

EGYETEMI DOKTORI (Ph. D.) ÉRTEKEZÉS

**Ischaemia-reperfúziós változások vizsgálata
vékonybél segmenten és vékonybél transplantációs
állatkísérletes modelleken
sebészeti- és mikrosebészeti technikák alkalmazásával**

Dr. Bráth Endre

Témavezető:

**Prof. Dr. Furka István
az MTA doktora**



**DEBRECENI EGYETEM
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2011.

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. A kísérletes vékonybél transzplantációs állatmodellek módszertanának rövid történeti áttekintése ..	8
2.2. Mesenterialis ischaemia-reperfusio okozta károsodások	9
2.3. Szabadgyökök részvétele a mesenterialis ischaemia-reperfusió folyamatokban	11
2.4. Az apoptózis jelentősége az ischaemia-reperfusio során	12
2.5. Az ischaemiás praeconditionálás	13
2.6. Lehetséges védőhatások az ischaemia-reperfusió károsodásokkal szemben	14
2.6.1. Az allopurinol védőhatása az ischaemia-reperfusió károsodásokkal szemben	14
2.6.2. Az E-vitamin védőhatása az ischaemia-reperfusió károsodásokkal szemben	16
2.7. Az ischaemia-reperfusió károsodások haemorheologiai vonatkozásai	17
2.8. Éranastomosisok nélküli „avascularis” bélsegment transzplantációs modellek	19
3. CÉLKITŰZÉSEK	20
4. A MESENTERIALIS ISCHAEMIA-REPERFUSIO OKOZTA KÁROSODÁSOK VIZSGÁLATA JEJUNUM-SEGMENTEKEN - I. KÍSÉRLETI MODELL	21
4.1. ANYAG ÉS MÓDSZER	21
4.1.1. Kísérleti állatok, anaesthesia	21
4.1.2. Műtéti módszer a kettős, izolált jejunum-segment megvalósításához	21
4.1.3. Kísérleti csoportok a reperfusió károsodások időbeni lefolyásának meghatározására	23
4.1.4. Kísérleti csoportok a különböző időtartamú ischaemiás praeconditionálás vizsgálatára	23
4.1.5. Kísérleti csoportok a praeconditionálás, valamint az allopurinol és az E-vitamin előkezelés vizsgálatára	25
4.1.6. Morphologiai vizsgáló módszerek	26
4.1.6.1. Makroszkópos vizsgálatok	26
4.1.6.2. Mikroszkópos vizsgálatok	26
4.1.6.2.2. Immunhisztokémiai vizsgálat apoptózis kimutatására	26
4.1.6.2.3. Az apoptotikus sejtek számolása a reperfusió károsodások időbeni lefolyásának meghatározására	26
4.1.6.2.4. Apoptotikus index számítása a különböző időtartamú ischaemiás praeconditionálás, valamint az allopurinol és az E-vitamin előkezelés vizsgálatára	27
4.2. EREDMÉNYEK	27
4.2.1. Makroszkópos vizsgálatok eredményei	27
4.2.2. Mikroszkópos vizsgálatok eredményei	27
4.2.2.1. Hagyományos szövettani vizsgálatok eredményei a reperfusió károsodások időbeni lefolyásának meghatározására	27
4.2.2.2. Az immunhisztokémiai vizsgálat eredményei a reperfusió károsodások időbeni lefolyásának meghatározására	28
4.2.2.3. Hagyományos szövettani vizsgálat eredményei a különböző időtartamú	31
4.2.2.4. Immunhisztokémiai vizsgálat eredménye a különböző időtartamú praeconditionálás kapcsán	31
4.2.2.5. Az immunhisztokémiai vizsgálat eredménye a praeconditionált, az allopurinol és az E- vitamin előkezelés kapcsán	33
4.3. MEGBESZÉLÉS	35
5. MESENTERIALIS ISCHAEMIA-REPERFUSIO OKOZTA HAEMORHEOLOGIAI ÉS HAEMATOLOGIAI VÁLTOZÁSOK VIZSGÁLATA AZ ARTERIA MESENTERICA SUPERIOR LESZORÍTÁSÁT KÖVETŐEN - II. KÍSÉRLETI MODELL	40
5.1. ANYAG ÉS MÓDSZER	40
5.1.1. Kísérleti állatok, anaesthesia	40
5.1.2. Műtéti módszer, kísérleti csoportok	40
5.1.3. Laboratóriumi vizsgálatok	40

5.1.3.1. Vörösvérsejt deformabilitási vizsgálatok filtrométerrel.....	41
5.1.3.2. Haematologiai vizsgálatok	41
5.2. EREDMÉNYEK	
5.2.1. A vörösvérsejt deformabilitás változásai	42
5.2.2. A haematologiai paraméterek változásai.....	43
5.3. MEGBESZÉLÉS	44
6. HAEMORHEOLOGIAI ÉS HAEMATOLOGIAI PARAMÉTEREK VÁLTOZÁSA	
A LOKÁLIS ÉS A SZISZTÉMÁS KERINGÉSBEN MESENTERIALIS ISCHAEMIA-	
REPERFUSIO FOLYAMATAI SORÁN PATKÁNYBAN - III. KÍSÉRLETI MODELL.....	46
6.1. ANYAG ÉS MÓDSZER	46
6.1.1. Kísérleti állatok, anaesthesia	46
6.1.2. Műtéti módszer, kísérleti csoportok.....	46
6.1.3. Laboratóriumi vizsgálatok	47
6.1.3.1. Vörösvérsejt deformabilitási vizsgálatok ektacytometerrel	47
6.1.3.2. Vörösvérsejt aggregatio mérése	48
6.1.3.3. Haematologiai vizsgálatok	48
6.2. EREDMÉNYEK	48
6.2.1. A vörösvérsejt deformabilitás változásai	48
6.2.2. Vörösvérsejt aggregatio változásai	50
6.2.3. A haematologiai paraméterek változásai	50
6.3. MEGBESZÉLÉS	52
7. ÉRANASTOMOSISOK NÉLKÜLI VÉKONYBÉL TRANSPLANTATIÓS EGÉR MODELL	
IV. KÍSÉRLETI MODELL.....	56
7.1. ANYAG ÉS MÓDSZER	56
7.1.1. Kísérleti állatok, anaesthesia	56
7.1.2. Műtéti módszer, kísérleti csoportok.....	56
7.1.2.1. Donor műtétek	56
7.1.2.2. Recipiens műtétek	58
7.1.3. Makroszkópos vizsgálatok.....	59
7.1.4. Mikroszkópos vizsgálatok	59
7.2. EREDMÉNYEK	59
7.2.1. Makroszkópos vizsgálatok eredménye	60
7.2.2. Mikroszkópos vizsgálatok eredményei.....	60
7.3. MEGBESZÉLÉS	63
8. MIKROSEBÉSZETI ALAPOK OKTATÁSI TEMATIKÁJÁNAK	
TOVÁBBFEJLESZTÉSE TRANSPLANTATIÓS KUTATÁSOKHOZ.....	66
8.1. A mikrosebészeti alapok elsajátításához szükséges oktatási tematika.....	66
8.2. A haladó mikrosebészeti ismereteket igénylő vékonybél transplantió elsajátításához	
szükséges oktatási tematika	68
9. FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	72
10. ÖSSZEFOGLALÁS	72
11. SUMMARY	76
12. IRODALOMJEGYZÉK.....	76
12.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke	77
12.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke.....	85
12.3. Az értekezés témájával összefüggő közlemények jegyzéke	85
12.4. Egyéb közlemények jegyzéke.....	87
13. TÁRGYSZAVAK.....	88
14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	89
15. FÜGGELÉK.....	90

1. BEVEZETÉS

A klinikai és a kísérletes transplantatio során előforduló sikertelenségnek számos oka lehet, ezek közül kiemelten fontos kérdések: az ischaemia-reperfusio kapcsán kialakuló károsító hatások, a rejectio különböző típusai, valamint nem elhanyagolhatóak a műtéttechnikai problémák sem. A kísérletes transplantatiós modelleknek ezen folyamatok megértését kell szolgálnia, lehetőség szerint csökkentve eredményeikkel a szövödmények kialakulásának lehetőségeit.

Számos súlyos kórállapotban csak a *vékonybél transplantatio* lehet az egyetlen kezelési lehetőség, melynek segítségével megmenthető a beteg élete, vagy az egyetlen lehetőség, amellyel elfogadható életminőség biztosítható.

A különböző kóros folyamatok miatt kialakult „*rövid-bél*” *syndroma* az egyik leggyakoribb indikációja a vékonybél transplantationak. A vékonybél volvulus, a Crohn betegség, a malabsorptio, a radiációs enteritis, a familiáris polyposis, a pseudoobstructio, a Gardner syndroma és a desmoid (mesenterialis) tumorok is lehetnek még a bél transplantatio indikációs területei [Grant, 1989., 1996.; Deltz, 1991.; Bruin és mtsai, 1994.; Ferencz és mtsai, 2001.; Perner, 2002.; Middleton és Jamieson, 2005.].

A *vascularis* megbetegedések visceralis területen kialakuló elváltozásai közül az arteria mesenterica superior emboliája, a vena mesenterica superior thrombosisa, vagy a vasculitisek különböző formái vezethetnek bélelhaláshoz, mely kezelését transplantatióval lehet megoldani [Grant és mtsai, 1989., 1990., 1996.; Todo és mtsai, 1992.; Perner, 2002.; Chang és Stein, 2003.; Middleton és Jamieson, 2005.; Yasuhara, 2005.].

Mindenképpen meg kell említenünk a *neuroendocrin* kórformákat is: aganglionosis, progresszív motilitási zavar, amelyek kezelésében a vékonybél transplantatio szintén

megoldást jelenthet. Természetesen a kiterjedt, a gastrointestinalis traktus nagyfokú sérülésével járó *trauma* kezelésében is szükséges lehet a transplantatio [Grant, 1989., 1996.; Perner, 2002.; Middleton és Jamieson, 2005.].

Az évekig tartó, *tartós parenteralis táplálás* megszüntetésének is megoldása lehet a szervátültetés, mely jelentős életminőség változást hozhat a beteg számára.

Gyermekkorban a necrotizáló enterocolitis, a volvulus neonatorum, a *veleszületett fejlődési rendellenességek* közül az intestinalis atresia különböző formái, komplikált gastroschisis, pseudoobstructio, Hirschprung-betegség, microvillosus inclusiós betegség és mucoviscidosis is orvosolhatók lehetnek vékonybél transplantatio segítségével [Grant, 1989., 1996.; Perner, 2002.; Middleton és Jamieson, 2005.].

A klinikai problémakör vázlatos felsorolása önmagában is mutatja a kérdés fontosságát. Mivel a vékonybél transplantatio komplex folyamat, még számos, részleteiben nem teljesen ismert kérdés vár megválaszolásra, melyek közül néhányat az alábbiakban kívánok kiemelni, melyek egyben kutatásaink tárgyát is képezték.

Ismert tény a *mesenterialis ischaemia-reperfusio* okozta károsodások lehetősége, s hogy ennek kapcsán -a károsodás mértékétől függően- apoptotikus folyamatok indulnak be [Buttke és Sandstrom, 1994.; Shah és mtsai, 1997.(a), 1997.(b); Ikeda és mtsai, 1998.; Noda és mtsai, 1998.; Coopersmith és mtsai, 1999.; Ramachandran és mtsai, 2000.; Fukuyama és mtsai, 2001.], ugyanakkor nem ismerjük például azt, hogy befolyásolja-e az E-vitamin, és az allopurinol -mint jól ismert antioxidánsok- ezen folyamatokat?

Az utóbbi időben intenzíven kutatott terület többek között az *ischaemiás praeconditionálás* hatásmechanizmusa is [Murry és mtsai, 1986., 1991.; Reimer és mtsai, 1986.; Li és mtsai, 1990.; Iwamoto és mtsai, 1991.; Walker és Yellon, 1992.; Marber és mtsai, 1993.; Ishida és mtsai, 1997.; Yellon és mtsai, 1998.; Chien és mtsai,

1999.; Liu és mtsai, 2001.; Ferencz és mtsai, 2002., 2004.; Pasupathy és Homer-Vanniasinkam, 2005.].

Számos szervnél -szív, máj, vázizomzat, vékonybél- kimutatták az ischaemiás praeconditionálás hatékonyságát. Az irodalmi adatok ellentmondásosak a tekintetben, hogy milyen időtartamú praeconditionálási módszereket érdemes alkalmazni, melyek hatásosak és befolyásolják-e, s ha igen, hogyan az ischaemia-reperfusio kapcsán kialakuló apoptosist a bélfal nyálkahártyájában?

A transplantatio sikerességét nagymértékben befolyásolja a szövetek jó vérellátása. Az ischaemia-reperfusio komplex folyamata több területen jelentős változást indít el a *mikrokeringés*ben is [Boros és mtsai, 1994., 1995.; Haglund, 1994.; Bradbury és mtsai, 1995.; Szabó és mtsai, 1997.; Bernát és Pongrácz, 1999.; Haglund és Bergqvist, 1999.; Anaya-Prado és mtsai, 2002.; Boros, 2003.; Bernát és mtsai, 2005.]. Ezen kutatási területen belül egyik fontos kérdés az, hogy a vörösvérsejtek deformabilitását, filtrálhatóságát mennyire károsítja az ischaemia-reperfusio folyamata kapcsán kialakulható mikrokeringési zavar, hiszen ismert, hogy a rigid, károsodott membránnal rendelkező vörösvérsejteknek a capillárisokon való áthaladási képessége csökken [Granger és mtsai, 1980.; Dormandy és mtsai, 1985.; Reinhart és Chien, 1985.; Mohandas és Chasis, 1993.; Granger és Korthuis, 1995.; Koppensteiner, 1996.; Baskurt és mtsai, 1998.; Kayar és mtsai, 2001.; Reinhart, 2001.; Anaya-Prado és mtsai, 2002.; Németh és mtsai, 2006.(a), 2006.(b)].

Míg az előzőekben felvetett kérdéskör vizsgálata nagy- és kislaboratóriumi állatokon is történhet, addig a vékonybél transplantatio immunológiai folyamatainak kutatása jelentős részben kislaboratóriumi állatokon -egér, patkány- történik [Monchik és Russel, 1971.; Grant, 1989.; Sonnino és mtsai, 1990.; Garcia és mtsai, 1990.; Zhong és mtsai,

1991.; Squiers és mtsai, 1992.; Zhong és mtsai, 1993.(a), 1993.(b); Kato és mtsai, 1996.; Timmermann és mtsai, 1998.].

Számos genetikailag módosított congenikus, transzenikus és knock out egértörzs biztosít lehetőséget a folyamatok tisztázására. A különböző részletek a széles körben hozzáférhető immunológiai, molekuláris biológiai módszerekkel, poly-monoklonális antitestek alkalmazásával vizsgálhatók.

A költség-haszon arány is a kisállat modellek alkalmazása esetén a legkedvezőbb, összehasonlítva nagy laboratóriumi állat modellekkel [Grant, 1989.; Zhong és mtsai, 1991., 1993.(a), 1993.(b); Zhang és mtsai, 1994., 1996.; Timmermann és mtsai, 1998.].

Meg kell viszont említeni az egér modellek egyik nehézségét, hogy speciális *mikrosebészeti tapasztalatot* és gyakorlatot igényelnek a mikro-ér-anastomosisok műtéti nehézségei miatt.

Fontos tehát az egyszerű, gyorsan kivitelezhető kísérletes transplantációs modell kialakítása is, amely bár mikrosebészeti alapismereteket igényel, mégis könnyen elsajátítható, megtanulható legyen.

Ezért e mikrosebészeti transplantációs technika elsajátításához és biztonságos alkalmazásához a mikrosebészeti alapok megtanulása és tanítása is kiemelkedő jelentőségű momentum.

A bél transplantatio kapcsán a korábbiakban említett és felmerülő számos kérdés vonatkozásában -három laboratóriumi állatfajon- az alábbiakban megfogalmazott céllal végeztük kutatásainkat, keresve azokra a választ, idővel akár a klinikumban történő alkalmazhatóságra való tekintettel is.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A kísérletes vékonybél transzplantációs állatmodellek módszertanának rövid történeti áttekintése

Kutyákon végzett kísérletes vékonybél transzplantációról először Alexis Carrel számolt be 1902-ben, majd 1905-ben is. Lillehei 1959-ben végzett sikeres kutatásokat kutyákon vékonybél transzplantáció kapcsán.

Monchik és Russel 1971-ben, Grant 1989-ben, Zhong és munkatársai 1991-ben dolgoztak ki mikrosebészeti éranastomosis technikát igénylő vékonybél transzplantációs modellt *patkányokon*.

Az 1990-es évek elején Squiers és Zhong munkacsoportjai párhuzamosan dolgoztak ki *egereken* vékonybél transzplantációs modellt, amely tekintettel e méretekre, igen nagy mikrosebészeti jártasságot, haladó mikrosebészeti technikát igényelt [Zhong és mtsai, 1991.; Squiers és mtsai, 1992.].

Sebésztechnikailag számos vékonybél transzplantációs kísérleti modell ismert, leggyakrabban a hasüregben belül történt átültetéssel. Sonnino egy egészen különleges modellt alakított ki patkányokban, amelyben a vékonybelet a nyak bőre alá transzplantálta és a vena jugularis externát, valamint az arteria carotis communis használta end-to-side anastomosisok segítségével a vérellátás biztosítására [Sonnino és mtsai, 1990.].

Az ér anastomosis készítésével kialakított „vascularis” modellek mellett éranastomosis nélküli, ún. „*avascularis*” kísérletes műtéti eljárásokat is többen alkalmaztak. Klos 1977-ben használta a nagycepleszt először vékonybél transzplantatio számára. Kísérletében *sertések* eltávolított vékonybeleit becsavarta a nagycepleszbe és nem készített éranastomosis. A bélfal rétegeit 6 héttel a transzplantációt követően néhány esetben azonosította, de általában csak az izomréteget tudta kimutatni. A korai postoperatív időszakban nem talált különbséget a homograftok és az autograftok bélfal szerkezete között [Klos, 1977.].

Tisinai és munkatársai patkányokon végzett kísérleteikben magzatokból eltávolított jejunum és ileum segmenteket helyeztek a vese tokja alá, illetve göngyöltek a nagycsepleszbe. Mindkét esetben 2 héttel a transplantációt követően neovascularizált vékonybelet tudtak kimutatni [Tisinai és mtsai, 1990.].

McBride patkányokon végzett kísérleteiben a magzati béldarabokat a csepleszbe burkolta és 6 héttel a műtétet követő vizsgálatok eredményei alapján a csepleszt alkalmasnak találta a bél transplantatio megvalósításához és a további kutatások számára [McBride és mtsai, 1998.].

Természetesen nemcsak külföldön folynak kísérletek a vékonybél transplantatio területén. Hazánkban is több intézetben behatóan és eredményesen foglalkoznak a vékonybél transplantatio kapcsán felmerülő kérdések kutatásával. A teljesség igénye nélkül kiemelendők Ferencz és munkatársai munkái [Ferencz és mtsai, 2001., 2002., 2004.], akik kutyákon végzett kísérleteikben a prae- és postconditionálás folyamatát több szempontból is elemezték. Boros [Boros és mtsai, 1994., 1995.; Boros, 2003.] és Szabó [Szabó és mtsai, 1997.] kutatásai az ischaemia-reperfüsiós károsodások microcirculatiós változásaival foglalkoznak a bélfalban.

E rövid történeti áttekintésből is látható, hogy számos tényező befolyásolhatja a béltransplantatio sikerét kísérletes körülmények között is.

Ezen tényezők közül a kutatómunkánk tervezésénél is fontosnak ítélt -s egyben vizsgálni kívánt- ischaemiás-reperfüsiós változásokról, s annak következményeiről kívánok rövid áttekintést adni a következőkben.

2.2. Mesenterialis ischaemia-reperfüsió okozta károsodások

A mesenterialis ischaemia időtartama döntő tényező, amely meghatározza a bélfal károsodásának mértékét. Bradbury leírta, hogy 15 perces mesenterialis ischaemia következtében a vékonybél villusainak szerkezeti sérülését lehet kimutatni. Ha az ischaemia 3 órás, a mucosa sérülése kifejezetté válik, de a regenerációs folyamatok révén új epithelium

képződése lehetséges a cryptákból. Ha az ischaemia időtartama 6 óra, vagy annál több, transmuralis necrosis következhet be [Bradbury és mtsai, 1995.].

Bármely szervben az ischaemia időtartama alatt az ATP mennyisége és így az aktív transzmembrán ion-transport csökken, ami intracellularis ion és víz beáramlást eredményez. Ez a sejtek duzzadásához, funkciójuk károsodásához vezet. Az endothelsejtek károsodásával vasoconstrictio, endothel duzzadás, a vér alakos elemeinek lokális „besűrűsödése”; a microhaematocrit növekedése, valamint főként a polymorph magvú neutrophil leukocyták számának lokális növekedése következik be. A leukocyták az endothel sejtekhez tapadnak, ami a capillarisk obstruciójához, következményes lokális microcirculációs zavarhoz vezethetnek a reperfusio során, így prolongálódik az ischaemia károsító hatása a reperfusio időtartamára. A jelenség neve „no reflow phenomén” [Majno és mtsai, 1967.; Reinhart és Chien, 1985.; Mohandas és Chasis, 1993.; Haglund, 1994.; Bradbury és mtsai, 1995.; Koppensteiner, 1996.; Szabó és mtsai, 1997.; Bernát és mtsai, 1999., 2005.; Kayar és mtsai, 2001.; Reinhart, 2001.; Anaya-Prado és mtsai, 2002.; Rezkalla és Kloner, 2002.; Németh és mtsai, 2006.(a)].

Parks és Granger szerint paradox módon a szövetek károsodása nemcsak az ischaemia időtartama alatt következik be, hanem a károsodás folytatódik a reperfusio, reoxygenisatio ideje alatt is, vagyis a reperfusio, mely nélkülözhetetlen az ischaemiás szövetek túlélése számára, további károsodásokat okoz a szövetekben, melyet az irodalom „reperfusio paradoxon”-nak nevez [Granger és mtsai, 1980., 1981., 1986.(a), 1986.(b); Parks és mtsai, 1982.; Parks és Granger, 1986.(a), 1986.(b); Granger, 1988.; Parks és mtsai, 1988.; Granger és Korthuis, 1995.].

Hasonlóan más szervekhez a mesenterialis ischaemia-reperfusio okozta károsodásoknak is egyik legfontosabb felelősei az oxigén eredetű szabadgyökök, ahogy ezt Massberg is leírta [Massberg és Messmer, 1998.].

2.3. Szabadgyökök részvétele a mesenterialis ischaemia-reperfüsiós folyamatokban

Szabadgyökök minden olyan molekula-species, amely egy vagy több párosítatlan elektront tartalmaz, ami hajlamos a párképződésre, ezért a szabadgyökök rövid élettartamúak és kémiaiailag igen reaktívak.

Az ischaemia-reperfüsió során képződő oxigén-intermedierek, illetve szabadgyökök (-OH^\cdot , O_2^\cdot , $\text{H}_2\text{O}_2^\cdot$ stb.) károsíthatják a sejtmembrán szerkezetét, inaktiválják az enzimeket, a lipidek peroxidációját okozzák, bizonyos sejtek öregedéséhez, pusztulásához vezetnek, amely lehet apoptosis vagy necrosis egyaránt [Whitehead, 1976.; Parks és mtsai, 1982.; Parks és Granger, 1986(a); Parks és mtsai, 1988.; Schoenberg és Berger, 1990., 1993.; Sies, 1991.; Grace, 1994.; Haglund, 1994.; Bradbury és mtsai, 1995.; Róth, 1997.; Kong és mtsai, 1998.; Bernát és Pongrácz, 1999.; Haglund és Bergqvist, 1999.; Ferencz és mtsai, 2001.].

2.4. Az apoptosis jelentősége az ischaemia-reperfüsió során

A bélnyálkahártya a gyorsan regenerálódó, megújuló szövetek egyike, ezért érzékenyen reagál az ischaemia-reperfüsió kapcsán kialakuló károsodásokra egyaránt.

Chiu kimutatta és osztályozta az ischaemia kapcsán kialakuló bélnyálkahártya károsodások szövettani jeleit, s azok mértékét 5 fokozatban írta le [Chiu és mtsai, 1970.]:

- 0 fázis: A normal mucosa szerkezete.
- 1 fázis: A normal mucosa szerkezetet ért enyhe károsodást a villusok csúcsi részén kialakuló subepithelialis tér (Gruenhagen-féle tér) megjelenése jellemzi.
- 2 fázis: A kiterjedt subepithelialis tér kismértékű nyálkahártya elemelkedéssel alakul ki.
- 3 fázis: A nyálkahártya masszívan eltávolodik a villusok csúcsától és oldalától, néhány nyálkahártya nélküli bélboly is látható.
- 4 fázis: Nyálkahártya nélküli bélbolyok, dilatált capillarisok jelennek meg.
- 5 fázis: A lamina propriában megfigyelhető desintegratio, ulceratio és bevérzés.

Az epithelium sejtjei elpusztulásuk során leválnak a bélbolyhokról és a bél lumene felé távoznak. Pótlásukról a Lieberkühn crypták állandó sejtproliferációval gondoskodnak [Chiu és mtsai, 1970.; Shah és mtsai, 1997.(a), 1997.(b); Coopersmith és mtsai, 1999.; Quaedackers és mtsai, 2000.; Ferencz és mtsai, 2001.].

A sejthalálnak alapvetően két típusa különíthető el: a *necrosis*, amely a sejten belül végbemenő folyamatokat tekintve passzív, valamint a programozott sejthalál, ami aktív sejttevékenység következménye. A programozott sejthalálnak több formája is megkülönböztethető, közülük az *apoptosis* az -aktiváció-indukálta sejtpusztulás- tűnik a legjelentősebbnek. Az ischaemia-reperfusio okozta apoptosis is ebbe a csoportba sorolható [Kerr és mtsai, 1972.; Buttker és Sandstrom, 1994.; Cohen, 1994.; Majno és Joris, 1995.; McConkey, 1998.; Kopper és Fésüs, 2002.; Zhang és mtsai, 2004.; Horváth és Szabó, 2005.].

Az apoptosissra jellemző, hogy fiziologiás és pathologiás hatások egyaránt okozzák, pontosan szabályozott folyamatok sora, energiát igényel, makromolekula szintézis és „de novo” gén-transcriptio szükséges hozzá. A DNS lebontása endogén endonukleázok általi internucleosomal hasítással -endonucleolysis- történik, ezért a kiváltó hatást követően bizonyos időtartamnak el kell telnie, míg ezek a folyamatok végbemehetnek [Kerr és mtsai, 1972.; Cohen, 1994.; Majno és Joris, 1995.; McConkey, 1998.; Kopper és Fésüs, 2002.].

A mesenterialis ischaemia kapcsán kialakuló apoptosist először Shah írta le, különös tekintettel a jellemző szövettani folyamatokra [Shah és mtsai, 1997.(a), 1997.(b)].

Köztudott, hogy fiziologiásan a bélnyálkahártya sejtjeinek kb. 10%-a apoptosissal pusztul el. Az apoptosis morfológiailag a magi chromatin tömörülésével, a környező sejtektől való elválással, a sejtmag zsugorodásával, majd fragmentálódásával, a cytoplasma kondenzálódásával és fragmentációjával, végső soron a sejt széttöredezésével, valamint a macrophagok és szomszédos sejtek általi phagocytosissal jellemezhető leginkább. [Kerr és mtsai, 1972.; Buttker és Sandstrom, 1994.; Cohen, 1994.; Majno és Joris, 1995.; Shah és mtsai, 1997.(a), 1997.(b); McConkey, 1998.; Fésüs és mtsai, 2002.].

Az apoptózis tehát alapjaiban különbözik a necrosistól. Míg a sejtek necrosisra aspecifikus károsító tényezők hatására, addig az apoptózis regulált ligand-receptor kölcsönhatások révén alakulhat ki.

Egyértelmű irodalmi adatok azonban nem állnak rendelkezésre a mesenterialis ischaemiát követően kialakuló apoptózis időbeni lefolyására, pedig ez a kérdés a vékonybeleben végzett sebészeti beavatkozások során fontos tényező is lehet.

2.5. Az ischaemiás praeconditionálás

Praeconditionálás során a szöveteket egy vagy több, egymást követő rövid időtartamú ischaemiának teszik ki, amit reperfusio követ, ezáltal a szövetek életképessége fokozódik a hosszú időtartamú ischaemia okozta károsító hatásokkal szemben. A praeconditionálásnak védő szerepe van az ischaemia-reperfusio okozta károsodásokkal szemben. Az ischaemiás praeconditionálást, mint egy endogén adaptációs mechanizmust, először Murry írta le 1986-ban [Murry és mtsai, 1986.].

A ischaemiás praeconditionálásnak két időperiódusban mutatták ki védőhatását a szívizom vonatkozásában. A korai védelem az ischaemiás történést követő 1-3 óra közötti időintervallumban fejt ki protektív hatását. A folyamatot az irodalom a *klasszikus praeconditionálás* elnevezéssel idézi. A *késői praeconditionálás* (delayed preconditioning vagy second window of protection) a 24-72 óra közötti időszakban biztosít védelmet az ischaemia okozta károsodásokkal szemben [Marber és mtsai, 1993.].

Számos szövetnél -szív, máj, vese, vázizomzat, agy- kimutatták már, hogy akár az ischaemiás praeconditionálás klasszikus vagy korai formája, akár a késői formája fokozza a szerv ischaemia-reperfusió károsodással szembeni toleranciáját [Murry és mtsai, 1986., 1991.; Reimer és mtsai, 1986.; Godin és Garnett, 1989.; Li és mtsai, 1990.; Marber és mtsai, 1993.; Iwamoto és mtsai, 1991.; Walker és Yellon, 1992.; Ishida és mtsai, 1997.; Yellon és

mtsai, 1998.; Chien és mtsai, 1999.; Cochrane és mtsai, 1999.; Pasupathy és Homer-Vanniasinkam, 2005.].

A vékonybél transplantatio során lehetőség van a klasszikus praeconditionálás védőhatásának kihasználására. Az ideális praeconditionálási módszer vékonybél esetén azonban sem klinikai-, sem kísérletes vonatkozásban nem ismert, az irodalmi adatok is ellentmondásosak [Walker és Yellon, 1992.; Hotter és mtsai, 1996.; Yellon és mtsai, 1998.; Ferencz és mtsai, 2002., 2004.; Cinel és mtsai, 2003.].

Murry és munkatársai a 4x5-5 perces praeconditionálási eljárást hatékonynak találták coronaria arteriák elzáródása okozta szívizom károsodások kivédésére kutyákban [Murry és mtsai, 1986.]. Hasonló eredményeket értek el Li és munkatársai egyszeri 15 perces, vagy 6 és 12 perces ischaemiás praeconditionálással is [Li és mtsai, 1990.].

Ferencz és munkatársai 4x5 perces praeconditionálás kapcsán vizsgálták az NF- κ B szerepét vékonybél transplantatio során [Ferencz és mtsai, 2002., 2004.].

Áttekintve az irodalomban fellelhető különböző preconditionálási időtartamokat, itt is megállapítható, hogy nincs egységes álláspont arra vonatkozóan, hogy a különböző praeconditionálási időtartamok közül melyek lehetnek hatásosak kísérletes vékonybél segment modellünkben, ezért kísérleteink egy része erre a területre irányult.

2.6. Lehetséges védőhatások az ischaemia-reperfüziós károsodásokkal szemben

2.6.1. Az allopurinol védőhatása az ischaemia-reperfüziós károsodásokkal szemben

Az allopurinolt az 1950-es évek közepén Falco tumorellenes szernek szánta, de később igazolódott xantin-oxidázt gátló hatása. Hatásmechanizmusa eredményeképpen csökkenti a húgysav szintet, ezért köszvényellenes szerként alkalmazzák [Rundles, 1966.(a), 1966.(b)]. Jelenleg is forgalomban van Milurit néven.

Az allopurinol és aktív metabolitja az oxipurinol gátolja a xantin-oxidázt, ezáltal csökkenti az ischaemia-reperfüzio okozta károsodásokat. Alacsony koncentrációban az

allopurinol szubsztrátja és kompetitív gátlószere az enzimnek, magas koncentrációnál pedig nem-kompetitív gátlószere, míg az oxipurinol kizárólag nem-kompetitív gátló.

Massey szerint az allopurinol esetén a felezési idő 2-3 óra, míg az oxipurinol felezési ideje a plasmában körülbelül 14-30 óra. A felezési időtartam elég hosszú, ami lehetővé teszi a xantin-oxidáz gátlást a reperfúziós időszakban is, hozzávetőlegesen 24 óráig [Massey és mtsai, 1970.; Borges és mtsai, 2002.].

A reperfúzió során a xantin-oxidáz a hipoxantint xantinná, majd húgysavvá alakítja. A folyamat során molekuláris oxigént használ, amelyből hidrogén-peroxid és szuperoxid gyökök keletkeznek nagy mennyiségben. Mivel az allopurinol a hipoxantin struktúranalógja, ezért xantin-oxidázhoz kötődve gátolja a működését és a szabadgyökök képződését [Granger és mtsai, 1980., 1981., 1986.(a), 1986.(b), 1988.; Granger és Korthuis, 1995.]. Ahhoz, hogy az allopurinol a védőhatását kifejtse, az ischaemia kezdete előtt szükséges alkalmazni a megfelelő koncentrációban [Pető és mtsai, 2005., 2007.].

Az allopurinolt az elmúlt évtizedben különböző ischaemia-reperfúziós szervmodellekben alkalmazták a károsodás csökkentésére, kivédésére. Szívizom ischaemia-reperfúziós modellben -az arteria coronaria leszorítás előtt alkalmazva- mérsékelte az infarctus kiterjedését és csökkentette az arrythmiák előfordulási gyakoriságát [Godin és Garnett, 1989.].

Agyi modell esetén csökkentette az infarctus kiterjedését és az idegsejtek károsodását mind a korai, mind a késői reperfúziós időszakban [Lindsay és mtsai, 1991.; Akdemir és mtsai, 2001.].

Máj patkány modelleknél mérsékelte a májkárosodást, a lipidperoxidációt és az NF- κ B aktivitást [Karwinski és mtsai, 1991., 1993.; Cohen, 1992.].

Vékonybél ischaemia-reperfúziós modellben csökkentette a bélbolyhok necrosisát, kedvezően befolyásolta az érpermeabilitást [Granger és mtsai, 1986.(b); Parks és Granger, 1986.(b)], mérsékelte a mucosa károsodást [Megison és mtsai, 1990.], a histamin

felszabadulást [Boros és mtsai, 1989.], a leukocytá infiltrációt, a lipidperoxidációt és a gyulladást kemokinek szintjét [Riaz és mtsai, 2002.; Ilhan és mtsai, 2003.].

Az allopurinol védőhatását kihasználva az ischaemia-reperfusio kapcsán kialakuló károsodásokkal szemben az University of Wisconsin oldatban is alkalmazzák szerv preservatio céljára [Owens és mtsai, 1974.].

2.6.2. Az E-vitamin védőhatása az ischaemia-reperfusió károsodásokkal szemben

Az E-vitamin (α -tocopherol) egyike a zsírban oldódó vitaminoknak. Az elnevezés alatt lipidoldékony molekula családot értünk, tagjai a tocopherolok (α , β , γ , δ), és tocotrienolok (α , β , γ , δ). A α -tocopherol használata a legáltalánosabban elterjedt [Ricciarelli és mtsai, 2001.; Schneider, 2005.; Chaumontet és mtsai, 2008.]. Az E-vitamin scavenger molekula, „csapdába ejti” a szabadgyököket. Különböző szervek ischaemia-reperfusió károsodásának kivédésére használják. Hatásukat a biológiai membránokban is kifejtik, gátolják a lipidperoxidációt [Wang és Quinn, 2000.].

Az E-vitamin vízben oldhatatlan, ezért rendkívül hatékony antioxidáns aktivitása a lipid komponensekre korlátozódik [Burton és mtsai, 1990.]. A bélből felszívódva az LDL (low density lipoprotein) szállítja a célszövetekhez. Az LDL szállítja a keringésben lévő E-vitamin 50%-át, ezért már az LDL particulumon belül képes gátolni a lipidperoxidációt [Chattopadhyay és Bandyopadhyay, 2006.]. Az E-vitamin két zsírsav peroxy csoportot is semlegesíteni képes, ezáltal gátolja a lipidperoxidációt.

Nyulakon végzett vizsgálatok igazolták, hogy az E-vitaminban dús diéta csökkenti az atherosclerosis kialakulását az érfalban [Chattopadhyay és Bandyopadhyay, 2006.].

Igazolták, hogy patkány májban csökkenti az ischaemia-reperfusio okozta károsodásokat [Zeng és mtsai, 1991.].

Kutya vese-autotransplantációs modellen végzett kísérletek során Euro-Collins oldathoz kiegészítésként adva az α -tocopherol csökkentette a lipidperoxidációt és a vese károsodás mértékét [Demirbas és mtsai, 1993.].

Az E-vitamin kedvező hatását kimutatták vékonybél autotransplantációt követően is kutya modellen, az α -tocopherol mérsékelte a szabadgyökök okozta károsodásokat [Yağmurdur és mtsai, 1998., 2003.].

2.7. Az ischaemia-reperfusió károsodások haemorheológiai vonatkozásai

Az emberi vér heterogén suspensio, amely plasmaticus komponensből és alakos elemekből tevődik össze. Ezért mind a folyadékháztartásban, mind a plasma fehérjék koncentrációjában bekövetkező változások, továbbá a vörösvérsejtek mennyiségi és minőségi változásai befolyással bírnak a keringő vér áramlási tulajdonságaira. Ezek a változások a keringés szakaszaitól függően eltérő módon fejtik ki hatásukat. Az ischaemia-reperfusio szempontjából a legnagyobb jelentőséggel a mikrokeringés szintje bír, ahol az érátmérő 300 microméter alatti [Bogár, 1999.].

A vér fő rheológiai paramétere a teljes vér viszkozitás, amelyet számos tényező határoz meg: a plasma viszkozitása, a haematocrit, a vörösvérsejtek deformabilitása, a vörösvérsejtek aggregációs képessége, a keringés szintjétől függő sebesség-gradiens és a hőmérséklet. A vörösvérsejtek deformabilitása függ a sejtmembrán rigiditásától, a sejtek felület-térfogat arányától, a belső viszkozitástól, valamint sejtmorphológiai sajátosságoktól.

A vörösvérsejtek megfelelő passzív alakváltoztató képessége a keringés két szakaszán játszik kiemelten fontos szerepet. Az egyik az úgynevezett „tömeges folyás” szakasza, amin belül is az arteriális rendszer nagy sebesség-gradiensű áramlási zónáiban történik a sejtek erőhatásra történő elongációja, ami a vér viszkozitását és így a vér fluiditását csökkenti. A másik zóna, ahol a vörösvérsejtek megfelelő deformálhatósága meghatározó tényező, az a mikrokeringés szintjén belül az úgynevezett „egyenkénti folyás” szakasza. Ebben a zónában a microcapillarisok átmérője a vörösvérsejtek normális átmérőjénél kisebb is lehet (akár 3-5 microméter), ezért a sejtek csak passzív alakváltoztatás révén juthatnak túl ezeken az ereken és biztosíthatják a megfelelő szöveti perfusiót [Stuart és Nash, 1990.; Bogár, 1999.].

A mikrokeringés szintjén belül a szöveti perfusio időben és térben dinamikusan változó mintázatát a vörösvérsejtekénél nagyobb méretű fehérvérsejtek is alakítják. A fehérvérsejtek eloszlását, a mikrokeringésben lévő eloszlását az érfallal való interakciók komplex folyamatai is meghatározzák. [Bogár, 1999.].

Az ischaemia-reperfusio lokális és szisztémás történései igen összetett módon hatnak a haemorheologiai paraméterekre. Egyrészt a testet érintő általános acut fázis reakció részeként emelkedhet a fibrinogén koncentráció, ami a plasma viszkozitás megnövekedését vonja maga után. Szintén ebben az irányban hat a folyadékháztartás változása és a gyulladással járó folyamatokat kísérő érpermeabilitás fokozódás is. Az acut fázis reakciókat általában haemoconcentratio kíséri, de függően a beavatkozás vagy a gyulladással járó folyamatok mértékétől akár vörösvérsejt-szám csökkenés is mutatkozhat. A fehérvérsejt-szám emelkedése, valamint a thrombocyták szám csökkenése vagy éppen emelkedése szintén az általános reakciók kísérő jelensége lehet [Koppensteiner, 1996.; Tóth és Juricskay, 1999.].

Az ischaemia-reperfusio során nemcsak az acut fázis reakciókon keresztül jöhetnek létre haemorheologiai változások, hanem az ischaemia alatt és a reperfusio korai perceiben a lokális fizikai és metabolikus változások (pH-szint csökkenés, laktát szint emelkedés, osmolaritás változások) direkt hatással bírhatnak a vörösvérsejt microrheologiai paramétereire, mint a deformabilitásra és az aggregációs készségre [Weed és mtsai, 1969.; Baskurt és mtsai, 1998.; Kayar és mtsai, 2001.; Németh és mtsai, 2003., 2004., 2006.(a), 2006.(b); Pető és mtsai, 2005., 2007.; Szokoly és mtsai, 2005.; Furka és mtsai, 2008.].

Az ischaemia-reperfusiónak kitett szövetekben létrejövő, valamint a kísérő gyulladással járó folyamatok során aktiválódott neutrophil granulocyták működéséből származó oxigén szabadgyökök (szuperoxid anion, hidroxilgyök, hidrogén-peroxid), valamint az NO szintetáz rendszer működése során megjelenő peroxinitrit direkt membrán károsító hatása révén növeli a vörösvérsejtek rigiditását, ezáltal a deformálhatóságuk csökken [McCord, 1985.; Baskurt és mtsai, 1998.; Nanobashvili és mtsai, 2002.].

2.8. Éranastomosisok nélküli bélsegment transzplantációs modellek

Az éranastomosisokkal készített bél transzplantatio kapcsán kialakuló károsodások egyik fontos területét képviselik az előbb már említett ischaemia-reperfüziós károsodások.

A másik jelentős probléma, amely a transzplantatio kapcsán kialakulhat, a rejectio. Ez utóbbi kérdés irodalmát nem kívánom taglalni [Timmermann és mtsai, 1998.].

A korábbi kis laboratóriumi állatokon -patkány, egér- létező kísérletes transzplantációs mikrosebészeti modelleket a 3.1. fejezetben már említettem. Ezek műtéti technikája nehézséget jelenthet egy mikrosebészetben nem, vagy kevésbé jártas kutató számára.

Ezért a mikrosebészeti alapismereteket igénylő, de éranastomosis nélkül megvalósítható újabb transzplantációs modell kialakítása volt a célunk az irodalomból már ismertetett egyéb eljárások ismeretében. [Monchik és Russel, 1971.; Klos, 1977.; Grant, 1989.; Tisinai és mtsai, 1990.; Zhong és mtsai, 1991., 1993.; Squiers és mtsai, 1992.; McBride és mtsai, 1998.].

Az általunk alkalmazott modellhez az alapötletet a Mikó és Furka által kidolgozott, és immunológiai vizsgálatok számára is alkalmas egér lép-autotranszplantációs modell adta, melynek lényege, hogy a nagyceplesz rétegei közé ültetett lépszeletek angiogenesis révén újra beereződnek, és ha csökkentebb mértékben is, de funkciójukat megtartják, s így életképesek lesznek [Mikó és mtsai, 2001.(b), 2003., 2005.; Sipka és mtsai, 2005., 2006.].

Kutatási célom az volt, hogy a fenti technika alkalmazásával egy vékonybél transzplantációs mikrosebészeti egér modellt alakítsak ki, allo- és xenotranszplantációs vizsgálatokhoz, mely kellő kritika után akár adatokat is szolgáltatathat a klinikai gyakorlat számára.

3. CÉLKITŰZÉSEK

I. Keverék kutyákon végzett vizsgálatok során:

1. A mesenterialis ischaemia-reperfusio okozta károsodások vizsgálatához egy *kettős, izolált* jejunum-segment modell kidolgozása, az ellátó mesenterialis ág szelektív leszorítási lehetőségével.
2. A jejunum-segment modellen fénymikroszkópos vizsgálatok végzése, különös tekintettel a vékonybél nyálkahártyában a 30 perces ischaemia-reperfusio kapcsán kialakuló apoptosist időbeni lefolyásának vizsgálatára.
3. A jejunum-segment modellen megállapítani, milyen ischaemiás praeconditionálási időtartamok hatásosak. A praeconditionálás befolyásolja-e az ischaemia-reperfusio kapcsán kialakuló apoptosist a bélfal nyálkahártyájában?
4. Az E-vitamin és az allopurinol feltételezett védőhatásának igazolása. E célból megvizsgálni, hogy befolyásolja-e az E-vitamin és az allopurinol az ischaemia-reperfusio kapcsán kialakuló apoptosist a bélnyálkahártyában?
5. Az arteria mesenterica superior teljes leszorítását követő ischaemia-reperfusió történések kapcsán haemorheologiai mérő módszerrel a vörösvérsejt deformabilitás változások követése, időbeni lefolyásának vizsgálata a mikrokeringésben bekövetkező változások jelzésére.

II. Outbred patkányokon végzett vizsgálatok során:

6. A mesenterialis ischaemia-reperfusio kapcsán a lokális és szisztémás keringésben kialakuló egyes haemorheologiai paraméterek változásainak vizsgálata újabb mérő módszerek alkalmazásával a mikrokeringésben bekövetkező változások kimutatására.

III. Inbred egereken végzett vizsgálatok során:

7. Éranastomosis nélküli ún. „avascularis” vékonybél transplantációs modell megvalósítása mikrosebészeti módszerrel.
8. Az „avascularis” vékonybél transplantátumok életképességének vizsgálata szövettani módszerekkel.
9. A mikrosebészeti alapoktatás tematikájának továbbfejlesztése transplantációs kutatásokhoz.

4. A MESENTERIALIS ISCHAEMIA-REPERFUSIO OKOZTA KÁROSODÁSOK VIZSGÁLATA JEJUNUM-SEGMENTEKEN - I. KÍSÉRLETI MODELL

4.1 ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1.1. Kísérleti állatok, anaesthesia

Vizsgálataink az „Állatok védelméről és kíméletéről” szóló 1998. évi XXVIII. Törvény előírásainak betartásával, a Debreceni Egyetem Állatkísérleti Tudományetikai Bizottság engedélyeivel történtek (engedély számok: 56/1997/ÁTEB, 24/1998/ÁTEB, 22/1999/ÁTEB).

Kísérleteinket összesen ötvenegy, 18-24 kg testtömegű ($23,4 \pm 2,63$ kg) keverék kutyán -korra és nemre való tekintet nélkül- végeztük. Az állatokat 2 hét megfigyelés után vontuk be a kísérletekbe. Egyedi ketrecekben tartottuk őket, normál vegyes étrendet, vízhez való hozzáférést és az állat igény szerinti szabad mozgási lehetőségét biztosítottunk számukra. A 18-22°C-os helyiségekben a fényciklus napszakoknak megfelelő volt.

A kísérleti állatok altatását intramuscularisan adott Primazin (2%-os xylazinium hydrochloricum, 1 mg/ttkg) és SBH-Ketamin (10%-os ketaminum hydrochloricum, 10 mg/ttkg) kombinált narcosist alkalmazva végeztük.

Valamennyi kísérletbe bevont állaton ugyanazt az általunk kidolgozott kettős vékonybél segment modellt alakítottuk ki, majd ezen a modellen történtek a továbbiakban az ischaemia-reperfusiós károsodások kimutatását és azok kivédését szolgáló vizsgálatok.

4.1.2. Műtéti módszer a kettős, izolált jejunum-segment megvalósításához

Median laparotomiát követően a vékonybeleket előemeltük, majd két 15 cm hosszú jejunum-segmentet alakítottunk ki a hozzájuk futó érellátás biztonságos izolálásával. Ezután a bélfalat három helyen átvágtuk azért, hogy csak a mesenterialis ellátó erek biztosítsák a segment vérrellátását.

Ezt követően mindhárom átmetszés helyén end-to-end bélanastomosist készítettünk -tehát a segment közepén és két szélén- PDS [polydioxanone], 3/0 varrófonallal a gastrointestinalis traktus folytonosságának helyreállítása céljából. Ezáltal két olyan egyenlő, 15 cm hosszú jejunum-segmentet alakítottunk ki, amelynek a vérrellátását csak a mesenterialis

érágak biztosították, mert a szomszédos bélszakaszból nem kaphattak semmilyen keringést. Az egyik segmenten -a leszorítás nélküli kontroll vizsgálatokat-, a másik segmenten az erek atraumatikus leszorítását követően az ischaemia-reperfúziós vizsgálatokat kívántuk elvégezni (1. ábra).

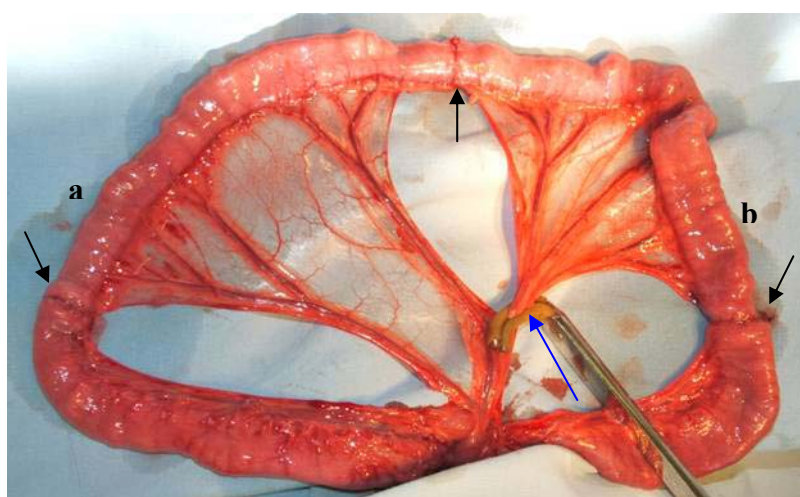


1. ábra

Kettős, izolált jejunum-segmet

- a./ az ellátó arteriális és venás mesenterialis ággal a kontroll vizsgálatokhoz,
 - b./ a preparált ellátó mesenterialis arteriális és venás ággal az ischaemia-reperfúziós vizsgálatokhoz.
- A nyilak a három anastomosis vonalára mutatnak.

Ezt követően az egyik jejunum-segmetet ellátó arteria ágat 30 percre atraumatikusan leszorítottuk a különböző, összehasonlító jellegű vizsgálatok során (2. ábra).



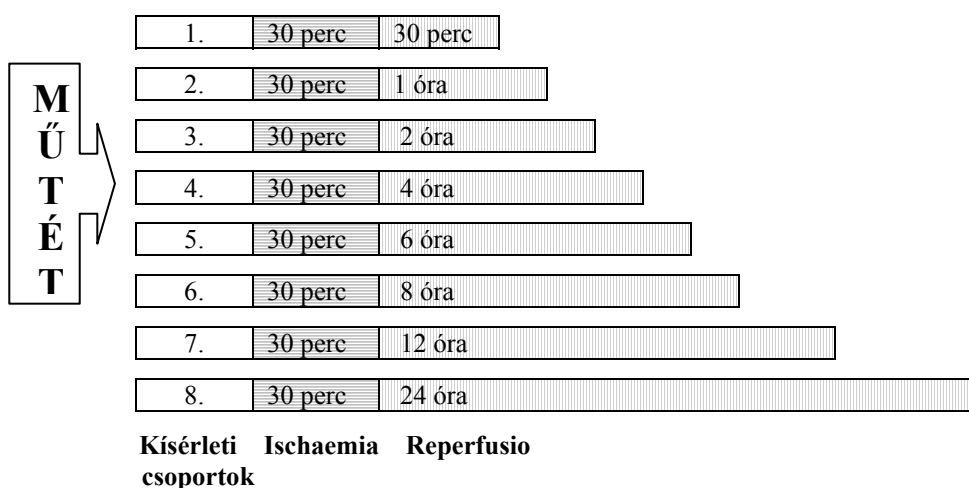
2. ábra

Kettős, izolált jejunum-segmet

- a./ ép ellátó artéria és vena mesenterialis ággal a kontroll vizsgálatokhoz,
- b./ az atraumatikusan leszorított mesenterialis artéria és vena ág (kék nyíl) az ischaemia-reperfúziós károsodások vizsgálatára. A fekete nyilak a három anastomosis vonalára mutatnak.

4.1.3. Kísérleti csoportok a reperfúziós károsodások időbeni lefolyásának meghatározására

A 24 fenti módon operált $24 \pm 2,63$ kg testsúlyú állatot nyolc, egyenként 3-3 állatot tartalmazó csoportba osztottuk. Minden csoportban az ischaemia-reperfúziós vizsgálatra alkalmazott jejunum-segmenet ellátó ereit atraumatikusan 30 percre leszorítottuk (2. ábra).



3. ábra

A kettős, izolált jejunum-segmeneten a mesenterialis erek 30 perces leszorítását követő különböző idejű reperfúziós kísérleti csoportok beosztása (n=3-3)

Majd a leszorított ér felengedését követően csoportonként különböző reperfúziós idejű vizsgálati periódus következett 30 perc, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 órás időtartammal. A reperfúziós idők letelte után szövettani mintavétel történt az *ischaemia-reperfúziós* jejunum segmentből és a leszorítás nélküli *kontroll* jejunum-segmenetből. A kísérleti protokollt a 3. ábra mutatja.

4.1.4. Kísérleti csoportok a különböző időtartamú ischaemiás praecondicionálás vizsgálatára

15 fenti módon operált állatot -átlagos testsúlyuk $22 \pm 1,38$ kg- öt kísérleti csoportra osztottunk, csoportonként 3-3 állattal.

Az *ép kontroll csoportban* a kettős, izolált jejunum-segmeneten semmiféle beavatkozás nem történt.

A *leszorított kontroll csoportban* a kettős izolált jejunum-modellen az I/R vizsgálatra alkalmazott bélszakasz ellátó ereit a műtétet követő 10 perces stabilizációs fázis letelte után

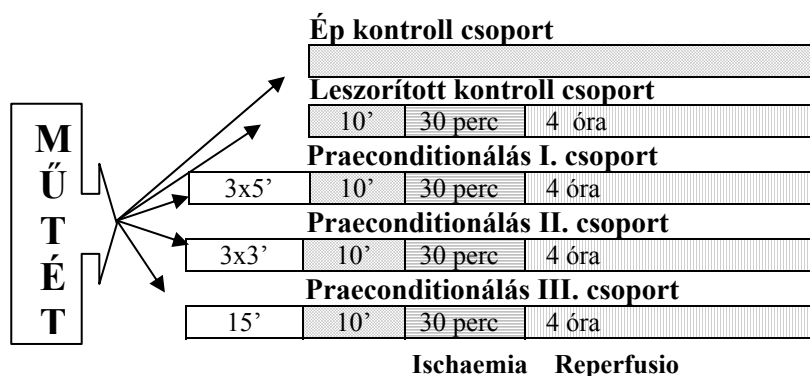
atraumatikusan 30 percre leszorítottuk, majd az ezt követő 4 órás reperfuziót követően szövettani mintavétel történt mind a leszorított, mind a leszorítatlan ép bélszakaszból.

A *praeconditionálás I. csoportban* a vizsgált bélszakaszt ellátó ereket 3x5 percen keresztül praeconditionáltuk (5 perces ischaemiás időszakok között 1 perces reperfuziós időtartamok), ezt követte a 10 perces felengedés-stabilizáció fázisa. Ezután következett a 30 perces leszorítás, és 4 órás reperfusio alkalmazása.

A *praeconditionálás II. csoportban* a vizsgált bélszakaszt ellátó ereket 3x3 percen keresztül praeconditionáltuk (3 perces ischaemiás időszakok között 1 perces reperfuziós időtartamok), ezt követte a 10 perces felengedés-stabilizáció fázisa. Az előző csoporthoz hasonlóan a 30 perces leszorítást 4 órás reperfusio követte.

A *praeconditionálás III. csoportban* a vizsgált bélszakaszt ellátó ereket 15 percen keresztül praeconditionáltuk (15 perces ischaemiás időszakasz reperfuziós időtartam nélkül), ezt követte a 10 perces felengedés-stabilizáció fázisa. Az előző csoportokhoz hasonlóan a 30 perces leszorítást 4 órás reperfusio követte.

A kísérleti protokollt a 4. ábra foglalja össze.



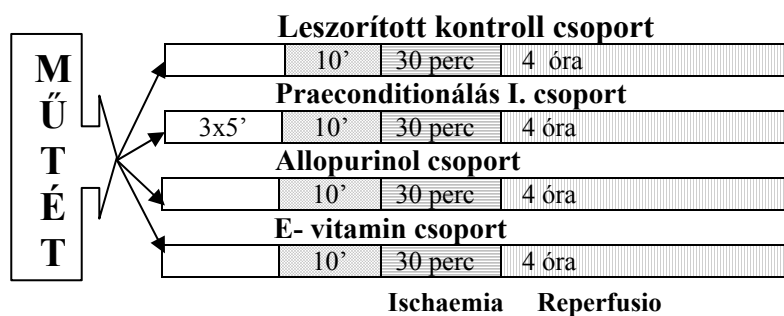
4. ábra

Kísérleti csoportbeosztás (n=3-3) a kettős, izolált jejunum-segmeneten a különböző időtartamú ischaemiás praeconditionálás hatásának vizsgálatára.

A beavatkozások befejezésekként szövettani mintavétel történt, mind a praeconditionált csoportokból, mind a leszorítás nélküli, ép kontrollként szolgáló jejunum-segmenetekből.

4.1.5. Kísérleti csoportok a praeconditionálás, valamint az allopurinol és az E-vitamin előkezelés vizsgálatára

12 kísérleti állatot -átlagos testsúly $23 \pm 1,26$ kg- 4 csoportra osztottunk csoportonként 3-3 állattal. A kísérleti csoportokban a korábban leírt kettős, izolált jejunum-segmenetet alakítottuk ki, s az 5. ábrán látható beosztásban és időrend szerint végeztük kísérleteinket.



5. ábra

Kísérleti csoportbeosztás (n=3-3) a kettős, izolált jejunum-segmeneten a praeconditionálás, valamint az allopurinol és az E-vitamin előkezelés vizsgálatára

A *leszorított kontroll csoport*ban a vizsgált bélszakaszt ellátó ereket a műtétet követő stabilizációs fázis letelte után atraumatikusan 30 percre leszorítottuk, majd 4 órás reperfusio következett.

A *praeconditionálás I. csoport*ban a vizsgált bélszakaszt ellátó ereket 3x5 percen keresztül praeconditionáltuk (5 perces ischaemiás időszakok között 1 perces reperfusiók időtartamok), ezt követte a 10 perces felengedés-stabilizáció fázisa. Ezután következett a 30 perces leszorítás, és 4 órás reperfusio alkalmazása.

Az *allopurinol csoport*ban 50 mg/ttkg allopurinolt juttattunk az előzőleg kipreparált vena jugularis externába a műtét kezdete előtt, és csak ezt követte a hasi feltárás és a kettős jejunum-segmenet kialakítása a korábban leírt műtéti módszer szerint.

Az *E-vitamin csoport*ban 25 mg/ttkg E-vitamint adtunk intramuscularisan a műtét kezdete előtt, s ezt követte a jejunum-segmenet kialakítása, a mesenterialis ellátó erek 30 perces leszorítása és a 4 órás reperfusio.

A műtét befejezése szövettani mintavétel volt, mind a leszorított, mind a leszorítás nélküli kontroll jejunum-segmenetekből.

4.1.6. Morphologiai vizsgáló módszerek

4.1.6.1. Makroszkópos vizsgálatok

A vizsgálati időtartam leteltével a szövettani mintavételt megelőzően a kísérleti állatok hasüregét áttekintettük, az anastomosisokat megvizsgáltuk. Ezt követően a **vékonybél** lumenét megnyitottuk, tartalmát megtekintettük, majd a mikroszkópos vizsgálatokra teljes keresztmetszetet biztosító szövetmintákat vettünk ki mind a praeconditionált csoportokból, mind a leszorított, mind a leszorítás nélküli, ép kontrollként szolgáló jejunum-segmenetekből.

4.1.6.2. Mikroszkópos vizsgálatok

A jejunum-segmenetek készítése során, az anastomosisok elkezdése előtt mindig történt szövettani mintavétel a bélfalból az összehasonlító vizsgálatok számára.

4.1.6.2.1. Hagyományos szövettani vizsgálatok

A szövettani mintákat 7%-os pufferolt formalin oldatban fixáltuk, majd paraffin beágyazást végeztünk. Ezután az 5µ vastagságú metszeteket haematoxylin-eosinnal festettük.

4.1.6.2.2. Immunhisztokémiai vizsgálat apoptózis kimutatására

Az apoptózis kimutatását immunhisztokémiai módszerrel, Apoptag Kit (in situ apoptosis detection kit, Oncor, Biomarker Ltd.) segítségével végeztük. Az apoptosissal elhaló sejtek TUNEL technikával váltak láthatóvá. A vizsgálatot a gyártó leírása szerint végeztük. Apoptosis során a sejtmagban aktiválódó endonukleázok a DNS állomány feltördelésével okozhatják az egyik szál törését (nick). A DNS molekula 3'OH végének digoxigeninnel jelölt nukleotidokkal történő megjelölését jelenti a TdT-mediated X-dUTP nick end labeling (TUNEL) technika.

4.1.6.2.3. Az apoptotikus sejtek számolása a reperfüziós károsodások időbeni lefolyásának meghatározására

A kísérlet első szakaszában, amikor az optimális reperfüziós időtartamot határoztuk meg, a csoportok közötti összehasonlítást -tekintettel a nagymennyiségű szövettani metszetre- egyszerű módszertan alapján végeztük. Negyvenszeres nagyításnál ocular micrometer alatt

10-10 látótérben megszámláltuk a TUNEL pozitív sejteket. A statisztikai analízist SPSS 10.0 software alkalmazásával, egyirányú ANOVA on ranks (Dunn's method) teszt segítségével végeztük ($p < 0.05$).

4.1.6.2.4. Apoptotikus index számítása a különböző időtartamú ischaemiás preconditionálás, valamint az allopurinol és az E-vitamin előkezelés vizsgálatára

A pontosabb összehasonlítás érdekében apoptotikus indexet számoltunk: a pozitívan festődő sejtmagok számát elosztottuk a bélbolyhok számával. Metszetenként 50 bélbolyh vizsgálata történt. A statisztikai analízist SPSS 10.0 software alkalmazásával Student-féle t-teszt segítségével végeztük ($p < 0.05$).

4.2. EREDMÉNYEK

4.2.1. Makroszkópos vizsgálatok eredményei

Valamennyi kísérletbe bevont állat túlélte a műtétet, a hasüregben kórosat nem találtunk, az anastomosisok tartottak, varratelégtelenséget nem észleltünk.

A mintavétel során, amikor megnyitottuk a bélfalat, fehér színű, nyálkás, a nyálkahártyához szorosan hozzátapadó kis mennyiségű, törmelékes bevonatot, lepedéket találtunk a vékonybél lumenekben a reperfúziót követő 30. percben, valamint az 1. és 2. órájában vett mintákban. Hasonlóan kis mennyiségű lepedéket találtunk a reperfúzió 12. és 24. órájában vett mintákban is.

Viszont a reperfúzió 4., 6. és 8. órájában a mintavétel során a nyálkahártya felszínén, ahhoz szorosan hozzátapadó *nagy mennyiségű fehér lepedéket*, sejtörmeléket találtunk, ami úgy nézett ki, mintha a teljes nyálkahártya levált volna a felszínről. Ezt a réteget nem távolítottuk el.

4.2.2. Mikroszkópos vizsgálatok eredményei

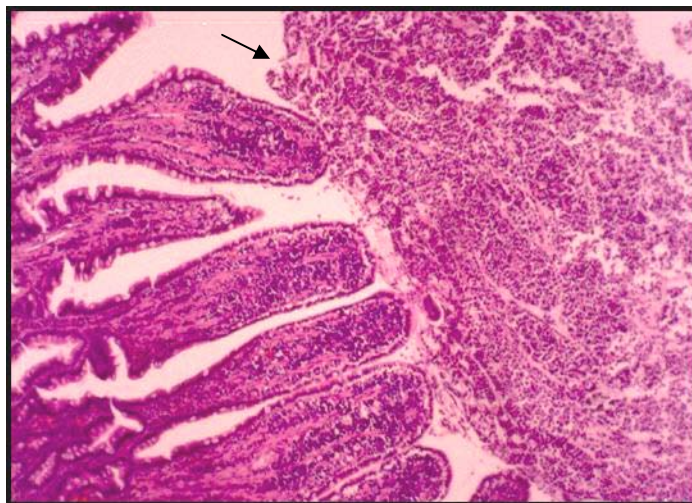
4.2.2.1. Hagyományos szövettani vizsgálatok eredményei a reperfúziós károsodások időbeni lefolyásának meghatározására

A haematoxylin-eosinnal festett metszetekben a bélnyálkahártya felszínén minimális sejtörmeléket találtunk a reperfúziót követő 30. percben, az 1. és a 2. óras mintákban.

A metszetek nagy részében a villusok csúcsi területén subepithelialis tér volt látható, komolyabb nyálkahártya károsodás nélkül. Számos lobsejtet, főként lymphocytákat találtunk a bélbolyhok felső zónájában. A bélfal szerkezete megtartott volt.

A *reperfusio* 4. és 6. órájában vett minták ép nyálkahártyát mutattak, de számos területen a villusok csúcsi részén subepithelialis tér (Gruenhagen-féle tér) alakult ki, nyálkahártya elemelkedéssel a bélbolyhok csúcsi részén. Lobos nyálkahártya és tunica propria volt látható, főként lymphocytákat találtunk. A bélfal mélyebb rétegeinek szerkezete megtartott volt, károsodást nem találtunk (6. ábra).

A *reperfusio* 8., 12. és 24. órájában a bélfal mélyebb rétegei nem mutattak károsodást. A kontroll mintákban normál nyálkahártya szerkezetet láthattunk. Eltérést, gyulladásos válasz sejtjes elemeit nem találtunk.



6. ábra

A bélnyálkahártya képe a *reperfusio* 6. órájában vett mintában
A nyíl a nyálkahártya felszínén lévő nagy mennyiségű sejtörmelékre mutat.
(HE festés, N: 100X)

4.2.2.2. Az immunhisztokémiai vizsgálat eredményei a reperfúziós károsodások időbeni lefolyásának meghatározására

Az ép kontroll mintákban $0,7 \pm 0,57$ volt az apoptotikus sejtek száma látóterenként 40x-es nagyítás mellett. Az apoptotikus aktivitás már a *30 perc reperfúziós idő* letelte után

emelkedett értéket mutatott: $2,96 \pm 0,61$ apoptotikus sejt látóterenként 40x-es nagyítás mellett. A TUNEL pozitív sejtek mind a nyálkahártya basalis részében, mind a bélbolyhok csúcsi részén is kimutathatóak voltak. Ezekben a metszetekben is láthatóak voltak lobsejtek, főként lymphocyták, mint a haematoxylin-eosinos metszetekben is.

A reperfusio *1. órájának* végén vett mintákban már több apoptotikus sejt számoltunk, melyek a basalis és apicalis részen is megtalálhatóak voltak. Dominánsan interstitialis sejtek, de hámsejtek is érintettek voltak az apoptosis folyamatában. A számszerű értékelés alapján $3 \pm 0,74$ apoptotikus sejt volt látóterenként 40x-es nagyítás mellett, mely szinte megegyezik az előző csoport értékeivel (I. táblázat).

A reperfusio *2. órájában* vett mintákban $6 \pm 1,17$ apoptotikus sejt volt látható látóterenként 40x-es nagyítás mellett. A bélfali mintákban is megfigyelhető volt lobsejtes infiltratio a bélbolyhok csúcsi zónájában, melyek dominánsan lymphocyták voltak.

A reperfusio *4. órájában* vett mintákban a bél lument vastagon lepedék fedte, mely számos TUNEL pozitív sejtet tartalmazott. Ezeket a lepedékben található sejteket nem számoltuk, mert ugyan a DNS károsodást kimutattuk bennük, de ezt necrosis folyamata is eredményezhette. Az apoptotikus sejtek száma látóterenként $14,2 \pm 1,31$ volt 40x-es nagyításnál. TUNEL pozitív sejteket legnagyobb számban a bélbolyhok csúcsán mutattunk ki, de jelen voltak a boholy basalis régiójában is, a basalisán elhelyezkedő cryptákban is sikerült apoptotikus sejteket detektálni, sőt a bélfal mélyebb rétegeiben is. Lobsejtek az előzőekben leírtakhoz hasonlóan itt is kimutathatóak voltak.

A reperfusio *6. órájában* vett mintákban detektáltunk legnagyobb számban apoptotikus sejteket, $16,3 \pm 1,05$ TUNEL pozitív sejt látóterenként. A 4. órás reperfusio mintáihoz hasonló volt a szövettani metszetek képe.

A reperfusio *8. órájában* vett mintákban lényegesen csökkent az apoptotikus aktivitás. Az apoptotikus sejtek száma *4* volt látóterenként. Intenzív lobsejtes beszűrődés volt látható a tunica propriában. Az apoptotikus sejtek basalisán és apicalisan is kimutathatóak voltak.

A 12 és 24 órás reperfúziós mintákban gyakorlatilag nem tudunk kimutatni apoptotikus sejteket, hasonlóan a kontroll mintához. Az apoptotikus sejtek száma látóterenként 1 volt 40x-es nagyításnál.

A kontroll mintában egészséges nyálkahártya szerkezetet láthattunk, eltérést a vékonybél fal mélyebb rétegeiben sem találtunk. A gyulladásos válasz sejtes elemei nem voltak kimutathatóak. Az apoptotikus aktivitás alacson szinten volt, 1-2 apoptotikus sejtet találtunk látóterenként. Viszont az apoptotikus sejtek csak a hám basalis részén helyezkedtek el.

Az apoptotikus aktivitás a vizsgált mintákban fokozatosan emelkedett, a maximumát a 4 és 6 órás reperfúziós idő letelte után láttuk. Ezt követően a TUNEL pozitív apoptotikus sejtek száma nagy mértékben csökkent a reperfúziót követő 12., 24. órában. Számuk megfelel az épp kontroll mintákban látható számoknak.

Az ismertetett eredményeket az I. táblázatban foglaltuk össze.

I. táblázat: Az apoptotikus aktivitás vizsgálatának eredményei a reperfúziós károsodások időbeni lefolyásának kimutatására

Reperfúziós mintavételek ideje	TUNEL pozitív apoptotikus sejtek száma	Apoptotikus sejtek elhelyezkedése
Ép kontroll	0,7±0,57	a bélbolyhok basalis és apicalis régiójában
30 perc	2,96±0,61*	a bélbolyhok basalis és apicalis régiójában
1 óra	3±0,74*	a bélbolyhok basalis és apicalis régiójában
2 óra	6±1,17*	a bélbolyhok apicalis régiójában
4 óra	14,2±1,31*	a bélbolyhok csúcsán, a basalis régióban, a basalisán elhelyezkedő cryptákban
6 óra	16±1,05*	a bélbolyhok csúcsán, a basalis régióban, a basalisán elhelyezkedő cryptákban
8 óra	3,83±0,79*	a bélbolyhok basalis és apicalis régiójában
12 óra	0,8±0,61	a bélbolyhok basalis és apicalis régiójában
24 óra	0,83±0,59	a bélbolyhok basalis és apicalis régiójában

*p<0,05 vs Ép kontroll, one way ANOVA on ranks (Dunn's method)

4.2.2.3. Hagyományos szövettani vizsgálat eredményei a különböző időtartamú ischaemiás praconditionálás, az allopurinol és az E-vitamin előkezelés kapcsán

Az előző vizsgálatok eredményeként ebben a kísérletsorozatban a műtétet követő stabilizációs fázis letelte után 30 perc ischaemia, majd 4 óra reperfusio következett a kontroll csoportban. A másik négy csoportban is, a különböző időtartamú praconditionálást, az allopurinol és az E-vitamin előkezelést követően ez volt a kísérleti protokoll.

A *haematoxylin-eosinnal festett* metszetekben minden csoportban közel *hasonló eredményt* kaptunk, gyakorlatilag nem volt különbség.

Mind a 3x5, 3x3 és az 1x15 perces praconditionálás-, illetve az allopurinol és az E-vitamin kezelés vizsgálati csoportjaiban vett mintákban a bél lumenben vastag sejttörmelék figyelhető meg a mucosa felszínén. Lobos nyálkahártya és tunica propria volt látható főként lymphocytákkal. Gyakran látszott kiterjedt subepithelialis tér nyálkahártya elemelkedéssel a bélbolyhok apicalis részén is. A bélfal mélyebb rétegeinek szerkezete megtartott volt, károsodást nem találtunk.

4.2.2.4. Immunhisztokémiai vizsgálat eredménye a különböző időtartamú praconditionálások kapcsán

A *Leszorított kontroll* csoportban az apoptotikus index értéke $2,76 \pm 1,19$ volt (II. táblázat). A mintavétel során a nyálkahártya felszínén lévő törmelék ebben a csoportban volt a legkevesebb. Az apoptotikus sejtek a mucosában helyezkedtek el leggyakrabban (7. ábra), de a mélyebb rétegekben is találtunk TUNEL pozitív sejteket.



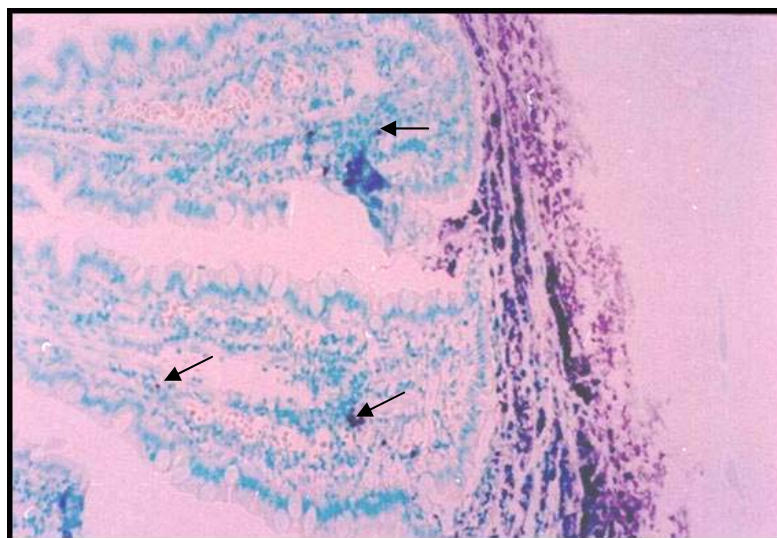
7. ábra

A TUNEL pozitív sejtek elhelyezkedése a bélnyálkahártyában.
Leszorított kontroll csoport (K): 30 perc ischaemia, 4 óra reperfusio.

A nyíl egy TUNEL pozitív sejtre mutat.

(Apoptag Kit, N: 100X)

A 3x5 perces *praeconditionálás* alkalmazása során az apoptotikus index értéke $6,75 \pm 1,2$ volt (II. táblázat). A *Leszorított kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikánsan emelkedett* ($p=0,014$) az apoptotikus sejtek száma. A nyálkahártyában találtuk a legnagyobb számban ezeket a sejteket (8. ábra).



8. ábra

A TUNEL pozitív sejtek elhelyezkedése a bélnyálkahártyában.

Praeconditionálás I. csoport (3x5 perc):

3x5 perces ischaemiás *praeconditionálás*, 30 perc ischaemia, 4 óra reperfusio.

A nyilak TUNEL pozitív sejtekre mutatnak.

(Apoptag Kit, N: 100X)

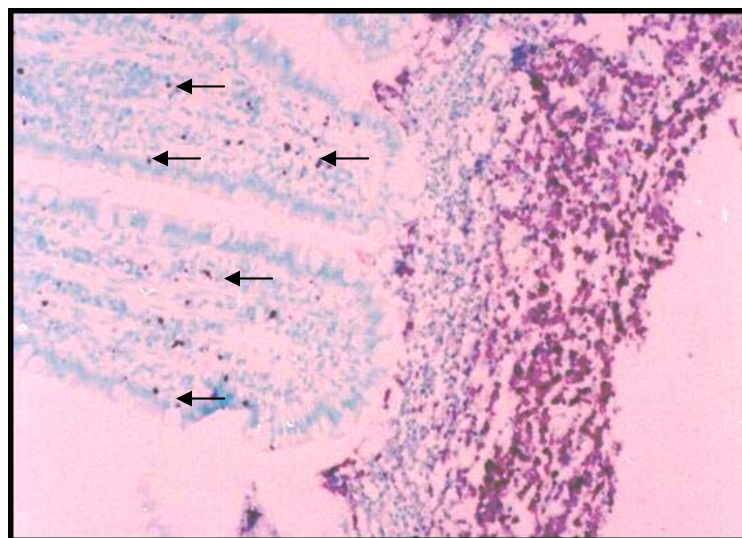
A 3x3 perces és 1x15 perces praeconditionálás alkalmazása kapcsán nem volt eltérés a Leszorított kontroll csoporthoz viszonyítva. Hasonló szövettani képet kaptunk mint a kontroll csoportban, az apoptotikus index értéke a 3x3 perces praeconditionálás alkalmazása során $3,85 \pm 1,2$; míg az 1x15 perces praeconditionálás kapcsán $2,81 \pm 1,3$ volt (II. táblázat).

4.2.2.5. Az immunhisztokémiai vizsgálat eredménye a praeconditionált, az allopurinol és az E- vitamin előkezelés kapcsán

A különböző ischaemiás praeconditionálási módszerek közül a 3x5 percest választottuk ki az ischaemia-reperfusio kapcsán már jól ismert védőhatású szerrel való összehasonlításához.

A Leszorított kontroll csoport és a 3x5 perces praeconditionálás eredményei megegyeznek az előző fejezetben leírtakkal, ezért azt nem ismételjük.

Az allopurinol (50 mg/ttkg) előkezelt csoportnál az apoptotikus index értéke $11,2 \pm 3,1$ volt (II. táblázat). A bél nyálkahártya felszínén a sejttörmelék nagyobb mennyiségben volt látható (9. ábra). A Leszorított kontroll csoporthoz és a praeconditionált csoporthoz viszonyítva is szignifikáns emelkedést ($p=0,005$) kaptunk a nyálkahártya apoptotikus index értékeiben.



9. ábra

A TUNEL pozitív sejtek elhelyezkedése a bélnyálkahártyában.

Allopurinollal előkezelt csoport:

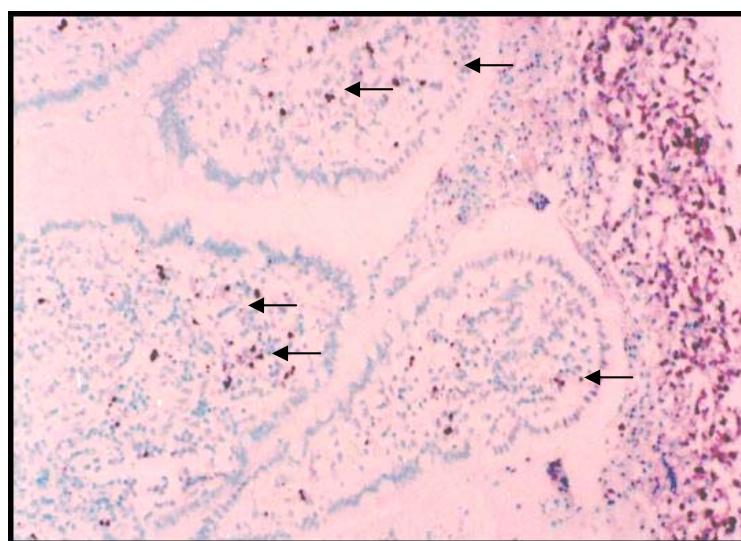
allopurinol 50 mg/ttkg előkezelés, 30 perc ischaemia, 4 óra reperfusio.

Az apoptotikus index értéke $11,2 \pm 3,1$ látóterenként.

A nyilak TUNEL pozitív sejtekre mutatnak.

(Apoptag Kit, N: 100X)

Az E-vitamin előkezelés alkalmazása után volt a legmagasabb az apoptotikus index értéke $12,2\pm 3,25$ (II. táblázat), amely mind a Leszorított kontroll ($p=0,002$), mind a Praeconditionálás I. ($p < 0,05$) csoporthoz viszonyítva is szignifikáns volt. Apoptotikus sejteket találtunk a bélbolyhok apicalis és basalis területein is. A nyálkahártyán belül TUNEL pozitivitást epithelialis és lobsejtek sejtek egyaránt mutattak. A lument vastagon bevonta a sejtörmelék (10. ábra).



10. ábra

A TUNEL pozitív sejtek elhelyezkedése a bélnyálkahártyában.

E-vitaminnal előkezelte csoport:

E-vitamin 25 mg/ttkg előkezelés, 30 perc ischaemia, 4 óra reperfusio.

Az apoptotikus index értéke $12,2\pm 3,25$ látóterenként.

A nyilak TUNEL pozitív sejtekre mutatnak.

(Apoptag Kit, N: 100X)

II. táblázat: Az apoptotikus index értékei a különböző időtartamú ischaemiás praconditionálás, az allopurinol és az E-vitamin előkezelés kapcsán

Kísérleti csoportok	Leszorított kontroll csoport	Praeconditionálás I. csoport (3x5 perces)	Praeconditionálás II. csoport (3x3 perces)	Praeconditionálás III. csoport (1x15 perces)	Allopurinol előkezelte csoport	E-vitamin előkezelte csoport
Apoptotikus index: TUNEL pozitív sejtmagok / 50 bélbolygra számolva	$2,76\pm 1,19$	$6,75\pm 1,2^*$	$3,85\pm 1,25$	$2,81\pm 1,3$	$11,2\pm 3,1^{# \wedge}$	$12,2\pm 3,25^{+ \wedge}$

* $p=0,014$, # $p=0,005$, + $p=0,002$ vs Leszorított kontroll; $\wedge p < 0,05$ vs Praeconditionálás I. csoport, Student-féle t-teszt

4.3. MEGBESZÉLÉS

A vékonybelet különleges tulajdonságai egyedülállóvá teszik a transzplantált szervek között. Kiemelkedő jelentőségű a bél rendkívüli érzékenysége az ischaemia-reperfúziós folyamatokra [Grant, 1989.; Grant és mtsai, 1990.; Deltz, 1991.; Todo és mtsai, 1992.; Bruin és mtsai, 1994.; Grant, 1996.; Perner, 2002.; Chang és Stein, 2003.; Middleton és Jamieson, 2005.]. Egyike azon szerveknek, amelyek nagyon érzékenyen reagálnak a vérellátás megszűnésére. Az ischaemia okozta morfológiai változások, sérülések karakterisztikusan a bélfal villusaiban kezdődnek és a crypták felé terjednek tovább [Chiu és mtsai, 1970.; Shah és mtsai, 1997.(a), 1997.(b); Coopersmith és mtsai, 1999.; Quaedackers és mtsai, 2000.].

Az ischaemia-reperfúzió kapcsán fellépő károsodások több tényezőre vezethetők vissza: reaktív oxigén intermedierek, leukocita adhesiók molekulák, nitrogén oxid, de a folyamatban szerepet játszó összes faktor még ma sem ismert [Parks és Granger, 1986(a); Parks és Granger, 1986.(b); Parks és mtsai, 1988.; Schoenberg és Berger, 1990., 1993.; Buttke és Sandstrom, 1994.; Haglund, 1994.; Bradbury és mtsai, 1995.; Haglund és Bergqvist, 1999.].

Az ischaemia-reperfúzió során a szabadgyökök legfontosabb forrását az aktivált neutrophil granulocyták mellett a xantin oxidáz/dehidrogenáz rendszer működése jelenti. A szövetek közül a bél tartalmaz legnagyobb mennyiségben xantin-dehidrogenáz enzimet, amely az ischaemia hatására a xantin oxidázzá alakul. Ez a folyamat leggyorsabban a bélben megy végbe, akár 1 perc alatt a xantin-dehidrogenáz teljes mennyisége átalakul oxidáz formává [Parks és mtsai, 1982.; Parks és Granger, 1986.; Parks és mtsai, 1988.]. Anoxia során a sejtben az ATP defoszforilálódik, az AMP koncentrációja fokozódik. Így a hypoxiás sejtben mind a xantin-oxidáz, mind annak egyik szubsztrátja jelen van. Reperfúzió-reoxigenizáció során a másik szubsztrát, a molekuláris oxigén is megjelenik és a xantin-oxidáz a molekuláris oxigént szuperoxid gyökké és hidrogénperoxiddá redukálja [Granger és mtsai, 1980.; Parks és Granger,

1986.(b); Parks és mtsai, 1988.; Schoenberg és Berger, 1990., 1993.; Buttke és Sandstrom, 1994.; Haglund, 1994.; Bradbury és mtsai, 1995.; Haglund és Bergqvist, 1999.].

Granger szerint a vékonybélben a legnagyobb xantin-oxidáz enzimaktivitás a villusok apicalis részében mutatható ki, ezért a szabagyökök okozta károsodások intenzívebbek ezen a területen [Granger és mtsai, 1980., 1981., 1986.(b); Granger és Korthuis, 1995.]. Mindez magyarázhatja hogy, miért találtunk olyan intenzív károsodást a nyálkahártyában, és miért ilyen nagy az apoptotikus sejtek száma a reperfusio 4. és 6. órájában.

Egyértelmű irodalmi adatok nem álltak rendelkezésre a mesenterialis ischaemiát követően kialakuló *apoptosis időben lefolyására*, ezért vizsgáltuk ezt munkánk során.

Az apoptosis aktív fehérjeszintézist igénylő folyamat, melynek végbemeneteléhez idő szükséges, ez lehet a magyarázata, miért volt alacsony az apoptotikus sejtek száma a reperfúziót követő 30. percben, és 1., valamint 2. órájában vett mintákban.

A reperfusio 4. és 6. óráiban vett mintákból készült metszeteken volt a legmagasabb az apoptotikus sejtek száma, vagyis modellünkben a 30 perces ischaemia, 4, 6 óra reperfusio a *legalkalmasabb idő periódus az apoptosis folyamatának vizsgálatára*.

Az apoptotikus sejtek száma alacsony volt a reperfusio 8., 12., 24. órájában vett mintákban, tehát a folyamat már lecsengett, további vizsgálatok számára nem alkalmasak ezek a reperfúziós időtartamok.

Az irodalom nem egységes a különböző időtartamú *praeconditionálási módszerek* alkalmazása kapcsán sem. A kutyák esetén az 5 perces praeconditionálási időtartam hatékonynak tűnt coronaria arteria leszorítások során. Murry kutyák esetén egyformán hatásosnak találta az 5 perces praeconditionálási periódusokat, valamint a 15 percig tartó praeconditionálással is jó eredményeket ért el. Ez a kedvező védőhatás 60 percig maradt meg, és 120 perc után teljesen megszűnt [Murry és mtsai, 1986., 1991.]. Yellon leírja, hogy különböző állatfajoknál más molekuláris mechanizmus érvényesülhet az *ischaemiás praeconditionálás* során.

A patkány, a nyúl, a kutya és a sertés szívizom praeconditionálása során eltéréseket találtak [Yellon és mtsai, 1998.].

Kísérleteinkben a fenti tények ismeretében is vizsgáltuk a különböző praeconditionálási protokollok hatékonyságát és az apoptosusra kifejtett hatását. Eredményeink azt mutatják, hogy praeconditionálás hatására növekszik az apoptotikus sejtek száma a bélfalban. Különösen a 3x5 perces módszer növelte szignifikánsan a TUNEL pozitív sejtek számát a kontroll csoporthoz viszonyítva. A 3x3 perces módszer szintén emelte az apoptotikus sejtek számát, míg az 1x15 perces praeconditionálás nem okozott változást az apoptosiban kísérleti modellünkben.

Előzetes feltételezésünk az volt, hogy a praeconditionálás csökkenteni fogja az ischaemia-reperfusio kapcsán kialakuló apoptos mértékét, mivel az ischaemiás praeconditionálás védelmet biztosít az ischaemia-reperfusio kapcsán kialakuló károsodásokkal szemben. Eredményeink azonban ezzel ellentétesek. Magyarázat az lehet, hogy keverék kutya modellünkben az alkalmazott praeconditionálási módszerek a 30 perc ischaemia 4 óra reperfusio kapcsán kialakuló károsodásokat nem tudják kivédeni.

Feltételezhetően a praeconditionált sejtek magasabb intracelluláris energia szintje tette számukra lehetővé az apoptotikus sejthalált.

Ferencz és munkatársai keverék kutyában 4x5 perces ischaemiás praeconditionálást alkalmazva hasonló eredményre jutottak [Ferencz és mtsai, 2002.]. TUNEL technikát alkalmazva DNS károsodást mutattak ki. A praeconditionált csoportban emelkedett értékeket találtak a kontrollhoz viszonyítva. Az NF- κ B-nek kulcsfontosságú szerepet tulajdonítottak a jelátviteli folyamatokban és az ischaemia-reperfusio kivédésére alkalmazott praeconditionálás mechanizmusában is, a jól ismert xantin-oxidáz, neutrophil granulocyták aktivációja mellett.

Az *allopurinol előkezelés* alkalmazása során is feltételezésünkkel ellentétes eredményt kaptunk -hasonlóan a praeconditionálásnál tapasztaltakhoz-, azaz nem csökkent, hanem

emelkedett az apoptotikus sejtek száma a bél nyálkahártyában. Mindez azt sugallhatja, hogy kialakulásában több faktor is szerepet játszhat.

Az ischaemia-reperfusio során fellépő oxidatív stressz csökkenthető az allopurinol előkezeléssel, amely hozzájárul a reaktív oxigéngyökök szintjének mérséklése által a sejtek túléléséhez. Mérséklődhet a sejteket érő intracellularis kalcium akkumuláció, az ATP felhasználás. A túlélő sejtek számának növekedése mellett elősegítheti az apoptotikus sejthalált a necrosissal szemben. Shah [Shah és mtsai, 1997.(a), 1997.(b)] igazolta, hogy az ischaemia-reperfusio apoptosist okoz a bélben, de azt is leírta, hogy ischemia-reperfusio után a bélfalban apoptosis és necrosis egyaránt kialakulhat. Modelljében bél transplantációt végzett patkányokon, és 24 órán keresztül 4°C-os fizioológias sóoldatban, illetve módosított University of Wisconsin oldatban -amely allopurinolt is tartalmaz- tárolta a bél graftokat. Modelljében az apoptosist tartja az elsődleges sejthalál formának szemben a necrosissal [Shah és mtsai, 1997.(a)].

Nicotera az ATP szintet tartja meghatározónak arra vonatkozóan, hogy a sejtek apoptosissal, vagy necrosissal pusztulnak el. Ha az intracellularis ATP szint alacsony, az apoptosist kiváltó stimulus necrosist okozhat. Az intracelluláris energia szint befolyásolja, hogy a két sejthalál típus közül melyik következik be [Nicotera és mtsai, 1998.].

McKonkey az alábbiak szerint határozza meg az apoptosis/necrosis bekövetkeztének feltételeit. *Apoptosis*: ATP hiány 25-50%, a Ca^{++} szint növekedés 200-400 nM, közepes mennyiségű szabadgyök képződés, a caspase-rendszer aktivációja szükséges a folyamathoz. *Necrosis*: ATP hiány 70-100%, a Ca^{++} szint növekedés $>1\mu M$, nagy mennyiségű szabadgyök képződés, Bcl-2 gátlás, a caspase-rendszer aktivációja nem szükséges a folyamathoz [McKonkey, 1998.].

Sheu szerint az *E-vitamin* gátolja az NF- κ B az aktivációját [Sheu és mtsai, 1999.]. Az NF- κ B részvételét számos folyamatban igazolták, például az ischaemia-reperfusio folyamataiban [Li és mtsai, 1990.; Nichols, 2004.], az apoptosisban, és az intestinalis

reperfusio folyamataiban, a szisztémás gyulladós válaszban is [Nichols, 2004.]. Nichols mesenterialis ischaemia kapcsán megállapította egér kísérletek során, hogy ha gátoljuk az NF- κ B aktivációját, akkor reperfúziót követően az apoptózis mértéke növekszik a nyálkahártyában.

A modellünkben talált eredmények is magyarázatot adhatnak az irodalomban leírt feltételezésre, mely szerint az E-vitamin az NF- κ B aktivációját gátolva fokozhatja az apoptosist a bél nyálkahártyájában az ischaemia-reperfusio kapcsán kialakuló sérülésekben [Ferencz és mtsai, 2002.].

Összegezve kísérletei eredményeinket elmondható, hogy amennyiben az ischaemiás inzultus enyhébb, vagy bizonyos védőfaktorok (pl. praeconditionálás, allopurinol, E-vitamin) vannak jelen, az ischaemiás sejthalál formája nagyobb mértékben apoptosissal történik. Gyulladás és szövetkárosodás kisebb mértékben jön létre a szövetekben, kedvezőbb feltételeket biztosítva a szövetregeneráció számára.

5. MESENTERIÁLIS ISCHAEMIA-REPERFUSIO OKOZTA HAEMORHEOLOGIAI ÉS HAEMATOLOGIAI VÁLTOZÁSOK VIZSGÁLATA AZ ARTERIA MESENTERICA SUPERIOR LESZORÍTÁSÁT KÖVETŐEN - II. KÍSÉRLETI MODELL

Ismereteink szerint a mesenterialis ischaemia-reperfúziós károsodások és a vörösvérsejt deformabilitás változások vonatkozásában kevés irodalmi adat áll rendelkezésre, ezért céljaink között szerepelt ennek a kérdéskörnek a vizsgálata is.

5.1. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1.1. Kísérleti állatok, anaesthesia

Vizsgálatainkat az „Állatok védelméről és kíméletéről” szóló 1998. évi XXVIII. Törvény előírásainak betartásával, a Debreceni Egyetem Állatkísérleti Tudományetikai Bizottság engedélyével végeztük (engedély szám: 22/1999/ÁTEB).

Kísérleteinket tíz, 22-25 kg testtömegű ($23,4 \pm 2,63$ kg) keverék kutyán -korra és nemre való tekintet nélkül- végeztük. Az állatokat a 4.1.1. fejezetben leírtak szerint tartottuk.

A kísérleti állatok altatását intramuscularisan adott Primazin (2%-os xylazinum hydrochloricum, 1 mg/ttkg) és SBH-Ketamin (10%-os ketaminum hydrochloricum, 10 mg/ttkg) kombinált narcosist alkalmazva végeztük.

5.1.2. Műtéti módszer, kísérleti csoportok

1. *Ischaemia-Reperfusio [I/R] csoport* (n=5): medián laparotomiát követően kipreparáltuk az arteria mesenterica superior, 30 percre leszorítottuk, majd a hasfalat 3 rétegben zártuk.

2. *Áloperált Kontroll [ÁL] csoport* (n=5): median laparotomiát követően csak 3 rétegű hasfalzárás történt.

5.1.3. Laboratóriumi vizsgálatok, statisztikai analysis

Laboratóriumi vizsgálatokat a műtét előtt 1 nappal (alpminta), a műtétet követően 30 perc, 1, 2, 4, 6 óra múlva, valamint az 1., 2., 3., 5. és 7. postoperatív napokon végeztük.

A statisztikai analízist Repeated Measures, T-teszt és Mann-Whitney féle Rank-Teszt segítségével végeztük ($p < 0.05$).

5.1.3.1. Vörösvérsejt deformabilitási vizsgálatok filtrométerrel

A mintavételek Na-heparin tartalmú csövekbe (143 IU, 7 ml, BD Vacutainer® Belliver Industrial Estate, UK) perifériás vérből, a vena saphena parva-ból történtek. A Na-heparinnal anticoagulált vérmintákat 10 perc centrifugálás, valamint a plasma és a 'buffy coat' eltávolítása után hígítottuk foszfát pufferrel (PBS), majd újra centrifugáltuk és eltávolítottuk a felülúszót. A vörösvérsejt-szuszpenziót 1:1 arányban PBS oldattal hígítottuk, majd meghatároztuk a haematocrit értékét Janetzky-kapilláris centrifugával (5 perc). A kapott haematocritnak megfelelően a mintát PBS-sel tovább hígítottuk a méréshez szükséges 5%-os sejtsuszpenzió-haematocritra.

A vörösvérsejtek deformálódási képességét a St. George's Blood Filtrometer módszer alapján, filtrációs elven működő Carat FT-1 típusú filtrométerrel (Carat Diagnosztika Kft., Budapest) határoztuk meg. A méréseket a mintavételtől számított 2 órán belül elvégeztük.

A mérések kontrollált 22±1 °C-os környezetben történtek. Az 5%-os vörösvérsejt-szuszpenziót 5 µm átlagos pórusátmérőjű polycarbonat filteren áramoltattuk át (Nuclepore®, Whatman Inc.) állandó 4 vízcm áramlási nyomás mellett. A kontrollt a kalibrálásakor átáramoltatott PBS oldat filtrációs sebesség értékei képezték. A minta haladási sebességét 4 pár fényforrás-fotodetektor jeléből számítja ki egy szoftver, és meghatározza a kezdeti relatív filtrációs sebességet (*initial relative filtration rate, IRFR*), majd a betáplált suszpenzió-haematocrit érték alapján kiszámításra kerül a relatív sejt tranzit idő (*relative cell transit time, RCTT*). Mindkét paraméter dimenzió nélküli szám. Az RCTT értékek fordítottan arányosak a vörösvérsejtek deformabilitásával: a filtráció során nehezen deformálódó sejtek lassabban haladnak át a filteren, így a tranzitidő megnyúlik.

5.1.3.2. Haematologiai vizsgálatok

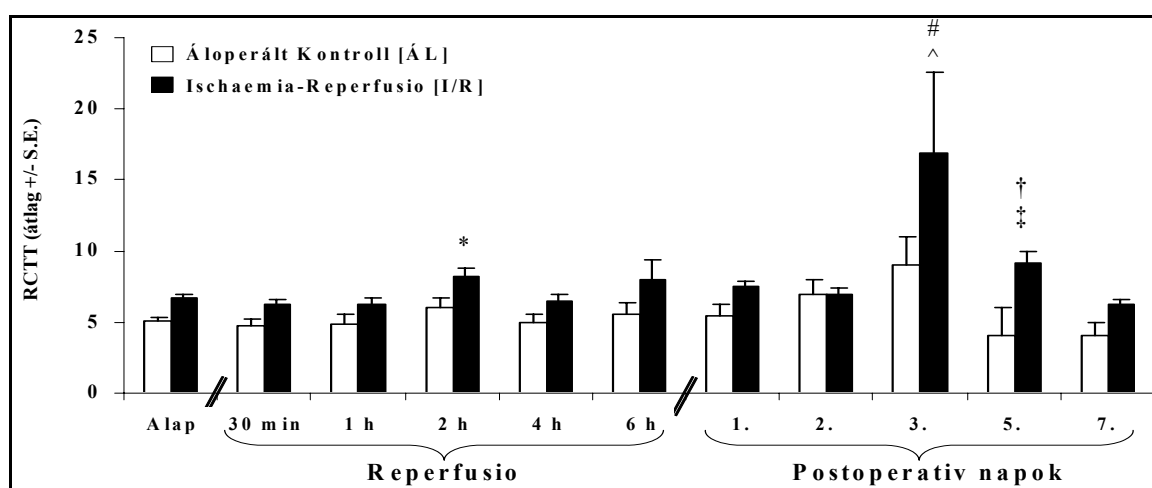
A K₃-EDTA anticoagulánst tartalmazó csövekbe (7,5%, 2 ml, BD Vacutainer® Belliver Industrial Estate, UK) nyert vérmintákból a következő quantitativ és qualitativ haematologiai paramétereket határoztuk meg a Sysmex F-800 típusú automatával (microcell counter) (TOA Medical Electronics Co., Ltd., Japan): vörösvérsejtszám (Vvs [$\times 10^6/\mu\text{l}$]), fehérvérsejtszám (Fvs [G/l]), haematocrit (Htc [%]), haemoglobin koncentráció (Hgb [g/dl]),

átlagos vörösvérsejt térfogat (mean corpuscular volume, MCV [fl]), átlagos vörösvérsejt haemoglobin tartalom (mean corpuscular hemoglobin, MCH [pg]), átlagos vörösvérsejt haemoglobin koncentráció (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC [g/dl]), vörösvérsejt eloszlási szélesség (red cell distribution width, RDW-CV [%]), thrombocytaszám (Thr [$\times 10^3/\mu\text{l}$]), átlagos thrombocytá térfogat (mean platelet volume, MPV [fl]).

5.2. EREDMÉNYEK

5.2.1. A vörösvérsejt deformabilitás változásai

A relatív sejt tranzit idő (RCTT) a reperfusio első órájában nem mutatott jelentős különbséget az *Ischaemia-Reperfusio csoport* és az *Áloperált Kontroll csoport* között. A reperfusio 2. órájában azonban kismértékű, de az első órához képest szignifikáns RCTT növekedés látszott az *Ischaemia-Reperfusio csoportban*. A legjelentősebb vörösvérsejt deformabilitás romlás a 3. postoperatív napon mutatkozott az RCTT értékek jelentős, szignifikáns növekedésével, nemcsak az *Áloperált Kontroll csoport*, hanem az *Ischaemia-Reperfusio csoportban* mért 2. napi értékekhez képest is, amely az 5. napon még mindig szignifikánsan emelkedett és a 7. postoperatív napra a kiindulási értékek irányába rendeződött (11. ábra).



11. ábra

A relatív sejt tranzit idő (RCTT) változásai

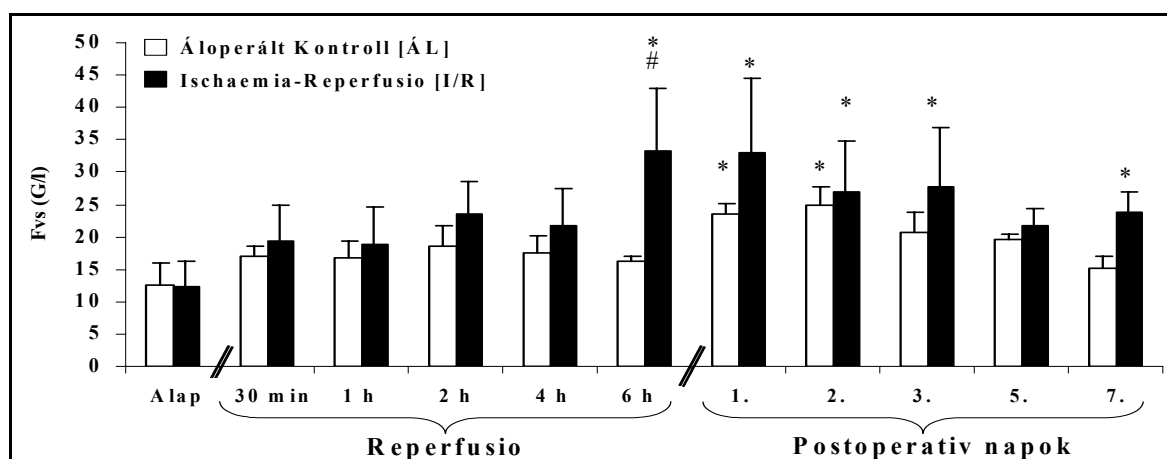
az Ischaemia-Reperfusio és Áloperált Kontroll csoportokban az idő függvényében

* $p=0.0120$ vs IR 1 óra; # $p=0.0321$ vs IR 2. nap (Wilcoxon signed rank test); ^ $p=0.048$ vs ÁL 3. nap;

† $p=0.0062$; ‡ $p=0.0003$ vs ÁL 5. nap (t-test és Mann-Whitney rank sum teszt).

5.2.2. A haematologiai paraméterek változásai

A *fehérvérsejtszám* a reperfusio első négy órájában fokozatos emelkedést mutatott az *Ischaemia-Reperfusio csoportban*, amely a 6. órára érte el csúcspontját. A megemelkedett fehérvérsejtszám mind a kiindulási, mind a kontroll értékekhez képest szignifikáns ($p < 0,001$) volt. Még az 1., 2., és 3. postoperatív napon is jelentősen magasabb fehérvérsejtszámot észleltünk, amely az 5. npra csökkenni kezdett. Az 1. és 2. postoperatív napon az *Áloperált Kontroll csoportban* is mutatkozott az alapértékekhez képest szignifikáns fehérvérsejtszám növekedés, azonban mértékében alulmaradt az ischaemia-reperfusió csoportban látható változásokhoz viszonyítva (12. ábra).



12. ábra

A fehérvérsejtszám (Fvs) változása az Ischaemia-Reperfusio és Áloperált Kontroll csoportokban az idő függvényében

* $p < 0,05$ vs Alap, # $p < 0,05$ vs ÁL

A *vörösvérsejtszám* a teljes vizsgálati periódus során nem mutatott szignifikáns változást, de az átlagértékek változása alapján elmondható, hogy az 1. postoperatív napra közel 7,5%-kal emelkedett a vörösvérsejtszám az *Ischaemia-Reperfusio csoportban*, majd az első postoperatív héten kismértékű csökkenést mutatott: a 7. postoperatív napon a vörösvérsejtszám a kiindulási érték (műtét előtti alapérték) 95,47%-át mutatta.

A *haemoglobin szint*, valamint a *haematocrit* ezzel párhuzamosan változott azzal a különbséggel, hogy az 1. postoperatív napon jelentkező enyhe fokú haemoconcentratio

csupán 3,81%-nyi haematocrit emelkedést jelentett, míg a 7. postoperatív napra a kiindulási érték 88,22%-ra csökkent.

Az *Ischaemia-Reperfusio* csoportban az átlagos vörösvérsejt térfogat, az átlagos vörösvérsejt haemoglobin tartalom- és koncentráció a postoperatív 3. és 7. nap között jelentkező vörösvérsejtszám-, haemoglobin- és haematocrit változásokból adódóan csak kismértékben változott.

A *thrombocyta* szám az *Ischaemia-Reperfusio* csoportban a teljes vizsgálati periódusban alig mutatott változást, az egyedi értékek variabilitása miatt nagy szórás mutatkozott. Az 1. postoperatív napra a kiindulási átlagérték 90,12%-át kitevő *thrombocyta* számot mértünk, amely a 2. és 7. postoperatív nap között kismértékű emelkedést mutatott, a 7. postoperatív napra az alapértékhez képest 15,44%-os emelkedést találtunk. Mindezt az átlagos *thrombocyta* térfogat igen kismértékű változása kísérte (1. postoperatív nap: 3,64%-nyi emelkedés, 7. postoperatív nap: 4,3%-nyi emelkedés). A kontroll csoportban ilyen jellegű változások sem voltak.

5.3. MEGBESZÉLÉS

Az *arteria mesenterica superior* leszorításával előidézett mesenterialis ischaemia-reperfusio haemorheologiai- és haematologiai vizsgálata során kapott eredmények azt sugallják, hogy a vörösvérsejt deformabilitás romlásának mértéke a 3. postoperatív napon a legjelentősebb, ezért ez az időszak kritikusnak tekinthető a postoperatív szövődmények szempontjából is.

A klinikai gyakorlatból is ismert korai postoperatív időszak szövődmény lehetőségei számos kísérletes modell kialakítását indokolták, amelyekben különböző időtartamú ischaemia-reperfusiók történések vizsgálatával bizonyították több szerv vonatkozásában is, hogy számos haemostaseologiai-, haematologiai- és haemorheologiai paraméter mutat szignifikáns romlást az első három postoperatív napon [Dormándy és mtsai, 1985.; Németh és mtsai, 2003., 2004., 2006.(a), 2006.(b); Pető és mtsai, 2005., 2007.; Szokoly és mtsai, 2005.].

Szövettypustól függően a különböző időtartamú és különböző szöveti kiterjedésű ischaemia és az azt követő reperfusio eltérő mértékben ronthatja a vörösvérsejt deformabilitást [Németh és mtsai, 2004., 2006.(b); Szokoly és mtsai, 2005.].

A korai postoperatív napok történései különbözhetnek a korai reperfusio időszakától. Az ischaemia után közvetlenül főleg metabolikus változások, valamint az ischaemiás szövet reperfusiójakor döntően a xantin-oxidáz rendszer működéséből felszabaduló szabadgyökök befolyásolják a vörösvérsejt deformabilitását [Fehér és Vereckei, 1985.; McCord, 1985.; Granger, 1988.; Granger és Korthuis, 1995.; Baskurt és mtsai, 1998.]. A szövetkárosodás mértékétől függően a polymorphonuclearis leukocyták aktivációjából és működéséből származó szabadgyökök hatása eredményezheti a postoperatív első néhány napban (dominánsan a 3. postoperatív nap) mutatkozó vörösvérsejt-szuszpenzió filtrálhatóság csökkenést [Anaya-Prado és mtsai, 2002.; Nanobashvili és mtsai, 2002.].

Irodalmi adatok szerint állatkísérletes végtagi ischaemia-reperfusiók modellen akár 10, illetve 15 perces ischaemia is a felengedés után azonnal szignifikáns mértékben rontja a vörösvérsejt deformabilitást és növeli a vörösvérsejt aggregációs készséget [Kayar és mtsai, 2001.]. A különböző szervek, szervrendszerek vizsgálatánál nyert adatok egymással csak elméleti szinten hasonlíthatóak össze, hiszen az ischaemiás tolerancia jelentősen szövettypus függő, és a vékonybél egyike az ischaemia-reperfusio kapcsán a kialakuló károsodásokra legérzékenyebben reagáló szöveteknek [Granger és mtsai, 1980., 1981., 1986.(b); Granger és Korthuis, 1995.].

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az arteria mesenterica superior leszorítását igénylő vékonybél műtéteket követő 1-3. postoperatív napon -az esetleges szövődmény lehetőségek felmerülése kapcsán- a vörösvérsejt deformabilitás vizsgálata (különös tekintettel az RCTT mérésére) adatokat szolgáltat a vékonybél műtetet követő állapotáról, és a műtéti beavatkozással együtt járó ischaemia-reperfusió károsodások kimutatásában jó jelző módszer lehet, korán jelezve a vékonybél érintettségét.

6. HAEMORHEOLOGIAI ÉS HAEMATOLOGIAI PARAMÉTEREK VÁLTOZÁSA A LOKÁLIS ÉS A SZISZTÉMÁS KERINGÉSBEN MESENTERIALIS ISCHAEMIA- REPERFUSIO FOLYAMATAI SORÁN PATKÁNYBAN - III. KÍSÉRLETI MODELL

Előző -haemorheologiai vizsgálatokat bemutató- kísérletsorozatunkat folytatva és kiegészítve, célunk a mesenterialis ischaemia-reperfusio kapcsán a szisztémás keringés mellett a lokális keringésben kialakuló haemorheologiai változások vizsgálata is volt patkány előkísérletben, újabb mérőmódszerek bevezetésével.

6.1. ANYAG ÉS MÓDSZER

6.1.1. Kísérleti állatok, anaesthesia

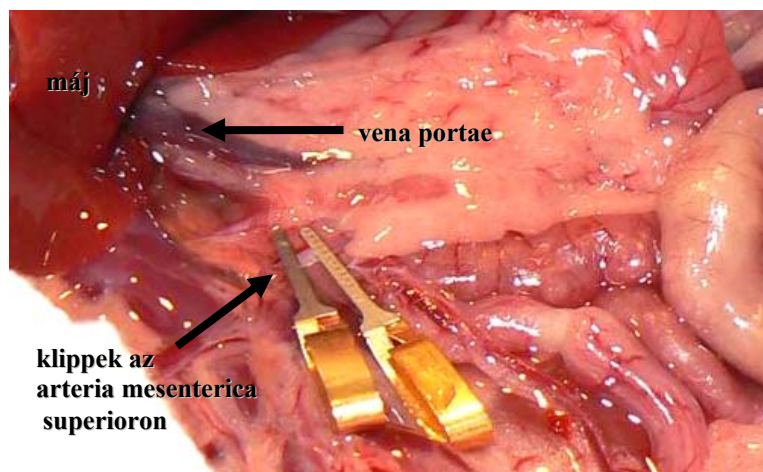
Vizsgálatainkat 10 db nőstény, $360.6 \pm 46.07\text{g}$ testtömegű CD outbred patkányon a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága engedélyével (engedély szám: 6/2006. DEMÁB) végeztük. Az állatok standard méretű ketrecekben az előírásoknak megfelelően voltak elhelyezve és tartva.

A beavatkozásokat subcutan adott Atropin (1%-os atropinum sulfuricum, 0,04 mg/ttkg, Paines&Byrne, Ltd.) premedikációt követően, intraperitonealis Nembutallal (Na-pentobarbital, 35 mg/ttkg, Phylaxia-Sanofi, Ltd.) anaesthesiában végeztük.

6.1.2. Műtéti módszer, kísérleti csoportok

1. *Ischaemia-reperfusio [I/R] csoport* (n=5): median laparotomia után, operációs mikroszkóp (Leica Wild M650, LEICA Ltd., Germany) alatt kipreparáltuk az arteria mesenterica superior, majd mikrosebészeti klippekkel 30 percre leszorítottuk (13. ábra). A klippek eltávolítása után a reperfusio 60. percéig végeztük laboratóriumi vizsgálatainkat.

2. *Áloperált kontroll [ÁL] csoport* (n=5): medián laparotomiát követően csak az arteria mesenterica superior preparálását végeztük el és leszorítás nem történt.



13. ábra

A kipreparált és leszorított arteria mesenterica superior patkányban

6.1.3. Laboratóriumi vizsgálatok, statisztikai analysis

A vérmintákat a vena portaeból illetve a vena cava caudalisból nyertük. A mintavételek során 0.2 ml vért vettünk 1 ml-es fecskendővel. A fecskendő kónuszába felszívott K₃-EDTA (1,5 mg/ml) segítségével végeztük az anticoagulálást.

Az *Ischaemia-reperfusio [I/R]* csoportban az arteria mesenterica superior preparálását követően végeztük az első mintavételt (Alap). Ezt követően a klippek felengedése előtt és után 1-1 perccel (R-1; R+1), majd a reperfusio 15. (R+15), 30. (R+30) és 60. (R+60) percében végeztük a mintavételeket.

Az *Áloperált Kontroll [ÁL]* csoportban az *Ischaemia-reperfusio [I/R]* csoportnak megfelelő időpontokban vettük a vérmintákat, természetesen itt érleszorítás nem történt. A mintavételi protokoll mindkét kísérleti csoportban azonos volt.

A statisztikai analízist egyirányú ANOVA on Ranks teszt és Mann-Whitney Rank sum teszt segítségével végeztük. A $p < 0.05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

6.1.3.1. Vörösvérsejt deformabilitási vizsgálatok ektacytometerrel

A vörösvérsejtek deformabilitásának meghatározását RheoScan D-200 slit flow ektacytometerrel (Sewon Meditech Inc., Dél-Korea) végeztük.

Ez az automata a lézer-diffrakció technikáját kombinálja a slit-flow (rés-áramlás) rheometriával. Az ektacytometer működési elve szerint a mintát egy kapilláris (d=216µm) tartalmazó speciális tartóba helyezük. Ezután a mintát az automata a kapillárisban vákuum-nyomás alá helyezi,

ezáltal a magas viszkozitású közegben a vörösvérsejtek in situ megnyúlnak. Ezt követően a mérőeszköz lézerdiodájának fénye áthalad a mikrorésen, -kapillárison (slit)-, így az abban található sejtek alakjának megfelelő diffrakciós képet, mintát kapunk. Ebből egy software segítségével kalkulálja ki a készülék az elongációs indexet (EI), amely egyenlő a $(L-W)/(L+W)$ hányadossal, ahol az L a hossza és W a szélessége a deformált sejteknek, állandó nyíróerő (Shear Stress [SS]) mellett.

A nyíróerő (SS) függvényében ábrázolva az elongációs indexet (EI), a Lineweaver-Burke analízist alkalmazva megadható a sejtek kalkulált maximális elongációs indexe az EI_{max} , és a kalkulált maximalis elongációs index feléhez tartozó nyíróerő értéke az $SS_{1/2}$. A maximális elongációs index az az érték, amelynél a sejt molekuláris és strukturális paramétereitől függően, adott nyíróerő (SS) mellett eléri maximális elnyújthatóságát. Tehát meghatározott nyíróerő tartományban (SS: 0-20 Pa), magas viszkozitású PVP (Polyvinylpyrrolidon) közegben lézerdiffraktogramm elemzésével méri a vörösvérsejtek deformabilitását. A magas viszkozitású közeg meggátolja a sejtek elmozdulását a kapillárisban, viszont a rá kifejtett erők képesek őket deformálni.

Általánosságban elmondhatjuk, hogy a vörösvérsejtek deformabilitása romlik, ha az EI_{max} értéke csökken és/vagy az $SS_{1/2}$ értéke emelkedik.

6.1.3.2. Vörösvérsejt aggregatio mérése

Kiegészítő vizsgálatként a vörösvérsejtek aggregációját is meghatároztuk a 30 perces ischaemia utolsó percében a klippek felengedése előtt (R-1), és a reperfusio végén (R+60).

A méréseket Myrenne MA1 aggregométer (Myrenne GmbH, Németország) segítségével végeztük. A berendezés az optikai aggregometria elvét használva működik, amely a véren áthaladó vagy visszaverődő, szóródó fény intenzitásának mérésén alapul.

6.1.3.3. Haematologiai vizsgálatok

Laboratóriumi méréseinket standard körülmények között végeztük. Qualitatív és quantitativ paramétereinket SYSMEX F-800 haematológiai automatán (microcell counter-TOA Medical Electronics Corp., Ltd., Japán) mértük. A mérések metodikája és a mért paraméterek megegyeznek a 5.1.3.2. „Haematologiai vizsgálatok” fejezetben leírtakkal.

6.2. EREDMÉNYEK

6.2.1. A vörösvérsejt deformabilitás változásai

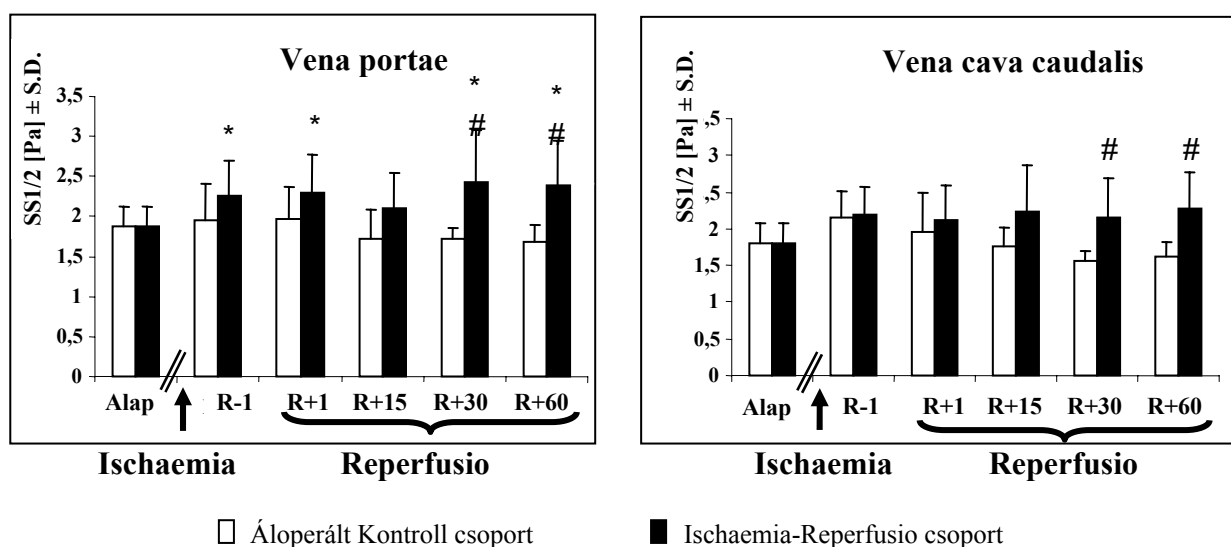
Nem volt szignifikáns eltérés a vizsgálat időtartama alatt a maximális elongációs index (EI_{max}) értékeiben a két kísérleti csoport között a vena portae és vena cava caudalis mintáiban.

Az EI_{max} értékei 0.553 és 0.560 közötti tartományban voltak.

Azonban, a maximális elongációs index érték feléhez tartozó nyíróerő az $SS_{1/2}$ értékei a reperfusió időszak utolsó 30 percében jelentős eltérést mutattak.

Az *Ischaemia-Reperfusio [I/R] csoport vena portae* mintáiban szignifikáns emelkedést tapasztaltunk az $SS_{1/2}$ értékeiben a reperfusio kezdete előtt (2.25 ± 0.44 Pa, $p=0.014$), és a klipp eltávolítása után egy perccel (2.30 ± 0.46 Pa), összehasonlítva az alapértékkel (1.87 ± 0.25 Pa, $p=0.009$). A legmagasabb $SS_{1/2}$ érték a reperfusio 30. percében (R+30) volt mérhető (2.43 ± 0.65 Pa), és kissé csökkent a reperfusio 60. percére (2.38 ± 0.56 Pa), viszont mindkét érték szignifikánsan emelkedett volt az alap és *Áloperált Kontroll* értékekhez képest (*Áloperált Kontroll* R+30: 1.71 ± 0.13 Pa, $p<0.05$ és 1.62 ± 0.20 Pa, $p<0.05$) (14. ábra).

Az *I/R csoport vena cava caudalisból* nyert mintáiban az $SS_{1/2}$ értékek emelkedtek a reperfusio 30. és 60. percében (2.14 ± 0.54 Pa és 2.17 ± 0.50 Pa), amely emelkedés szignifikáns volt az alapértékhez (1.80 ± 0.26 , $p<0.001$) és az *Áloperált Kontroll csoport* értékeihez viszonyítva (1.55 ± 0.13 és 1.62 ± 0.20 Pa, $p<0.001$) (14. ábra).



14.ábra

A vörösvérsejt deformabilitás változása az ischaemia-reperfusio során az Ischaemia-Reperfusio és az Áloperált Kontroll csoportokban az idő függvényében

* $p<0,05$ vs. Alap; # $p<0,05$ vs. Áloperált Kontroll

6.2.2. Vörösvérsejt aggregatio változásai

A portális vérminták aggregatiós értékei magasabbak voltak az ischaemia utolsó percében (R-1) és a reperfusio végén (R+60) a vena cava mintáival összehasonlítva. Számszerűen kifejezve a portális és vena cava caudalis aggregatiós index hányadosait a következő értékeket kaptuk: R-1 időpontban: 1.86 (vena portae: 6.55 ± 0.37 vs. vena cava: 3.51 ± 0.62); az R+60 időpontban a hányados értéke: 2.36 (vena portae: 4.06 ± 0.78 vs. vena cava: 1.72 ± 0.16).

Megállapítható, hogy a vena portae-ban a vörösvérsejtek aggregációja fokozottabb.

6.2.3. A haematologiai paraméterek változásai

A haematológiai paraméterek közül csak a szignifikáns eltérést mutatóakat ismertetjük.

Haematocrit változások

Az *Áloperált Kontroll* csoport vena portae-ból vett mintákban a haematocrit kismértékű csökkenést mutatott, míg az *Ischaemia-Reperfusio* csoportban szignifikáns ($p < 0.05$) emelkedést tapasztaltunk, mely csúcst a reperfusio első percében érte el. A vena cava caudalisból nyert minták elemzése során hasonló tendenciát figyelhettünk meg. A vena portae és vena cava caudalis mintái között egyetlen időpontban sem lehetett szignifikáns különbséget kimutatni (III. táblázat).

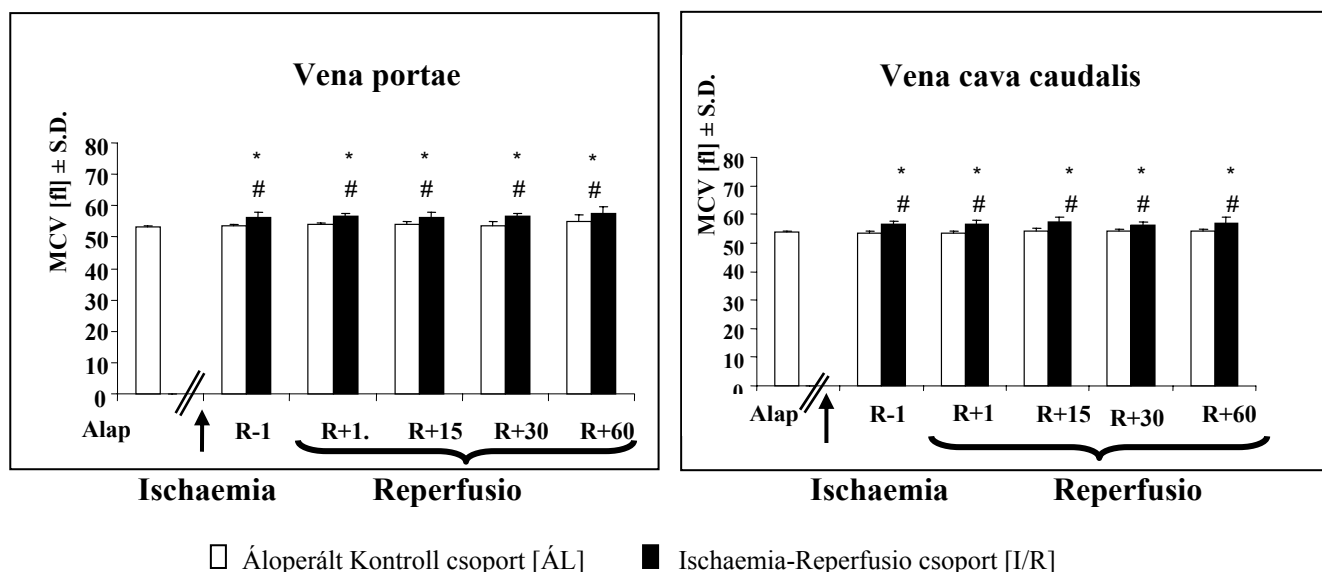
III. táblázat: A haematocrit változása a vena portae és a vena cava caudalis mintákban az Ischaemia-Reperfusio és az *Áloperált Kontroll* csoportokban az idő függvényében

Minta	Csoport	Alap	R-1	R+1	R+15	R+30	R+60
vena portae	Áloperált kontroll	35.21 ± 2.59	33.35 ± 5.08	33.38 ± 4.16	35.15 ± 3.66	34.19 ± 1.85	32.32 ± 4.49
	I/R		$41.21 \pm 2.3\#$	$45.08 \pm 4.16*\#$	$42.92 \pm 8.12\#$	$41.52 \pm 3.49\#$	$39.08 \pm 2.48\#$
vena cava caudalis	Áloperált kontroll	37.33 ± 5.36	35.31 ± 6.39	35.31 ± 5.29	34.73 ± 3.86	35.11 ± 2.53	$29.63 \pm 1.96*$
	I/R		$43.29 \pm 4.67*$	$46.06 \pm 9.05*\#$	$46.33 \pm 6.3*\#$	$41.98 \pm 3*\#$	$41.33 \pm 2.98*\#$

* $p < 0.05$ vs. Alap, # $p < 0.05$ vs. *Áloperált kontroll*

Átlagos vörösvérsejt térfogat változások

Az *Ischaemia-Reperfusio* csoport vena portaeból, valamint a vena cava caudalisból származó mintáiban folyamatosan és szignifikánsan ($p < 0.05$) emelkedtek az MCV értékek minden vizsgált időpontban, mind az *Áloperált Kontroll* csoporthoz, mind az alapértékhez viszonyítva. Az átlagos vörösvérsejt térfogat változását a 15. ábra foglalja össze.



15. ábra

Az átlagos vörösvérsejt térfogat változása a vena portae és a vena cava caudalis mintákban az *Ischaemia-Reperfusio* és az *Áloperált Kontroll* csoportokban az idő függvényében

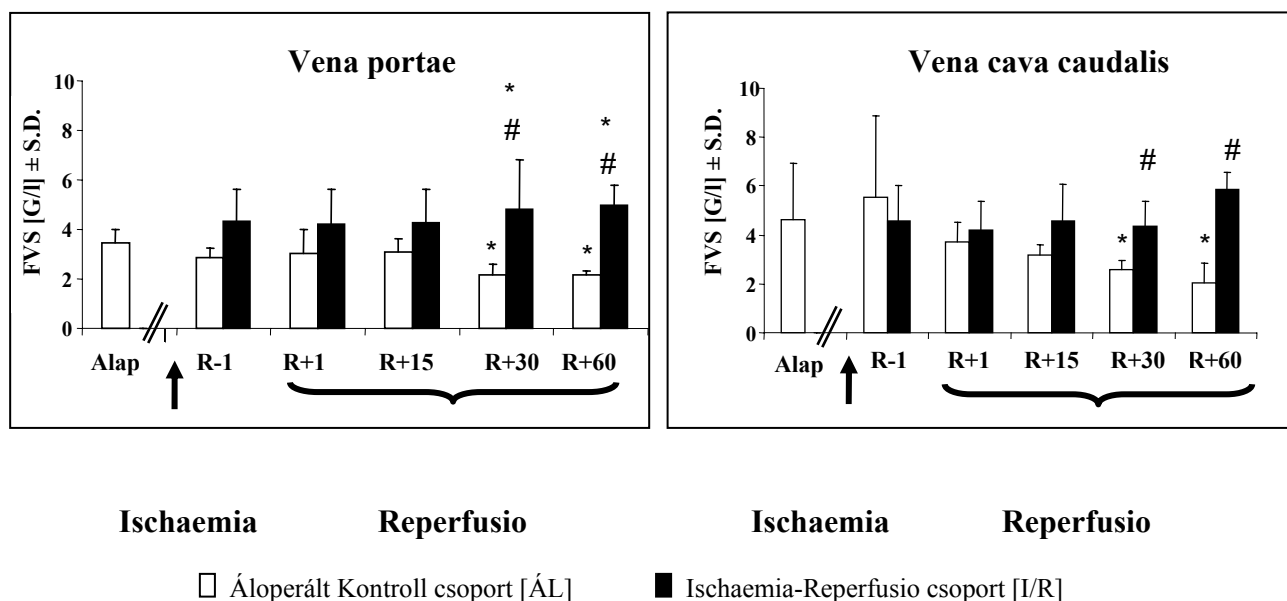
* $p < 0,05$ vs Alap; # $p < 0,05$ vs ÁL

Fehérvérsejtszám változások

Az *Ischaemia-Reperfusio* [I/R] csoport portális mintáiban emelkedést mutattak a fehérvérsejtszám értékei ($3.45 \pm 0.56 \times 10^3/\mu\text{L}$), amely emelkedés szignifikáns volt a reperfusio 30. ($4.81 \pm 2.02 \times 10^3/\mu\text{L}$) és 60. ($5.0 \pm 0.77 \times 10^3/\mu\text{L}$) perceiben, az *Áloperált Kontroll* csoport értékeihez viszonyítva. ($2.18 \pm 0.42 \times 10^3/\mu\text{L}$, $p < 0.001$ és $2.18 \pm 0.14 \times 10^3/\mu\text{L}$, $p < 0.001$) (16. ábra).

Az *Ischaemia-Reperfusio* csoport vena cava caudalis mintáiban szintén az előbbiekkal korreláló eredményeket kaptunk: a fehérvérsejtszám emelkedést mutatott a reperfusio 15. percében ($4.58 \pm 1.49 \times 10^3/\mu\text{L}$) az alapértékhez viszonyítva ($3.7 \pm 0.52 \times 10^3/\mu\text{L}$). További emelkedést tapasztaltunk a reperfusio 30. és 60. percében ($4.36 \pm 1.03 \times$

$10^3/\mu\text{L}$, $p<0.001$ és $5.86\pm 0.70 \times 10^3/\mu\text{L}$, $p<0.001$), összehasonlítva az alap és *Áloperált* Kontroll csoport értékeivel (2.58 ± 0.36 és $2.05\pm 0.82 \times 10^3/\mu\text{L}$, $p<0.05$) (16. ábra).



16. ábra

A fehérvérsejtszám változása a vena portae és a vena cava caudalis mintákban az Ischaemia-Reperfusio és az *Áloperált* Kontroll csoportokban az idő függvényében
 * $p<0,05$ vs Alap; # $p<0,05$ vs *ÁL*

Az *Áloperált* Kontroll csoport esetében folyamatos csökkenést figyelhettünk meg, mely a reperfusio 30. és 60. percében szignifikáns ($p<0.05$) csökkenést mutatott az alapértékhez viszonyítva (16. ábra).

6.3. MEGBESZÉLÉS

Kutatásainkban az ischaemia-reperfusiók folyamatok bizonyos haemorheologiai és haematologiai következményeit vizsgáltuk lokális és szisztémás keringésből nyert vérmintákban. Mértük a vörösvérsejtek passzív deformálhatóságát és elemeztük a haematocrit, a fehérvérsejtszám, az átlagos vörösvérsejt térfogat változásait, a vörösvérsejtek aggregációs készségét.

Eredményeink szerint a *lokális* keringésből (vena portae) és a *szisztémás* (vena cava caudalis) keringésből nyert mintákban megfigyelhettük a vörösvérsejtek deformabilitásának

romlását és a vörösvérsejtek aggregációjának növekedését, valamint a reperfusio során szignifikánsan emelkedett a haematocrit, az átlagos vörösvérsejt térfogat, a fehérvérsejtszám is.

Megerősítettük azokat a korábbi megállapításokat, hogy a haemorheológiai paraméterekben tapasztalt változások jelentősen befolyásolhatják a mikrokeringést az ischaemia után, ami additív módon növelheti a keringésből korábban kizárt területek károsodását. Ezek a megfigyeléseink ugyanis megegyeznek a végtagi ischaemia-reperfusio kapcsán leírt mikrokeringésben bekövetkező károsodások megfigyelésével [Németh és mtsai, 2004.].

Modellünkben azt figyelhettük meg, hogy a reperfusio 30. és 60. percében a vörösvérsejtek deformabilitása szignifikánsan romlott, mivel az $SS_{1/2}$ értékek emelkedtek ezen időpontokban mind a lokális (portális), mind a szisztémás (cavalis)vérmintákban.

Jelen kísérletünkben megfigyelt változások összhangban vannak az előző 5. fejezetben leírt modellünkben tapasztalt filtrometriás módszerrel kapott eredményekkel, miszerint a vörösvérsejt deformabilitása romlik mesenterialis ischaemia-reperfusio során. Az újabb ektacytometriás mérőmódszerrel kapott eredmények így megerősítették a vörösvérsejt deformabilitás változás kimutatásának jelző értékét ischaemia-reperfusió károsodások kapcsán.

A vörösvérsejtek deformabilitásának romlásának magyarázata lehet lokálisan kialakuló különböző mikrokörnyezeti tényezők változása, mint például az ionszint, a pH, az osmolaritas, és az intra- és extracellularis folyadékterek megoszlásának változásai, valamint az intracellularis ATP szint csökkenése. Ezen eltérések befolyásolhatják a vörösvérsejtek alakját, térfogatát. A vörösvérsejtek deformabilitását csökkentheti továbbá a megnövekedett szabadgyök koncentráció okozta lipidperoxidáció, különböző enzimekben, fehérje szerkezeti elemekben és haemoglobin molekulában bekövetkező pathológiás strukturális változások is [Baskurt és mtsai, 1998; Anaya-Prado és mtsai., 2002; Németh és mtsai., 2004.].

A vörösvérsejtek passzív deformálhatóságának megváltozása nagy szerepet játszik a sejtek microcapillárisokon való átjutásában. Az *Ischaemia-Reperfusió csoportban* mindkét helyről származó mintákban mért szignifikáns *átlagos vörösvérsejt térfogat* növekedés nagymértékben hozzájárulhat a vörösvérsejtek alakjának és abszolút térfogatának változása által a vörösvérsejtek deformabilitásának romlásához. Ezt a folyamatot erősítheti az *Ischaemia-Reperfusió csoportban* a lokális és szisztémás mintákban mért szignifikáns haematocrit emelkedés is [Granger, 1988.; Bradbury és mtsai, 1995.; Anaya-Prado és mtsai., 2002.].

Vizsgálataink során az $SS_{1/2}$ értéke szignifikánsan nőtt a reperfusio második felében, azaz a vörösvérsejtek deformabilitása romlott, így csak csökkent mértékben voltak képesek passzív alakváltozásra és a microcapillárisokon való áthaladásra, ezáltal fokozódhat a mikrokeringés károsodása, ami tovább fokozhatja a szövetek hypoxiás sérülését.

Elemmezve adatainkat, a portális vérmintákban a 30 percig tartó ischaemia végére a *vörösvérsejt aggregatio* mértékének fokozódását tapasztaltuk az alapértékhez képest, ez tovább emelkedett a reperfusio során a cavalis vérmintákhoz viszonyítva. A lokális, tehát a vena porta vérmintáiban megközelítőleg 2,5-szeres aggregatio fokozódást tapasztaltunk a reperfusio végére az azonos időpontú szisztémás, azaz a vena cava caudalis mintáihoz képest.

A vörösvérsejtek aggregációjának fokozódása ismert volt acut myocardialis infarctus, gyulladás, vagy trauma esetén [Baskurt és Meiselman, 2003.]. Azonban eddig nem találtunk irodalmi adatot, hogy hogyan változik ezen parameter mesenterialis ischaemia-reperfusio folyamata során.

Baskurt és munkatársai kísérletéből ismert, hogy ha a vörösvérsejteket xantin oxidáz-hypoxantin rendszer által termelt szuperoxid anionokat tartalmazó közegbe helyezük, akkor ez elsősorban a vörösvérsejtek aggregációs készségét befolyásolja, mint a deformabilitásukat [Baskurt és mtsai., 1998.]. Ugyanez a munkacsoport mutatta ki, hogy ischaemia-reperfusio során a vörösvérsejtek sejtfelszíni tulajdonságai megváltoznak. A vörösvérsejtek aggregációs készsége fokozódik, melynek oka a sejtfelszíni töltés csökkenése. Ugyanis, ha változik a vörösvérsejtek felszíni töltése, csökken az elektrosztatikus taszító erő is, ami a sejteket az

aggregatio irányába terelheti [Kayar és mtsai, 2001.; Baskurt és Meiselman, 2003].

A mesenterialis ischaemia-reperfusió károsodások multifaktoriális eredetűek, mely folyamatban jelentős szerepet játszhatnak a szabadgyökök, a nitrogén-oxid és a leukocyta adhesió molekulák. A szabadgyökök termelésében részt vehetnek a xantin-oxidáz enzimszisztéma tagjai, az aktiválódott neutrophil leukocyták és endothel sejtek is [Granger, 1988.; Bradbury és mtsai, 1995.; Granger és Korthuis, 1995.; Anaya-Prado és mtsai., 2002.]. A mesenterialis ischaemia és a szabadgyökök termelésének folyamatait korábbi fejezetekben röviden már ismertettük.

A vizsgálatunkban a fehérvérsejtszám emelkedett a reperfusio 30. és 60. percében a portális és cavális mintákban egyaránt. Különösen a polymorphonuclearis sejtek felszaporodása bír jelentőséggel, de a lymphocytáknak is fontos szerep jut a károsodás kialakulásában. A sejtek rigiditása, viscoelasticus elemeinek csökkenése, növekvő chemokin és cytokin szekréciónak aktivitása, a granulumaikban tárolt proteolitikus enzimek és szabadgyökök kijutása az érintett szövetek destrukciójához vezet. A folyamat hatékonysága epicentrumától távolodva csökken [Massberg és Messmer, 1998.].

Az aktiválódott polymorphonuclearis leukocyták növelhetik a bélnyálkahártyában jelentős mennyiségben megtalálható xantin-dehidrogenáz/xantin-oxidáz enzimszisztéma működése során termelődött szabadgyökök mennyiségét, ami fokozhatja a már működő károsító folyamatok hatásait. [Granger, 1988.; Granger és Korthuis, 1995.; Anaya-Prado és mtsai., 2002.].

Összefoglalva eredményeinket megállapíthatjuk, hogy a mesenterialis ischaemia-reperfusio során a haematocrit, a vörösvérsejt deformabilitás és a vörösvérsejt aggregatio, a fehérvérsejtszám, az átlagos vörösvérsejt térfogat változást mutat a lokális és a szisztémás vénás vérmintákban a reperfusio első órájában. Ezen nagyrészt haemorheológiai vizsgálatok segítséget nyújthatnak az ischaemia-reperfusio kapcsán megváltozó rheológiai paraméterek komplex pathomechanizmusának megértéséhez, s olyan adatokat szolgáltathatnak, melyek segíthetik a -mesenterialis ischaemiás okok miatt- esetleg kritikus állapotban lévő betegek klinikai kezelését, gyorsabb rehabilitációját.

7. ÉRANASTOMOSISOK NÉLKÜLI VÉKONYBÉL TRANSPLANTATIÓS EGÉR MODELL IV. KÍSÉRLETI MODELL

7.1. ANYAG ÉS MÓDSZER

7.1.1. Kísérleti állatok, anaesthesia

Vizsgálatainkat az „Állatok védelméről és kíméletéről” szóló 1998. évi XXVIII. Törvény előírásainak betartásával, a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság engedélyével végeztük (engedély szám: 6/2001. DEMÁB).

A mikrosebészeti modell alkalmazásával végzett kísérleteinknél harminchat, 20-24g testtömegű, mindkét nemű A/J egér ($22,32 \pm 1,66$ g) került felhasználásra. A kísérleti állatokat 22-24°C-os helyiségben, standard méretű, és kivitelezésű ketrecben tartottuk. A helyiségekben a napi fényciklus 12 óra volt (6:00-18:00). Minden állatnak konvencionális takarmányt és vízhez való szabad hozzáférést biztosítottunk. A műtét időtartama alatt fűthető padra helyeztük őket, konstans, 37°C-os testhőmérsékletet biztosítva. A postoperatív periódusban az egereket egyéni ketrecekben helyeztük el, melegítő lámpával biztosítva a megfelelő hőmérsékletet a kihülés megelőzése céljából.

Az anaesthesiát intraperitonealisán alkalmazott Nembutallal (Na-pentobarbital, 35 mg/ttkg, Phylaxia-Sanofi, Ltd.) és subcutan adott Atropinnal (1%-os atropinum sulfuricum, 0,05 mg/ttkg, Paines&Byrne, Ltd.) végeztük, 15 mg/ttkg/óra fenntartó dózissal.

7.1.2. Műtéti módszer, kísérleti csoportok

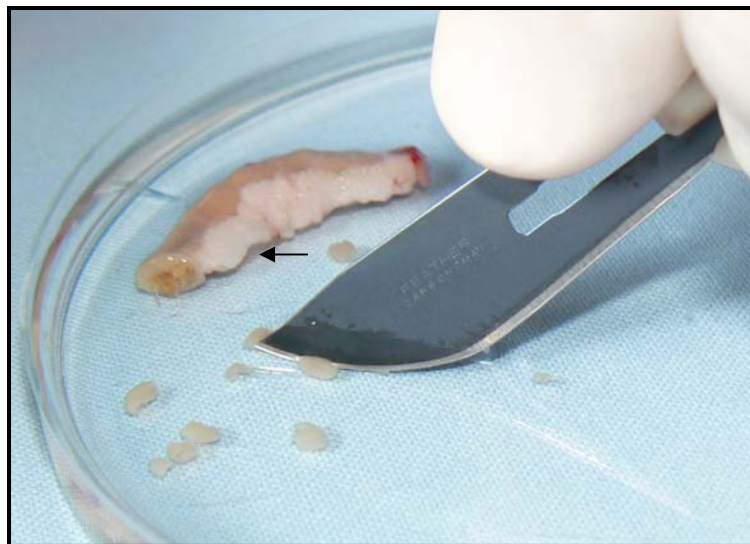
7.1.2.1. Donor műtétek

A beavatkozásokat A/J beltenyészített egereken végeztük. Donor műtétek (n=6): az állatokon szőrtelenítés, Betadinos dezinficiálás és izolálás után teljes median laparotomiát végeztünk, a processus xyphoideus (mely egereknél speciális tányér alakú nyúlvány) mellett mind jobb, mind bal oldalon a bordáig felhatoltunk ollóval.

Distalisan a húgyhólyagra vigyázva a symphysis pubica területéig elérve megnyitottuk a hasüreget. A hasfal izomzatába a köldöknek megfelelően jobb és bal oldalon öltést helyeztünk, és ezek segítségével feltártuk a hasüreget. Steril gézlapokkal izoláltuk a műtéti területet.

A vékonybeleket nedves vattapálcával előemeltük és testmeleg fiziológiás sóoldattal átitatott gézlapra helyeztük. Kiválasztottunk egy 2 cm hosszú jejunum-segmentet a Treitz szalagtól 2 cm távolságra, és ollóval eltávolítottuk. A jejunum-segmentet vékony polyethylen katéterrel kanüláltuk, majd a graftot lassan átmostuk. Az atmosáshoz egy porampulla Neomycin-sulfátot (Neomycin Sulfate, (600 IU/mg), Merck, Ltd.) hígítottunk fel 20 ml-re 4°C-os Ringer-laktát oldattal. A választott antibiotikum előnye, hogy bélben nem szívódik fel. Az atmosást addig végeztük, míg a mosó folyadék fel nem tisztult.

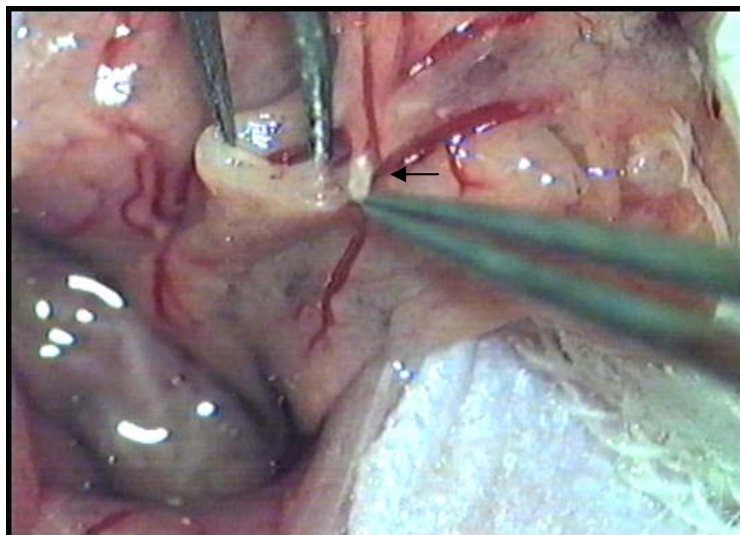
A bél segmentet hosszában megnyitottuk és számtalan apró 3x2x2 mm-es darabot készítettünk szike segítségével (17. ábra). A béldarabokat 4°C-os Ringer-laktát oldatban tároltuk felhasználásukig.



17. ábra
Az eltávolított bélszakaszból kisméretű darabok kialakítása
A nyíl az eltávolított jejunum-segmentre mutat.

7.1.2.2. Recipiens műtétek

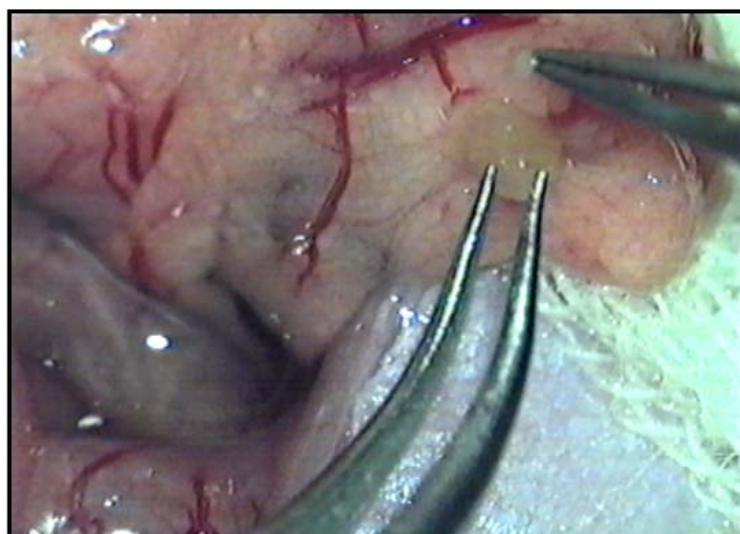
A recipiens műtétek (n=30) során medián laparotomiát követően a nagycepleszt előemeltük és nedves gézre helyeztük. Öt fészket készítettünk az omentum elülső lemezének megvasításával. A fészkeket mindig a csepleszben futó erek közelébe készítettük el, természetesen gondosan figyelve az ér sérülések elkerülésére (18. ábra).



18. ábra

Befogódóhely -fészek- készítése a nagycepleszben csipeszek segítségével
A nyíl a nagycepleszre és a benne futó erekre mutat.

Minden fészekbe -a nagyceplesz két lemeze közé- vékonybél darabokat helyeztünk (19. ábra).



19. ábra

Az előkészített jejunumdarab behelyezése a nagycepleszbe

A fészkeket 8/0-ás Prolene [polypropylene] öltésekkel zártuk, mely egyben a fészkek jelölését is szolgálta. A hasüreget lege artis zártuk (20. ábra).



20. ábra

A behelyezett jejunumdarabok jelölése és rögzítése öltés segítségével
A nyíl a nagycseplesz elülső lemezén ejtett nyílásába öltött tűt mutatja.

Az ischaemia okozta károsodások csökkentése céljából -hogya béldarabokat rövid ideig tároljuk- egy donor műtétet 5 recipiens műtét követett.

Hat héttel a sebészi beavatkozások után szövettani feldolgozásra mintavétel történt. A műtéteket és a szövettani mintavételt azonos napszakban végeztük, hasonló körülmények között (9:00 és 11:00 között).

7.1.3. Makroszkópos vizsgálatok

A vizsgálati időtartam leteltével a szövettani mintavételt megelőzően a kísérleti állatok hasüregét áttekintettük, a műtéti területet megvizsgáltuk, video- és fotodokumentáció történt.

7.1.4. Mikroszkópos vizsgálatok

A szövettani vizsgálatok alapját haematoxylin-eosin (HE), PAS, és Van Gieson festések képezték.

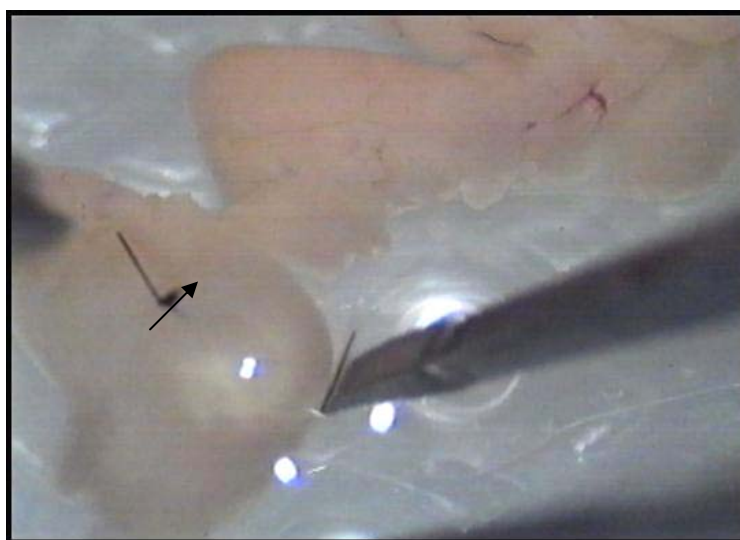
7.2. EREDMÉNYEK

A kísérlet időtartama alatt egyetlen kísérleti állatot sem veszítettünk el. A donor műtétek átlagos ideje 15 ± 2 perc, a recipiens műtétek ideje 25 ± 3 perc volt.

7.2.1. Makroszkópos vizsgálatok eredménye

A makroszkópos elemzés során 7 esetben nem találtuk meg a jelölt fészkeket. Kilenc esetben hasfali kitapadást figyeltünk meg. Máj körüli összenövéseket 4 esetben észleltünk.

A többi esetben komplikáció nélkül megtaláltuk a nagycseplesz fészkeket a transzplantált szervdarabokkal. Számos esetben az ábrán is látható víztiszta, áttetsző bennékű, cystosus képlet formájában találtuk meg a transzplantált béldarabokat (21. ábra). Az esetek többségében nem alakult ki ez az üreges képlet, hanem az átültetett béldarab mintegy szigetszerűen helyezkedett el a nagycsepleszbe ágyazva.



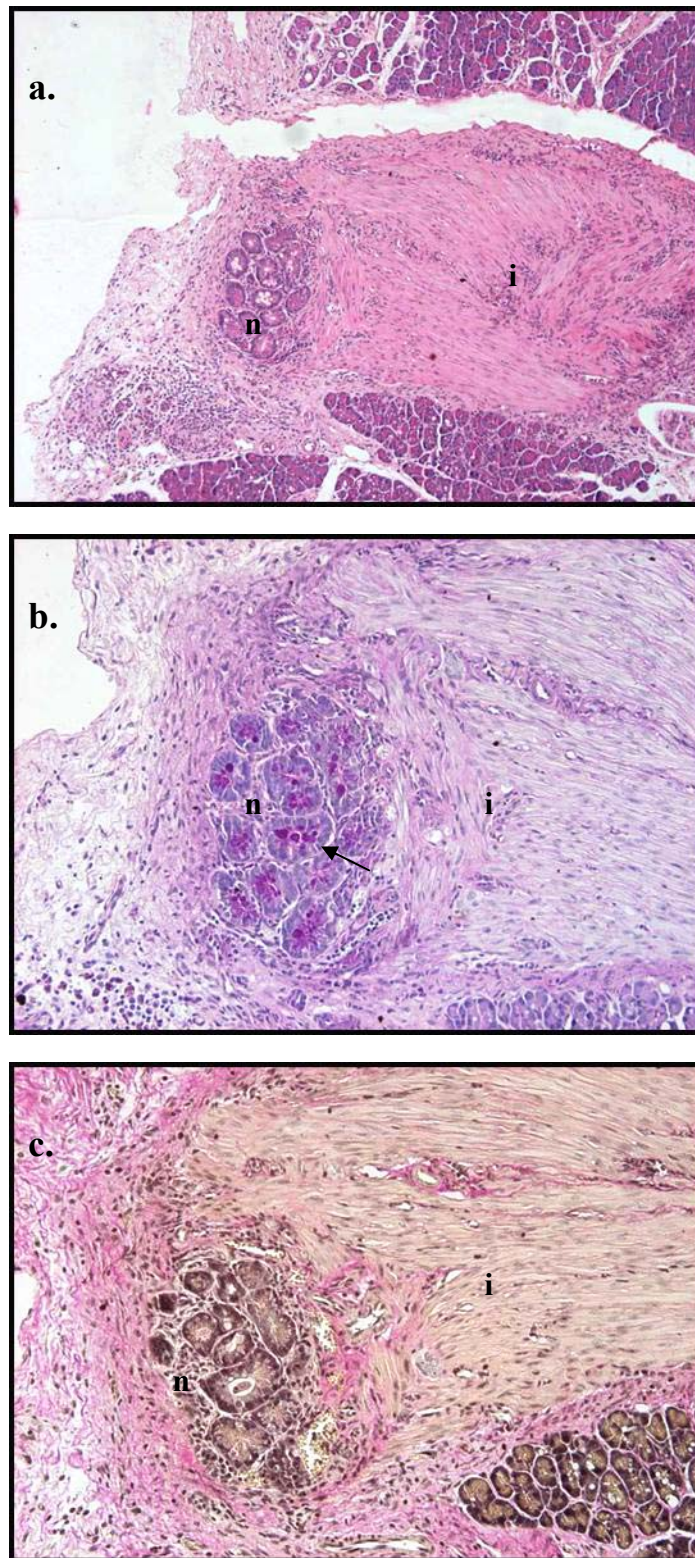
21. ábra

A csepleszből eltávolított, öltéssel jelölt, cystosus, transzplantált béldarab
A csipesz a folyadékkal telt jejunum darabot,
míg a nyíl a nagycsepleszbe helyezett jelölő öltést mutatja.

7.2.2. Mikroszkópos vizsgálatok eredményei

A szövettani vizsgálat során azonosítottuk a nagycsepleszbe helyezett béldarabokat. Minden béldarab jól erezett volt. A bélfal elvékonyodott, de minden rétege: a mucosa, submucosa, izomrétegek, subserosa és serosa is látható volt (22. a., b., c., ábra). A transzplantált darabokban a mirigyállomány működőképesnek tűnt. Az izomrétegben lymphocita infiltrációt lehetett kimutatni.

PAS festés segítségével sikerült a mirigyállomány által termelt mucint kimutatni, valamint a mucin termelésért felelős kehelysejteket is sikerült azonosítani (22. b., ábra).



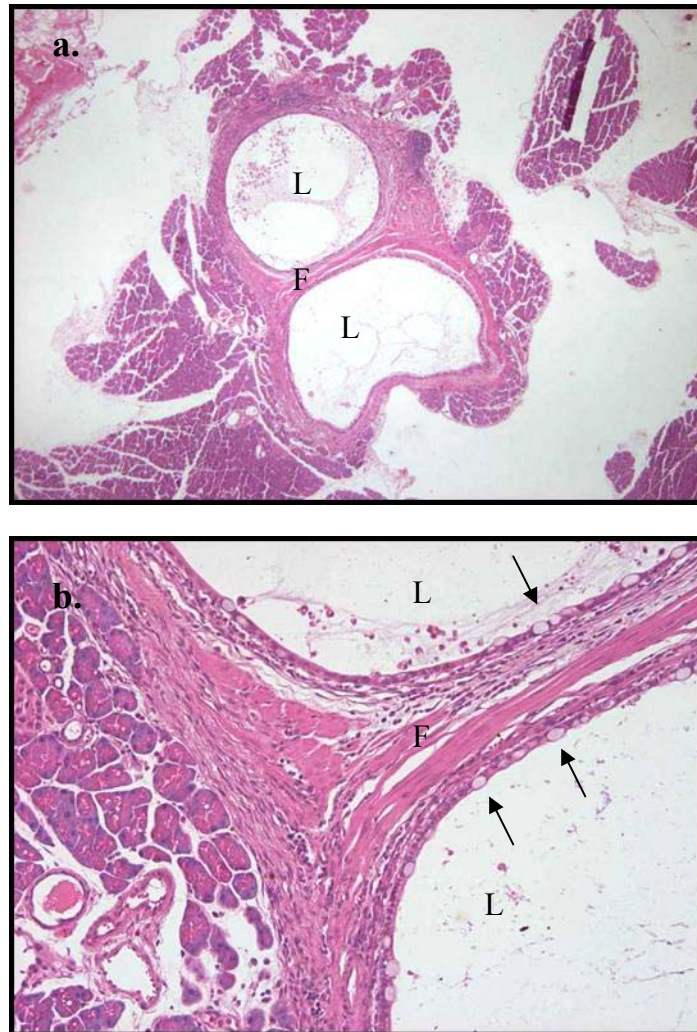
22. ábra

A nagycepleleszbe transzplantált jejunum darab szövettani képe

A „n” a nyálkahártyát, az „i” az izomréteget jelöli,
a nyíl a mucin termelésért felelős kehelysejtekre mutat.

(a.: HE festés, N: 100X; b.: PAS festés, N: 200X; c.: Van Gieson festés, N: 200X)

A víztiszta, áttetsző bennékű, cystosus képletek szövettani feldolgozása során a kitágult, elvékonyodott bélfalat minden rétegével sikerült azonosítani. A nyálkahártya egy rétegben helyezkedett el, és bizonyos területeken elvált (23. a., ábra).



23. ábra

A nagycepleleszbe transzplantált jejunum darab szövettani képe

Az „L” a bél lumenét, az „F” az elvékonyodott bélfalat jelöli,
a nyilak a nyálkahártyában lévő kehelysejtekre mutatnak.

(a.: HE festés, N: 50X; b.: HE festés, N: 200X)

A nagyított bélfal részleten jól láthatóak az elvékonyodott rétegek. A nyálkahártyában kehelysejteket lehet azonosítani (23.b. ábra). Az izomréteg elvékonyodott. A transzplantált béldarabok körül mononucleosis sejteket és óriássejteket lehet megfigyelni. A lument mucinosus anyag tölti ki.

7.3. MEGBESZÉLÉS

A *bélfal minden rétege* felismerhető volt a metszeteken. A meglévő mirigyállomány megőrizte *mucintermelő* képességét, és számos *kehelysejtet* sikerült azonosítani. Minden recipiensben sikeres volt a transplantatio.

Kísérletünkben törekedtünk a béldarabok beültetéséhez a legmegfelelőbb helyet megkeresni, valamint a postoperatív szövődményeket minimálisra csökkenteni.

Az irodalom alapján a szervezet különböző helyeire próbálták a bél segmenteket transplantálni. Uchida mesenteriumától teljesen megfosztott 1,5 cm-es vékonybél darabot transplantált a *hasfal subcutan terébe* és a bélfal minden rétegét sikerült azonosítani két héttel a műtét után, 75%-os revascularisatiós arányt állapított meg [Uchida és mtsai, 1999.(a), 1999.(b)].

Lane a *peritoneum fali lemeze és a rectus abdominis között* kialakított térbe transplantált 30 mm-es vékonybél segmenteket. Tíz nappal később mintavételnél 90%-os graft túlélést állapított meg, viszont a graftok bélfal szerkezete számos esetben sérült [Lane és mtsai, 1998.].

Tisinai 2 cm-es jejunum és ileum segmenteket használt. Az egyik csoportban a *vese tokja alá* ültette a vékonybél darabokat, a másik csoportban *az omentumba* csavarta a graftokat. Két héttel a műtét után az omentumba transplantált graftokat találta nagyobbaknak, de a különbség nem volt szignifikáns [Tisinai és mtsai, 1990.].

A *nagycseplesz megfelelő hely a transplantatio számára*, ezt bizonyította a korábbi, egereken kivitelezett lépautotransplantációs modell, mely az alapötletet adta a jelenleg részletezett bél transplantációs modellhez. A lépét eltávolítottuk, 3x2x2 mm-es darabokat alakítottunk ki belőle, majd a cseplesz kettőzetébe visszaültettük, és öltéssel fixáltuk [Mikó és mtsai, 2001.(a), 2003., 2005.].

Klos használta először a nagycseplest béltranszplantáció számára, de ő csak beborította a cseplesszel az autotranszplantált bélsegmentet, és homograftokat. Hat héttel a műtétek után az izomréteget minden esetben, a bélfal minden rétegét csak kevesebb esetben azonosította. A homograftok kilökődését tapasztalta [Klos, 1977.].

Az általunk használt műtéti technika során meghasítjuk a cseplesz elülső lemezét, és a kialakított fészekbe helyezzük, majd öltéssel is rögzítjük fix helyen a béldarabokat, nemcsak beborítjuk cseplesszel. Mindig egy nagycsepleszben futó ér mellé transzplantáltuk a graftokat.

A cseplest többek között három tulajdonsága teszi alkalmassá a transzplantáció számára: a vena portae-n történő vér elvezetés, a cseplesz baktériumellenes funkciója („a hasüreg rendőre”), és főként különleges képessége a revascularisációra. Levy igazolta a cseplezből kivont angiogen faktor neoangiogenetikus hatását [Levy és mtsai, 1998.].

Az egér modelleknek több általános előnye van más állatfajokon létrehozott kísérleti modellekkel szemben:

- 1./ Számos *genetikailag módosított egértörzset* ismerünk. Léteznek congenicus, transgenicus és knock out törzsek, melyek segítségével acut, chronikus rejectió modellek kialakítására, graft versus host folyamatok tanulmányozására nyílik lehetőség.
- 2./ Sokféle *monoklonális, poliklonális antitest* ismert a különböző beltenyésztett és kültenyésztett egér törzsek számára.
- 3./ A kis testtömeg miatt *kisebb mennyiségben* szükséges a különböző gyógyszerek, vegyszerek, reagensek, antitestek alkalmazása.
- 4./ A *tartási költségek* alacsonyabbak más állatoknál. Az egerek helyigénye kicsi, szaporodási képességük nagy [Timmermann és mtsai, 1998.].

Az egér modellek általános előnye mellett az *általunk kialakított modell előnyei:*

- 1./ Kivitelezése műtétechnikai szempontból egyszerű, viszonylag gyors.
- 2./ Nincs szükség éranastomosisok kialakítására.
- 3./ Egy nap alatt megerőltetés nélkül több mint 10 transplantációt lehet elvégezni, összehasonlítva a klasszikus szerv transplantációval, ahol éranastomosisokat kell készíteni.
- 4./ A modell alkalmas lehet újabb immunszuppresszáns gyógyszerek tesztjeire, az összejt kutatás számára is.
- 5./ Ideális a xenotransplantációs kutatások számára, amikor különböző fajok, különböző méretű szerveinek átültetésére kerül sor.
- 6./ Fontos előny, hogy a *szerv méretbeli különbsége nem jelent problémát.*
- 7./ Nemcsak egyetlen szerv számára alkalmas, hanem különböző szervek befogadására használható.

8. MIKROSEBÉSZETI ALAPOK OKTATÁSI TEMATIKÁJÁNAK TOVÁBB FEJLESZTÉSE TRANSPLANTATIÓS KUTATÁSOKHOZ

A mikrosebészet -mint a minimálisan invazív technikák egyike a laparoscopos beavatkozások mellett- a sebészet intenzíven fejlődő ágazata.

Mikrosebészeti beavatkozásokon értendő mindazon ténykedések összessége, melyeket optikai nagyítással -lupe vagy operáló mikroszkóp- az e feladatokra létrehozott eszközök, műszerek, sebészeti segédanyagok segítségével gyógyítási vagy kutatási céllal hajtanak végre.

A mikrosebészeti operációs technikákat számos manuális szakma alkalmazza: szemészet, idegsebészet, fül-orr-gégészet, szívsebészet, plasztikai- és helyreállító sebészet, ortopédia, traumatológia, kézsebészet, szülészet-nőgyógyászat, urológia, transzplantációs sebészet és gyermeksebészet.

Egyre nagyobb számban folynak olyan szerteágazó kutatások, melyek kis laboratóriumi állatokon -patkány, egér- mikroszkóp alatt történő beavatkozásokat igényelnek. Ezért nagy igény alakult ki a megfelelően képzett, mikrosebészeti technikában jártas szakemberek iránt, hiszen a mikrosebészeti módszerek alkalmazásával minimálisra csökkenthetők a beavatkozások okozta kockázatok, növelve a sebészi biztonságot.

8.1. A mikrosebészeti alapok elsajátításához szükséges oktatási tematika

A haladó mikrosebészeti műtéti technikát igénylő egér vékonybél transzplantatio nehézségei, és a tranplantatio kapcsán kialakuló szövődmények számának csökkentése céljából egy egyszerű modellt alakítottunk ki, melynek elsajátításához elegendő alapjártasság a mikrosebészetben.

A mikrosebészeti alapok elsajátításának ismert és bevált módszere a Furka által kidolgozott [Mikó és mtsai, 2001.(a); Furka és mtsai, 2006.(a), 2006.(b)] metodika, mely szinkron, aktív, videoasszisztált, individualis, önkontrollos és analizáló jellegű.

Az alaptechnikák elsajátítása ún. „száraz training” során történik:

A gyakorlatok tematikája a következő: az első gyakorlaton a mikrosebészet történetét, alkalmazási területeit: műtéti és kísérleti kis laboratóriumi állatmodellek szerepét ismertetjük. A második gyakorlat során az operáló mikroszkópok, a mikrosebészeti műszerek -ollók, tűfogók, csipeszek, approximátorok-, a mikrosebészeti varróanyagok és tűk bemutatása történik.

Ezután a műtői gyakorlatok következnek, melyek során az első, alapvető feladat a szemkéz összhangjának megteremtése a mikroszkóp alatt, különböző nagyítások mellett. A nagyítások mértékének beállítása a mikroszkóp típusától is függ, általában 6x, 10x, 16x és 40x nagyításokat jelentenek. A következő gyakorlatok feladatai a biztonságos „mélységérzés” elsajátítását segítik elő: betűkapargatás újságpapírról, gézszálak vezetése mikrosebészeti műszerekkel. Ezt követik a mikrosebészeti varrat- és csomózási technikák elsajátítását biztosító gyakorlatok: öltésbehelyezés gumikesztyűbe, gumikesztyű-ujjon ejtett metszés zárása, varratsorok készítése különböző irányokban. Az érvarratok és egy egyszerű end-to-end éranastomosis technika készítése kísérleti állatokból eltávolított arteria femoralis biomodellel.

Ezután következnek az élő szöveten történő beavatkozások. Feladat a patkány aorta abdominalisának rekonstrukciója: intraperitonealis anaesthesiát követően median laparotomia, aorta abdominalis infrarenalis szakaszának preparálása, majd end-to-end éranastomosis készítése a „száraz trainingek” során begyakorolt technika szerint [Mikó és mtsai, 2001.(a); Furka és mtsai, 2006.(a), 2006.(b)].

Az alaptanfolyamokon általában eddig a szintig jutnak el a résztvevők. A fenti módszer elsajátítása elegendő mikrosebészeti jártasságot ad a kísérletezőnek, hogy az általunk leírt modellt biztonsággal végezhesse.

Amennyiben a mikrosebészeti alaptechnikát már elsajátította a résztvevő, akkor lépésről lépésre haladhat előre a komolyabb technikai felkészültséget igénylő mikrosebészeti műtéti beavatkozások irányába.

A patkány aorta abdominalisa mellett a vena cava caudalis rekonstrukciójának elvégzése is új nehézségi fokozatot jelent.

Ezt követheti a patkány arteria femoralisán, majd carotis communisán kivitelezett end-to-end, end-to-side éranastomosisok elsajátítása, begyakorlása.

Az ún. „száraz training” elősegíti az élőben való gyakorlást, ez egyben állatkíméleti módszer is, s az élet tisztelete mellett biztosítja az Állatvédelmi Törvény egyik alapvető szabályát, - a *3R szabályt*- azaz: Reduction, Refinement, Replacement betartását is [Russell és Burch, 1959.].

A fokozatosság igen fontos, mert ha valaki egyből élő állatban akar anastomosisot csinálni, igen ritka kivételtől eltekintve ez az első próbálkozás sikertelen lesz még akkor is, ha komoly sebészi gyakorlattal rendelkezik az illető. Az a tapasztalat, hogy a technika lépésről-lépésre való elsajátítása, a türelmes munka, a kitartás vezethet csak sikerélményhez a sebészet ezen igen nehéz, de csodálatos világában. [Furka és mtsai, 2006.(a), 2006.(b)]

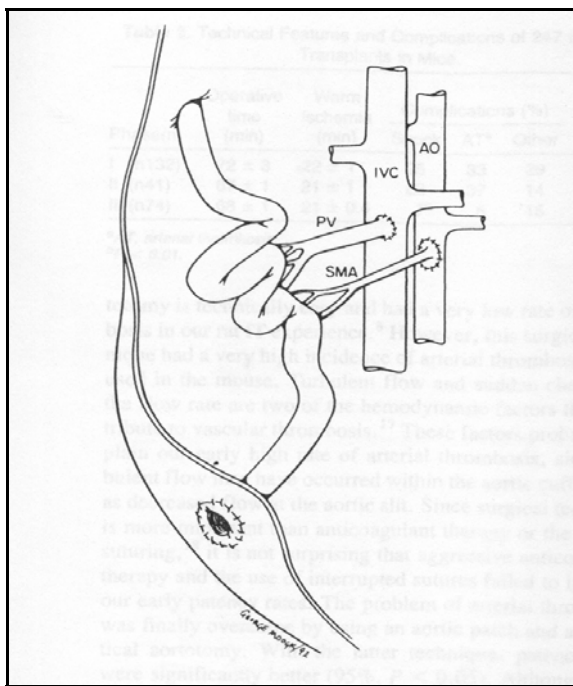
8.2. A haladó mikrosebészeti ismereteket igénylő vékonybél transzplantatio elsajátításához szükséges oktatási tematika

Az összehasonlítás és jobb megértés érdekében röviden ismertetem az eredeti -éranastomosisokkal készített- ún. „vascularis” mikrosebészeti vékonybél transzplantációs modell módszerét, összehasonlításként az általunk kialakított avascularis egér vékonybél transzplantációs modellünkkel, s modellünk előnyeinek igazolására. A Zhong által leírt [Zhong és mtsai, 1993.(a), 1993.(b)] egereken végzett vascularis vékonybél transzplantációs modell fontosabb lépéseit, komplikációit a teljesség igénye nélkül ismertetem, melyet lehetőségem nyílt a modell kialakítójától megtanulni és alkalmazni azt egy korábbi, hosszabb idejű tanulmányutam kapcsán.

A módszer lényegét a 24. ábra szemlélteti, fő műtéttechnikai lépései a következők:

A *donor műtétek* során medián laparotomiát követően első lépésként a vastagbelet és az ileumot eltávolítjuk, majd a proximális jejunumot (a teljes béltraktus mintegy 50%-a) azonosítjuk, és a mesenterialis ereket lekötjük.

A vena portae-t gondosan elválasztjuk a pancreastól, ezután kipreparáljuk az aortát és a truncus coeliacust lekötjük, továbbá a vena lienalist szintén lekötjük. Vékony tűvel az aorta infrarenalis szakaszát megsúrjuk, majd a kiválasztott graftot 0,2-0,4 ml 4°C-os heparinos Ringer-laktát infúzióval átmoszuk. Ezután a vena portae-t a máj hilushoz közel átvágjuk. Carrel szerinti patch technikának megfelelően az aortát szintén átvágjuk, majd a graftot nedves gézbe csavarva jeges, 4°C-os Ringer-laktátba helyezük és felhasználásáig tároljuk.



24. ábra

Vascularis vékonybél transplantációs modell Zhong szerint

[Zhong és mtsai, 1993.(a)]

IVC – vena cava inferior, AO – aorta abdominalis,
PV – vena portae, SMA – arteria mesenterica superior

A *recipiens műtét* során medián laparotomiát követően az aorta és a vena cava caudalis infrarenalis szakaszát óvatosan kipreparáljuk, majd mind az aorta, mind a vena cava 1 cm-es szakaszát kirekesztjük a keringésből mikrosebészeti klippek segítségével. Ellipszis alakú arteriotomiát és venotomiát készítünk, és a kirekesztett érszakaszokat heparinos

physiologias sóoldattal átöblítjük. A donor vékonybél szakaszt óvatosan a megfelelő pozícióban a recipiens közelébe helyezzük.

Először a donor és a recipiens venát end-to-side anastomosissal egyesítjük 11/0-ás Prolene (polypropylen) varróanyag segítségével, gondosan figyelve, hogy a recipiens vena cava caudalison kialakított ellipszis alakú venotomiás nyílás hossza meghaladja a donor vena cava inferior átmérőjét. A hátsó falat az érsebészetben alkalmazott alapszabállyal ellentétben invertáló öltések segítségével -az éranastomosis készítése során mindig az érfal intima rétegeit fektetjük egymáshoz- az ér lumene felől varrjuk, majd az elülső falat a szabályoknak megfelelően evertáló öltésekkel készítjük el.

Az arteriás szár end-to-side anastomosisának elkészítéséhez szintén 11/0-s Prolennel tova futó öltéseket használunk az előzőekben leírt módszerrel.

A műtét befejezésének egyik lehetősége, hogy az eredeti bélszakaszt érintetlenül hagyva, az átültetett vékonybelet két stoma segítségével vezetjük ki a hasfalra.

A másik lehetőség, hogy az átültetett bélszakasz és az eredeti jejunum között end-to-side anastomosist készítünk, míg a graft másik végét stomaként kiültetjük. A hasüreget egy rétegben zárjuk.

A műtét nagy tapasztalatot igényel a mikrosebészet területén. A vékonybél transplantatio technikájának megtanulása előtt el kell sajátítani az end-to-side éranastomosis készítésének rutinszerű -10-15 percen belüli- kivitelezését.

A tanulási fázisban 100 transplantatiót ajánlott elvégezni az átlag 20-23g testtömegű egereken, hogy a műtét technikai szövődményei ne befolyásolják a transplantatiót követő vizsgálatokat.

Milyen szövődmények lehetnek? *A vékonybéltransplantatio szövődmény lehetőségei:*

Hypovolaemiás és septicus shock

A shock a legáltalánosabb komplikáció egereken vékonybél transplantatiót követően, amely a recipiens halálához vezethet az első 48 órában. A műtét során történt manipulációk

könnyen megsérthetik a bélfal szerkezetét, valamint a béltraktus folyadékkal való átmosása során használt nyomás -magas értéke miatt- szintén könnyen okozhat károsodásokat a bélfal szerkezetében. Az ischaemia-reperfusio kapcsán kialakuló károsító hatások szintén gátolják a fiziologiás bélfal működést, elősegítve a folyadékvesztést, a baktériumok translocációját, ami hypovolaemias vagy septicus shockhoz vezethet.

Arteriás thrombosis

A legáltalánosabb késői komplikáció egerek bél transplantációját követően. A tapasztalatok azt mutatják, hogy a megfelelő sebészi technika fontosabb szerepet játszik a szövődmény elkerülésében, mint az anticoagulans kezelés. Ajánlott nem felszívódó varróanyaggal, tova futó öltésekkel rövid idő alatt elkészíteni az anastomosist, ellentétben a hosszabb ideig tartó csomós öltések behelyezésével.

Stoma necrosis

Ezen komplikáció 4-7 nappal a műtét után jelentkezik, általában mechanikai sérülés, helytelen technika miatt alakul ki. Az obstructio dehydratiót, perforatiót, peritonitist eredményez, amely halálos kimenetelű is lehet.

Ezen szövődmény lehetőségek elkerülését csak a sok-sok gyakorlással szerzett mikrosebészeti jártasság alapozhatja meg, biztosítva a sikeres állatmodell megvalósítását.

A felsorolt komoly szövődmények vetették fel bennünk a lépautotransplantatio már korábban kidolgozott módszerének a kipróbálását -kis módosításokkal- a vékonybél transplantatio „avascularis” típusának megvalósításához, mely technikát a 6.1.2. alfejezetben mutattam be részletesen.

9. FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

I. Keverék kutyákon végzett vizsgálatok során:

1. Keverék kutyákon *egy új műtéti modellt -a kettős, izolált jejunum-segment modellt-* valósítottunk meg a mesenterialis ischaemia-reperfusio okozta károsodások vizsgálatára. A modellben az egyik segment az atraumatikus érleszorítást követően az ischaemia-reperfusió vizsgálatok elvégzését biztosította, míg a másik segment a leszorítás nélküli kontroll lehetőségét szolgálta.
2. Először írtuk le keverék kutyákon *vékonybél nyálkahártyában az ischaemia-reperfusio* kapcsán kialakuló *apoptosis időbeni lefolyását a műtétet követő első 24 órában*. A kettős, izolált jejunum-segment modellen 30 perces ischaemiát követően már a reperfusio 30. percétől sikerült apoptotikus sejteket kimutatni a *vékonybél nyálkahártyában, a legnagyobb mértékben a reperfusio 4. és 6. órájában*.
3. A kettős, izolált jejunum-segment modellen sikeresen vizsgáltuk a különböző *ischaemiás praeconditionálási* protokollok hatékonyságát. Megállapítottuk, hogy a 3x5 perces ischaemiás praeconditionálási protokoll szignifikánsan növelte az *apoptotikus aktivitást*.
4. Először írtuk le az *E-vitamin (25 mg/ttkg) és az allopurinol (50 mg/ttkg)* alkalmazása során az *ischaemia-reperfusio* okozta *apoptosis emelkedését* a bélnyálkahártyában.
5. Következtetésként levonható volt, hogy *ha az ischaemiás inzultus enyhébb*, vagy bizonyos *védőfaktorok (pl. praeconditionálás, allopurinol, E-vitamin)* vannak jelen, az *ischaemiás sejthalál formája nagyobb mértékben apoptosissal történhet*. Gyulladás és szövetkárosodás kisebb mértékben jön létre a szövetekben, *kedvezőbb a feltételeket biztosítva a szövetregeneráció számára*. A modellünkben talált eredmények magyarázatot adhatnak az irodalomban leírt feltételezésre is, mely szerint az E-vitamin az NF- κ B aktivációját gátolva fokozhatja az apoptosist a bél nyálkahártyájában az ischaemia-reperfusio kapcsán kialakuló sérülésekben.

6. Keverék kutyákon 30 perces arteria mesenterica superior leszorítása során végzett haemorheologiai filtrometriás vizsgálatok eredményeink kapcsán elsőként hívtuk fel a figyelmet arra, hogy a postoperatív 3. napon -az esetleges szövődmény lehetőségek felmerülése kapcsán- kiemelkedően fontos lehet a *vörösvérsejtek deformabilitásának vizsgálata*, ami jelző értékű adatokat szolgáltat a vékonybél műtétet követő állapotáról, a műtéti beavatkozással együtt járó ischaemia-reperfúziós károsodások mértékéről, korán jelezve a vékonybél érintettségét, valamint a *mikrokeringés esetleges károsodását*.

II. Outbred patkányokon végzett vizsgálatok során:

7. Elsőként hívtuk fel a figyelmet outbred patkányokban a 30 perces mesenterialis ischaemia és az azt követő 60 perces reperfúzió haemorheologiai ektacytometriás és aggregometriás vizsgálata kapcsán arra, hogy a mesenterialis régióból a keringés újraindulásakor *rheologiailag lényegesen rosszabb minőségű vér áramlik a test többi részére*. Igazoltuk több haemorheologiai paraméter -*vörösvérsejt deformabilitás, a vörösvérsejt aggregatio, a haematocrit, átlagos vörösvérsejt térfogat- lokális szignifikáns* romlását a szisztémás keringéshez képest. Ezen haemorheologiai vizsgálatok segítséget nyújthatnak az ischaemia-reperfúzió kapcsán megváltozó rheologiai paraméterek komplex pathomechanismusának megértéséhez, s olyan adatokat szolgáltathatnak, melyek segíthetik a -mesenterialis ischaemiás okok miatt- esetleg kritikus állapotban lévő betegek klinikai kezelését, gyorsabb rehabilitációját.

III. Inbred egereken végzett vizsgálatok során:

8. *Új költség-hatékony „avascularis” vékonybél transplantációs technikát* dolgoztunk ki *inbred egerekben*, a korábban tanszékünkön kidolgozott lép-autotransplantációs technika részbeni módosításával.

9. Az „*avascularis*” *vékonybél transzplantációs technikát* alkalmazva makroszkópos és mikroszkópos vizsgálatokkal igazoltuk a *nagycseplezbe* helyezett vékonybél darabok életképességét. A bélfal minden rétegét sikerült azonosítani és igazoltuk a transzplantált béldarabkák mirigyhám működését is a mucintermelés kimutatásával. A modell alkalmas lehet újabb immunszuppresszáns gyógyszerek tesztjeire, összejt- és xenotranszplantációs kutatások számára.
10. Egereken történő kísérleti munkához kidolgozásra került a haladó mikrosebészeti ismereteket igénylő vékonybél transzplantatio elsajátításához szükséges oktatási tematika, felhívva egyúttal a figyelmet a szövődmény lehetőségekre is.

10. ÖSSZEFOGLALÁS

A mesenterialis ischaemia-reperfusio napjainkban is komoly klinikai probléma, amely a bélrendszeren végzett műtétek, különböző mesenterialis kórállapotok, valamint vékonybél transzplantatio során a túlélés meghatározó tényezője lehet. A mesenterialis ischaemia-reperfusio pathomechanizmusának további megértése és a kísérletes transzplantációs modellek technikai problémáinak javítása érdekében három laboratóriumi állatfajon végeztük kísérleteinket.

Az I. kísérletes modellben keverék kutyákban a kettős, izolált jejunum-segmenetek kialakítása kapcsán megállapítottuk, hogy a 30 perces ischaemiát követően a reperfusio 4. és 6. órájában a legnagyobb a vékonybél nyálkahártyában az apoptotikus aktivitás.

Továbbá a 3x3 perces és 3x5 perces ischaemiás praecondicionálás, az E-vitamin (25 mg/ttkg), az allopurinol (50 mg/ttkg) alkalmazása -feltételezésünkkel ellentétesen- az ischaemia-reperfusio okozta apoptosis emelkedését eredményezte a bélnyálkahártyában.

A II. kísérletes modellben keverék kutyákban az arteria mesenterica superior 30 perces leszorítását követő reperfusio során filtrometriás mérésekkel igazoltuk a vörösvérsejtek deformálhatóságának romlását, mely a postoperatív 3. napon mutatkozott.

A III. kísérletes modellben kültenyésztett patkányokban 30 perces mesenterialis ischaemia és az azt követő reperfusio kapcsán ektacytometriás mérésekkel a vörösvérsejtek deformabilitása szignifikánsan romlott, a vörösvérsejt aggregatio, a haematocrit, az átlagos vörösvérsejt térfogat és a fehérvérsejtszám szignifikánsan emelkedett a lokális (vena portae) vérmintákban a szisztémás (vena cava caudalis) keringésből nyert mintákhoz képest.

A IV. kísérletes modellben „avascularis” vékonybél transzplantációs inbred egér modell kialakítása során igazoltuk a nagycsepleszbe helyezett vékonybél darabok életképességét. A modell kivitelezése műtéttechnikai szempontból egyszerű, gyors. Nincs szükség éranastomosisok kialakítására. Egyúttal a vékonybél transzplantációs kísérleteket segítő haladó mikrosebészeti oktatási tematika is kidolgozásra került.

11. SUMMARY

Mesenterial ischemia-reperfusion injury is still a serious clinical problem which can be the determining factor of survival in gastrointestinal tract surgery, different mesenterial diseases and small bowel transplantation. In order to perceive the pathomechanism of mesenterial ischemia-reperfusion and to improve the technical problems of the experimental transplantation models we performed our research on three different laboratory animal species.

In case of the *first experimental model* due to creating isolated double jejunum-segments on mongrel dogs we found out that the greatest apoptotic activity was detected at the 4th and 6th hour of reperfusion after 30 minutes ischemia in the mucosa of the small intestine.

It was also stated that application of the *3x3 and 3x5 minutes ischemic preconditioning, Vitamin E (25 mg/bwkg), Allopurinol (50 mg/bw/kg)* resulted in *increased apoptosis* caused by *ischemia-reperfusion* in the mucosa in contrast to our hypothesis.

In the *second experimental model* on mongrel dogs during the reperfusion after 30 minutes ischemia of the superior mesenteric artery we verified *the worsening of the red blood cell deformability* by filtrometric measuring on the 3rd postoperative days.

In the third *experimental model* on outbred rats, 30 minutes of mesenterial ischemia followed by reperfusion resulted in *significant decreasing of red blood cell deformability* measured by ektacytometer; the *red blood cell aggregation, the hematocrit, the mean corpuscular volume and the white blood cell count values were significantly increased* in *local* venous blood (portal vein) compared to the *systemic* venous blood (caudal caval vein).

In the fourth experimental „avascular” small bowel transplantation model on inbred mice we proved the viability of the small intestine chips implanted into the *greater omentum*. The design of this operation technique *is a simplified and quick model without any vascular anastomosis*. In connection with this model we also developed an *advanced microsurgical educational protocol* to help the small bowel transplantation experiments.

12. IRODALOMJEGYZÉK

12.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Akdemir H., Asik Z., Pasaoglu H., Karakucuk I., Oktem I.S., Koc R.K.: The effect of allopurinol on focal cerebral ischaemia: an experimental study in rabbits. *Neurosurg. Rev.* 2001;24:131-135.
2. Anaya-Prado R., Toledo-Pereyra L.H., Lentsch A.B., Ward P.A.: Ischemia/reperfusion injury. *J. Surg. Res.* 2002. 105. 248-258.
3. Baskurt O.K., Temiz A., Meiselman H.J.: Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties. *Free Rad. Biol. Med.* 1998. 24. 102-110.
4. Baskurt O.K., Meiselman H.J.: Blood rheology and hemodynamics. *Semin. Thromb. Hemostas.* 2003. 29. 435-450.
5. Bernát S.I., Bogár L., Csornai M., Imre S., Juricskay I., Kollár L., Novák Z., Pécsvárady Zs., Pongrácz E., Rozsos I., Tóth K.: Módszertani útmutató a haemorheologiai mérések végzéséhez. *Érbetegségek* 2005. Suppl 1. 27-33.
6. Bernát S. I., Pongrácz E. (eds.): *A klinikai haemorheologia alapjai.* Kornétás Kiadó, Budapest, 1999.
7. Bogár L.: Diagnosztika. In: Bernát S. I., Pongrácz E. (eds.): *A klinikai haemorheologia alapjai.* Kornétás Kiadó, Budapest, 1999, pp. 33-50.
8. Borges F., Fernandes E., Roleira F.: Progress towards the discovery of xanthine-oxidase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 2002;9:195-217.
9. Boros M., Kaszaki J., Nagy S.: Oxygen free radical induced histamine release during intestinal ischemia and reperfusion. *Eur. Surg. Res.* 1989;21:297-304.
10. Boros M., Kaszaki J., Ördögh B., Nagy S.: Intramucosal pH changes following complete segmental ischemia, as compared with the effects of superior mesenteric artery occlusion. *Eur. Surg. Res.* 1994;26:76-86.
11. Boros M., Takaichi S., Hatanaka K.: Ischemia time dependency of reperfusion injury following complete arterial occlusion of the rat small intestine. *Transplant. Proc.* 1995;27:2789-2790.
12. Boros M.: Microcirculatory dysfunction during intestinal ischemia-reperfusion. *Acta Physiol. Hung.* 2003;90:263-279.
13. Bradbury A.W., Brittenden J., McBride K., Ruckley C.V.: Mesenteric ischaemia: a multidisciplinary approach. *Br. J. Surg.* 1995;82:1446-1459.
14. Bruin R.W.F. de, Heineman E., Marquet R.L.: Small bowel transplantation: an overview. *Transpl. Int.* 1994;7:47-61.
15. Burton G.W., Ingold K.U., Cheeseman K.H., Slater T.F.: Application of deuterated alpha-tocopherols to the biokinetics and bioavailability of vitamin E. *Free Radic. Res. Commun.* 1990;11:99-107.
16. Buttke T.M., Sandstrom P.A.: Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* 1994;15:1-4.
17. Carrel A.: La technique opératoire des anastomoses vasculaires et le transplantation des viscères. *Lyon med.* 1902;98:859-865.
18. Carrel A.: The transplantation of organs. A preliminary communication. *JAMA* 1905;45:1645-1645.
19. Chang J.B., Stein T.A.: Mesenteric Ischemia: acute and chronic. *Ann. Vasc. Surg.* 2003;17:323-328.
20. Chattopadhyay A., Bandyopadhyay D.: Vitamin E in the prevention of ischemic heart disease. *Pharmacol. Rep.* 2006;58:179-187.
21. Chaumontet C., Bex V., Veran F., Martel P.: The vitamin E analog tocopherol succinate strongly inhibits gap junctional intercellular communication in rat liver cells (IAR203). *J. Nutr. Biochem.* 2008;19:263-268.

22. Chien C.T., Chen C.F., Hsu S.M., Lee P.H., Lai M.K.: Protective mechanism of preconditioning hypoxia attenuates apoptosis formation during renal ischemia/reperfusion phase. *Transplant Proc.* 1999;31:2012-2013.
23. Chiu C.J., McArdle A.H., Brown R., Scott H.J., Gurd F.N.: Intestinal mucosal lesion in low-flow states. A morphologic, hemodynamic and metabolic reappraisal. *Arch. Surg.* 1970;101:478-483.
24. Cinel I., Avlan D., Cinel L., Polat G., Atici S., Mavioglu I., Serinol H., Aksoyek S., Oral U.: Ischemic preconditioning reduces intestinal epithelial apoptosis in rats. *Shock* 2003;19:588-592.
25. Cochrane J., Williams B.T., Banerjee A., Harken A.H., Burke T.J., Cairns C.B., Shapiro J.I.: Ischemic preconditioning attenuates functional, metabolic, and morphologic injury from ischemic acute renal failure in the rat. *Ren. Fail.* 1999;21:135-145.
26. Cohen J.J.: Apoptosis: physiologic cell death. *J. Lab. Clin. Med.* 1994;124:761-765.
27. Cohen P.J.: Allopurinol administered prior to hepatic ischaemia in the rat prevents chemiluminescence following restoration of circulation. *Can. J. Anaesth.* 1992;39:1090-1093.
28. Coopersmith C.M., O'Donnell D., Gordon J.I.: Bcl-2 inhibits ischemia-reperfusion-induced apoptosis in the intestinal epithelium of transgenic mice. *Am. J. Physiol.* 1999;276:G677-G686.
29. Deltz E.: Current status of small bowel transplantation. *Ann. Med.* 1991;23:507-508.
30. Demirbas A., Bozoklu S., Ozdemir A., Bilgin N., Haberal M.: Effect of alpha-tocopherol on the prevention of reperfusion injury caused by free oxygen radicals in the canine kidney autotransplantation model. *Transplant. Proc.* 1993;25:2274-2274.
31. Dormandy J., Flute P., Mátrai A., Bogár L., Mikita J.: The new St. George's blood filterometer. *Clin. Hemorheol.* 1985. 5. 975-983.
32. Fehér J., Vereckei A.: Szabadgyök reakciók jelentősége az orvostudományban. *Biogal Gyógyszergyár*, 1985.
33. Ferencz A., Afsin T., Kalmár-Nagy K., Szántó Z., Róth E., Horváth Ö.P.: Az oxidatív stressz monitorozása kísérletesen létrehozott vékonybél autotranszplantációt követően. *Magy. Seb.* 2001;54:60-64.
34. Ferencz A., Szántó Z., Borsiczky B., Kiss K., Kalmár-Nagy K., Telek G., Szeberényi J., Horváth Ö.P., Róth E.: The effects of preconditioning on the oxidative stress in small-bowel autotransplantation. *Surgery* 2002;132:877-884.
35. Ferencz A., Szántó Z., Kalmár-Nagy K., Horváth Ö.P., Róth E.: Mitigation of oxidative injury by classic and delayed ischemic preconditioning prior to small bowel autotransplantation. *Transplant. Proc.* 2004;36:286-288.
36. Fésüs L., Tóth R., Mádi A.: Az apoptóziskutatás története. In: *Apoptózis, 2002.* pp. 15-34. szerk. Kopper L., Fésüs L., Medicina Könyvkiadó RT. Budapest
37. Fukuyama K., Iwakiri R., Noda T., Kojima M., Utsumi H., Tsunada S.: Apoptosis induced by ischemia-reperfusion and fasting in gastric mucosa compared to small intestinal mucosa in rats. *Dig. Dis. Sci.* 2001;46:545-549.
38. Furka A., Nemeth N., Gulyas A., Brath E., Peto K., Takacs I.E., Furka I., Sapy P., Miko I.: Hemorheological changes caused by intermittent Pringle (Baron) maneuver in beagle canine model. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2008;40:177-189.
39. Furka I., Bráth E., Németh N., Mikó I.: Learning microsurgical suturing and knotting techniques: comparative data. *Microsurgery* 2006;26:4-7.(a)
40. Furka I., Bráth E., Németh N., Mikó I.: Gondolatok a mikrosebészeti oktatásról. Mire volt elég az 5460 óra a mikrosebészeti alapoktatásban? *Magy. Seb.* 2006;59:147-151.(b)
41. Garcia B., Zhong R., Wijsman J., Wang P., Chen H., Sutherland F., Duff J., Grant D.: Pathological changes following intestinal transplantation in the rat. *Transplant. Proc.* 1990;22:2469-2470.
42. Godin D.V., Garnett M.E.: Altered antioxidant status in the ischemic/reperfused rabbit myocardium: effects of allopurinol. *Can. J. Cardiol.* 1989;5:365-371.
43. Grace P.A.: Ischaemia-reperfusion injury. *Br. J. Surg.* 1994;81:637-647.

44. Granger D.N.: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia/reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* 1988;255:H1269-1275.
45. Granger D.N., Hollwarth M.E., Parks D.A.: Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 1986;548:47-63.(a)
46. Granger D.N., Korthuis R.J.: Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu. Rev. Physiol.* 1995;57:311-332.
47. Granger D.N., McCord J.M., Parks D.A., Hollwarth M.E.: Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology* 1986;90:80-84.(b)
48. Granger D.N., Rutili G., McCord J.M.: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981;81:22-29.
49. Granger D.N., Senett M., McElearney P.: Effect of local arterial hypotension on cat intestinal capillary permeability. *Gastroenterology* 1980;79:474-480.
50. Grant D.: Intestinal transplantation: current status. *Transplant. Proc.* 1989;21:2869-2871.
51. Grant D.: Current results of intestinal transplantation. *Lancet* 1996;347:1801-1803.
52. Grant D., Wall W., Mimerault R., Zhong R., Ghent C., Garcia B., Stiller C., Duff J.: Successful small-bowel/liver transplantation. *Lancet* 1990;335:181-184.
53. Haglund U.: Gut ischaemia. *Gut* 1994;25:S73-S76.
54. Haglund U., Bergqvist D.: Intestinal ischemia – the basics. *Langenbeck's Arch. Surg.* 1999;384:233-238.
55. Horváth E., Szabó Cs.: A sejthalál mechanizmusai: apoptózis vagy nekrosis? *Praxis* 2005;9:10-19.
56. Hotter G., Closa D., Prados M., Fernández-Cruz L., Prats N., Gelpí E., Roselló-Catafau J.: Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996;222:27-32.
57. Ikeda H., Suzuki Y., Suzuki M., Koike M., Tamura J., Tong J.: Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut* 1998;42:530-537.
58. Ilhan H., Alatas O., Tokar B., Colak O., Pasaoglu O., Koku N.: Effects of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody, allopurinol, and methylene blue on intestinal reperfusion injury. *J. Pediatr. Surg.* 2003;38:1591-1595.
59. Ishida T., Yakimuzu K., Gute D.C., Korthuis R.J.: Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock* 1997;8:86-94.
60. Iwamoto T., Miura T., Adachi T., Noto T., Ogawa T., Tsuchida A., Iimura O.: Myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning was not attenuated by oxygen free-radical scavengers in the rabbit. *Circulation* 1991;83:1015-1022.
61. Karwinski W., Farstad M., Ulvik R., Soreide O.: Sixty-minute normothermic liver ischemia in rats. Evidence that allopurinol improves liver cell energy metabolism during reperfusion but that timing of drug administration is important. *Transplantation* 1991;52:231-234.
62. Karwinski W., Bolann B., Ulvik R., Farstad M., Soreide O.: Normothermic liver ischemia in rats: xanthine oxidase is not the main source of oxygen free radicals. *Res. Exp. Med. (Berl).* 1993;193:275-283.
63. Kato Y., Yamataka A., Yagita H., Okumura K., Fujiwara T., Miyano T.: Specific acceptance of fetal bowel allograft in mice after combined treatment with anti-intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte function-associated antigen-1 antibodies. *Ann. Surg.* 1996;223(1):94-100.
64. Kayar E., Mat F., Meiselman H.J., Baskurt O.K.: Red blood cell rheological alterations in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Biorheology* 2001. 38. 405-414.
65. Kerr J., Wyllie A., Currie A.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972;26:239-257.

66. Klos I.: Avascular transplantation of small bowel in newborn piglets. *J. Pediatr. Surg.* 1977;12:43-48.
67. Kong S.E., Blennerhassett L.R., Heel K.A., McCauley R.D., Hall J.C.: Ischaemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust. NZ J. Surg.* 1998;68:554-561.
68. Koppensteiner R.: Blood rheology in emergency medicine. *Semin. Thromb. Hemost.* 1996. 22. 89-91.
69. Kopper L., Fésüs L.: Apoptózis. *Medicina Könyvkiadó RT. Budapest.* 2002.
70. Lane G.J., Yamataka A., Kato Y., Miyazaki E., Kobayashi H., Miyano T.: Multiple bowel atresias after syngeneic fetal small bowel transplantation in rats. *J. Pediatr. Surg.* 1998;33:896-898.
71. Levy Y., Mikó I., Hauck M., Mathesz K., Furka I., Orda R.: Effecte of omental angiogenic lipid factor on revascularization of autotransplanted spleen in dogs. *Eur. Surg. Res.* 1998;30:138-143.
72. Li G. C., Vasquez B.S., Gallagher K.P., Lucchesi B.R.: Myocardial protection with preconditioning. *Circulation* 1990;82:609-619.
73. Lillehei R.C., Gott B., Miller F.A.: The physiologic response of the small bowel of the dog to ischemic including prolonged in vitro presentation of the bowel with successful replacement and survival. *Ann. Surg.* 1959;150:543-560.
74. Lindsay S., Liu T.H., Xu J.A., Marshall P.A., Thompson J.K., Parks D.A., Freeman B.A., Hsu C.Y., Beckman J.S.: Role of xanthine dehydrogenase and oxidase in focal cerebral ischemic injury to rat. *Am. J. Physiol.* 1991;261:H2051-2057.
75. Liu H., McPherson B.C., Yao Z.: Preconditioning attenuates apoptosis and necrosis: role of protein kinase C epsilon and-delta isoforms. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001;281:H404-410.
76. Majno G., Ames III. A., Chiang J.: No reflow after cerebral ischaemia. *Lancet* 1967;2:569-570.
77. Majno G., Joris I.: Apoptosis, oncosis and necrosis: an overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 1995;146:3-15.
78. Marber M.S., Latchman D.S., Walker J.M., Yellon D.M.: Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993;88:1264-1272.
79. Massberg S., Messmer K.: The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant. Proc.* 1998;30:4217-4223.
80. Massey V., Komai H., Palmer G., Elion G.B.: On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo[3,4-d]pyrimidines. *J. Biol. Chem.* 1970;245:2837-2844.
81. McBride W.J., Sartorelli K.H., Vane D.W.: Allogeneic fetal intestinal transplantation with KF506 immunosuppression. *J. Pediatr. Surg.* 1998;33:932-934.
82. McConkey D.J.: Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol. Lett.* 1998;99:157-168.
83. McCord J.M.: Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 1985;312:159-163.
84. Megison S.M., Horton J.W., Chao H., Walker P.B.: High dose versus low dose enteral allopurinol for prophylaxis in mesenteric ischemia. *Circ. Shock* 1990;30:323-329.
85. Middleton S.J., Jamieson N.V.: The current status of small bowel transplantation in the UK and internationally. *Gut* 2005;54:1650-1657.
86. Mikó I., Bráth E., Furka I.: Basic Teaching in microsurgery. *Microsurgery* 2001;21:121-123.(a)
87. Mikó I., Bráth E., Furka I., Kovács J., Zong R.: Spleen autotransplantation in mice: A novel experimental model for immunology study. *Microsurgery* 2001;21:140-142.(b)

88. Mikó I., Bráth E., Németh N., Tóth F. F., Sipka S., Kovács J., Sipka S., Fachel J., Furka A., Furka I., Zhong R.: Hematological, hemorheological, immunological and morphological studies of spleen autotransplantation in mice: preliminary results. *Microsurgery* 2003;23:483-488.
98. Mikó I., Serfőző J., Kappelmayer J., Sipka S., Furka A., Imre S., Galuska L., Kovács J., Bráth E., Pető K., Németh N., Furka I.: Megmenthető-e a sérült lép? 20 év kutatási eredményei. *Magy. Seb.* 2005. 58. 69-73.
99. Mohandas N., Chasis J.A.: Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin. Hematol.* 1993;30:171-192.
100. Monchik G. J., Russel P. S.: Transplantation of small bowel in the rat: technical and immunological considerations. *Surgery* 1971;70:693-702.
101. Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A.: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-1136.
102. Murry C.E., Richard V.J., Jennings R.B., Reimer K.A.: Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol.* 1991;260:H796-804.
103. Nanobashvili J., Neumayer C., Fuegl A., Sporn E., Prager M., Polterauer P., Malinski T., Huk I.: Ischaemia/reperfusion injury of skeletal muscle: mechanism, morphology, treatment strategies, and clinical applications. *Eur. Surg.* 2002;34:83-89.
104. Németh N., Lesznyák T., Bráth E., Ács G., Nagy Á., Pap Szekeres J., Furka I., Mikó I.: Changes in microcirculation after ischemic process in rat skeletal muscle. *Microsurgery* 2003;23:419-423.
105. Németh N., Szokoly M., Ács G., Bráth E., Lesznyák T., Furka I., Mikó I.: Systemic and regional hemorheological consequences of warm and cold hind limb ischemia-reperfusion in a canine model. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2004;30:133-145.
106. Németh N., Gulyás A., Bálint A., Pető K., Bráth E., Kiss F., Furka I., Baskurt O.K., Mikó I.: Measurement of erythrocyte deformability and methodological adaptation for small animal microsurgical models. *Microsurgery* 2006;26:33-37.(a)
107. Németh N., Lesznyák T., Szokoly M., Furka I., Mikó I.: Allopurinol prevents erythrocyte impairing but not the hematological alterations after limb ischemia-reperfusion in rats. *J. Invest. Surg.* 2006;19:47-56.(b)
108. Nichols T.C.: NF- κ B and reperfusion injury. *Drug. News Perspect.* 2004;17:99-104.
109. Nicotera P., Leist M., Ferrando-May E.: Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol. Lett.* 1998; 102-103:139-142.
110. Noda T., Iwakiri R., Fujimoto K., Matsuo S., Aw T.Y.: Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. *Am. J. Physiol.* 1998;274:G270-G276.
111. Owens M.L., Lazarus H.M., Wolcott M.W., Maxwell J.G., Taylor J.B.: Allopurinol and hypoxanthine pretreatment of canine kidney donors. *Transplantation* 1974;17:424-427.
112. Parks D., Granger D.: Xanthine oxidase: Biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol. Scand.* 1986;548:87-99.(a)
113. Parks D.A., Granger D.: Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am. J. Physiol.* 1986;250:G749-753.(b)
114. Parks D.A., Bulkley G.B., Granger D.N., Hamilton S.R., McCord J.M.: Ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. *Gastroenterology* 1982;82:9-15.
115. Parks D.A., Williams T.K., Bechman J.S.: Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am. J. Physiol.* 1988;254: G768-G774.
116. Pasupathy S., Homer-Vanniasinkam S.: Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: emerging concepts. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2005;29:106-115.
117. Perner F.: Szervtransplantatio az emésztőrendszerben. In: Kiss J.: *Gastroenterologiai sebészet.* Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2002, pp.155-163.

118. Petó K., Oláh V. A., Bráth E., Németh N., Gulyás A., Szilasi M., Sárvári M., Furka I., Mikó I.: Ischaemia-reperfusion vesekárosodás és az Allopurinol védő hatásának kimutatása vizelet NAG követésével. *Magy. Seb.* 2005;58:134-137.
119. Petó K., Németh N., Bráth E., Takács E. I., Baskurt O. K., Meiselman H. J., Furka I., Mikó I.: The effect of renal ischaemia-reperfusion on hemorheological factors: preventive role of allopurinol. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2007;37:347-358.
120. Quaedackers J.S.L.T., Beuk R.J., Bennet L., Charlton A., Egbrink M.G.A., Gunn A.J., Heineman E.: An evaluation of methods for grading histologic injury ischemia/reperfusion of the small bowel. *Tranplant. Proc.* 2000;32:1307-1310.
121. Ramachandran A., Madesh M., Balasubramanian K.A.: Apoptosis in the intestinal epithelium: Its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000;15:109-120.
122. Reimer K.A., Murry C.E., Yamasawa I., Hill M.L., Jennings R.B.: Four brief periods of ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am. J. Physiol.* 1986;251:H1306-1315.
123. Reinhart W.H., Chien S.: Roles of cell geometry and cellular viscosity in red cell passage through narrow pores. *Am. J. Physiol.* 1985;248:473-479.
124. Reinhart W.H.: Molecular biology and self-regulatory mechanisms of blood viscosity: a review. *Biorheology* 2001;38:203-212.
125. Rezkalla S.H., Kloner R.A.: No-reflow phenomenon. *Circulation* 2002;105:656-662.
126. Riaz A.A., Wan M.X., Schafer T., Dawson P., Menger M.D., Jeppsson B., Thorlacius H.: Allopurinol and superoxide dismutase protect against leucocyte-endothelium interactions in a novel model of colonic ischaemia-reperfusion. *Br. J. Surg.* 2002;89:1572-1580.
127. Ricciarelli R., Zingg J.M., Azz A.: Vitamin E: protective role of a Janus molecule. *FASEB J.* 2001;15:2314-2325.
128. Róth E.: Oxygen free radicals and their clinical implications. *Acta Chir. Hung.* 1997;36:302-305.
129. Rundles R.W.: Effects of allopurinol on 6-mercaptopurine therapy in neoplastic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 1966;25:655-656.(a)
130. Rundles R.W.: Allopurinol in gouty nephropathy and renal dialysis. *Ann. Rheum. Dis.* 1966;25:694-696.(b)
131. Russell W.M.S., Burch, R.L.: *The Principles of Humane Experimental Technique.* Methuen. London. 1959.
132. Schneider C.: Chemistry and biology of vitamin E. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005;49:7-30.
133. Schoenberg M.H., Berger H.G.: Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion. *Chem. Biol. Int.* 1990;76:141-161.
134. Schoenberg M.H., Berger H.G.: Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit. Care Med.* 1993;21:1376-1386.
135. Shah K.A., Shurey S., Green C.J.: Apoptosis after intestinal ischemia-reperfusion injury. A morfological study. *Transplantation* 1997;64:1393-1397.(a)
136. Shah K.A., Shurey S., Green C.L.: Characterization of apoptosis in intestinal ischemia-reperfusion injury: a light and electron microscopic study. *Int. J. Exp. Pathol.* 1997;78:355-363.(b)
137. Sheu J.R., Lee C.R., Hung W.C., Lee Y.M., Chen Y.C., Yen M.H.: Comparison of the relative activities of α -tocopherol and PMC on platelet aggregation and antioxidative activity. *Life Sci.* 1999;65:197-206.
138. Sies H.: Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 1991;91:3C,31S-38S.
139. Sipka S. Jr., Bráth E., Tóth F. F., Fábrián Á., Furka I., Mikó I.: Lép autotransplantatio és lépeltávolítás haematologiai és immunologiai hatásainak összehasonlító vizsgálata egerekben. *Magy. Seb.* 2005;58:84-88.

140. Sipka S. Jr., Bráth E., Tóth F. F., Fábrián Á., Krizsán Cs., Baráth S., Sipka S., Németh N., Bálint A., Furka I., Mikó I.: Distribution of peripheral blood cells in mice after splenectomy or autotransplantation. *Microsurgery* 2006;26:43-49.
141. Sonnino R.E., Teitelbaum D.H., Hannel R.P. Jr.: Cervical small bowel transplantation in the rat: a useful tool. *Microsurgery* 1990;11:309-313.
142. Squiers E.C., Kelley S.E., West J.C.: Small bowel transplantation in the mouse: development of a model. *Microsurgery* 1992;13:345-347.
143. Stuart J.: International Committee for Standardization in Haematology: Guidelines for measurement of blood viscosity and erythrocyte deformability. *Clin. Hemorheol.* 1986; 6:439-454.
144. Stuart J., Nash GB.: Red cell deformability and haematological disorders. *Blood Rev.* 1990;4:141-147.
145. Szabó A., Kaszaki J., Boros M., Nagy S.: Possible relationship between histamine and nitric oxide release in the postischemic flow response following mesenteric ischemia of different duration. *Shock* 1997;7:376-382.
146. Szokoly M., Németh N., Bráth E., Ács G., Hamar J., Mikó I., Furka I.: Kísérletes „funkcionális amputációs modell” lehetősége az ischaemia-reperfusio tükrében. *Magy. Seb.* 2005;58:138-143.
147. Timmermann W., Gassel H.-J., Ulrichs K., Zhong R., Thiede A.: Organtransplantation in Rats and Mice. *Microsurgical Techniques and Immunological Principles*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York., Heidelberg, 1998.
148. Tisinai K., Shedd F., Harris R., Unthank J., Grosfeld J., Abu-Dalu K., Grosfeld J.: Comparison of growth, neovascularization, and enzymatic function of fetal intestinal grafts in the omentum and renal capsule. *J. Pediatr. Surg.* 1990;25:914-916.
149. Todo S., Tzakis A., Abu-Elamagd K., Reyes J., Fung J., Casavilla A., Nakamura K., Yagihashi A., Jain A., Murase N., Iwaki Y., Demetris A. van Thiel D. Starzl T.: Cadaveric small bowel and small bowel-liver transplantation in humans. *Transplantation* 1992;53:369-376.
150. Tóth K., Juricskay I.: Rheologiai alapfogalmak. In: Bernát S. I., Pongrácz E. (eds): *A klinikai haemorheologia alapjai*. Kornétás Kiadó, Budapest, 1999. pp. 13-24.
151. Uchida H., Yoshida T., Kobayashi E., Mizuta k., Fujimura A., Miyata M., Kawarasaki H., Hashizume K.: Experimental small bowel transplantation using newborn intestine in rats: I. Lipid absorption restored after transplantation of nonvascularized graft. *J. pediatr. Surg.* 1999;34;1007-1011.(a)
152. Uchida H., Kobayashi E., Yanagisawa K., Mizuta K., Kitoh Y., Fujimura A., Tominaga S.I., Kawarasaki H., Hashizume K.: Experimental small bowel transplantation using newborn intestine in rats: II.revascularization of newborn intestine is independent of vascular endothelial growth factor. *J. Pediatr. Surg.* 1999;34:1396-1400.(b)
153. Walker M.D., Yellon D.M.: Ischaemic preconditioning: from mechanisms to exploitation. *Cardiovasc. Res.* 1992;26:734-739.
154. Wang X.Y., Quinn P.J.: The location and function of vitamine E in membranes. *Mol. Membr. Biol.* 2000;17:143-156.
155. Weed R.I., La Celle P.L., Merrill E.W.: Metabolic dependence of red blood cell deformability. *J. Clin. Invest.* 1969;48:795-809.
156. Whitehead R.: The pathology of ischemia of the intestines. *Pathol. Annu.* 1976;11:1-52.
157. Yağmurdu M.C., Özdemir A., Coskun T., Kiliñç K., Özenç A.: Effects of α -tocopherol on reperfusion injury in the canine small bowel autotransplantation model. *Transplant. Proc.* 1998;30:824-827.
158. Yağmurdu M.C., Özdemir A., Özenç A., Kiliñç K.: The effects of α -tocopherol and verapamil on mucosal functions after gut ischemia/reperfusion. *Turk. J. Gastroenterol.* 2003;14:26-32.

159. Yasuhara H.: Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. *Surg. Today* 2005;35:185-195.
160. Yellon D.M., Baxter G.F., Garcia-Dorado D., Heusch G., Sumeray M.S.: Ischaemic preconditioning: present position and future directions. *Cardiovasc. Res.* 1998;37:21-33.
161. Zeng L.H., Wu J., Carey D., Wu T.W.: Trolox and ascorbate: are they synergistic in protecting liver cells in vitro and in vivo? *Biochem. Cell Biol.* 1991;69:198-201.
162. Zhang C., Sheng Z.Y., Hu S., Gao J.C., Li J.Y., Yu S., Liu Y.: The role of oxygen-free radical in the apoptosis of enterocytes in scalded rats after delayed resuscitation. *J. Trauma* 2004;56:611-617.
163. Zhang Z., Schlachta C., Garcia B., Stiller C., Duff J., Grant D., Zhong R.: Intestinal transplantation in different mouse strain combinations. *Transplant. Proc.* 1994;26:1532-1532.
164. Zhang Z., Zhu L., Quan D., Garcia B., Ozcay N., Duff J., Stiller C., Lazarovits A., Grant D., Zhong R.: Pattern of liver, kidney, heart and intestine allograft rejection in different mouse strain combinations. *Transplantation* 1996;62:1267-1272.
165. Zhong R., Grant D., Sutherland F., Wang P., Chen H., Lo S., Stiller C., Duff J.: Refined technique for intestinal transplantation in the rat. *Microsurgery* 1991;12:268-274.
166. Zhong R., Zhang Z., Quan D., Duff J., Stiller C., Grant D.: Development of a mouse intestinal transplantation model. *Microsurgery* 1993;14:141-145.(a)
167. Zhong R., Zhang Z., Quan D., Garcia B., Duff J., Stiller C., Grant D.: Intestinal transplantation in the mouse. *Transplantation* 1993;56:1034-1037.(b)

12.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

1. **Bráth E.**, Kovács J., Mikó I., Komár T., Furka I.: Apoptosis caused by ischaemia-reperfusion in the intestinal wall of laboratory animals.
Acta. Chir. Austr. 1998;30(Suppl. Nr. 147):45-46.
2. **Bráth E.**, Furka I., Németh N., Szabó Gy., Pető K., Ács G., Lesznyák T., Cserni T., Papp Szekeres J., Mikó I.: Changes of the red blood cells deformability caused by mesenteric ischemia-reperfusion injury. An experimental animal study.
In: Proceedings of the 37th Congress of the European Society for Surgical Research, 2002. pp. 281-285. Ed: Boros M., Monduzzi Editore, Bologna
3. Mikó I., **Bráth E.**, Furka I., Kovács J., Kelvin D., Zong R.: Spleen autotransplantation in mice: A novel experimental model for immunology study.
Microsurgery 2001;21:140-142. **IF: 0,844**
4. Mikó I., **Bráth E.**, Furka I.: Basic teaching in microsurgery.
Microsurgery 2001;21:121-123. **IF: 0,844**
5. **Bráth E.**, Mikó I., Kovács J., Tóth F. F., Facht J., Furka I.: Multiorgan transplantation with a new organ-chip technique in mice. Preliminary histological data.
Microsurgery 2003;23:466-469. **IF: 0,711**
6. **Bráth E.**, Németh N., Papp L., Békési L., Varga S., Tóth A., Mikó I., Furka I.: Mikrosebészeti oktatás a kutatás és a klinikai gyakorlat szolgálatában.
Magy. Seb. 2005;58:111-115.
7. Furka I., **Bráth E.**, Németh N., Mikó I.: Learning microsurgical suturing and knotting techniques: comparative data.
Microsurgery 2006;26:4-7. **IF: 0,882**
8. **Bráth E.**, Németh N., Kiss F., Sajtos E., Hevér T., Mátyás L., Tóth L., Mikó I., Furka I.: Changes of local and systemic hemorheological properties in intestinal ischemia-reperfusion injury in the rat model.
Microsurgery 2010;30:321-326. **IF: 1,244**
9. **Bráth E.**, Németh N., Kovács J., Pető K., Mikó I., Furka I.: Effects of allopurinol and preconditioning on apoptosis due to ischemia-reperfusion on a double jejunum-segment canine model.
Acta Cir. Bras. Közlésre elfogadva **IF: 0,479**

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktor értéke: 5,004

12.3. Az értekezés témájával összefüggő közlemények jegyzéke

1. Schwabegger A. H., Kronberger P., Obrist P., **Bráth E.**, Mikó I.: Functional Sphincter Ani Externus Substitute Using Free Innervated Latissimus Dorsi Muscle (LDM) Flap: an Experimental Study in Dogs.
In: Reconstructive Microsurgery 2001. pp. 43-44.
Eds.: Fu-Chan Wei, David C. C. Chuang, Hung-Chi Chen, Monduzzi Editore, Bologna

2. Pap Szekeres J., Cserni G., Furka I., Svebis M., Cserni T., **Bráth E.**, Németh N., Mikó I.: Transplantation and microsurgical anastomosis of free omental graft. Experimental animal model of a new operative technique in dogs.
Microsurgery 2003;23:414-418. **IF: 0,711**
3. Németh N., Lesznyák T., **Bráth E.**, Ács G., Nagy Á., Pap Szekeres J., Furka I., Mikó I.: Changes in microcirculation after ischemic process in rat skeletal muscle.
Microsurgery 2003;23:419-423. **IF: 0,711**
4. Németh N., Szokoly M., Ács G., **Bráth E.**, Lesznyák T., Furka I., Mikó I.: Systemic and regional hemorheological consequences of warm and cold hind limb ischemia-reperfusion in a canine model.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 2004;30:133-145. **IF: 0,63**
5. Sipka S. Jr., **Bráth E.**, Tóth F.F., Fábrián Á., Furka I., Mikó I.: Lép autotransplantatio és lépeltávolítás haematologiai és immunologiai hatásainak összehasonlító vizsgálata egerekben.
Magy. Seb. 2005;58:84-88.
6. Pap Szekeres J., Pető K., Németh N., Cserni G., Furka I., Svébis M., Cserni T., **Bráth E.**, Mikó I.: Extraabdominalisan átültetett cseplesz lebeny mikrocirkulációjának intraoperatív vizsgálata laser Doppler flowmetria segítségével kutyán.
Magy. Seb. 2005;58:116-119.
7. Pető K., Oláh V. A., **Bráth E.**, Németh N., Gulyás A., Szilasi M., Sárvári M., Furka I., Mikó I.: Ischaemia- reperfüziós vesekárosodás és az Allopurinol védő hatásának kimutatása vizelet NAG követésével.
Magy. Seb. 2005;58:134-137.
8. Mikó I., Németh N., Sipka S. Jr. **Bráth E.**, Pető K., Gulyás A., Furka I., Zhong R.: Hemorheological follow-up after splenectomy and spleen autotransplantation in mice.
Microsurgery 2006;26:38-42. **IF: 0,882**
9. Sipka S. jr., **Bráth E.**, F Toth F., Aleksza M., Kulcsar A., Fabian Á., Barath S., Balogh P., Sipka S., Furka I., Miko I.: Cellular and serological changes in the peripheral blood of splenectomized and spleen autotransplanted mice.
Transpl. Immunol. 2006;16:99-104. **IF: 2,297**
10. Furka I., **Bráth E.**, Németh N., Mikó I.: Gondolatok a mikrosebészeti oktatásról. Mire volt elég az 5460 óra a mikrosebészeti alapoktatásban?
Magy. Seb. 2006;59:147-151.
11. Schwabegger A. H., Kronberger P., Obrist P., **Bráth E.**, Mikó I.: Functional sphincter ani externus reconstruction for treatment of fecal stress incontinence using free latissimus dorsi muscle transfer with coaptation to the pudendal nerve: preliminary experimental study in dogs.
J. Reconstr. Microsurg. 2007;23:79-85. **IF: 0,722**

12. Pető K., Németh N., **Bráth E.**, Takács E. I., Baskurt O. K., Meiselman H. J., Furka I., Mikó I.: The effect of renal ischaemia-reperfusion on hemorheological factors: preventive role of allopurinol.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 2007;37:347-358. **IF: 0,977**

Az értekezés témájával összefüggő közlemények összesített impakt faktor értéke: 6,93

12.4. Egyéb közlemények jegyzéke

1. Incze D., **Bráth E.**, Pető K., Kovács J., Kuhnyár Á., Sefcsik I., Furka I.: Laparolift használata utáni hasfalelváltozások kísérletes vizsgálata.
In: Bibliomed Medizinische Verlagsgesellschaft mbH. 2000. pp. 11-16.
2. Szűcs G., Tóth I., Bráth E., Gyáni K., Mikó I.: Nyelőcsővel készült süllyesztett és más gyakrabban alkalmazott anasztomózis változatok belső nyomástűrésének vizsgálata modell kísérletekben.
Magy. Seb. 2001;54:239-244.
3. Szűcs G., Tóth I., Bráth E., Gyáni K., Mikó I.: Adatok a nyelőcső és a gyomor reszekciós műtéteinél kézzel varrt anasztomózisok korai fizikai varratbiztonságához.
Magy. Seb. 2001;54: 325-330.
4. Szűcs G., Barna T., Tóth I., **Bráth E.**, Gyáni K., Incze D., Mikó I.: Süllyesztett anasztomózisok gyógyulásának vizsgálata állatkísérletekben.
Magy. Seb. 2003;56:73-79.
5. Szűcs G., Tóth I., Barna T., **Bráth E.**, Gyáni K., Mikó I.: Operation technique and healing process of telescopic ileocolostomy in dogs.
Acta Vet. Hung. 2003;51:539-550. **IF: 0,535**
6. Szűcs G., Tóth I., Barna T., **Bráth E.**, Gyáni K., Mikó I.: Experimental examination of the healing process of the telescopic esophageal anastomosis.
Dis. Esoph. 2003;16:229-235. **IF: 0,809**

Egyéb közlemények összesített impakt faktor értéke: 1,344

A fenti megadott közlemények összesített impakt faktor értéke: 13,278

A tézisben nem szerepeltetett közleményekkel kiegészített összesített impakt faktor értéke: 33,248

13. TÁRGYSZAVAK

Magyar nyelven:

mesenterialis ischaemia-reperfusio, ischaemiás praecondicionalás, apoptosis, haemorheologia, nagy és kis laboratóriumi állatok, mikrosebészet, mikrosebészeti oktatás

Angol nyelven:

mesenterial ischemia-reperfusion, ischemic preconditioning, apoptosis, hemorheology, large and small laboratory animals, microsurgery, microsurgical education

14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt és elsősorban köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, *Prof. Dr. Furka István* egyetemi tanárnak és *Prof. Dr. Mikó Irén* egyetemi tanárnőnek, akiktől minden támogatást, biztatást, emberi és szakmai segítséget megkaptam, időt és fáradságot sohasem kímélve segítették a kutatómunka végzését. Hálás köszönettel tartozom nekik.

Köszönettel tartozom jelenlegi és volt közvetlen munkatársaimnak: *Dr. Németh Norbert*, *Dr. Pető Katalin* és *Dr. Takács E. Ildikó* egyetemi adjunktusoknak, *ifj. Dr. Sipka Sándornak*, *Dr. Lesznyák Tamásnak*, *Dr. Hauck Mátyásnak*, *Szabó Györgyinek* valamint *Dr. Sefcsik István* és *Dr. Keserű Péter* főállatorvos uraknak, akik állandó biztatásukkal, tanácsaikkal segítették munkámat.

Munkám nem jöhetett volna létre, ha a *Sebészeti Műtéttani Tanszék valamennyi munkatársa* nem segítette volna kutatásaim elvégzését.

Külön köszönet illeti a kollaborációs partnereket, akik segítsége sokat jelentett munkám elkészítésénél: szeretném köszönetemet kifejezni *Prof. Dr. Robert Zhong* egyetemi tanárnak (University of Western Ontario London/Kanada) aki sajnos már eltávozott közülünk. Tőle tanulhattam meg az általa kialakított vékonybél transplantatio mikrosebészeti technikáját. Szeretném megköszönni *Dr. Kovács Judit* főorvosnőnek a szövettani vizsgálatokhoz és *Prof. Dr. Facher József* egyetemi tanárnak és *Dr. Tóth F. Ferenc* egyetemi adjunktusnak az egér kísérletekben nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsósorban hálámat fejezem ki *Családomnak: feleségemnek és gyermekemnek, szüleimnek és testvéremnek*, hogy mindig mindenben támogattak, és ameddig tehetik támogatni fognak.

15. FÜGGELÉK

a megjelent publikációk és kéziratok gyűjteménye.