

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**Az endoszkópia szerepe és lehetőségei a gasztroenterológiai
diagnosztika és terápia néhány területén kutyában**

PhD-értekezés tézisei

Dr. Psáder Roland

2014

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Dr. Sterczler Ágnes

egyetemi docens, PhD

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar

Belgyógyászati Tanszék és Klinika

témavezető

.....

Dr. Psáder Roland

1. Bevezetés és célkitűzések

A gyomor-bél endoszkópia, mint kiegészítő diagnosztikai eljárás, kiemelkedő szerepet játszik a különböző gastrointestinalis kórképek korai felismerésében. Számos esetben a legcélravezetőbb és minimálisan invazív eljárás, mely segítséget nyújt a makroszkópos elváltozások felismerése mellett – a célzott biopsziás mintavételnek köszönhetően – a szubklinikai vagy kezdeti stádiumban lévő betegségek kórismézésében. A gasztro-duodenoszkópia kiválóan alkalmas a beteg gyógyulásának nyomon követésére is, valamint a mesterséges táplálás egyik alternatíváját jelentő nasojejunalis tápszonda alkalmazhatóságának vizsgálatára. Munkám során szeretnék rámutatni a gyomor-bél endoszkópia szerepére és lehetőségeire a gasztroenterológiai diagnosztika és terápia néhány területén kutyában.

A humán irodalmi adatok szerint a jejunum második kacsába, a Treitz ligamentum mögé helyezett tápszonda alkalmazásával elkerülhető a hasnyálmirigy stimulációja, mivel kimarad a cephalicus és a gastricus fázis, így az intrajejunalis táplálás nem fokozza a pancreas alapszekrécióját (Bodoky et al., 1991; Harsányi et al., 1991; Oláh et al., 2002). Azt is tudjuk, hogy a táplálás következtében kialakuló epehólyag-kontrakció és hasnyálmirigynedv elválasztás közös neuro-humoralis szabályozás alatt áll. STERCZER és mtsai (1996) kidolgozták és leírták az epehólyag-kontrakció mérésének ultrahangos módszerét, melyet alkalmazva a táplálás következtében kialakuló epehólyag összehúzódásának mérésére, a kapott adatokból következtethetünk a hasnyálmirigy működésére is. A nasojejunalis tápszonda endoszkóppal történő levezetését kutyában elsőként a mi munkacsoportunk írta le az állatorvosi szakirodalomban (Pápa et al., 2009). A dolgozat első részében az enterális táplálás epehólyag működésére gyakorolt hatását vizsgáltuk kutyákban. Célunk annak meghatározása volt, hogy a szondán át négy anatómiai pozícióba (jejunum, duodenojejunalis átmenet, duodenum descendens és gyomor) juttatott cholagog tápoldat hogyan hat az epehólyag működésére. Ehhez anatómiai előtanulmányban vizsgáltuk az egyes vékonybél szakaszok hosszát kutyában annak érdekében, hogy a tápszondánkat a kísérlet során – ellenőrző röntgenfelvételek nélkül – pozícionálni tudjuk. Egy másik előtanulmányban bizonyítottuk a Lipofundin infúzió (Lipofundin MCT/LCT 20%, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Németország) cholagog hatását, mivel nem találtunk irodalmi hivatkozást erre vonatkozóan.

A World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) Gastrointestinal Standardization Group 2008-ban kidolgozott egy általános és nemzetközi ajánlást a kutyák és macskák gyomor- és bélbiopsziáinak kórszövettani értékelésére (Day et al., 2008), melynek hazai alkalmazása is időszerűvé vált.

Az értekezés második részében kutyák endoszkópos gyomorbiopsziáinak átfogó kórszövettani, klinikopatológiai és immunhisztokémiai értékelését végeztük el. Vizsgálatunk célja, hogy a WSAVA által publikált nemzetközi standardot átültessük a hazai gyakorlatba. Másrészt összefüggéseket keressünk a vizsgált kutyák gyomorbiopsziáinak kórszövettani eltérései és a klinikai vonatkozások között (retrospektív tanulmány). Immunhisztokémiai vizsgálataink során az egészséges, lymphocytás gastritises és pecsétgyűrűsejtes adenocarcinomás kutyák gyomrából származó necropsziás és endoszkópos biopsziás minták claudin expresszióját vizsgáljuk, és ezek összehasonlító elemzését végezzük el. Célunk olyan immunhisztokémiai markerek keresése, melyek korai stádiumban jelezhetik a kórfolyamatot vagy rávilágíthatnak a betegség kialakulásának patomechanizmusára.

2. Az endoszkóppal bevezetett enteralis tápszonda és a tápadagolás helyének hatása a kutyák epehólyag működésére

2.1. A kutya egyes vékonybél szakaszainak mérése (anatómiai előtanulmány)

2.1.1. Anyag és módszer

Mivel adatainkat főleg kutyahullákon gyűjtöttük, melyeket a hullajelenségek (hullamerevség, autolysis) befolyásolhatnak, így szükséges volt összevetni a kapott értékeket élő állatokon nyert adatokkal is. Lehetőségünk volt arra, hogy az AIDR Auricoop Kft. (2120 Dunakeszi, Pálya u. 2.) végleges elaltatásra váró három kísérleti beagle kutyáján elvégezhessük a méréseinket műtéti körülmények között, még élő állapotban és az euthanasia után is. E három kutya egyikébe élő állapotban tápszondát vezetünk a duodeno-jejunalis átmenetig, és azt ellenőriztük, hogy a szonda helyeződése változott-e az euthanasia után. A beavatkozások minden esetben a hatályos állatvédelmi szabályok betartásával történtek.

A vizsgált kutyákat három csoportba soroltuk:

1. nem homogén fajtájú kutyahullák (n=25; 14 kan, 11 szuka)
2. beagle fajtájú kutyahullák (n=10; 5 kan, 5 szuka)
3. élő beagle fajtájú kísérleti kutyák (n=3; 1 kan, 2 szuka)

Méréseinket az Anatómiai és Szövetani Tanszék bonctermében (1. csoport), az AIDR Auricoop Kft. bonctermében (2. csoport) és a SZIE ÁOTK Belgyógyászati Tanszék és Klinikán (3. csoport) végeztük el. A 3. csoport esetében a röntgenvizsgálat a Sebészeti és Szemészeti Tanszéken készült, az állatok post mortem vizsgálata a Patológiai Tanszéken történt.

A kutyák egyes vékonybél szakaszainak hossza és a testtömeg, valamint a marmagasság közötti összefüggések erősségének és szignifikanciájának megállapításához regresszió analízissel meghatároztuk a determinációs együtthatót (R-négyzet) és a P-értéket.

2.1.2. Eredmények és megbeszélés

1. Különböző méretű és marmagasságú kutyák csoportján és a beagle fajtájú kutyahullák csoportján belül is az egyes vékonybél szakaszok hossza nagymértékű variációt mutat.

2. Az adatok nagymértékű varianciája miatt nem lehet sem a testtömeg, sem a marmagasság ismeretében olyan egyenletet felírni, mellyel az egyes vékonybél szakaszok hossza pontosan megállapítható lenne.
3. Az élő és post mortem állapotban mért vékonybél szakaszok hossza között számottevő különbséget nem tapasztaltunk, habár a kis elemszám miatt ennek statisztikai módszerekkel való igazolására nem volt lehetőségünk.
4. Egy állaton igazoltuk, hogy az endoszkóppal levezetett nasojejunalis tápszonda helyzete megegyezett a röntgenfilmen, a műtéti körülmények között laparotómiával talált és a boncolás során látható pozícióval.

1.2. Lipofundin epehólyagra gyakorolt hatása (előtanulmány)

2.2.1. Anyag és módszer

Hét beagle kutyának (nem: 3 kan, 4 szuka; kor: 10-22 hó; testtömeg: 10,0-14,3 kg) szájon át adagoltuk 2ml/kg dózisban a Lipofundin infúziót, és az epehólyag ürülés mértékét az "area-length" ultrahangos módszerrel határoztuk meg (Sterczer et al., 1996). A Lipofundin beadása előtti nulladik percben és utána tízpercenként 3-3-szor mértük az epehólyag térfogatát, és az eredményeket rögzítettük. A kutyák fizikális és vérlabor vizsgálat (mennyiségi és minőségi vérkép, szérum összes zsírsav, alkalikus foszfatáz, alanin-aminotranszferáz, gamma-glutamil-transzferáz, albumin, összfehérje és kreatinin szint) alapján egészségesek voltak. A kutyákat a mérések előtt egyedi ketrecekben, ugyanabban a helyiségben tartottuk és 24 órán át koplaltattuk. Kísérletünket a hatályos állatvédelmi szabályok betartásával végeztük. Az eredmények statisztikai értékeléséhez a kétmintás Student-féle t-próbát és az R statisztikai szoftvert (R Development Core Team, 2006) használtuk.

2.2.2. Eredmények és megbeszélés

A Lipofundin oldat a legerőteljesebb epehólyag összehúzódnást a beadást követő 30. percben 5 és a 40. percben 2 kutyánál okozta. A maximális epehólyag-kontrakció átlagosan 44,2% (35,3-57,6%) volt. Az alaphelyzethez képest bekövetkező szignifikáns térfogatcsökkenést a beadást követő 10-50. perc között mértük. Az epehólyag gyors térfogatcsökkenését annak telődése követte, mely a beadást követő 40. percben kezdődött. A

Lipofundin oralis adagolása nem okozott a kutyáknál semmilyen káros mellékhatást (pl. hasmenést, hányást, hasi fájdalmat).

Kísérletünkben bizonyítottuk a szájon át adagolható Lipofundin infúzió epehólyag-kontrakciót okozó hatását. A Lipofundin jól tolerálható, hatékony, könnyen alkalmazható készítmény. A Lipofundin infúzió alkalmas az enterális tápszonda helyeződésének és epehólyag-kontrakcióra gyakorolt hatásának vizsgálatára.

1.3. Az endoszkóppal bevezetett enterális tápszonda és a tápadagolás helyének hatása a kutyák epehólyag működésére

2.3.1. Anyag és módszer

Kísérleti állatok, az epehólyag-térfogat mérése

Öt beagle kutyán végeztük el a kísérletet (nem: 3 kan és 2 szuka; kor: 32-36 hónap; testtömeg: 11,6-15,4 kg). A kutyák fizikális és rutin vérlabor (mennyiségi és minőségi vérkép, szérum összehesav, összbilirubin, albumin, összfehérje, alkalikus foszfatáz, alanin-aminotranszferáz, alfa-amiláz, lipáz, karbamid és kreatinin) vizsgálat alapján egészségesek voltak. A kutyákat egyedi ketrecekben, ugyanabban a helyiségben tartottuk, a kísérletet megelőző 10 napban Hill's Science Plan Adult 1-6 (Hill's Pet Nutrition, Inc., USA) táppal etettük naponta kétszer, csapvíz ad libitum állt rendelkezésükre. Méréseink előtt a kutyákat 24 órán át koplaltattuk. Vizsgálatainkat a Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar Etikai Bizottságának engedélyével (engedély száma: 1037/002/2004) végeztük. A Lipofundin beadása előtti nulladik percben és utána ötpercenként 3-3-szor mértük az epehólyag térfogatát a már ismertetett módon (Sterczer et al., 1996). Az eredmények statisztikai értékeléséhez a kétmintás Student-féle t-próbát és az R statisztikai szoftvert (R Development Core Team, 2006) használtuk.

A vizsgálat menete, a tápszonda pozícionálása

Vizsgálatainkat 24 órás koplaltatás után végeztük. A Lipofundin epehólyag ürülésre gyakorolt hatását négy anatómiai pozícióban vizsgáltuk (20-30 cm mélyen a jejunumban, a duodenujejunalis flexuránál, a duodenum descendensben és a gyomorban). Általános anaesthesiában a tápszondát 20-30 cm mélyen a jejunumba vezettük az endoszkóppal és a

szonda helyzetét kontrasztos röntgenfelvétellel kontrolláltuk (Pápa et. al., 2009). Ezután 0,9%-os NaCl (Salzol infúzió, TEVA Co. Ltd., Gödöllő, Hungary) infúziót adagoltunk a szondán át 60 percen keresztül 2 ml/kg/perc sebességgel, és megmértük az alap epehólyag-térfogatot. Ezt követően infúziós pumpa segítségével 2 ml/kg Lipofundint juttattunk 15 perc alatt a jejunumba. Az epehólyag térfogatát ötperces időközönként 3-4-szer megmértük 60 percen át. A 60. perctől ismét fiziológiás sóoldatot adagoltunk a tápszondán keresztül 2 ml/kg/perc sebességgel 60 percen át. Felületes anaesthesiában (propofol 3-6 mg/kg bolusban iv.) a tápszondát röntgen kontroll alatt a duodenojejunalis flexuráig visszahúztuk, és az ornyílásnál és a homlok bőrénél csomós varrattal rögzítettük. A fenti lépéseket ismételtük minden egyes anatómiai pozícióban (a szonda pozícionálása felületes anaesthesiában, röntgen kontroll, fiziológiás sóoldat, alap epehólyag-térfogat rögzítése, Lipofundin infúzió, epehólyag összehúzódás mérése, fiziológiás sóoldat adása). Végül általános anaesthesiában a tápszondát eltávolítottuk. A fenti kísérlet időtartama kutyánként 10-12 óra volt.

Egy másik napon, 24 órás koplaltatást követően éber állapotban ultrahangos méréssel felvettük az alap epehólyag-térfogatot, majd 2 ml/kg Lipofundin infúziót adtunk fecskendővel szájon át a kísérleti kutyáknak, és 60 percen át ötpercenként megmértük 3-4-szer az epehólyag térfogatát.

Statisztikai analízis

A kísérleti adatok statisztikai értékelése az ÁOTK Biomatematikai és Számítástechnikai Tanszékén történt. Az epehólyag-térfogat változásának százalékos adatainak hipotézis vizsgálatát lineáris kevert modellel végeztük, így figyelembe lehetett venni az ugyanazon egyedben (kutyán) mért adatok függőségét. A lineáris kevert modellt az ún. Restricted Maximum Likelihood módszerrel illesztettük (Pinheiro és Bates, 2000). A fix hatások szignifikanciáját (időpontok, illetve bélszakaszok) F-tesztekkel, 5%-os szinten vizsgáltuk. A maximális térfogat változás bélszakasz függését variancia analízissel vizsgáltuk, és Tukey-féle többszörös összehasonlításokat használtunk a szignifikáns különbségek detektálására. Az elemzéshez az R 2. 10. 1. statisztikai programot használtuk (R Development Core Team, 2009).

2.3.2. Eredmények és megbeszélés

A tápszondán át 20-30 cm mélyen a jejunumba adagolt Lipofundin az első szignifikáns epehólyag összehúzódást (GBE1: középérték 5,9%; 2,6-9,6%) az adagolás megkezdésétől számított 10. percben okozta ($P < 0,05$). Az átlagos maximális kontrakció mértéke 7,2% (3,1-

12,7%) volt, melyet a 20. percnél mértük ($P < 0,05$). A duodenojejunalis átmenetnél az első szignifikáns epehólyag összehúzódást (GBE2: középérték 8,9%; 3,2-12,3%) már az 5. percben kiváltotta a Lipofundin ($P < 0,01$). Az átlagos maximális kontrakció mértéke ebben a pozícióban 12,9% (-0,9-22,1%) volt a 15. percben ($P < 0,001$). A duodenum descendensbe juttatott Lipofundin infúzió az első szignifikáns epehólyag-kontrakciót az 5. percnél okozta (GBE3: középérték 6,9%; -2,4-11,0%) ($P < 0,05$) és itt a 15. percben elért átlagos maximális kontrakció 19,5% (8,3-27,3%) ($P < 0,001$) volt. A szájon át adagolt Lipofundin (GBE4) az első szignifikáns epehólyag összehúzódást az 5. percnél érte el, középértéke 8,9% (1,9-21,3%) ($P < 0,05$) és az átlagos maximális kontrakció a 20. percben 30,4% (26,3-36,1%) ($P < 0,001$) volt.

A Lipofundin okozta maximális epehólyag-kontrakciók mértéke és időpontja a vizsgált anatómiai pozíciókban különböző volt. Az átlagos maximális kontrakció 9,2% (3,7-13,8%) volt a jejunumban (GBE1), 16,6% (9,3-22,2%) a duodenojejunalis átmenetben (GBE2), 26,2% (22,5-29,5%) a duodenum descendensben (GBE3) és 34,3% (28,7-46,4%) a gyomorban (GBE4) az adagolt tápoldat hatására. Nem volt szignifikáns különbség a Lipofundin által kiváltott maximális kontrakciók tekintetében statisztikailag összevetve a jejunum-duodenojejunalis átmenet (GBE1max/GBE2max) és a duodenum descendens-gyomor (GBE3max/GBE4max) pozícióknál mért adatokat. Ugyanakkor a Lipofundin következtében kialakult maximális összehúzódás mértéke a jejunumban és a duodenojejunalis átmenetben szignifikánsan különbözött a duodenum descendensben és a gyomorban tapasztalt maximális válasz értékektől. A fiziológiás sóoldat adagolása alatt (2 ml/kg/perc 60 percen át) nem tapasztaltunk szignifikáns térfogat változást az alap epehólyag-térfogathoz képest.

Vizsgálataink során bebizonyosodott, hogy minél mélyebben juttattuk a Lipofundint a gyomor-bél rendszerbe, annál rövidebb ideig tartó és kisebb mértékű epehólyag-kontrakciót tapasztaltunk. Így a jejunalis táplálás alkalmas lehet egyes epeúti megbetegedések (obstrukcióval járó vagy fertőzőes eredetű) kezelése során. A 20-30 cm mélyen a jejunumba adagolt Lipofundin eredményeink alapján csekély mértékű epehólyag összehúzódást okozott, mely alapján feltételezzük, hogy ebben az anatómiai helyzetben a jejunalis tápszonda alkalmas a pancreatitisben szenvedő kutyák mesterséges táplálására is, azonban ennek bizonyítására további klinikai vizsgálatokra van szükség.

3. Az endoszkópia diagnosztikai szerepe a kutyák gyomorbetegségeinek kórjelzésében

3.1. Kutyák endoszkópos módszerrel vett gyomorbiopsziáinak retrospektív vizsgálata

3.1.1. Anyag és módszer

Minták eredete

Tanulmányunkban a SZIE ÁOTK Kisállatkórházának Endoszkóp Laborjába 2007. január és 2010. december között hányás tünete miatt gyomortükrözésre érkezett kutyák endoszkópos módszerrel vett gyomorbiopsziáinak összefoglaló értékelését végeztük el. A gasztroszkópos vizsgálat során a kutyák gyomrából biopsziás fogóval anatómiai régióként (fundus, corpus ventriculi, antrum pyloricum), minimum 3-3 biopsziát vettünk. A mintákat 8%-os pufferolt formaldehid oldatba helyeztük és jelöltük.

A betegek részben az egyetemi klinikákról, másrészt magán-állatorvosoktól érkeztek a gasztroszkópos vizsgálatra. Az említett időszakban összesen 81 kutyából 87 mintavétel történt. A vizsgálatból kizártuk a daganatos betegeket, valamint azokat a mintákat, amelyeket csupán a nyálkahártya legfelületesebb részéből nyertünk. Így összesen 60 kutyából származó 66 minta retrospektív vizsgálatára került sor.

Szöveti feldolgozás és értékelés

A biopsziák kórszöveti feldolgozása a SZIE ÁOTK Patológiai Tanszékén történt. A minták 8%-os pufferolt formaldehid oldatban történő 24 órás fixálása és paraffinos beágyazása után 4 µm vastag szöveti metszeteket készítettünk, melyeket hematoxilín-eozinnal festettünk a gyulladásos és morfológiai elváltozások elbírálása céljából, ezenfelül módosított Giemsa festést és szükség esetén Warthin-Starry festést alkalmaztunk a GHLO (Gastric Helicobacter-like Organisms) kimutatása érdekében. A kórszöveti értékelést mindig ugyanaz a személy végezte. A szöveti minták egységes elemzése érdekében az említett nemzetközi ajánlást (Day et al., 2008) honosítottuk és kiegészítettük a gyomor fundusi régiójával, valamint a GHLO-fertőzöttség vizsgálatával. A standard előírásainak megfelelően 0-3-as skálán (nincs, enyhe, közepes, súlyos) jelöltük a gyomornyálkahártya lymphocytás-plasmasejtes, eosinophil sejtes, neutrophil sejtes beszűrődését és a lymphoid

follicularis hyperplasiát. A mintáink vizsgálata során a GHLO-fertőzöttséget szintén 0-3-as skálán osztályoztuk (nincs, enyhe, közepes, súlyos) a patológus megítélésére hagyatkozva.

Gyógykezelés

Az alkalmazott gyógykezelést hat fokozatba soroltuk, melyek időrendi sorrendben a következők:

1. tüneti kezelés gyógyszerei (hányáscsillapítók, H₂- antagonisták),
2. egyszerű diéta (gyári tápok intestinal formulája vagy zsírszegény és csontmentes eleség),
3. gluténmentes diéta új fehérjeforrással,
4. rövid ideig tartó (néhány napos), monoterápiában alkalmazott antibiotikum kezelés (amoxicillin, enrofloxacin vagy egyéb antibiotikum, esetleg metronidazol),
5. Helicobacterium eradikációs kezelés (minimum 10 napig tartó amoxicillin-klavulánsav 2 x 10 mg/kg/nap, klaritromicin 2 x 8-10 mg/kg/nap, metronidazol 2 x 10-15 mg/kg/nap kezelés minimum 2-es vagy 3-as kombinációban egy időben vagy egymást követően alkalmazva),
6. prednizolon kezelés (általában 2 mg/kg/nap induló dózissal, az adagot 2 hetente 50%-kal csökkentve a legkisebb hatékony dózis eléréséig).

A betegek gyógykezelése ezen fokozatok szerint történt, amennyiben a kezelésre adott válasz nem volt megfelelő – azaz a beteg továbbra is hányt, vagy a panaszai nem múltak – úgy a sorrendben következő terápiát folytattuk.

Statisztikai értékelés

Az összefüggés vizsgálatokat Spearman-féle rangkorreláció számításával és tesztelésével végeztük el (Reiczigel et al., 2010). $P < 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak az eredményeket. Az elemzésekhez az R 2.14.0 statisztikai programot használtuk (R Development Core Team, 2011).

3.1.2. Eredmények és megbeszélés

A 8 (13,3%) keverék mellett a leggyakoribb fajta a labrador retriever, yorkshire terrier 4-4 (6,7%), francia bulldog és golden retriever 3-3 (5,0%) volt. Lymphocytás-plasmasejtes gyulladást 43 (65,2%), eosinophilssejtes beszűrődést 5 (7,6%), neutrophilssejtes beszűrődést 10 (15,2%), lymphoid follicularis hyperplasiát 6 (9,1%) és GHLO fertőzöttséget 34 esetben

(51,5%) jegyezték fel. A panaszmentesség eléréséhez szükséges és elegendő mértékű gyógykezelés alakulása az egyes betegeknél: 1. tüneti kezelés 12 (18,2%), 2. egyszerű diéta 9 (13,6%), 3. gluténmentes diéta új fehérjeforrással 17 (27,8%), 4. rövid ideig tartó antibiotikum vagy metronidazol kezelés 6 (9,1%), 5. helicobacterium eradikációs kezelés 13 (19,7%), 6. prednizolon kezelés 9 (13,6%) esetben történt.

A statisztikai elemzés alapján szukáknál a neutrophil granulocytás beszűrődés pozitívan (Spearman-féle korreláció: 0,567, $P=0,001$), míg a GHLO pozitivitás negatívan (Spearman-féle korreláció: -0,39, $P=0,03$) korrelál a korrallal. Míg szukákban a lymphocytás-plasmasejtes gyulladás negatívan (Spearman-féle korreláció: -0,39, $P=0,039$), addig kanokban pozitívan (Spearman-féle korreláció: 0,44, $P=0,007$) korrelál a GHLO pozitivitással. Sem a gyulladáshoz vezető elváltozások (neutrophilsejtes, lymphocytás-plasmasejtes vagy eosinophilsejtes), sem a GHLO pozitivitás mértéke nincs összefüggésben az alkalmazott gyógykezeléssel.

Fentieket összegezve megállapíthatjuk, hogy munkánk során alkalmaztunk elsőként a hazai gyakorlatban egy nemzetközileg elfogadott ajánlást a gyomorbiopátumok szövettani értékelésére, amelyet kiegészítettünk a gyomor fundusi régiójával is, és új szempontként bevettük a GHLO fertőzöttséget. Átfogó képet kaptunk a gyomortükrözésre érkezett hazai kutyák GHLO fertőzöttségéről és az egyes gyulladáshoz vezető elváltozások előfordulásáról. Az endoszkópos gyomorbiopátumok ilyen esetszámú feldolgozására a hazai szakirodalomban még nem volt példa. A GHLO fertőzöttség, a szövettani elváltozások mértéke és a kezelés intenzitása egyértelmű összefüggéseket nem mutatnak egymással, amely megállapítás egybevág a szakirodalmi adatokkal.

3.2. Egészséges, lymphocytás gyomorgyulladásban és peccétgyűrűsejtes gyomor-adenocarcinómában szenvedő kutyák necropsziás és endoszkópos módszerrel vett gyomormintáinak immunhisztokémiai vizsgálata claudin-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -10 és -18 markerekkel

3.2.1. Anyag és módszer

Mintavétel, a gyomorminták eredete

Egészséges gyomorminták

Az egészséges gyomorminták gyűjtése necropsziás mintavétellel történt a SZIE ÁOTK Kisállatkórházába érkező, nem gastrointestinalis panaszok miatt spontán elhullott vagy euthanasiára került kutyákból. Kísérletünkben 20 felnőtt kutyát vizsgáltunk (kor: 3-14 év; átlag: 8 év; 11 kan, 9 szuka). A friss kutyahullák gyomrának fundusi, corpusi és antrumi részéből 2 x 2 x 0,5 cm-es mintákat metszettünk ki, majd helyeztünk 8%-os pufferolt formaldehyd oldatba. A mintákat egyedileg jelöltük.

Lymphocytás gyomorgyulladásos minták

A lymphocytás gyomorgyulladásra jellemző claudin expresszió vizsgálatához 12 kutya endoszkópos biopsziás gyomormintáit használtuk fel. A mintákat tartalmazó paraffinos blokkokat a Patológiai Tanszék szövettani archívumából válogattuk, melyek kivétel nélkül a Kisállatklinika Endoszkóp Laboratóriumába 2007. január és 2013. december között hányás tünetei miatt gyomortükrözésre érkezett kutyákból származtak. Minden egyes esetben a vizsgált gyomor fundusi, corpusi és antrumi részéből minimum 3-3 biopsziás mintát vettünk a korábbi gasztroszkópia során, a retrospektív tanulmányunkban említett módon.

Peccétgyűrűsejtes gyomor-adenocarcinomás minták

A gyomor-adenocarcinomás minták claudin expressziójának vizsgálatához 14 kutya (kor: 6,5-13,5 év; átlag 10 év; 10 kan, 4 szuka) endoszkópos biopsziás gyomormintáit dolgoztunk fel. A minták gyűjtése és válogatása a lymphocytás gyomorgyulladásos mintákhoz hasonlóan történt.

Immunhisztokémiai vizsgálatok

A claudin-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -10 és -18 molekulák immunhisztokémiai vizsgálata szobahőmérsékleten, 24 órán át 8%-os, pufferolt (pH=7,0) formaldehid oldatban fixált, majd paraffinba ágyazott blokkokból történt. A beágyazás után 3–4 µm vastagságú szövettani metszeteket készítettünk, amelyeket előbb xyloolban (2x10 percen keresztül), majd csökkenő koncentrációjú (3x5 percen át 100%-os, 70%-os majd 50%-os töménységű) alkoholban deparaffinizáltunk, majd foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS) való mosás után magas hőmérsékleten, mikrohullámmal (800 Watt, 30 perc) antigénfeltárást végeztünk. A feltáráshoz Target Retrieval Solution (DAKO, Glostrup, Dánia; pH=6,0) oldatot használtunk. A vizsgálathoz használt anti-claudin antitesteket szobahőmérsékleten, 60 percen keresztül reagáltattuk a mintáinkkal. Az endogén peroxidáz aktivitását 0,3%-os hidrogén-peroxidot tartalmazó metanollal blokkoltuk 5 percen keresztül. Az immunhisztokémiai reakciót avidin-biotin peroxidázrendszerrel jelöltük (DAKO LSAB2 Kit), amelyhez 3,3-diaminobenzidin (DAB) kromogén szubsztrátot használtunk. Mayer-féle haemalaunt alkalmaztunk kontrasztfestésként. Minden egyes claudinvizsgálathoz ismert pozitív szöveti kontrollokat használtunk, és negatív kontrollként kihagytuk a megfelelő elsődleges ellenanyagot.

3.2.2. Eredmények és megbeszélés

Vizsgálataink során a kutyák egészséges gyomornyálkahártyájában és az enyhe fokú, a mérsékelt és a súlyos fokú lymphocytás gyomorgyulladás esetén is intenzív, homogén, lineáris claudin-18 membránpozitivitást találtunk a gyomornyálkahártya felszíni hámsejtjeiben, továbbá mind a fundus- és mind a pylorusmirigyekben, a proximalis és a distalis mirigyterületeken egyaránt. A claudin-2 ellenanyaggal végzett vizsgálatok során, mindhárom fokozatú lymphocytás gyulladással mintacsoportban, intenzív, homogén, lineáris membránpozitivitást figyeltünk meg a pylorusmirigyekben. A megvizsgált gyulladással szövetmintákban a felszíni gyomornyálkahártya-sejtek és a mirigyhámsejtek claudin-1, -3, -4, -5, -6, -7, -8, és -10 negativitást mutattak. A kötőszöveti sejtek, a claudin-5 pozitív vér- és nyirokér-endothelsejtek, valamint a gyulladással sejtek, a lymphocyták, a plasmasejtek, a macrophagok a vizsgálatba bevont claudinokra negativitást mutattak.

A pecsétgyűrűsejtes gyomor-adenocarcinomás minták immunhisztokémiai vizsgálata során a fundusi és pylorusi régió epithelialis eredetű tumorsejtjei claudin-18 negatívak voltak az invazív fronton. A fundusi régió dysplastikus epithelsejtjei gyenge claudin-18 pozitivitást mutattak, szemben a környező fundusi egészséges nyálkahártyával, ahol intenzív, homogén,

lineáris claudin-18 membránpozitivitást észleltünk a felszíni gyomornyálkahártya-sejtekben, a fundusi mirigyek proximalis és distalis részében, beleértve a nyálkatermelő nyaki sejteket, a parietalis és fősejteket és az enteroendokrin sejteket. Az infiltratív módon növekvő neoplasticus sejtek és az ezeket határoló területek dysplasticus epithelsejtjei claudin-1, -3, -4, -5, -6, -7, -8 és -10 negatívak voltak.

Eredményeink alapján a claudin-18 a gyomornyálkahártya epithelsejtjei közötti tight junction sejtkepcsoló struktúra fontos alkotója. A kutyák lymphocytás gyomorgyulladásáról megállapítottuk, hogy annak kialakulása és súlyossága nem különbözik az egészséges állapotról egyébként jellemző claudin expressziótól. Így a claudinfehérjék szintjén ebben a kórképben nem sikerült tight junction strukturális változást vagy permeabilitás fokozódást igazolni. A claudin-18 csökkent expressziója a tumorgenezis korai jele lehet. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a claudin-18 csökkent expressziója fontos szerepet játszhat a kutyák gyomrának carcinogenesisében, és a gyomor pecsétgyűrűsejtes adenocarcinomája esetén ez összefüggésbe hozható a tumor agresszivitásával. Tanulmányunkban igazoltuk, hogy a tumorról határos területek dysplasticus epithelsejtjeinek gyenge claudin-18 pozitivitása diagnosztikai markere a tumorgenezisnek.

4. Új tudományos eredmények

1. Kutyákban nem lehet sem a marmagasság, sem a testtömeg ismeretében olyan egyenletet szerkeszteni, mellyel az egyes vékonybél szakaszok hossza pontosan megállapítható lenne.
2. A szájon át adott Lipofundin oldat cholagog hatása jól mérhető, így alkalmas az enterális tápszonda helyeződésének epehólyag-kontrakcióra gyakorolt hatásának vizsgálatára. Minél mélyebbre juttatjuk a Lipofundin tápoldatot a gyomor-vékonybélbe, annál kisebb mértékű és rövidebb ideig tartó epehólyag-kontrakciót kapunk. Így feltételezzük, hogy 20-30 cm mélyen a jejunumba vezetett tápszonda hasznos lehet a heveny hasnyálmirigy-gyulladás kezelésében.
3. Bevezettünk a hazai gyakorlatunkba egy nemzetközileg elfogadott módszert a gyomorbiopatómók szövettani értékelésére, melybe új szempontként bevettük a gyomor GHLO-fertőzöttségét. Ily módon átfogó képet kaptunk a gyomortükrözésre érkezett hazai kutyák GHLO-fertőzöttségéről és az egyes gyulladásos elváltozások előfordulásáról. Az endoszkópos gyomorbiopatómók ilyen esetszámú feldolgozására a hazai szakirodalomban még nem volt dokumentált példa.
4. A claudin-18 a gyomornyálkahártya epithelsejtjei közötti tight junction sejtkapcsoló struktúra fontos alkotója, és feltehetően paracellularis barriert képez – az egerhez hasonlóan – a gyomorsavval szemben.
5. A lymphocytás gyomorgyulladásról megállapítható, hogy annak kialakulása és súlyossága nem különbözik az egészséges állapotra egyébként jellemző claudin-2, -5, -18 expressziótól kutyában. Így claudinfehérjék szintjén ebben a kórképben nem sikerült tight junction strukturális változást vagy permeabilitás fokozódást, mint hajlamosító tényezőt megállapítani.
6. A kutyák gyomrának pecsétgyűrűsejtes adenocarcinomájában a tumorsejtek nem expresszálják – immunhisztokémiai módszerrel kimutatható mértékben – a claudin-18 fehérjéket az invazív fronton. A tumorról határos területek dysplastikus epithelsejtjeinek gyenge claudin-18 pozitivitása korai diagnosztikai markere lehet a tumorigenezisnek.

5. A jövő kutatási lehetőségei

A dolgozatban összefoglalt eredmények alapján további kérdések merülnek fel a jejunális táplálás pancreatitisben szenvedő kutyák gyógykezelésének klinikai gyakorlatába való bevezetésével és a kutyák egyes gyomorbetegségeinek diagnosztikájával és terápiájával kapcsolatban. Ezek megválaszolására prospektív vizsgálatokra van szükség, melyek a következők lehetnek:

1. Akut pancreatitis korai jejunális táplálása kutyában: prospektív, randomizált vizsgálat.
2. Gyomorbetegségek etiológiai megközelítése, endoszkópos és szövettani diagnózisa, célzott terápiája, a gyógyulás endoszkópos ellenőrzése prospektív vizsgálatban.
3. Rákmegelőző állapotok (atrophia, intestinalis metaplasia, adenoma, MALT lymphoma) követése *Helicobacter* eradikáció után.
4. *Helicobacter* reinfekció szűrő jellegű követése kutyában.

6. Irodalomjegyzék

1. Bodoky Gy., Harsányi L., Pap Á.: Effect of enteral nutrition on exocrine pancreatic function. *Am. J. Surg.*, 1991. *161*. 144-148.
2. Day, M. J., Bilzer, T. et al.: Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. *J. Comp. Path.*, 2008. *138*. S1-S43.
3. Harsányi L., Bodoky Gy., Pap Á., Tihanyi T., Flautner L.: The effect of two different methods of jejunal feeding on pancreatic function. *Orvosi Hetilap*, 1991. *132*. 2659-2662, 2665.
4. Oláh, A., Pardavi, G., Belágyi, T., Nagy, A., Issekutz, Á., Mohamed E. G.: Early nasojejunal feeding in acute pancreatitis is associated with lower complication rate. *Nutrition*, 2002. *18*. 259-262.
5. Pápa, K., Psáder, R., Sterczer, Á., Pap, Á., Rinkinen, M., Spillmann, T.: Endoscopically guided nasojejunal tube placement in dogs for short-term post-duodenal feeding. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, 2009. *19*. 554-63.
6. Pinheiro, J. C., Bates, D. M.: *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer. ISBN 978-1-4419-0318-1. 2000. 1-528.

7. R Development Core Team: R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2006-2009-2011. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
8. Reiczigel, J., Harnos, A., Solymosi, N.: Biostatistika nem statisztikusoknak. Pars Kft., Nagykovácsi, 2010. 465.
9. Sterczer, A., Vörös, K. and Karsai, F.: Effect of cholagogues on the volume of the gallbladder of dogs. Res. Vet. Sci., 1996. 60. 44-47.

7. Az értekezés alapjául szolgáló referált közlemények jegyzéke

1. **Psáder, R.,** Sterczer, Á., Pápa, K., Harnos, A., Szilvási, V., Pap, Á.: Effect of enteral feeding on gallbladder function in dogs. *Acta Vet. Hung.*, 2012. *60.* 211-222. **IF: 1,173**
2. Sterczer, Á., Reiczigel, J., **Psáder, R.,** Pápa, K., Vörös, K., Pap, Á.: Cholagogue-induced gallbladder emptying in the diagnosis of canine biliary obstruction. *Acta Vet. Hung.*, 2012. *60.* 199-209. **IF: 1,173**
3. **Psáder R.,** Pápa K., Hőnich E., Harnos A., Jakab Cs., Sterczer Á.: Kutya endoszkópos módszerrel vett gyomorbiopsziájának retrospektív vizsgálata. *Magy. Állatorv. Lapja*, 2012. *134.* 537–548. **IF: 0,146**
4. **Psáder, R.,** Jakab, Cs., Máthé, Á., Balka, Gy., Pápa, K., Sterczer, Á.: Expression of claudins in the normal canine gastric mucosa. *Acta Vet. Hung.*, 2014. *62.* 13-21. **IF: *1,173**
5. **Psáder R.,** Jakab Cs., Balka Gy., Pápa K., Sterczer Á.: Lymphocytás gyomorgyulladásban szenvedő kutya endoszkópos módszerrel vett gyomorbiopsziájának immunhisztokémiai vizsgálata kludin-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -10 és -18 markerekkel. *Magy. Állatorv. Lapja*, 2014. *136.* 105–114. **IF: *0,146**

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Sterczér Ágnesnek az odaadó szakmai és emberi segítséget, a külföldi tanulmányutaim megszervezésében nyújtott nélkülözhetetlen támogatást és a kutatásaimhoz elengedhetetlen anyagi források megteremtését.

Köszönettel tartozom tanszékvezetőmnek, Prof. Vörös Károlynak a támogatásáért, a munkámhoz szükséges infrastrukturális és tárgyi feltételek megteremtéséért, a külföldi tanulmányutaim engedélyezéséért.

Külön szeretném megköszönni Dr. Jakab Csabának, hogy ötleteivel, tanácsaival segített és mellettem állt a kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálataim során.

Köszönöm endoszkópos mentoromnak, Pap Ákos professzor úrnak az évek óta tartó szakmai iránymutatását, emberi támogatását. Külön köszönöm a gasztroenterológiai kutatócsoportunknak nyújtott segítségét, ötleteit, tanácsait, melyekkel önzetlenül, iskola teremtő módon tette lehetővé a fejlődésünket.

Köszönöm Prof. Sótónyi Péternek az anatómiai előtanulmánnyal kapcsolatos tanácsait.

Köszönöm a társszerzők munkáját.

Köszönöm a Belgyógyászati Tanszék és Klinika munkatársainak segítségét a mintagyűjtésben, emellett külön köszönettel tartozom Dr. Pápa Kingának a munkám során adott tanácsokért.

Köszönöm a Patológiai Tanszék szövettani asszisztensének, Pop Renátának és adminisztrátorának, Herczeg Mihályné Icának a lelkiismeretes és megbízható munkáját.

Köszönöm a Radiológiai Osztály munkatársainak, Kampó Józsefné Marikának és Opor Károlynak a segítségét és türelmét a röntgenvizsgálatok elkészítése során.

Köszönöm Dr. Novák Istvánnak, az AIDR Auricoop Kft. állatorvosának, hogy lehetőséget teremtett az anatómiai méréseink elvégzésére beagle kutyákon.

Köszönöm Bajcsayné Fábrián Ibolya rendszergazdának a kórszövettani értékelőlapok elkészítése kapcsán nyújtott segítségét.

Köszönöm az Idegennyelvi Lektorátus korábbi vezetőjének, Karvázy Balázs tanáromnak az angol nyelvű szakcikkek lektorálásában nyújtott segítségét.

Köszönöm az Állatorvos-tudományi Könyvtár munkatársainak, Kiss Józsefné Oláh Editnek, Miszori Katalinnak, Orbán Évának, Winkler Beának az egyes szakcikkek beszerzésével és a tudománymetriai adatok rendelkezésemre bocsátásával kapcsolatos gyors és hatékony segítségét.

Köszönöm Dr. Bíró Ferencnek és Dr. Gáspár Zoltánnak a tanulmányutaim szponzorációjában nyújtott segítségét.

Szeretném megköszönni az Endoszkóp Labor korábbi és jelenlegi munkatársainak, Péter Zsolt, Takács-Radics Bíborka, Leitner Dóra, Ványolos-Pintér Szilvia asszisztenseknek és Dr. Balogh Márton és Dr. Csöndes Judit kollégáimnak a hétköznapi munka során nyújtott segítségét.

Köszönöm Merl Anikó gazdasági felelős mindennapi támogatását, rugalmasságát és segítségét, mely elengedhetetlen az endoszkópos szakrendelések zökkenőmentes működéséhez.

Köszönöm Dr. Faigl Vera kolléganőmnek, barátomnak a tanácsait, megjegyzéseit, szakmai és emberi támogatását, a dolgozat javítása során nyújtott értékes segítségét.

Köszönöm Szüleimnek, hogy mindvégig támogattak, és lehetővé tették számomra, hogy állatorvos lehessenek. Köszönöm Feleségemnek és Gyermekeimnek, hogy gondoskodásukkal, türelmükkel és támogatásukkal a kutatásaimmal foglalkozhattam.