

**EIIIE4: EGY ÚJ THROMBOCYTA ELLENES  
MONOKLONÁLIS ELLENANYAG  
KARAKTERIZÁLÁSA**

Szakdolgozat

**Sinka Lília**

**Témavezetők:** Dr. Oláh Imre és Dr. Nagy Nándor

Semmelweis Egyetem  
Általános Orvostudományi Kar, Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet

2003, Budapest

## **TARTALOMJEGYZÉK**

<b>BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS</b>	<b>2</b>
<b>IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	<b>4</b>
1. A MADÁR VÉR SEJTES ELEMEI	4
1.1. Hasonlóságok és különbségek a madár és az emlős vérsejtjei között	4
1.2. A madár vér alakos elemei	4
2. A THROMBOCYTÁK ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE	8
2.1. A thrombocyták funkciói	8
2.2. A thrombocyták elektronmikroszkópos szerkezete	9
2.3. A thrombocytákra jellemző molekulák	11
2.4. A thrombocyták fejlődése	13
<b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	<b>15</b>
1. KÍSÉRLETI ÁLLATOK	15
2. ELLENANYAGOK	15
3. SZÖVETTANI FELDOLGOZÁS	16
3.1. Fagyasztott metszetek készítése	16
3.2. A zselatin-szaharózos beágyazás	16
3.3. Vérkenet-készítés	17
4. IMMUNHISZTOKÉMIA ÉS IMMUNFLUORESZCENCIA	17
4.1. Immunhisztokémia	17
4.2. Immunfluoreszcencia	17
5. MAY-GRÜNWARD-GIEMSA FESTÉS	18
6. IMMUNHISZTOKÉMIA MAY-GRÜNWARD-GIEMSA FESTÉSSEL	18
7. FÉNYKÉPEZÉS ÉS KÉPFELDOLGOZÁS	19
<b>EREDMÉNYEK</b>	<b>20</b>
1. AZ EIII4 MOLEKULA EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA FELNŐTT SZÖVETEKEN	20
2. AZ EIII4 MOLEKULA EXPRESSZIÓJA AZ EMBRIONÁLIS FEJLŐDÉS SORÁN	22
3. AZ EIII4-POZITÍV SEJTEK SEJTTÍPUSÁNAK MEGHATÁROZÁSA	23
4. AZ EIII4 MOLEKULA SEJTEN BELÜLI LOKALIZÁCIÓJA	24
<b>EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE</b>	<b>27</b>
<b>KONKLÚZIÓ</b>	<b>28</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	<b>29</b>
<b>IRODALOMJEGYZÉK</b>	<b>30</b>

## **BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS**

Napjainkban a monoklonális ellenanyagokat széles körben alkalmazzák mind az alapkutató, mind a klinikai diagnosztika területein.

Ha a monoklonális ellenanyag egy adott sejttípusra specifikus molekulát ismer fel, kiváló eszközt jelent a kérdéses sejttípus eredetének, differenciálódásának illetve egy szöveten belüli előfordulásának tanulmányozására. A monoklonális ellenanyagok előállítása hybridómák klónozásával készül. A monoklonális ellenanyagok előállítására Köhler és Milstein (1975) Nobel-díjjal is jutalmazott hybridóma-technikáját használjuk. A hybridóma-módszer során myoma-sejteket fúzionáltatunk immunizált egérből származó lépsejtekkel. A sejtfúzió olyan sejteket, hybridómákat eredményez, amelyek termelik az ismert antigénre specifikus ellenanyagot, és rendelkeznek a tumorsejtekre jellemző halhatatlansággal is. Az ellenanyagot termelő hybridómákat többszöri klónozási eljárásnak vetjük alá, és az így kitisztított klónok fogják termelni az immunizálás során használt sejteket vagy molekulákat specifikusan felismerő ellenanyagokat. Ezután a klón által termelt monoklonális ellenanyagot karakterizálni kell, vagyis meg kell határozni az általa felismert sejt típusát, szöveti eloszlását, fajspecifitását, és az általa felismert antigén sejtbeli lokalizációját és biokémiai tulajdonságait.

Laboratóriumunkban gyöngytyúk lépsejtek ellen készítettünk monoklonális ellenanyagokat, amelyeket a madarak haemopoetikus és lympho-myeloid szerveinek tanulmányozására, és ezek fejlődésének vizsgálatára kívánunk felhasználni.

A haemopoetikus sejtekre specifikus monoklonális ellenanyagok alkalmazása lehetőséget nyújt a vér sejtjeinek és a vérképzésnek a tanulmányozására, és a haematológiai betegségek nagy száma és változatossága miatt gyakorlati jelentőséggel is bír. A madár, mint modell állat választása mellett számos érv szól, például az Obese csirke-törzs jelenleg az egyetlen olyan modell, amely alkalmas a humán Hashimoto-thyreoiditis tanulmányozására, és a madár embrión végzett kísérletekkel (szervtelep-transzplantációk, kiméra-kísérletek) sikerült azonosítani a madarak, majd később az emlősök vérképző helyeit, továbbá a fajspecifikus monoklonális ellenanyagok és a kiméra-módszer ötvözésével pedig a madár embrióban lehetett tisztázni először a ganglionléc, a szomita és a haemopoetikus eredetű sejtek sorsát.

Szakdolgozatomban a gyöngytyúk lépsejtek ellen termeltetett EIIIE4 elnevezésű egér monoklonális ellenanyag immuncitokémiai karakterizálását mutatom be.

Az EIIIE4 IgG<sub>1</sub> izotípusú monoklonális ellenanyag vizsgálata során az EIIIE4 ellenanyag a gyöngytyúk lép vörös pulpájában olyan sejtcsoportokat jelölt, amelyekről elrendeződésük és morfológiájuk alapján felvetődött, hogy az ellenanyag a thrombocytákat jelöli. Munkám során céloom volt:

- a) az EIIIE4-pozitív sejtek szöveti eloszlásának jellemzése a felnőtt gyöngytyúk szövetekben
- b) az EIIIE4-pozitív sejtek megjelenésének vizsgálata az embrionális fejlődés során
- c) az EIIIE4-pozitív sejtek sejtípusának meghatározása és elemzése más fajokban
- d) az EIIIE4 molekula sejtbeli lokalizációjának meghatározása.

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

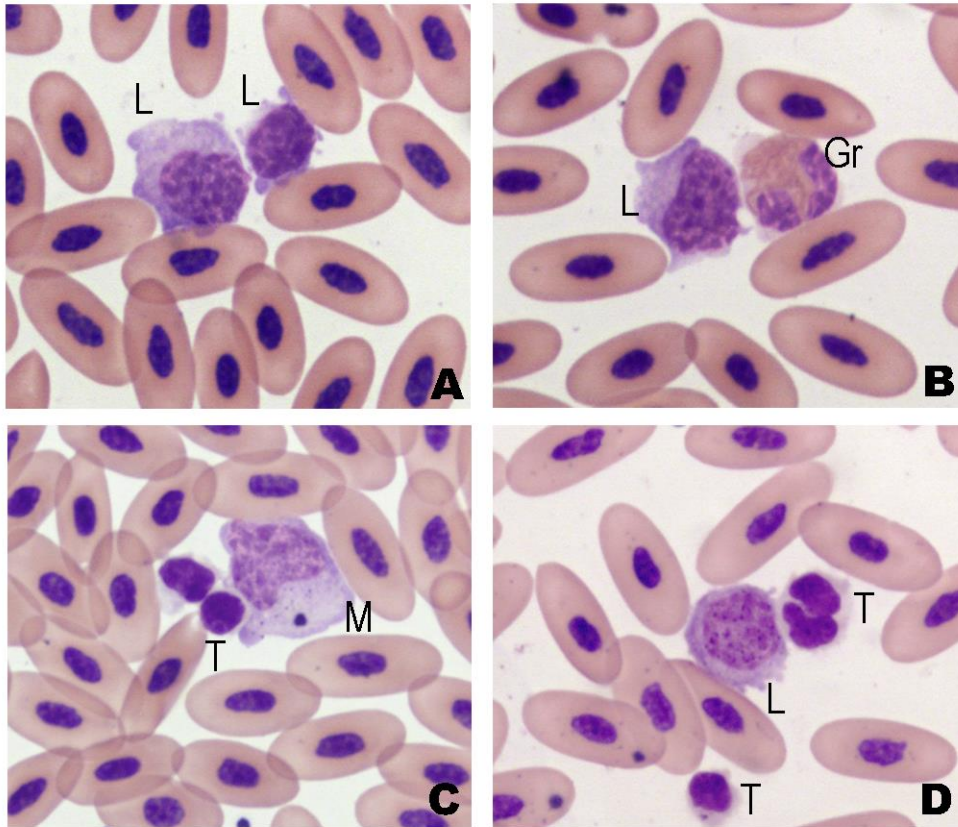
### 1. A MADÁR VÉR SEJTES ELEMEI

#### 1.1. Hasonlóságok és különbségek a madár és az emlős vérsejtjei között

A madarak egyes vérsejtjei jelentős eltéréseket mutatnak az emlősökéihez képest, de funkcióikat tekintve a sejtek megfeleltethetők egymásnak. A madarak eosinophil és basophil granulocytái, a monocyták és a lymphocyták hasonlóak az emlősökéhez. A madár heterophil granulocytái megfelelnek az emlősök neutrophil granulocytáinak. Az érett erythrocyták a madarakban nagy ovális sejtek, amelyek ovális sejtmaggal rendelkeznek. Az éretlen vörösvérsejtek kerekesebbek, a sejtmagjuk is kerekesebb, és citoplazmájuk polikromáziás festődést mutat. A madár thrombocytá az emlős vérlemezkéknek felel meg. A madarak thrombocytái kis, kerek, sejtmaggal rendelkező sejtek, a sejtmag körül csak vékony citoplazmaszegélyt látunk. Fontos különbség, hogy a madár thrombocytá jelentős phagocytá-funkcióval is rendelkezik.

#### 1.2. A madár vér alakos elemeinek jellemzése

**Erythrocyták:** A madár erythrocyta nagy, tojásdad morfológiájú sejt, a vérkenetben ovális alakúnak látszik, és az emlősökkel ellentétben sejtmaggal rendelkezik. Az ovális sejtmag a sejt közepén helyezkedik el, erősen elektrodenz, a kromatinállománya egyenletesen oszlik el, sejtmagvacska nem található meg benne (Lucas és Jamroz, 1961). May-Grünwald-Giemsa módszerrel festett kenetben a vörösvérsejtek citoplazmája halvány téglavörös, a sejtmag homogén, és sötétlilára festődik. A sejt mérete fajonként nem mutat eltérést, átlagos mérete 7,5-12  $\mu\text{m}$ . A csontvelőben képződő vörösvérsejtek átlagos élettartama 20-35 nap. Szerepük -csakúgy, mint emlősökben- az oxigénszállítás (1.a ábra).



**1. ábra. Gyöngytyúk vérkenet.** A: lymphocyták (L) és erythrocyták, B: lymphocyták (L) és granulocyták (Gr) az erythrocyták között, C: monocyták (M) két thrombocytával (T) és erythrocyták, D: lymphocyták (L) thrombocytákkal (T) és erythrocyták. (600x).

**Leukocyták:** A leukocytákat granulocytákra (heterophil, eosinophil és basophil granulocyták) és a granulomokat nem tartalmazó lymphocytákra és monocytákra oszthatjuk fel. A heterophil granulocyták és a monocyták a legaktívabb phagocytasejtek, az eosinophilok és a basophilok phagocytáló képessége gyengébb. A keringő fehérvérsejtek mennyiségére vonatkozó adatok jelentős eltérést mutatnak, amely részben az eltérő mérési technikáknak köszönhető; a leukocyták száma  $9,3-32,3 \times 10^3$  között változik.

**Lymphocyták:** A vérben leggyakrabban előforduló fehérvérsejtek, az emlősökéihez hasonlóan a legheterogénebb populációt képviselik (1.a.ábra). A sejtek mérete alapján feloszthatók kis-, közepes- és nagy lymphocytákra (Lucas és Jamroz, 1961). A sejtek átmérője átlagosan  $8,0-8,1 \mu\text{m}$ . A lymphocyták nagy, kerek sejtmagja a sejttest közepén helyezkedik el, de néha excentrikus elhelyezkedésű, a sejtek monocyták-jelleget kölcsönözve. A

sejtmag kromatinszerkezete durva, rögös, főleg a kis lymphocytákban. A citoplazmatikus struktúrák (Golgi-apparátus, mitochondriumok, citocentrum, lysosomák) bizonyos mértékű polarizáltságot mutatnak: a sejt egyik részében, a sejtmag behúzódásánál helyezkednek el. A lymphocyták finom szerkezetét Schumacher (1965), Enbergs és Kristensen (1968), Maxwell és Trejo (1970) írta le.

**Monocyták:** A monocyták a lymphocytáknál nagyobb sejtek, bár a két sejtípus mérethatárai átfedést mutatnak (1.c.ábra). A sejtek átlagos átmérője 12,1  $\mu\text{m}$ . A sejtek általában kerek, kitérkedések lehetnek rajtuk, az endoplazmát esetenként szabálytalan hyalinköpeny veszi körül (Lucas és Jamroz, 1961). A citoplazmában gyakran megtalálható a lymphocytáktól való elkülönítést megkönnyítő szerkezet, a Hof-terület, amely a sejtmagon található behúzódás körüli halványabb, vakuolizált plazmát jelenti. A Wright-festéssel a Hofban található világos narancs festődésű, kör alakú képletek valószínűleg a jól fejlett Golgi-apparátus fénymikroszkópos megjelenései (Enbergs és Kriesten, 1968; Maxwell és Trejo, 1970). A citoplazmában elszórtan finom, homokszerű, vöröses-narancs színnel festődő partikulumok láthatók, amelyek az emlősök monocytáiban megtalálható azurophil granulomoknak felelnek meg. A citoplazma a phagocytáló sejtekre jellemző módon gazdagon struktúrált, különösen szembeötlő a lysosomák (heterolysosomák) nagy száma és változatos formája, valamint a sejtek felületi tagozódása.

**Granulocyták:** A madarakban három fajta granulocytát különböztetünk meg: a heterophil, a basophil és az eosinophil granulocytákat (1.b.ábra).

**Heterophilek:** A megfestett vérkenetben a heterophilek csaknem mindig kerekded sejtek lebonyozott maggal és állandóan változó amoeboid formával (Kelly és Dearstyne, 1935). Magjuk változatos formájú, lebonyeinek száma egy és öt között változik, és ezeket vékony hidak kötik össze. A kromatinállomány durva, sötétben festődő blokkokat alkot. A sejtmag lebonyozottsága az életkorával együtt növekszik, számuk a csirkében átlagosan 2,44 (Lucas és Jamroz, 1961; Dhingra, 1969; Maxwell és Trejo, 1970). A heterophilek és az eosinophil granulocyták is eosinophil granulomokat tartalmaznak, emiatt elkülönítésük sokszor nehézségekbe ütközik, annál is inkább, mivel a heterophil granulocyták pálca alakú szemcséi

gyakran degenerálódnak, így az eosinophilok kerek granulumaikhoz válnak hasonlónak. A heterophilok citoplazmája alapvetően nem festődik, és nagy mennyiségű acidophil granulomot tartalmaz. Ha a szemcsék degenerálódnak (például a Wright-festés következtében), a granulumok eosinophil anyaga megfesti a plazmát (Lucas és Jamroz, 1961). A heterophilek szemcséi hisztokémiailag savanyú mukopoliszacharidokat, bázikus fehérjéket, hidrolázokat, peroxidázt, lúgos foszfátázt és lysosimet tartalmaznak. A sejtek felületén mikrobolyhok és nyúlványok emelkednek ki. A citoplazmatikus granulumok számában és formájában jelentős eltérések figyelhetők meg, alapjában véve azonban két csoportot különböztetünk meg: a nagy, orsó alakú szemcséket és a kisebb, lekerekített formájúakat (Maxwell és Trejo, 1970).

*Eosinophil granulocyták:* Ezek a sejtek átlagosan 7,3  $\mu\text{m}$  nagyságúak, de a sejt méret 4-11  $\mu\text{m}$  között változhat. A sejtek formája kerekded, a világos citoplazma halványkéken festődik (Wright-festés). A sejt mag általában nehezen látható a nagy mennyiségű citoplazmatikus granulum miatt. A sejt mag a heterophilekhez hasonló, azonban általában kettőnél kevesebb lebenyből áll (Lucas és Jamroz, 1961), és erősen festődik. A sejt plazma nagy mennyiségű eosinophil szemcsét tartalmaz. A granulumok formája némi változatosságot mutathat (Lucas és Jamroz, 1961). A sejtek felületén nyúlványok és mikrobolyhok találhatóak. Az eosinophil granulocyták finom szerkezetét Kelényi és Németh (1969), illetve Maxwell és Trejo (1970) írták le.

*Basophil granulocyták:* Átlagosan alig kisebbek a heterophileknél, alakjuk hasonlóan kerek. A citoplazma színtelen, és nagy mennyiségű, basophilen festődő, közepes méretű, gömbölyű szemcsét tartalmaz. A szemcsék a festési eljárás során könnyen felbomlanak, és ekkor jól láthatóvá válik a sejt mag szerkezete. A kerek vagy ovális sejt mag a sejt közepén helyezkedik el, homogén, halvány festődést mutat. A citoplazmában fejlettebb a durva felszínű endoplazmás retikulum, több a riboszóma és nagyobb mitochondriumok találhatóak a szemcsék között. A sejtek felülete szintén erősen tagolt (Dhingra, 1969; Maxwell és Trejo, 1970).



## 2. A THROMBOCYTÁK ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE

### 2.1. A thrombocyták funkciói

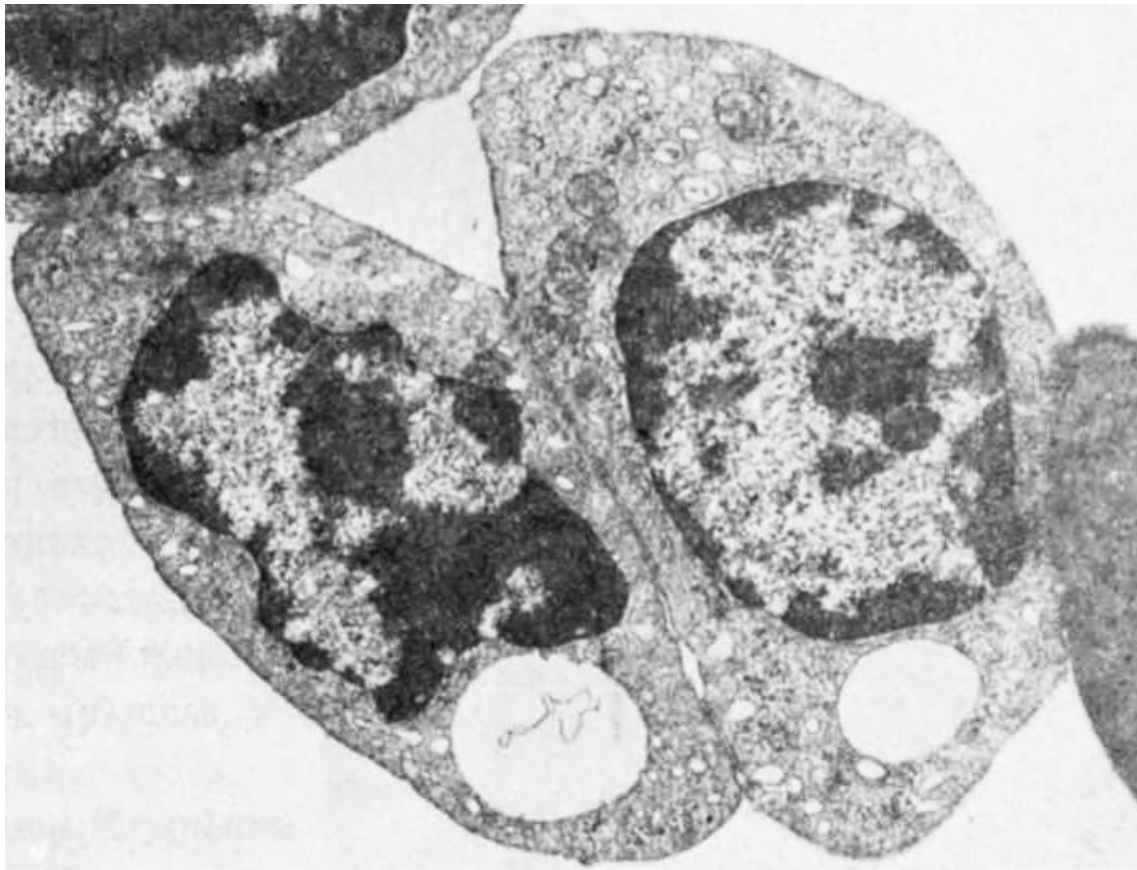
A csirke thrombocyták (1.c. és 1.d.ábra) több funkcióval rendelkeznek: szerepük van a szerotonin felvételében, tárolásában és felszabadításában. (Meyer és Sturkie, 1974), a haemosztázisban és a phagocytózisban. Az emlősök vérlemezkéihez hasonló szerepet játszanak az aggregációban és a véralvadék képződésben. Képesek összegyűlve hozzátapadni a sérült endothéliumhoz, hogy alvadékdugót képezzenek és így biztosítsák az érpálya folyamatosságát. A madár thrombocyták elsősorban az extrinsic alvadási faktorokra reagálnak az emlősök vérlemezkéivel ellentétben (Belamarich, 1968; Belamarich, Simoneit, 1973). A madár thrombocyták in vitro a kollagén, a thrombin és a szerotonin hatására aggregálódnak, viszont adenosin-difoszfátéra nem. A képződött véralvadék egészében az összezsapódott thrombocytákából áll. Az aggregáció során felszabaduló citoplazmatikus termékek, mint például a szerotonin, hatással vannak a lokális véráramlásra és elősegítik a további thrombocyta aggregációt. (Stalsberg és Prydz, 1963).

A thrombocyták degenerálódása a vérzés pillanatában megkezdődik, de a folyamat előrehaladása és mértéke madaranként jelentős eltéréseket mutat. Makroszkóposan a sejtek összetapadása figyelhető meg, néhány sejttől egészen több százig. A mikroszkópos változás a sejtmembrán festődésének változásával kezdődik (világoskékről bíborvörösre vált, Wright-festés), majd a sejt alakja kerekesebbé válik, és a citoplazma mennyisége lecsökken, valószínűleg a széli anyag elvesztése miatt. Végül a sejt már csak egy piknotikus sejtmagból és az azt körülvevő citoplazma szegélyből áll, amelyben a specifikus granulumok még gyakran felismerhetők. A thrombocyták a vérzés során összezsapódnak és szétesnek, a folyamat során azonban csak igen kis mennyiségű tromboplastin szabadul fel. Glick és munkatársai szerint (1964) a thrombocyták aktív phagocytá funkcióval rendelkeznek. Azóta kiderült, hogy a thrombocyták az elsődleges phagocyták a csirke vérben (Chang és Hamilton, 1979). A csirkében körülbelül háromszor annyi thrombocyta van, mint amennyi egyéb phagocytá aktivitású sejt összesen kering a vérben. A thrombocyták 1,7-szer több baktériumot tudnak

bekebelezni mintegy harmadannyi idő alatt, mint a heterophil granulocyták vagy a monocyták. (Chang és Hamilton, 1979).

## 2.2 A thrombocyták elektronmikroszkópos szerkezete

A madarak thrombocytái az emlősök vérlemezkéinek felelnek meg. A thrombocyták kisebbek az érett vörösvérsejtekénél, átlagosan 5-10  $\mu\text{m}$  nagyságúak. Alakjuk ovális, de az erythrocytáknál gömbölydedebbek, és jelentős alakbeli eltérés figyelhető meg az egyes sejtek között: a kerekétől a szabálytalan formán át a hosszúkáig minden variáció megtalálható (Lucas és Jamroz, 1961). A thrombocyta sejtmag kerek, ovális formájú; kerekesebb, mint az erythrocytáké (1.c, 1.d.ábra). A kondenzált kromatinállomány miatt a sejtmag tömör, sötétben festődő, durván szemcsézett festődést ad, a maghátyáról leváló riboszómák jól láthatók (Maxwell és Trejo, 1970). A sejtek citoplazmája nem homogén, hálószerű rajzolat figyelhető meg benne, amelyeket vakuolumként identifikáltak (Bradley, 1937; Blount, 1939), bár nem mutatják a tipikus vakuola-szerkezetet (Lucas és Jamroz, 1961), inkább csak a citoplazma halványabban festődő részeiként jelennek meg (2.ábra).



2. ábra. Thrombocyták (EM. 11 600-szoros nagyítás; Guzsál E., 1981. után)

A citoplazmában mindegyik citoplazmatikus organelum megtalálható: néhány mitochondrium, kevés durva felszínű endoplazmás retikulum, szegényes Golgi-apparátus hozzakapcsolódó vesiculákkal (Carlson és Sweeny, 1968) és elszórtan szabad riboszómák illetve mikrotubulusok (2.ábra). A durva felszínű endoplazmás retikulumról a riboszómák helyenként hiányoznak. A citoplazmában néhány glikogénszemcse is megfigyelhető. (Maxwell, 1973). Gyakran találhatók centriolumok a sejtekben. Számos thrombocyta tartalmaz sima felszínű, gyakran tág lumenű endoplazmatikus retikulumot. A széles ciszternák „sötét”, elektrodenz anyagot tartalmazhatnak. Rendszerint pinoyitotikus vesiculák is jelen vannak a sejtekben. (Maxwell, 1973). Jellemzőek a nagy számú és változatos formájú vesiculumok, vakuolumok és mikrotubulusok. A 0,2 és 1  $\mu\text{m}$  átmérőjű vakuolumokban sokféle anyagot mutattak ki, hidrolázokat, például savanyú foszfátzt, amelyből lysosomális működésre (phagocytózis) lehet következtetni., továbbá véralvadást segítő faktorokat, savanyú mukopoliszacharidokat, lipideket, szerotonint stb. Előfordulnak multivesiculáris testecskék, lamelláris testecskék, illetve egy-két nagyméretű, 0,7  $\mu\text{m}$  átmérőjű zárvány myelinizált elektrodenz tartalommal (Daimon és Uchida, 1978). Ezen kívül koncentrikusan elhelyezkedő kettős membránszerkezetek is találhatók a sejtben, homogén elektronszegény tartalommal, ezek összeköttetésben állhatnak a maghártyával. A citoplazmában a sejtekre jellemző granulumokat is találunk, amelyek változó méretű, helyzetű és számú szemcsék. A legjellemzőbb, hogy egy magányos denz granulumot találunk a sejtmag egyik pólusán, de előfordulhat, hogy egy második granulum is megtalálható a másik póluson, illetve számos, elszórt granulum lehet a sejtmag körül. A granulumok formája igen változatos: az egyszerű, denz alaktól a kettős formán át a többszörösen összetett ill. diffúz változatig. Az elektron mikroszkópos vizsgálatok során leírt erősen elektrodenz szemcsék ezeknek felelnek meg, és vérzés során 5-hydroxytryptamine szabadul fel belőlük, miközben szétesnek (Kuruma, 1970). A thrombocytákban megtalálható tubulusok két csoportba oszthatók: az elektrodenz tubulusok körülbelül 45  $\mu\text{m}$  szélesek és homogén szerkezetűek, gyakran a durva felszínű endoplazmás retikulumhoz kapcsolódnak; az elektronszegény tubulusok átmérője 75 - 125  $\mu\text{m}$  közötti. Az elektrodenz

tubulusok, a maghártya, a durva felszínű endoplazmatikus retikulum és a kettős membránszerkezetek alkotják a denz tubuláris rendszert (DTS), amely emlősben is megtalálható (Breton-Gorius és Guichard, 1972). Az elektronszegény tubulusok elágazhatnak, és kapcsolatban állnak a sejthártyával illetve az elektronszegény vakuolumokkal a sejtfelszínnel kapcsolatban álló rendszert alkotva, amely megfelel az emlősöknél leírt felszínhez kapcsolódó kanalikuláris rendszernek (surface connected system, SCS; Behnke, 1967). A nagy vacuolumok is csatlakoznak ehhez a nyílt kanalikuláris rendszerhez (Taffarel és Oliveira, 1993), és más struktúrákkal együtt részt vesznek az endocytotikus folyamatokban. A thrombocyták finom szerkezetét Schumacher (1965), Enbergs és Kriesten (1968), Carlson (1968), Kuruma (1970), Maxwell és Trejo (1970) írták le.

### **2.3. A thrombocytákra jellemző molekulák**

A thrombocyták molekuláris tulajdonságait nem vizsgálták részletesen, ennek elsősorban a fejlődési-vonal specifikus markerek hiánya az oka. Az érett csirke thrombocyták felszínén fibronectin (Sorrel, 1988; Horiuchi, 1992) és számos integrin molekula (Hemler, 1990; Kaspers, 1993; Lacoste-Eleau, 1994; Corbel, 2002) expresszálódik. A madár thrombocyták kimutatására használható markerek:

#### **K1:**

A K1 molekula a csirke macrophágok és a thrombocyták egy integrinszerű sejtfelszíni antigénjével reagál, és egy 135 kDa és egy 61-68 kDa molekulásúlyú polipeptidből álló heterodimer molekula (Kaspers, 1993). A K1 molekula csirke embrióban a bursa Fabricii folliculus hámsejtjeit ismeri fel, gyöngytyúokban a felnőtt bursa kéreg-velő határ hámsejtjein és a folliculus-asszociált hámot támasztó sejteken expresszálódik (Magyar, 2001; Oláh, 2002).

#### **GRL1 és GRL2:**

A granulocyták és thrombocyták szekrécións granulumaiban azonosított GRL1 (92-94 kDa) és GRL2 (45-60 kDa) polipeptidek az exocrin illetve endocrin mirigyek sejtjeiben és a haemopoetikus sejtekben megtalálható szekretoros granulumokat jelölik. Különböző mechanizmussal kapcsolódnak a szekretoros granulum membránjához: a GRL1 perifériás proteinként viselkedik, ellenben a

GRL2 a transzmembránproteinek jellegzetességeit mutatja (Thomas, 1994). A haemopoetikus rendszer fejlődése során a GRL1 a thrombocytákat és a myelocytákat ismeri fel, míg a GRL2 thrombocytákban, myelocytákban, myeloid progenitorokban és az erythroid progenitorok egy alcsoportján expresszálódik (Thomas, 1993). Az első GRL-pozitív sejtek az embrionális fejlődés 2,5 napjától jelennek meg (Hamburger-Hamilton stádium, HH:16) a vérben. Ezek a sejtek egyrészt thromboplastok, amelyek a 4 stádiumtól (HH:21) kezdve már nem mutathatók ki, másrészt pedig thrombocyták (Thomas, 1993).

### **MEP17, MEP21 és a MEP26:**

A MEP17 (140 és 15 kDa), a MEP21 (150 kDa) és a MEP26 (47-60 kDa) molekulák thrombocytákat és normális, illetve transzformált haemopoetikus sejteket is jelölnek (McNaghy, 1992, 1997). A MEP17 valószínűleg az emlős VLA-2 integrin (CD49b) homológja a madarakban (Hemler, 1990), és blokkolja a madár thrombocyták kollagéndependens adhézióját (Bradshaw, 1995). A MEP17 leukocytákat jelöl a granulocytákon és a késői vörösvérsejteken kívül, a MEP21 thrombocytákon és transzformált haemopoetikus sejtvonalakon, míg a MEP26 thrombocytákon, néhány korai erythrocytán és eosinophil granulocytákon expresszálódik (McNaghy, 1992).

### **11C3:**

A 11C3 monoklonális ellenanyag a csirke thrombocyták felszínén található GPIIb-IIIa integrinhez kötődik. Kizárólag a thrombocyta fejlődési vonalat jelöli a vérben, lépben és csontvelőben. A molekula heterodimer, 112 és 90 kDa molekulatömeggel (amely redukció után 112 és 26 kDaltonra változik). Thrombocyta-aktivátor funkcióval rendelkezik thrombinszerű hatásokkal, de gátolja a thrombin-aktivált thrombocyták adhézióját fibrinogénhez és kisebb mértékben a fibronectinhez, dózistól függően (Lacoste-Eleau, 1994). A 11C3 molekula a humán vérlemezke-specifikus integrin és fibrinogén-receptor GPIIb-IIIa (CD41/61) madár-homológja. (Pidard, 1983; Ody, 1999). A 11C3 reagál myeloid és erythroid progenitorsejtekkel és T-lymphocytákkal a csontvelőben (Ody, 1999, 2001). A 11C3 marker pozitivitást mutat a 4. embrionális napon a szikhólyag haemopoetikus sejtein, és a 16. embrionális napon már jelöl thrombocytákat és néhány éretlen thromboplastot a lépben és

a csontvelőben. A 11C3 molekula ezen kívül endothelsejteken is expresszálódik (Corbel, 2002).

**111-427:** A 111-427 egyes csirke haemopoetikus sejtvonalakon expresszálódik, többek között thrombocytákon (Lacoste-Eleaume, 1992), és jelöli a humán T-sejt receptort (TCR) is (Bleux, 1995).

**2C12:** A 2C12 monoklonális ellenanyag MD(Marek's disease)CC-MSB1 lymphoblast-sejtvonalat jelöl, és normális csirke thrombocytákkal reagál (Higashihara, 1986).

**BA3:** kacsá thrombocytákat jelölő ellenanyag (Bertram, 1998).

**LM609:** egy anti- $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin (CD61) molekula, amely csirke haemopoetikus sejteket, macrophágot, endothelt és thrombocytákat jelöl (Lian, 1999; Corbel, 2002).

**LIBS6:** anti-CD41/CD61 molekula, aktivált thrombocytákat ismer fel (Frelinger, 1991; Jin, 2002).

#### 2.4. A thrombocyták fejlődése

A madarak vérképző rendszerének kialakításában a haemopoetikus őssejtek (HSC) több generációja vesz részt. Az első a szikhólyagból származik, és az embrionális fejlődés első (E1) illetve második (E2) napján keletkezik. A második generáció a harmadik naptól (E3) jelenik meg a szikhólyagban és az embrióban. Az embrióból származó sejtek a definitív vérképző szerveket kolonizálják, míg a szikhólyag őssejtjeiből a kikelés előtt eltűnő erythrocyták fejlődnek ki.

A madár embrió definitív vérképzésének megindulását jelzi az aorta ventrális falához tapadó sejtaggregátumok megjelenése a fejlődés harmadik napján (E3). A hatodik napra (E6) ezek a sejtcsoportok eltűnnek, és a dorsális mesentériumban található paraaortikus régió vérképző helyeit hozzák létre (Dieterlen-Lièvre 1984, 1994; Jaffredo, 2000). Az itt lévő sejtek erythroid és granulo-myeloid kolóniák képzésére képesek. Az innen származó pre-T- és B-lymphocytá prekurzorok illetve myeloid prekurzorsejtek kolonizálják a thymust, a bursa Fabricii és a lépét is (Cooper, 1991; Dieterlen-Lièvre, 1994, 1997). Az újabb kísérleti eredmények azt mutatják, hogy létezik még egy vérképző hely, és ez az allantois, amely madárban a harmadik napon (E3)

feljődik ki, és a splanchopleura alkotja, csakúgy, mint a szikhólyagot (Caprioli, 1998).

A madarak thrombocytái az emlősökéivel ellentétben nem megakaryocytákból fejlődnek, hanem thromboplastokból differenciálódnak a felnőtt madár csontvelőjében. Az embrionális fejlődés során a korai csirke embrió vérében két sejtféle fordul elő: az erythroid sejtvonal korai stádiumai és az embrionális thrombocyták (ETs). Az erythrocyták a szikhólyag *area opaca vasculosájában* jelennek meg először, a thromboplastok-thrombocyták eredete azonban sokáig vitatott volt. Az embrionális thrombocyták a HH10+ stádiumtól kezdve (35 órával az inkubáció megkezdése után) megtalálhatók az embrió vérében. A 6-13 stádiumú embrionális blastoderma *in vivo* és *in vitro* tenyésztése során kiderült, hogy az embrionális thrombocytaképzés az *area opaca vasculosa* egész területén megjelenik, míg az *area pellucida* nem vesz részt a thrombocytaképzésben. Az embrionális thrombocyták az *area opaca vasculosa* vérszigeteinek dorsalis szélén kezdenek differenciálódni már a 9. stádiumban, és később vándorolnak a *vasa vitellina* lumenébe, és lépnek be a véráramba (Tahara és Morinaka, 1990). A korai embrionális thrombocyták (HH 12+, 15) általában nagyobbak (14  $\mu\text{m}$ ) az erythroid sejteknél, és fáziskontraszt mikroszkóp alatt kevésbé denz sejtmaggal rendelkeznek. A 24. stádiumban már a közepes (8  $\mu\text{m}$ ) thrombocyták is megtalálhatók, a kis ET-k (5  $\mu\text{m}$ , Lucas és Jamroz, 1961) a 37. stádiumban jelennek meg. Elektronmikroszkópos vizsgálattal is két típusú sejtet különíthetünk el a korai csirke embrióban, aszerint, hogy a sejt tartalmaz-e glikogén szemcséket. A 3-5 napos embrióban az előbbi sejtben sok glikogén granulum van, egyrészt a maghátyához közel, másrészt a citoplazma perifériás nyúlványaiban. A glikogén szemcsék elszórtan helyezkednek el a citoplazmában, nem figyelhetők meg glikogén-aggregátumok. A sejtmag alakja és a mikrotubulusok elrendeződése is jellegzetes. A maghátyán feltűnő behúzódnásokat észlelhetünk. A mikrotubulus-kötegek a sejt belsejében találhatóak, a sejtmag közelében (Tahara, 1983).

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 1. KÍSÉRLETI ÁLLATOK

Immunhisztokémiai vizsgálatokra gyöngytyúk (*Numida meleagris*), csirke (White Leghorn, SPF, Phylaxia-Sanophi, Magyarország) és fürj (*Coturnic coturnix japonica*) embriók, illetve kikelt állatok szerveit használtam. Gyöngytyúk és fürjtojásokat kistermelőktől vásároltuk. A madártojásokat laboratóriumunk keltetőgépeiben (38°C-on, 60% páratartalom) inkubáltam. Kétéltű, hüllő és patkány szerveket Dr. Víg Bélától kaptam. A kísérleti célokra felhasznált állatok tartása és feldolgozása megfelelt az állatvédelmi törvényekben előírtaknak.

### 2. ELLENANYAGOK

Kísérleteimhez összehasonlító immunhisztokémiai céljára a következő egér ellenanyagokat, reagenseket használtam:

- anti-vimentin (Amf-b17) GRL-1, GRL-2 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, USA)
- anti-csirke IgG (CG-106; Sigma-Aldrich Magyarország Kft.)
- madár B-sejt marker (Bu-1a és Bu1b; Dr Olli Vainio, Turku, Finnország, szívességéből)
- fürj haemopoietikus és endothél marker (QH1, Dr. Thierry Jaffredo, Párizs, Franciaország, szívességéből)
- madár thrombocytá markerek (MEP-17, MEP-21; Dr. Kelly M. McNagny; University of British Columbia, Canada szívességéből)
- anti csirke-IgM, anti-CD3 (M-I; Dr. Chen-lo H. Chen, Birmingham, AL, USA, szívességéből)
- csirke thrombocytá marker (K-1; Dr. Hyun Soon Lillehoj, Animal and Natural Resources Institute, USDA-ARS, Beltsville, USA szívességéből)
- biotinilált-anti-egér IgG; avidin-biotinilált-peroxidáz komplex; (Vector Laboratories, Inc Burlingame CA, USA)
- streptavidin-Alexa A-488; A-546; A-594 (Molecular Probes, Oregon, USA)



### **3. SZÖVETTANI FELDOLGOZÁS**

#### **3.1. Fagyasztott metszetek készítése**

Az idősebb embriók és felnőtt állatok szerveit májdarabkákkal borítottam, hogy megakadályozzam a kiszáradást és folyékony nitrogénben lefagyasztottam. Az így nyert blokkokból kriosztáttal 7-11 µm metszeteket készítettem ezeket poly-L-Lysine-nel (Sigma) bevont tárgylemezre vettem fel, majd 10 percig levegőn szárítottam, hideg acetonnal fixáltam és újra szobahőmérsékleten megszárazítottam.

#### **3.2. A zselatin-szacharózos beágyazás**

A 10 naposnál fiatalabb embriókat pufferolt 4 % formaldehidben 1 óráig fixáltam. Az embriókat 15%-os szacharóz 0,1 M-os foszfát-puffer oldatában, 4°C-on, 48 órát, majd 15%-os szacharózt és 7,5% zselatint tartalmazó foszfát-pufferben 1 órát, 37°C-on inkubáltam. Az így kapott blokkokat körbevágva -60°C-os 2-metilbután-izopentánban (Fluka, Sigma) lefagyasztottam és -20° C-on tároltam. A metszés előtt a blokkokat a kriosztátba helyeztem, hogy átvegyék annak hőmérsékletét, majd -18 illetve -20°C-on metszeteket készítettem poly-L-Lysine-nel (Sigma) bevont tárgylemezre.

#### A szacharóz-zselatinos beágyazáshoz használt oldatok

Foszfát-puffer: 0,24 M-os foszfát-puffer törzsoldat (pH=7,2); 3 liter oldat összetétele:  
19,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 81 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , desztillált víz

Az oldatot hűtőben tároljuk, felére hígítjuk, és az így kapott 0,12 M-os puffer pár napig eltartható 4°C-on. A szacharóz tartalmú puffer (15 m/V%-os) is hűtőben tárolható, a szacharózt és zselatint tartalmazó foszfát-puffert (7,5 m/V%-os) 50 ml-es csövekben tartjuk -20°C-on (többször is visszafagyasztható).

Foszfát-paraformaldehid-puffer (4%-os):

Elkészítése: a végső térfogat felének megfelelő mennyiségű desztillált vizet felforraltunk, és egy-két kanál formaldehid port adunk a forrásban lévő vízhez, majd a

végső térfogat felének megfelelő mennyiségű 0,24 M-os foszfát-puffert adunk hozzá, és hagyjuk kihűlni a kész oldatot.

### **3.3. Vérkenet-készítés**

A leölt állat egyik nagyartériájából vettem vért egy fecskendő segítségével, a friss vérből egy cseppet helyeztem a tárgylemezre, és egy másik tárgylemez segítségével kenetet készítettem. A lemezeket szobahőmérsékleten hagytam, és száradás után 10 percig metanolban, ill. acetonnal fixáltam őket. Ezután hagytam, hogy a lemezek megszáradjanak, majd  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltam őket a további feldolgozásig.

## **4. IMMUNHISZTOKÉMIA ÉS IMMUNFLUORESZCENCIA**

### **4.1. Immunhisztokémia**

Az immunhisztokémia vizsgálatokat fagyasztott (kriosztátos) metszeteken végeztem. A metszeteket 10 percig PBS-el rehidráltam. Ezután hozzáadtam a primer ellenanyagot (70  $\mu\text{l}$ ) a metszetekhez és szobahőmérsékleten, 60 percig inkubáltam őket. Másodlagos ellenanyagként 70  $\mu\text{l}$  biotinilált szekunder ellenanyagot (ló anti-egér IgG-t, Vector), 3  $\mu\text{l}/\text{ml}$  PBS-ben hígítva adtam a metszetekhez és szobahőmérsékleten további 60 percig inkubáltam. A szöveti endogén peroxidázt 10 percig, 3 %-os  $\text{H}_2\text{O}_2$ -val blokkoltam, vagy DAB-al előhívtam. A szekunder ellenanyag kötődésének előhívására avidin-biotinilált peroxidáz komplexet használtam. Minden metszetre 70  $\mu\text{l}$ -t mértem, és szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltam. Az előhívást 100 ml PBS-ben, 25 mg 4-chloro-1-naftollal (Sigma), 0,5 ml 3%-os  $\text{H}_2\text{O}_2$  jelenlétében végeztem. 25 perc elteltével, a kellő erősségű színreakció kifejlődését követően, a metszeteket PBS-el öblítettem és vízdékony fedőanyaggal (Poly-Aqua Mount, Polyscience Inc, Warrington PA, USA) lefedtem.

### **4.2. Immunfluoreszcencia**

Ezzel a módszerrel vizsgáltam a kiválasztott ellenanyagok vérkenetben adott jelölését és hasonló festést készítettem a konfokális mikroszkópiára is.

Immunfluoreszcens festésnél az első ellenanyagot azonos módon inkubáltam mint az immunhisztokémiánál. Ezt követően, 70 µl avidinnel jelzett fluorokrómot (streptavidin-Alexa) adtam a rendszerhez (1:200 PBS-ben). Mindezt fénytől védve, szobahőmérsékleten, 40 percig inkubáltam. A sejtmagok jelöléséhez a keneteket még 20 percig DAPI-val inkubáltam. Mosás után vízzel vékony fedőanyaggal lefedtem.

Az immunfestések során használt pufferek:

PBS: összetétele: 8 g/l NaCl (137 mM), 0,2 g/l KCl (2,7 mM), 1,42 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (8 mM), 0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,5 mM)

Előhívószerek:

DAB: 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma); 50 mg/10 ml PBS koncentrációban (törzsoldat készítése: 500 mg DAB-ot 10 ml PBS-ben feloldani, szűrni, -20 °C-on tárolni)

CN: chloro-naftol (Sigma); 25 mg/100 ml PBS töménységben (törzsoldat készítése: 500 mg CN-t feloldani 2 ml abszolút ethanolban, -20 °C-on tárolni)

## **5. MAY-GRÜNWALD-GIEMSA FESTÉS**

A methanollal fixált vérkenetet desztillált vízzel felére hígított May-Grünwald-oldatban inkubáltam 5 percen át. Miután leöntöttem a festéket róla, a lemezt híg Giemsa-oldatban inkubáltam (10 csepp Giemsa-oldat 10 ml desztillált vízben oldva), 15 percig. Ezután gyors öblítés következett desztillált vízzel, amelyet szűrőpapíros leitatás és szárítás követett. Az így előkészített kenetet lefedés nélkül, cédrusolaj rácseppentése után immerziós lencsés fénymikroszkóp alatt vizsgáltam.

## **6. IMMUNHISZTOKÉMIA MAY-GRÜNWALD-GIEMSA FESTÉSSEL**

A methanollal fixált keneteket 5 percig rehidráltam PBS-ben. Ezt 10 perces fehérje-blokkolás követte BSA-ban. Ezután a keneteket a primer ellenanyagokkal inkubáltam 45 percen át nedves kamrában, majd 45 perces inkubáció következett a szekunder

ellenanyaggal nedves kamrában. Ezt az endogén peroxidáz enzim blokkolása követte. Az előhívást DAB-oldattal végeztem, 1-2 percig. (A DAB-oldathoz egy eppendorf DAB törzsoldatot 100 ml PBS-sel hígítottam, az így létrejött elegyet leszűrtem, és 500 µl 3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t öntöttem hozzá.) Ezt követte a May-Grünwald-Giemsa festés (a fent részletezett módszer alapján).

## **7. FÉNYKÉPEZÉS ÉS KÉPFELDOLGOZÁS**

Az elkészült metszetekről Zeiss Axiophot mikroszkóp segítségével Olympus DP50 típusú kamerával digitális fényképeket készítettem. A konfokális képeket BioRad MRC 1024 típusú konfokális mikroszkóppal, Dr. Paku Sándor (Semmelweis Egyetem, I.sz. Patológiai Intézet) segítségével készítettem. A további feldolgozást Adobe Photoshop 5.0 típusú programmal végeztem.

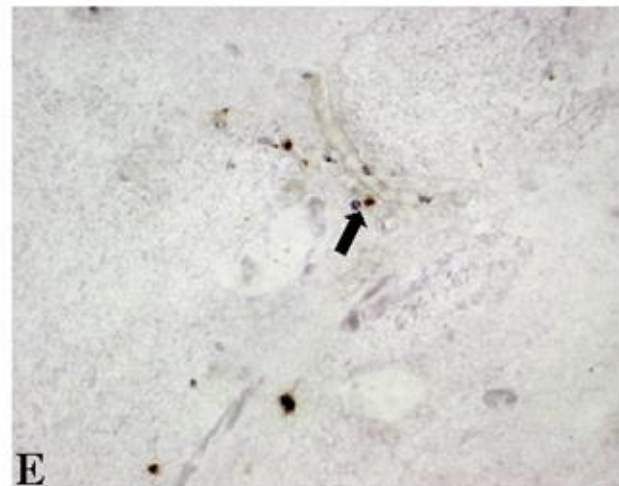
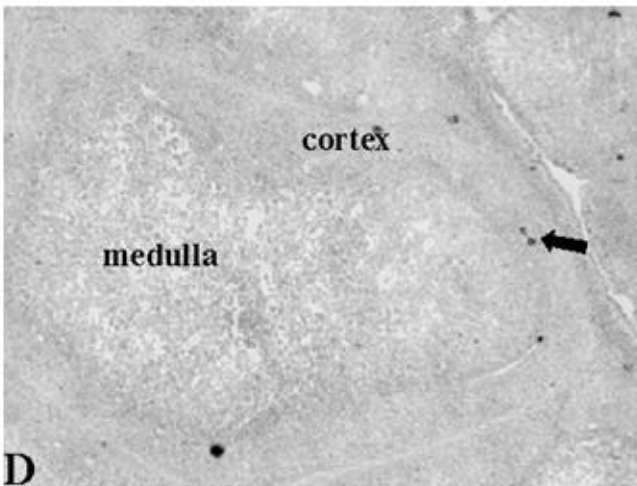
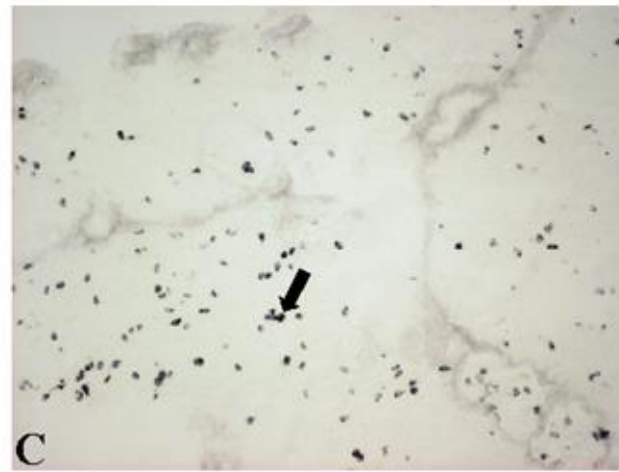
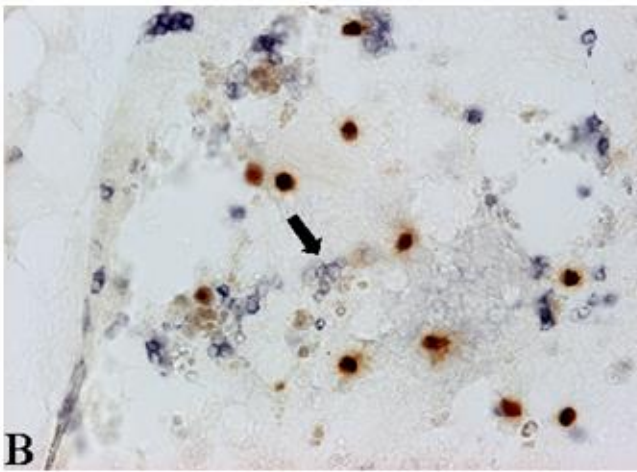
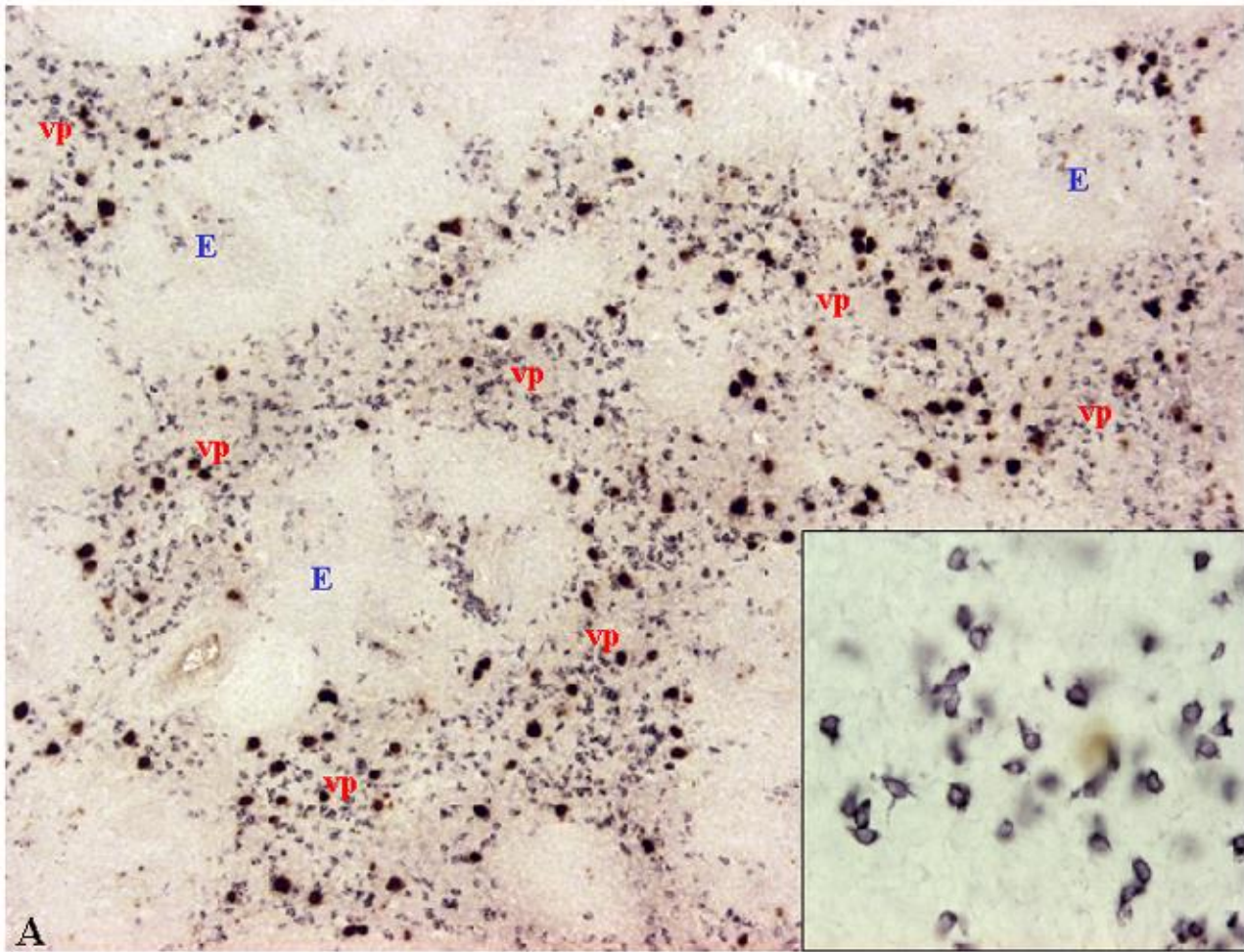
## **EREDMÉNYEK**

### **1. AZ EIIE4 MOLEKULA EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA FELNŐTT SZÖVETEKEN**

Az EIIE4 (izotípusa: IgG<sub>1</sub>) monoklonális ellenanyag által felismert molekula expresszióját először felnőtt gyöngytyúk szöveteiben vizsgáltam. A fagyasztott metszetek immunhisztokémiai vizsgálata során a lép vörös pulpájában nagy számú EIIE4-pozitív sejtcsoportokat találtam, amelyek thrombocytákra jellemző eloszlást és morfológiát mutattak (3.a.ábra). A két hetes gyöngytyúk csontvelőben az EIIE4-pozitív sejtek nagy számban jelennek meg, és csoportos elrendeződést mutatnak (3.b.ábra). A tüdőben szintén számos EIIE4-pozitív sejt található elszórtan a parabronchiális régióban (3.c.ábra). A bursa Fabricii-ben az EIIE4-pozitív sejtek a kéreg-velő határon található kapillárisokban voltak megtalálhatók (3.c.ábra), hasonló elrendeződést figyeltem meg a thymusban (3.d.ábra), a coecális tonsillában, a bélrendszerben és az egyéb szervekben, ahol csak kis számú sejt jelölődött az erekben. A központi idegrendszerben és a mirigyekben nem találtam EIIE4-pozitív sejteket. Az EIIE4 molekula különböző fajokkal való keresztreakcióját béka, csirke, fűrj, patkány lépmeteszeten vizsgáltam, de az ellenanyag semmilyen más fajon nem mutatott keresztreakciót.

---

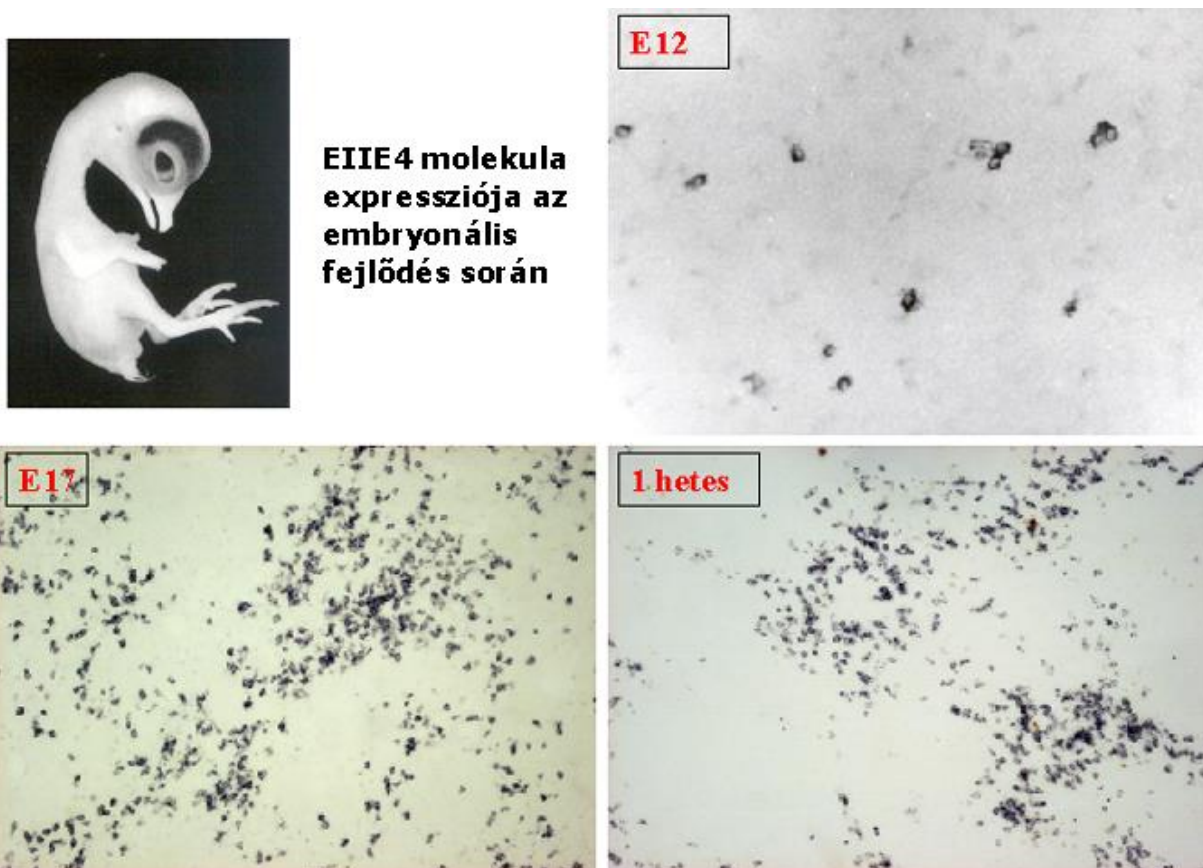
**3.ábra. Az EIIE4 molekula expressziója a felnőtt gyöngytyúk szövetekben.** A. EIIE4-pozitív sejtek a lép vörös pulpájában. Vp: vörös pulpa., E: ellipszoid; 10 hetes gyöngytyúk lép (120x; 296x). B. EIIE4-pozitív sejtek (nyíl) a csontvelőben (190x); 1 hetes gyöngytyúk. C. EIIE4-pozitív sejtek (nyíl) a tüdő parenchymájában (100x); 6 hetes gyöngytyúk. D. és E. EIIE4-pozitív sejtek (nyíl) a bursa Fabricii kéreg-velő határ (100x) és a thymus (nyíl) kapillárisereiben (100x); 6 hetes gyöngytyúk.





## 2. AZ EIIE4 MOLEKULA EXPRESSZIÓJA AZ EMBRIONÁLIS FEJLŐDÉS SORÁN

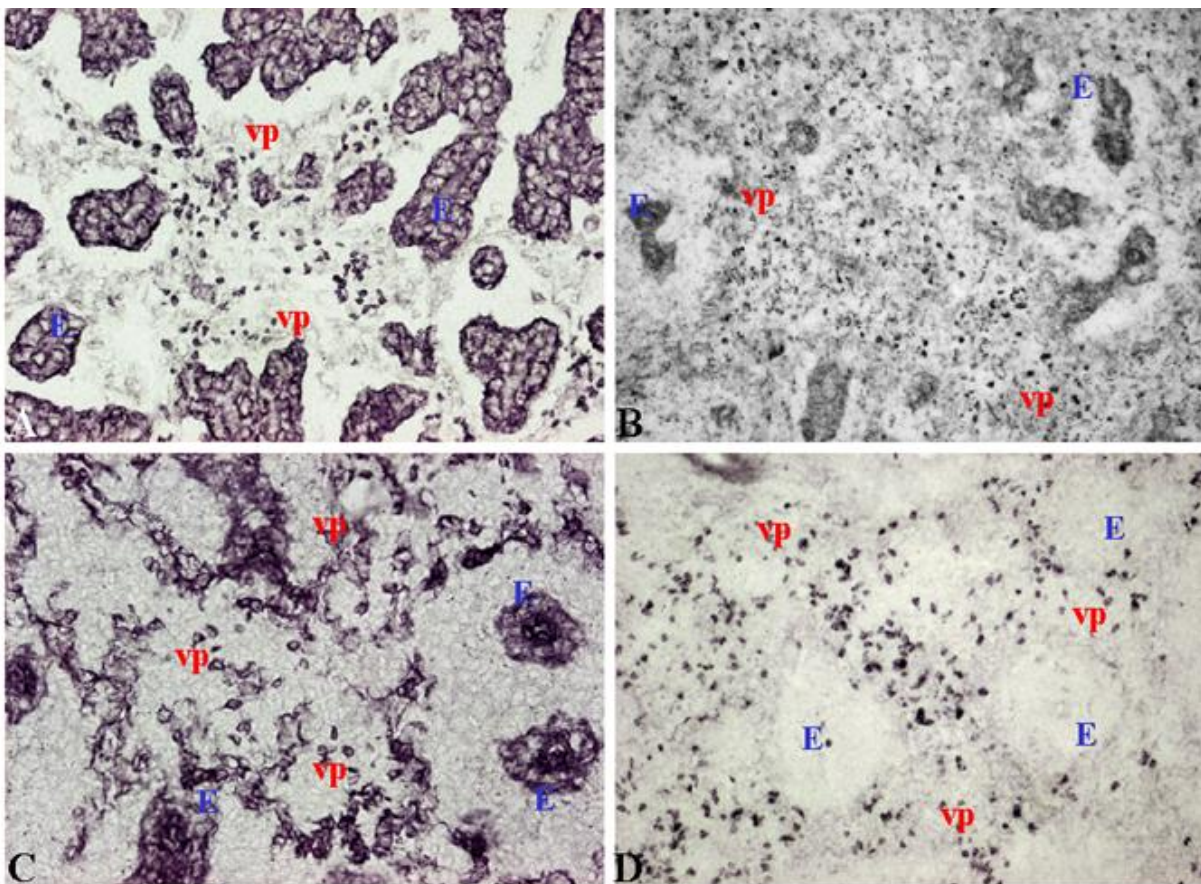
Különböző korú embriók felhasználásával megpróbáltam kideríteni az EIIE4-pozitív sejtek megjelenésének időpontját a gyöngytyúkban. Azt tapasztaltam, hogy ezek a sejtek legkorábban a 12. embrionális napon jelennek meg a lépben. Ebben a stádiumban a lép vörös és fehér pulpája még nem különül el. Az EIIE4-pozitív sejtek 2-3 sejtés aggregátumokat alkotnak elszórtan a lép parenchymában (4.ábra). A 17. embrionális napra megindul a vörös és a fehér pulpa elkülönülése, és az EIIE4-pozitív sejtek egyre inkább a leendő vörös pulpa területén lokalizálódnak, és a korábbi fejlődési stádiumban megfigyelt módon csoportosulnak (4.ábra).



**4.ábra.** EIIE4 molekula expressziója a gyöngytyúk lépben az embrionális fejlődés során. E12 stádiumban kevés sejt jelölődik elszórtan (240x); E17 stádiumban a vörös pulpában lokalizálódó EIIE4-pozitív sejtek kirajzolják a vörös és fehér pulpa határait (96x); 1 hetes madárban az EIIE4-pozitív sejtek a felnőttre jellemző szöveti eloszlást mutatnak (96x).

### 3. AZ EIIE4-POZITÍV SEJTEK SEJTTÍPUSÁNAK MEGHATÁROZÁSA

Az embrionális és a felnőtt szöveteken végzett immunhisztokémiai festések alapján az EIIE4 molekula nem expresszálódott T- illetve B-lymphocytákon, macrophágokon, ezért az EIIE4-pozitív sejtek anatómiai lokalizációja és megjelenése alapján feltételeztem, hogy az EIIE4 marker thrombocytákat jelöl. Ennek tisztázására összehasonlítottam az EIIE4 molekula expresszióját a kereskedelmi forgalomban elérhető, csirke thrombocytát jelölő ellenanyagokkal: MEP17, MEP21, GRL2, K1 (5.ábra).

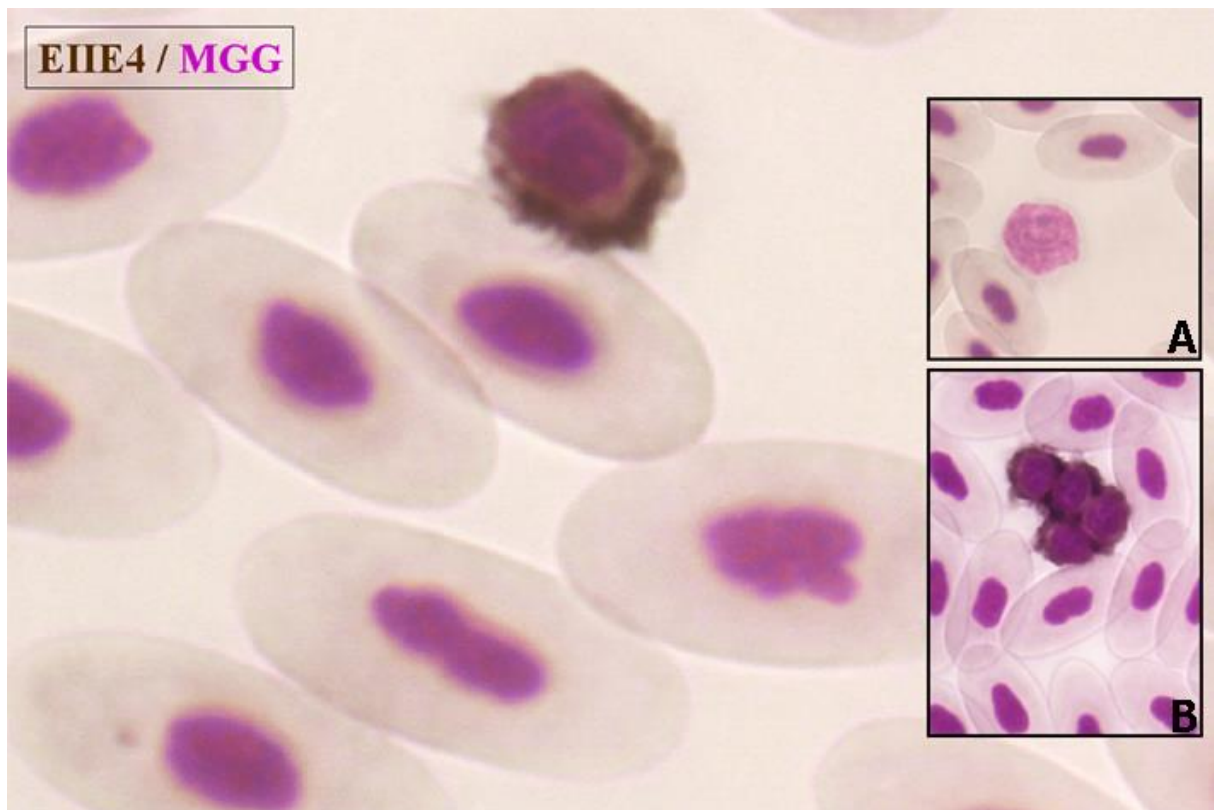


**5.ábra. Madár lép összehasonlító festése más thrombocyta markerekkel.**  
**A.** MEP17-pozitív sejtek a vörös pulpában (vp) és az ellipszoidban (E); 3 hetes gyöngytyúk lép (120X). **B.** GRL2-pozitív sejtek a vörös pulpában (vp) és az ellipszoidban (E) (120x); 3 hetes gyöngytyúk lép. **C.** MEP21-pozitív sejtek a vörös pulpában (vp) és ellipszoidban (E) (240x); 5 hetes csirke lép. **D.** K1-pozitív sejtek a vörös pulpában (vp), az ellipszoidokat a K1 nem jelöli (E) (120x); 5 hetes csirke lép.



A vizsgált ellenanyagok közül kettő: a MEP17 és a GRL2 gyöngytyúkkal is keresztreagált. Immunhisztokémiai módszerrel felnőtt gyöngytyúk lépmeteszeten tanulmányoztam a thrombocyták szöveti eloszlását, amely az EIIE4 által jelölt sejtekéhez hasonló volt. A MEP17 a thrombocyták mellett festi a lép ellipszoidjait és az endothelsejteket is. (5.a.ábra) A GRL2 szekrécións granulumokat jelöl (5.b.ábra). Következő lépésben vérkeneteken is megvizsgáltam az EIIE4 molekula expresszióját.

A gyöngytyúk vérkeneten az immunhisztokémiai eljárást May-Grünwald-Giemsa festéssel kombináltam. Az MGG-festéssel a vérsejtek magja rózsaszínnel, az EIIE4 a DAB-bal történt előhívást követően barnával festődött. A MGG-EIIE4 kettős festés esetén az EIIE4 ellenanyag gyűrűszerűen festi a thrombocyták citoplazmáját, a sejtmagok körül EIIE4-negatív citoplazma-udvar látható (6.ábra).



**6.ábra.** Gyöngytyúk vérkenet (MGG-festéssel kiegészített EIIE4-immunhisztokémia). EIIE4-pozitív thrombocytá (negatív citoplazmatikus udvarral) és erythrocyták (2 000x); **A.** EIIE4-negatív lymphocytá és erythrocyták (640x). **B.** EIIE4-pozitív thrombocyták (640x).

A thrombocytán kívül más fehérvérsejt nem mutatott pozitívítást. A vérkeneteket immunfluoreszcens módszerrel is megfestettem, és differenciál-interferencia-kontraszt (DIC) eljárással, vagyis Nomarski-optikával azonosítottam a thrombocytákat. A vérkenetben mindhárom ellenanyag (EIIIE4, GRL2, MEP17) a thrombocytákat jelölte, amelyeket morfológiájuk alapján és a fent említett módon könnyen el lehetett különíteni a többi vérsejttől (7.ábra).

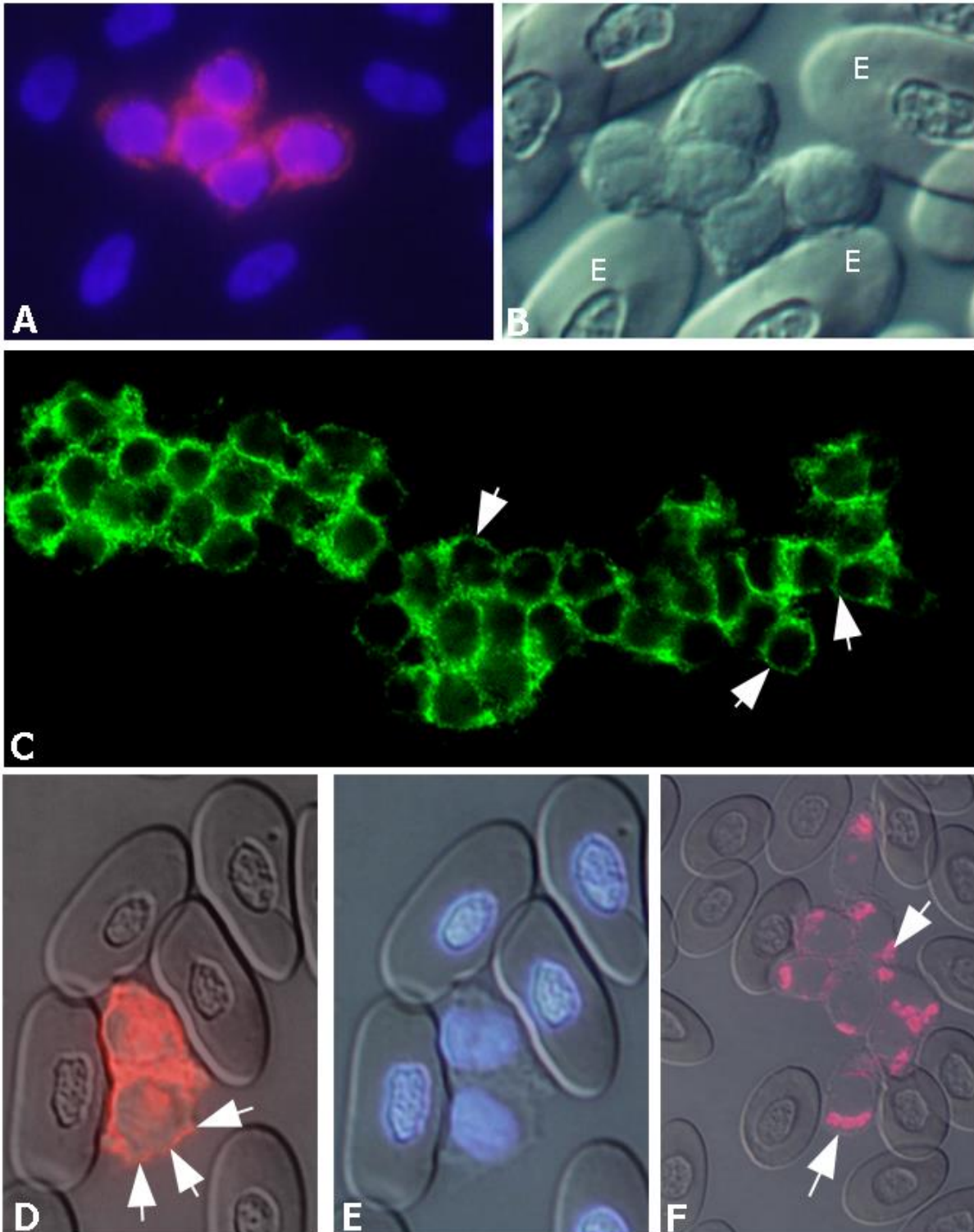
#### 4. AZ EIIIE4 MOLEKULA SEJTEN BELÜLI LOKALIZÁCIÓJA

Az EIIIE4 által felismert antigén sejten belüli elhelyezkedésének tanulmányozására immunfluoreszcens festést alkalmaztam, amelyet DAPI-magfestéssel egészítettem ki. Az EIIIE4 gyűrűszerű, szemcsés, egyenletes eloszlású festődést mutatott a thrombocyták citoplazmájában (7.a., 7.c.ábra).

A pontosabb lokalizáció meghatározásához konfokális elektronmikroszkópos vizsgálatot végeztem (7.c.ábra), amely többletinformációval nem szolgált, ezért összehasonlítást végeztem olyan ellenanyagokkal (MEP17, GRL2), amelyeknek sejtbeli lokalizációja pontosan ismert. Az immunfluoreszcens eljárással készült képeken jól látszott, hogy a membránmarker MEP17 (anti-integrin  $\alpha_2$  molekula) a thrombocyták sejtthártyáját rajzolja ki egyértelműen (7.d.ábra), míg a szekrécións granulumokhoz kötődő GRL2 intracitoplazmatikus festődést adott (7.f.ábra).

---

**7.ábra. az EIIIE4 molekula sejten belüli lokalizációjának vizsgálata. A.** EIIIE4-pozitív thrombocyták és erythrocyták (EIIIE4-immunfluoreszcens festés és DAPI-magfestéssel; 880x). **B.** Thrombocyták és erythrocyták (differenciál-interferencia-kontrasztos eljárás, DIC; 1200x). **C.** EIIIE4 pozitív thrombocyták csoportja (konfokális mikroszkópos felvétel; 800X). **D.** Thrombocyták és erythrocyták (MEP17-immunfluoreszcens jelölés és DIC, 1200x). **E.** Thrombocyták és erythrocyták (DAPI-magfestés, 1200x). **F.** Thrombocyták és erythrocyták (GRL2-immunfluoreszcens jelölés és DIC, 880x).



## **EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE**

Munkám során az EIIE4 monoklonális ellenanyag karakterizálását végeztem el. Ez az antitest a korábbi vizsgálatok alapján feltehetően a gyöngytyúk thrombocytákat jelöli.

A felnőtt szöveteken végzett immunhisztokémiai festések igazolták a feltételezést, amelyet a kereskedelemben elérhető thrombocyta markerekkel végzett komparatív festések is alátámasztottak. Az EIIE4 csak a lépben, a csontvelőben és a tüdőben jelölt nagyszámú sejtet. A megfestett vérkeneteken tapasztalt eredmények szintén megerősítették a feltételezésem helyességét. Az EIIE4-pozitív sejtek az erythrocytáknál és a leukocytáknál kisebb sejtek, amelyek morfológiájuk alapján thrombocytáknak felelnek meg. A vérben található nagy mennyiségű EIIE4-pozitív sejt elrendeződése és morfológiája is arra enged következtetni, hogy ezek a sejtek thrombocyták. Az EIIE4 expressziója az embrionális fejlődés során ismét alátámasztotta állításomat, hiszen az embrionális lépben jelölt sejtek elhelyezkedése és morfológiája megfelelt a thrombocytáénak, és a lép felnőttre jellemző szerkezetének kialakulása során, vagyis a vörös és fehér pulpa differenciálódásával az EIIE4-pozitív sejtek a thrombocytákra jellemzően a vörös pulpában helyezkedtek el.

Az EIIE4 sejtbeli lokalizációjának meghatározásához vérkeneten végeztem komparatív festéseket. Ehhez a gyöngytyúk szövetekkel is keresztreagáló két ellenanyagot használtam fel: a GRL2-t, amely intracitoplazmatikusan helyezkedik el, hiszen a szekretoros granulumok membránjához kapcsolódik, és transzmembránprotein-jellegzetességeket mutat (Thomas, 1994), és a MEP17-et, amely membránmarker (anti-integrin- $\alpha_2$  molekula és az emlős VLA-2 integrin homológja a madarakban, Hemler, 1990). Az EIIE4 gyűrűszerű, szemcsés, egyenletes eloszlású festődést mutatott a thrombocyták citoplazmájában, amely nagyon hasonló volt a MEP17 jelöléssel kapott képhez, ezért feltételezhető, hogy az EIIE4 ellenanyag egy thrombocyta-specifikus membránmolekulát jelöl. A pontosabb sejtbeli lokalizáció meghatározása érdekében elektronmikroszkópos vizsgálatokat tervezek. Az irodalomban számos madárspecifikus thrombocyta marker ismert, de mindegyik jelöl más sejtípust is.

A K1 molekula (135 kDa és egy 61-68 kDa molekulásúlyú polipeptidből álló heterodimer) a csirke macrophágok és thrombocyták egy sejtfelszíni antigénjével reagál, és a lép vörös pulpája mellett a bursa Fabricii hámját is jelöli (Magyar, 2001; Oláh, 2002). A MEP21 a lép thrombocytáin kívül a lép ellipszoidjait is festi, emellett azonban normális illetve vírustranzformált haemopoetikus sejteket is felismer (McNagny, 1992). A MEP17 festi a lép ellipszoidjait is a thrombocyták mellett. A MEP17-ről tudjuk, hogy valószínűleg az emlős VLA-2 integrin homológja a madarakban (Hemler, 1990). A csirke granulocytákban és thrombocytákban azonosított GRL2 (45-60 kDaltonos polipeptid) által festett thrombocyták szöveti eloszlása a gyöngytyúk lépben az EIIE4 által jelölt sejtekéhez hasonló volt, azonban mivel a GRL2 szekrécións granulomokot jelöl, számos endo- és exocrin mirigy sejtjeit festi a leukocytákon kívül (Thomas, 1993, 1994). A haemopoetikus rendszer fejlődése során a GRL2 thrombocytákban, myelocytákban, myeloid progenitorokban és az erythroid progenitorok egy alcsoportján is expresszálódik (Thomas, 1993). Az LM609, a 11C3 és a 111-427 monoklonális ellenanyagok thrombocyták mellett endothel és haemopoetikus sejteken is expresszálódnak (Lian, 1999; Corbel, 2002; Pidard, 1983; Ody, 1999; Corbel 2002; Lacoste-Elleume, 1992, 1994; Bleux, 1995). A felsorolt markerekkel ellentétben az EIIE4 kizárólag a gyöngytyúk thrombocytákat jelöli. A molekula biokémiai karakterizálására tett kísérletek eddig nem jártak eredménnyel, de a jövőben szeretném meghatározni az antitest molekulatömegét és biokémiai tulajdonságait is.

### **KONKLÚZIÓ**

- a) az elvégzett vizsgálatok során kiderült, hogy az EIIE4 egy thrombocytát jelölő sejt- és fajspecifikus ellenanyag, ellentétben a többi thrombocytá markerrel,
- b) az EIIE4 monoklonális ellenanyag ígéretes molekuláris markernek bizonyul sejtvonalspecificitása miatt, és alkalmas eszköz lehet a thrombocyták differenciálódásának és funkcióinak tanulmányozására.

## IRODALOMJEGYZÉK

Beaupain D. M. C. and Dieterlen-Lievre F. (1979). Are developmental hemoglobin changes related to the origin of stem cells and site of erythropoiesis? *Blood* 53: 212-225

Behnke O. (1967). Electron microscopic observations on the membrane systems of the rat blood platelet. *Anat Rec* 158: 121-138

Belamarich F. A. and Simoneit L. W. (1973). Aggregation of duck thrombocytes by 5-hydroxytryptamine. *Microvasc Res* 6(2), 229-34

Belamarich F. A., Shepro D. and Kien M. (1968). ADP is not involved in thrombin-induced aggregation of thrombocytes of a non-mammalian vertebrate. *Nature* 220: 509-10

Bertram E. M., Jilbert A. R. and Kotlarski I. (1998). Characterisation of duck thrombocytes. *Res Vet Sci* 64: 267-270

Bleux C., Lacoste-Eleaume A. S., Cabaniols J. P., Carriere D., Poncelet P. and Kanellopoulos-Langevin C. (1995). A mouse monoclonal antibody specific for the V beta 5.3 chain of the human TcR recognizes a subgroup of the mouse TcR V beta 8.2 chains. *J Leukoc Biol* 57: 491

Bradshaw A. D., McNagny K. M., Gervin D. B., Cann G. M., Graf T. and Clegg O. (1995). Integrin  $\alpha_2\beta_1$  mediates interactions between developing embryonic retinal cells and collagen. *Development* 121: 3593-3602

Breton-Gorius J. and Guichard (1972). Ultrastructural localization of peroxidase activity in human platelets and megakaryocytes. *Am J Pathol* 66: 277-93

Caprioli A., Jaffredo T., Gautier R., Dubourg C. and Dieterlen-Lievre F. (1998). Blood-borne seeding by hematopoietic and endothelial precursors from the allantois. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 1641-1646

Carlson H. C. and Sweeny P. R. (1968). Electron microscopy and histochemical demonstration of lysosomal structures in chicken thrombocytes. *Avian Dis* 12(4), 636-44

Chang C. F. and Hamilton P. B. (1979). The thrombocyte as the primary circulating phagocyte in chickens. *J Reticuloendothel Soc* 25(6), 585-90

Cheresh D. A., Spiro R. C. (1987). Biosynthetic and functional properties of an Arg-Gly-Asp-directed receptor involved in human melanoma cell attachment to vitronectin, fibrinogen, and von Willebrand factor. *J Biol Chem* 262(36), 17 703-17 711

Cooper M. D., Chen C. H., Bucy R. P. and Thompson C. B. (1991). Avian T cell ontogeny. *Adv Immunol* 30, 87

Corbel C. (2002). Expression of alphaVbeta3 integrin in the chick embryo aortic endothelium. *Int J Dev Biol* 46(6), 827-30

Daimon T. and Uchida K. (1978). Electron microscopic and cytochemical observations on the membrane systems of the chicken thrombocyte. *J Anat* 125(1), 11-21

Dieterlen-Lievre F. (1975). On the origin of hematopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J Embryol Exp Morphol* 33, 607-619

Dieterlen-Lievre F. (1984). Emergence of intraembryonic blood stem cells in avian chimeras by means of monoclonal antibodies. *Dev Comp Immunol* 3, 75-80

Dieterlen-Lievre F. (1994). Hemopoiesis during avian ontogeny. *Poultry Sci Rev* 5, 273-305

Dieterlen-Lievre F. (1997). Intraembryonic hematopoietic stem cells. *Haematol Oncol Clin North Am* 11, 1149-1171

Frelinger A. L. 3<sup>rd</sup>, Du X. P., Plow E. F., Ginsberg M. H. (1991). Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa) alter receptor affinity, specificity, and function. *J Biol Chem* 266(26), :17 106-17 111

Glick B., Sato K. et al. (1964). Comparison of the phagocytotic ability of normal and bursectomised birds. *J Reticuloendoth Soc* 1, 442-449

Hemler M. E., Elices M. J., Parker C. and Takada Y. (1990). Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunol Rev* 114, 45-65

Higashihara T., Mikami T., Kodama H., Izawa H. and Tamura H. (1986). Detection of a new antigen associated with chicken thrombocytes on Marek's disease lymphoblastoid cell line. *JNCI* 76(6), 1085-1094

Horiuchi H., Hayashi M., Matsuda H., Murata M. (1992). Identification of fibronectin in chicken thrombocytes. *Cell Struct Funct* 17(2), 93-98

Jaffredo T, Gautier R, Brajeul V, Dieterlen-Lievre F. (2000). Tracing the progeny of the aortic hemangioblast in the avian embryo. *Dev Biol* 224(2), 204-14

Jin J, Quinton T. M., Zhang J, Rittenhouse S. E., Kunapuli S. P. (2002). Adenosine diphosphate (ADP)-induced thromboxane A(2) generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin alpha(IIb)beta(3) and ADP receptors. *Blood* 99(1), 193-198



Kaspers B., Lillehoj H. S. and Lillehoj E. P. (1993). Chicken macrophages and thrombocytes share a common cell surface antigen defined by a monoclonal antibody. *Vet Immunol Immunopathol* 36(4), 333-346

Kuruma I., Okada T., Kataoka K. and Sorimachi M. (1970). Ultrastructural observation of 5-hydroxytryptamine-storing granules in the domestic fowl thrombocytes. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 108(2), 268-81

Lacoste-Eleaume A-S., Bleux C., Corbel C., Carriere D., Poncelet P., Kanellopoulos J. and Kanellopoulos-Langevin C. (1992). A new marker on chicken hematopoietic cells is defined by a monoclonal antibody raised against a V beta chain of the human TCR. *Dev Immunol* 2, 273-284

Lacoste-Eleaume A-S., Bleux C., Quéré P., Coudert F., Corbel C. and Kanellopoulos-Langevin C. (1994). Biochemical and Functional Characterisation of an Avian Homolog of the Integrin GPIIb-IIIa Present on Chicken Thrombocytes. *Experimental Cell Research* 213, 198-209

Lian J., Guoping C., Shapiro S. S., Tran L. P., Beacham D. A. (1999). Glycoprotein Iba $\alpha$  can mediate endothelial cell migration on von Willebrand factor-containing substrata. *Exp Cell Res* 252(1), 114-122

Lucas A. M. and Jamroz C. (1961). Atlas of Avian Haematology. Washington: United States Department of Agriculture

Magyar A., Nagy N., Gumati M. K. and Oláh I. (2001). K1 antigen expression in normal and immunosuppressed birds. *Current Progress on Avian Immunology Research*. Edited by K. A. Schat. Ithaca, NY 137-143

Maxwell M. H. (1973). An ultrastructural comparison of the mononuclear leucocytes and thrombocytes in six species of domestic bird. *J Anat* 117, 69-80

Maxwell M. H. and Trejo F. (1970). The ultrastructure of white blood cells and thrombocytes of the domestic fowl. *Br Vet J.* 126(11), 583-92

McNagny K. M., Lim F., Grieser S. and Graf T. (1992). Cell surface proteins of chicken hematopoietic progenitors, thrombocytes and eosinophils detected by novel monoclonal antibodies. *Leukemia* 6, 975-984

McNagny K.M., Pettersson I., Rossi F., Flamme I., Shevchenko A., Mann M. and Graf T. (1997). Thrombomucin, a Novel Cell Surface Protein that Defines Thrombocytes and Multipotent Hematopoietic Progenitors. *The Journal of Cell Biology* 138(6), 1395-1407

Meyer D. C. and Sturkie P. D. (1974). Distribution of serotonin among blood cells of the domestic fowl. *Proc Soc Exp Biol Med* 147(2), 382-6

Ody C., Vaigot P., Quere P., Imhof B. A. and Corbel C. (1999). Glycoprotein IIb-IIIa is expressed on avian multilineage hematopoietic progenitor cells. *Blood* 93(9), 2898-2906

Ody C., Corbel C., Dunon D., Vainio O., A Imhof B. (2001). MHC class II beta-chain and alphaIIb beta3 integrin are expressed on T-cell progenitors in embryonic bone marrow. *Mol Immunol* 38(1), 45-53

Oláh I., Gumati M. K., Nagy N., Magyar A., Kaspers B. and Lillehoj H. (2002). Diversity of the K1 antigen expression by the cortico-medullary and reticular epithel cells of the bursa of Fabricius in chicken and guine fowl. *Dev Comp Immunol* 26(5), 481-488

Pidard D., Montgomery R. R., Bennett J. S. and Kunicki T. J. (1983). Interaction of AP-2, a monoclonal antibody specific for the human platelet glycoprotein IIb-IIIa complex, with intact platelets. *J Biol Chem* 258(20), 12582-6

Sorrel J. M. (1988). Ultrastructural localization of fibronectin in bone marrow of the embryo chick and its relationship to granulopoiesis. *Cell Tissue Res* 252(3), 565-571

Stalsberg and Prydz (1963). Studies on chick embryo thrombocytes. Function in primary haemostasis. *Thromb Diath Hemorrhag* 9, 291-299

Taffarel M. and Oliveira M. P. (1993). Cytochemical analysis of the content of chicken thrombocytes vacuoles. *Cell Biol Int.* 17(11), 993-9

Thomas J-L., Pourquie O., Coltex M., Vaigot P. and Le Douarin N. M. (1993). Identification in the Chicken of GRL1 and GRL2: Two Granule Proteins Expressed on the Surface of Activated Leukocytes. *Experimental Cell Research* 204, 156-166

Thomas J-L., Stieber a. and Gonatas N. (1994). Two proteins associated with secretory granule membranes identified in chicken regulated secretory cells. *Journal of Cell Science* 107, 1297-1308

Yutaka Tahara and Toshiyuki Morinaka (1990). The Blood Island is a Site of Formation of the Primary embryo Thrombocyte in the Chick Blastoderm. *Develop Growth and Differ* 32(4), 403-409

Yutaka Tahara, Shigeki Omori and Akihiko Hashimoto (1983). Formation of Embryo Thrombocytes in Chick Blastoderm: Morphology, Site of production and Time of Emergence in the Blood. *Develop, Growth and Differ* 25(1), 75-83

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Köszönettel tartozom családomnak, akik mindig mellettem álltak, és mindenben támogattak.

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőimnek: Dr. Oláh Imrének, a Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézete vezetőjének, aki lehetővé tette, hogy az irányítása alatt álló intézetben tanuljak, dolgozzak, és aki mindvégig irányította munkámat; és Dr. Nagy Nándornak, a Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet tanársegédjének, aki mindvégig segítette munkámat, aki megismertetett a különböző laboratóriumi technikákkal. Köszönettel tartozom mindkettőjüknek, amiért bevezettek a madár immunológia és fejlődéstan tudományába.

Köszönetemet kell továbbá kifejeznem Dr. Magyar Attila laborvezetőnek, aki segítséget nyújtott munkám során.

Szeretném továbbá megköszönni a támogatást a labor PhD. hallgatóinak: Minkó Krisztinának, Felföldi Balázsnak és Ígyártó Botondnak, akik hasznos tanácsokkal láttak el vizsgálódásaim során.

Végül szeretném megköszönni munkáját laboratóriumunk asszisztenseinek, Incze Jutkának és Urák Beátának.