

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**ISCHAEMIA-REPERFUSIÓS VÁLTOZÁSOK VIZSGÁLATA
VÉKONYBÉL SEGMENTEN ÉS VÉKONYBÉL TRANSPLANTATIÓS
ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLEKEN
SEBÉSZETI- ÉS MIKROSEBÉSZETI TECHNIKÁK ALKALMAZÁSÁVAL**

Dr. Bráth Endre

Témavezető: Prof. Dr. Furka István



**DEBRECENI EGYETEM,
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola**

Debrecen, 2011.

A doktori tézis betétlapja

**„ISCHAEMIA-REPERFUSIÓS VÁLTOZÁSOK VIZSGÁLATA
VÉKONYBÉL SEGMENTEN ÉS VÉKONYBÉL TRANSPLANTATIÓS
ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLEKEN
SEBÉSZETI- ÉS MIKROSEBÉSZETI TECHNIKÁK ALKALMAZÁSÁVAL”**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Bráth Endre

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája
(Klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Furka István, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Altorjay Áron, az MTA doktora
Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2011. március 9. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Sándor József, kandidátus
Dr. Pórszász Róbert, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Altorjay Áron, az MTA doktora
Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
Prof. Dr. Sándor József, kandidátus
Dr. Pórszász Róbert, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2011. március 9. 14 órakor, I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterem

1. BEVEZETÉS

A mesenterialis ischaemia a mai napig magas mortalitással járó megbetegedés. A vékonybél a mesenterialis ischaemia-reperfusio kapcsán sérülést szenvedhet: például vékonybél transzplantatio, aorta- és szívsebészeti beavatkozások, hypovolaemiás shock, mesenterialis infarctus vagy enterocolitis necrotisans neonatalis következtében is.

A mesenterialis ischaemia-reperfusiók károsodások multifaktoriális eredetűek, mely folyamatban jelentős szerepet játszanak a szabadgyökök, a nitrogén-oxid és a leukocytá adhesiós molekulák. A szabadgyökök termelésében részt vehetnek a xantin-oxidáz enzimrendszer tagjai, az aktiválódott neutrophil leukocyták és endothel sejtek is.

Ismert tény a *mesenterialis ischaemia-reperfusio* pathomechanismusa során kialakuló károsodások -a károsodás mértékétől függően- apoptotikus folyamatokat indíthatnak be, ugyanakkor kevés adat áll rendelkezésre, hogy védőfaktorok -*E-vitamin* (jól ismert antioxidáns), *allopurinol* (a xantin-oxidáz gátlószere) és *ischaemiás praeconditionálás*-jelenlétében, hogyan változik ez a folyamat a vékonybél transzplantatio területén.

Az ischaemiás praeconditionálás endogén adaptációs mechanizmusa fokozza a szervek ischaemia-reperfusiók károsodással szembeni toleranciáját. Számos szervnél -szív, máj, vázizomzat, vékonybél- kimutatták az ischaemiás praeconditionálás védőhatását. Az irodalmi adatok azonban ellentmondásosak tekintetben, hogy melyik a leghatékonyabb vékonybél praeconditionálási módszer

A transzplantatio sikerességét nagymértékben befolyásolja a szövetek jó vérellátása. A mesenterialis ischaemia-reperfusio komplex folyamata több területen jelentős változást indít el a bél *mikrokeringésében* is.

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.

Míg az előzőekben felvetett kérdéskör vizsgálata nagy- és kislaboratóriumi állatokon is történhet, addig a vékonybél transzplantatio immunológiai folyamatainak kutatása jelentős részben kislaboratóriumi állatokon -egér, patkány- történik.

Számos genetikailag módosított congenikus, transzgenikus 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.

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

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

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

A bél transzplantatio kapcsán a korábbiakban említett és felmerülhető 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. 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 bél 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 bél nyálkahártyájában?
5. Az arteria mesenterica superior teljes leszorítását követő ischaemia-reperfusió történésének kapcsán haemorheologiai mérőmódszerrel a vörösvérsejt deformabilitás változások követe, 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 mérőmódszerek alkalmazásával a mikrokeringésben bekövetkező változások kimutatására.

III. Inbred egereken végzett vizsgálatok során:

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

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

3.1 ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1.1. 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 végeztük.

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.

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.

3.1.2. 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 vérellátását.

Ezt követően mindhárom átmetszés helyén end-to-end bél-anastomosist 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 vérellátását 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-reperfusiós vizsgálatokat kívántuk elvégezni.

Ezt követően az egyik jejunum-segmentet ellátó arteria ágat 30 percre atraumatikusan leszorítottuk a különböző, összehasonlítható jellegű vizsgálatok során

3.1.3. Kísérleti csoportok a reperfusiós 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-reperfusiós vizsgálatra alkalmazott jejunum-segment ellátó ereit atraumatikusan 30 percre leszorítottuk.

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

3.1.4. Kísérleti csoportok a különböző időtartamú ischaemiás praeconditionálás 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-segmenten 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 reperfusiót 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 reperfüziós időtartamok), ezt követte a 10 perces felengedés-stabilizáció fázisa. Ezután következett a 30 perces leszorítás, és 4 órás reperfüzió alkalmazása.

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

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

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

3.1.5. 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-segmentet alakítottuk ki.

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

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

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

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

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

3.1.6. Morphologiai vizsgáló módszerek

3.1.6.1. 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-segmentekből.

3.1.6.2. Mikroszkópos vizsgálatok

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

3.1.6.2.1. Hagyományos szövettani vizsgálatok

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

3.1.6.2.2. Immunhisztokémiai vizsgálat apoptózis kimutatására

Az apoptózis kimutatását immunhisztokémiai módszerrel, Apoptag Kit (in situ apoptózis detection kit, Oncor, Biomarker Ltd.) segítségével végeztük. Az apoptóssal elhaló sejtek TUNEL technikával váltak láthatóvá. A vizsgálatot a gyártó leírása szerint végeztük. Apoptózis 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.

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

3.1.6.2.4. Apoptotikus index számítása a különböző időtartamú ischaemiás praecondicionálás, 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 vizsgálatát történt. A statisztikai analízist SPSS 10.0 software alkalmazásával Student-féle t-teszt segítségével végeztük ($p < 0.05$).

3.2. EREDMÉNYEK

3.2.1. 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, törmelékeny bevonatot, lepedéket találtunk a vékonybél lumenekben a reperfüziót követő 30. percben, valamint az 1. és 2. órájában vett mintákban. Hasonlóan kis mennyiségű lepedéket találtunk a reperfüzió 12. és 24. órájában vett mintákban is.

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

3.2.2. Mikroszkópos vizsgálatok eredményei

3.2.2.1. Hagyományos szövettani vizsgálatok eredményei a reperfüziós károsodások időbeni lefolyásának meghatározására

A haematoxylin-eosinnal festett metszetekben a bélnyálkahártya felszínén minimális sejttörmeléket találtunk a reperfüziót követő *30. percben, az 1. és a 2. óra* 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 megőrzött volt.

A *reperfüzió 4., 6. és 8. 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

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

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

A reperfusio 1. és 2. órájának végén vett mintákban már több apoptotikus sejtet számoltunk, melyek a basalis és apicalis részen is megtalálhatóak voltak.

Az apoptotikus aktivitás a vizsgált mintákban fokozatosan emelkedett, a maximumát a 4 és 6 óras 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. Eredményeinket 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)

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

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

Mind a 3x5, 3x3 és az 1x15 perces praecondicionálás-, illetve az allopurinol és az E-vitamin kezelés vizsgálati csoportjaiban vett mintákban a bél lumenben vastag sejttrótmelékkel figyeltünk 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.

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

A *leszorított kontroll* csoportban az apoptotikus index értéke $2,76 \pm 1,19$ volt.

A különböző időtartamú praeconditionálások közül csak a *3x5 perces praeconditionálás* alkalmazása során kaptunk *szignifikánsan emelkedett* apoptotikus index értéket a *leszorított kontroll csoport*hoz viszonyítva, mely $6,75 \pm 1,2$ volt. Ezért a különböző ischaemiás praeconditionálási módszerek közül a *3x5 perces* választottuk ki az ischaemia-reperfusio kapcsán már jól ismert védőhatású szerrel való összehasonlításához.

Az *allopurinol* (50 mg/ttkg) *előkezelt* csoportnál az apoptotikus index értéke $11,2 \pm 3,1$ volt. A bél nyálkahártya felszínén a sejttörmelék nagyobb mennyiségben volt látható. A *leszorított kontroll* csoporthoz és a praeconditionált csoporthoz viszonyítva is *szignifikáns emelkedést* kaptunk a nyálkahártya apoptotikus index értékeiben.

Az *E-vitamin előkezelés* alkalmazása után volt a legmagasabb az apoptotikus index értéke $12,2 \pm 3,25$, amely *mind a leszorított kontroll* ($p=0,002$), *mind a praeconditionálás I. csoport*hoz viszonyítva is *szignifikáns volt*. Apoptotikus sejteket találtunk a bélbolyhok apicalis és basalis területein is. A nyálkahártyán belül TUNEL pozitivitást epithelialis és lobjeitek sejtek egyaránt mutattak. A lument vastagon bevonta a sejttörmelék (II. táblázat).

II. táblázat: Az apoptotikus index értékei a különböző időtartamú ischaemiás praeconditionálás, 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 előkezelt csoport	E-vitamin előkezelt 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

3.3. MEGBESZÉLÉS

Az *ischaemia-reperfusio kapcsán fellépő károsodások* több tényezőre vezethetők vissza: reaktív oxigén intermedierek, leukocytá adhesiós molekulák, nitrogén oxid, de a folyamatban szerepet játszó összes faktor még ma sem ismert.

Az ischaemia-reperfusio 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. 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. Reperfusio-reoxigenizáció során a másik szubsztrát, a molekuláris oxigén is megjelenik és a xantin-oxidáz a molekuláris oxigént szuperoxid gyökké és hidrogénperoxiddá redukálja.

Granger szerint a vékonybélben a legnagyobb xantin-oxidáz enzimaktivitás a villusok apicalis részében mutatható ki, ezért a szabagyökök okozta károsodások intenzívebbek ezen a területen. 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 apoptózis aktív fehérjeszintézist igénylő folyamat, melynek végbemeneteléséhez idő szükséges, ez lehet a magyarázata, miért volt alacsony az apoptotikus sejtek száma a reperfüziót követő 30. percben, és 1., valamint 2. órájában vett mintákban.

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

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

Az irodalom nem egységes a különböző időtartamú praecondicionálási módszerek alkalmazása kapcsán sem. Yellon leírja, hogy különböző állatfajoknál más molekuláris mechanizmus érvényesülhet az ischaemiás praecondicionálás során. A patkány, a nyúl, a kutya és a sertés szívizom praecondicionálása során eltéréseket találtak.

Kísérleteinkben a fenti tények ismeretében is vizsgáltuk a különböző praecondicionálási protokollok hatékonyságát és az apoptózisra kifejtett hatását. Eredményeink azt mutatják, hogy praecondicionálás hatására növekszik az apoptotikus sejtek száma a bél falban. 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 praecondicionálás nem okozott változást az apoptózisban kísérleti modellünkben.

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

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

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

Az allopurinol előkezelés alkalmazása során is feltételezésünkkel ellentétes eredményt kaptunk -hasonlóan a praecondicionálásnál 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-reperfüzio során fellépő oxidatív stressz csökkenthető az allopurinol előkezeléssel, amely hozzájárul a reaktív oxigénradikálok szintjének mérséklése által a sejtek túléléséhez. Mérséklődhet a sejteket érő intracelluláris kalcium akkumuláció, az ATP felhasználás. A túlélő sejtek számának növekedése mellett elősegítheti az apoptotikus sejthalált a necrosis szemben. Shah igazolta, hogy az ischaemia-reperfüzio apoptosist okoz a bélben, de azt is leírta, hogy ischaemia-reperfüzio után a bél falban apoptózis és necrosis egyaránt kialakulhat. Modelljében az apoptosist tartja az elsődleges sejthalál formának szemben a necrosis.

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

McKonkey az alábbiak szerint határozza meg az apoptózis/necrosis bekövetkeztének feltételeit. Apoptózis: 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.

Sheu szerint az *E-vitamin* gátolja az NF- κ B az aktivációját. Az NF- κ B részvételét számos folyamatban igazolták, például az ischaemia-reperfusio folyamataiban, az apoptózisban, és az intestinalis reperfusio folyamataiban, a szisztémás gyulladásos válaszban is.

Nichols mesenterialis ischaemia kapcsán megállapította, 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.

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.

4. 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.

4.1. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1.1. Kísérleti állatok, anaesthesia

Kísérleteinket tíz, 22-25 kg testtömegű ($23,4\pm 2,63$ kg) keverék kutyán végeztük (engedély szám: 22/1999/ÁTEB).

A kísérleti állatok altatását 3.1.1. fejezetben leírtakkal megegyezően végeztük.

4.1.2. Műtéti módszer, kísérleti csoportok

1. *Ischaemia-Reperfusio [I/R] csoport* (n=5): medián laparotomiát követően kiperaráltuk 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.

4.1.3. Laboratóriumi vizsgálatok, statisztikai analysis

Laboratóriumi vizsgálatokat a műtét előtt 1 nappal (alapminta), 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 ($p<0.05$).

4.1.3.1. 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-szuspenziót 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 sejtszuspenzió-haematocritra.

A vörösvérsejtek deformálódási képességét a St. George's Blood Filtration módszer alapján, filtrációs elven működő Carat FT-1 típusú filtratóval (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-szuspenziót 5 μm átlagos pórusátmérőjű polycarbonat filteren áramoltattuk át (Nuclepore[®], Whatman Inc.) állandó 4 vízcm áramlási nyomás mellett. A kontrollt a kalibráláskor 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 szuszpenzió-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 megnövekszik.

4.1.3.2. Haematologiai vizsgálatok

A K_3 -EDTA anticoagulánst tartalmazó csövekbe (7,5%, 2 ml, BD Vacutainer[®] Belliver Industrial Estate, UK) nyert vérmintákból a következő kvantitatív és kvalitatív 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]).

4.2. EREDMÉNYEK

4.2.1. 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.

4.2.2. 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. napra 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.

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 a különbséggel, hogy az 1. postoperatív napon jelentkező enyhe fokú haemokonzentráció 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 igen 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.

4.3. MEGBESZÉLÉS

A klinikai gyakorlatból is ismert korai postoperatív időszak szövődmény lehetőségek 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.

Szövettípustól függően a különböző időtartamú és különböző szöveti kiterjedésű ischaemia és az azt követő reperfusio eltérő mértékben ronthatja a vörösvérsejt deformabilitást.

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 vörösvérsejtek deformabilitását. 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-szuspenzió filtrálhatóság csökkenést.

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. A különböző szervek, szervrendszerek vizsgálatánál nyert adatok egymással csak elméleti szinten hasonlíthatóak össze, hiszen az ischaemiás tolerancia jelentősen szövettípus függő, és a vékonybél egyike az ischaemia-reperfusio kapcsán a kialakuló károsodásokra legérzékenyebben reagáló szöveteknek.

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-reperfusiók károsodások kimutatásában jó jelző módszer lehet, korán jelezve a vékonybél érintettségét.

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

Az haemorheologiai kísérletsorozatunkat folytatva célunk a mesenterialis ischaemia-reperfusio során a szisztémás keringés mellett a lokális keringésben kialakuló változások vizsgálata is volt patkány előkísérletben, újabb mérőmódszerek bevezetésével.

5.1. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1.1. Kísérleti állatok, anaesthesia

Vizsgálatainkat 10 db nőtény, $360.6 \pm 46.07g$ testtömegű CD outbred patkányon végeztük (engedély szám: 6/2006. DEMÁB).

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.

5.1.2. 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. 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.

5.1.3. Laboratóriumi vizsgálatok, statisztikai analysis

A vérmintákat a vena portaéból 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.

5.1.3.1. 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 kapillárist ($d=216\mu\text{m}$) tartalmazó speciális tartóba helyezük. Ezután a mintát az automata a kapillárisban vákumnyomás alá helyezi, ezáltal a magas viszkozitású közegben a vörösvérsejtek in situ megnyúlnak. Ezt követően a mérőeszköz lézerdiódájának 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.

5.1.3.2. 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.

5.1.3.3. Haematologiai vizsgálatok

Laboratóriumi méréseinket standard körülmények között végeztük. Qualitatív és kvantitatív paramétereinket SYSMEX F-800 haematológiai automatán (microcell counter-TOA Medical Electronics Corp., Ltd., Japán) mértük. A mérések metodikája és a mért paraméterek megegyeznek a 4.1.3.2. „Haematologiai vizsgálatok” fejezetben leírtakkal.

5.2. EREDMÉNYEK

5.2.1. 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, $p<0.05$).

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, $p<0.001$).

5.2.2. Vörösvérsejt aggregatio változásai

A portális vérminták aggregációs 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 aggregációs 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 portaeban a vörösvérsejtek aggregációja fokozottabb.

5.2.3. A haematologiai paraméterek változásai

A haematologiai paraméterek közül csak a szignifikáns eltérést mutatóakat ismertetjük.

Haematocrit változások: Az *Áloperált Kontroll* csoport vena portaeból vett mintákban a haematocrit kismértékű csökkenést mutatott, míg az *Ischaemia-Reperfusio* csoportban szignifikáns ($p<0.05$) emelkedést tapasztaltunk, mely csúcsát 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.

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.

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 $2.18 \pm 0.14 \times 10^3/\mu\text{L}$, $p < 0.001$).

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 $2.05 \pm 0.82 \times 10^3/\mu\text{L}$, $p < 0.05$).

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

5.3. MEGBESZÉLÉS

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.

Modellünkben 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 4. 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.

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.

Elemezve 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. 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. Ugyanez a munkacsoport mutatta ki, hogy ischaemia-reperfusio során 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.

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.

Az aktiválódott polymorphonuclearis leukocyták növelhetik a bélnyálkahártyában jelentős mennyiségben megtalálható xantin-oxidáz enzimrendszer működése során termelődött szabadgyökök mennyiségét, ami fokozhatja a már működő károsító folyamatok hatásait.

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 pathomechanismusának megértéséhez, s olyan adatokat szolgáltathatnak, melyek segíthetik a -mesenterialis ischaemiás okok miatt- esetleg kritikus állapotban lévő betegek klinikai kezelését, gyorsabb rehabilitációját.

6. ÉRANASTOMOSISOK NÉLKÜLI VÉKONYBÉL TRANSPLANTATIÓS EGÉR MODELL - IV. KÍSÉRLETI MODELL

6.1. ANYAG ÉS MÓDSZER

6.1.1. Kísérleti állatok, anaesthesia

A mikrosebészeti modell alkalmazásával végzett kísérleteinknél harminchat, 20-24g testtömegű A/J egér ($22,32 \pm 1,66g$) került felhasználásra (engedély szám: 6/2001. DEMÁB).

Az anaesthesiát i.p. 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.

6.1.2. Műtéti módszer, kísérleti csoportok

6.1.2.1. Donor műtétek

A beavatkozásokat A/J beltenyésztett 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 baloldalon a bordáig felhatoltunk ollóval. Distalisan a húgyhólyagra vigyázva a symphysis pubica területéig elérve megnyitottuk 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 kanuláltuk, 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 szikével. A béldarabokat 4°C-os Ringer-laktát oldatban tároltuk felhasználásukig.

6.1.2.2. Recipients műtétek

A recipients műtétek (n=30) során medián laparotomiát követően a nagycsepleszt előemeltük és nedves gézre helyeztük. Öt fészket készítettünk az omentum elülső lemezének meghasításával. A fészkeket mindig a csepleszben futó erek közelébe készítettük el, természetesen gondosan figyelve az ér sérülések elkerülésére. Minden fészkebe -a nagycseplesz két lemeze közé- vékonybél darabokat helyeztünk. A fészkeket 8/0-ás Prolene (polypropylene) öltésekkel zártuk, mely egyben a fészkek jelölését is szolgálta. A hasüreget lege artis zártuk. Az ischaemia okozta károsodások csökkentése céljából -hogyan a béldarabokat rövid ideig tároljuk- egy donor műtétet 5 recipients műtét követett.

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

6.1.3. Makroszkópos vizsgálatok

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

6.1.4. Mikroszkópos vizsgálatok

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

6.2. EREDMÉNYEK

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

6.2.1. Makroszkópos vizsgálatok eredményei

A makroszkópos elemzés során 7 esetben nem találtuk meg a jelölt fészkeket. 9 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. Az esetek többségében nem alakult ki ez az üreges képlet, hanem az átültetett béldarab mintegy szigetszerűen helyezkedett el a nagycsepleszbe ágyazva.

6.2.2. 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. 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 helysejteket is sikerült azonosítani.

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. A nyálkahártyában helysejteket lehet azonosítani. Az izomréteg elvékonyodott. A transzplantált béldarabok körül mononucleosis sejteket és óriássejteket lehet megfigyelni. A lument mucinosus anyag töltötte ki.

6.3. MEGBESZÉLÉS

A *bélfal minden rétege* felismerhető volt a metszeteken. A meglévő mirigyállomány megőrizte *mucintermelő* képességét, és számos *helysejtet* sikerült azonosítani. 23 recipientsben sikeres volt a transzplantatio.

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

Az irodalom alapján a szervezet különböző helyeire próbálták a bél segmenteket transzplantálni. Uchida mesenteriumától teljesen megfosztott 1,5 cm-es vékonybél darabot transzplantált a *hasfal subcutan térébe* és a bélfal minden rétegét sikerült azonosítani két héttel a műtét után, 75%-os revascularisatiós arányt állapított meg.

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

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 transzplantált graftokat találta nagyobbaknak, de a különbség nem volt szignifikáns.

A *nagycseplesz megfelelő hely a transzplantatio számára*, ezt bizonyította a korábbi, egereken kivitelezett lépautotranszplantációs modell, mely az alapötletet adta a jelenleg részletezett bél transzplantációs modellhez.

Klos használta először a nagycsepleszt béltranszplantatio 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.

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

A csepleszt többek között három tulajdonsága teszi alkalmassá a transzplantatio számára: a vena portae-n történő vér elvezetés, a cseplesz baktériumellenes funkciója („a hasüreg rendőre”), és főként különleges képessége a revascularisatióra. Levy igazolta a csepleszből kivont angiogen faktor neoangiogenetikus hatását.

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

- 1./ Számos *genetikailag módosított egértörzset* ismerünk. Léteznek congenicus, transgenicicus és knock out törzsek, melyek segítségével acut, chronikus rejectiós 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.

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 transzplantációt lehet elvégezni, összehasonlítva a klasszikus szerv transzplantációval, ahol éranastomosisokat kell készíteni.
- 4./ A modell alkalmas lehet újabb immunszuppresszáns gyógyszerek tesztjeire, az összejt kutatás számára is.
- 5./ Ideális a xenotranszplantációs 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.

7. MIKROSEBÉSZETI ALAPOK OKTATÁSI TEMATIKÁJÁNAK TOVÁBB FEJLESZTÉSE TRANSPLANTATIÓS KUTATÁSOKHOZ

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.

7.1. A mikrosebészeti alapok elsajátításához szükséges oktatási tematika

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

A mikrosebészeti alapok elsajátításának ismert és bevált módszere a Furka által kidolgozott metodika, mely szinkron, aktív, videoasszisztált, individualis, önkontrollos és analízáló jellegű.

Az *alaptechnikák elsajátítása* ún. „száraz training” során történik, ahol a *gyakorlatok tematikája* a következő: az *első gyakorlaton* a mikrosebészet történetét, alkalmazási területeit, a 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 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 biomoddellen.

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.

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 lépcsőről lépésre haladhat előre a komolyabb technikai felkészültséget igénylő mikrosebészeti műtétek irányába.

A patkány aorta abdominalisa mellett a vena cava caudalis rekonstrukciójának elvégzése is új nehézségi fokozatot jelent. Ezt követheti az arteria femoralison, majd az arteria carotis communison 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.

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

Az összehasonlítás és jobb megértés érdekében röviden ismertetem az eredeti Zhong által leírt -éranastomosisokkal készített- ún. „vascularis” mikrosebészeti vékonybél transzplantatiós modell módszerét, összehasonlításként azt az általunk kialakított avascularis egér vékonybél transzplantatiós modellünkkel, s modellünk előnyeinek igazolására.

A módszer lényege, főbb műtétechnikai lépései a következők:

A *donor műtétek* során medián laparotomiát követően első lépésként a vastagbelet és az ileumot eltávolítjuk, majd a jejunumot azonosítjuk, és a mesenterialis ereket lekötjük. A vena portae-t gondosan elválasztjuk a pancreastól, ezután kireparáljuk az aortát és a truncus coeliacust lekötjük, továbbá a vena lienalist szintén lekötjük. Vékony túvel az aorta infrarenalis szakaszát megszurjuk, 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.

A *recipiens műtét* során medián laparotomiát követően az aorta és a vena cava caudalis infrarenalis szakaszát óvatosan kireparáljuk, 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 fiziologiás sóoldattal átöblítjük. A donor vékonybél szakaszt a megfelelő pozícióban a recipiens közelébe helyezük.

Először a donor és a recipiens *venát end-to-side anastomosissal* egyesítjük 11/0 Prolene (polypropylen) varróanyag segítségével, gondosan figyelve, hogy a recipiens vena cava caudalison kialakított ellipszis alakú venotomiás nyílás hossza meghaladja a donor vena cava caudalis 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 Prolennel tova futó öltéseket használunk.

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 transzplantatio technikájának megtanulása előtt el kell sajátítani az end-to-side éranastomosis készítésének rutinszerű -10-15 percen belüli- kivitelezését. A tanulási fázisban 100 transzplantatiót ajánlott elvégezni az átlag 20-23g testtömegű egereken, hogy a műtét technikai szövődményei ne befolyásolják a transzplantatiót követő vizsgálatokat.

Milyen *szövődmények* lehetnek? A *vékonybéltranszplantatio szövődmény lehetőségei*:

Hypovolaemiás és septicus shock: A shock a legáltalánosabb komplikáció egereken vékonybél transzplantatiót 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 transzplantációját 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.

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

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

8. FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. Keverék kutyákon *egy új műtéti modellt -a kettős, izolált jejunum-segment modellt-* valósítottunk meg a mesenterialis ischaemia-reperfusio okozta károsodások vizsgálatára. 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 praecondicionálási* protokollok hatékonyságát. Megállapítottuk, hogy a 3x5 perces ischaemiás praecondicionálási 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 (praecondicionálás, allopurinol, E-vitamin)* vannak jelen, *az ischaemiás sejthalál formája nagyobb mértékben apoptosissal történhet*. Gyulladás és szövetkárosodás kisebb mértékben jön létre a szövetekben, *kedvezőbb feltételeket biztosítva a szövetregeneráció számára*. A modellünkben talált eredmények 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.
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 szolgáltathat a vékonybél műtétet követő állapotáról, a műtéti beavatkozással együtt járó ischaemia-reperfusió károsodások mértékéről, korán jelezve a vékonybél érintettségét, valamint a *mikrokeringés esetleges károsodását*.
7. Először hívtuk fel a figyelmet outbred patkányokban a 30 perces mesenterialis ischaemia és az azt követő 60 perces reperfusio 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-reperfusio 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.
8. *Új költség-hatékony „avascularis” vékonybél transplantációs technikát* dolgoztunk ki *inbred egerekben*, a korábbi tanszékünkön kidolgozott lép-autotransplantációs technika részbeni módosításával.

9. Az „*avascularis*” *vékonybél transzplantációs technikát* alkalmazva makroszkópos és mikroszkópos vizsgálatokkal igazoltuk a *nagycsepleszbe* helyezett vékonybél darabok életképességét. A bélfal minden rétegét sikerült azonosítani. Igazoltuk a transzplantált béldarabkák mirigyhám működését is a mucintermelés kimutatásával. A modell alkalmas lehet újabb immunszuppresszáns gyógyszerek tesztjeire, őssejt- 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.

9.1. 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., Pap 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., Kevin 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

9.2. 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: 0,630**
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 lebény 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

9.3. 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

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Iktatószám: DEENKÉTK /21/2011.

Tételszám:

Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Bráth Endre

Neptun kód: IYO441

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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. 30 (4), 321-326, 2010.
IF:1.244 (2009)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.20707>
2. Furka, I., **Bráth, E.**, Németh, N., Mikó, I.: Learning microsurgical suturing and knotting techniques: Comparative data.
Microsurgery. 26 (1), 4-7, 2006.
IF:0.882
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.20201>
3. **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.
Magyar Seb. 58, 111-115, 2005.
4. **Bráth, E.**, Mikó, I., Kovács, J., Tóth, F.F., Fachel, J., Furka, I.: Multiorgan transplantation with a new organ-chip technique in mice: Preliminary histological data.
Microsurgery. 23 (5), 466-469, 2003.
IF:0.711
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.10169>
5. **Bráth, E.**, Furka, I., Németh, N., Szabó, G., Pető, K., Ács, G., Lesznyák, T., Cserni, T., Pap 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.
Ed.: Boros Mihály, Monduzzi Editore S.p.A., Bologna, 281-285, 2002.
6. Mikó, I., **Bráth, E.**, Furka, I.: Basic teaching in microsurgery.
Microsurgery. 21 (4), 121-123, 2001.

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 tanszéki munkatársainak: *Dr. Németh Norbert*, *Dr. Pető Katalin* és *Dr. Takács E. Ildikónak* 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 transzplantatio mikrosebészeti technikáját. Szeretném megköszönni *Dr. Kovács Judit főorvosnőnek* a szövettani vizsgálatokhoz és *Prof. Dr. Facht 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.

IF:0.844

DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.1021>

7. Mikó, I., **Bráth, E.**, Furka, I., Kovács, J., David, K.: Spleen autotransplantation in mice: A novel experimental model for immunology study.

Microsurgery. 21 (4), 140-142, 2001.

IF:0.844

DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.1026>

8. **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. 30 (Suppl.147), 45-46, 1998.

További Közlemények

9. Hevér, T., Németh, N., **Bráth, E.**, Tóth, L., Kiss, F., Sajtos, E., Mátyás, L., Szasztkó, J., Drimba, L., Peitl, B., Csiki, Z., Mikó, I., Furka, I.: Morphological, hemodynamical and hemorheological changes of mature artificial saphenous arterio-venous shunts in the rat model.

Microsurgery. 30 (8), 649-656, 2010.

IF:1.244 (2009)

DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.20784>

10. Kiss, F., Németh, N., Sajtos, E., **Bráth, E.**, Pető, K., Baskurt, O.K., Furka, I., Mikó, I.: Examination of aggregation of various red blood cell populations can be informative in comparison of splenectomy and spleen autotransplantation in animal experiments.

Clin. Hemorheol. Microcirc. 45 (2-4), 273-280, 2010.

IF:1.78 (2009)

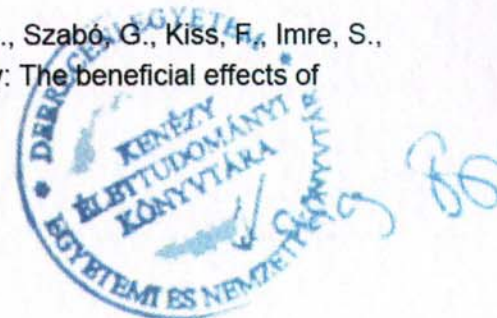
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2010-1304>

11. Mikó, I., Németh, N., Sajtos, E., **Bráth, E.**, Pető, K., Furka, A., Szabó, G., Kiss, F., Imre, S., Furka, I.: Splenic function and red blood cell deformability: The beneficial effects of spleen autotransplantation in animal experiments.

Clin. Hemorheol. Microcirc. 45 (2-4), 281-288, 2010.

IF:1.78 (2009)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2010-1307>



12. Sajtos, E., Németh, N., Kiss, F., **Bráth, E.**, Pető, K., Hevér, T., Mátyás, L., Furka, I., Mikó, I.: Application of leukocyte antisedimentation rate calculation in investigation of spleen salvaging experimental surgical techniques.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 45 (2-4), 289-294, 2010.
IF:1.78 (2009)
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2010-1308>
13. Tamás, R., Németh, N., **Bráth, E.**, Sasvári, M., Nyakas, C., Debreczeni, B., Mikó, I., Furka, I.: Hemorheological, morphological, and oxidative changes during ischemia-reperfusion of latissimus dorsi muscle flaps in a canine model.
Microsurgery. 30 (4), 382-388, 2010.
IF:1.244 (2009)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.20699>
14. Furka, A., Németh, N., Gulyás, A., **Bráth, E.**, Pető, K., Takács, E.I., Furka, I., Sápy, P., Mikó, I.: Hemorheological changes caused by intermittent Pringle (Baron) maneuver in experimental beagle canine model.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 40 (3), 177-189, 2008.
IF:1.814
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2008-1128>
15. 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. 37 (4), 347-358, 2007.
IF:0.977
16. Mikó, I., **Bráth, E.**, Németh, N., Furka, A., Sipka, S., Pető, K., Serfőző, J., Kovács, J., Imre, S., Benkő, I., Galuska, L., Sipka, S., Ács, G., Furka, I.: Spleen autotransplantation: Morphological and functional follow-up after spleen autotransplantation in mice : A research summary.
Microsurgery. 27 (4), 312-316, 2007.
IF:1.07
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.20362>
17. 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. 23 (2), 79-85, 2007.
IF:0.722

DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-970187>

18. Szabó, G., Mikó, I., Nagy, P., **Bráth, E.**, Pető, K., Furka, I., Gamal, E.M.: Adhesion formation with open versus laparoscopic cholecystectomy: An immunologic and histologic study.
Surg. Endosc. 21 (2), 253-257, 2007.
IF:2.242
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00464-005-0015-y>
19. Mikó, I., Németh, N., Sipka, S., **Bráth, E.**, Pető, K., Gulyás, A., Furka, I., Zhong, R.: Hemorheological follow-up after splenectomy and spleen autotransplantation in mice.
Microsurgery. 26 (1), 38-42, 2006.
IF:0.882
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.20208>
20. Furka I., **Bráth E.**, Németh N., Mikó I.: Gondolatok a mikrosebészeti oktatásról: Mire volt elég az 5460 óra a mikrosebészeti alapoktatásban?
Magyar Seb. 59, 147-151, 2006.
21. Sipka, S., **Bráth, E.**, Tóth, F.F., Aleksza, M., Kulcsar, A., Fábán, Á., Baráth, S., Balogh, P., Sipka, S., Furka, I., Mikó, I.: Cellular and serological changes in the peripheral blood of splenectomized and spleen autotransplanted mice.
Transpl. Immunol. 16 (2), 99-104, 2006.
IF:2.297
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2006.03.013>
22. Pető K., Oláh 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.
Magyar Seb. 58, 134-137, 2005.
23. 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.
Magyar Seb. 58, 116-119, 2005.
24. Sipka S., **Bráth E.**, Tóth F.F., Fábán Á., Furka I., Mikó I.: Lép autotransplantatio és lépeltávolítás haematologiai és immunologiai hatásainak összehasonlító vizsgálata egerekben.
Magyar Seb. 58, 84-88, 2005.

25. 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. 30 (2), 133-145, 2004.
IF:0.63
26. Szűcs G., Barna T., Tóth I., **Bráth E.**, Gyáni K., Incze D., Mikó I.: Süllyesztett anasztomózisok gyógyulásának vizsgálata állatkísérletekben.
Magyar Seb. 56, 73-79, 2003.
27. 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. 51, 539-550, 2003.
28. 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. 23 (5), 419-423, 2003.
IF:0.711
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.10175>
29. 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. 16 (3), 229-235, 2003.
IF:0.809
DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1442-2050.2003.00334.x>
30. Pap Szekeres, J., Cserni, G., Furka, I., Svébis, 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. 23 (5), 414-418, 2003.
IF:0.711
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.10176>
31. Szűcs G., Tóth I., **Bráth E.**, Gyáni K., Mikó I.: Adatok a nyelőcső és a gyomor reszekciós műtéteinél kézzel varrt anasztomózisok korai fizikai varratbiztonságához.
Magyar Seb. 54, 325-330, 2001.
32. Szűcs G., Tóth I., **Bráth E.**, Gyáni K., Mikó I.: Nyelőcsővel készült süllyesztett és más gyakrabban alkalmazott anasztomózis változatok belső nyomástűrésének vizsgálata modell kísérletekben.
Magyar Seb. 54, 239-244, 2001.

33. 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. Ed.: Fu-Chan Wei, David C. C. Chuang, Hung-Chi Chen, Monduzzi Editore, Bologna, 43-44, 2001.
34. Incze D., **Bráth E.**, Pető K., Kovács J., Kuhnyár Á., Sefcsik I., Furka I.: Laparolift használata utáni hasfalelváltozások kísérletes vizsgálata.
In: Bibliomed Medizinische Verlagsgesellschaft. [s.l.], [s.n.], 11-16, 2000.

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.01.27

