B 5125

KRENÁCS TIBOR - GYÓGYSZERÉSZ

ESCHERICHIA COLI ELIMINÁCIÓJÁNAK TANULMÁNYOZÁSA MORFOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL KISÉRLETES PYELONEPHRITISBEN

ORVOSI-BIOLÓGIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

SZEGEDI ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM KÓRBONCTANI ÉS KÓRSZÖVETTANI INTÉZET

S Z E G E D

1985.

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 14

B5125
SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 14
SZEGEDI ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM KÉPZŐMŰVÉSZETI KÖNYVTÁRA SZEGED
E 2.467

TARTALOM

I. BEVEZETÉS 1

II. A KISÉRLETES PYELONEPHRITIS IRODALMÁNAK ÁTTEKINTÉSE.. 2

II.1. Az elváltozás modellezése 2

II.2. A gyulladásos alapjelenségek morfológiája 5

II.3. A vesegyulladás mechanizmusa és a szövetkárosodás okai 8

II.3.1. A phagocytasejtek szerepe a gyulladásban és a veseparenchyma pusztulásában 8

II.3.2. E. coli, ill. somatikus antigénjének kimutatása a gyulladás folyamán 12

II.3.3. E. coli antigénjei, valamint immunológiai tényezők szerepe a pyelonephritis pathogensisében..14

III. IMMUNHISZTOKÉMIA ÉS JELENTŐSÉGE A PYELONEPHRITIS TANULMÁNYOZÁSÁBAN 18

IV. CÉLKITŰZÉS 20

V. ANYAG ÉS MÓDSZER 22

V.1. Baktériumtenyésztés, antigén előállítás 22

V.2. Immunizálás 22

V.3. Immunglobulinok elválasztása 23

V.4. Veseszuszpenzió, aspecifikus immunglobulinok megkötése 24

V.5. Az immunsavó karakterizálása 24

V.5.1. Szerotipus kontroll 24

V.5.2. Dupla immundiffúzió 25

V.5.3. Indirekt haemagglutináció 25

V.5.4. Antigén-kimerítéses kontroll 26
V.6. Kisérletes modell 26
V.7. A rögzített anyag előkezelése és festése 27
V.7.1. Fénymikroszkópos vizsgálatok 27
V.7.2. Elektronmikroszkópos vizsgálatok 28
V.8. Fénymikroszkópos peroxidáz-antiperoxidáz /PAP/ technika 29
V.9. Savanyú-foszfatáz enzimhisztokémia 30
V.10. Immunelektronmikroszkópos kezelés 31
VI. EREDMÉNYEK 32
VI.1. Az immunsavó előállítása és jellemzése, valamint az immunhisztokémiai technikák beállítása 32
VI.2. E. coli pyelonepritis tanulmányozása 34
VI.2.1. Korai elváltozás 35
VI.2.2. Késői elváltozás 37
VI.3. Táblázatok és ábrák 40
VII. MEGBESZÉLÉS 42
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS 50
IX. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK ÉS ELŐADÁSOK A TÉMÁBAN 52
X. IRODALOM 54

A szövegben használt rövidítések:

PN = pyelonephritis

PMNG = polymorph-magvú neutrophil granulocyta

I. BEVEZETÉS

A vesebetegségek pathogenesisével foglalkozók figyelme sokáig elsősorban a glomerulusokra irányult (65). A vese fő tömegét kitevő interstitium és - a vele szoros kapcsolatban álló - tubuláris hám kóros elváltozásait csak az utóbbi időben kezdték intenziven tanulmányozni (1o4).

Az emberi élet során kialakuló fertőzések - a légzőszervrendszer után - leggyakrabban a húgyutakat betegítik meg(84). A húgyuti infekciók jelentős része a vesét érintve az interstitiumból kiinduló, másodlagosan a vesecsatorna különböző szakaszait és a vesemedencét is károsító gyulladásos elváltozásokat hoz létre (1o4). A pyelonephritisnek /PN/ nevezett kórképet az esetek 80-90 %-ában a vastagbél normál baktériumflórájában is megtalálható Gram-negatív baktériumok okozzák (38). A leggyakoribb Gram-negatív fertőző mikroorganizmus az E. coli - mintegy 80 %-ban -, melyet a Proteus, Klebsiella és az Enterobactaer követ (104). Egyéb enterális eredetű baktériumok közül a Streptococcus faecalis, valamint Staphylococcus fajok, ill. ritkán gombák - leginkább Candida - is szerepelhetnek a PN kiváltásában (84).

A human bakteriális eredetű tubulointerstitiális gyulladáshoz hasonló elváltozások számos állatfajban mesterségesen is előidézhetők (51).

A kisérletes PN morfológiai vizsgálatával foglalkozó kutatók kezdetben a gyulladás kialakulásának körülményeit (37), az alapelváltozások makroszkópos és mikroszkópos jellemzőit (61) és a kórokozók vesében való elszaporodásának és vizeletben való megjelenésének folyamatát (92) tanulmányozták.

A SZOTE Kórbonctani Intézetében több évtizede folyik human és kisérletes vesepathológiai munka. Közel húsz éve számoltak be az E. coli-val haematogen úton patkányban létrehozott PN fénymikroszkópos és bakteriológiai megfigyeléséről (76).

A morfológia és az immunológia módszereinek fejlődése, - elsősorban az elektronmikroszkópia elterjedése, az immunhisztokémia megjelenése, valamint a receptor-kutatások és a kóréletlani szemlélet egyre nagyobb térhódítása - a kórfolyamat elemzésének újabb lehetőségeit kinálják (17,49,94,1o2).

Az utóbbi években intézetünkben is korszerűbb módszerekkel tanulmányozzuk a PN morfológiai jelenségeit. A közelmúltban megjelent közlemények a kisérletes vesegyulladás transzmissziós és pásztázó elektronmikroszkóppal megfigyelhető tubuláris elváltozásairól számolnak be (42,43,44).

Az immunhisztokémiai módszerek szenzitivitásának ugrásszerű fokozódásával (23), az antigén-antitest kötődés fajlagosságában rejlő lehetőségeket igyekeztünk kihasználni újabb vizsgálatainkban. Érzékeny fénymikroszkópos peroxidáz-antiperoxidáz /PAP/ módszerrel, ultrastrukturális immunhisztokémia segítségével, valamint hagyományos fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal tanulmányoztuk a PN-t kiváltó kórokozó lokalizációját, ill. fali antigénjének eliminációját. Doktori munkám az e témában tett megfigyeléseink összegzése.

II. A KISÉRLETES PYELONEPHRITIS IRODALMÁNAK ÁTTEKINTÉSE:

II.1. Az elváltozás modellezése

A kutatók a kisérletek döntő többségét a human gyakoriságnak megfelelően E. coli-valvégezték (51),

de más baktériumok, mint Proteus mirabilis (15), Klebsiella pneumoniae (93), Pseudomonas aeruginosa (31), valamint Enterococcus (35) által kiváltott PN morfológiai tulajdonságait is vizsgálták.

Legtöbben - az egyszerű vesepapillával rendelkező - patkányt (51), egeret (1o3), nyulat (2o), néhányan tengerimalacot (26), mások - az emberihez hasonlóan multipapilláris veséjű - macskát (82), sertést (1o4), valamint majmot (28) használtak kisérleteikben.

Human viszonyok között a fertőzés leggyakrabban a húgyhólyagból az ureteren keresztül jut a vesébe, azonban ilyen esetekben is számolni kell bizonyos mértékű haematogén baktérium recirkulációval (27). Súlyos reflux esetén az E. coli baktériumok egyrésze keresztüljut a vesemedence hámján és a vérerek közvetítésével éri el a vesét.

Habár PN minden egyéb bevatkozás nélkül előidézhető intravenásan (32), retrograd úton (58), vagy közvetlenül a vesébe beadott mikroorganizmusokkal (69), a kórokozó könnyebben megtelepszik a vesében, ha előzetesen ureter-lekötéssel létrehozott vizeletpangással (34), vagy vesemasszázzsal (8) a szervet károsítjuk. Előbbi az emberi PN kialakulását jobban megközelíti (84).

Függetlenül attól, hogy a fertőző mikroorganizmus retrograd vagy haematogen úton éri el a vesét, az alapelváltozások morfológiai megjelenése azonos (17).

Normális körülmények között az egészséges vese igen rezisztens haematogen eredetű kórokozókkal szemben, ami különösen érvényes az E. coli-ra. Kisérletesen minden tízezer baktériumból, mindössze egy képes megtelepedni az ép vesében,

amit azonban a szerv antibakteriális mechanizmusai könnyen kiküszöbölnek (84). A baktérium fertőző képességét egyrészt a befogadó szervezet fogékonysága határozza meg, melyet bizonyos hajlamosító tényezők befolyásolnak. Azok a faktorok, melyek potenciálisan képesek intrarenális hydronephrosist okozni, elősegítik a PN kialakulását (92). Az obstructiv uropathia a leggyakoribb elváltozás, mely lehetővé teszi Gram-negatív baktériumok megtelepedését és elszaporodását a vesében (34, 39). A veseszövetben elektromos égetéssel létrehozott (89), vagy Staphylococcus fertőzést követően kialakult hegesedés (21), vesemasszázs következtében fellépő interstitiális oedema (8), K^+ ion depletio (114), heveny és krónikus vérnyomás emelkedés (48, 113), valamint az arteria renalis lekötése (76), mind-mind növelik a vese fogékonyságát a kórokozókkal szemben. A jelenség pontos kórélettani magyarázata nem ismert.

A PN kialakulási gyakorisága és az elváltozás mértéke nagyban függ a fertőző baktériumtörzs pathogen tulajdonságaitól: a törzs virulenciájától (61), inváziós és adhéziós képességétől (1o3), esetleges enterotoxin termelésétől; valamint az alkalmazott ureterlekötés, vagy leszorítás időtartamától (1o).

Pilus nélküli és pilusokkal rendelkező E. coli törzsek eltérő kinetikával váltanak ki ureterlekötéssel kombinált ascendáló PN-t (1o3).

Az E. coli specifikus, azaz az uroepithelium glukolipid receptoraihoz való tapadása a pilusok /fimbriák/ felszinén elhelyezkedő lectinszerű anyagokhoz kötött (49).

A specifikus ligand-receptor kapcsolódásnak két formája mutatható ki: az egyik D-mannózzal, ill. szintetikus mannóz-származékkal gátolható (3, 100), a másikért mannóz-rezisztens receptorok felelősek (1o6). Az uroepithel mannóz-rezisztens receptorának aktív kötőcsoportja a human P-vércsoport-rendszerű vér glukoszfingolipid antigénjein is megtalálható (36). Ezért a mannóz-rezisztens haemagglutinációra képes baktériumok fimbriáit P-fimbriáknak nevezik (49), mely organellumok PN-ben betöltött virulencia-faktor szerepe mind human viszonyok között (60), mind kisérletes modellen (55,95) igazolódott. A felső húgyuti E. coli fertőzések másik fontos virulencia tényezője, a baktériumok felszinét borító savanyú poliszacharid K antigén (96), mellyel szinte minden human pyelonephritogen törzs is jelentős mennyiségben rendelkezik (54).

II.2. A gyulladásos alapjelenségek morfológiája

Kisérletes PN-ben a gyulladásos jelenségek meghatározott sorrendben és módon követik egymást, eltérések elsősorban csak az elváltozások lokalizációjában és mértékében lehetnek aszerint, hogy milyen állatfajon, milyen mikroorganizmussal és milyen körülmények között történik a kórfolyamat modellezése.

Proteus mirabilis súlyosabb és hosszabb ideig tartó elhalása károsodásokat okoz patkányvesében, - gyakran kőképződés kíséretében - mint az E. coli (8, 15).

Haematogen Staphylococcus vese fertőzésben a gyulladásos reakció eltérő irányban terjed patkány és tengerimalac veséjében (26).

Haematogén úton E. coli-val előidézett PN-ben általában erőteljesebb elváltozások jönnek létre veseszerte, mint ascendáló fertőzésben, mely utóbbi elsősorban csak a vesemedencét, és a veseparenchyma hilus-környéki területeit érinti (37).

A retrográd módon, a vizeletelfolyás folyamatos akadályozása mellett előidézett krónikus PN-t, minden esetben maradandó szövetkárosodást okozó heveny fázis előzi meg. Azonban az E. coli által ílymódon kiváltott, krónikusnak tartott vesegyulladásban, a hegesedés súlyosbodása a baktériumok állandó jelenléte ellenére sem észlelhető (16). Kétnapos egyoldali ureterlekötés alatt a patkány keringésébe juttatott E. coli gennyes gyulladást okoz az állat veséjében (43). A gátolt vizeletlefolyás miatt már a fertőzést követő második órában hyperaemia jelentkezik a veseerekben (76). Négy óra elteltével megkezdődik a polymorph-magvú neutrophil granulocyták felszaporodása és endothelhez való tapadása a peritubuláris capillarisokban. Nyolc óra után a marginálódott lobsejtek kivándorlása indul meg az erek falának endothelsejtjei között az alapi hártyán keresztül az interstitiumba(43). Morfológiailag ez tekinthető a gyulladás kiindulási fázisának (76). Két nappal a fertőzés után a megnagyobbodott vese állományában elszórtan tályogok láthatók, körülöttük az interstitiumban lobsejtek szaporodnak fel (92).

Elektronmikroszkóppal a gennyes beolvadások környezetében néhol a capillarisfalak és a tubularis alapi hártya elszakadása, valamint fibrinkiválás is megfigyelhető (43). A tubuláris basal membrán károsodásának helyén a csatornahámsejtek elhalnak, az így létrejött réseken keresztül az interstitium és a csatorna-lumen gyulladásos sejtjeit „lobsejtes híd" köti össze (43). A 6. napra a PMNG-k zöme a tubulusok sérülésein keresztül a lumenbe jutva elhagyja az interstitiumot (44). A tubulusok űrterébe jutott gennysejtek a vizeletben is megjelennek. A heveny lobsejtek a vesemedence falában is gyulladásos gócokat hozhatnak létre. 7-10 napos állatokban a tályogok helyén macrophagokat tartalmazó sarjszövet kezd kialakulni (43). A fertőzés 24. órájától egyre erőteljesebb, a 4. napra stasisig fokozódó vérbőség, a 7. naptól fokozatosan csökken (42). Hathéttel a fertőzést követően a gennyes beolvadások helyén fibroblastokból, capillarisokból, macrophagokból, lymphocytákból és durva collagenrostokból álló sarj szövet képződik (42). A glomerulusokat a gyulladásos folyamatok nem érintik, csupán az erősen heges területeken figyelhető meg a Bowman-tok megvastagodása (43).

Normális körülmények között a vesekéregnek a velőnél gazdagabb vérellátása, ugyanakkor fertőzésekkel szembeni erősebb rezisztenciája indokolhatja azt, hogy a haematogén PN kezdeti elváltozásai mind a kéreg, mind a velő, mind a vesemedence perivasculáris területeiről kiindulhatnak (76). Az ureteren keresztül a vesébe jutó, ott megtelepedő és elszaporodó E. coli a fent részletezetthez hasonló gyulladásos reakciót indít el (16).

II.3. A vesegyulladás mechanizmusa és a szövetkárosodás okai

II.3.1. A phagocytasejtek szerepe a gyulladásban és a veseparenchyma pusztulásában

Kísérletes PN-ben a veseerekben, majd a vese interstitiumában felszaporodó baktériumok helyi gyulladást okoznak (44). A gyulladás az állat szervezetének védekező reakciója a számára idegen anyaggal szemben, melynek elsődleges célja a gyulladást kiváltó mikroorganizmus hatástalanítása és kiküszöbölése, majd a szöveti szerkezet helyreállítása, ill. pótlása (84). A helyi gyulladásos jelenségek a vérerekkel ellátott kötőszövetben kémiai mediátorok közvetítésével és különböző sejtek részvételével zajlanak.

A kísérleti állat keringésébe juttatott E. coli-ból alacsony molekulasúlyú lipoproteinek szabadulnak fel (lol,lo5), melyek kemotaktikus hatást gyakorolnak a keringő PMNG-kre és monocytákra és a komplement-rendszert alternatív úton aktiválják (47). Az oldható bakteriális faktorok és az opsonizált - C3b-vel, vagy immunglobulinokkal fedett - baktériumok a phagocytasejtek - PMNG-k, valamint monocyták és macrophagok - sejtfelszíni receptoraihoz kötődnek és metabolikus átalakulásokat indítanak el (59,lo9). A folyamat eredményeként a sejtek aktivált állapotba kerülnek, bennük emelkedik a különböző hidrolázok és reaktív oxigén származékok szintje, így fokozott mértékben képessé válnak a baktériumok bekebelezésére és elpusztítására (84).

Az aktiválódás biokémiai folyamatait specifikus ultrastruktúrális változások jelzik, melyek bizonyos sejtorganellumok - elsősorban lysosomák - átalakulásában és számának növekedésében nyilvánulnak meg (1o7). A phagocytasejt felszíni receptorain kötődő E. coli-t a sejt nyúlványok kibocsátásával fokozatosan körülöleli, majd a baktérium fölött a sejthártya egyesül (72). A kórokozót így membrán-határolt phagocyta-vacuolum ún. „phagosoma" szállítja a sejtben, ami enzimtartalmú lysosomával ún. „phagolysosomává" egyesül.
A phagocytasejt lysosomái olyan enzimeket - neutrális proteázokat, lysozymet, lactoferrint, savanyú hidrolázokat - és reaktív oxigénszármazékokat - hidrogénperioxidot, szuperoxidokat, szabad oxigén és hidroxil gyököket - tartalmaznak, melyek a baktérium sejtfalát támadva azt elpusztítják (84). A fertőzéssel szembeni védekezés első vonalához tartozó PMNG-k leghatékonyabb baktericid rendszere a hidrogénperoxid-myeloperoxidáz-haloid rendszer, ami a monocyta-sor elemeiből hiányzik (1o9). Savas közegben, hidrogénperoxid és haloid ion / Cl^-, Br^-, I^-,/ jelenlétében, myeloperoxidáz enzim hatására a neutrophil sejtek lysosomáiban hypohaloidsav képződik (24). A hypohaloidsav könnyen bomlik, s belőle nascens oxigén szabadul fel, ami igen erős oxidálószer, így baktericid hatású (1o8).

A bekebelezés során a phagocyta-vacuolumok pH-ja rövid időn belül pH 4-5 közé süllyed, ami a lysosomális hidrolázok pH optimuma, kedvező a hidrogénperoxid-peroxidáz rendszer működéséhez és a nem saválló baktériumokat közvetlenül elpusztítja (45).

Az elpusztult mikroorganizmusok anyagát ugyancsak lysosomális hidrolázok bontják le (29). Az érpályán belül megkezdődött phagocytosissal párhuzamosan, az aktivált neutrophilekből felszabaduló enzimek (91), a monocyta-sor elemeire kemotaktikus hatású kationos fehérjék (84), az aktiválódott komplement-rendszer egyes elemei - elsősorban a C3a, C3b és C5a -(84); valamint a monocytákból és macrophagokból felszabaduló, a phagocytasejtek szaparodását serkentő faktorok (59) hatására fokozódik az érfalak permeabilitása és a heveny lobsejtek felszaporodása a gyulladás helyén (56). A prostaglandinok tovább erősítik a permeabilitási faktorok hatását (41). Egyre több leukocyta vándorol az interstitiumba, ugyanakkor a folyadék kiáramlás is fokozódik és egyre nagyobb molekulasúlyú fehérjék - köztük fibrinogén is - kijutnak az erekből(43). A gyulladásos mediátorok és a felszabaduló enzimek hatására irreverzibilis capillarisfal károsodás is létrejöhet, ami súlyosbítja a veseparenchyma gyulladásos infiltrációját (44). Az acut gyulladásos jelenségek lezajlása után felszaporodó macrophagok olyan faktorokat is kiválasztanak, melyek serkentik a fibroblastok növekedését és az érképzést (59), így a pusztuló szövet pótlásában is jelentős szerepet játszanak.

A phagocytasejtek azonban nemcsak endocytosissal képesek a baktériumokat elpusztítani és lebontani, hanem exocytosis révén belőlük enzimek és reaktív oxigén származékok is felszabadulnak, melyek a kórokozókon kívül, a környező szöveteket is károsítják (lo8).

Az acut gyulladásos sejtek és a tubuláris hám integritását antioxidáns enzimrendszer védi / szuperoxid-diszmutáz, kataláz / (24). A gyulladásos gócban felszabadult enzimek szövetkárosító hatását szérum antiproteázok, / -1-antitripszin, -1- antichymo-tripszin, -2-macroglobulin, / próbálják semlegesíteni (46).

Mesterségesen előidézett PN-ben a PMNG infiltráció és a szövetkárosodás szoros kapcsolatát kisérletekkel is sikerült igazolni.

Sullivan és munkatársai E. coli-val haematogen úton patkányban kiváltott PN-ben a hegesedéssel járó veseparenchyma pusztulás okait keresve, a komplement-rendszer szerepét vizsgálták a gyulladás korai fázisában (99). Specifikus C3 inaktivátor kobraméreggel gátolták a komplement eredetű kemotaktikus faktorok képződését. A fertőzés után 2 nappal a kezelt állatok veséjében - a kontrollhoz képest - a fokozódott baktériumszaporulat ellenére, a csökkent PMNG infiltráció következtében mérséklődött a veseszövet károsodása.

Shimamura hasonló kisérletes modellen mustárnitrogénnel előidézett leukocyta-depletio és a szövetkárosodás kapcsolatát tanulmányozta fény- és elektronmikroszkóppal (94). Megállapította, hogy a leukocyta-hiányos állatok veséjének szerkezete a fertőzést követő 30. óráig jelentéktelen kóros elváltozást mutat. 40 óra elteltével azonban a gátolt leukocyta infiltráció ellenére is kialakulnak degeneratív jelenségek a tubuláris hámban. Ez a tény felhívja a figyelmet arra, hogy a baktériumoknak, vagy egyéb faktoroknak is szerepük lehet a veseparenchyma pusztulásában.

Bille és Glauser kisérletükben a leukocyták mozgását, kemotaktikus aktivitását és lysosomális degranulációját gátló colchicinnel a veseszövet súlyos hegesedését ki tudták védeni retrograd E. coli PN-ben (6). Roberts és munkatársai, a gyulladásos sejtekből felszaporodó szuperoxidok szövetkárosító hatását szuperoxid-diszmutáz enzimmel tudták mérsékelni (88). Ugyanakkor Glauser kisérletében (3o) a prostaglandinszintézist gátló indometacin nem csökkentette szignifikánsan az ún. „exudatív PN" kialakulásának gyakoriságát.

II.3.2. E. coli, ill. somatikus antigénjének kimutatása a gyulladás folyamán

A baktériumok vesenyulladásban játszott kóroki szerepének tisztázásához szükséges a morfológiailag ép mikroorganizmusok, vagy lebomlási termékeik veseszövetben való elhelyezkedésének tanulmányozása. A fertőzött állat vesehomogenizátumából és vizeletéből kitenyésztett baktériumok mennyisége a gyulladás különböző fázisaiban megfelelő felvilágosítást ad a kórokozók veseinvéziójának és elszaporodásának kinetikájáról (76), valamint a bakteriuria mértékéről (92).

Míg a kórfolyamat kezdetén a gyulladt veseszövetben a baktériumok hagyományos festési eljárásokkal és elektronmikroszkóppal azonosíthatók (1o2), lebomlási termékeik elhelyezkedése csupán immunhisztokémiai módszerrel követhető (17). Kisérletesen előidézett haematogen E. coli Pn-ben a baktériumok már az első óra után nagy számban tenyésznek ki az állat veséjéből (92). Ekkor immunfluoreszcenciával a peritubuláris és glomeruláris veseerekben mutathatók ki.

A fertőzés a 2. óra után fokozatosan terjed a peritubuláris interstitiumba, azonban a glomerulusok extravasculáris terét még később sem érinti. Nyilvánvaló leukocyta infiltráció ebben a stádiumban még nem észlelhető és az állat vizelete is steril. Az interstitiumba jutott mikroorganizmusn , erőteljesen szaporodni kezdenek (44). A fertőzés 4. órájától a vizeletből is kitenyészthetők. A veseszövetből történő baktériumtenyésztés eredményei fokozatos emelkedés után, a 48. óra körül érik el maximális értéküket (76, 92), majd egyenletes csökkenést mutatnak. A heveny gyulladás kezdeti fázisában, épnek látszó baktériumok és amorf, immunhisztokémiailag bakteriálisnak bizonyult törmelék mutatható ki az interstitium gennyes területein és a szomszédos tubulusok lumenében (17). 3-4 héttel a haematogén fertőzést követően az állat vizelete fokozatosan sterillé válik, majd 4 hét után már veseszövetéből sem tenyészik ki kórokozó (92). Ezzel szemben akadályozott vizeletlefolyás mellett kiváltott retrograd E. coli PN-ban az állatok 100 nappal a fertőzés után is bakteriuriások(16). Immunhisztokémiai módszerrel a vese sterillé válását követően is kimutatható bakteriális antigén (17).

Kísérletes E. coli PN korai fázisát követően megjelenő macrophagok egyrésze erős PAS pozitív festődést mutat (1o2). PAS pozitív interstitiális sejtek hónapokig kimutathatók a PN-es hegszövetben (17). 7 nappal a fertőzés után a macrophagok phagolysosomáiban elektronmikroszkóppal még felismerhető baktériumok vannak (1o2). Később a fénykiroszkóppal PAS pozitívnak megfelelő sejtek cytoplasmájában ultrastrukturálisan ún. „myelin-figurákat"és amorf granuláris anyagot lehet kimutatni. Tan és Heptinstall,valamint Cotran vizsgálatai szerint

a PN folyamán a „cytosomatartalom" átalakulása myelin-figurákból amorf anyaggá, párhuzamot mutat a PAS pozitivitás elvesztésével (17,1o2). Mivel a PAS pozitív sejtek megjelenésük kezdetén azonosítható baktériumokat tartalmaznak, feltételezik, hogy a későbbi fázisban kialakuló myelin-figurák, majd amorf elektrondenz intracytoplasmatikus anyagok a kórokozó lebomlási termékeit is magukban foglalják. PAS pozitív interstitiális sejtek más mikroorganizmusok által kiváltott PN késői fázisában is megfigyelhetők, azonban human PN-ben megjelenésük nem jellemző (17).

A bakteriális antigén kimutatásának human viszonyok között diagnosztikus jelentősége van, mivel számos steril vese mutat a PN-re utaló morfológiai jeleket (1). Az antigén jelenlétének igazolása a potenciálisan szóbajövő baktériumtörzsek nagy száma miatt nehézségekbe ütközik. Kunin olyan antigént izolált, mely számos Enterobacteriaceae családba tartozó faj egyedeiben jelen van (57). Aoki és munkatársai ilyen közös antigén ellen előállított immunsavó segítségével számos ún. „abakteriális" idült PN bakteriális eredetét tudták igazolni (2).

II.3.3. E. coli antigénjei, valamint immunológiai tényezők szerepe a PN pathogenesisében

A baktériumok, ill. endotoxinjuk közvetlen szövetkárosító hatása nem jelentős, mivel a PMNG infiltráció mértékének mesterséges csökkentésekor, a baktériumszám nyilvánvaló emelkedése mellett is mérsékeltebb szövetpusztulás jelentkezik (94, 99).

A bakteriális endotoxin lipid-A komponense elsősorban közvetve, a gyulladásos reakció kiváltásával játszik szerepet a szövetkárosodásban (83).

A szervezet helyi gyulladásos válaszának mértéke szempontjából, a fertőzés első 4 napján, a baktériumok elszaporodásának gyorsasága és az összbaktériumszám döntő jelentőségű (69). Antibakteriális szerek ezen időszakon belül jelentősen képesek csökkenteni a kóros szövettani elváltozásokat. Ampicillin, Carbenicillin, Nitrofurantoin, Cephalotin, Thiamphenicol a PN korai fázisában a veseszövet megóvása tekintetében nemcsak a baktériumszám csúcsát megelőző időben, hanem azt követően is hatékony. Antibiotikumkezelés következtében a mikroorganizmusok száma jelentősen csökken, ami a lobsejtinfiltrációt, s így a következményes szövetpusztulást is mérsékli. Ha az első 4 napon a gennyes elváltozások már kialakultak, a vese bakteriológiai statusának gyógyszeres megváltoztatása már nem befolyásolja a károsodás mértékét.

Mikroorganizmus-fertőzés hatására enyhefokú szerzett rezisztencia alakul ki a kisérleti állat szervezetében egyes heterológ pirogénekkel, ill. homológ endotoxinnal végzett ismételt inokulációt követően (4o, 64). A rezisztencia egyik faktora nem tipus-specifikus és rövid ideig tart, másik tényezője a klasszikus, antigének hatására termelődő antitestekhez kötött specifikus humorális védekezés (93). Kisérleti körülmények között az O-, a K- valamint a pilus-antigénekkel szemben termelt antitestek, megfelelő dózisban hatékonyak mind ascendáló, mind haematogén E. coli vesefertőzéssel szemben (52, 95,1o4). A baktériumok uroepithelhez tapadásának

megakadályozásában fontos szerepet tulajdonítanak a pilus antigénjei ellen termelődő secretoros IgA-nak (9o).

Kisérletes E. coli PN-ben a kórokozó somatikus antigénja gyors és erőteljes antitesttermelést indít el, melynek során mindhárom fő immunglobulin osztályba /IgG, IgA, IgM/ tartozó ellenanyagok képződnek (66,96). A nyilvánvaló humorális védekezés ellenére a baktériumok nagymértékben képesek elszaporodni a vesében (66) és haematogen infekció esetében néhány hétig (17), retrograd fertőzést követően hónapokig jelen lehetnek az állat vizeletében (16). A kevésbé hatékony humorális védekezés következhet abból a tényből, hogy a kórokozó egyik jelentős virulenciafaktora a K-antigén, sokkal jelentéktelenebb általános és helyi antitesttermelést vált ki, - ahol IgA helyileg nem képződik - mint az O-antigén (96). A K-antigén immunogenitása carrierproteinnel történő konjugálással fokozható (52). A PN korai fázisában a nem megfelelő immunológiai védekezés oka az ineffektív humorális tényezők mellett, a sejtközvetített immunválasz csökkent aktivitása lehet (7o,112).
A lép T-lymphocytáinak mitogénekkel szembeni válaszképessége már a fertőzés után 2 órával jelentősen csökken (5). Az aktivitáscsökkenés maximuma az inokulációt követő 48-72.órában jelentkezik (6o), ami egybeesik a baktériumok gyors elszaporodásával a vesében (92). A nagydózisú antigen okozta gátolt T-sejt aktivitásért (5), egy a lépsejtek közül sejtszeparálással izolálható supressor-sejt populáció felelős (67). A supressor-sejtek eltávolításával a lép lymphociáinak normális válaszképessége megőrízhető (7o).

A veseszövet in vitro komplement inaktiváló hatásának in vivo körülmények között feltehetően nincs szerepe a fertőzéssel szembeni fokozott fogékonyságban (66). A komplement-inaktivált állatokkal végzett PN-es kisérletek rávilágítottak a komplement-rendszer fontos szerepére a kórokozókkal szembeni védekezésben (52,99). A Gram-negatív baktériumok egyik leghatékonyabb eliminációs lehetősége az antitestek által segített phagocitosis sem képes meggátolni a kórokozók elszaporodását a betegség kezdetén (66). Valószínű, hogy a szervezet a masszív, de a fertőzés elterjedésének megakadályozásához nem elegendő mértékű PMNG infiltrációval a leukocytákból felszabaduló erőteljes kémiai aktivitású faktorok által közvetített szövetpusztulást igyekszik mérsékelni (66).
A gátolt T-lymphocyta-funkció miatt a lymphokinek szintje alacsony, ami késlelteti és korlátozza a macrophagok aktiválódását, így a gyulladás késői fázisában is csökken a sejtes válasz hatékonysága (59).

A PN immunológiai vizsgálata kapcsán néhányan felhívták a figyelmet a humorális immunitás aetiológiai szerepére az idült PN pathogenesisében, autoimmun folyamatot feltételezve a vesekárosodás hátterében (62). Veseszövet ellenes antitesteket azonban PN-es esetekben nem tudtak kimutatni (5o).

III. IMMUNHISZTOKÉMIA ÉS JELENTŐSÉGE A PYELONEPHRITIS TANULMÁNYOZÁSÁBAN

Az immunhisztokémia a fajlagos antigén-antitest kötődés révén, jelölt antitestek segítségével, antigéntulajdonságokkal rendelkező, vagy antigénné alakítható anyagok szövettani kimutatását teszi lehetővé, a biokémiai eljárásoknál érzékenyebb módon(78).

Coons 1941-ben elsőként fluoreszkáló festékkel jelölt antitesteket alkalmazott antigének kimutatására (13). Az eljárás azonban csak az ötvenes években terjedt el, azután, hogy felfedezője részletes tanulmányokban foglalkozott a festék-antitest konjugálás és a nemkívánt háttérreakció keletkezésének körülményeivel (14). Az immunfluoreszcens módszer később a PN tanulmányozásában is helyet kapott (15, 16, 17, 92).
Élő baktériummal /16), ill. a kórokozó alkoholos-acetonos kivonatával szemben (92) termelt, flureszcein-izotiocianáttal kapcsolt immunglobulinok, a baktériumokat és lebomlási termékeit jelölni tudták szövettani metszeteken.

Az immunfluoreszcens módszer, melyet egyszerű és gyors alkalmazhatósága miatt, ma is sokhelyen rutinszerűen használnak – azonban számos előnytelen tulajdonsággal rendelkezik. Legfontosabb ezek közül a háttér szöveti szerkezetének gyenge felismerhetősége, a fluoreszcencia intenzitásának gyors csökkenése, valamint a kezelt metszetek rövid altarthatósága, ami miatt retrospectiv vizsgálatok nem lehetségesek (78). Az említett hátrányokat Nakane és Pierce a peroxidáz enzim, jelzőanyagként való bevezetésével küszöbölték ki (74).Előhíváskor, a metszeteken lokalizálódó antigénhez a specifikus antitesten keresztül kötődő enzim, hidrogénperoxid jelenlétében, a rendszerhez adott

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED

diaminobenzidin /DAB/ festéket barna csapadékká polimerálja (97). A rekaciótermék és a szöveti szerkezet fénymikroszkóppal jól tanulmányozható, kombinált felülfestési eljárások alkalmazhatók és a reakció intenzitása is szinte korlátlan ideig változatlan marad.

A legutóbbi évtizedben az immunhisztokémiai eljárások módszertana rohamosan fejlődött. Az antigén-antitest, ill. hapten-antitest kötések szelektivitását kihasználva számtalan immunológiai lánc építhető fel (23), melyek végén a peroxidázon kívül más enzimek is szerepelhetnek (78), jelezve a keresett antigén szöveti elhelyezkedését.

Az egy-egy antigén-determinánssal szemben termelt monoclonális ellenanyagok (71) alkalmazásával az immunhisztokémiai reakciók fajlagossága, a többlépcsős technikákkal, ill. az immunlánc végén a jelölő enzimek számának növelésével a reakciók érzékenysége nagyságrendekkel növelhető (23).

Az egyik legérzékenyebb többlépcsős, ma már Magyarországon is viszonylag könnyen elérhető módszer, a Sternberger által 1970-ben kifejlesztett peroxidáz-antiperoxidáz /PAP/ technika (98). Az eljárás lényege, hogy egyazon állatfajból származó, - az antigénhez specifikusan kötődő - ún. első antitestet és a jelző enzimet hordozó peroxidáz-antiperoxidáz /PAP/ - komlexet, ezen állatfaj immunglobulinjaival szemben más fajban előállított immunglobulinokkal kapcsoljuk össze / 1. ábra /.

A PAP-komplex egyenként három peroxidáz molekulát tartalmaz, ami a kis mennyiségben jelenlevő szöveti antigének kimutathatóságát elősegíti (97).

Napjainkban az immunhisztokémia fejlettsége az interacelluláris antigének ultrastrukturális elhelyezkedésének tanulmányozását is lehetővé teszi. A Faulk és Taylor immunkollid módszere (25) nyomán kidolgozott, markerként különböző méretű elektrondenz kolloid aranyszemcsékkel jelölt antitesteket felhasználó eljárások, a leggyakoribbak az elektronmikroszkópos immunhisztokémiai gyakorlatban (79).

Az érzékeny PAP technika a DAB elektrondenzitása következtében ugyancsak alkalmazható ultrastrukturális vizsgálatokban, de a módszer hátránya, hogy a kezelt vékony metszetek nem kontrasztozhatók (97).

Az immunhisztokémia olyan összetett szerves anyagok detektálását biztosítja - meghatározott szöveti strukturákhoz kötötten -, melyek jelenléte diagnosztikus információt nyújt, vagy segíti a kórfolyamatok pathogenesisének megértését (78).

IV. CÉLKITŰZÉS

Az E. coli-val kísérletesen előidézett PN alapjelenségeivel foglalkozó tanulmányok a téma megközelítését illetően igen sokszínűek. Tárgyalják elsősorban a pyelonephritogen baktériumok és az uroepithel-sejtek közötti ligand-receptor kapcsolat jelentőségét (86), a kórokozók vesében való elszaparodásának körülményeit (76), a gyulladásos sejtek szöveti infiltrációjának kinetikáját (44), immunológiai tényezők szerepét a fertőzéssel szembeni védekezésben (66), a szövetkárásodás és pótlódás mechanizmusát, morfológiai jellemzőit (43), valamint a szövetdestrukció okainak gyógyszeres befolyásolási lehetőségeit (68).

A baktériumok és lebomlási termékeik eliminációja szempontjából azonban eddig csupán néhány kutatócsoport tett megfigyeléseket (17, 92). Eredményeik immunfluoreszcens módszer alkalmazásán alapulnak, melynek legfőbb hiányossága, hogy a fluoreszkáló reakciótermék környezete a sötét háttér miatt nem tanulmányozható. Így a bakteriális eredetű antigének - melyek ugyancsak fontos szerepet játszhatnak a gyulladásos folyamatban - lokalizációjának részletei nem figyelhetők meg. Ezért a PN jelenségeit vizsgálva célszerűnek látszott a baktérium somatikus antigénjének nyomonkövetésére érzékeny, közvetlen szövettani tanulmányozásra alkalmas eredményt nyújtó fénymikroszkópos PAP módszer és ultrastrukturális megfigyeléseket biztosító immunhisztokémiai eljárás kidolgozása.

A doktori munka célitűzései:

- A pyelonephritogen O1:K1:H7:F11 antigénszerkezetű E. coli törzs somatikus antigénjével szemben immunsavó előállítása nyúlban.
- Az immunsavó tisztítása és karakterizálása.
- A tisztított immunsavóval fénymikroszkópos PAP technika és elektronmikroszkópos szintű immunhisztokémiai módszer beállítása.
- A fenti módszerek segítségével az E. coli baktérium, ill. somatikus antigénje elhelyezkedésének nyomonkövetése a vesében az idő függvényében.
- A lobsejtek és vesetubulosok vizsgálata a kórokozók eliminálásában betöltött szerepüket illetően.
- A vesetubulusok lysosomális aktivitásának tanulmányozása enzimhisztokémiai módszerrel.
- A gyulladás késői fázisában megjelenő PAS pozitív macrophagok és a baktériális lebomlási termékek kapcsolatának vizsgálata.

V. ANYAG ÉS MÓDSZER

V.1. Baktériumtenyésztés, antigén előállítás

A kísérlethez O1:K1:H7:F11 /dr Czirók Évától - Országos Közegészségügyi Intézet - kapott / antigénszerkezetű, human erythrocyták mannóz-rezisztens haemagglutinációjára képes adheziv fimbriákkal rendelkező E. coli törzset használtunk (18). A tenyésztést 1 g Bacto-peptonból, 10 g Lab-Lemco húsextraktumból, 5 g nátriumkloridból és 1000 ml desztilált vízből álló levesben 37°C-on 24 óráig végeztük. A levest felhasználás előtt 120°C-on 30 percig autoklávoztuk. A baktériumtenyészetet centrifugálás után, fiziológiás sóoldattal kétszer mostuk és újra centrifugáltuk. Az O-antigént maszkírozó flagelláris H; valamint felszíni K-antigének inaktiválásának céljából az azonos térfogatú fiz. sóoldatban felvett üledéket 2 órán át 100°C-os vízfürdőn tartottuk (19).

A centrifugálást követően a baktériumszuszpenziót 96 %-os etanollal 37°C-on 4 órán át inkubáltuk. Végül a hőstabil, főként O-antigéneket tartalmazó üledéket (111) acetonnal újra centrifugáltuk, majd mostuk és szobahőn beszárítottuk.

V.2. Immunizálás

Az immunsavót 2,5-3 kg-os új-zélandi albino nyulakból nyertük. Az antigént 1 ml fiz. sóoldatban intravénásan, vagy ezt 1 ml komplett Freund-adjuvánssal 1 : 1 arányban emulgeálva, az állatok hátbőre alá adtuk / I. táblázat/ (12).

Az immunizálás folyamán tájékozódó ellenanyagtiter meghatározást végeztünk tárgylemezen direkt agglutinációs módszerrel. A levett vér centrifugált szérumából kétszeres sorozathígításokat készítettünk. Minden egyes hígítás tárgylemezre felcseppentett 2 cseppjéhez, 2 csepp fiz. sóoldattal ötszázszorosra hígított hővel elölt baktériumszuszpenziót adtunk. A makroszkópos agglutinációt lupenagyítással vizsgáltuk.

Intravénás emlékeztető oltások után az állatokat elvérezztettük. A szérum ellenanyagtiterét az előbbiek szerint mértük.

V.3. Immunglobulinok /Ig/ elválasztása

A levett vért szobahőn 4 órán át alvadni hagytuk, majd az elkülönített savót Janetzky /32c centrifugával 3000-es fordulaton 10 percig centrifugáltuk. A komplementet 56°C-on 30 percig inaktiváltuk. 7 ml szérumot 6,5 ml telített ammóniumszulfát oldattal / $(NH_4)_2SO_4$- oldat/ szobahőn 1 órán át inkubáltuk, ezt követően 4500-as forulattal 30 percig ülepítettük. Az üledéket 6,5 ml 0,15 M-os pH 7,2-es sós-foszfát pufferrel /PBS/: NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na_2HPO_4 8 mM, NaH_2PO_4 2 mM/ és 3,5 ml /$(NH_4)_2SO_4$- oldattal az előbbi módon inkubáltuk és centrifugáltuk. A nyert üledéket 2 ml PBS-ben vettük fel, majd féligáteresztő hártyán 2o°C-on PBS-el szemben 48 órán át dializáltuk.

V.4. Veseszuszpenzió, aspecifikus Ig megkötés

A nemspecifikus ellenanyagok mennyiségét Kaplan módszerének (53) módosításával készített veseszuszpenzióval csökkentettük. 8 egészséges hím Wistar patkány bal veséjét nembutalos altatás után 295 mOsm-os Tyrode-oldattal (63) in situ teljes vértelenedésig perfundáltuk. A vesék kéregállományát folyékony nitrogénnel lefagyasztottuk, majd felengedés után feldarabolva üveg-potterrel homogenizáltuk. A nyert pépet háromszoros mennyiségű PBS-el 105 000 g-n 10°C-on / Beckman L 88 ultracentrifugával / háromszor 20 percig tömörítettük, a felülúszót mindig elöntve. Végül az üledéket azonos mennyiségű PBS-ben vettük fel. A dializált immunsavóhoz azonos térfogatú vesehomogenizátumot adtunk. A felülúszót 20°C-os 2 órás inkubálás után, 105 000 g-n 10°C-on végzett 20 perces centrifugálással különítettük el. Az antitesttitert csőagglutinációs módszerrel (92) mértük. Kétszeres sorozathígítások mellett, a 2000-es és 4000-es érték között százanként emelkedve újabb hígításokat készítettünk. Az immunsavót 1 ml-enként ampullákba mértük és liofilizáltuk. A lezárt ampullákat felhasználásig 4°C-on tároltuk.

V.5. Az Immunsavó karakterizálása

V.5.1. Szerotipus kontroll

Az általunk készített savót E. coli 12 979 CDC 075 /American Type Collection/ törzs - az antigén előállításnál leírtak szerint készített - alkoholos acetonos mosással készített üledékével szemben csőagglutinációs próbának (92) vetettük alá.

V.5.2. Dupla immundiffúzió

A módszer alkalmas antigének és antitestek között lejátszódó precipitációs reakció láthatóvá tételére (12). A keletkező precipitációs vonalak számából, szélességéből, intenzitásából, valamint az immunreakción kívül festődő részletekből következtetni lehet az antigéneket, ill. antitesteket tartalmazó kivonatok tisztaságára és titerére.
Az immunreagenseket 0,1 M-os Veronal-nátrium pufferrel /pH 8,6/ 1 %-os nemes agarból készített gélben futtattuk 16 órán át (22). A felülfestést Coomassie brilliant blue festékkel végeztük.

V.5.3. Indirekt haemagglutináció

Az előbbinél érzékenyebb titermeghatározásra alkalmas módszer (22). Glutáraldehiddel aktivált pulyka vörösvérsejt szuszpenziót 3000-as fordulaton 2 x 10 perces centrifugálással végzett mosás után, a deszt. vízben feloldott általunk készített immunszérummal, szobahőn fél órán át inkubáltuk. Ezután a szuszpenziót az előbbi módon centrifugálva kétszer mostuk. A meghatározást 1 %-os marha szérum albuminnal /BSA/ előkezelt, majd kiszárított mikro-ELISA lemezen végeztük. /A 0,1 % Triton X-100 detergenst /fenil-alkil polietilénglikol/ tartalmazó PBS-ben hidratált antigénkivonatból kétszeres léptékkel hígítási sort készítettünk. A lemez lyukaiba azonos térfogatú 50-50 µl hígított antigént, majd antiszérummal előkezelt pulyka vvt szuszpenziót adtunk.
A glutáraldehid a fehérjéket, - így az antitesteket is - képes Schiff-kötéssel a vörösvérsejtekhez kötni. A szuszpenzióhoz megfelelő mennyiségben hozzáadott antigén antitesthez

kapcsolódását haemagglitináció jelzi.

V.5.4. Antigén-kimerítéses kontroll

A deszt. vízzel ötszázszorosra hígított immunsavót azonos hígítású kétszeres térfogatú hidratált antigénnel reagáltattuk. Ezt az elegyet a morfológiai vizsgálatokban használt PAP technikához az E. coli ellenes savó helyett alkalmaztuk.

V.6. Kísérletes modell

A PN-t a Kórbonctani Intézet saját tenyésztéséből származó 250-300 g-os hím Vistar patkányokban O1:K1:H7:F11 antigénszerkezetű E. coli-val idéztük elő. A baktériumtenyészetet a kísérlet előtt egészséges patkányvesén háromszor passzáltuk és újratenyésztettük. A logaritmikus fázisban szaporodó baktériumokat 3000-as fordulattal 20 percig centrifugáltuk, majd denzitométerrel, fiz. sóoldatot használva az üledék denzitását 0,3-ra állítottuk be. Ez az érték, a baktériumszuszpenzió denzitásának a mikroorganizmusszám függvényében felállított kalibrációs görbén $7,5 \times 10^7$ E. colinak felelt meg milliliterenként.

Az állatok baloldali húgyvezetékét intraperitoneális altatást követően feltártuk és 48 órára lekötöttük. A műtét után másfél órával a keringésbe 100 testsúlygrammonként 1 ml beállított töménységű baktériumszuszpenziót juttattunk a farokvénán keresztül (44). A fertőzést követő 2., 4., 6., 8., 1o., 14., 21., 28., 42. és 49. napon 4-4 állat beteg

vseséjét az alábbiak szerint rögzítettük fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz.

A makroszkóposan a PN jeleit mutató veséket altatásban az a. iliaca communisok oszlásánál az a. abdominalisba vezetett és retrograd irányban az a. renalisok eredéséig feltólt tűn keresztül 30 másodperces 354 mOsm-os módosított Tyrode-oldatos (63) öblítéssel vértelenítettük, majd 10 percig in situ rögzítettük. A rögzítés körülményei a morfológiai vizsgálat céljának megfelelően különböztek.

A fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémiai vizsgálatokhoz 0,5 % glutáraldehidet és 2 % paraformaldehidet tartalmazó puffert (11) használtunk rögzítőszerként. A hagyományos és az enzimhisztokémiai elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz 1 % glutáraldehidet tartalmazót. A rögzítéseket az enzimhisztokémiai vizsgálatok kivételével - amelyek 4°C-on zajlottak - szobahőn végeztük.

V,7, A rögzített anyag előkezelése és festése

V.7.1. Fénymikroszkópos vizsgálatok

4- 4 állat 5 x 5 x 1 mm-es vesekéreg darabkáit a perfúzió után további 6 órán át 4 %-os neutrális formalinban utórögzítettük, majd felszálló alkoholsorban történt víztelenítés után, paraffinba ágyaztuk. A szövettani festéseket és az immunhisztokémiai reakciók egyrészét 5 µm-es metszeteken végeztük. A paraffinba ágyazott vesedarabokból, további faragás után ultramikrotómmal 1 µm-es félvékony metszeteket készítettünk ugyancsak immunhisztokémiai festés céljára.

Az anyag feldolgozásában az alábbi szövettani festéseket használtuk (77):

- Hematoxilin-Eosin /A sejtmagok és a cytoplasma alapfestésére/.
- Crossmon /A kötőszövet - alciánkékkel világoskék - és a fibrinoid - oranzs-fukszinnal piros - elkülönítésére/.
- Perjódsavas-Schiff / PAS / /Szénhidrátok, neutrális mucopoliszacharidok, mucoproteinek, valamint glikogén kimutatására, melyek egyrésze az alapi hártyák felépítésében vesz részt/.
- Berlini-kék /Savas közegben a szövetekben levő háromértékű vas kimutatására/.
- Schmorl /A háromértékű vasat kétértékűvé redukáló lipofuscin pigment kimutatására/.
- Turnbull-kék /Kétértékű vas kimutatására.Eredményét a Schmorl reakcióval összevetve az utóbbiból a már eleve jelenlevő vas-II kizárható/.

V.7.2. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

Az 1 mm^3-esre vágott vesekéreg darabkákat a perfúziós oldattal azonos oldatban történt 4^oC-os 2 órás immerziós utórögzítést követően, neutrális isotoniás pufferben hidegen mostuk.

A hagyományos elektronmikroszkópos vizsgálatokra szánt anyagot 2 %-os ozmiumtetroxidban egy órán át utórögzítettük, 5 %-os vizes uranilacetáttal kontrasztoztuk, ezt követően felszálló alkoholsoros dehidrálás végén propilénoxidból EPON 812 /Fluka, Svájc/ műgyantába ágyaztuk. Az ultramikrotómmal metszett félvékony - kb. 0,5 µm-es - metszetek metilénkék-bázikus fukszin festést kaptak. A 40-80 nm-es vékony metszetek uranilacetáttal és ólomcitráttal utókontrasztoztuk. Az ultrastrukturális immunhisztokémiai eljárásokat 96 %-os etanolból LR White /London Resin Co./ hidratálódó műgyantába ágyazott, előkezeletlen vékony metszeteken végeztük.

A vizsgálatok TESLA BS 500 transzmissziós elektronmikroszkóppal 60 KV-on folytak.

V.8. Fénymikroszkópos peroxidáz-antiperoxidáz /PAP/ technika

Korábbi megfigyeléseink szerint a kétnapos PN-es állatok veséjében bázikus fukszinnal festődő, eredeti alakjukat megtartott baktériumok nagy számban találhatók. A PAP technika /1. ábra/ beállításához, ezért 48 órás állatok veséjét használtuk fel. A paraffinblokkokból készült metszeteket xilolban / 3 x 10 percig /, majd leszálló alkoholsorban / 1 x abszolut, 2 x 96 %-os, 1 x 70 %-os, ill. 1 x 50 %-os etanol/ 10-10 percig tartva hidratáltuk. Az EPON-ba ágazott vékony metszetekről immunkezelés előtt a műgyantát telített nátriumhidroxidból és tömény metanolból készült nátrium-metoxiddal 20 percig végzett maratással távolítottuk el.

Első lépésben a metszet endogén peroxidázait blokkoltuk szobahőn, metanolban oldott 0,5 % hidrogénperoxiddal (7). Ezután az aspecifikus fehérjekötő helyeket telítettük a kapcsoló antitestet szolgáló állattal megegyező fajból származó tömény sertés szérummal (97). A szérumot leráztuk és a kezelést az általunk készített E. coli ellenes savóval folytattuk. A nyúlban termelt első antitesthez sertésben termelt anti-nyúl immunglobulinokat kapcsoltunk /Dakopatts, Dánia/, melynek nemspecifikus metszethez kötődését a korábban alkalmazott normál szérum akadályozta. Végül az immunológiai lánchoz nyúlban előállított PAP-komplexet /Dakopatts/ adtunk, ami fajlagosan kötődött a második antitesthez. / 1.ábra/ Az optimális festődést eredményező hígításokat mindhárom immunreagens esetében számos kombinációt alkalmazva kerestük /II. táblázat/. Az előhívást mikroszkópos ellenőrzés mellett 3,3'-diaminobenzidinnel /DAB/ végeztük. Az inkubálások - az endogén peroxidázgátlás kivételével - 37°C-os nedves kamrában 30 percig tartottak. A lépéseket minden esetben 3 x 5 perces pufferes mosás követte. Pufferként mindvégig 0,2 M-os, pH 7,6-os trisósav oldatot alkalmaztunk. Az immunhisztokémiai reakciót, a sejtmagok és a basalmembrán feltüntetésére, hematoxilin-eozin és PAS festéssel kombináltuk.

A negatív szövettani kontrollként kezelt metszetekről az E. coli ellenes savót kihagytuk.

V.9. Savanyú-foszfatáz enzimhisztokémia

A lysosomák fontos szerepet töltenek be a sejtek metabolikus folyamataiban (29). Különleges jelentőséggel bírnak a sejtek idegen anyagokat - így pl. a mikroorganizmusokat-

kiküszöbölő funkciójában. A savanyú-foszfatáz enzim a lysosomális aktivitás markereként tekinthető (4).

A hidegen rögzített, 1 %-os agar-gélbe ágyazott szövetből „tissue chopperrel" 50 µm vastag metszeteket készítettünk. Ezután a metszeteket hidegen 7,5 % szacharóz tartalmú 0,1 M-os semleges nártiumkakodilát pufferrel mostuk. Az enzimreakciót Barka és Anderson által módosított Gömöri-médiumban (4) végeztük, melynek összetétele az alábbi volt:

10 ml 0,125 %-os nátrium-β-glicerofoszfát,
10 ml 0,1 M-os pH 5,0-s esetsav nátriumacetát puffer,
10 ml deszt. víz,
20 ml 0,2 %-os ólomnitrát-oldat.

A 37°C-os 15 perces inkubálást S-collidines 1 %-os ozmium-tetroxidos utórögzítés, collidines mosás, majd Durcupan ACM /Fluka/ műgyantában ágyazás követte.

A reakció specificitásának jó megitélhetősége érdekében a vékony metszeteket vagy egyáltalán nem, vagy csak enyhén kontrasztoztuk uranilacetáttal és ólomcitráttal. A negatív kontroll inkubációs oldatában a szubsztrát-oldatot deszt.víz helyettesítette.

V. 10. Immunelektronmikroszkópos kezelés

Az ultrastrukturális immunhisztokémiai vizsgálatainkban kolloid arannyal konjugált második antitestet alkalmaztunk. Az aranyszemcsék uranilacetáttal való utókontrasztozás után jól felismerhetőek az antitest kötődésének helyén (75).

Az immunreakciókat beágyazott vékony metszeteken ún. „post-embedding" eljárással hajtottuk végre (97). Az elektronmikroszkópos nikkel grideket metszettel lefelé a reagensek- 1-1 cseppjén úsztattuk. Az antitestek szövetbe penetrálását és az antigen feltárását 2,28 %-os perjódsavas, majd 0,028 %-os Na-borohidrides előkezelés (8o),valamint 0,1 %-os tripszines emésztés (7) segítette. Az optimális reakciókörülmények beállításakor az E. coli ellenes savót és a második antitestként alkalmazott 40 nm-es kolloid aranyszemcsékkel konjugált juhban termelt anti-nyúl immunglobulin oldatot / Janssen, Belgium / különböző hígítások, inkubációs idők és hőmérsékletek többféle kombinációjával vizsgáltuk /III. táblázat /. A metszeteket a lépések között PBS-el 3 x 15 percig mostuk, a reakció végén 5 %-os uranilacetáttal 15 percig kontrasztozuk (75). A negatív kontroll metszetek kezelésekor a specifikus kórokozóellenes savó helyett, normál nyúlszérumot használtunk.

VI. EREDMÉNYEK

VI.1. Az immunsavó előállítása és jellemzése, valamint az immunhisztokémiai technikák beállítása

Az immunizálás végén /I. táblázat / a tájékoztató lemezagglutinációs titermeghatározás szerint a komplett Freud-adjuvánssal bevezetett, majd intravénásan folytatott antigénbevitellel / I. és II. állat / magasabb antitesttitert

értünk el, mint másik két esetben. Az I. és II. nyúl savója az antigénnel 1 : 1280-as hígításig adott reakciót, míg a II. és IV. csak ennél töményebb oldatban.

Veseszuszpenzióval végzett kimerítés után az immunsavó az antigént 1 : 3000-es hígításig agglutinálta. Az immunszérum más E. coli törzzsel keresztreakciót nem adott.

Dupla immundiffuzióval / 2. ábra / az antigén 1 : 8-as hígításával a tömény immunsavó halvány, de még megitélhető precipitációs vonalat adott. A vonalak elmosódott, kiszélesedett volta a savóban visszamaradt még jelentős mennyiségű nemspecifikus szennyező fehérjéknek, valamint a lipopoliszacharid-protein antigén kismértékű diffuziójának a következménye.

Sertés anti-nyúl savóval a PAP komplex éles, az antibakteriális savó kevésbé éles, de intenzív precipitációs vonalat eredményezett / 3. ábra /. Indirekt haemagglutinációs próbával az antigén 1 : 128-as hígításban még agglutinálta a tömény E. coli ellenes savóval előkezelt glutáraldehiddel aktivált pulyka vvt-t.

Kétnapos állat, az antigénkimerítéses kontroll-szérummal PAP módszer szerint kezelt metszetein DAB reakciót nem észleltünk.

Az ellenőrző vizsgálatok szerint az általunk előállított polivalens savó a kisérletünkben használt E. coli törzszsel szemben specifikusnak tartható.

A fénymikroszkópos PAP technika beállításakor / II. táblázat / az E. coli ellenes savó 1 : 1000-es, a kapcsoló antitest 1 : 2o-as és a PAP komplex 1 : 4o-es hígításával intenzív, nemkivánt háttérfestés nélküli reakciót kaptunk, mely a baktériumokat szelektíven jelölte / 11. ábra /. A negatív kontrollként kezelt metszeteken egyetlen esetben sem észleltünk festődést.

Az elektronmikroszkópos immunhisztokémiai módszer beállításakor / III. táblázat / az előemésztett grideken 1 : 2o-as hígítású baktériumellenes savóval és 1 : 10-es hígítású anti-nyúl savóval észleltük a legmegfelelőbb eredményt / 14/A. és B. ábra /. Az első savóval végzett inkubálás idejének nyújtása / 2 órára/, ill. hőmérsékletének emelése / 37°C-ra / nem növelte az aranyszemcsék számát a baktériumokon. Túl tömény E. coli ellenes immunsavó használata esetén fokozódott a baktériumokon kívüli helyeken lekötődött aranyszemcsék száma és összecsapzódása / 14/C. ábra /. A nemkivánt háttérpozitivitást nem tudtuk teljes mértékben kiküszöbölni.

VI.2. E. coli pyelonephritis tanulmányozása

Kísérletünkben az operált állatok mintegy 3o %-a pusztult el a vizsgálati időpont előtt. A bakteriális fertőzést túlélt, különböző időpontokban leölt patkányok 9o %-ának megbetegített veséje makroszkóposan a PN jeleit mutatta.

VI.2.1. Korai elváltozás / a 2. és 6. nap között /

A heveny PN-es vese a másik oldali egészségeshez képest jelentősen duzzadt volt. Felszínét apró tályogok, - az alapállománynál világosabb, abból kiemelkedő - foltjai borították / 4. ábra /. Fénymikroszkóposan a gócosan elhelyezkedő gennyes beolvadások a vese kéreg- és velőállományában, ill. legnagyobb számban a kéreg-velő határán voltak megfigyelhetők / 5. ábra /. A tályogok környezetében az interstitiumot heveny lobsejtes beszűrődés szélesítette ki / 6. ábra /. A gyulladásos sejtek egyrésze a peritubuláris capillarisokban és venulákban foglalt helyet. Az interstitiumot infiltráló sejtek zömében PMNG-k, kisebb számban monocyták voltak. Az erekben marginálódó lobsejtek között néhány eosionophil granulocyta és lymphocyta is felismerhető volt. Fénymikroszkóppal számos tubulus űrterében baktériumok százait figyeltük meg / 6. ábra /. Nagyobb nagyítással a mikroorganizmusok kisebb csoportokban a tubuláris hámsejtek cytoplasmájában is látszottak / 7. ábra /. Elektronmikroszkóppal vizsgálva, a baktériumokat tartalmazó uroepithel sejtek luminális pólusán microvillusok, cytoplasmájában számos mitochondrium és lysosoma volt / 8. ábra /. A kórokozókat főként membrán-határolt phagosomák tartalmazták. A sejtek basalis részében és a sejtmag körül számos savanyú-foszfatáz pozitív lysosoma, valamint degradálódó mikroorganizmusokat és enzimet egyaránt magában foglaló phagolysosoma látszott / 9. ábra /. Néhány alkalommal a phagolysosomák keletkezésének különböző mozzanatait is meg tudtuk figyelni / 10./A és B. ábra /.

A phagosomák száma mindig jelentősen meghaladta a lysosomák és a phagolysosomák együttes számát. A baktériumok felvételére a proximalis kanyarulatos csatorna hámsejtek voltak képesek, distalisabb tubulusrészletek epithelsejtjeiben E. coli-t csak elvétve láttunk. Egyes baktériumokkal kitöltött tubulusok hámja teljesen eltűnt, a kórokozókat csupán a megmaradt alapi hártya határolta a gyulladt interstitium felé / 11. ábra /. Immunperoxidáz módszerrel a mikroorganizmusok a gyulladt interstitiumban szabadon is, de főként a PMNG-k és macrophagok cytoplasmájában voltak kimutathatók / 12. ábra /. Elektronmikroszkóppal általában többessével phagolysosomákon belül látszottak / 13. ábra /. A baktériumokat a tubulus lumenben és hámban, néhol a phagocytasejtek cytoplasmájában is egy nem-ozmiumozható világos udvar vette körül. A kórokozó kivonatával szemben termelt antitesteket jelölő kolloid aranyszemcsék mind a tubuláris hámban / 14. ábra /, mind a phagocytasejtekben levő mikroorganizmusok sejtfalán lokalizálódtak / 15. ábra /.

Az interstitiumban egyre nagyobb számban felszaporodott aktív macrophagok phagolysosomáiban a baktériumokon és myelinfigurákon kívül, sejtmaradványok is felismerhetők voltak / 16. ábra/.

A gennyes beolvadások környezetében a heveny gyulladásos sejtek a tubulusok falát is infiltrálták. Elszórtan kanyarulatos csatorna részletek alapi hártyájának szakadásai, valamint hámsejt-necrosisok látszottak. Egyes tubulusok űrterét számos szorosan egymás mellé rendeződött PMNG és macrophag töltötte ki / 17. ábra /.

Az így kialakult sejtes cylindereket leggyakrabban distalis és gyűjtőcsatorna szakaszokban és a vesemedencében figyeltük meg. Elektronmikroszkóppal a cylinderek macrophagjainak - a cytoplasma jórészét kitöltő phagolysosomáiban számos eltérő mértékben pusztult baktérium látszott.

A korai elváltozás végén a gyulladt területeken egyre több macrophagot láttunk, ugyanakkor a gennyes beolvadásokban a PMNG-k nagyrésze pusztult, törmelékes volt és a tubuláris „bakrétium-felhők" száma is jelentősen csökkent. A tályogokkal határos területeken a károsodottfalú tubulusok lecsupaszított, néhol feltünően vastag, többrétegű, tekervényes basalis membrájai maradtak vissza. Felszínükhöz mindkét oldalról, főként macrophagok, valamint PMNG-k simultak / 18. ábra /. A macrophagok phagolysosomái nagymennyiségű baktériumot foglaltak magukba. Elektronmikroszkóppal megfigyeltük, hogy a baktériumok sejtfalát myelin-figurák többszörös hullámosvonal- -szerű képletei szorosan körülvették / 19. ábra /. Egyes macrophagok cytoplasmájában phagocytált baktériumokkal telt PMNG-ket is megfigyeltünk. Az acut szak végén a capillarisok, venák és venulák vérbősége szembetűnő volt.

VI.2.2. Késői elváltozás / a 6. nap után /

A heveny gyulladásos jelenségek lezajlását követően a lobos területekről a gennysejtek nagyrésze, valamint a „baktériumfelhők" eltűntek. Helyükön kezdetben viszonylag sejtszegény, macrophagokat tartalmazó sarjszövet kialakulása volt megfigyelhető.

A tubulosok egyrésze -legikább a kéregállományban - csökkent magfestést mutatott, zsugorodott és lumennélkülivé vált. Számos kitágult distalis és gyűjtőcsatornában macrophagokból, kevés granulocytából és sejttörmelékből összeállt cylindereket láttunk. Az interstitiumban - különösen a 10. naptól - háromszög alakú elnyújtott maggal rendelkező fibroblastok, viszonylag kisméretű kerek lymphocyták, valamint elektronmikroszkópos megjelenésükben ekcentrikusan elhelyezkedő maggal és dús endoplasmás reticulum-hálózattal bíró plasmasejtek is felszaporodtak.

Elektronmikroszkóppal a phagocytált baktériumok morfológiai megjelenésük alapján a fertőzést követő 8. napig voltak azonosíthatók. A késői elváltozás kezdetén az E. coli antigén nagyrésze az interstitiumban elhelyezkedő macrophagok cytoplasmájában volt kimutatható / 20. ábra /. A macrophagok jelentős számban PAS pozitív festődést adtak. Bennük, PAS reakcióval kombinált E. coli ellenes savóra felépített PAP technikával, a DAB-al granulárisan barnára festődő baktérium antigén és lila PAS pozitív anyag jelenlétét egymás mellett tudtuk kimutatni / 21. ábra /. Csak PAS pozitív, vagy csak E. coli pozitív macrophagokat is láttunk. Elektronmikroszkóppal 3 hét után a nagymennyiségű collagen-rost által körülvett macrophagok cytoplasmáját szinte teljesen kitöltő telolysosomák voltak megfigyelhetők / 22. ábra /. Nagyobb nagyítással ezekben a sejtorganellumokban myelin-figurák többnyire koncentrikusan rendeződött vonalszerű képletei és elektrondenz szemcsés anyag látszottak. / 23. ábra /.

Az ultrastrukturális immunhisztokémiai módszerrel kezelt metszeteken az E. coli ellenes antitesteket jelölő kolloid aranyszemcsék többnyire a myelin-figurák vonalain helyezkedtek el / 24. ábra /. A tanulmányozott 4. héten a fertőzött vese makroszkóposan már lényegesen kisebb volt az ellenoldali egészségesnél / 25. ábra /. Felszíne a heges területeknek megfelelően erőteljes behúzódásokat mutatott. Fénymikroszkóposan kis nagyítással a súlyos parenchymakárosodás következtében a vese eredeti szerkezetét csak helyenkét lehetett felismerni. A viszonylag épnek látszó glomerulusok a nagymértékű tubulushám pusztulás miatt közel kerültek egymáshoz. Az antigént tartalmazó macrophagok a velőállománytól a vese felszínéig terjedő, ékszerűen kiszélesedő hegszövetben látszottak / 26. ábra/. Fénymikroszkópos immunhisztokémiával a cylinderek macrophagjainak többségében is E. coli pozitivitást mutattunk ki / 27. ábra /.

A 4. hét után a myelin-figurák egyre több macrophag phagolysosomáiból tűntek el, helyüket amorf elektronmikroszkópos megjelenésükben lipofuscin maradékpigmentre emlékeztető residuális testek foglalták el. Ultrastrukturális immunhisztokémiával ezekben a maradéktestekben bakteriális antigén jelenlétét már nem tudtuk kimutatni.

A tanulmányozott időszak végéhez közeledve fénymikroszkóposan az E. coli antigenitást hordozó macrophagok száma fokozatosan csökkent és a reakció intenzitása is mérséklődött.

Fénymikroszkóposan kórokozókból származó antigént a cylinderek, valamint a heges szövet kisebb csoportokba rendeződött macrophagjainak cytoplasmájában még a 7. hét után is jelentős mennyiségben ki tudtuk mutatni. Ultrastrukturálisan a tanulmányozott időszak végén a macrophagok nagyrészében csak lipofuscinra emlékeztető denz testeket láttunk. Egyéb organellumokat a sejtek alig tartalmaztak / 28. ábra /. Ekkor a lipofuscin pigment jelenlétét a fénymikroszkópos Schmorl-reakció is igazolta / 29. ábra /. A párhuzamosan végzett Turnbull-kék reakcióval a metszetek alig festődtek.

VI.2.3. TÁBLÁZATOK ÉS ÁBRÁK

Az ábráknál használt rövidítések:

C = collagen
G = glomerulus
GYCS = gyüjtőcsatorna
H = Hematoxilin magfestés.
HE = Hematoxilin-eozin festés.
IE = Immunelektronmikroszkópos kezelés, uranilacetáttal utókontrasztozott metszet.
IS = interstitium
LI = lipofuscin pigment
LY = lysosoma
M = mitochondrium
MBF = Metilénkék-bázikus fukszin festés.

MF	=	myelin-figura
MV	=	microvillusok
PAP	=	E. coli ellenes első savóval végzett peroxidáz-antiperoxidáz reakció.
PAS	=	Perjódsavas - Schiff reakció.
PL	=	phagolysosoma
PMNG	=	polymorph-magvú neutrophil granulocyta
PN	=	pyelonephritis
PS	=	phagosoma
R	=	ribosoma
RER	=	durvafelszínű endoplasmás reticulum
SF	=	Gömöri-féle savanyú-foszfatáz reakció, enyhén utókontrasztozott metszet.
SM	=	sejtmag
TBM	=	tubuláris basalmembrán
TH	=	tubuláris hámsejt
Zs	=	zsírcsepp

Az elektronmikroszkópos metszeteket, ahol más jelzés nem szerepel, uranilacetáttal és ólomcitráttal utókontrasztoztuk.

I. táblázat

Uj-zélandi albino nyulak immunizálása E. coli alkoholos-acetonos extraktumával / O antigén /.

A kezelés időrendi lefolyása

Kezelési napok	Az antigén mennyisége mg-ban és beadásának módja nyulanként			
	I.	II.	III.	IV.
1.	1 F. sc.	1 F. sc.	1 iv.	1 F. sc.
3.	-	-	2,5 iv.	-
5.	5 iv. 3,5 F. sc.	5 iv. 1 F. sc.	5 iv.	3,5 F. sc.
7.	6 iv.	6 iv.	6 iv.	-
9.	7 iv.	7 iv.	7 iv.	3,5 F. sc.
11.	8 iv.	8 iv.	8 iv.	-
13.	9 iv.	9 iv.	9 iv.	3,5 F. sc.
15.	10 iv.	10 iv.	10 iv.	-
21.	t.t.m. 1 iv.	t.t.m. 1 iv.	t.t.m. 1 iv.	t.t.m. 1 iv.
24.	3 iv.	3 iv.	3 iv.	3 iv.
27.	5 iv.	5 iv.	5 iv.	5 iv.
34.	t.t.m. elv.	t.t.m. elv.	t.t.m. -	t.t.m. -

F. sc. = komplett Freund-adjuvánssal subcutan

iv. = intravénásan

t.t.m. = tájékoztató titermeghatározás

elv. = elvéreztetés

II. táblázat

Fénymikroszkópos PAP-technika beállítása E. coli baktérium ill. somatikus antigénjének kimutatására

Nyúl anti-E. coli savó hígítások	Sertés anti-nyúl savó hígítások	Nyúl PAP-komplex hígítások	Eredmények	
			reakció	háttér
1 : 10	1 : 10	1 : 20	++	+++
	1 : 20	1 : 40	++	+++
	1 : 50	1 : 100	++	++
1 : 100	1 : 10	1 : 20	++	++
	1 : 20	1 : 40	++	+
	1 : 50	1 : 100	++	+
1 : 500	1 : 10	1 : 20	+++	+
	1 : 20	1 : 40	+++	+
	1 : 50	1 : 100	++	+
1 : 1000	1 : 10	1 : 20	+++	+
	1 : 20	1 : 40	+++	-
	1 : 50	1 : 100	++	-
1 : 1500	1 : 10	1 : 20	++	-
	1 : 20	1 : 40	++	-
	1 : 50	1 : 100	+	-

A táblázatban szereplő összes inkubálás 37 °C-on 30 percig tartott.

A specifikus reakció és a nemspecifikus háttér relativ intenzitása, a vizsgálatok során talált maximálishoz /+++/ viszonyítva / +++ = erős; ++ = közepes; + = gyenge; - = nincs /.

III. táblázat

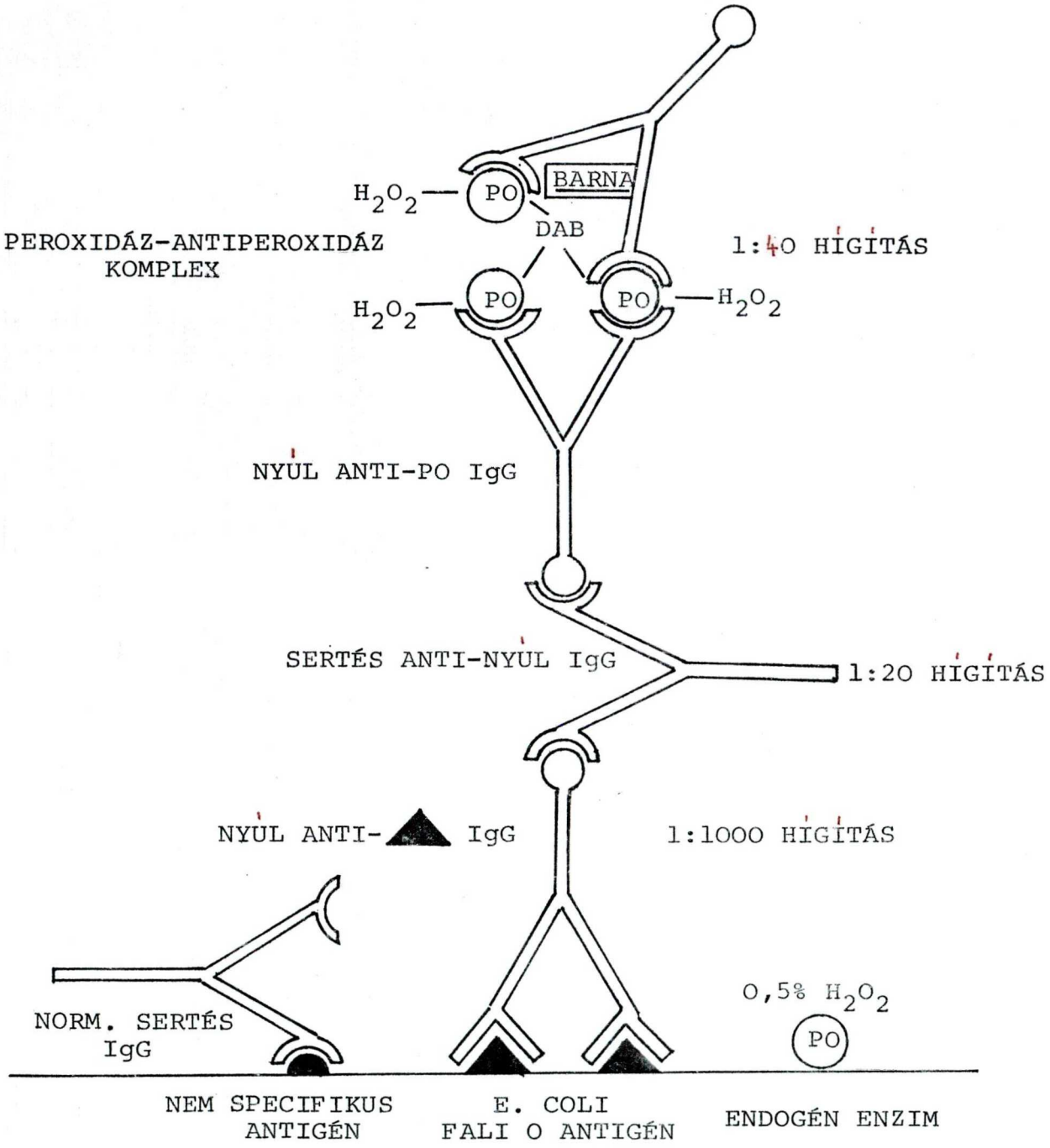
Ultrastrukturális immunhisztokémiai módszer beállítása

E. coli baktérium ill. somatikus antigénjének kimutatására

Nyúl anti-*E. coli* savó higítások	Kolloid arannyal jelzett anti-nyúl savó higítások	Eredmények	
		reakció	háttér
1 : 10	1 : 10	+++	+++
1 : 20	1 : 10	+++	++
1 : 50	1 : 10	++	++
1 : 100	1 : 10	+	+
1 : 10	1 : 20	++	++
1 : 20	1 : 20	++	+
1 : 50	1 : 20	+	+
1 : 100	1 : 20	+	+
előemésztett 1 : 20	1 : 10	+++	+
	1 : 10, szobahőn 2 óra	+++	++
	1 : 10, 4 °C-on 24 óra	+++	+++
	1 : 10, 37 °C-on 30 perc	+++	++
előemésztett 1:20, szobahőn 2 óra	1 : 10	+++	+
előemésztett 1:20, 4 °C-on 24 óra	1 : 10	a metszet leúszott	
előemésztett 1:20, 37 °C-on 30 perc	1 : 10	+++	+

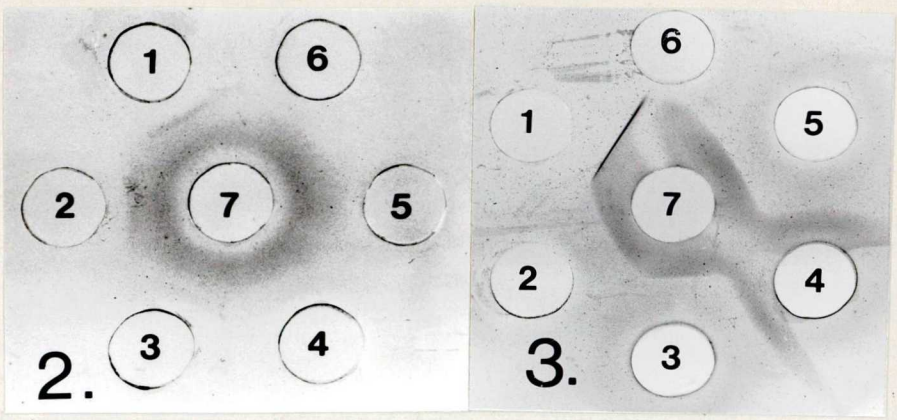
Az inkubálások, ahol más jelzés nem szerepel, szobahőn 30 percig tartottak.

A specifikus reakció és a nemspecifikus háttér relatív intenzitása, a vizsgálatok során talált maximálishoz /+++/ viszonyítva / +++ = erős; ++ = közepes; + = gyenge; /.



1. ábra

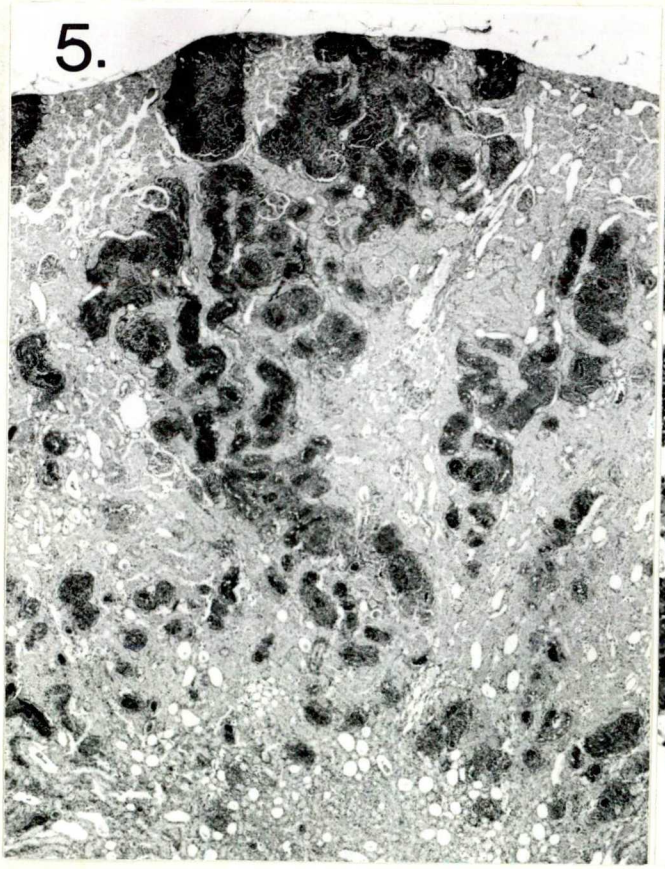
ESCHERICHIA COLI KIMUTATÁSÁRA ALKALMAZOTT PEROXIDÁZ-ANTI-PEROXIDÁZ MÓDSZER ELVE ÉS MENETE VÁZLATOSAN

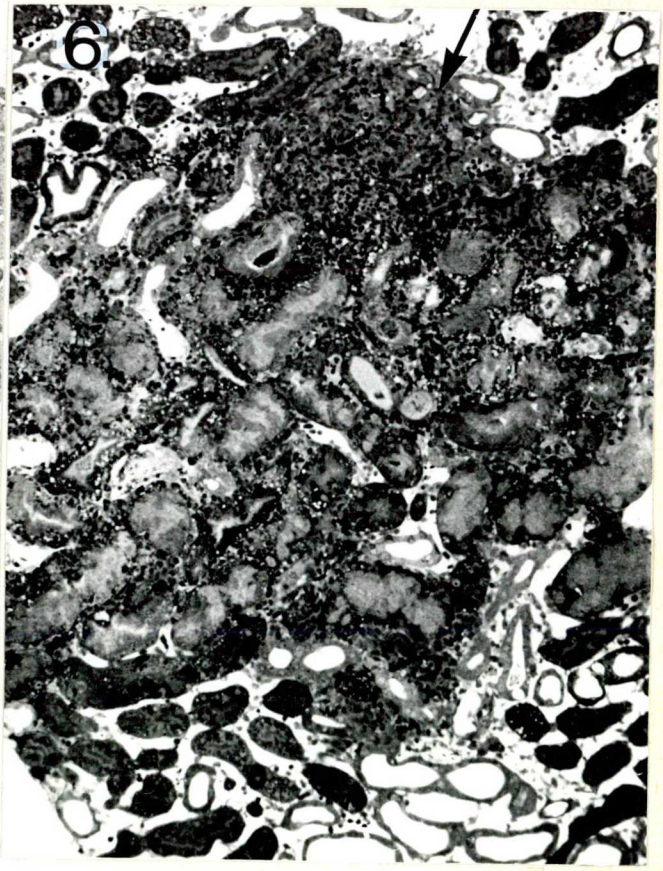


2. ábra. Dupla immundiffúzió. Az antigén különböző sorozathígításaival /1-6/ szemben diffundáló antiszérum/7/ az 1-estől a 3-as lyukig ad megitélhető precipitációs vonalat. /1 = 2 x hígítás, 2 = 4 x hígítás, 3 = 8 x hígítás./

3. ábra. Dupla immundiffúzió. A PAP módszerben használt immunreagensek közti kötődés vizsgálata. A PAP komplex /1/ és az anti-nyúl savó /7/ között éles, az E. Coli ellenes /2,3,5/ és az anti-nyúl savók /4,7/ között halványabb precipitációs vonal látszik. A normál sertésszérum /6/ egyik savóval sem reagált.

4. ábra. 2 napos PN. Ugyanabból az állatból származó baloldali egészséges és jobboldali megnagyobbodott, gennyes beolvadásokkal tarkított felszinű heveny PN-es vese.

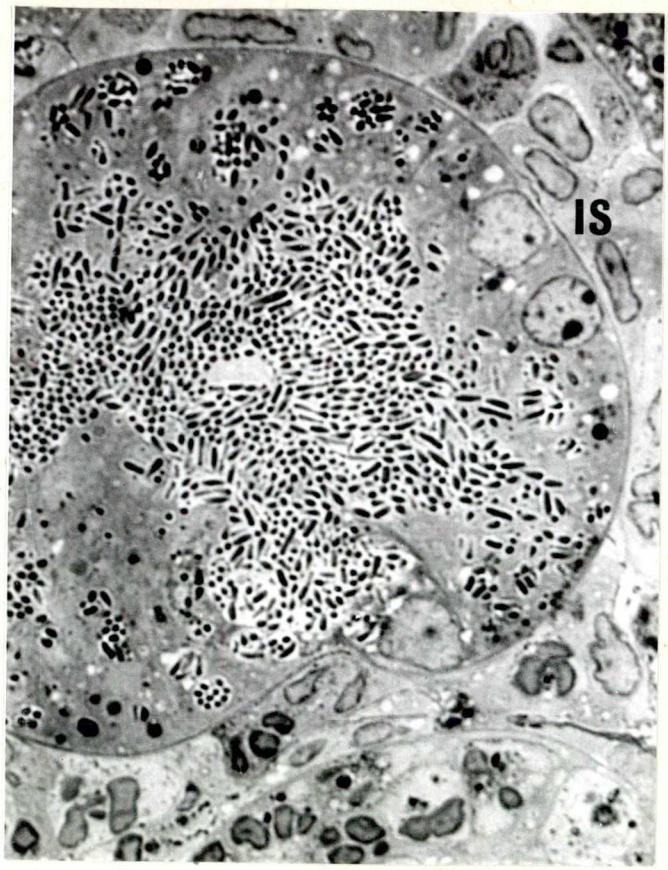




5. ábra. 2 napos PN. A vese kéreg és velőállományban elszórtan tályogok sötét foltjai látszanak.
HE, 35 x

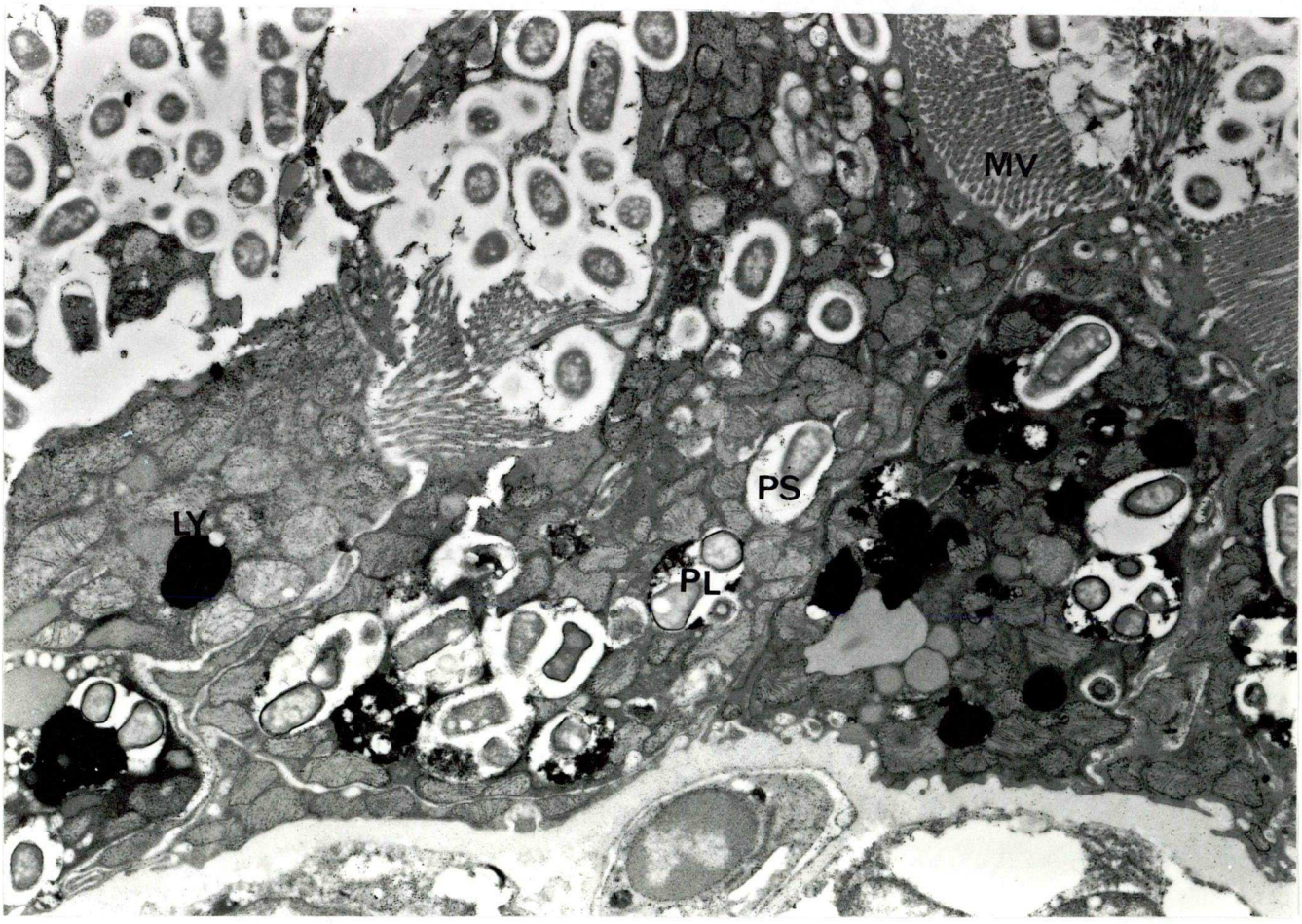
6. ábra. 2 napos PN. A gennyes beolvadás /nyíl/ környezetében a tubulointerstitiumot heveny lobsejtek szélesítik ki, a tubulusok űrtere a bennük levő nagyszámú baktériumtól finoman szemcsézett.
Félvékony metszet, MBF, 140 x

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 14

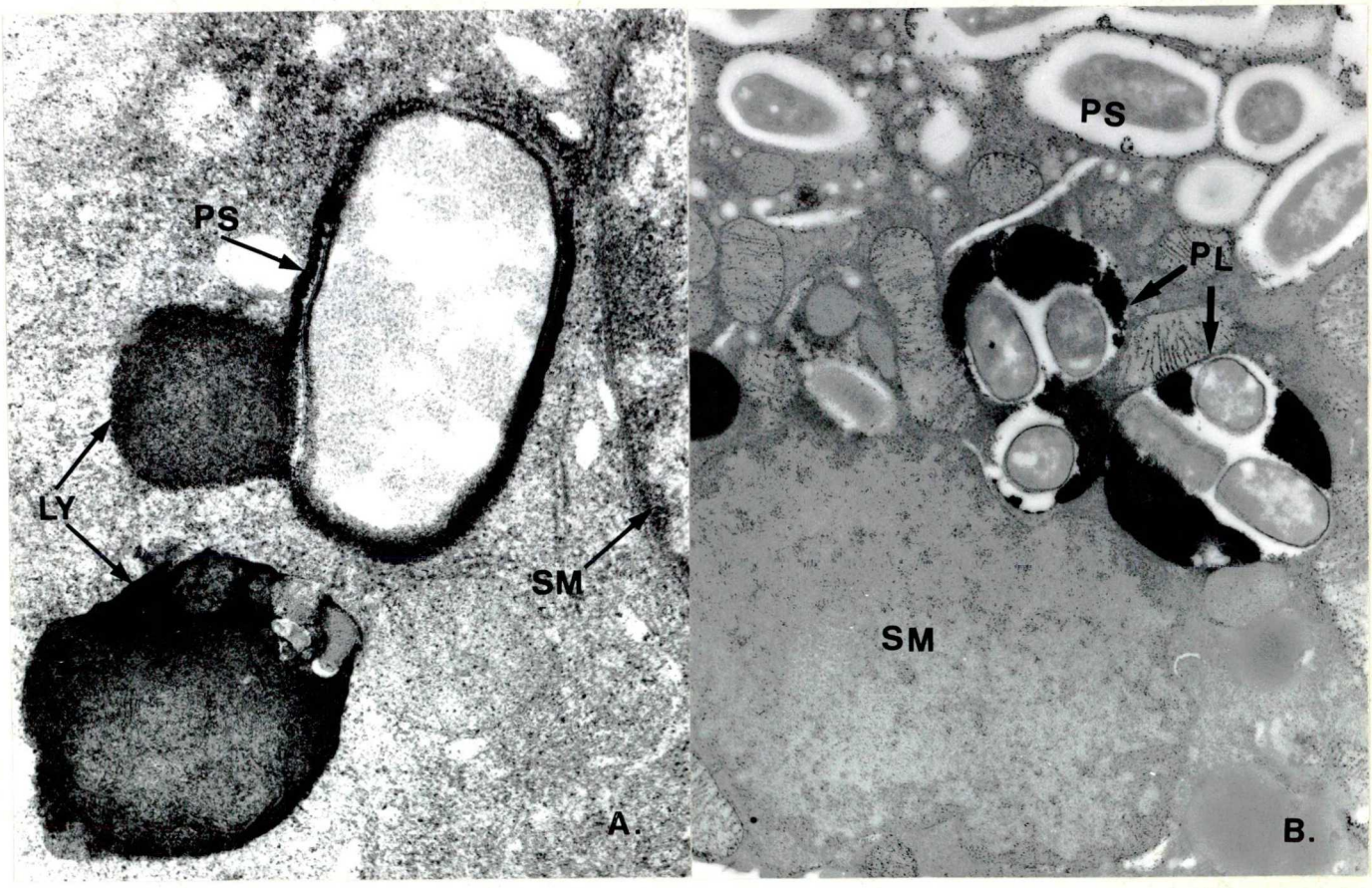


7. ábra. 2 napos PN. A baktériumok nemcsak a tubulusok lumenét töltik ki, hanem kis csoportokban a tubuláris hámsejtekben is láthatók. Az interstitiumban heveny gyulladásos sejtek vannak. Félvékony metszet, MBF, 1400 x

8. ábra. 2 napos PN. Baktériumfelvétel a proximalis kanyarulatos csatorna részlet jelentős károsodása nélkül. Az E. coli-t tartalmazó phagosomák a hámsejtekben a luminalis pólustól /fent/ a basalis régióig /lent/ nagy számban láthatók. Számos megkettőződött, osztódó baktérium is megfigyelhető. Az intertubuláris capillarisban /legalól/ gyulladásos sejtek vannak.
8400 x



9. ábra. 2 napos PN. Phagocytált kórokozók a proximalis kanyarulatos csatorna hámsejtjeiben. Az E. coli-t tartalmazó phagosomák a savanyú-foszfatáz enzim-reakcióval feltüntett lysosomákkal egyesülve phagolysosomákat hoznak létre.
SF, 7700 x

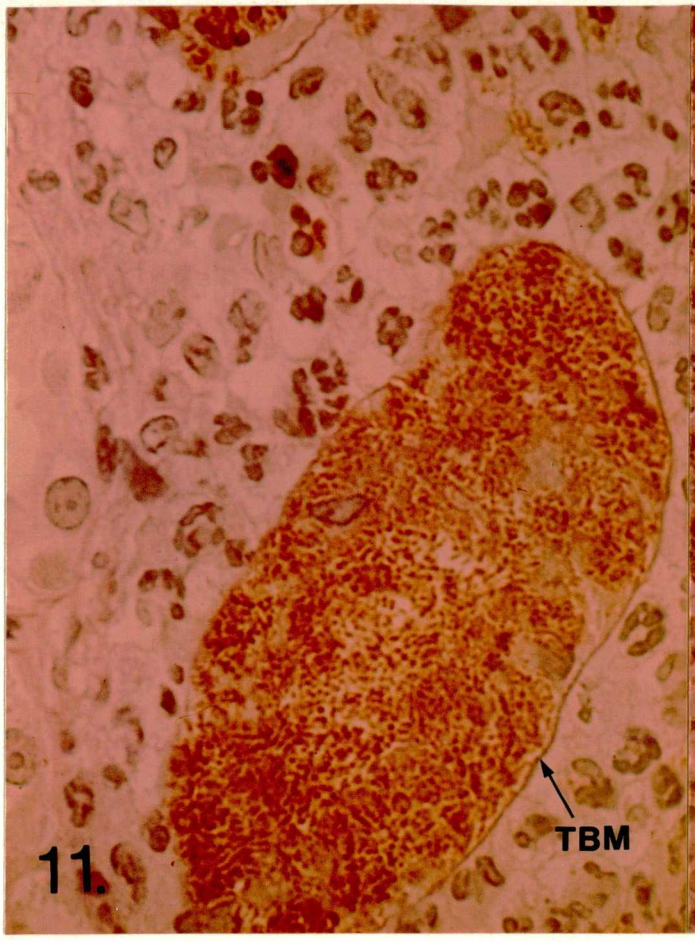


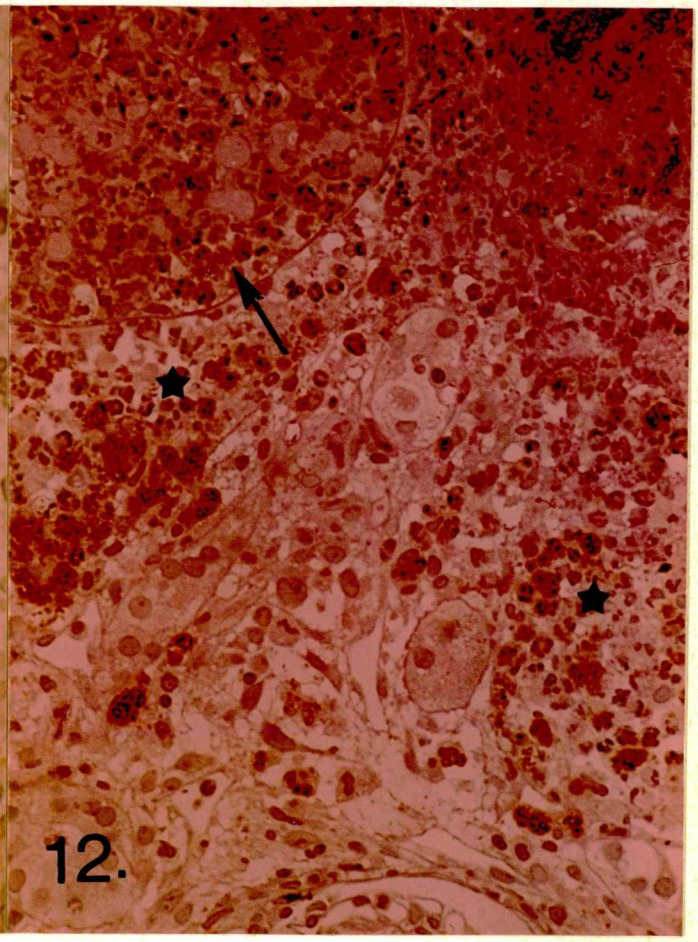
10. ábra 2. napos PN. Phagolysosomaképződés.

A./ A savanyú-foszfatáz pozitív lysosoma a baktériumot szállító phagosomával történt fúzióját követően, enzimtartalmával körül folyja a kórokozókat.

B./ Egyenként több mikroorganizmus is magukba foglaló bőséges enzimtartalmú phagolysosomák a tubuláris hámsejt magja mentén.

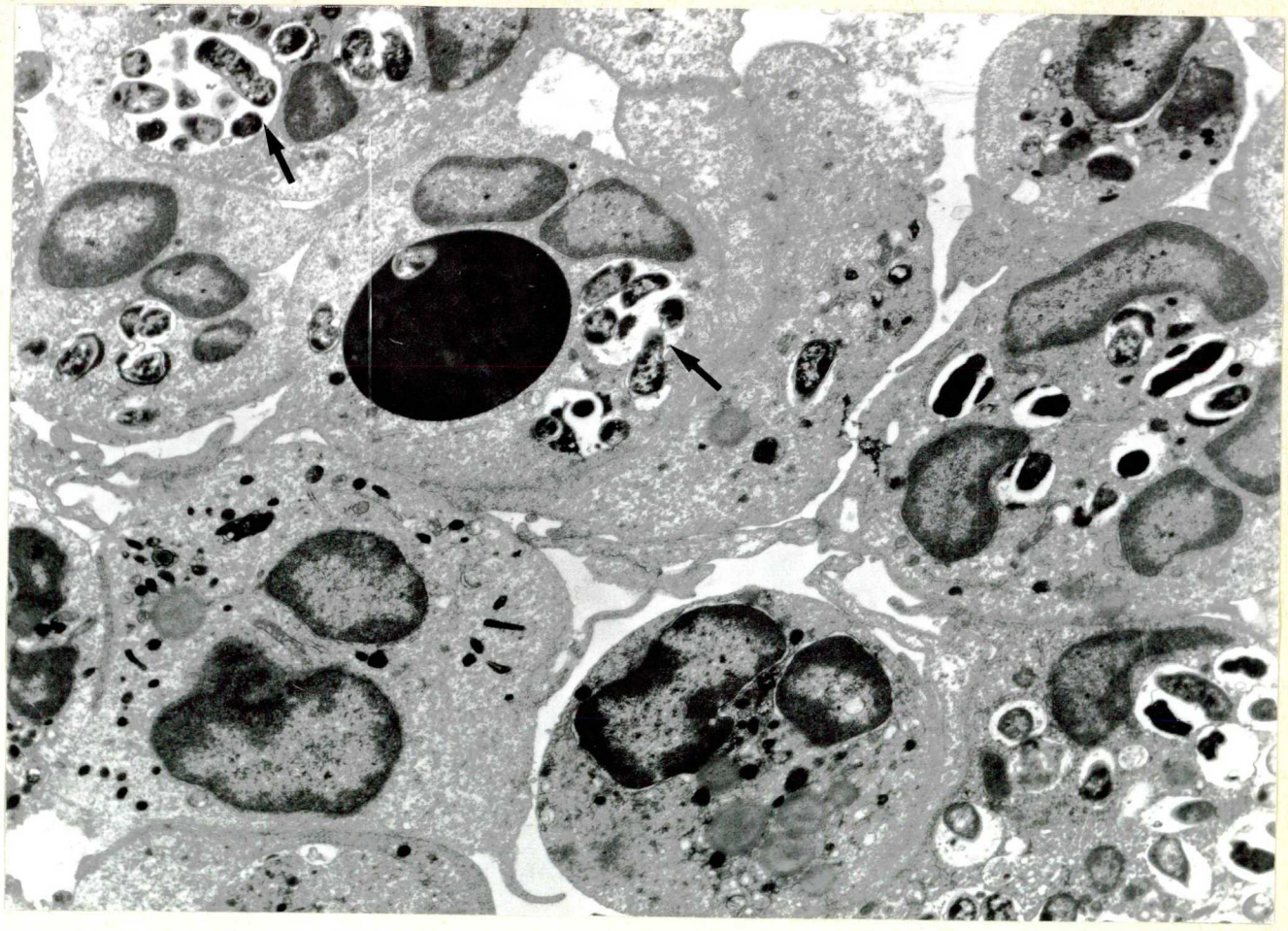
SF, A./ 320000 x B./ 10000 x





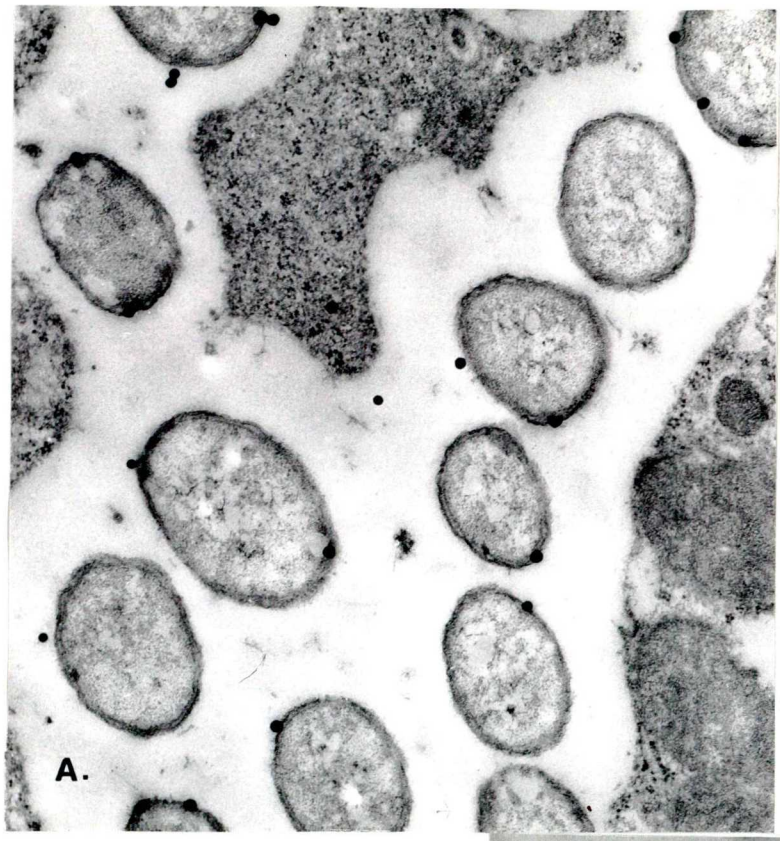
11. ábra. 2 napos PN. A proximalis kanyarulatos csatorna súlyosan károsodott. A benne levő nagyszámú, barnára festődő baktériumot csak a csupasz alapi hártya választja el a heveny lobsejtekkel zsúfolt interstitiumtól.
Félvékony metszet, PAS + PAP-reakció +H, 560 x

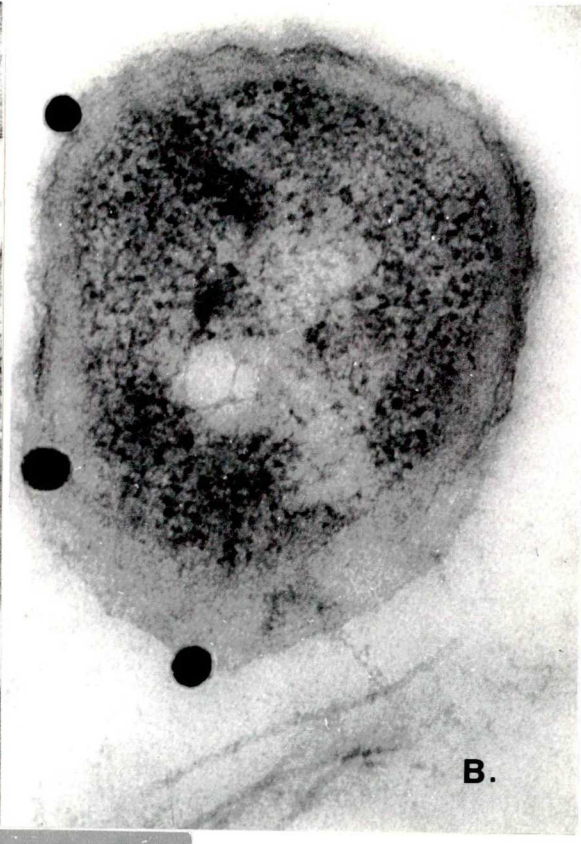
12. ábra. 4 napos PN. Az immunperoxidáz módszerrel barnára festődő baktériumok a károsodott tubulus űrterét és hámsejtjeit /nyíl/, valamint az interstitiumot /csillag/ infiltráló gyulladásos sejtekben látszanak.
Félvékony metszet, PAS + PAP-reakció +H, 350 x

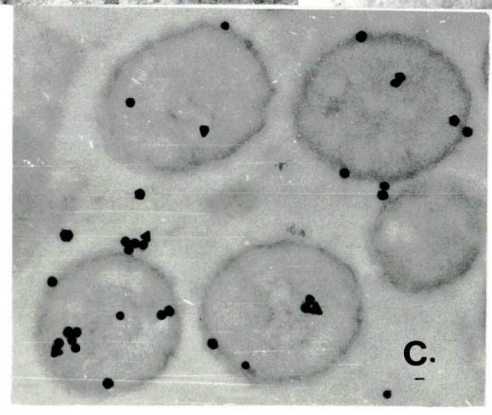


13. ábra. 2 napos PN. Az interstitiumot beszűrő PMNG-k phagolysosomáiban károsodott, de még felismerhető baktériumok /nyil/ vannak. A phagocytosist mutató granulocyták cytoplasmája enzimtartalmú - sötét, elektrondenz- granulumokat már alig, vagy egyáltalán nem tartalmaz.

9200 x





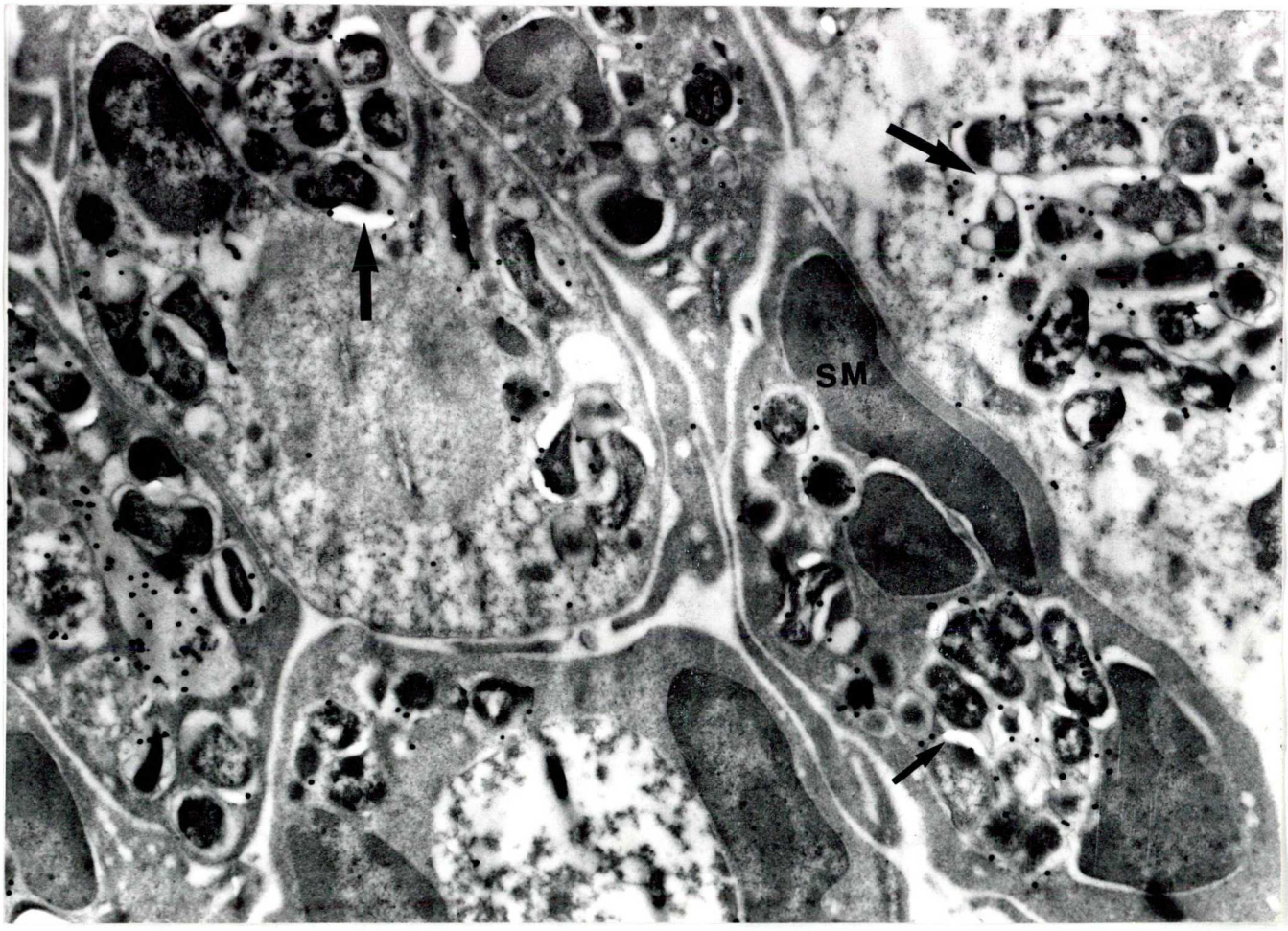


14. ábra. A./ 2 napos PN. Kórokozók a károsodott tubulushámban. A bakteriális antigént jelző kolloid aranyszemcsék kis számban, de specifikusan a baktériumokon lokalizálódnak.

B./ Felnagyítva, az arany-szemcsék a mikroorganizmusok sejtfalához kötötten látszanak.

C./ Túlzottan tömény E. coli ellenes savó a jelzőanyag összecsapzódását és nemspecifikus lekötődésének fokozódását eredményezi.

IE, A./ 30000 x B./ looooo x C./ 26000 x

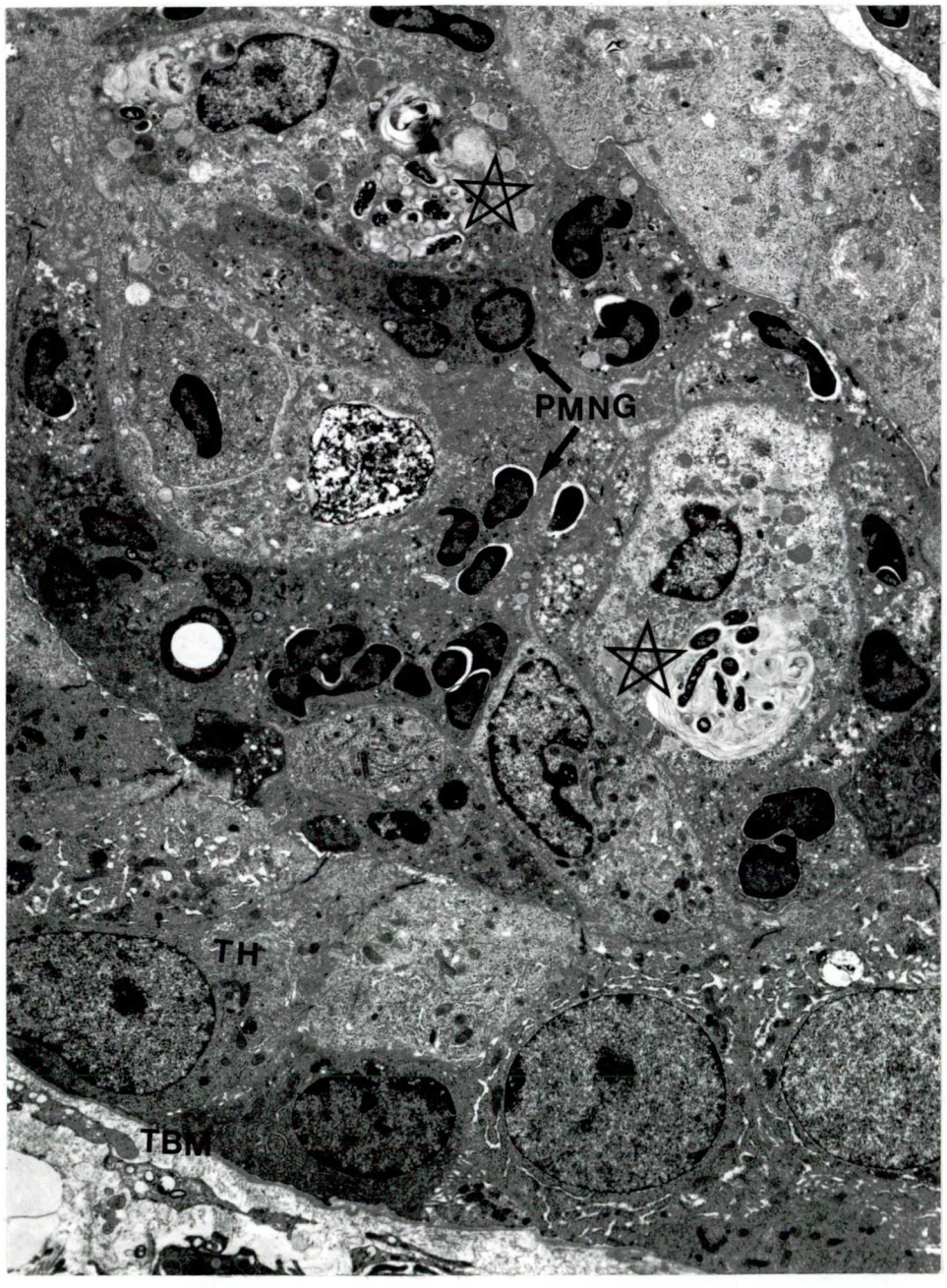


15. ábra. 2 napos PN. Az aranyszemcsék döntő többsége a PMNG-kben phagocytált pusztuló baktériumokat /nyíl/ jelzi. Elvétve néhány szemcse másutt is látszik.

IE, 16000 x

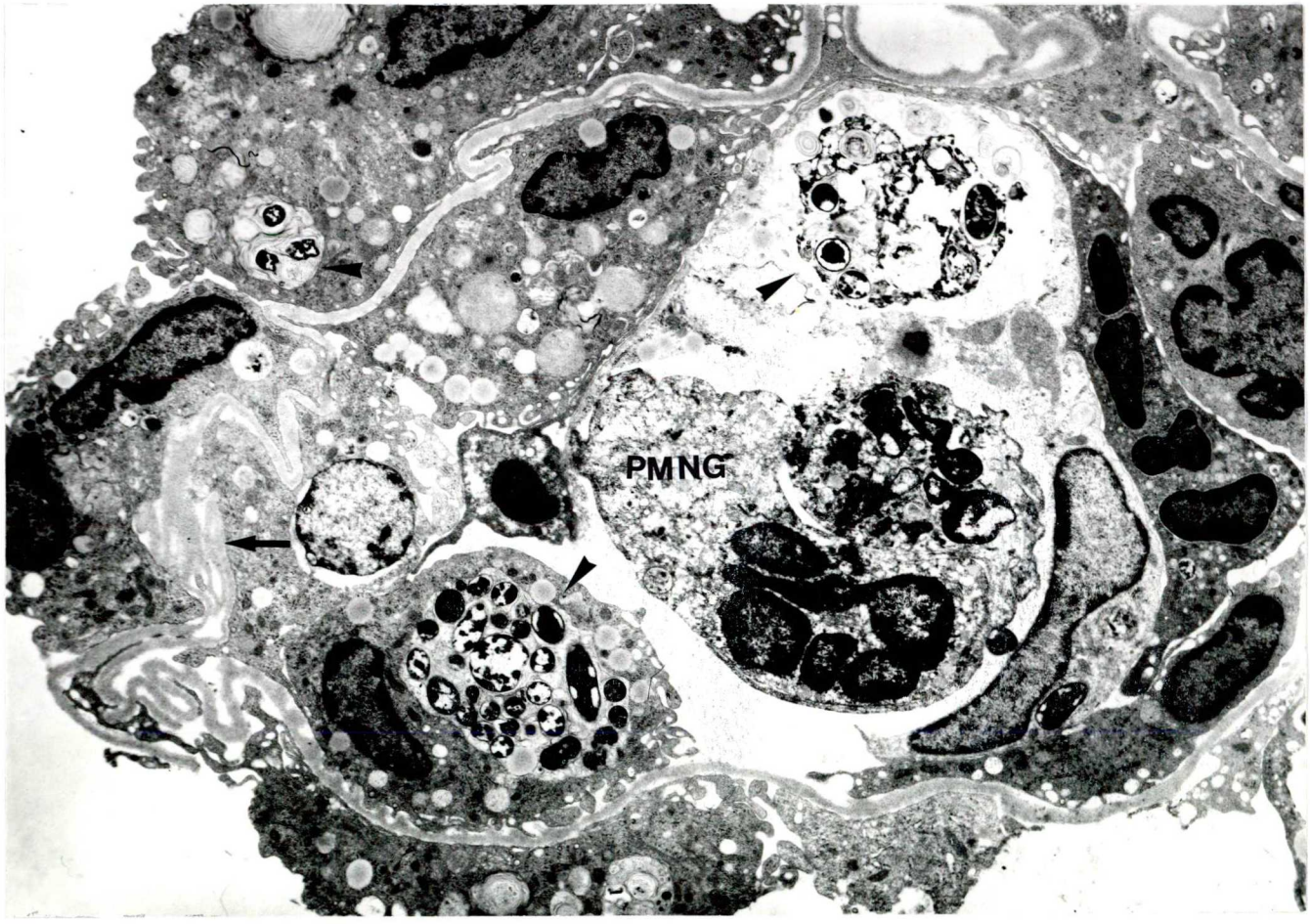
16. ábra. 4 napos PN. Az aktív macrophag sejtmagja oldalra nyomott, phagolysosomáiban degradálódó baktériumok /nyíl/ sejtmaradvány /csillag/ és myelinfigurák /nyílhegy/ látszanak. A sejtben sok szabad ribosoma, durvafelszínű endoplasmás reticulum, valamint számos mitochondrium és néhány zsírcsepp figyelhető meg.

18000 x



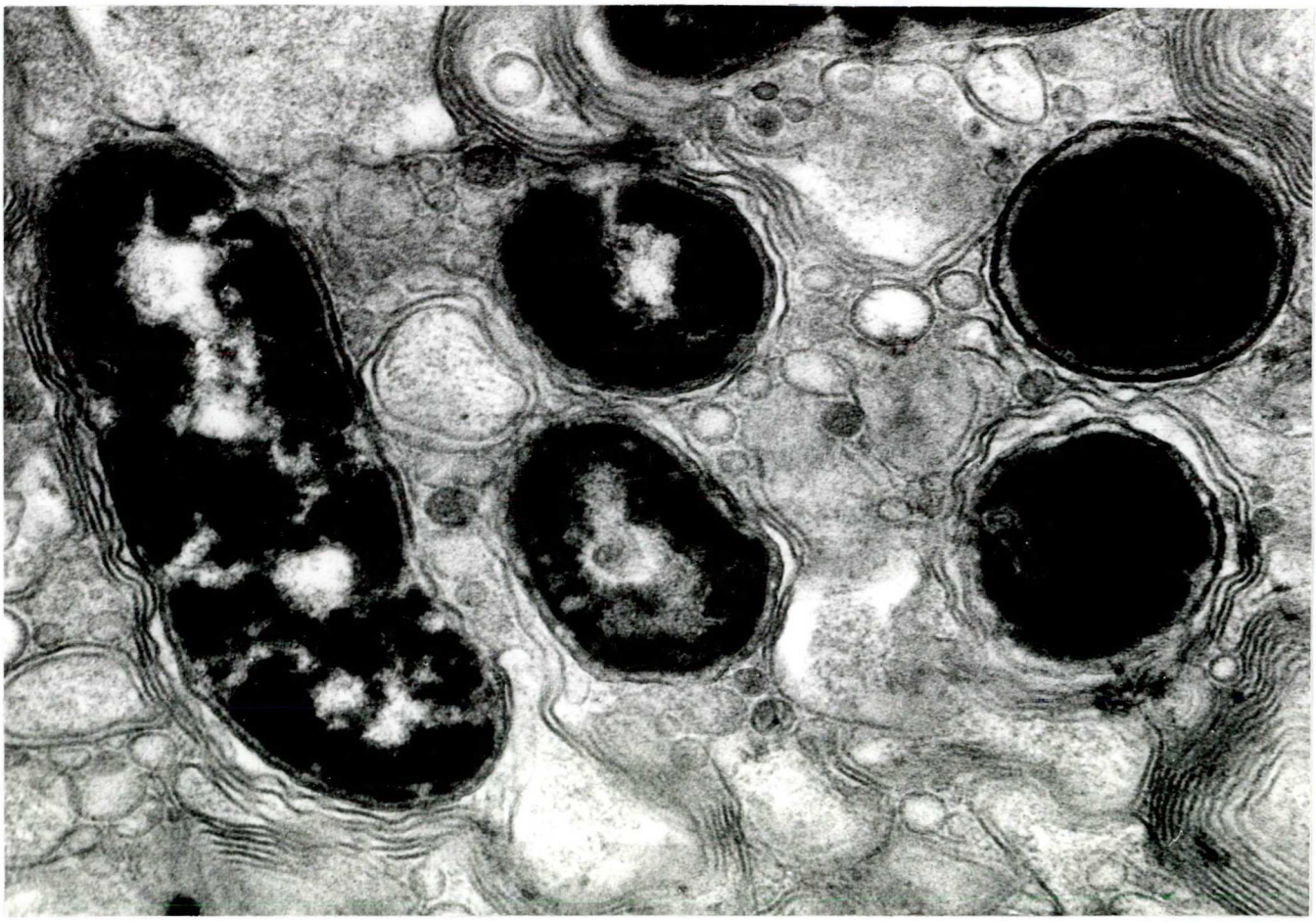
17. ábra. 6 napos PN. A distalis csatorna űrterét PMNG-kből és macrophagókból álló kompakt sejtes cylinder tölti ki. A macrophagok nagyméretű phagolysosomáiban degradálódó baktériumok /csillag/ ismerhetők fel.

4500 x



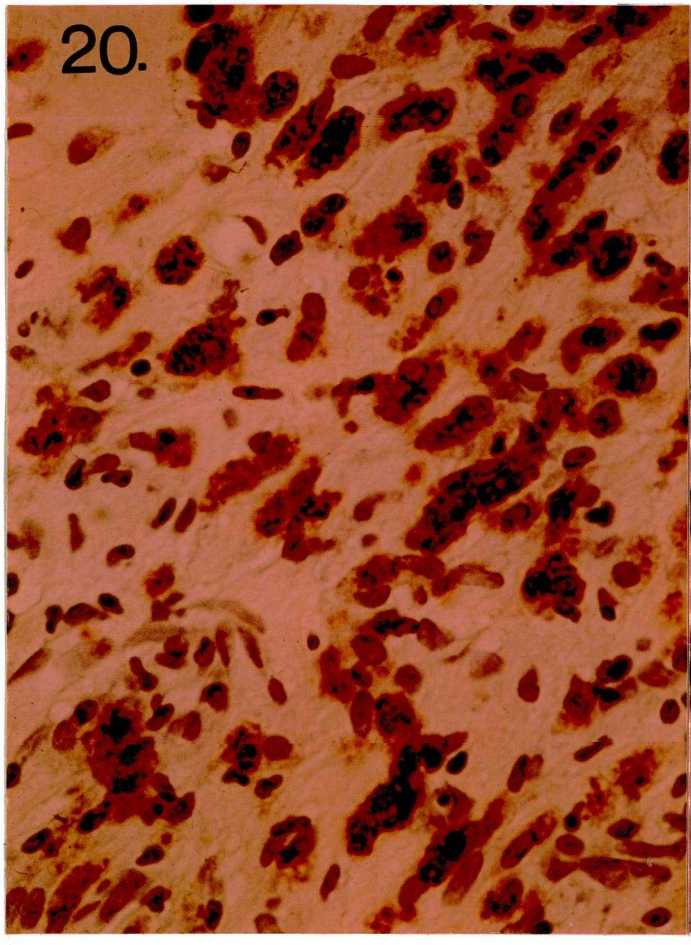
18. ábra. 6 napos PN. A tubulushám teljesen eltűnt. A tekervényessé vált, néhol többrétegű /nyíl/ tubuláris basalmembránhoz mindkét oldalról lobsejtek simulnak. A macrophagok phagolysosomáiban /nyílhegy/ többé-kevésbé károsodott baktériumok vannak.

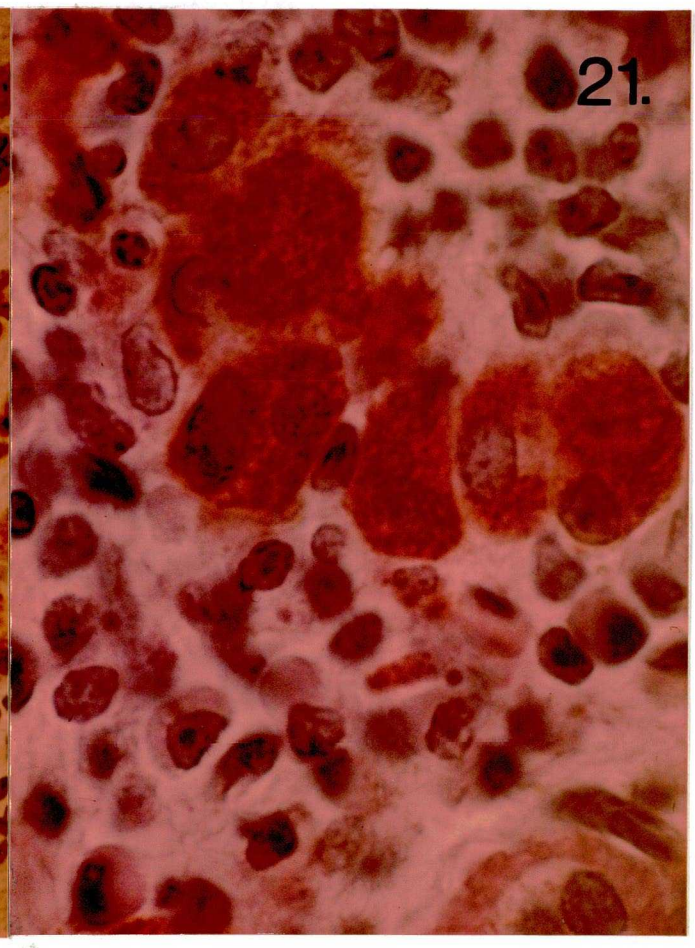
5000 x



19. ábra. 6 napos PN. Macrophag phagolysosoma részlet. A hossz- és keresztmetszetben látszó mikroorganizmusok fala eltérő mértékben károsodott. Jól megfigyelhető a kórokozók és a körülöttük képződött párhuzamos rajzolatú vonalszerű képletek, az ún. „myelin-figurák" szoros kapcsolata.

66000 x



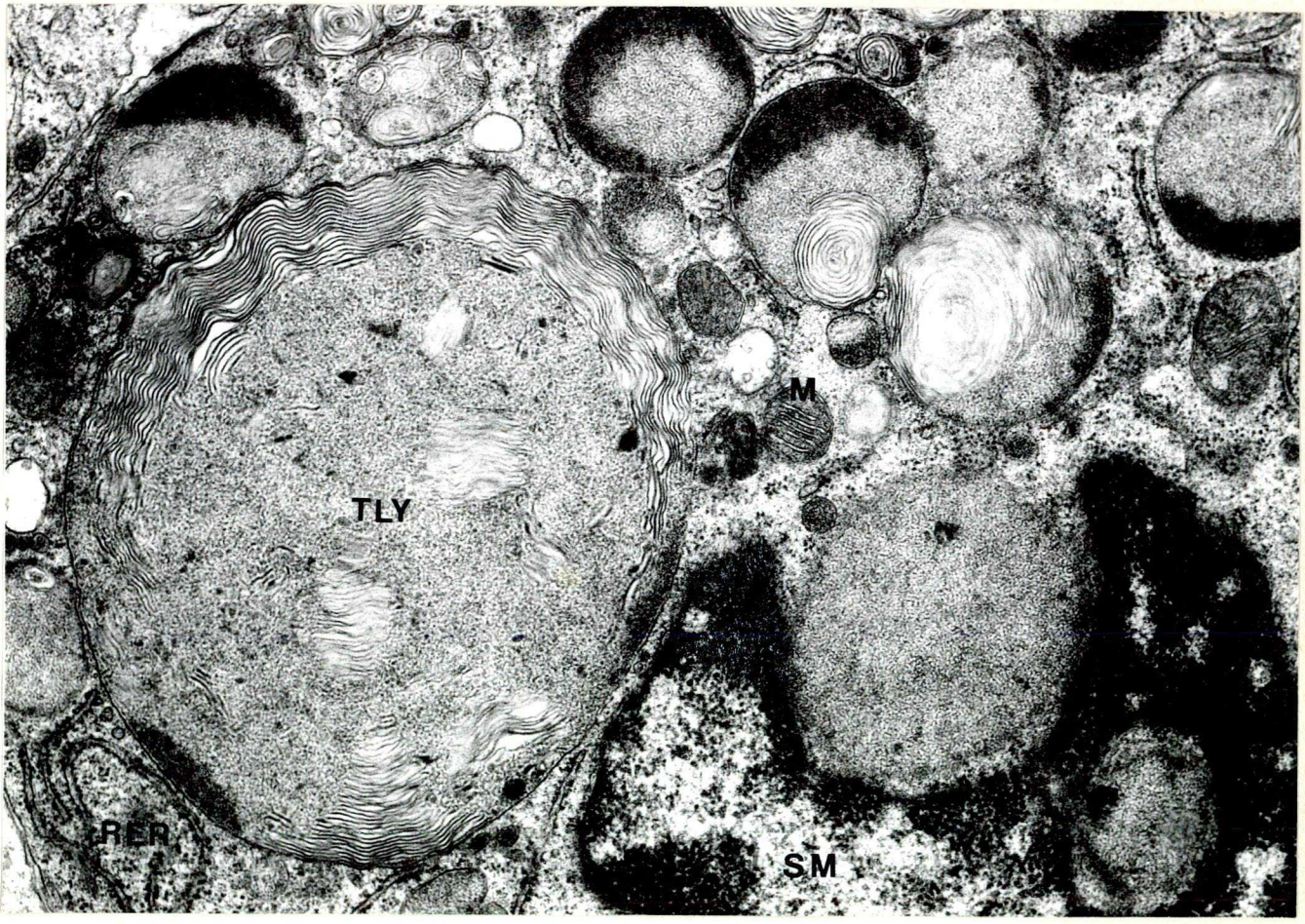


2o. ábra. 2 hetes PN. A heveny gyulladásos jelenségek lezajlása után képződött sarjszövetben az immunhisztokémiai módszerrel barnára festődő bakteriális antigén macrophagokban lokalizálódik.
PAP-reakció + H, 560 x

21. ábra. 3 hetes PN. A PAS pozitív interstitiális macrophagok egyrészének cytoplasmájában a PAS pozitív anyaggal együtt az E. coli antigént jelző barna granuláris csapadék is jelen van.
PAS +PAP-reakció +H, 1400 x

22. ábra. 3 hetes PN. A heges szövetben elhelyezkedő macrophagok cytoplasmáját telolysosomák töltik ki. A sejteket nagymennyiségű collagen-rost veszi körül.

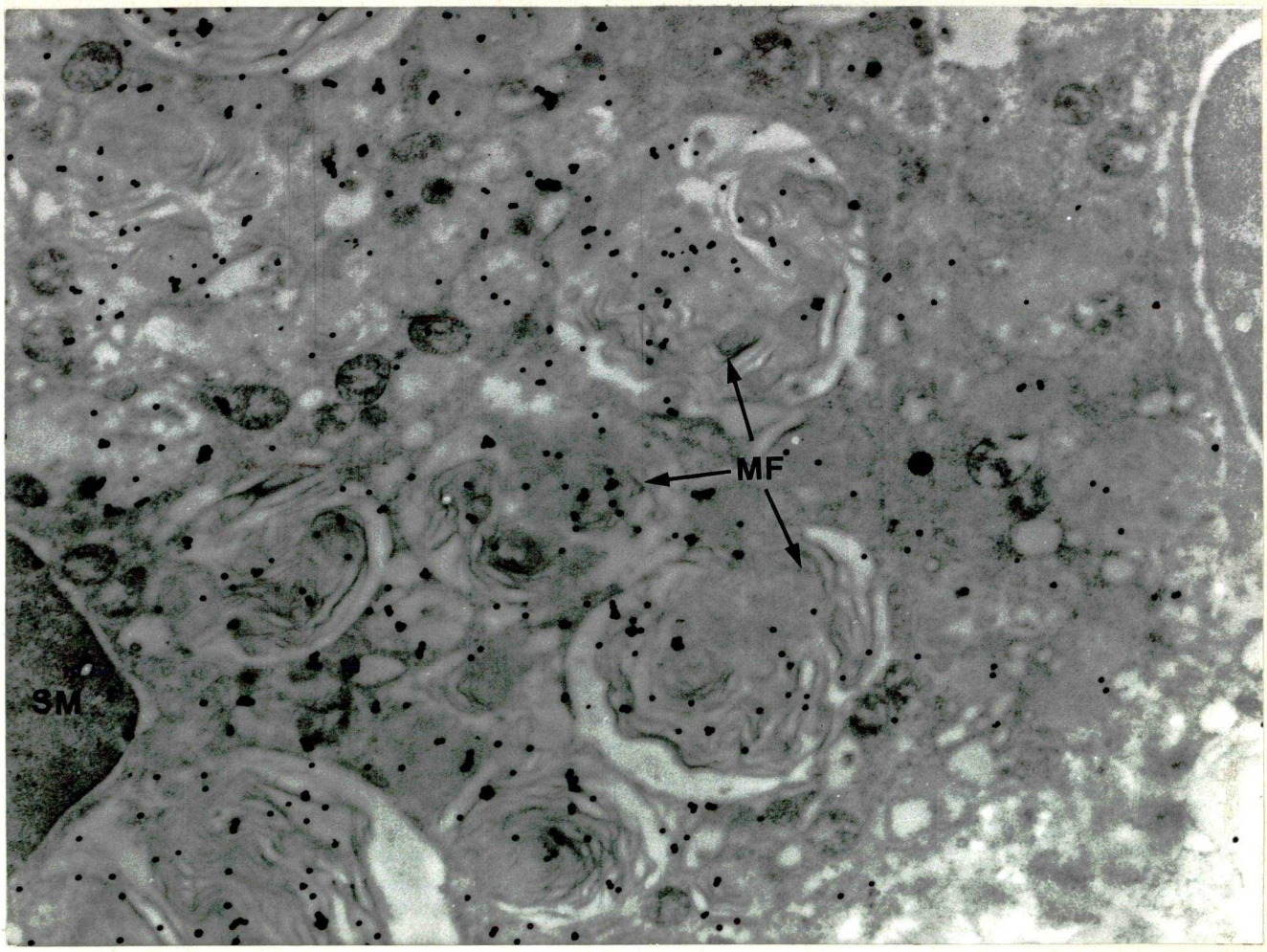
2800 x



23. ábra. 3 hetes PN. Macrophag-részlet. A telolysosomákat myelin-figurák, valamint félhold alakban erősen, másutt gyengébben elektrondenz anyag tölti ki.

28000 x

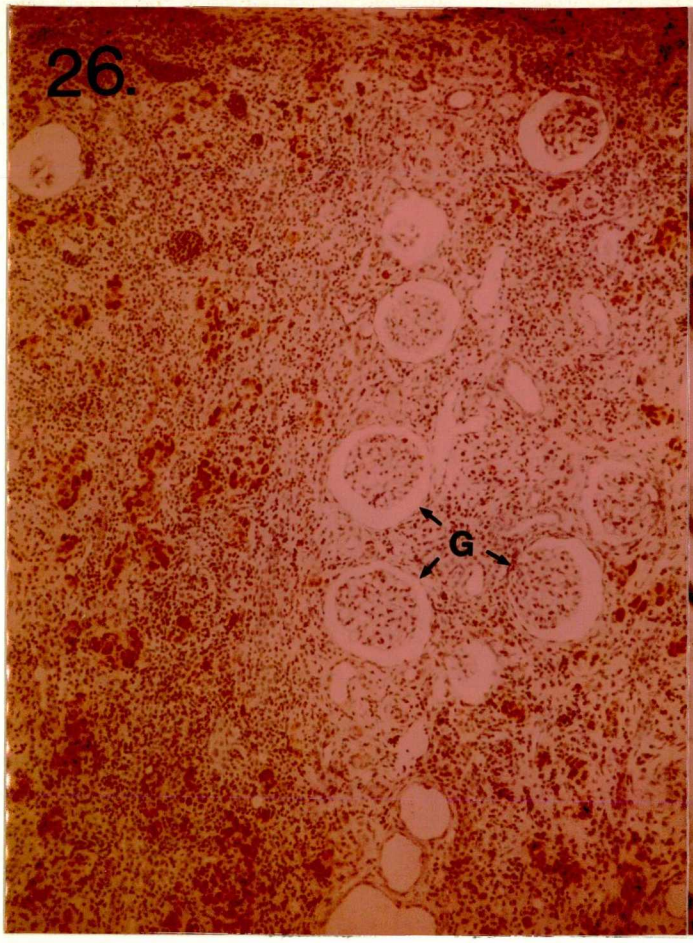
SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 14.



24. ábra. 2 hetes PN. A bakteriális antigént jelölő kolloid aranyszemcsék myelin-figurákhoz kötötten, elsősorban a macrophag phagolysosomáiban helyezkednek el. Elszórtan néhány részecske más organellumokon is látszik.

IE, 25000 x

25. ábra. 4 hetes PN. A jobb oldali, beteg vese, a bal oldali egészségeshez képest zsugorodott, felszinén durva behúzódások, metszlapján a papilla deformitása /nyíl/ látszik.

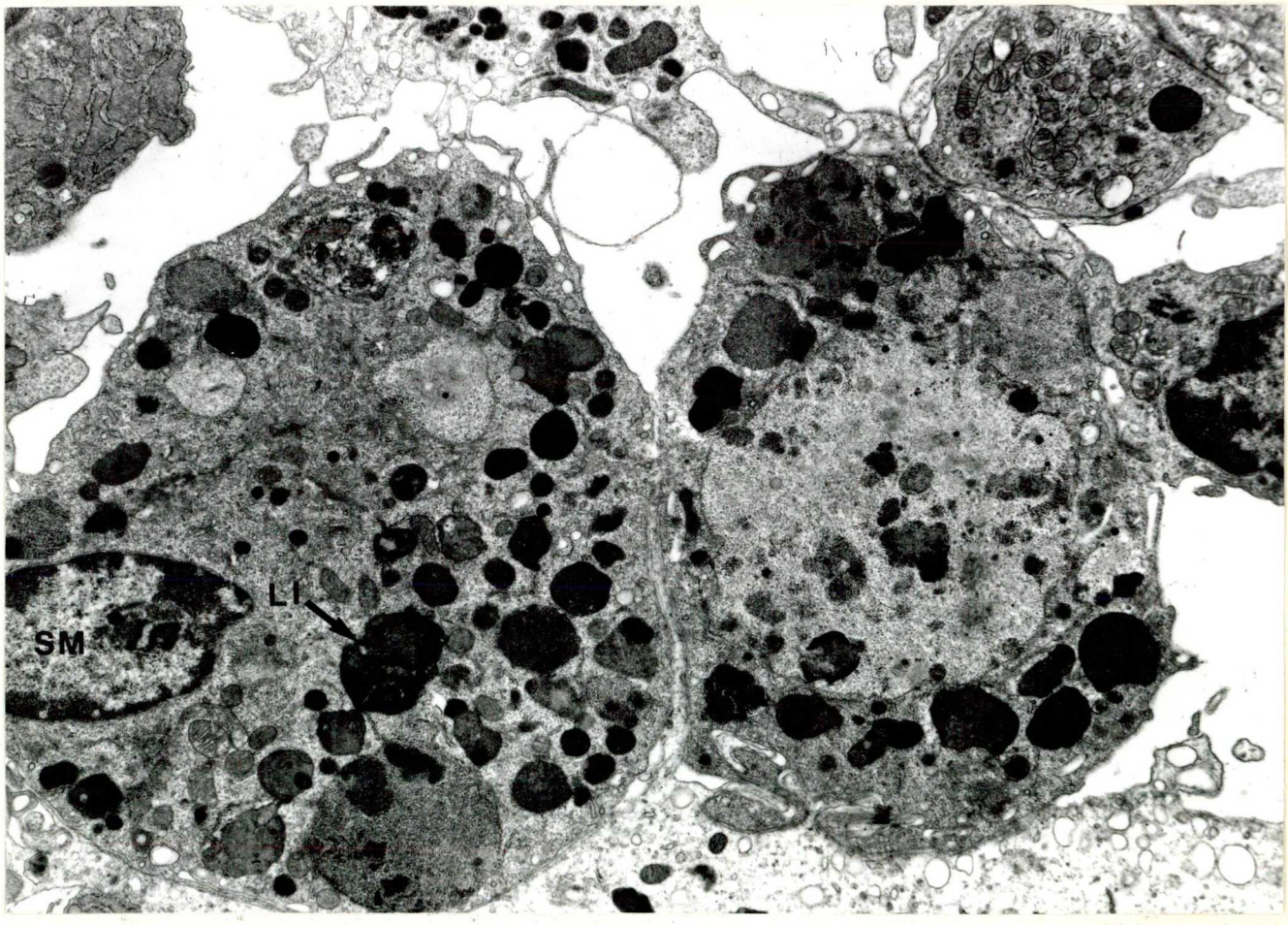


26. ábra. 4 hetes PN. Átnézeti képen súlyos parenchyma-pusztulás látszik. Tubulusok már nem ismerhetők fel, az épnek tűnő glomerulusok közel kerültek egymáshoz. Az interstitium sejtjeiben E. coli pozitivitás /barna/ még kimutatható.

PAP-reakció +H, 90 x

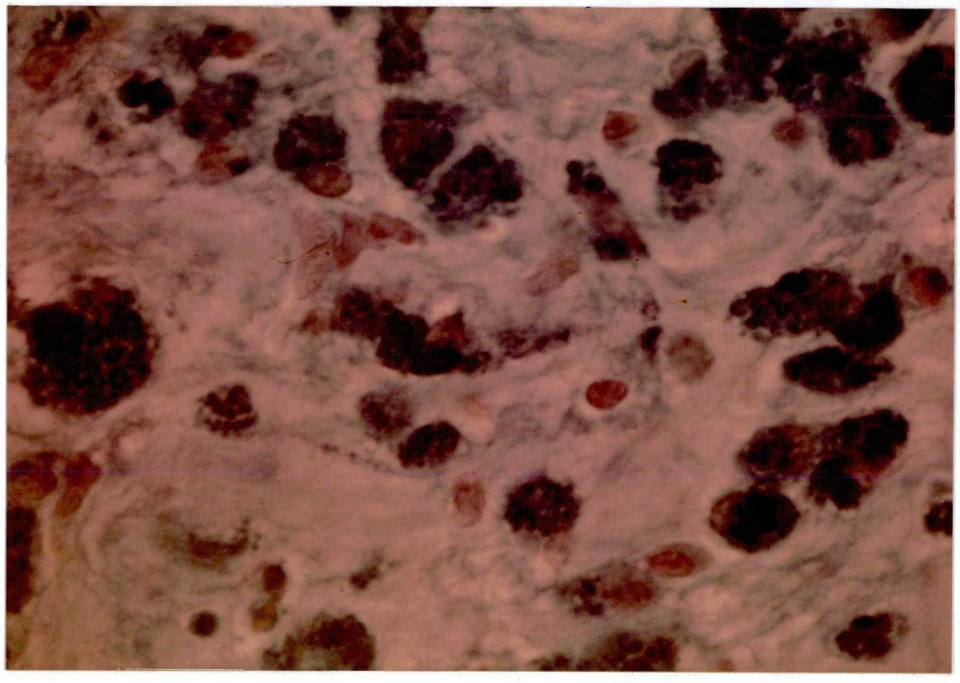
27. ábara. 4 hetes PN. Az E. coli antigén / barna / a gyűtőcsatorna sejtes cylinderének macrophagjaiban lokalizálódik.

PAP-reakció + H, 560 x



28. ábra. Egy hónapnál idősebb elváltozásokban felszaporodó inaktív macrophagok. A residuális testek tartalma lipofuscin maradékpigment elektronmikroszkópos képére emlékeztet. A sejtek enzimtartalmú granulumokkal nem rendelkeznek, egyéb sejtalkotókban szegények.

7500 x



29. ábra. A tanulmányozott időszak végén a macrophagok fokozott lipofuscin tartalmát kék színreakció jelzi.
Schmorl-reakció + H, 880 x

VII. MEGBESZÉLÉS

A human PN-hez hasonló elváltozások patkányban való előidézéséhez igen virulens E. coli törzsre van szükség /9/. A virulencia egyik fontos tényezője a baktériumok human P-vércsoportú vvt. agglutináló képességével jellemezhető/36/. Az ún. „P-fimbriákkal" rendelkező - általunk is használt - pyelonephritogen E. coli-val haematogen úton erőteljes, az egész vesét érintő megbetegedés alakítható ki /43/. Kísérletes haematogen PN-ben azonban a nagymennyiségban beadott baktérium okozta systemás endotoxin-shock az állatok jelentős részét a vizsgálati idő előtt elpusztíthatja /37/. Ascendáló modellben az elhullás jóval csekélyebb mértékű, ugyanakkor a megbetegedés kevésbé markáns morfológiai következményekkel jár /16/. Ezért kísérletünkben haematogén modellt használtunk. A systemás endotoxin-shockot a baktériumtenyészet előzetes egészséges patkányvesén történő többszöri passzálásával és újratenyésztésével jelentős mértékben mérsékelni tudtuk.

A veseparenchyma megfelelő rögzítése - különösen gyulladt szövet esetében - igen nehéz. A paraformaldehidből frissen készült formalin gyorsan diffundál a szövetekbe, azonban membránstrukturák megőrzésére nem alkalmas, mivel már 2 %-os pufferes oldatának osmolalitása is magasabb a fiziológiásnál /~500 mOsm/. A glutáraldehid a formalinnál lassabban hatol át a szöveti hártyákon, a membránok szerkezetét jól megőrzi, ugyanakkor az antigének egyrészében

maradandó károsodásokat okozhat / 11/. Ezért a fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémiai vizsgálatokhoz viszonylag alacsony koncentrációjú glutáraldehidből és paraformaldehidből álló rögzítőszert használtunk. A nephron különböző szakaszai eltérő érzékenységet mutatnak hyper-, vagy hyposmotikus szöveti fixáló oldatokra. Míg a glomerulusok szerkezete erősen hyperosmotikus 4 %-os neutrális formalinban is /~1900 mOsm/ viszonylag jól megtartott és a distalisabb csatornaszakaszok is jelentősebb strukturális abnormalitások nélkül tűrik a fiziológiásnál kissé magasabb osmotikus nyomást, a proximalis kanyarulatos csatornaszakaszok igen érzékenyek ilyen tekintetben /63/. Azoknál a rögzítőszereknél, ahol a fiziológiáshoz hasonló ionösszetételű puffer-oldat csak alacsony osmotikus aktivitású glutáraldehidet tartalmazott, az osmosis-nyomást nátriumkloriddal a proximalis kanyarulatos csatornák rögzítésére optimálisnak tartott 354 mOsm-ra állítottuk be.

A membránok ultrastrukturális megőrzése ozmiumtetroxidos rögzítéssel érhető el legjobb hatásfokkal /11/. Az elektronmikroszkópos immunhisztokémiában és enzimhisztokémiában azonban antigén - és enzimkárosító hatása miatt nem alkalmazhattuk. Ezért ezeken a metszeteken az ultrastruktúra nehezebben ismerhető fel.

Az antitestek előállítására /71/, a polivalens savók nemspecifikus ellenanyagainak eltávolítására szelektív eljárások: ismeretesek /12/. Ezek többsége eszköz- és anyagigényes, alkalmazásuk gyakorlott szakembert kíván. Monoclonalis ellenanyagok ma még nehezen hozzáférhetők, sőt tudomásunk szerint az általunk használt E. coli törzzsel szemben

termelt monoclonalis ellenanyag kereskedelmi forgalomban sehol sem szerezhető be. Így olyan immunizálási és savó előállítási eljárást kellett választanunk, mely elméleti immunológiával nem foglalkozó intézetben is megvalósítható. Az immunizálást nyúlban végeztük, hogy az immunsavót első antitestként sertés-anti-nyúl savóval és nyúlban termelt PAP komplex-szel, ill. kolloid arannyal jelölt anti-nyúl savóval a fény- és elektronmikroszkópos immuntechnikában használni tudjuk. Jó immunválaszt a komplett Freund-adjuvánssal bevezetett, intravénásan folyatott immunizálással kaptunk.

A beágyazott blokkokból készült metszeteken végzett immunhisztológiai reakciók érzékenységét a rögzítés és beágyazás során fellépő antigénveszteség csökkenti /11/. Ennek minimalizálását célozva a vesedarabokat rövid ideig utórögzítettük és a beágyazás során a fénymikroszkópos blokkoknál a paraffin hőmérsékletét 60°C alatt, elektronmikroszkópos blokkoknál az LR White műgyanta polimerizációs hőmérsékletét 52°C alatt tartottuk. Az 1-5 µm vastag fénymikroszkópos metszetek az antigént olyan mennyiségben tartalmazták, amely kimutathatóságukat az egész vizsgálati idő alatt lehetővé tette.

Az előállított polivalens savóban, a tisztítás és kimerítés után maradt nemspecifikus immunglobulinok mennyisége a fénymikroszkópos immunhisztokémiai reakció eredményét nem zavarta. A 80-100 nm vékony elektronmikroszkópos metszetek már lényegesen kisebb mennyiségű antigént tartalmaztak. Ennek következében, valamint a rögzítés és beágyazás

során károsodott, feltehetően jelentős mennyiségű antigén miatt, a baktériumokon csak kevés aranyszemcse lokalizálódott.

Nativ anyagból fagyasztó ultramikrotómmal készült vékony metszeteken lényegesen több jelzőanyag képes a baktériumokhoz specifikusan kötődni /79/. Az aranyszemcsék nemspecifikus kapcsolódását nem tudtuk teljes mértékben kiküszöbölni. Különösen néhány-hetes elváltozásokban a sejtmagokon észlelt nemkívánt reakció volt szembetűnő. Ennek ellenére a jelzőanyag bizonyos helyeken való feldúsulása a többi morfológiai vizsgálat eredményével összevetve lehetővé tett az antigén intracelluláris sorsára vonatkozó következtetéseket is.

A patkányvese rögzítése, valamint beágyazása során szerzett tapasztalatainkat biopsiával nyert human veseszövet immunhisztokémiai feldolgozásában tudjuk hasznosítani.

A kísérleti állat keringésébe juttatott E. coli néhány óra alatt megjelenik a vizeletpangással károsított veseszövetben /92/ A heveny gyulladásos sejtek szöveti infiltrációját elsősorban a mikroorganizmusok által aktivált komplement-rendszer /87/ egyes elemei, valamint kisebb mértékben a baktériumokból felszabaduló oldható faktorok közvetlen kemotaktikus ingere indítja el /1o8/. A komplement-inaktivátor kobra méreg erőteljesen csökkenti a PMNG infiltrációt /99/. A marginálódó lobsejtekkel borított érfalak átjárhatóságát a neutrophilekből felszabaduló /1o9/, valamint aktivált komplement eredetű anyagok elősegítik /84/.A helyileg felszabadult prostaglandinok fokozzák a permeabilitási faktorok hatását /41/.

Az erőteljes és folyamatos kemotaktikus inger következtében felszaporodó leukocyták degranulációjából származó enzimek az érfalak endotheljét maradandóan károsítják /83/. A képződött szakadásokon keresztül hatalmas mennyiségű baktérium és gyulladásos sejt jut az interstitiumba /43/. Kezdetben a bakteriális antigént az infiltrátumban döntő többségben levő PMNG-ák és kisszámú macrophag phagolysosomáiban tudtuk kimutatni. Ekkor a baktériumok elektronmikroszkópos megjelenésük alapján is azonosíthatók voltak.

A neutrophilekben a phagocytosis által kiváltott metabolikus aktiválódás hatására keletkezett enzimek és reaktív oxigén származékok exocytosis révén a veseparenchymát is károsítják /28/, és a tubuláris basalmembrán focalis folytonossági hiányát okozzák /43/. A réseken át a gennyes interstitiális infiltrátum egyrésze a károsodott tubulusok űrterébe jut, sejtes cylindereket képez, majd a nephronon végighaladva a vizelettel eltávozik/6/. A cylindereket képező lobsejtekkel az általunk phagocytált baktériumok is kiürülnek. Ahol a tubulusfal rupturák közelében korábban nagyszámú szabad kórokozó volt, a károsodott tubulusok lumenében kialakuló „baktérium-felhők" gyulladásos sejtet alig tartalmaznak. Az uroepitheliummal kapcsolatba jutott kórokozókat a proximális kanyarulatos csatornaszakaszok képesek phagocytálni.

A baktériumtartalmú phagosomák és a savanyú-foszfatáz enzimreakcióval feltüntetett lysosomák egyesülését követően phagolysosomák képződését figyeltük meg. Mivel a lysosomális enzimek nem képesek a nagyszámban felvett baktérium elpusztítására, ezért a sejtek irreverzibilisen károsodnak.

csupán alapi hártyájuk áll ellent a bakteriális endotoxin hatásának. A baktériumok kezdeti adhéziójában fontos szerepük lehet a tubuláris hámsejtek felszíni receptorainak és a receptorokhoz kötődő bakteriális ligandumoknak (36). Húszonnégy órás egyoldali ureter elzárás nem fokozza a tubuláris folyadék nyomását, így hydrostatikai tényezők valószínűleg nem befolyásolják a baktériumfelvételt (110). A distalis és gyüjtőcsatornák baktérium-phagocytosist nem mutatnak. Tubuláris fehérje-reabsorptióra szintén csak a proximalis kanyarulatos csatorna képes (33).

A PMNG-ák szöveti infiltrációja mindaddig zajlik, amig baktériumok vannak jelen, ill. jutnak be a veseszövetbe. A phagocytasejtekből regurgitálódó enzimek a veseparenchymán és a baktériumokon kivül magukat a lobsejteket is károsítják. Az elváltozás 4. - és 6. napja között a PMNG-k nagyrésze necrobiotikussá válik, ill. eliminálódik. A gyulladás heveny szaka ezzel lezárul. Az infiltrátumban már korábban is jelenlevő, ekkorra felszaporodó macrophagok phatocytálják a még kimutatható baktériális antigént és a károsodott sejtek törmelékeit. A phagocytotikusan aktív macrophagok a tekervényes alapi hártya maradványokat is körülveszik. PAS reakcióval az interstitiális macrophagok nagyrészében phagocytált mucopoliszacharidok mutathatók ki /17,102./ A PAS pozitív sejtek egyrészében direkt módszerrel baktérium antigén egyidejű jelenlétét is igazoltuk. A PAS pozitív anyag feltehetően a phagocytált tubuláris basalmembrán, valamint mikroorganizmus sejtfal lebomlásából származik.

Az acut gyulladás helyén más mononucleáris sejtek is megjelennek. A helyi humorális immunválaszra lymphocyták és plasmasejtek hívják fel a figyelmet. A három fő immunglubolin osztályba / IgG, IgA, IgM / tartozó specifikus antitestek a szérumban már az acut fázis végén megjelennek (96). Antibakteriális ellenanyagok mind a K-, mind az O-antigénnel, mind a pilusokkal szemben termelődnek (81). A humorális immunválasz azonban nem eléggé hatékony a baktériumok elszaporodásának megakadályozásában(66).

Az interstitiális macrophagok PAS pozitivitásának megjelenésével egyidőben elektronmikroszkóposan egyre több, myelinfigurákat tartalmazó telolysosomákkal telt macrophag figyelhető meg. Ultrastrukturális immunhisztokémiával myelinfigurákban bakteriális antigént mutattunk ki. Az elváltozás 4. hete után a myelin-figurák fokozatosan amorf elektrondenz granulumokká alakulnak át. Fénymikroszkópos Schmorl-reakcióval redukáló képessége alapján az intracytoplasmatikus anyag lipofuscin maradék-pigmentnek bizonyult. A lipofuscin pigment a zsírmetabolizmus terméke, valószinűleg sejtfali eredetű lipidek emészthetetlen maradéka (29,77). A lipofuscinnal telt macrophagok sejtorganellumokat alig tartalmaznak, ami az inaktiválódást tükrözi.

A bakteriális antigén fokozatosan csökkenő, de még jelentős mennyiségben - a cylindereket képező, valamint az interstitiálisan elhelyezkedő macrophagokban még 7 héttel a fertőzést követően is perzisztál. A bakteriális antigén lassú kiürülésében a sejtes immunitás supressor sejtek általi gátoltsága is szerepet játszik. (67).

A csökkent T-sejt aktivitás a mérsékelt lymphokin felszabadításon keresztül korlátozott macrophag funkciót eredményez (59). A lymphokinekhez hasonló, a macrophagok migrációját gátló faktor az E. coli tenyészetéből is izolálható (1o5).

A késői elváltozásban a szövethiány pótlásában collagenrostokat termelő fibroblastok is részt vesznek (43). A fibroblastok simaizom tulajdonságokkal rendelkeznek, így fontos szerepet játszanak a hegszövet, s így a vese zsugorodásában (73). Szövetpusztulás csak a gennyes gyulladás, általunk korai elváltozásnak nevezett fázisában figyelhető meg. Ekkor a masszív, de a baktériumok elszaporodását megakadályozni nem tudó PMNG infiltráció, a felszabaduló enzimek és reaktív oxigén-gyökök révén a legfontosabb károsító tényező (6, 94, 99). A bakteriális endotoxin a phagocytosist mutató proximális kanyarulatos csatornahámban játszik közvetlen szövetkárosító szerepet. A keringés stasisig fokozódó lassulása, valamint az interstitium gyulladásos kiszélesedése következtében kialakuló ischaemia is oka a veseszövet irreverzibilis destrukciójának (44).

A heveny gyulladásos jelenségek lezajlása után, még hónapokig kimutatható bakteriális antigén nem hozza létre a gyulladásos szövetpusztulás progresszióját. A morfológiai kép a spontán gyógyulás jeleit mutatja.

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizeletpangással előzetesen károsított patkányvesében heveny gennyes pyelonephritist hoztunk létre, az állat keringésébe intravénásan bejuttatott nagyszámú E. coli-val.

A vesegyulladás lezajlása során a baktérium, ill. somatikus antigénjének lokalizációját és eliminációját tanulmányoztuk. A morfológiai megjelenés alapján már nem azonosítható bakteriális anyag immunhisztokémiai kimutatásához, a kórokozó tenyészetének - főként O-antigént tartalmazó - kivonatával szemben immunsavót készítettünk nyúlban. A tisztított és megfelelően jellemzett polivalens savó felhasználásával fénymikroszkópos PAP technikát és ultrastrukturális immunhisztokémiai módszert állítottunk be a baktérium sorsának nyomonkövetésére.

Az elváltozás heveny szakában a baktériumok egyrésze phagocytált formában az interstitium gennyes beolvadásai és a sejtes cylinderek polymorphmagvú neutrophil granulocytáinak, - kisebb számban - macrophagjainak, valamint a gyulladt területek környezetében elhelyezkedő proximalis kanyarulatos csatornák hámsejtjeinek phagosomáiban és phagolysosomáiban volt. Mikroorganizmusokat egyes tubulusok lumenében és az interstitiumban szabadon is észleltünk. Az elváltozás morfológiai képe és a bakteriális antigén lokalizációja a 6. nap után lényegesen megváltozott. A tályogok „genny sejt halmazai" és a tubuláris „baktérium-felhők" eltüntek.

Helyükön mononucleáris sejteket tartalmazó sarjszövet alakult ki. A bakteriális antigén a heges szövet és a sejtes cylinderek mycrophagjaiban volt kimutatható. A baktériumok a 8. nap után már elektronmikroszkóppal sem voltak felismerhetők. Néhány hetes elváltozásban a macrophagok cytoplasmája myelin-figurákat magukban foglaló telolysosomákkal volt zsúfolásig kitöltve. Ultrastrukturális immunhisztokémiai módszerrel kimutattuk, hogy a myelin-figurák vonalszerű képletei E. coli-ból származó antigént is tartalmaznak. A macrophagok egyrésze PAS pozitív, feltehetően bekebelezett alapi hártya eredetű anyagot, valamint kórokozó antigént egyaránt magában foglal. A 4. hét után a myelin-figurák nagyrésze amorf elektrondenz termékké alakult át, ugyanakkor a PAS pozitív macrohagok száma is csökkent.

A Schmorl-reakcióval pozitív, elektronmikroszkópos megjelenésében lipufuscinra emlékeztető maradékpigmentet tartalmazó macrophagok E. coli pozitivitást alig, vagy egyáltalán nem mutattak. A 7. hét elteltével a bakteriális antigén macrophagokban perzisztált, ugyanakkor a folyamat a spontán gyógyulás jeleit mutatta. Az immunhisztokémiailag intracellulárisan kimutatott antigén már nem fokozta a gyulladásos reakció mértékét és a következményes szövetpusztulást.

A jegyzőkönyvben alkalmazott jelölések magyarázata

VKM Az érintésvédelem az MSz 172/1-72. K. /1978.M.1981./ sz. lo.621 pontjában előirt kioldási feltételeket kielégiti, megfelelő.

ÉVH Az érintésvédelem az előirt kioldási feltételeket nem elégiti ki, vagy nincs kiépitett érintésvédelem, nem megfelelő.

EPM Egyenpotenciálon van, megfelelő.

EPN Nincs egyenpotenciálon, nem megfelelő.

NU Alkalmazott érintésvédelmi mód: nullázás

TF Törpefeszültségről üzemelő villamos berendezés.

VF Védőföldeléssel ellátott villamos berendezés

ÁVK Áramvédőkapcsolás

FVK Feszültségvédő kapcsolás

KSz Kettős szigetelés

VE Védőelválasztás

EB Elkerités, burkolás

ESZ Elszigetelés

MSz Megerősitett szigetelés

SZB Szigetelő burkolat

TF-TN Törpefeszültségről üzemelő villamos berendezés a hálózatra való csatlakoztatása szabványtalan /dugalj és dugvilla tipusa nem megfelelő/, az MSz. 16oo/1-77. sz. 6.34 pontja szerint.

SZN Szabványtalan nullázás, nem megfelelő.

VF-AT Védőföldelés önálló alkalmazása nullázott hálózaton tilos !

E Egyszerü érintésvédelmi fokozat

F Fokozott érintésvédelmi fokozat

P Patkolt /áthidált/ biztositó alkalmazása tilos az MSz. 16oo/1-77. sz. 6.53 pontja szerint.

ÜK Üzemen kivüli villamos berendezés.

sz.n. számnélküli, olvashatatlan adattábla, vagy nincs adattábla, nem megfelelő.

KSZJ Kettős szigetelés jellegü

MF Megfelelő

NM Nem megfelelő

TJ Tájékoztató jelleggel

MS-84-221 VGV.

IX. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK ÉS ELŐADÁSOK A TÉMÁBAN:

1. Iványi B. Krenács T. Petri S. Farkas Z. Ormos J.: Phagocytosis of bacteria by tubular cells in experimental pyelonephritis. Proc. Eighth European Congress on Electron Microscopy, Budapest, Life Sciences II,, 3. kötet, 2331-2332, 1984.

2. Krenács T. Iványi B. Csókási Zs. Petri S. Lantos J.: Escherichia coli ellenes immunsavó készítése és immunhisztokémiai felhasználása kisérletes pyelonephritis morfológiai vizsgálatokhoz. Kisérletes Orvostudomány, 37:243-247, 1985.

3. Iványi B. Krenács T. Lantos J.: Immunocytochemical detection of Escherichia coli in experimental pyelonephritis. International Symposium on Histochemistry, Debrecen, Előadáskivonatok, 130, 1985.

4. Iványi B. Krenács T. Petri S.: Phagocytosis of bacteria by proximal tubular epithelium in experimental pyelonephritis. Virchows Arc. B., /közlésre elfogadva/.

5. Iványi B. Krenács T. Petri S.: A proximalis kanyarulatos csatornák baktériumphagocytosisa kisérletes pyelonephritisben. Morphol. Ig. Orv. Szemle, /közlésre elfogadva/.

SZTE Bérczemi Könyvtár SZEGED 14.

6. Iványi B. Krenács T. Petri S.: Vesetubulusok baktériumphagocytosisa kisérletes pyelonephritisben. Fiatal Kutatók Tudományos Fóruma, Szeged, 1984. április 12.

7. Iványi B. Krenács T. Petri S.: Bacterial tubular phagocytosis in experimental pyelonephritis. Martin-Luther-Iniversität Halle-Wittenberg, Pathologisches Institut, Freundschafts-symposium, Halle, 1984. április 12.

8. Krenács T. Iványi B.: Escherichia coli kimutatása kisérletes pyelonephritisben immunhisztokémiai módszerekkel. SZAB-SZOTE Tudományos Ülés, Szeged, 1985. április 2.

X. IRODALOM

1. Angell M.E. Relman A.S. Robbins S.L.: „Activ" chronic pyelonephritis without evidence of bacterial infection. New Engl.J. Med. 278: 1303-1308, 1968.

2. Aoki S. Imamura S. Aoki M. McCabe W.R.: „Abacterial" and bacterial pyelonephritis: Immunfluorescent localisation of bacterial antigen. New Engl. J. Med. 281: 1375-1382, 1969.

3. Aronson M. Medalia O. Schori L. Mirelman D. Ofek I.: Prevention of colonization of the urinary tract of mice with E. coli by blocking of bacterial adherence with methyl α-D-mannopyranoside. J. Infect. Dis. 139: 329-332, 1979.

4. Barka T. Anderson P.J.: Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as a coupler. J. Histochem. Cytochem. 10: 741-758, 1962.

5. Bash J.A. Waksman B.H.: The supressiv effect of immunization on the proliferativ responses of rat T cells in vitro. J. Immunol. 114: 782-787, 1975.

6. Bille J. Glauser M.P.: Protection against chronic pyelonephritis in rats by supression of acute suppuration: Effect of colchicine and neutropenia. J. Inf. Dis. 146: 22o-226, 1982.

7. Bourne J.A.: Handbook of immunoprexidase staining methods, Dako Corp. Santa Barbara, 1983.

8. Braude A. Shapiro A.P. Simienski J.: Hematogenous pyelonephritis in rats: III. Relationship of bacterial species to the pahogenesis of acute pyelonephritis. J. Bacteriol. 77: 270-280, 1959.

9. Brooks S.J.D. lyons J.M. Braude A.I.: Immunization against retrograde pyelonephritis. Am. J. Pathol. 74: 345-358, 1974.

lo. Brumfitt W. Heptinstall R.H.: Experimental pyelonephritis: The influence of temporary and permanent ureteric obstruction on the localization of bacteria. Brit. J. Exp. Pathol. 39: 610-617, 1958.

11. Bullock G.R.: The current status of fixation for electron microscopy: a review. J. Microscopy, 133: 1-15, 1984.

12. Clausen J.: Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules, 2. javított kiadás, Elsevier, Amsterdam, Preparation of antisera and purification of antibodies 218-221.; Double immunodiffusion 233-234, 1981.

13. Coons A.H. Creech H.J. Jones R.N.: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 47: 200-2o2, 1941.

14. Coons A.H. Kaplan M.H.: Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. Exp. Med. 91: 1-12, 1950.

15. Cotran R.S.: Retrograde Proteus pyelonephritis in rats: Localization of antigen and antibody in treated sterile pyelonephritic kidney. J. Exp.Med.117: 813-822, 1963.

16. Cotran R.S. Thrupp L.D. Hajj S.N. Zangwill D.P. Vivaldi E. Kas H.: Retrograde E. coli pyelonephritis in the rat: A bacteriologic, pathologic, and fluorescent antibody study.J.Lab. Clin. Med. 61: 987-1004, 1963.

17. Cotran R.S.: The renal lesion in chronic pyelonephritis: Immunflurescent and ultrastructural studies. J. Infect. Dis. 12o: 1o9-117, 1969.

18. Czirók É. Csík M. Börzsönyi M.: Incidence in enteritis of Enterobacteriaceae isolates possessing human colonization factor antigen. New human colonization factors. Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 28: 119-127, 1981.

19. Davis B.D. Dulbecco R. Fisen H.N. Ginsberg H.S. Wood W.B. Mc Catry M.: Microbiology inculuding immunology and molecular genetics, 2. kiadás, Harper-Row, Hagerstown, The enteric bacilli and similar Gram-negatív bacteria: Antigenic structure 759-765,; E. coli 767-769, 1973.

2o. De Navasquez S.: Experimental pyelonephritis in the rabbit produced by staphilococcal infection. J. Pathol. Bact. 62: 429-436, 1950.

21. De Navasquez S.: Further studies in experimental pyelonephritis produced by various bacteria, with special reference to renal scarring as a factor in pathogenesis J. Pathol. Bact. 71: 27-26, 1956.

22. Erdei A. Fésűs L. Rajnavölgyi É.: Immunological methods. A FEBS „Immunological methods and applications" cimmel tartott haladó tanfolyamának kiadványa. Göd. ELTE 1981.

23. Falini B. Taylor C.R.: New developments in immunoperoxidasa techniques and their application. Archives of Pathol. Lab. Med. 107: 1o5-117, 1983.

24. Fantone J.C. Ward P A.: Role of oxigen derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reaction. Am. J. Pathol. 107: 397-418, 1982.

25. Faulk W.P. Taylor G.M.: An immunocolloid method for the electron microscope. Immunochemistry 8: 1o81-1o83,1971.

26. Foster W.D.: The pathology of early stages of experimental pyelonophritis in the guinipig and rat. J.Path. Bact. 89: 657-663, 1965.

27. Frierer J. Talner L. Braude A.I.: Bacteremia in the pathogenesis of retrograde E. coli pyelonephritis in the rat. Am. J. Pathol. 64: 443-456, 1971.

28. Fussel E.N. Roberts J.A.: The ultrastructure of acute pyelonephritis in the monkey. J. Urol. 132: 179-183, 1984.

29. Ghadially F.N.: Lysosomes, in: Ultrastructural pathology of the cell and matrix, szerk: Ghadially F.N., második kiadás, Butterworths, London, 435-579, 1982.

3o. Glauser M.P.: Effect of indometacin on the incidence of experimental pyelonephritis. Infect. Immun. 40: 529-533, 1983.

31. Gorril R.H.: The fate of Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis, and Escherichia coli in the mouse kidney. J. Pathol. Bact. 89: 81-88, 1965.

32. Gorrill R.H.: The effect of obstruction of the ureter on the renal localisation of bacteria. J. Pathol. Bact. 72: 59-71, 1956.

33. Graham R.C. Karnovsky M.J.: The early stage of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem. 14: 291-3o2, 1966.

34. Guze L.B. Beeson P.B.: Experimental pyelonephritis. I. Effect of ureteral ligation on the course of bacterial infection in the kidney of the rat. J. Exp. Med. 1o4: 8o3-8o8, 1956.

35. Guze L.B. Goldner B.H. Kalmanson G.M.: Pyelonephritis. I. Observations on the course of chronic nonobstructed

Enterococcal infection in the kidney of the rat. Yale J. Biol. Med. 33: 372-385, 1961.

36. Hagberg L. Jodal U. Korhonen T.K. Lidin-Janson G. Lindberg U. Svanborg-Edén C.: Adhesion, hemagglutination, end virulence of E. coli causing urinay tract infections. Infect. Immun. 31: 564-570, 1981.

37. Heptinstall. R.H.: Experimental pyelonephritis: A comparison of blood-borne and ascending patterns of infection. J. Path. Bact. 89: 71.80, 1965.

38. Heptinstall R.H.: Pathology of the kidney, 2. kiadás, 3. kötet, Little-Brown Co. Urinary tract infection, reflux, and pyelonephritis, 1257-1321, 1983.

39. Hjort E.F. Loken A.C.: Experimental hydronephrosis: Influence of infection on the histological picture. Scand. J. Urol. Nephrol. 12: 139-143, 1978.

40. Hunter B.W. Souda L.L. Sanford J.P.: Acquired resistance to reinfection in experimental ascending pyelonephritis. J. Lab. Clin. Med. 58: 827, /abstract/ 1961.

41. Issekutz A.C. Movat H.Z.: The effect of vasodilatator prostaglandins on polymorphonuclear leukocyte infiltration and vascular injury. Am.J. Pathol. 107: 300-309, 1982.

42. Iványi B. Farkas Z.. Bohus K. Lantos J. Ormos J.: Kisérletes pyelonephritis pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálata. Morph. Ig. Orv. Szemle 24: 81-87, 1984.

43. Iványi B. Lantos J. Ormos J.: Ultrastucturális vizsgálatok ksérletes pyelonephritisben. Morph. Ig. Orv. Szemle 23: 161-168, 1983.

44. Iványi B. Ormos J. Lantos J.: Tubulointerstitial inflammation, cast formation, and renal parenchimal damage in experimental pyelonephritis. Am. J. Pathol. 113: 300-308. 1983.

45. Jacques Y.V. Baiton D.F.: Changes in pH within the phagocytic vacuole of human neutrophils and monocytes. Lab. Invest. 39: 179-188. 1978.

46. Janoff A. Caro H.: Proteases, antiproteases and oxidants: Pathways of tissue injury during inflammation, in: Majno G. Cotran R.S. Kaufman N.: Current topics in infalmmation and infection, Williams-Wilkins, Baltimore, 62-82. 1982.

47. Johnston W.H. Latta H.: Acute hematogenous pyelonephritis in the rabbit. Electron microscopic study of E. coli localization and early acute inflammation. Lab. Invest. 38:: 439-446. 1978.

48. Jones R.K. Shapiro A.P.: Incereased susceptibility to pyelonephritis during acute hypertension by angiotensin II, and norepinephrine. J. Clin. Invest. 42: 179-184, 1963.

49. Kallenius G. Svenson S.B. Möllby R. Cedergren B. Hultberg H. Winberg J.: Structure of carbohydrate part of receptor on human uroepithelial cells for pyelonephritogenic E. coli. Lancet, 2: 604-606, 1981.

50. Kalmanson G.M. Guze L.B.: Pyelonephritis. An attempt to demonstrate anti-kidney antibody in the sera of patinets with chronic bacteriuria. Am.J. Med. Sci. 246: 53-536, 1963.

51. Kaijser B. Larsson P.: Experimental acute pyelonephritis caused by Enterobacteria in animals. A review. J. Urol. 127: 787-790, 1982.

52. Kaijser B. Larsson P. Olling S. Scheerson R.: Protection against acute, ascending pyelonephritis caused by E. coli in rats, using isolated capsular antigen conjugated to bovin serum albumin. Infect. Immun. 39: 142-146, 1983.

53. Kaplan M.H.: Localization of streptococcal antigens in tissues. J. Exp. Med. 1o7: 341-352, 1958.

54. Kauser B.: Immunology of E. coli: K antigen and its relation to urinary tract infection. J. Infect. Dis. 127: 670-677, 1973.

55. Kétyi I.: Immunological approach to the pathogenical role of E. coli adhesive factor „119" in a suckling mouse urinary tract modell. Acta microbiol. Acad Sci. hung. 29: 123-127, 1982.

56. Kopaniak M.M. Issekutz A.C. Movat H.Z.: Kinetics of acute inflammation induced by E. coli in rabbits. Quantitation of blood flow, enhanced vascular permeability, hemorrhage, and leukocyte accumulation. Am.J. Pathol. 98: 485-498, 1980.

57. Kunin C.M.: Separation, characterization, and biological significance of common antigen in Enterobacteriaceae. J. Exp. Med. 117: 813-822, 1963.

58. Larsson P. Kaijser B. Baltzer I.M. Olling S.: An experimental model for ascending acute pyelonephritis caused by E.coli or Proteus in rats. J. Clin. Pathol. 33: 408-412, 1980.

59. Lasser A.: The mononuclear phagocytic system. A review. Human Pathology 14: 108-126, 1983.

60. Latham R.H. Stamm W.E.: Role of fimbriated E. coli in urinary tract infections in adult Women: Correlation with localisation studies. J. Inf. Dis.149: 835-840, 1984.

61. Mallory G.K. Crane A.R. Edwards J.E.: Pathology of acute and healed experimental pyelonephritis. Arch. Pathol. 30: 330-347, 1940.

62. Marosvári J. Beregi E. Szepesházi K. Román H.: Gamma-globulin and complement in the pyelonephritic kidney. Int. Urol. Nephrol. 3: 429-435, 1971.

63. Maunsbach A.N.: The influence of different fixatives and fixation methods on the ultrastructure of rat kidney proximal tubule cells. I. Comparison of different perfusion fixation methods and of glutaraldehyde, formaldehyde and osmium tetroxide fixatives. J. Ultrastruct. Res. 15: 242-282, 1966.

64. McCabe W.R.: Tolerance to bacterial endotoxin produced by proliferation of Gram-negativ bacteria in the kidney. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 107: 402, 1961.

65. Meadows R.: Renal histopathology, 2. kiadás, Oxford Univ. Press, 1978.

66. Miller T. E.: Immunologic factors in the pathogenesis of renal infection. Kidney Int. 16: 665-671, 1979.

67. Miller T.E.: infection-induced immunosupression in pyelonephritis: Characteristic of the supressor cell /s/. Kidney Int. 24: 313-322, 1983.

68. Miller T.E. Philips S.: Pyelonephritis: The relationship between infection, renal scarring, and antimicrobial therapy. Kidney Int. 19: 654-662, 1981.

69. Miller T.E. Robinson K.B: Experimental pyelonephritis: A new method inducing pyelonephritis in the rat. J. Infect. Dis. 127: 307-310, 1973.

70. Miller T.E. Scott L. Stewart E. North D.: Modification by supressor cells and serum factors of the cell-mediated immun response in experimental pyelonephritis. J. Clin. Invest. 61: 964-972, 1978.

71. Milstein C.: Monoclonal antibodies. Cancer 49: 1953-1957, 1982.

72. Moore P.L. Bank H.L. Brissie N.T. Spicer S.S.: Phagocytosis of bacteria by polymorphonuclear leukocytes: A freeze-fracture, scanning electron microscope, and thin section investigation of membrane structure. J. Cell. Biol. 76: 158-174, 1978.

73. Nagle R.B. Kneiser M.R. Bulger R.E. Benditt E.P.: Induction of smooth muscle caracteristics in renal interstitial fibroblasts during obstructiv nephropathy Lab. Invest. 29: 422-427, 1973.

74. Nakane D.K. Pierce G.B.Jr:: Enzyme labelled antibodies preparation and application for the localisation of antigen. J. Histochem. Cytochem. 14: 929-931, 1966.

75. Newman G.R. Jasani B.: Immunelectronmicroscopy: immunogold and immunoperoxidase compared using a new post-embedding system. Med. Lab. Sciences 41: 238-245, 1984.

76. Ormos J. Csapó Zs. Lantos J.: Contributions to the development of experimental pyelonephritis. Acta morphol. Acad, Sci. hung. 16. 85-101, 1968.

77. Pearse A.G.E.: Histochemisty, Theoretical and applied, 3. kiadás, 1. kötet, Little-Brown Co., Boston, The periodic acid-Schiff reaction 307-313, 1968; 2.kötet, Churcill-Livingstone, Edingurg, Lipofuscin 1076-1082, 1972.

78. Polak J.M. Van Noorden S.: Immunocytochemistry, Practical applications in pathology and biology, Wright PSG, Bristol, 1983.

79. Polak J.M. Varndell I.M.: Immunolabelling for electron microscopy, Elsevier, Amsterdam, 1984.

8o. Polak J.M. Varndell I.M.: Immunolabelling for electron microscopy.A Royal Postgraduate Medical School, London, által szervezett tanfolyam kiadványa, jan. 28 - febr. 1. 1985.

81. Rene P.: Serological response to E. coli pili in pyelonephritis. Infect. Immun. 37: 749-754, 1982.

82. Rényi-Vámos F. Balogh F.: Pyelonephritis, Akadémiai Kiadó Budapest, 1977.

83. Richman A.V. Gerber L.I. Balis J.U.: Peritubular capillaries: A major target site of endotoxin-induced vascular injury in the primate kidney. Lab. Invest. 43: 327-332, 1980.

84. Robbins S.L. Cotran R.S. Kumar V.: Pathologic basis of disease, 3. kiadás, Saunders Co. Philadelphia, Infammation and repair 40-84; Pyelonephritis and urinary tract infection 1030-1036, 1984.

85. Roberts J.A.: Prevention of pyelonepritis by immunization With P-fibriae. J. Urol. 131: 602-607, 1984.

86. Roberts J.A. Kaack B. Kallenius G. Möllby R. Winberg J. Svenson S.B.: Receptors for pyelonephritogenic E. coli in primates. J. Urol. 131: 163-168, 1983.

87. Roberts J.A. Roth J.K. Jr. Dominigue G. Lewis R.W. Kaack B. Baskin G.: Immunology of pyelonephritis in the primate model. VI. Effect of complement depletion. J. Urol. 129: 193-196, 1983.

88. Roberts J.A. Roth J.K. jr. Dominigue G. Lewis R.W. Kaack B. Baskin G.: Immunology of the pyelonephritis in the primate modell. V. Effect of superoxide dismutase. J. Urol. 128: 1394-1400, 1982.

89. Rocha H. Guze L.B. Freedman L.R. Beeson P.B.: Experimental pyelonephritis.III. The influence of localized injury in different part of the kidney on susceptibility to bacillary infection. Yale J. Biol. Med.30: 431-346, 1958.

90. Rother K.: Immunpathologie der Pyelonephtiris. Klin. Wochenschr. 61: 1011-1017, 1983.

91. Ryan G. Majno G.: Acute inflammation: A review. Am.J. Pathol. 86: 185, 1977.

92. Sanford J.P. Hunter B.W. Donaldson P.: Localization and fate of E. coli in hematogenous pyelonephritis. J. Exp. Med. 116: 285-294, 1962.

93. Sanford J.P. Hunter B.W. Souda L.L.: The role of immunity in the pathogenesis of experimental hamatogenous pyelonephritis. J. Exp. Med. 115: 383-389, 1962.

94. Shimamura T.: Mechanisms of renal tissue destruction in an experimental acute pyelonephritis. Exp. Mol. Pathol. 34: 34-43, 1981.

95. Silverblatt F.J. Cohen L.S.: Antipili antibody affords protection against experimental ansending pyelonephritis. J. Clin. Inv. 64: 333-336, 1979.

96. Smith J.W. Kaijser B.: The local immune response to E. coli K and O antigen in experimental pyelonephritis. J. Clin. Invest. 58: 276-281, 1976.

97. Sternberger L.A.: Immunocytochemistry, Második kiadás, John Wiley and Sons, New York, 1979.

98. Sternberg L.A. Hardy P.H.Jr. Cuculis J.J. Meyer H.G.: The unlabelled antibody-enzyme method of immunochemistry. Preparation of soluble antigen-antibody complex /horseradish peroxidase- antihorseradish peroxidase / and its use in the identification of spirochetes. J. Histochem. Cytochem. 18: 315-333, 1970.

99. Sullivan M.J. Harvey R.A. Shimamura T.: Experimental pyelonephritis: The role of polymorphonuclear leukocyte and complement system in structural damage to the rat kidney. Fed. Proc. 36: 1070, 1977.

100. Svanborg-Edén C. Freter R. Hagberg L. Hull R. Hull S. Leffler H. Schoolnik G.: Ihibition of experimental ascending urinary tract infection by an epithelial cell-surface analogue. Nature, 298: 560-562. 1982.

101. Tainer J.A. Turner S.R. Lynn W.S.: New aspects of chemotaxis. Specific target-cell attraction by lipid and lipoprotein fractions of E. coli chemotactic factors. Am.J. Pathol. 81: 401-410, 1975.

102. Tan H.K. Heptinstall R.H.: Experimental pyelonephritis: A light and electronmicroscopic study of the periodic acid-Schiff positive interstitial cell. Lab. Invest. 20: 62-69, 1969.

103. Tanaka N. Une T. Ogawa H.: Experimental pyelonephritis in mice following ascending infection with E. coli: Acute phase. Acta Pathol Jpn. 31: 179-187, 1981.

104. Tolkoff-Rubin N.E. Rubin R.H.: Urinary tract infection, in: Cotran R.S. Brenner B.M. Stein J.H.: Contemporary issues in nephrology 10. kötet, Tubulointerstitial nephropathies. Churchill Livigstone, New York, 49-76. 1983.

105. Yoshida T. Cohen S. Bigazzi P.E. Kurasuji T. Amsden A.: Inflammatory mediators in culture filtrates of E. coli. Macrophag migration iinhibitory, neutrophil chemotactic, lymphocyte mitogenic and fibroblast cytotoxic activities. Am. J. Pathol. 81: 389-400, 1975.

106. Väisänen V. Elo J. Tallgren L.G. Siitonen A. Mäkelä P.H. Svanborg-Edén C. Kallenius G. Svenson S.B. Hultberg H. Korhonen T.: Mannose-resistante hemagglutination and P antigen recognition are characteristic of E. coli causing primary pyelonephritis. Lancet, 2: 1336-1339, 1981.

107. Van der Rhee H.J. Van de Burg-de Winter C.P.M. Daems W.Th.: The differentation of monocytes into macrophages, epitheloid cells, and multinucleated giant cells in subcutaneous granulomas. Cell Tissue Res. 197: 355-378, 1979.

108. Weiss S.J. Lo Buglio A.F.: Biology of disease: Phagocyte-generated oxigen metabolites and cellular injury. Lab. Invest. 47: 5, 1982.

109. Weissman G. Smolen J.E. Korchak H.M.: Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils. New Engl. J. Med. 303: 27-34, 1980.

110. Wilson D.R.: Pathophysiology of obstructiv nephropathy. Kidney Int. 18: 281-293, 1980.

111. Williams C.A. Chase M.W.: Methods in immunology and immunochemistry, 4. kötet, Academic Press, New York, 80-83, 1977.

112. Williams T.W. Friedlander A.M. Lyons J.M. Braude A.I.: Cellular immunity in pyelonephritis: Identification of supressor cell activity of spleen cells in response to concannavalin A and inhibition of lymphocyte-mediated L cell cytotoxicity.J.Immunol.116: 778-781, 1976.

113. Woods J.W.: Susceptibility of rats with hormonal hypertension to experimental pyelonephritis. J. Clin Invest. 37: 1786-1689, 1958.

114. Woods J.W. Welt L.G. Hollander W.Jr. Newton M.: Susceptibility of rats to experimental pyelonephritis following recovery from potassium depletion. J. Clin. Inv. 39: 28-33, 1960.

Köszönetemet fejezem ki Ormos Jenő Professzor Úrnak, amiért munkánkat mindvégig támogatta, értékes tanácsaival személyesen is segítette és lehetőséget biztosított számomra a dolgozat elkészítéséhez, valamint Dr Iványi Bélának, aki a kisérletes munkát és eredményeinek feldolgozását irányítva, a vese morfológiai tanulmányozásában szerzett nagy tapasztalatát igyekezett megosztani velem.

Megköszönöm Dr Czirók Évának, hogy a kisérletben használt baktériumtörzset a rendelkezésünkre bocsátotta, továbbá Dr Lantos Juditnak a baktériumtenyésztésben és az antigén kivonásban, Dr Csókási Zsoltnak az immunsavó előállitásában, Dobó Endrének a savó karakterizálásában és Dr Zentay Zoltánnak az immunelektronmikroszkópos vizsgálatokban nyújtott önzetlen segítségét.

Köszönettel tartozom Elhardtné Bakacsi Mária, Szamosvári Jenőné, Danyiné Szekeres Katalin és Pintér Klára asszisztenseknek, valamint Dezső Mihály és Szupera Pálné fotósoknak az anyag elkészítésében és dokumentálásában végzett gondos munkájukért.

Végül, hálásan köszönöm Édesanyámnak, hogy a gépelés fáradtságos munkáját magára vállalva, dolgozatom végső formáját kialakította.

Szeged, 1985. október

2231
1985