

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Microvascularis anastomosisok regenerációjának  
vizsgálata kísérletes sebészeti modelleken**

**Dr. Fazekas László Ádám**

**Témavezető: Prof. Dr. Németh Norbert**



**DEBRECENI EGYETEM**

**KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2025**

## TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	1
1 BEVEZETÉS .....	2
2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	4
2.1 Éregyesítésről általában.....	4
2.2 A sebgyógyulás folyamata .....	5
2.3 A szöveti száradás hatása a sebgyógyulásra.....	7
2.4 A PACAP és a BGP 15 .....	9
2.4.1 A PACAP .....	9
2.4.2 A BGP-15 .....	12
2.5 Szakítószilárdság mérése.....	13
2.6 Haemorheologiai paraméterek.....	15
3 CÉLKITŰZÉSEK .....	20
4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	21
4.1 Kísérleti engedély .....	21
4.2 Kísérleti állatok és felhasznált gyógyszerek.....	21
4.3 Műtéti protokoll.....	21
4.4 Mintavételi protokoll.....	23
4.5 Kísérleti csoportok, kiegészítő lépések .....	23
4.5.1 PACAP 1-38 érgyógyulásra kifejtett hatásának vizsgálata.....	23
4.5.2 A BGP-15 érgyógyulásra kifejtett hatásának vizsgálata .....	28
4.5.3 Szövetek nedvesen tartásának jelentőségének vizsgálata .....	28
4.6 Laboratóriumi vizsgálatok.....	28
4.6.1 Hematológiai paraméterek .....	28
4.6.2 Micro-rheologiai paraméter.....	29
4.7 Szakítószilárdság mérése.....	31
4.7.1 Stabil keret kialakítása.....	31
4.7.2 A húzómechanika pontos kialakítása .....	32
4.7.3 Az erőmérő rendszer és annak kalibrálása .....	33
4.7.4 A kezdő- és végpozíció .....	34
4.7.5 Mikrokontroller .....	34
4.7.6 A szoftver .....	34
4.7.7 A kalibrálás.....	34
4.7.8 Mérés kivitelezése és kiértékelése.....	35
4.8 Szövettan .....	36

4.9	Statisztikai analízis .....	37
5	EREDMÉNYEK .....	38
5.1	PACAP 1-38 érgyógyulásra kifejtett hatásának vizsgálata .....	38
5.1.1	Általános megfigyelések .....	38
5.1.2	Mikrokeringés .....	39
5.1.3	Hematológiai változások .....	40
5.1.4	Vörösvérsejt deformabilitás és aggregatio .....	41
5.1.5	Szakítószilárdság mérése.....	42
5.1.6	Hisztológia, molekuláris biológia.....	42
5.2	A BGP-15 érgyógyulásra kifejtett hatásának vizsgálata .....	51
5.2.1	Általános megfigyelések .....	51
5.2.2	Laboratoriumi vizsgálatok.....	52
5.2.3	Szakítószilárdság mérése.....	54
5.2.4	Szövetteni vizsgálatok .....	55
5.3	Szövetek nedvesen tartásának jelentőségének vizsgálata.....	57
5.3.1	Makroszkópos megfigyelések .....	57
5.3.2	Laboratóriumi paraméterek .....	59
5.3.3	Szakítószilárdság mérése.....	61
5.3.4	Hisztomorfológia.....	63
6	MEGBESZÉLÉS.....	67
7	FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK .....	76
8	ÖSSZEFOGLALÁS.....	77
9	SUMMARY .....	78
10	IRODALOMJEGYZÉK.....	79
10.1	Hivatkozott közlemények jegyzéke.....	79
10.2	Hitelesített publikációs lista .....	89
11	TÁRGYSZAVAK.....	93
12	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	94
13	FÜGGELÉK.....	95

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AI: aggregációs index  
BGP-15: N'-(2-hidroxi-3-(piperidin-1-il)propoxi)-3-piridine-karboximidamid  
BP: hemosztatikus szivacs (bioplast)  
CREB - cAMP-reszponzív elemhez kötődő fehérje  
DAMPs: károsodás-asszociált molekulák  
ECM – extracelluláris mátrix  
EI: elongációs index  
EPAC - cAMP által közvetlenül aktivált kicserélő fehérje  
Fvs: fehérvérsejt  
GPCRs: G-fehérjéhez kapcsolt receptorok  
GSK-3 - glikogén-szintáz-kináz-3  
H&E: Hematoxylin és Eosin szövettani festés  
Hgb: hemoglobin  
HSF-1: Hősokk fehérje 1  
HSP: hősokk fehérjék  
Htc: hematokrit  
I/R: ischaemia-reperfusio  
IL – interleukin  
IP3 – inozit triszfoszfát  
JAK – janus kináz  
JNK - c-Jun N-terminális kináz  
JNK: c-Jun N-Terminális Kináz  
MCH: átlagos vörösvérsejt (corpuscularis) hemoglobin tartalom  
MCHC: átlagos vörösvérsejt (corpuscularis) hemoglobin koncentráció  
MCV: átlagos vörösvérsejt (corpuscularis) térfogat  
mp: másodperc  
NF- $\kappa$ B - nukleáris faktor kappa-B  
PAC-1: hypophysis adenilát cikláz-aktiváló polipeptid I receptor  
PACAP 1-38: hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid  
PAMPs: patogén-asszociált molekulák  
PARP-1: Poli(ADP-ribóz) polimeráz 1  
PVP: polivinil-pirrolidon  
RAP1 – Ras asszociált fehérje 1  
ROS - reaktív oxigénvegyületek  
ROS: reaktív oxigén szabadgyökök  
SS: nyírófeszültség (shear stress, (Pa))  
TGF - transzformáló növekedési faktor  
Thr: trombocita  
TNF $\alpha$  - tumor nekrozis faktor alfa  
VIP: Vazoaktív intesztinális polipeptid  
VPAC - vasoaktív intestinalis polipeptid receptor  
VPAC-1: vazoaktív intesztinális polipeptid receptor 1  
VPAC-2: vazoaktív intesztinális polipeptid receptor 2  
VVS: vörösvérsejt

*„Nézni a világot becsukott szemekkel,  
Látni azt, amit még nem látott meg ember  
Gyönyörködni titkos, mély harmóniákban,  
Emlékezni arra, mit sohasem láttam.”  
(Teller Ede, 1908 – 2003)*

## **1 BEVEZETÉS**

A microvascularis anastomosisokat számos sebészeti szakterület alkalmazza, különösen a rekonstruktív és transzplantációs sebészet. A megfelelő érregenerációhoz számos feltételnek biztosítottnak kell lennie, ezért különösen fontos a vérellátás helyreállítása során az extra óvatosság. A szövetek előkészítése, preparálása, megfelelő mértékű nedvesítése, a kialakult vagy a kialakított trauma mértéke, az adventitia nem megfelelő eltávolítása, a hibás szögben történt egyeztetés, az ér megcsavarodása, a vérzéses komplikációk, a trombózis, a gyulladás és az ischaemia-reperfusiós károsodás, mind befolyásolhatja az anastomizálás sikerességét. Az érzékeny szövetekkel történő bánásmód során alapvető fontosságú a műtéti terület testhőmérsékletű fiziológiás sóoldattal történő hidratációja. Erről azonban nem sok objektív tanulmány áll rendelkezésre, hanem inkább csak empirikus megfigyelések.<sup>1-7</sup>

A hidratáltság kritikus szerepet játszik a szövetek életképességének megőrzésében, a vizualizáció javításában és a szöveti trauma csökkentésében, különösen a kényes mikrosebészeti műtéteknél. A szövetek hidratáltsági állapota kulcsfontosságú a perioperatív időszakban a microvascularis anastomosisok készítése során, mivel a kiszáradás jelentős mértékű károsodáshoz vezethet.<sup>8-10</sup> A szövetek kiszáradásából eredő sejtkárosodás ronthatja az életképességet és felvetheti a nekrozis lehetőségét. Ezenkívül a kiszáradás érgörcsöt idézhet elő, ami megnehezíti az anasztomizálás folyamatát és potenciálisan akadályozza a posztoperatív véráramlást. A dehidratált szövetek törékennyé válnak és elveszítik rugalmasságukat, növelve a varrás vagy manipuláció során bekövetkező véletlen sérülés kockázatát. A kiszáradt szövetek a láthatóságot is rontják azáltal, hogy a vér és a szövettörmelékek a műtéti területre tapadnak, szennyeznek a területet és megnehezítik a beavatkozást. Továbbá a kiszáradt erek hajlamosabbak az endothel sérülésére, ami növeli a trombusképződés, a posztoperatív trombózis és a graft meghibásodásának kockázatát. Végül a perioperatív kiszáradás miatt károsodott gyógyulás befolyásolja a sejtek migrációját, proliferációját és differenciálódását, amelyek a sebgyógyulás alapvető folyamatai.<sup>11-13</sup>

A szövetek megfelelő hidratálása nemcsak a szövetek életképességének fenntartását segíti elő, hanem megkönnyíti a mikrosebészeti eljárások során a kényes struktúrák manipulálását és összevarrását is.<sup>14</sup> A szövetek hidratálásának elhanyagolása a műtétek során fokozott szövődményekhez vezethet, például a gyógyulási idő meghosszabbodásához, a posztoperatív szövődmények magasabb arányához és a sebészeti eredmények romlásához.<sup>15</sup> Sebészeti jelentőségének ellenére, korlátozott irodalom áll rendelkezésre a szövetek nedvesen tartásáról, főként az olyan objektív adatok tekintetében, mint amilyenekkel a szövettani, biomechanikai és a folyadékdinamikai megfigyelések szolgálhatnak.

Az anastomizált ér megfelelő regenerációja kritikus fontosságú a fiziológias érfunkció helyreállításához. A folyamat hasonló a sebgyógyuláshoz, az inflamatorikus, a proliferációs és a maturációs fázisok itt is jelen vannak. Az extracelluláris mátrixot termelő sejtek beszivárgása és az új mátrix kialakítása nagyban meghatározza az anastomosis biomechanikai stabilitását. Folyamatos erőfeszítések történtek-e regenerációs folyamatok támogatására és a klinikai eredmények javítására, például a műtéti idő lecsökkentésével a varrat nélküli technikák esetén, valamint az idegen anyagok mérséklésével a szövetragasztók használata révén. A szövetek regenerálására számos gyógyszert vizsgáltak, ilyen ígéretes gyógyszerjelölt lehet a PACAP és a BGP-15-is.<sup>16-21</sup>

A pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) neuropeptid segíthet a gyógyulási folyamatokban, mivel csökkenti a gyulladást, az apoptózist és az oxidatív stresszt. A BGP-15 egy gyógyszerjelölt molekula, amelyet magyar kutatók fedeztek fel a hősokk fehérjék vizsgálata során, és gyulladáscsökkentő, anti-apoptotikus tulajdonságain kívül további védőhatásokkal is rendelkezik. Mindazonáltal ezen sokoldalú hatóanyagokat még soha nem vizsgálták a microvascularis regenerációs folyamatokban.<sup>22-25</sup>

A kutatásunk során a hematológiai és haemorheológiai vizsgálatok mellett a biomechanikai és hisztopatológiai jellemzőket is elemeztük, hogy felmérjük a PACAP és/vagy a vérzéscsillapító szivacs, a BGP-15 vagy akár a szövetek nem megfelelő nedvesítésének a hatását a microvascularis anastomosisok regenerációjára patkányokban.

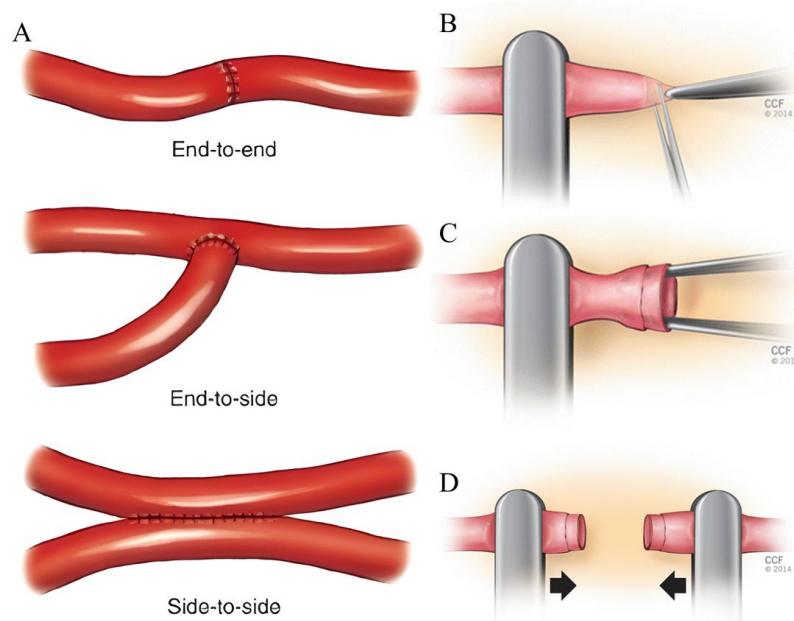
## 2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 Éregyesítésről általában

A sebészet a 19. század végén és a 20. század elején jelentős fejlődésen ment keresztül, különösképpen az érsebészet területén, főként az érvarratok tekintetében. Az 1800-as évek végéig az érsebészeti beavatkozások legfőképpen a sérült, vérző erek lekötésére korlátozódtak, és a századfordulóra a sebészek mindössze kilenc emberi artériát tudtak varratokkal egyesíteni. Az első sikeresen végrehajtott és dokumentált érvarrat 1877-ben Szentpéterváron készült. Kutyákon portocavalis anastomosisok készültek side-to-side technikával. Ezt követően 1891-ben Alexander Jassinowski orosz sebész, aki szintén kutyákon végzett kísérleteket, sikeresen hajtott végre carotis anastomosisokat egyszerű csomós öltésekkel, selyem varróanyaggal. Kiemelendő még Ullmann Imre munkássága, aki 1902-ben a fejletlen varrattechnika okán Payr-féle magnéziumgyűrűket használt az erek összekapcsolásához a világ első sikeres vese átültetéséhez (kutya), mellyel megmutatta, hogy a transzplantáció nem csupán elméleti lehetőség. Az érsebészet nehéz kezdetét követően az egyik legfontosabb mérföldkő Alexis Carrel nevéhez fűződik, aki 1912-re kifejlesztette a trianguláris ér-anastomosis technikát. Ezt a módszert széles körben alkalmazzák, hiszen biztosítja az érvégek stabil egymáshoz rögzítését, valamint a varrat biztonságos kivitelezését, mellyel megalapozta a modern érsebészetet. Jelentőségét a kiérdemelt Nobel-díja is bizonyítja.<sup>4, 5, 7, 26-29</sup>

Az erek egyesítése során három fő technikát alkalmazhatunk: end-to-end (a leggyakrabban alkalmazott módszer, ahol a két érvéget varrják össze), end-to-side (egyik érvégét egy másik ér oldalához csatlakoztatják) és side-to-side (két ér oldalfala kerül összekapcsolásra) anastomosis (1. ábra, A). A varratsor közvetlen közelében található adventitia eltávolítása segít elkerülni, hogy adventitia darabok nyomuljanak a lumenbe az anastomizálás során (1. ábra, B). A gyártástechnológia fejlődésével ennek jelentősége csökkent, de továbbra is előnyös az eltávolítása, hiszen növeli az érfal rétegeinek átláthatóságát, és lehetővé teszi, hogy a varratok az érfal teljes vastagságán keresztül haladjanak, elkerülve a varratelégtelenséget. Ugyanakkor a vasa vasorum és a simaizmotokat ellátó idegek megőrzése elengedhetetlen az erek funkciójának biztosításához. Minden 1 mm feletti ér esetén ez az érhálózat felelős a tunica media megfelelő táplálásáért, melynek intaktsága a gyógyulási folyamatokban kritikus szerephez jut. Mikrosebészeti beavatkozásoknál körülbelül 50%-al lehet tágítani az érvégeket, melyet finoman, csipesszel érdemes kivitelezni. Ez a beavatkozás hozzájárul az ér heparinos atmoszához és a pontosabb öltéskezeléshez, mivel a feszítés hatására a simaizmotok megbénulnak és néhány órán keresztül elmarad a görcsös összehúzódás (1. ábra, C). Az első öltés csomózását megelőzően az approximátor pófáit összebb tolva

elkerülhetjük, hogy a csomózás során roncsolódjon az érfal. Ennek oka, hogy a távol elhelyezkedő érvegekbe a feszülő varróanyag belevág, mely varratelégtelenséghez vezethet, illetve gyakori oka lehet a szűracsatorna vérzéseknek is (1. ábra D).<sup>4, 5, 30-36</sup>



**1. ábra**

**Főbb ér egyesítési technikák (A) és a kezdeti lépések end-to-end anastomosis esetén**

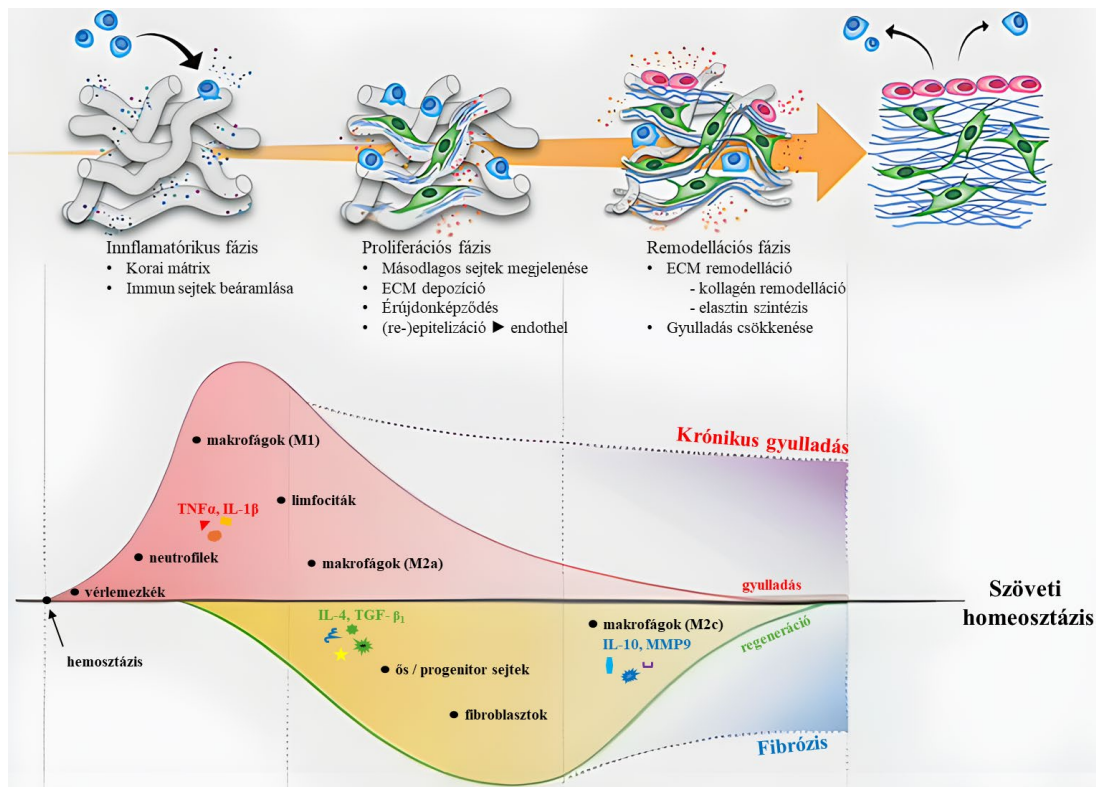
Az adventitia eltávolítását (B) követően tágítjuk az ér lumenét (C), majd pedig az approximátor összeh húzásával (D) meggátoljuk, hogy a feszülő érvegekbe belevágjon (tágítsa a szűracsatornát) a varróanyag a csomózások során<sup>35, 36</sup>.

Öltéstípusok tekintetében a három legfontosabb módszer az egyszerű csomós, a tovaftató, valamint a sleeve-technika (az egyik érveget a másikba csúsztatják, majd szituációs öltésekkel, esetleg szövetragasztóval rögzítik). Mikrosebészeti alkalmazás esetén az egyszerű csomós öltések alkalmazása a javallott, mivel a tovaftató technikák esetén a szűkítés és a varratelégtelenség kockázata felülírja a rövidebb elkészítési idővel járó előnyöket.<sup>4, 5, 37</sup>

**2.2 A sebgyógyulás folyamata**

A sebgyógyulás egy dinamikus, három fő szakaszból álló biológiai folyamat, amelyben különböző sejttípusok koordinált működése biztosítja a sérült szövet helyreállítását. Az ideális gyógyulás során a sejtes események szigorú időrendben követik egymást, azonban olyan tényezők, mint a diabetes, az öregedés, vagy akár a különböző patogének megzavarhatják ezt a folyamatot. Ez gyakran nem megfelelő sebgyógyuláshoz vagy akár krónikus sebek kialakulásához vezet. Ezek a krónikus sebek jelentős egészségügyi és gazdasági terhet jelentenek, különösen gyakori előfordulásuk és visszatérő jellegük miatt. Ezért kiemelt

jelentőségű a sebgyógyulást szabályozó mechanizmusok részletes megértése mind biológiai, mind klinikai szempontból<sup>38, 39</sup> (2. ábra).



2. ábra

### A sebgyógyulás három fő fázisa

TNF - tumor nekrozis faktor; ECM – extracelluláris mátrix; IL – interleukin;

TGF - transzformáló növekedési faktor

([https://www.researchgate.net/figure/Overview-of-the-different-stages-of-in-situ-tissue-regeneration-going-from-a-synthetic\\_fig1\\_317621474](https://www.researchgate.net/figure/Overview-of-the-different-stages-of-in-situ-tissue-regeneration-going-from-a-synthetic_fig1_317621474))

A gyulladás, mint az elsődleges immunválasz védelmet biztosít a különböző patogénekkal szemben. A hemosztázist követően kialakuló védelmi reakció, amelyet a sérülés helyén felszabaduló károsodás-asszociált molekulák (DAMPs) és patogén-asszociált molekulák (PAMPs) váltanak ki. Ezek aktiválják a gyulladásos mediátorok termelődését, beleértve a citokineket és a kemokineket, amelyek további immunsejteket vonzanak a sérült területre az elhalt szövetek és baktériumok eltávolítása érdekében. Ez a fázis néhány órától akár 3-6 napig is eltarthat, a seb mélységétől és típusától függően.<sup>38, 40, 41</sup>

A proliferációs szakaszban a keratinociták, fibroblasztok, endothelsejtek és makrofágok intenzív szaporodása és differenciálódása zajlik. A sebgyógyulás korai fázisában (akár 12 órán belül) a keratinociták a gyulladásos folyamatok, illetve a mechanikai és elektromos feszültség változások okán aktiválódnak a seb peremén. Ezt követően részleges epitheliális–mesenchimális átalakuláson mennek át, hogy migrálhassanak a sebágyban. A keratinociták az integrin receptorok segítségével kölcsönhatásba lépnek a sebágyban

lévő mátrixfehérjékkel (pl. fibronektin, kollagén), és ezáltal képesek áthaladni a sérült, nekrotikus szövettermeléken. Ezzel párhuzamosan a fibroblasztok feladata a fibringazdag ideiglenes mátrix lebontása és egy erőteljes, kollagénben gazdag granulációs szövet kialakítása, valamint az angiogenezis révén új erek képződnek, amelyek tápanyaggal látják el a regenerálódó területet. Ez a szakasz heteken át is eltarthat, különösen érvarratok esetén, ahol a zavartalan vérkeringés helyreállítása kritikus fontosságú.<sup>39, 42</sup>

A remodelációs fázisban az ECM átalakulása zajlik, ahol a kezdetben lerakódott fibrin hialuronra, fibronectinre és proteoglikánokra cseréli. A regeneráció progressziója során a gyengébb III. típusú kollagén fokozatosan helyet cserél az I. típusú kollagénnel, így növelve a kialakuló hegyszövet szakítószilárdságát. Ez a folyamat hónapokig, de akár évekig is eltarthat és még számos sejt részt vesz a lezárásában, ahol végeredményként egy funkcionális, de az eredeti szövetből akár teljesen eltérő tulajdonságú hegyszövet jön létre.<sup>38, 39, 43</sup>

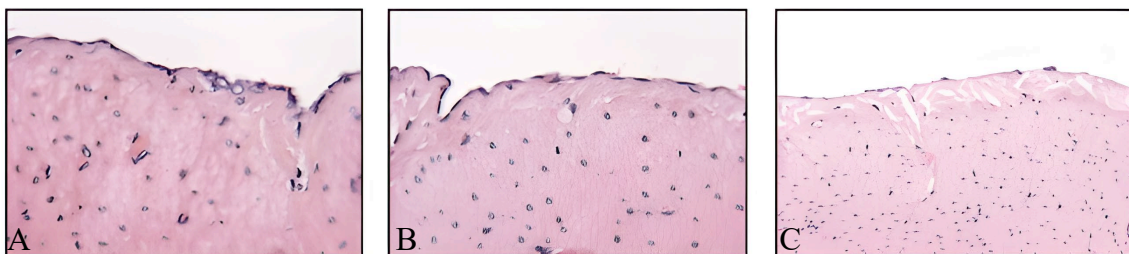
Az érvarratoknál a legfontosabb a varratvonal stabilitása, a vérzés elkerülése és a vérkeringés mihamarabbi helyreállítása. A gyulladós fázis általában 2-5 napig tart mely során nagyban csökken az erek szakítószilárdsága, ami a gyulladós sejtek (neutrofilek, makrofágok, limfociták, stb.) intenzív aktiválódásából, a struktur fehérjék és sérült sejtek eltávolításából adódik. Az erek falának gyógyulása gyorsabb, mint a bőr esetében, de a varratoknál a mechanikai terhelés, a vérnyomás és a trombózisveszély jelentős szerepet játszik. A proliferációs fázis 2-3 hétig tarthat, és a szövetek helyreállítására összpontosít, ekkor kezdi az adott ér visszanyerni a mechanikai szilárdságát. A makrofágok által kibocsátott növekedési faktorok hatására a fibroblasztok aktiválódnak, hogy kollagént és elasztint termeljenek, ami az érfal struktúráját biztosítja. A remodellációs fázis hónapokig, sőt, éveken keresztül is tarthat. A kezdetben termelt kollagénszálak átrendeződnek, és az új kollagén erősebbé és rugalmasabbá válik. A regenerált szövetek alkalmazkodnak a mechanikai terheléshez, az áramlási viszonyoknak megfelelően. A gyulladás, regeneráció és remodeláció fázisai összefonódnak, ahol a helyes időzítés és koherens biokémiai válaszok szükségesek a sikeres gyógyuláshoz. A gyógyulás sikerességét befolyásolja a sebellenlét, a fertőzés megelőzése, a megfelelő nedves környezet, valamint a beteg általános állapota (pl. cukorbetegség, dohányzás, keringési zavarok).<sup>44-49</sup>

### **2.3 A szöveti száradás hatása a sebgyógyulásra**

A műtéti beavatkozások során a szövetek megfelelő hidratáltsága és oxigénellátása kritikus szerepet játszik a gyógyulás sikerében, hiszen ezek hiánya elindíthatja az apoptotikus folyamatokat, vagy akár nekrozishoz is vezethet. A deszikkáció (szöveti kiszáradás) egy súlyos

probléma, amely akkor lép fel, amikor a szövetek túlzott folyadékvesztést szenvednek. Ez kompromittálhatja a sejtek működését és rontja a sebgyógyulást. A vízhiány gátolhatja a sejtek anyagcseréjét, enzimek aktivációját, csökkentheti az ECM szintézisét és növelheti a gyulladás kockázatát.<sup>12-15, 50, 51</sup> A szöveti száradás fő oka műtét közben elsődlegesen a nyitott sebészeti területeken jelen lévő fokozott párolgás melyet elősegíthet a környezeti levegő szárazsága. Ez különösen összetett beavatkozásoknál, elhúzódó műtéteknél válhat jelentős folyadék-egyensúlyi zavarrá, a nem megfelelő folyadékpótlás mellett.<sup>13, 50</sup>

A szöveti hidratáltság fenntartásához hozzájárul a szisztémás folyadék-egyensúly helyreállítása, mely elősegíti a megfelelő szöveti perfúziót. Ezek mellett a fiziológiás sóoldatok vagy speciális hidratáló gélek alkalmazása a sebészeti területen csökkenthetik a kiszáradás és a fertőzés kockázatát.<sup>50-52</sup> Ugyanakkor a hagyományos nyitott műtéthez képest a csökkentett szöveti expozícióval járó módszerek, például laparoszkópos beavatkozások is hozzájárulhatnak a szövetek megfelelő védelméhez, de ott is elengedhetetlen a megfelelő páratartalmú gáztér fenntartása (3. ábra). A száraz szövetek hajlamosabbak a gyulladásra, a sebészi beavatkozás utáni hegesedésre és a lassúbb gyógyulásra. Az immunsejtek migrációja lelassul és a hámosodás is zavart szenved a száraz környezetben, valamint a dehidratáltság révén további sejtek válhatnak apoptotikussá. Emiatt a műtét során a megfelelő hidratáltság fenntartása kulcsfontosságú a posztoperatív szövődmények minimalizálása érdekében.<sup>12, 14, 15, 53, 54</sup>



**3. ábra**

**Szövetek száradásának hatása vastagbél szövettani képre**

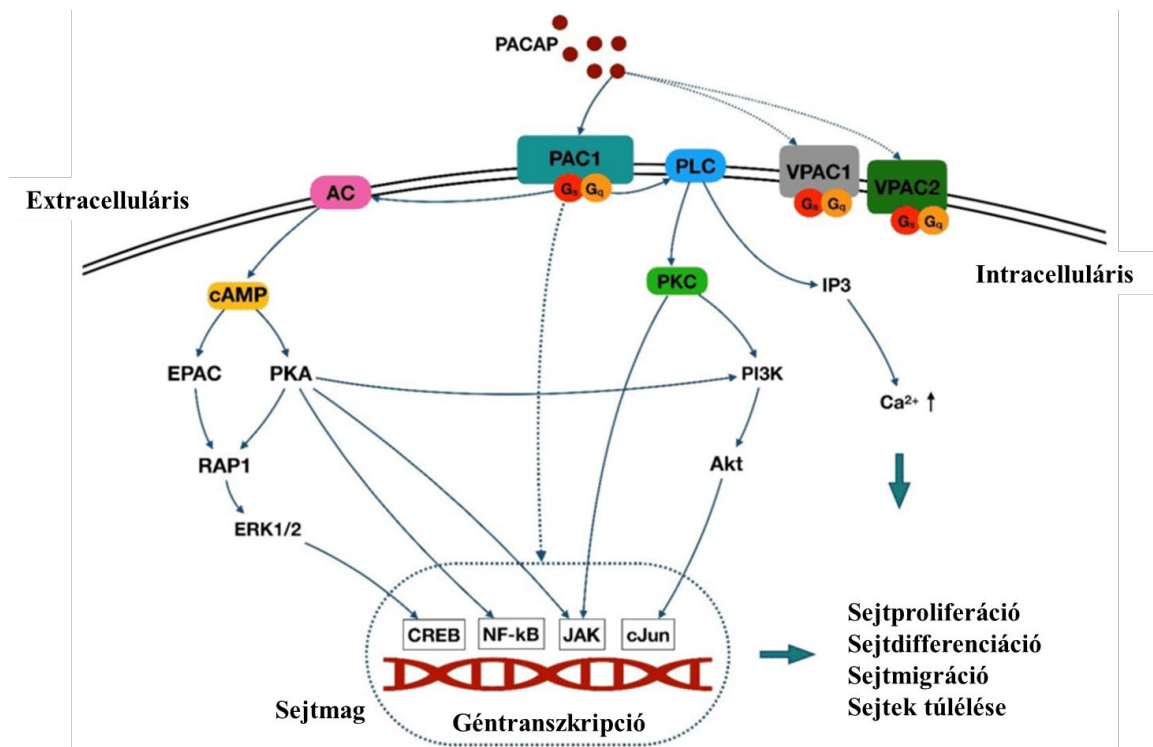
Fiziológiás mesothelium normál morfológiával, expozíció nélkül (A); Enyhe mesotheliális eltérés, 30 mp 37 °C-os, 95%-os páratartalom hatására (B); Kiterjed mesotheliális károsodás és a sejtek atrófiája, 30 mp 20 °C-os, 0,0002%-os páratartalom mellett (C), Kavic és mtsai. szerint.<sup>53</sup>

Klasszikus műtéttani tétel a szövetek testhőmérsékletű fiziológiás sóoldattal való nedvesítése, mégis kevés az objektív adat ennek az optimalizálására.

## 2.4 A PACAP és a BGP 15

### 2.4.1 A PACAP

A PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polipeptide) neuropeptid egy széleskörűen tanulmányozott hatásspektrumú molekula melyet először 1989-ben extraháltak birka hipotalamuszból.<sup>55</sup> A központi idegrendszeri előfordulásán kívül, számos perifériás szövetben termelődik és általános védő szereppel bír a szöveteket érő káros oxidatív hatások kivédésében. A PACAP két fő formában fordul elő. Az egyik egy 38 aminosavból álló, a másik egy 27 aminosavas neuropeptid, melyeket PACAP-38-nak, illetve PACAP-27-nek neveznek. Szerkezete és funkciója az evolúció során megmaradt, ami régóta fontos szerepére utal.<sup>56, 57</sup> A PACAP aminosav-szekvenciája nagy hasonlóságot mutat a vasoaktív intestinalis polipeptiddel (VIP), és a VIP/glukagon/szekretin családba tartozik.<sup>58</sup> A PACAP és a VIP közötti jelentős homológia miatt három receptoron keresztül képesek hatást gyakorolni: a PAC1, VPAC1 és VPAC2. Ezek B osztályba tartozó G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GPCRs), amelyek különböző jelátviteli kaszkádokon keresztül fejtik ki hatásukat (4. ábra).<sup>57-59</sup>



4. ábra

#### PACAP főbb jelátviteli útvonalai a PAC1 receptoron keresztül

A PAC1 (hypophysis adenilát cikláz-aktiváló polipeptid I) receptor jelátviteli mechanizmusai középpontjában a cAMP/PKA (ciklikus adenzin-monofoszfát/fehérje kináz A) és PLC/PKC (foszfolipáz C/protein kináz C) útvonalak állnak. Ezek az útvonalak széleskörű biológiai folyamatokat befolyásolnak, ideértve a neuroprotekción, a sejtproliferáción és a hormonális szabályozáson. VPAC - vasoaktív intestinalis polipeptid receptor; IP3 – inozit triszfoszfát; EPAC - cAMP által közvetlenül aktivált kicserélő fehérje; RAP1 – Ras asszociált fehérje 1; CREB - cAMP-válasz elemhez kötődő fehérje; NF-κB - nukleáris faktor kappa-B; JAK – janus kináz. (<https://www.researchgate.net/figure/Schematic-pathway-of-PACAP-signaling-cascades-PACAP-exerts-function-via-activation-of-fig1-342644125>)

Tanulmányok igazolták, hogy a PACAP citoprotektív hatású több szervben. Kimutatták, hogy ez a neuropeptid rendkívül hatékonyan védekezik a szövetekre potenciálisan káros hatású stimulusok ellen, mind az agyban, mind a perifériás szervekben. A PACAP citoprotektív hatásainak nagy része az antiapoptotikus, antioxidáns és gyulladáscsökkentő tulajdonságainak tulajdonítható.<sup>25, 60</sup> Különböző állatmodellekben megfigyelték a PACAP expressziójának csökkenését az idő múlásával. Ezért az öregedés számos aspektusa magyarázható a PACAP endogén védőhatásának hiányával. Továbbá, a PACAP hiányát sikeres modellként használták az öregedés hatásainak utánozására egerekben.<sup>61</sup>

A PACAP szövetvédő szerepe miatt kiemelt jelentőségű lehet sebészeti kutatásokban, hiszen műtétek során a szervezetet jelentős trauma éri. Érsebészeti beavatkozásoknál a szövetgyógyulás és az érfal rétegeinek megfelelő regenerációja kulcsfontosságú a sikeres felépüléshez. Az optimális érregeneráció elősegítésének egyik módja a gyulladás elkerülése, mivel a gyulladásos folyamatok károsíthatják a szöveteket.<sup>42, 62</sup> A PACAP hozzájárulhat a szövetregenerációhoz, mivel gyulladáscsökkentő hatásait számos tudományos publikáció dokumentálta. A PACAP és receptorjainak expressziója széles körben jelen van az emésztőrendszerben, és a PACAP fontos szerepet játszik a bélgyulladás és egyéb bélpatológiák esetén. Kimutatták, hogy a PACAP csökkenti a gyulladást és a steatosist a májban, ahol egyértelműen gátolja az elhízással összefüggő májbetegségek kialakulását. A légzőrendszerben a PACAP gyulladáscsökkentő hatását mind a felső, mind az alsó légutakban megfigyelték.<sup>63</sup>

A PACAP valóban multifunkcionális neuropeptid, mivel erős bizonyíték támasztja alá antioxidáns hatásának neuroprotektív jellegét is. Ez a hatás megfigyelhető a vizuális, auditív és olfaktorikus érzékelési rendszerekben. A PAC1 receptor kifejeződik az agyban az auditív pálya struktúráiban, valamint a cochleában is. Egy *in vitro* tanulmányban, amely a PACAP védőhatását vizsgálta a belsőfülben, kimutatták, hogy a PACAP hatékonyan növelte a hidrogénperoxidnak kitett cochlearis sejtek életképességét és védett az oxidatív stressz által indukált apoptotikus sejthalál ellen. Ez nemcsak a PACAP antioxidáns képességét bizonyítja, hanem utal antiapoptotikus hatására is.<sup>64, 65</sup> Ezek az antiapoptotikus és antioxidáns hatások ismételt megfigyelhetők voltak a patkányvese vizsgálatában, ahol a PACAP egyértelműen csökkentette az oxidatív stressz által indukált sejthalált. Ezt patkányvese sejt kultúrákon mutatták ki, ahol dózisfüggő hatást figyeltek meg. A PACAP kezelés eredményeként nőtt a sejtek életképessége. Élő patkányokban ezt a túlélést elősegítő mechanizmust az oxidatív stressz markerek és a glutation aktivitás nyomon követésével magyarázták ischaemia/reperfúzió után. A PACAP szignifikánsan növelte a glutation szintjét *in vivo*. Ez nemcsak a PACAP antiapoptotikus és

antioxidáns képességét bizonyítja, hanem utal az endogén antioxidánsok és radikalfogók („radical scavenger”) részvételére is ebben a sejt-túlélési mechanizmusban.<sup>60</sup>

Az oxidatív stressz csökkentése létfontosságú a sejtkárosodás elleni védekezésben. Ez lehetővé teszi a szervezet különböző szövetei számára, hogy védelmet nyújtsanak a reaktív oxidatív metabolitok csökkentésével a vérben. A PACAP integrális szerepe az oxidatív stressz szabályozásában fiziológiai körülmények között a PAC1 receptoron keresztül kifejtett hatásain keresztül figyelhető meg. Ez az antioxidáns képesség a szabályozásban kizárólag a PACAP-ra jellemző, és nem figyelhető meg a VIP PAC1 receptor stimulációja esetén.<sup>72</sup>

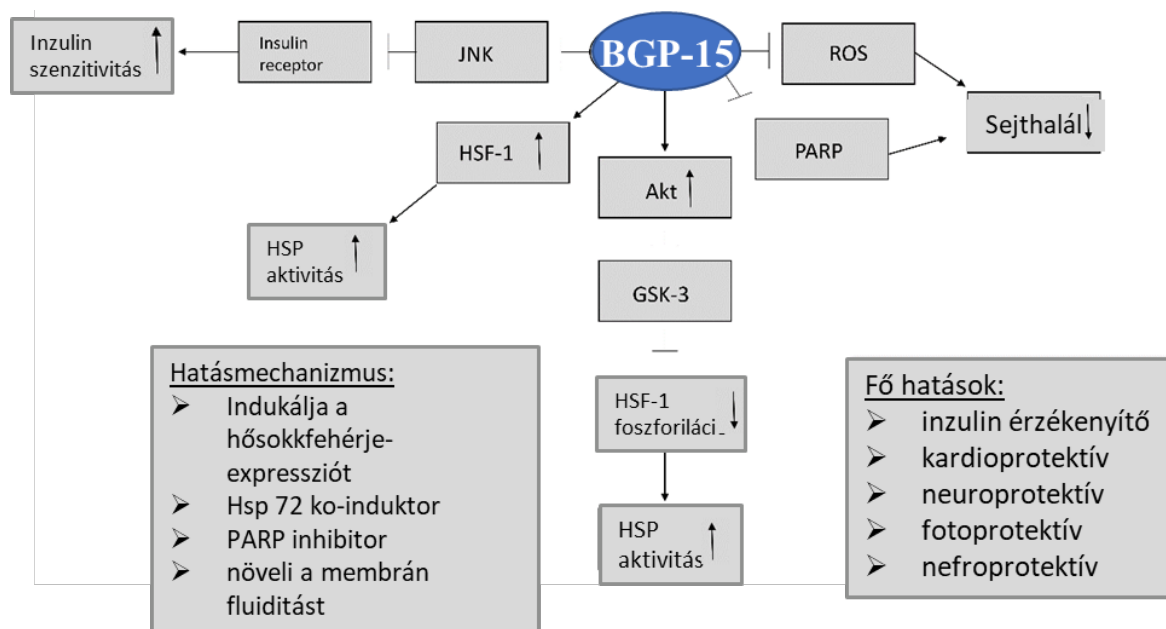
Endothelsejtek *in vitro* vizsgálatában a PACAP ugyanazt az antiapoptotikus és antioxidáns hatást fejtette ki a MAPK jelátviteli út segítségével. Ezt akkor mutatták ki, amikor az endothelsejtek túlélését elősegítette a pro-apoptotikus út aktivitásának csökkentésével és az oxidatív stressz által kiváltott antiapoptotikus út aktivitásának növelésével. Ez bizonyítja az endothelsejtek oxidatív stresszből eredő apoptotikus hatások elleni védelmét, és a PACAP közvetlen kapcsolatát a PAC1 receptor jelátviteli útjaival.<sup>64</sup>

A PACAP stabilitása mindig is érdekes kérdés volt annak fiziológiás szerepének megértése és terápiás alkalmazási lehetőségeinek felmérése szempontjából. A PACAP két aktív formájának molekuláris stabilitását tesztelték, és kimutatták, hogy a PACAP1-38 sokkal stabilisabb, mint a PACAP1-27. Továbbá, a PACAP1-38 oldat fiziológiás sóoldatban vagy vízben 4°C-on (hűtőszekrény hőmérsékleten) viszonylag stabil. Szobahőmérsékleten a PACAP oldatok lebomlást mutattak, így kevés stabil, aktív formában lévő PACAP maradt meg.<sup>67</sup> Tekintve, hogy a PACAP *in vitro* körülmények között szobahőmérsékleten alacsony stabilitást mutat, ez még alacsonyabb stabilitást jelent a 37°C-os emberi testben. Ennek oka a PACAP lebomlása a vér peptidázai által, ami jelentősen rövidíti az *in vivo* felezési idejét, különösen a dipeptidil peptidáz-4 (DPP4) általi degradáció miatt. Ez alapján a PACAP felezési ideje 3-10 perc közöttire becsülhető. Ha a PACAP-ot intravénásan szeretnénk alkalmazni terápiás célokra, további kutatásokra van szükség a kémiai stabilizálás és az enkapszulációs szállítási mechanizmusok területén.<sup>68-70</sup>

Annak ellenére, hogy többféle szerv és szövet tekintetében vizsgálták, az ér-anastomosisok regenerációjára kifejtett hatása nem ismert.

## 2.4.2 A BGP-15

A BGP-15 egy sokoldalú magyar fejlesztésű gyógyszerjelölt, mely az inzulin érzékenyítő tulajdonsága mellett fokozza a hősokk fehérjék, és csökkenti a szabadgyökök termelődését, így gátolva az intrinsic apoptotikus útvonalat. Felfedezése a hősokk fehérjék vizsgálata közben történt, a BGP-15 (C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>HCL) egy vízben jól oldódó, kisméretű molekula (nicotin-amidoxin származék).<sup>71</sup> A BGP-15 gátolja a c-Jun N-terminal kináz (JNK) és p38 mitogénaktivált protein kináz (MAPK) aktivitását, amelyek kulcsfontosságúak a gyulladásos válasz mediálásában. A JNK gátlás révén csökkenti az inzulinreceptor-foszforiláció inhibícióját, javítva az inzulinérzékenységet. LPS-indukált gyulladásos modellekben a vegyület csökkentette a mitokondriális ROS-termelést és stabilizálta a membránpotenciált, valamint elősegítette az oxidatív foszforilációt, melyek különösen jelentősek szív- és idegszövetek regenerációjában.<sup>71-73</sup> Sejtvédő szerepe megnyilvánul a PARP-1 enzim inhibitorizmusában is, ami csökkenti a mitokondriális reaktív oxigénszármazékok (ROS) képződését és a sejthalált. MitoSOX festéssel validálták is, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-indukálta ROS-termelést 20-30%-kal csökkenti, mely különösen fontos krónikus gyulladásos állapotokban, ahol a ROS-szint emelkedett. A ROS-csökkenés és a JNK/p38 gátlás 50%-kal mérsékli a kaspáz-3 aktivációt mely hozzájárul az anti apoptotikus hatásához (5. ábra).<sup>71, 73, 74</sup>



5. ábra

### BGP-15 főbb mechanizmusai

A BGP-15 hatásmechanizmusai középpontjában a stresszfehérjék indukciója, a PARP-1 (poli-ADP-ribóz polimeráz 1) gátlás és a mitokondriális védelem áll. Ezek az útvonalak szinergikusan javítják a metabolikus, kardiovaszkuláris és neuroprotektív funkciókat. ROS - reaktív oxigénvegyületek; HSP – hősokk fehérje; HSF-1 – hősokk fehérje 1; JNK - c-Jun N-terminális kináz; GSK-3 - glikogén-szintáz-kináz-3; (<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/2/429/htm>)

Hatásai igen széleskörűek, például gátolja az 1-es típusú hőszokk fehérje acetilációját (HSF-1), ami emelkedett hőszokk fehérje indukcióhoz vezet, illetve ko-indukálja a Hsp72 hőszokk fehérjét, amely javítja a sejtek stressztűrő képességét és részt vesz a károsodott fehérjék újratermelődésében. Hypertóniás szívmodellekben a vegyület csökkentette a TGF- $\beta$ /Smad jelátvitel aktivitását, ami a kollagénlerakódás és a szívizom fibrosis csökkenéséhez vezetett. A BGP-15 módosítja a koleszterinben gazdag membránalkotók szerveződését, javítva a sejtmembrán fluiditását, ami hozzájárul a sejtek mechanikai stresszel szembeni ellenállóképességéhez.<sup>75-78</sup>

Használhatjuk inzulin rezisztencia kezelésében, illetve protektív hatású Duchenne izom disztrófiában, diastolés dysfunkcióban, tachycardiában, szívelégtelenségben, pitvar fibrillációban, illetve enyhítheti a cardiotoxicitást is. Ezeken túl előnyös hatása a mitokondriális stresszel kapcsolatos betegségekben is. Habár a hatásának pontos mechanizmusa a mai napig ismeretlen, hatásossága megkérdőjelezhetetlen.<sup>71, 78, 79</sup>

Ér-anastomosisok regenerációjára, biomechanikai tulajdonságaira nem ismert a hatása.

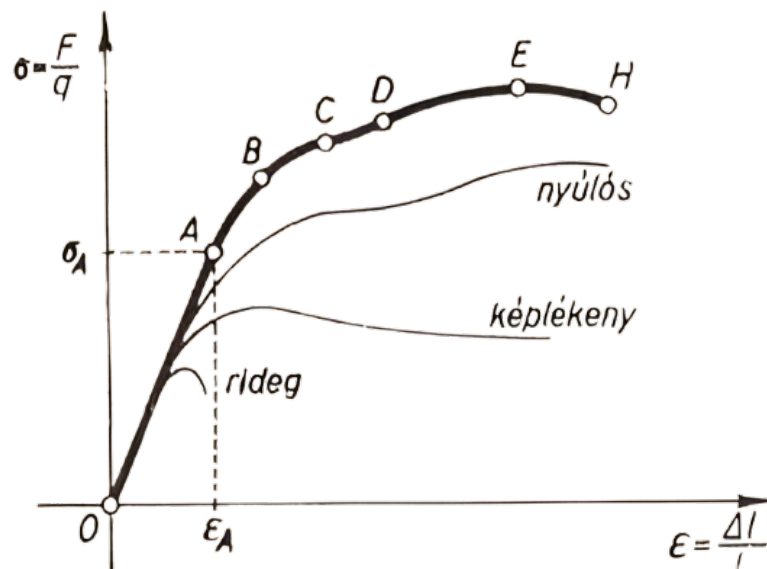
## **2.5 Szakítószilárdság mérése**

Az ér-anastomosisok regenerációjának megértéséhez fontos a biomechanikai tulajdonságok vizsgálata, hiszen az érfal terhelhetősége, struktúrája és a megváltozott hemodinamika közvetlenül befolyásolja a gyógyulási folyamatokat.

Különböző anyagok eltérő fizikai tulajdonságokat mutatnak, mivel szerkezetüket más-más atomi felépítés határozza meg. Az anyagok mechanikai viselkedését alapvetően a molekulák közötti távolságok és az ezekből eredő kölcsönhatási erők szabályozzák. Ezek az erők döntően befolyásolják az anyag szakítószilárdságát, vagyis azt a maximális terhelést, amelynek az anyag szakadás nélkül ellenáll. A szakítószilárdság meghatározása során valójában a molekulák közötti kölcsönhatások összességét vizsgáljuk. A méréshez szabványosított, homogén szerkezetű „próbatesteket” alkalmazunk, amelyekre pontosan szabályozott húzóerőt fejtünk ki. A szakítószilárdság számértéke megadja, hogy mekkora erő (newton) szükséges az anyag egységnyi keresztmetszetének (m<sup>2</sup>-ben) szétválasztásához. Ezt az értéket pascal (Pa) egységben adjuk meg, amely a nyomás mértékegységként is ismert. A próbatestek szakítása során tehát nem csupán az anyag külső tulajdonságait, hanem annak mélyebben rejlő szerkezeti sajátosságait is feltárjuk, ami lehetővé teszi az anyagok viselkedésének pontosabb előrejelzését különböző terhelési feltételek mellett.<sup>81, 82</sup>

Amikor rugalmas próbatestre húzóerőt fejtünk ki, a molekulák közötti távolság növelésére törekszünk. Hooke törvénye szerint a húzal megnyúlása egyenesen arányos a

kifejtett húzóerővel ( $F$ ) és a huzal hosszával ( $l$ ) ugyanakkor fordítottan arányos az anyag keresztmetszeti felületének nagyságával ( $q$ ).<sup>82</sup> Ez azonban csak bizonyos határig érvényes, amíg el nem érjük az „arányossági határt” (6. ábra, A pont). Ezt követően a növekvő feszülés az anyagot az arányosnál nagyobb mértékben nyújtja. Rövid szakasz után elérjük a „rugalmassági határt” (6. ábra, B pont), amelyen túl az anyag maradandóan deformálódik, és nem tér vissza eredeti hosszára. A „folyási határ” (6. ábra, C pont) elérése után az anyag képlékenyé válik, a plaszticitása növekszik, és ezen a majdnem vízszintes szakaszon kis alakváltozás is jelentős maradandó deformációt okoz. A „felkeményedési szakasz” (6. ábra, D pont) elérésekor az anyag ismét merevebbé válik, és a további nyúlás ismét növekvő feszültséget igényel, amíg el nem érjük a maximális terhelhetőséget (6. ábra, E pont), vagyis a „szakítási szilárdságot”. Ezen a ponton az anyag keresztmetszete gyorsan csökken, végül egy ponton (6. ábra, H pont) hirtelen elszakad. Különböző anyagok diagramjai eltérőek az egyes szakaszok hosszában (6. ábra, A-H). Nyúlékony anyagoknál (pl. réz, alumínium) a rugalmas szakasz (6. ábra, 0-B) dominál. Képlékeny anyagoknál, például ólomnál vagy agyagnál, a „plasztikus szakasz” (6. ábra, C-D) a kifejezettebb. Rideg anyagok (üveg, öntöttvas) esetében viszont nincs folyáshatár, és az anyag a rugalmassági határ után azonnal eltörik.<sup>81-85</sup>



**6. ábra**

**Reprezentatív feszültség-megnyúlás diagram.**

A feszültség ( $\sigma = F/q$ ) - és relatív megnyúlás ( $\epsilon = \Delta l/l$ ) összefüggését mutató ábra, amely a különböző anyagok viselkedését és mechanikai tulajdonságait mutatja. A: arányossági határ; B: rugalmassági határ; C: folyási határ; D: felkeményedési szakasz; E: szakítási szilárdság;

H: próbatest elszakadása

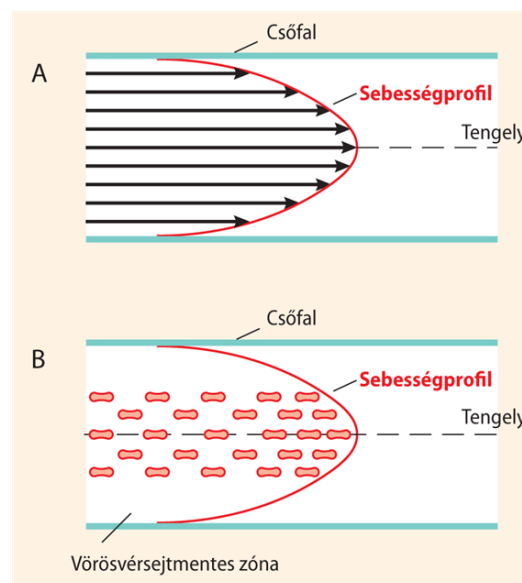
(Budó és Pócza, 1970 nyomán módosított ábra)

Kis erek és microvascularis anastomosisok szakítószilárdságát eddig kevésbé vizsgálták, annak ellenére, hogy objektív adatot szolgál az adott szövet mechanikai integritásáról. Ez egy elfogadott, könnyen reprodukálható, standardizálható, gyorsan elvégezhető vizsgáló módszer, melyet az izom, bőr és bél varratok vizsgálatára már számtalanszor alkalmaztak.<sup>86-89</sup>

## 2.6 Haemorheológiai paraméterek

A haemorheologia görög eredetű szó, a vér és annak sejtes, valamint plazmatikus alkotóelemeinek a makro- és mikroszkópikus áramlástanával, illetve a vele kölcsönhatásba lévő érfal alakváltozásával foglalkozó tudományág.<sup>90</sup> Fiziológiástól való eltérése rontja a szövetek perfúzióját és különböző betegségekkel szembeni ellenállóképességet. Ezen tudományágon belül megkülönböztetünk macro- és micro-rheológiai paramétereket a nagy- és kis-erekben fellépő viszonyoknak megfelelően.<sup>91-93</sup>

A micro-rheologia területéhez tartoznak a szervezetünk legkisebb átmérőjű erei (maximálisan 100µm), tehát az arteriolák, prae-capillaris arteriolák, metarteriolák, arterio-venosus anastomosisok, capillárisok és postcapillaris venulák. Ugyanakkor mégis ezen hálózathoz tartozik a legnagyobb vaszkuláris összfelület.<sup>92-94</sup> A vér áramlása során kapcsolatba kerül az érfallal és úgynevezett „reális folyadékként” viselkedik. Ez azt jelenti, hogy a folyadék belső, tehát sejtek közötti, valamint az érfallal szembeni súrlódását nem hanyagolhatjuk el. Ebből következik, hogy az egyes folyadékrétegek közötti súrlódás révén a rétegek sebessége különböző (7. ábra), így csupán az egyes rétegek átlagsebességét lehet megadni az adott ér keresztmetszetén. Ezt a jelenséget lamináris áramlásnak nevezzük, melynek kialakulása



7. ábra

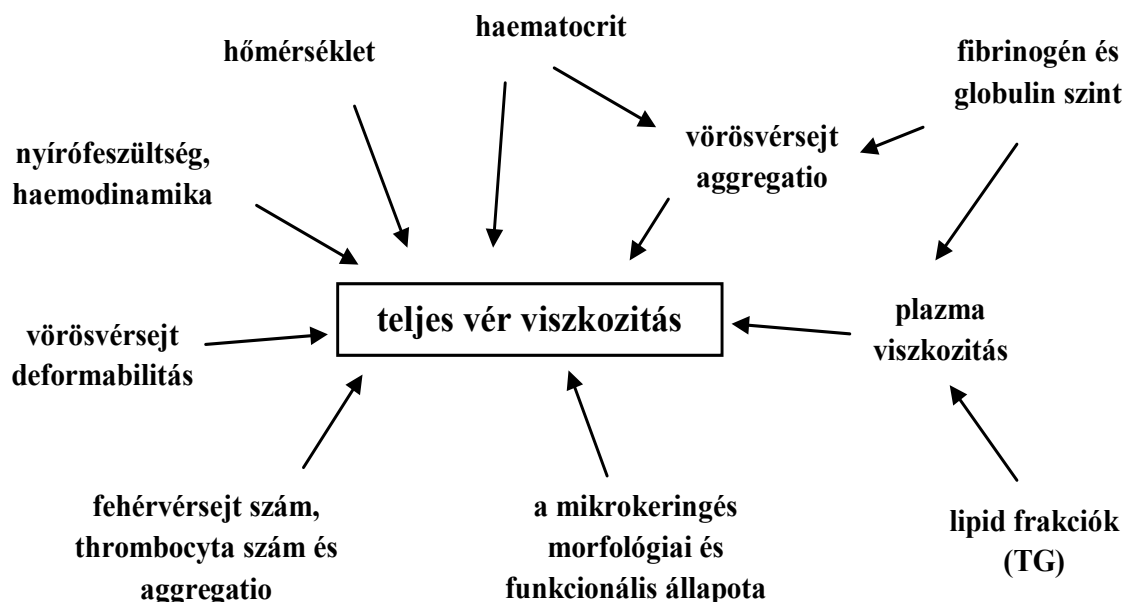
### A vér áramlása

Legnagyobb áramlási sebesség centralisan, míg a legkisebb a fal mellett; A: Lamináris áramlás, B: A vörösvérsejtek a legnagyobb átmérőjükkel az áramlás irányába rendeződnek.<sup>96</sup>

nagyban függ a maximális áramlási sebességtől, illetve a vér sűrűdésétől, tehát a viszkozitásától és sűrűségétől.<sup>95,96</sup>

A Hagen-Poiseuille törvény szigorú értelemben csak a vékony, hosszú, merev falú csövekben történő nem pulzáló lamináris áramlás leírására alkalmas, úgynevezett newtoni folyadékok (a folyadék viszkozitása a sebesség gradienstől függetlenül konstans) esetén, ugyanakkor jó közelítéssel alkalmazható az erekben történő áramlási viszonyok jellemzésére is. Az egyenlet kimondja, hogy a folyadék áramlási intenzitása (Q, adott idő alatt átfolyó vér mennyisége) egyenesen arányos a perfúziós nyomással (P1 – P2, a cső kezdeti és végpontja közötti nyomáskülönbség), a cső sugarának (r) negyedik hatványával és a párhuzamosan kapcsolt, azonos keresztmetszetű csövek számával (N), és fordítottan arányos a cső hosszával (l) és a viszkozitással (η):  $Q = ((P1-P2)*N*\pi*r^4) / (8*l*\eta)$ . A szervezet önreguláló mechanizmusai révén, mint amilyen a vasomotoros működés is, képes befolyásolni a perifériás ellenállást, amin keresztül közvetve az áramlási sebességre is hatással van.<sup>95,96</sup>

A haemorheologia egyik lényeges tényezője a teljes vér viszkozitása, melyet különböző patológiás folyamatok döntően képesek befolyásolni, így változtatva meg az áramlási viszonyokat.<sup>91-94</sup> A viszkozitást több paraméter is befolyásolja (8. ábra), melyek között megkülönböztetünk „külső” és „belső” faktorokat. A külső tényezők közé tartozik a hőmérséklet és a vasculáris morfológia által befolyásolt tényezők, mint amilyen a sebesség-gradiens, és a nyírófeszültség.

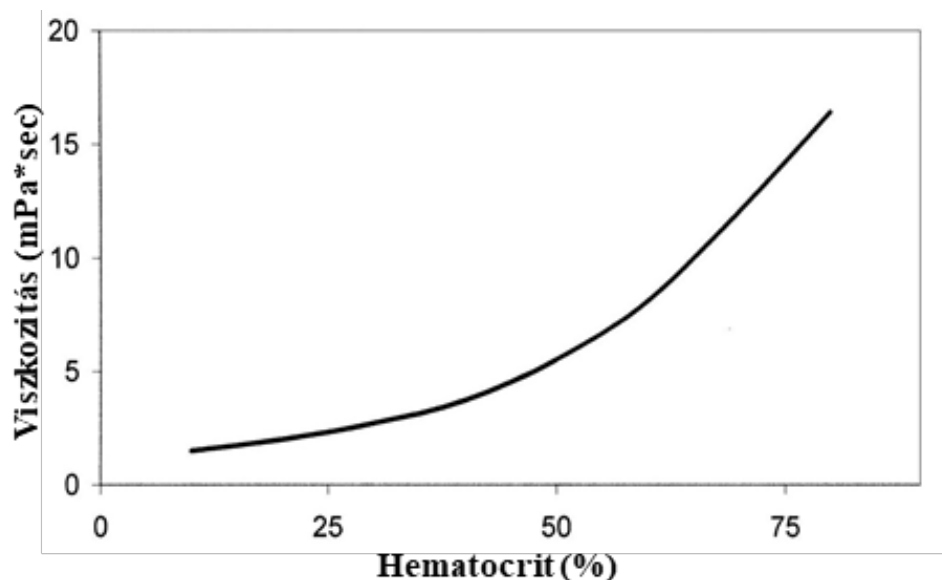


**8. ábra**  
Teljes vér viszkozitását befolyásoló tényezők<sup>97</sup>

Mivel a nyíróerő és a viszkozitás fordítottan arányos, így a nyíróerő növekedésével fokozatosan csökken, a csökkenő sebesség-gradiens hatására pedig növekszik a viszkozitás

mértéke. Magas nyíróerők hatására fellépő nyírósebességek ( $100-200 \text{ sec}^{-1}$ ) mellett  $37^\circ\text{C}$ -on a vér viszkozitása 4-5 Centipoise (cP), mely a nyíróerők további növekedésére már alig csökken.  $100 \text{ sec}^{-1}$  alatti nyírósebesség esetén viszont a viszkozitás mértéke exponenciálisan növekszik,  $10 \text{ sec}^{-1}$ -nél 10 cP,  $1 \text{ sec}^{-1}$ -nél 20 cP,  $0,1 \text{ sec}^{-1}$ -nél pedig már 100 cP.<sup>92</sup>

Mivel a vér valójában egy kétfázisú folyadék, így a viszkozitását a plazma és a sejtés elemek összessége is befolyásolja, melyek „belső” tényezőkként szerepelnek. A plazma szuszpendáló közegként viselkedik a sejtés elemek számára, így közvetlenül befolyásolja a viszkozitást. Fő alkotóeleme a víz (93%), melyben oldva található a fehérjék, glükóz, véralvadási faktorok, hormonok és széndioxid. A plazma viszkozitása newtoni folyadékoknak megfelelően változik ( $37^\circ\text{C}$ : 1,1-1,35 cP). Patológias folyamatok (pl. szöveti sérülés) során, az akut fázis reakciók révén, a növekvő plazmafehérje mennyiség következményeként a mértéke növekszik. Itt kiemelendő a fibrinogén jelentősége, valamint, hogy paraproteinémiák során akár 5-6 cP-re is növekedhet a viszkozitása.<sup>92, 98, 99</sup> A sejtés elemek a fellépő lamináris áramlás során zavarják az áramvonalakat, így leginkább a morfológiai és mechanikai tulajdonságaik járulnak hozzá a teljes vér magasabb viszkozitásához. Mivel az alakos elemek közül a vörösvérsejtek száma nagyságrendekkel több, így a hematocrit érték kiemelt szereppel bír (9. ábra). A sejtés elemek közül az egyik legfontosabb befolyásoló tényező a vörösvérsejtek fizikai tulajdonsága, azaz a deformálhatóságuk és az aggregációs képességük.<sup>93, 94</sup>



9. ábra

**Viszkozitás és a hematocrit összefüggése**

Fiziológias hematocrit érték tartomány (~45%) felett exponenciálisan nő a viszkozitás.<sup>94</sup>

A deformabilitás és hematocrit értékek a magas nyíróerő esetén, míg az aggregáció alacsony nyíróerőnél befolyásolja jelentősen a vér viszkozitását. Ezen kívül még fontos tényező lehet a fehérvérsejtek, illetve a trombociták mennyisége és aggregációja is.<sup>92</sup>

A mikrokeringés során akár 3-4  $\mu\text{m}$ -es belső átmérőjű kapillárisokon is át kell jussanak a 7-8  $\mu\text{m}$  átmérőjű és 2  $\mu\text{m}$  vastagságú bikonkáv alakú vörösvérsejtek. A fiziológias sejtek a nagy nyíróerő hatására „irányba állnak” és közben az alakjuk deformálódik (vízcsepp forma). Ezen mechanizmusok közvetlenül képesek befolyásolni a viszkozitást, valamint a mikrokeringést, hiszen a kisméretű kapillárisok által ellátott területek (pl. szívizomzat) oxigénellátottsága függ tőle.<sup>92, 100</sup>

A vörösvérsejtek átlagos élettartama 120 nap, körülbelül ennyi ideig képesek ellátni a fiziológias feladatukat. Elsődlegesen a lép (és a máj) feladata, hogy a „mikrokeringés felügyelőjeként”, a kapillárisaiban található vörös pulpa makrofágok révén kiszűrje az elöregedett, csökkent deformabilitású sejteket.<sup>96, 101</sup> Fiziológias körülmények között a sejtek alakváltozásának képessége a külső hatásokkal szemben reverzibilis, azonban a sejtek membránjának a rugalmassági határa feletti erők maradandó, végzetes károsodásokat okozhatnak.<sup>92, 93, 96</sup> Ilyen erők léphetnek fel szívbillentyűk, graftok, erőltetett menetelés (March hemoglobinuria), vagy akár extracorporális keringtetés során. Fiziológias körülmények között 15 Pa körüli nyírófeszültség éri a vörösvérsejteket, azonban már 100 Pa mértékű, többször ismétlődő behatás is képes hemolízist indukálni, míg a testen kívüli vérkeringtetés során akár 1000 Pa is érheti a sejteket.<sup>102-104</sup>

A vörösvérsejtek alakváltozási képességéhez elsődlegesen a membránt alkotó, tisztán viszkózus lipid kettős réteg és az alatta elhelyezkedő citoszkeleton felelős.<sup>105, 106</sup> A citoszkeleton felépítő fehérje hálózat integritása (spectrin lehorgonyozva band 3 és glycophorin proteinekhez) határozza meg a bikonkáv elasztikus morfológiát.<sup>107, 108</sup> A strukturális adottságokat (deformabilitás), a sejtek aktívan is képesek befolyásolni a membráncsatornákon (pl. az intracelluláris kalciumszint növekedése csökkenti) keresztül. Az ATP függő káliumcsatornák pedig hozzájárulnak a sejt megfelelő térfogatához.<sup>109</sup> A sejtek felszín/térfogat arányának fiziológiástól való eltérése, valójában nagyobb mértékben képes befolyásolni a kapillárisokon történő átjutást, mint a citoszkeleton rigiditásának változása.<sup>110</sup> A vörösvérsejtek deformabilitását a membrán elaszticitása és viszkozitása mellett több paraméter is befolyásolja. Ilyen a citoplazma viszkozitása (hemoglobin koncentráció) és a specifikus bikonkáv forma, tehát a deformálódásnak helyet adó, adott térfogatnak fokozottabb szabadságot biztosító felszín.<sup>93, 111</sup> A deformabilitás romlása, a vörösvérsejtek kisebb átmérőjű

erekben történő fennakadását eredményezheti, mely az adott szövetek perfúzióját rontja, különböző patológiás folyamatokat okozva.<sup>92, 93, 112</sup>

Ha a vörösvérsejtekre nem hatnak nyíróerők (stasis), vagy nagyon alacsony sebességgel áramlanak (nyírósebesség kevesebb mint 1 s<sup>-1</sup>), akkor reverzibilis módon kapcsolódnak össze, tehát aggregálódnak. Ilyenkor jellegzetes „pénztekercs” (rouleaux) formációt alakítanak ki. Az áramlás intenzitás növekedésének hatására a változatos konglomerátumok képesek feloszlani kisebb darabokra, akár sejtekre.<sup>111, 113</sup> A tekercsek és a tekercseket alkotó vörösvérsejtek száma változó, összefüggést mutat a makromolekulák jelenlétével, különösképpen a fibrinogénnal, melynek emelkedett szintje a gyulladásos folyamatok során serkentheti a vörösvérsejt aggregációt.<sup>114</sup> A sejtek összekapcsolódására két elmélet elfogadott. A „bridging” modell szerint a különböző makromolekulák (*in vivo* proteinek, globulinok pl. fibrinogén, vagy *in vitro* polimerek pl. dextrán) képesek nem kovalens kötések kialakítására. Ekkor „hidakat” képeznek az egymáshoz közel került vörösvérsejtek membránjai közt.<sup>115</sup> A másik elmélet szerint („depletion”), a közel kerülő sejtek között makromolekula szegény övezet alakul ki, mely megváltozott ozmotikus gradienssel jár és segíti a sejtek összetapadását.<sup>113</sup> Mind a két elmélet lényege, hogy a sejtek elaszticitása és az elektrosztatikus taszítása (sejtburok (glycocalyx) netto negatív töltése), valamint a mechanikai nyíróerők, tehát a disaggregáló erők, nem képesek a sejteket egymástól szeparálva tartani.<sup>92, 114, 116</sup>

Vörösvérsejtek aggregációs romlását számos patológiás folyamatban leírták, melyek a mikrokeringés romlásával járnak. Ilyenek lehetnek a bakteriális betegségek során végbemenő akut fázis reakciók, cukorbetegség vagy akár a hemoglobinopathiák okozta, vörösvérsejteket érő fokozott oxidatív stressz.<sup>94, 115</sup> Ugyanakkor a vörösvérsejtek aggregációja a megfelelő fiziológiai áramlási dinamikához is hozzájárul. A postcapillaris venulák területén az érpálya közepére sodródott nagyobb mennyiségű aggregátum létrehoz egy sejtmentes övezetet (Poiseuille-zóna), így csökkentve az áramlási ellenállást az érfallal szemben.<sup>92, 93, 118</sup>

### 3 CÉLKITŰZÉSEK

1. *In vivo* modell kidolgozása, amellyel vizsgálhatjuk a microvascularis ér-anastomosisok regenerációs folyamatait
2. Érvarratok mechanikai integritásának (szakítószilárdságának) objektív vizsgálata, készülék továbbfejlesztése
3. A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) hatásának követéses vizsgálat során az anastomosisok „érésére”
4. A BGP-15 hatásának vizsgálata az anastomosisok gyógyulására
5. Kvalitatív és kvantitatív adatok gyűjtése a szövetek intraoperatív nem megfelelő nedvesítésének jelentőségéről

## **4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **4.1 Kísérleti engedély**

A kísérleteinket a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (1998. évi XXVIII. törvény „Az állatok védelméről és kíméletéről”) és az Európai Unió állatkísérleteket érintő (63/2010 EU-irányelv) előírásainak megfelelően végeztük. Kutatási tervünk regisztrálásra és jóváhagyásra került a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság (engedély regisztrációs szám: 21/2022/DEMÁB) által.

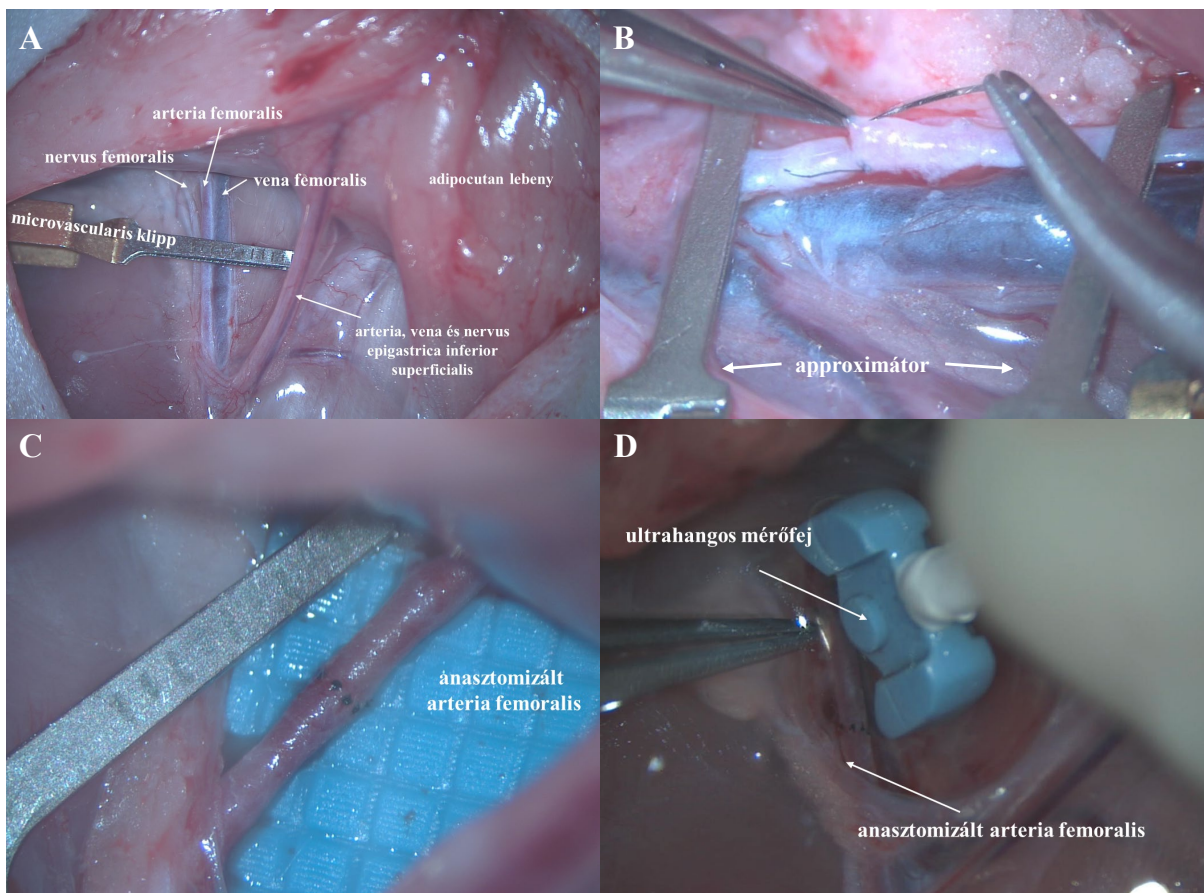
### **4.2 Kísérleti állatok és felhasznált gyógyszerek**

Hím Wistar (CrI:WI) patkányokat (Toxi-Coop Zrt., Budapest, Magyarország) vontunk be a vizsgálatainkba. Az állatok hat hetes korukban érkeztek a Tanszék állatházába, ahol 2-3 hétig akklimatizálódtak. Az előkészítés során az állatok tömegét lemértük, majd ennek megfelelően általános érzéstelenítésben részesítettük az egyedeket Ketamin-Xilazin kombinációjával (100 mg/kg; 10 mg/kg).<sup>119</sup> Trombózis megelőzésére heparint (HEPARIBENE, Teva Gyógyszergyár Zrt., Debrecen), adtunk a laterális farokvénán keresztül (80 NE/kg). A posztoperatív fájdalomcsillapítás érdekében a hagyományos NSAID-okat kizártuk, hogy a gyógyulási folyamatokat egyéb ráhatás nélkül értékelhessük, ezért Tramadolt (15 mg/testsúlykg/nap) alkalmaztunk intraperitoneálisan a műtét végén és az első három posztoperatív napon.<sup>120</sup>

### **4.3 Műtéti protokoll**

A műtéti területeket depiláltuk és fertőtlenítettük (Betadine, Egis Gyógyszergyár Zrt., Budapest). A jobb hátsó végtag belső combján, a ligamentum inguinale szintje alatt és azzal párhuzamosan körülbelül 4 cm hosszú bemetszést ejtettünk. A mikrosebészeti beavatkozásokhoz ALPHA ENT-4A (Elektro Optika, Érd, Magyarország) mikroszkópot használtunk. Az artéria körüli zsíros kötőszövetet kipreparáltuk a lágyékszalagtól egészen az a. saphena és az a. poplitea eredéséig, elválasztva a vena femoralistól és az idegektől. Az arteria, vena és nervus epigastrica inferior superficialis (PACAP kezelt állatok esetén ezek a képletek átvágásra kerültek), illetve a vena és nervus femoralis és azok oldalágait funkció megőrző módon atraumatikusan kezeltük és szükség esetén a képletek sérülése nélkül félre húztuk őket. Az approximátor egyik klippjét a ligamentum mellé, a másikat pedig a femoralis artéria distális elágazása elé helyeztük. A kettő között ollóval merőlegesen átmetszettük az eret. Heparinos bemosást követően (~0,4 mL, 2500 NE/mL) fiziológiás sóoldattal öblítettünk és gézt használtunk a felesleg felszívására. A minimális adventitia eltávolítását követően, a nyolc

egyszerű csomós öltést poliamid-6 monofil varróanyaggal (Daclon, SMI, Vith, Belgium) készítettük, amely 10/0 szerozatút tartalmazott. Az érszegélyek megfelelő egymáshoz illesztése érdekében az átellenesen elhelyezett két tartóöltés segítségével elkülönítettük az ér elülső és hátsó falát. A tartóöltéseket úgy vágtuk le, hogy az egyik szálát hosszabbra hagytuk (~ 3 mm), míg a másikat közvetlenül a csomó mellett vágtuk le. A megmaradt hosszabb szálát felhasználva óvatosan manipuláltuk az érszegélyt, hogy azok megfelelően illeszkedjenek egymáshoz, könnyítve a megfelelő öltés mélységének és távolságának kialakítását. Ezt követően a tartóöltések felezőpontjában alkalmaztunk egy új középső tartó öltést, majd pedig további egy-egy felezőöltést a középső és a tartóöltések között (10. ábra, A-C).



**10. ábra**

**Főbb műtéti lépések**

Műtéti terület preparálása (A), tartóöltések behelyezése (B), elkészült anasztomosis (C), véráramlás mérése (D)

Miután elkészült az elülső fal, a varróanyagot minden öltésnél (kivéve a szélső tartóöltéseket) a csomó mellett levágtunk. Az approximátor átfordításával és a két szélső tartóöltés megfelelő pozícionálásával előtárult a hátsó fal, amelybe hasonló módon helyeztünk el további három öltést. Végül a két szélső tartóöltés hosszabb szálait is levágtuk a csomó mellett. Ez az egyszerű, de gondosan kialakított csomós technika lehetővé teszi az érvégek pontos illeszkedését és könnyű manipulációt a műtét során.<sup>4, 5, 121</sup> Az approximátor eltávolítását

követően általában csak enyhébb szivárgás volt megfigyelhető. Az anastomosis átjárhatóságát minden esetben „Milking-tesztel” ellenőriztük.<sup>4, 5, 30</sup> A BGP és deszikkációs erek esetében az áramlás kvantitatív is vizsgáltuk (T206, Transonic Systems Inc., USA) (10. ábra D).

Műtét végén a seb szélét betadinos gézzel letöröltük, és a bőrt horizontális tovafutó matracvarrattal zártuk. A követési időszak alatt naponta sebkontrollt végeztünk, szükség esetén Betadinos sebápolást végeztünk.

#### **4.4 Mintavételi protokoll**

Laboratóriumi mérések céljából preoperative, valamint a műtét utáni 7., 14. és 21. napon a laterális farokvénát kánüláltuk (26 G), amelyen keresztül 0,5 ml vért vettünk (K3-EDTA, Vacutainer®, Becton Dickinson GmbH, Franklin Lakes, NJ, USA), majd 0,8 ml fiziológiás sóoldattal visszamosztunk. A műtét végén a kánül eltávolítását követően subcutan további 1 ml fiziológiás sóoldatot adtunk folyadékpótlásként.

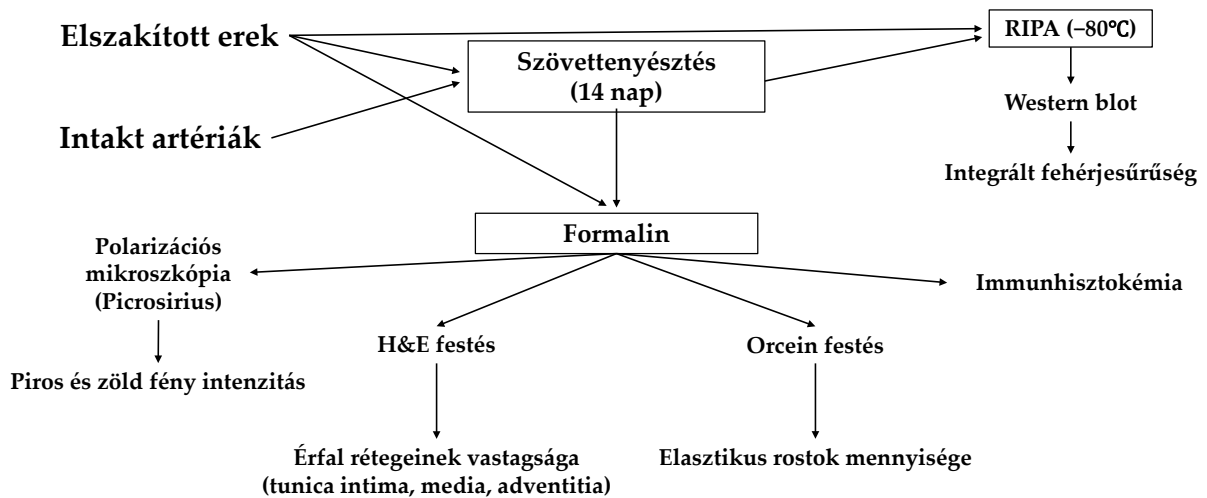
A háromhetes követési időszak végén a meghatározott szövetmintákat (anastomizált és ép, ellenoldali arteria femoralis; deszikkációs kutatás esetén az arteria és vena epigastrica inferior superficialist is) eltávolítottuk, és az állatokat túlaltattuk. A femoralis artériákat a belső iliaca ágától a poplitealis elágazásig preparáltuk. Az ereket az eltávolításukat követően a lehető leghamarabb szakítószilárdság mérésnek vetettük alá. Az állatoknak intravénásan Ketamin-Xilazin oldatot (50 mg/ttkg; 5 mg/ttkg) adtunk, miután mindkét ér eltávolításra került, hogy a tömény oldat ne befolyásolhassa a vizsgálati eredményeket.

#### **4.5 Kísérleti csoportok, kiegészítő lépések**

##### ***4.5.1 PACAP 1-38 érgyógyulásra kifejtett hatásának vizsgálata***

Harmincnégy Wistar hím patkányt ( $321,23 \pm 37,1$  g) véletlenszerűen SHAM (n = 8) BP (bioplast, vérzéscsillapító szivacs) (n = 8), PACAP (n = 8) és PACAP + BP (n = 8) csoportokba osztottuk a kezeléseknek megfelelően. A kutatás során eltávolított szövettani minták sorsa a 11. ábrán látható. A PACAP csoportok 0,2 µg PACAP 1-38-at (100 µg/fiola, amelyet a Szegedi Egyetemről Tóth Gábor professzor biztosított) kaptak kétnaponta (az első kezelés közvetlenül a műtét után), amelyet 0,2 ml fiziológiás sóoldatban oldottunk fel és adtunk be, majd további 0,2 ml fiziológiás sóoldattal öblítettük a kánült. A többi csoport szintén 0,4 ml fiziológiás sóoldatot kapott kétnaponta a beadási ponton keresztül. Az bioplast (BP) csoportok kialakításakor egy 3 × 4 mm-es Spongostan Standard™ (Raritan, Franklin Township, NJ, USA) hemasztatikus szivacsdarabot helyeztünk az anastomosis köré. A PACAP + BP csoport

esetében a PACAP első adagját közvetlenül a szivacsra injektáltuk a műtét végén, majd ezt követően sebet zártunk (4/0 poliglikolsav, Surgicryl Rapid, SMI, Vith, Belgium).

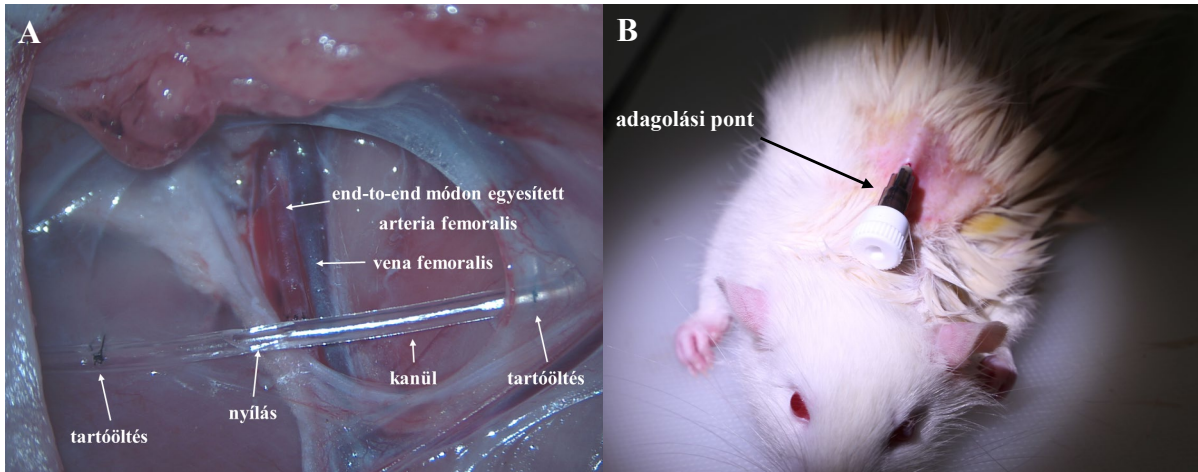


**11. ábra** A szövetminták előkészítésének és a vizsgálatoknak a protokollja.

A farmakonokkal történő kezelésére több opció is felmerült a kutatásunk során. A farmakon beadásának egyik lehetséges módja a farokvénán történő bejuttatás. Ezen módszer a szisztémás terhelés mellett a PACAP alacsony felezési ideje miatt is elvetésre kellett kerülnön. A lokális kezelés elérése érdekében elsőként a lokális injekciós bejuttatás merült fel, ami viszont a nem megfelelő standardizálhatóság miatt lett elvetve. Ezek mellett állat etikai szempontból is lényeges kiemelni, hogy mind a két módszer az állat kétnaponkénti jelentős stresszelésével és/vagy altatásával járt volna.

Ezeket átgondolva, saját készítésű kanülök mellett döntöttünk, melyet nagy pontossággal az érhez lehet vezetni a subcutan térben, másik végénél pedig az állat által nem elérhető lokalizációban (két elülső lapocka közè) egy adagolási pontot alakítottunk ki, így biztosítva a stresszmentes lokális kezelést. Egy tompa hegyű 22G 1× (Neoject, Dispomed GmbH&Co. KG, Gelnhausen, Németország) tűt helyeztünk egy 20 cm hosszú polietilén (Polyethylene Tubing, Clay Adams, 427411, BD Intramedic™, Sollentuna, Svédország) csőbe (0,965 mm külső átmérő, körülbelül 0,05 mL térfogat). Ezt egyenként az állatok méretéhez igazítottuk a műtét során, figyelembe véve, hogy a rágcsálók gyakran összegömbölyödve pihennek. A rögzítés biztosítása érdekében a tú merevítő szárnyain mindkét oldalon 2 mm-es fúrófejjel lyukat fúrtunk. Az előkészítés után a belsejét és a külsejét Betadinnal fertőtlenítettük, majd fiziológiás sóoldattal öblítettük ki a behelyezés előtt. Az ágyéki régióból egy csatornát készítettünk egy Lumniczer segítségével subcután az állat hátán keresztül a lapockák közé nyírt területig, ahol bemetszést ejtettünk, és behelyeztük az előkészített kanült. A sebet a tű felett és alatt Donati öltésekkel (4/0 poliglikolsav, Surgicryl Rapid, SMI, Vith, Belgium) zártuk, és a tűt

két egyszerű lengőcsomóval (3/0 selyem, fonott, SMI, Vith, Belgium) rögzítettük. A kanül másik végét az ér fölé (~1 cm) vezettük, és három ponton rögzítettük a környező szövetben (8/0 poliamid-6, monofil, Vitrex, Herlev, Dánia). Végül a kánülön egy lyukat ( $1,05 \pm 0,034$  mm) vágunk közvetlenül az anastomosis felett a lokális kezelés céljából (12. ábra).



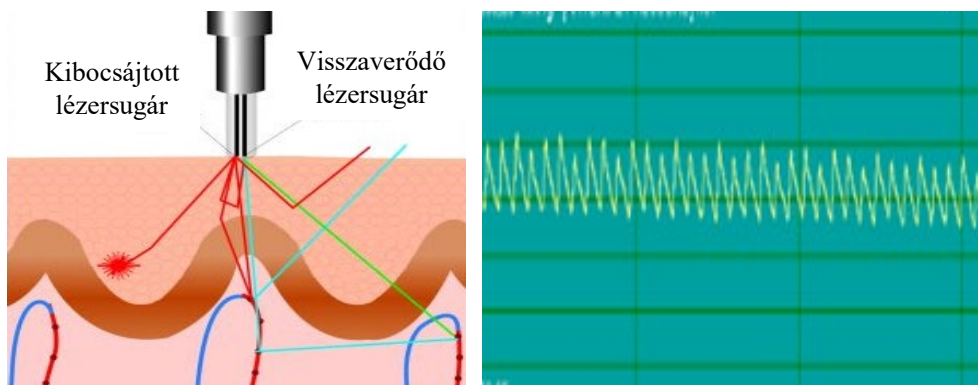
**12. ábra**

**Lokális kezelés kialakítása kanül segítségével**

Műtéti területen rögzített kanülvégen, az anastomosis felett, egy kis nyílást ejtettünk (A), Másik végét a lapockák között rögzítettük, kialakítván egy adagolási pontot (B)

**4.5.1.1 Microcirculatiós mérések**

Mikrocirkulációs méréseket végeztünk a műtét előtt, 3 perccel az artériás leszorítás után, a műtét végén, a 7., 14. és 21. napon a patkányok lábfejének laterális oldalán lévő disztális lábduor alsó részén. LD-01 Laser Doppler áramlásmérőt (Experimetria Rt., Budapest, Magyarország) használtunk, standard „pencil probe” szondával (MNP100XP, Oxford Optronix Ltd., Adderbury, Egyesült Királyság). Ez a készülék a vizsgált szövetterület (kb.  $1 \text{ mm}^3$ ) mikrokeringéséről egy relatív paramétert (véráramlási egység, BFU) szolgáltat, amelyet a mozgó vörösvérsejtek sebessége és száma folyásol be, azok iránya nem (13. ábra, A).<sup>122</sup>



**13. ábra**

**Laser Doppler működési elve<sup>122</sup> (A) és egy reprezentatív mérési görbe (B)**

Minden mérésnél egy 20 másodperces BFU felvételt átlagoltunk (13. ábra, B). A mikrocirkulációs mérési pontokon ellenőriztük a bőr hőmérsékletét is (ri-thermo® N professional Clinical Thermometer, Riester, Phoenix, USA).

#### 4.5.1.2 Szövettenyésztés

A szövettenyésztő helyiségben végzett előkísérlet során véglegesített tenyésztési eljárás alapján a levágott erek egy részét HG-DMEM táptalajban tenyésztettük (Dulbecco-féle módosított Eagle-táptalaj, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), amelyet 10% FCS-vel (magzati borjúsavó; Gibco, Gaithersburg, MD, USA), valamint antimikrobiális szerekkel (penicillin, streptomycin, ampicillin, fungizone + aszkorbinsav) egészítettünk ki. Az érdarabokat Petri-csészékbe helyeztük (Eppendorf, Hamburg, Németország), majd 37 °C-on, 5%-os CO<sub>2</sub>-tartalmú, 95%-os páratartalmú inkubátorban 14 napig tenyésztettük. A tenyésztés során egyes mintákat PACAP-pal kezeltünk (10 µL PACAP, 10 nmol/L koncentráció) 48 óránként, az adott csoportnak megfelelő táptalajcserék időpontjai szerint. Ezek az erek olyan állatokból származtak, amelyek korábban a SHAM, vagy a kezelcsoporthoz tartoztak *in vivo*. Az ép és anastomisált artériák mellett PACAP-ot teszteltünk egy olyan csoporton is (ép artériák, mint viszonyítási alap), amely frissen preparált, mechanikai sérülés nélküli ereket tartalmazott. Két patkányból négy arteria femoralist preparáltunk, majd ezeket mikrosebészeti ollóval félbevágtuk. Ezek az érdarabok méretükben hasonlóak voltak a kettétépett ér darabokhoz (megközelítőleg 4 mm). A kísérletekhez az erek proximális és disztális részeit egyenlő arányban használtuk fel. Az *in vitro* kísérletek során ugyanazokat a kezeléseket folytattuk az egyes erekben, mint az *in vivo* kísérletekben, kivéve a viszonyítási alapként szolgáló csoportot, amelyet *in vivo* nem szakítottunk szét és nem is kezeltünk.

#### 4.5.1.3 Immunhisztokémia

Az erekben az I-es típusú kollagén és az elasztin lokalizációját vizualizáltuk. Az érmintákat 4%-os formaldehidben fixáltuk, majd 70%-os etanolban mostuk. A beágyazás után sorozat metszeteket készítettünk, melyeket paraffinból való eltávolítás követett, majd PBS-ben (pH 7,4) történő öblítés következett. A nem specifikus kötődési helyeket 1% szarvasmarha szérumalbumint (BSA; Amresco LLC, Solon, OH, USA) tartalmazó PBS-sel blokkoltuk. Ezt követően a mintákat 1:500-as hígítású monoklonális I-es típusú kollagén elleni (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), valamint 1:1500-as hígítású poliklonális elasztin elleni (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ellenanyagokkal inkubáltuk 4 °C-on, egy éjszakán át. Az elsődleges ellenanyagok vizualizálásához anti-nyúl Alexa Fluor 555 másodlagos ellenanyagot (Life

Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) használtunk 1:1000-es hígításban. A mintákat DAPI-t tartalmazó Vectashield fedőközegbe (Vector Laboratories, Peterborough, UK) helyeztük a sejtmag DNS megfestéséhez. A negatív kontrollokhoz csak az anti-nyúl Alexa Fluor 555-öt használtuk, elsődleges ellenanyag nélkül. A fénymikroszkópos felvételek DP74 kamerával (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) készültek Olympus Bx53 mikroszkópon (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). A képek rögzítéséhez a Cell Sense Entry 1.5 szoftvert (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan) használtuk állandó kamera-beállításokkal a fluoreszcens jelintenzitások összehasonlíthatósága érdekében. Az Alexa555 és DAPI képeket Adobe Photoshop 10.0 verziójú szoftverrel fedtük össze. A képek kontrasztját egységesen növeltük anélkül, hogy a beállításokat megváltoztattuk volna.

#### 4.5.1.4 Western blott

Az érmintákat fiziológias sóoldatban mostuk, majd  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A mintákat folyékony nitrogénben, szövetdarálóval mechanikusan homogenizáltuk. Ezután  $100\text{ }\mu\text{L}$  homogenizáló RIPA pufferbe (Radio Immuno Precipitation Assay;  $150\text{ mM}$  nátrium-klorid,  $1,0\%$  NP40,  $0,5\%$  nátrium-dezoxikolsav,  $50\text{ mM}$  Tris,  $\text{pH } 8,0$ ) gyűjtöttük őket, mely proteázgátlókat tartalmazott (Aprotinin –  $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ ,  $5\text{ mM}$  Benzamidin, Leupeptin –  $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ , Tripszin inhibitor –  $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ ,  $1\text{ mM}$  PMSF,  $5\text{ mM}$  EDTA,  $1\text{ mM}$  EGTA,  $8\text{ mM}$  nátrium-fluorid,  $1\text{ mM}$  nátrium-ortovanadát). A szuszpenziókat  $30$  másodpercig pulzáló ultrahanggal szonikáltuk  $40\text{ A}$  erősségen (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA). A Western blot analízishez teljes sejtlizátumokat készítettünk.  $20\text{ }\mu\text{g}$  fehérjét választottunk szét  $7,5\%$ -os SDS–poliakrilamid gélen az I-es típusú kollagén, elasztin és aktin kimutatásához. A fehérjéket elektroforetikusan nitrocellulóz membránokra transzferáltuk, majd az elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk egy éjszakán át  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, a fent megadott hígításban.  $30$  perces PBST-ben történő mosás után a membránokat peroxidáz-kapcsolt másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk: anti-nyúl IgG ( $1:1500$ ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) vagy anti-egér IgG ( $1:1500$ ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A jelek kimutatásához az Advansta Inc. (Menlo Park, CA, USA) által gyártott fokozott kemilumineszcens módszert alkalmaztuk a gyártó utasításai szerint. Belső kontrollként aktint használtunk (housekeeping protein), és az elasztin és I-es típusú kollagén expressziós eredményeit ehhez normalizáltuk. A jelek megjelenítését egy gél dokumentációs rendszerrel (Fluorchem E, ProteinSimple, San Jose, CA, USA) végeztük. A jelek optikai denzitását az ImageJ 1.40 g szoftver segítségével mértük.

#### ***4.5.2 A BGP-15 érgyógyulásra kifejtett hatásának vizsgálata***

Harminckét hím, Wistar patkányt ( $330,2\text{g}\pm 17,5\text{g}$ ) négy egyenlő csoportba osztottunk a kezeléseknek megfelelően: SHAM, kanülált SHAM (KSHAM), BGP-15 kontroll (KBGP) és BGP operált (BGPO) csoportokra. A KSHAM és a BGPO csoportokban egy kanül került beültetésre, mely megegyezett a PACAP kezelt állatok protokolljával. A farmakonnal kezelt csoportba tartozó állatok a 14. napig minden második napon 15 mg BGP-15-öt kaptak. A KSHAM csoportban azonos mennyiségű fiziológiás sóoldattal történt a kezelés. Arteria femoralis anastomosis csak a KBGP csoport esetén nem történt, itt az állatok műtéti beavatkozás nélkül, subcutan kapták a kezelést, hogy tisztán a BGP hatását tudjuk megfigyelni. A beavatkozások végén az inguinalis sebet 4/0, fordított vágó tűvel rendelkező, poliglikolid-poli (e-kaprolakton) kopolimer (Simfra, KOLLSUT, USA) varróanyaggal zártuk.

#### ***4.5.3 Szövetek nedvesen tartásának jelentőségének vizsgálata***

Az ér-anastomosisok elkészítéséhez csoportonként 8, összesen 24 hím Wistar patkányt (testtömeg:  $307,54 \pm 27,69$  gramm) használtunk fel. Az állatokat utánkövetés nélküli kontroll (UNK), Operált, Deszikkált csoportokra osztottuk. Anastomosis mind a három csoportban készült, azonban az UNK csoport esetén nem történt utánkövetés, az anastomosisokat a varrást követően, frissen vizsgáltuk. Az Operált csoportunkban különös figyelmet fordítottunk arra, hogy a műtét során ( $31\pm 3,5$  perc) nedvesen tartsuk a műtéti területet, ezt fiziológiás sóoldattal (Izotóniás sóoldat 0,9%; B. Braun Avitum Hungary; Magyarország) tettük, míg a másik nem nedvesített (deszikkált) csoportunkban pedig fokozott figyelmet fordítottunk arra, hogy egyaránt az operátor se nedvesítse a területet, de a szövetközi folyadék és a seb területén felgyülemlő minden jellegű folyadéktól is elszeparálódjon az ér. A sebzáráshoz 4/0, fordított vágó tű, poliglikolid-poli (e-kaprolakton) kopolimer (Simfra, KOLLSUT, USA) varróanyagot használtunk.

### **4.6 Laboratóriumi vizsgálatok**

#### ***4.6.1 Hematológiai paraméterek***

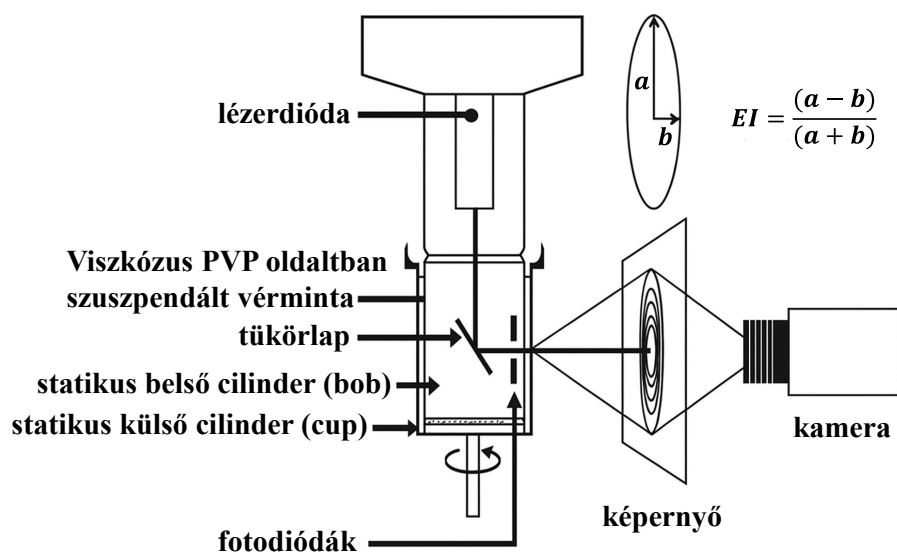
A hematológiai méréseket Sysmex K-4500 hematológiai automata analizátorral végeztük (TOA Medical Electronics Co., Ltd., Kobe, Japán). A vizsgálataink során a vörösvérsejtszámot (Vvs, ( $\times 10^{12}/\text{L}$ )), a fehérvérsejtszámot (Fvs, ( $\times 10^9/\text{L}$ )) és a vérlemezkeszámot (Thr, ( $\times 10^9/\text{L}$ )) apertura-impedancia elven határozta meg, míg a hemoglobin koncentrációt (Hgb (g/L)) spektrofotometriás módszerrel. Ezen adatokból származtatja az átlagos vörösvérsejt térfogatot (MCV, (fL)), az átlagos vörösvérsejt hemoglobin tartalmat

(MCH, (pg)), az átlagos vörösvérsejt hemoglobin koncentrációt (MCHC, (g/dL)) és a hematokritot (Hct, (%)).

#### 4.6.2 *Micro-rheologiai paraméter*

##### 4.6.2.1 Vörösvérsejt deformabilitás mérése

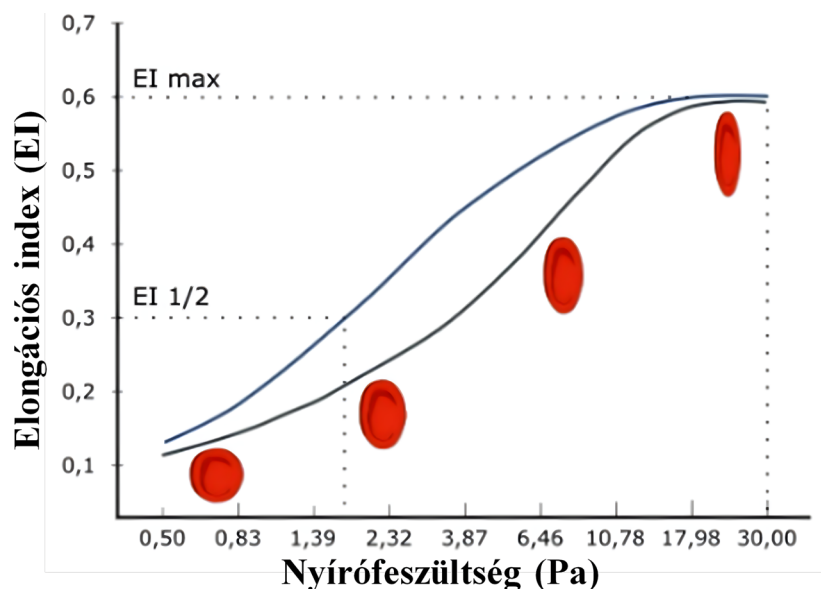
A vörösvérsejtek deformabilitását az elongációs index-szel (EI) jellemezhetjük, melyet a hozzá tartozó nyíróerők (SS, (Pa)) függvényében a deformabilitás görbéken ábrázolhatunk. Kísérletünk során ektacytometriás elven (laser-diffraktiós ektacytometria) működő LoRRca MaxSis Omoscan ektacytométert (RR Mechatronics International BV, Zwaag, Hollandia) segítségével határoztuk meg.<sup>123, 124</sup> A készülék (18. ábra) laser fénynyalábot bocsájt ki, mely a vörösvérsejt-szuszpendáló közeg különböző sűrűségű határfelzínének találkozásán szóródik, ami a sejtek elongációjának mértékével, tehát alakváltozásával arányos. A két koncentrikus cylinder közötti résbe (0,3 mm) helyezett mintán forgómozgás segítségével nyírófeszültséget hoz létre a készülék. K3-EDTA-val antikoagulált, 10 µl vért magas viszkozitású polimer oldatban (360 kDa polyvinyl-pyrrolidon, PVP; viszkozitás: 28 mPas, ozmolaritás: 294 mOsm/kg, pH=7,3-7,4; ~1 ml) szuszpendáljuk közvetlenül a mérések előtt. A magas viszkozitás közvetítő közegként elősegíti a sejtek megfelelő „irányba állását”, illetve a magas nyíróerő áttevődését a sejtek membránjára, mely azok elongációjához vezet. Ennek hiányában az erő átadása nem megfelelően végződné, a sejtek csupán különböző sebességgel pördülnének, mely hibás méréshez vezetne. A számítógép meghatározza a henger fordulatszámát, tehát a nyírófeszültséget, a kapott szóródási mintázatot pedig ennek megfelelően elemzi. A mérések ellenőrzött, standard 37 °C-os hőmérsékleten történtek, ami hozzásegít az *in vivo* környezet szimulálásához.<sup>92</sup>



18. ábra A LoRRca működése<sup>92</sup>

A diffrakciós mintázat alapján hosszúsága (A) és szélessége (B) ismeretében az elongációs index kiszámolható:  $EI = \frac{A-B}{A+B}$ . Minél nagyobb ez az érték, a sejtek annál inkább elnyúltak. Adott nyírófeszültség értéknél nézve, a nagyobb EI jobb vörösvérsejt deformálhatóságot jelez. Az EI és a hozzátartozó nyírófeszültség adatpárokat Lineweaver-Burke féle non-lineáris regresszió alapuló elemzésnek vetettük alá, mely alapján meghatározható volt a végtelenhez tartozó maximális EI ( $EI_{max}$ ) valamint ennek a feléhez tartozó EI ( $EI_{1/2}$ ) – nyírófeszültség ( $SS_{1/2}$  (Pa)) pár:  $\frac{1}{EI} = \frac{SS_{1/2}}{EI_{max}} * \frac{1}{SS} + \frac{1}{EI_{max}}$ .<sup>92, 123</sup>

Az egyes elongációs index – nyírófeszültség görbék (19. ábra) összehasonlítása történhet egy-egy mért nyírófeszültség értékhez rendelt EI összehasonlításával (pl. EI 3 vagy 5 Pa-nál), vagy a görbét leíró kiszámolt paraméterekkel (pl.  $EI_{max}$ ,  $SS_{1/2}$ ). A deformabilitás romlásával az  $EI_{max}$  csökken és az  $SS_{1/2}$  nő, vagyis a hányadosuk is csökken.<sup>92, 94, 123, 124</sup>



**19. ábra Vörösvérsejt deformabilitás görbék**

A két görbe hasonló maximális elongációra képes, azonban ezen érték feléhez tartozó félmaximális nyírófeszültségük különböző. Adott elongációs érték eléréséhez a fekete görbe esetén nagyobb nyírófeszültség szükséges. A kék görbe egy optimálisabb meredekségű görbe, alacsonyabb nyírófeszültség esetén is relatíve nagyobb deformációra képes.

(Lorrca.com)

#### 4.6.2.2 Vörösvérsejt aggregatio mérése

A vörösvérsejtek aggregációs képességének mértékét a Myrenne MA-1 erythrocyta aggregometer (Myrenne GmbH, Roetgen, Németország) segítségével határoztuk meg, amely fénytranszmissziós elven működik. A vérmintát egy 2<sup>o</sup>-os csiszolt üveg lencséből és egy ráhajtható üveg tárgylemezből álló (cone-plate) mérőkamra rendszer fogadja be. 20 µl-nyi anticoagulált (K3-EDTA, 1,5-1,8 mg/ml) vért cseppentünk a lencse közepére, ahol a tárgylemez ráhajtatásával kör alakban szétterül, a lencse domborulatának megfelelően. Egy infravörös dióda

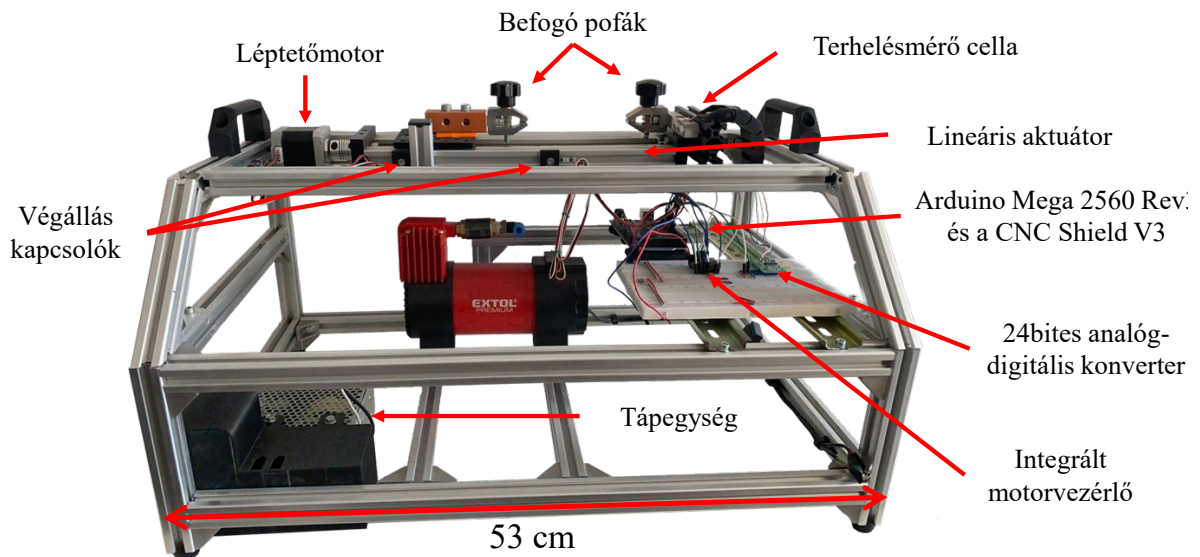
helyezkedik el az üvegrendszer felett, melynek mintán áthaladó intenzitás-változását az alatta elhelyezkedő detektor regisztrálta. A mintatároló kamra egy motor segítségével forgásba hozható, meghatározott 600 Hz-es fordulatszámmal. Ennek hatására a sejtek disaggregálódnak, a minta fénytranszmissziójának csökkenését eredményezve. A motor hirtelen megállásakor, vagy 3 Hz-es fordulatszámra csökkenésekor a sejtek aggregálódni kezdenek, a fényintenzitás folyamatosan növekszik. Az M paraméter jelzi a motor teljes megállását, amikor a nyírási feszültség hirtelen 0-ra csökken, míg a M1 paraméter mutatja a 3 Hz-es fordulatszám, tehát nagyon alacsony, fiziológiához hasonló nyíróerő mellett mért adatokat. A disaggregált állapottól számított 5. illetve 10. másodpercben meghatározott fényintenzitásból határoztuk meg az aggregációs indexeket. Innen származtatott az általunk is mért négy, dimenzió nélküli paraméter (M 5s; M 10s; M1 5s; M1 10s), melyek növekedése fokozott aggregációs készséget jelez.<sup>92, 123-125</sup>

#### **4.7 Szakítószilárdság mérése**

A szakítószilárdság mérése egy továbbfejlesztett, egyedi készítésű eszközt alkalmaztunk, mely a Debreceni Egyetem, Informatikai Kar, Információ Technológiai Tanszékének és az Általános Orvostudományi Kar, Sebészeti Műtéttani Tanszékének közreműködésével jött létre. A készülék korai változata,<sup>126, 127</sup> a tapasztalatok alapján tovább lett fejlesztve.

##### **4.7.1 Stabil keret kialakítása**

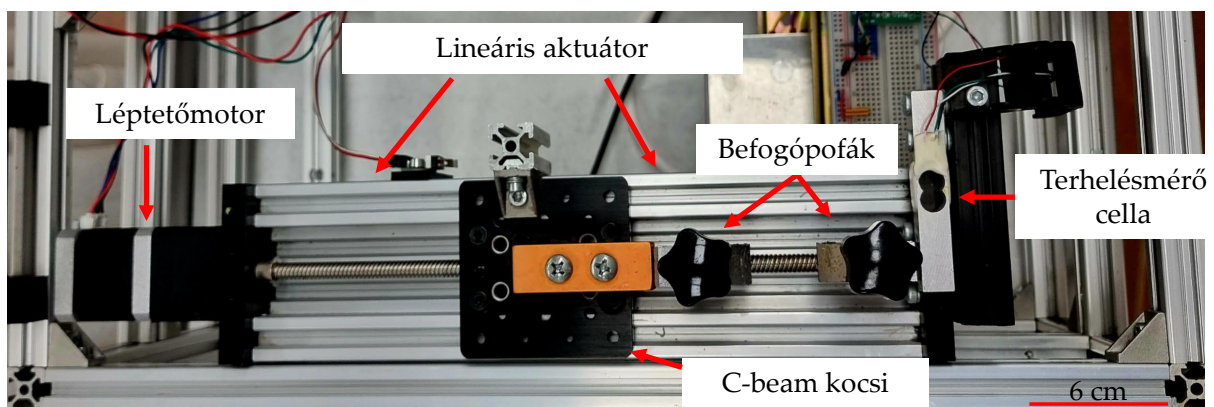
A készülék tervezésének egyik legfontosabb szempontja a stabil és erős váz kialakítása volt. A mérés során jelentős erők hatnak a szerkezetre, így a precíz adatfelvételhez elengedhetetlen, hogy a készülék ne mozduljon el vagy rezegjen túlságosan. Ez jelentős fejlődést jelent az előző, egyszerű fémdobozból készült változathoz képest, amely nagyobb torziót engedélyezett, ami pontatlanabb mérésekhez vezetett. A robusztus kialakítás mellett fontos szempont volt a könnyű, mégis tartós szerkezet, amely könnyen szállítható laboratóriumi, műtéti és oktatási helyszínek között. Ezért a vázat nagy szilárdságú alumínium profilokból építettük fel (14. ábra).



**14. ábra**  
Szakító szilárdság vizsgáló készülék felépítése

#### 4.7.2 A húzómechanika pontos kialakítása

A pontos mechanika elengedhetetlen a megbízható mérésekhez. A húzóegység egy HPV7 C-Beam lineáris aktuátorra (Guangzhou Hanpose 3D Technology Co., Ltd., Kína) épül, amely egy C-alakú alumínium szerkezeti elemmel van összekötve. A mozgató mechanizmust egy NEMA17 léptetőmotor (42BYGHW811M, Kuongshun Electronic Ltd., Kína) hajtja, amelyet egy Arduino CNC Shield V3-ra (Kuongshun Electronic Ltd., Kína) épített DRV882 motorvezérlő (Pololu Robotics and Electronics, USA) irányít. A motor egy tengelykapcsoló révén egy T8 trapézmenetes orsóval kapcsolódik, amely egy kottyanásmentes trapézanyát mozgat, ami révén a C-beam kocsi pontos lineáris mozgást végez (15. ábra).



**15. ábra**  
Húzómechanika

Az előző eszköz egy műanyag szíjjal húzta a fogókat, ami nemlineáris erőátvitelt és változó sebességet eredményezett. A felcsévélődő szíj a tengely átmérőjének növekedése miatt

a motor minden lépése nagyobb erőt fejtett ki, ráadásul a szíj rugalmassága csökkentette a hatékonyságot és pontosságot. Emellett a régi fogó csak 2 mm-nél vékonyabb mintákat tudott megfogni.

A fejlesztés során először 3D nyomtatott fogókat próbáltunk ki, de ezek nem voltak elég stabilak a nagy húzóerők mellett. Végül HJJ-001 típusú ipari szabványú fogókat (Baoshishan Co., Dalian, Kína) alkalmaztunk, amelyek akár 500 N erőt is kibírnak. A fogó felülete bordázott, hogy megakadályozza a minta elcsúszását vagy megsérülését (14, 15 és 16. ábra).

#### ***4.7.3 Az erőmérő rendszer és annak kalibrálása***

A húzóerő mérésére egy nyúlásmérő bélyeggel ellátott, IP 65 védelemmel rendelkező erőmérő cellát (TAL220, Deecom Technology, Kuala Lumpur, Malajzia) használtunk, kiegészítve egy analóg-digitális átalakítóval. A nyúlásmérő bélyeg a rögzített test mechanikai változásait elektromos ellenállásváltozássá alakítja át. Ahogy a test deformálódik, a hozzáerősített nyúlásmérő bélyeg rugalmas alakváltozáson megy keresztül, miközben a benne lévő vezetők ellenállása megváltozik. Az általunk választott típus egy széles körben alkalmazott erőmérő cella, amelyet gyakran használnak tesztberendezésekben, mérőeszközökben, nyomó- és húzószervezetekben. Két párhuzamosan elhelyezett nyúlásmérő bélyeget tartalmaz, mérési kapacitása 5 kg (49,03 N). Az eszközt állandó szobahőmérsékleten, laboratóriumi körülmények között használtuk, hogy biztosítsuk a mérések összehasonlíthatóságát. Ennek eredményeként a hiba és a nemlinearitás  $\pm 0,05\%FS$  alatt van, gyakorlatilag észlelhetetlen.

A jel digitalizálásához egy HX711 típusú, nagy pontosságú, 24 bites analóg-digitális átalakítót (Avia Semiconductor Xiamen Ltd., Hsziamen, Kína) használtunk. A HX711-et kifejezetten nyúlásmérő bélyegekhez és más erőmérő cellákhoz tervezték. Az erőmérő cella adatainak pontossága érdekében kalibrálni kellett a műszert. A kalibrálás biztosítja, hogy a mérőeszköz pontos és megbízható legyen. Kalibrációhoz etalon súlyokra volt szükség. Mivel a cella szerkezete a mérések során deformálódik, ajánlott a kalibrálást évente megismételni. A mérési hibák kiküszöbölésére egy mérési időn belül több, páratlan számú mérést végez egymás után a lehető legnagyobb leolvasási sebességgel. Az adatokat puffer memóriában tárolja, és a medián értéket továbbítja a számítógépre. Így a hibás, szélsőséges értékek kiszűrésre kerülnek.

A legfontosabb különbség az első verziójú készülékhez képest az volt, hogy az érzékelő szélesebb mérési tartománnyal rendelkezik, ami lehetővé tette változatosabb minták vizsgálatát.

#### **4.7.4 A kezdő- és végpozíció**

A mechanikus mozgás korlátozására végállás-kapcsolókat (B073TYWX86, Qianxin Electronics Co., Ltd., Sanghaj, Kína) építettünk be, amelyek megakadályozzák, hogy a kocsi túlhaladja a megengedett mozgástartományt, mely visszafordíthatatlan károsodásokhoz vezethetne a mérőműszerben. Az első verziójú készülék esetén a mérés addig folytatódott, amíg az előre megadott lépésszámot el nem érte, így, ha a csigas rendszer a végponthoz ért a méréssorozat vége előtt, a készülék tovább húzott, és ezzel saját magát is károsíthatta. Ezzel ellentétben a húzószerkezetre szerelt végálláskapcsolók megakadályozzák, hogy a kocsi elérje a mozgástartomány határait, mint például, hogy nekiütközzön az erőmérő cellával felszerelt befogóbilincsnek (14. ábra).

#### **4.7.5 Mikrokontroller**

Az Arduino Mega 2560 (RS-75-12, MEAN WELL Enterprises Co., Ltd., Új-Tajpej, Tajvan) vezérlőkártya kezeli az A/D átalakítóból érkező 24 bites jelet, vezérli a motort, figyeli a kapcsolókat, miközben valós időben kommunikál a számítógéppel. A panel 54 digitális bemeneti/kimeneti csatlakozással (I/O port) rendelkezik, amelyek közül 16 PWM (impulzusszélesség-moduláció) kimenetként, másik 16 pedig bemenetként használható analóg jelek számára. A kártyán található egy USB, egy tápfeszültség, valamint egy ICSP (In-Circuit Serial Programming) csatlakozó. A teljes eszköz tápellátását egy 72 W-os tápegység modul biztosítja (RS-75-12, MEAN WELL Enterprises Co., Ltd., Új-Tajpej, Tajvan) (14. ábra).

#### **4.7.6 A szoftver**

Az eszköz első verziójához egy asztali alkalmazás készült C# nyelven, és a gép USB 2.0 porton keresztül kommunikált a számítógéppel. A jelenlegi verzióban egy univerzális soros monitort kezdtünk el használni (QtSerialMonitor 1.5, Michal W. által fejlesztett nyílt forráskódú szoftver a GitHub Inc.-től, San Francisco, Kalifornia, USA). Ez lehetőséget nyújt parancsok kiadására az eszköz felé (például a pofák előre meghatározott pozícióba mozgatása, motor sebességének beállítása, mérés indítása), biztonsági mentést készít (folyamatos log fájl mentése), valamint a mért adatok meghatározott helyre, CSV fájlba történő exportálására.

#### **4.7.7 A kalibrálás**

Két problémával szembesültünk a készülék kalibrálásakor: az erőérzékelőt vízszintes irányú erők mérésére tervezték, és a két pofa közötti távolság csupán 15 cm volt, így nem lehetett egyszerű szabvány súllyal kalibrálni. A megoldás végül az volt, hogy az egész

berendezést 90 fokkal elforgattuk, és vízszintes helyzetbe állítottuk. Ezután megfelelő méretű, próba súlyokat készítettünk, amelyeket a pofák közé helyeztünk, és a felső részen lévő rögzítőszalag segítségével befogtunk. A szenzorhoz tartozó Arduino könyvtár (HX711\_ADC) tartalmaz egy kalibráló programot is (Calibration.ino 1.2.11, Olav K., nyílt forráskódú szoftver, GitHub Inc., San Francisco, Kalifornia, USA), amely segít meghatározni a kalibrációs állandót, amelyet aztán a saját programunkban használhatunk. Miután a készülék meghatározta az üres állapothoz tartozó 0 értéket, a készített súlyokat felerősítettük, majd egy hitelesített laboratóriumi mérleggel (AJCS Laborscale, Demandy, Budapest, Magyarország) lemértük. Ezt az értéket adtuk meg a programnak, amely ezután visszaadott egy konstans értéket – ez lett a kalibrációs szám. A mérést minden súllyal ( $n = 5$ ) tízszer elvégeztük, az eredményeket átlagoltuk, és a kapott értéket beillesztettük az Arduino programkódba.

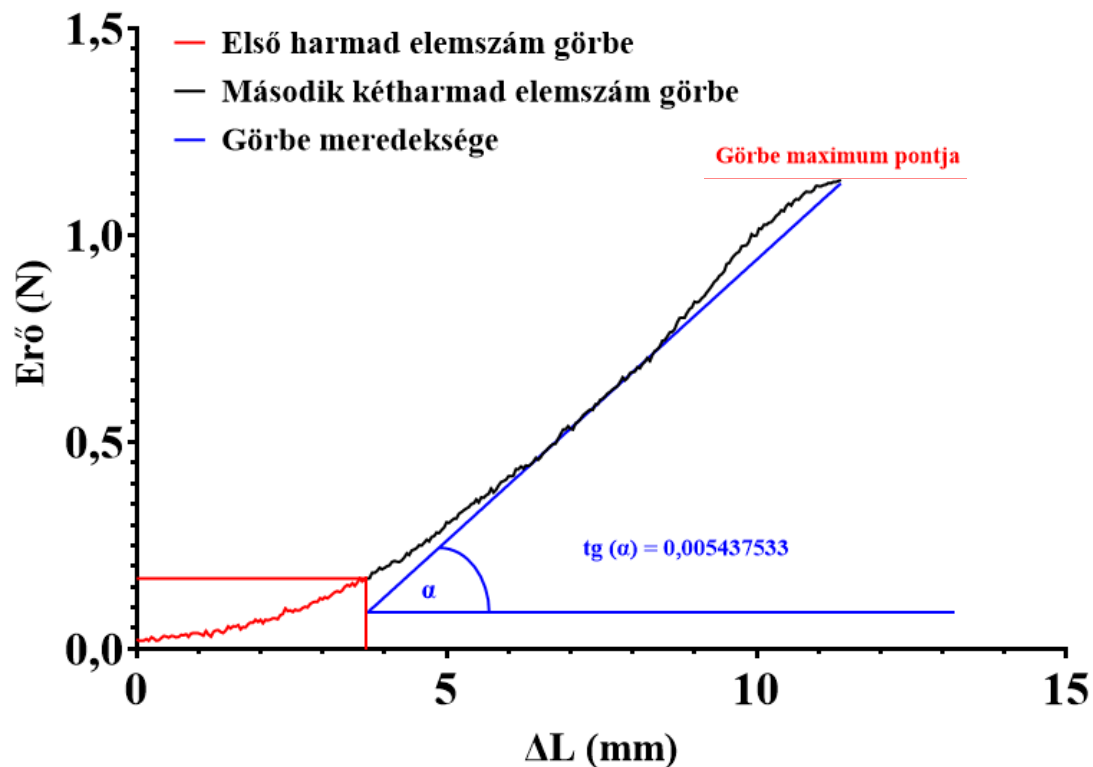
#### **4.7.8 Mérés kivitelezése és kiértékelése**

Az eltávolított artériákat mindig ugyanazon a helyen rögzítettük a befogó pofákban, 8 mm távolságra egymástól, az anastomosis helyét pedig középre igazítottuk (16. ábra). A motor által kifejtett húzóerőt (PACAP kezelt erek esetén: 48,66 lépés/mp; 1,95 mm/mp; többi kutatás során: 4,78 lépés/mp; 0,1912 mm/mp) grammban rögzítettük, és az adatokat CSV fájlba exportáltuk, melyek elemzésére Microsoft Excel 2016 programot használtunk. Az adatfeldolgozás során elvégeztük a gramm-newton átváltást ( $9,81 \text{ m/s}^2$ ), valamint elemeztük a maximális értéket (maximális szakítószilárdság) és az erő-megnyúlás görbe meredekségét a különböző pontokon.



**16. ábra**  
**Szakítószilárdság mérés**

Az elemzést a 0,0098 N feletti görbeszakaszon végeztük, mivel a műszer pontossága alapján ezen a tartományon már nem voltak jelen szabálytalan elemek. Mivel a görbék szakadásmintázata hasonlított az elasztomerekéhez, az eredetileg szabálytalanabb első egyharmadot figyelmen kívül hagytuk, és csak a felszálló szakasz meredekségét ( $\text{tg}\alpha$ ; a teljes szakításgörbe 33–100%-a között) elemeztük, amely információt nyújt a kollagén integritásáról és rugalmasságáról, mely komponens elsődlegesen felelős a különböző szövetek mechanikai stabilitásáért (17. ábra).<sup>128-130</sup>



17. ábra

Szakítószilárdság görbék (erő/megnyúlás) maximumának és meredekségének reprezentatív meghatározása

#### 4.8 Szövettan

A szövettani vizsgálatok az Anatómiai Szövet- és Fejlődéstani Intézetben történtek. A mintákat háromszor PBS-ben mostuk, majd 4%-os formalinban fixáltuk, ezután paraffinba ágyztuk őket. Sorozatmetszetek készítését követően hematoxilín-eozin (H&E, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) festést végeztünk morfológiai analízishez, valamint orcein festést (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) az elasztin vizualizálására. A festési protokollokat a gyártói utasítások szerint hajtottuk végre. A mikroszkópos képeket Olympus Bx53 mikroszkóppal és DP74 kamerával (Olympus Corporation, Tokió, Japán) készítettük. A kollagénrostok ereiben való orientációjának vizsgálatához a nem specifikus picrosirius festést (Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, USA) alkalmaztunk. A polarizált fény síkját  $\lambda/4$ -gyel elforgatva (Olympus Bx53 polarizációs mikroszkóp) a kettőtörést mutató struktúrák kollagénrostokat jelölnek, ahol a fényes piros struktúrák vastagabbak, míg a zöld struktúrák vékonyabb kollagénrostokat mutatnak.

A tunica intima, media és adventitia vastagságának méréséhez H&E festett minták  $20\times$  nagyítású objektívvel készült képeit vizsgáltuk az ImageJ 1.40 g szoftverrel. Egy merőleges vonalat húztunk a membrana elastica internától a tunica adventitia irányába, majd meghatároztuk a pixelértékeket.

Az eredményeket a kontroll pixelértékek százalékában adtuk meg. Metszetenként húsz független mérést végeztünk, és kísérleti csoportonként több független artériát használtunk fel. Az orcein festésnél a normál szint inverz színre (zöld és fekete) állítottuk a pixelkontraszt növelése érdekében. A zöld pixelek számát az ImageJ szoftverrel határoztuk meg. Az érfal egyenlő területét vizsgáltuk  $40\times$  objektív nagyítás mellett az orcein (zöld) pozitivitás meghatározásához.

#### **4.9 Statisztikai analízis**

A tervezett mintaelemszámot (egyed) G\*Power 3 program segítségével, a Mead-egyenlet alapján határoztuk meg.<sup>85</sup>

A statisztikai elemzéshez a GraphPad Prism 9.1.2 (v.226) szoftvert használtuk. Minden adateloszlásnál ellenőriztük a normalitást, és ennek megfelelően Student t-tesztet vagy nem parametrikus tesztek (Wilcoxon vagy Mann-Whitney próbát) és kétutas/ismételt mérése ANOVA-tesztek alkalmaztunk. A szignifikanciaszintet  $p < 0,05$  értéknél határoztuk meg.

## 5 EREDMÉNYEK

### 5.1 PACAP 1-38 érgyógyulásra kifejtett hatásának vizsgálata

#### 5.1.1 Általános megfigyelések

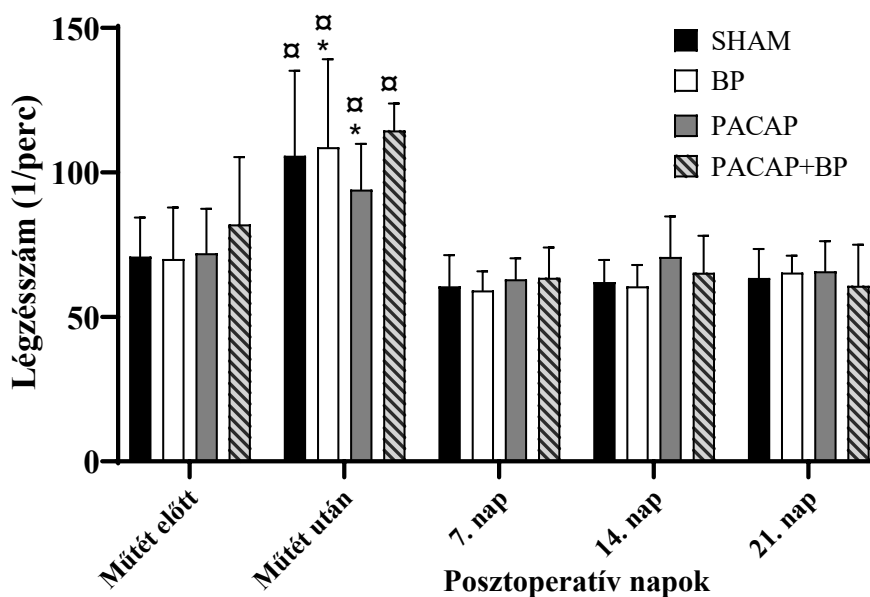
Minden operációt sikeresen, standard módon végeztünk el. Az állatok súlya minden csoportban jelentősen csökkent a sebészeti trauma után a 7. napig, majd a 21. napra visszatér a kiindulási értékekhez (I. táblázat).

I. táblázat. Az állatok súlyának változása az utánkövetési időszak alatt.

	Csoport	Alap	7. nap	14. nap	21. nap
Testtömeg (g)	SHAM	286.86±34.5	263.43±36.4 *	284.43±27.9	317.71±26.5
	BP	303.14±23.3	290.57±14.6 *	301.14±19.8	322.14±26.8
	PACAP	335.25±14.7 \$	308.25±13.5 * #	325.625±23.1 #	339.625±21.4
	PACAP+BP	353.13±33.2 #	324.13±25.7 * #	328.13±30.5 #	347.13±38.3

Átlagok±S.D., n=8/csoport, \*p<0,05 vs. alap; #p<0,05 vs. SHAM.; \$p<0,05 vs. BP.

A légzési paraméterek az anesztézia alatt minden csoportban hasonlóak voltak; csak a műtét végén emelkedtek szignifikánsan, amikor már csökkent az altatószer hatása (BP: p = 0,0216; PACAP: p = 0,0424) (20. ábra).



20. ábra

#### Az állatok légzésszáma

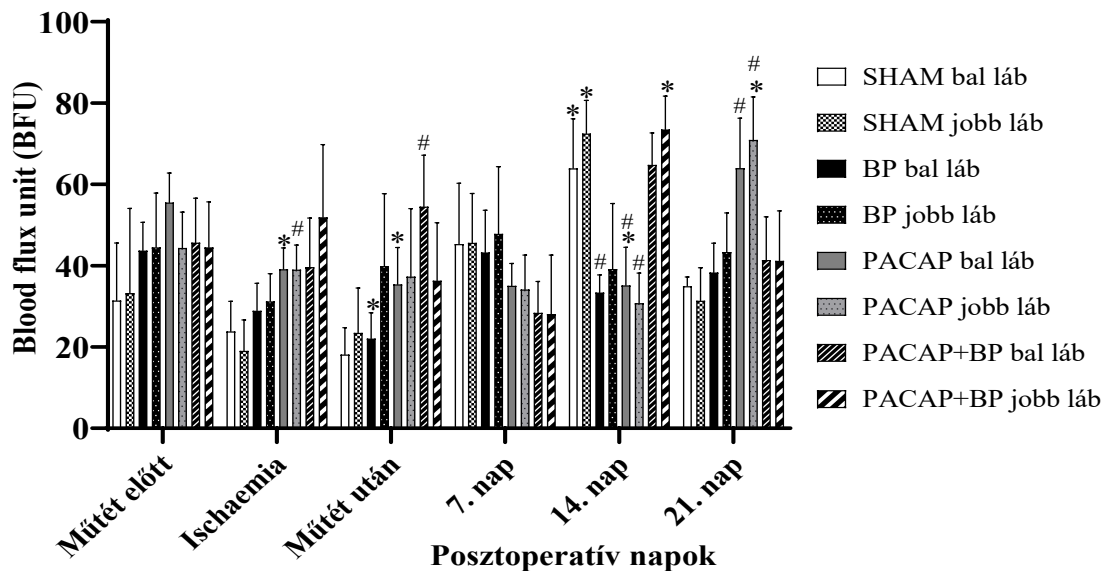
Az adatokat átlag ± SD. értékek formájában mutatjuk be. A különbségeket szignifikánsnak tekintettük n=8/csoport, \*p<0,05 vs. a műtét előtt; □p<0,05 vs. a 21. napon.

A követési időszak végén minden csoportban mérsékelt aneurizma-képződést figyeltünk meg az anastomosis helyén (SHAM: 2; BP: 3; PACAP: 1; PACAP + BP: 2). Négy állatnál pedig artériás elzáródást (SHAM: 2; BP: 2).

### 5.1.2 Mikrokeringés

A mikrokeringési mérések előtt közvetlenül mért talpbőrhőmérsékletek szinte azonosak voltak mindkét láb esetében, a legmagasabb értékeket a műtét után mértük (SHAM bal:  $31,08 \pm 2,63$  °C, jobb:  $30,47 \pm 2,97$  °C; BP bal:  $31,73 \pm 0,98$  °C, jobb:  $31,74 \pm 1,36$  °C; PACAP bal:  $33,28 \pm 0,96$  °C, jobb:  $33,09 \pm 1,1$  °C; PACAP + BP bal:  $32,01 \pm 1,68$  °C, jobb:  $31,916 \pm 1,11$  °C). A SHAM csoport kivételével a többi csoportban a napok haladtával csökkenést észleltünk, a legalacsonyabb értékeket a 21. napon mértük (SHAM bal:  $30,93 \pm 0,81$  °C, jobb:  $30,95 \pm 0,72$  °C; BP bal:  $29,22 \pm 1,38$  °C, jobb:  $29,84 \pm 1,88$  °C; PACAP bal:  $30,19 \pm 1,27$  °C, jobb:  $30,09 \pm 1,21$  °C; PACAP + BP bal:  $29,2 \pm 1,19$  °C, jobb:  $29,48 \pm 0,97$  °C).

A jobb és bal lábfej keringési paraméterei (BFU) szinte azonos módon változtak a beavatkozások során. Az iszkémia alatt a keringési paraméterek minden csoportban csökkentek, kivéve a PACAP + BP csoport műtött lábát. A műtét utáni értékek szinte megegyeztek az iszkémia alatti értékekkel. A legalacsonyabb posztoperatív értékek a következők voltak: SHAM: 21. nap, BP: 14. nap, PACAP: 14. nap (bal láb  $p = 0,0323$ ), PACAP + BP: 21. nap. A posztoperatív napok során a keringés fokozatosan növekedett, és a maximális értékeket a PACAP + BP (jobb láb  $p = 0,0291$ ) és a SHAM csoport (bal láb  $p = 0,0392$ ; jobb láb  $p = 0,0004$ ) esetében a 14. npra érték el. A BP csoportban a legmagasabb értékeket a 7. napon, a PACAP csoportban pedig a 21. napon mérték (jobb láb  $p = 0,002$ ) (21. ábra).



21. ábra

A lábfej bőrének mikrocirkulációs véráramlási egységének (BFU) változása a SHAM, a BP, a PACAP és a PACAP+BP csoportokban.

Átlag $\pm$ S.D., n=8/csoport, \* $p < 0,05$  vs. műtét előtt; # $p < 0,05$  vs. SHAM.

### 5.1.3 Hematológiai változások

A PACAP és BP csoport kivételével a trombocitaszám szignifikánsan megnőtt a műtét után (SHAM 14. nap:  $p = 0,025$ ; PACAP + BP 7. nap:  $p < 0,0001$ ), majd szinte minden csoportban a 21. napra normalizálódott. A vörösvérsejt-szám a 14. napig csökkent, ami után normalizálódni kezdett. A fehérvérsejtszám a műtét utáni 7. napon minden csoportban emelkedett (SHAM:  $p = 0,0267$ ; BP:  $p < 0,0326$ ; PACAP:  $p = 0,0242$ ; PACAP + BP:  $p < 0,0003$ ), leginkább a SHAM állatoknál, majd az értékek csökkenni kezdtek. A PACAP-kezelt csoportokban enyhe időeltolódás figyelhető meg, a maximumot a 14. napon érték el, majd csökkent, de a 21. napon is szignifikánsan eltértek ( $p = 0,0026$ ) a műtét előtti állapothoz képest. A hemoglobin és MCV paraméterek a műtét után folyamatosan csökkentek a 21. napig, azonban a csoportok között nem volt szignifikáns különbség. A hematokrit is a 14. napig csökkent, majd a 21. napra emelkedett (II. táblázat).

**II. Táblázat. Hematológiai paraméterek változásai a követési időszak alatt.**

Változó	Csoport	Alap	7. nap	14. nap	21. nap
FVS ( $10^9/L$ )	SHAM	11,95±3,63	18,92±7,94 *	18,89±3,18 *	13,82±4,84
	BP	10,88±40	17,47±6,37 *	17,79±3,15 *	15,88±5,07
	PACAP	11,11±4,65	16,31±2,43 *	21,95±6,78 *	18,81±5,67 *
	PACAP+BP	10,04±3,58	15,29±4,04 *	16,13±4,12 *&	13,38±2,72 *&
VVS ( $10^{12}/L$ )	SHAM	7,59±0,48	6,84±0,81	7,02±0,34 *	7,44±0,37
	BP	7,57±0,44	7,51±0,34 #	7,35±0,29 #	7,22±0,61 *
	PACAP	7,81±0,34	7,63±0,33 #	7,29±0,49 *	7,63±0,21
	PACAP+BP	8,01±0,34 +	7,33±0,55 *	7,40±0,23 *#	7,50±0,46 *
Htc (%)	SHAM	44,66±2,79	39,23±3,05 *	39,75±1,92 *	41,76±2,26 *
	BP	44,38±1,8	42,34±2,40 *#	41,06±2,35 *	40,06±3,50 *
	PACAP	45,60±1,85	43,16±2,52 *#	40,54±2,26 *	42,19±2,28 *
	PACAP+BP	46,15±1,87	40,75±2,96 *	41,04±1,58 *	41,54±2,20 *
Hgb (g/L)	SHAM	14,9±1,01	13,35±1,43 *	13,14±0,75 *	13,61±0,81 *
	BP	15,09±0,69	14,34±0,88 *	13,51±0,76 *	12,96±1,07 *
	PACAP	15,40±0,61	14,56±0,92 *	13,38±0,84 *	13,70±0,87 *
	PACAP+BP	15,53±0,45	13,71±0,98 *	13,43±0,41 *	13,36±0,81 *
MCV (fL)	SHAM	58,90±2,13	57,76±4,59	56,69±2,77 *	56,19±1,78 *
	BP	58,73±1,69	56,33±2,04 *	55,82±2,09 *	55,56±1,89 *
	PACAP	58,41±1,44	56,56±1,73 *	55,70±1,76 *	55,24±2,07 *
	PACAP+BP	57,51±10	55,59±1,08 *	55,48±0,98 *	55,43±1,11 *
Plt ( $10^9/L$ )	SHAM	718,43±236,20	900±140,97	990,93±181,6 *	835,86±129,69
	BP	647,14±209,38	877,93±232,37	719,79±375,57	598,93±216,68 #
	PACAP	736,50±115,93	899,63±254,41	819,81±266,16	751,06±196,66
	PACAP+BP	682,19±220,62	1025,63±173,21 *	1031,31±236,01 *	917,31±135,92 *+&

Átlag±S.D., n=8/csoport, \* $p < 0,05$  vs. alap, # $p < 0,05$  vs. SHAM, + $p < 0,05$  vs. BP, & $p < 0,05$  vs. PACAP.

### 5.1.4 Vörösvérsejt deformabilitás és aggregatio

A vörösvérsejt deformabilitás enyhe romlást mutatott a 7. napon (PACAP csoportban  $EI_{max}$ :  $p = 0,023$  a kiindulási értékhez képest) és a 14. napon (PACAP + BP csoportban  $EI_{max}$ :  $p = 0,0012$  és  $SS1/2$ :  $p = 0,0039$  a kiindulási értékhez képest), de a 21. napra minden csoportban normalizálódott (III. táblázat).

**III. táblázat.** A vörösvérsejtek deformabilitás ( $EI_{max}$  és  $SS1/2$ ) és a vörösvérsejt-aggregációs paraméterek (M 5s, M 10s, M1 5s és M1 10s) változásai

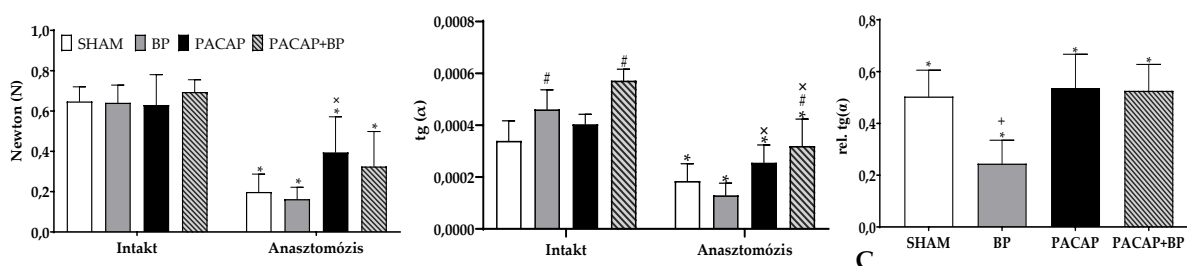
Változó	Csoport	Alap	7. nap	14. nap	21. nap
$EI_{max}$	SHAM	0,57±0,01	0,55±0,03	0,57±0,01	0,58±0,02
	BP	0,58±0,02	0,57±0,01	0,58±0,01	0,58±0,02
	PACAP	0,58±0,02	0,57±0,02 *	0,57±0,02	0,58±0,01
	PACAP+BP	0,59±0,01 #	0,56±0,01 *	0,57±0,01 *	0,59±0,01 +&
$SS1/2$ (Pa)	SHAM	1,51±0,20	1,50±0,12	1,58±0,18	1,54±0,22
	BP	1,47±0,20	1,56±0,14	1,67±0,21	1,54±0,15
	PACAP	1,47±0,19	1,45±0,13	1,63±0,32	1,48±0,23
	PACAP+BP	1,61±0,13	1,61±0,18 &	1,46±0,17 *+	1,59±0,16
M 5s	SHAM	2,64±1,04	3,87±1,46 *	3,14±0,82	2,78±1,01
	BP	3±1,35	4,44±1,21 *	3,90±1,55	3,88±2,16
	PACAP	3,62±1,34 #	4,97±1,83 *	4,51±1,37 *#	5,15±1,67 *#
	PACAP+BP	3,09±1,05	4,56±1,63 *	4,67±1,31 *#	3,68±0,98 #&
M 10s	SHAM	6,39±3,81	8,31±2,42	7,84±2,04	6,87±1,55
	BP	7,45±2,70	10,38±3,81 *#	9,17±4,12	9,75±2,41 *#
	PACAP	8,89±2,59 #	11,24±3,58 *#	9,10±2,60	9,22±2,53 #
	PACAP+BP	9,32±2,41 #	9,53±3,02	9,16±2,04 #	8,60±1,47 #
M1 5s	SHAM	2,41±1,41	3,01±1,51	2,93±0,95	2,14±1,09
	BP	2,48±1,02	4,08±1,56 *	2,90±0,95	3,03±1,63
	PACAP	3,43±1,30 #+	4,08±1,37 *#	3,32±1,29	4,05±1,16 *#+
	PACAP+BP	3,20±1,08 +	3,78±1,53	3,69±1,18 #+	3,29±0,98 #&
M1 10s	SHAM	6,06±3,62	7,83±3,64	7,22±2,21	5,89±1,37
	BP	6,90±3,11	9,82±4,43 *	8,92±4,13	8,23±2,82 #
	PACAP	9,30±2,66 #+	10,82±3,95 #	8,47±2,86	9,67±2,61 #
	PACAP+BP	9,02±2,20 #+	9,15±3,36	9,77±2,89 #	8,39±2,81 #

Átlagok±S.D., n=8/csoport, \* $p < 0,05$  vs. alap, # $p < 0,05$  vs. SHAM, + $p < 0,05$  vs. BP, & $p < 0,05$  vs. PACAP.

A vörösvérsejt aggregatio posztoperatív minden csoportban romlott. Ez a 7. p.o. napon volt észlelhető az M 5s és M1 5s paraméterekben, különösen a kezelt csoportokban a kiindulási értékekhez képest (M 5s: SHAM  $p = 0,0278$ ; BP  $p = 0,0027$ ; PACAP  $p = 0,0012$ ; PACAP + BP  $p < 0,0001$ ; M1 5s: BP  $p = 0,0008$ ; PACAP  $p = 0,0296$ ). A 21. napon csak a PACAP csoport mutatott szignifikáns eltérést (M 5s:  $p < 0,0001$ ; M1 5s:  $p = 0,0163$ ). Az M 10s és M1 10s paraméterekben a 7. napon emelkedést figyeltünk meg, leginkább a BP csoportban (M 10s: BP  $p < 0,0001$ ; PACAP  $p = 0,0078$ ; M1 10s: BP  $p = 0,005$  a kiindulási értékhez képest). Ez a romlás a 21. napon csak a BP csoportban maradt fenn (M 10s: BP  $p = 0,0014$  a kiindulási értékhez képest) (III. táblázat).

### 5.1.5 Szakítószilárdság mérése

Minden esetben az anastomizált arteria femoralis szignifikánsan gyengébb volt, mint az ép kontralaterális artéria. Az ellenoldali artériához képest a legalacsonyabb értékeket a BP csoportban, a legerősebb anastomosisokat pedig a PACAP csoportban találtuk (SHAM:  $0,647 \pm 0,073$  vs.  $0,198 \pm 0,089$  N; BP:  $0,641 \pm 0,088$  vs.  $0,163 \pm 0,059$  N; PACAP:  $0,63 \pm 0,15$  vs.  $0,395 \pm 0,177$  N; PACAP + BP:  $0,694 \pm 0,061$  vs.  $0,325 \pm 0,173$  N) (22/A. ábra). Az anastomosisok szakítószilárdsága szignifikánsan ( $p < 0,0001$ ) csökkent a saját ép artériához képest (100%): SHAM anastomosis:  $30 \pm 10,4\%$  ( $p < 0,0001$  vs PACAP), BP:  $25,9 \pm 12,3\%$  ( $p < 0,0001$  vs. PACAP;  $p = 0,0456$  vs. PACAP + BP), PACAP:  $57,8 \pm 8,3\%$  ( $p = 0,0137$  vs. PACAP + BP), PACAP + BP:  $39,6 \pm 7,5\%$ . A szakítási görbék emelkedő szakaszának meredeksége csökkent az ép érhez képest. A görbék 33–100%-os szakaszában az ép artériához képest a legnagyobb eltérést a BP csoport mutatta ( $28,3 \pm 8,9\%$ ), míg a legkisebb eltérés a PACAP csoportban volt ( $64,8 \pm 22,5\%$ ). A másik két csoport közel azonos eltérést mutatott (SHAM:  $53,5 \pm 13,4\%$ ; PACAP + BP:  $55,8 \pm 16,8\%$ ) (22/B. ábra). Az anastomizált erek meredekségét a saját ipsilaterális artériájukhoz viszonyítottuk (100%), és mindegyik szignifikáns eltérést mutatott ( $p < 0,0001$ ): SHAM csoport:  $50,3 \pm 10,2\%$  ( $p = 0,0021$  vs BP), BP:  $24,5 \pm 9\%$ , PACAP:  $53,7 \pm 13\%$  ( $p = 0,0015$  vs. BP), PACAP + BP:  $52,6 \pm 10,2\%$  ( $p = 0,0039$  vs. BP) (22/C. ábra).



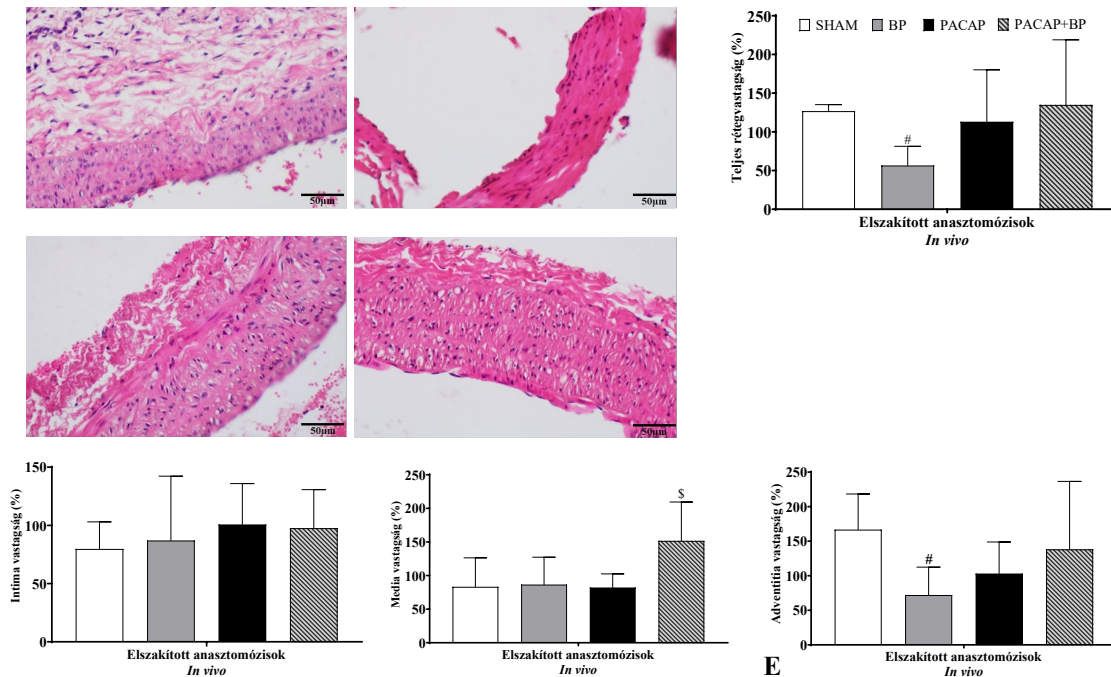
**22. ábra.** Az artériák szakadásához szükséges maximális szakítószilárdsági értékek newtonban (A), a szakítószilárdsági grafikonok teljes meredeksége a 33-100%-os tartományban (B), valamint a meredekségi értékek relatív változása az ellenoldali, intakt érhez képest (C). Átlagok $\pm$ S.D.,  $n=8$ /csoport, \* $p < 0,05$  vs. intakt artéria (SHAM oldal), # $p < 0,05$  vs. SHAM csoport,  $\times p < 0,05$  vs. BP csoport.

### 5.1.6 Hisztológia, molekuláris biológia

#### 5.1.6.1 Érfalrétegek vastagsága

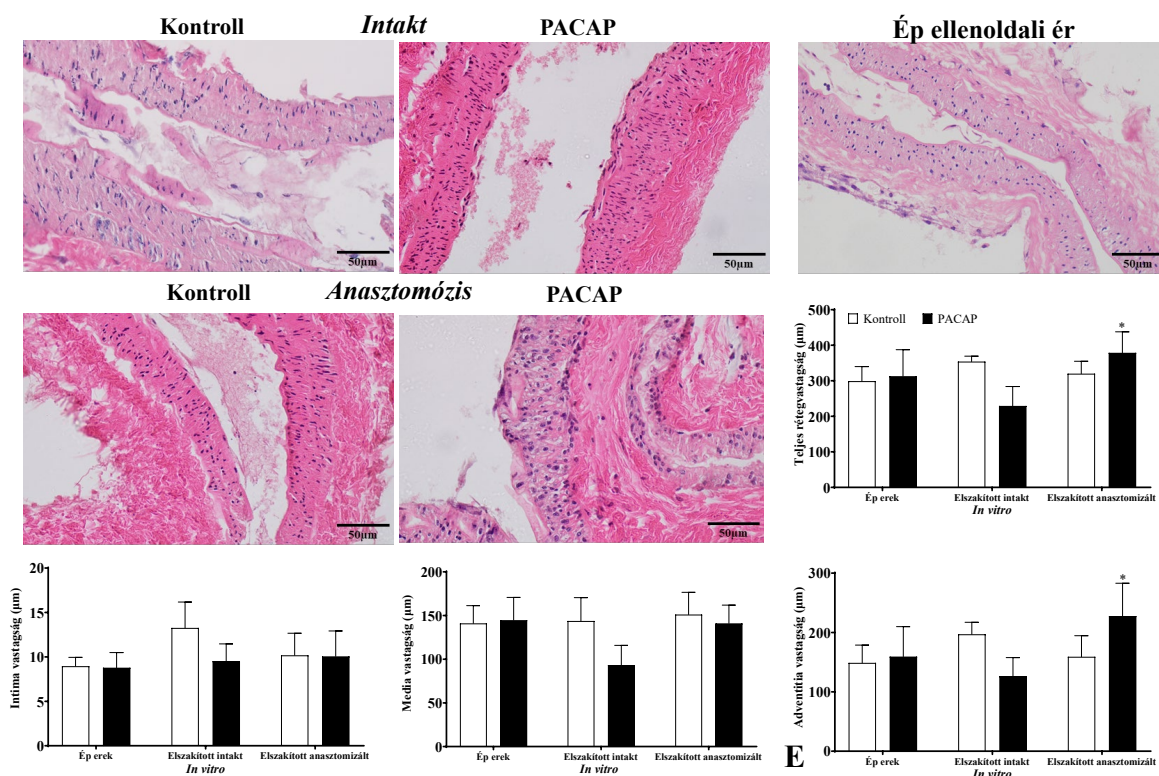
Az artériák falvastagsága csökkent a BP kezelés után ( $p = 0,0058$ ). A kombinált PACAP + BP kezelés védőhatást gyakorolt a csökkenés ellen. Az anastomizált artériákban a tunica intima nem változott a BP vagy PACAP kezelést követően, de enyhe, nem szignifikáns növekedés figyelhető meg a SHAM anastomosisokhoz képest. A tunica media vastagsága szignifikánsan nőtt a PACAP + BP kezelésű mintákban ( $p = 0,0121$ ) a többi anastomizált

artériához képest. A tunica adventitia falvastagságának csökkenése szignifikáns volt a BP kezelt anastomosisokban a SHAM-hez képest, míg a PACAP kezelés enyhe csökkenést eredményezett. A kombinált kezelés csökkentette a tunica adventitia vastagságának csökkenését az anastomizált erekben (23. ábra).



**23. ábra.** Reprezentatív szövettani fotók (eredeti objektív: 20X) és az érfalvastagság adatok (szakítószilárdsági próbával mért) artériákból. A: reprezentatív H&E festett metszetek, B: teljes rétegvastagság, C: tunica intima vastagsága, D: tunica media vastagsága, E: tunica adventitia vastagsága. Átlag±S.D., n=8/csoport, #p<0,05 vs. SHAM csoport.

Az ép erek falai (ép ellenoldali ér referenciaértékként) a PACAP kezeléstől függetlenül nem mutattak szignifikáns változást, sőt az erek szakítással történő traumatizációját követő *in vitro* PACAP kezelés sem okozott szignifikáns változást az anastomizált erekben. Ezzel szemben a PACAP növelte az artériák falvastagságát. A tunica intima külön elemzése nem mutatott szignifikáns változást sem ép, sem anastomizált erekben az *in vitro* PACAP kezelést követően. A tunica media vastagsága enyhén csökkent az *in vitro* tenyésztett erekben, de egyik csoportban sem volt szignifikáns eltérés. Érdekes módon a PACAP kezelés csökkentette a tunica adventitia vastagságát az *in vitro* tenyésztett erekben, de szignifikáns növekedést okozott az anastomizált erekben (24. ábra).



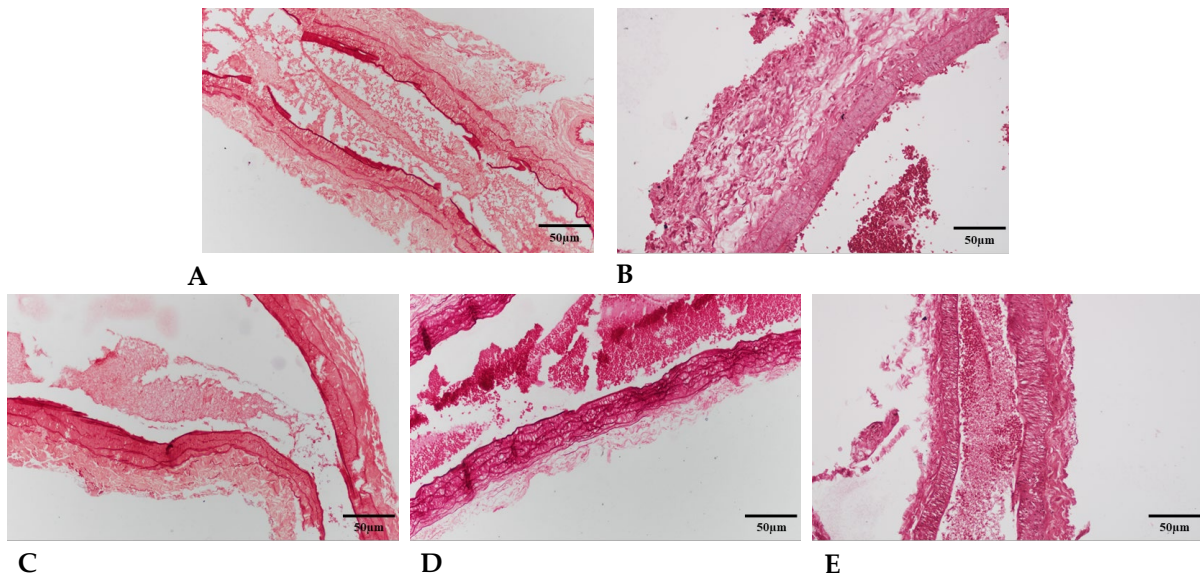
**24. ábra.** Reprezentatív szövettani fotók (eredeti objektív nagyítás: 20X) és az érfal rétegvastagság adatai az *in vitro* tenyésztett (14 nappal a szakítás után: ép vagy anasztomizált; 14 nappal az eltávolítás után: SHAM) artériák. A: reprezentatív H&E festett metszetek, B: teljes rétegvastagság, C: tunica intima vastagsága, D: tunica media vastagsága, E: tunica adventitia vastagsága. Átlag  $\pm$  S.D., n=8/csoport

#### 5.1.6.2 Elasztin expresszió

Az erek elasztikus rostjainak mennyiségét orceinfestéssel vizualizáltuk, kvantifikáltuk. Az anasztomizált artériákban az orceinfestés intenzitása csökkent a BP csoportban az ép és SHAM anasztomizált erekhez képest. Ezzel szemben a PACAP hozzáadása a BP-hez növelte az orceinfestés intenzitását az anasztomizált erekben *in vivo* (25. ábra). Az elasztin lamellák számát is meghatároztuk a tunica mediában, és némi eltérést észleltünk a különböző csoportok ép artériái között. A BP jelenléte enyhe csökkenést okozott az elasztikus gyűrűk számában az anasztomizált tunica mediában. A PACAP kezelés növelte az elasztikus lamellák számát ezekben az erekben, de a BP alkalmazása csökkentette a PACAP hatását az anasztomizált artériákban. Az orcein-pozitivitást a kanül körüli kötőszövetben is mértük, ahova PACAP diffundálhatott. Bár az erek környezetében az elasztin-pozitivitás alacsony volt, a PACAP adagolást követően enyhe, de nem szignifikáns növekedés figyelhető meg (IV. táblázat).

Az *in vitro* tenyésztett erek, beavatkozás nélkül, nem mutattak szignifikáns változást az orcein-pozitivitásban a PACAP adagolását követően, de az orcein-pozitivitásuk szignifikánsan magasabb volt, mint a megműtött erekben. A megműtött erekben a PACAP enyhe, de nem szignifikáns csökkenést okozott. Az anasztomizált erekben a PACAP jelenléte nem okozott

változást. Az elasztikus lamellák száma, hasonlóan az *in vivo* kísérletekhez, enyhén nőtt a PACAP hozzáadásával az *in vitro* szövettenyészetekben (IV. táblázat).



**25. ábra.** Reprezentatív orcein festett szövettani fotók (eredeti nagyítás: 20X) az intakt kontroll artériáról (A), a SHAM (B), BP (C), PACAP (D) és PACAP+BP (E) anastomizált artériáikról.

Az elasztin fehérje expresszióját Western blot analízissel is vizsgáltuk (26. ábra). Az ép és anastomizált erek alacsony elasztin expressziót mutattak a SHAM csoportokban. A PACAP és BP kezelés növelte az elasztin expresszióját mind az ép, mind az anastomizált artériákban. Továbbá, a PACAP hozzáadása BP-al vagy anélkül növelte az elasztin expresszióját az anastomizált erekben az ép artériákhoz képest. Hasonló expresszió-növekedést észleltek a PACAP-kezelt *in vitro* szövettenyészetekben (IV. táblázat).

	SHAM		BP		PACAP		PACAP+BP		Szövettenyésztés	
I. típusú kollagén 139 kDa										
	1.0	0.5	1.0	1.0	1.0	0.2	1.0	0.5	1.0	1.4
Elasztin 70 kDa										
	1.0	0.4	1.0	1.1	1.0	1.6	1.0	1.5	1.0	1.5
Aktin 42 kDa										
	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	I	A	I	A	I	A	I	A	SHAM	PACAP

**26. ábra.** Frissen beágyazott és a szövettenyésztett artériák reprezentatív Western blot képei az I. típusú kollagén, elasztin és aktin tekintetében a kísérleti csoportokban.

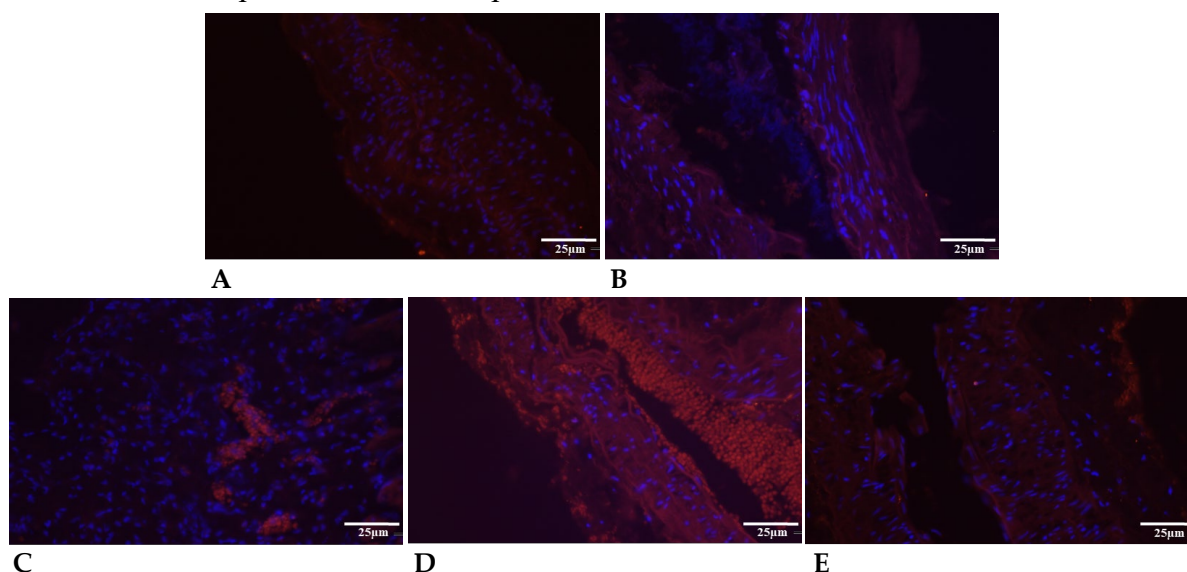
I: intakt, A: anastomizált; n=3 / csoport; relatív denzitás értékek

**IV. Táblázat.** Elasztin-tartalom a szakítást követően beágyazott és a tenyésztett erekben.

Változó	Csoport	Intakt oldal	Anastomisált
<i>Szakítást követően beágyazott erek</i>			
Integrált zöld fénysűrűség (képpontok száma) medián (Q1-Q3)	SHAM	13501,88 (13205,36-197852,10)	14731,83 (13597,90-224739,80)
	BP	81904,64 (13576,89-168056,55)	1587,68 (1117,11- 14289,80)
	PACAP	15613,63 (14051,40-149313,40)	13520,22 (13218,87-14900,47)
	PACAP+BP	13912,72 (13437,50-106210,71)	13516,40 (13218,87-14149,79)
A rugalmas membránok száma (szám/mező) átlagok ± S.D.	SHAM	3,50±0,58	4±1,41
	BP	4,20±0,44	3±1
	PACAP	4,86±1,21	5,40±1,34
	PACAP+BP	5,00±1,58	3,33±1,15
Western blot integrált pixelsűrűség (pixelek száma) átlag ± S.D.	SHAM	1±0	0,6±0,0
	BP	1±0	1,05±0,07
	PACAP	1±0	1,6±0,0
	PACAP+BP	1±0	2,6±0,0
<i>Szakítást követően szövettenyésztőben tartott erek</i>			
Integrált zöld fénysűrűség (pixelek száma) medián (Q1-Q3)	SHAM	13850,36 (13566,50-48305,46)	13871,32 (13486,03-166405,70)
	PACAP	13912,72 (13396,37-14600,46)	14511,32 (14076,57-185590,30)
A rugalmas membránok száma (szám/mező)	SHAM	3,50±0,55	3,75±0,96
	PACAP	4,80±1,30	4,67±0,58

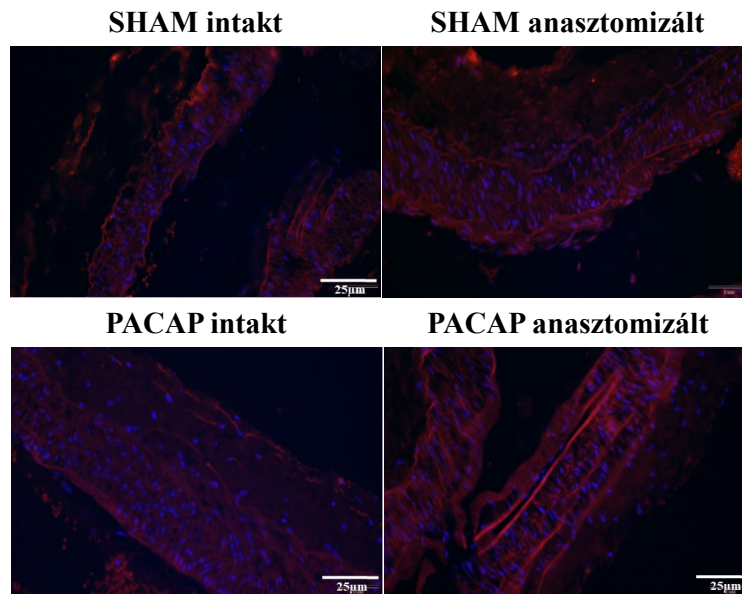
Átlagok ± S.D., n=8/csoport

Az elasztin immunopozitivitását immunhisztokémiával is kimutattuk. A SHAM és BP csoportok ép ereiben diffúz jeleket észleltek, néhány lamella immunpozitivitással (27. ábra). A PACAP-kezelt csoportokban elasztin-pozitív lamellák voltak észlelhetők. A PACAP-kezelt



**27. ábra.** Reprezentatív képek elasztin immunhisztokémiájáról (eredeti nagyítás: 40X) az intakt ellenoldali artéria (A), a SHAM (B), BP (C), PACAP (D) és PACAP+BP (E) anastomisált artériáiról.

anastomisált erekben a diffúz és lamellas elasztin-pozitív jelek hangsúlyosabbá váltak az ép erekhez képest. A BP kezelés csökkentette az elasztin immunpozitív lamelláinak jelét az anastomisált erekben. Hasonló eredményeket észleltek a tenyésztett erekben, ahol erős diffúz elasztin jeleket vizualizáltak az ép *in vitro* tenyésztettekben. A PACAP kezelés növelte a lamellák szerveződését az anastomisált *in vitro* artériákhoz képest (28. ábra).

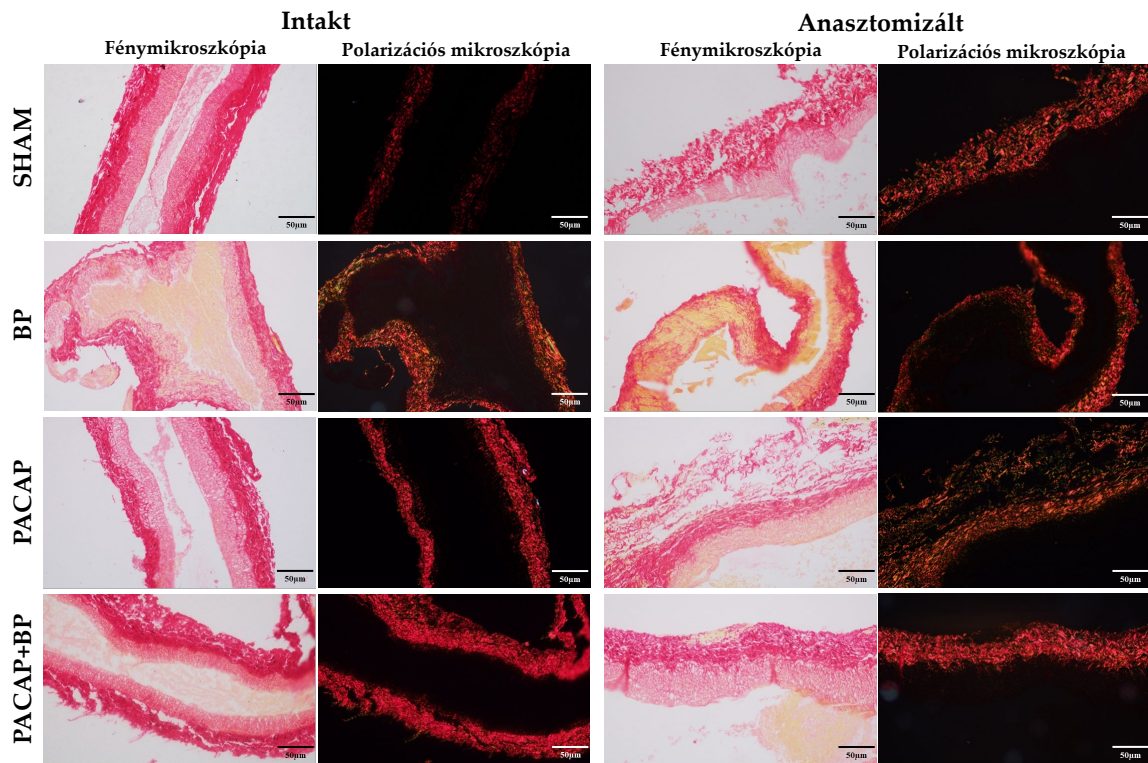


**28. ábra.** Reprezentatív képek az elasztin immunhisztokémiájáról (eredeti nagyítás: 40×) a szövettenyészített artériákon.

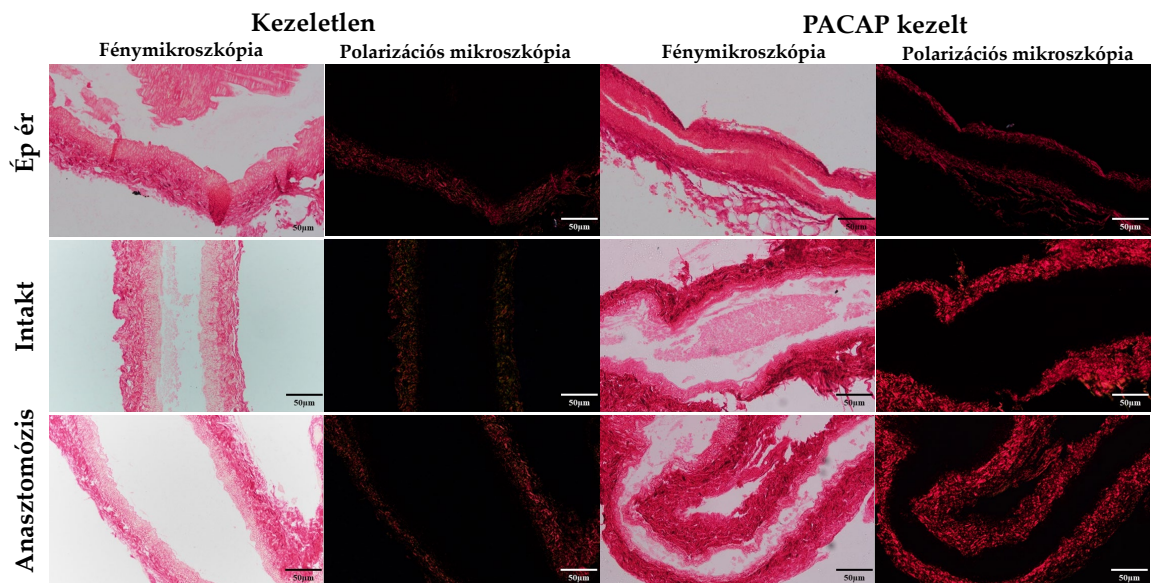
### 5.1.6.3 I. típusú kollagén expresszió

Az artériák tunica mediájában az I. típusú kollagén befolyásolja az erek integritását, így a kollagén jelenlétét picrosirius festéssel vizsgáltuk (29. és 30. ábra).

Az ép erekben a BP csökkentette a vastag, de emelte a vékony kollagénszálak mennyiségét a tunica mediában (V. táblázat). A PACAP főként a vékony szálak esetén okozott csökkenést, az anastomisált ereknél viszont emelkedett a vastag szálak mennyisége. Az *in vitro* szövettenyészettekben az anastomisált majd elszakított (traumatizált) ereket vizsgáltuk. Ebben az esetben a PACAP kezelés enyhén növelte a vastag kollagénszálak jelenlétét a vékony szálak megváltoztatása nélkül. A ép artériákhoz hasonló mennyiségű vastag kollagénszál volt észlelhető a SHAM csoportokban, de csökkenés figyelhető meg a PACAP-kezelt erekben. A vékony szálak számossága csökkent mind a SHAM, mind a PACAP szövettenyészettekben. Az anastomisált megműtött erekben csökkent a vastag szálak száma az ép és megműtött SHAM csoporthoz képest. A vastag és vékony kollagénszálak száma szignifikánsan csökkent a PACAP-kezelt *in vitro* anastomisált tenyésztettekben (V. táblázat).

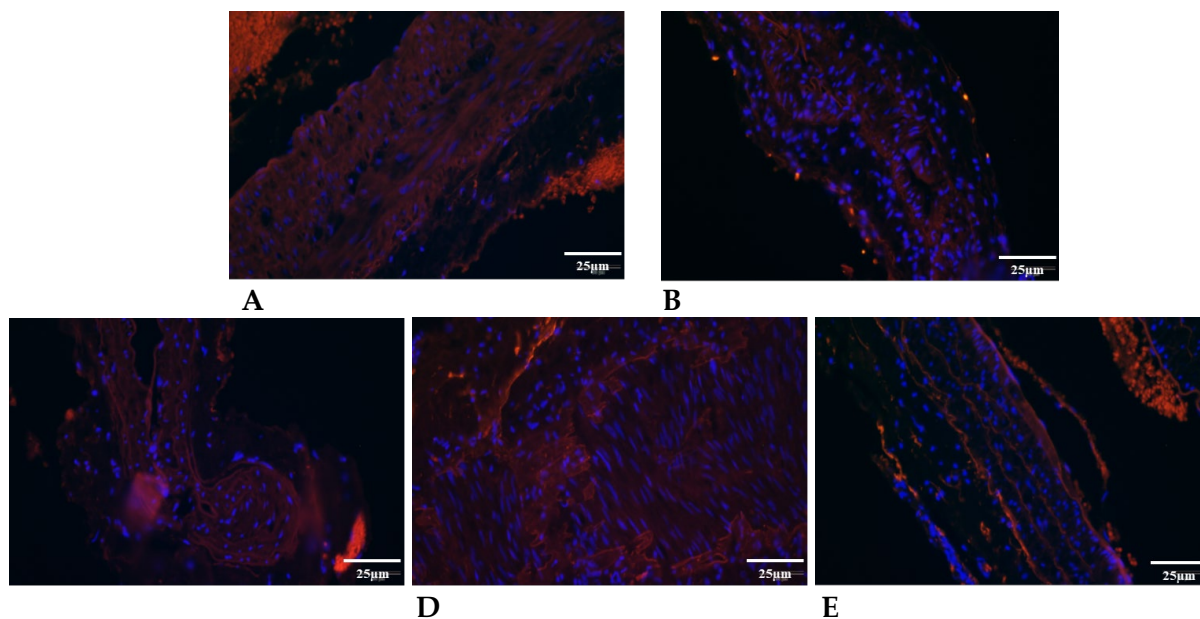


29. ábra. Reprezentatív picosirius festett artéria metszetek. (eredeti objektív nagyítás: 20×)



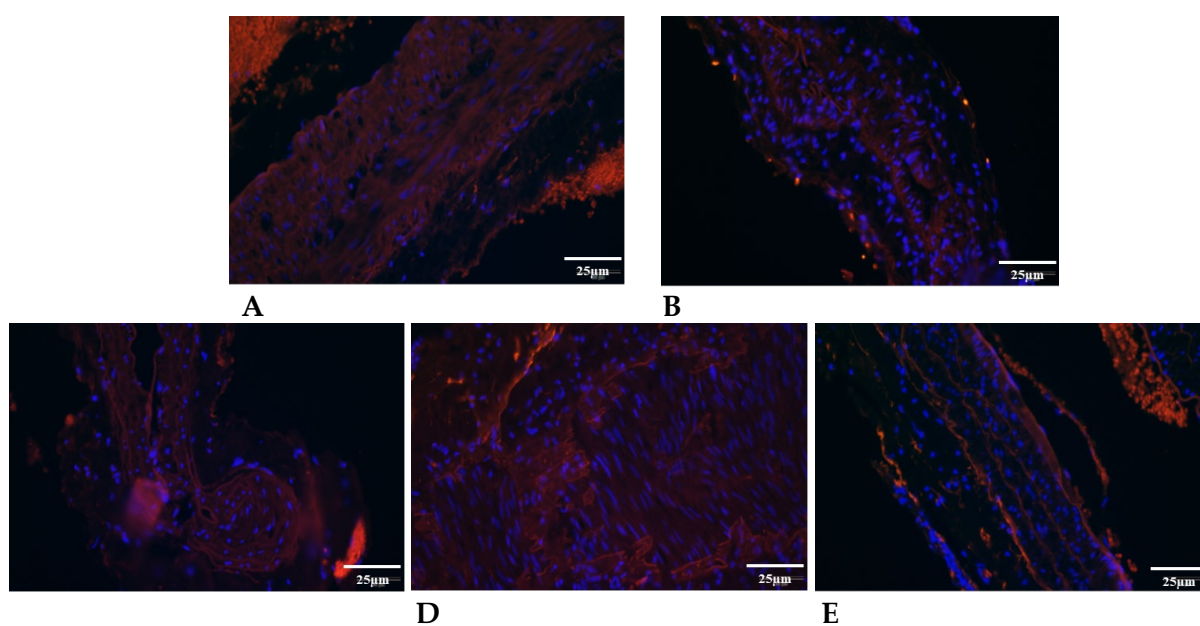
30. ábra. Reprezentatív picosirius festett szövettenyésztett artériák. (eredeti objektív nagyítás: 20×)

Az I. típusú kollagén specifikus expresszióját Western blot analízissel tovább vizsgáltuk, és hasonló eredményeket kaptunk *in vivo*. A PACAP alkalmazása csökkentette az expressziót az anastomizált erekben, de a BP jelenléte nem okozott változást. Az *in vitro* szövettenyészetekben az I. típusú kollagén expresszió alig volt észlelhető, de enyhe emelkedés figyelhető meg az anastomizált tenyészetekben (V. táblázat, 30. ábra). Az I. típusú kollagén lokalizációját immunhisztokémiával is követtük (31. ábra).



**31. ábra.** Reprezentatív képek az I-es típusú kollagén immunhisztokémiájáról (eredeti objektív nagyítás 40X) az intakt kontroll artériáról (A), a SHAM (B), BP (C), PACAP (D) és PACAP+BP (E) csoportok anastomizált artériáiról.

SHAM és kezelt artériák tunica mediája diffúz és szálszerű immunpozitivitást mutatott. Az ép artériákban a PACAP és BP alkalmazás csökkentette a diffúz I. típusú kollagén jeleket és hasonló módon csökkentette a kollagénszálakat, mint a picrosirius festés eredményei. Az anastomizált erek I. típusú kollagén immunpozitivitása tovább csökkent, és a száljelek eltűntek a PACAP-kezelt és BP csoportokban. A szövetenyészetekben diffúz és száljeleket észleltek az ép erekben, ahol a PACAP adagolás tovább növelte a tunica media kollagénszál-tartalmát. Az anastomizált tenyésztett erekben I. típusú kollagénszálak voltak észlelhetők a tunica mediában. A PACAP adagolás növelte a diffúz kollagén jeleket, de nem fokozta a szálképződést (32. ábra).



**32. ábra.** Reprezentatív képek az I-es típusú kollagén immunhisztokémiájáról a szövetenyésztett artériákon. (eredeti objektív nagyítás: 40×)

**V. táblázat.** Az I. típusú kollagén tartalma a frissen eltávolított és a szövettenyésztett erekben.

Változó	Csoport	Intakt oldal	Anastomisált
<i>Szakítást követően beágyazott erek</i>			
Vörös fényintenzitás (pixelek száma) medián (Q1-Q3)	SHAM	13825,44 (9343,24-20063,81)	9291,28 (7364,89-14288,00)
	BP	9322,30 (7509,55-22460,15)	7120,21 (5930,57-7931,24)
	PACAP	12484,11 (8666,51- 13373,92)	10621,18 (8903,27-11105,26)
	PACAP+BP	13198,04 (11975,60-13240,30)	9597,01 (7794,21-10650,40)
	SHAM	1473,62 (1270,92-8565,78)	3799,73 (1564,56-6101,55)
Zöld fényintenzitás (pixelek száma) medián (Q1-Q3)	BP	4389,07 (4042,19-9744,79)	3677,36 (2871,04-4479,74)
	PACAP	2787,34 (2182,58-4455,78)	3223,48 (2049,68-3928,61)
	PACAP+BP	4632,54 (1583,69-4829,60)	1979,14 (1846,70-2104,08)
Western blot integrált pixelsűrűség (szám/mező) átlag ± S.D.	SHAM	1±0	0,4±0
	BP	1±0	1±0
	PACAP	1±0	0,2±0
	PACAP+BP	1±0	0,5±0
<i>Szakítást követően szövettenyésztőben tartott erek</i>			
Vörös fényintenzitás (pixelek száma) medián (Q1-Q3)	SHAM	41106,71 (22098,34-43538,714)	21036,31 (8323,01-21060,99)
	PACAP	65156,94 (6218,90-77448,39)	12360,17 (12281,60-12473,94)
Zöld fényintenzitás (pixelek száma) medián (Q1-Q3)	SHAM	4767,25 (4491,69-5700,38)	5973,45 (2862,03-6410,84)
	PACAP	3199,41 (1657,89-8563,06)	2092,74 (1686,29-5685,69)

Átlag±S.D., n=8/csoport

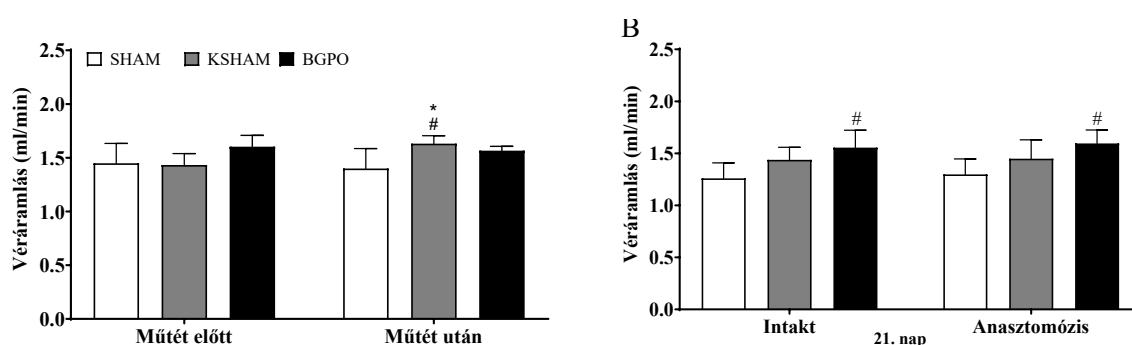
#### 5.1.6.4 Granulomás szövet a kannula körül

Perikannulárisan granulomás szövet képződött minden csoportban, de a PACAP-kezelt esetekben ez kifejezettebb volt. A polarizált fényben vizsgált picrosirius-festett metszeteken nem szignifikáns emelkedést észleltünk a PACAP-kezelt csoportokban mind a vörös (SHAM és BP: 8030,26 ± 1224,92; PACAP és PACAP + BP: 17 954,93 ± 5270,92), mind a zöld (SHAM és BP: 3575,05 ± 2248; PACAP és PACAP + BP: 9203,76 ± 3876,22) fénydenzitásban. Az orceinfestésű metszeteken nem volt látható különbség a PACAP-kezelt csoportokban (SHAM és BP: 1212,869 ± 183,353; PACAP és PACAP + BP: 1382,403 ± 93,97) integrált fényssűrűség tekintetében.

## 5.2 A BGP-15 érgyógyulásra kifejtett hatásának vizsgálata

### 5.2.1 Általános megfigyelések

A kutatás során nem talákoztunk aneurizmával, vagy trombózissal. Az áramlási paraméterek a műtét során alig változtak, egyedül a KSHAM csoportban volt megfigyelhető egy szignifikáns változás az alap értékhez ( $p=0,0116$ ) és a SHAM ( $p=0,0203$ ) csoporthoz képest. A 21. napon, a saját ép ellenoldali artériák adataival összevetve az anasztomosisok áramlását, a BGPO csoportnál volt megfigyelhető szignifikáns emelkedés, az ép és az anasztomizált oldalon is. Ezen adatok mérése állatonként közel azonos időben (anesztetikus mélységben) történt, így a relatív adatokat vizsgálva, nem volt eltérés a csoportok között (SHAM: 95,70%, KSHAM: 1,18%, BGPO: 0,99%) (33. ábra)



**33. ábra** Artériás véráramlás a Műtét napján (A), valamint a 21. napon (B).

Átlag±S.D., n=8/csoport, \* $p<0,05$  vs. műtét előtt; # $p<0,05$  vs. SHAM

Az állatok az általános gondozási folyamatokat, a kétnaponkénti kezeléseket, illetve a sebtisztításokat jól tűrték. Ez főként a BGP kezelt állatok esetén volt megfigyelhető. Az esetükben általánosságban elmondható, hogy sokkal nyugodtabban viselkedtek a társaikhoz képest. Az állatok tömege a műteti traumát követően növekedni kezdett és a BGPO csoport kivételével a 21. napra meg is haladták a kiindulási értéket, a SHAM ( $p=0,0132$ ) és a BGPK ( $p=0,0303$ ) csoportokban ez szignifikáns mértékű volt (VI. táblázat).

**VI. táblázat.** Az állatok súlyának változása a nyomon követési időszak alatt.

Változó	Csoport	Alap	7. nap	14. nap	21. nap
Testtömeg (g)	SHAM	325,13±18,01	313,83±11,6	344,71±23,88	365,71±27,69 *
	KSHAM	349,75±6,04	327,88±12,45 *	343±7,13 *	352,25±11,91
	BGPK	308,5±7,07	318,13±11,21 *	328,75±11,9 *	341±12,01 *
	BGPO	337,33±11,5	320,43±29,79	312,83±16,44 *	336,33±11,68

Átlag±S.D., n=8/csoport \* $p<0,05$  vs. Alap

## 5.2.2 Laboratóriumi vizsgálatok

### 5.2.2.1 Hematológiai mérések

Bár a BGP-15-öt lokálisan, közvetlenül az anastomosis helyére juttattuk, nem csak az erekre volt hatással, felszívódás révén a keringésbe is kerülhetett, így szisztémás hatásokat is kifejthetett. A KSHAM csoportban szignifikáns, tartós leukocytosis alakult ki, amely a 7. naptól a 21. napig fennállt, jelezve a műtéti trauma és a kanül által kiváltott elhúzódó gyulladással való választ. Ezzel szemben a BGPK és BGPO csoportokban alacsonyabb, átmeneti FVS-emelkedés volt csak megfigyelhető, sőt a 14. napon a BGPK csoportban a kiindulási érték alá csökkenéssel, ami a BGP-15 gyulladáscsökkentő hatását erősíti (VII. táblázat).

**VII. Táblázat.** Hematológiai paraméterek változásai.

Változó	Csoport	Alap	7. nap	14. nap	21. nap
FVS (10 <sup>9</sup> /L)	SHAM	10,22±1,89	11,23±2,4	11,48±2,31	12,54±3,42 *
	KSHAM	11,71±1,59	16,47±2,71 *, #	17,18±3,16 *, #	16,55±3,25 *
	BGPK	11,11±1,52	12,79±3,31	9,26±1,18 *, \$	10,41±2,42 \$
	BGPO	9,52±1,16 \$	12,35±2,17 *, \$	11,64±2,3 \$	11,66±3,2
VVS (10 <sup>12</sup> /L)	SHAM	8,04±0,27	7,53±0,75	8,23±0,44	8,27±0,35
	KSHAM	7,91±0,83	7,48±0,31	7,67±0,4 #	8,1±0,23
	BGPK	7,77±0,17	7,61±0,28	7,54±0,35 #	7,79±0,2 #, \$, ×
	BGPO	8,04±0,61	7,4±0,27 *	7,04±0,46 *, #, \$	7,06±0,34 *, #, \$
Htc (%)	SHAM	45,17±1,88	42,69±4,96	45,87±2,14	46,38±1,76
	KSHAM	45,59±3,65	42,69±1,94 *	43,34±2,62	45,59±1,86
	BGPK	44,71±1,37	43,24±1,17 *, ×	42,69±1,5 *, #	44,29±1,64
	BGPO	45,52±3,57	40,83±1,43 *	38,96±2,7 *, #	39,41±2,5 *, #
Hgb (g/L)	SHAM	15,35±0,55	14,36±1,32	15,22±0,77	15,06±0,57
	KSHAM	15,05±1,81	13,96±0,66	13,99±0,94 #	14,68±0,67
	BGPK	14,82±0,51 #	14,45±0,45	14,11±0,52 #	14,54±0,45 #
	BGPO	15,18±1,06	13,53±0,54 *	12,38±0,91 *, #	12,52±0,88 *, #
MCV (fL)	SHAM	56,54±1,42	56,7±1,87	55,92±1,43 *	56,34±1,34
	KSHAM	57,81±1,86	57,1±1,14 ×	56,49±1,37	56,28±1,33
	BGPK	57,53±1,07	56,83±1,24 *, ×	56,69±1,25 *, ×	56,87±1,68
	BGPO	56,63±0,81	55,16±0,91 *	55,36±0,89 *	55,77±1,25 *
Plt (10 <sup>9</sup> /L)	SHAM	689,81±312,82	997,43±177,14 *	931,93±232,62	834,5±142,34
	KSHAM	733,13±160,84	774,19±295,95	725,71±309,58	902,79±229,66
	BGPK	744,86±191,93	667,13±327,53	898±148,42	725,36±316,77
	BGPO	809,15±79,78	947,43±72,96 *	992,5±138,78 *	962±86,99 *

Átlag±S.D., n=8/csoport \*p<0,05 vs. alap, #p<0,05 vs. SHAM, \$ p<0,05 vs. KSHAM, × p<0,05 vs. BGP

A BGPO csoportban mind a vörösvértestszám, mind a hematokrit értékek szignifikáns, folyamatos csökkenést mutattak, különösen a 14. és 21. napon (VVS: 7,04±0,46 és 7,06±0,34; Htc: 38,96±2,7 és 39,41±2,5). A BGPK csoportban viszont enyhébb csökkenés volt megfigyelhető, amely a 21. napra közel normalizálódott. Ezzel szemben a többi csoportban csak a műtéti traumát követő első héten volt jelentősebb eltérés az alapértékekhez képest. A BGPO csoportban a hemoglobinszint a 14. és 21. napon is szignifikánsan alacsonyabb volt,

mint a többi csoportban. Ez az érték a vörösvértestszám és hematokrit csökkenésével párhuzamosan jelentkezett, míg a BGPK csoportban csak enyhe, de konzisztens csökkenés volt tapasztalható a 14. napig. A SHAM és KSHAM csoportokban a hemoglobinszint jelentősebb eltérése a 7. napra korlátozódott (VII. táblázat).

A BGPO csoportban szignifikánsan alacsonyabb MCV-értékeket mértünk minden időpontban, ami a mikrocitózis irányába történő eltolódásra utalhat. A BGPK csoportban szintén kisebb, de statisztikailag szignifikáns csökkenés volt észlelhető a korai postoperatív hetekben. A kontrollcsoportokban az MCV nem mutatott klinikailag releváns változást. A BGPO állatokban tartós trombocitózis alakult ki, a 7. naptól kezdve mindvégig szignifikánsan magasabb értékekkel. A BGPK csoportban és a KSHAM csoportban nem észleltünk számottevő változást a trombocitaszámokban. A SHAM csoportban átmeneti, posztoperatív trombocitaemelkedés volt megfigyelhető, amely a 14. naptól csökkent (VII. táblázat).

#### 5.2.2.2 Vörösvérsejt deformabilitás és aggregatio

Az  $EI_{max}$  értékek minden csoportban kis mértékű ingadozást mutattak, de a különbségek klinikailag nem szignifikánsak. Az  $SS_{1/2}$  érték tekintetében a KSHAM csoportban jelentős csökkenés volt tapasztalható a 7. napon ( $p=0,0071$  vs alap érték), ami a VVS deformálhatóság romlását jelezheti. A BGPO és SHAM csoportoknál ilyen eltérés nem volt megfigyelhető. Ezzel szemben a műtėti stressz nélküli BGPK csoportban a 7. napon emelkedett  $SS_{1/2}$  érték volt ( $p=0,0023$  vs alap érték), ami a deformálhatóság romlására utalhat (VIII. táblázat).

A vörösvérsejtek aggregatioja esetén az M 5s paraméter tekintetében, a BGP-t kapó (BGPK és BGPO) csoportokban a 7. naptól kezdődően szignifikáns aggregatiofokozódás volt megfigyelhető ( $*p<0,05$  vs SHAM, KSHAM), amely a 21. napra is fennállt. A KSHAM csoport esetén is markáns emelkedés volt megfigyelhető, ez azonban a 21. napra közel normalizálódott. A hosszabb aggregatios idő (M 10s paraméter) mellett is hasonló tendencia mutatkozott. A SHAM csoportban posztoperatív, átmeneti emelkedés volt látható, Míg a BGPO csoportban a 21. napra jelentős szignifikáns emelkedés volt tapasztalható ( $p=0,001$ ). M1 5s és M1 10s (alacsony nyírófeszültség melletti aggregatio) esetén a BGPK csoportban a 21. napra emelkedést mértünk az M1 5s értékben, ami a posztoperatív aggregatio fokozódására utal. A BGPO csoportban ugyancsak magasabb értékeket láttunk, különösen az M1 10s mutató esetében, amely tartós fokozottabb aggregatios hajlamot jelez (VIII. táblázat).

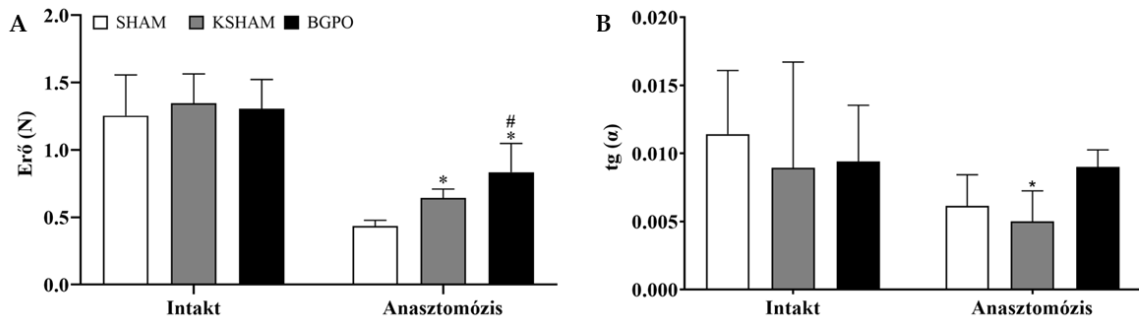
**VIII. táblázat.** A vörösvérsejtek deformabilitásának (EI<sub>max</sub> és SS<sub>1/2</sub>) és a vörösvérsejt-aggregációs paraméterek (M 5s, M 10s, M1 5s és M1 10s) változásai.

Változó	Csoport	Alap	7. nap	14. nap	21. nap
EI <sub>max</sub>	SHAM	0,55±0,03	0,54±0,02	0,57±0,03	0,56±0,02
	KSHAM	0,54±0,04	0,53±0,04	0,56±0,03	0,57±0,01
	BGPK	0,55±0,03	0,56±0,02	0,57±0,03 ×	0,56±0,02
	BGPO	0,56±0,03	0,55±0,02	0,54±0,02	0,57±0,03
SS <sub>1/2</sub> (Pa)	SHAM	2,25±0,3	2,07±0,18	2,05±0,32	1,97±0,5
	KSHAM	2,12±0,27	1,57±0,51 *, #	1,89±0,27	2,15±0,32
	BGPK	2,13±0,19	2,38±0,13 *, #, \$	2,02±0,48	2±0,37
	BGPO	2,16±0,42	2,1±0,17 \$	2,1±0,17	2,16±0,23
M 5s	SHAM	2,36±1,23	2,11±1,08	2,37±0,99	2,53±1,1
	KSHAM	1,86±1,31	4,02±1,18 *, #	3,78±1,31 *, #	2,58±1,24
	BGPK	3,1±0,77	3,84±1,61 #	3,6±2,16 #	3,33±0,85 *
	BGPO	2,73±1,05	3,48±1,91 #	3,89±1,46 *, #	4,16±1 *, #
M 10s	SHAM	5,6±2,14	10,48±2,64 *	9,66±2 *	7,81±3,69 *
	KSHAM	3,09±0,68 #	10,33±1,41 *, #	9,36±2,3 *	5,23±2,27 *
	BGPK	9,54±1,7 #, \$	8,25±2,01 \$	7,49±2,3 *, \$	7,92±2,79 \$, ×
	BGPO	8,32±2,43 #, \$	9,23±2,87	8,46±1,9	11,93±1,96 *, \$
M1 5s	SHAM	3,41±1,47	2,46±0,94	2,42±0,98	2,5±0,94
	KSHAM	2,03±0,91	3,67±1,08 *, #	3,41±0,76 *, #	2,38±0,82
	BGPK	3,83±0,72	2,78±1,03 *, \$	2,48±1,33 *	4,47±0,77 #, \$
	BGPO	3,08±0,77	2,69±1,62	3,67±1,04 *, #	3,56±1,16 #, \$
M1 10s	SHAM	6,26±2,94	7,85±3,14	8,21±3,37	7,31±3,42
	KSHAM	4,58±2,24 *	9,65±2,42 *	9,34±3,22	4,89±2,02 #, ×
	BGPK	9,18±1,14 #	8,68±2,39	8,03±2,96 ×	8,8±2,47 \$
	BGPO	9,68±2,49 #	8,59±3,02	10,49±3,2	10,41±1,41 #

Átlag±S.D., n=8/csoport \*p<0,05 vs. alap, #p<0,05 vs. SHAM, \$ p<0,05 vs. KSHAM, × p<0,05 vs. BGP

### 5.2.3 Szakítószilárdság mérése

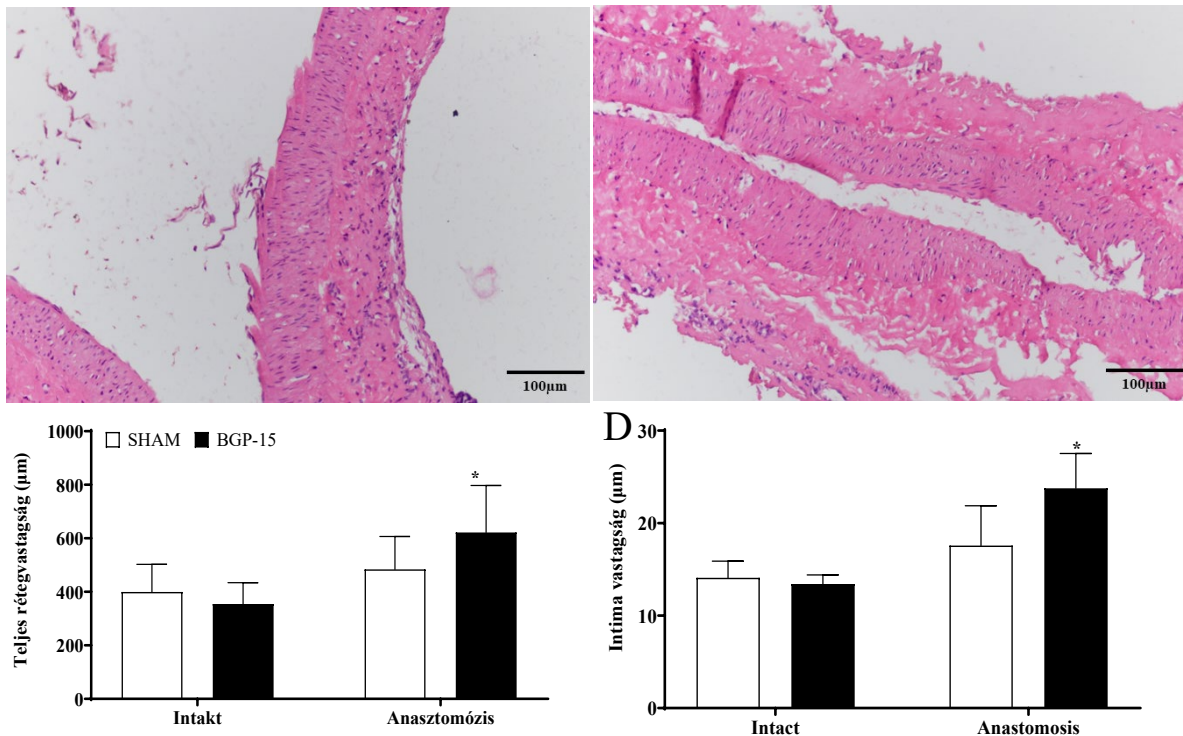
Az intakt artériák jelentősen nagyobb szakítószilárdsággal rendelkeztek, mint az anastomizáltak. A BGP kezelés emelte az anastomosisok szakítószilárdságát, azonban a KSHAM csoportnál is megfigyelhető egy emelkedés. A görbék meredeksége a 33-100%-os tartományban (kollagén dominálta, irreverzibilis deformációs szakasz) esetén a legnagyobb eltérés a KSHAM csoportban volt, míg a BGPO csoport esetén volt a legkevesebb eltérés az intakt erekhez képest, mely az artéria biomechanikai érésének elősegítésére utal (34. ábra).



**34. ábra** Az anastomizált artériák erő-alakváltozás görbéinek numerikus elemzése. A: maximális szakítószilárdság; B: szakítószilárdság meredeksége a 33-100%-os tartományában. Átlag±S.D. n=8/csoport \*p<0,05 vs. intakt; #p<0,05 vs. SHAM;

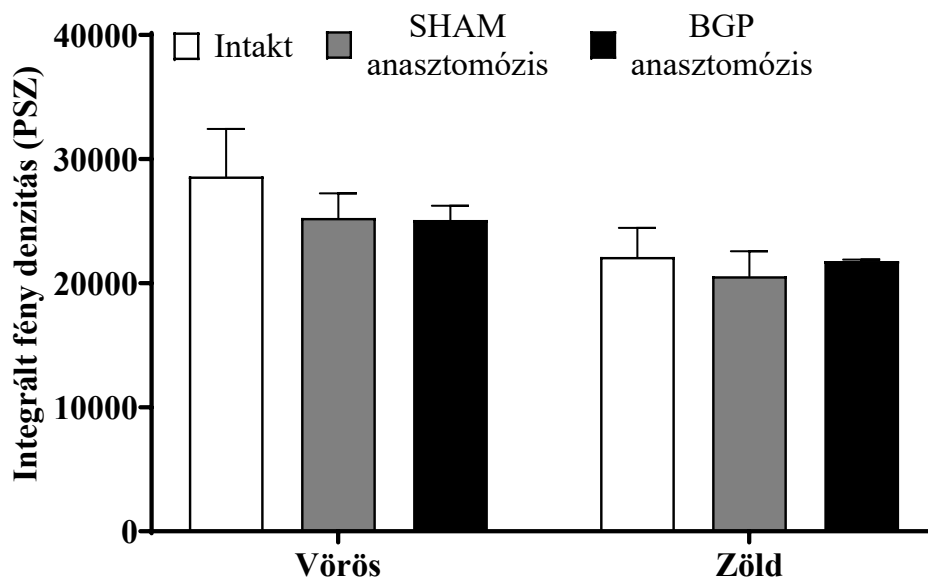
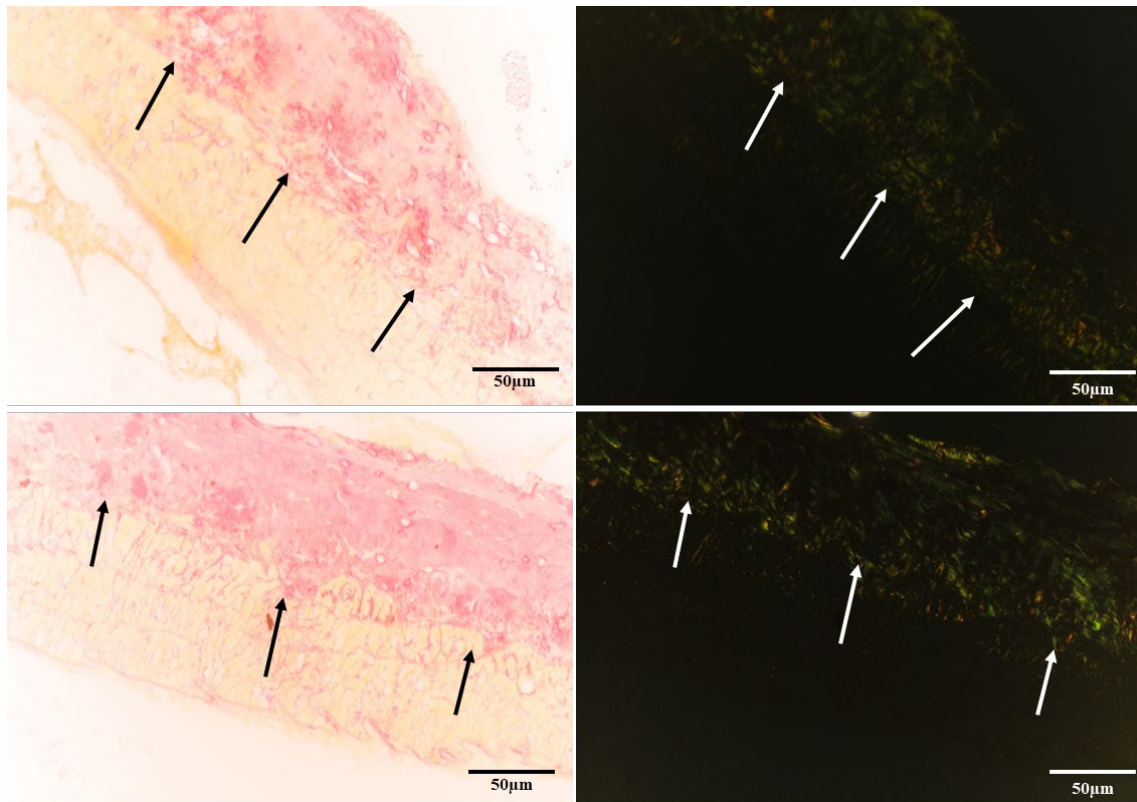
#### 5.2.4 Szöveti vizsgálatok

H&E festett metszteken vizsgáltuk az érfal rétegeinek a vastagságát. A teljes rétegvastagság esetén a BGPO csoportban szignifikáns eltérést láthattunk a SHAM csoporthoz képest, mely a SHAM csoportnál jelen lévő fiziológiás, sebést követő intima hiperplasiát is felerősítette (35. ábra).



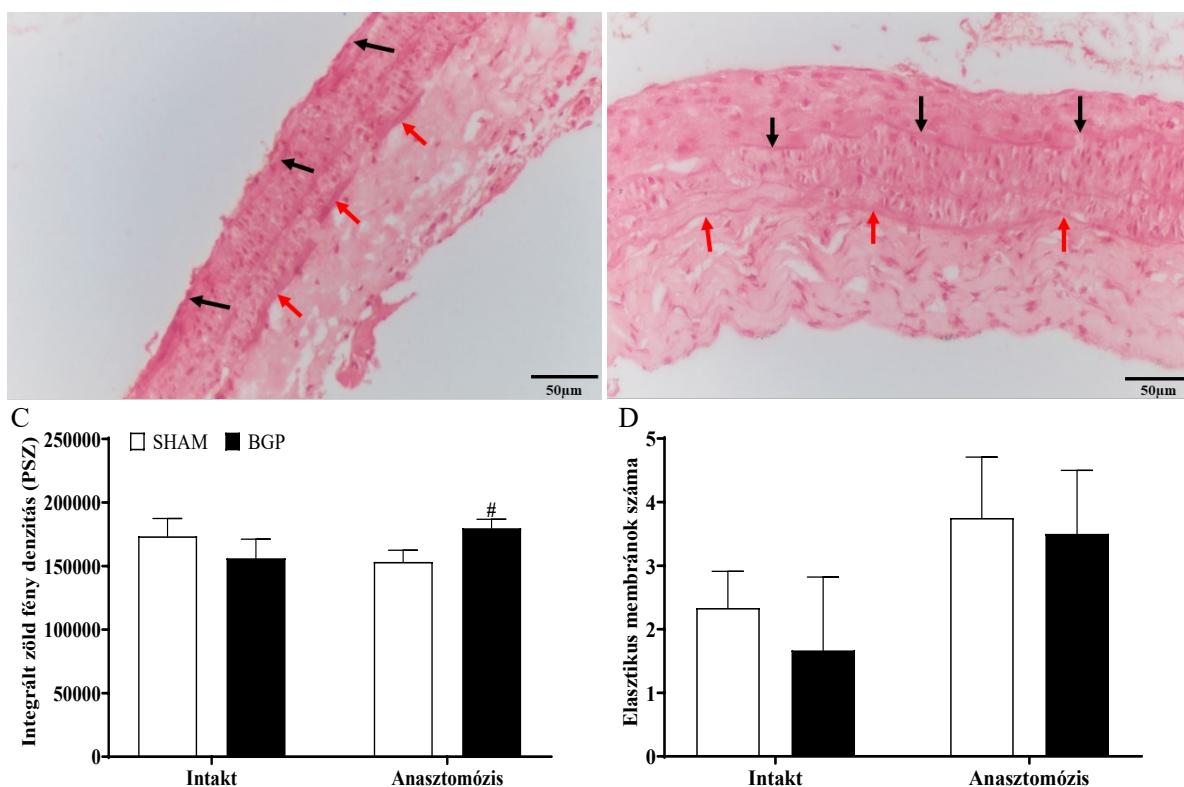
**35. ábra** Reprezentatív szövettani fotók az artériás anastomosisokról (A: SHAM, B: BGPO; eredeti objektív nagyítás: 20X) és a metsztek kvalitatív elemzése. C: teljes rétegvastagság, D: tunica intima vastagsága. Átlag±S.D., n=8/csoport \*p<0,05 vs. Intakt csoport.

Picrosirus festett metszteken vizsgáltuk az I. típusú kollagénrostok mennyiségét. A vastag (vörös) és vékony (zöld) rostok esetén nem szignifikáns mértékben, de alacsonyabb érték volt megfigyelhető az anastomosisokban az intakt erekhez képest. A BGPO csoport anastomosisaiban a vékonyabb rostok mennyisége enyhén emelkedett volt a SHAM csoporthoz képest (36. ábra).



**36. ábra** Reprezentatív picrosirius festett metszetek a kísérleti csoportok eltávolított artériáiból. (A: SHAM, B: BGPO; eredeti objektív nagyítás: 40X; fekete és fehér nyilak: tunica adventitia) és a metszetek kvalitatív elemzése (C). Átlag±S.D., n=8/csoport

Az orcein festett metszeteken vizsgáltuk az elasztikus rostok mennyiségét és az általuk képzett lamellák számát. A BGPO csoport esetén szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető az elasztikus rostok mennyiségében, a lamellák számbeli eltérése nélkül (37. ábra).



**37. ábra** Reprezentatív orcein festett metszetek a kísérleti csoportok eltávolított anasztomizált artériáiból. (A: SHAM, B: BGPO; fekete nyilak: membrana elastica interna, piros nyilak: membrana elastica externa; eredeti objektív nagyítás: 40X) és a metszetek kvalitatív elemzése (C, D). Átlag±S.D., n=8/csoport, #p<0,05 vs. SHAM

### 5.3 Szövetek nedvesen tartásának jelentőségének vizsgálata

#### 5.3.1 Makroszkópos megfigyelések

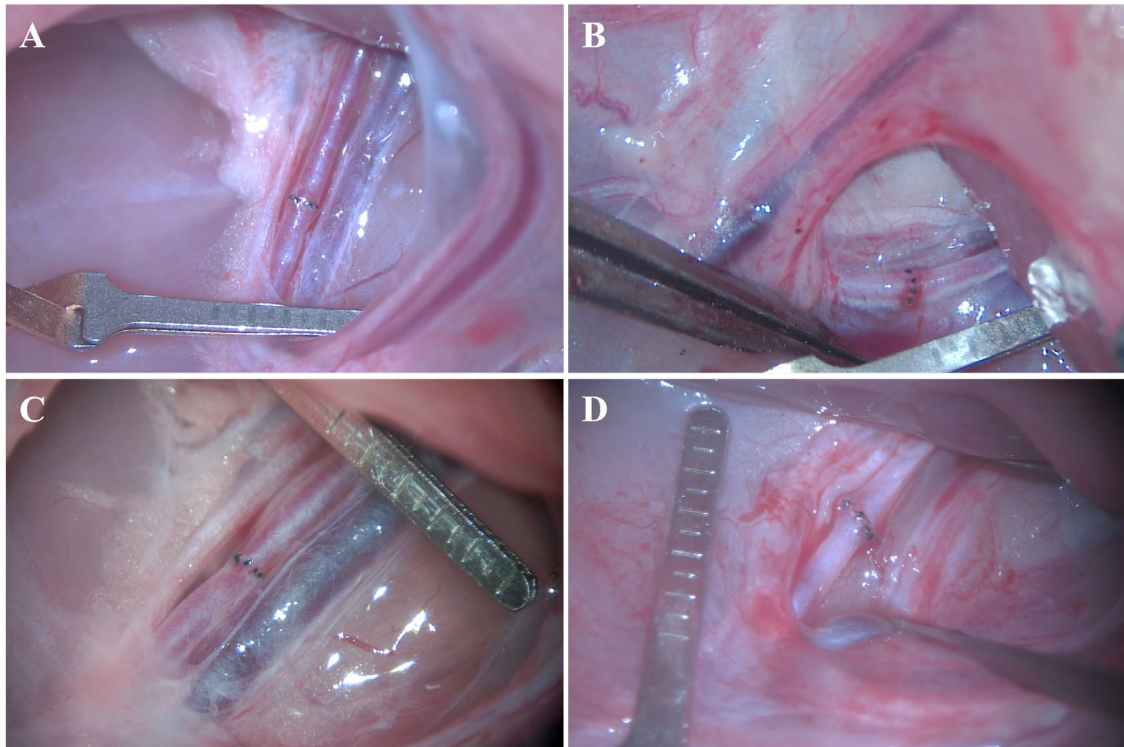
A sebészeti beavatkozások során megfigyeltük, hogy a nem nedvesen tartott szövetek manipulálása egyre nehezebbé vált. A Deszikkált csoportban a 21. napon a műtéti helyen fokozottabb, sűrűbb kötőszövet volt, valamint az egyik artériában trombózis, egy másikban pedig aneurizma alakult ki (38. ábra).

Az epigasztriális ereket nem érintette a metszési és varratkészítési sérülés, de az őket tartalmazó szövetrészt volt a leginkább kitéve a kiszáradásnak. Az állatok súlya a követési időszak alatt hasonlóan változott, azonban a kiszáradásos csoportban sokkal nagyobb volt a szórás, és a súlygyarapodás is alacsonyabb volt az Operált csoporthoz képest (IX. táblázat).

IX. táblázat. Az állatok súlyának változása a nyomon követési időszak alatt.

Változó	Csoport	Alap	7. nap	14. nap	21. nap
Testtömeg (g)	Operált	316,80±11,63	315,40±12,24	343,80±18,43 *	361,40±11,08 *
	Deszikkált	298,88±28,63	303,14±18,65	324,33±28,64 *	335,57±21,22 *

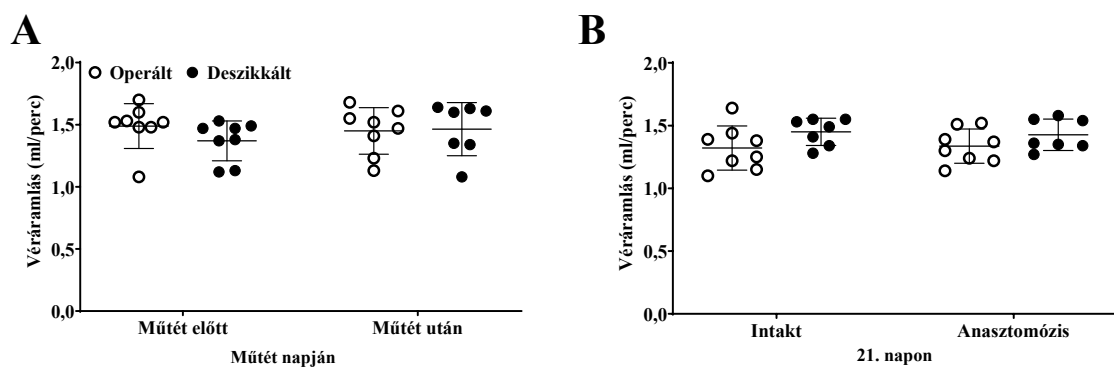
Átlag±S.D., n=8/csoport, \*p<0,05 vs. alap, relative értékek *dölt betűvel*



**38. ábra** Reprezentatív műtéti képek a nedvesített (Operált) (A, B) és a kiszáritott (Deszikkált) csoportokban (C, D) az anastomosis után (A, C) és a 21. napon (B, D). (eredeti nagyítás: 16×)

Mindkét csoportban sikeresen elvégeztük az összes anastomizálást, amint azt a műtét előtti és utáni artériás áramlási sebességek mutatták (39. ábra, A). A 21. napon nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport vagy a két oldal között, de a Deszikkált csoportban enyhén megnövekedett véráramlást figyeltünk meg (39. ábra, B).

Az állatok bőrhőmérséklete nem változott szignifikánsan, de a Deszikkált csoportban enyhén emelkedett talp bőrhőmérsékletet mutattak a 21. napon (X. táblázat).



**39. ábra** Artériás véráramlás az Operált és Deszikkált csoportban a műtét előtt és után (A), valamint a 21. napon (B). Átlag ± SD., n=8/csoport

### 5.3.2 Laboratóriumi paraméterek

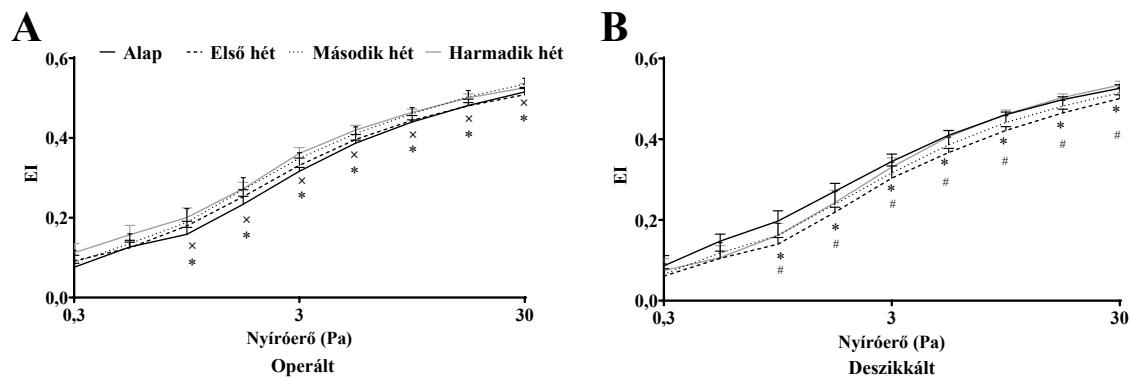
A hematológiai paraméterek esetén enyhe eltérések voltak megfigyelhetők. A követési időszak alatt a fehérvérsejtszám nem változott jelentősen. A vörösvérsejtszám a második héten mindkét csoportban szignifikáns emelkedést mutatott (Operált  $p=0,0169$ ; Deszikkált  $p=0,0018$ ), a harmadik héten pedig csak az Operált mutatott különbséget ( $p=0,0418$ ). A hematokrit a 2. héten szignifikáns növekedést mutatott ( $p=0,0030$ ) a Deszikkált csoportban az Operálthoz képest. A hemoglobin koncentrációban az egyetlen szignifikáns különbség az első héten az Operált csoportban történt ( $p=0,0220$ ). A vérlemezkészám mindkét csoportban enyhe növekedést mutatott, legnagyobb mértékben az Operált csoportban, ahol az első héten szignifikáns ( $p=0,0007$ ) mértékű volt. Az MCV a második ( $p=0,0212$ ) és a harmadik ( $p=0,0233$ ) héten nőtt a Deszikkált csoportban. Az MCH az első héten nőtt a Deszikkált csoportban ( $p=0,0168$ ), míg az Operáltban a második ( $p=0,0002$ ) és a harmadik ( $p=0,0007$ ) héten csökkent. Az MCHC szintén szignifikáns csökkenést mutatott az Operált csoportban a második ( $p=0,0003$ ) és a harmadik ( $p=0,0001$ ) héten (XI. táblázat).

**XI. táblázat.** A kiválasztott hematológiai paraméterek változásai az utánkövetési időszak alatt.

Változó	Csoport	Alap	7. nap	14. nap	Változó
FVS ( $10^9/L$ )	Operált	10,6±1,68	12,71±2,13	12,61±3,275	12,08±3,75
	Deszikkált	10,27±2,31	10,51±1,17	10,414±1,820	11,08±1,31
VVS ( $10^{12}/L$ )	Operált	7,95±0,34	7,95±0,34	7,95±0,337 *	7,95±0,34 *
	Deszikkált	7,3±0,29	7,73±0,29	7,73±0,29 *	7,73±0,29
Hct (%)	Operált	44,87±1,93	43,41±4,82	46,21±2,08	46,37±1,76
	Deszikkált	44,57±1,81	45,06±1,63	46,34±1,58 *	45,65±2,36
MCV (fL)	Operált	56,54±1,42	56,7±1,87	55,92±1,43	56,34±1,34
	Deszikkált	57,68±1,05	57,14±1,54	56,74±1,17 *	56,42±1,03 *
Plt ( $10^9/L$ )	Operált	796,83±156,51	1012,9±88,25	903,2±169,66	857,25±54,46
	Deszikkált	663,94±186,33	756,33±161,73 #	818,08±60,11	776,79±159,54
Hbg (g/L)	Operált	15,35±0,55	14,59±0,94	15,22±0,77	15,06±0,57
	Deszikkált	15,03±0,61	15,09±0,31	15,38±0,57	14,85±0,49
MCH (pg)	Operált	19,26±0,62	19,01±0,41	18,51±0,65 *	18,45±0,59*
	Deszikkált	18,81±0,34	19,14±0,35 *	18,81±0,34	18,71±0,58
MCHC (pg)	Operált	34,07±0,73	33,53±1	33,09±0,52 *	32,71±0,49 *
	Deszikkált	33,73±0,75	33,52±0,73	33,17±0,61	33,19±1,03

Átlagok±S.D., n=8/csoport, \* $p<0,05$  vs. alap, # $p<0,05$  vs. SHAM

Vizsgáltuk a vörösvérsejtek deformálhatósági paraméterét is. A Deszikkált csoport görbéi az első héten mutatták a legnagyobb csökkenést az alaphoz képest, ami a deformálhatóság romlására utal. Érdekes módon az Operált csoport görbéi a beavatkozást követően emelkedést mutattak (40. ábra). Az  $EI_{max}$  és  $SS_{1/2}$  értékek között nem volt szignifikáns különbség a csoportok között. Az  $EI_{max}/SS_{1/2}$  az első héten szignifikáns csökkenést mutatott a Deszikkált csoportban az alaphoz ( $p=0,0014$ ) és az Operálthoz ( $p=0,0471$ ) képest. Az EI 3Pa a műtét után csökkenést mutatott a csoportokban, de a harmadik héten az értékek növekedtek, leginkább az Operált esetén ( $p=0,0061$  vs. alap) (XII. táblázat).



**40. ábra** Deformálhatósági görbék az Operált (A) és a Deszikkált (B) csoportokban. A vörösvérsejtek deformálhatósága az elongációs indexszel jellemezhető, amelyet a hozzá tartozó nyírófeszültség függvényében ábrázolunk. Az adatokat átlag $\pm$ SD értékeként mutatjuk be.  $n=8$ /csoport, \* $p<0,05$  vs. alap

A vörösvérsejtek aggregatiojának mértékét az aggregációs index fejezi ki. Az M 5s és M1 5s index paraméterei a műtétet követően a deszikkált csoportban megemelkedtek, és az első héten szignifikánsak voltak a SHAM-hez képest (M 5s  $p=0,0190$ ; M1 5s  $p=0,0026$ ), majd a harmadik hétig normalizálódtak. Az M 10s paraméterben a műtétet követően az Operált csoportban növekedés, míg a deszikkált csoportban csökkenés volt tapasztalható. Ez az első héten szignifikáns különbséget okozott a két csoport között ( $p=0,0423$ ), de a harmadik hétre normalizálódtak. Az M1 10s paraméter csak kis, nem szignifikáns változásokat mutatott (XII. táblázat).

**XII. táblázat.** A vörösvérsejtek deformálhatóságának ( $EI_{max}$  és  $SS_{1/2}$ ) és a vörösvérsejt-aggregációs paraméterek (aggregációs indexek M 5s, M 10s, M1 5s és M1 10s) változása az Operált és a Deszikkált csoportban a követési időszak alatt.

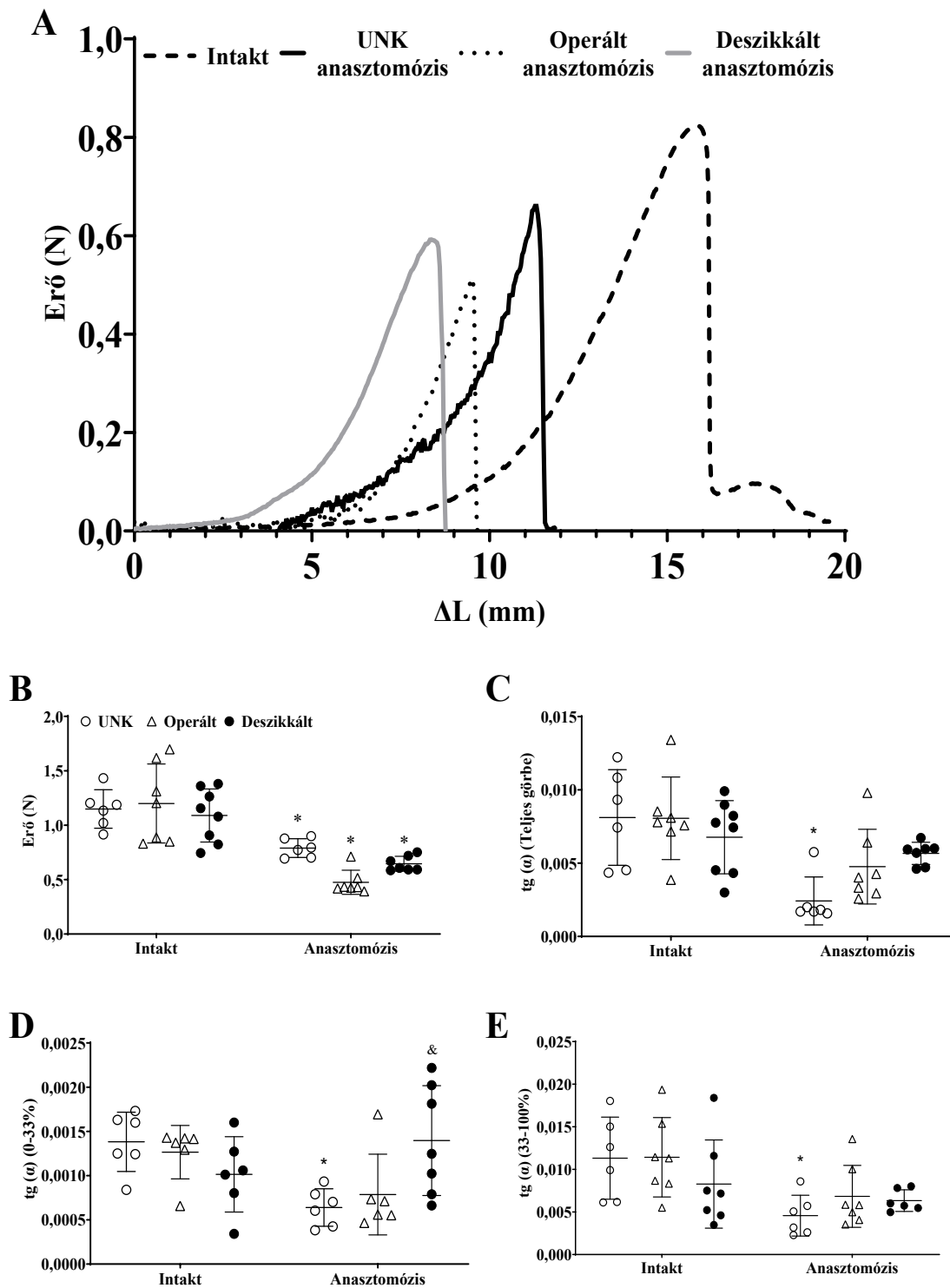
Változó	Csoport	Alap	7. nap	14. nap	Változó
EI at 3 Pa	Operált	0,335±0,025	0,336±0,019	0,350±0,027	0,364±0,01 *
	Deszikkált	0,349±0,016	0,323±0,044	0,327±0,031	0,343±0,03
$EI_{max}$	Operált	0,549±0,027	0,533±0,023	0,570±0,025	0,555±0,023
	Deszikkált	0,573±0,019 #	0,554±0,031	0,564±0,023	0,567±0,019
$SS_{1/2}$ (Pa)	Operált	2,234±0,208	2,158±0,233	2,025±0,326	2,158±0,154
	Deszikkált	2,122±0,268	2,477±0,365 *	2,335±0,441	2,223±0,298
$EI_{max}/SS_{1/2}$ (Pa <sup>-1</sup> )	Operált	0,254±0,019	0,250±0,029	0,273±0,039	0,254±0,019
	Deszikkált	0,273±0,020	0,219±0,026 *, #	0,238±0,039	0,265±0,04
M 5s	Operált	2,35±1,07	2,11±0,94	2,37±0,99	2,54±1,1
	Deszikkált	2,51±0,92	2,86±0,85 #	3,18±1,93	2,74±1,32
M 10s	Operált	7,49±3,21	9,09±2,91	8,13±2,92	7,97±3,84
	Deszikkált	8,36±2,74	7,13±2,34 #	6,29±3,92	7,73±3,71
M1 5s	Operált	2,79±1,33	2,46±0,85	2,52±0,95	2,62±0,91
	Deszikkált	2,86±1,07	3,27±0,76 #	2,56±1,45	2,78±1,04

Átlagok±S.D., n=8/csoport, \*p<0,05 vs, alap; #p<0,05 vs. Operált

### 5.3.3 Szakítószilárdság mérése

A szakítószilárdsági mérésekből erő-megnyúlás diagramokat kaptunk, amelyeket numerikusan is elemeztünk (41. ábra). Az artériák feszültség-alakváltozás görbéinek lefutása az elasztomerekhez hasonló. Az elemzés meghatározta a maximális szakítószilárdságot (41. ábra, B), amelyre mindhárom csoport anastomosisa szignifikánsan gyengébbnek bizonyult az ép kontralaterális artériához képest (UNK p=0,0146; Operált p<0,0001; Deszikkált p=0,0006). A csoportok között nem volt szignifikáns különbség, de a legerősebbek a frissen készült UNK anastomosisok, a leggyengébbek pedig az Operált artériák voltak.

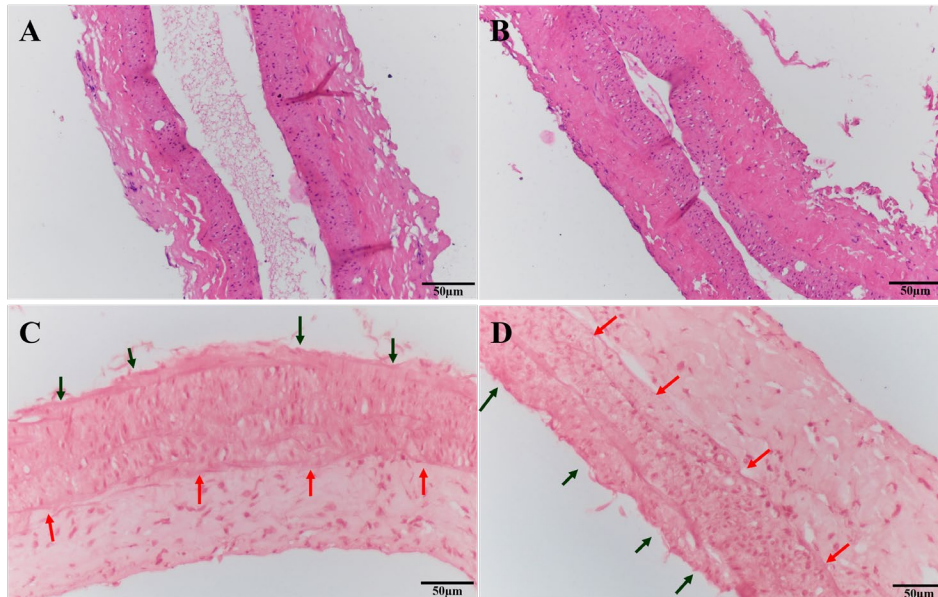
A görbék meredekségét a teljes szakaszon (0,001N- maximális pont; 41. ábra, C) és külön-külön a teljes szakasz 0-33% (41. ábra, D) és 33-100% (41. ábra, E) területein vizsgáltuk. A teljes görbe esetében a UNK anastomosisnál volt a legnagyobb eltérés a saját kontralaterális artériához képest (p=0,0024), mind a görbe kezdeti részén (0-33%) (p=0,0138 vs. saját alap), mind a görbe terminális részén (33-100%) (p=0,0138 vs. saját alap). A Deszikkált és Operált csoportok esetében a lejtők nem csökkentek szignifikánsan a görbe teljes és végső szakaszán az ép ellenoldali érhez képest. A Deszikkált csoport esetében azonban a kezdeti szakaszban növekedés volt megfigyelhető az ellenoldali intakt érhez képest, ami szignifikáns (p=0,0175) különbségnek bizonyult a UNK csoporthoz képest (41. ábra).



**41. ábra** A különbözőképpen kezelt artériák reprezentatív szakítószilárdságmérési feszültség-megnyúlás görbéi (A). A különbözőképpen kezelt artériák feszültség-megnyúlás görbéinek numerikus elemzése (B-E). B: maximális szakítószilárdság; a szakítószilárdság meredeksége a 0,001N-tól a maximális pontig (C); a görbék 33-100%-os tartományában (D); a görbék 33-100%-os tartományában (E). ( $L_0=8$  mm; motor sebessége: 1,95 mm/s) Átlagok $\pm$ S.D., n=8/csoport, \*p<0,05 vs. Intakt; &p<0,05 vs UNK és Operált

### 5.3.4 Hisztomorfológia

Az anastomosisok között nem volt szignifikáns különbség a teljes falvastagság és a tunica adventitia vastagsága tekintetében. Az intima vastagsága azonban nem növekedett a Deszikkált csoportban. A tunica media vastagsága elsősorban a Deszikkált csoportban nőtt ( $p=0,0127$  vs. UNK) (42. ábra A, B, XIII. táblázat).



42. ábra H&E (A, B) és orcein (C, D) festett szövettani preparátumok reprezentatív fotói nedvesített (A, C) és kiszáritott csoportokban (B, D). Fekete nyilak: membrana elastica interna, piros: membrana elastica externa. (eredeti objektív nagyítás: 20×)

XIII. táblázat A H&E-festett femoralis artériák kvantitatív elemzése.

Változó	Csoport	Intakt	Anastomosis
Teljes rétegvastagság ( $\mu\text{m}$ )	UNK	140.59±18.03	132.31±35.2
	Operált	142.37±17.39	154.28±43.05
	Deszikkált	147.46±5.78	151.1±19.12
Tunica intima vastagsága ( $\mu\text{m}$ )	UNK	3.5±0.76	3.66±0.63
	Operált	3.21±0.35	3.95±0.68
	Deszikkált	2.74±0.53	3.03±0.86
Tunica media vastagsága ( $\mu\text{m}$ )	UNK	65.64±9.36	56.03±9.59
	Operált	66.31±11.84	67.12±9.75
	Deszikkált	61.1±6.48	76.35±11.5*
Tunica adventitia vastagsága ( $\mu\text{m}$ )	UNK	75.42±13.97	71.63±7.4
	Operált	74.59±5.67	78.13±17.06
	Deszikkált	80.56±14.31	76.54±12.45

Átlagok±S.D., n=8/csoport, \* $p<0.05$  vs. UNK

Az artériás fal rétegvastagságán kívül általános morfológiai elemzést is végeztünk. A tunica intima mind az Operált, mind a Deszikkált csoportban patológiás rendellenességek nélkül azonosítható volt. A Deszikkált csoport tunica mediájában több duzzadt sejt jelent meg, és a sejtek összlétszáma is megnőtt az Operált csoporthoz képest. A tunica adventitia kissé

sűrűbb kollagénmátrixot és valamivel sűrűbb szövetet tartalmazott, és valószínű, hogy a Deszikkált csoportban a fibroblasztok száma is megnőtt. Másrészt a festődés intenzitása magasabb volt a tunica adventitiában a Deszikkált csoportban. Ez az erősebb eozinofil megjelenés fokozott fehérjeexpressziót jelenthet.

Az epigasztrikus artériában csak a tunica intima mutatott szignifikáns növekedést mind az Operált ( $p=0,0073$ ), mind a Deszikkált csoportban ( $p=0,073$ ) az ép érhez képest. Ezzel szemben az epigasztrikus véna esetében a Deszikkált csoportban a tunica media, az adventitia és a teljes vastagság nem szignifikáns megvastagodása volt megfigyelhető (XIV. táblázat).

**XIV. táblázat** A H&E-festett epigasztrikus erek numerikus elemzése.

Változó	Csoport	Intakt	Anastomosis
Az artéria teljes rétegvastagsága ( $\mu\text{m}$ )	Operált	85,31 $\pm$ 22,15	97,53 $\pm$ 24,59
	Deszikkált	103,52 $\pm$ 22,38	94,95 $\pm$ 11,78
Az artéria tunica intima vastagsága ( $\mu\text{m}$ )	Operált	2,42 $\pm$ 0,54	2,72 $\pm$ 0,54 *
	Deszikkált	2,3 $\pm$ 0,42	3,11 $\pm$ 0,49 *
Az artéria tunica media vastagsága ( $\mu\text{m}$ )	Operált	41,12 $\pm$ 10,43	46,1 $\pm$ 13,72
	Deszikkált	47,6 $\pm$ 8,75	43,38 $\pm$ 8,67
Az artéria tunica adventitia vastagsága ( $\mu\text{m}$ )	Operált	41,77 $\pm$ 15,16	48,72 $\pm$ 15,37
	Deszikkált	53,63 $\pm$ 14,25	49,34 $\pm$ 6,72
A véna teljes rétegvastagsága ( $\mu\text{m}$ )	Operált	74,78 $\pm$ 9,87	84,72 $\pm$ 15,19
	Deszikkált	84,83 $\pm$ 20,76	103,22 $\pm$ 31,2
A véna tunica intima vastagsága ( $\mu\text{m}$ )	Operált	2,97 $\pm$ 0,51	3,11 $\pm$ 0,72
	Deszikkált	2,63 $\pm$ 0,28	2,88 $\pm$ 0,53
A véna tunica media vastagsága ( $\mu\text{m}$ )	Operált	20,99 $\pm$ 3,57	22,67 $\pm$ 2,81
	Deszikkált	21,89 $\pm$ 3,95	27,12 $\pm$ 4,81
Tunica adventitia vastagsága a vénában ( $\mu\text{m}$ )	Operált	50,01 $\pm$ 6,86	58,57 $\pm$ 12,98
	Deszikkált	55,49 $\pm$ 11,87	75,3 $\pm$ 26,35

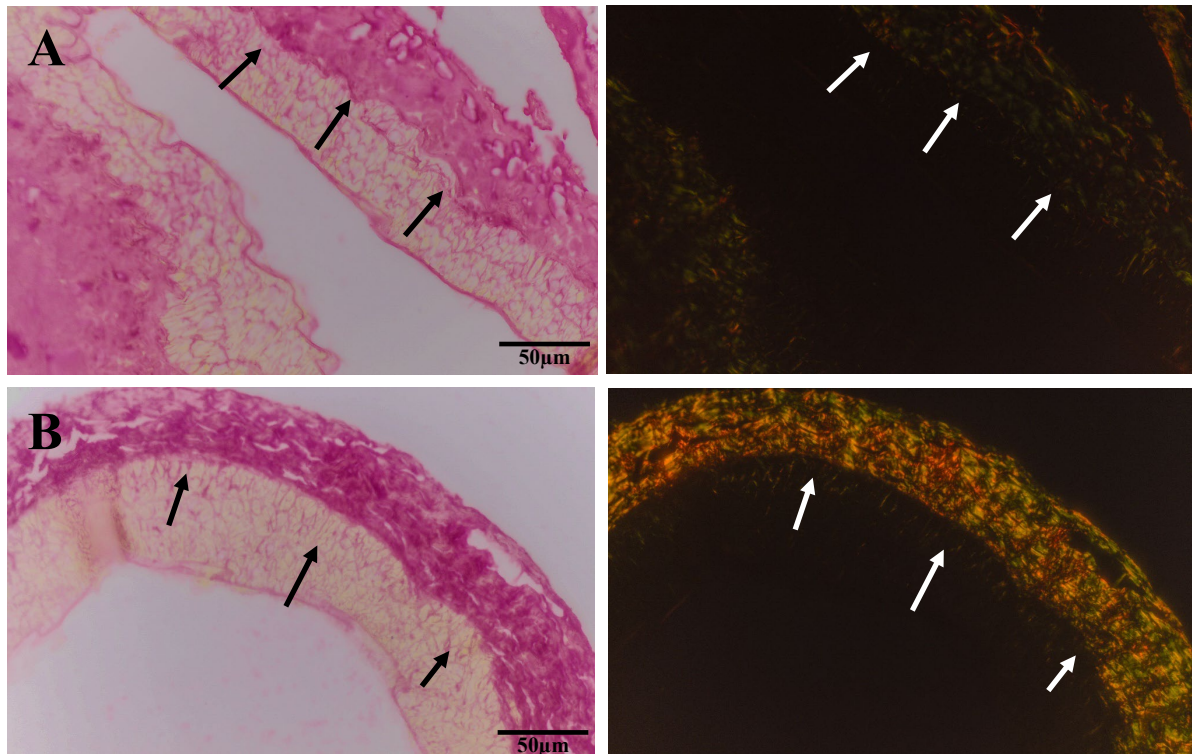
Átlag $\pm$ S.D., n=8/csoport, \* $p<0,05$  vs. alap;

A picrosirius festett metszeteken mind a vörös (vastag rostok), mind a zöld (vékony rostok) fényintenzitás növekedést mutatott a Deszikkált csoportban az ép artériákhoz képest, a vörös fényintenzitásban pedig szignifikáns ( $p=0,0226$ ) növekedést figyeltünk meg a UNK anastomosisokhoz képest (43. ábra, XV. táblázat).

**XV. táblázat** A picosirius festett arteria femoralisok numerikus elemzése.

Változó	Csoport	Intakt	Anastomosis
Vörös fény intenzitása (PSZ)	UNK	578,54±59,63	651,98±246,68
	Operált	725,6±74,33	785,81±304,96
	Deszikkált	623,34±177,03	1361,48±539,29 *
Zöld fény intenzitása (PSZ)	UNK	292,81±26,92	312,59±129,49
	Operált	319,92±110,44	419,6±140,2
	Deszikkált	404,78±180,31	497,43±67,35

Átlagok±S.D., n=8/csoport, \*p<0.05 vs. UNK



**43. ábra** Reprezentatív picosirius festett metszetek a nedvesített (A) és kiszáritott (B) artériák anastomosisairól. A fekete és fehér nyilak azonos helyzetben vannak, a tunica adventitia felé mutatva. (eredeti objektív nagyítás: 20×)

Az orceinnel festett metszeteken megvizsgáltuk a rugalmas rostok mennyiségét és lamellákba rendeződését (42. ábra C, D, 16. táblázat). A combartériák esetében nem láttunk egyértelmű különbségeket a rugalmas rostok mennyiségében és a lamellák elrendeződésében. Az epigasztrikus artériában azonban az Operált csoportban nem szignifikáns növekedést tapasztaltunk, ami a Deszikkált csoportban nem volt megfigyelhető. A Deszikkált csoportban a lamellák mennyiségénél kis mértékű csökkenés volt megfigyelhető (XVI. táblázat).

**XVI. táblázat** Az orceinnel festett comb- és epigasztrikus artériák numerikus elemzése.

Változó	Csoport	Intakt	Anastomosis
A combartériák integrált zöld fénysűrűsége (PN)	UNK	148041,9±14321,8	156312,43±13557,55
	Operált	164909,09±24347,49	163000,28±14676,05
	Deszikkált	171133,97±19677,77	171628,83±19031,97
A combartériák rugalmas membránjainak száma	UNK	3,25±0,96	3±1
	Operált	3,13±1,36	2,75±0,96
	Deszikkált	3±1,22	2,83±1,33
Az epigasztrikus artériák integrált zöld fénysűrűsége (PN)	Operált	62073,42±19461,56	107936,74±11233,76
	Deszikkált	78402,12±36852,39	71562,8±44341,04
Az epigasztrikus artériák rugalmas membránjainak száma	Operált	1,29±0,76	1,2±0,45
	Deszikkált	1,11±1,05	0,75±0,46

Átlagok±S.D., n=8/csoport,

## 6 MEGBESZÉLÉS

A tudományos kutatások elsődlegesen a rágsálókat részesítik előnyben (kutatások során felhasznált laborállatok 95%-a egér és patkány),<sup>131</sup> főként mivel kisebbek (olcsóbb a tartásuk), gyorsabban szaporodnak és fejlődnek, valamint mert genomjukat átfogóan feltérképezték. A rágsálók képezik a leggyakoribb szív- és érrendszeri betegségmodellt, mivel fiziológiai hasonlóságok, mellett a 3R szabálynak is megfelelnek. A *Rattus norvegicus* több mint 150 éves, hosszú múltra tekint vissza a biológiai kutatásokban, ami gazdag irodalmat biztosít és megfelelően tájékoztathatja és támogathatja a kortárs alap- és transzlációs kutatási erőfeszítéseket. A patkányok az emberekkel történő interakcióikkal összefüggő stresszre adott válaszreakciójuk jóval alacsonyabb, mint az egereké. Ezek mellett a relatíve nagyobb méret hozzájárul a műtéti lehetőségek növeléséhez, valamint olyan mintavételi (szövetek és vér mennyisége) szabadságot biztosít, ami tovább növeli értéküket kutatási modellként.<sup>131-135</sup>

Ahhoz, hogy a microvascularis érvarratok gyógyulását tudjuk vizsgálni, először egy megfelelő modell kialakítására van szükség. Ehhez meg kell találni a megfelelő modellállatot és modell eret. Lehetőségként felvetődött a relatíve nagy átmérőjű (~ 2,25 mm) abdominális artéria, de a median laparotomia túl nagy megterheléssel járna az állatoknak. Az arteria carotisok is relatíve nagyobb átmérőjűek (~ 1,5 mm), valamint az ellenoldali ér kontrollként szolgálhat az önkontrollos összehasonlító vizsgálatok során. A preparálás folyamán viszont számos nehézségbe ütközhetünk (nervus laryngeus recurrens, nervus vagus, agyi ischaemia kialakulása). Az arteria femoralisok (~ 1 mm) az előbbiekkal szemben könnyen hozzáférhetőek, preparálás során nemes képleteket nem érintünk, megfelelő hosszúságú és az állatot a teljes elzáródása is csak minimálisan terheli a végtag gazdag kollaterális hálózata révén, így végül a kutatásunk patkány femoralis artériát választotta modelljéül.<sup>133, 136</sup>

A sebgyógyulási zavarokkal kapcsolatos kutatások többsége kiemeli a helyi és szisztémás hatások, például a gyulladás, az alapbetegségek, cukorbetegség, magas vérnyomás, daganatos megbetegedések, oxigénellátottság, életkor stb. jelentőségét.<sup>42</sup> A vaszkuláris sebészeti beavatkozások számos klinikai tényezővel járhatnak, amelyek szövödményekhez és késleltetett gyógyuláshoz vezethetnek az anastomosis során. Ezek közé tartozik az egyenlőtlen érátmérők turbulens áramlást okozó hatása, a hosszabb érkirekesztés pedig a meghosszabbított hypoxia miatti sejtkárosodáshoz vezethet, valamint a nem megfelelő mikrokeringés és kollaterális vérellátás. A hypertonia, diabetes és daganatok, valamint a gyógyszerek tovább ronthatják az érgyógyulást. Ezért kiemelt jelentőségű a microvascularis anastomosis regenerációjának javítása a klinikai gyakorlatban.<sup>137-140</sup>

Az első kísérleti szakasz célja az volt, hogy felmérjük a PACAP, BGP-15 és a vérzéscsillapító szivacs lokális alkalmazásának hatását artériás microvascularis anastomosisok regenerációjára, különös tekintettel a hemodinamikai, hematológiai, haemorheológiai, biomechanikai és hisztomorfológiai változásokra, melyek ilyen tekintetben korábban még nem voltak vizsgálva. A PACAP és BGP-15 lokális kezeléséhez beadási módszert fejlesztettük ki, amely rövid felezési idejű PACAP esetében is hatékony volt. Előnyei közé tartozik az alacsony költség, a könnyű és egyedi igényre szabható pozicionálás, valamint a beadandó mennyiség és annak időzítésének programozása, változtathatósága, ami egy "kimeríthetetlen" tárolóval rendelkezik. Hátrányai közé tartozik a beadási pont környezeti expozíciója, ami egyedül tartást igényelhet az állatoknál, valamint a háti területen végzendő sebészeti beavatkozás szükségessége sérülése esetén. A releváns csoportoknak 0,2 µg PACAP-ot adtunk kétnaponta, míg a többi csoport fiziológiás sóoldatot kapott. A BP csoportokban egy hemosztatikus szivacsot helyeztünk az anastomosis köré. A varrat közelében lévő artériát teljesen körülvette a gelatin alapú hemosztatikus szivacs. Ez mechanikus gátként működhet az anastomosis körülvevő kötőszövet és a legkülső adventitia réteg között. Emellett a közvetlen környezetére a folyadékfelvétel miatti duzzadása tamponáló hatást gyakorolhat. Ezek együttesen gátolhatják a különböző „crosstalk” mechanizmusokat és a regenerációban részt vevő sejtek (pl. fibroblastok) migrációját. A varratgyógyulás elősegítésén túl a macrophagok hozzájárulnak a BP kollagéjének felszívódásában, és idegentest-granulómát is okozhatnak.<sup>141-143</sup>

A neuropeptid *in vivo* hatásainak tisztázása érdekében *in vitro* szövettenyésztett érmintákat is használtunk az extracelluláris mátrix változásában közrejátszó folyamatok tanulmányozására kontrollált körülmények között.<sup>144</sup> Vizsgáltuk a teljesen ép ellenoldali kontroll (referencia), frissen eltávolított és megműtött (UNK), valamint anastomizált, majd utánkövetett erek válaszmechanizmusait. Így az elszigetelt erek nem voltak kitéve a környező szövetek által befolyásolt mechanizmusainak, gyulladásos reakcióknak vagy a sejtmigrációnak. A tenyésztett erek egyformán voltak kitéve a PACAP-nak, amelynek lebomlása és mikrokeringés általi eltávolítása gátolva volt. A BP csoportban megfigyelt morfológiai és mechanikai változások ezek kombinált hatásának eredményei lehetnek. Különösen fontos, hogy a PACAP fiziológiásan is felszabadulhat idegvégződésekből, de a neuropeptid külsőleg történő adagolása módosíthatja ezeket a hatásokat. A követési időszak után a BP főleg a PACAP + BP csoportokban maradt meg, ahol a PACAP hatással lehetett a macrophagokra, befolyásolva az ér-varrat gyógyulását.<sup>24, 145-147</sup>

Függetlenül az adagolás módjától, a PACAP terápiás alkalmazásának egyik kihívása a rövid felezési ideje a perifériás vérben a DPP4 enzim aktivitása miatt. Ez ösztönözte a kutatókat

a stabilitás javítására és a hatás időtartamának növelésére, beleértve a PACAP analógok és különböző beadási rendszerek, például mikroszferák és nanorészecskék használatát,<sup>147</sup> vagy különféle lokális adagolási lehetőségeket<sup>148</sup>. A PACAP szisztémás beadása hátrányos a lehetséges mellékhatások és a rövid felezési idő miatt.<sup>149, 150</sup> Állatkíméleti okokból és a lehető legpontosabb adagolás érdekében nem alkalmaztunk ismételt tűszúrással járó adagolást, hanem a Larsen és Christensen által leírt kannulációs módszerhez hasonló eljárást fejlesztettünk ki.<sup>151</sup> Mivel a PACAP lokális alkalmazása védőhatást mutatott szárazszem-szindróma modellben és neurológiai állatmodellekben, a lokális kezelés előnyös módja a terápiának.<sup>152</sup> Például a PACAP-38 lokális adagolása neuroprotektív hatást mutatott ischaemiás stroke, traumás agysérülés és Parkinson-kór állatmodellekben.<sup>153, 154</sup>

A precízen pozicionált neuropeptid adagolásának eredményeként a laboratóriumi paraméterek nem mutattak specifikus változást a PACAP szisztémás hatására vonatkozóan. A fehérvérsejtszám esetében azonban a PACAP gyulladáscsökkentő hatása az első héten megfigyelhető volt, a későbbi napokon bekövetkezett növekedés pedig a szövetsatorna kialakulását követő felszívódási zavarokkal hozható összefüggésbe. A vörösvérsejt aggregatio romlást mutatott a posztoperatív hetekben a SHAM csoporthoz képest. A PACAP csoport mutatta a legnagyobb romlást a 21. napon. Ismeretes, hogy a gyulladással járó folyamatok, akut fázis reakciók, szabad gyök reakciók és anyagcsere változások befolyásolhatják a mikrorheológiai paramétereket, például a vörösvérsejt deformabilitást és aggregációt.<sup>155-157</sup>

Az anastomosisok szakítószilárdságát newtonban fejeztük ki a kontralaterális ép artériákhoz viszonyítva a különböző csoportok szerint. Egy ép artéria szakítószilárdsága  $0,652 \pm 0,094$  N, míg az általunk használt varróanyag egy szálának szakítószilárdsága  $0,522 \pm 0,047$  N volt. Mivel a nyolc csomó (16 szál varróanyag) egyidejű használata nagyobb szakítószilárdságot eredményezett, mint az ép artéria, így biztosított volt, hogy nem a varróanyag szakadását vagy felolrostonódását vizsgáltuk az anastomosisoknál. A legtöbb esetben az anyag a leggyengébb pontján szakad, ami esetünkben a károsodott, anastomizált és részben regenerálódott terület. Megfigyeléseink, amelyek szerint a varratok minden esetben az anastomosisok közelében mentek tönkre, ezt támasztják alá. Így összehasonlíthatjuk a kapott adatokat, amelyeket kizárólag az anastomosisok tényleges regenerációja befolyásol.<sup>158, 159</sup>

Az anastomizált artériák szakítószilárdsága szignifikánsan alacsonyabb volt a 21. napon az ép artériákhoz képest. A PACAP csoport mutatta a legerősebb anastomosisokat, míg a BP és SHAM anastomosisok a leggyengébbnek tűntek. A görbék meredeksége az artériák rugalmasságára utalhat. Merevebb szövetek esetén a meredekség nagyobb, így gyorsabban érik el a maximumot, mint a rugalmasabb szövetek kisebb meredekséggel.<sup>131</sup> Az eredmények azt

mutatják, hogy az ér szakadási mintázata hasonló az elastomerekéhez.<sup>130,132</sup> A görbe első harmadában a meredekség általában alacsonyabb, majd fokozatosan parabolikusan emelkedik. Az első harmad szabálytalansága miatt csak a görbe 33–100%-os szakaszát elemeztük. Ez minden anastomosis esetében alacsonyabb volt az ép artériákhoz képest. A szakítószilárdság és a meredekség eltérése az ép artériákhoz képest a 21. napon részleges regenerációs folyamatokat tükröz, amelyek legrosszabbul a BP csoportban voltak, valószínűleg a nem megfelelő érés miatt.<sup>160-164</sup>

Összehasonlítottuk az általános morfológiai különbségeket, és megmértük a tunica intima, media és adventitia vastagságát H&E-festett mintákon. A frissen eltávolított és megműtött erek hisztológiai metszetein a rétegek vastagsága viszonylag nagy szórást mutatott. A szakítószilárdság vizsgálat során a szövetrétegek valószínűleg megrongálódtak és megnyúltak, ami eltérő formalin-fixálási reakciót eredményezhetett, viszont csak így tudtuk ugyan azon ereknek a mechanikai és szövettani vizsgálatait elvégezni. Az artériák tunica intimája nem változott a csoportok között. A tunica media is hasonló volt, de szignifikánsan megnőtt a PACAP + BP csoportban. A SHAM anastomosisokban a tunica adventitia vastagsága nőtt, míg a BP csoportban szignifikánsan csökkent. A PACAP csoportban nem szignifikáns csökkenés volt észlelhető, míg a kombinált PACAP + BP kezelés antagonist hatást eredményezett. Ezek az érstruktúra változások a PACAP által aktivált többféle jelátviteli út eredményei lehetnek, mivel korábban publikálták, hogy a PACAP gátolhatja az angiogenezist és a fibroblast felhalmozódást.<sup>165</sup> Továbbá csökkentheti a mátrixbontó enzimek, például a matrix metalloproteináz-2 és -9 funkcióját,<sup>165, 166</sup> ami megakadályozhatja a tunica media és adventitia lebontását. Következésképpen a PACAP folyamatos jelenléte a BP-al együtt jobb és lassabb jelátviteli aktivációt eredményezett, megtartva az ér rétegeinek morfológiai egyensúlyát a regeneráció során. A BP alkalmazása megtarthatja a varratokat és az ereket épségben,<sup>167</sup> de nem képes aktiválni a védő jelátviteli utakat, amelyek serkenthetik az ér regenerációját vagy az extracelluláris mátrix expresszióját, ahogy a PACAP tette a callus képződésében<sup>168</sup> vagy a chondrogenesisben.<sup>169</sup>

A szövettenyészetekben az artériák sejtjei képesek voltak túlélni a mechanikus traumát (szakítószilárdság mérés), és volt idő a falstruktúra helyreállítására, így kevésbé volt jellemző a szórás az eredményekben. Az anastomizált és ép artériákban a PACAP kezelés megakadályozta a szakításos trauma kialakulását, ami a hisztológiai képeken is látható volt; emellett az anastomizált artériák rétegeinek vastagságának növekedését is észleltük. A PACAP kezelés hatása az extracelluláris mátrixra az ép referencia artériákban is megfigyelhető volt, bár ezek a különbségek nem voltak szignifikánsak. Az *in vitro* PACAP adagolás növelte a rétegek

vastagságát a nem károsodott referencia és a másodszer is károsodott (elszakított) anastomizált artériákban. Ez további bizonyíték arra, hogy a PACAP serkentheti az extracelluláris mátrix komponensek, például az I. típusú kollagén expresszióját tenyésztett körülmények között, ahogy azt az osteoblastokban már kimutatták.<sup>170, 171</sup> Az ép és frissen károsodott artériák esetében a PACAP csökkentette a rétegek vastagságát, ami arra utal, hogy a PACAP megakadályozhatja az erős mechanikai erők káros hatását egy bizonyos küszöbig, de a szövetek közötti együttműködési rendszer hiányában nem képes visszafordítani a folyamatos degradációt, a lebontó folyamatokat.<sup>172,173</sup> Bár ez a tanulmány igazolta a PACAP kétségtelen hatását az ér regenerációjára, az *in vivo* és *in vitro* kísérletek közötti ellentmondásos eredmények oka lehet a PACAP lebontó enzimek jelenléte *in vivo* és hiánya *in vitro*, ami a neuropeptid különböző lokális hatásához vezet.

Az elasztikus rostok elrendeződését orcein és immunhisztokémiai festéssel vizsgáltuk. A SHAM csoport mutatta a legerősebb festést, a BP csoport a leggyengébbet. A PACAP + BP csoportban szintén észlelhető volt némi antagonistá hatás. A belső és külső elasztikus lamellák jól megfigyelhetők voltak a metszeteken. A tunica mediában több membránszerveződésű elasztikus lamella volt megfigyelhető a PACAP csoportban, azonban a PACAP kezelés nem védett a BP csoportban megfigyelt csökkentett membránszám ellen. A PACAP emellett növelte az elasztin tartalmát a pericannuláris kötőszövetben *in vivo*. Immunhisztokémiával megnövekedett immunpozitivitást figyeltek meg az elasztikus szálakban a tunica mediában a PACAP kezelést követően. Erősebb diffúz pozitivitás is látható volt az újonnan képződött elasztikus membránok miatt. A Spongostan gelatin alapú vérzéscsillapító szivacsok sajátos rugalmassággal rendelkeznek, megőrizve a megvarrt erek normál funkcióját és elősegítve a jobb sebgyógyulást<sup>167</sup> anélkül, hogy befolyásolnák az extracelluláris mátrix termelődését és szerveződését. Míg a PACAP egy jól kiegyensúlyozott szintig képes serkenteni a mátrix képződését, ahogy azt a vesében a IV. típusú kollagén expressziójánál mutatták<sup>174</sup>, nem rendelkezünk adatokkal az elasztin képződésre gyakorolt közvetlen hatásáról. Ez az első tanulmány, amely a neuropeptidok szerepét mutatja az elasztin expresszióban és szerveződésben az ér regenerációja során. Továbbá, *in vitro* a PACAP növelte az elasztin expressziót a referencia és anastomizált artériákban, míg az elasztikus membránok száma enyhén nőtt minden csoportban.

A Western blot analízis megnövekedett elasztinszál-expressziót mutatott a PACAP csoportban a SHAM anastomosisokhoz és ép artériákhoz képest. Ezek az eredmények tovább támasztják alá a PACAP közvetlen hatását az elasztin expresszióra szisztémás aktiváció nélkül, de az elasztin lamelláris szerveződés részben mechanikus aktiváció, például vasodilatáció vagy

vasorelaxáció által szabályozható. Ezért a BP alkalmazás csökkentheti az erek mechanikus mozgását, ami részben magyarázatot adhat a csökkent elasztin expresszióra és lamellaképződésre.

A picrosirius festéssel nem specifikus kollagén jelölést figyeltünk meg vörös színezéssel. A polarizált fény  $\lambda/4$ -el történő forgatásával értékeltük az I. típusú kollagén-szálak tájolását és vastagságát. A zöld fény intenzitása a vékonyabb szálakhoz, a vörös szín intenzitása a vastagabb szálakhoz tartozik. Nem volt szignifikáns különbség az anastomosisok között, de a vastag szálak csökkenését és a vékony szálak mennyiségének növekedését figyeltük meg a BP csoportban. A PACAP kezelés a SHAM artériákhoz hasonló szálvastagság mennyiséget eredményezett. A csontképződés és regeneráció során kimutatták, hogy a PACAP egy bizonyos küszöbön növeli az I. típusú kollagén termelődését,<sup>168, 170</sup> és publikálták, hogy a neuropeptid jelenléte gátolhatja a mátrixbontó enzimek, például a hialuronidázok és matrix metalloproteinázok aktivációját<sup>166</sup>. Ezért a PACAP védő hatása az ér regenerációjában inkább a kollagén lebontás megakadályozásán keresztül valósul meg, mint a kollagén termelésen. Másrészt az I. típusú kollagén immunhisztokémia jeleket adott a tunica mediában, ami arra utal, hogy a sejtek kollagén termelése itt módosul a neuropeptid hatására. Valószínű, hogy a PACAP lokál specifikus módon növelte a kollagén termelést a tunica mediában, de nem eredményezett fibrotikus felhalmozódást a legkülső rétegben, antifibrotikus funkciója miatt.<sup>175, 177</sup> Ezzel ellentétben kísérletünkben a PACAP-kezelt anastomosisok mikrosebészeti preparálása nehezebb volt a 21. posztoperatív napon. Masszív pericannuláris szövetet találtunk, amelyben a vastag és vékony kollagén-szálak tartalma megnőtt. Ez arra utal, hogy a PACAP alkalmazása idegentestekkel, például kannulákkal és/vagy implantátumokkal megváltoztathatja a PACAP által aktivált jelátviteli utak fiziológiás folyamatát. Hasonló eredményeket mutattak néhány kórosan megváltozott szövetképződésben, például daganatokban, ahol a PACAP és receptorai túlexpresszáldtak és elősegítették a tumor progresszióját.<sup>177</sup>

Összefoglalva, a PACAP kezelések elősegíthették az extracelluláris mátrix kimerülését és érését. A szakítószilárdság vizsgálatában a görbék meredeksége csökkent, ami jobb rugalmasságot jelez. A görbék maximuma (szakítószilárdság) a legmagasabb volt a PACAP-kezelt csoportokban és a legalacsonyabb a BP csoportban, valószínűleg a szivacs „elhatároló” hatása miatt. A BP jelenléte csökkentheti a sejtmigrációt és komprimálhatja a vasa vasorumot. Továbbá a PACAP elsősorban a mediát befolyásolta, az elasztin expressziót és szerveződést módosította a kollagén expresszió megváltoztatása nélkül.

Bár a BGP-15 lokálisan, közvetlenül az anastomosis helyére került bejuttatásra, az eredmények alapján szisztémás felszívódása is kimutatható volt, mely különböző szinteken

befolyásolta a regenerációs folyamatokat. Korábbi, egerekben történt vizsgálatok esetén, a súlyos depressziós zavarral összefüggésben biztató eredményeket találtak a BGP-15 esetén.<sup>176</sup> A kutatásunk során, ezzel összefüggésben, az állatok különösen nyugodt viselkedése a kezelések során is jelen volt. Ennek jelentősége felveti az esetleges pszichiátriai alkalmazhatóságát, ilyen irányú további vizsgálatokat. A sebészi beavatkozások minden esetben sikeresek voltak, sem aneurizma, sem trombózis nem alakult ki. A posztoperatív artériás áramlási paraméterek minimális mértékben változtak, és csak a KSHAM csoportban mutatkozott statisztikailag szignifikáns eltérés a kiindulási értékhez és a SHAM csoporthoz képest. A 21. napon azonban a BGPO csoportban az anastomizált és az ellenoldali ép artériákban is fokozott véráramlás volt kimutatható, ami a regeneráció és érfalújraképződés dinamikájára utalhat. Ennek ellenére a relatív véráramlási különbségek nem tértek el szignifikánsan a csoportok között. Korábbi tanulmányok kimutatták a szívre és következetesen a keringésre kifejtett hatásait, melynek okán befolyásolhatja az áramlási sebességet.<sup>22, 23, 77</sup>

A hematológiai vizsgálatok alapján a BGPO csoportban a vörösvérsejt-szám, a hematokrit és a hemoglobinszint szignifikánsan csökkent a 14. és 21. napra, míg a BGPK csoportban ez a változás enyhébb volt és idővel normalizálódott. Ez arra utal, hogy a BGP-15 szisztémás felszívódása befolyásolhatja a hematopoiesist, különösen, ha valamilyen vérzéssel járó trauma is jelen volt. A trombocitaszám tartósan magasabb volt a BGPO csoportban, ami fokozott aggregációs készséget, illetve gyulladáshoz vezető aktivitást is jelezhet. Ezzel szemben a BGPK és a kontrollcsoportok értékei nem mutattak klinikailag releváns változásokat.

A vörösvérsejt-deformabilitás paramétereinek alapján elmondható, hogy a BGP-15 lokális alkalmazása önmagában nem okozott káros deformabilitás változást, bár a 7. napon némi romlás feltételezhető. A BGPO csoportban nem tapasztaltunk számottevő eltérést az alapértékekhez képest. A KSHAM csoportban viszont a 7. napon szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető, ami a kanül által kiváltott gyulladáshoz vezető hatás következménye lehet. Ezzel szemben a vörösvérsejt-aggregáció tekintetében a BGP-15 mindkét alkalmazási módja fokozott aggregációs hajlamot mutatott. Az M 5s, M 10s, M1 5s és M1 10s paraméterek értékei szignifikánsan emelkedtek, különösen a BGPO csoportban, ahol a 21. napon is fennállt ez az állapot. Ez a fokozott aggregációs készség csökkentheti a mikrokeringés hatékonyságát, különösen posztoperatív állapotban.

A szakítószilárdsági tesztek eredményei alapján az anastomizált erek gyengébbek voltak, mint az intakt ellenoldali artériák. Ugyanakkor a BGP-15 alkalmazása a BGPO csoportban növelte a maximális szakítószilárdságot az SHAM csoporthoz képest. A BGPK csoport esetén a kanül által kiváltott fokozott szövetképződés növelhette a szilárdságot.

Különösen érdekes, hogy a görbe meredeksége a 33–100%-os tartományban (mely a kollagén dominálta irreverzibilis deformációs szakasz) a BGPO csoportban mutatta a legkisebb eltérést az intakt erekhez képest, ami az érfal biomechanikai érése és rugalmasabb regenerációjára utal. A H&E festett metszetek alapján a BGPO csoportban szignifikáns intima- és teljes falvastagság-növekedést tapasztaltunk a SHAM csoporthoz képest. Ez megerősíti az érfal fiziológiás sebést követő válaszreakcióját, illetve arra utal, hogy a BGP-15 felerősítheti az intima hiperpláziát. A Picrosirius-vörössel festett mintákban a kollagénrostok mennyisége az anastomosis területén enyhén csökkent az intakt oldali erekhez képest, de a BGPO csoportban a vékonyabb (zöld) rostok enyhe emelkedést mutattak a SHAM-hez képest, ami a finomabb struktúrájú ECM újjáépítésére utal. Az orceinfestés során a BGPO csoportban szignifikáns növekedés volt megfigyelhető az elasztikus rostok mennyiségében, azonban a lamellák száma nem változott, ami arra utal, hogy az újonnan szintetizált elasztikus komponensek még nem rendeződtek strukturált lamellákká, tehát az ér érési folyamata még zajlik.

A jövőbeni kutatások célja e hatások dózis- és időfüggésének pontosítása, valamint a BGP-15 egyéb beadási formáinak (pl. biopolimer hordozók, gyógyszerkibocsátó rendszerek) fejlesztése lehet a klinikai alkalmazhatóság előmozdítására.

Általánosságban elmondható, hogy a szövetek nedvesítettsége, mint változó tényező, nem szerepelt a sebgyógyulási zavarokkal kapcsolatos vizsgálatok paramétereit között. Ahol mégis, ott elsősorban a bőrgyógyászat és a farmakológia területén folyt kutatás, különböző hidrogélek és egyéb helyi sebgyógyító eljárások vizsgálatával<sup>179</sup>. Ezek a vizsgálatok szintén hangsúlyozzák és alátámasztják a szöveti hidratáltság jelentőségét a sebgyógyulásban.

A kiszáradt vagy nem megfelelően hidratált szövetek kevésbé rugalmasak, törékennyé válhatnak, és hajlamosabbak a sérülésre, ami fokozott szövetsérülést, az erek átteresztőképességének csökkenését és a sebészeti eredmények romlását eredményezheti. A mikrosebészet precíz jellege megköveteli az optimális műtéti területet a legmagasabb szintű pontosság és siker érdekében, ebben pedig a műtéti terület megfelelő nedvesítése kulcsfontosságú szerepet játszik<sup>180-182</sup>. Microvascularis anastomosisok kialakítása során a nedvesség megtartása az érvégeknél megkönnyíti a manipulációt és csökkenti az érspazmus, trombózis, aneurizma, illetve az anastomosis későbbi elégtelenségének kockázatát.

Kutatásunk azon sebészi alaptételen alapul, miszerint a szövetek kiszáradása számos nem kívánt szövődémmel járhat, úgymint sebgyógyulási zavarok, kötőszöveti összenövések, vagy varratszétválás. Ilyen esetekben a sebek újranyílhatnak, elfertőződhetnek, fokozott fájdalommal és másodlagos kötőszöveti gyógyulással járhatnak<sup>183</sup>. Hasi sebészetben sipoly,

perforáció, összenövések és mechanikus ileusz is kialakulhat, ezért kiemelten fontos a műtéti terület folyamatos nedvesen tartása.<sup>184</sup>

Célunk volt ezen empirikus megfigyelés objektív adatokkal való alátámasztása és tisztázása. Ezt mikrosebészeti vaszkuláris anastomosisok elvégzésével értük el, mivel az erek gyógyulása és az állatkísérletek lehetőséget biztosítottak a jó reprodukálhatóságra, gyorsaságra és standardizálásra.<sup>185</sup> A sebgyógyulás egy komplex folyamat, amelyben a gyulladás, érújráképződés és kötőszöveti átalakulás egyaránt szerepet játszik.<sup>38, 186</sup> Ezért olyan paramétereket választottunk, amelyek megfelelően tükrözik a gyógyulási folyamatot, valamint a kizáradt szöveteken jelentkező elváltozásokat: hematológiai, haemorheológiai, szövettani, szakítószilárdsági és makroszkópos megfigyelések.<sup>42, 187</sup>

Makroszkóposan azt tapasztaltuk, hogy az anastomosisok és az eszközös manipuláció szignifikánsan nehezebb volt a Deszikkált (kiszáritott csoport) esetében. A szövetek elhalványultak a műtét végére, elveszítették a mikroszkóp fénye által kiemelt enyhe fénylő felületüket. A harmadik héten történő eutanázia után a műtéti területet vizsgálva azt találtuk, hogy a korábban műtött, gyógyult terület fokozottabb mennyiségű, tömöttebb kötőszövetet tartalmazott, ami megnehezítette az erek újbóli preparálását. A legfontosabb, hogy reoperáció során aneurizmák és trombózis kizárólag a Deszikkált csoportban fordultak elő. Ezek az eredmények összhangban állnak az irodalommal, ahol főként a bél, hashártya és szaruhártya szövetek voltak érintettek.<sup>8, 188-190</sup>

## **7 FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK**

1. Sikeresen kidolgoztunk egy modellt a microvascularis ér-anastomosisok regenerációs folyamatainak vizsgálatára, valamint a különböző lokális kezelések költséghatékony és megfelelően modulálhatósággal történő kivitelezésére.
2. Az érvarratok mechanikai integritásának (szakítószilárdságának) objektív vizsgálata továbbfejlesztettük a szakítószilárdság-mérő készüléket, mely többféle szövetminta típus esetén használható.
3. Először számoltunk be a PACAP és a BGP-15 microvascularis anastomosisokra kifejtett hatásáról, a szisztémás hatások figyelembevételével. A PACAP alkalmazása növelte az elastin kifejeződést, míg a BP csökkentette azt, de az I. típusú kollagén kifejeződésében nem észleltünk jelentős változásokat. A biomechanikai rugalmasság és a szakítószilárdság a PACAP csoportban nőtt, míg a BP csoportban csökkent. A kombinált alkalmazásuk azonban előnyös volt az érregeneráció szempontjából.
4. A BGP-15 lokális alkalmazása kedvező hatást gyakorol a microvascularis anastomosisok regenerációjára, javította a gyulladásos válasz szabályozását, támogatta a biomechanikai érés folyamatát, valamint strukturális szinten is segítette az érfal remodellációját. Ugyanakkor a szisztémás felszívódás következtében megfigyelt hematológiai és aggregációs változások, különösen a BGP kezelt anasztomizált csoportban, további vizsgálatot igényelnek.
5. A szövetek intraoperatív nem megfelelő nedvesítésének jelentőségéről bemutatott objektív adatok alátámasztják a klasszikus sebészi elvet. További kutatások szükségesek a hidratálás gyakoriságának és időtartamának optimalizálására annak érdekében, hogy meghatározható legyen a szöveti kiszáradás visszafordítható/irreverzibilis határvonala.

## 8 ÖSSZEFOGLALÁS

A jelen kutatások eredményei alapján általánosan megállapítható, hogy a mikrosebészeti beavatkozás során alkalmazott különböző hatóanyagok (különösen a BGP-15 és a PACAP) komplex módon befolyásolják a microvasculáris anastomosisok regenerációját. A BGP-15 lokális alkalmazása kedvezően hatott az érfal biomechanikai érése, a gyulladással szabályozására, valamint az anastomosisok szerkezeti integritására. A PACAP alkalmazása szintén jótékony hatást fejtett ki, különösen az elasztin expresszió fokozásán keresztül.

A haemorheológiai vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy a BGP-15, különösen vérvesztéssel járó traumatikus állapotot követően, fokozza a vörösvérsejtek aggregációs hajlamát, ami rontja a mikrokeringés hatékonyságát, és klinikailag releváns lehet a szűk lumenű erek esetén. Ugyanakkor a vörösvérsejt deformabilitás nem romlott érdemben, sőt az önmagában alkalmazott BGP-15 esetén (BGPK) enyhe javulás is mutatkozott. A PACAP jelenléte ellensúlyozta a sebészi trauma és a BP által indukált negatív hematológiai és szöveti változásokat.

A szöveti hidratáltság fenntartása szintén kiemelkedő szerepet játszott az optimális sebgyógyulásban. A kiszáradás zavarja az anastomosis érést, fokozza a gyulladást és rontja a biomechanikai tulajdonságokat, ezért a megfelelő intraoperatív hidratálás alapvető fontosságú a sikeres mikrosebészeti kimenetelhez.

Összességében a BGP-15 és PACAP célzott alkalmazása ígéretes lehetőséget kínál a microvascularis anastomosisok minőségének javítására. A szisztémás hatások, különösen a hematológiai és aggregációs eltérések, további vizsgálatokat igényelnek, különösen a dózisoptimalizálás és a beadási forma szempontjából. Eredményeink megerősítik, hogy a sebészi technika mellett a lokális gyógyszeres beavatkozás és a mikrokörnyezet finomhangolása kulcsszerepet játszhat az érrendszeri regeneráció sikerében.

## 9 SUMMARY

Based on the results of the present research, it can be generally concluded that the various pharmacological agents applied during microsurgical interventions—particularly BGP-15 and PACAP—exert complex effects on the regeneration of microvascular anastomoses. The local administration of BGP-15 had a favorable impact on the biomechanical maturation of the vessel wall, modulation of the inflammatory response, and the structural integrity of the anastomoses. PACAP also exerted beneficial effects, especially through the enhancement of elastin expression.

Hemorheological analyses revealed that BGP-15, particularly following traumatic conditions accompanied by blood loss, increased the aggregation tendency of red blood cells, which may impair microcirculatory efficiency and be clinically relevant in vessels with narrow lumens. At the same time, red blood cell deformability was not significantly impaired; in fact, a slight improvement was observed when BGP-15 was administered alone (BGPK). The presence of PACAP counteracted the adverse hematological and tissue changes induced by surgical trauma and BGP-15.

Maintaining tissue hydration also played a crucial role in optimal wound healing. Dehydration was found to disrupt anastomotic maturation, enhance inflammation, and deteriorate biomechanical properties; therefore, proper intraoperative hydration is essential for successful microsurgical outcomes.

In summary, the targeted application of BGP-15 and PACAP offers a promising strategy for improving the quality of microvascular anastomoses. Nevertheless, the systemic effects—especially hematological and aggregation-related changes—warrant further investigation, particularly in terms of dose optimization and administration routes. Our findings confirm that, beyond surgical technique, local pharmacological intervention and the fine-tuning of the microenvironment are key factors in the success of vascular regeneration.

## 10 IRODALOMJEGYZÉK

### 10.1 Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Nahabedian MY, Momen B, Manson PN. Factors associated with anastomotic failure after microvascular reconstruction of the breast. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114(1):74-82.
2. Lidman D, Daniel RK. Evaluation of clinical microvascular anastomoses---reasons for failure. *Ann Plast Surg.* 1981;6(3):215-23.
3. Lidman D, Daniel RK. The normal healing process of microvascular anastomoses. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1981;15(2):103-10.
4. Furka I, Miko I. Mikrosebeszeti alapismeretek. 2011.
5. Miko I, Furka I. Mutettani alapismeretek. 2016.
6. Hallock GG, Rice DC. Use of a microvascular coupler for repair of major distal upper extremity artery injuries. *J Hand Microsurg.* 2009;1(1):3-6.
7. Tamai S. History of microsurgery. *Plast Reconstr Surg.* 2009;124(6S):e282-94.
8. Zhang W, Wu Q, Li L, Cui T, Sun L, Wang N. Prevention of desiccation induced postsurgical adhesion by thermosensitive micelles. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014;122:309-15.
9. Bereuter JP, Geissler ME, Geissler R, Schmidt S, Buck N, Weiß J. Impact of dehydration on laparoscopic performance: a prospective, open-label, randomized cross-over trial. *Surg Endosc.* 2024;38(3):1390-7.
10. Spöler F, Frenz M, Schrage NF. Towards a new in vitro model of dry eye: the ex vivo eye irritation test. In: *Research Projects in Dry Eye Syndrome.* Karger Publishers; 2010. p. 93-107.
11. Moore AL, Marshall CD, Nauta A, Lorenz HP, Longaker MT. Scarless wound healing: From experimental target to clinical reality. In: *Principles of Regenerative Medicine.* Academic Press; 2019. p. 65-92.
12. Schneider A, Feussner H. *Biomedical engineering in gastrointestinal surgery.* Academic Press; 2017.
13. Chevront SN, Kenefick RW. Dehydration: physiology, assessment, and performance effects. *Compr Physiol.* 2011;4(1):257-85.
14. Niederstätter IM, Schiefer JL, Fuchs PC. Surgical strategies to promote cutaneous healing. *Med Sci.* 2021;9(2):45.
15. Gonzalez CV, Carvalho EO, Galvão NS, Nogueira PC, Santos VL. Prevalence of complicated surgical wounds and related factors among adults hospitalized in public hospitals. *Rev Esc Enferm USP.* 2022;56(sp):e20210477.
16. Infanger M, Shakibaei M, Kossmehl P, Hollenberg SM, Grosse J, Faramarzi S. Intraluminal application of vascular endothelial growth factor enhances healing of microvascular anastomosis in a rat model. *J Vasc Res.* 2005;42(3):202-13.
17. Azapagic A. *Advancing Reconstructive and Regenerative Medicine: Enhancing Vascular, Wound, and Neural Repair With Microsurgery and Drug-Eluting Technologies [dissertation].* The University of Utah; 2024.
18. Pingarron-Martín L, Arias-Gallo LJ. Sildenafil effect on prevention of thrombosis after microsurgical anastomosis: experimental rat model of thrombotic suture. *Oral Maxillofac Surg.* 2014;18:53-8.
19. Sakarya AH, Uzun H, Türkkani A, Çakar AN, Hsieh YH, Üstün GG. Effects of systemic and local caffeine on vessel diameter, anastomosis patency, and intimal hyperplasia in the rat. *J Reconstr Microsurg.* 2019;35(4):244-53.
20. Han SK, Kim SW, Kim WK. Microvascular anastomosis with minimal suture and fibrin glue: experimental and clinical study. *Microsurgery.* 1998;18(5):306-11.

21. Cho AB, Wei TH, Torres LR, Junior RM, Rugiero GM, Aita MA. Fibrin glue application in microvascular anasztomosis: comparative study of two free flaps series. *Microsurgery*. 2009;29(1):24-8.
22. Peto A, Kosa D, Feher P, Ujhelyi Z, Sinka D, Vecsernyes M. Pharmacological overview of the BGP-15 chemical agent as a new drug candidate for the treatment of symptoms of metabolic syndrome. *Molecules*. 2020;25(2):429.
23. Peto A, Kosa D, Haimhoffer A, Feher P, Ujhelyi Z, Sinka D. Nicotinic amidoxime derivate bgp-15, topical dosage formulation and anti-inflammatory effect. *Pharmaceutics*. 2021;13(12):2037.
24. Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Leceta J, Ganea D. PACAP in immunity and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;992(1):141-57.
25. Horvath G, Opper B, Reglodi D. The neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is protective in inflammation and oxidative stress-induced damage in the kidney. *Int J Mol Sci*. 2019;20(19):4944.
26. Eck NV. K voprosu o perevyazkie vorotnois veni. *Prevaritelnoye soobshtshjenye. Voenn Med Zh*. 1877;130:1-2.
27. Jassinowsky A. Ein Beitrag zur Lehre von der Gefäßnaht. *Arch Klin Chir*. 1891;42:816-41.
28. Jones CL. Surgical Instruments: History and Historiography. In: Schlich T, editor. *The Palgrave Handbook of the History of Surgery*. Palgrave Macmillan; 2018.
29. Comroe JH Jr. Who was Alexis who? *Am Rev Respir Dis*. 1978;118(2):391-402.
30. Acland RD, Russell RC. Practice Manual for Microvascular Surgery. *Plast Reconstr Surg*. 1990;85(3):475.
31. Biemer E, Duspiva W, Herndl E, Stock W, Ramatschi P. Replantation an der oberen Extremität durch mikrovaskuläre Anasztomosen. *Chir Praxis*. 1977;22:281-96.
32. Cobbett J. Small vessel anasztomosis. A comparison of suture techniques. *Br J Plast Surg*. 1967;20(1):16-20.
33. Eisenhardt HJ, Hennecken H, Klein PJ, Pichlmaier H. Experiences with different techniques of microvascular anasztomosis. *Microsurgery*. 1980;1(5):341-50.
34. Szentagothai J, Rethelyi M. Funkcionalis anatomia: az ember anatomiaja, fejlodestana, szovettana es tajanatomiaja. *Medicina*; 2006.
35. Harris P, Nagy S, Vardaxis N. *Mosby's Dictionary of Medicine, Nursing and Health Professions-Australian & New Zealand Edition-eBook*. Elsevier Health Sciences; 2014.
36. Siemionow MZ, Kwiecien GJ, Uygur S, Bobkiewicz A. Arterial and Venous Microanasztomosis Models. In: *Plastic and Reconstructive Surgery: Experimental Models and Research Designs*. Springer London; 2014. p. 11-31.
37. Zhang L, Tuchler RE, Shaw WW, Siebert JW. A new technique for microvascular sleeve anasztomosis. *Microsurgery*. 1991;12(5):321-5.
38. Wallace HA, Basehore BM, Zito PM. Wound Healing Phases. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2023.
39. Schultz GS, Chin GA, Moldawer L, Diegelmann RF. Principles of wound healing. In: *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*. 2011.
40. Soliman AM, Barreda DR. Acute inflammation in tissue healing. *Int J Mol Sci*. 2022;24(1):641.
41. Krizanova O, Penesova A, Sokol J, Hokynkova A, Samadian A, Babula P. Signaling pathways in cutaneous wound healing. *Front Physiol*. 2022;13:1030851.
42. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010;89(3):219-29.
43. Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol*. 2020;10(9):200223.

44. Kumar I, Staton CA, Cross SS, Reed MWR, Brown NJ. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and its receptors in human surgical wounds. *J Br Surg.* 2009;96(12):1484-91.
45. Bonnici L, Suleiman S, Schembri-Wismayer P, Cassar A. Targeting signalling pathways in chronic wound healing. *Int J Mol Sci.* 2023;25(1):50.
46. Ren ZH, Wu HJ, Ji T, Wang K, Gokavarapu S, Zhang CP. Clinical application of an original vascular anasztomosis: a clinical multicenter study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2016;74(11):2288-94.
47. Lidman D, Daniel RK. The normal healing process of microvascular anasztomoses. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1981;15(2):103-10.
48. Isogai N, Kamiishi H, Chichibu S. Re-endothelialization stages at the microvascular anasztomosis. *Microsurgery.* 1988;9(2):87-92.
49. Macchiarelli GM, Familiari G, Caggiati A, Magliocca FM, Riccardelli FR, Mianf A. Arterial repair after microvascular anasztomosis: scanning and transmission electron microscopy study. *Cells Tissues Organs.* 1991;140(1):8-16.
50. Ousey K, Cutting KF, Rogers AA, Rippon MG. The importance of hydration in wound healing: reinvigorating the clinical perspective. *J Wound Care.* 2016;25(3):122, 124-30.
51. Moore AL, Marshall CD, Barnes LA, Murphy MP, Ransom RC, Longaker MT. Scarless wound healing: Transitioning from fetal research to regenerative healing. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2018;7(2):e309.
52. Bertsch P, Diba M, Mooney DJ, Leeuwenburgh SCG. Self-Healing Injectable Hydrogels for Tissue Regeneration. *Chem Rev.* 2023;123(2):834-73.
53. Kavic MS, Levinson CJ, Wetter PA. Prevention and management of laparoendoscopic surgical complications. *SLS.* 2005;Chapter 38.
54. Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2011;19(3):441-53.
55. Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;164:567-74.
56. Hirabayashi T, Nakamachi T, Shioda S. Discovery of PACAP and its receptors in the brain. *J Headache Pain.* 2018;19(1).
57. Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: 20 Years after the Discovery. *Pharmacol Rev.* 2009;61(3):283-357.
58. Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev.* 2000;52(2):269-324.
59. Sureshkumar K, Saenz A, Ahmad SA, Lutfy K. The PACAP/PAC1 Receptor System and Feeding. *Brain Sci.* 2022;12(1):13.
60. Horvath G, Brubel R, Kovacs K, Reglodi D, Opper B, Ferencz A. Effects of PACAP on Oxidative Stress-Induced Cell Death in Rat Kidney and Human Hepatocyte Cells. *J Mol Neurosci.* 2011.
61. Reglodi D, Atlasz T, Szabo E, Jungling A, Tamas A, Juhasz T. PACAP deficiency as a model of aging. *GeroScience.* 2018;40(5-6):437-52.
62. DiPietro LA. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *J Leukoc Biol.* 2016;100(5):979-84.
63. Toth D, Szabo E, Tamas A, J T, Horvath G, Fabian E. Protective Effects of PACAP in Peripheral Organs. *Front Endocrinol.* 2020;11.

64. Racz B, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F, Tamas A, Jozsa R. Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen Comp Endocrinol.* 2007;153(1-3):115-23.
65. Racz B, Horvath G, Reglodi D, Gasz B, Kiss P, Gallyas F. PACAP ameliorates oxidative stress in the chicken inner ear: An in vitro study. *Regul Pept.* 2010;160(1-3):91-8.
66. Ohtaki H, Satoh A, Nakamachi T, Yofu S, Dohi K, Mori H. Regulation of Oxidative Stress by Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Mediated by PACAP Receptor. *J Mol Neurosci.* 2010;42(3):397-403.
67. Kovacs AK, Atlasz T, Werling D, Szabo E, Reglodi D, Toth GK. Stability test of PACAP in eye drops. *J Mol Neurosci.* 2020;71(8):1567-74.
68. Toth D, Tamas A, Reglodi D. The neuroprotective and biomarker potential of PACAP in human traumatic brain injury. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):827.
69. Hajdu T, Kovacs P, Zsigrai E, Takacs R, Vago J, Cho S. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide has inhibitory effects on melanoma cell proliferation and migration in vitro. *Front Oncol.* 2021;11.
70. Bourgault S, Vaudry D, Dejda A, Doan N, Vaudry H, Fournier A. Pituitary adenylate Cyclase-Activating Polypeptide: Focus on structure-activity relationships of a neuroprotective peptide. *Curr Med Chem.* 2009;16(33):4462-80.
71. Peto A, Kosa D, Feher P, Ujhelyi Z, Sinka D, Vecsernyes M. Pharmacological overview of the BGP-15 chemical agent as a new drug candidate for the treatment of symptoms of metabolic syndrome. *Molecules.* 2020;25(2):429.
72. Sumegi K, Fekete K, Antus C, Debreceni B, Hocsak E, Gallyas F Jr. BGP-15 protects against oxidative stress-or lipopolysaccharide-induced mitochondrial destabilization and reduces mitochondrial production of reactive oxygen species. *PLoS One.* 2017;12(1):e0169372.
73. Sarszegi Z, Bognar E, Gaszner B, Konyi A, Gallyas F, Sumegi B. BGP-15, a PARP-inhibitor, prevents imatinib-induced cardiotoxicity by activating Akt and suppressing JNK and p38 MAP kinases. *Mol Cell Biochem.* 2012;365:129-37.
74. Szabados E, Literati-Nagy P, Farkas B, Sumegi B. BGP-15, a nicotinic amidoxime derivate protecting heart from ischemia reperfusion injury through modulation of poly (ADP-ribose) polymerase. *Biochem Pharmacol.* 2000;59(8):937-45.
75. Budzyński MA, Crul T, Himanen SV, Toth N, Otvos F, Sistonen L. Chaperone co-inducer BGP-15 inhibits histone deacetylases and enhances the heat shock response through increased chromatin accessibility. *Cell Stress Chaperones.* 2017;22:717-28.
76. Literati-Nagy Z, Tory K, Literati-Nagy B, Kolonics A, Török Z, Gombos I. The HSP co-inducer BGP-15 can prevent the metabolic side effects of the atypical antipsychotics. *Cell Stress Chaperones.* 2012;17:517-21.
77. Horvath O, Ordog K, Bruszt K, Deres L, Gallyas F, Sumegi B. BGP-15 Protects against Heart Failure by Enhanced Mitochondrial Biogenesis and Decreased Fibrotic Remodelling in Spontaneously Hypertensive Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021(1):1250858.
78. Sapra G, Tham YK, Cemerlang N, Matsumoto A, Kiriazis H, Bernardo BC. The small-molecule BGP-15 protects against heart failure and atrial fibrillation in mice. *Nat Commun.* 2014;5(1):5705.
79. Gyongyosi A, Csaki N, Peto A, Szoke K, Fenyvesi F, Bacskay I. BGP-15 protects against doxorubicin-induced cell toxicity via enhanced mitochondrial function. *Int J Mol Sci.* 2023;24(6):5269.
80. Öveges J. *Erdekes fizika.* Nemzeti Tankönyvkiado; 1995.

81. Budo A, Pocza J. Kísérleti fizika I.: (Mechanika, hangtan, hotan). Tankönyvkiado; 1975.
82. Hooke R. Lectures de potentia restitutiva, or of spring explaining the power of springing bodies. John Martyn; 1678.
83. Davis JR, editor. Tensile testing. ASM international; 2004.
84. Baysal A, Yayla P, Turkmen HS, Karaca Ugural B. Mechanical characterization of hybrid biocomposites reinforced with nonwoven hemp and unidirectional flax fibers. *Polym Compos.* 2023;44(6):3555-66.
85. Tirumalasetty G. Mechanical characterization of hybrid biocomposites. 2008.
86. Rossi LF, Ramos RR, de Medeiros Kesting D, da Silveira Soldi M, Ely JB, d'Acampora AJ. Tensile strength study of the abdominal wall following laparotomy synthesis using three types of surgical wires in Wistar rats. *Acta Cir Bras.* 2008;23:73-7.
87. Duraes LC, Duraes EF, Lobato LF, Oliveira PG, Sousa JB. Correlation between bursting pressure and breaking strength in colonic anasztomosis. *Acta Cir Bras.* 2013;28:447-52.
88. Dos Santos CHM, Santos Filho KG, Cassino PC, Chiquetti CV, Mello AP, Dourado DM. Differences between polydioxanone and poliglactin in intestinal anasztomoses--- A comparative study of intestinal anasztomoses. *J Coloproctol.* 2017;37:263-7.
89. Gal P, Toporcer T, Vidinsky B, Mokry M, Novotny M, Kilik R. Early changes in the tensile strength and morphology of primary sutured skin wounds in rats. *Folia Biol (Praha).* 2006;52(4):109.
90. Copley AL. The rheology of blood. A survey. *J Colloid Sci.* 1952;7(3):323-33.
91. Kensey KR. The mechanistic relationships between hemorheological characteristics and cardiovascular disease. *Curr Med Res Opin.* 2003;19(7):587-96.
92. Nemeth N. Haemorheologiai alapismeretek. Debreceni Egyetemi Kiado; 2020.
93. Copley AL. Introduction: On the way to modern clinical hemorheology. In: *Clinical Hemorheology: Applications in Cardiovascular and Hematological Disease, Diabetes, Surgery and Gynecology.* Springer Netherlands; 1987. p. 1-8.
94. Baskurt OK, Meiselman HJ. Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost.* 2003;29(5):435-50.
95. Damjanovich S, Fidy J, Szöllosi J. Orvosi biofizika. Medicina Könyvkiado Rt.; 2007.
96. Fonyo A, Geiszt M, Kollai M. Az orvosi elettan tankönyve. Medicina Könyvkiado Zrt.; 2011.
97. Bogar L. Diagnosztika. In: Bernat SL, Pongracz E, editors. *A klinikai haemorheologia alapjai.* Kornetas Kiado; 1999. p. 33-50.
98. Lowe GDO. Rheology of paraproteinemias and leukemias. In: *Clinical blood rheology,* vol 2. CRC Press; 1988. p. 67-88.
99. Somer T, Meiselman HJ. Disorders of blood viscosity. *Ann Med.* 1993;25(1):31-9.
100. Schmid-Schönbein H, Wells RE, Goldstone J. Fluid drop-like behaviour of erythrocytes---disturbance in pathology and its quantification. *Biorheology.* 1971;7(4):227-34.
101. Nagelkerke SQ, Bruggeman CW, Den Haan JM, Mul EP, Van Den Berg TK, Van Bruggen R. Red pulp macrophages in the human spleen are a distinct cell population with a unique expression of Fc- $\gamma$  receptors. *Blood Adv.* 2018;2(8):941-53.
102. Giersiepen M, Wurzinger LJ, Opitz R, Reul H. Estimation of shear stress-related blood damage in heart valve prostheses-in vitro comparison of 25 aortic valves. *Int J Artif Organs.* 1990;13(5):300-6.
103. Min Yun B, Aidun CK, Yoganathan AP. Blood damage through a bileaflet mechanical heart valve: a quantitative computational study using a multiscale suspension flow solver. *J Biomech Eng.* 2014;136(10).

104. Horobin JT, Sabapathy S, Simmonds MJ. Repetitive Supra-Physiological Shear Stress Impairs Red Blood Cell Deformability and Induces Hemolysis. *Artif Organs*. 2017;41(11):1017-25.
105. Chasis JA, Shoheit SB. Red cell biochemical anatomy and membrane material properties. *Annu Rev Physiol*. 1987;49:237-48.
106. Paradkar S, Gambhire P. The Role of Cytoskeleton of a Red Blood Cell in Its Deformability. *J Indian Inst Sci*. 2021:1-8.
107. Lux SE. Dissecting the red cell membrane skeleton. *Nature*. 1979;281:426-9.
108. Hochmuth RM, Waugh R. Erythrocyte membrane elasticity and viscosity. *Annu Rev Physiol*. 1986;49:209-19.
109. Lew VL, Tiffert T. On the mechanism of human red blood cell longevity: roles of calcium, the sodium pump, PIEZO1, and gardos channels. *Front Physiol*. 2017;8:977.
110. Namvar A, Blanch AJ, Dixon MW, Carmo OM, Liu B, Tiash S. Surface area-to-volume ratio, not cellular rigidity, determines red blood cell traversal through small capillaries. *bioRxiv*. 2020.
111. Carciati A, Guido S, Tomaiuolo G. Red blood cells under flow: blood rheology and effect of vascular endothelial cells on haemodynamics in vitro. 2017.
112. García-Callejo FJ, Marco-Algarra J, Pla-Gil I, Monzo-Gandía R, Juantegui-Azpilicueta M, Martínez-Beneyto P. Pathologic erythrocyte deformability in patients with sudden sensorineural hearing loss. *Acta Otorrinolaringol (Engl Ed)*. 2012;63(4):249-57.
113. Wagner C, Steffen P, Svetina S. Aggregation of red blood cells: from rouleaux to clot formation. *C R Phys*. 2013;14(6):459-69.
114. Flormann D, Aouane O, Kaestner L, Ruloff C, Misbah C, Podgorski T. The buckling instability of aggregating red blood cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-10.
115. Lominadze D, Dean WL. Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte aggregation. *FEBS Lett*. 2002;517(1-3):41-4.
116. Cruz-Chu ER, Malafeev A, Pajarskas T, Pivkin IV, Koumoutsakos P. Structure and response to flow of the glycocalyx layer. *Biophys J*. 2014;106(1):232-43.
117. Baskurt OK, Meiselman HJ. Erythrocyte aggregation: basic aspects and clinical importance. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2013;53(1-2):23-37.
118. Chung B, Kim S, Johnson PC, Popel AS. Computational fluid dynamics of aggregating red blood cells in postcapillary venules. *Comput Methods Biomech Biomed Engin*. 2009;12(4):385-97.
119. Green CJ, Knight J, Precious S, Simpkin S. Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: A 10-year experience. *Lab Anim*. 1981;15:163-70.
120. Cannon CZ, Kissling GE, Hoenerhoff MJ, King-Herbert AP, Blankenship-Paris T. Evaluation of dosages and routes of administration of tramadol analgesia in rats using hot-plate and tail-flick tests. *Lab Anim*. 2010;39:342-51.
121. Saade F, Quemener-Tanguy A, Obert L. Tricks in End-to-End Anastomosis in Microsurgery: a Systematic Review. *Indian J Surg*. 2023;85:740-7.
122. Leahy MJ. *Microcirculation Imaging*. John Wiley & Sons; 2012.
123. Baskurt OK, Boynard M, Cokelet GC, Connes P, Cooke BM, Forconi S. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2009;42:75-97.
124. Hardeman M, Goedhart P, Shin S. Methods in hemorheology. In: *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. IOS Press; 2007. p. 242-66.
125. Rampling MW, Meiselman HJ, Neu B, Baskurt OK. Influence of cell-specific factors on red blood cell aggregation. *Biorheology*. 2004;41(2):91-112.

126. Godo ZA, Apro A, Madar J, Szabo B, Nemeth N. Microcontroller-based vein testing system. In: 2017 9th International Conference on Electronics, Computers and Artificial Intelligence (ECAI). IEEE; 2017. p. 1-6.
127. Szabo B, Fazekas L, Ghanem S, Godo ZA, Madar J, Apro A. Biomechanical comparison of microvascular anastomoses prepared by various suturing techniques. *Injury*. 2020;51:2866-73.
128. Millereau P, Ducrot E, Clough JM, Wiseman ME, Brown HR, Sijbesma RP. Mechanics of elastomeric molecular composites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018;115:9110-5.
129. Yun X, Gardner L. Stress-strain curves for hot-rolled steels. *J Constr Steel Res*. 2017;133:36-46.
130. Ebrahimi AP. Mechanical properties of normal and diseased cerebrovascular system. *J Vasc Interv Neurol*. 2009;2:155-62.
131. Hickman DL, Johnson J, Vemulapalli TH, Crisler JR, Shepherd R. Commonly used animal models. In: *Principles of animal research for graduate and undergraduate students*. 2016. p. 117.
132. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen and Co. Ltd.; 1959.
133. Sharp P, Villano JS. *The laboratory rat*. CRC Press; 2012.
134. Ghanbari M, Salkovskiy Y, Carlson MA. The rat as an animal model in chronic wound research: An update. *Life Sci*. 2024:122783.
135. Scholz JA, Ramos CC, VanLith CJ, De la Vega RE, Boschen SL, Evans CH. Use of the Rat as a Model in Regenerative Medicine. In: *The Laboratory Rat*. Academic Press; 2020. p. 1077-1105.
136. Maes L, Delvaux G, Wu JX. Regeneration of the femoral artery following experimental end-to-end anastomosis in the rat. An ultrastructural follow-up. *Eur Surg Res*. 1987;19(3):185-92.
137. Bennett KM, Kent KC, Schumacher J, Greenberg CC, Scarborough JE. Targeting the most important complications in vascular surgery. *J Vasc Surg*. 2017;65:793-803.
138. Sharifpour M, Bittner EA. Critical care of the vascular surgery patient. *Anesthesiol Clin*. 2022;40:775-90.
139. Stojanovic MD, Markovic DZ, Vukovic AZ, Dinic VD, Nikolic AN, Maricic TG. Enhanced recovery after vascular surgery. *Front Med*. 2018;5:2.
140. Khanh LN, Helenowski IB, Hoel AW, Ho KJ. The comorbidity-polypharmacy score is an objective and practical predictor of outcomes and mortality after vascular surgery. *Ann Vasc Surg*. 2020;69:206-16.
141. Feldman RP, Marcovici A, Suarez M, Goodrich JT. Foreign body granuloma mimicking intracranial meningioma: Case report and review of the literature. *Neurosurgery*. 1999;44:855-8.
142. Tanghe KK, Chalmers BP, Blevins JL, Figgie MP, Carli AV, Agrusa CJ. Hemostatic agents in orthopedic surgery. *HSS J*. 2023;19:247-53.
143. Charlesworth TM, Agthe P, Moores A, Anderson DM. The use of haemostatic gelatin sponges in veterinary surgery. *J Small Anim Pract*. 2012;53:51-6.
144. Raunio H, Taavitsainen P, Honkakoski P, Juvonen R, Pelkonen O. In vitro methods in the prediction of kinetics of drugs: Focus on drug metabolism. *Altern Lab Anim*. 2004;32:425-30.
145. Martinez C, Delgado M, Pozo D, Leceta J, Calvo JR, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulate endotoxin-induced IL-6 production by murine peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol*. 1998;63:591-601.

146. Delgado M, Ganea D. Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2001;167:966-75.
147. Lamine A, Letourneau M, Doan ND, Maucotel J, Couvineau A, Vaudry H. Characterizations of a synthetic pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide analog displaying potent neuroprotective activity and reduced in vivo cardiovascular side effects in a Parkinson's disease model. *Neuropharmacology.* 2016;108:440-50.
148. Reglodi D, Atlasz T, Jungling A, Szabo E, Kovari P, Manavalan S. Alternative routes of administration of the neuroprotective pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Curr Pharm Des.* 2018;24:3892-904.
149. Tamas A, Reglodi D, Farkas O, Kovesi E, Pal J, Povlishock JT. Effect of PACAP in central and peripheral nerve injuries. *Int J Mol Sci.* 2012;13:8430-48.
150. Zhu L, Tamvakopoulos C, Xie D, Dragovic J, Shen X, Fenyk-Melody JE. The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: In vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38). *J Biol Chem.* 2003;278:22418-23.
151. Larsen JJ, Christensen AV. Subarachnoidal administration of the 5-HT uptake inhibitor citalopram points to the spinal role of 5-HT in morphine antinociception. *Pain.* 1982;14:339-45.
152. Hirabayashi T, Shibato J, Kimura A, Yamashita M, Takenoya F, Shioda S. Potential therapeutic role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide for dry eye disease. *Int J Mol Sci.* 2022;23:664.
153. Fang Y, Ren R, Shi H, Huang L, Lenahan C, Lu Q. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: A promising neuroprotective peptide in stroke. *Aging Dis.* 2020;11:1496-512.
154. Horvath G, Reglodi D, Fabian E, Opper B. Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on cell death. *Int J Mol Sci.* 2022;23:4953.
155. Baskurt OK. Mechanisms of blood rheology alterations. In: *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics.* IOS Press; 2007. p. 170-90.
156. Nemeth N, Deak A, Szentkereszty Z, Peto K. Effects and influencing factors on hemorheological variables taken into consideration in surgical pathophysiology research. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2018;69:133-40.
157. Nemeth N, Peto K, Magyar Z, Klarik Z, Varga G, Oltean M. Hemorheological and microcirculatory factors in liver ischemia-reperfusion injury---An update on pathophysiology, molecular mechanisms and protective strategies. *Int J Mol Sci.* 2021;22:1864.
158. Abellan D, Nart J, Pascual A, Cohen RE, Sanz-Moliner JD. Physical and mechanical evaluation of five suture materials on three knot configurations: An in vitro study. *Polymers.* 2016;8:147.
159. Anushya P, Ganesh SB, Jayalakshmi S. Evaluation of tensile strength of surgical absorbable and nonabsorbable suture materials after immersion in different fruit juices: An in vitro study. *J Adv Pharm Technol Res.* 2022;13(Suppl 1):S108–S111.
160. Handorf AM, Zhou Y, Halanski MA, Li WJ. Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression. *Organogenesis.* 2015;11:1–15.
161. Svensson RB, Smith ST, Moyer PJ, Magnusson SP. Effects of maturation and advanced glycation on tensile mechanics of collagen fibrils from rat tail and Achilles tendons. *Acta Biomater.* 2018;70:270–280.
162. Martinez-Vidal L, Murdica V, Venegoni C, Pederzoli F, Bandini M, Necchi A. Causal contributors to tissue stiffness and clinical relevance in urology. *Commun Biol.* 2021;4:1011.

163. Park JH, Jo SB, Lee JH, Lee HH, Knowles JC, Kim HW. Materials and extracellular matrix rigidity highlighted in tissue damages and diseases: Implication for biomaterials design and therapeutic targets. *Bioact Mater.* 2022;20:381–403.
164. Gauthier V, Kyriazi M, Nefla M, Pucino V, Raza K, Buckley CD. Fibroblast heterogeneity: Keystone of tissue homeostasis and pathology in inflammation and ageing. *Front Immunol.* 2023;14:1137659.
165. Maugeri G, D'Amico AG, Saccone S, Federico C, Rasa DM, Caltabiano R. Effect of PACAP on hypoxia-induced angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma. *Biomedicines.* 2021;9:965.
166. Szentleky E, Szegeczki V, Karanyicz E, Hajdu T, Tamas A, Toth G. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) reduces oxidative and mechanical stress-evoked matrix degradation in chondrifying cell cultures. *Int J Mol Sci.* 2019;20:168.
167. Kang BS, Na YC, Jin YW. Comparison of the wound healing effect of cellulose and gelatin: An in vivo study. *Arch Plast Surg.* 2012;39:317–321.
168. Lerner UH, Lundberg P, Persson P, Ransjö M, Håkanson R. Helodermin, helospectin, and PACAP stimulate cyclic AMP formation in intact bone, isolated osteoblasts, and osteoblastic cell lines. *Calcif Tissue Int.* 1994;54:284–289.
169. Juhasz T, Matta C, Katona E, Somogyi C, Takacs R, Gergely P. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) signalling exerts chondrogenesis promoting and protecting effects: Implication of calcineurin as a downstream target. *PLoS One.* 2014;9:e91541.
170. Jozsa G, Szegeczki V, Palfi A, Kiss T, Helyes Z, Fulop B. Signalling alterations in bones of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene deficient mice. *Int J Mol Sci.* 2018;19:2538.
171. Lauretta G, Ravalli S, Szychlinska MA, Castorina A, Maugeri G, D'Amico AG. Current knowledge of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in articular cartilage. *Histol Histopathol.* 2020;35:1251–1262.
172. Juhasz T, Szentleky E, Somogyi C, Takacs R, Dobrosi N, Engler M. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) pathway is induced by mechanical load and reduces the activity of hedgehog signaling in chondrogenic micromass cell cultures. *Int J Mol Sci.* 2015;16:17344–17367.
173. Shioda S, Nakamachi T. PACAP as a neuroprotective factor in ischemic neuronal injuries. *Peptides.* 2015;72:202–207.
174. Li M, Balamuthusamy S, Khan AM, Maderdrut JL, Simon EE, Batuman V. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents cisplatin-induced renal failure. *J Mol Neurosci.* 2011;43:58–66.
175. Mori H, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Sato A, Endo K. Cardioprotective effect of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on Doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Circ J.* 2010;74:1183–1190.
176. Li H, Cao L, Yi PQ, Xu C, Su J, Chen PZ. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ameliorates radiation-induced cardiac injury. *Am J Transl Res.* 2019;11:6585–6599.
177. Moody TW, Nuche-Berenguer B, Jensen RT. Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, and their receptors and cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2016;23:38–47.
178. Liu Q, Zhao JN, Fang ZT, Wang X, Zhang BG, He Y. BGP-15 alleviates LPS-induced depression-like behavior by promoting mitophagy. *Brain Behav Immun.* 2024;119:648–664.

179. Rippon MG, Ousey K, Cutting KF. Wound healing and hyper-hydration: a counterintuitive model. *J Wound Care*. 2016;25(2):68–75.
180. Bereuter JP, Geissler ME, Geissler R. Impact of dehydration on laparoscopic performance: a prospective, open-label, randomized cross-over trial. *Surg Endosc*. 2023;38(3).
181. Ishii M, Tashima H, Tomita K, Kurita T, Kubo T. Moisturization of the surgical field during cancer resection reduces perioperative complications in reconstruction surgery. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2022;10(5):e4296.
182. Suh HP, Hong JP. The role of reconstructive microsurgery in treating lower-extremity chronic wounds. *Int Wound J*. 2019;16(4).
183. Monika P, Chandraprabha MN, Rangarajan A, Waiker PV, Chidambara Murthy KN. Challenges in healing wound: Role of complementary and alternative medicine. *Front Nutr*. 2022;8.
184. de Araujo Martins-Romeo D, Rivera Domínguez A. Complications after abdominal surgery. *Radiol Engl Ed*. 2023;65(1):S99–S108.
185. Hajar R. Animal testing and medicine. *Heart Views*. 2011;12(1):42.
186. Wang X, Jacobs DS. Contact lenses for ocular surface disease. *Eye Contact Lens*. 2022;48(3):115–118.
187. Griffin M, Premakumar Y, Seifalian A, Butler PE, Szarko M. Biomechanical characterization of human soft tissues using indentation and tensile testing. *J Vis Exp*.
188. Gray RI, Ott DE, Henderson AC, Cochran SA, Roth EA. Severe local hypothermia from laparoscopic gas evaporative jet cooling: A mechanism to explain clinical observations. *JLS*. 1999;3(3):171.
189. Park JS, Cha SJ, Kim BG. An assessment of the effects of a hyaluronan-based solution on reduction of postsurgical adhesion formation in rats: A comparative study of hyaluronan-based solution and two film barriers. *J Surg Res*. 2011;168(1):49–55.
190. Efron N. Contact Lens Complications: Contact Lens Complications E-Book. Elsevier Health Sciences; 2018. Available from: [https://books.google.hu/books/about/Contact\\_Lens\\_Complications\\_E\\_Book.html?id=kOJ1DwAAQBAJ](https://books.google.hu/books/about/Contact_Lens_Complications_E_Book.html?id=kOJ1DwAAQBAJ)
191. Hohf RP. Tensile strength of the arterial-prosthesis anastomosis during healing. *Ann Surg*. 1962;156(5):805–10.
192. Germolec DR, Shipkowski KA, Frawley RP, Evans E. Markers of inflammation. *Methods Mol Biol*. 2018;1803:57–79.
193. Paladino L, Subramanian RA, Bonilla E, Sinert RH. Leukocytosis as prognostic indicator of major injury. *West J Emerg Med*.
194. Ng LF, Zuzel M, Born GV. Changes in the concentration of leucocytes and platelets in the peripheral blood during sterile inflammation in rabbits. *Br J Exp Pathol*. 1977;58(2):200–208.
195. Gaynor JS, Muir WW. Handbook of Veterinary Pain Management - E-Book. Elsevier Health Sciences; 2008. Available from: [https://books.google.hu/books/about/Handbook\\_of\\_Veterinary\\_Pain\\_Management\\_E.html?id=l-s-X92ucvWC](https://books.google.hu/books/about/Handbook_of_Veterinary_Pain_Management_E.html?id=l-s-X92ucvWC)
196. Xue M, Jackson CJ. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Adv Wound Care*. 2015;4(3):119–136.
197. Taylor AM, Bordoni B. Histology, blood vascular system. PubMed. 2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553217/>
198. Mauro CR, Tao M, Yu P. Preoperative dietary restriction reduces intimal hyperplasia and protects from ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg*. 2016;63(2):500–509.e1.

## 10.2 Hitelesített publikációs lista



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/535/2025.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Fazekas László  
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10082253

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Fazekas, L.**, Handari, D., Tran, L. D. L., Varga, Á., Mátrai, Á. A., Fillér, C., Al-Smadi, M. W., Al-Khafaji, M. Q., Tóth, A., Juhász, T., Németh, N.: An old-new problem: the impact of intraoperative tissue desiccation on the regeneration of vascular anastomoses.  
*Curr. Probl. Surg.* 72, 1-15, 2025.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cpsurg.2025.101883>  
IF: 1.9 (2024)
2. Godó, Z., **Fazekas, L.**, Fritsch, G., Szabó, B., Németh, N.: A Custom-Developed Device for Testing Tensile Strength and Elasticity of Vascular and Intestinal Tissue Samples for Anastomosis Regeneration Research.  
*Sensors.* 24 (18), 1-11, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/s24185984>  
IF: 3.5
3. **Fazekas, L.**, Szabó, B., Szegeczki, V., Fillér, C., Varga, Á., Godó, Z., Tóth, G., Reglődi, D., Juhász, T., Németh, N.: Impact Assessment of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) and Hemostatic Sponge on Vascular Anastomosis Regeneration in Rats.  
*Int. J. Mol. Sci.* 24, 1-24, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms242316695>  
IF: 4.9





### További közlemények

4. Kincses, G., **Fazekas, L.**, Varga, Á., Mátrai, Á. A., Nguyen, X. L., Barabási, K., Flaskó, A., Juhász, T., Molnár, Á., Németh, N.: Following-Up Micro-Rheological and Microcirculatory Alterations During the Early Wound Healing Phase of Local and Rotated Musculocutaneous Flaps in Rats.  
*Life (Basel)*. 15, 1-14, 2025.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life15091424>  
IF: 3.4 (2024)
5. Flaskó, A., **Fazekas, L.**, Kincses, G., Varga, Á., Mátrai, Á. A., Czirják, I., Dodity, N., Bácskay, I., Pető, Á., Reglődi, D., Fillér, C., Juhász, T., Németh, N.: Impacts of PACAP 1-38 and BGP-15 on the Healing of Fasciocutaneous Groin Flaps Affected by Ischemia-Reperfusion in Rats.  
*Biomedicines*. 13 (9), 1-18, 2025.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines13092129>  
IF: 3.9 (2024)
6. Adorján, D. M., **Fazekas, L.**, Varga, Á., Mátrai, Á. A., Bidiga, L., Lesznyák, T., Deák, Á., Pető, K., Németh, N.: Metabolic and Microcirculatory Changes in Severe Renal Ischemia-Reperfusion and Ischemic Preconditioning in the Rat: are They Detectable in the First Hour of Reperfusion?  
*Life*. 15 (4), 1-13, 2025.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life15040592>  
IF: 3.4 (2024)
7. Godó, Z., Pető, K., Balog, K., Deák, Á., Ványolos, E., **Fazekas, L.**, Szentkereszty, Z., Németh, N.: A Custom-Tailored Multichannel Pressure Monitoring System Designed for Experimental Surgical Model of Abdominal Compartment Syndrome.  
*Sensors*. 24, 1-12, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/s24020524>  
IF: 3.5
8. Varga, Á., Mátrai, Á. A., **Fazekas, L.**, Al-Khafaji, M. Q., Ványolos, E., Deák, Á., Szentkereszty, Z., Pető, K., Németh, N.: Changes in microcirculation of small intestine end-to-end anastomoses in an experimental model.  
*Microvasc. Res*. 156, 1-8, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2024.104731>  
IF: 2.7





9. Mátrai, Á. A., Varga, Á., **Fazekas, L.**, Baráth, B., Nellamkuzhi, N. J., Nghi, T. B., Németh, N., Deák, Á.: Effect of Bile on Hemodynamics and Blood Micro-Rheological Parameters in Experimental Models of Bilhemia.  
*Metabolites*. 14 (4), 1-13, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo14040211>  
IF: 3.7
10. Varga, Á., Mátrai, Á. A., Baráth, B., **Fazekas, L.**, Brasil, F. S., Mehta, A., Ványolos, E., Deák, Á., Lesznyák, T., Pető, K., Németh, N.: Local and Systemic Micro-Rheological Changes during Intestinal Anastomosis Operation: a Metabolic Dependence in an Experimental Model.  
*Metabolites*. 14 (8), 2-15, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo14080458>  
IF: 3.7
11. Al-Smadi, M. W., **Fazekas, L.**, Varga, Á., Mátrai, Á. A., Aslan, S., Beqain, A., Al-Khafaji, M. Q. M., Baráth, B., Novák, L., Németh, N.: Minor micro-rheological alterations in the presence of an artificial saphenous arteriovenous shunt, as an arteriovenous malformation model in the rat.  
*Clin. Hemorheol. Microcirc.* 87 (1), 27-37, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-231825>
12. Al-Smadi, M. W., **Fazekas, L.**, Aslan, S., Bernát, B., Beqain, A., Al-Khafaji, M. Q. M., Priksz, D., Orlik, B., Németh, N.: A Microsurgical Arteriovenous Malformation Model on Saphenous Vessels in the Rat.  
*Biomedicines*. 11 (11), 1-14, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines11112970>  
IF: 3.9
13. Bernát, B., Erdélyi, R., **Fazekas, L.**, Garami, G., Szekeres, R., Takács, B., Bombicz, M., Varga, B., Sárkány, F., Ráduly, A. P., Romanescu, D. D., Papp, Z., Tóth, A., Szilvássy, Z., Juhász, B., Priksz, D.: Drug Candidate BGP-15 Prevents Isoproterenol-Induced Arrhythmias and Alters Heart Rate Variability (HRV) in Telemetry-Implanted Rats.  
*Pharmaceuticals (Basel)*. 16 (3), 1-22, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph16030359>  
IF: 4.3
14. Szegezcki, V., **Fazekas, L.**, Kulcsár, M., Reglődi, D., Török, P., Orlik, B., Laganà, A. S., Jakab, A., Juhász, T.: Endometrium as Control of Endometriosis in Experimental Research: assessment of Sample Suitability.  
*Diagnostics*. 12 (4), 1-17, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics12040970>  
IF: 3.6





15. Szabó, B., Gasz, B., **Fazekas, L.**, Varga, Á., Kiss-Pápai, L., Matolay, O., Rezsabek, Z., Al-Smadi, M. W., Németh, N.: Heterogeneous Maturation of Arterio-Venous Fistulas and Loop-Shaped Venous Interposition Grafts: a Histological and 3D Flow Simulation Comparison. *Biomedicines*. 10, 1-14, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines10071508>  
IF: 4.7
16. Szabó, B., **Fazekas, L.**, Ghanem, S., Godó, Z., Madar, J., Apró, A., Németh, N.: Biomechanical comparison of microvascular anastomoses prepared by various suturing techniques. *Injury-Int. J. Care Inj.* 51 (12), 2866-2873, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.injury.2020.02.104>  
IF: 2.586
17. Ghanem, S., Lesznyák, T., **Fazekas, L.**, Tánczos, B., Baráth, B., Nasser, M., Horváth, L., Bidiga, L., Szabó, B., Deák, Á., Pető, K., Németh, N.: Microrheology, microcirculation and structural compensatory mechanisms of a chronic kidney disease rat model: a preliminary study. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 75 (1), 47-56, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-190763>  
IF: 2.375

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 56,061**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):  
10,3**

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománytermetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.09.30.



## 11 TÁRGYSZAVAK

mikrosebészet

microvascularis anastomosis

PACAP

BGP-15

szöveti kiszáradás

szöveti regeneráció

szakítószilárdság

haemorheologia

vörösvérsejt deformabilitás

vörösvérsejt aggregatio

microsurgery

microvascular anasztomosis

PACAP

BGP-15

tissue desiccation

tissue regeneration

tensile strength

hemorheology

red blood cell deformability

red blood cell aggregation

## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetomnek, Prof. Dr. Németh Norbert tanszékvezető Úrnak, aki a szakértelmével és türelmével mindvégig mögöttem állt. Köszönöm a szakmai iránymutatást és a kutatási feltételeket, melyekkel lehetőséget teremtett a fejlődésemre, már egészen 2018 óta, amikor is először kapcsolódhattam be a Tanszék tudományos munkájába.

Köszönettel tartozok Dr. Souleiman Ghanemnek és Dr. Szabó Balázsnak, akik elhivatottságukkal példát mutattak és elsoként ismertették meg velem az állatkísérletek menetét és a mikrosebészetet. Köszönöm Prof. Dr. Furka Istvánnak, hogy szilárd mikrosebészeti alapokról indulhattam. Továbbá köszönöm Prof. Dr. Mikó Irénnek, Dr. Pető Katalinnak Dr. Ványolos Erzsébetnek és Dr. Deák Ádámnak a szakmai tanácsokat, javaslatokat.

Hatalmas köszönettel tartozom Dr. Al-Smadi Mohhamad, Dr. Varga Ádám, Dr. Mátrai Ádám Attila, Dr. Bedőcs-Baráth Barbarának, Füzesi Róbert, jelenlegi és volt kollégáimnak, jóbarátaimnak, akik mindig és mindenben mellettem álltak és támogattak. Köszönöm a számtalan, kellemes együtt töltött pillanatot, illetve a támogatásukat a nehéz időszakokban is.

Köszönetet szeretnék mondani a Sebészeti Műtéttani Tanszék valamennyi munkatársának, hogy baráti környezetben tölthettem mindennapjaimat és végezhettem a munkámat.

Köszönöm minden kedves Kollaborációs Munkatársamnak az együtt eltöltött időt, valamint a munkájukat, mellyel hozzájárultak a szakmai fejlődésemhez, a disszertációm elkészítéséhez, továbbá új perspektívák megismeréséhez. Mind az Anatómiai Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Pathológia Intézet és a Gyógyszertechnológiai Tanszék Munkatársainak hálával tartozom, akik közül az évek során többen is a Barátaim lettek.

Ezen disszertáció nem készülhetett volna el a Családom, valamint a Barátaim szeretete, támogatása és ösztönzése nélkül, melyért mindig hálás leszek. Köszönöm Édesanyámnak, Nagypapámnak, Feleségemnek, hogy mindig velem voltak, támogattak, ösztönöztek, illetve megteremtették a biztos hátteret, hogy most itt lehessenek.

Támogatások:

NKFI-1 "OTKA" K-139184

ÚNKP-20-2-I-DE-58, ÚNKP-21-3-I-DE-157, ÚNKP-22-3-I-DE-344

## **13. FÜGGELÉK**

***Az értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények másolatai***