

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

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

Dr. Sipka Sándor János

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

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

**Debrecen
2007.**

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
1. BEVEZETÉS.....	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
2.1. A lép anatómiája.....	6
2.2. A lép szerkezete emberben.....	7
2.3. A lép szerkezete egérben.....	9
2.4. A lép élettana.....	10
2.5. A lépsebészet története.....	12
2.5.1. Splenectomia.....	16
2.5.2. A splenectomia következményei.....	17
2.5.3. Splenosis és járulékos lép.....	19
2.5.4. A lépmegetartó sebészet és a lép-autotransplantatio.....	20
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	22
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	23
4.1. A kísérletek körülményei.....	23
4.2. Sebészi beavatkozások és kísérleti állatcsoportok.....	23
4.3. Makroszkópos vizsgálatok.....	26
4.4. Laboratóriumi mérőmódszerek.....	27
4.4.1. Vérvérkép meghatározás.....	27
4.4.2. A lymphocyták alosztályok vizsgálata.....	27
4.4.3. Serologiai vizsgálatok.....	28
4.4.4. Phagocyták aktivitás mérése.....	28
4.5. Mikroszkópos vizsgálatok.....	28
4.5.1. Haematoxylin-eosin festés.....	28
4.5.2. Immunhistológiai reakciók.....	29
4.6. Adatfeldolgozás, statisztikai analysis.....	30
5. EREDMÉNYEK.....	31
5.1. A makroszkópos vizsgálatok eredményei.....	31
5.2. A laboratóriumi vizsgálatok eredményei.....	32
5.2.1. A vérvérkép vizsgálatok eredményei.....	32
5.2.1.1. Az átlagos vörösvérsejt térfogat (MCV) változásai.....	32
5.2.1.2. A perifériás vér össz-lymphocyták számának változásai.....	34
5.2.2. A lymphocyták alosztályok vizsgálatának eredményei.....	35
5.2.2.1. A perifériás vér CD3+ T-lymphocyták számának változásai.....	35
5.2.2.2. A perifériás vér CD19+ B-lymphocyták számának változásai.....	36
5.2.3. A serologiai vizsgálatok eredményei.....	37
5.2.4. A phagocyták aktivitás mérése eredményei.....	38
5.2.4.1. A perifériás vér granulocyták számának változásai.....	38
5.2.4.2. A perifériás vér phagocytáinak aktivitás változásai.....	39
5.3. A mikroszkópos vizsgálatok eredményei.....	40
5.3.1. Az autotransplantátumok kimutatása haematoxylin-eosin festéssel.....	40
5.3.2. Az immunhistológiai vizsgálatok eredményei.....	41
5.3.2.1. Érendszeri változások az autotransplantált lépdarabokban.....	41
5.3.2.2. A T- és B-sejtek és a follicularis dendritikus sejtek vizsgálatának eredményei.....	43
5.3.2.3. A macrophagok vizsgálata az autotransplantált lépdarabokban.....	44

6. MEGBESZÉLÉS	46
7. ÚJ EREDMÉNYEK	51
8. ÖSSZEFOGLALÁS	52
9. SUMMARY	53
10. IRODALOMJEGYZÉK	54
10.1.Hivatkozott közlemények jegyzéke.....	54
10.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	62
10.3. Az értekezés témájával összefüggő egyéb közlemények	62
10.4.Egyéb közlemények.....	62
11. TÁRGYSZAVAK.....	63
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	64
13. FÜGGELÉK.....	65

1. BEVEZETÉS

A modern orvostudomány számára a lép a vérpályához kapcsolódó nyirokszerv, ami sokrétű funkcióival a szervezet számos működésében részt vesz, illetve kiszűri a vérben keringő, a szervezet számára veszélyes részecskéket [Szentágothai és mtsa, 1996.].

Sebészi szempontból azonban a lép egy nehezen kezelhető, nagy vérzéseket okozó szerv volt, és sérüléseinek ellátására sokáig a splenectomia volt az egyedüli megoldás. A szemléletváltást 1952-ben a King és Schumacher által leírt „overwhelming postsplenectomy infection syndrome” (OPSI-szindróma), vagyis a lépeltávolítás utáni uralhatatlan sepsis indította el [King és mtsa, 1952.]. Mivel ez egy gyors progressziójú és nagy mortalitású kórkép, aminek az oka a lép hiánya, a lép fontossága felértékelődött. Világszerte több sebészeti és traumatológiai centrumban dolgoztak ki lépmegetartó eljárásokat a lép megvarrásától kezdve a részleges lépeltávolításon át a hálóval való beborításig. Természetesen ezen műtéti technikák kifejlesztése együtt járt, valamint ráépült a lép felépítésének, keringésének és működésének pontosabb, alaposabb megismerésével, feltérképezésével.

A súlyosan sérült lép azonban nem menthető meg minden esetben, -a splenectomiát el kell végezni-, és az ilyen helyzetek megoldására jelent meg a lépszövet visszaültetésének, a lép-autotransplantationnak az igénye. Az autotransplantatio bevezetésére az a régi felismerés adta a gondolatot, hogy a súlyos, roncsoló lépsérülés utáni splenectomiát követően a lépszövet spontán, heterotop autotransplantálódását figyelték meg. Ez azt jelentette, hogy kis, túlélő lépszigetek tapadtak meg a csepleszen, illetve a hasüregben a hashártyával borított felszíneken. E lépdarabkák működőképességét is igazolták. Ez a splenosis-nak nevezett jelenség súlyos lépsérülések után egyes szerzők szerint 66%-os is lehet [Ludtke és mtsai,

1989.]. Az autotransplantatit -állatkísérletes körülmények között- több módszerrel is megpróbálták, de ezekből a klinikai gyakorlatba kevés került át. Egyes beavatkozások a transplantatumok sérülékenysége (pl. hasbőr alá vagy könyökhajlatba történő helyezés miatt), mások a nem megfelelő megtapadási arány miatt lettek sikertelenek.

Furka és munkatársai 1989-ben írták le az autotransplantatio „lépkötény” technikáját kutyán, mely során a lép kis, vékony, körülbelül 2-3 mm vastag, 2x3 cm nagyságú szeleteit ültették vissza a cseplesz rétegei közé. Így azok biztosan és biztonságosan a helyükön maradtak, vékony átmérőjük miatt diffúzióval tudtak táplálkozni, ami lehetővé tette a túlélésüket az új, tápláló véredényrendszer kialakulásáig [Furka és mtsai, 1989.]. Mikó és munkatársai 2001-ben sikeresen adaptálták ezt a lép-autotransplantációs technikát beltenyészített egérre is [Mikó és mtsai, 2001.]. Ezzel a módszerrel az eredeti léptömegnek körülbelül 10-15 %-nyi része került visszaültetésre. Ezt a módszert Debrecenben alkalmazták először a klinikumban is, mára már közel kétszáz esetben [Szendrői és mtsai, 1993; 1997]. Az országos szám közel háromszáz.

A beltenyészített egereken történő kutatások lehetőséget adtak arra, hogy az egyes immunológiai és haematológiai paraméterek a különböző típusú műtéti csoportokban laboratóriumi módszerekkel pontosabban legyenek vizsgálhatók a kisebb egyéni variabilitások miatt.

Így kutató munkám során splenectomizált-, lép-autotransplantált-, ép kontroll- és áloperált kontroll beltenyészített egerekben haematológiai és immunológiai vizsgálatokat végeztem, melyeknek eredményeit kívánom bemutatni és értelmezni a Ph.D. értekezésemben.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A lép anatómiája

A lép az emberi test legnagyobb nyirokszerve, normálisan 120-200 g tömegű, átlagosan 12x6x4 cm nagyságú szerv, mely kóros körülmények között akár harminc szorosára is megnagyobbodhat. Az egész lépet -a hilusnak a pancreashoz közel eső részének kivételével- a peritoneum borítja. Rögzítését a hashártya kettőzetekből kialakuló szalagokon kívül (ligamentum phrenicolienale, ligamentum gastrolienale, ligamentum colicolienale) a hilushoz menő érkepletek biztosítják. A szalagok kollagén rostjainak fő iránya megegyezik a szerv vongálások fő irányával, és ez könnyen a léptok repedéséhez vezethet.

A lép erei, nyirokereit és idegeit a lépkapun haladnak át. Arteriás vérellátása az arteria lienalisból és a különböző szalagokban futó kisebb erekből származik, és a lép mintegy 10 cm hosszú hilusában lépnek be.

A lépen belül az arteriák és a csatlakozó vénák egymástól csaknem teljesen elkülönülő segmenteket látnak el, megteremtve ezzel a segmentális lépeltávolítás anatómiai alapját, illetve a minden tizedik emberben megtalálható intersegmentális anastomosisok komoly műtéti nehézségeket -és vérzéseket- okozhatnak. A lép segmentális felépítésének gondolata 1802-ben jelent meg Assolath-nál, aki kutyákon demonstrálta, hogy a léparteria végágai közül egyet-egyét lekötve csak specifikusan ezek ellátási területei sérülnek, leírva ezzel a segmentumok létezését. Gray a lépről szóló könyvében úgy fogalmaz, hogy az egyik arteriába beadott folyadék vagy levegő nem kerül át más ágakba, illetve egy-egy ág lekötésekor a hozzá tartozó léprész elhal, a többi egészséges marad [Gray, 1854.]. A lép segmentális felépítését - valamint a közöttük lévő avascularis területet- mind arteriás [Gupta és mtsai, 1976.], mind

venás [Dawson és mtsai, 1986.] oldalról igazolták, és a sebészi ellátás az új anatómiai alapokra helyeződött át [Streicher, 1986].

A vér nagy része a lépből a vena lienalison keresztül távozik, amely a pancreas alatt haladva, a mesenterialis vénákkal egyesül a vena portaeban. A venás vér kis része cardia-táji vénákba, illetve a bal vesetok körüli retroperitoneális venás hálózatba kerül. Ezen kis collateralisok portalis nyomásnövekedés esetén hatalmas venás hálózattá erősödhetnek meg.

A regionális nyirokcsomók a léphilusban helyezkednek el. A nyirokutak a pancreas nyirokereivel egyesülve futnak a cysterna chyliibe [Littman, 1988, Gaál, 2002.].

2.2. A lép szerkezete emberben

A lép felszínét a hashártyával összenőtt tok veszi körül, melyből kötőszövetes sővények -trabeculák- irányulnak a lép parenchymájába, ahol hálózatot alkotnak. A trabeculák a lép kapuja (hilus) felé konvergálnak. A lép hilusa mentén a lép arteria és az idegek lépnek be valamint vena ágai és a nyirokerekkel együtt lépnek ki. A belépő képletek a trabeculákban haladnak tovább. A lép trabeculái között található a lép parenchymája, a léppulpa, melynek két típusát lehet a lép friss metszésén megkülönböztetni azon régi, anatómiai tapasztalat alapján, hogy a metszéslapra vízszintesen engedve az állomány egy része kimosható (vörös pulpa), míg másik része fehéres szövet formájában visszamarad (fehér pulpa). Ezen morphologiai különbség funkcionális különbséget is takar.

A vörös pulpa a lépállomány körülbelül 80% -át teszi ki, és mikroszkóposan két részből áll: tömöttebb, sejtekben gazdag kötegekből (Billroth-féle pulpakötegek) és az ezek között elhelyezkedő lazább szerkezetű, az arteriák és a vénák között kapcsolatot létesítő sinusokból. A vörös pulpa megszűri a vért és eltávolítja a testidegen anyagokat és a sérült/ érintett vörösvérsejteket.

A léppulpa állományának maradék 20 %-át a fehér pulpa teszi ki, amely fénylő, fehéres színű, hosszúkás vagy kerekded átmetszetű struktúrák szöveteké, és az egész test

nyirokszöveiteinek egynegyedét teszi ki. Bár nyirokszerv, nincsenek ide befutó nyirokutak, viszont a perctérfogat 5-10 %-a áramlik rajta keresztül. Részeit, az ereket körülvevő, lymphocytákból és járulékos sejtekből álló periarteriális lymphoid hüvely (PALS - T -sejtes zóna), a lép folliculusai (régies nevükön: Malpighi-testecskék – B -sejtes zóna), továbbá az ezeket a képleteket köpenyszerűen körülvevő, azokat a vörös pulpától elhatároló marginalis zóna (B -sejtes zóna és specializált macrophagok) alkotják.

A lép a vér szűrőjeként komplex, de nagyon fontos keringéssel rendelkezik. A vér a léparterián át a hilusnál lép be, majd a trabeculák mentén hatol le a parenchymába. A trabecularis arteriákból kis ágak válnak le a vörös pulpa felé, ahol nyirokszövettel körülvett centrális arteriákká válnak. A centrális arteriákból további kisebb ágak válnak le, hogy a fehér pulpa capillarissait ellássák [Sasou és mtsai, 1986.]. Ezek vagy a fehér pulpa - marginalis zóna határon, vagy a marginalis zónában végződnek, illetve néhány túlér a fehér pulpán és a vörös pulpában végződik. A vér a marginalis zónán szűrődik át a vörös pulpa irányába és vagy összegyűlik a marginalis zóna nyitott végű venás sinusaiban („gyors út”), vagy a vörös pulpa hálózatán szűrődik keresztül („lassú út”) [Schmidt és mtsai, 1993.]. Az arteria centralisok ezután ecetszerűen oszlanak szét (arteriae penicilliformes) a vörös pulpában (nyílt érrendszer), vagy közvetlenül a lép venás sinusaiba torkollanak (zárt érrendszer) [Mebius és mtsa, 2005.]. A vörös pulpában kerülnek szoros kapcsolatba a phagocytáló reticulumsejtek és a macrophagok a vér sejtes elemeivel és a vérben lévő antigénekkal. A vörös pulpából a vér a lépsinusokba, majd a venás capillarissokon és trabeculáris venákon keresztül a hilusi venákba kerül [Röhlich, 2002; Cesta, 2006; Elmore, 2006].

Konventionálisan festett paraffin metszeteken a follicularis marginális zóna körül látható a perifollicularis zóna [Van Krieke és mtsa, 1986, 1988]. Ezen régió a vörös pulpa specializált -folliculusokat körülvevő- része, ahol a sinusok erednek/ végződnek. Az itteni

capillarisok közül számos macrophagok egy- és kétretegű hüvelyével fedett [Steiniger és mtsai, 2001.].

2.3. A lép szerkezete egérben

Az egér és a humán lép felépítése és működése számos hasonlóság mellett jelentős különbségeket mutat. Természetesen mindkét léptípusban jelen vannak a főbb szövettani compartmentek és subcompartmentek, de az egérben a marginalis zóna sokkal kifejezettebb, mint az emberben. A hilusi belépés után az emberben több a kis arteriás elágazások száma, így gyakran számos kisebb ér is van jelen a fehér pulpában, szemben az egér néhány arteriás ágával, amelyek a folliculusok különböző részeit fúrják át, és a periarterioláris lymphoid hüvely (PALS) centrális arteriáját alkotják [Steiniger és mtsa, 2000]. A centrális arteriola terminális ágai a fehér pulpán keresztül jutnak el a marginalis zónába, vagy az azon túli vörös pulpához. Egerekben néhány nagyobb fehér pulpa ér közvetlenül is átvezethet a vörös pulpába, ezek az áthidaló „bridging” csatornák [Mitchell, 1973.]. Intravitális festéssel még a fehér pulpa erek lüktetése is megfigyelhető volt [Grayson és mtsai, 2003.]. Az egerek nem sinusoidális érrendszerében az endothelsejtek közötti nagy hézagok könnyű akadályai a sejtek átjutásának. A nyitott keringésnek köszönhetően jelentős mennyiségű vér filtrálódik ki a lépgerendák között, és a reticularis sejtek nyúlványaikkal összekapcsolódva szűrik a kijutott vért, mielőtt az belépne a venás keringésbe, eltávolítva a fizikailag hibás vagy sérült vörösvérsejteket [Weiss, 1990.]. A vér kisebb része viszont közvetlenül áramlik át az arteriás rendszerből a venásba, elkerülve az extravasatiót.

A fehér pulpában a T -sejtek körülveszik a centrális arteriolát és a periarterioláris lymphoid hüvelyt (PALS) alkotják, amihez a B -sejtekből és follicularis dendritikus sejtekből álló folliculusok csatlakoznak. A follicularis dendriticus sejtek (FDC) az antigén bemutatásban vesznek részt. Ezek a sejtek megkötik és megtartják a dendritjeik felszínén az

immunkomplexeket, így hosszú távon raktározzák a feldolgozatlan antigéneket, amelyek valószínűleg fontos szerepet játszanak mind a B -sejt memóriában, mind a másodlagos antitest válaszban [Tew és mtsai, 1990., Kapasi és mtsai, 1998.]. A fehér pulpa reticularis fibroblast elemei jelentős fenotípusbéli eltéréseket mutatnak [Balogh és mtsai, 2004], szerepük a rácsrost-hálózat kialakításán túlmenően különböző solubilis molekulák gyors transportját lehetővé tevő csatornarendszer (conduit) képzése [Mebius és mtsa, 2005].

A vörös- és fehérpulpa között található a marginalis zóna, amelyben megtalálhatók a specializálódott marginalis sinus endothelsejtek, valamint az azokat körülvevő fibroblast hálózat, marginalis zóna macrophag alcsoportok, és egy különálló B -sejt csoport [Kraal, 1992.; Martin és mtsa, 2002.; Karlsson és mtsai, 2003.].

Rágcsálókban a vörös pulpa kiegészítő myelopoeticus compartmentként szolgálhat a foetalis koron kívül is, illetve a keringő lymphocyták nagy részének kilépési kaput is nyújt. Az itt található macrophagok eredményesen phagocytálják a vérben lévő antigéneket és a sérült vörösvérsejteket. Továbbá a plazmasejtek raktáraként is szolgálnak [MacLennan és mtsai, 2003.]

A lép egyes vascularis compartmentjei nemcsak a lymphoid sejtekhez való topographiai viszonyukban és haemodinamikai jellegzetességeiben, hanem a bélelő endothelsejtek sejtfelszíni tulajdonságaiban és fejlődéstani jellegzetességeiben is jelentékeny eltérést mutatnak (Balázs és mtsai, 2001; Balogh és mtsai, 2007)

2.4. A lép élettana

A lép élettani szerepe sokrétű. A lépnek négy fő funkciója ismert. Befolyásolja a vér alakos elemeinek élettanát, nyirokszervként funkcionál, a vérkeringés szabályozásában részt

vesz és vértképző szervként is funkcionálhat. [Neman, 1997.; Hiatt és mtsai, 1997.; Krstic, 1984.].

Filtrációs funkció:

Az előregedett, sérült, deformált vagy immunglobulinnal fedett vörösvérsejtek eltávolítása valamint egyéb keringő anyagok (baktériumok, koloidális részecskék) kiszűrése. Képes megszabadítani a vörösvérsejteket az intracellularis testektől, degenerált mitochondriumoktól vagy a vasszemcséktől éppúgy, mint bizonyos kórokozóktól (malária). Léptávolítás esetén a peripheriás vérben ezért jelennek meg az ún. Howell-Jolly testek, melyek vasrészecskék a vacuolákat tartalmazó vörösvérsejteken. Az IgG és IgM molekulákkal fedett vörösvérsejtek számára csak a lépben olyan lassú a keringés, hogy azok az Fc-receptorokhoz kötődhessenek. A sérült és deformált vörösvérsejtek pedig a csökkent deformabilitásuk miatt nem tudnak átlépni a lépsinusok falán. A vörös pulpa macrophagjai kebelezik be az arra megérett vörösvérsejteket. A vörösvérsejtek elbontásával a lép részt vesz a szervezet vastranszportjában is, napi több mint 20 mg vas recirkuláltatásával.

Immunológiai funkció:

A vérben keringő antigének kiszűrése és prezentálása, a B -lymphocyta termelés és érés, a T -lymphocyta érés, valamint a monocyta - macrophag átalakulás serkentése, továbbá a plazmasejtek raktározása. A tokos baktériumokkal szemben a lép az elsődleges immunválasz helye, továbbá a B -sejtek által termelt immunglobulinok egyik képzési helye is. A lépben rendkívül magas a phagocytáló sejtek (macrophagok, reticulumsejtek) száma, melyek kulcsszerepet játszanak az idegen anyagok elleni korai védekezésben. Rowley már 1950-ben leírta, hogy a lép immunválasza az intravenás antigén adásnál jelentős. A későbbi vizsgálatok számos, a nem specifikus védekező rendszert érintő tényező szerepére (pl.: tuftsin, lysosym, complement faktorok, kininek, interferonok termelése) világítottak rá.

Tárolási funkció:

Simaizomsejteken bővelkedő, trabeculáris vázzal bíró állatokban a lép vörösvérsejt „tároló” vagy „kiürítő” funkcióját e trabecularis váz simaizomzatának tónusa dönti el. Erélyes összehúzódása jelentékeny mennyiségű vörösvérsejtet juttat hirtelen a vérpályába. Ismert, hogy kutyákban a lép akár harmadára is összehúzódhat.

Az emberi lép kötőszövetes váza mellett ilyen mechanizmust nem tudtak igazolni. Emberben a lép inkább a vérlemezkék, a lymphocyták és a granulocyták tárolásában, illetve az utóbbiak vándorlásában és „homing”-jában játszik fontos szerepet. A lép az összes lymphocytá 20 % -át tartalmazza. A tárolás növekedése esetén (pl. lépmeagnagyobbodás) peripheriás lymphocytopenia és thrombocytopenia, míg a tárolási kapacitás csökkenése, illetve splenectomia esetén lymphocytosis és trombocytosis alakulhat ki.

Haemopoiesisben való részvétel:

A humán egyedfejlődés során az első, jól definiálható vérképző szerv a szikhólyag, amelynek szerepét a 6. gestatio héttől a magzati máj és a lép, a 20. gestatio héttől pedig az embrionális csontvelő veszi át. A születéskor az erythropoesis kizárólagos helyévé a csontvelő válik. Fokozott vérképzéssel járó kórállapotokban, illetve myelofibrosisban a haematopoeticus szövet újból megjelenik az ébrényi vérképző szervekben, a májban, a lépben és a nyirokcsomókban.

2.5. A lépsebészet története

Ókori írások alapján a lépet egy olyan szervnek tartották, ami egyik oldalról a nevetés szerve, másik oldalról pedig akadályozza mind az embereket, mind az állatokat a futásban. A Bibliában a Királyok Könyvében leírták, hogy Dávid király futóinak eltávolították a lépüket, hogy gyorsabbak legyenek. Ókori források, például Pliny szerint a görögök vagy kivágták, vagy forró vassal égették ki a maratoni futók lépét [Moynihan, 1921.]. Az ilyen

„beavatkozáson” átesett személyek gyorsabban futottak, de elvesztették a humorérzéküket. Mivel abban az időben a mediterraneumban a malária endémiás volt, és a malária a népesség nagy részét megfertőzve komoly, akár 10 kg-os lépmegnagyobbodást is okozhatott, nem meglepő, hogy egy így megnagyobbodott szervet eltávolítva az egyén atlétikai teljesítménye jelentősen javult. Ezt egyébként 1922-ben Macht és Finesilver a John Hopkins Egyetemen kísérletesen is bizonyította, ugyanis előzetesen betanított egészséges és splenectomizált patkányokat versenyeztetve igazolták, hogy a splenectomizáltak tényleg gyorsabbak voltak. [Macht és mtsa, 1922.; Morgenstern, 1997.; Hansen és mtsa, 2000.].

Az első splenectomiát Andriano Zaccarello végezte el 1549-ben egy fiatal nőbetegen, akinek a megnagyobbodott lépe hüvelyi úton tapintható volt. A páciens túlélte a műtétet, és felépülve hosszú életet élt. Eugene Pool az 1923-ban megjelent „A lép sebészete” (Surgery of the spleen) című munkájában úgy írta, hogy az 1800 -as évekig Zaccarellon kívül még 10 sebész próbálkozott lépeltávolítással, többnyire nyílt hasi trauma miatt, részlegesen a hasüregen kívülre került lép miatt. 1826-ban Karl Quittenbaum szerzett kettős elsőbbséget a splenectomiák történetében. Egyrészt az első electiv splenectomia, másrészt az első publikált kudarc miatt a beteg rossz általános állapot a miatt. Később munkatársa, Well, az 1864-ben végrehajtott sikeres lépeltávolítása után úgy nyilatkozott, hogy ezt a műtétet a nagy kockázat miatt csak akkor szabad elvégezni, ha a betegnek nincs más módja az életben maradásra, illetve olyan kórállapotokban javallható csak, ahol a lép élettani működése súlyosan zavart (pl. leukémiában) [Well, 1866.].

Kocher kezdte el először alkalmazni azt a gyakorlatot, mely a lépét a legkisebb sérülése esetén is eltávolította, mert funkció nélküli szervnek tartotta [Kocher, 1911.]. Ezt a dogmát 1919-ben Morris és Bullock döntötte meg, amikor kísérletesen igazolták a splenectomizált patkányok fertőzésekkel szembeni fokozott érzékenységét [Morris és mtsa, 1919.]. Bár a sebészek elutasították a szerzők azon feltételezését, hogy ez embernél is

hasonlóan működik, számos kutatót további kísérletekre ösztönzött, míg a többiek továbbra is nagyszámú lépét távolítottak el a legapróbb sérülésnél valamint haematologiai betegségek esetén. Morris és Bullock felfedezésének klinikai vonatkozása továbbra is kérdéses volt.

A helyzet 1951-ben kezdett megváltozni, amikor Gruber és munkatársai egy esetismertetés keretében írtak egy gyermekről, aki sepsisben halt meg lépeltávolítás után. A gyermek congenitalis idiopathias thrombocytopeniával született, és a világra jövétele után 14 órával már el is távolították a lépét. A szerzők leírták, hogy ez a gyermek az első újszülött, akinél sikeresen végeztek ilyen műtét [Gruber és mtsai, 1951.].

King és Schumacher 1952-ben írta le az „overwhelming postsplenectomy infection syndrome”-ot (OPSI-szindróma), vagyis lépeltávolítás utáni uralhatatlan sepsis kórképet öt gyermekben, akiken congenitalis haemolyticus anaemia miatt végeztek lépeltávolítást életük első hat hónapján belül. Cikkükben úgy fogalmazzák, hogy az élet korai hónapjaiban elvégzett lépeltávolítást legalább néhány évig tartó, fertőzésekkel szembeni fokozott fogékonyság követi [King és mtsa, 1952.]. Ugyanezen kórképet Smith és munkatársai 1957-ben írták le egy léptrauma utáni eset kapcsán [Smith és mtsai, 1957.]. Később több tanulmányban is közölték, hogy a lép nélküli betegeknél sokkal magasabb a postoperatív fertőzések veszélye [Horan és mtsa, 1962.; Slater, 1973.; McKinnon és mtsai, 1973.]. Steel és Lim a trauma miatt splenectomizált betegek 27 %-ában talált postoperatív fertőzést [Steel és mtsa, 1975.].

A lépsérülések kezelésében 1968-ban Upadhyaya munkacsoportjánál felmerült a konzervatív kezelés lehetősége is (NOM - Non Operative Management). Megfigyelték, hogy számos lépsérült betegnél a vérzés a laparotomiáig elállt [Upadhyaya és mtsa, 1968.]. Munkacsoportjuk 27 rhesus majmot vetett alá szimulált traumának 1971-ben, amikor is azt találták, hogy a lép segmentális felépítése a magyarázata a különböző súlyosságú vérzéseknek hasonló nagyságú traumák esetén. Ha ugyanis a repedések a különböző vérellátású területek

határain, illetve határai mentén történnek, kis vérzéssel kell csak számolni. Viszont ha a sérülés a határokra merőlegesen történik, és mélyen beszakítja ezeket a területeket, súlyos vérzés és shock lesz a következmény [Upadhyaya és mtsai, 1971.]. Upadhyaya kollegája Simpson, Douglas-sal együtt 1971-ben már megfigyelési és ellátási protokollt is leírt gyermekek lépsérülésének gyanúja esetére, külön hangsúlyozva a non-operatív kezelést is [Douglas és mtsai, 1971.; Zucker és mtsai, 1984.]. Természetesen az is fontos, hogy ne legyen egyéb indikációja a laparotomiának (pl. áthatoló üregi sérülés), illetve haemodinamikailag stabil legyen a beteg limitált transfusio mellett is [Guillon és mtsai, 2000.]. Kezdetben úgy vélték, hogy 55 éves kor fölött mindenképpen operálni kell [Godley és mtsai, 1989.], de későbbi tanulmányok megdöntötték ezt a feltevést [Barone és mtsai, 1999.; Cocanour és mtsai, 2000.].

A kisebb sérülések esetére is már a 70-es években megjelent a lépszövet varrattal történő ellátásának az igénye és az első technikák leírása [Mishalany, 1974.; Burrington, 1977.; Slim, 1979.]. Többek között Ratner beszámolója számos stratégiát javasol, például a nyolcas öltéseket, a nagy vérző erek egyenkénti lekötését, illetve helyi vérzéscsillapító anyagok felhasználását [Ratner, 1977.]. Buntain és Lynn ötlete pedig egy „fonal-létra” volt, egymásra merőleges matracöltések elhelyezése merőlegesen a sérülés vonalára [Buntain és mtsai, 1979.].

A súlyosan sérült, de ép hilusú lépet polyglicolsav és polyglactin alapanyagú felszívódó hálóval körbevarrva próbálták megmenteni [Delany és mtsai, 1982.,1985.; Takeda és mtsai, 1990.; Tribble és mtsai, 1987.; Vanderschot és mtsai, 1993.].

A vérzés csökkentésére 1984-ben jelent meg az arteria lienalison keresztül a kiválasztott segment selectiv embolizációja, mint a lépműtét egyik alternatívája [Mozes és mtsai, 1984.]. Bár Scalfani és munkatársai 98,5 % -os sikerarányról írtak, ezt a későbbi cikkírók nem erősítették meg [Scalfani és mtsai, 1995.]. Haan és munkatársai 13,5 % -os sikertelenségi-,

valamint 20 % -os komplikációs arányról írtak, beleértve 13 % vérzést, 3 % nem észrevett sérülést valamint 4 % fertőzést [Haan és mtsai, 2004.]. Bár a lép-embolizáció során a lép megmarad, de nincs adat a megőrzött, illetve megváltozott funkciójáról. Mivel a lép-sinusok perfúzióját az arteriális nyomás biztosítja, nem tudható, hogy az arteria elzáródása miként befolyásolja a visszamaradó lépfunkciót [Richardson, 2005.].

A technika fejlődésével új eszközök is megjelentek a sebészek eszköztárában. Így a májsebészeti beavatkozásoknál sikeresen használt ultrahang és laser vérzéscsillapító eljárások mellett a rádiófrekvenciás energia felhasználása a lép sebészeténél is bevezetésre került pl. a részleges lépeltávolításhoz [Velanovich és mtsa, 2003.; Jiao és mtsai, 2006.].

Mára a traumatológusok és a sebészek szemléletében a lép teljes vagy részleges megtartásának, illetve megmentésének igénye került előtérbe [Szendrői és mtsai, 1993., 1997.; McClusky, 1999a.; 1999b.].

2.5.1. Splenectomia

A lépeltávolítás gyakorlata több évszázadra nyúlik vissza. Ma a splenectomia az általános- és a baleseti sebészeti osztályokon a rutinműtétek közé tartozik. Elvégezhető laparotomiából, vagy laparoscopos módszerrel.

A splenectomia leggyakoribb javallatai [Littmann és mtsa, 1988.; Flautner és mtsa, 2003]:

Ép szerkezetű lép esetén:

- lépsérülés
- arteria lienalis aneurysma
- léptorsio
- szomszédos szervek malignomája
- vena lienalis trombosis

Kóros elváltozású lépben:

- gyulladásszerű betegség (abscessus, malária, stb.)
- cysta, daganat

- portalis hypertonia
- haematologia betegségek
- autoimmun betegség (pl. immunthrombocytopenias purpura)
- rendszerbetegségek (pl. lipid tárolási betegségek)

2.5.2. A splenectomia következményei

A lép eltávolítása általában az étellel összeegyeztethető, ennek ellenére a betegek csaknem egy negyedében általános panaszok jelentkeznek: fáradékonyság, hasi dyscomfort érzés, fogyás, keringési zavarok, ingerlékenység és vegetatív labilitás. Ezeket alkohol-intolerantia, sebgyógyulási zavarok és a fertőzésekkel szembeni ellenálló képesség csökkenése kíséri.

A splenectomiát gyors változások követik a vérképben. Sokszor a műtét végére jelentősen emelkedik a vérlemezkeszám. Idővel a vörösvérsejtekben Howell-Jolly testek jelennek meg. Ez viszonylag jó indikátora a lép hiányának. Melléklép, incomplett lépeltávolítás, részleges resectio és splenismus esetén a Howell-Jolly testek megjelenése nem történik meg. Ezen túlmenően vacuolisált és kóros sejtalakok is észlelhetők a peripheriás vérképben. A fehérvérsejtszám megemelkedik, és a vér viszkozitása megnő.

Splenectomiát követően életkortól függően változik a szervezet védekezőképessége: gyermekkorban -elsősorban 3 éves kor alatt-, idősebbeknél -60 év felett- jelentősen fokozódik a fertőzésveszély. A legfontosabb pathophysiologiai problémák a csökkent immunglobulin szintnek, -különösen az IgM termelésnek- a gyengébb phagocytosis és opszonin hatásnak, valamint a szervezet filtrációs kapacitás beszűkülésének a következményei. Az esetek 2-6 %-ában ezek együttesen vezetnek el a néha évek múlva kialakuló, igen súlyos, nagy (75 % feletti) mortalitású septicus állapothoz, a gyors progressziójú sepsishez. Ennek angol neve „overwhelming postsplenectomy infection” syndrome (OPSI-syndroma) vagyis lépeltávolítás utáni uralhatatlan sepsis. Ezt a kórképet először 1952-ben King és Schumacher

írta le, és azóta is nagy figyelem övezi. [King és mtsa, 1952.]. Mivel lépeltávolítás után csökken az immunrendszer opsonisatiois képessége, a kórokozó legtöbbször a polisacharid tokkal rendelkező Pneumococcus, Haemophilus influenzae, valamint Meningococcus baktérium. A gyermekekben nagyobb gyakorisággal alakul ki kisebb mortalitású meningitis, míg felnőtteknél a nagyobb halálozású septicaemia dominál [Holdsworth és mtsai, 1991.]. A csökkent immunvédekezés veleszületett léphiánynál is fennáll [Brendolan és mtsai, 2007.].

A súlyos szövödmény kivédése vaccinációval, évekig tartó antibiotikus profilaxissal, a lépszövet megtartását szolgáló sebészi megoldásokkal lehetséges [Sieber, 1992.; Hiatt, 1997.].

Sajnos az is ismert, hogy mivel a lép kulcsfontosságú a thymus independens immunválaszban, a lépeltávolításon átesett személyek antitest titere töredéke lehet a léppel rendelkező társaiénak [Amlot és mtsa, 1985.]. Tsunoda és munkatársa pedig fiatal, 3 hetes egereken írta le a lépeltávolítás markánsabb immundepressiv hatását felnőtt, 10 hetes egerekhez képest [Tsunoda és mtsa, 1987.].

A postsplenectomiás sepsis annál gyakoribb és súlyosabb, minél fiatalabb korban történt a splenectomia, illetve függ a lépeltávolítás okától is. Ugyanis, ha a műtét oka Hodgkin kór vagy más haematologiai betegség, a betegek között sokkal nagyobb valószínűséggel fog OPSI-syndroma előfordulni, mintha trauma miatt történik a lépeltávolítás. Haematologiai betegségekben ezért -amennyiben lehetséges- a lépeltávolítást 3 éves kor utánra kell halasztani. Traumás esetekben pedig törekedni kell a lép megtartó- azaz a szervmegtartó műtéti megoldásra [Littmann és mtsa, 1988.; Flautner és mtsa, 2003; Gaál, 2002.].

A fokozott, fertőzésre való érzékenység parazitákkal, maláriával szemben is fennáll, és a fertőzött személyben a lép eltávolítása felgyorsítja a betegség progressióját [Wyler, 1983.]. Ezzel szemben HIV betegeken elvégzett splenectomia viszont elnyújtja az AIDS kezdetét, valószínűleg a léppel együtt eltávolított nagy mennyiségű fertőzött lymphocytá eltávolítása révén [Bernard és mtsai, 1998.].

2.5.3. Splenosis és járulékos lép

A splenosis régóta ismert jelenség mely szerint traumás lépsérülést, illetve lépeltávolítást követően a lép szétszóródott állománya spontán implantálódhat a hasüregben. Ezen kis darabkák megtapadnak a nagycseplesz, máj, gyomor és egyéb szervek hashártyával borított felszínén, s azon néhány millimétertől a centis nagyságig terjedő plakkokat, illetve lépszövet réteget hozhatnak létre. A splenosis gyakorisága súlyos lépsérülések után egyes szerzők szerint 66%-os is lehet. Mikroszkóposan a normál léphez hasonló szerkezetűnek tűnnek, de a tok fibrotikus, illetve az érellátása sok kis artérián keresztül valósul meg, nem pedig egy hiluson áthaladó főeren át és a trabeculák is hiányozhatnak [Rice és mtsa, 1980.]. Bár a splenosisos esetek nagy részét a hasüregben írták le, irodalmi adatok szólnak a mellüregben [Buchino és mtsa, 1998.], illetve az agyban [Rickert és mtsai, 1998.] történő előfordulásáról is. A megtapadt lépdarabkák tumort utánozhatnak a mellkasban [Thourani és mtsai, 2005.] a hasüregben [Dweyer és mtsa, 2005.], és a lövés utáni hegben akár a bőr alatt is [Yeh és mtsai, 2006.]. A hasüregben összenövések-, illetve a kismedencében chronikus fájdalom forrásai lehetnek [Sarraf és mtsai, 2006.].

A járulékos vagy szám feletti lép általában a „fő lép” hilusában található. Wadham és munkatársai 250 kórboncolást végeztek el tudatosan keresve a járulékos lépeket, és 46 esetben (18,4 %) találtak. Ezek mérete 2 mm és 3,5 cm között mozgott, és a legnagyobb járulékos lép 6,6 gramm súlyú volt. A helyük az esetek 41 %-ban a léphilus, 23%-ban lieno-renalis szalag, 13%-ban a gastrolienalis szalag, 11%-ban a pancreas farka, 7%-ban a nagycseplesz volt, valamint 4%-ban a rekesz alatti kötőszövetbe volt beágyazva a járulékos lép [Wadham és mtsai, 1981.]. Traumás sérüléseknél a járulékos lép is lehet vérzésforrás, [Habib és mtsa, 2001.], illetve krónikus kismedencei fájdalom háttere [Wacha és mtsai, 2002.].

Pearson és munkatársai leírták, hogy ezen lépdarabkák „újraéledhetnek”, nevezetesen radiotechnícium-scannel igazolt splenosisos esetekben a Howell-Jolly testek már nem voltak

kimutathatóak [Pearson és mtsai, 1978.]. Legalább 20-30 g maradék lépszövet szükséges a Howell-Jolly testek eltűnéséhez. Míg néhány lépfunkció visszatérhet, a fertőzésekkel szembeni védelem kérdéses marad. Hátterében a splenosis kis mennyisége, illetve ritka előfordulása állhat. OPSI syndromában elhunyt gyerekek és felnőttek kórboncolása során talált összesített lépmennyiség 4 és 92 g között változott. Ezekben az esetekben ez nem volt elég az infekciókkal szembeni kellő védelemhez [Corazza és mtsai, 1984.].

2.5.4. A lépmegtartó sebészet és a lép-autotransplantatio

Traumás lépsérülések illetve egészséges lép sérülése esetén a sebészeti szakmai irányelvek [Moor, 1995.] alapján a következőképpen kell eljárni.

Kis sérülések esetén a konzervatív therapia eredményes lehet. II. és III. fokozatú sérülésnél „nyolcas” vagy „matrac” öltést használnak, illetve szövetragasztó anyagot és/vagy bioplastot. Szükség esetén mobilizált csepleszdarabbal lehet a sérülést befedni [Feliciano, 1990.]. Nagyobb sérülés esetén (III.-IV. fokozat) alkalmával lehetőség van részleges lép resectiora is. Általános elv, hogy a lépmegtartó műtét ideje nem nyújthatja meg jelentősen a műtéti időt, vagy nem növelheti meg az intraoperatív vérvesztést. A laparoscopos technika térhódításával haemodinamikailag stabil betegek esetében exploratív, illetve therápiás laparoscopia alkalmazása is bekerült a modern sebészi eszköztárba [Baliqúe és mtsai, 1999.; Huscher és mtsai, 2005., Kanyári és mtsai, 2006.].

Természetesen vannak olyan esetek is, amikor a lép nem tartható meg pl. súlyos, IV.-V. fokozatú sérülés esetén, vagy a hilus leszakadása alkalmával. Ezekre az esetekre jelent meg a lépszövet részleges megmentésének, a lép-autotransplantationak az igénye. Furka és munkatársai 1989-ben írták le az autotransplantatio „lépkötény” technikáját kutyán, amivel a lép kis, vékony szeleteit (körülbelül 2-3 mm vastag 2x3cm kiterjedésű szeletkéket) ültetnek vissza a nagycseplesz rétegei közé [Furka és mtsai, 1989.]. Fontos műtéttechnikai módosítás

volt az eddigi beavatkozásokkal szemben, hogy a lépdarabkák a cseplesz rétegei közé és nem arra kerültek rá, ezért biztosabban a helyükön maradtak, nagyobb felületén kaptak tápanyagot, valamint így az összenövések kialakulása is elkerülhető volt. Ezzel a módszerrel az eredeti léptömeghez képest körülbelül 10-15 %-nyi lépszövet kerül visszaültetésre. Ezen visszaültetett léptömeg mennyiség választásnak az volt a magyarázata, hogy még a nagyon súlyosan roncsolt lépből is ez még egy biztosan megmenthető mennyiség, illetve, ha túl nagy darabok kerülnek visszaültetésre, akkor azok belseje nem kap diffúzióval elég tápanyagot az új vérellátás kialakulásáig, ezért azok elhalhatnak. Ilyenkor steril tályog jön létre, ami további komplikációk, valamint felülfertőződés forrása lehet. A lép-autotransplantatio Furka-féle módszerét Debrecenben alkalmazták először a klinikumban, mára már közel kétszáz esetben [Szendrői és mtsai, 1993.; 1997]. Országosan pedig közel háromszáz betegnél került sor ilyen műtétre.

Mikó és munkatársai 2001-ben sikeresen adaptálták a lép-autotransplantatio módszerét egerekre is. Így lehetőség nyílt a lép-autotransplantatiót követő morfológiai és funkcionális eltérések inbred egereken történő részletesebb vizsgálatára [Mikó és mtsai, 2003., 2006.].

A lép visszaültetés több formája közül lehetséges még a szövetragasztó anyaggal történő rögzítés is a csepleszhez [Havlicek és mtsai, 1992.], vagy a lépszeletek izolált vékonybél-darabba történő ültetése [Pabst és mtsa, 1993.]. A lép-autotransplantatiót leírták kézzel-asszisztált-laparoscopos módszerrel sertésen [Biertho és mtsai, 2004.], továbbá betegeken is tisztán laparoscopos technikával hazai [Svébis és mtsai, 2005.], és külföldi szerzők [Petroianu és mtsa, 2006.]. A lépdarabok beültetésének további helyei lehetnek a rectus hüvely, valamint a retroperitoneum is.

A legalkalmasabb hely azonban a kedvező vérellátás, a portalis elvezetés és az antibacterialis „clearance” miatt a nagycseplesz.

3. CÉLKITŰZÉSEK

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

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

1. A peripheriás vér alakos elemeinek számban és eloszlásban történő változásainak mérése.
2. A lymphocyta alcsoportok sejtszámainak-, és arányainak követése.
3. A szérumfehérjék -immunglobulinok, complement faktorok- szintjében történő változások mérése.
4. A peripheriás vér phagocita aktivitásának vizsgálata.
5. Fénymikroszkópos vizsgálatokkal a lép autotransplantatumok komplex, szövettani elemzése a hagyományos haematoxylin-eosin szövettani festésmóddal és immunhistologiai reakciók által sejttípus-szelektív jelölési módok segítségével ép- és áloperált kontroll állatok lépszövetéhez viszonyítva azokat.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. A kísérletek körülményei

Kísérleteink kezdete előtt a korábban elsajátított mikrosebészeti alapismereteinkre építve a lépeltávolítás és a lép-autotransplantatio műtéti technikáját megtanultuk és begyakoroltuk.

Kísérleteinket összesen 126 darab, 23-26 gramm súlyú mindkét nemből közel egyenlő arányban származó Balb/c egéren végeztük. A műtéteket két hónapos egereken hajtottuk végre. Az állatokat a tervezett mérések előtt kettő, illetve nyolc hónappal operáltuk meg, azért, hogy a laboratóriumi vizsgálatokhoz a mintavételek és a mérések egy időben, párhuzamosan történhessenek.

Ez azt jelenti, hogy összehasonlító laborvizsgálatok idején a vizsgált állatok egyik csoportja négy, a másik pedig tíz hónapos volt.

Ezen egerekből 96 állaton történtek a haematologiai, az immunológiai és a serologiai vizsgálatok, további 30 állatból a haematoxilin-eozin festéses szövettani-, és az immunhistologiai vizsgálatok.

4.2. Sebészi beavatkozások és kísérleti állatcsoportok

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

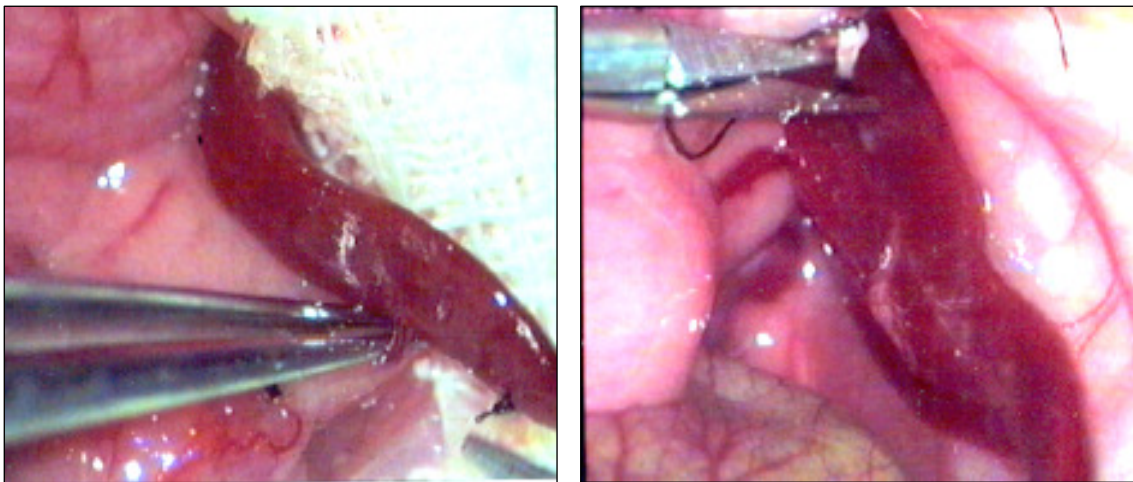
Az állatokat műtétechnikai szempontból négy, közel egyenlő csoportra osztottuk:

A) *Ép kontroll csoport (K)*: sem műtéti beavatkozás, sem altatás nem történt.

B) „*Áloperált*” *kontroll csoport (ÁL)*: a hasüreg megnyitása, a lép előemelése, majd visszahelyezése, illetve két rétegű hasfalzárás történt.

C) *Splenectomizált (lépeltávolított) csoport (SE)*: a hasüreg megnyitása után a lépet előemeltük, és a léparteriák lekötése és átvágása után eltávolítottuk (1. ábra) a lépet, majd a hasüreget két rétegben zártuk.

D) *Autotransplantált csoport (AU)*: a hasüreg megnyitása után a lépet előemeltük, és a léparteriák lekötése után a lépet eltávolítottuk. Az eltávolított lépből szobahőmérsékletű Ringer-laktát oldatban 5 darab, körülbelül 2x2x2 mm nagyságú lépdarabkát metszettünk, ami az eredeti léptömeg körülbelül 10-15%-át jelentette (2. ábra). Ezeket a darabkákat a csepleszben létrehozott „fészkekbe” helyeztük (3. ábra). A „fészkek” fonállal történő zárása (4. ábra) után a hasüreget két rétegben zártuk.



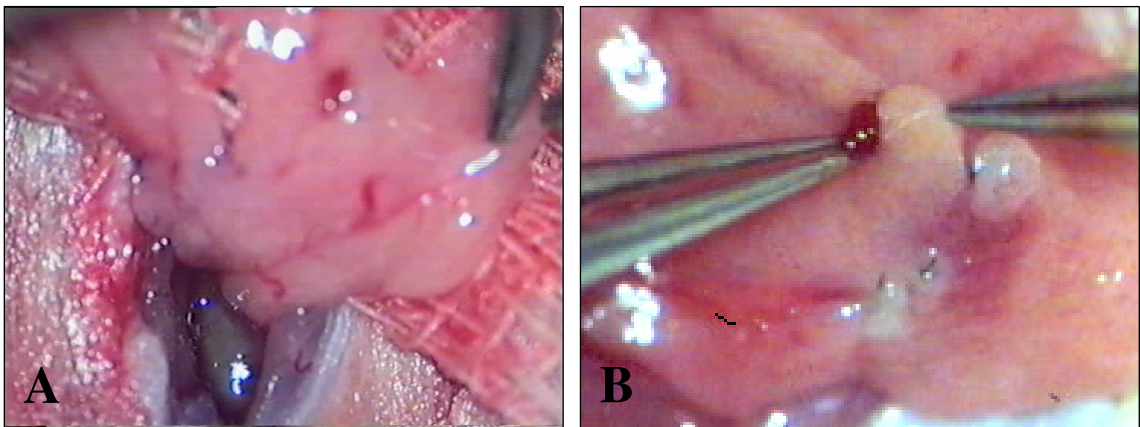
1. ábra.

A léparteria lekötése és átvágása



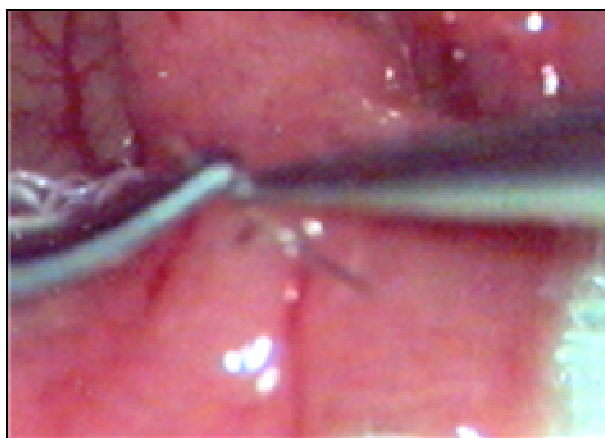
2. ábra.

Az eltávolított lépből a beültetésre előkészített lépdarabkák



3. ábra.

A csepleszben készített „fészkek” (A) és a lépdarabkák behelyezése (B)



4. ábra

A „fészkek” zárása a csepleszben

A hasüreg zárása előtt 1,0-1,2 ml steril physiologias sóoldatot fecskendeztünk az állatok hasüregébe volumenpótlás, illetve az összenövések megelőzése céljából.

A műtétek után az állatok melegítő lámpa alatt töltöttek még körülbelül 6 órát. Az egerek általában a műtétet követően egy órán belül felébredtek. Vizet és tápot ad libitum kaptak. Antibiotikum kezelést nem alkalmaztunk.

A négy műtéti típust és a két postoperatív vizsgálati időpontot figyelembe véve az alábbi kísérleti csoportokat alakítottuk ki:

A műtét utáni két hónapos csoportok és jelölésük:

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

A műtét utáni nyolc hónapos csoportok és jelölésük:

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

4.3. Makroszkópos vizsgálatok

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

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

4.4. Laboratóriumi mérőmódszerek

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

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

4.4.1. Vértkép meghatározás

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

4.4.2. A lymphocytálosztályok vizsgálata

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

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

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

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

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

4.4.3. Serologiai vizsgálatok

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

4.4.4. Phagocytá aktivitás mérés

A peripheriás vér neutrophil granulocytáinak működését a zymozán (Sigma, USA) stimuláció után keletkezett szabadgyökök kemilumineszcenciájának mérése alapján luminométerrel (Berthold, Németország) jellemeztük [Sipka és mtsai, 1986.]. A kétszeresére hígított vér 250 µl-éhez 250 µl 1 mg/ml-es zymozán oldatot adtunk. A reakciót 50 µl 2×10^{-6} M-os luminol hozzáadásával erősítettük fel. Az állatokból párhuzamos méréseket végeztünk.

4.5. Mikroszkópos vizsgálatok

4.5.1. Haematoxylin-eosin festés

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

4.5.2. Immunhistológiai reakciók

Az immunhistológiai vizsgálatok egérlép-endothel és strómasejtekkel (fibroblastok, marginalis zona macrophagok, follicularis dendritikus sejtek) reagáló patkány eredetű monoklonális antitestekkel történtek [Balogh és mtsai, 2005; Balázs és mtsai, 2001] a Pécsi Tudományegyetem Immunológiai és Biotechnológiai Intézetében.

Az IBL-7/22 antitest egy közös sinusoidalis és arteriolaris endothel-membrán antigénhez kapcsolódik. Az endothelialis reaktivitás mellett a periarteriolaris lymphoid hüvely és a vörös pulpa bizonyos reticularis komponensei is jelölődnek ezen ellenanyaggal, míg a folliculus régió nem [Balázs és mtsai, 1999]. A marginalis sinus endothelsejtjei pozitívan festődnek az IBL-7/1 antitesttel [Balogh és mtsa, 2005] és MAdCAM-1 antigén [Kraal és mtsai, 1995] elleni ellenanyaggal. A vizsgálatokat 8 µm-es fagyasztott és aceton-fixált metszeteken végeztük

A T -sejtek azonosítása anti-CD3 antitestekkel, a B -sejtek jelölése anti-B220 ellenanyaggal történt, a follicularis dendritikus sejteket FDC-M1 ellenanyaggal azonosítottuk. A marginalis zóna macrophagjainak két különböző alcsoportját festettük meg, az IBL-12 elnevezésű ellenanyag a MARCO-t (Macrophage Receptor with Collagenous structure) ismerte fel [Kvell és mtsai, 2006], az IBL-13 jelű pedig a marginalis zona metallophil macrophagjai által expresszált szialoadhezint (CD169) jelölte meg. A primer antitesteket biotinált egér monoklonális anti-patkány (MRK-1) másodlagos ellenanyaggal (BD Pharmingen) reagáltattuk, mely kötődését HRPO-streptavidinnal detektáltuk (Sigma Aldrich, USA), H₂O₂-amino-etil-karbazol szubsztrát-kromogén felhasználásával 0,1 M Na-acetát pufferben (pH: 5,2). Az endogén peroxidáz-aktivitás gátlására a metszeteket előzőleg 1 mg/ml fenil-hidrazinnal kezeltük.

4.6. Adatfeldolgozás, statisztikai analysis

Az egyes vizsgálati csoportokban a mérési átlagok és a standard deviatio +/- S.D. meghatározása után a statisztikai analízishez SigmaStat for Windows 1.0 statisztikai programot használtunk. Az adatok normál eloszlása esetén „one-way ANOVA” tesztet alkalmaztunk a csoportok közti összehasonlításra. Szignifikáns eredmény esetén Dunett teszttel hasonlítottuk össze a párok átlagait. Nem normál eloszlás esetén Kruskal-Wallis teszttel dolgoztunk. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikáns eltérésnek.

Az adatok feldolgozása során a szignifikáns változásokat ($p < 0,05$) két csoportba osztottuk. Az egyikbe azon változások kerültek (pl. hemoglobin, vagy vérlemezke adatok) amelyeket mindhárom („autotransplantált”, „splenectomizált”, „áloperált”), műtött állatcsoportban észleltünk. Ezeket „operáció specifikus” eltérésnek tekintettük, és ezek további elemzése a jelen munkánkban nem szerepel.

Ezzel szemben a változások másik csoportja csak a lépműtött („autotransplantált”, „splenectomizált”) állatokban volt megfigyelhető. Ezek értékelését az egészséges kontrollok adataihoz viszonyítva végeztük a teljes helyreállítás (100%, restitutio ad integrum) szempontjából, bár mindig feltüntetjük az áloperált csoport eredményeit is, amelyek egyébként lényegi különbséget nem mutatnak a kontrollok adataihoz képest.

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

5. EREDMÉNYEK

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

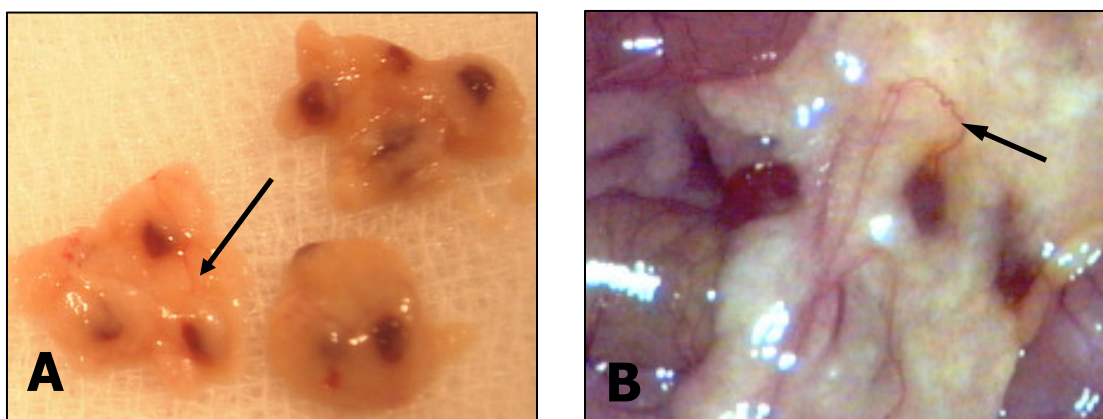
5.1. A makroszkópos vizsgálatok eredményei

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

A mintavételeknél mind makroszkóposan, mind az operáló mikroszkóp alatt jól láthatóak voltak a megtapadt lép- autotransplantatumok mind a hozzájuk vezető megerősödött erek (5. ábra). A vérvételek után mindig ellenőriztük operációs mikroszkóp alatt azt, hogy minden visszaültetett lépdarabka fellelhető legyen.

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

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



5. ábra.

A cseplésbe ültetett kéthónapos túlélő lépdarabkák makroszkópos képe (A), és operáló mikroszkóp alatti képe (B). Jól követhetők a lépdarabkákhoz futó erek. (N:16x) A nyilak az autotranszplantatumok ereződését mutatják.

5.2. A laboratóriumi vizsgálatok eredményei

5.2.1. A vérkép vizsgálatok eredményei

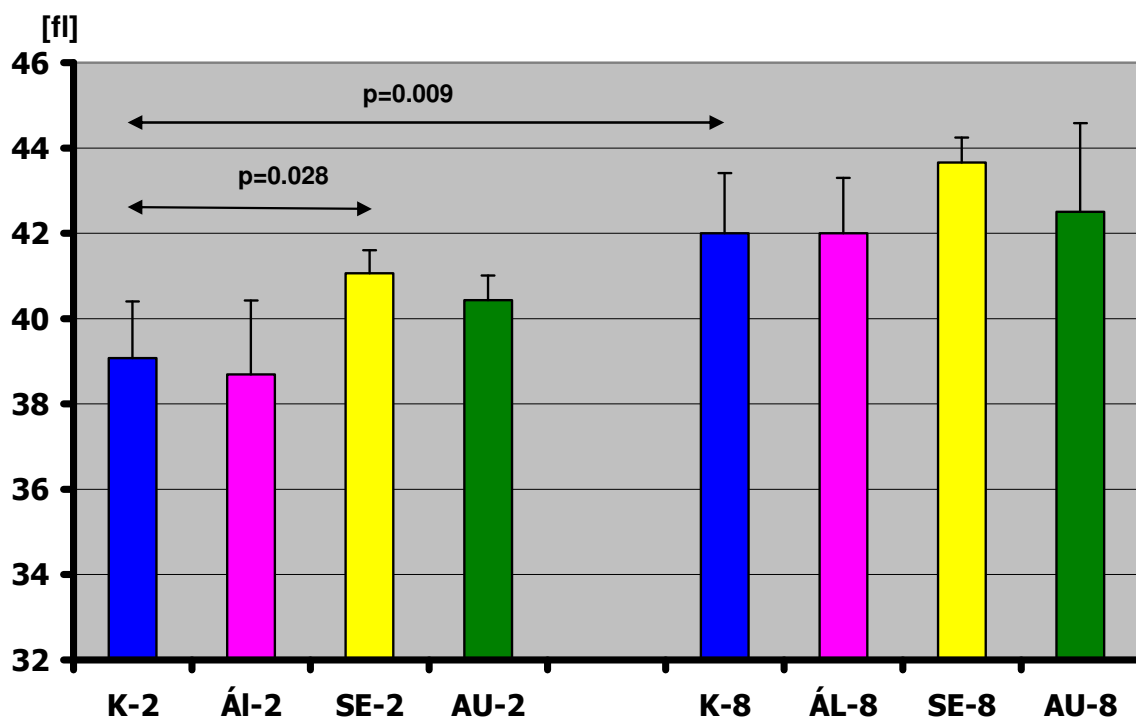
5.2.1.1. Az átlagos vörösvérsejt térfogat (MCV) változásai

A 2. postoperatív hónapban végzett vizsgálatok során a haematologiai automatával mért átlagos vörösvérsejt térfogat „mean corpuscular volume” -MCV- változásai azt mutatták, hogy a keringésben szignifikánsan megnőtt az átlagos vörösvérsejt térfogat a splenectomizált (SE-2) csoportban az ép kontroll (K-2) csoporthoz képest (K-2: $39,08 \pm 1,327$ fl vs. SE-2: $41,00 \pm 0,6$ fl, $p= 0,028$). Az autotranszplantált (AU-2) állatokban is emelkedett vörösvérsejt

térfogat volt észlelhető az ép kontrollokhoz (K-2) képest, bár ez az emelkedés csak közelítette, de nem érte el a szignifikáns különbséget.

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

A 8. postoperatív hónapban az MCV értékei között nem volt szignifikáns eltérés, bár az autotransplantált csoportban bizonyos mértékű filtrációs aktivitásra utalhat az, hogy a nagy átmérőjű vörösvérsejtek aránya kisebb bennük, mint a splenectomizált állatokban, s arányuk közelíti az ép- és áloperált kontroll csoportokét a 8. postoperatív hónapban (7. ábra).



6. ábra.

Az átlagos vörösvérsejt térfogat változásai a 2. és a 8. postoperatív hónapban

K-2: $39,08 \pm 1,327$ fl vs. K-8: $42,00 \pm 1,414$ fl, $p=0,009$

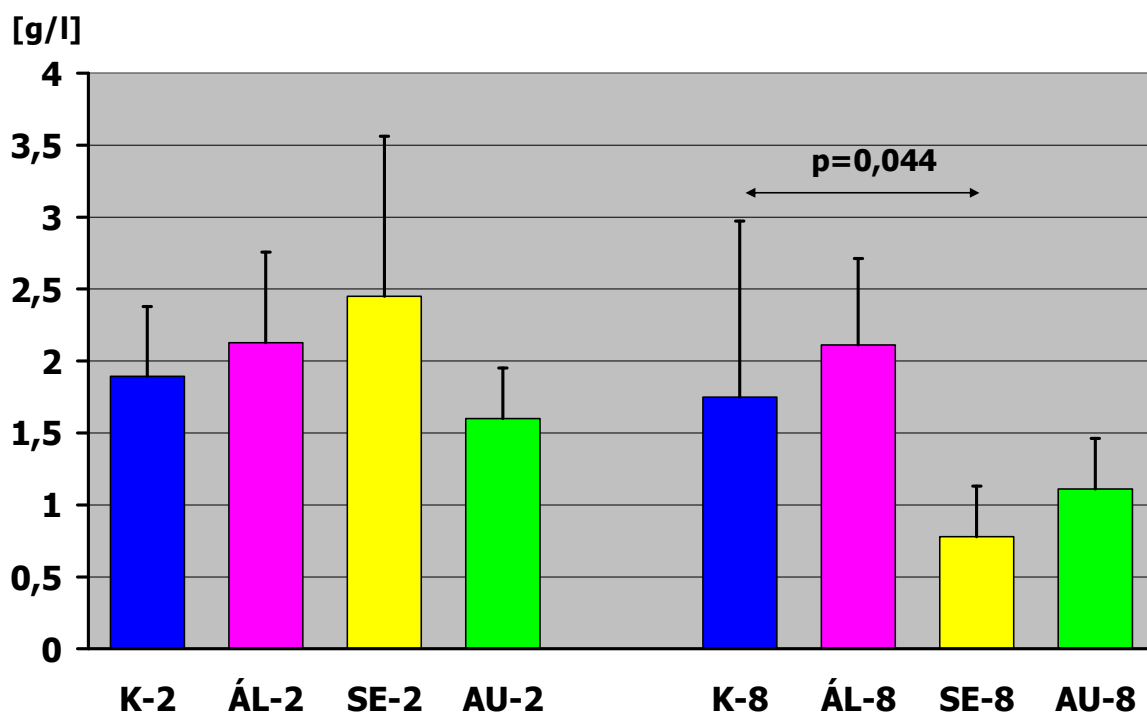
K-2: $39,08 \pm 1,327$ fl vs. SE-2: $41,00 \pm 0,6$ fl, $p=0,028$

(K-2: ép kontroll - 2 hó; ÁI-2: áloperált kontroll - 2 hó; SE-2: splenectomia - 2hó; AU-2: autotransplantatio - 2 hó;
K-8: ép kontroll - 8 hó; ÁL-8: áloperált kontroll - 8 hó; SE-8: splenectomia - 8hó; AU-8: autotransplantatio - 8 hó)

5.2.1.2. A perifériás vér össz-lymphocyta számának változásai

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

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



7. ábra.

A lymphocyták számának változásai a 2. és a 8. postoperatív hónapban

K-8: $1,75 \pm 1,222$ G/l vs. SE-8: $0,78 \pm 0,35$ G/l, $p= 0,044$

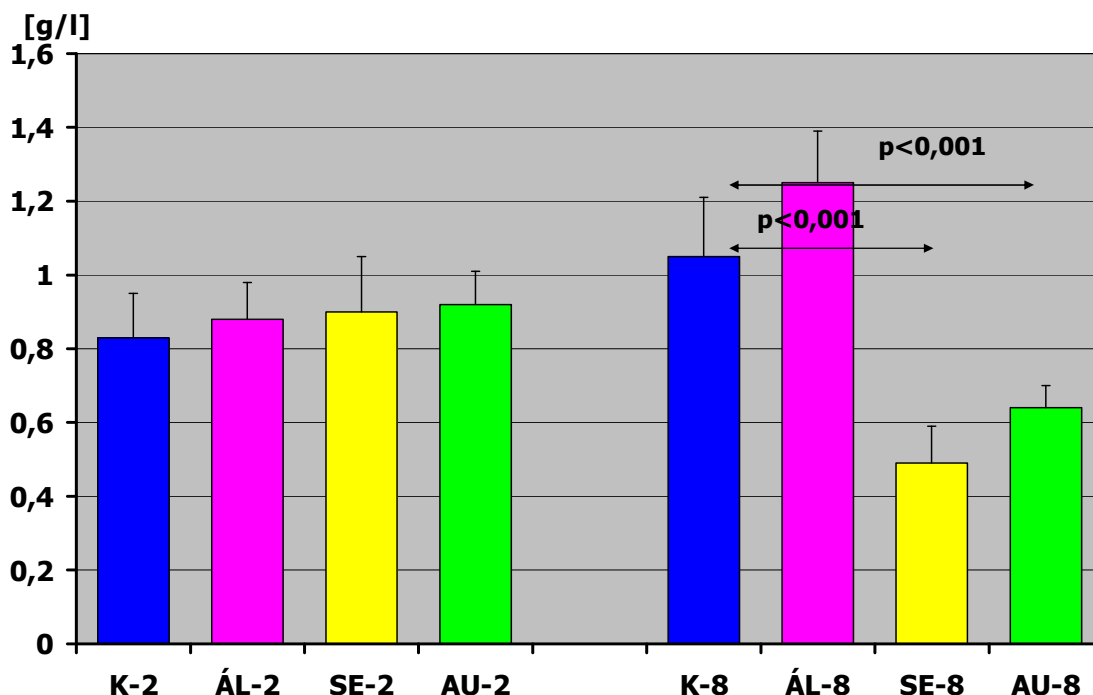
(K-2: ép kontroll - 2 hó; ÁL-2: áloperált kontroll - 2 hó; SE-2: splenectomia - 2hó; AU-2: autotransplantatio - 2 hó;
K-8: ép kontroll - 8 hó; ÁL-8: áloperált kontroll - 8 hó; SE-8: splenectomia - 8hó; AU-8: autotransplantatio - 8 hó)

5.2.2. A lymphocyták alosztályok vizsgálatának eredményei

5.2.2.1. A peripheriás vér CD3+ T-lymphocyták számának változásai

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

A 8. *postoperatív hónapban* viszont mind a splenectomizált (SE-8), mind az autotransplantált (AU-8) csoportban szignifikánsan csökkent a CD3+ T-lymphocyták száma az azonos korú kontrollhoz képest, bár az autotransplantáltaknak kb. 20% százalékkal magasabb volt a CD3+ T-lymphocyták száma, mint a nyolchónapos splenectomizáltaknak. Ez a tendencia hasonló ahhoz, mint amit az össz-lymphocyták számra kaptunk (K-8: $1,05 \pm 0,16$ G/l vs. SE-8: $0,49 \pm 0,10$ G/l, $p < 0,001$; vs. AU-8: $0,64 \pm 0,06$ G/l, $p < 0,001$) (9.ábra).



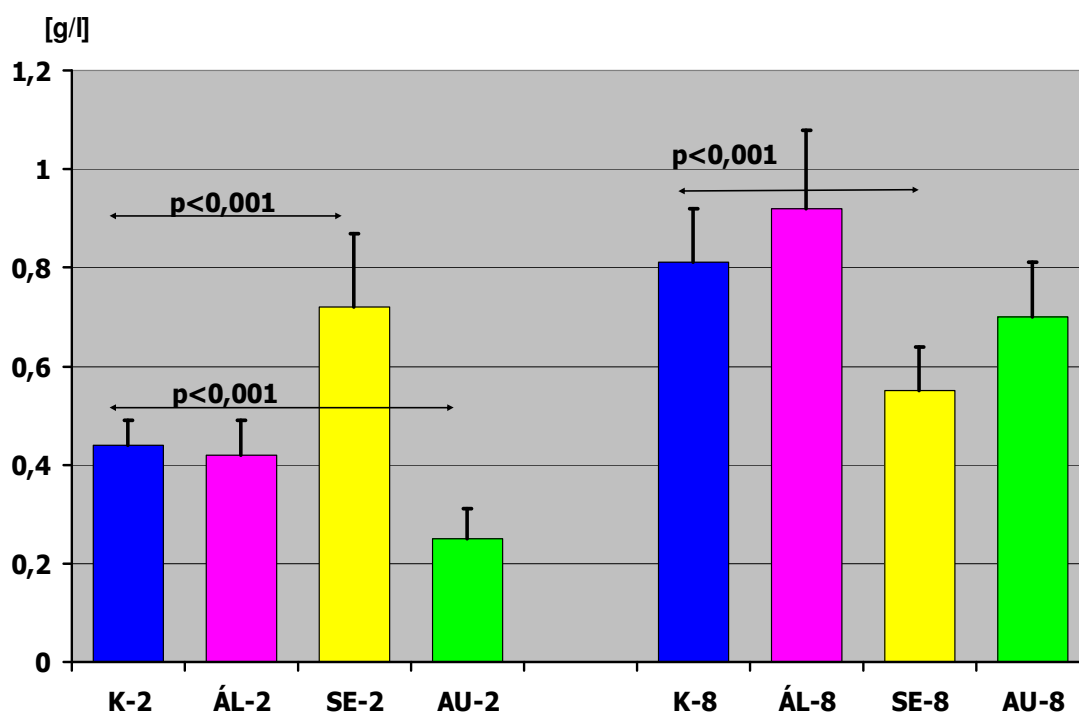
8. ábra.

A CD3+ T-lymphocyták számának változásai a 2. és a 8. postoperatív hónapban
K-8: $1,05 \pm 0,16$ G/l vs. SE-8: $0,49 \pm 0,10$ G/l, $p < 0,001$; vs. AU-8: $0,64 \pm 0,06$ G/l, $p < 0,001$
(K-2: ép kontroll - 2 hó; ÁL-2: áloperált kontroll - 2 hó; SE-2: splenectomia - 2hó; AU-2: autotransplantatio - 2 hó;
K-8: ép kontroll - 8 hó; ÁL-8: áloperált kontroll - 8 hó; SE-8: splenectomia - 8hó; AU-8: autotransplantatio - 8 hó)

5.2.2.2. A peripheriás vér CD19+ B -lymphocyták számának változásai

A 2. *postoperatív hónapban* a splenectomizált állatokban (SE-2) szignifikánsan emelkedett, az autotransplantáltakban (AU-2) viszont lecsökkent a CD19+ B -sejt szám található a hasonló korú ép kontrollokhöz (K-2) képest (K-2: $0,44 \pm 0,05$ G/l vs. SE-2: $0,72 \pm 0,15$ G/l, $p < 0,001$; vs. AU-2: $0,25 \pm 0,06$ G/l, $p < 0,001$).

A 8. *postoperatív hónapban* viszont csak a splenectomizált csoportban (SE-8) csökkent szignifikánsan a CD19+ B -lymphocyták száma az azonos korú ép kontrollhoz (K-8) viszonyítva. Az autotransplantáltaknak itt mintegy 20% százalékkal magasabb volt a CD19+ B -lymphocyták száma, mint a splenectomizált állatoknál, viszont így itt már az ép kontrollhoz képest kevésbé csökkent értéket kaptunk. Ez a tendencia is hasonló ahhoz, mint amit az össz-lymphocytá-, valamint a CD3+ T -sejtszámra kaptunk (K-8: $0,81 \pm 0,11$ G/l vs. SE-8: $0,55 \pm 0,09$ G/l, $p < 0,001$) (10.ábra).



9. ábra.

A CD 19+ B -lymphocyták számának változásai a 2. és a 8. postoperatív hónapban

K-2: $0,44 \pm 0,05$ G/l vs. SE-2: $0,72 \pm 0,15$ G/l, $p < 0,001$; vs. AU-2: $0,25 \pm 0,06$ G/l, $p < 0,001$

K-8: $0,81 \pm 0,11$ G/l vs. SE-8: $0,55 \pm 0,09$ G/l, $p < 0,001$

(K-2: ép kontroll - 2 hó; ÁL-2: áloperált kontroll - 2 hó; SE-2: splenectomia - 2hó; AU-2: autotransplantatio - 2 hó;
K-8: ép kontroll - 8 hó; ÁL-8: áloperált kontroll - 8 hó; SE-8: splenectomia - 8hó; AU-8: autotransplantatio - 8 hó)

5.2.3. A serologiai vizsgálatok eredményei

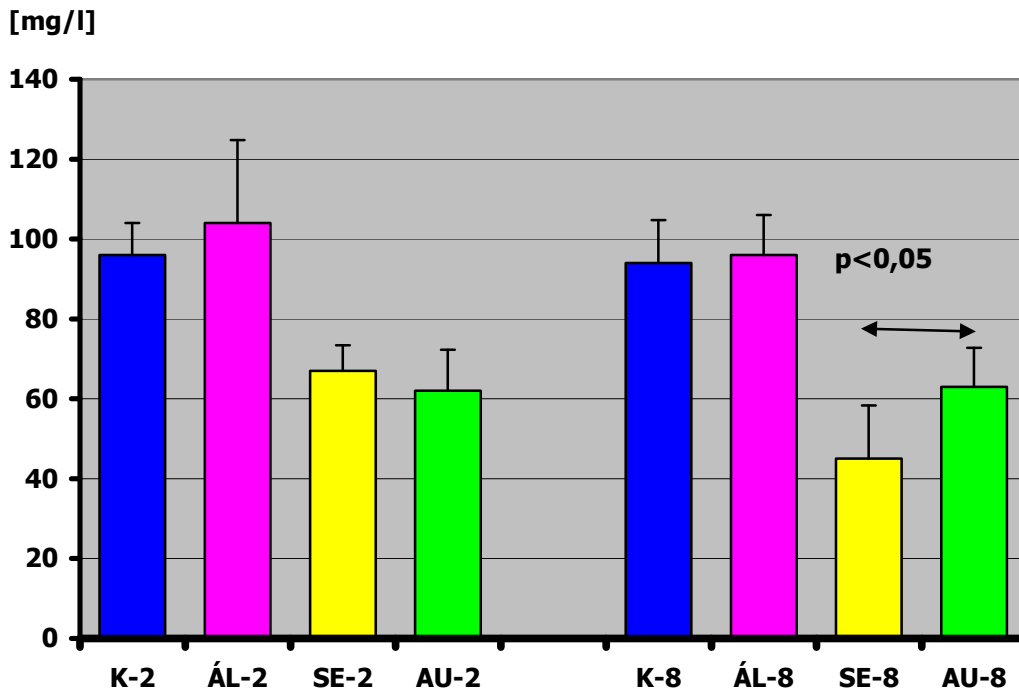
5.2.3.1. A szérum immunglobulin M szintjének változásai

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

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

Ezzel szemben az autotransplantált egerekben (AU-8) a korábbi, a 2. *postoperatív hónapban* mért értéken maradt az IgM szintje, ami azonban már szignifikánsan magasabb, mint a splenectomizált állatokban (SE-8) mérhető ellenanyagszint (SE-8: $45 \pm 13,3$ mg/l vs. AU-8: $63 \pm 9,8$ mg/l, $p < 0,05$) (11. ábra).

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



10. ábra.

A IgM szintek változásai a 2. és a 8. postoperatív hónapban

SE-8: $45 \pm 13,3$ mg/l vs. AU-8: $63 \pm 9,8$ mg/l, $p < 0,05$

(K-2: ép kontroll - 2 hó; ÁL-2: áloperált kontroll - 2 hó; SE-2: splenectomia - 2hó; AU-2: autotransplantatio - 2 hó;
K-8: ép kontroll - 8 hó; ÁL-8: áloperált kontroll - 8 hó; SE-8: splenectomia - 8hó; AU-8: autotransplantatio - 8 hó)

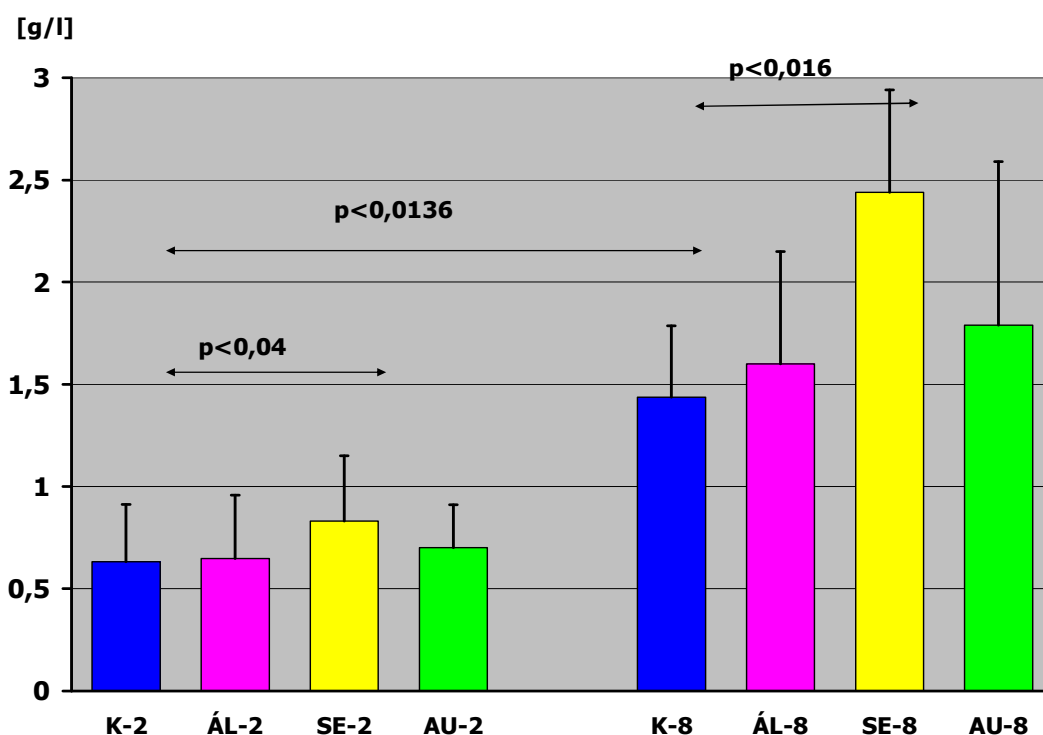
5.2.4. A phagocytá aktivitás mérés eredményei

5.2.4.1. A peripheriás vér granulocytá számának változásai

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

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

A 8. *postoperatív hónapban* a splenectomizált állatoknál (SE-8) tovább emelkedett a neutrophil granulocyták száma az azonos korú ép kontrollokhoz képest (K-8: $1,337 \pm 0,35$ G/l vs. SE-8: $2,44 \pm 0,5$ G/l; $p=0,016$). Ez az emelkedés kisebb mértékű volt az autotransplantált csoportban (AU-8) (12. ábra).



11. ábra.

A neutrophil granulocyták számának változásai a 2. és a 8. postoperatív hónapban

K-2: $0,633 \pm 0,35$ G/l vs. SE-2: $0,831 \pm 0,41$ G/l; $p=0,04$

K-2: $0,633 \pm 0,35$ G/l vs. K-8: $1,337 \pm 0,35$ G/l; $p=0,0136$

K-8: $1,337 \pm 0,35$ G/l vs. SE-8: $2,44 \pm 0,5$ G/l; $p=0,016$

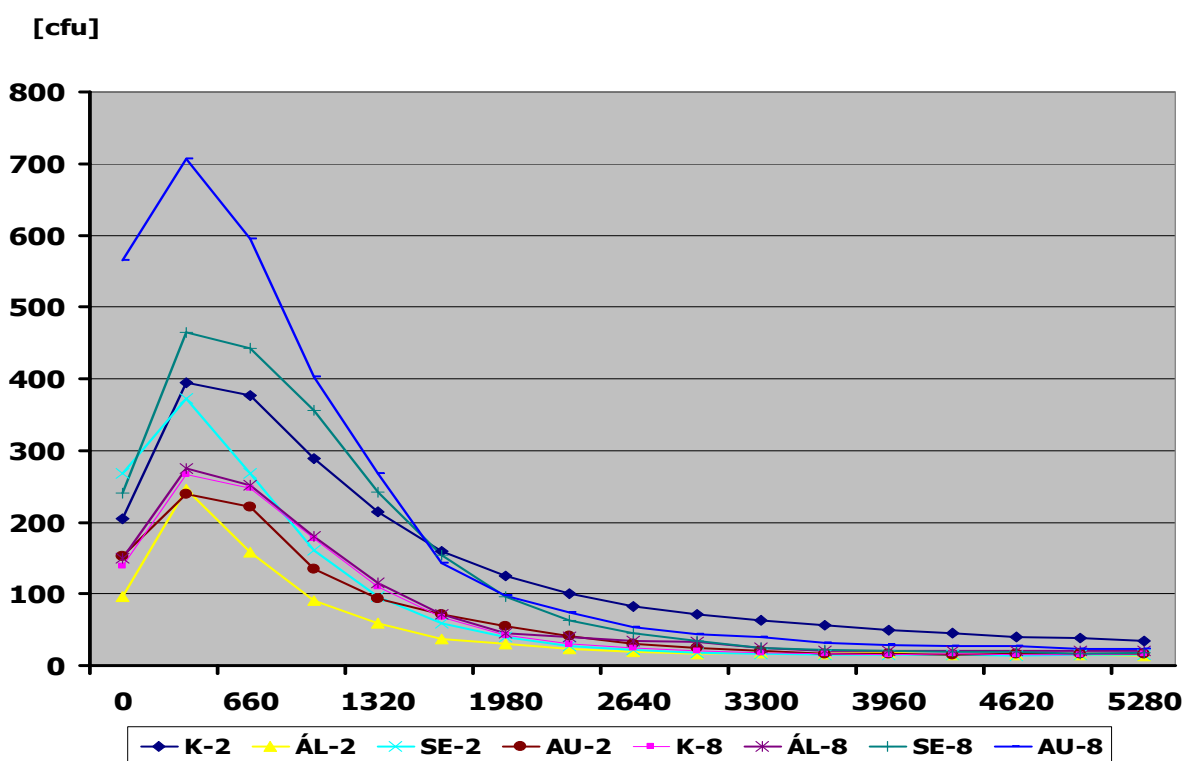
(K-2: ép kontroll - 2 hó; ÁL-2: áloperált kontroll - 2 hó; SE-2: splenectomia - 2 hó; AU-2: autotransplantatio - 2 hó;

K-8: ép kontroll - 8 hó; ÁL-8: áloperált kontroll - 8 hó; SE-8: splenectomia - 8 hó; AU-8: autotransplantatio - 8 hó)

5.2.4.2. A peripheriás vér phagocytáinak aktivitás változásai

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

Mégis meglepetésünkre ezt az egyébként valóban erős aktivitást is túlszárnyalta a nyolc hónapos autotransplantáltakban talált phagocytaműködés (szabadgyök-képzés, kemilumineszcencia). Ez a megfigyelés a kisebb neutrophil számú rendszernek a jobb és hatékonyabb phagocytaműködését mutatta. (13. ábra).



12. ábra.

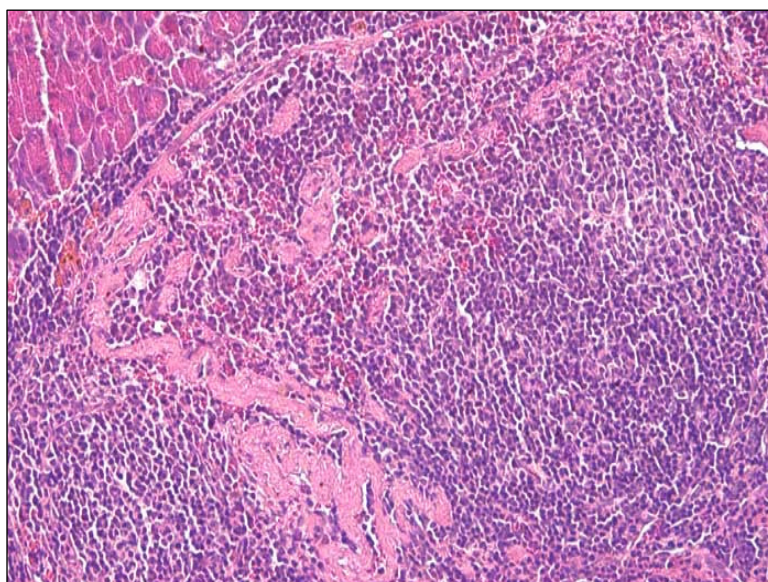
A peripheriás vér phagocytaműködésének zymozánstimuláció hatására a 2. és a 8. postoperatív hónapban

(K-2: ép kontroll - 2 hó; AL-2: áloperált kontroll - 2 hó; SE-2: splenectomia - 2 hó; AU-2: autotransplantatio - 2 hó; K-8: ép kontroll - 8 hó; AL-8: áloperált kontroll - 8 hó; SE-8: splenectomia - 8 hó; AU-8: autotransplantatio - 8 hó)

5.3. A mikroszkópos vizsgálatok eredményei

5.3.1. Az autotransplantatumok kimutatása haematoxylin-eosin festéssel

A 2. mind a 8. postoperatív hónapban vizsgált autotransplantatumokban a lépszövetet kötőszöveti kapszula határolta, melyből trabeculák hatoltak be a lépszövet mélyére, ahol ezek egy kötőszövetes hálót, vázat alkottak. A trabeculákkal együtt haladtak be és le a segmentális arteriák és venák. A kötőszövetes sővények között intact vörös pulpa és fehér pulpa volt látható. A lépdarabkák körül az egér cseplésében normálisan is jelen lévő szétszórt pancreaszövet szigetek is megtalálhatóak voltak (6. ábra).



13. ábra.

Lép-autotransplantatum szövettani képe a 2. postoperatív hónapban.

(HE festés, N: 100x)

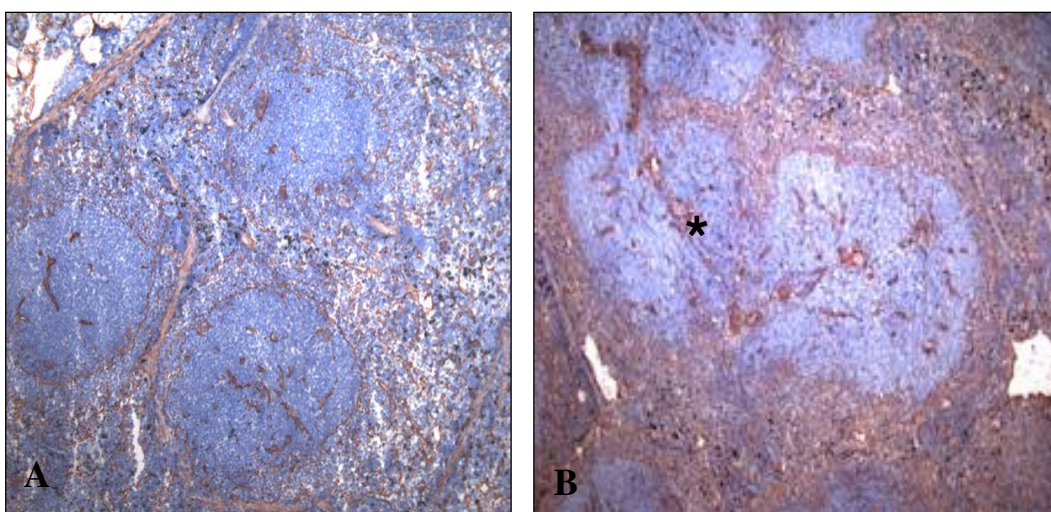
A beültetett lépdarabkákban a normális lépszövet elemei, és főbb struktúrái megtalálhatók. Ez a szövettani szerkezetű lép hosszú távon is életképesek volt, ezt bizonyítják a beültetés utáni 8. postoperatív hónapban végzett szövettani vizsgálatok eredményei is.

5.3.2. Az immunhistologiai vizsgálatok eredményei

5.3.2.1. Érendszeri változások az autotransplantált lépdarabkákban

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

Az IBL-7/22-es antitesttel, -egy pán-endothel és retikuláris fibroblast elleni markerrel festve a metszeteket az autotransplantált állatokban a 2. és 8. *postoperatív hónapban* sem látszik a centrális arteriolának megfelelő képlet az áloperált kontroll állatokból származó léphez viszonyítva. Emellett kevésbé kifejezett a vörös pulpa rajzolata is (14. ábra).



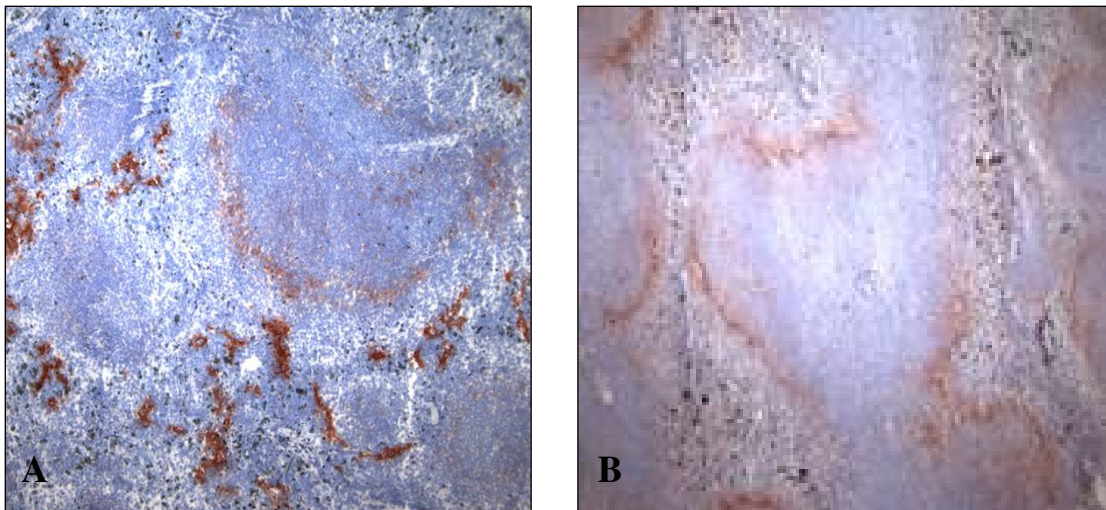
14. ábra.

Az IBL-7/22 pozitív sejtek elhelyezkedése a 8. postoperatív hónapban a lép-autotransplantált és áloperált kontroll lépszövetben

(N:40x, háttérfestés: haematoxylin a centrális arteria *-gal jelölve)

(A: autotransplantatio - 8 hó B: áloperált kontroll - 8 hó)

Az emberi ép lépben a *perifollicularis zónán* keresztül kapcsolódnak össze az arteria terminálisok a venulákkal egy „nyitott” keringésen keresztül. Egerekben ez, illetve az embernél egy ezzel ekvivalens terület, játszik fontos szerepet a B-sejtek „homing”-jában. A *marginalis sinus* endotheljét jelölő MAdCAM-1 antitesttel pozitívan jelölődő sejteket vizsgálva azt találtuk, hogy az áloperált kontroll (ÁL-8) egerekben a *marginalis sinus* gyengébben jelölődik az autotransplantaltakhoz (AU-8) képest. Ezzel szemben az autotransplantált egerekben a vörös pulpában a mesenterialis nyirokcsomó HEV-jeihez (High Endothelial Venules) mérhető intenzitású festődés figyelhető meg, és a MAdCAM-1 expressio csak részleges a fehér pulpa állomány nagyobbik része mentén (15.ábra). Ezek a változások azt mutatják, hogy az autotransplantált állatok túlélő lépszövetében alakulnak ki olyan elváltozások, melyek eltérnek a normális lépszövetétől, és ezek befolyásolhatják a B-sejtek „homing” folyamatait és ellenanyag képző képességüket.



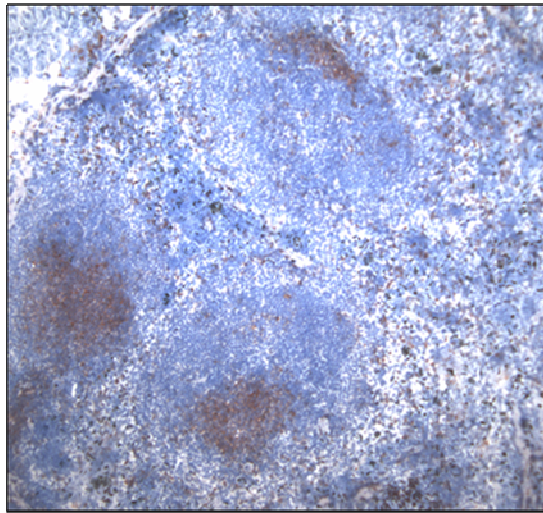
15. ábra.

A MAdCAM-1 pozitív marginalis sinus endothel elhelyezkedése a 8. postoperatív hónapban a lép-autotransplantált és áloperált kontroll lépszövetben (N:40x)

(A: autotransplantatio - 8 hó B: áloperált kontroll - 8 hó)

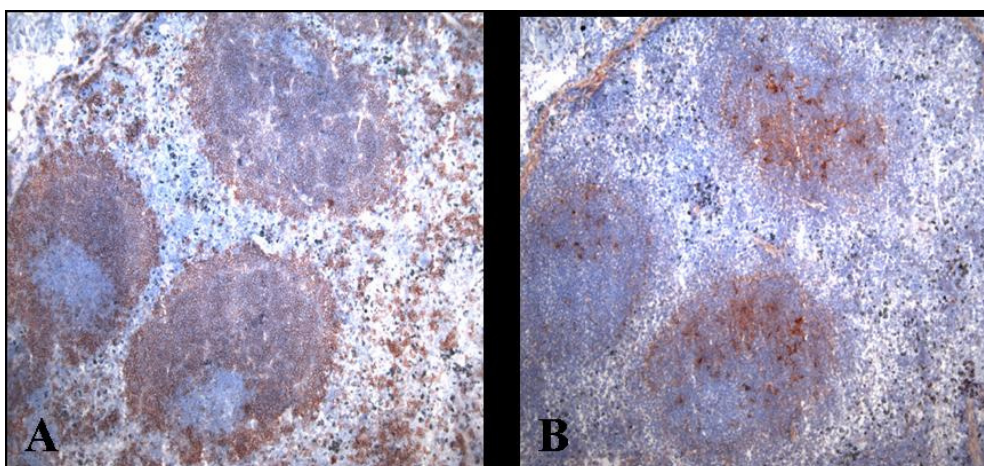
5.3.2.2. A T- és B -sejtek és a follicularis dendritikus sejtek vizsgálatának eredményei

A T- és B-sejteket vizsgálva az autotransplantált állatokban egy enyhe B-sejt dominanciát láttunk az áloperáltakhoz képest nyolc hónappal a beavatkozások után. Ez a B-sejtes terület körülbelül 30%-os növekedését, és a T-sejtes terület körülbelül 50%-os csökkenését jelentette (16. ábra). A B -sejt érésben és aktivációban részt vevő follicularis dendritikus sejtek (FDC) elhelyezkedése egybevágott a B -sejt zónával. (17. ábra)



16. ábra.

A 8. postoperatív hónapban a CD3+ T -sejtek elhelyezkedése a lép-autotransplantatumban (N:100x)



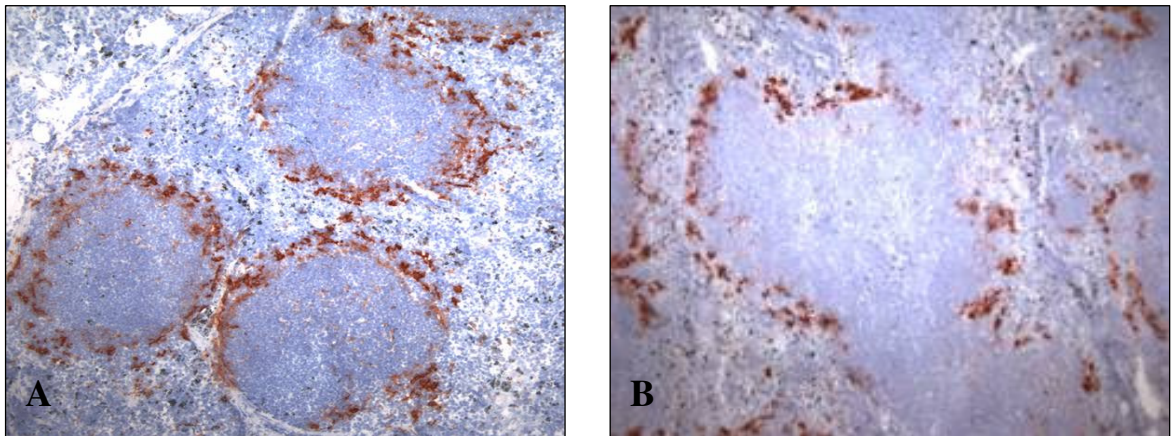
17. ábra.

A 8. postoperatív hónapban a B220+ B -sejtek (A) és az M1+ follicularis dendritikus sejtek (B) elhelyezkedése a lép-autotransplantatumban (N:100x)

5.3.2.3. A macrophagok vizsgálata az autotransplantált lépdarabkákban

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

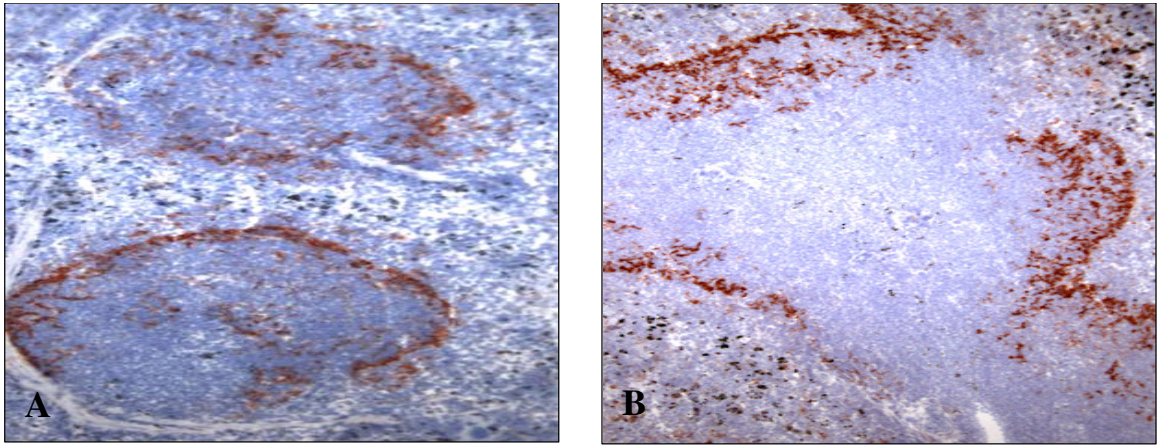
A két vizsgált alcsoport közül az egyik az IBL-12-Anti-MARCO (MAcrophage Receptor with COllagenous structure) antitesttel festődő macrophag populáció (18. ábra), míg az IBL-13 ellenanyaggal detektált szialoadhezín (Sn-CD169) hordozó metallofil makrofág alcsoport volt (19. ábra). A MZ területében mindkét alcsoport megtartott megoszlást mutatott. Emellett a Sn-pozitív alcsoport esetében jelentékeny mértékű follikuláris reaktivitás is szembevetendő volt, mely T-dependens antigénekkal való immunizálást követő csíracentrumképződés során jelentkezik, feltehetőleg a hasüregi beavatkozás következtében.



18. ábra.

A 8. postoperatív hónapban az IBL-12-Anti-MARCO pozitív macrophagok elhelyezkedése a lép-autotransplantatumban (N:100x)

(A: autotransplantatio - 8 hó B: áloperált kontroll - 8 hó)



19. ábra.

A 8. postoperatív hónapban az IBL-13:Anti-metallophil macrophag antitest pozitív macrophagok elhelyezkedése a lép-autotransplantatumban (N:100x)

(A: autotransplantatio - 8 hó B: áloperált kontroll - 8 hó)

6. MEGBESZÉLÉS

A lépmegettartó sebészi beavatkozásoknak széleskörű irodalma van. A téma jelentőségét az adja, hogy megnőtt azoknak a traumáknak a száma, melyekben lépeltávolítást igénylő sérülés jön létre. Ez az állapot, különösen, ha kora gyermekkorban alakul ki a még fejletlen immunrendszer miatt-, ha idősebb korban jön létre, az egész immunrendszerben mind a természetes, mind az adaptív immunválasz hatékonyságának csökkenése miatt veszélyes szövődmény lehetőségeket hordozhat magában. Ennek az állapotnak a klinikai szempontból legsúlyosabb, legveszélyesebb formája az „Overwhelming postsplenectomy Infection” syndrome (OPSI-syndroma) lehet. Bár nem túl gyakori szövődmény, de ha létrejön, nagy mortalitású, különösen a tokos baktériumokkal történő fertőzések esetén. Ezért nagy jelentőségű az a pár éve Magyarországon is érvényes szakmai irányelv és gyakorlat, hogy lépeltávolítás után kötelező elindítani a mesterséges aktív immunizálást a pneumococcus vaccinnal, és megfelelő antibiotikus védelem is szükséges.

A sebészek és traumatológusok számos lépmegettartó lehetőséget és műtéti típust dolgoztak ki az elmúlt évek során abból a célból, hogy minél több működőképes lépszövetet lehessen megmenteni a szervezet számára. Az ugyanis egyértelműen igazolást nyert, hogy az eredeti lép tömegének, kb. 10-40% az, ami ideális esetben, képes megőrizni a lép funkcióit egy szövetroncsoló trauma után. A nagy szakmai kihívást a kutató sebészek számára az jelentette és jelenti, hogy milyen sebészi technikával lehet biztonságosan elérni a legnagyobb mennyiségű működőképes lépszövet megmentését.

A Furka és munkatársai által 1989-ben kidolgozott „lépkötény” lép-autotransplantációs technika két szempontból hozott újdonságot. Egyrészt a lépdarabkák nagycsepleszbe történő beültetése jobb túlélési eredményeket mutatott a csepleszbe történő revascularisatio révén,

másrészt ez a technika csökkentette az adhéziós szövődmények lehetőségét a hasüregben [Furka és mtsai, 1989.].

Ennek az eredetileg kutyákra kidolgozott módszernek a beltenyészített egerekre történő adaptálása Mikó és munkatársai révén valósult meg, akik, HE festett szövettani vizsgálatokkal is bizonyították a lépdarabkák megtapadását és regenerálódását a 6. postoperatív hétre [Mikó és mtsai, 2001.]. Debrecenben a traumatológusok részéről a módszer leírását követően nagy érdeklődés mutatkozott arra, hogy a klinikai gyakorlatban is alkalmazzák ezt a technikát [Szendrői és mtsai, 1993, 1999]. Így Debrecenben a lép-autotransplantatio vonatkozásában két fontos előretörés történt. Egyrészt traumás lépsérülést követően jelentős számú betegnél történt lép-autotransplantatio, illetve a beltenyészített egereken megvalósult kísérleti modell [Mikó és mtsai, 2001] alapján létrejött a lehetősége a lép-autotransplantatio immunrendszerre kifejtett hatásainak komplex és összehasonlító vizsgálatának.

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

A szövettani vizsgálatoknak a jelentős kibővülését jelentette, hogy immunhistológiai vizsgálatokkal -egy kollaborációs munka keretében- speciális monoklonális ellenanyag birtokában adatokat tudtunk szolgáltatni a beültetett lép finomabb szerkezetéről is. Jelentősnek tartható az az új megfigyelés, hogy a csepleszbe ültetett lépdarabkákban -bár azok életképesek, állományuk tömege növekszik- nincs centrális arteria. Ez arra utal, hogy a csepleszbe ültetés hatására megváltozik a beültetett lépdarabkákban a vérkeringés iránya és

jellege. Valószínűleg ennek a következménye az, hogy az eredeti lépszövethez képest megváltozik a folliculusok, a fehér és vöröspulpa, illetve a macrophagok elrendeződése. Ezekből kiemelhető, hogy a T -sejtek száma mind a lépben, mind a peripherián jelentősen lecsökken, míg a B -sejtek esetében a peripherián tapasztalható B -sejt csökkenéshez képest a folliculusokban B -sejtszám növekedés történik a kontrollhoz képest.

A megváltozott membrán flexibilitású vörösvérsejtek felnőttkorban fiziológiásan a lépben filtrálódnak ki a keringésből. A lép eltávolítása után ez a funkció is elvész, így a keringésben megnő a nagyobb méretű vörösvérsejtek száma és aránya. A peripheriás vér haematologiai paramétereinek vizsgálatában reprodukálni tudtuk azt a korábbi, lép eltávolítás utáni változást, hogy megnő a nagyobb átmérőjű, és a lép szűrő funkciójának elmaradása miatt a keringésben megmaradt vörösvérsejtek aránya. Ez a jelenség a műtétet követő 2. és 8. postoperatív hónapban is megfigyelhető volt az autotransplantált csoportban, de csak a 2. postoperatív hónapban volt szignifikáns. Ehhez azt a kiegészítést kell tenni, hogy az autotransplantatiót követő 8. hónapban a 2. hónaposokhoz képest általában megnőtt a vörösvérsejt átmérő és térfogat. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogyha bár nem szignifikáns mértékben is, de az autotransplantált állatcsoportokban a műtétet követően mind két mind nyolc hónap után a keringésben levő „nagy átmérőjű” vörösvérsejtek száma kisebb volt, mint a splenectomizált csoportokban. Ez a beültetett lépdarabkák bizonyos szűrő funkciójának meglétére utal.

A lymphopenia ténye a peripherián mind a splenectomizált, mind az autotransplantált állatcsoportokban érvényes a műtétet követő 8. hónapban. Ez a tendencia teljesen érvényes a CD3+ T -sejtekre. A CD19+ B -sejtek esetében viszont a 2. postoperatív hónap után a splenectomizált csoportban lényegesen magasabb a peripheriás sejtszám, mint az ép kontrollban vagy az autotransplantált csoportban. Az autotransplantáltakban mérhető csökkenést azzal magyarázzuk, hogy ebben az időszakban a lépfolliculusok begyűjtik a

peripheriáról a csontvelő felől érkező B-sejtek egy részét. Meg kell említeni azonban, hogy a 8. postoperatív hónapra az autotransplantált állatok vérében -ha nem is szignifikáns módon- emelkedettebb B -sejt számértéket találtunk, mint a splenectomizált állatokban. Ez a tendencia érvényes volt a T -sejtekre-, és a teljes lymphocyta számra egyaránt. Ez azt mutatja, hogy a beültetett lépdarabkák nyolc hónap után már a T - és B -sejt képzés szempontjából is a normálhoz jobban közelítő állapotot hoztak létre, mint, ami a lépeltávolítást követően.

Az OPSI-szindróma szempontjából kiemelt fontosságú a tokos baktériumokat opsonizáló szérum IgM szintje. Vizsgálataink egyik legnagyobb értékének azt tartjuk, hogy az autotransplantált állatcsoport szérumában a splenectomizált állatok értékeihez képest szignifikánsan magasabb szérum IgM értékeket találtunk. Ez arra utal, hogy ezek az állatok egy bakteriális fertőzéssel szemben valószínűleg hatékonyabb védő ellenanyagképzést mutathatnak, mint léphiányos társaik. Meg kell jegyezni azonban azt is, hogy ennek a szignifikáns laboreltérésnek a kimutatásához sokban segített az is, hogy a lézer nephelometer segítségével kisebb szórású, finomabb eltéréseket tudtunk mérni, mint például a sejtfloreszimetriával, aminél ugyan például megtaláltuk, a „szemmel látható” T - és B -sejtszám emelkedést az autotransplantált állatokban, de ezek az eltérések a nagy szórás miatt nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak.

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

Meglepetést jelentett ugyanakkor, hogy a zymozánnal aktivált és luminollal felerősített kemiluminescencia az autotransplantált csoportban magasabb volt, mint a splenectomizált

állatokban. Ezt azzal magyarázzuk, hogy az autotransplantált csoportban meglévő magasabb IgM szintek a zymozán részecskék jobb opszonizációját eredményezhették, miáltal azok internalizálódása, phagocytalódása jobb hatásfokú lett, mint a splenectomizált állatok vérében. Meg kell jegyezni, hogy ebben a jelenségben kb. 90%-át kitevő neutrophil granulocyták aktivitása nyilvánul meg. Ez a megfigyelés a kisebb neutrophil számú rendszernek a fokozottabb phagocytá működését mutatja.

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

7. ÚJ EREDMÉNYEK

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

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

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Napjaink motorizált világában a traumás balesetek és az ezzel összefüggő műtétek száma sajnos folyamatosan emelkedik. A korábbi gyakorlatot a traumásan sérült lép eltávolítását javasolta, de a lép sokrétű funkcióinak megismerése a szemléletmód változását eredményezte. A súlyosan sérült lép szövetének megmentésére dolgozták ki Furka és munkatársai az autotransplantatio lépkötény technikáját, aminél a lép kis szeleteit ültetik vissza a cseplez rétegei közé. Ezt a módszert Mikó és munkatársai 2001-ben sikeresen adaptálták egérre. Munkánkban beltenyésztett egereken néztük a lép-autotransplantatio haematologiai és immunologiai hatásait, és a következőket találtuk:

- 1) Az autotransplantált lépdarabkák beültetett tömegük arányában javítják a peripheriás vérben a vörösvérsejtek kiszűrését, a T- és B- lymphocyták számát és eloszlását, a neutrophil granulocyták phagocytalo képességét, továbbá az antibakteriális védekezésben fontos szerepet játszó IgM termelést.
- 2) A nagy cseplezbe ültetett lépdarabkának megváltoznak a keringési viszonyai, az arteria centrális eltűnik, eredeti lépszövethez képest megváltozik a folliculusok, a fehér és vöröspulpa, illetve a macrophagok elrendeződése. A változások közül kiemelhető, hogy a T-sejtek száma mind a lépben, mind a peripherián jelentősen lecsökken, míg a B-sejtek esetében a peripherián tapasztalható B-sejt csökkenéshez képest a folliculusokban B-sejtszám növekedés történik a kontrollhoz képest.

9. SUMMARY

In the motorized world of nowadays the number of accidents and the operations of the traumatic patients are constantly increasing. The previous practice used to cut the damaged spleen out, but through the recognition of the various functions of the spleen, the viewpoint of the surgeons changed. For saving the tissue of the severely damaged spleen had Furka and his coworkers developed the spleen apron method of autotransplantation, in which they replant small slices of the spleen into the two layers of the greater omentum. This method was also adapted for mice by Mikó and her coworkers in 2001. In our current work we monitored the hematological and immunological changes after the spleen-autotransplantation in inbred mice, and we found the followings:

- 1) The autotransplanted spleen chips are taking positive effect in the ratio of the replanted size compared to their original amount of the spleen on the filtration of the erythrocytes, the ratio and the number of the T- and B- lymphocytes the phagocytic activity of the neutrophil granulocytes, and the level of IgM, playing a crucial role in the antibacterial defense.
- 2) The circulation of the spleen chip replanted into the greater omentum alters. The central artery disappears, the arrangement of the follicles, the red -, the white pulp and the macrophages change. From the alterations the following changes can be stressed: first, the decrease in the number of T- lymphocytes both in the spleen and in the periphery, second, the number of B-lymphocytes decreases in the periphery but increases in the follicles.

10. IRODALOMJEGYZÉK

10.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Amlot P.L., Hayes A.E. (1985) Impaired human antibody response to the thymus-independent antigen, DNP-Ficoll, after splenectomy. Implications for post splenectomy infections. *Lancet* 1(8436):1008-1011.
2. Balázs M., Grama L., Balogh P. (1999) Detection of phenotypic heterogeneity within the murine splenic vasculature using rat monoclonal antibodies IBL-7/1 and IBL-7/22. *Hybridoma* 18:177-182.
3. Balazs M., Horvath G., Grama L., Balogh P. (2001) Phenotypic identification and development of distinct microvascular compartments in the postnatal mouse spleen. *Cell Immunol.* 212(2):126-137.
4. Balique J.G., Porcheron J., Gayet B., Luxembourger O., Bourbon M., Breton C., Blanc P. (1999) Laparoscopic splenorrhaphy using a resorbable prosthesis in splenic injuries. Apropos of 5 cases. *Chirurgie* 124(2):154-158.
5. Balogh P., Aydar Y., Tew J.G., Szakal A.K. (2001) Ontogeny of the follicular dendritic cell phenotype and function in the postnatal murine spleen. *Cell Immunol.* 214:45–53.
6. Balogh P., Aydar Y., Tew J.G., Szakal A.K. (2002) Appearance and phenotype of murine follicular dendritic cells expressing VCAM-1. *Anat. Rec.* 268:160–168.
7. Balogh P., Horváth G., Szakál AK (2004) Immunoarchitecture of Distinct Reticular Fibroblastic Domains in the White Pulp of Mouse Spleen. *J. Histochem. Cytochem.* 52(10): 1287–1298.
8. Balogh P., Petz A. (2005) Szelektíve binding of biotinilated albumin to the lymphoid microvasculature. *Histochem. Cell Biol.* 123(4-5):357-363.
9. Balogh P., Balazs M., Czompoly T., Weih D.S., Arnold H.H., Weih F. (2007) Distinct roles of lymphotoxin-beta signaling and the homeodomain transcription factor Nkx2.3 in the ontogeny of endothelial compartments in spleen. *Cell Tissue Res.* 328(3):473-486.
10. Barone J.E., Burns G., Svehlak S.A. (1999) Management of blunt splenic trauma in patients older than 55 years. *J. Trauma* 46:87-90.
11. Bernard N.F., Chernoff D.N., Tsoukas C.M. (1998) Effect of splenectomy on T-cell subsets and plasma HIV viral titers in HIV-infected patients. *J. Hum. Virol.* 1(5):338-345.
12. Biertho L., Gagner M., Waage A., Kim W.W., Jacob B., Faife-Faife B., Sokhar N., Del Genio G. (2004) Laparoscopic hand-assisted spleen autotransplantation. *Surg. Endosc.* 18:1335-1339.

13. Brendolan A., Rosado M.M., Carsetti R., Selleri L., Dear T.N. (2007) Development and function of the mammalian spleen. *Bioessays* 29(2):166-177.
14. Buchino J.J., Buchino J.J. (1998) Thoracic splenosis. *South Med. J.* 91:1054-1056.
15. Burrington J.D. (1977) Surgical repair of a ruptured spleen in children: report of eight cases. *Arch. Surg.* 112:417-419.
16. Buntain W.L., Lynn H.B. (1979) Splenorrhaphy: changing concepts for the traumatized spleen. *Surgery* 86(5):748-760.
17. Cesta M.F. (2006) Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol. Pathol.* 34(5):455-465.
18. Cocanour C.S., Moore F.A., Ware O.N. (2000) Age should not be a determinant for nonoperative management of blunt splenic injuries. *J. Trauma* 48:606-612.
19. Corazza G.R., Tarozzi C., Vaira D., Frisoni M., Gasbarrini G. (1984) Return of splenic functions after splenectomy: how much tissue is needed? *BMJ* 289:861-864.
20. Dawson D.L., Molina M.E., Scott-Conner C.E.H. (1986) Venous segmentation of the human spleen. A corrosion cast study. *Am. Surg.* 52(5):253-256.
21. Delany H.M., Porreca F., Mitsudo S., Solanki B., Rudavsky A. (1982) Splenic capping: an experimental study of a new technique for splenorrhaphy using woven polyglycolic acid mesh. *Ann. Surg.* 196(2):187-193.
22. Delany HM, Rudavsky AZ, Lan S. (1985) Preliminary clinical experience with the use of absorbable mesh splenorrhaphy. *J. Trauma* 25(9):909-913.
23. Douglas G.J., Simpson J.S. (1971) The conservative management of splenic trauma. *J. Pediatr. Surg.* 6(5):565-570.
24. Dwyer N.T., Whelan T.F. (2005) Renal splenosis presenting as a renal mass. *Can. J. Urol.* 12:2710-2712.
25. Elmore SA. (2006) Enhanced histopathology of the spleen. *Toxicol. Pathol.* 34(5):648-655.
26. Feliciano D.V., Spjut-Patrinely V., Burch J.M., Mattox K.L., Bitondo C.G., Cruse-Martocci P., Jordan G.L. Jr. (1990) Splenorrhaphy. The alternative. *Ann. Surg.* 211(5):569-580.
27. Flautner L., Sárváry A. (2000) *A sebészeti és traumatológiai tankönyve.* Semmelweis Kiadó, Budapest
28. Furka I., Mikó I., Tarsoly E. (1989) Heterotopic autotransplantation of the spleen in animal experiments. *Khirurgija (Mosk).* 9:125-127.
29. Gaál Cs. (2002): *Sebészeti, Medicina Kiadó, Budapest, pp. 788-793.*

30. Godley C.D., Warren R.L., Sheridan F.L. (1996) Nonoperative management of blunt splenic injury in adults: age over 55 years as a powerful predictor of failure. *J. Am. Coll. Surg.* 183:133-139.
31. Gupta C.D., Gupta S.C., Arora A.K., Singh P.J. (1976) Vascular segments in the human spleen. *J. Anat.* 121(3):613-616.
32. Gray H. (1854) *On the Structure and Use of the Spleen.* John W. Parker, London, pp. 1-53. cit in: McClusky D.A. 3rd, Skandalakis L.J., Colborn G.L., Skandalakis J.E. (1999) Tribute to a triad: history of splenic anatomy, physiology, and surgery-part 1. *World J. Surg.* 23(3):311-325.
33. Grayson M.H., Hotchkiss R.S., Karl I.E., Holtzman M.J., Chaplin D.D. (2003) Intravital microscopy comparing T lymphocyte trafficking to the spleen and the mesenteric lymph node. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284(6):2213-2226.
34. Gruber S., Redner B., Kogut B. (1951) Congenital idiopathic thrombopenic purpura in a premature infant with splenectomy. *New York Med. J.* 51(5):649-650.
35. Guillon F., Borie F., Millat B. (2000) Spleen trauma. *J. Chir.* 137(4):205-213.
36. Haan J.M., Biffl W., Knudson M.M. (2004) Splenic embolisation revised: a multicenter review. *J. Trauma* 56:542-547.
37. Hansen K., Singer D.B. (2000) Asplenic-hyposplenic overwhelming sepsis: postsplenectomy sepsis revisited. *Pediatr. Dev. Pathol.* 4(2):105-121.
38. Habib E., Elhadad A. (2001) Traumatic rupture of an accessory spleen. *Ann. Chir.* 126(1):65-66.
39. Holdsworth R.J., Irving A.D., Cushieri A. (1991). Postsplenectomy sepsis and its morality rate: Actual versus perceived risk. *Br. J. Surg.* 78:1031-1038.
40. Horan M., Colebach J.H. (1962) Relation between splenectomy and subsequent infection: a clinical study. *Arch. Dis. Child.* 37:398-414.
41. Huscher C.G., Mingoli A., Sgarzini G., Brachini G., Ponzano C., Paola M.D., Modini C. (2006) Laparoscopic treatment of blunt splenic injuries: initial experience with 11 patients. *Surg. Endosc.* 20(9):1423-1426.
42. Jiao L.R., Tierris I., Ayav A., Milicevic M., Pellicci R., Navarra G., Habib N.A. (2006) A new technique for spleen preservation with radiofrequency. *Surgery* 140:464-466.
43. Kanyári Zs., Kincses Zs., Orosz L., Juhász B., Tanyi M., Lukács G., Damjanovich L. (2006) A laparoszkópia elterjedése a lépsebészetben haematológiai kórképek esetén. *Magy. Seb.* 59:7-11.

44. Kapasi Z.F., Qin D., Kerr W.G., Kosco-Vilbois M.H., Shultz L.D., Tew J.G., Szakal A.K. (1998) Follicular dendritic cell (FDC) precursors in primary lymphoid tissues. *J Immunol.* 160(3):1078-1084.
45. Karlsson M.C., Guinamard R., Bolland S., Sankala M., Steinman R.M., Ravetch J.V. (2003) Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone. *J. Exp. Med.* 198:333–340.
46. King H., Schumacher H.B. (1952) Splenic Studies. I. Susceptibility to infection after splenectomy performed infants and children. *Ann. Surg.* 136: 239-242.
47. Kocher E.T. (ed) (1911) Textbook of operative surgery. Black, London In: Hiatt J.R., Phillips E.H., Morgenstern L. (eds) (1997) *Surgical Diseases of the Spleen.* Springer-Verlag, Berlin, pp. 233.
48. Kraal G., Schornagel K., Streeter P.R., Holzmann B., Butcher E.C. (1995) Expression of the mucosal vascular addressin, MAdCAM-1, on sinus-lining cells in the spleen. *Am. J. Pathol.* 147(3):763-71.
49. Kraal G. (1992) Cells in the marginal zone of the spleen. *Int. Rev. Cytol.*132:31-74.
50. Krstic R.V. (1984) *Illustrated Encyclopedia of Human Histology.* Springer-Verlag, Berlin, pp. 388-389.
51. Kvell K., Czompolý T., Pikkarainen T., Balogh P. (2006) Species-specific restriction of cell surface expression of mouse MARCO glycoprotein in murine cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24;341(4):1193-1202.
52. Leemans R., Harms G., Rijkers G.T., Timens W. (1999) Spleen autotransplantation provides restoration of functional splenic lymphoid compartments and improves the humoral immune response to pneumococcal polysaccharide vaccine. *Clin. Exp. Immunol.* 117(3):596–604.
53. Littmann I., Berentei Gy. (1988) *Sebészeti műtétan.* Medicina, Budapest, pp. 565-572.
54. Lucas H.A. (2004) IgM memory B cells: origin, mutation, and mobilisation by polysaccharide vaccination. *Blood* 104:3417–3418.
55. Ludtke F.E., Mack S.C., Schuft-Werner P. (1989). Splenic function after splenectomy for trauma. Role of autotransplantation and sepsis. *Acta Chir. Scand.* 155(10):533-539.
56. Macht D.I., Finesilver E.M. (1922) The effect of splenectomy on integration of muscular movements in the rat. *Am. J. Physiol.* 62:525-530.
57. MacLennan I.C., Toellner K.M., Cunningham A.F., Serre K., Sze D.M., Zuniga E., Cook M.C., Vinuesa C.G. (2003) Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* 194:8–18.
58. Martin F., Kearney J.F. (2002) Marginal-zone B cells. *Nature Rev. Immunol.* 2:323–335.

59. McClusky D.A. 3rd, Skandalakis L.J., Colborn G.L., Skandalakis J.E. (1999) Tribute to a triad: history of splenic anatomy, physiology, and surgery-part 1. *World J. Surg.* 23(3):311-325.
60. McClusky D.A. 3rd, Skandalakis L.J., Colborn G.L., Skandalakis J.E. (1999) Tribute to a triad: history of splenic anatomy, physiology, and surgery-part 2. *World J. Surg.* 23(5):514-526.
61. McKinnon W.M., Sanders H.S., Zamora L.F., Marion L. (1973) Splenectomy: indications, results and complication in 406 patients. *Am. Surg.* 39:72-74.
62. Mebius R.E., Kraal G. (2005) Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* 5(8):606-616.
63. Mikó I., Bráth E., Furka I., Kovács J., Kelvin D., Zhong R. (2001) Spleen autotransplantation in mice: a novel experimental model for immunology study. *Microsurgery* 21:140-142.
64. Mikó I., Bráth E., Németh N., F. Tóth F., Sipka S. jr. , Kovács J., Sipka S.,Fachet J., Furka A., Furka I., Zhong R. (2003) Hematological, hemorrhological, immunological and morphological studies of spleen autotransplantation in mice: preliminary results. *Microsurgery* 23:483-488.
65. Mikó I., Németh N., Sipka S. jr., Bráth E., Pető K., Gulyás A., Furka I., Zhong R. (2006) Hemorrhological follow-up after splenectomy and spleen autotransplantation in mice. *Microsurgery* 26:38-42.
66. Mishalany H.G. (1974) Repair of the ruptured spleen. *J. Pediatr. Surg.* 9:175-178.
67. Mitchell J (1973) Lymphocyte circulation in the spleen. Marginal zone bridging channels and their possible role in cell traffic. *Immunology* 24:93-107.
68. Morgenstern, IL., (1997) A history of Splenectomy In: Hiatt, J.R., Phillips, E.H., Morgenstern, L. (eds) (1997) *Surgical Diseases of the Spleen*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 3-4.
69. Morris D.H., Bullock F.D. (1919) The importance of the spleen in resistance to infection. *Ann. Surg.* 70:513-521.
70. Moynihan B. (1921) *The Spleen and Some of its Diseases*. Philadelphia,W.B. Saunders, pp. 4-33.
71. Mozes M.F., Spigos D.G., Pollak R. (1984) Partial splenic embolization, an alternative to splenectomy. Results of prospective randomized study. *Surgery* 96:694-702.
72. Neman R.S. (1997) Pathology of the spleen. In: Hiatt J.R., Phillips E.H., Morgenstern L. (eds) (1997) *Surgical Diseases of the Spleen*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 25-29.
73. Pearson H., Johnston D., Smith K.A., Touloukian R.J. (1978) The born again spleen: return of splenic function after splenectomy for trauma. *N. Engl. J. Med.* 298:1389-1392.

74. Petroianu A., Cabezas-Andrade M.A., Neto R.B. (2006) Laparoscopic splenic autotransplantation. *Surg. Laparosc. Endosc. Percutan Tech.* 16:259-262.
75. Ratner M.H., Garrow E., Valda V., Shashikumar V.L., Somers L.A. (1977) Surgical repair of the injured spleen. *J Pediatr Surg* 12:1019-1025.
76. Rice H.M., James P.D. (1980) Ectopic splenic tissue failed to prevent fatal pneumococcal septicaemia after splenectomy for trauma. *Lancet* 1:565-566.
77. Richardson D.J. (2005) Changes in the management of injuries to the liver and spleen. *J. Am. Coll. Surg.* 200:648-669.
78. Rickert C.H., Maasjosthusmann U., Probst-Cousin S., August C., Gullotta F. (1998) A unique case of cerebral spleen. *Am. J. Surg. Pathol.* 22:894-896.
79. Röhlich P. (2002) Szövettan. Semmelweis Egyetem Képzéskutató, Oktatástechnológia és Dokumentációs Központ, Budapest pp. 223-227.
80. Sarraf K.M., Abdalla M., Al-Omari O., Sarraf M.G. (2006) Diagnostic difficulties of pelvic splenosis: case report. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 27(2):220-221.
81. Sasou S., Satodate R., Masuda T., Takayama K. (1986) Scanning electron microscopic features of spleen in the rat and human: a comparative study. *Scan. Electron. Microsc. Pt.3*:1063-1069.
82. Scalfani S.J.A., Shaftan G.W., Scalea T.M. (1995) Nonoperative salvage of computed tomography-diagnosed splenic injuries: utilization of angiography for triage and embolization for hemostasis. *J. Trauma* 38:818-825.
83. Schmidt E.E., MacDonald I.C., Groom A.C. (1993) Comparative aspects of splenic microcirculatory pathways in mammals: the region bordering the white pulp. *Scanning Microsc.*;7(2):613-628.
84. Sieber G. (1992) Clinical aspects, pathophysiology, therapy and expert evaluation of splenectomy. *Versicherungsmedizin* 44(2):56-60.
85. Sipka S., Ábel Gy., Csongor J., Nyirkos P., Facht J. (1986) Effect of mannozymb on the chemiluminescence of phagocytes. *Acta Microbiol. Hung.* 33(3):263-270.
86. Slater H. (1973) Complications of splenectomy. *Am. Surg.* 39:221-223.
87. Slim M.S., Najjar N.E., Mishalany H.G. (1979) Preservation of the injured spleen. *Br. J. Surg.* 66(9):671-672.
88. Smith C.H., Erlandson M., Schulman I., Stern G. (1957) Hazard of severe infections in splenectomised infants and children. *Am. J. Med.* 22:390-404.
89. Steel M., Lim R.C. (1975) Advances in management of splenic injuries. *Am. J. Surg.* 130:159-165.

90. Steiniger B., Barth P. (2000) Microanatomy and function of the spleen. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 151:1-101.
91. Steiniger B., Barth P., Hellinger A. (2001) The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp : do fibroblasts guide lymphocyte immigration? *Am. J. Pathol.* 159(2):501-512.
92. Streicher H.J. (1986) Anatomically related surgery of the spleen. *Chirurg* 57:177-181.
93. Svébis M., Pap-Szekeres J., Venczel L., Gera L., Rajtár M., Sinkó M., Furka I., Mikó I. (2005) Minimálisan invazív módszerrel végzett, lép-autotransplantált beteg postoperatív követésére alkalmazott képkötő eljárás hockal nyert kezdeti tapasztalataink. *Esetismertetés. Magy. Seb.* 58:80-83.
94. Szentágothai J., Réthelyi M (1996) Funkcionális anatómia. *Medicina Kiadó-Semmelweis Kiadó, Budapest* pp. 768-772.
95. Szendrői T., Hajdú Z., Mikó I., Bagyó J., Bokk A., Barnák G., Furka I. (1993) Autologous spleen transplantation. *Orv. Hetil.* 17; 134, 125-128.
96. Szendrői T., Mikó I., Hajdú Z., Ács G., Kathy S., Furka I., Szabó L. (1997) Splenic autotransplantation after abdominal trauma in childhood. Clinical and experimental data. *Act. Chir. Hung.* 36, 349-351.
97. Takeda J., Hashimoto K., Tanaka M., Iwai H., Kakegawa T. (1990) Experimental and clinical evaluation of the splenic capping method in the treatment of injured spleens. *Jpn. J. Surg.* 20:137-142.
98. Tew, J. G., Kosco M. H., Burton G. F., Szakal A. K. (1990) Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol. Rev.* 117:185-185.
99. Thourani V.H., Sharma J., Duarte I.G., Miller J.I. Jr (2005) Intrathoracic splenosis. *Ann. Thorac. Surg.* 80:1934-1936.
100. Tribble C.G., Joob A.W., Barone G.W., Rodgers B.M. (1987) A new technique for wrapping the injured spleen with polyglactin mesh. *Am. Surg.* 53(11):661-663.
101. Tsunoda Y., Shibusawa M. (1987) The effect of splenectomy in immature mice. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 88(3):318-326.
102. Upadhyaya P., Simpson J.S. (1968) Splenic trauma in children. *Surg. Gynecol. Obstet.* 126(4):781-790.
103. Upadhyaya P., Nayak N.C., Moitra S. (1971) Experimental study of splenic trauma in monkeys. *J. Pediatr. Surg.* 6(6):767-773.
104. Van Krieken J.H., te Velde J. (1986) Immunohistology of the human spleen: the inventory of the localisation of lymphocyte subpopulations. *Histopathology* 10:285-294.

105. Van Krieken J.H., te Velde J. (1988) Normal histology of the human spleen. *Am. J. Surg. Pathol.* 12:777-785.
106. Well T.S. (1866) On excision of enlarged spleen, with a case in which the operation was performed. *Med. Times Gaz.* 1:2-2. cit in: McClusky D.A. 3rd, Skandalakis L.J., Colborn G.L., Skandalakis J.E. (1999) Tribute to a triad: history of splenic anatomy, physiology, and surgery-part 1. *World J. Surg.* 23(3):311-325.
107. Vanderschot P., Cuypers P.H., Rommens P., Broos P. (1993) Splenic function after splenic rupture treated with an absorbable mesh. *Unfallchirurg* 96(5):248-252.
108. Velanovich V., Weaver M. (2003) Partial splenectomy using a coupled saline-radiofrequency hemostatic device. *Am. J. Surg.* 185:66-68.
109. Wacha M., Danis J., Wayand W. (2002) Laparoscopic resection of an accessory spleen in a patient with chronic lower abdominal pain. *Surg. Endosc.* 16(8):1242-1243.
110. Wadham B.M., Adams P.B., Johnson M.A. (1981) Incidence and location of accessory spleens. *N. Engl. J. Med.* 304:1111-1111.
111. Weiss L. (1990) The spleen in malaria: the role of barrier cells. *Immunol. Lett.* 25(1-3):165-172.
112. Wylyer D.J. (1983) Splenic functions in malaria. *Lymphology* 16(2):121-127.
113. Yeh C.J., Chuang W.Y., Kuo T.T. (2006) Unusual subcutaneous splenosis occurring in a gunshot wound scar: pathology and immunohistochemical identification. *Pathol. Int.* 56:336-339.
114. Zucker K., Browns K., Rossman D., Hemingway D., Saik R. (1984) Nonoperative management of splenic trauma. Conservative or radical treatment? *Arch Surg.* 119(4):400-404.

10.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- 1) **Sipka S. jr.**, Bráth E., F. Tóth F., Fábíán Á., Krizsán Cs., Baráth S., Sipka S., Németh N., Bálint A., Furka I., Mikó I. (2006) Distribution of peripheral blood cells in mice after splenectomy or autotransplantation. *Microsurgery* 26:43-49.

IF:0,812

- 2) **Sipka S. jr.**, Bráth E., F. Tóth F., Aleksza M., Kulcsár A., Fábíán Á., Baráth S., Balogh P., Sipka S., Furka I., Mikó I. (2006) Cellular and serological changes in the peripheral blood of splenectomized and spleen autotransplanted mice. *Transp. Immun.*16:99-104.

IF: 1,98

- 3) **Sipka S. jr.**, Bráth E., F. Tóth F., Fábíán Á., Furka I., Mikó I. (2005) Lép autotranszplantáció és lépeltávolítás haematologiai és immunologiai hatásainak összehasonlító vizsgálata egerekben. *Magy. Seb.* 58:84-88.

10.3. Az értekezés témájával összefüggő egyéb közlemények

- 4) Mikó I., Bráth E., Németh N., F. Tóth F., **Sipka S. jr.**, Kovács J., Sipka S., Fachet J., Furka A., Furka I., Zhong R. (2003) Hematological, hemorrheological, immunological and morphological studies of spleen autotransplantation in mice: preliminary results. *Microsurgery* 23:483-488.

IF:0,812

- 5) Mikó I., Németh N., **Sipka S. jr.**, Bráth E., Pető K., Gulyás A., Furka I., Zhong R. (2006) Hemorrheological follow-up after splenectomy and spleen autotransplantation in mice. *Microsurgery* 26:38-42.

IF:0,812

10.4. Egyéb közlemények

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

11. Tárgyszavak

Splenectomy	-	Splenectomy
Lép-autotransplanatio	-	Spleen-autotransplantation
OPSI-syndroma	-	OPSi-syndrome
IgM	-	IgM
Phagocyt	-	phagocyte
Immunhistologia	-	Immunhistology
Arteria centralis	-	central artery

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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

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