

Zespół Chirurgii Doświadczalnej i Transplantologii
Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej P.A.N.
w Warszawie.

Kierownik: Prof. Dr med. Jan Nielubowicz

BADANIA DOŚWIADCZALNE NAD PRZESZCZEPIANIEM
ŚLEDZIONY.

Rozprawa na stopień doktora medycyny.

Marek Skośkiewicz



525

<http://rcin.org.pl>

Spis treści.

I. Wstęp	3
II. Przegląd piśmiennictwa	5
III. Badania własne:	
- technika przeszczepiania śledziony u psa	12
- technika przeszczepiania śledziony u królików	17
- kontrola czynności przesz- czepionej śledziony	23
- wyniki	27
IV. Omówienie	44
V. Wnioski	48
VI. Podziękowanie	49
VII. Spis rycin	50
VIII. Bibliografia	52

I. Wstęp .

Celem mojej pracy było opanowanie techniki przeszczepiania śledziony w warunkach doświadczalnych oraz opracowanie metod kontroli czynności przeszczepionej śledziony.

Pozornie badania doświadczalne nad przeszczepianiem śledziony mogą wydawać się mało uzasadnione. Śledziona nie jest narządem niezbędnym do życia, a w olbrzymiej większości urazów śledziony bez wahania podejmuje się decyzję o usunięciu narządu, aby nie ryzykować ewentualnego krwawienia. U dorosłych splenektomia poza krótkotrwałymi zmianami składu morfologicznego krwi nie powoduje żadnych zaburzeń, które musiałyby być systematycznie kompensowane leczeniem substytucyjnym. Nawet przed ukończeniem dojrzewania zabieg ten nie stanowi bezpośredniego zagrożenia życia chorego.

Wiadomo natomiast, że zabiegi przeszczepiania narządów obciążone są nieporównanie większym

Wiadomo natomiast, że zabiegi przeszczepiania narządów obciążone są nieporównanie większym ryzykiem. Co skłania więc do podjęcia prób przeszczepiania śledziony nie tylko w warunkach doświadczalnych, lecz również prób klinicznych?

Śledziona jest dużym skupiskiem komórek immunologicznie kompetentnych. Większość z nich obdarzona jest zdolnością syntezy globulin istotnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Czasami genetycznie uwarunkowany defekt

rozwojowy powoduje brak możliwości syntezy tych białek. Następstwem tego stanu jest szereg zaburzeń zależnych od fizjologicznej roli brakującego białka. One to stanowią bezpośrednie zagrożenie życia całego organizmu. W tych warunkach wypełnienie defektu genetycznego przeszczepioną, allogenną tkanką zdolną do syntezy globulin stwarza możliwość przedłużenia życia tych chorych.

Kliniczne próby przeszczepiania śledziony podejmowano tylko w nielicznych ośrodkach / 39, 56 / . Najwcześniejsze pochodzą z początkowego okresu klinicznego przeszczepiania nerek. Przypuszczano wówczas, że równoczesne przeszczepienie nerki i dużej masy komórek immunologicznie kompetentnych może korzystnie modyfikować reakcję immunologiczną ustroju biorecy przeciwko allogennej nerce. Nagromadzone w późniejszym czasie obserwacje kliniczne i teoretyczne wykazały niesłuszność takiego postępowania. Podobnie nie uzasadnione okazały się próby modyfikowania przebiegu uogólnionego procesu nowotworowego wywoływaniem reakcji "graft versus host" przez przeszczepienie śledziony tym chorym. Najbardziej obiecująca wydaje się możliwość przeszczepiania śledziony w przypadkach wrodzonego niedoboru globulin jak w agammaglobulinemii lub hemofilii. Podjęte próby kliniczne, chociaż tylko z krótkotrwałym powodzeniem, przemawiają za możliwością wykorzystania tej metody leczenia / /.

II. Przegląd piśmiennictwa.

Aż do lat pięćdziesiątych bieżącego stulecia śledzinę traktowano jako narząd niemy, którego funkcje fizjologiczne nie były dokładnie poznane. Wpływ śledziony na skład morfologiczny krwi krążącej oraz rolę śledziony jako zbiornika krwi przypisywano głównie miazdze czerwonej. Przeznaczenie miazgi białej przez wiele lat nie było dokładnie wyjaśnione. Uważano ogólnie, że śledziona jako skupisko tkanki chłonnej bierze udział w reakcjach immunologicznych oraz w syntezie globulin.

Warunki anatomiczne śledziony, jej długa szypuła naczyniowa, pojedyncze naczynia doprowadzające oraz zbita budowa narządu sprzyjały wykorzystaniu śledziony do badań doświadczalnych. Dodatkowym udogodnieniem stało się spostrzeżenie O.T. Manley⁸ a i wsp. / 55/, którzy wykazali, że wolne fragmenty śledziony autogennej umieszczone w tkance podskórnej łatwo się przyjmują i mają dużą zdolność proliferacji. R.C. Lillehei i wsp. /51/ wykazali później, że dożylne lub dootrzewnowe wstrzykiwanie zawiesiny komórek śledziony daje takie same efekty jak przeszczepienie całego narządu lub jego fragmentów. Spostrzeżenia te miały podstawowe znaczenie dla wielu badań doświadczalnych z zakresu immunologii przeszczepiania narządów przeprowadzonych na małych

zwierzętach jak myszy i szczury.

Pierwszą próbę przeszczepienia śledziony z odtworzeniem ciągłości naczyń wykonał Alexis Carrel w 1908 r. W przeprowadzonej serii doświadczeń udało mu się technicznie przeszczepianie śledziony. Jednak, jak to sam stwierdził, głównym problemem pozostało biologiczne współdziałanie przeszczepionego narządu z organizmem biorcy.

W 1952 roku M. Simonsen / 74 / ponownie podjął badania nad przeszczepianiem śledziony. Stosując do zespołów naczyniowych łączniki z vitalium lub polietylenu przeszczepiał śledzionę auto- i allogenną. Po raz pierwszy zwrócił uwagę na pojawianie się nacieków komórek jednojądrzastych zarówno w śledzionie przeszczepionej jak i w śledzionie biorcy. Nacieki te w późniejszym okresie po operacji zawierały komórki plazmatyczne. Simonsen traktował te nacieki jako morfologiczny wyraz reakcji ustroju na przeszczep oraz reakcji przeszczepu na tkanki ustroju biorcy. Porównywał je do zmian obserwowanych podczas parabiocy.

Późniejsze lata przyniosły szereg prac poświęconych przeszczepianiu śledziony allogenną w warunkach doświadczalnych / 3, 18, 31, 32, 39, 56, 60/. Najwcześniejsze spośród nich, prace Hume'a i wsp. / 39 / i F.D. Moore'a i wsp. / 60 / umożliwiły poznanie obrazu histologicznego prze-

szczepionej śledziony allogennej oraz skuteczności działania dostępnej w tamym czasie immunosupresji. Wszyscy autorzy tego czasu podkreślali niemożność oceny aktualnego stanu przeszczepionej śledziony. Nie pozwalało to określić skuteczności postępowania immunosupresyjnego przed zupełnym zniszczeniem narządu.

T.L. Marchioro i wsp. /56 / jako kryterium czynności przeszczepionej śledziony próbowali przyjąć zmiany czasu przeżycia krwinek czerwonych znakowanych ⁵¹ Cr. Sami jednak stwierdzili, że zaobserwowane zmiany mogą być w większym stopniu spowodowane hemolizą niż wychwytywaniem tych krwinek przez przeszczepioną śledzionę. J.C. Pierce i wsp. /68 / przeszczepiali śledzionę allogenną u psów na szyję. Czynność narządu oceniali na podstawie zdolności obkurczania się przeszczepionej śledziony pod wpływem adrenaliny. F.D. Moore i wsp. / 60 / i A.G. Kuligin /46 / ocenę czynności przeszczepionej allogennej śledziony opierali na badaniu histologicznym wycinków śledziony pobieranych drogą otwartej biopsji w możliwie małych odstępach czasu. T.L. Marchioro i wsp. / 56/ oraz D.R. Mahajan i wsp. / 52 / stosowali jednoczesne przeszczepianie dwóch narządów od tego samego dawcy np. śledziony i nerki lub śledziony i skóry. Łatwą do oceny czynność nerki lub wygląd przeszczepionego płata skórniego uważali za wskaź-

nik zmian zachodzących również w śledzionie. Okazało się to niezupełnie dokładne, ponieważ jak stwierdzono dla zachowania sprawności przeszczepionej śledziony allogennej potrzeba bardziej intensywnego postępowania immunosupresyjnego niż w przypadku allogennej nerki.

Dokładniejszą ocenę stanu przeszczepionej śledziony umożliwia ocena syntezy białek charakterystycznych tylko dla przeszczepionego narządu. Takim białkiem mogą być przeciwciała produkowane przeciwko antygenom, z którymi później przeszczepiona śledziona zetknęła się jeszcze w organizmie dawcy. J.D. Wakefield i N.R. Rose / 82 / w doświadczeniach na myszach wykazali, że izolowane komórki śledziony pobrane od myszki immunizowanej krwinkami barana, po dootrzewnowym wstrzyknięciu innej myszce zachowują zdolność produkcji przeciwciał. O ile biorcą była mysz z tego samego wśobnego szczepu co dawca, przeciwciała utrzymywały się długo / ponad 100 dni /. Natomiast u biorcy różniącego się od dawcy w locus H- 2 przeciwciała udawało się stwierdzić jedynie w ciągu pierwszych kilku dni po wstrzyknięciu komórek.

Łatwość wykonania przeszczepów śledziony u małych zwierząt / przeszczepy wolne lub wstrzykiwanie zawiesiny komórek/, u których możliwe jest dobieranie dowolnych różnic antygenów transplantacyjnych, spowodowała, że ten schemat doś-

wiadczeń stał się modelem dla opracowania wielu szczegółowych zagadnień z zakresu immunologii przeszczepiania narządów /88/.

Już M. Simonsen / 74 / w swych doświadczeniach z 1952 roku podkreślał, że podczas przeszczepiania śledziony należy brać pod uwagę również reakcję przeszczepu przeciwko organizmowi biorcy. Jest to tak zwana reakcja "graft versus host". W późniejszych badaniach D.M. Hume i wsp. / 39/ i F.D. Moore⁹ i wsp. / 60 / jak również inni autorzy stwierdzali w narządach biorcy obok nacieków komórek jednojądrzastych inne objawy tej reakcji. Były to: szybka utrata wagi, postępujące wyniszczenie, wzrost masy elementów układu siateczkowo-śródbłonkowego oraz znacznie nasilona niedokrwistość ze skróceniem czasu przeżycia krwinek czerwonych.

W doświadczeniach na myszach wsobnych wstrzyknięcie hybrydzie F_1 zawiesiny komórek śledziony jednego ze szczepów rodzicielskich stało się modelem dla dalszych badań reakcji "graft versus host". Genotyp hybrydy F_1 wyklucza możliwość reagowania przeciwko antygenom szczepów rodzicielskich. Natomiast genotyp szczepu rodzicielskiego nie wyklucza możliwości reakcji przeciwko antygenom drugiego szczepu rodzicielskiego zawartym w organizmie hybrydy F_1 /88/.

Wydaje się, że trudności opanowania reakcji "graft versus host" spowodowały zmniejszenie liczby prac poświęconych przeszczepianiu śledziony. Stało się tak, ponieważ immunosupresja stwarzając lepsze warunki przeżycia dla przeszczepionej śledziony naraża tkanki biorcy na powolny proces niszczenia. Sprawa wymaga dalszych badań. Wydaje się, że dla powodzenia konieczne jest uzyskanie stanu równowagi dynamicznej między dwoma przeciwstawnymi sobie procesami. Jest to zjawisko podobne do układu krzepnięcia i fibrynolizy krwi.

Współczesne metody postępowania immunosupresyjnego umożliwiają bardziej długotrwałe zachowanie czynności przeszczepionych komórek allogennych. E.O. Field i J.E. Gibs / 30 / wykazali, że immunologicznie kompetentne komórki dawcy inkubowane z surowicą antylimfocytarną w rozcieńczeniu 1 : 10 tracą zdolność wywoływania reakcji "graft versus host" po wstrzyknięciu myszkom hybrydom F₁. Inkubowanie z surowicą antylimfocytarną w rozcieńczeniu 1 : 100 powoduje, że reakcja "graft versus host" ma nasilenie odpowiadające wstrzyknięciu dwa razy mniejszej liczbie komórek niż w rzeczywistości podano.

M.J. Sellar i P.E. Polaniak / 72 / myszkom z genetycznie uwarunkowaną niedokrwistością makrocytarną wstrzykiwali allogenne komórki krwiotwórcze. W grupie myszek, którym podano suro-

wicę antylimfocytarną, stwierdzono hemoglobinę i komórki krwiotwórcze dawcy w szpiku przez okres 160 dni. U myszek kontrolnych, którym podawano zwykłą surowicę tego samego gatunku co zwierzę produkujące surowicę antylimfocytarną nie stwierdzono syntezy hemoglobiny dawcy, ani nie znaleziono komórek krwiotwórczych dawcy w szpiku biorcy.

W ostatnich dwóch latach, wskutek najnowszych badań zainteresowanie badaczy ponownie skupia przeszczepianie śledziony u ludzi. Wskazaniem do tego stała się hemofilia. Wynikło to stąd, że podczas perfuzji izolowanej wątroby zwierzęcej krwią chorych ze śpiączką wątrobową stwierdzono wzrost poziomu globuliny antyhemofilowej w krwi przepływającej przez wątrobę.

J.C. Norman i wsp. / 65/ oraz W.P. Webster i wsp. / 83/ wykazali, że izolowana śledziona zwierzęca perfundowana krwią chorego z hemofilią lub podłączona do naczyń psa z hemofilią powodowała wzrost poziomu globuliny antyhemofilowej do wartości prawidłowych. J.C. Norman i wsp. / 64/ przeszczepiając śledzionę u psów z hemofilią stwierdził, że śledziona od dawcy spokrewnionego / pies dawca z tego samego miotu co biorca / powoduje utrzymywanie się prawidłowego poziomu globuliny antyhemofilowej przez okres 6 tygodni, to jest do czasu odrzucenia przeszczepu. Do wyjaśnienia pozostaje wpływ obecnie stosowanych

leków immunosupresyjnych na czynność tej przeszczepionej śledziony.

III. Badania własne.

Materiał. - Badania doświadczalne przeprowadzono na 38 psach i 26 królikach w następujących grupach:

Grupa I - kontrolna - 3 psów, u których wykonano jedynie splenektomię.

Grupa II - 15 psów, którym autogenną śledzionę przeszczepiono do prawego dołu biodrowego.

Grupa III - 15 psów, którym do prawego dołu biodrowego przeszczepiono śledzionę allogenną jednocześnie usuwając własną śledzionę biorcy.

Grupa IV - 26 królików, którym śledzionę allogenną przeszczepiono do naczyń szyjnych. Śledziony królika biorcy nie usuwano.

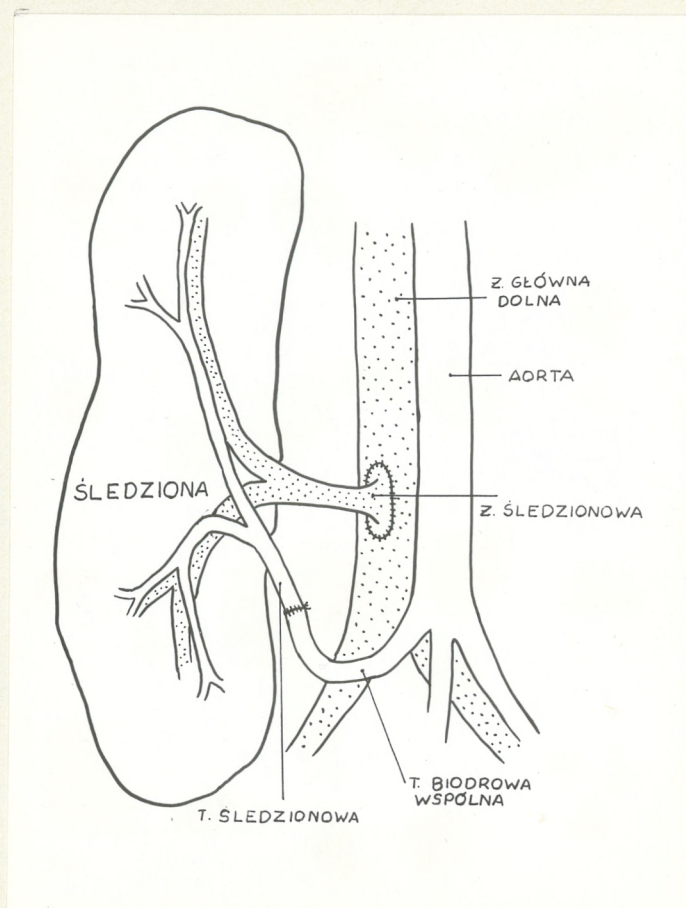
Technika przeszczepienia śledziony u psa.

Psy usypiano Eunarconem w dawce 40 mg/kg wagi podanym dożylnie. Jamę brzuszną otwierano w linii środkowej poczem podwiązywano i przecinano wszystkie naczynia więzadła żołądkowo-śledzionowego. Wypreparowywano żyłę śledzionową oraz biegnącą równolegle lecz nieco głębiej tętnicę śledzionową. Podczas preparowania naczyń szczególnie dokładnie podwiązywano drobne gałązki

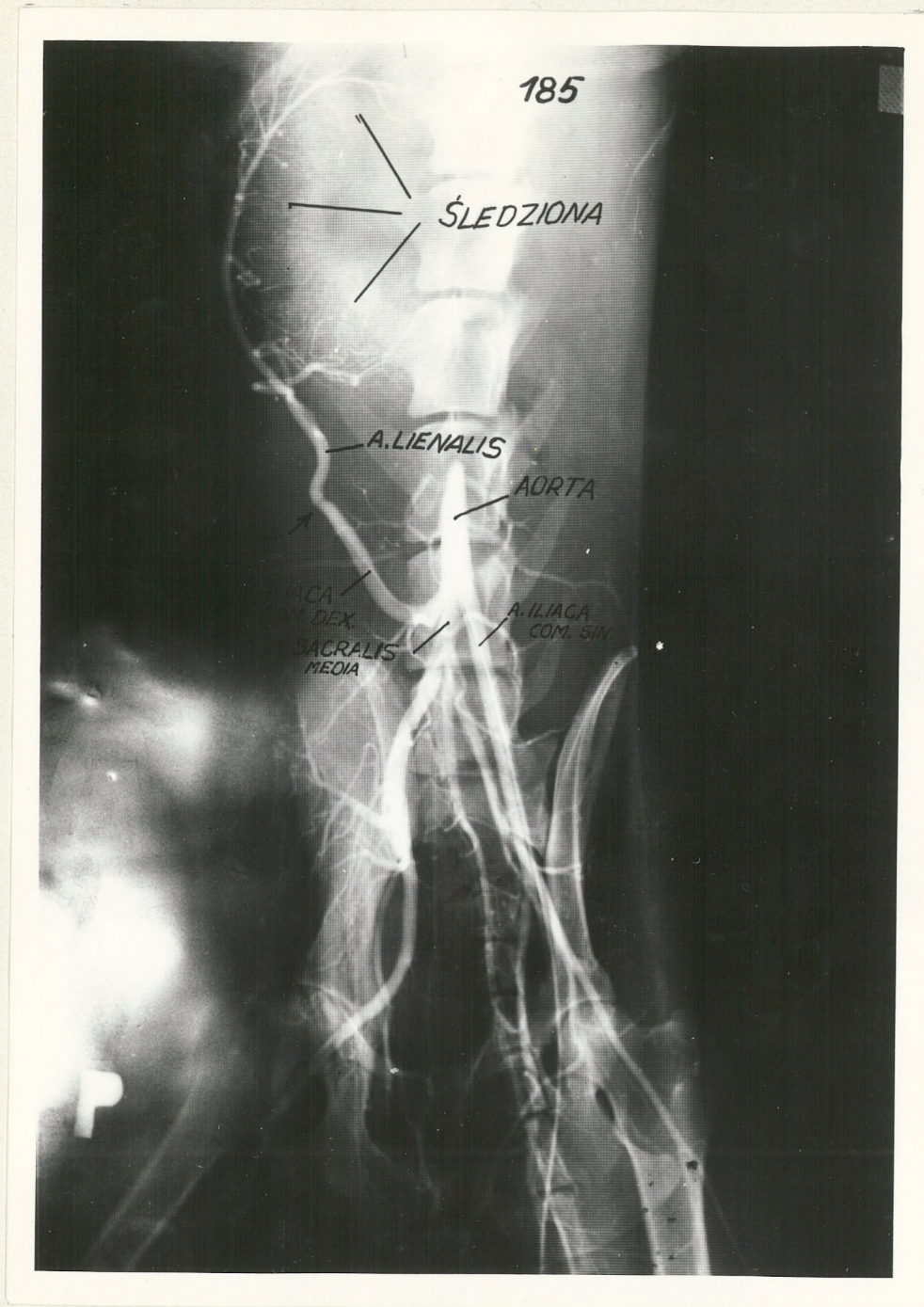
tętnicze i żyłne unaczyniające ogon trzustki. Główne pnie naczyń śledzionowych wypreparowywałem na odcinku 1 - 2 cm. i podwiązywałem. Usuniętą śledzionę przepłukiwałem poprzez tętnicę 150 ml. płynu Ringera o temperaturze + 4° C. Następnie żyłę śledzionową zespalano z żyłą główną dolną "koniec do boku", a tętnicę śledzionową z tętnicą biodrową zewnętrzną "koniec do końca".
/ patrz ryciny na stronie 14, 15, i 16 /.

Aby umożliwić zawinięcie tętnicy biodrowej zewnętrznej wysoko ku górze, przecinałem również tętnicę biodrową wewnętrzną. Jej podwiązany kikut w niektórych doświadczeniach wykorzystywałem do wprowadzenia na okres kilku dni cewnika, którego koniec wyprowadzałem przez skórę w okolicy grzbietu. Cewnik ten ułatwiał wykonanie arteriografii i podawanie krwinek znakowanych izotopem chromu bezpośrednio do t. śledzionowej.

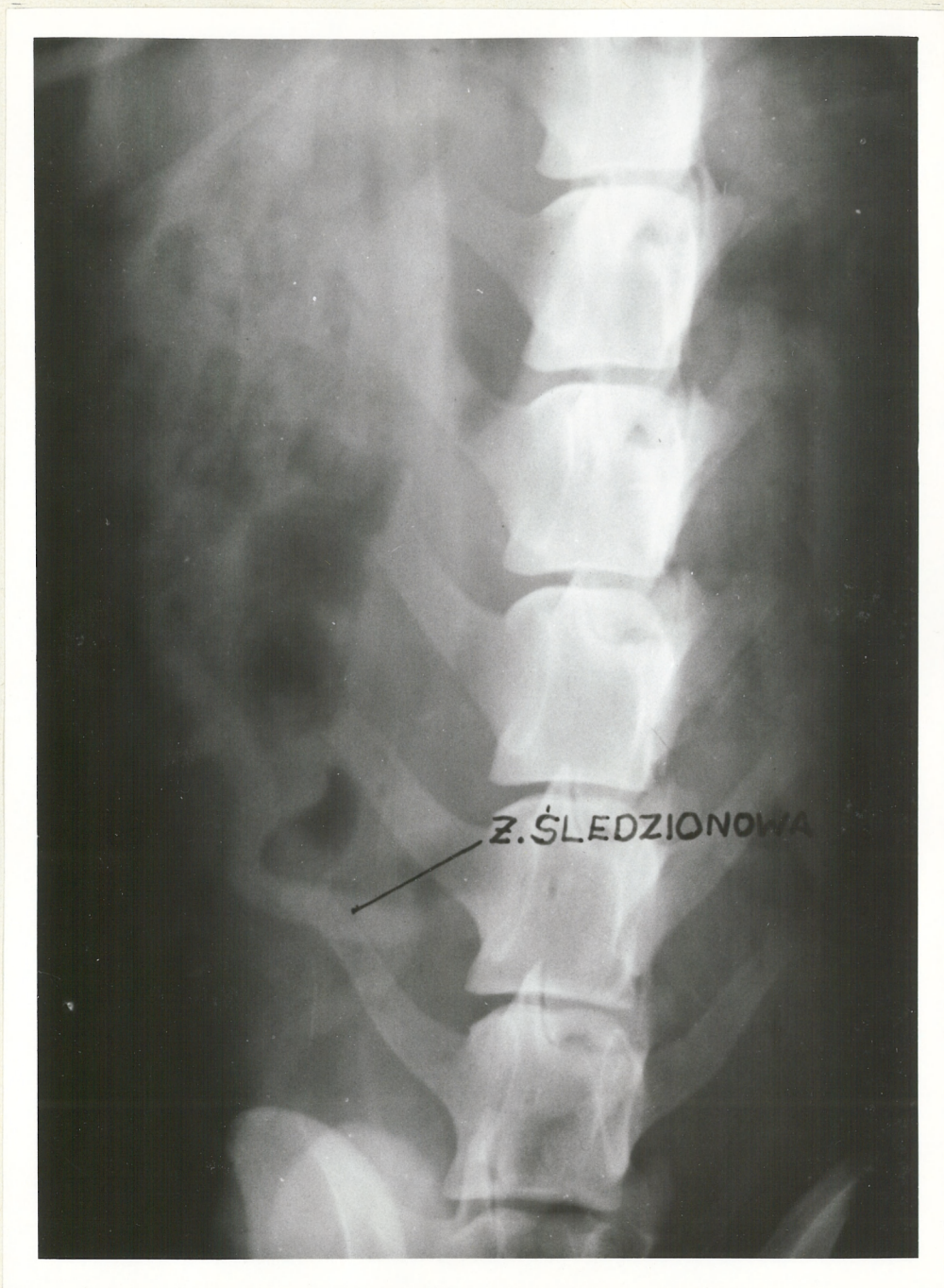
W przeszczepach autogennych stosunkowo częstą przyczyną niepowodzeń była niedrożność zespolenia żylnego. Aby temu zapobiec starałem się robić zespolenie żyłne możliwie szerokie. W późniejszych doświadczeniach żyłę śledzionową odpreparowywałem nieco dalej od wnęki, aż do miejsca gdzie łączy się z nią żyła odzwiernikowa. Odcinając żyłę śledzionową zabierałem również krótki



Rycina 1. Schemat zespożeń naczyniowych przy przeszczepianiu śledziony u psa.



Rycina 2. Arteriografia przeszczepionej autogennej śledziony psa.



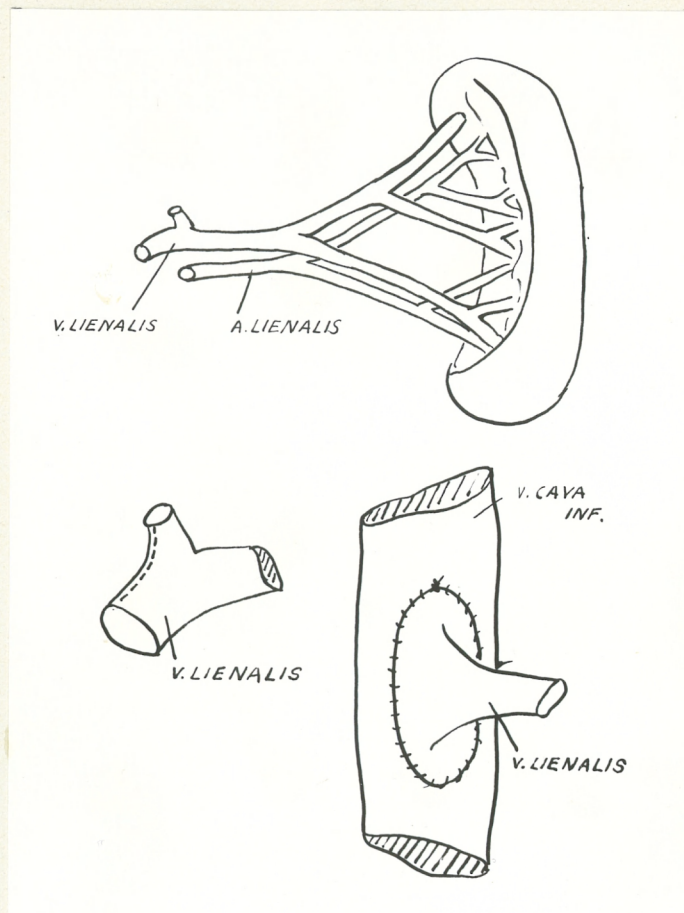
Rycina 3. Faza żylna angiografii przeszczepio-
nej śledziony psa. Cień żyły śledzionowej ury-
wa się przy ujściu do żyły głównej dolnej.

odcinek tej bocznicy tak, jak to przedstawiono na rycinie na stronie 18. Następnie przecinano żyłę podłużnie, tak, aby linia przecięcia biegła po stronie przeciwległej ujściu żyły śledzionowej. Dzięki temu uzyskiwałem zespolenie znacznie szersze niż przy zwykłym zespoleniu "koniec do boku".

Wszystkim psom z allogennymi przeszczepami śledziony jednocześnie usuwałem śledzionę. Praktycznie, operowano jednocześnie dwa psy, którym wymieniałem śledziony.

Technika przeszczepienia śledziony u królika.

Do zabiegu stosowałem znieczulenie złożone. Wprowadzenie dożylnie Eunarconem rozcieńczonym pięciokrotnie w dawce nie przekraczającej 100mg. w dalszym ciągu znieczulenie wziewne eterowe. W linii środkowej otwierałem powłoki brzuszne od wyrostka mieczykowatego do spojenia łonowego. Przecinałem więzadło żołądkowo-śledzionowe podwiązując wszystkie zawarte w nim naczynia. Odpreparowywałem śledzionę od trzustki, poczem idąc wzdłuż naczyń odpreparowywałem pień trzewny podwiązując wszystkie jego gałęzie oprócz tętnicy śledzionowej. Żyłę śledzionową odpreparowywałem na całym przebiegu aż do jej ujścia do żyły wrotnej, którą również odsłaniałem na krótkim odcinku. Śledzionę pobierałem z odcinkiem aorty oraz żyły wrotnej. Ułatwiało to wprowadzenie do pnia

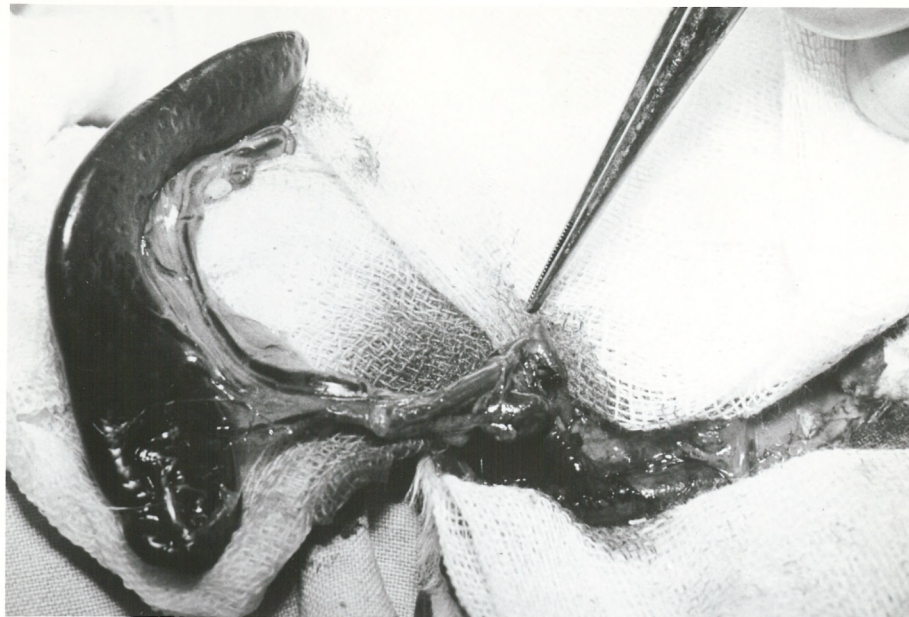


Rycina 4. Metoda poszerzenia zespolenia żylnego podczas przeszczepiania śledziony u psa.

trzewnego kaniuli, poprzez którą płukałem śledzionę 20 ml płynu Ringera o temperaturze + 4° C. W takim samym środowisku była ona przechowywana później do czasu ukończenia zespolenia naczyńowych u biorcy.

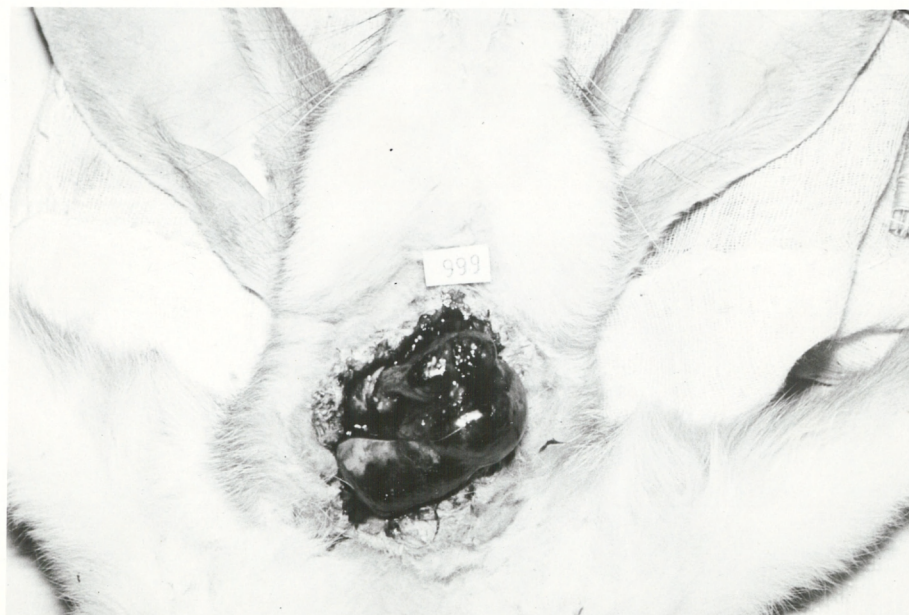
Biorca. W linii środkowej rozciąłem skórę przedniej powierzchni szyi. Następnie odpreparowałem ją szeroko tak, aby utworzyć kieszeń podskórną, która będzie zdolna pomieścić przeszczepioną śledzionę. Wypreparowałem żyłę szyjną zewnętrzną oraz tętnicę szyjną wspólną. Do żyły szyjnej zewnętrznej wszywałem fragment żyły wrotnej zawierający ujście żyły śledzionowej.

Pień trzewny zespałem z tętnicą szyjną wspólną "koniec do końca". Do wykonania zespolenia naczyńowych używałem nici Ethicon 6-0 z atraumatyczną ośmiomilimetrową igłą. Oprócz normalnego zestawu narzędzi chirurgicznych do zabiegu używałem również niektórych narzędzi okulistycznych: imadło, pensety oraz nożyczki. Na stronie 20 i 21 przedstawiłem wygląd zespolenia naczyńowych podczas zabiegu, Wygląd przeszczepionej śledziony trzy dni po operacji oraz arteriografię śledziony przeszczepionej na szyję.



Rycina 5. Wygląd zespołań naczyniowych po przeszczepieniu allogennej śledziony do naczyń szyjnych królika.

Rycina 6. - poniżej - Allogenna śledziona królika przeszczepiona na szyję. Trzy dni po operacji widoczne nacieczenie narządu oraz ognisko niedokrwienia na jednym z biegunów.





Rycina 7. Arteriografia allogennej śledziony królika przeszczepionej na szyję. Widoczne zawinięcie szypuły naczyniowej oraz ułożenie narządu podobnie jak na rycinie poprzedniej.

Kontrola czynności przeszczepionej śledziony.

Czynność przeszczepionej śledziony kontrolowałem oznaczając liczbę krwinek płytkowych, ogólną liczbę krwinek białych i liczbę limfocytów, poziom całkowitego białka w surowicy i frakcję gammaglobulin. Wykonywałem również : oznaczenia miana heterogennych homaglutynin i hemolizyn oraz liczby komórek produkujących przeciwciała. Wymienione badania uzupełniałem wykonaniem arteriografii, scyntygrafii oraz badania histologicznego. Nie wszystkie te badania można było wykonać w każdej grupie doświadczeń. Potrzeba wprowadzenia niektórych z nich wynikła dopiero w późniejszych grupach.

Zmiany składu morfologicznego krwi obwodowej oraz składu białek surowicy oceniałem na podstawie porównania wyników uzyskanych w grupach doświadczalnych z wynikami grupy kontrolnej, którą stanowiły psy po splenektomii.

Liczbę krwinek płytkowych określałem metodą kokainową. Do rozcieńczenia krwi pobieranej do mieszalnika używałem hypotonicznego płynu z dodatkiem kokainy. Skład płynu:

Cocaini hydrochlorici	1,2
Natrii chlorati	0,08
Agae destillatae	ad 20,0

W kamerze hematocymetru krwinki płytkowe wi-

doczne były jako błyszczące żółto-zielonkawe punkty.

Liczbę krwinek białych i frakcję limfocytów oraz ogólny poziom białka i frakcję gammaglobulin określano metodami rutynowymi.

Oznaczenia miana hemaglutyniny i hemolizyny. Wykonywałem je tylko w grupie IV / przeszczepienie allogennej śledziony u królików/, ponieważ podczas próbnych doświadczeń na psach stwierdziłem, że u tego zwierzęcia nie udaje się uzyskać dostatecznie wysokiego miana przeciwciał.

Hemaglutyniny.- Królika dawcę immunizowałem krwinkami barana podawanymi dożylnie. Podawałem dwukrotnie po 1 ml. 50% zawiesiny krwinek w odstępach dziesięciodniowych. Czwartego dnia po drugiej immunizacji pobierałem śledzionę i przeszczepiałem królikowi "Zdrowemu". Miano hemaglutyniny oznaczałem u dawcy: przed pierwszym podaniem krwinek, przed drugim podaniem krwinek i w dniu pobrania śledziony; u biorcy: przed przeszczepieniem oraz 1, 3, 5, 7 i 9 dnia po przeszczepieniu.

Hemolizyny. Miano hemolizyn oznaczałem tylko u tych królików, u których oznaczałem liczbę komórek produkujących przeciwciała. Ta zmiana rodzaju oznaczanego przeciwciała podyktowana była wymogami zastosowanej techniki oznaczeń.

Oznaczanie liczby komórek śledziony produkujących przeciwciała - "plaque forming cells". Oznaczenia

te wykonywałem zgodnie z techniką podaną przez autora metody - Jerne'go / 43/, a adaptowaną w naszych warunkach przez M. Zaleskiego / 86/. Ponieważ zastosowana metoda pozwalała wykryć komórki produkujące przeciwciała 19 S, do których należą hemolizyny, w tej grupie doświadczeń zastosowałem odmienny schemat immunizacji.

Królika dawcę immunizowałem jednorazowym podaniem 1 ml 50% zawiesiny krwinek barana dożylnie. Szczyt odpowiedzi serologicznej przypada wówczas między piątym a ósmym dniem / 86 /. Piątego dnia po podaniu krwinek pobierałem śledzionę dawcy i przeszczepiałem ją innemu królikowi na szyję. Miano hemolizyn określałem u dawcy przed podaniem krwinek i przed pobraniem śledziony; u biorcy - przed przeszczepieniem śledziony i trzeciego dnia po przeszczepieniu czyli ósmego dnia po podaniu antygeny. Tego samego dnia we fragmencie przeszczepionej śledziony określałem liczbę komórek zdolnych do produkcji hemolizyn przeciwko krwinkom barana.

Pobrany fragment przecierałem przez sitka platynowe. Po przepłukaniu płynem Hanksa i określeniu liczby komórek w 1 ml zawiesiny objętość odpowiadającą 10^6 komórek śledziony mieszałem z agarrem wzbogaconym płynami do hodowli tkankowych

i krwinkami barana, po czym wylewałem na szkiełka o wymiarach 34 x 36 mm. Po zastygnięciu płytki umieszczałem w wilgotnej komorze w temperaturze 37° C. Po godzinnej inkubacji powierzchnię płytek pokrywałem roztworem dopełniacza i pozostawiałem na dalsze półtorej ^{godzinny} inkubacji w cieplarni. Po inkubacji liczyłem widoczne gołym okiem lysinki, które odpowiadają strefie hemolizy wokół komórek produkujących hemolizyny dla krwinek barana. Do dalszej interpretacji przyjmowałem wartość średnią z trzech płytek nastawionych z tą samą zawiesiną komórek śledziony. Na stronie 26 przedstawiono wygląd takiej lysinki pod małym powiększeniem mikroskopu. / 100 x /

Arteriografia. Wypreparowywałem lewą t. udową i przez nią wprowadzałem cewnik polietylenowy tak, aby jego koniec tkwił niewiele ponad rozwidłnieniem aorty. Zdjęcie wykonywałem w końcowym momencie wstrzyknięcia 20 ml środka cieniującego. Dla uzyskania fazy żyłnej zdjęcie wykonywałem 6-7 sekund później. U zwierząt, u których podczas zabiegu wprowadziłem cewnik do kikuta t. biodrowej wewnętrznej, badanie to nie przysparzało trudności. Nawet niewielka ilość środka cieniującego podana bezpośrednio do tętnicy biodrowej zewnętrznej powodowała dostateczne wysycenie naczyń wewnątrz śledzionowych.



Rycina 8. Plamka na płytce agarowej według metody Jerne'go. Przejaśnienie odpowiada strefie hemolizy krwinek barana zmieszanych z agarem. Powiększenie mikroskopu - 100 x .

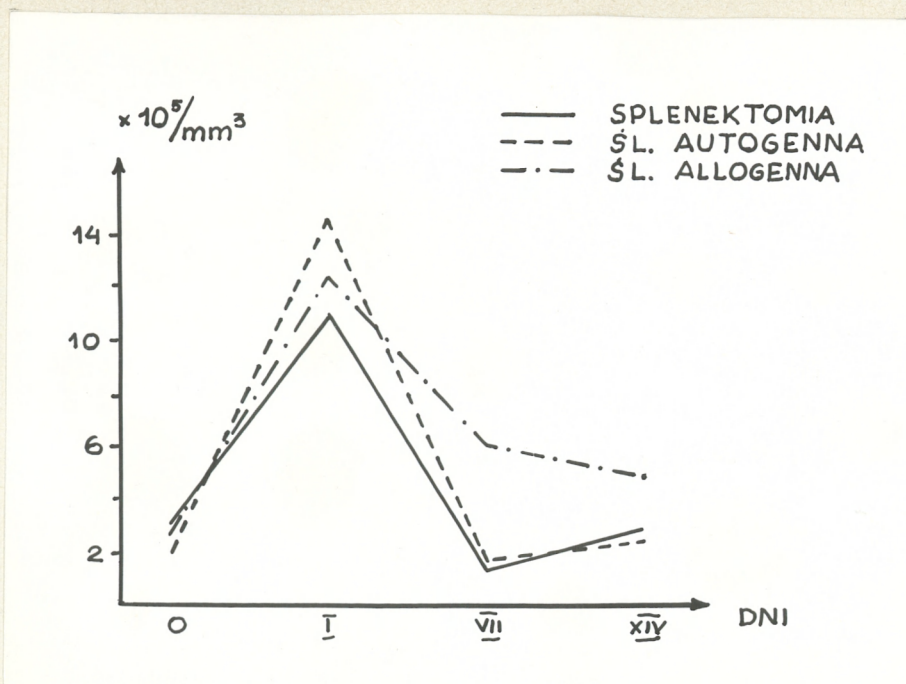
Scyntygrafia. Do badania używano krwinek biorcy znakowanych izotopem chromu, ^{51}Cr . Po inkubacji z chromianem sodu zawierającym izotop krwinki przepłukiwano i następnie uszkodzono przez podgrzanie do 57°C przez okres 30 minut. Tak oznakowane krwinki wstrzykiwałem dożylnie biorcy. Zapis wykonywano po upływie 30 minut. Następnie w znieczuleniu ogólnym po otwarciu brzucha pobierałem fragment wątroby i śledziony dla określenia aktywności sfagocytowanych krwinek.

Badanie histopatologiczne. Dla oceny histopatologicznej pobranych fragmentów śledziony stosowano jedynie rutynowe metody barwienia.

Wyniki.

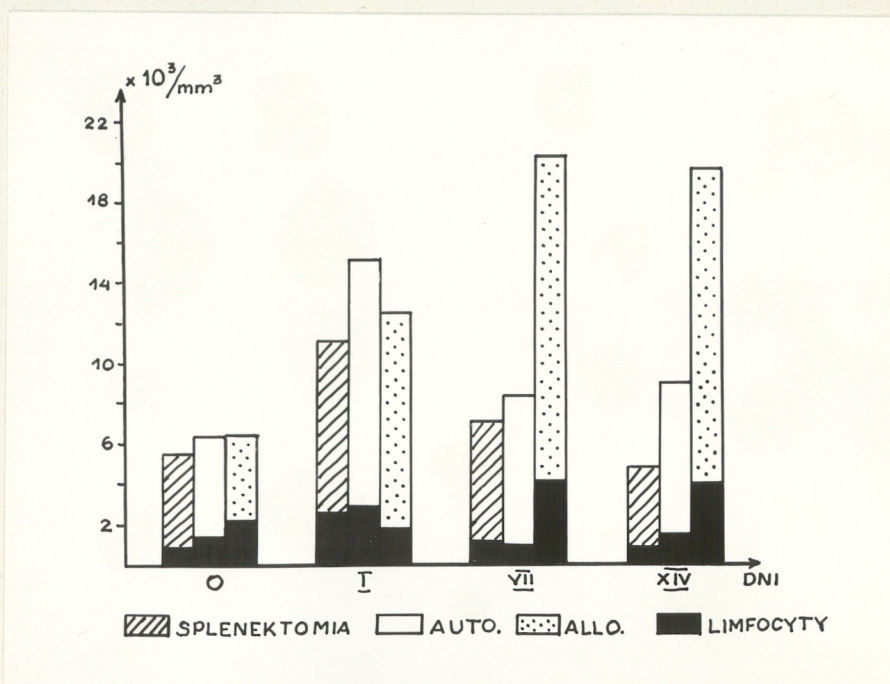
Na stronie 28 na rycinie 9 przedstawiłem zmiany liczby krwinek płytkowych u psów po splenektomii, przeszczepieniu śledziony autogennej i przeszczepieniu śledziony allogennej. We wszystkich trzech grupach obserwowana wyraźny wzrost liczby krwinek płytkowych pierwszego dnia po zabiegu. Już siódmego dnia po operacji liczba ta wracała do górnej granicy wartości prawidłowych.

Rycina 10 na stronie 28 przedstawia zmianę liczby limfocytów i ogólnej liczby krwinek białych. W bezpośrednim okresie pooperacyjnym w krwi obwodowej powstawał przejściowy wzrost liczby krwinek



Rycina 9. Wykres zmian liczby krwinek płytkowych u psów po splenektomii, autogennym oraz allogennym przeszczepie śledziony.

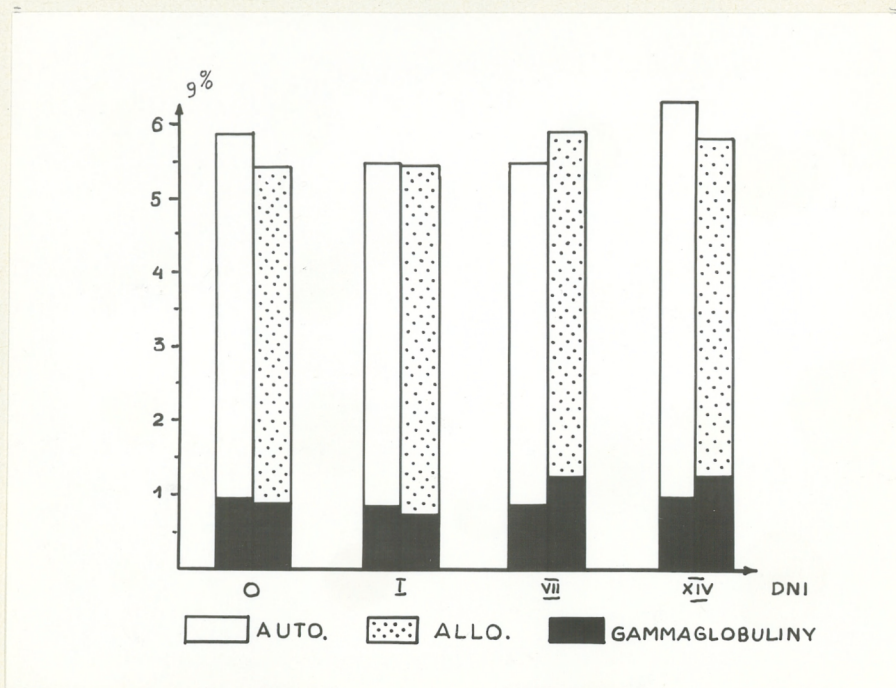
Rycina 10. - poniżej - Ogólna liczba krwinek białych i frakcja limfocytów w tych samych grupach doświadczalnych.



białych. W żadnej z badanych grup nie stwierdzono istotnego zwiększenia procentu limfocytów w rozmazach. Wzrost liczby limfocytów w 1 mm^3 krwi zależny był w większym stopniu od wzrostu liczby krwinek białych niż od przesunięcia w rozmazie.

Ogólny poziom białka surowicy krwi zarówno w grupie przeszczepów autogennych jak i allogennych nie ulegał istotnym zmianom. Po przeszczepach allogennych w drugim tygodniu po operacji obserwowałem wzrost frakcji gammaglobulin. Zmiany te przedstawione zostały na rycinie 11 na stronie 30.

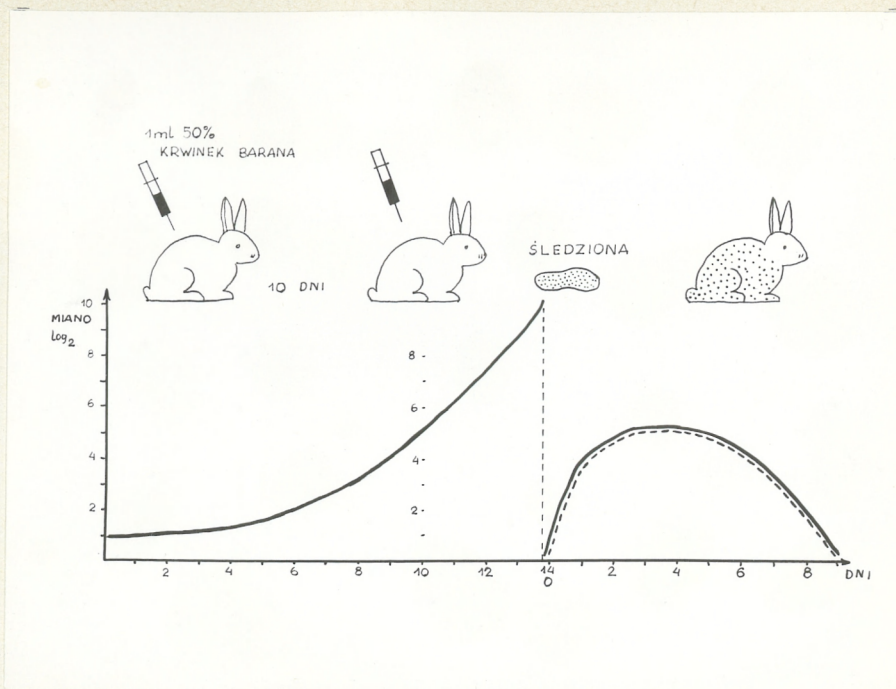
Wykonałem 26 doświadczeń z przeszczepieniem śledziony u królików. Wyjściowe miano hemaglutynin dawcy / przed pierwszą immunizacją / podobnie jak i biorcy / przed przeszczepieniem / nie przekraczało 8. U 13 królików już pierwszego dnia po przeszczepieniu stwierdziłem wzrost miana hemaglutynin do 256. Na tym poziomie utrzymywało się ono do 7 i 9 dnia poczem opadało do wartości początkowych. W obrazie histologicznym pobieranych fragmentów śledziony allogennej okres ten odpowiada całkowitemu zniszczeniu mięszu śledziony. Królikom, u których do trzeciego dnia po zabiegu nie stwierdziłem wzrostu miana hemaglutynin rewidowałem ranę pooperacyjną. We wszystkich



Rycina 11. Poziom białek osocza i frakcja gammaglobulin u psów po autogennym i allogennym przeszczepie śledziona. W grupie przeszczepów allogennych niewielki wzrost frakcji gammaglobulin w drugim tygodniu po operacji.

tych przypadkach stwierdziłem martwicę przeszczepio-
nej śledziony. Na rycinie 12 na stronie 32
przedstawiłem schemat doświadczenia oraz śred-
nie wartości miana hemaglutynin dla tej grupy
doświadczeń. Należy jeszcze dodać, że śledzioną
dawcy po pobraniu dokładnie przepłukiwałem
płynem Ringera. W kilku doświadczeniach ozna-
czałem miano hemaglutynin w próbkach krwi pobra-
nych około 30 minut po przywróceniu krążenia przez
przeszczepioną śledzionę. We wszystkich tych przy-
padkach miano hemaglutynin nie przekraczało
wartości wyjściowych. Kilkanaście godzin później
u tych samych zwierząt stwierdzałem typowy wzrost
miana hemaglutynin.

Miano hemolizyn oznaczałem tylko u królików
u których później określałem według metody Jer-
nego liczbę komórek produkujących przeciwciała.
Króliki te były immunizowane według innego sche-
matu, a przez oznaczenie miana hemolizyn miało zna-
czenie pomocnicze. Na podstawie wyników uzyskanych
z oznaczeniem hemaglutynin^(przyjmowanie) te doświadczenia jako
udane technicznie, w których przeszczepiona śle-
dziona produkowała hemolizyny. Dopiero wówczas
u tych królików oznaczałem liczbę komórek pro-
dukujących przeciwciała. Badania te przeprowa-
dziłem w trzech grupach zwierząt:
Grupa I - 4 zdrowe króliki, od których wzięto



Rycina 12. Schemat doświadczenia na królikach z przeszczepianiem śledziony od immunizowanego dawcy. Krzywa przedstawia średnie miano hemaglutynin u dawcy a następnie u biorcy.

Liczba komórek produkujących hemolizynę przeciwko krwinkom barana na 10^6 komórek śledziony.

L.p.	Królik zdrowy	Królik imm. śledziona "in situ".	Królik imm. śledziona przeszczep.
1.	1	100	8
2.	0,4	36	19
3.	16	50	16
4.	8	37	462
5.		130	67
\bar{x}	5,1	70,6	114
st. odch.	65	37,8	168

śledzoną do badania,

Grupa II - 5 królików immunizowanych jednorazowym wstrzyknięciem 1 ml 50% zawiesiny krwinek barana dożylnie. Śledzoną pobierałem do badania VIII dnia po immunizacji.

Grupa III - 5 królików, którym przeszczepiłem allogenną śledzoną od immunizowanego dawcy. Śledzoną pobierałem do badania trzeciego dnia po przeszczepieniu cayli ósmego dnia po immunizacji.

Na podstawie wyników przedstawionych w tabeli na stronie 32 można stwierdzić, że liczby komórek produkujących przeciwciała przypadające na milion komórek śledziona w drugiej i trzeciej grupie doświadczeń są do siebie bardzo zbliżone. Różnią się one natomiast wyraźnie od wartości grupy pierwszej. Dla grupy trzeciej, z przeszczepioną śledzioną, różnicę tę można przyjąć z ufnością rzędu $P = 0.05$.

Arteriografia.

W przeszczepach autogennych u psów arteriografia śledziona pozwalała wyłączyć błędy techniczne. Uwidocznienie prawidłowych tętnic po upływie tygodnia od operacji praktycznie oznaczało długotrwałe przeżycie śledziona.

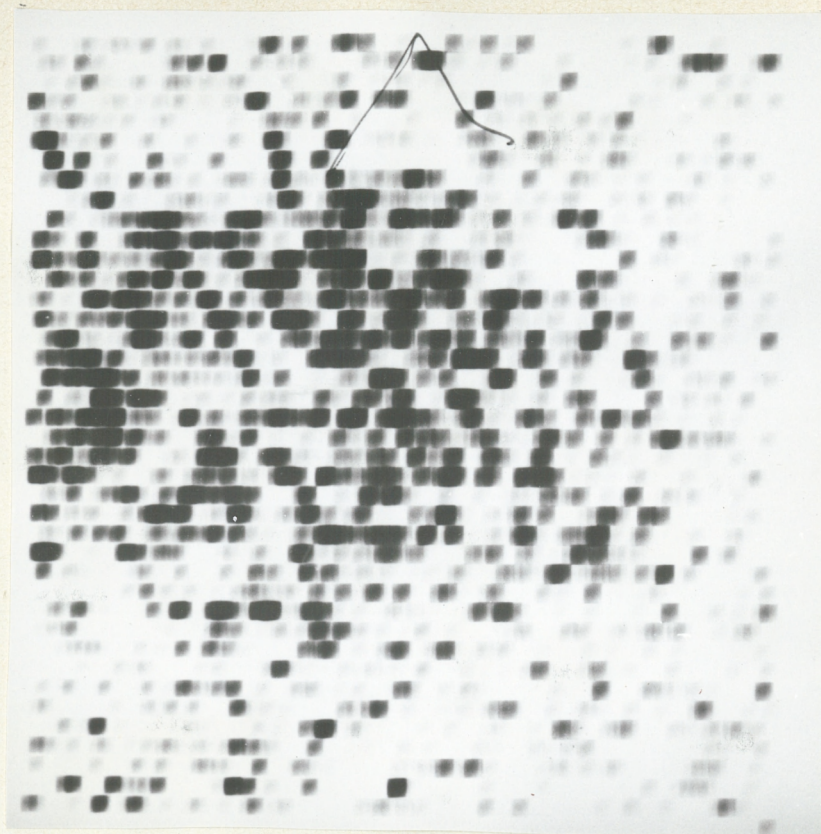
W przeszczepach allogennych arteriografia umożliwiała ocenę zmian strukturalnych narządu.

Wynacznienia podanego środka cieniującego ozna-
czyły zaawansowane zniszczenie mięszu śledziony,
natomiast prawidłowy obraz naczyń wewnątrzśledzio-
nowych nie upoważniał do wyciągnięcia jakichkol-
wiek wniosków co do czynności śledziony. U nie-
których psów prawidłowy obraz naczyń stwierdza-
łem nawet kilkanaście dni po przeszczepieniu
śledziony allogennej. U tych psów podczas lapa-
totomii, a następnie w badaniu histologicznym
stwierdzało się zniszczenie wszystkich elemen-
tów mięszowych i przekształcenie się ich w
bezpostaciowe masy włóknikowe, które zachowały
jeszcze przybliżony kształt narządu.

Scyntygrafia.

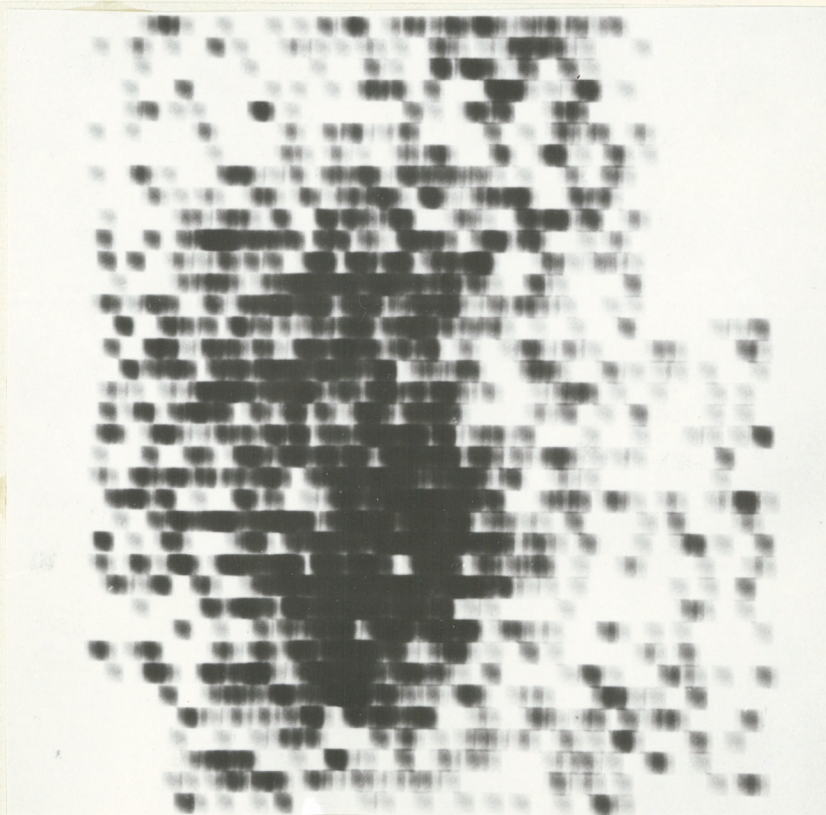
Badania izotopowe przeprowadziłem u siedmiu
psów: trzech zdrowych, dwóch z przeszczepem auto-
gennym i dwóch z przeszczepem allogennym śledzio-
ny.

U psów zdrowych zarys scyntygraficzny śle-
dziony zlewał się z lewym płatem wątroby tak,
że nie można było interpretować uzyskanego obra-
zu. / Patrz rycina 14 na stronie 35/. Natomiast
badanie aktywności wycinków wątroby i śledziony
wykazało, że więcej znakowanych krwinek wychwy-
tywanych jest przez jednostkę masy wątroby, niż
śledziony. Uwzględniając wagę całej wątroby i śle-
dziony stwierdzono, że tylko 15 -20% podanej



Rycina 14. Scyntygrafia zdrowego psa. Cień śledziony zlewa się z wątrobą.

Rycina 15. - poniżej - Scyntygram śledziony allogennej trzy dni po przeszczepieniu.



aktywności gromadzi się w śledzionie.

U psów ze śledzioną autogenną przeszczepioną do naczyń biodrowych po stronie prawej długa szypuła naczyniowa powodowała, że sam narząd ulokowany był najczęściej w prawym podżebrzu / patrz - arteriografia na stronie 15 /. W tej grupie uzyskany obraz również nie nadawał się do interpretacji pomimo uprzedniej arteriografii, która umożliwiała kontrolę prawidłowego ustawienia sondy. Opierając się na rozkładzie aktywności można było stwierdzić, że przeszczepiona autogenna śledziona gromadzi aktywność w podobnym procencie co śledziona zdrowego psa.

Te same przyczyny uniemożliwiały wyciągnięcie pryncyjalnych wniosków z obrazów scyntygraficznych przeszczepionej allogennej śledziony. Stwierdzono tylko, że trzeciego dnia po operacji jest ona zdolna do wychwytywania uszkodzonych krwinek biorcy. Rycina 15 na stronie 35 przedstawia scyntygram śledziony allogennej trzeciego dnia po zabiegu.

Niestety, długi biologiczny okres półtrwania używanego izotopu uniemożliwił powtórzenie pomiarów u tego samego zwierzęcia. Z powodu dużych wahań rozmieszczenia podanego izotopu u poszczególnych psów oraz różnej i zmiennej masy śledziony nie można było porównywać wartości bezwzględnych.

Badanie histopatologiczne.

Zdjęcia preparatów histologicznych przedstawione są na końcu fragmentu poświęconego wynikom badania histologicznego.

We fragmentach pobranych z przeszczepionej śledziony autogennej narząd miał budowę prawidłową. Widoczne były liczne niezmiennione grudki chłonne, a zatoki żyłne miazgi czerwonej zawierały prawidłową ilość krwi. / rycina 16 /.

Obraz mikroskopowy fragmentów śledziony allogennej zmienny był w zależności od upływu czasu od chwili przeszczepienia narządu. Doba I i II - liczne grudki chłonne zachowywały prawidłowy wygląd. W miazdze czerwonej dominowało nadmierne wypełnienie zatek żylnych krwią.

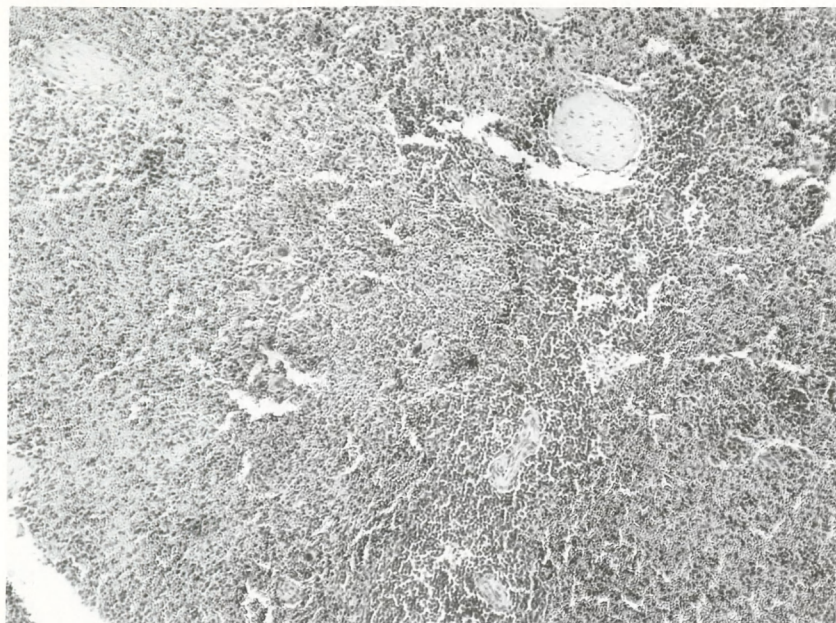
Doba III i IV - do utrzymującego się obrazu nadmiernego wypełnienia miazgi czerwonej krwią dołączają się zmiany w grudkach chłonnych. Ich struktura ulega częściowemu zatarciu. /Rycina 17/.

Doba V - cechy rozpoczynającej się martwicy narządu. Grudki chłonne są znacznie zniekształcone, niektóre nawet szczątkowe / Rycina 18/. W miazdze czerwonej przepełnionej krwią pojawiają się nacieki leukocytarne / Rycina 19/. Nacieki takie występują również w beleczkach łącznotkankowych / Rycina 20/. Obraz ten wska-

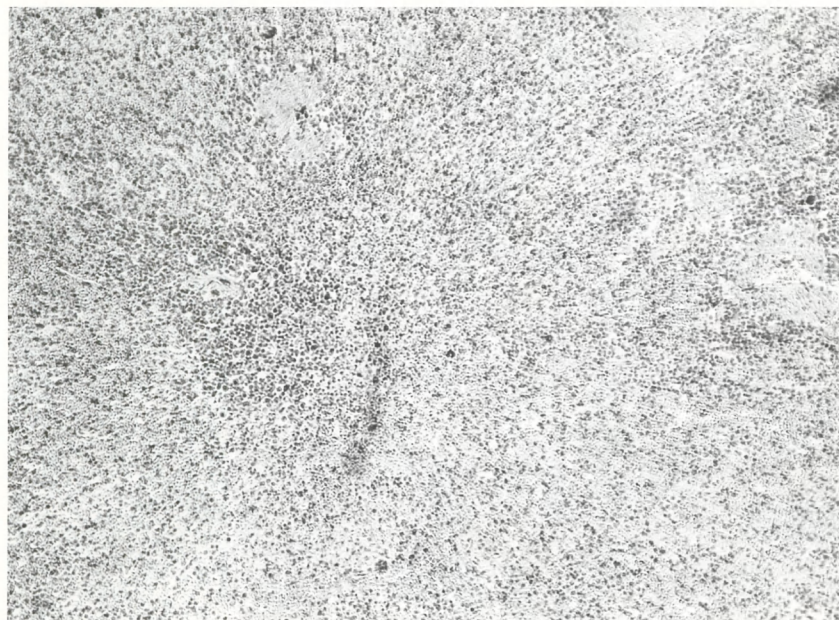
zuje na martwicę zarówno mięszu śledziony jak i jej zrębu. Naczynia krwionośne są drożne.

Doba VII - Na rycinie 21 przedstawiłem wygląd makroskopowy allogennej śledziony siódmego dnia po przeszczepieniu. Jest duża, wypełnia prawie połowę jamy brzusznej. Robi wrażenie żywego narządu ze znacznym przekrwieniem biernym. Mikroskopowo stwierdza się natomiast cechy rozległej martwicy obejmującej wszystkie elementy tkankowe.
/ Rycina 22, 23 i 24/.

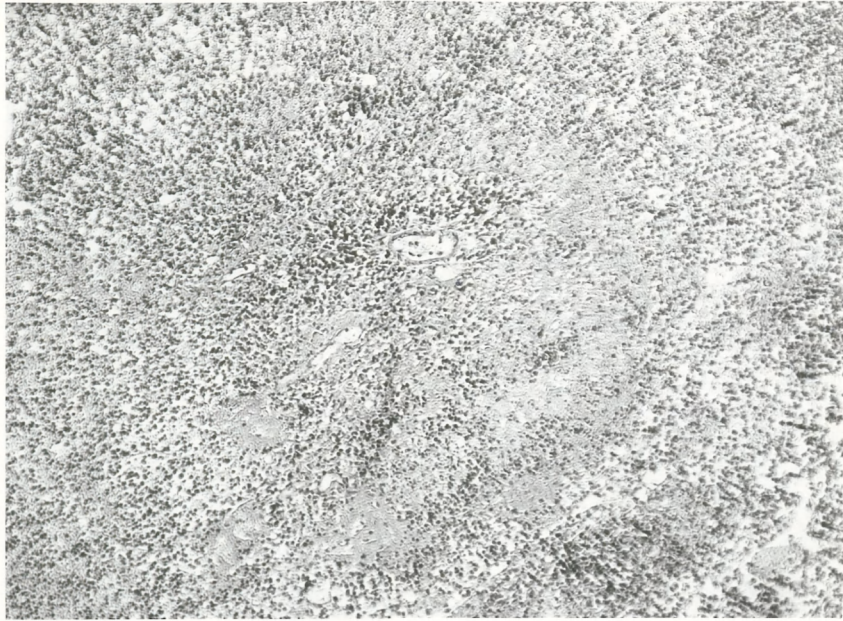
Rycina 25 przedstawia allogenną śledzionę królika trzeciego dnia po przeszczepieniu czyli ósmego dnia od chwili immunizowania dawcy. W tej grupie zwierząt często spotykano duże odczynowe grudki chłonne, miejscami zawierające komórki plazmatyczne. Obraz ten może być morfologicznym wyrazem zmian zachodzących w śledzionie w okresie maksymalnej syntezy przeciwciał.



Rycina 16. Preparat śledziony autogennej
Prawidłowa budowa narządu. / 100 x /.



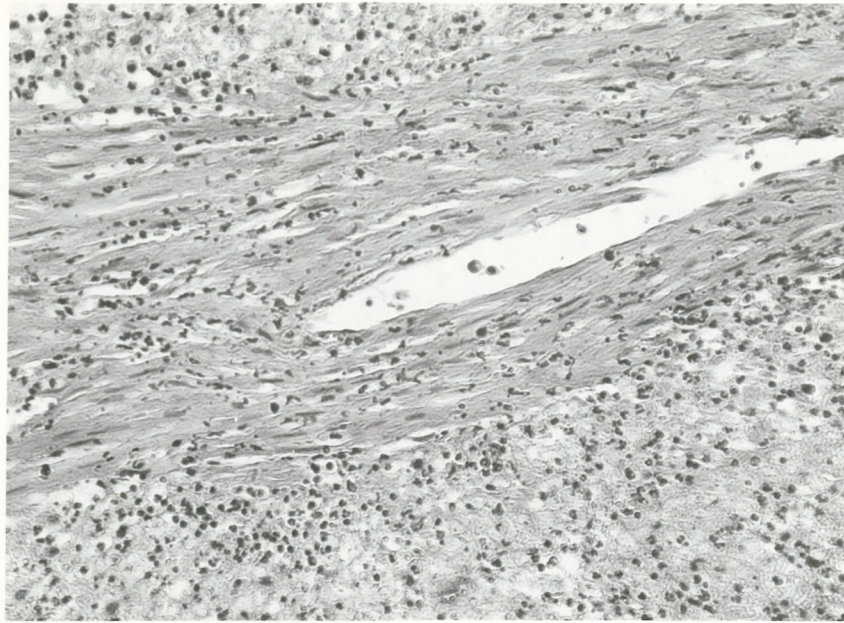
Rycina 17. Allogenna śledziona psa 3 dni
po przeszczepieniu. Częściowe zatarcie
budowy grudki chłonnej.



Rycina 18. Allogenna śledziona psa 5 dni po przeszczepieniu. Zachowane szczątki grudki chłonnej tylko w bezpośrednim sąsiedztwie naczynia centralnego.



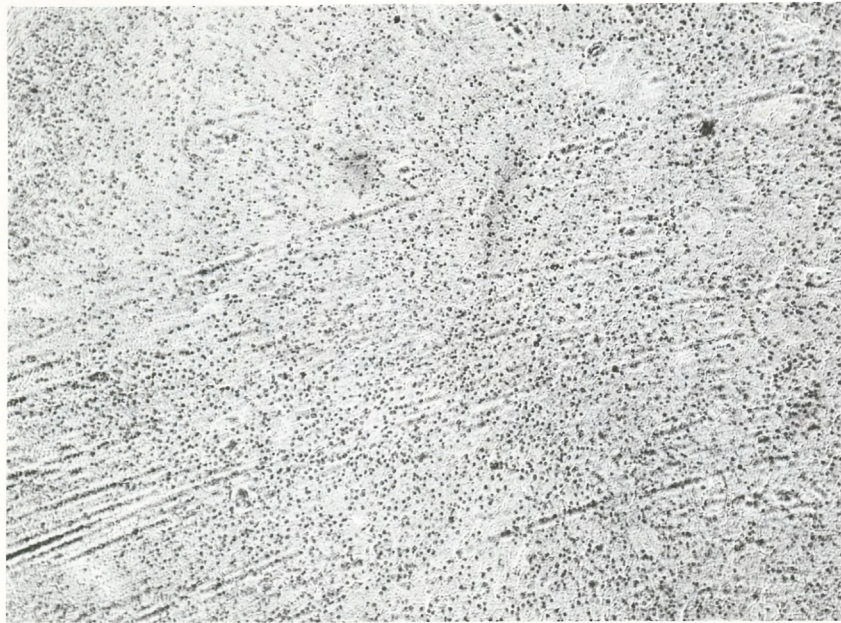
Rycina 19. Preparat - jak wyżej. Nadmierne wypełnienie miazgi czerwonej krwią.



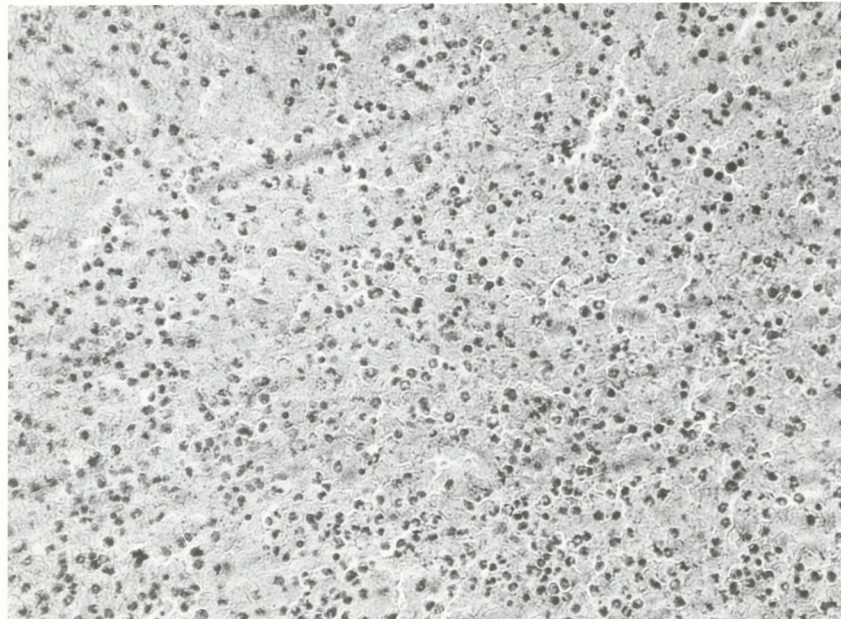
Rycina 20. Preparat - jak wyżej. Zachowane jądra w beleczkach łącznotkankowych.



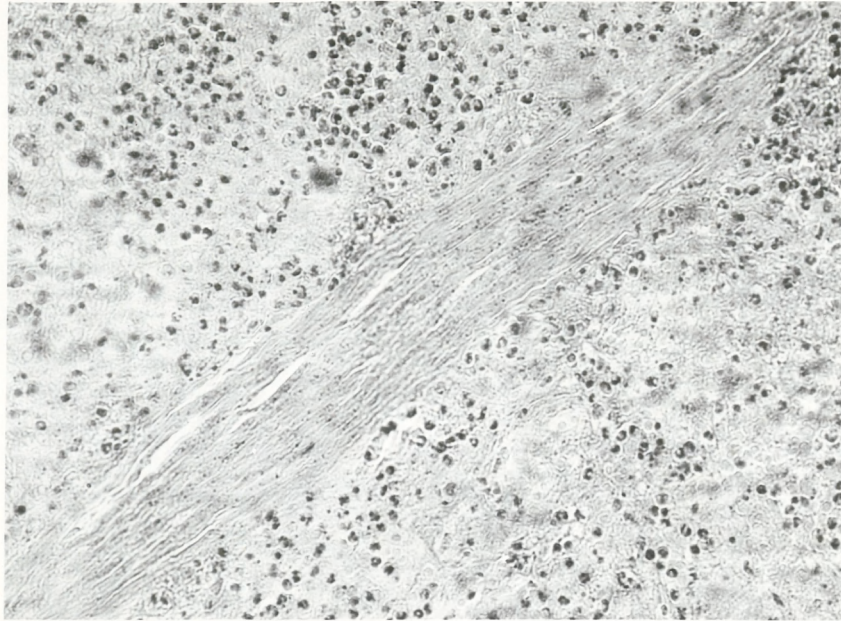
Rycina 21. Makroskopowy wygląd allogennej śledziony psa 7 dni po przeszczepieniu. Śledziona wypełnia większą część jamy brzusznej i robi wrażenie nacieczonej.



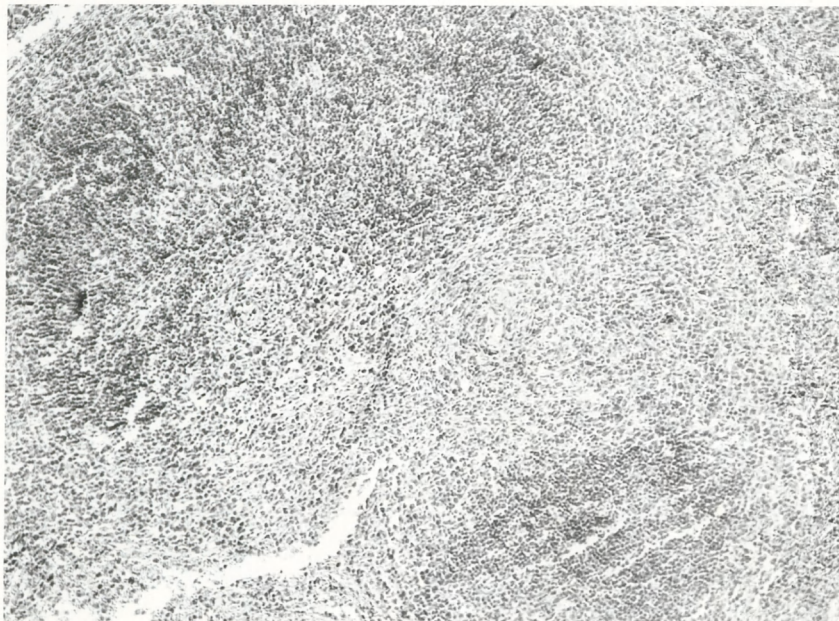
Rycina 22. Preparat śledziony pokazanej na poprzedniej rycinie. Rozległa martwica miazgi czerwonej.



Rycina 23. Preparat - jak wyżej. Większość komórek miazgi czerwonej stanowią komórki wielojądrzaste / 400 x /.



Rycina 24. Preparat - jak wyżej. Martwica obejmuje również elementy łącznotkankowe śledziony.



Rycina 25. Allogenna śledziona królika od immunizowanego dawcy. Trzy doby po przeszczepieniu a osiem od immunizacji. Grudki chłonne mają liczne zlewające się ze sobą ogniska rozmnażania.

IV. Omówienie.

Celem mojej pracy było opracowanie techniki przeszczepiania śledziony u zwierząt oraz opracowanie metod, które pozwalają określić stan czynnościowy przeszczepionej śledziony.

Autogenny przeszczep śledziony do naczyń biodrowych u psów umożliwia długotrwałą sprawność przeszczepionego narządu. Podczas zabiegu należy starać się zapewnić możliwie jak najszersze zespolenie żyłne. Umieszczając narząd w jamie brzusznej trzeba również pamiętać, że wiotka żyła śledzionowa łatwo może ulec zagięciu, co spowoduje szybkie zniszczenie narządu.

Autogenny przeszczep śledziony u królików jest technicznie niemożliwy. Natomiast przeszczep śledziony allogennej do naczyń szyjnych królika jest dobrym modelem do badania czynności przeszczepionej śledziony. Pod warunkiem posiadania dostatecznie cienkich nici doświadczenie takie można wykonać w każdym laboratorium. Przeszczepianie śledziony do naczyń szyjnych, a nie do jamy brzusznej, sprawia, że całość zabiegu jest stosunkowo mało obciążająca dla biorcy.

Wyniki uzyskane w przeprowadzonych przeze mnie doświadczeniach pozwalają stwierdzić, że badanie składu morfologicznego krwi oraz składu białek osocza u psów z przeszczep-

pioną śledzioną nie informuje o stanie czynnościowym tego narządu. Zarówno po przeszczepach autogennych jak i po allogennych obserwuje się w pierwszych dniach po zabiegu przejściowy wzrost liczby krwinek płytkowych, krwinek białych, w tym również samych limfocytów. Po upływie około tygodnia skład morfologiczny krwi wraca do wartości prawidłowych. Takie same zmiany składu krwi stwierdziłem również w grupie kontrolnej psów, u których wykonałem tylko splenektomię.

Trudno mi jest wytłumaczyć, dlaczego wzrasta liczba krwinek płytkowych u psów po przeszczepie autogennym. Może to być wynikiem odwracalnego zaburzenia czynności mięszu śledziony, spowodowanego okresem niedokrwienia lub też zmienionym odpływem żylnym. Normalnie krew ze śledziony odpływa do układu żyły wrotnej, natomiast po przeszczepieniu do układu żyły głównej dolnej.

Wzrost miana przeciwciał przeciwko krwinkom barana u królików-biorców śledziony od immunizowanych dawców świadczy, że w warunkach obcego ustroju przeszczepiona śledzioną zdolna jest nadal produkować przeciwciała. Oznacza to, że klony komórek immunologicznie kompetentnych, syntetyzujących gammaglobuliny, produkują je nadal pomimo nadmiaru innego obcego anty-

geny, z którym komórki te stykają się w ustroju biorcy. Wynika to stąd, że dla dalszego działania efektorowa część łańcucha odpowiedzi immunologicznej nie wymaga obecności antygeny, który tę odpowiedź spowodował.

Obecność przeciwciał przeciwko krwinkom barana udaje się stwierdzić do 6 - 9 dnia po przeszczepieniu. Natomiast w obrazie histologicznym śledziony allogennej zaawansowane zmiany stwierdza się już od trzeciego dnia, głównie w miazdze czerwonej. Od piątego dnia widoczne są wyraźne objawy niszczenia grudek chłonnych, a siódmego dnia zmiany wsteczne obejmują już wszystkie elementy narządu.

Ta różnica między nasileniem zmian morfologicznych a zdolnością syntezy przeciwciał wskazuje, że część tych zmian może być odwracalną.

Synteza przeciwciał przez przeszczepioną śledzionę może być wskaźnikiem sprawności miazgi białej. Informacji o czynności miazgi czerwonej mogą dostarczyć badania izotopowe pod warunkiem posiadania odpowiednich znaczników. Znaczniki takie powinny mieć możliwie krótki biologiczny okres półtrwania, pozwalający na powtórzenie badania po kilku dniach. Znacznik taki winien też charakteryzować się możliwie dużym powinowactwem do mięszo śledziony.

Spośród znanych, najlepiej warunki te spełnia 1 -bromo,mercuri hydroksypropanon znakowany izotopem rtęci, ^{197}Hg . W przeprowadzonych badaniach z krwinkami znakowanymi chromem / preparaty rtęci 197 nie były dla mnie dostępne /stwierdziłem, że allogenna śledziona psa w trzeciej dobie po przeszczepieniu mimo wyraźnych objawów martwicy widocznych w obrazie mikroskopowym, zachowuje jeszcze zdolność gromadzenia uszkodzonych krwinek. Jak mi się to wydaje, jedną z przyczyn takiego stanu może być mała sprężystość narządu i związana z tym podatność na skutki biernego przekrwienia, które zawsze powstaje po przeszczepieniu.

Uzyskane przeze mnie wyniki odpowiadają spostrzeżeniom Wakefielda i Rose'a / 82/, którzy stwierdzili, że komórki śledziony myszy przenieszone przez barierę H-2 zachowują zdolność syntezy przeciwciał przez pierwszych kilka dni po zabiegu.

Jednoczesne badanie histologiczne i badanie syntezy przeciwciał przez przeszczepioną śledzionę umożliwia dokładniejszą ocenę czynności narządu. Pozwala też krytycznie ocenić objawy morfologiczne, które mogą być w pewnym stopniu odwracalne.

V. Wnioski.

Na podstawie przeprowadzonych przeze mnie badań wyciągnąłem następujące wnioski:

1. Stosowana technika chirurgiczna umożliwia długotrwałą sprawność przeszczepionej śledziony.
2. Czynność przeszczepionej śledziony można ocenić przy pomocy metod określających poziom syntetyzowanych przez przeszczepioną śledzionę białek.
3. Zastosowanie znaczników izotopowych o krótkim biologicznym okresie półtrwania może dostarczyć pewnych informacji o stanie miazgi czerwonej przeszczepionej śledziony.

Podziękowanie.

Panu Profesorowi Janowi Nielubowiczowi serdecznie dziękuję za wskazanie przedmiotu badań oraz krytyczne uwagi, którymi dzielił się ze mną w różnych etapach mojej pracy.

Panu Profesorowi Kazimierzowi Ostrowskiemu składam podziękowanie za udostępnienie pracowni Zakładu Histologii i ²Embriologii Akademii Medycznej w Warszawie dla wykonania części badań. Pani doktor Jolancie Jędrzejczyk oraz doktorowi Markowi Zaleskiemu, z tego Zakładu, serdecznie dziękuję za bezpośrednią pomoc i rady, którymi mi służyli w czasie mojej pracy.

Osobne podziękowanie składam doktorowi Janowi Doroszewskiemu z Zakładu Radioizotopów Akademii Medycznej za zainteresowanie zagadnieniami wchodzącymi w zakres moich badań oraz za wykonanie oznaczeń izotopowych.

Za pomoc podczas zabiegów operacyjnych serdecznie dziękuję Wszystkim Kolegom z Zespołu Chirurgii Doświadczalnej i Transplantologii CMDIK, a w szczególności doktorowi Wojciechowi Rowińskiemu za rady i krytyczne uwagi, z których korzystałem w ciągu całego okresu mojej pracy.

Marek Skośkiewicz

Spis rycin.

1. Schemat zespoła naczyń	14
2. Arteriografia przeszczepionej śledziony autogennej psa	15
3. Faza żylna angiografii prze- szczepionej śledziony psa	16
4. Metoda poszerzania zespolenia żylnego u psa	18
5. Zespolenia naczyniowe przesz- czepionej śledziony królika	20
6. Śledziona królika trzy doby po przeszczepieniu	20
7. Arteriografia przeszczepionej śledziony królika	21
8. Płytki agarowe wg. Jerne'go	26
9. wykres krwinek płytkowych	28
10. Wykres krwinek białych	28
11. Poziom białek surowicy	30
12 Schemat doświadczenia na królikach.	32
13. Liczby komórek produkujących hemolizyny	32
14. Scyntygrafia zdrowego psa	35
15. Scyntygrafia śledziony allogennej	35
16. Preparat śl. autogennej	38
17. Śl. allogenna - III doba	38
18. Śl. allogenna - V doba grudka chłonna	39
19. Śl. allogenna - V doba miazga czerwona	39

20. Śl. allogenna - V doba	
beleczka łącznotkankowa	40
21. Śl. allogenna VII doba	
wygląd makroskopowy	40
22. Śl. allogenna - VII doba	
miazga czerwona	41
23. Śl. allogenna - VII doba	
miazga czerwona	41
24. Śl. allogenna - VII doba	
beleczka łącznotkankowa	42
25. Śl. allogenna królika - III doba	
grudka chłonna	42

B I B L I O G R A F I A .

1. Adamski, S., A. Alichniewicz: Zmiany w ustroju po usunięciu śledziony.
Endokrynologia Polska t. IV str 7 - 20.
2. Ashford, T.P. et al.: Correlation of fine structure /electron microscopy/ and functional status of reticuloendothelium cells in spleen.
Surg. Forum: 16: 46 - 7, 1965.
3. Barner, H.B., E.A. Schenk: Autotransplantation of the frozen-thawed spleen.
Arch. of Pathology 82: 267, 1966.
4. Barner, H.B.: Frozen storage of the spleen.
Surg. Forum 16: 83, 1965.
5. Blaustein Ancel /ed./ The spleen.
New York 1963, Mc Graw-Hill Book Co. Inc.
6. Blamey, R.W.: Experiments in tumor immunology.
B.J.Surg. 55: 769, 1968.
7. Boak, J.L., Miles Fox, R.E. Wilson: Activity of lymphoid tissues from antilymphocyte, serum treated mice.
The Lancet 1: 750, 1967, Nr 7493.
8. Boxall, T.A., S.Hirose, B.Eiseman: Experimental evaluation of heterologous ex vivo spleen perfusion.
Ann. Surg. 166: 118, 1967.
9. Boxall, T.A. et al.: Immunological competence of the isolated perfused pig spleen.
J.Surg. Res. 8: 172, 1968.
10. Boxall, T.A. et al.: The ex-vivo perfused spleen.
Surg. Forum 17: 260, 1966.

11. Chaneron, E.A. et al.: Migration of antibody forming cells and antigen-sensitive precursors between spleen, thymus and bone marrow.
Immunology 14: 553, 1968.
12. Charmot, T.G. et al.: Current status of knowledge on the physiology of the spleen.
Rev. Prat. 15: 3357, 1965.
13. Chi-Tao Chou, B. Cinader, S. Dubiski: Quantitative studies of antibody production by plaque-forming cells.
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 32: 317, 1967.
14. Colosi, G.: Morphological aspects of proliferation in vitro of fragments of rat thymus, spleen and didymis after presevation.
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 44: 107, 1968.
15. Cooney, D.P. et al.: The pathophysiology of hypersplenic thrombocytopenia.
Arch. Int. Med. 121: 332, 1968.
16. Crevald, S.van: The importance of liver and spleen in the formation of antihemophilic factor.
Nedrl. T. Geneesk. 112: 469, 1968.
17. Cunningham, A.J. et al.: Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells.
Immunology 14: 599, 1968.
18. Dagradi. A. et al.: Auxillary homotransplants of the liver and spleen en block./Experimental research/.
Chir. Ital. 18: 681, 1966.

19. Dalton, M.L. et al.: Fate of dearterialized spleen.
Arch. Surg. 91: 541, 1965.
20. Delanois, A.L. et al.: Isolated perfused dog spleen method.
Experientia 24: 307, 1968.
21. Diener, E. et al.: Cells in human spleen forming antibody to sheep erythrocytes.
The Lancet 1: 820, April 15, 1967.
22. Doan, C.A.: The spleen, its structure and function.
Postgraduate Med. 43: 126, 1968.
23. Dolejskova, V. et al.: Effect of thymectomy and, or splenectomy performed at different ages on allotransplantation reaction.
Folia Biol. 13: 367, 1967.
24. Dornfest, B.S. et al.: Effect of erthropoetin on reticulocyte release from the isolated perfused rat spleen.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 149: 249, 1968.
25. Eiseman, B.: Extracorporeal assist liver, spleen, lungs.
Scand. J. Gastroent. 1: 241, 1966.
26. Elenes, N.A. et al.: The reservoir function of the spleen and its relation to postsplenectomy anemia in the dog.
Blood 24: 299, 1964.
27. Ellis, E.F. et al.: The role of the spleen in immunity with special reference to the post splenectomy problem in infants.
Pediatrics 37: 11, 1966.

28. Ernström, V. et al.: Migratuon of splenic lymphocytes.
Acta Path. Microbiol. Scand. 72: 379, 1968.
29. Ferrer, J.F. et al.: Effect of splenectomy on the regression of transplantable tumors.
Cancer Res. 28: 1116, 1968.
30. Field, F.D., J.E. Gibbs: Cross reaction of anti-lymphocyte serum with hemopoietic stem cells.
Nature 17: 561, 1968.
31. Filatow, A.N. et al.: Experimental transplantat - tion of the whole spleen for the prevention of tissue incompatibility.
Pat. Fiziol. Eksp. Ter. 9: 34, 1965.
32. Fiscus W.G. et al.: Effect of spleen homotrans - plantation in animals subjected to sublethal doses of total body irradiation.
Surg. Foru. 14: 182, 1963.
33. Ford, W.L., J.L. Govans: The role of lymphocytes in antibody formation. The influence of lympho - cyte migration on the initiation of antibody ~~fo~~ formation in the isolated perfused spleen.
Proc. Roy. Soc. Biol. 168: 244, 1967.
34. de Gabriele, G. et al.: Regulation of platelet production: "hypersplenism in the experimental animal".
Brit. J. Haemat. 13: 384, 1967.
35. Giedosz, B. i wsp.: Wpływ śledziony na oporność osmotyczną leukocytów.
Pat. Pol. 16: 95, 1965.

36. Good, A.R. et al.: Transplantation studies in patients with agammaglobulinemia.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 64: 882, 1957
37. Henke, H. et al.: The radioiron uptake, catabolism of radiochromium labeled erythrocytes and the argyrophilia in the reticulo-histio-histiocyte system of spleen autografts of the mouse.
Z. Ges. Exp. Med. 142: 191, 1967.
38. Holtermann, O.A. et al.: Primary introduction of plaque forming antibody producing cells in spleen organ culture.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127: 675, 1968.
39. Hume, D.M. et al.: The homotransplantation of kidneys and of fetal liver and spleen after total body irradiation.
Ann. Surg. 152: 354, 1960.
40. James, K.: In vivo and in vitro effect of anti-lymphocytic IgG in sensitized spleen cells.
Nature 217: 261, 1960.
41. Jandl, J.H., R.H. Aster: Increased splenic pooling and pathogenesis of hypersplenism.
Am. J. Med. Sci. 253: 27, 1967.
42. Jenkins, J.D., W.M. Stahl: Lymphocyte trapping in dog popliteal lymph nodes: the influence of acute uremia and pharmacologic immunosuppression.
Ann. Surg. 167: 63, 1968.
43. Jenre, N.K., A.A. Nordin, C. Henry: The agar plaque technique for recognizing antibody producing cells. W książce: B. Amos i H. Koprowski "Cell-bound antibodies" str. 109 - 130.

44. Kemeny, M.M., V.H. Covelli, H.S. Sise, J.C. Norman:
Circulating antihemophilic globulin /VIII/ responses to adrenaline infusion: test of transplanted rodent and dog splenic function.
Surg. Forum 19: 190, 1968.
45. Kojima, Y., J.P. Lambilliotte, H.E. Sise, J.C. Norman:
Antihemophilic globulin synthesis by the isolated perfused spleen.
Surg. Forum. 18: 293, 1967.
46. Kuligin, A.G. : Auto and homotransplantation of the spleen on a vascular stem in the dog.
Eksp. Khir. i Anest. 11: 17, 1968.
47. Kwietniak, J.K.: Splenektomia i jej wpływ na układ krwiotwórczy i zachowanie się odporności nieswoistej u ludzi zdrowych, z chorobami krwi oraz u zwierząt doświadczalnych. Praca doktorska.
48. Lambilliotte, J.P. et al.: Liberation of factor VIII /AHF/ by isolated swine spleen perfused with hemophilic human blood.
Rev. Franç. Clin. Biol. 13: 3958, 1968.
49. Lebedev, A.A. et al.: Changes in protein fractions after autotransplantation of the kidney and spleen.
Bull. Eksp. Biol. Med. 60: 42, 1965.
50. Libre, E.P. et al.: Relationships between spleen, platelets and factor VIII levels.
Blood 31: 358, 1968.
51. Lillehei, R.C. et al.: Studies on the treatment of acute radiation sickness in dogs with various

- preparations of spleen.
Surgery 48: 716, 1960.
52. Mahajan, D.R. et al.: Canine spleen transplantation: effect of 6-MP on homograft rejection.
J.Surg. Res. 5: 413, 1965.
53. Mahnke, P.F. et al.: On the histotopography of antibody formation in the rabbit.
Zbl. Allg. Path. 109: 402, 1966.
54. Mandel, M.A. et al: Destruction of splenic transplantation antigens by factor present in liver.
J. Immunology 95: 673, 1965.
55. Manley, O.T., D. Marine : The transplantation of splenic tissue into the subcutaneous fascia of the abdomen in rabbits.
J. Exp. Med. 25: 619, 1917.
56. Marchioro, T.L. et al.: Splenic homotransplantation.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 120: 626, 1964.
57. Martin, Ch.: Antibody proteins synthesis by lymph nodes homotransplanted to a agammaglobulinemic patients.
J. Clin. Invest.
58. Michie, D.: The biometrics of the spleen weight assay. W książce: Handbook of experimental immunology. Ed. D.M. Weir Blackwell 1967, Oxford.
59. Moore, A.T. et al.: The ex vivo perfused spleen as a source of immune lymphocytes.
S.G.O. 126: 1251, 1968.

60. Moore, F.D. et al.: Experimental whole organ ~~x~~ transplantation of the liver and spleen.
Ann. Surg. 152: 374, 1960.
61. Nałęczynska, A. et al.: The effect of epinephrine on serum level of factor ~~x~~ VIII / AHG / in normal subjects.
Po. Med. J. 5: 78, 1966.
62. Neher, G.H. et al. Ultrastructure of antibody release from plaque forming cells.
Vox Sng. 14: 63, 1968.
63. Nelp, W.B. et al.: Splenic infarction diagnosed preoperatively by photoscanning.
J.A.M.A. 197: 368, 1966.
64. Norman, J.C. et al.: Transplantation of the ~~x~~ spleen: experimental cure of hempphilia.
Surgery 64: 1, 1968.
65. Norman. J.C. et al.: Transplantation of the spleen.
Ann. Int. Med. 68: 700, 1968.
66. Pernis, B. et al.: Cells producing IgD immunoglobulin in human spleen.
Nature 211: 424, 1966.
67. Peterson, R.D. et al.: The pathogenesis of immunologic deficiency diseases.
Am.J.Med. 38: 579, 1965.
68. Pierce, J.C., G.L. MacDonald, R.L. Varco: An epinephrine test for evaluating the functional survival of splenic transplants in the dog.
Surg. Forum 12: 110, 1961.

69. Roberts, H.R. et al.: A clinical and experimental study of acquired inhibitors of factor 8. *Blood* 26: 805, 1965.
70. Sakoma, S.: Electronmicroscopic studies of arterial blood vessels of the spleen, especially their relation to the reticuloendothelial system. *Tohoku J. Exp. Med.* 94: 23, 1968.
71. Schlesinger, M. et al.: Serological analysis of thymus and spleen grafts. *J. Exp. Med.* 127: 1127, 1968.
72. Sellar, J.M., P.E. Polani: Transplantation of allogeneic hemopoietic tissue in adult anemic mice of the W series using antilymphocyte serum. *The Lancet* 1: 18, 1969. Nr 7584.
73. Shulman, R. et al.: The physiologic basis for therapy of classic hemophilia / factor VIII deficiency and related disorders. *Ann. Int. Med.* 67: 856, 1967.
74. Simonsen, M. et al.: Biological incompatibility in kidney transplantation in dogs. I Experimental and morphological investigations. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 32: 1. 1953.
75. Suzuki, C. et al.: Experimental studies of canine lung allotransplantation. The effect of cytotoxic agents and donor spleen cells for immunosuppressive treatment. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 55: 200, 1968.

76. Symes, M.O. et al.: A human spleen cell bank.
The Lancet 1: 1052, 1968. May 18.
77. Symes, M.O., A.G. Riddell: Immunologically competent cells in the treatment of malignant disease.
The Lancet 1: 1054, 1968.
78. Symes, M.O. et al.: The viability of human spleen cells after cooling in vitro.
Brit. J. Surg. 53: 794, 1966.
79. Tannenberg, W.J. et al.: The life-cycle of antibody forming cells. I. The generation time of 19 S hemolytic plaque-forming cells.
J. Exp. Med. 128: 895, 1968.
80. Wagner, H.N. et al.: Evaluation of structure and function of spleen with radioactive tracers.
J.A.M.A. 199: 202, 1967.
81. Wagner, H.N. et al.: 1-mercuri 2-hydroxypropane / M.H.P. /.
Arch. Int. Med. 13: 696, 1964.
82. Wakefield, J.D., N.R. Rose: Antibody synthesis by transferred lymphoid cells: the influence of the host genetic environment on the duration of the immune response.
Transpl. 6: 91, 1968.
83. Webster, W.P. et al.: Allotransplantation of spleen in hemophilia.
N. Carolina Med. J. 28: 505, 1967.
84. Wheeler, H.B. et al.: The homograft response to whole organ transplantation of the canine spleen.
J.Surg. Res. 2: 114, 1962.

85. Wolf, P.L. et al.: A histochemical study of immune destruction of the lymphopoietic system. *Experientia* 23: 1012, 1967.
96. Zaleski, M. - kontakt osobisty.
87. Zawadzki, Z.A.: Z zagadnień fázjopatologii śledziony. *P.T.L.* 8: 246, 1954.
88. Sankowski, A.: Ocena reakcji przeszczepu przeciwko biorcy w układzie słabej niezgodności tkankowej - Praca doktorska. Warszawa, 1969.