

Szent István Egyetem

Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**A belső rectushüvelyből képzett
autolog érgraft morfológiai és
funkcionális vizsgálata kutyákban**

PhD értekezés tézisei

Dr. Csébi Péter

2015

Szent István Egyetem

Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető:

.....
Prof. Dr. Németh Tibor PhD, dip. ECVS

Tanszékvezető egyetemi tanár

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar,
Sebészeti és Szemészeti Tanszék és Klinika

.....
dr. Csébi Péter

1. BEVEZETÉS

Az érsebészetben gyakran alkalmaznak különböző érprotáló eljárásokat. Elterjedt a saját erek és a szintetikus anyagok felhasználása is, de minden szempontból ideális érprotézist még nem sikerült kifejleszteni. Saját erek beültetésénél nehézséget okoz, hogy a rendelkezésre álló perifériás erek száma korlátozott, ráadásul ilyen érszakaszt csak egy újabb, más területen elvégzett sebészi beavatkozással lehet nyerni, megváltoztatva ezzel a fiziológiás anatómiai viszonyokat. További gondot okoznak a szisztémás érbetegségek pl. atherosclerosis, amely fennállása esetén a perifériás vénák nem mindig alkalmasak donor ereknek. A szintetikus graftok nagyobb átmérőben jó alternatívát nyújtanak, de a kis átmérőjű artériák esetén gyakran elzáródnak, és a transzplantációs sebészetben a szervek kilökődésének megakadályozására alkalmazott immunszuppresszió mellett a szeptikus szövődményekre is hajlamosabbak, mint a saját erek.

A különleges követelményeket támaztó transzplantációs sebészet számára ideális érgraft megtalálásának érdekében kezdte meg Kóbori mtsaival a belső rectushüvelyből képzett graftok kísérletes, majd klinikai felhasználását artériás érprotálásként (Kóbori és mtsai., 2000, 2003, 2005, 2008). Kedvező eredmények születtek, mert hasi műtét esetén nem kell más területen is feltárást végezni és

viszonylag rugalmasan lehet különböző átmérőjű és hosszúságú graftokat kialakítani úgy, hogy a módszer alkalmazása miatti költségnövekedés nem számottevő. Az immunszuppressziós kezelés sem befolyásolta az érgraftok működését.

Jelen dolgozat a belső rectushüvely érgrafttal végzett további kísérletes vizsgálatokat mutatja be. A korábban csak artériás érpótlásként kipróbált belső rectushüvely graftot vénás foltgraftként ültettük be, hogy vizsgálhassuk a vénás környezetben történő felhasználhatóságát, és újabb immunhisztokémiai módszereknek köszönhetően lehetőség nyílt az artériás tubularis érgraftok korábbinál részletesebb szövetmorfológiai vizsgálatainak elvégzésére is. Az izometriás tenzió mérésével az artériás tubularis graft vazoaktív anyagok hatására adott kontrakciós és relaxációs képességeit tudtuk vizsgálni.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A kutatómunka keretében alapvetően három hipotézist állítottunk fel.

1. A korábban már artériás környezetben kipróbált belső rectushüvely érgraft alkalmas vénás környezetben is ér pótlásra.
2. Az artériás érgraftként felhasznált belső rectushüvely a beültetést követően morfológiai átalakuláson megy keresztül és beépül az artériába.
3. Az artériás érgraftként felhasznált belső rectushüvely morfológiai átalakulása együtt jár azokkal az artériákra jellemző tulajdonságok kialakulásával is, amelyek a szervezetben a változó igényekhez való megfelelő alkalmazkodás érdekében szükségesek, vagyis képes megfelelő ingerlés hatására a kontroll erekhez hasonló összehúzódásra és kitágulásra.

Mindezek megválaszolásának érdekében három kísérletet végeztünk:

1. Belső rectushüvelyből kialakított vénás foltgraftok beültetése, *in vivo* utókövetése és morfológiai (szövetteni, immunhisztokémiai) vizsgálata.
2. Belső rectushüvelyből kialakított artériás tubularis graftok beültetése, *in vivo* utókövetése és morfológiai (szövetteni és immunhisztokémiai) vizsgálata.
3. Belső rectushüvelyből kialakított artériás tubularis graft miográfiás funkcionális vizsgálata és összehasonlítása kontroll artériával.

3. SAJÁT VIZSGÁLATOK I.: A belső rectushüvelyből kialakított vénás graftok vizsgálata

3.1 Anyag és módszer

A kísérlet során négy kutyában összesen 15 vénás *foltfootot* alakítottunk ki a belső rectushüvelyből. A graftokat első lépésben a v. iliaca communisokba (8 db graft), majd 3 hónappal később a v. jugularisokba (7 db graft) ültettük be.

A műtéteket általános sebészeti narkózisban végeztük. A kísérletet az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács javaslata alapján az illetékes hatóság engedélyezte. Engedély száma: 73/2008.

A műtét során a hátfekvésben rögzített kutyáknál alsó medián laparotomia során feltártuk a v. iliaca communisokat. A belső rectushüvely prepubicus területéről 2x3 cm-es téglalap alakú darabot metsztünk ki, majd ebből 1cm hosszú és 0,5 cm széles foltot képeztünk, amelyet ráillesztettük az éren kialakított anyagiányra úgy, hogy a mesothellel fedett peritoneális felszíne nézzen az ér lumene felé, majd futóvarratokkal rögzítettük. A v. jugularisokon három hónappal később végeztük el a beavatkozást. A posztoperatív időszakban a kutyák 0,2 mg/ttkg meloxicam (sc.) injekciót kaptak 5 napon keresztül, valamint antikoagulációs terápiaként két héten át 200 NE/ttkg sc. heparint.

A graftot tartalmazó érszakaszok morfológiáját, átjárhatóságát Doppler-ultrahangos vizsgálattal és CT angiográfiával ellenőriztük.

Az utókövetés (v. iliaca communisnál 6 hónap, v. jugularisnál 3 hónap) leteltével a kísérleti kutyákon újabb műtéti beavatkozást végeztünk, amely során a beültetett foltgraftokat kivettük úgy, hogy a minta tartalmazza a beültetett graftokat és az azt befogadó érszakaszt is. Az így kinyert mintákat szövettanilag és immunhisztokémiaileg vizsgáltuk, hogy képet kapjunk a graftok morfológiai jellemzőiről. Az immunhisztokémiai vizsgálataink során: anti-*claudin-5* és anti-*CD31* antitesteket alkalmaztunk. Külső pozitív kontrollként alkalmaztuk a kutyák emlőrákjában kialakult mikroerek endothelsejtjeit CLD-5 esetében (Jakab et al., 2008b), és a kutyából származó haemangiosarcomát CD31 esetében (Jakab et al., 2009a).

3.2 Eredmények

Az érgraftok kialakítása és beültetése során műtéttechnikai akadály nem lépett fel, és a recirkuláció megindulása után az operált érszakaszokon a vérátáramlás zavartalan volt. Akut posztoperatív szövődmények (pl. ér varrat-dehiscentia, szeptikus komplikáció, infekció vagy nekrozis) jelei nem voltak láthatók. Adhézión kialakulására bizonyítékot nem találtunk és egyéb morfológiai károsodás jelei sem voltak láthatók. A graftokban elzáródás nem történt, mindegyik műtött érszakasz átjárható maradt. A mintavételi műtétek során szintén nem találtunk szövődményekre utaló jeleket. Az azonos állatokba beültetett graftok azonos eredményt hoztak.

A színes Doppler vizsgálatok alapján a kísérleti területek minden esetben átjárhatóak voltak.

A CT angiográfia nem mutatott ki morfológiai vagy áramlási rendellenességet a beültetett foltgraftok területén.

A sebészi úton eltávolított mintákat első lépésben rutin szövettani vizsgálatnak vetettük alá. Ennek során a gyulladástól mentes, nem thrombotizált, nem stenotizált graftokban intakt, egyrétegű endothelbélést figyeltünk meg. Sem endothel fosztott, sem hyperplasticus területeket nem láttunk. A subendothelialis szöveti rétegek gyulladással szoros infiltrátumtól (kereksejtektől, neutrophil leukocytáktól,

histiocytáktól) mentesnek bizonyultak. Ezen a területen elsősorban vaskos kollagén rostokat figyeltünk meg, közöttük elnyúlt, orsó alakú fibrocytákkal (érett kötőszöveti sejtekkel), illetve multifokálisan elhelyezkedő kapilláris és arteriola átmetszetekkel.

Az anti-CLD-5 és az anti-CD31 antitestekkel végzett immunhisztokémiai vizsgálatok megerősítették a HE hisztopatológiai vizsgálatok során nyert tapasztalatokat: az érgraftok belső felületén differenciált, egyrétegű, gyulladástól és degeneratív elváltozásoktól mentes endothelréteg alakult ki. Az endothelsejtek sejtmembránjában expresszálandó CLD-5 molekula intenzív, lineáris membránreakció formájában volt látható az érgraftokban. Az anti-CD31-el végzett vizsgálataink során szintén pozitív membránreakciót észleltünk az érgraftokat bélelő endothelsejtekben. Ez alapján az eredeti rectushüvely grafft borító mesothel sejtek helyét endothel sejtek vették át már a három hónapos kontrolloknál is. A grafftal fedett területek érszerűen átalakultak, érdemi eltérés a három illetve 6 hónappal a beültetést követő szövettani eredmények között nem volt.

3.3 Megbeszélés

Kísérletünkben a belső rectushüvelyből készített és frissen kinyert autolog vénás foltgraftok klinikai felhasználási lehetőségét vizsgáltuk kutyákban. A belső rectushüvelyből képzett graftot korábban már néhány kísérlet során kipróbálták artériás-foltgraftként (Cousar és mtsai, 1952; Pacholewicz és mtsai, 1998) és tubularis érprotézisként az artériás rendszerben (Kóbori és mtsai, 2003, 2008; Németh és mtsai, 2005). Mivel a klinikai betegellátásban az állatorvosi területen is szükség lehet esetenként (pl. adrenalectomia, thymoma eltávolítása, pajzsmitigy adenocarcinoma) a nagyvénák rekonstrukciójára (Holsworth 2004; Tobias 2012), indokolt a belső rectushüvelyből képzett graft vénasebészetben történő felhasználási lehetőségének a vizsgálata.

A kísérleti elrendezés során a Kóbori és mtsai által korábban már kidolgozott protokollt vettük alapul és adaptáltuk a vénás köreneyezethez (Kóbori és mtsai, 2003, 2008).

A beültetéseket követően az érintett vénaszakaszok átjárhatóságát és egyéb morfológiai jellemzőit Doppler-ultrahangos módszerrel és CT-angiográfiával vizsgáltuk. A CT angiográfia során a humán gyógyászatban kidolgozott protokollt vettük alapul (Sun, 2006; Kock és mtsai, 2007), ami tökéletesen adaptálható volt a kutyák vizsgálatára. A két

módszer vizsgálati eredményei megegyeztek egymással, egyik graft esetében igazolódott aneurysma, stenosis, elzáródás vagy kilökődés.

A v. jugularis graftokat három hónappal a beültetés után, a v. iliaca graftokat pedig 6 hónappal később távolítottuk el. Ez lehetővé tette, hogy a hisztomorfológiai vizsgálatainkat két különböző útokövetési idő mellett végezhessük el és az eredményeket összehasonlíthassuk egymással. Különösen nagy hangsúlyt fektettünk a graft belfelszínének vizsgálatára, mert az újonnan képződő endothel sejtréteg alapvetően fontos az alacsony thrombogenitású környezet kialakításában, ezért a HE festés mellett a minták immunhisztokémiai vizsgálatát is elvégeztük endothel specifikus markerek (CD31 és claudin-5) felhasználásával (Jakab és mtsai, 2009a).

A szövettani és immunhisztokémiai vizsgálataink alapján a belső rectushüvely a korábbi artériás kísérletek eredményeivel megegyezően (Kóbori 2003, 2008) beépült a véna falába és a lumenalis felszínét egyrétegű endothel sejtréteg borította. Kilökődésnek vagy gyulladásnak nem volt jele a mintákban. Tekintettel arra, hogy a morfológiai átalakulás már a harmadik hónap végén eltávolított graftokban is teljes volt, és az ezt követő három hónapban sem történt semmilyen kedvezőtlen változás, kilökődésre vagy gyulladásra várhatóan a későbbiekben sem kell számítani.

A vizsgálatunk alapján a belső rectushüvelyből képzett foltgraft alkalmas lehet nagyvénák részleges rekonstrukciójára. Miután az elvégzett kísérlet alapján a belső rectushüvelyből képzett graft anyagát tekintve a vénás rendszerben is kiválóan megfelel érpotló anyagként, további vizsgálatok javasoltak arra vonatkozóan, hogy csőszerű érpotló anyagként, hosszabb érszakaszok kiváltására, hogyan lehetne a gyakorlatban felhasználni. Artériákon végzett korábbi vizsgálatok arra utalnak, hogy csőszerű interpositumként néhány cm-es szakaszok kiváltására is alkalmas lehet a belső rectushüvely graft, de a vénás rendszerben egy ilyen tubularis graft beültetése technikailag nehezebb, mert a vénák vékonyabb fala, és a vénás rendszerben uralkodó alacsonyabb vérnyomás illetve lassabb véráramlás miatt a posztoperatív thrombotisatióra és elzáródásra nagyobb az esély. Ezt stentek beültetésével meg lehet előzni, de használatuk jelentősen növeli a költségeket (Tobias 2012).

4. SAJÁT VIZSGÁLATOK II.: A belső rectushüvelyből kialakított artériás tubularis graftok morfológiai vizsgálata

4.1 Anyag és módszer

A belső rectushüvelyből a Kóbori által kidolgozott módszer alapján képeztünk 8 érgraftot, amelyeket 4 kísérleti beagle kutya a. iliaca externába ültettünk be (Kóbori 2003, 2005, 2008).

A kísérletet az illetékes hatóság engedélyezte. Engedély száma: 73/2008.

A sebészi beavatkozást általános anesztéziában hajtottuk végre. A hasüreget median laparotomiával nyitottuk meg és feltártuk az aorta abdominalis medence előtti elágazási területét a jobb oldali a. iliaca externával együtt. A belső rectushüvelyből egy 3×4 cm-es téglalap alakú darabot metszettünk ki. Ebből egy standard 5 mm átmérőjű üvegbot körül 2 cm hosszú tubularis graftot alakítottunk ki úgy, hogy a rectushüvely belső peritonealis felülete a graft lumene felé tekintsen. A műtét során i.v. 200 NE/ttkg heparint adtunk (Heparin inj., Richter Gedeon) a trombózis megelőzésre. A graftot egyrétegű 2 pont közötti futó varrattal vég-a-véghez anasztomózzissal illesztettük be az artériába. Posztoperatív antikoaguláns kezelésként naponta kétszer sc. 200 NE/ttkg heparint adtunk két héten keresztül. Műtét utáni

fájdalomcsillapításra naponta egyszer sc. 0,2 mg/ttkg sc. meloxicamot (Metacam inj., Boehringer Ingelheim) használtunk 5 napon keresztül.

A graftot tartalmazó érszakaszok átjárhatóságát a femoralis pulzus tapintásával naponta ellenőriztük. Emellett rendszeresen Doppler-ultrahangos vizsgálatot végeztünk.

A 3 hónapos utókövetés leteltével újabb műtéti beavatkozással a működőképességüket megtartott 4 db érgraftot a befogadó érszakasz egy darabjával együtt eltávolítottuk.

Az eltávolított garftokból szövettani és immunhisztokémiai metszeteket készítettünk és összehasonlítottuk a graftot befogadó artéria (továbbiakban kontroll), a graft anyagát adó belső rectushüvely és az érgraft felépítését. A rutin *HE* festés mellett *azan* festést végeztünk a collagen rostok és *orcein* festést az elasztikus rostok kimutatására. Az immunhisztokémiai vizsgálataink során anti-*claudin-5*, anti-*desmin*, anti- α -*smooth muscle actin* (α -SMA) és anti-*pancytokeratin AE1-AE3* antitesteket használtunk fel. Külső pozitív kontrollként használtuk a kutyák emlőrákjában kialakult mikroerek endothelsejtjeit CLD-5 esetében, leiomyomát α -SMA-nál, musculus arrector pili-t desminre és emlőmirigyet pancytocerinra.

4.2 Eredmények

Négy kutyán végeztük el a tubularis artériás graftok beültetését, így összesen 8 graftot hoztunk létre. Az érgraftok kialakítása és beültetése során műtétechnikai akadály nem lépett fel, és a recirkuláció megindulása után benne a vérátáramlás zavartalan volt.

A graftok működését a műtétet követően rendszeresen ismételt femoralis pulzusvizsgálattal és Doppler-ultrahangvizsgálattal ellenőriztük. Ezek alapján 8-ból 4 graft a harmadik hónap végére elzáródott, kettő jelentősen beszűkült, de átjárható maradt és kettő elfogadhatóan funkcionált.

A 3 hónap leteltével egy ismételt beavatkozás keretében az átjárhatóan megmaradt graftokat a befogadó artéria egy kis proximális és distalis darabjával együtt elátovoltítottuk. Makroszkóposan az eltávolított graftoknál vaskos és merev falat láttunk, de a belső, lumen felőli felület ép volt. A beszűkült vagy elzáródott graftok körül kollaterális érhálózat épült ki.

A szövettani vizsgálattal megállapítottuk, hogy a *kontrollként használt intakt érszakasz* esetében a HE festéssel láthatóvá vált az érfal szabályos rétegzettsége, a tunica intima, media és externa (adventitia). A media rétegben szabályos elrendeződésű, elnyúlt orsó alakú, kék sejtmaggal rendelkező

simaizom sejteket lehetett látni. Az azan-festés a falban lévő collagen rostokat kék színben tüntette fel. Az adventitia réteg fokozottabb kollagén rost tartalmat mutatott a media réteghöz képest. Az orcein festés a nagymennyiségű elasztikus rostot jelenített meg a lamina elastica interna és externa területének megfelelően. Az ép *belső rectushüvely* belfelszínét mesothel sejtréteg borította. A falában azan festéssel kollagénrostokat és orcein festéssel elasztikus rostokat lehetett kimutatni. Simaizmok nem lehetett látni. A beültetett *graft* esetében is megfigyelhető volt a HE festéssel az érfalszerű szöveti rétegződés, de sokkal hypocellularisabb mediaszerű zónával. A *graft* belfelszínén elnyúlt, endothelszerű sejtek, alattuk a tunica media sejtszövetekre emlékeztető, orsó alakú sejtmaggal rendelkező mesenchymalis sejteket lehetett látni. Az azan festéssel nagymennyiségű kollagén rosttömeget lehetett látni. Az orcein festéssel elasztikus rostokat lehetett kimutatni.

Az immunhisztokémiai vizsgálat alapján a *kontroll* esetében az endothel réteg CLD-5 immunreaktivitását lineáris, intenzív, barna színreakció jelezte. Az érfalrészlet tunica media sejtjeiben intenzív, homogén, cytoplasmaticus desmin pozitívitást (barna színreakció) lehetett látni. Az érfalrészlet tunica media sejtjeiben, valamint a környező vasa vasorumokban intenzív, homogén, diffúz, cytoplasmaticus α -SMA-pozitívitás (barna színreakció) jelent meg. Az érfalrészlet pancytocerin negatív volt. Az ép *belső rectushüvely*

belfelszínét mesothel sejtek borítják, amelyek pancytocerin pozitívak és CLD-5 negatívak voltak. A belső rectushüvely fala α -SMA negatív és desmin pozitív volt. A *graftok* belső felszínét lapos fusocellularis sejtréteg fedte, amely CLD-5 pozitív és pancytocerin negatív volt. A *graftok* vasa vasorumainak endothel bélése is CLD-5 pozitív volt (pozitív belső kontroll). A *graftok* falában látható orsó alakú sejtek közepes mértékű α -SMA és desmin pozitívítást mutattak.

Az immunhisztokémiai eredmények összefoglalását a **1. táblázatban** lehet látni.

1. táblázat. Az immunhisztokémiai eredmények:

	Kontroll	Rectus-hüvely	RF graft
CLD-5	+++	-	++
α-SMA	+++	-	++
Desmin	+++	+++	+ / +++
Pancytocerin	-	+++	-

4. 3 Megbeszélés

Kísérletünkben a harmadik hónap végére négy érgraft maradt átjárható, vagyis a beültetett graftok 50%-a. Ebből a négyből kettő be volt szűkülve. Ezzel szemben a korábbi kísérletek 90%-os eredményességről számolnak be (Kóbori és mtsai., 2008). A jelentős eltérés hátterében számos tényező állhat. Felmerülhet technikai hiba lehetősége (pl. a lumen felőli mesothel sejtek sérülése, túl nagy különbség a befogadó artéria és graft átmérője között). Különbség adódhat még abból is, hogy nem adtunk thrombocyta aggregációt gátló acetyl-szalicilsavat a posztoperatív időszakban

A vizsgálatunk célja azonban nem a Kóbori és mtsai által elvégzett korábbi kísérletek eredményeinek ellenőrzése volt, hanem kiindulva az általuk elvégzett jóval nagyobb esetszámú kedvező kísérleti eredményekből, a kialakított belső rectushüvely érgraftok további morfológiai, immunhisztokémiai vizsgálatát végeztük el. Kóbori és mtsai a korábbi kísérletekben a CD34 és a vWf biomarkerek felhasználásával egészítették ki a rutin szövettani vizsgálatokat (Kóbori 2003; 2008), de időközben újabb, specifikusabb immunhisztokémiai biomarkerek (claudin-5, desmin, α -sma, pancytocerin) bevonására is lehetőség nyílt.

A szövettani-morfológiai vizsgálataink alapján a belső rectushüvely az artériás érszakaszba történő bültetését

követően jelentősen átalakult. A vizsgálatunk alapján az intakt belső rectushüvely hasüreg felőli felületét immunhisztokémiailag CLD-5 negatív és pancycoceratin pozitív mesothel sejtek borítják, de az érgraftokban a belső luminalis sejtréteg CLD-5 pozitívvá és pancycoceratin negatívvá vált, megegyezően az intakt endothel sejtekkel. Mindezek alapján az endothel specifikus CLD-5 biomarker (Jakab és mtsai, 2008a) felhasználásával a RF graft belfelszínén a beültetést követően egy új endothel réteg létrejöttét igazoltuk. A vizsgálataink alapján az intakt belső rectushüvely desmin pozitivitást és a vascularis simaizomra specifikus α -SMA (Nagamoto és mtsai, 2000) negativitást mutat, de az érgraft falában a nagymennyiségű collagen rost mellett látható orsó-alakú sejtek, az erek simaizom sejtjeihez hasonlóan, α -SMA pozitívak voltak. Az immunreakcióban bekövetkező változás arra utal, hogy a belső rectushüvelyben lévő fibroblast sejtek myofibroblast sejtekké alakultak át (transzdifferenciáció), amelyek simaizom actint tartalmazó fibroblastok (Meng és mtsai, 2001).

A vizsgálatunk alapján a belső rectushüvely autolog érgraft egy lehetséges alternatív érpotló anyagnak tűnik, mert jól beépül a befogadó artéria falába, kilökődést nem tapasztaltunk, szerkezete, különösen a belfelszínét beborító endothelrétegnek köszönhetően, a befogadó artériához hasonlóvá válik. Ugyanakkor a fala a befogadó artériánál

vastagabb és rugalmatlanabb, és a mi vizsgálatunkban, eltérően a korábbiaktól, nagy százalékban stenosisra és elzáródásra hajlamosnak bizonyult. Tubularis artériás graftként való esetleges klinikai felhasználása csak szoros monitorozás és megfelelő thromboprophylaxis mellett, és szükség esetén az elzáródást megakadályozó stentek használatával javasolható.

5. SAJÁT VIZSGÁLATOK III.: A belső rectushüvelyből kialakított artériás tubularis graftok miográfiás vizsgálata

5.1 Anyag és módszer

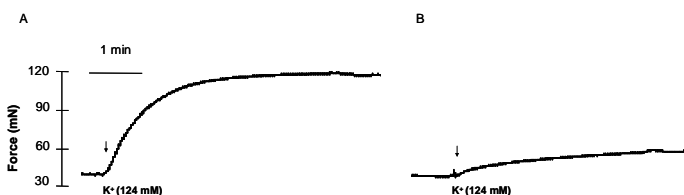
Izolált érszegmentumok izometriás tenziójának mérése.

Az érszegmentumok vizsgálatát a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Klinikai Kísérleti Kutató – és Humán Élettani Intézet laboratóriumában végeztük. Az izometriás tenzió mérésére Högestatt és mtsai illetve Hardebo és mtsai módszerét használtuk (Högestatt és mtsai, 1983; Hardebo és mtsai, 1986). A saját vizsgálatok II.-ben leírt módon beültetett és három hónapot követően kivett és Tyrode-oldatban tárolt két érgraftot használtuk fel a vizsgálathoz. A két érgraftból csupán egy volt alkalmas a miográfos vizsgálatra, mert a másik átmérője túl nagy volt és nem illeszkedett megfelelően a miográf tüihez. A vizsgálatra alkalmas graftot és a hozzá tartozó érszakaszokat szobahőmérsékletű Krebs-oldatba merítettük és sebészi mikroszkóp alatt (WILD M3Z, Switzerland) megtisztítottuk a kötőszövetől és zsírtól. Két, egyenként 5 mm hosszúságú hengeres darabot preparáltunk a graftból, valamint egy-egy darabot a proximalis és a distalis intakt érszakasz területéről. Az előkészítés során nagy figyelmet fordítottunk az endothelium megőrzésére. Az érgyűrűket két 200 µm átmérőjű, egymással párhuzamos

rozsdamentes acéltűre helyeztük. Az egyik tű egy mikromanipulátorhoz, a másik pedig egy erőmérőhöz csatlakozott, amelynek segítségével, erősítés után, az izometriás tenzióban bekövetkező változásokat regisztráltuk. A mérések során párhuzamosan rögzítettük a változásokat a graftot és kontroll eret tartalmazó kádakban. A kísérlet első lépéseként meghatároztuk a kontrakciós választ 124 mM (0,124 mol/l) K^+ -ot tartalmazó Krebs-oldat segítségével, ezt az értéket tekintettük referenciakontrakciónak. A vazoaktív anyagként elsőként a kontrakciót okozó phenylephrint (PE) adtuk az oldathoz. A kiváltott hatást kumulatív dózis-hatásgörbék segítségével határoztuk meg. Fokozatosan egyre nagyobb töménységben adagoltuk, 10^{-8} mol/l-től egészen 10^{-4} mol/l-ig. Miután a kontrakcióban elértünk egy stabil platófázist, az endothelium működésének vizsgálatára mosás nélkül acetil-kolint (ACh) adtunk, kezdve 10^{-9} mol/l koncentrációtól haladva 10^{-5} mol/l-ig. A kiváltott hatást a PE-hez hasonlóan rögzítettük. Végül egy thromboxán A_2 analóg, az U-46619 hatását teszteltük, amely erős összehúzódot képes kiváltani az erekben.

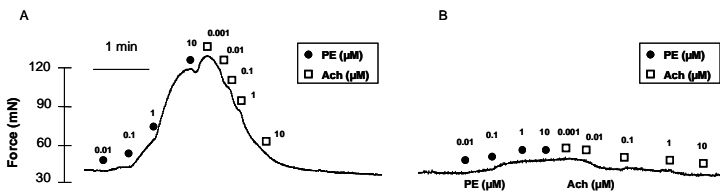
5.2 Eredmények

A kísérlet első lépéseként meghatároztuk a kontrakciós választ 124 mM K^+ -ot tartalmazó Krebs-oldat segítségével (**1. ábra**). Az artéria esetében az izometriás tenzió mértéke 80 mN-al emelkedett, míg a beültett graft esetében csak 20 mN-al.



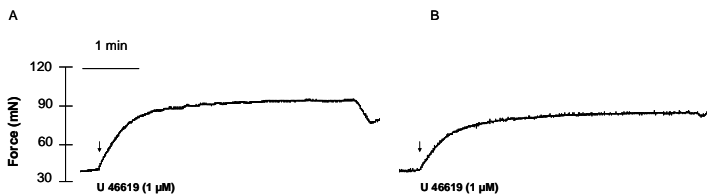
1. ábra. A 124 mM K^+ oldat által kiváltott kontrakció mértéke látható az artérián (A) és a grafton (B). Független tengelyen a tenzió mértéke (mN), vízszintes tengelyen az idő látható (min).

A K^+ után mind az artériát, mind a graftot az összehúzódást okozó PE-vel ingereltük úgy, hogy a koncentrációját fokozatosan növeltük 10^{-8} mol/l-ről 10^{-5} mol/l-re. Amikor az összehúzódás mértéke elérte tetőpontját, ACh-t kezdtünk el adni 10^{-9} mol/l-től 10^{-5} mol/l-ig növelve a koncentrációt, amivel a NO által okozott relaxációt tudtuk vizsgálni. Az artériákkal összehasonlítva a PE dózisfüggő kontrakciós hatása és az Ach kumulatív relaxációs hatása a graftban kevésbé érvényesült (**2. ábra**).



2. ábra. A PE indukálta kontrakció és Ach kiváltotta relaxáció mérése az artériában (A) és a graftban (B). A pontok jelzik a PE és az üres négyzetek az Ach beadását. Függőleges tengelyen a tenzió mértéke (mN), vízszintes tengelyen az idő látható (min).

Ezt követően az U-46619 hatását vizsgáltuk, amely a graftban a PE-nél lényegesen nagyobb összehúzódást váltott ki, aminek a mértéke már megközelítette az artériás érgyűrűben mérhető értéket (**3. ábra**).



3. ábra. Az U46619 által kiváltott kontrakció mérése az artériában (A) és a graftban (B). Függőleges tengelyen a tenzió mértéke (mN), vízszintes tengelyen az idő látható (min).

5.3 Megbeszélés

A miográfiás vizsgálat eredményeiből látható, hogy a belső rectushüvely-érgraft reagált a K^+ -ra, vagyis a K^+ által okozott depolarizáció a simaizom-elemek összehúzódását váltotta ki. Ennek a mértéke azonban messze elmaradt a kontroll erekben tapasztaltnál képest. A graftokból végzett szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok alapján az érgraft fala nagymennyiségű collagen rostot és elasztikus rostot tartalmaz és emellett myofibroblastok láthatóak benne, de az artéria falában látható egységes simaizom-sejtréteg hiányzik. Ez a jelentős morfológiai különbség indokolhatja a lényegesen gyengébb összehúzódást. Az érgraft a PE adására is összehúzódással válaszolt, de ennek a mértéke ismét messze elmaradt a kontroll artériához képest. Az érgraft reagált az ACh hatására is, amely NO-felszabadulást eredményez az endothelsejtekből és a simaizomsejtek relaxációját okozza. A relaxáció mértéke közel 100%-os volt, de ennek az eredménynek az értékelését nagyban megnehezíti a kismértékű előzetes referencia összehúzódás (prekontrakció). Az érgraft reagált a thromboxán A_2 agonista U-46619 adására is. Érdekes módon az összehúzódás mértéke hasonló volt a kontroll artériához.

Az elvégzett vizsgálatok alapján a miográfiás módszer alkalmas volt az izometriás tenzió mérésére kutya artérián és az érgraftokon is. Megállapítható volt, hogy a vasoaktív

anyagok hatására az érgraft esetében is a kontroll artériához hasonló irányú változás jött létre, de a thromboxán A_2 agonista U-46619 kivételével ez a reakció jelentősen gyengébb volt. A pontos statisztikai kiértékelést a mintaszám nem tette lehetővé, de az elvégzett vizsgálat rámutat arra, hogy az érgraft, a belső felszínét borító endothelsejt-réteg és a falában megtalálható myofibroblastok miatt nem csak morfológiailag, hanem a vazoaktív anyagok hatására változó izometriás tenziója alapján élettanilag is mutat hasonlóságot a kontroll artériával.

6. A VIZSGÁLATI EREDMÉNYEKET LIMITÁLÓ TÉNYEZŐK

Az elvégzett kísérletek eredményeinek értékelését számos tényező limitálja. A belső rectushüvely érgraftot a vénák esetében csak foltgraftként próbáltuk ki, így nem tudjuk, hogy tubularis graft formájában fel lehet-e használni. A vénák rekonstrukciós sebészetében lenne ennek jelentősége, de további kísérleteket igényelne a kérdés megválaszolása. Az artériás graftok esetében kevés számú működő graftot tudtunk kialakítani, ami befolyásolja a belső rectushüvely érgraft érsebészeti felhasználási lehetőségének megítélését. Korábban mások már nagyobb számban és kedvezőbb eredménnyel végeztek a belső rectushüvellyel kísérletes vizsgálatot, de összességében, a mi tapasztalatainkat is figyelembe véve, további kísérletek szükségesek a klinikai alkalmazás megkezdése előtt. A miográfias vizsgálat során egyértelműen tudtuk igazolni, hogy a módszer alkalmas a belső rectushüvely érgraft funkcionális vizsgálatára, és a vazóaktív anyagok hatására bekövetkezett válaszreakciók funkcionáló endothel sejtréteget és rugalmas falszerkezetet feltételeznek, de annak megítélése, hogy ezek a graftok az intakt erekhez képest pontosan milyen mértékben képesek a kontrakcióra és relaxációra és így az intakt érhez hasonló funkció biztosítására, csak statisztikailag kiértékelhető számú mintán elvégzett kísérlet alapján lehetne megítélni.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- 1) Igazoltuk, hogy a belső rectushüvelyből képzett autolog foltgraft gyulladással és kilökődésre utaló jelek nélküli beépül a vénák falába.
- 2) Immunhisztokémiailag igazoltuk, hogy a belső rectushüvelyből képzett autolog vénás foltgraft belfelszínét claudin-5 és CD31 pozitív ép endothelsejtréteg borítja, a beültetését követően három hónappal.
- 3) Kísérletesen igazoltuk, hogy a belső rectushüvely autolog foltgraftként alkalmas vénák rekonstrukciójára.
- 4) Igazoltuk, hogy a belső rectushüvelyből képzett autolog tubularis artériás érgraft a beültetést követően morfológiailag átalakul, és az immunhisztokémiailag pancytocerin pozitív mesothel sejtréteg helyét claudin-5 pozitív endothel sejtréteg foglalja el.
- 5) Immunhisztokémiailag igazoltuk, hogy a belső rectushüvelyből képzett autolog tubularis artériás érgraft falában lévő fibroblastok a beültetést követően α -SMA pozitív myofibroblastokká alakulnak át.

6) Igazoltuk, hogy a miográfiás módszer alkalmas az izometriás tenzió mérésére kutya artérián és a belső rectushüvelyből képzett érgraftokon is. Megállapítást nyert, hogy az érgraft vasoaktív anyagok hatására kontrakcióra és relaxációra képes.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Cousar, J. E. and Lam, C. R. (1952): Rectus sheath grafts in vascular repair. *Arch. Surg.* 65, 471–476.
2. Hardebo J.E., Hanko J., Kahrstrom, J. et al. (1986): Electrical field stimulation in cerebral and peripheral arteries: a critical evaluation of the contractile response. *J Auton Pharmacol.* 6, 85-96.
3. Holsworth, I. G., Kyles, A. E., Bailiff, N. L., et al (2004): Use of a jugular vein autograft for reconstruction of the cranial vena cava in a dog with invasive thymoma and cranial vena cava syndrome. *J Am Vet Med Assoc* 225:1205.
4. Högestatt, E. D., Andersson, K. E., Edvinsson, L. (1983): Mechanical properties of rat cerebral arteries as studied by a sensitive device for recording of mechanical activity in isolated small blood vessels. *Acta Physiol Scand.* 117, 49-61.
5. Jakab, Cs., Halász, J., Szász, A. M., Kiss, A., Schaff, Zs., Rusvai, M., Abonyi Tóth, Zs. and Kulka, J. (2008b): Evaluation of microvessel density (MVD) in canine mammary tumours by quantitative immunohistochemistry of the claudin-5 molecule. *Acta Vet. Hung.* 56, 495–510.
6. Jakab, Cs., Halász, J., Kiss, A., Schaff, Zs., Rusvai, M., Gálfi, P. and Kulka, J. (2009a): Claudin-5 protein is a new differential marker for histopathological differential diagnosis of canine hemangiosarcoma. *Histol. Histopathol.* 24, 801–813.

7. Kóbori, L., Dallos, G., Gouw, A. H. S., Németh, T., Nemes, B., Fehérvári, I., Tegzess, A. M., Sloff, M. J. H., Perner, F., de Jong, K. P. (2000): Experimental autologous substitute vascular graft for transplantation surgery. *Acta. Vet. Hung.*, 48, 355-360.
8. Kóbori, L., Németh, T., Nemes, B., Dallos, G., Sótónyi Jr. P., Fehérvári, I., Patonai, A., Sloff, M. J. H., Járny, J., de Jong, K. P. (2003): Experimental Vascular Graft for Liver Transplantation. *Acta Vet. Hung.* 51, 529–537.
9. Kóbori, L., Doros, A., Németh, T., Fazakas, J., Nemes, B., Slooff, M. J., Járny, J. and de Jong, K. P. (2005): The use of autologous rectus facia sheath for replacement of inferior caval vein defect in orthotopic liver transplantation. *Transpl. Int.* 18, 1376–1377.
10. Kóbori, L., Németh, T., Nagy, P., Dallos, G., Sótónyi, P. Jr., Fehérvári, I., Nemes, B., Görög, D., Patonai, A., Monostory, K., Doros, A., Sárvány, E., Fazekas, J., Gerlei, Zs., Benkő, T., Piros, L., Járny, J. and De Jong, K. P. (2008): Experimental results and clinical impact of using autologous rectus fascia sheath for vascular replacement. *Acta Vet. Hung.* 56, 411–420.
11. Kock, M. C. J. M., Dijkshoorn, M. L., Pattynama, P. T. M. and Hunink, M. G. M. (2007): Multidetector row computed tomography angiography of peripheral arterial disease. *Eur. Radiol.* 17, 3208–3222.

12. Meng, Y., Han, X., Huang, L., Bai, D., Yu, H., He, Y., Jing, Y. (2001): Orthodontic mechanical tension effects on the myofibroblast expression of alpha-smooth muscle actin. *Angle Orthod.* 80, 912–918.
13. Nagamoto, T., Eguchi, G., Beebe, D., C. (2000): Alpha-smooth muscle actin expression in cultured lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41, 1122-9.
14. Németh, T., Kóbori, L., Dallos, G., Nemes, B., Manczur, F., Heteyi, Cs., Sloof, M. J. H., de Jong, K. P. (2005): Belső rectushüvelyből készett autograft éprotézis kísérletes vizsgálata kutyákban. *Magyar Állatorvosok Lapja* 127, 99-105.
15. Pacholewicz, J. K., Daloisio, C., Shawarby, O. A., Dharan, S. M., Gu, J., and McGrath, L. B. (1994): Efficacy of autologous peritoneum as a biological membrane in cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg.* 563-565.
16. Sun, Z. H. (2006): 3D multislice CT angiography in post-aortic stent grafting: a pictorial essay. *Korean J. Radiol.* 7, 205–211.
17. Tobias, K. M., Johnston, S. A. (2012): *Veterinary Surgery Small Animal. Vascular surgery.* Elsevier Saunders. St. Louis. 1854-1869.

9. A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI

Csébi, P., Jakab, Cs., Patonai, A., Arany-Tóth, A., Kóbori, L. and Németh, T. (2014): Morphological evaluation of experimental autologous rectus fascia sheath vascular grafts used for arterial replacement in a dog model. *Acta Veterinaria Hungarica* 62, 429-438. IF: 0.802.

Csébi, P., Jakab, Cs., Németh, T. (2014): Morphological evaluation of experimental autologous rectus fascia sheath grafts used for arterial replacement in a dog model. Conference Abstract. *Veterinary Surgery* 43, 129. IF: 0.989.

Csébi, P., Ruisanchez, É., Jakab, Cs., Patonai, A., Arany-Tóth A., Nemes, K., Németh, T. (2014): Hogyan reagál az autolog rectus hüvelyből képzett érgraft vazóaktív anyagok hatására? Kísérletes miográfós vizsgálat kutya modellben. *Magyar Állatorvosok Lapja* 136, 743-749. IF: 0.185.

Csébi, P., Németh, T., Jakab, Cs., Patonai, A., Garamvölgyi, R., Manczur, F., Spitzner, Á., Arany-Tóth, A. and Kóbori, L. (2011): Experimental results of using autologous rectus fascia sheath for venous patch grafts in dogs. *Acta Veterinaria Hungarica* 59, 373–384. IF: 0.673.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet:

- Dr. Németh Tibornak, témavezetőmnek támogatásáért és a kísérletekben nyújtott segítségéért,
- Dr. Jakab Csabának és Dr. Patonai Attilának a szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok során nyújtott segítségéért,
- Dr. Ruisanchez Évának a miográfiás vizsgálatok kivitelezésében nyújtott segítségéért,
- Dr. Garamvölgyi Ritának a CT angiográfiás vizsgálatokban nyújtott segítségéért,
- Dr. Manczur Ferencnek, Dr. Dudás-Györki Zoltánnak és Dr. Hetey Csabának az ultrahangos vizsgálatokban nyújtott segítségéért,
- Dr. Spitzner Ádámnak és Dr. Nemes Katalinnak a kísérletekben nyújtott segítségéért,
- Kampó Józsefné Marikának a műtéti fotókért
- Pop Renátának a szövettani metszetek elkészítéséért
- Dr. Arany Tóth Attila kollégámnak tanácsaiért,
- Oláh Editnek, Orbán Évának, Pádár Évának és a SZIE ÁOTK könyvtár többi dolgozójának az irodalmazásban nyújtott segítségéért,
- és Családomnak, a mindvégig kitartó biztatásért és támogatásért.