

Szent István Egyetem

Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

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

PhD értekezés

Dr. Csébi Péter

2015

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Prof. Dr. Németh Tibor PhD, dip. ECVS

Tanszékvezető egyetemi tanár

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

témavezető

Dr. Manczur Ferenc PhD

Egyetemi docens

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Belgyógyászati Tanszék és Klinika

Dr. Balogh Lajos PhD

Osztályvezető

Országos Sugárbiológiai Intézet

Prof. Dr. Kóbori László PhD

Egyetemi tanár

Semmelweis Egyetem Transzplantációs Klinika

Készült 8 példányban. Ez aszámú példány.

.....

dr. Csébi Péter

TARTALOMJEGYZÉK

1. ÖSSZEFOGLALÁS	6
3. CÉLKITŰZÉSEK	9
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
4.1 A belső rectushüvely anatómiai és szövettani felépítése	10
4.2 Az artériák szövettani felépítése	12
4.3 A vénák szövettani felépítése	13
4.4 Az artéria-, és vénapótlás lehetőségei	14
4.4.1 Szintetikus érprotézisek	15
4.4.2 Autolog és heterolog vénák és artériák ér pótlásként történő felhasználása	17
4.4.3 A peritoneum, mint autolog alternatív érgraft	18
4.4.4 A belső rectushüvely, mint alternatív autolog érgraft	18
4.5 Alapvető érsebészeti technikák	20
4.6 A vénák rekonstrukciós sebészete	22
4.7 Autograftok használata az állatorvosi érsebészeti gyakorlatban	23
4.8 Az erek izometriás tenziójának mérése	24
4.9 Az érgraftok immunhisztokémiai vizsgálata	25
5. SAJÁT VIZSGÁLATOK I.: A belső rectushüvelyből kialakított vénás graftok vizsgálata	27
5.1 Anyag és módszer	27
5.1.1 A belső rectushüvelyből képzett vénás foltgraftok beültetése.....	27
5.1.2 A graftok funkcióképességének Doppler-ultrahangos vizsgálata.....	30
5.1.3 A graftok funkcióképességének CT angiográfiás vizsgálata	30
5.1.4 Szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok	31
5.2 Eredmények	32
5.2.1 A graftok beültetésének eredményei.....	32

5.2.2 Ultrahangos és színes Doppler-ultrahangos vizsgálati eredmények.....	32
5.2.3 CT angiográfiás eredmények.....	34
5.2.4 Szövettani és immunhisztokémiai eredmények.....	36
5.3 Megbeszélés.....	38
6. SAJÁT VIZSGÁLATOK II.: A belső rectushüvelyből kialakított artériás tubularis graftok morfológiai vizsgálata.....	40
6.1 Anyag és módszer.....	40
6.1.1 A belső rectushüvelyből kialakított tubularis artériás graftok beültetése.....	40
6.1.2 A graftok funkcióképességének pulzus tapintásos és Doppler-ultrahangos vizsgálata.....	43
6.1.3 Szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok.....	43
6.2 Eredmények.....	44
6.2.1 A graftok beültetésének eredményei.....	44
6.2.2 A graftok funkcióképességének pulzus tapintásos és Doppler-ultrahangos vizsgálati eredményei.....	45
6.2.3 A szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei.....	47
6.2.3.1 A hematoxilin és eozin, azan és orcein festés eredményei.....	47
6.2.3.4 Az immunhisztokémia eredményei.....	53
6.3 Megbeszélés.....	56
7. SAJÁT VIZSGÁLATOK III.: A belső rectushüvelyből kialakított artériás tubularis graftok miográfiás vizsgálata.....	59
7.1 Anyag és módszer.....	59
7.2 Eredmények.....	63
7.3 Megbeszélés.....	65
8. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	67
9. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	69
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	70
11. A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI.....	80
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	84

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

RF	Rectus fascia
HE	hematoxin- és eozin-festés
SZIE ÁOTK	Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar
IHC	immunhistochemistry / immunhisztokémia
α -SMA	alpha smooth muscle actin / alfa simaizom aktin
mtsai	munkatársai
PBS	phosphate-buffered saline / Foszfáttal pufferelt sóoldat
PE	phenylephrin
Ach	acetyl-kolin
CD31	cluster of differentiation 31
CD34	cluster of differentiation 34
CLD-5	Claudin-5
vWf	von Willenbrand faktor
CT	komputer tomográfia
ROI	region of interest

Megjegyzés: A dolgozatban az orvosi szakkifejezések helyesírása során az Akadémiai Kiadó Orvosi helyesírási szótárát vettem alapul.

1. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben a belső rectushüvelyből készített friss, nem tartósított, autolog vénás foltgraftok és artériás tubularis érgraftok klinikai felhasználási lehetőségeit, morfológiai és funkcionális jellemzőit vizsgáltuk kutyákban.

Az első kísérletünkben négy kutyában összesen 15 vénás foltgraftot 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 beültetéseket követően az érintett vénaszakaszok átjárhatóságát és egyéb morfológiai jellemzőit Doppler-ultrahangos módszerrel és CT-angiográfiával vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy egyik graft esetében sem alakult ki aneurysma, stenosis, elzáródás vagy kilökődés. Az első beültetést követően 6 hónappal távolítottuk el a graftokat, így a v. iliaca communis graftokat 6 hónapon keresztül, a v. jugularis grraftokat pedig 3 hónapon keresztül követtük. Szövettani és endothel specifikus biomarkerek (CD31 és claudin-5) felhasználásával immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk, amelyek eredményei alapján a foltgraft beépült a véna falába és a luminalis felszínét egyrétegű endothel sejtréteg borította be. Kilökődésnek vagy gyulladásnak nem volt jele a mintákban. Vizsgálataink eredménye alapján a belső rectushüvelyből képzett foltgraft alkalmas lehet nagyvénák részleges rekonstrukciójára.

Második kísérletünkben 8 tubularis artériás érgraftot ültettünk be 4 kutya a. iliaca externáiba. A műtétet követő harmadik hónap végén is átjárható 4 érgraftot eltávolítottuk és szövettani és immunhisztokémiai módszerekkel vizsgáltuk. A morfológiai vizsgálat során megállapítottuk, hogy a belső rectushüvely az artériás érszakaszba történő beültetését követően jelentősen átalakult. Eredendően az intakt belső rectushüvely hasüreg felőli felületét immunhisztokémiaailag claudin-5 negatív és pancytoceratin pozitív mesothel sejtek borítják, de az érgraftokban a belső luminalis sejtréteg claudin-5 pozitívvá és pancytoceratin negatívvá vált, megegyezően az intakt endothel sejtek immunhisztokémiai jellemzőivel. Mindezek alapján megállapítottuk, hogy a graft belfelszínén új endothel réteg jött létre a beültetést követően. Az intakt belső rectushüvely α -SMA negativitást mutatott, de az érgraft falában a nagymennyiségű kollagénrost mellett látható orsó-alakú sejtek, az erek simaizom sejtjeihez hasonlóan, α -SMA pozitívak voltak. Az immunhisztokémiai reakcióban bekövetkező változás arra utal, hogy a belső rectushüvelyben lévő fibroblast sejtek myofibroblast sejtekké alakultak át. Vizsgálataink 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, de a fala a befogadó artériánál vastagabb és a simaizomsejtréteg hiánya miatt rugalmatlanabb.

Harmadik kísérletünkben egy gyógyult belső rectushüvelyből képzett artériás *tubularis érgraft miográfiás vizsgálatát* végeztük el három hónappal a beültetést követően. Az izometriás tenzióban bekövetkező változások alapján megállapítottuk, hogy az érgraftnál mérhető izometriás tenzió a 124 mM K⁺, a phenylephrin és az acetil-kolin hatására azonos irányba változott, mint a kontroll artéria esetében, de a thromboxán A₂ agonista U-46619 kivételével ez a változás jóval kisebb mértékű volt. 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 hasonlóságot mutat a kontroll artériával.

2. BEVEZETÉS

Az érsebészetben gyakran alkalmaznak különböző érpótló 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 fiziológiai 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 érpótlásként (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.

3. 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.

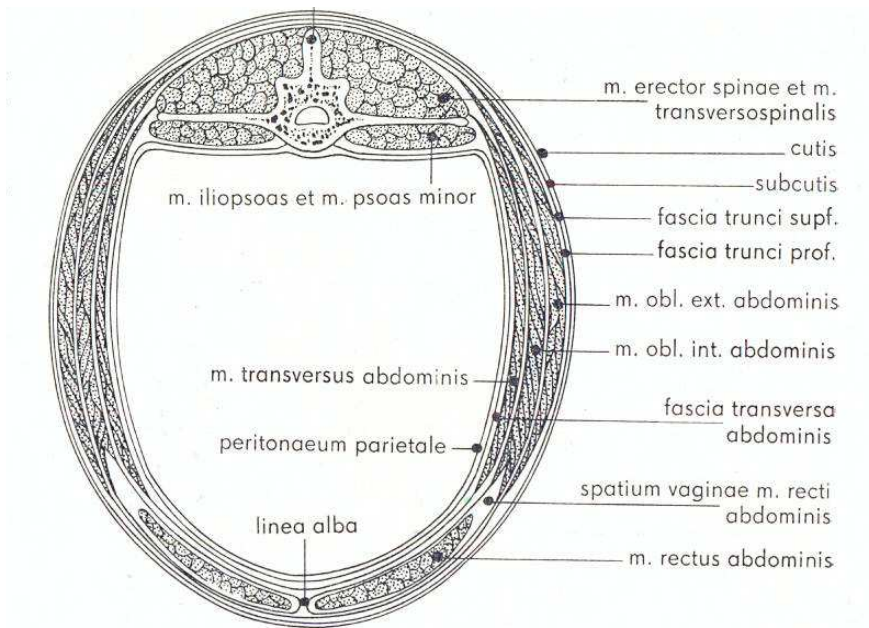
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1 A belső rectushüvely anatómiai és szövettani felépítése

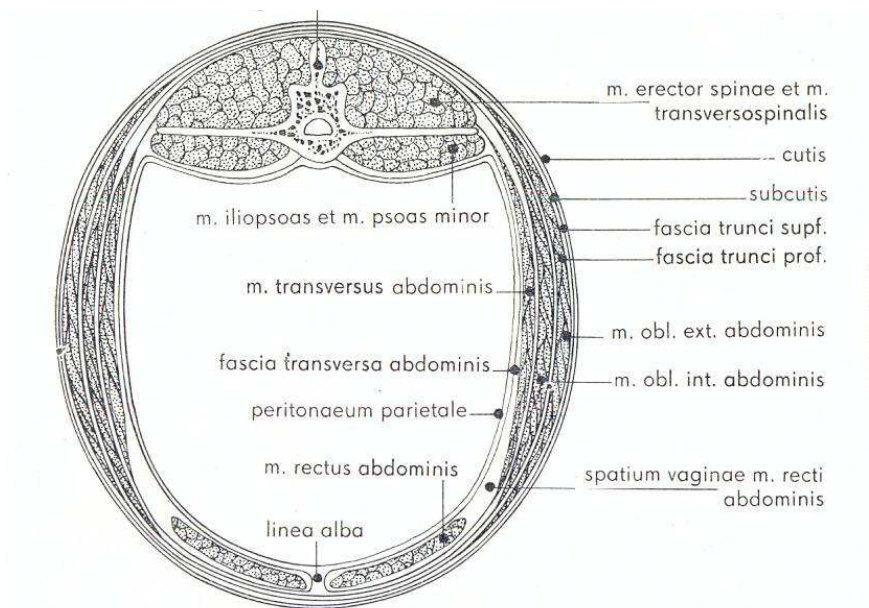
A hasfal izmos vázát négy izom, a *musculus obliquus abdominis externus*, a *musculus obliquus abdominis internus*, a *musculus transversus abdominis*, a *musculus rectus abdominis* és ezek rugalmas izompólyája alkotja, amelyekhez belülről a peritoneum fali lemeze fekszik. A *musculus rectus abdominis* a has ventralis falán, a fehérvonal két oldalán helyeződő, lapos, orsó alakú, erős izom. A szegycsonton és az első bordapáron ered, a két *eminentia iliopubicát* a fancsont előtt összekötő inas kötegen (*tendo praepubicus*), a fanfésűn és a medence *symphysisén* tapad meg. A *musculus rectus abdominis* eredésétől tapadásáig a környező izmok ínlemezei és a peritoneum által határolt hüvelyszerű képletben foglal helyet, amelyet az anatómiai nomenklátúra *rectushüvelynek* nevez, amelynek réteges felépítésében a has különböző pontjain más és más izmok *aponeurosisai* vesznek részt.

Az egyenes hasizom *cranialis* eredését követően a külső *rectushüvelyt* a *musculus obliquus abdominis externus* ínlemeze adja, amely az ellenkező oldali ugyanazon izom ínlemezével a *linea albában* találkozik. Ebben a magasságban a *musculus obliquus abdominis internus* és *transversus* ínlemeze az egyenes hasizom belső felületére tér, mint belső *rectushüvely*. A köldöknél a *musculus obliquus abdominis internus* két ínlemezre válik, ahogyan az egyenes hasizomhoz ér, így ebben a magasságban a külső *rectushüvelyt* a külső ferde hasizom ínlemeze, valamint a belső ferde hasizom külső ínlemeze adja, a belső *rectushüvely* alkotásában a belső ferde hasizom belső ínlemeze és a haránt hasizom *aponeurosis*a vesz részt (1. ábra).

A *postumbilicalis* régióban a *musculus rectus abdominis* a *musculus obliquus abdominis internus* belső ínlemeze alá kerül, így a *rectushüvely* falának a hasüreghez közelebb fekvő belső részét a *musculus transversus abdominis* izom ínlemeze fogja alkotni, amely hasonlóképpen az előző izmokhoz a *linea albában* találkozik ellenoldali párjával. A külső *rectushüvely* alkotásában továbbra is a *musculus obliquus abdominis externus* és *internus* játszik szerepet. A *praepubicus* hasfali részen az egyenes hasizom újból átfúrja hüvelyének belső falát adó izom ínlemezét és becsúszik alá, így a *rectushüvelynek* a külső részéhez a *musculus transversus abdominis* ínlemeze is hozzájárul. A hüvely belső falát a *fascia transversa abdominis* és a *peritoneum parietale* együtt alkotja. A belső *rectushüvely* sebészi felhasználása során a graftok donor területeit ez a régió adta (2. ábra).

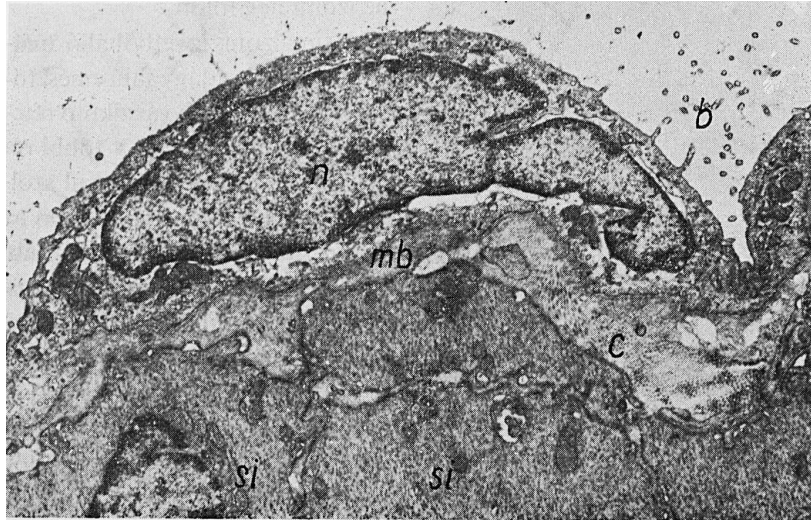


1. ábra. A rectushüvely felépítése a praeumbilicalis területen (Fehér, 2004).



2. ábra. A rectushüvely felépítése a prepubicus területen (Fehér, 2004).

A peritoneum parietale a testüregét bélelő savós hártya, tunica serosa, amit egy adventitia réteg fűz a hasfalhoz, amely tömött rostos kötőszövetet is tartalmaz, így a parietális lemez erős, rugalmas felfüggesztéssel bír. A savóshártya amellelt, hogy lezárja, elhatárolja a szerveket, a serosus folyadékkal bevont síkos felületével lehetővé teszi a szervek egymás melletti könnyű elmozdulását. Belső, hasüreg felőli felületükön *mesothel* sejtek találhatóak (**3. ábra**). A mesothel sejtek szerepet játszanak a serosus folyadéknak mind a filtrációjában, mind a reszorpciójában (Guzsal, 1981).



3. ábra. Mesothel sejt (Guzsal, 1981).

4.2 Az artériák szövettani felépítése

Az artériákon belül három fő típust különíthetünk el: a rugalmas (elasztikus) típusú artériákat, az izmos (muscularis) típusú artériákat és az arteriolákat.

A nagy *rugalmas típusú artériák* a szervezet legnagyobb, szívközeli artériái, mint pl. az aorta és a carotisok. Leglényegesebb tulajdonságuk a bennük lévő rugalmas rostok nagy száma. Faluk három rétegből épül fel: tunica intima, media és externa. Az intimát endothelsejtek borítják, amelyek vékony basalis membránra támaszkodnak. Ez alatt kötőszöveti alapállományba ágyazott myoepithelialis sejtek, collagen rostok és hosszanti irányban elrendezett elasztikus rostok találhatóak. A tunica mediában a simaizomsejtek között nagy mennyiségű elasztikus és collagen rost helyezkedik el. A media külső rétegét egy kondenzálódott elasztikus rosttömeg határolja el az adventitiától, amelyet külső elasztikus lamellának neveznek. Az ilyen típusú erek legkülső rétege (tunica externa) az adventitia vagy

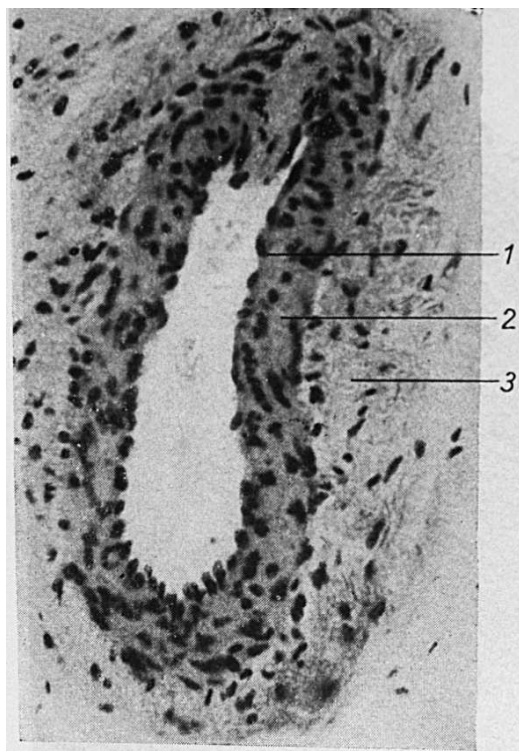
a serosa, amelyet laza rostos kötőszövet épít fel. Idegvégződések és vékony vasa vasorumok találhatóak benne.

Az *izmos típusú artériákhoz* tartoznak a nagyvérkör perifériás artériái, mint pl. a végtagok, a fej és a zsigerek artériái. A közepesen nagyméretűek felépítése hasonlít az elasztikus típusú artériákéhoz, de az intimát a mediától hullámos lefutású membrana elastica interna választja el. A mediában a simaizomsejtek koncentrikusan helyezkednek el, az adventitiát lamina elastica externa választja el a mediától.

Az *arteriolák* 2 mm átmérőnél kisebbek és a belső szervekben és szövetekben találhatóak. A lamina elastica externa és a lamina elastica interna nem kereshető fel, az adventitia kiszélesedett (Guzsal, 1981; Acsády és Nemes, 2001).

4.3 A vénák szövettani felépítése

A vénák az artériákkal összehasonlítva tágabbak és vékonyabb falúak. A vénák falát is három rétegre osztjuk: tunica intima, media és externa. Az intima endothel rétege alatt többé-kevésbé kifejezett subendothelialis szövet helyeződik, amelyet vékony kötőszöveti rostok (kollagén és elasztikus) és kevés kötőszöveti sejt alkotnak, csak a tágabb vénákban találhatóak hosszanti irányulású simaizomkötegek. A media simaizomsejteket és kötőszöveti rostokat (kollagén és elasztikus) tartalmaz, amelyek aránya a véna típusától függően eltérő. Az izomsejtkötegek a külső és a belső rétegben főként hosszanti, a középső, tömörebb rétegben körkörös és spirális elrendezésűek. A rostok hálószerű fonadékot alkotnak megakadályozva ezzel a vénafal túlságos kitágulását. A tunica externa a véna fal legjelentősebb rétege, amely nem választható el élesen a mediától, sőt gyakran a környező kötőszövettől sem. Kötőszöveti rostokból és sejtekből épül fel, a rostok a környező kötőszövet rostjaival állnak kapcsolatban, így a vénák nagyobb fokú összeesését akadályozzák meg (Guzsal, 1981) (**4. ábra**).



4. ábra. Véna felépítése: 1. Intima, 2. Media, 3. Adventitia (Guzsal, 1981).

4.4 Az artéria-, és vénapótlás lehetőségei

Az erek pótlása nagy kihívást jelent a gyakorlatban. Az érpótlásra felhasznált anyagoknak egyszerre számos követelménynek kell megfelelni (Acsády és Nemes, 2001; Teebken és Haverich, 2002):

- ne legyenek antigének
- ne legyenek carcinogének
- környezetükbe jól épüljenek be
- szerkezetük legyen stabil, szövetnedvek számára inert
- kellő átmérőben és hosszban álljanak rendelkezésre
- legyenek raktározhatók
- faluk vér számára ne legyen átteresztő
- bennük cellularis neointima képződjék, de ne alakuljon ki neointimalis hyperplasia
- ne legyenek thrombogének
- faluk nyomással szemben legyen tartósan ellenálló
- ne redukálják a pulzáló keringést

- legyenek fertőzéssel szemben ellenállóak
- legyenek jól kezelhetők (elasztikusak, flexibilisek, jól varrhatóak)

Jelenleg minden szempontból és minden körülmények között tökéletes érpótló anyag nem létezik. A nehézségek ellenére az érpótlás lehetősége már a 20. század elején felkeltette a sebészek érdeklődését. Elsőként Carrel, Guthrie és Goyannes számoltak be sikeres autolog érrekonstrukcióról (Goyannes, 1906). Az 50-es évek után az erek pótlását a mesterséges anyagokkal, elsőként porózus textillel próbálták meg (Voorhees és mtsai, 1952), majd a 70-es években politetrafluoroetilén-ből (PTFE) készült anyagokban látták a megoldást (Norton és Eisemann, 1975).

Jelenleg érpótlásra friss autolog erek, krioprezervált erek és szintetikus erek és egyéb autolog szövetek (pl. peritoneum, belső rectushüvely) felhasználásával is próbálkoznak

4.4.1 Szintetikus érprotézisek

A szintetikus érprotéziseket gyakran alkalmazzák az érsebészetben, mert az autolog graftok csak korlátozottan érhetőek el. A szintetikus polimerek megfelelő erősséget, ellenállást, biokompatibilitást biztosítanak a használatból eredő erőhatásokkal szemben. A szintetikus anyagok egyik legnagyobb előnye, hogy könnyen alakíthatók, teljesen sterilek és ennek köszönhetően a beültetéskor a fertőzés esélye szinte elhanyagolható (Roll és mtsai, 2008; Ravi és mtsai, 2009). Felhasználásuk során nehézséget okoz, hogy szintetikus anyagként negatív immunreakciót válthatnak ki (Lam és Wu, 2012), és a kis átmérőjű erek esetében gyakran alakul ki intima hyperplasia, ami a graft elzáródásához vezethet (Strandness és Eidt, 2000). A transzplantációs sebészetben további gondot okoz, hogy az elengedhetetlen immunszuppressziós kezelés mellett, a szintetikus graftok esetében a saját ereknél gyakoribbak a szeptikus szövődmények és a következményes kilökődés (Demirer és mtsai, 2001; Roll és mtsai, 2008).

Az *in vitro* kísérletek szerint az endothel sejtek képesek rásarjadni a polimer vázra, ami azért lényeges, mert a jó hemodinamikai tulajdonságok biztosításának alapja az alacsony thrombosis hajlam. Az endothel-, neoendothel réteg megjelenése a különböző érprotézisekben és humán graftokban régóta ismert tulajdonság. Minél korábban jelenik meg az endothel réteg a lumenben, annál jobbak az eredmények. Ezért 1978 után elindultak azon próbálkozások, hogy a különböző érprotéziseket endothel-sejt kultúrákkal kezeljenek (Stanley és mtsai, 1982). A polyethylene (Dacron) és a PTFE (Teflon) graftok lumenét endothel réteggel vonták be és ez kis átmérő (4mm) esetén is alacsony thrombogenitást mutatott. A humán alkalmazás Herring és Fasol nevéhez kötődik és 1987-ben már klinikai

vizsgálat is indult e téren (Herring és mtsai, 1987), de az eredmények nem voltak meggyőzőek. Az endothel sejtek életképessége a graftokban igen változó volt és a protézisek fala is különböző mértékben megvastagodott, a lumeni réteggel együtt (Fasol és mtsai, 1989). Mindezek mellett az endothel sejtek izolálása és „vetése” is igen körülményes volt. A szigetekben megtapadt endothel sejtek okozhatták a nem igazán meggyőző eredményeket, ezért újabb alternatívákra volt szükség. Mivel csak az autolog, jó minőségű endothel sejtekkel lehetne jobb eredményt elérni Clarke és munkatársainak új ötlete támadt. A peritoneumot, pleurát, pericardiumot és cseplest borító mesothel sejtek hasonló felhasználásába kezdtek. Már 1984-ben jó eredményeket közöltek kísérleti állatokban, mesothel sejtekkel bevont Dacron alkalmazásával. A megtapadás 90% feletti volt, a mesothel sejtek ellenálltak az artériás keringésnek (Clarke és mtsai, 1984a). A mesothel sejt fibrinolitikus hatású prostacyclint termel. Hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, mint az endothel (Coene és mtsai, 1981). Kísérletekben kis átmérőjű (4-6mm) protézisekben is jól funkcionált és könnyen elérhető volt (Bear, 1990). Az endothelhez hasonló az integrin (adhéziós antigén) expressziója is. Egyéb antigének (CD9, CD10, CD13, CD55, CD63) és az integrin make-up jelenléte is jellemző a mesothel sejtekre, amelyek egy része felelős a thrombocytá aggregációért (Pronk és mtsai, 1988). A kutatások azt is igazolták, hogy a mesothel sejtek szöveti faktor expressziója megváltozott a vizsgálatok alatt, és ez növelte a procoagulációs indexet és thrombosis hajlamot (Clarke és mtsai, 1984b). Ezen mesothel funkcióváltozás még nem tisztázott, de okának felderítése, esetleges befolyásolása vélhetően még jobb eredményeket adhatna. Természetesen az is valószínű, hogy a mesothel sejtek eredeti helyükön másképpen viselkednek. A különböző sejtenyészési technikák és graftokra történő sejt-ültetés egyaránt károsítja a sérülékeny mesothel sejteket. A jó eredmények elérése céljából sértetlen endothel/mesothel sejtrétegre volna szükség. A graft falában történő átépülési folyamatok mértéke és minősége szintén a lumeni felszínről felszabaduló faktorok által indukált.

4.4.1.1 Szintetikus felszívódó polimerek; az ePTFE és a PET, valamint a poliuretán

Az ePTFE (expanded polytetrafluoroethylene, Gore-TEX®) és a PET (polyethylene terephthalate, Dacron®) porózus polimerek, amelyek elektronegatív luminalis felszínnel rendelkeznek, rostanyaguk 30 mikrométeres és kitűnően mutatják a fali endothelizációt. Legtöbbször aorta reprodukcióra és femoropopliteáris bypass-hoz használják őket. A Dacron polimerek hullámos lefutású szálakból épülnek fel, magas a flexibilitásuk, elaszticitásuk és ellenállóak a hurokképződéssel szemben. A poliuretán egy kopolimer, amely három

különböző típusú monomerekből épül fel: a kemény összetevőből, ami diizocianát, lánc stabilizátorból és lágy összetevőből, ami a diol. A kemény összetevő felel a graft tartásáért, a lágy pedig a flexibilitásért. Ez a fajta felépítés hasonlít legjobban az emberi erek felépítésére. Általában carotis-modelleknél használják és bizonyított, hogy FGF-2 és heparin adásával elősegíthető a jobb endothelizáció (Roll és mtsai, 2008; Ravi és mtsai, 2009).

4.4.1.2 Felszívódó polimerek érfal alapszerkezetként

Érfal alapszerkezetként olyan polimereket alkalmaznak, amelyek elősegítik az endothel sarjadást és megtartják az érrendszeri graftok rugalmas szerkezetét, valamint hasonló szerkezetet mutatnak, mint az extracelluláris matrix. Ezeket a graftokat általában poliglikolsav polimerizációjából készítik és egyéb biopolimerek felhasználásával képesek a különböző tulajdonságokat befolyásolni. Ezek a graftok körülbelül 6 hét alatt szívódnak fel a szervezetben és ezután már csak a matrix marad vissza. A felszívódás befolyásolható poli-alfa-tejsavval, poli-hidroxi-kanoáttal, polikaprolakton-kopolitejsavval és polietilén-glikollal. Az állatkísérletek során a beültetést követő egy hónap elteltével kimutatható volt, hogy a beültetett érszakasz pozitív választ ad szerotonin, endothelin-1 és prosztaglandin adására, ami a megfelelő reendothelizációra utal (Roll és mtsai, 2008; Ravi és mtsai, 2009).

4.4.2 Autolog és heterolog vénák és artériák ér pótlásként történő felhasználása

A saját perifériás vénák (v. cephalica, v. saphena, v. jugularis) és artériák érgraftként történő felhasználása ma már rutinszerű a humán orvosi gyakorlatban (Thomas 1988; Alavakkio, 1988; Miyazaki és mtsai, 1995; Takayama és mtsai, 1995; Hanack és mtsai, 1997). Alkalmazásuk esetén kilökődésre nem kell számítani és szeptikus szövődményekre sem hajlamosak, de felhasználásuk során gondot okozhat a megfelelő átmérőjű ér hiánya és fennálló szisztémás érbetegség (pl. atherosclerosis). Elérhetőségük is korlátozott, mert donor érszakaszt csak egy újabb, más területen elvégzett sebészi beavatkozással lehet nyerni, megváltoztatva ezzel a fiziológiás anatómiai viszonyokat (Kóbori és mtsai, 2008). Megfelelő donor bank esetén a cryoprezervált homograftok alkalmazása jelentős alternatíva. A cryoprezervált homograftok megjelenése és humán alkalmazása 1950 után indult el (Dubost és mtsai, 1952; DeBakey és mtsai, 1954; Szilágyi és mtsai, 1957). A mai modern cryoprezerválás mellett a homograft bankok jól működnek és a felhasználásukra vonatkozó irodalmi adatok is biztatóak (Bíró és mtsai, 2001). Az alkalmazással elért eredmények májátültetés után is elfogadhatóak, de a graftok késői nekrozisa, fibrosisa vagy akár teljes elzáródása is ismert (Buell és mtsai, 2002; Vogt és mtsai, 2002). Ezek a szövődmények előbb, utóbb retranszplantációt tesznek szükségessé. A donor erek (friss, cryoprezervált)

késői károsodásának okát kereshetjük rejekcióban és prezervációs ártalomban egyaránt (Land, 1994).

4.4.3 A peritoneum, mint autolog alternatív érgraft

Egyes esetekben a vénák rekonstrukciójára (pl. invazív máj illetve mellékvese tumorok miatti vena cava inferior resectio után) is szükség lehet, és ebből a célból a kísérletes vizsgálatok alapján felhasználható a peritoneum. Az egyik modellben az állatok 30-40 kg-os sertések voltak. A kísérlet során a v. cava caudalisból kimetszett ovális rést fedték be egy 2,5×2,5 cm-es peritoneum darabbal. A graftokat a beültetés előtt 10 percig 100%-os alkoholban fixálták. A bavatkozást követően ellenőrző vizsgálatokkal követték a graftok viselkedését és morfológiai változásait. Az 5 órás minták nem mutatták thrombotizáció jeleit, azonban némi fibrinkicsapódás megfigyelhető volt a peritoneum luminalis felületén. A 8 napos minták megfelelő szerkezeti struktúrát mutattak a vénában, de a teljes endothelizációra csak a 15. napra kaptak bizonyítékot. Hat hét alatt a v. cava teljesen meggyógyult, és fertőzés vagy egyéb szövődmény egyik esetben sem alakult ki (Akimaru és mtsai, 2000). Később hasonló vizsgálatot a v. portaen is végeztek, és lényegében megegyező eredményt kaptak (Yoshioka és mtsai, 2001).

4.4.4 A belső rectushüvely, mint alternatív autolog érgraft

A belső rectushüvely (rectus fascia, RF) érsebészeti felhasználásában az egyik nagy előnyt az jelenti, hogy rendelkezésre áll egy eredeti, autolog és életképes mesothel sejtréteg, nem kell sejtkultúrák vetésével foglalkozni. A véráram által indukált endothel kialakulásáig jelen van egy elfogadható minőségű, alacsony thrombogenitású mesothel sejtréteg és nem kell tartanunk a prezervációs ártalmaktól és a kilökődési reakcióktól. Kezdetben főleg a szívsebészetben alkalmazták az RF graftot, mert egyes esetekben szükség van a pericardialis rések zárására és az érszakaszok helyettesítésére a szív illetve az itt kilépő nagy értörzsek területén. Bilfinger már 1983-ban jó eredményeket közölt a gyermekkori kamrai septum defektus ellátása során alkalmazott rectus izom fasciáról. Azt is leírták, hogy aorta pótlás esetén az aortával, lineáris növekedést mutat fiatal állatokban (Bilfinger és mtsai, 1983). Az RF lemez életképessége és a hemodinamikai jellemzői klinikailag megfelelőnek bizonyultak, a korán megjelenő neoendothel rétegnek köszönhetően thrombogenitása is alacsony volt (Coltharp, 1989). Anagnostopoulos és mtsai is kedvező eredményekről számoltak be az RF lemez congenitális szívhábák kezelésében való felhasználásáról (Anagnostopoulos és mtsai, 1995). Az RF körkörös (tubuláris) érgraftként azonban nem került humán alkalmazásra. Állatkísérletekben történtek csak próbálkozások. Cousar és Lam 1952-ben kutyákon alkalmazta az RF lemezt az aorta részleges pótlására

(aorta-patch), de tubuláris grafftként is alkalmazták kísérleteik során (Cousar és mtsai, 1952). Az aorta pótlás gondolata az érsebészetből származik, a fertőzött aorta protézisek helyettesítésére kerestek újabb alternatívákat. Ezen kísérletekben azonban az RF alkalmazása általában izomköpennyel együtt történt (Kehne és mtsai, 1956). Pacholewicz és mtsai egy kísérlet során 12 keverék kutyán rectushüvelyből készített foltgraftokat használtak fel a mesterségesen létrehozott elváltozások zárásához. Az első 6 kutya esetében a pulmonalis artérián nyitottak ablakot és ezt egy varratokkal rögzített foltgrafttal zárták el. A másik 6 kutyán atrialis defektust generáltak a septum megnyitásával, amelyet egy rectus grafttal bevont cardiopulmonalis bypass-sal zártak. Néhány állatnál a pericardium zárásához is felhasználták a graftokat. A mintavétel 90 nappal később történt és nem mutatott semmiféle kóros intracardialis adhesiót, csak enyhe epicardialis elváltozásokat. A foltgraftok szövettani vizsgálata intakt morfológiát mutatott aktív fibroblast és simaizom sejtekkel. A Proline C14 abszorpciós próba és az autoradiographia életképes sejteket mutatott ki a mintákban. A vizsgálatok alapján az RF graftok alkalmasnak bizonyultak biológiai membránok és a pericardium helyettesítésére (Pacholewicz és mtsai, 1998).

Májátültetéskor az artériás erek trombózisa jelenti a legfőbb problémát. Hiába az azonos paraméterekkel rendelkező donorok használata, így is a szövődmények legnagyobb hányadát a nekrozisok és a trombózisok okozzák. Gyakoriak a reperfúziós komplikációk, továbbá a hypoxia is hátráltatja az eredményes gyógyulást (Kóbori és mtsai, 2003, 2008). Rendszeres limitáló tényező még az ilyen műtétek során, hogy a donor máj erei nem elég hosszúak, így mesterséges anyagokkal kell az anasztomózisokat megoldani. Ez újabb problémákat vet fel, mert a mesterséges erek felhasználása során gyakran alakulnak ki szeptikus szövődmények, illetve a szervezet nem mindig fogadja be az erek pótlására alkalmazott szintetikus anyagokat (Németh és mtsai, 2005.; Kóbori és mtsai, 2003, 2008).

A transzplantációs sebészet számára ideális érgraft megtalálásnak érdekében a mesothel sejtekkel bélelt, és így differenciálódásra képes belső rectushüvelyből képzett érgraftok kísérletes vizsgálata a 2000-es évek elején kezdődtek. Kóbori és mtsainak első kísérlete során 7 kutyába ültettek be artériás tubularis érgraftokat. Az utókövetés egy hónapig tartott, és a 7 graftból 5 átjárható maradt. Az egyik graft elzáródásának hátterében technikai hibát, a másikon pedig szeptikus szövődményt állapítottak meg (Kóbori és mtsai, 2000). Második kísérletük során 8 érgraftot ültettek be és 6 esetben 6 hónapig, két esetben pedig 12 hónapig hagyták bent őket. A kutyákat az immunuszuppresszív cyclosporin-A-val kezelték, hogy minél inkább hasonlítsanak a kísérleti körülmények a májtranszplantációs sebészeti esetekhez. Mindegyik graft átjárható maradt, de két esetben stenosis alakult ki. HE festéses szövettani, és a CD34-et valamint a von Willenbrand faktort (vWf) felhasználva immunhisztokémiai vizsgálatot végeztek. Megállapították, hogy az érgraft belső felszínén

endothel sejtek jelentek meg. Elektronmikroszkópos vizsgálataik alapján simaizom filamentumokat és elasztikus rostokat is láttak. A cyclosporin nem okozott degeneratív elváltozásokat (Kóbori és mtsai, 2003). A harmadik kísérletükben 41 graftot ültettek be 6 hónapra. Az esetek felében immunszuppressziót is alkalmaztak és összességében 37 érgraft maradt átjárható. Két esetben trombózis, két esetben pedig stenosis okozott elzáródást. Aneurysma egyik esetben sem alakult ki. Az érgraftokat ismét szövettani, immunhisztokémiai (CD34 és vWf) és elektronmikroszkópos vizsgálatoknak vetették alá. Megállapították, hogy a belső rectushüvely graftok az érszerű átalakulás jeleit mutatják, endothel réteggel, elasztikus rostokkal és simaizomsejtek megjelenésével. Az elektronmikroszkópos vizsgálataik alapján hypoxia nem lépett fel az érgraftban, mert a mitochondriumok épek voltak. Összességében megállapították, hogy az autolog belső rectushüvely graftok elfogadhatóan nagy arányban hosszú távon is megőrizték átjárhatóságukat (Kóbori és mtsai, 2008).

4.5 Alapvető érsebészeti technikák

Az érsebészet orvosi jelentősége kiemelkedő és jól kidolgozott módszertana van (Acsády és Nemes, 2001). Érsebészeti beavatkozásra szükség lehet érelzáródás, érsérülés, aneurysma képződés, és szervtranszplantáció során is. Nagy jelentősége van a megfelelő varrattechnikának és az alkalmazott varróanyagok minőségi jellemzőinek.

A jó érvarrattal szemben alapvető követelmény, hogy ne roncsolja az eret, jól zárjon, ne szűkítsen, ne okozzon turbulenciát. Ennek érdekében az érfalat kíméletesen kell öltetni. A tűt nem tolni, hanem gördíteni kell. A varratot úgy kell behelyezni, hogy az intima az intimához feküdjön és így minél kevesebb fonal kerüljön a lumenbe.

A műtétek során különféle varratípusokat alkalmaznak. Az egyszerű tova futó varrat a leggyakrabban használt varratforma. Gyorsan elkészíthető és jó tömítést ad, ezért legtöbbször anasztomózisok és foltplastikák rögzítésénél használják. Ennél tökéletesebb tömítést csak a tova futó matracvarrat ad, amelyet leggyakrabban kis kaliberű erek anasztomózisához vesznek igénybe, de figyelni kell arra, hogy a csomózásnál, ha erősen meghúzzák a fonalat, csokorba ráncolja és szűkíti az eret. Használhatók a fent említett varratok szimpla formái is. Az egyes csomós varrat indikációs területe szűk, általában növekedésben lévő páciens érműtéténél alkalmazzák pl.: vég-a-véghez anasztomózishoz. Legnagyobb hátránya, hogy ez adja a legkevesebb tömítést. Az egyes matracvarrat előnye az előzővel szemben, hogy az érszéleket jobban összefekteti és kifordítja. Ezáltal jobb a tömítés és a sebszélek is jobban illeszkednek egymáshoz, illetve helyes varrattechnikával

fonalrészlet alig marad a lumenben. Gépi varratok használatára is van lehetőség. Az így kialakított varratsor egyes matracöltések sorának felel meg azzal az előnnyel, hogy a merev kapocssor mintegy „kipányvázza” az ér lumenét és az kevésbé tud beszűkülni.

A varráshoz felhasznált fonalak csak atraumatikus varróanyagok lehetnek, hengeres átmérőjű túvel. Így érhetjük el a legjobb tömítést, mert nem alakul ki szűracsatorna. A felhasznált fonalak készülhetnek selyemből és műszálból, lehetnek sodrottak, fonottak illetve monofilamentek.

Alternatív megoldás lehet az érragasztás, de a gyakorlatban kevésbé terjedt el, mivel a metódika körülményes, illetve alig alkalmazható megbízhatóan anasztomózisok, foltplasztikák készítésére. További hátránya, hogy csak száraz területen ad jó zárást. Vékony rétegben kell felvinni az ér felszínére, mivel a lumenbe jutva szövődményeket okozhat.

Az elzáródott, vagy helyreállíthatatlan hibákat tartalmazó érszakaszokat áthidaló anasztomózisokkal lehet kezelni. Leggyakrabban vég-a-véghez anasztomóziót használnak, amely során a rendellenes érszakaszt eltávolítják és egyesítik a két szabad véget. A nagyobb kaliberű, 8 mm-es vagy nagyobb átmérőjű ereknél az érvégeket, ha azok harántmetszetűek, különösebb szűkület nélkül lehet egyesíteni tova futó varrattal. Kisebb átmérőjű ereknél az ér végeket célszerű ferdére vágni, és az így készített ovális érvégeket egyesíteni. Gyakran alkalmaznak vég az oldalhoz típusú anasztomózisokat is. Ilyenkor az ér reszekciója helyett bypass technikával hidalják át a tökéletlen szakaszt.

Az arteriotomia szűkületmentes zárására alkalmazzuk a foltplasztikát, amelynek anyaga leggyakrabban véna vagy alloplasztikus protézisdarab. A foltot úgy kell méretre szabni, hogy ne okozzon hemodinamikai zavart. A túl széles folt által keletkezett tágulat turbulenciát, megnövekedett oldalnyomást és a véráram lelassulását eredményezi. Mindez kedvez a további lokális tágulásnak és a thrombusképződésnek.

Az elzáródott vagy sérült érszakaszok interpositumbeültetéssel is pótolhatók, ha az anasztomózis nem lehetséges. Interpositumként kaliberében megfelelő anyagot használhatunk. Minél kisebb átmérőjű artéria helyreállítása szükséges, annál inkább kell törekednünk autolog graft alkalmazására.

A rekonstruktív érműtétek során általánosan alkalmazott eljárások a következők:

- szisztémás heparinizálás az érkirekesztés előtt és neutralizálás az érfelengedés mögött,
- megfelelő be- és kiáramlás megteremtése,

- az érlumen megnyitása után záráskor vagy a bypass elkészültekor az utolsó öltések behelyezése és a keringés megindítása előtt alulról és felülről gyors és mértékletes véreztetés az esetleges fragmentumok kiürítésére és a légtelenítés elvégzésére, valamint
- maradéktalan vérzéscsillapítás.

4.6 A vénák rekonstrukciós sebészete

Az arteriák rekonstrukciója mellett egyes esetekben bizonyos nagyvénák helyreállítása is szükséges. A v. cava inferior rekonstrukciójára májtumorok eltávolítása (Huguet és mtsai, 1995; Miyazaki és mtsai, 1995), leiomyosarcomák (Smith és mtsai, 1984; Iwatsuki és mtsai, 1988; Huguet és mtsai, 1995), vese carcinomák (Okada és mtsai, 1989; Marshall és Reitz, 1985; Sakaguchi és Nakamura, 1993; Huguet és mtsai, 1995) és mellékvese carcinomák esetén (Smith és mtsai, 1984; Bodie és mtsai, 1989; Decker és Kuhner, 1991; Miller és mtsai, 1991; Huguet és mtsai, 1995) kerül sor. A v. portae (McKinnon és mtsai, 1981; Sakaguchi és Nakamura, 1993; Myazaki és mtsai, 1995; Takayama és mtsai, 1995), a v. hepatica (Sakaguchi és Nakamura, 1993; Wakabayashi és mtsai, 1998) és a v. iliaca (Plate és mtsai, 1985) rekonstrukciója is leírásra került.

A rekonstrukcióhoz felhasználtak mind autolog vénákat, mind érprotéziseket. A v. femoralis superficialist a v. cava inferiornál (Decker és Kuhner, 1991), a v. saphena (McKinnon és mtsai, 1981; Urayama és mtsai, 1993), a v. renalis sinister (Myazaki és mtsai, 1995) és a v. jugularis (Wakabayashi és mtsai, 1998) a v. portae esetében, míg a v. iliaca a v. hepatica rekonstrukciójában került felhasználásra (Wakabayashi és mtsai, 1998).

A perifériás vénák mellett sertéseken végzett kísérletekben, alkoholban fixált peritoneumot is alkalmaztak vénás foltgraftként (Akimaru és mtsai, 2000; Yoshioka és mtsai, 2001). Egy esetleírás szerint a belső rectushüvelyt is felhasználták májtranszplantáció során jelentkező v. cava inferior defektus helyreállítására (Kóbori és mtsai, 2005).

4.7 Autograftok használata az állatorvosi érsebészeti gyakorlatban

Az állatorvosi gyakorlatban érsebészeti beavatkozásokat ritkábban végeznek, de nem példa nélküliek. Egyes onkológia elváltozások, pl. invazív mellékvese vagy vesedaganatok, tymomák, pajzsmirigy carcinomák súlyosan károsíthatják a helyi vérkeringést azzal, hogy infiltrálnak, esetleg komprimálnak nagy ereket. A vérkeringés helyreállítása csak a tumor eltávolításával és az erek rekonstrukciójával lehetséges (Tobias 2012).

Holsworth és mtsai a v. jugularisból képzett autolog tubularis grafftal rekonstruálták a v. cava cranialist egy tymoma eltávolítását követően. Az autograft használata lehetővé tette, hogy a tumort teljes egészében eltávolítsák (Holsworth és mtsai, 2004).

Egyes súlyos traumás esetekben vagy veleszületett rendellenességeknél is szükséges lehet érsebészeti beavatkozásra és ér pótlás használatára. Egy esetleírásban a v. jugularist használták fel Fallot-tetralógiás kutyában a szisztémás keringési-pulmonális keringési sönt kialakítására a módosított Blalock-Taussig eljárás során (Pelosi és mtsai, 2006).

Az intrahepaticus porto-cavalis söntök sebészi ellátása során súlyos szövődmény jelentkezhet a sönt lezárásakor, mert ez a splanchnicus területen fatális vérnyomásemelkedést okozhat. Ennek megelőzésére egy lehetőség, hogy a sönt elzárása előtt első lépésként a v. jugularis felhasználásával egy extrahepaticus söntöt alakítsanak ki, amit egyáltalán nem, vagy csak fokozatosan szűkítenek be, és így megelőzhető a vérkeringés összeomlása (White és mtsai, 1996; Kyles és mtsai, 2001; Gellasch és mtsai, 2003; Kyles és mtsai, 2004).

4.8 Az erek izometriás tenziójának mérése

Élettani körülmények között az erek nem egyszerű csőként funkcionálnak, hanem megfelelő hatásokra összehúzódással vagy elernyedéssel képesek reagálni, alkalmazkodva a szervezet változó igényeihez. Ennek a viselkedésnek a kísérletes vizsgálatára az egyik lehetséges módszer az izometriás tenzió, vagyis az állandó rosthossz melletti feszülés mérése.

A vizsgálat során az erőmérő acéltűre rögzített érgyűrű feszülésében a különböző vazóaktív anyagok hatására bekövetkező változást mérik (Halpern és mtsai, 1978). A tenzió mérő kifejlesztése Mulvany és Halpern nevéhez fűződik (Mulvany és mtsai, 1976). A miográf készülék 2 rozsdamentes L alakú acéltűből áll, amelyek egymással szemben helyezkednek el. Az egyik tű egy erőmérőhöz van csatlakoztatva, amelynek segítségével az izometriás tenzióban bekövetkező változásokat poligráfon regisztrálják. Az ér az értartókra kerül, ami egy 8 ml térfogatú kádba merül. Az optimális, élettani viszonyoknak leginkább megfelelő feszülés meghatározott matematikai képletek segítségével megadható, de általában tapasztalati értékek alapján állítják be a műszereket.

Az izometriás tenzió mérésére Högestatt és mtsai, illetve Hardebo és mtsai dolgoztak ki megfelelő módszert. A mérést megelőzően a szerveket standard Krebs-oldatban tartják, és oxigén-széndioxid gázzal buborékolatják át. A mérési módszer lényege, hogy először meghatározzák az ideális passzív tenziót, majd 60 perc inkubáció következik. Közben az oldatot háromszor lecserélik és felmelegítik a szervfürdőt 37 °C-ra szobahőmérsékletről. Ezután meghatározzák a maximális kontrakciós választ, K⁺-os Krebs oldattal. A következő lépésekben már a kísérletet végző döntésétől függ, hogy milyen vazóaktív anyagokat fog alkalmazni. Általában noradrenalin, idazoxan, nitroglicerin, szintetikus alfa-adrenoceptorokon ható: U46619, UK14304 és acetil-kolin a felhasznált hatóanyag (Halpern és mtsai, 1978; Högestatt és mtsai, 1983; Hardebo és mtsai, 1986).

Belső rectushüvelyből képzett érprotézisen még izometriás tenzió meghatározást nem végeztek.

4.9 Az érgraftok immunhisztokémiai vizsgálata

Az immunhisztokémiai vizsgálatot a patológiában az 50-es években vezették be, és mostanra nélkülözhetetlen diagnosztikai eljárássá vált (Krutsay 1999; Mason és Gatter, 1987). Alkalmazása a rutinszerűen használt formaldehid-oldatban konzervált és paraffinba, vagy műgyantába ágyazott preparátumon történik. Az immunológiai eljárás specificitása kezdetben még korlátozott volt, de később az ellenanyagok (antitestek) előállításának és a tisztítási módszerek finomodásának köszönhetően a 80-as években az immunhisztokémia az egyik leggyakrabban használt patológiai, tumor-diagnosztikai eszközzé vált (Jakab és mtsai, 2009a). A módszer az immunológiából jól ismert antigén-antitest reakción alapszik (Krutsay 1999). Az immunhisztokémia során nagy molekulású vegyületeket: fehérjéket, glikoproteineket, poliszacharidok vagy lipideket mutatunk ki a sejtekben, vagy az extracelluláris térben (Krutsay 1999; Mason és Gatter, 1987). Az immunhisztokémia segítségével kimutathatók hormonok, lektinek, enzimek, immunglobulin könnyű- és nehézláncok, haemoglobin, myoglobin, fehérvérsejttípusok, protozoonok, baktériumok, vírusok stb., tehát mindazok, amelyek ellen kísérleti állatokban ellenanyag termelhető (Krutsay 1999; Merz és mtsai, 1993). Az antigén-antitest kapcsolódás helye közvetlenül nem látható, azt valamilyen technikával láthatóvá kell tenni. Ennek érdekében az alkalmazott immunsavókat jelölni kell. Az antitesthez enzim, fluoreszkáló színezék vagy kolloid arany kapcsolható. Jelölt immunsavók a kereskedelemben gyári készítményként beszerezhetők.

Az immunhisztokémiai eljárásokat direkt és indirekt módszerekre lehet felosztani. A direkt módszer során jelölt elsődleges antitesteket használnak fel. Az eljárás gyors, olcsó, de érzékenysége alacsony. Az indirekt módszerek lényege az, hogy nem közvetlenül az antigénhez kapcsolódott primer antitestet, hanem az ellene termelt, hozzá kapcsolódott secunder antitestet mutatjuk ki közvetetten, valamilyen speciális technikával (Krutsay 1999; Nagy és mtsai, 2002; Stoica és mtsai, 2001). Az indirekt módszerek közé tartoznak: az enzim-immunkomplex módszer (PAP), az avidin-biotin-enzimkomplex módszer (ABC), a streptavidin-biotin-enzimkomplex módszer, az enzimmel jelölt avidin-biotin-enzimkomplex módszer (LAB), az enzimmel jelölt streptavidin-biotin-enzimkomplex módszer (LSAB) (Guesdon és mtsai, 1979; Hau és mtsai, 1981; Krutsay 1999).

Immunhisztokémiai vizsgálataink során claudin-5, CD31, desmin, α -sma és pancycoceratin biomarkereket használtunk fel.

A *claudin-5* (CLD-5) molekula egy endothel specifikus „tight junction” fehérje (Tsukita és mtsai, 2001). Korábbi állatorvosi onkológiai kutatások bizonyították, hogy a humanizált anti-claudin-5 antitest intenzív keresztreakciót ad a kutya endothel sejtekkel. A CLD-5 alkalmasnak bizonyult a vérerek és nyirokerek endothel sejtjeinek megjelenítésére különböző kutya szövetekben (Jakab és mtsai, 2008a) és primer tumorokban lévő neoangiogenetikus mikroerek kimutatására (Jakab és mtsai, 2008b). Mindemellett a CLD-5 antitest nagyban elősegíti kutyákban a benignus és malignus endothelialis eredetű tumorok kimutatását (Jakab és mtsai, 2009b).

A *CD31* transzmembrán fehérje az endothel sejtek sejtközi kapcsolatainak kialakításában vesz részt és fontos szerepet játszik a thrombocytá adhésios folyamatokban is. Immunhisztokémiai vizsgálatok során elsősorban az endothelsejtek kimutatására használják (Ganji-Azar 2007). Kutya hemangiosarcomákon végzett vizsgálatok alapján a *CD31* alkalmas volt az endothelsejtek kimutatására, de a CLD-5 erősebb membrán pozitivitást mutatott (Jakab és mtsai, 2009a).

A *desmin* egy nem specifikus izomfehérje, ami simaizomban, harántcsíkos izomban és szívizomban is megtalálható (Li 1997). Szentitív és specifikus izom markernek számít (Ragdaeng és mtsai, 1991). Az α -*sma* ezzel szemben csak a simaizomsejtekben fordul elő, sőt nagyrészt csak a vascularis simaizomsejtekben, és gyakran alkalmazzák a myofibroblastok kimutatására (Nagamoto és mtsai, 2000).

A cytokeratinok fehérjék, amelyek a cytoplasmában megtalálható komplex keratin filamentum hálózatot alkotják és számos típusuk szerv vagy szövetspecifikusan jelenik meg. A *pancytokeratin* mint biomarker egy antitest-koktél, amellyel többféle cytokeratint is ki lehet mutatni. Segítségével megjeleníthetőek a mesothel sejtek (Terada 2011). A patológiai diagnosztikában széles körben elterjedt a használata a pleurális folyadékgyülemek mesothelialis sejtjeinek a kimutatásában (de Brot 2013; Conner 2014; Przewdziecki 2014,) és a tumorok tipizálásában mind a humán (Ko 2014,), mind az állatorvosi vonalon (Kim 2002; Geninet 2003; Kang 2004; Regetti 2005; Sato 2005; Morini 2006; Seo 2007, Vural 2007, Vascellari 2011).

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

5.1 Anyag és módszer

5.1.1 A belső rectushüvelyből képzett vénás foltgraftok beültetése

A kísérlet során négy kutyában összesen 15 vénás foltgraftot 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.

Az első beültetést követően 6 hónappal távolítottuk el a graftokat, így a v. iliaca communis graftokat 6 hónapon keresztül, a v. jugularis graftokat pedig 3 hónapon keresztül követtük.

A műtéteket a SZIE ÁOTK Sebészeti és Szemészeti Tanszékén végeztük. Minden műtétet Prof. Dr. Németh Tibor Dip. ECVS és Dr. Csébi Péter végzett. A kísérletet az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács javaslata alapján az illetékes hatóság engedélyezte. Engedély száma: 73/2008.

A műtétek általános sebészeti narkózisban végeztük. Premedikációra 0,5 mg/ttkg i.v. diazepamot (Seduxen 5 mg/ml inj., Richter Gedeon) és 0,01 mg/ttkg i.v. fentanylt (Fentanyl inj., Richter Gedeon) használtunk, az indukciót 3 mg/ttkg i.v. propofollal (Diprivan 1% inj. AstraZeneca Pharmaceuticals) végeztük, fenntartásra pedig 2 (v/v)% sevoflurant (Sevoran) alkalmaztunk 2 L/perc oxigénáramlás mellett. Perioperatív fájdalomcsillapításra a műtét során folyamatosan infúziós pumpából biztosított fentanylt használtunk 0,02 mg/ttkg/óra dózisban. Emellett Ringer-laktát infúziót adtunk 10 ml/ttkg/óra fenntartó adagban. Közvetlenül a műtéti beavatkozás előtt a trombózis megelőzésére 200 NE/ttkg iv. heparint (Heparin inj., Richter Gedeon) adtunk.

A műtét során a hátfekvésben rögzített kutyáknál alsó medián laparotomia során feltártuk a v. iliaca communisokat. A belső rectushüvely postumbilicalis területéről 2x3 cm-es téglalap alakú darabot metszettünk ki, majd ebből 1cm hosszú és 0,5 cm széles foltot képeztünk, amelyet a beültetésig (10-20 perc) fiziológiás sóoldatban tartottunk (**5. ábra**). Miután kimetszettük a megfelelő méretű foltgraftot, a kísérleti ereket izoláltuk a beültetéshez. Az erek szabaddá tétele után a keringést érkirekesztővel blokkoltuk, majd szikével körülbelül 1cm-es vágást ejtettünk az ér felületén úgy, hogy a teljes érfalat átvágtuk és így megnyílt az

ér lumene. Az előzőleg kimetszett és előkészített rectushüvely graftot ráillesztettük az éren kialakított anyagiánnyra úgy, hogy azt teljesen befedje, de ne lógjon túl a bemetszés széli részén, hanem lehetőleg teljesen illeszkedjen ahhoz. A foltot úgy pozícionáltuk, hogy a mesothellel fedett peritoneális felszíne nézzen az ér lumene felé. Következő lépésként 6/0 USP méretű polipropilén (Prolene, Ethicon) varróanyaggal, futóvarratokkal rögzítettük a foltot az ér felületén (**6-8. ábra**). Miután megbizonyosodtunk, hogy a folt szivárgásmentesen fedi a mesterséges anyagiányt, a hasi sebet 4 rétegben zártuk futó varratokkal. A v. jugularisokon három hónappal később végeztük el a beavatkozást a hasi műtétnél leírt altatási és érsébeszeti módszer alkalmazásával (**9-10. ábra**). A posztoperatív időszakban a kutyák 0,2 mg/ttkg meloxicam (sc.) injekciót kaptak 5 napon keresztül, valamint antikoagulációs terápiaként 200 NE/ttkg heparint, amit subcutan adtunk naponta kétszer. A heparint a műtétet követő két héten keresztül alkalmaztuk.

Kísérlet vázlat:

1. **v. iliaca communis graftok beültetése (8 db)**



2. **A funkcióképesség Doppler-Ultrahangos ellenőrzése a műtét másnapján, majd hetente 1x az első hónapban, majd havonta 1x.**



3 hónappal később

3. **v. jugularis graftok beültetése (7 db)**



4. **A funkcióképesség Doppler-Ultrahangos ellenőrzése a műtét másnapján, majd hetente 1x az első hónapban, majd havonta 1x.**



1 hónappal később

5. **CT angiográfia**

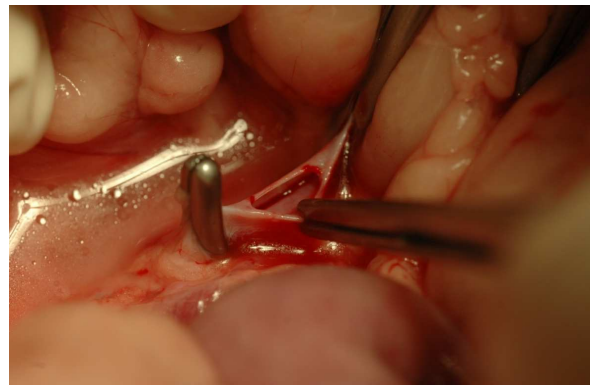


2 hónappal később

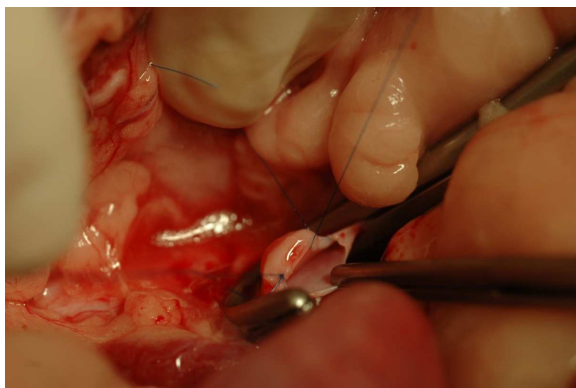
6. **Graftok eltávolítása, szövettani és immunhisztokémiai vizsgálat**



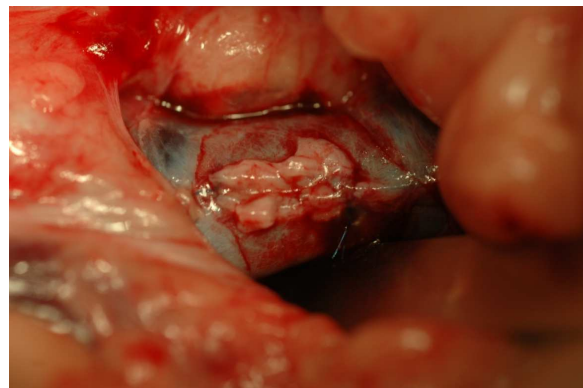
5. ábra. A belső rectushüvely graft kimetszése.



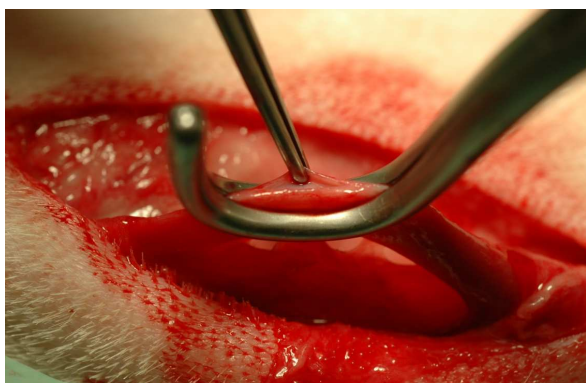
6. ábra. A v. iliaca communis lumenének megnyitása.



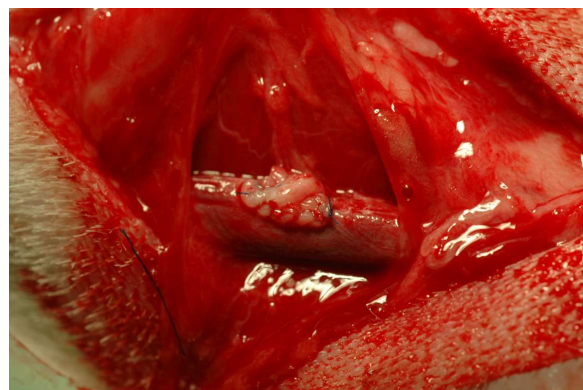
7. ábra. A v. iliaca communis graft futó varrattal történő rögzítése.



8. ábra. Az elkészült v. iliaca communis graft



9. ábra. A v. jugularis műtéti területének részleges kirekesztése Satinsky érfogóval és a v. jugularis érfalának megnyitása.



10. ábra. A beültetett graft a v. jugularis felületén

5.1.2 A graftok funkcióképességének Doppler-ultrahangos vizsgálata

A graftot tartalmazó érszakaszok morfológiáját, átjárhatóságát Doppler-ultrahangos vizsgálattal ellenőriztük a SZIE ÁOTK Belgyógyászati Tanszékén egy ESAOTE MEGAS GPX típusú ultrahang-készülékkel. A beültetést követő első vizsgálatra a műtétet követő napon került sor, majd az első hónapban hetente, a második hónaptól kezdve havonta végeztünk kontrollokat.

5.1.3 A graftok funkcióképességének CT angiográfiás vizsgálata

Az ultrahangos vizsgálatok mellett, a v. iliaca communis graft beültetését követő 4. hónapban, CT-angiográfiát is végeztünk a Kaposvári Egyetem Diagnosztikai és Onkoradiológiai Intézetében, egy Siemens Sensation Cardiac Multislice 16 CT készülékkel. Az állatokat általános anesztéziában vizsgáltuk. Premedikációra diazepamot (0,5 mg/tt, iv.), indukcióra propofolt (6 mg/ttkg iv.), fenntartásra 2,0 (v/v)% isofluránt használtunk 2 L/perc oxigénáramlás mellett. A CT angiográfia során intravénásan nagy sebességgel (2-3 ml/sec flow) nem ionizált jódot tartalmazó röntgen kontrasztanyagot (30 ml Omnipaque 350 mg/ml) fecskendeztünk be bolusban, amely jelentős denzitás-növekedést okozott az érrendszerben. Az injekció után a helikális CT mérések indításakor bolus tracking technikát alkalmaztunk, amelynek megfelelően a ROI (region of interest) karikát a vizsgálni kívánt érszakasz „elé” tettük, és amikor a kontrasztanyag kellő koncentrációban odaért, akkor indult a szkennelés. A vizsgálatot az első, artériás fázisban végeztük, amikor maximális volt a kontrasztanyag koncentráció. A vizsgálat helikális üzemmódban (120 kV, 140 mAs, 512×512 képmátrix) történt, a szeletvastagság 1,5 mm, az asztalléptetés 1,5 mm volt. A rekonstrukciós increment 1,5 mm volt, átfedő szeleteket, valamint lágyszöveti algoritmust használva. A képrekonstrukció során MPR (Multi Planar Reconstruction) technikát alkalmaztunk.

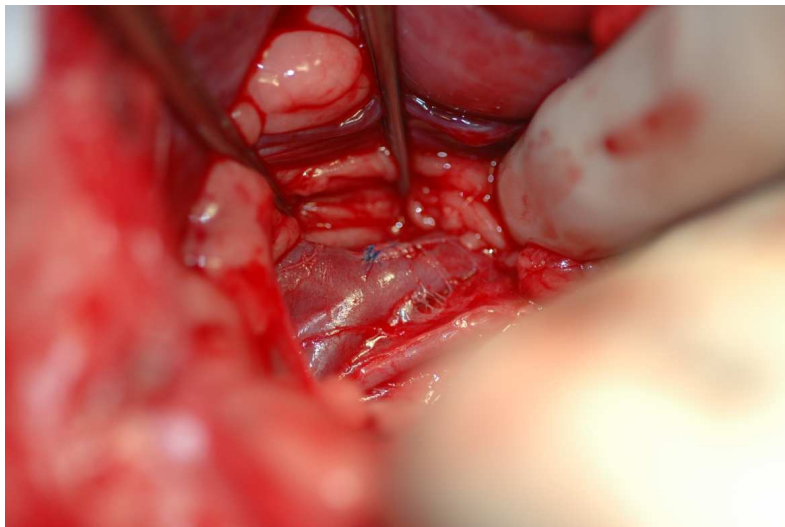
5.1.4 Szövetteni és immunhisztokémiai vizsgálatok

A három ill. 6 hónapos utókövetés 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 érgraft sebészi mintákat 8%-os pufferolt (PBS, pH 7.0) formaldehidoldatban konzerváltuk és a vizsgálatokat a SZIE ÁOTK Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékén végeztük. A fixálás után elkészült paraffinos blokkokból, *Reichert* típusú mikrotómmal, 3-4 µm vastagságú harántmetszeteket készítettünk, amelyeket hematoxinin és eozinnal festettünk meg *Shandon Varistain 24-4* automata segítségével. A metszetek kiértékelése Nikon Optiphot-2 típusú fénymikroszkóp segítségével történt. A kórszövetteni felvételeinket Nikon Coolpix 4500 digitális kamerával készítettük. A továbbiakban a minták immunhisztokémiai vizsgálataihoz a metszeteket kétszer váltott xyloban (2×10 percen keresztül), majd háromszor váltott alkoholban (3×5 percen át 100 %-os, 70 %-os és 50-os alkohol) deparaffináltuk, majd 1×-es PBS-sel való mosás után antigénfeltárást végeztünk. Az antigének feltárása magas hőmérsékleten, mikrohullámmal (30 perc, 800 W) történt, kiegészítve Target Retrieval Solution feltáró oldattal (DAKO, Glostrup, Dánia, pH 6). Az endogén-peroxidáz aktivitását 0,3%-os H₂O₂-dal, metanolban blokkoltuk 5 percen keresztül. Az immunhisztokémiai vizsgálataink során: anti-**claudin-5** (1:100 hígítás, egér monoclonalis ellenanyag, Zymed Inc.) és anti-**CD31** (1:80 hígítás, egér monoclonalis ellenanyag, DAKO) 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). Mindkét antitestnél a membránreakció erősségét egy három keresztben rendszerben jelenítettük meg. A (+++) erős intenzitásnak, a (++) közepes intenzitásnak, míg a (+) gyenge intenzitásnak felelt meg. Az intenzitás mértékét a külső pozitív kontrollhoz viszonyítottuk.

5.2 Eredmények

5.2.1 A graftok beültetésének eredményei

Összesen 4 kutyán végeztük el a foltgraftok beültetését: a mindkét oldali v. iliaca communisukat és egy kivétellel (az egyik kutyánál a jobb oldali v. jugularis el volt záródva) mindkét oldali v. jugularisukat is felhasználtuk, így összesen 8 iliaca graftot és 7 jugularis graftot alakítottunk ki. 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 nekrózis) jelei nem voltak láthatók. Adhéziók 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 (**11. ábra**). Az azonos állatokba beültetett graftok azonos eredményt hoztak.

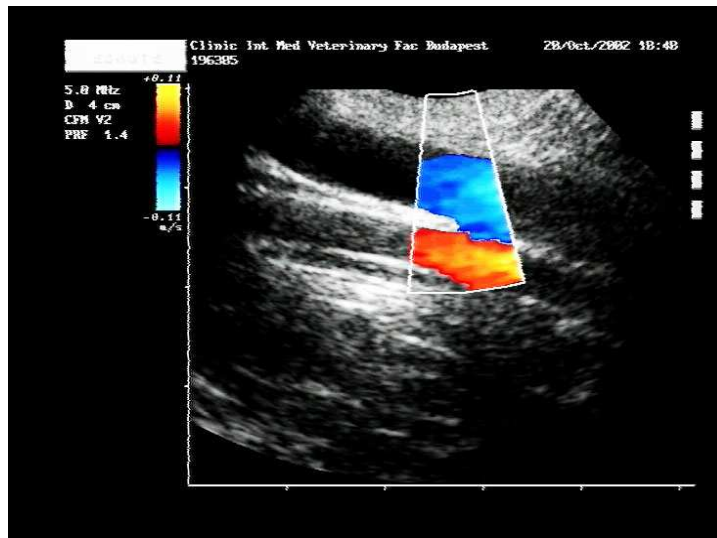


11. ábra. A v. iliaca foltgraft az eltávolításkor.

5.2.2 Ultrahangos és színes Doppler-ultrahangos vizsgálati eredmények

A v. jugularisok jól ábrázolhatóak voltak, de felkeresésükkor némi nehézséget okozott a közvetlenül bőr alatti helyeződésük. Nem megfelelően ráhelyezve a vizsgálófejet, könnyen elnyomhatóak voltak. A v. iliaca communisok felkeresését és beazonosítását nehezítette,

hogy számos nagyobb értörzs is található a területen, de a v. cava caudalistól indulva a lágyéktájékon szétágazó vénákat lehetett követni. Az ultrahangos vizsgálattal ellenőrizni tudtuk az erek morfológiáját és funkcióképességét a beültetés területén. A kontroll vizsgálatok során elváltozásokat (falvastagodást, stenosiszt, elzáródást, aneurysmát) nem láttunk egyik érben sem. A színes Doppler vizsgálatok alapján a kísérleti területek minden esetben átjárhatóak voltak (**12-13. ábra**).



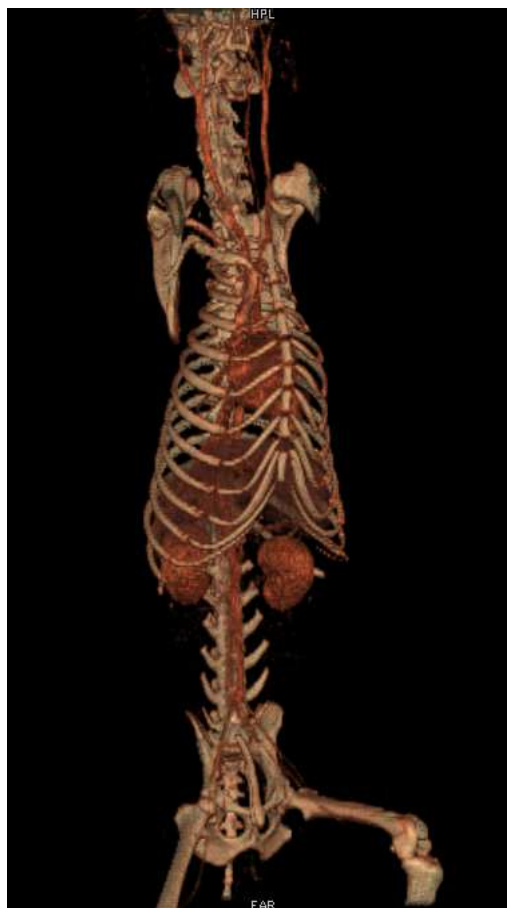
12. ábra. Doppler-ultrahangos áramlásvizsgálat a v. jugularisnál (felül v. jugularis, alul a. carotis). A színes Doppler-vizsgálat mutatja a két érben a vér ellentétes irányú áramlását.



13. ábra. Fiziológias áramlási viszonyokat mutató Doppler-ultrahangos vizsgálat a v. iliaca communisnál.

5.2.3 CT angiográfias eredmények

A CT angiográfiával a vizsgált erek morfológiai és áramlási jellemzőit egyaránt hatékonyan fel lehetett mérni. A képelemzés a transversalis szeletek szisztematikus elemzésével történt. A kontrasztanyaggal feltöltött erek a képsorozaton jól követhetőek voltak. A mérések után lehetőség nyílt a kontrasztanyaggal feltöltött erek egyéb lágy szövetektől elválasztott 3D megjelenítésére is. A vizsgálatok illusztrációjaként mindegyik kutyáról egy-egy ilyen rekonstrukciós képet lehet látni (**14-15. ábra**). Az angiográfia nem mutatott ki morfológiai vagy áramlási rendellenességet a beültetett foltgraftok területén. Az egyik kutyánál volt egy már korábban elzáródott v. jugularis, ami a CT angiográfiával egyértelműen kimutatható volt.



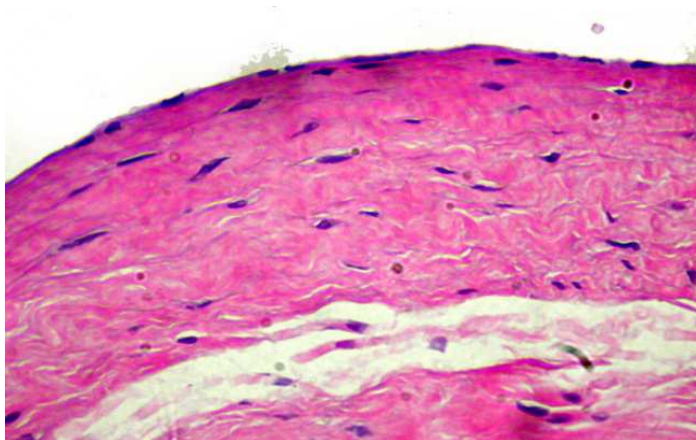
14. ábra. A kontrasztanyaggal feltöltött v. jugularisok és v. iliaca communisok 3D rekonstrukciós ábrázolásán elzáródás, vagy egyéb morfológiai eltérés nem látható.



15. ábra. A kontrasztanyaggal feltöltött v. jugularisok és v. iliaca communisok 3D rekonstrukciós ábrázolásán a jobb oldali v. jugularis elzáródása látható. A többi rajzolódó ér intakt.

5.2.4 Szöveti és immunhisztokémiai eredmények

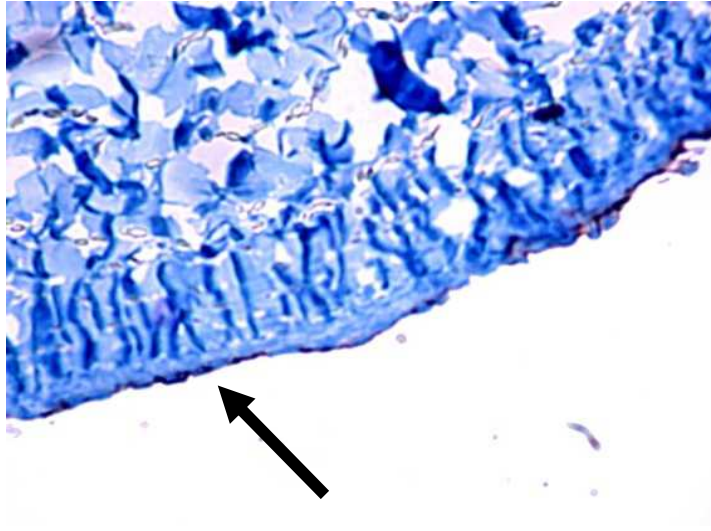
A sebészi úton eltávolított mintákat első lépésben rutin szövettani vizsgálatnak vetettük alá. Ennek során a gyulladástól mentes, nem thrombotizált, nem stenotizált graftokban intakt, egyrétegű endothelbélést figyeltünk meg. Sem endothel fosztott, sem hyperplasticus területeket nem láttunk. A subendothelialis szöveti rétegek gyulladással sejt infiltrátumtól (kereksejtektől, neutrophil leukocytáktól, histiocytáktól) mentesnek bizonyultak. Ezen a területen elsősorban vaskos kollagén rostokat figyeltünk meg, közöttük elnyúlt, orsó alakú fibrocytákkal (érett kötőszöveti sejtekkel) (16. ábra), illetve multifokálisan elhelyezkedő kapilláris és arteriola átmetszetekkel. A fénymikroszkópos vizsgálataink során az érgraftok falának mélyebb rétegeiben vékony kötőszöveti tokkal rendelkező, fibrotikusan demarkálódott, fel nem szívódó sebészi varrófonalakat láttunk, amelyek környezetében fibrocytákat, és kisebb számban lymphoid sejteket észleltünk. Egyes metszetekben a szövettani feldolgozás során a mechanikailag eltávolított varrófonalnak csak a szövettani helyét észleltük, környezetükben kisszámú kereksejtes beszűrődéssel.



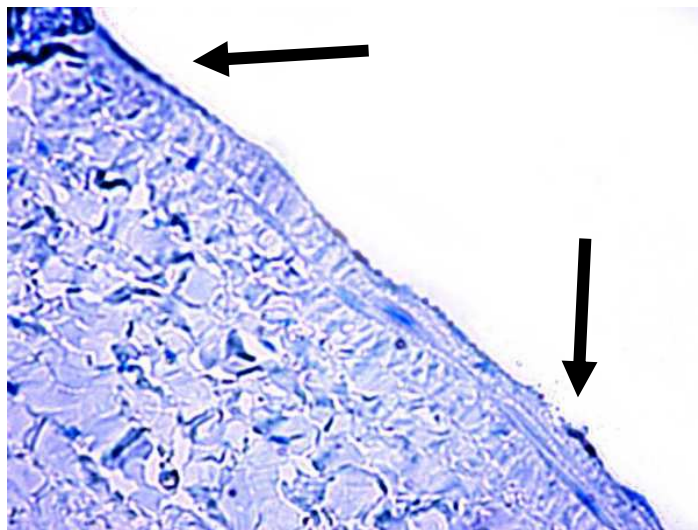
16. ábra. A lumen felületén endothel sejteket, a subendothelialis területeken elsősorban vaskos kollagén rostokat figyeltünk meg, közöttük elnyúlt, orsó alakú fibrocytákkal (HE 400×).

Az anti-CD31 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 CD31 molekula intenzív, lineáris membránreakció formájában volt látható az érgraftokban (17.

17. ábra). Az anti-CD31-el végzett vizsgálataink során szintén pozitív membránreakciót észleltünk az érgraftokat bélelő endothelsejtekben, viszont gyengébb immunreaktivitást mutatott, mint a CLD-5 (**18. ábra**). Az ép területekről vett kontroll mintákkal összehasonlítva a grafftal fedett területeket, morfológiai eltérést nem láttunk.



17. ábra. CLD-5 okozta (+++) barna színreakció a grafftendothel felületén (IHC 400×).



18. ábra. A graftok CD-31-el végzett vizsgálata során (++) barna színreakció jelentkezett a grafftot luminalisan fedő endothel rétegben (IHC 200×).

Az eredeti rectushüvely grafftot 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. Az eredmények összefoglalása az **1. táblázatban** látható.

1. táblázat						
	Utókövetés	Doppler-UH	CT angiográfia	HE festés	CD31	claudin 5
v. jugularis foltgraft	3 hónap	átjárható	átjárható	vascularis átalakulás	++	+++
v. iliaca foltgraft	6 hónap	átjárható	átjárható	vascularis átalakulás	++	+++

5.3 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 környezethez (Kóbori és mtsai, 2003, 2008). A graftok anyagát a prepubicus területéről nyertük. Négy kutyában összesen 15 vénás foltgraftot alakítottunk ki úgy, hogy mindegyik kutya mindkét v. iliaca communisán, illetve egy kivétellel mindkét v. jugularis externáján is elhelyeztünk egy-egy foltgraftot. Az egyik kutyában a jobb oldali v. jugularis el volt záródva, ezért ezt az eret a kísérletbe nem tudtuk bevonni. Mivel a graftokat az elkészítésüket követően szinte azonnal felhasználtuk, tárolásból vagy tartósításból származó károsodást nem szenvedtek. A kísérleteink alapján a belső rectushüvelyből képzett graftok elkészítése nem okozott technikai nehézséget.

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 luminalis 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 megfelelő 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).

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

6.1 Anyag és módszer

6.1.1 A belső rectushüvelyből kialakított tubularis artériás graftok beültetése

A belső rectushüvelyből a Kóbori és mtsai által kidolgozott módszer alapján képeztünk érgraftokat, amelyeket az a. iliaca externába ültettünk be (Kóbori és mtsai, 2003, 2008). A műtéteket a SZIE ÁOTK Sebészeti és Szemészeti Tanszékén végeztük 4 kísérleti beagle kutyán. Összesen 8 graftot ültettünk be. Minden műtétet Prof. Dr. Németh Tibor Dip. ECVS és Dr. Csébi Péter végzett.

A kísérletet az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács javaslata alapján az illetékes hatóság engedélyezte. Engedély száma: 73/2008. A kísérlet során mindvégig a vonatkozó állatvédelmi és kísérleti engedélyezési szabályok szerint jártunk el.

A sebészi beavatkozást általános anesztéziában hajtottuk végre, amelynek protokollja megegyezett a vénás foltgraftok beültetése során alkalmazottal (Lásd Saját vizsgálatok I.). 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 (**19. ábra**). Ebből egy standard 5 mm átmérőjű üvegbot körül 2 cm hosszú tubularis graftot alakítottunk ki atraumatikus futó varrattal (Prolene USP 6/0, Ethicon) úgy, hogy a rectushüvely belső peritoneális felülete a graft lumene felé tekintsen (**20. ábra**). Közvetlenül az artéria keringésből való kirekesztése előtt i.v. 200 NE/ttkg heparint adtunk be (Heparin inj., Richter Gedeon) trombózis megelőzésre. A lezárt artériát ezt követően átmetszettük és a graftot egyrétegű 2 pont közötti futó varrattal vég-a-véghez anasztomózissal beillesztettük (**21-22. ábra**). Az érkirekesztés megszüntetését követően a graft morfológiáját és szivárgásmentességét ellenőriztük, majd a hasüreget 4 rétegben zártuk. 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 3 hónapos utókövetés leteltével újabb műtéti beavatkozással a működőképességüket megtartott érgraftokat a befogadó érszakasz egy darabjával együtt eltávolítottuk. Két graftot 8 %-os pufferolt (PBS, pH 7.0) formaldehyddoldatban konzerváltuk, a másik kettőt pedig mesterséges tápoldatba (Tyrode-oldat) helyeztük. Ezeket a graftokat a miográfiás vizsgálathoz használtuk fel (Lásd Saját vizsgálatok III.), majd azt követően 8 %-os pufferolt (PBS, pH 7.0) formaldehyddoldatban konzerváltuk.

Kísérlet vázlat:

1. a. iliaca externa graftok beültetése (8 db)

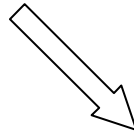


2. A funkcióképesség Doppler-Ultrahangos ellenőrzése a műtét másnapján, majd hetente 1x az első hónapban, majd a 2. és 3. hónap végén 1x.



3 hónappal később

3. A 4 db átjárható graft eltávolítása

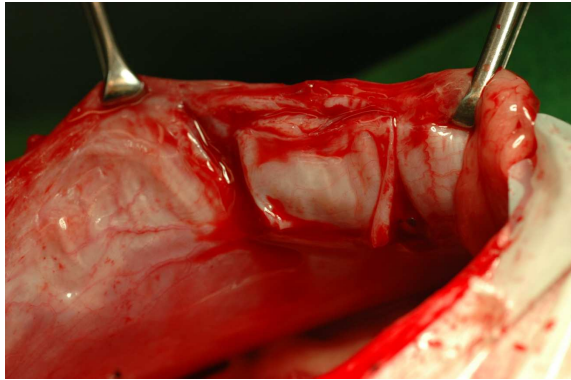


A 2 legjobb graft tápoldatba helyezése miográfiás vizsgálathoz (lásd 3. kísérlet), majd utána formalinos fixálás

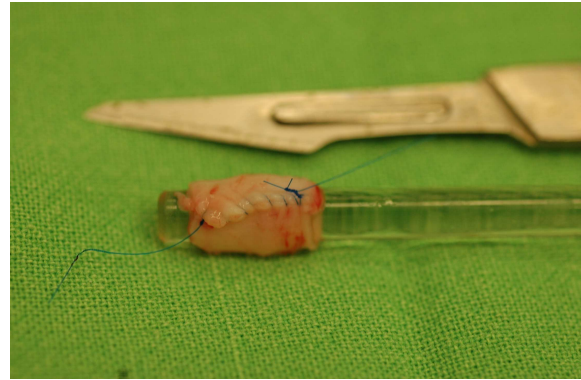
A megmaradt 2 graft formalinos fixálása



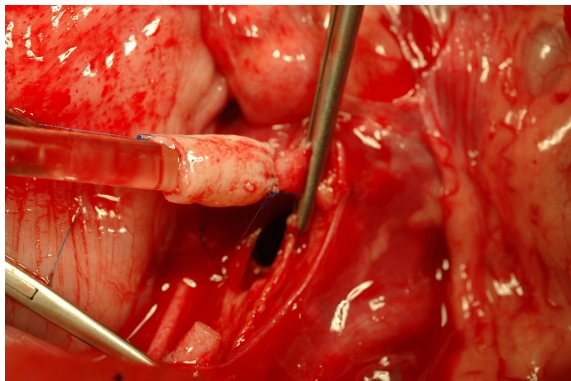
5. Szövetteni és immunhisztokémiai vizsgálat a 4 db átjárhatóan megmaradt graftból és összehasonlítás a kontroll artériával és a donor belső rectushüvellyel



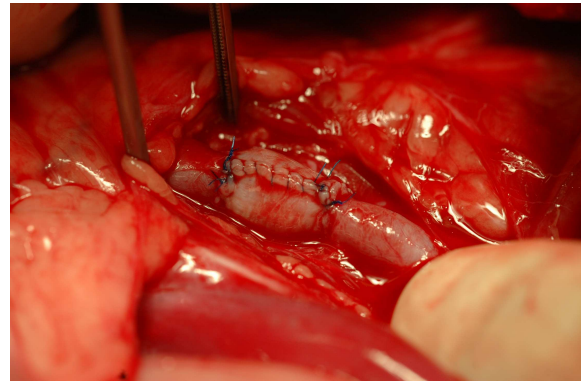
19. ábra. A belső rectushüvelyből egy 3×4 cm-es téglalap alakú darabot vágunk ki.



20. ábra. 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.



21. ábra. A graftot egyrétegű 2 pont közötti futó varrattal vég-a-véghez anasztomózzal beillesztettük.



22. ábra. A 20 mm hosszú belső rectushüvely autograft a beültetést követően.

6.1.2 A graftok funkcióképességének pulzus tapintásos és Doppler-ultrahangos vizsgálata

A graftot tartalmazó érszakaszok átjárhatóságát a femoralis pulzus tapintásával naponta ellenőriztük, és szubjektív jellemzésére + (plusz) és – (mínusz) jelölést alkalmaztunk:

++: nagyon jól tapintható, telt pulzushullám, közepes erővel nyomható el

+: jól tapintható pulzushullám, de kissé gyengébb és könnyebben elnyomható

+/-: nehezen tapintható, a pulzushullám könnyen elnyomható

-: nem tapintható pulzushullám

Emellett rendszeresen Doppler-ultrahangos vizsgálatot végeztünk a SZIE ÁOTK Belgyógyászati Tanszékén egy Brüel & Kjaer Medical Panther 2002 típusú gépen 5 Mhz szektor transzducerrel. Az első vizsgálatra a műtétet követő napon került sor, majd az első hónapban hetente végeztünk ultrahangos kontroll vizsgálatokat, ezt követően a második és harmadik hónap végén végeztünk még kontroll vizsgálatot. Minden alkalommal ellenőriztük az ér felkereshetőségét, a véráramlás meglétét, a véráramlás irányát és a véráramlás sebességét.

6.1.3 Szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok

A kísérlet végéig nyitva maradt 4 db graftból a Saját vizsgálatok I.-ben leírt módon készítettük el a szövettani és immunhisztokémiai vizsgálati metszeteket. A szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatunk során összehasonlítottuk a graftot befogadó artéria (továbbiakban kontroll), a graft anyagát adó belső rectushüvely és a beültetést követően 3 hónappal eltávolított érgraft felépítését. A rutin **HE** festés mellett **azan** festést végeztünk a collagen rostok és **orcein** festést az elasztikus rostok kimutatására. Az immunhisztokémiai vizsgálataink során a következő antitesteket használtuk fel: anti-**claudin-5** (1:100 hígítás, egér monoclonalis ellenanyag, Zymed Inc.) anti-**desmin** (1:400 hígítás, egér monoclonalis ellenanyag, Novocastra), anti- **α -smooth muscle actin** (α -SMA) (1:8000 hígítás, egér monoclonalis ellenanyag, Sigma), és anti-**pancytokeratin AE1-AE3** (1:100 hígítás, egér monoclonalis ellenanyag, DAKO). 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. A membránreakció erősségét egy három keresztet rendszerben jelenítettük meg: (+++) erős intenzitásnak, (++)

közepes intenzitásnak, míg (+) gyenge intenzitásnak felelt meg. Az intenzitás mértékét a külső pozitív kontrollhoz viszonyítottuk.

6.2 Eredmények

6.2.1 A graftok beültetésének eredményei

Négy kutyán végeztük el a tubularis artériás graftok beültetését, így összesen 8 graftot hoztunk létre. A felhasznált rectushüvely darabot a prepubicus területéről távolítottuk el. A kirekesztés megszüntetése után több esetben is szivárgó vérzés jelentkezett az anasztomózis területéről, amely tamponálással megszűnt. Az érgraftok kialakítása és beültetése során műtétechnikai akadály nem lépett fel, és a recirkuláció megindulása után benne a vérátáramlás zavartalan volt. A pulzus és Doppler-ultrahangos vizsgálatok alapján a 8 graftból négy maradt átjárható a 3. hónap végére. Ebből a négyből kettő olyan volt, ami nem mutatott szűkületet. A beszűkült vagy elzáródott graftok körül kollaterális érhálózat épült ki. A négy átjárható graftot ismételt műtéti beavatkozás keretében a befogadó ér egy szakaszával együtt eltávolítottuk és szövettani, immunhisztokémiai valamint miográfós vizsgálatot végeztünk. Makroszkóposan az eltávolított graftoknál vaskos és merev falat láttunk, de a belső, lumen felőli felület ép volt.

6.2.2 A graftok funkcióképességének pulzus tapintásos és Doppler-ultrahangos vizsgálati eredményei

A graftok működését a műtétet követően rendszeresen ismételt femoralis pulzusvizsgálattal ellenőriztük (2. és 3. táblázat).

2. táblázat: A femoralis pulzus vizsgálatának eredménye a műtétet követő 7. napon:

Tapintható pulzus				
	1. kutya	2. kutya	3. kutya	4. kutya
Jobb a. iliaca ext.	++	+	++	+/-
Bal a.iliaca ext.	-	++	+	++

3. táblázat: A femoralis pulzus vizsgálatának eredményei a reoperáció előtt:

Tapintható pulzus				
	1. kutya	2. kutya	3. kutya	4. kutya
Jobb a. iliaca ext.	+/-	+/-	-	-
Bal a.iliaca ext.	-	++	+/-	+

Egy esetben a graft már a műtétet követő első héten elzáródott. A harmadik hónap végére három esetben egyáltalán nem volt pulzus, háromnál bizonytalanul gyenge pulzust lehetett érezni és csak két olyan graft maradt, amelynél jól tapintható volt a pulzus.

A pulzusvizsgálatok mellett minden hónap végén, összesen három alkalommal, Doppler-ultrahangos vizsgálattal is ellenőriztük az érgraftok működését (**4. táblázat**).

4. táblázat: Az UH vizsgálatok eredményei:

	1. kutya	2. kutya	3. kutya	4. kutya
1. hónap végén	Bal: nincs áramlás	Bal: normális	Bal: normális	Bal: átjárható, kislefokú stenosis
	Jobb: normális	Jobb: normális	Jobb: normális	Jobb: csökkent átjárhatóság, keskeny áramlás
2. hónap végén	Bal: nincs áramlás	Bal: normális	Bal: csökkent átjárhatóság, stenosis	Bal: átjárható, kislefokú stenosis
	Jobb: átjárható, de csökkent áramlás	Jobb: csökkent átjárhatóság, kislefokú stenosis	Jobb: Stenosis, keskeny áramlás	Jobb: Nincs áramlás
3. hónap végén	Bal: nincs áramlás	Bal: átjárható, benne enyhe turbulencia	Bal: stenosis, csökkent átjárhatóság	Bal: átjárható, kislefokú stenosis
	Jobb: stenosis, csökkent átjárhatóság	Jobb: nincs áramlás	Jobb: nincs áramlás	Jobb: nincs áramlás

A Doppler-ultrahangvizsgálatok alapján 8-ból 4 graft a harmadik hónap végére elzáródott, kettő jelentősen beszűkült, de átjárható maradt és kettő elfogadhatóan funkcionált.

6.2.3 A szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei

6.2.3.1 A hematoxinilín és eozin, azan és orcein festés eredményei

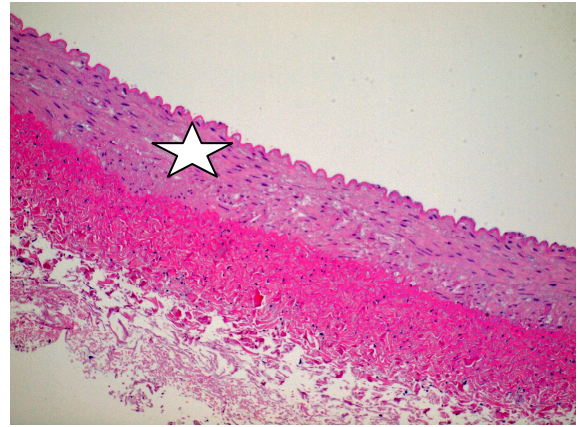
A **kontroll** esetében a HE festéssel láthatóvá vált az érfal szabályos rétegzettsége, a tunica intima, media és externa (adventitia). A media rétegben szabályos elrendeződésű, elnyúlt orsó alakú, kék sejtmaggal rendelkező simaizom sejteket lehetett látni. Az azan-festés a falban lévő collagen rostokat kék színben tüntette fel. Az adventitia réteg fokozottabb kollagén rost tartalmat mutatott a media réteghez képest. Az orcein festés a nagymennyiségű elasztikus rostot jelenített meg a lamina elastica interna és externa területének megfelelően (**23-28. ábra**).

Az ép **belső rectushüvely** belfelszínét mesothel sejtréteg borította. A falában azan festéssel kollagénrostokat és orcein festéssel elasztikus rostokat lehetett kimutatni. Simaizmokat nem lehetett látni (**29-31. ábra**).

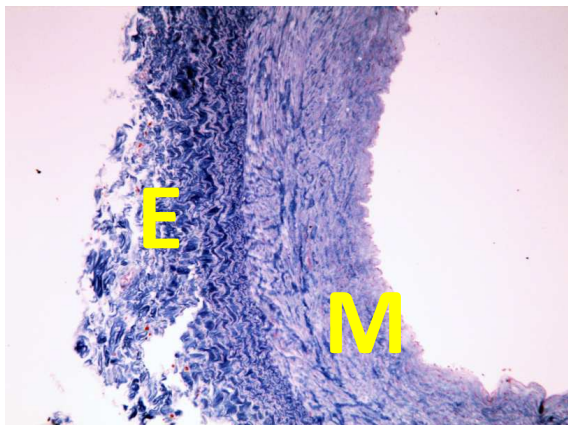
A beültetett **graft** esetében is megfigyelhető volt a HE festéssel az érfalszerű szöveti rétegződés, de sokkal hypocellularisabb mediaszerű zónával. A graft belfelszínén elnyúlt, endothelszerű sejtek, alattuk a tunica media sejteire emlékeztető, orsó alakú sejtmaggal rendelkező mesenchymalis sejteket lehetett látni. Az azan festéssel nagymennyiségű kollagén rosttömeget lehetett látni. Az orcein festéssel elasztikus rostokat lehetett kimutatni (**32-40. ábra**).



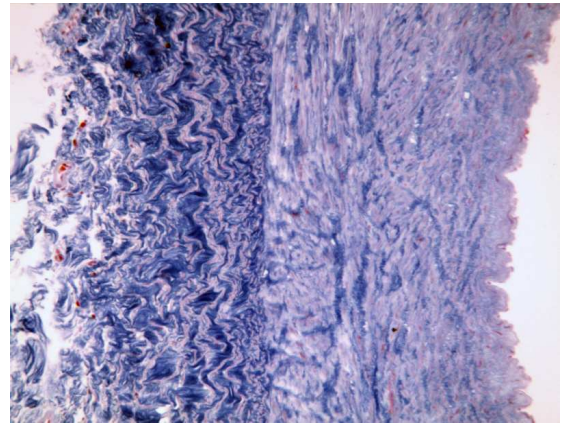
23. ábra. HE, kontroll: A muscularis típusú artéria szabályos falszerkezete látható (100×).



24. ábra. HE, kontroll: Az artéria falszerkezete látható nagyobb nagyításban. Orsó alakú simaizomsejtek vannak a tunica mediában (*csillag*) (200×).



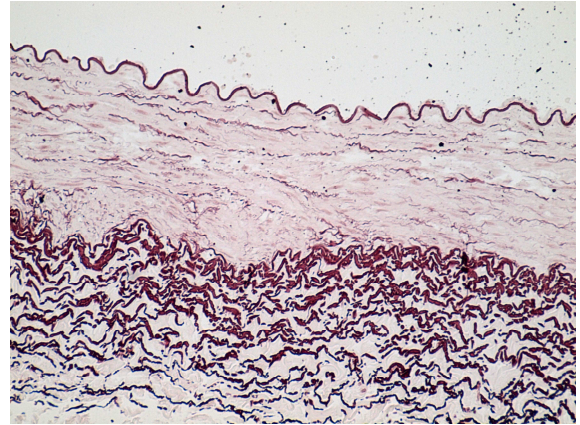
25. ábra. Azan, kontroll: a kollagénrostok kék színben tűnnek fel a tunica externa (E) és media (M) rétegben (200×).



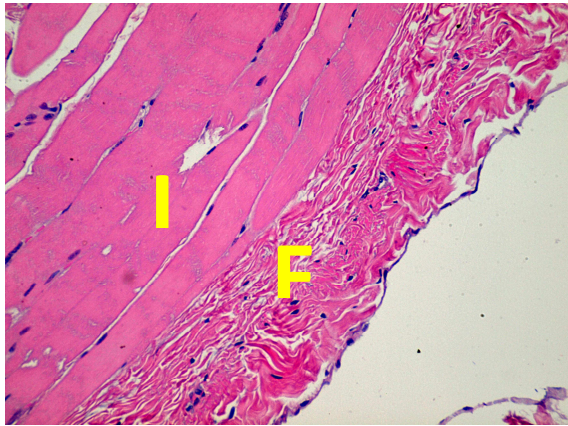
26. ábra. Azan, kontroll: A nagyobb nagyítású felvételen jól érzékelhető a baloldali kollagén dús adventitia réteg és a jobb oldali simaizom gazdag, kollagén rost szegényebb, halványabb kék színben feltűnő tunica media.



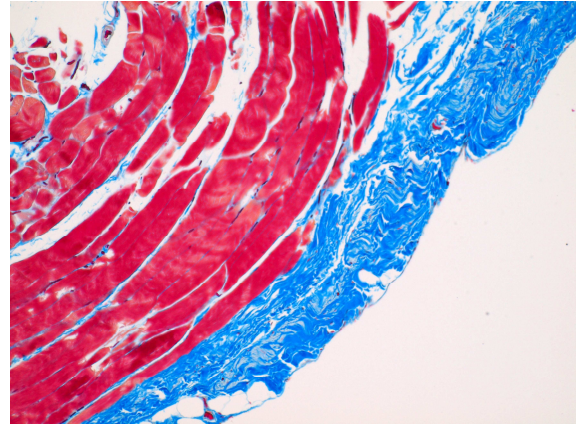
27. ábra. Orcein, kontroll: az elasztikus rostok barna színben tűnnek fel az artéria falában (100×).



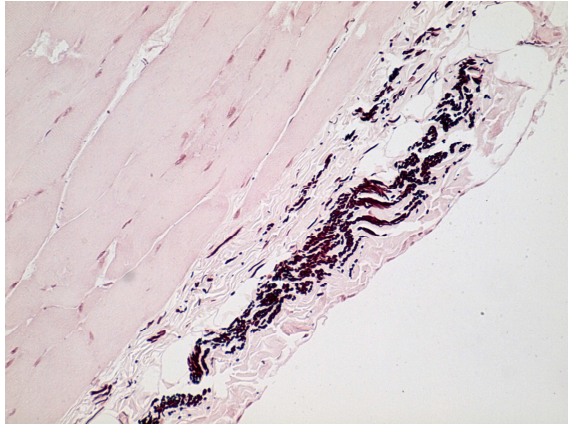
28. ábra. Orcein, kontroll: az elasztikus rostok barna színben tűnnek fel az artéria falában (400×).



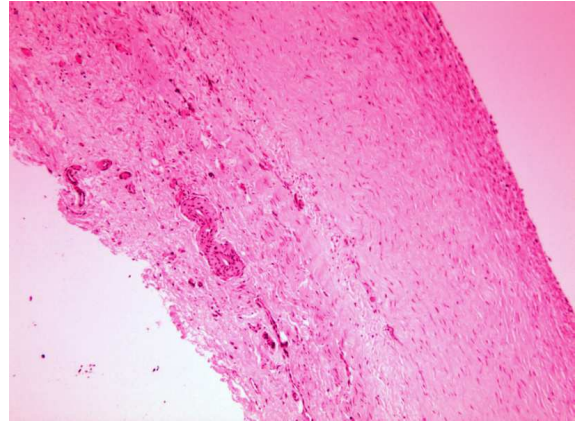
29. ábra. HE, belső rectushüvely: A donor területként szolgáló peritoneum és fascia szerkezete látható. I= rectus izom, F=fascia (100×).



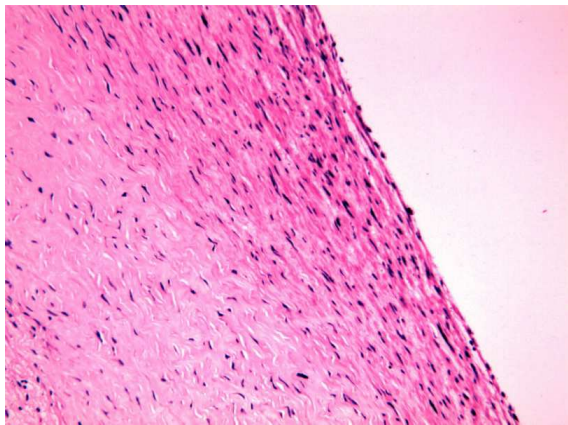
30. ábra. Azan, belső rectushüvely: A donor területként szolgáló peritoneum és fascia szerkezete látható. A collagén rostok kék színben tűnnek fel (100×).



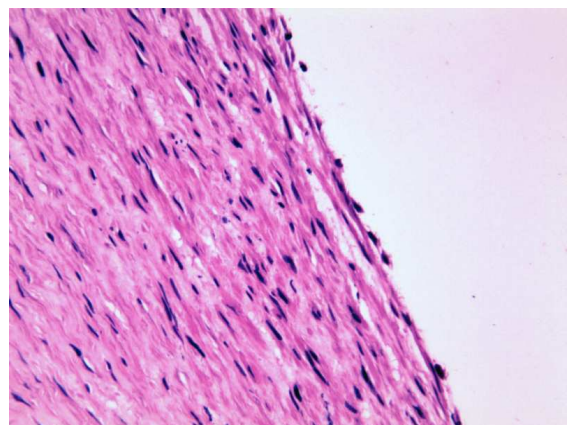
31. ábra. Orcein, belső rectushüvely: A donor területként szolgáló peritoneum és fascia szerkezete látható. Az elasztikus rostok barna színben tűnnek fel (100×).



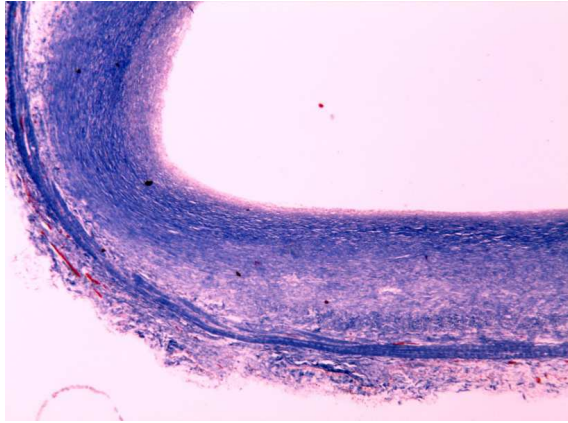
32. ábra. HE, graft: A beültetett graft érfalszerű szöveti rétegződése, hypocellularisabb mediaszerű zónával (100×).



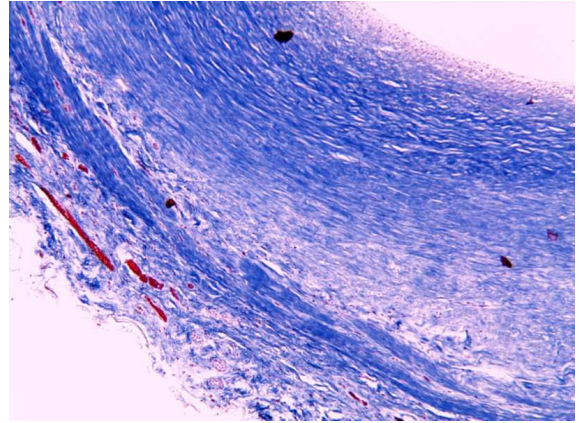
33. ábra. HE, graft: A kép jobb oldalán a graft belfelszínét beborító elnyúlt, endothelszerű sejtek, alattuk a tunica media sejtjeire emlékeztető, orsó alakú sejtmaggal rendelkező mesenchymalis sejtek láthatók (200×).



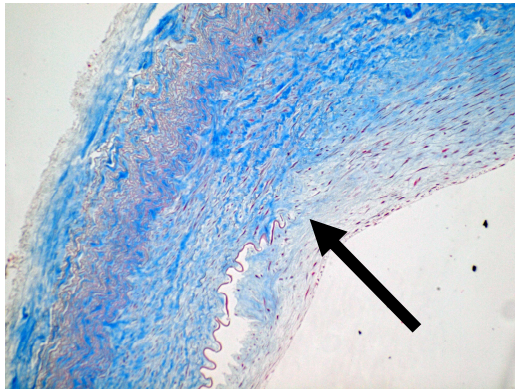
34. ábra. HE, graft: Nagy nagyítású felvétel a graft belfelszínéről és a media rétegének felső részéről (400×).



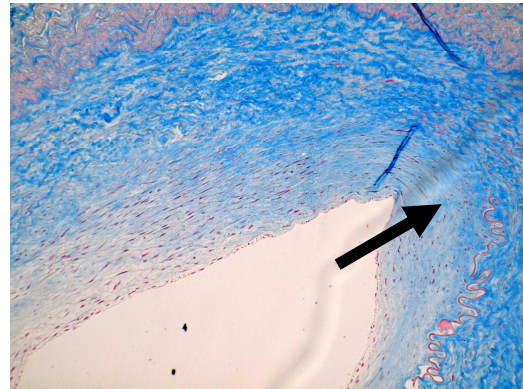
35. ábra. Azan, graft:-pozitív, kék színben előtűnő collagen rostok a graft szövetben (100×).



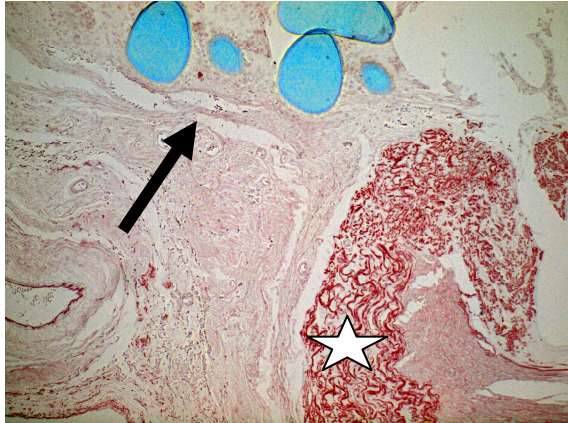
36. ábra. Azan, graft: Nagyobb nagyítású felvétel, az azan-pozitív, kék színű collagen rostokról (200×).



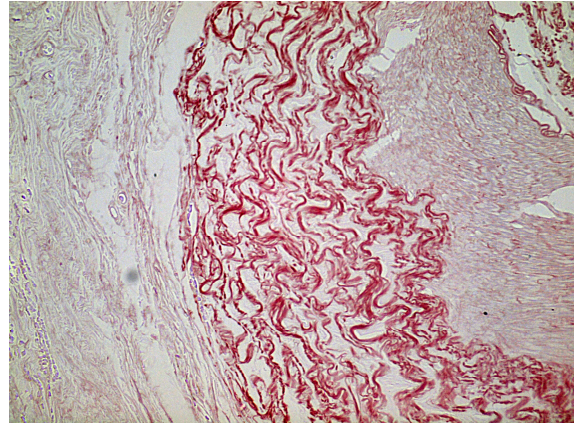
37. ábra. Azan, az ér és a graft átmeneti területéről készült metszet: A nyíllal jelölt területnél látható, ahogy az ér falába beépült graft találkozik az érrel (100×).



38. ábra. Azan, az ér és a graft átmeneti területéről készült metszet: A nyíllal jelölt területnél látható, ahogy az ér falába beépült graft találkozik az érrel (100×).



39. ábra. Orcein, az ér és a graft átmeneti területéről készült metszet: A nyíllal jelölt területnél a fel nem szívódó fonal darabjai láthatóak. A csillag orceinnel festődő elasztikus rostokat mutat. (200×).



40. ábra. Orcein, az ér és a graft átmeneti területéről készült metszet: Nagyobb nagyítású felvétel az elasztikus rostokról. (400×).

6.2.3.4 Az immunhisztokémia eredményei

A **kontroll** esetében az endothel réteg CLD-5 immunreaktivitását lineáris, intenzív, barna színreakció jelezte. Az érfalrészlet tunica media sejtjeiben intenzív, homogén, cytoplasmaticus desmin pozitivitást (barna színreakció) lehetett látni. Az érfalrészlet tunica media sejtjeiben, valamint a környező vasa vasorumokban intenzív, homogén, diffúz, cytoplasmaticus α -SMA-pozitivitás (barna színreakció) jelent meg. Az érfalrészlet pancytoceratin negatív volt.

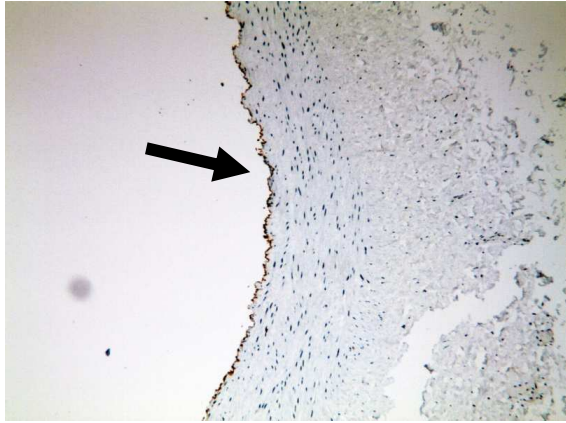
Az ép **belső rectushüvely** belfelszínét mesothel sejtek borítják, amelyek pancytoceratin pozitívak és CLD-5 negatívak voltak. A belső rectushüvely fala α -SMA negatív és desmin pozitív volt.

Az **graftok** belső felszínét lapos fusocellularis sejtréteg fedte, amely CLD-5 pozitív és pancytoceratin 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 pozitivitást mutattak (**41-48. ábra**).

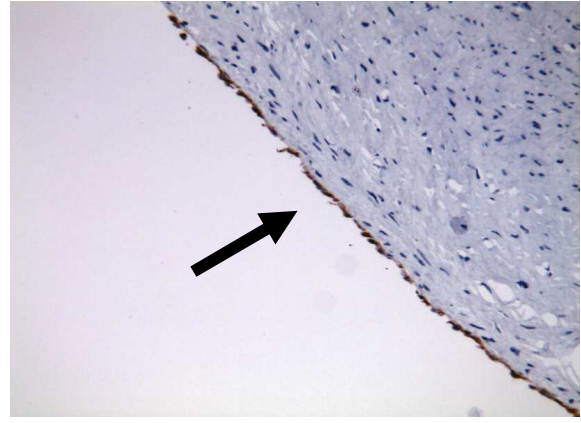
Az immunhisztokémiai eredmények összefoglalását a **5. táblázatban** lehet látni.

5. táblázat. Az immunhisztokémiai eredmények:

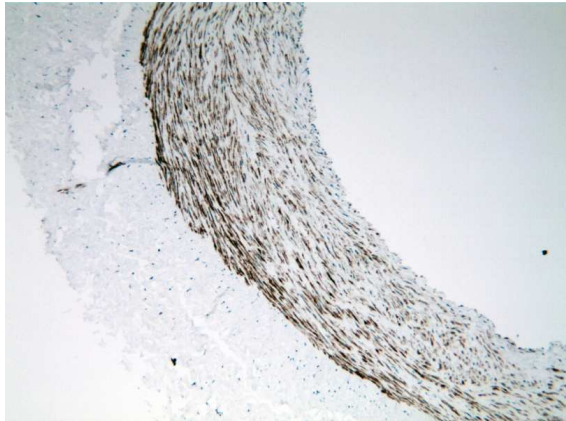
	Kontroll	Rectus-hüvely	RF graft
CLD-5	+++	-	++
α-SMA	+++	-	++
Desmin	+++	+++	+ / +++
Pancytoceratin	-	+++	-



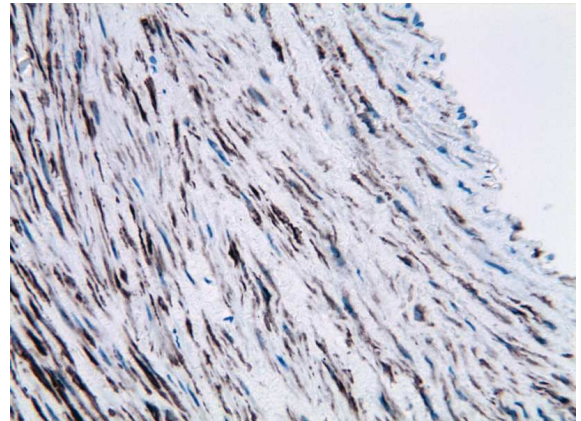
41. ábra. CLD-5, kontroll: Linearis, intenzív, barna színreakció jelzi az érbelhártyasejtek *claudin-5* immunreaktivitását (IHC, 100×).



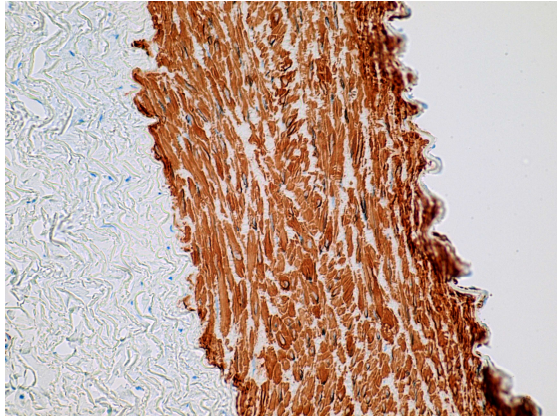
42. ábra. CLD-5, graft: *Claudin-5* pozitív (linearis barna színreakció) orsóalakú endothel sejtek az érgraft belfelszínén (IHC, 200×).



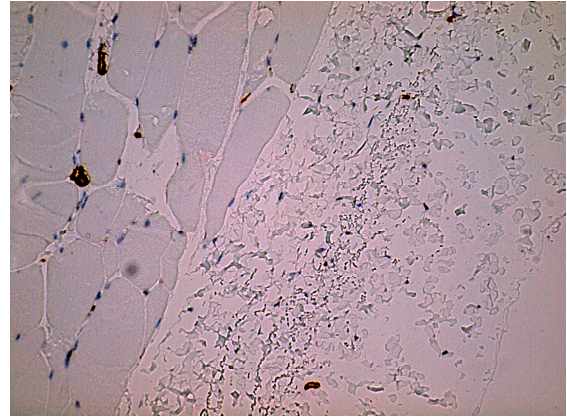
43. ábra. Desmin, kontroll: Intenzív, homogen, cytoplasmaticus desmin pozitívítás (barna színreakció) az érfal tunica media sejtjeiben (IHC, 100×).



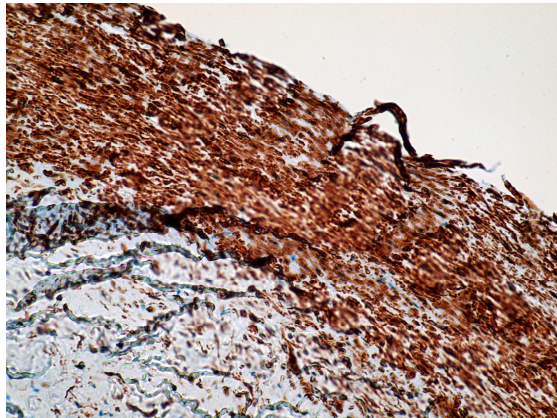
44. ábra. Desmin, graft: Nagyobb nagyítású felvétel a desmin immunreaktivitásról (IHC, 400×).



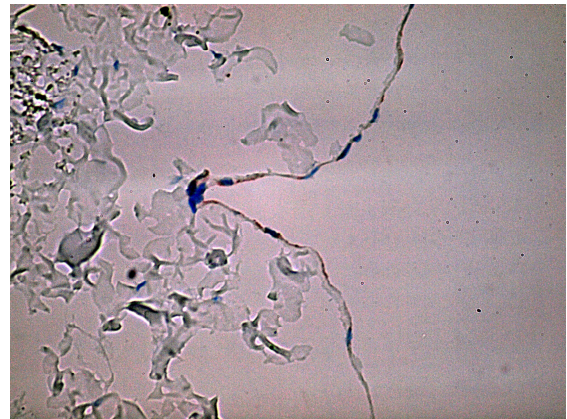
45. ábra. α -SMA, kontroll: Intenzív, homogén, diffúz, cytoplasmaticus α -SMA-pozitivitás (barna színreakció) a kontroll tunica media sejtjeiben (IHC, 100 \times).



46. ábra. α -SMA, belső rectushüvely: α -SMA negativitás a donor belső rectushüvely falában. (IHC, 200 \times).



47. ábra. α -SMA, graft: Cytoplasmaticus α -SMA pozitivitás a graftban lévő transzdifferentiálódott, fusocellularis sejtekben (barna színreakció). (IHC, 200 \times).



48. ábra. Pancytokeratin, belső rectushüvely: a mesothelsejtek pozitív barna színreakciója látható a nagyrészt lesodródott mesothel sejtrétegben. (IHC, 400 \times).

6. 3 Megbeszélés

Kísérletünkben a belső rectushüvelygraftok kialakításának és beültetésének protokollja megegyezett a korábban Kóbori és mtsai által kidolgozott és sikeresen alkalmazott módszerrel. 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.

A jelentős különbség háttérében számos tényező állhat. Az egyik lehetőség, a technikai gyakorlatlanság az érgraftok kialakítása és beültetése során. Minden sebészeti beavatkozásnak van egy tanulási görbéje. Valószínűnek tartjuk, hogy nagyobb gyakorlattal, több graft beültetése esetén jobb eredményeket kaptunk volna.

Technikai jellegű problémaként felmerülhet, hogy a kísérletünkben a standard 5 mm átmérőjű üvegbot körül kialakított graft 1-2 mm-el nagyobb átmérőjű volt, mint a befogadó artéria. Kóbori és mtsainak korábbi kísérleteiben 15-30 kg-os kutyákat használtak, ezzel szemben a mi kísérletünkben 12-15 kg-osak voltak, ami nagyobb mértékű különbséget eredményezett az átmérőkben. Az érgraftok mechanikai viselkedésének elemzéséből kiderült, hogy nagyon lényeges a befogadó és a beültetett érszakaszok méretbeli közelsége. Ellenkező esetben a véráramlásban kialakuló turbulenciák, a vég-a-véghez anasztomózisnál a két különböző anyag határán kialakuló nyíró erők az intima megvastagadásához és a graft stenosisához, végső soron elzáródásához vezethetnek (Salacinski és mtsai, 2001).

Kóbori és mtsainak eredményeitől eltérés adódhat még abból is, hogy eltérő anti-koaguláns kezelést alkalmaztunk a posztoperatív időszakban. A műtétet követően a korábbi kísérletekkel megegyezően két hétig adtunk naponta kétszer Na-heparint 200 NE/ttkg adagban, de emellett a thrombocyták aggregációját gátló alacsony dózisú acetyl-szalicilsav kezelést nem alkalmaztunk. A kezelés elmaradásának alapvetően két oka volt. Az egyik, hogy a műtét utáni időszakban a szakma szabályainak megfelelően gondoskodtunk a megfelelő fájdalomcsillapításról és a kutyák számára törzskönyvezett nem-szteroid típusú gyulladáscsökkentőt, a meloxicamot adtuk 5 napon keresztül. Az acetyl-szalicilsav alacsony dózisban nem kielégítő fájdalomcsillapító, magasabb dózisban pedig a kutyák esetében jelentkező nem-szteroidokhoz köthető mellékhatások szempontjából a meloxicamnál sokkal kedvezőtlenebb, különös tekintettel a gasztrointesztinális fekélyképződésre. Emellett az is egy általános szabály, hogy lehetőség szerint egyszerre két különböző nem-szteroidot a

fokozottabban jelentkező mellékhatások miatt nem adunk (Tranquilli és mtsai, 2007). A másik ok arra vezethető vissza, hogy a mai napig nincsen egyértelmű szakirodalmi ajánlás, bizonyítékokon alapuló eredmény a kutyák anti-thromboticus terápiájára vonatkozóan. Mind az egyes hatóanyagok hatékonyságáról, a szükséges dóziszról és a kezelés időtartamáról megoszlanak a vélemények (Lunsford és Mackin, 2007). Mindenesetre a kísérletünkben a korábbiakhoz képest rosszabb átjárhatósági eredmények háttérében az eltérő thromboprophylaxis szerepet játszhatott. Míg a vénás graftok esetében elegendő a heparinos kezelés, addig az artériás graftoknál szükség van a thrombocyta aggregáció gátlására is (Tobias 2012). A későbbiekben hasonló kísérlet esetén célszerűnek tartanánk az acetyl-szalicilsav használatát és a műtét utáni fájdalomcsillapítás céljából nem egy másik nem-szteroidot, hanem más hatásmechanizmusú fájdalomcsillapítót, pl. opiátot javasolnánk.

Az elzáródások háttérében állhat a graft lumen felőli oldalát borító érzékeny mesothel sejtek sérülése is, ugyanis ezek kulcsfontosságú szerepet játszanak a trombózis megelőzésében. In vitro kísérletek alapján tudjuk, hogy a mesothel sejtekkel borított mesterséges érpothlások alacsony thrombogenitásúak (Pronk és mtsai, 1988), mert a mesothel sejtek az endothel sejtekhez hasonlóan fibrinolyticus hatású prostacyclint termelnek (Kent és mtsai, 1988; Sharp és mtsai, 1989; Deutsch és mtsai, 1999; Maeda és mtsai, 2000). Mindezek alapján, a mesothel sejtréteg sérülése fokozza a trombózis kialakulásának veszélyét.

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 pancytocerin pozitív mesothel sejtek borítják, megegyezően az irodalmi adatokkal (Avakian és mtsai, 2008), de az érgraftokban a belső luminalis sejtréteg CLD-5 pozitívra és pancytocerin negatívra vált, megegyezően az intakt endothel sejteknél tapasztalt és korábban a szakirodalomban is leírt immunhisztokémiai jellemzőkkel (Morita és mtsai, 2003;

Jakab és mtsai, 2009a). 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. Ennek a mechanizmusa nem teljesen tisztázott. Valószínűleg az endothel sejtek az erekből migrálnak a graftba és elfoglalják a mesothel sejtek helyét (transzmigráció), de nem kizárható az sem, hogy a mesothel sejtek alakulnak át endothel sejtekké a megváltozó szöveti környezetben (transzdifferentiáció). Az előbbi magyarázatot támasztják alá azok kísérletek, amelyekben sikeresen szélesztettek endothel sejteket a mesterséges érpotló anyagok felületére (Deutsch és mtsai, 1999), és azok is, amelyekben a foltgraftként használt alkoholban fixált peritoneum luminalis felszínén a beültetést követően 14 nappal már endothel réteg volt kimutatható (Yoshioka és mtsai, 2001). A beültetést követően három hónappal elvégzett vizsgálataink erre bővebb magyarázatot nem tudnak adni, mert ekkorra már a belfelszín egyenletes endothel réteg borította, nem volt különbség a graft széli és középső része között. Korábban végzett mintavételekkel, a graftok széli és középső területeinek összehasonlításával, tovább lehetne vizsgálni ezt a kérdést.

A vizsgálataink alapján az intakt belső rectushüvely desmin pozitívást 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 (transzdifferentiáció), amelyek simaizom actint tartalmazó fibroblastok (Meng és mtsai, 2001). Ez a morfológiai változás növelheti a belső rectushüvely graft rugalmasságát, lehetővé téve a sikerebb alkalmazkodást az új, vaszkuláris környezethez.

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 grafftént való esetleges klinikai felhasználása csak szoros monitorozás és megfelelő thromboprophylaxis mellett, és szükség esetén az elzáródást megakadályozó stentek használatával javasolható. Rutinszerű alkalmazását megelőzően további nagyszámú kísérletes beültetés hosszú távú utókövetése szükséges, mert a rendelkezésre álló adatok alapján hosszútávú következtetések levonására nincsen lehetőség.

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

7.1 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 tűihez. 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 (**51. ábra**). 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 (**49., 50., 52. ábra**). A mérések során párhuzamosan rögzítettük a változásokat a graftot és kontroll éret tartalmazó kádakban (610-M Multi Myograph System, Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark). Az ér az értartókkal egy 8 ml térfogatú kádba merült, ami 37 °C-os, 95% O₂ és 5% CO₂ keverékével átbuborékolgatott standard Krebs-oldattal volt feltöltve. Ezt követően az érgyűrűket 60 percig inkubáltuk a megfelelő passzív tenzióértéken, s miközben az elhasználandó inkubáló oldatot 20 percenként cseréltük, a szervfürdőket szobahőmérsékletről 37 °C-ra melegítettük. A passzív tenzióértéket 40 mN-ra állítottuk be, mert korábbi kísérletekben az erek ezen az értéken mutatták a legerősebb összehúzódást (Halpern és mtsai, 1978). 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. Ennek kórélettani alapja, hogy a nagy extracelluláris K⁺-koncentráció depolarizálja a sejteket, amely simaizom-összehúzódást vált ki, így

érösszehúzóadás jön létre. Ezután háromszoros öblítés következett és újra Krebs-oldatba helyeztük az érszakaszokat. A vazoaktív anyagok hozzáadását 20 perc kiegyenlítési idő előzte meg azért, hogy a rendszer visszaálljon a kiindulási alapértékre. Elsőként phenylephrint (PE) adtunk az oldathoz, amely egy jól ismert érösszehúzó hatású α -1-típusú adrenerg receptor agonista. 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. Az anyagok kimosása után ismét 30 perc kiegyenlítés következett. Végül egy thromboxán A_2 analóg, az U-46619 hatását teszteltük, amely stabil, erős összehúzóhatást képes kiváltani a simaizomsejtekben, szűkítve így az eret.

Az izometriás tenzió meghatározására az MP 100-as rendszert használtuk és a mérési adatokat az AcqKnowledge 3.8.2 software (BIOPAC System Inc, Goleta, CA, USA) segítségével értékeltük ki. A kísérletben a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) által gyártott hatóanyagokat használtunk fel, amelyeket az ethanolban feloldott U-46619 kivételével desztillált vízben oldottunk fel. Az egyes vazoaktív anyagok különböző hígításait fiziológias sóoldattal korábbi miográfiás kísérletek során ismertetett hígítási soroknak megfelelően készítettük el (Chiba és mtsai, 1987; Jones és mtsai, 1990).

Kísérlet vázlata:

1. **Krebs- oldat**



optimális erőfeszítés, 37oC

2. **K⁺ Krebs-oldat** (kontrakciós válasz)



3. **Öblítés 3x**



4. **Krebs-oldat** (equilibráció)



20-30 percet követően

5. **Phenylephrin** (10^{-8} - 10^{-4} mol cc.)



6. **ACh** (10^{-9} – 10^{-5} mol cc.)



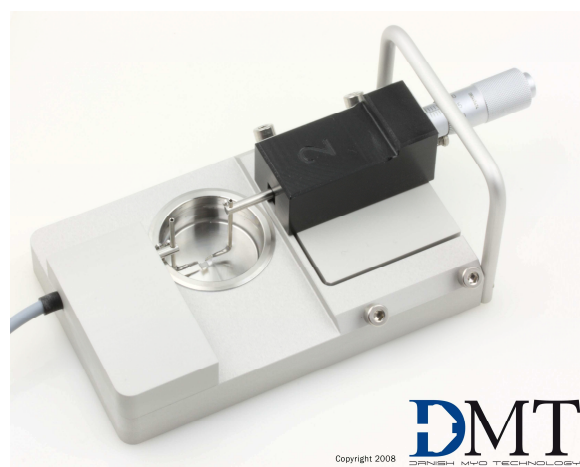
7. **Mosás 1x**



8. **U46619** (Tromboxán receptor agonista)



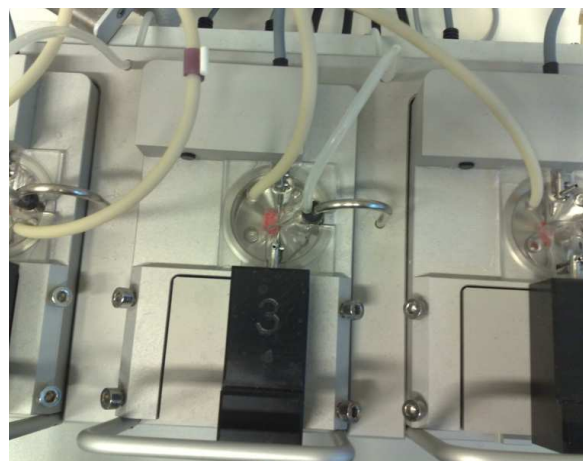
49. ábra. A miográfia során alkalmazott miográfiás kád és az érgyűrűt tartó két 200 μm átmérőjű, egymással párhuzamos rozsdamentes acél tű látható.



50. ábra. Az egyik tű egy mikromanipulátorhoz, a másik pedig egy erőmérőhöz csatlakozott, amelynek segítségével, erősítés után, az izometriás tenzióban bekövetkező változásokat regisztráltuk.



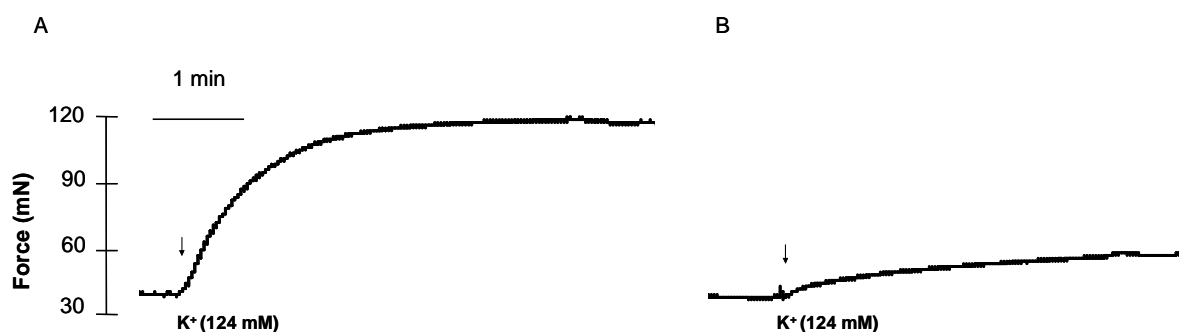
51. ábra. A Krebs-oldatba merített érgraft előkészítése sebészi mikroszkóp alatt.



52. ábra. Az érgraftból készített cilindrikus szegementum miográfiás vizsgálata.

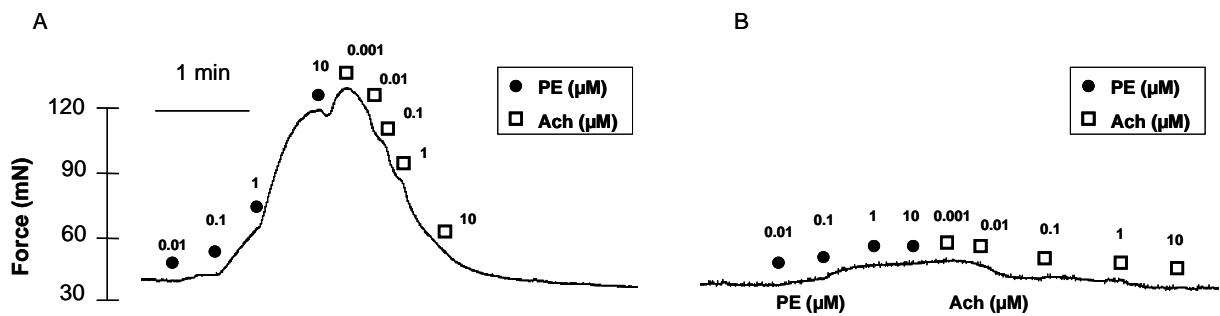
7.2 Eredmények

A kísérlet első lépéseként meghatároztuk a kontrakciós választ 124 mM K⁺-ot tartalmazó Krebs-oldat segítségével (**53. ábra**). Az artéria esetében az izometriás tenzió mértéke 80 mN-al emelkedett, míg a beültett graft esetében csak 20 mN-al.



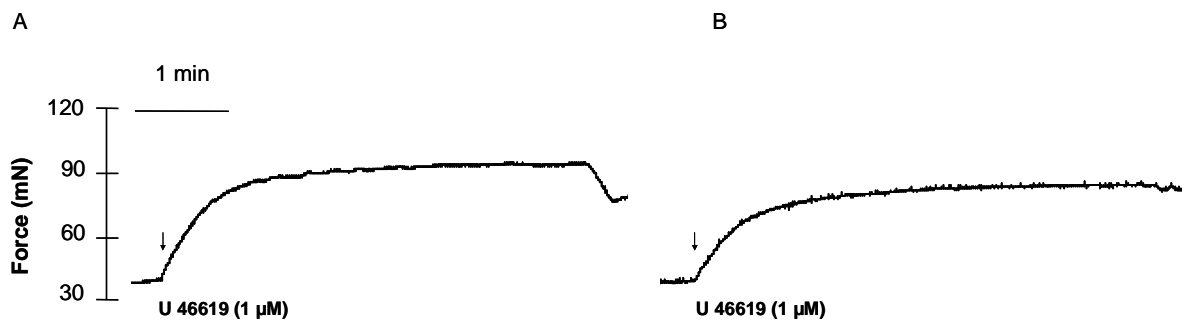
53. ábra. A 124 mM K⁺ oldat által kiváltott kontrakció mértéke látható az artérián (A) és a grafton (B). Függőleges tengelyen a tenzió mértéke (mN), vízszintes tengelyen az idő látható (min).

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 dóziszfüggő kontrakciós hatása és az Ach kumulatív relaxációs hatása a graftban kevésbé érvényesült (**54. ábra**).



54. 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 (**55. ábra**).



55. 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).

7.3 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. A PE egy α -1-adrenoceptor agonista, ami azt jelenti, hogy csak akkor vált ki reakciót, ha a simaizomsejtek felületén α -1-receptorok expresszálódnak. A kontroll artériához képest renyhe összehúzódás hátterében a már említett morfológiai eltérések mellett az α -1-receptorok megjelenésében megnyilvánuló különbség is szerepet játszhat, de ennek meghatározása további vizsgálatokat igényelne. Az érgraft reagált az ACh hatására is, amely az endothelsejtek muszkarin receptoraihoz kötődve, 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). A kísérlet alapján azt nem lehet megállapítani, hogy a kontroll erekhez hasonló előzetes összehúzódás esetén milyen hatása lett volna az ACh-nak. Az érgraft reagált a thromboxán A_2 agonista U-46619 adására is. Érdekes módon az összehúzódás mértéke hasonló volt a kontroll artériához, sőt, ha az eredményt összevetjük a K^+ okozta referencia összehúzódással is, azt látjuk, hogy míg a kontroll artériában a K^+ -hoz viszonyított kontrakció kb. 60%-os, addig az érgraftban kb. 200%-os. Az erős összehúzódásnak számos oka lehet. Elvben, kevés simaizomtól gyenge kontrakció várható, ahogyan azt a PE esetében is láttuk, de lehetséges, hogy az U-46619 esetében több a receptor, vagy a másodlagos jelátvivők szintjén erősödik fel a folyamat, és így kevesebb simaizomelem is erősebben reagál. Ezek egyikére sincs adatunk. Ismert, hogy a tromboxánreceptor-aktivációnak proliferatív hatása is van (Pakala és mtsai, 1997), és lehet, hogy a fokozott összehúzódási készség normális reakció az éppen növésben lévő simaizomsejtektől. Ismert, hogy az NO és a thromboxán receptorok között kölcsönhatás van mind receptor, mind a másodlagos hírvivő molekulák (ún. „downstream mediátor”) szintjén (Benyó és mtsai, 1998; Sawada és mtsai, 2001). Ezek alapján előfordulhat, hogy amíg a beépülő endothel nem tud elegendő NO-t felszabadítani, addig a thromboxánreceptor és a hozzá tartozó másodlagos jelátvivő folyamatok nem kerülnek gátlás alá.

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

8. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Kísérleteinkben a belső rectushüvelyből készített friss, nem tartósított, autolog vénás foltgraftok és artériás tubularis érgraftok morfológiai és funkcionális jellemzőit vizsgáltuk kutyákban.

Az első kísérletünkben négy kutyában összesen 15 vénás foltgraftot alakítottunk ki a Kóbori és mtsai által korábban már kidolgozott módszer vénás környezethez való adaptálásával (Kóbori és mtsai, 2003, 2008). A beültetéseket követően az érintett vénaszakaszok átjárhatóságát és egyéb morfológiai jellemzőit Doppler-ultrahangos módszerrel és CT-angiográfiával vizsgáltuk. A két módszerrel történt vizsgálat alátámasztotta egymás eredményeit, egyik graft esetében sem alakult ki aneurysma, stenosis, elzáródás vagy kilökődés. A v. jugularis graftokat három hónappal a beültetés után, a v. iliaca graftokat pedig 6 hónappal később távolítottuk el. A minták szövettani és immunhisztokémiai vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a belső rectushüvely beépült a véna falába és a luminalis felszínét egyrétegű endothel sejtréteg borította be. Kilökődésnek vagy gyulladásnak nem volt jele a mintákban. A vizsgálataink alapján a belső rectushüvelyből képzett foltgraft alkalmas lehet nagyvénák részleges rekonstrukciójára.

Második kísérletünkben, Kóbori és mtsainak módszerét alapul véve, 8 artériás tubularis graftot ültettünk be, abból a célból, hogy a graftok morfológiai és funkcionális jellemzőit újabb immunhisztokémiai eljárásokkal vizsgáljuk. A beültetést követő harmadik hónap végére a graftok közül 4 maradt átjárható, amely eredmény jelentősen elmaradt a Kóbori és mtsai által végzett korábbi kísérletek eredményességétől. Az elzáródások hátterében valószínűleg technikai problémák és a nem megfelelő thromboprophylaxis állt. Az átjárható graftokat eltávolítottuk és elvégeztük a szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatukat. Mindezek alapján a belső rectushüvely az artériás érszakaszba történő beültetését követően jelentősen átalakult, a graft belfelszínén a beültetést követően új endothel réteg jött létre. Az érgraft falában a nagymennyiségű collagen rost és elasztikus rost mellett látható orsó-alakú sejtek, az erek simaizom sejtjeihez hasonlóan, immunhisztokémiaailag α -SMA pozitívak voltak. Az immunreakcióban bekövetkező változás arra utal, hogy belső rectushüvelyben lévő fibroblast sejtek myofibroblast sejtekké alakultak át. Mindezek 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, de a fala a befogadó artériánál vastagabb és rugalmatlanabb. Vizsgálataink alapján nagy százalékban stenosisra és elzáródásra hajlamos. Tubularis artériás graftként való esetleges klinikai felhasználása csak szoros monitorozás és megfelelő thromboprophylaxis mellett, és szükség esetén az elzáródást megakadályozó stentek használatával javasolható. Rutinszerű alkalmazását megelőzően további nagyszámú kísérletes beültetés hosszú távú utókövetése szükséges.

Harmadik kísérletünkben egy belső rectushüvelyből képzett artériás tubularis érgraft miográfiás vizsgálatát végeztük el. Az elvégzett vizsgálatok alapján a miográfiás módszer alkalmas volt az izometriás tenzió mérésére kutya artérián és az érgraftokon is. Megállapítható volt, hogy a vazoaktív anyagok hatására az érgraft esetében is a kontroll artériához hasonló irányú változás jött létre, de a thromboxán A₂ agonista U-46619 kivételével ez a reakció jelentősen gyengébb volt. Az elvégzett vizsgálat rámutat arra, hogy az érgraft, a belső felszínét borító endothelrejt-réteg és a falában megtalálható myofibroblastok miatt nem csak morfológiailag, hanem a vazoaktív anyagok hatására változó izometriás tenziója alapján élettanilag is hasonlóságot mutat a kontroll artériával.

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 miográfiás vizsgálat során egyértelműen tudtuk igazolni, hogy a módszer alkalmas a belső rectushüvely érgraft funkcionális vizsgálatára, és a vazoaktív 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.

9. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- 1) Igazoltuk, hogy a belső rectushüvelyből képzett autolog foltgraft gyulladássos 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 pancycoceratin 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.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Acsády, Gy., Nemes, A. (2001): Az érsebészet tankönyve. Medicina Kiadó Könyvkiadó Rt. Budapest.
2. Akimaru, K., Onda, M., Tjiri, T., Yoshida, H., Mamada, Y., Taniai, N., Yoshioka, M., Mineta, S. (2000): Reconstruction of the Vena Cava with the Peritoneum. *The American Journal of Surgery*. 179, 289-293.
3. Alavaikko, A. (1988): Spiral autogenous venous graft in the replacement of large vessels. An experimental study with special reference to replacement of the inferior vena cava. *Acta Chir. Scand. Suppl.* 542, 1–5.
4. Anagnostopoulos, C. E., Connery, C. P. et al.(1995): Initial clinical experience with rectus sheath grafts in congenital heart effects. *J. Cardiovasc. Surg.* 36, 429-432.
5. Avakian, A., Alroy, J., Rozanski, E., Keating, J., Rosenberg, A. (2008): Lipid-rich pleural mesothelioma in a dog. *J Vet Diagn Invest.* 20, 665–667.
6. Bearn, P. E.; Parry, D. T.; Galvin, D., Seddon, A. N., McCollum, C. N., Marston, A. (1990): Platelet deposition on mesothelial-seeded Dacron as femoral artery grafts. *Br. J. Surg.*; 77: 701 (abstract)
7. Bilfinger, T. V., Beere, P. E., Sanderson, C., Glagov, S. and Anagnostopoulos, C. E. (1983): Parallel growth of rectus sheath grafts and recipient aorta. Critical role of graft tissue preservation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 86, 294–299.
8. Biró, G., Szabó, A., Szeberin, Z. and Nemes, A. (2001): Arterial reconstructions performed by homograft implantation [in Hungarian]. *Magy. Seb.* 54, 63–67.
9. Buell, J.F., Funaki, B., Cronin, D.C., Yoshida, A., Perlman, M.K., Lorenz, J., Kelly, S., Brady, L., Leef, J.A. and Millis, J.M. (2002): Long term venous complications after full size and segmental pediatric liver transplantation. *Ann. Surg.* 236, 658-666.
10. Benyó, Z., Görlach, C. and Wahl, M. (1998): Involvement of thromboxane A2 in the mediation of the contractile effect induced by inhibition of nitric oxide synthesis in isolated rat middle cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab.* 18(6), 616–618.
11. Bodie, B., Novick, A. C., Pontes, J. E., et al. (1989): The Cleveland clinic experience with adrenal cortical carcinoma. *J Urol.* 141, 257–260.
12. Chiba, S., Kawai, K. (1987): Responses of isolated canine and simian femoral arteries and veins to phenylephrine, xylazine and KCl after removal of endothelium. *J. Auton. Pharmacol.*, 7, 3-10.

13. Clarke, J. M. F., Pittilo, R. M., Nicholson, L. J., Woolf, N. and Marston, A. (1984a): Seeding Dacron arterial prosthesis with peritoneal mesothelial cells: a preliminary morphological study. *Br. J. Surg.* 71, 492–494.
14. Clarke, J. M. F., Pittilo, R. M., Machin, S. J., Woolf, J. N. (1984b): A study of the possible role of mesothelium as a surface for flowing blood. *Trombos. Haemostas.* 51, 57-60.
15. Coene, M. C., Solheid, C., Claes, M. and Herman, A. G. (1981): Prostaglandin production by cultured mesothelial cells. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 249, 316–318.
16. Coltharp, W. H. (1989): Experimental aortic replacement with a vascularised tissue graft. *Arch. Surg.* 124, 1331–1334.
17. Conner, J. R., Cibas, E. S., Hornick, J. L., Qian, X. (2014): Wilms tumor 1/cytokeratin dual-color immunostaining reveals distinctive staining patterns in metastatic carcinoma, and mesothelial cells in pleural fluids: an effective first-line test for the workup of malignant effusions. *Cancer Cytopathol.* 122, 586-95.
18. Cousar, J. E. and Lam, C. R. (1952): Rectus sheath grafts in vascular repair. *Arch. Surg.* 65, 471–476.
19. Decker, R. A., Kuhner, M. E. (1991): Adrenocortical carcinoma. *Am Surg.* 57. 502–513.
20. Dubost, C., Allary, M., Oeconomous, N. (1952): Resection of an aneurysm of the abdominal aorta. *Arch Surg.* 64, 405-408.
21. DeBakey, M. E., Creech, O. and Cooley, D. A. (1954): Occlusive disease of the aorta and its treatment by resection and homograft replacement. *Ann Surg.* 140, 290-310.
22. de Brot, S., Hilbe, M. (2013): Pulmonary alveolar microlithiasis with concurrent pleural mesothelioma in a dog. *J Vet Diagn Invest.* 25, 798-802.
23. Demirer S., Gecim, I. E., Aydinuraz, K., Ataoglu, H., Yerdel, M. A., Kuterdem, E. (2001): Affinity of *Staphylococcus epidermidis* to various prosthetic graft materials. *J Surg Res.* 99, 70-74.
24. Deutsch, M., Meinhart, J., Fischlein, T., Presii, P. and Zilla, P. (1999): Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. *Surgery.* 126, 847-885.
25. Fasol, R. D., Zilla, P. P., Deutsch, M., Grimm, M., Fischlein, T. and Laufer, G. (1989): Human endothelial cell seeding: Evaluation of its effectiveness by platelet parameters after one year. *J. Vasc. Surg.* 9, 432–436.
26. Fehér, Gy. (2004): A háziállatok funkcionális anatómiája 1. A has izmai. 210-214. Budapest, Mezőgazda Kiadó.

27. Ganjei-Azar, P. (2007): Color Atlas of Immunocytochemistry in Diagnostic Cytology. 47. New York, Springer Science+Business Media.
28. Gellasch, K. L., Patricelli, A. J., Sicard, G. K. and McAnulty, J. E. (2003): Use of portocaval venografts with ameroid ring constrictor placement and hepatic lobectomy for treatment of intralobular intrahepatic portocaval shunts in four dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222, 455–460.
29. Geninet, C., Bernex, F., Rakotovao, F., Crespeau, F. L., Parodi, A. L., Fontaine, J. J. (2003): Sclerosing peritoneal mesothelioma in a dog – a case report. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 50, 402-5.
30. Goyannes, D. J. (1906): Plastic substitution of arteries and veins, application of venous arterioplasty, the new method in the treatment of aneurysms. *j. El. Siglo Medico.* 53, 546-561.
31. Guesdon, J. L., Ternynck, T., Avrameas, S. (1979): The use of avidin-boitin interaction in immunoenzymatic techniques unlabeled anti. *J. Histochem. Ctochem.* 27, 1131-1139.
32. Guzsál, E. (1981): *Háziállatok szövettana.* Budapest, Mezőgazda Kiadó. 26-32, 74.
33. Hanack, U., Ringe, B. and Lot, T. (1997): Portal vein replacement by hepatic vein transposition. *Am. J. Surg.* 174, 353–354.
34. Halpern, W., Mulvany, M. J. et al. (1978): Mechanical properties of smooth muscle cells in the walls of arterial resistance vessels. *J. Physiol.,* 275, 85-101.
35. 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.
36. Hau, S. M., Raine, L., Fanger, H. (1981): Use of avidine-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Ctochem.* 29, 577-580.
37. Herring, M. B., Compton, R. S., Gardner, A. L. and LeGrand, D. R. (1987): Clinical experiences with endothelial seeding in Indianapolis. In: Zilla-P. P., Fasol-R. D. and Deutsch-M. (eds) *Endothelialization of Vascular Grafts.* Karger, Basel. 218–224.
38. 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.
39. 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.

40. Huguet, C., Ferri, M., Gravelli, A. (1995): Resection of the suprarenal inferior vena cava. The role of prosthetic replacement. *Arch Surg.* 130, 793-797.
41. Iwatsuki, S., Todo, S., Starzl, T. E. (1988): Right trisegmentectomy with a synthetic vena cava graft. *Arch Surg.* 123, 1021-1022.
42. Jakab, Cs., Halász, J., Szász, A. M., Batmunkh, E., Kiss, A., Schaff, Zs., Rusvai, M., Gálfi, P. and Kulka, J. (2008a): Expression and localisation of claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 and -10 proteins in the normal canine mammary gland. *Acta Vet. Hung.* 56, 341–352.
43. 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.
44. 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.
45. Jakab, Cs., Balka, Gy., Rusvai, M., Gálfi, P., Stark, R. and Kulka, J. (2009b): Diagnosis of spindle cell hemangioma in a dog by the use of claudin-5 [in Hungarian, with English abstract and figures]. *Magyar Állatorvosok Lapja* 131, 402–407.
46. Jones, L. F., Tackett, R. L. (1990): Chronic cocaine treatment enhances the responsiveness of the left anterior descending coronary artery and femoral artery to vasoactive substances. *J. Pharamcol. Exp. Ther.*, 255, 1366-70.
47. Kang, B. C., Lee, Y. S., Lee, S. K. (2004): Malignant pleural mesothelioma in a woodchuck (*Marmota monax*). *J Vet Med Sci.* 66, 1617-9.
48. Kehne, H., Sensenig, D. M. (1956): Arterial replacement with rectus fascia. *Arch. Surg.* 72, 516-519.
49. Kent, K. C., Oshima, A., Ikemoto, T. and Whittemore, A. D. (1988): An in vitro model for human endothelial cell seeding of a small diameter vascular graft. *ASAIO-Trans.* 34, 578-580.
50. Kim, J. H., Chi, Y. K., Yoon, H. Y., Kweon, O. K., Kim, D. Y. (2002): Juvenile malignant mesothelioma in a dog. *J Vet Med Sci.* 64, 269-71.
51. Ko, H. M., Kamil, Z. S., Geddie, W. R. (2014): Microcystic variant malignant mesothelioma presenting as a localised paraspinal mass. *Cytojournal.* 11, 16 (abstract).
52. 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.

53. Kóbori, L., Németh, T., Nemes, B., Dallos, G., Sótonyi Jr. P., Fehérvári, I., Patonai, A., Sloff, M. J. H., Járay, J., de Jong, K. P. (2003): Experimental Vascular Graft for Liver Transplantation. *Acta Vet. Hung.* 51, 529–537.
54. Kóbori, L., Doros, A., Németh, T., Fazakas, J., Nemes, B., Slooff, M. J., Járay, 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.
55. Kóbori, L., Németh, T., Nagy, P., Dallos, G., Sótonyi, P. Jr., Fehérvári, I., Nemes, B., Görög, D., Patonai, A., Monostory, K., Doros, A., Sárváry, E., Fazekas, J., Gerlei, Zs., Benkő, T., Piros, L., Járay, 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.
56. 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.
57. Krutsay, M. (1999): *Patológiai technika. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 279-286.*
58. Kyles, A. F., Gregory, C. R., Jackson, J., Ilkiw, J. E., Pascoe, P. J., Adin, C. A. and Samii, V. F. (2001): Evaluation of a portocaval venograft and ameroid ring for the occlusion of intrahepatic portocaval shunts in dogs. *Vet. Surg.* 30, 161–169.
59. Kyles, A. F., Gregory, C. R. and Adin, C. A. (2004): Re-evaluation of a portocaval venograft without an ameroid constrictor as a method for controlling portal hypertension after occlusion of intrahepatic portocaval shunts in dogs. *Vet. Surg.* 33, 691–698.
60. Lam, T., M. and Wu, C. J. (2012): Biomaterial applications in cardiovascular tissue repair and regeneration. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 10(8), 1039-1049.
61. Land, W. (1994): The potential impact of the reperfusion injury on acute and chronic rejection events following organ transplantation. *Transplant. Proc.* 26, 3169-3171.
62. Li, Z., Mericskay, M., Agbulut, O., Butler-Browne, G., Carlsson, L., Thornell, L., E., Babinet, C., Paulin, D. (1997). Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 139, 129–44.
63. Lunsford, K. V., Mackin, A. J. (2007): Thromboembolic therapies in dogs and cats: an evidence based approach. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 37(3), 579-609.

64. Maeda, M., Fukui, A., Nakamura, T., Inada, Y., Tamai, S., Tatsumi-Nagano, K., Yamamoto, H., Ogata, S., Iwata, H. and Ikada, Y. (2000): Progenitor endothelial cells on vascular grafts: an ultrastructural study. *J. Biomed. Mater. Res.* 51, 55-60.
65. Marshall, F. F., Reitz, B. A. (1985): Supradiaphragmatic renal cell carcinoma tumor thrombus: indication for vena caval reconstruction with pericardium. *J Urol.* 133- 266.
66. Mason, D.Y., Gatter, K.C. (1987): The role of immunocytochemistry in diagnostic pathology. *J. Clin. Pathol.* 40. 1042-1054.
67. McKinnon, W. M., Smith, R. B., Davis, S. C. et al. (1981): Ruptured hepatic artery aneurysm with hepatic artery-to-portal vein fistula: preservation of portal flow by autologous vein reconstruction. *Surgery.* 89, 626-630.
68. 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.
69. Merz, H., Rickers, O., Schrimel, S., et al. (1993): Constant detection of surface and cytoplasmic immunoglobulin heavy and light chain expression in formalin-fixed and paraffinembedded material. *J. Pathol.* 170, 257-264.
70. Miller, C. M., Schwartz, M.E., Nishizaki, T. (1991): Combined hepatic and vena caval resection with autogenous caval graft replacement. *Arch Surg.* 126. 106-108.
71. Miller, T., R. (2003): Immunohistochemistry in the evaluation of atypical epithelial cells in effusions.
72. Miyazaki, M., Itoh, H., Kaiho, T., Ambiru, S., Togawa, A. and Sasada, K. (1995): Portal vein reconstruction at the hepatic hilus using a left renal vein graft. *J. Am. Coll. Surg.* 180, 497–498.
73. Morini, M., Bettini, G., Morandi, F., Burdisso, R., Marcato, P. S. (2006): Deciduoid peritoneal mesothelioma in a dog. *Vet Pathol.* 43, 198-201.
74. Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M., Tsukita, S., Miyachi, Y. (2003): Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. *Experim Derm.* 12, 289–295.
75. Mulvany, M. J., Halpern, W., (1976): Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature.* 15. 260. (5552), 617-619.
76. 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.
77. Nagy, G., Szekeres, G., Kvell, K., et al. (2002): Development and characterisation of a monoclonal antibody family against aquaporin 1 (AQP1) and aquaporin 4 (AQP4). *Pathol. Oncol. Res.* 8, 115-124.

78. Németh, T., Kóbori, L., Dallos, G., Nemes, B., Manczur, F., Hetyei, Cs., Sloof, M. J. H., de Jong, K. P. (2005): Belső rectushüvelyből készett autograft érprotézis kísérletes vizsgálata kutyákban. *Magyar Állatorvosok Lapja* 127, 99-105.
79. Norton, L., Eiseman, B. (1975): Replacement of portal vein during pancreatectomy for carcinoma. *Surgery* 77, 280-284.
80. Okada, Y., Kumada, T., Habuchi, T. et al. (1989): Total replacement of the suprarenal inferior vena cava with a polytetrafluoroethylene tube graft in 2 patients with tumor thrombi from carcinoma. *J Urol.* 141, 111-114.
81. 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.
82. Plate, G., Einarsson, E., Eklof, B., et al. (1985): Iliac vein obstruction associated with acute iliofemoral venous trombózis. *Acta Chir Scand.* 151, 607–611.
83. Przewdziecki, R., Sapierynski, R. (2014): Using of immunocytochemistry in differential diagnosis of neoplasms of serosal cavities in dogs. *Pol J Vet Sci.* 17, 149-59.
84. Ravi, S., Qu, Z. and Chaikof, E. L. (2009): Polymeric materials for tissue engineering of arterial substitutes. *Vascular* 17, 45–54.
85. Roll, S., Müller-Nordhorn, J., Keil, T., Scholz, H., Eidt, D., Greiner, W. and Willich, S. N. (2008): Dacron[®] vs. PTFE as bypass materials in peripheral vascular surgery – systematic review and meta-analysis. *BMC Surgery* 8, 1–8.
86. Pakala, R., Willerson, J. T., Benedict, C. R. (1997): Effect of serotonin, thromboxane A₂, and specific receptor antagonists on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 96, 2280-6.
87. Pelosi, A., Eyster, G. E., Dejardin, L. M. et al (2006): Use of a jugular vein graft in a modified Blalock-Taussig procedure in dogs. *Am J Vet Res* 67, 174.
88. Pronk, A., Bouter, P. K., Hoyneck van Papendrecht, A. A. G. M., Hezius, H. C., Verkooyen, R. P., Verbrugh, H. A. Leguit, P. (1988): Seeding vascular prostheses with mesothelial cells: an alternative to endothelial cell seeding. *Eur. Surg. Res.* 20, 3 (abstract).
89. Pronk, A., de Groot, P. G., van Papendrecht, H., Verbrugh, H. A., Leguit, P., van Vroonhoven, T. J. M. V., Sixma, J. J. (1992): Thrombogenicity and procoagulant activity of human mesothelial cells. *Arterioscler Thromb.* 12, 1428-1436.
90. Rangdaeng, S., Truong, L. D. (1991): Comparative immunohistochemical staining for desmin and muscle-specific actin. A study of 576 cases. *Am J Clin Pathol.* 96, 32-45.

91. Reggeti, F., Brisson, B., Ruotsalo, K., Southorn, E., Bienzle, D. (2005): Invasive epithelial mesothelioma in a dog. *Vet Pathol.* 42, 77-81.
92. Sakaguchi, S. Nakamura, S. (1993): Venous surgery in resection for abdominal malignancy. *Cardiovasc Surg.* 1, 122–127.
93. Salacinski, H. J., Goldner, S., GNEdiceandrea, A., Hamilton, G., Seifalian, A. M., Edwards, A., Carson, R. J. (2001): The mechanical behavior of vascular grafts: a review. *J Biomater Appl.* 15(3), 241-78.
94. Sato, T., Miyoshi, T., Shibuya, H., Fujikura, J., Koie, H., Miyazaki, Y. (2005): Peritoneal biphasic mesothelioma in a dog. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 52, 22-5.
95. Sawada, N., Itoh, H., Yamashita, J., Doi, K., Inoue, M. (2001): The alpha, but not the beta, isoform of the human thromboxane A2 receptor is a target for nitric oxide-mediated desensitization. Independent modulation of Tp alpha signaling by nitric oxide and prostacyclin. *J Biol Chem.* 278, 51190–51202.
96. Seo, K. W., Choi, U. S., Hong, S. J., Byeun, Y. E., Kang, M. S., Pachrin, B., Kim, W. H., Hwang, C. Y., Kim, D. Y., Youn, H. Y., Lee, C. W. (2007): Palliative intravenous cisplatin treatment for concurrent peritoneal and pleural mesothelioma in a dog. *J Vet Med Sci.* 69, 201-4.
97. Sharp, W. V., Schmidt, S. P., Meerbaum, S. O. and Pippert, T. R. (1989): Derivation of human microvascular endothelial cells for prosthetic vascular graft seeding. *Ann. Vasc. Surg.* 3, 104-107.
98. Smith, B. M., Mulherin, J. L., Sawyers, J. L. et al. (1984): Suprarenal vena cava occlusion. Principle of operative management. *Ann Surg.* 199, 656-668.
99. Stanley, J. C., Burkel, W. E., Ford, J. W., Vinter, D. W., Kahn, R. H., Whitehouse, W. M. and Graham, L. (1982): Enhanced patency of small-diameter externally supported Dacron ilio- femoral grafts seeded with endothelial cells. *Surgery* 92, 994–1005.
100. Stoica, G., Tasca, S. I., Kim, H. T. (2001): Point Mutation of neu Oncogene in Animal Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Vet. Pathol.* 38, 679–688.
101. Strandness, D. E., Eidt, J., F. Jr. (2000): Peripheral vascular disease. *Circulation.* 102, IV. 46-51.
102. Sun, Z. H. (2006): 3D multislice CT angiography in post-aortic stent grafting: a pictorial essay. *Korean J. Radiol.* 7, 205–211.
103. Szilagyi, D. E., McDonald, D. A., Smith, R.F. (1957): Biologic fate of human atrial homografts. *Arch Surg.* 75, 506-529.
104. Takayama, Y., Kanamaru, H., Yokoyama, H., Hashimoto, H., Yoshino, G., Toyoda, H., Osawa, Y., Ito, M., Uenoyama, S. and Koda, Y. (1995): Portal vein

- reconstruction using an internal jugular vein graft: report of a case. *Surg. Today* 25, 378–380.
105. Teebken, O. E., Haverich, A. (2002): Tissue engineering of small diameter vascular grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 23 (6), 475-85.
 106. Terada, T. (2011): Immunohistochemical profile of normal mesothelium and histiocytic/mesothelial hyperplasia: a case report. *Int J Clin Exp Pathol.* 4, 631-636.
 107. Thomas, J. H., Pirce, G. E., Iliopoulos, J., et al. (1988): Vascular graft selection. *S Clin North Am.* 68, 865-874.
 108. Tobias, K. M., Johnston, S. A. (2012): *Veterinary Surgery Small Animal. Vascular surgery.* Elsevier Saunders. St. Louis. 1854-1869.
 109. Tranquilli, W. J., Thurmon, J.C., Grimm, K. A. (2007): *Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia. Opioids, Nonsteroidal Anti-inflammatories, and Analgesic Adjuvants.* Fourth Edition. Blackwell Publishing. 241-271.
 110. Tsukita, S., Furuse, M. and Itoh, M. (2001): Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 285–293.
 111. Urayama, H., Katada, S., Matsumoto, I. et al. (1993): Reconstruction of the jugular and portal blood flows using remodelled great saphenous vein grafts. *Surg Today* 23, 936–938.
 112. Vascellari, M., Carminato, A., Camali, G., Melchioti, E., Mutinelli, F.(2011): Malignant mesothelioma of the tunica vaginalis testis in a dog.: histological and immunohistochemical characterization. *J Vet Diagn Invest.* 23, 135-9.
 113. Vogt, P. R., Brunner-LaRocca, H. P., Lachat, M., Ruef, C. and Turina, M. I. (2002): Technical details with the use of cryopreserved arterial allografts for aortic infección: influence on early and midterm mortality. *J. Vasc. Surg.* 35, 80–86.
 114. Voorhees, A. B., Jaretzki, A. and Blakemore, A.H. (1952): The use of tubes constructed from Vinyon 'N' cloth in bridging arterial defects. *Ann. Surg.* 135, 332-336.
 115. Vural, S. A., Ozyldiz, Z., Ozsoy, S. Y. (2007): Pleural mesothelioma in a nine-month-old dog. *60*, 30-3.
 116. Wakabayashi, H., Maeba, T., Okano, K. et al (1998): Treatment of recurrent hepatocellular carcinoma by hepatectomy with right and middle hepatic vein reconstruction using total vascular exclusion with extracorporeal bypass and hypothermic hepatic perfusion: report of a case. *Surg. Today* 28, 547–550.
 117. White, R. N., Trower, N. D., McEvoy, F. J., Garden, O. A. and Boswood, A. (1996): A method for controlling portal pressure after attenuation of intrahepatic portocaval shunts. *Vet. Surg.* 25, 407–413.

118. Yoshioka, M., Onda, M., Tajiri, T., Akimaru, K., Mineta, S., Hirakata, A. and Takubo, K. (2001): Reconstruction of the portal vein using a peritoneal patch-graft. *Am. J. Surg.* 181, 247–250.

11. A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI

A doktori kutatás témájához kapcsolódó, lektorált, impakt faktoral bíró tudományos

folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk:

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., 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.

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.

A doktori kutatás témájához kapcsolódó konferencia prezentációk, szakfolyóiratokban megjelent konferencia összefoglalók:

Csébi, P., Jakab, Cs., Németh, T. (2014): Morphological evaluation of experimental autologous rectus fascia sheath grafts used for arterial replacement in a dog model. Poster. 23rd ECVS (European College of Veterinary Surgeons) Annual Scientific meeting.

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., Németh, T. (2015): Hogyan reagál az autolog rectus hüvelyből képzett érgraft vasoaktív anyagok hatására? Kísérletes miográfós vizsgálat kutya modellben. Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, Klinikumok és gyógyszerteran.

Csébi P., Jakab Cs., Németh T. (2014): Az autolog belső rectushüvelyből képzett érgraft morfológiai vizsgálata. Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, Klinikumok és gyógyszerteran.

Csébi P. (2009): A belső rectus hüvelyből képzett vénás autograftok kísérletes vizsgálata kutyában. Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Bizottsága, Akadémiai beszámoló, Klinikumok és gyógyszerteran.

A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó, lektorált, impakt faktorral bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk:

Arany-Tóth, A., **Csébi, P.**, Reiczigel, J., Sére, V., Németh, T. (2013): Subarachnoid pressures and cardiorespiratory parameters during cisternal myelography in isoflurane anesthetized dogs. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 40, 390-398. IF: 1.776.

Matskási, I., Ipolyi, T., Jakab, Cs., Simon, Cs., Ijjas, L., **Csébi, P.** (2013): Epiphysealis dysplasia (ED) kezdődő diabetes mellitus és patellaficam együttes előfordulása egy brit rövid szőrű macskában. *Magyar Állatorvosok Lapja* 135, 685-691. IF: 0.185.

Arany-Tóth, A., **Csébi, P.**, Reiczigel, J., Németh, T. (2012): Pressure-volume Index-based Volume Calculation of Contrast Medium for Atlanto-occipital Myelography in Dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 53, 430-436. IF: 1.414.

Csébi, P., Balogh, L., Jakab, Cs., Ipolyi, T., Molnár, P., Arany-Tóth, A. (2011): Intracranialis meningeoma macskában — Klinikopatológiai eset feldolgozása. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 12, 727-734. IF: 0.201.

Csébi, P., Jakab, Cs, Jánosi, K., Sellyei, B., Ipolyi, T., Szabó, Z., Arany-Tóth, A., Németh, T. (2010): Vertebral osteomyelitis and meningomyelitis caused by *Pasteurella canis* in a dog — Clinicopathological case report. *Acta Vet Hung* 58, 413-421. IF: 1.264.

Csébi, P., Jakab, Cs. Ipolyi, T. Arany Tóth, A. Sére, V. (2010): Kutya Cryptococcus neoformans okozta meningitise: Klinikopatológiai eset feldolgozása. Magyar Állatorvosok Lapja 132, 341-348. IF: 0.300.

Arany-Tóth, A., **Csébi, P.**, Psáder, R. (2010): Harapott nyaki sérülés orosz agáron. Magyar Állatorvosok Lapja 132, 718-721. IF: 0.300.

Jakab, Cs., **Csébi, P.**, Szász, A. M., Szabó, Z., Patonai, A. (2009): Kutya krónikus óriásredős gyomorgyulladás. Magyar Állatorvosok Lapja 131, 601-609. IF: 0.200.

Jakab, Cs., Rusvai, M., Gálfi, P., Szabó, Z., **Csébi, P.**, Szabára, Á., és Kulka, J. (2009): Kutya lipidizált emlőrák nyirokérinváziójának vizsgálata claudin-5 és CD31 markerekkel. Magyar Állatorvosok Lapja 131, 610-619. IF: 0.200.

Jakab, Cs., Rusvai, M., Szabó, Z., **Csébi, P.**, Kulka, J., és Tátrai, P. (2009): Kutya Claudin-5 expressziós vizsgálatok kutyák haemangiosarcomájában konfokális mikroszkóppal. Magyar Állatorvosok Lapja 131, 659-668. IF: 0.200.

Arany-Tóth, A., **Csébi, P.**, Jensen, H.S., Németh, T. (2008): A liquornyomás mérése mielográfia alatt kutyában. Klinikai előtanulmány. Magyar Állatorvosok Lapja 130, 698-703. IF: 0,088.

Jakab, Cs., Arany-Tóth, A., **Csébi, P.**, Szász, M. A., Rusvai, M., Gálfi, P., Kulka, J. (2008): Kutya nervus hypoglossusból kiinduló, rosszindulatú perifériás ideghüvely daganata (MPNST): Esetismertetés. Magyar Állatorvosok Lapja, 671-679. IF: 0.088.

Arany-Tóth A., **Csébi P.**, Németh T. (2006): Kutyák gyomormotilitása – rendellenességek és vizsgálati lehetőségek. Magyar Állatorvosok Lapja 128, 387-394. IF: 0.155.

Csébi, P., Arany-Tóth, A., Sére, V., Jakab, Cs. (2006): Kaukázusi juhászkutya agyvelőben áttétet képző orrüregi adenocarcinómája. Esetismertetés és irodalmi áttekintés. Magyar Állatorvosok Lapja, 358-362 IF: 0.155.

Csébi, P., Arany-Tóth, A. (2006): Kisállatok orrüregének és melléköbleinek röntgen- és CT-vizsgálata. Magyar Állatorvosok Lapja, 95-99. IF: 0.155.

Bilgili, H., Diószegi, Z., **Csébi, P.** (2006): Detailed preoperative planning for fracture treatment with Ilizarov method in three dogs. Vet Comp Orthop Traumatol. 19, 162-171. IF: 0.446.

Jakab, Cs., Kovács, R., B. Szabó, Gy., Pápa, K., Balka, Gy., **Csébi, P.** (2004): Negyedik agykamrai plexus chorioideus papilloma nyolcéves tibeti masztiiffban. Klinikopatológiai esetismertetés. Magyar Állatorvosok Lapja 126, 743-749. IF: 0.158.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet:

- Dr. Németh Tibornak, témavezetőmnek támogatásáért, tanácsaiért, 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 fotók elkészítéséért,
- Pop Renátának a szövettani metszetek elkészítéséért
- Dr. Arany Tóth Attila kollégámnak a munkám során nyújtott tanácsaiért,
- a Sebészeti Tanszék dolgozóinak a vizsgálatok során nyújtott segítségükért,
- 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.