

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Microvascularis anastomosisok regenerációjának  
vizsgálata kísérletes sebészeti modelleken**

Dr. Fazekas László Ádám

Témavezető: Prof. Dr. Németh Norbert



DEBRECENI EGYETEM  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2025

**Microvascularis anastomosisok regenerációjának vizsgálata kísérletes sebészeti modelleken**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a klinikai orvostudományok tudományágban\*

Írta: Dr. Fazekas László Ádám okleveles orvosdoktor

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája  
(Experimentális és operatív orvostudományok programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Németh Norbert

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Jancsó Gábor, PhD  
Dr. Bereczky Zsuzsanna, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Méhes Gábor, MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Jancsó Gábor, PhD  
Dr. Bereczky Zsuzsanna, PhD  
Prof. Dr. Arató Endre, PhD  
Prof. Dr. Sótonyi Péter, MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet  
„A” épület  
2026. január 30. 13:00

## **BEVEZETÉS**

A microvascularis anastomosisokat számos sebészeti szakterület alkalmazza, különösen a rekonstruktív és transzplantációs sebészet. A megfelelő érregenerációhoz számos feltételnek biztosítottak 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-reperfúziós 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.

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. 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.

A szövetek megfelelő hidratálása nemcsak a szövetek életképességének fenntartását segíti elő, hanem megkönnyíti a mikrosebészeti eljárások során a kényes struktúrák manipulálását és összevarrását is. 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. 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 fiziológiai 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.

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.

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.

## **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

## **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **1.1 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.

### **1.2 Kísérleti állatok és felhasznált gyógyszerek**

Hím Wistar (Crl: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). Thrombosis 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.

### **1.3 Műtési protokoll**

A műtési 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 átmetsztük 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 szerőzatút 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 szálat hosszabbra hagytuk (~ 3 mm), míg a másikat közvetlenül a csomó mellett vágtuk le. A megmaradt hosszabb szálat felhasználva óvatosan manipuláltuk az érskéletet, 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.

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 pozicionálásával 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. Az approximátor eltávolítását követően általában csak enyhébb szivárgás volt megfigyelhető. Az anastomosis átjárhatóságát minden esetben „Milking-teszttel” ellenőriztük. A BGP és deszikkációs erek esetében az áramlás kvantitatív is vizsgáltuk (T206, Transonic Systems Inc., USA).

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

#### **1.4 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 kanül 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.

## 1.5 Kísérleti csoportok, kiegészítő lépések

### 1.5.1 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  $0,2 \mu\text{g}$  PACAP 1-38-at ( $100 \mu\text{g}/\text{fiola}$ , 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 adtuk be, majd további  $0,2$  ml fiziológiás sóoldattal öblítettük a kanült. A többi csoport szintén  $0,4$  ml fiziológiás sóoldatot kapott kétnaponta a beadási ponton keresztül. Az bioplast (BP) csoportok kialakításakor egy  $3 \times 4$  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).

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 kétnaponta jelentős stresszelésével és/vagy altatásával járt volna.

Ezeket átgondolva, saját készítésű kanülok mellett döntöttünk, melyet nagy pontossággal az érhez lehet vezetni a subcutan térben, másik végénél pedig az állat által nem elérhető lokalizációban (két elülső lapocka közé) egy adagolási pontot alakítottunk ki, így biztosítva a stresszmentes lokális kezelést. Egy tompa hegyű  $22\text{G } 1 \times$  (Neobject, 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 tű merevítő szárnyain mindkét oldalon  $2$  mm-es fűrófejjel lyukat fűrtünk. 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.

#### 1.5.1.1 Microcirculációs 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 lábdundor 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.

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

#### 1.5.1.2 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 kezeltcsoporthoz 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 ereken, mint az *in vivo* kísérletekben, kivéve a viszonyítási alapként szolgáló csoportot, amelyet *in vivo* nem szakítottunk szét és nem is kezeltünk.

#### 1.5.1.3 *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.

#### 1.5.1.4 *Western blott*

Az érmintákat fiziológias sóoldatban mostuk, majd -70 °C-on tároltuk. A mintákat folyékony nitrogénben, szövetdarálóval mechanikusan homogenizáltuk. Ezután 100 µL homogenizáló RIPA pufferbe (Radio Immuno Precipitation Assay; 150 mM nátrium-klorid, 1,0% NP40, 0,5% nátrium-dezoxikolsav, 50 mM Tris, pH 8,0) gyűjtöttük őket, mely proteázgátlókat tartalmazott (Aprotinin – 10 µg/mL, 5 mM Benzamidin, Leupeptin – 10 µg/mL, Tripszin inhibitor – 10 µg/mL, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 8 mM nátrium-fluorid, 1 mM nátrium-ortovanadát). A szuszpenziókat 30 másodpercig pulzáló ultrahanggal szonikáltuk 40 A erősségen (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA). A Western blot analízishez teljes sejtlizátumokat készítettünk. 20 µg 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 °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.

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

Harminckét hím, Wistar patkányt (330,2g±17,5g) 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.

### **1.5.3 Szövetek nedvesen tartásának jelentőségének vizsgálata**

Az ér-anastomosisok elkészítéséhez csoportonként 8, összesen 24 hím Wistar patkányt (testtömeg: 307,54 ± 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±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.

## 1.6 Laboratóriumi vizsgálatok

### 1.6.1 Hematológiai paraméterek

A hematológiai méréseket Sysmex K-4500 hematológiai automata analizátorral végeztük (TOA Medical Electronics Co., Ltd., Kobe, Japán). A vizsgálataink során a vörösvérsejtszámot ( $V_{vs}$ , ( $\times 10^{12}/L$ )), a fehérvérsejtszámot ( $F_{vs}$ , ( $\times 10^9/L$ )) és a vérlemezkeszámot ( $Thr$ , ( $\times 10^9/L$ )) 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 haemoglobin tartalmat (MCH, (pg)), az átlagos vörösvérsejt haemoglobin koncentrációt (MCHC, (g/dL)) és a haematokritot (Hct, (%)).

### 1.6.2 Micro-rheológiai paraméterek

#### 1.6.2.1 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-diffraktív ektacytometria) működő LoRRca MaxSis Omoscan ektacytométert (RR Mechatronics International BV, Zwaag, Hollandia) segítségével határoztuk meg. A készülék laser fénynyalábot bocsájt ki, mely a vörösvérsejtszuszpendáló közeg különböző sűrűségű határfelületeinek találkozásán szóródik, ami a sejtek elongációjának mértékével, tehát alakváltozásával arányos. A két koncentrikus cylinder közötti részbe (0,3 mm) helyezett mintán forgómozgás segítségével nyírófeszültséget hoz létre a készülék. K3-EDTA-val antikoagulált, 10  $\mu$ l 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.

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:  $\frac{1}{1/EI} = \frac{SS_{1/2}}{EI_{max}} * \frac{1}{SS} + \frac{1}{EI_{max}}$ .

Az egyes elongációs index – nyírófeszültség görbék 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.

#### 1.6.2.2 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°-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 diszaggregálódnak, 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 diszaggregált 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.

#### 1.7 Szakítószilárdság mérése

A szakítószilárdság mérésére 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, a tapasztalatok alapján tovább lett fejlesztve.

### **1.7.1 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, műtési és oktatási helyszínek között. Ezért a vázat nagy szilárdságú alumínium profilokból építettük fel.

### **1.7.2 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.

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.

### **1.7.3 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 puffér 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.

#### **1.7.4 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 húzószervezetre szerelt végálláskapcsolók megakadályozzák, hogy a kocsi elérje a mozgástartomány határait, mint például, hogy nekiütközzön az erőmérő cellával felszerelt befogóbilincsnek.

#### **1.7.5 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-Tajpei, Tajvan).

### **1.7.6 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.

### **1.7.7 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 1.2-1

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.

### **1.7.8 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. 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.

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 ( $tg\alpha$ ; 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.

## **1.8 Szövettan**

A szövettani vizsgálatok az Anatómiai Szövet- és Fejlődéstani Intézetben történtek. A mintákat háromszor PBS-ben mostuk, majd 4%-os formalinban fixáltuk, ezután paraffinba ágyaztuk őket. Sorozatmetszetek készítését követően hematoxilin-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  $40\times$  objektívnagyítás mellett az orcein (zöld) pozitivitás meghatározásához.

## **1.9 Statisztikai analízis**

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

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 méréses ANOVA-teszteket alkalmaztunk. A szignifikanciaszintet  $p < 0,05$  értéknél határoztuk meg.

## **EREDMÉNYEK**

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

#### ***1.10.1 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.

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:  $p = 0,0424$ ).

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).

#### ***1.10.2 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. napra érték el. A BP csoportban a legmagasabb értékeket a 7. napon, a PACAP csoportban pedig a 21. napon mérték (jobb láb  $p = 0,002$ ).

### **1.10.3 Hematológiai változások**

A PACAP és BP csoport kivételével a thrombocytaszám 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.

### **1.10.4 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.

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 az 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 az BP csoportban maradt fenn (M 10s: BP  $p = 0,0014$  a kiindulási értékhez képest).

### **1.10.5 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). Az anastomosisok szakítószilárdsága szignifikánsan ( $p < 0,0001$ ) csökkent a saját ép artériákhoz 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 az 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:  $55,8 \pm 16,8\%$ ). Az anastomisált 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).

### **1.10.6 Hisztológia, molekuláris biológia**

#### **1.10.6.1 Érfalrétegek vastagsága**

Az artériák falvastagsága csökkent az BP kezelés után ( $p = 0,0058$ ). A kombinált PACAP + BP kezelés védőhatást gyakorolt a csökkenés ellen. Az anastomisált artériákban a tunica intima nem változott az 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 anastomisált 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 anastomisált erekben.

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 anastomisált erekben. Ezzel szemben a PACAP növelte az artériák falvastagságát. A tunica intima külön elemzése nem mutatott szignifikáns változást sem ép, sem anastomisált 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 anastomisált erekben.

#### **1.10.6.2 Elasztin expresszió**

Az erek elasztikus rostjainak mennyiségét orceinfestéssel vizualizáltuk, kvantifikáltuk. Az anastomisált artériákban az orceinfestés intenzitása csökkent az BP csoportban az ép és SHAM anastomisált erekhez képest. Ezzel szemben a PACAP hozzáadása az BP-hez növelte az orceinfestés intenzitását az anastomisált erekben *in vivo*. Az elasztin lamellák számát is

meghatároztuk a tunica mediában, és némi eltérést észleltünk a különböző csoportok ép artériái között. Az BP jelenléte enyhe csökkenést okozott az elasztikus gyűrűk számában az anastomizált tunica mediában. A PACAP kezelés növelte az elasztikus lamellák számát ezekben az erekben, de a BP alkalmazása csökkentette a PACAP hatását az anastomizált 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.

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 anastomizált 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.

Az elasztin fehérje expresszióját Western-blot analízissel is vizsgáltuk. 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.

Az elasztin immunopozitivitását immunhisztokémiával is kimutattuk. A SHAM és BP csoportok ép ereiben diffúz jeleket észleltek, néhány lamella immunopozitivitással. A PACAP-kezelt csoportokban elasztin-pozitív lamellák voltak észlelhetők. A PACAP-kezelt anastomizált erekben a diffúz és lamellas elasztin-pozitív jelek hangsúlyosabbá váltak az ép erekhez képest. Az BP kezelés csökkentette az elasztin immunopozitív lamelláinak jelét az anastomizált 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 anastomizált *in vitro* artériákhoz képest.

#### 1.10.6.3 I. típusú kollagén expresszió

Az artériák tunica mediájában az I. típusú kollagén befolyásolja az erek integritását, így a kollagén jelenlétét picrosirius festéssel vizsgáltuk.

Az ép erekben a BP csökkentette a vastag, de emelte a vékony kollagénszálak mennyiségét a tunica mediában. A PACAP főként a vékony szálak esetén okozott csökkenést, az anastomizált ereknél viszont emelkedett a vastag szálak mennyisége. Az *in vitro* szövettenyészetekben az anastomizált 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 szövettényészetekben. Az anastomizált 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* anastomizált tenyészetekben.

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 az BP jelenléte nem okozott változást. Az *in vitro* szövettényészetekben az I. típusú kollagén expresszió alig volt észlelhető, de enyhe emelkedés figyelhető meg az anastomizált tenyészetekben. Az I. típusú kollagén lokalizációját immunhisztokémiával is követtük.

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 szövettényészetekben 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.

#### 1.10.6.4 *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:  $8030,26 \pm 1224,92$ ; PACAP és PACAP + BP:  $17\,954,93 \pm 5270,92$ ), mind a zöld (SHAM és BP:  $3575,05 \pm 2248$ ; PACAP és PACAP + BP:  $9203,76 \pm 3876,22$ ) fénydenzitásban. Az orceinfestésű metszeteken nem volt látható különbség a PACAP-kezelt csoportokban (SHAM és BP:  $1212,869 \pm 183,353$ ; PACAP és PACAP + BP:  $1382,403 \pm 93,97$ ) integrált fényűrűség tekintetében.

### 1.11 A BGP-15 érgyógyulásra kifejtett hatásának vizsgálata

#### 1.11.1 *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 anastomosisok áramlását, a BGPO csoportnál volt megfigyelhető szignifikáns emelkedés, az ép és az anastomizált 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%)

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 műtéti 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.

### **1.11.2 Laboratóriumi vizsgálatok**

#### *1.11.2.1 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 gyulladást 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.

A BGPO csoportban mind a vörösvértestszám, mind a hematokrit értékek szignifikáns, folyamatos csökkenést mutattak, különösen a 14. és 21. napon (VVS:  $7,04\pm 0,46$  és  $7,06\pm 0,34$ ; Htc:  $38,96\pm 2,7$  és  $39,41\pm 2,5$ ). 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.

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 thrombocytosis alakult ki, a 7. naptól kezdve mindvégig szignifikánsan magasabb értékekkel. A BGPK csoportban és a KSHAM csoportban nem észleltünk számottevő változást a thrombocytaszámokban. A SHAM csoportban átmeneti, posztoperatív thrombocytaemelkedés volt megfigyelhető, amely a 14. naptól csökkent.

#### *1.11.2.2 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 műtéti stressz nélküli BGPK csoportban a 7. napon emelkedett  $SS_{1/2}$  érték volt ( $p=0,0023$  vs alap érték), ami a deformálhatóság romlására utalhat.

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.

#### *1.11.3 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 érének elősegítésére utal.

#### *1.11.4 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

képeket, mely a SHAM csoportnál jelen lévő fiziológiás, sebést követő intima hiperplasiát is felerősítette.

Picrosirus festett metszeteken 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.

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.

## **1.12 Szövetek nedvesen tartásának jelentőségének vizsgálata**

### **1.12.1 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.

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.

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

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

### **1.12.2 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 hemoglobín koncentrációban az egyetlen szignifikáns különbség az első héten az Operált csoportban történt ( $p=0,0220$ ). A vérlemezkeszám 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.

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. 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).

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.

### ***1.12.3 Szakítószilárdság mérése***

A szakítószilárdsági mérésekből erő-megnyúlás diagramokat kaptunk, amelyeket numerikusan is elemeztünk. Az artériák feszültség-alakváltozás görbéinek lefutása az elasztomerekhez hasonló. Az elemzés meghatározta a maximális szakítószilárdságot, 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) és külön-külön a teljes szakasz 0-33% és 33-100% 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.

#### ***1.12.4 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).

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.

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.

Az orceinnel festett metszeteken megvizsgáltuk a rugalmas rostok mennyiségét és lamellákba rendeződését. 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.

## **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 haematológiai 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.



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., Dody, N., Bácskay, I., Pető, Á., Reglódi, 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. Szegeczki, 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 alapjául szolgáló közleményekre): 10,3**

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

Debrecen, 2025.09.30.



## 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