

## I. A kutatás elméleti háttere és célja

A különböző szerveken végzett sebészi beavatkozások (pl. daganat sebészeti beavatkozások, transplantatio, plasztikai sebészeti beavatkozások, súlyos végtagsérülések, műtéti keringési shuntok) során az ellátó erek szükséges időleges leszorítása kapcsán az egyes szervek vérellátása hosszabb-rövidebb ideig károsodhat. A műtétek során a szervekben, szövetekben komplex anyagcsere- és morfológiai változások, ischaemia-reperfusio (I/R) okozta károsodások jöhetnek létre. Az I/R során keletkezett károsító ágensek gátolják a szervek, szövetek további sorsát, életképességét, regenerációját nagymértékben befolyásolják. Az oxidatív stressz kapcsán a különböző szervekben kialakuló egyes folyamatok tisztázása volt a célunk, segíteni a kialakulható súlyos szövődmények megértését a klinikai gyakorlat számára, elősegítve ezzel megelőzésüket is.

## II. Kutatási modellek

### 1. Máj modell

A szervkímélő májdaganat sebészet egyik legfontosabb célja a vérvesztés minimalizálása, a transfúziós igény csökkentése, funkcionálisan elegendő májparenchyma megtartása. A műtétek során fellépő ischaemia-reperfusió károsodások nagymértékben befolyásolják a műtétek eredményességét. A lig. hepatoduodenale leszorításával járó Báron/Pringle manőver alkalmazása -a májkeringés időleges kirekesztése révén- biztonságosabbá teheti a májsebészeti beavatkozásokat.

Az általunk kidolgozott új állatkísérletes modellben vizsgáltuk a Báron/Pringle manőver alkalmazásával járó lokális és szisztémás haematológiai-, haemorheológiai-, haemostaseológiai hatásait, a májenzim szintek eltéréseit és a májszövetben létrejövő szövettani elváltozások milyenségét.

A kísérletek során beagle kutyákon 3 egymást követő alkalommal Pringle/Báron műfogást alkalmazunk atraumás érleszorítóval úgy, hogy minden leszorítás 15-15 percig tartott, közte 5-5 perces reperfusió időszakokkal, majd 30 perc reperfusiót követően az állatok exterminalásra kerülnek. A kanülált ereken (v. portae, v. hepatica, v. jugularis ext., a. femoralis) keresztül meghatározott időközökben vérvételre került sor mind a perifériás, mind a szisztémás keringésből a fentebb jelzett laboratóriumi vizsgálatokra, illetve a májjállományból -minden leszorítás kapcsán- biopsziát vettünk szövettani történések követésére. A Báron/Pringle manőver alkalmazásával járó, lokális és szisztémás változások vizsgálatát célzó kísérletek 2008-ban befejezésre kerültek.

A *lokális* változások közt a fehérvérsejt szám, a haematocrit különböző mértékű és a vörösvérsejt aggregációs-index szignifikáns fokozódása említendő a manőverek számától függően, legfőképp a vena portae rendszerében. A *szisztémás* hatások a vér viszkozitásának relatív növekedésében, a vörösvérsejt deformabilitás romlásában, valamint a prothrombin idő és az aktivált partialis thromboplastin idő megnyúlásában nyilvánultak meg.

A szisztémás keringésben a májfunkciós paraméterek vizsgálatánál elsőként mutattunk rá arra a tényre, hogy a harmadik Báron/Pringle manővert követően tendenciózus jellegű volt a GPT enzimaktivitás emelkedés, míg 30 perces reperfusio végén a GOT és LDH enzimaktivitás értékek is tendenciózusan emelkedtek a GPT mellett a kiindulási alapértékeikhez viszonyítva.

A máj morfológiai vizsgálatai is májkárosodást igazoltak, ugyanis a harmadik Báron/Pringle manőver után több necroticus sejt, apoptoticus sejt, lymphocytás beszűrődés, pangás, valamint vacuolizált májsejt volt található, mint az első két manővert követően. A 30 perces reperfusio után kifejezett necrosist, intenzívebb gyulladást, nagyfokú pangást és vacuolisatiót, valamint centrilobularisan a májsejtgerendák rendezetlenségét, néhol felbomlását láthattuk. (Ezen két utóbbi kutatási adatok közlése még folyamatban van).

Állatkísérletes modellen hosszúnak bizonyult a háromszori leszorítási periódus. Az egyszeri vagy kétszeri alkalmazásnál a preventív hatás érvényesült, míg a lig. hepadoadanale kettőnél több leszorítása a rheológiai-, haemostaseológiai változások, a májfunkciós és a morfológiai eltérések révén a korai postoperatív kockázatot növelhetik, mely egyben a kutatások *klinikai jelentőségét* is alátámasztja. Ugy gondoljuk, hogy ezen eredmények alapján meghatározhatóvá válhat egyes a májsebészeti beavatkozások során a máj időleges vértelenítésére szolgáló Báron manőver optimális és biztonságos alkalmazásának feltétele. (A párhuzamosan végzett klinikai anyag feldolgozása során is megállapítható volt az, hogy a Báron/Pringle manővernek a modern sebészeti technikák mellett is van létjogosultsága kiterjesztett májresectióknál).

*A kutatási adatok feldolgozásából egy, a kísérletek haemorheologiai, haematologiai eredményeit bemutató saját közlemény, valamint 3 haemorheologiai mérés technikai standardizációhoz, e kutatási adatokra is részben támaszkodó közlemény jelent meg, illetve 2 előadás hangzott el a 10th International Congress of the Romanian Association of Plastic Surgeons 2008. évi kongresszusán Bukarestben és a 15th Conference of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation (ESCHM) 2009. évi Kongresszuson, Svájcban*

*Az OTKA kutatás egyik résztvevője, Dr. Furka Andrea levelező Ph.D. hallgató 2011. május 20-án sikeresen megvédte „A ligamentum hepatoduodenale leszorításának hatásai a májműtétek eredményeire kísérletes és klinikai adatok alapján” című Ph.D. disszertációját, melyben a kutatási adatok értekezésének kísérletes részeként szerepeltek egy ötéves klinikai májsebészeti adatfeldolgozás mellett.*

## **2. Vékonybél modell**

A mesenterialis ischaemia-reperfusio (I/R) napjainkban is komoly klinikai probléma, amely a bélrendszeren végzett műtétek, különböző mesenterialis kórállapotok, valamint vékonybél transzplantatio során a túlélés meghatározó tényezője lehet. A mesenterialis I/R pathomechanizmusának további megértése és a kísérletes transzplantációs modellek technikai problémáinak javítása érdekében a korábban kutyákon végzett kísérletsorozat folytatásaként patkányokon végeztük kísérleteinket lokális és szisztémás haematologiai-, haemorheologiai-, haemostaseologiai mérésekkel, valamint szövettani vizsgálatokkal is kiegészítve azokat.

Korábbi kutatásunk eredményeinek összegzése kapcsán kutyákban egy kettős, izolált jejunum segment kialakítása kapcsán megállapítottuk, hogy a 30 perces ischaemiát követően a reperfusio 4-6. órájában a legnagyobb a vékonybél nyálkahártyában az apoptotikus aktivitása, továbbá a 3x3 perces és 3x5 ischaemiás preconditionálás, az E-vitamin, az Allopurinol alkalmazása -feltételezésünkkel ellentétesen- az I/R okozta apoptosis emelkedését eredményezi a bélnyálkahártyában. Ugyancsak kutyákban az a. mesenterica superior 30 perces leszorítását követő reperfusio során filtrometriás mérésekkel igazoltuk a vörösvérsejtek deformálhatóságának romlását, mely a posztoperatív 3. napon mutatkozott. (Ezen eredményeket is az OTKA periódus idején közöltük).

2008-ban az outbred patkányokon kialakított modellben 30 perces arteria mesenterica superior leszorítás és az azt követő 60 perces reperfusio kapcsán ektacytometriás mérésekkel kimutattuk a vörösvérsejtek deformabilitásának szignifikáns romlását, a vörösvérsejt aggregatio, a haematocrit, az átlagos vörösvérsejt térfogat és a fehérvérsejtszám szignifikánsan emelkedését a *lokális* (vena portae) vérmintákban a *szisztémás* (vena cava caudalis) keringésből nyert mintákhoz képest.

A munka 2009-ben kiegészült az ischaemiás postconditionálás (IPC) feltételezett kedvező hatásának vizsgálatával, melynek során az IPC csoport állataiban az ischaemia végén 6-szor 10 másodperces leszorítással az I/R által kiváltott lokális microrheologiai elváltozásokat enyhíteni, mérsékelni tudtuk.

A kutatások *klinikai jelentőségét* az adja, hogy több kísérletes modell kapcsán elsőként hívtuk fel a figyelmet arra, hogy a 3. posztoperatív napon -az esetleges szövődmény lehetőségek kapcsán- kiemelkedően fontos lehet a vörösvérsejtek deformabilitásának vizsgálata, ami jelző értékű adatokat szolgáltat a vékonybél műtétet követő állapotáról, a műtéti beavatkozással együtt járó I/R károsodások mértékéről, korán jelezve a vékonybél érintettségét, valamint a mikrokeringés esetleges károsodását.

*Az eredményekről beszámoltunk a 2008. évi International Society for Experimental Microsurgery (ISEM) Kongresszuson, Shanghai-ban, 2009-ben a 1st Central and Eastern European Laboratory Animal (CEELA) Conference rendezvényén Budapesten és az MST XXII. Kísérletes Sebész Kongresszusán Szegeden, továbbá a European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation (ESCHM) Kongresszusán Svájcban, 2010-ben a Debreceni Akadémiai Bizottság (DAB) Tudományos Ülésén.*

*A kutatás eredményeiből 2 angol nyelvű közlemény jelent meg a Microsurgery és a Cirurgica Brasileira folyóiratokban, 4 kongresszusi absztrakt a fentebb jelzett kongresszusok kapcsán. A kutatás eredményei az OTKA kutatásban résztvevő munkatársunk, Dr. Bráth Endre 2011. március 9-én megvédett „Ischaemia-reperfusiók változások vizsgálata vékonybél segmenten és vékonybél transzplantációs állatkísérletes modelleken sebészeti- és mikrosebészeti technikák alkalmazásával” című Ph.D. értekezésének alapjául szolgáltak.*

## **3. Szabadlebens modell**

A plasztikai és rekonstrukciós sebészetben a szövetek pótlására alkalmazott szabadlebenyek túlélését és új környezetükben funkciójukba való beilleszkedését számos tényező befolyásolja. Az I/R hatására létrejött változások pontos pathomechanizmusának tisztázása jelentősen növelhetné a szabadlebeny átültetés biztonságát a *klinikai gyakorlatban* is.

2007-ben a musculus latissimus dorsi lebeny I/R-s kísérletei beagle kutyákon történt előkísérlettel kezdődtek meg, melynek során az izom kétoldali kireparálása történt érnnyéllel, majd a bal oldalon 1 órás atraumatikus leszorítás történt, melyet 60 perces reperfusio követett. A jobb oldali lebeny kontrollként szolgált. A reperfusio során adott időközönként az érnnyél vénájából vérvétel történt

haematologiai és haemorheologiai vizsgálatok céljából, továbbá mintavétel is történt az izomszövetből morfológiai vizsgálatok céljából illetve az oxidatív stressz kimutatására.

A fehérvérsejt szám az I/R oldalon a haematocrit szinttel együtt folyamatosan emelkedett a reperfüziós periódus során, ugyanakkor a vörösvérsejt aggregatio szignifikáns mértékű fokozódását találtuk a reperfüzio első 5 percében.

Morfológiai vizsgálatok kimutatták az I/R izomszövetre káros hatását, valamint az izombiopsziákból nyert homogenizátumban a GSH-peroxidáz aktivitás, GSH-, TBARS-, és carbonyl tartalom egyértelműen mutatták az oxidatív stressz jelenlétét.

*Az adatok feldolgozásából közlemény jelent meg a Microsurgery folyóiratban. A Magyar Sebészet folyóiratban megjelent közlemény már egy újabb klinikai alkalmazási lehetőséget is jelez e témakörhöz kapcsolódóan. Az eredményekről beszámoltunk a 2008. évi International Society for Experimental Microsurgery (ISEM) Kongresszuson, a 10th International Congress of the Romanian Association of Plastic Surgeons 2008. évi kongresszusán Bukarestben illetve az eredmények összefoglalása elhangzott a DAB Tudományos Ülésén 2010-ben. A haemorheologiai mérés technikai standardizációhoz e kutatás adatait is részben magába foglaló közlemény jelent meg, illetve előadás hangzott el a 15th Conference of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation (ESCHM) 2009. évi svájci kongresszusán.*

#### **4. Amputatum modell**

Napjainkban a mikrosebészeti technika lehetőséget nyújt a végtagok replantációjára, revaszkularizációjára. Az I/R károsodások azonban döntően befolyásolhatják a késői eredményeket, a végtag életképességét, funkcióját, a sérült végtag rehabilitációját.

*Az amputatum modellel kapcsolatos kutatómunkánk folytatásaként, az eddig nem publikált adatok feldolgozása révén a 2008. évi International Society for Experimental Microsurgery (ISEM) Kongresszuson és a 10th International Congress of the Romanian Association of Plastic Surgeons 2008. évi kongresszusán Bukarestben előadás hangzott el, 2009-ben közlemény jelent meg az Acta Cirurgica Brasileira folyóiratban. A haemorheologiai mérés technikai standardizációhoz e kutatás adataira is részben épülő közlemény jelent meg, illetve előadás hangzott el a 15th Conference of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation (ESCHM) 2009. évi konferenciáján, Svájcban.*

#### **5. Arterio-venosus (A-V) shunt modell**

##### **5.1. Sapheno-saphenosus modell**

Kapcsolódóan az érleszorítással és felengedéssel járó folyamatok vizsgálatához, a pályázat kutatási programjának bővítéseként ezen OTKA kutatás keretében end-to-side arterio-venosus shunt-ök kialakítása történt nappali Ph.D. hallgatónk munkájaként, aki az OTKA kutatáshoz hivatalos résztvevőként 2008. augusztus 1-től kapott csatlakozási lehetőséget. Ezen az állatkísérletes modellen adatokat kívántunk szolgáltatni a haemodialysisre kerülő betegeknek kialakított arterio-venosus shunt funkcionális és morfológiai változásainak követéséhez, a shunt-ök érseinek tanulmányozásához.

A kísérletek patkányokon történtek mikrosebészeti technikával, az e célból kidolgozott end-to-side shunt kialakításával a bal arteria saphena és vena saphena medialis között. Haematologiai, haemorheologiai vizsgálatok, mikrocirkulációs haemodynamikai és szöveti áramlás mérések, a shunt-ök szövettani feldolgozása történt.

Az arterio-venosus haemorheologiai alapkülönbségeket vizsgálva azt találtuk, hogy az aorta abdominalisból vett vérmintákban a vörösvérsejt deformabilitást leíró elongációs index kismértékben alacsonyabb. Az aggregációs index érték magasabb a vena cava caudalis-ból származó mintákhoz képest.

Az A-V shunt területéről vett arteriális és vénás vérminták vörösvérsejt deformabilitását leíró elongációs index paraméterei alacsonyabbak voltak a nem-operált oldali és az ép kontroll értékekhez képest, csökkenő arterio-venosus különbséget mutatva. A vörösvérsejt aggregációs index értékek a shunt oldalán mind az a. saphena-ban, mind a v. saphena medialis-ban magasabbak voltak.

A párhuzamosan elvégzett vérgáz analízis során a pCO<sub>2</sub> értékek és a vér pH értékek az élettani viszonyoknak megfelelőek voltak, eltérést nem tapasztaltunk.

Az A-V shunt kismértékű változást okozott a shunt oldali comb és talp bőrének szöveti mikrocirkulációs értékeiben. A haemodynamikai paraméterekben csak lokális különbségek mutatkoztak.

A morfológiai és szövettani vizsgálatokkal kimutatható volt, hogy az A-V anastomosis mindkét szára dilatálódott a shunt érése során, amely a 8. postoperatív hétre megfigyelhető volt. Szövettanilag a shunt arteriális és vénás szarán egyaránt az érfal intima és media rétegeinek megvastagodása volt megfigyelhető.

A kialakított end-to-side művi sapheno-saphenosus A-V shunt mikrosebészeti módszerekkel biztonságosan elkészíthető, anatómiai lokalizációját tekintve könnyű hozzáférhetőséget biztosít, a szisztémás keringést nem terheli meg jelentősen.

A kísérletek további kutatások alapját adhatják a haemodialysishez használt shunt-ök érését befolyásoló tényezők és a szövődmény lehetőségek elkerülésének vizsgálatára, amelyek a *klinikai gyakorlat számára* fontos információt adhatnak.

*Az adatok feldolgozásából 2 közlemény jelent meg a Microsurgery és a Korea Australia Rheology Journal folyóiratokban, 6 előadás hangzott el: 2008-ban az International Society for Experimental Microsurgery (ISEM), 2009-ben az MST XXII. Kísérletes Sebészeti Szekció, az European Society for Surgical Research (ESSR), a CEELA Kongresszusain valamint a 6. Magyar Mikrokeringés Kongresszuson és 2010-ben a Magyar Haemorheologiai Társaság XVII. Kongresszusán.*

*Valamennyi kutatási adat az OTKA kutatásban résztvevő nappali Ph.D. hallgatónk, Dr. Hevér Tímea „Kísérletes művi arterio-venosus shunt-ök morfológiai és véráramlástanai vizsgálatai” című 2011. március 31-én megvédett Ph.D. értekezésének részeként szerepelt.*

## **5.2. Aorto-porto-cavalis modell**

A kutatás kiterjesztéseként 2011 tavaszától új kísérlet sorozatban, újabb, érzékenyebb mérőmódszerekkel (LoRRca MaxSis Osmoscan ektacytometer), az eddigiéknél pontosabb rheológiai változások meghatározására alkalmas paraméterekkel (osmoscan funkció) vizsgáltuk patkány modellben az aorto-porto-cavalis micro-rheológiai különbségeket, amelyek a különböző mikrosebészeti modellekben kialakított éranastomosisok és shunt-ök véráramlástanai hatásaihoz nyújthatnak további alapszolgáltatásokat. A vizsgálatokat Dr. Klárik Zoltán levelező Ph.D. hallgató közreműködésével végeztük.

*A kutatás eredményeiből 1 közlemény a Clinical Hemorheology & Microcirculation folyóiratban 2012. január 31-ével elfogadásra került.*

## **6. Testicularis I/R modell**

A here ductus deferens torsio vagy trauma következtében kialakuló ischaemiája és az azt követő reperfusio microcirculációs és micro-rheológiai paraméterekre -vörösvérsejt deformabilitás és vörösvérsejt aggregatio- kifejtett hatásai kevésbé ismertek.

2010. közepén kezdődtek az ide vonatkozó kísérletek 6-8 hónapos Sprague-Dawley hím patkányokon a kérdések tisztázására, csatlakozva a tanszék haemorheológiai munkacsoportjának kutatásaihoz.

*Az előkísérleti adatokból két folyóirati absztrakt jelent meg, valamint előadások hangzottak el 2011-ben a 7. Magyar Mikrokeringés Kongresszuson, Dobogókőn valamint az MST XXIII. Kísérletes Sebészeti Kongresszusán, Budapesten.*

## **7. Egyéb érmodellek**

### **7.1. In vitro érmodell**

Kutatási témához kapcsolódóan Langendorff szerinti patkányszív modellen kezdődtek a vizsgálatok az I/R károsodások követésére. Kimutattuk a szabadgyökök okozta károsodások jelenlétét a balkamrai szívmintákban 15 perces ischaemiát követően, amely kapcsán a centrophoxine védőhatását találtuk, biztató előzetes eredményekkel.

A centrophoxine előkezelést patkány aorta hipoxia/reoxigenizációs folyamataira in vitro körülmények között is vizsgáltuk, szintén jelentős védőhatást tapasztaltunk. A centrophoxine erőteljesen javította a vascularis endothel integritását, fokozta a relaxáló faktorok felszabadulását. Az előkezelés nem befolyásolta a hypoxia által kiváltott relaxáció erősségét, de jelentősen csökkentette a reoxigenizációs viszonyok között észlelhető -minden valószínűség szerint a szabadgyök felszabadulásán alapuló- fokozott kontraktúrát.

*Eredményeinkről 2009-ben Szegeden a Magyar Szabadgyök-kutató Társaság V. Kongresszusán, az MST XXII. Kísérletes Sebészeti Kongresszusán és Budapesten a Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXXIII. Vándorgyűlésén számoltunk be.*

### **7.2. Aorta abdominalis modell**

2008-tól kezdődött az aorta abdominalis infrarenalis szakaszának leztorításával előidézett I/R károsodások szervekre gyakorolt, valamint szisztémás hatásának vizsgálatára szolgáló modell kialakítása patkányokon, mely a rákövetkező évben az állatszámok emelésével folytatódott.

A kutatási eredményekből főként a haemorheológiai paraméterek (vörösvérsejt aggregatio, vörösvérsejt deformabilitás) vérgáz, és vér pH átfogó elemzéséből, valamint a máj funkcionális értékek változásairól hangzottak el előadások. Az eddigi eredmények azt mutatták, hogy a vér pH, a pCO<sub>2</sub> és a pO<sub>2</sub> értékek kismértékben változtak. Az I/R-t követően a fehérvérsejt szám megduplázódott, a májenzimek közül a GOT több, mint 60%-kal emelkedett, a GOT/GPT arány mérsékelten növekedett

a reperfúziós periódus végére. Az aggregációs index értékek emelkedését tapasztaltuk a reperfúzió során, a vörösvérsejt deformabilitást leíró elongációs index értékek kismértékű csökkenést mutattak.

Az előzetes vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy az I/R-t követően a szisztémás gyulladás következtében a leszorítás helyétől távolabbi szervek mikrocirkulációs zavara is létrejöhet. A sokszervi érintettség további tisztázására és a szervkárosodás mértékének reverzibilitásának megállapítására a kísérletek folytatására lenne szükség.

*A kutatás eredményeiből előadások hangzottak el 2009-ben a Magyar Szabadgyök-kutató Társaság V. Kongresszusán, az MST XXII. Kísérletes Sebész Kongresszusán, Szegeden, a Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXXIII. Vándorgyűlésén Budapesten és 2010-ben a Magyar Haemorheológiai Társaság XVII. Kongresszusán Pécsen.*

Megjegyzés: A kutatómunka 2011 márciusától -Dr. Mátyás Lili levelező Ph.D. hallgató külföldre való távozása miatt- szünetel, bár a kutatási adatokból egy közlés előkészítése folyamatban van.

### **7.3. Arteria renalis modell**

Erre a kutatási periódusra esett egy korábbi OTKA támogatással végzett ischaemia-reperfúziós kutatómunkánk további eredményeinek feldolgozása, közlésre való elkészítése, melyből egy közlemény jelent meg a *Clinical Hemorheology & Microcirculation* folyóiratban.

## **8. Haemorheológiai mérési methodikák standardizációja, vérgáz, vér pH, laktát eredmények átfogó elemzése a különböző ischaemia-reperfúziós modellek kapcsán**

A különböző sebészeti és mikrosebészeti módszerrel létrehozott modelleken történt haemorheológiai mérőmódszerek alkalmazása során számos mintavételezéssel, tárolással, mérőmódszer standardizációval kapcsolatos megállapítás kidolgozása történt, összevetve a kísérleteknél használt különböző állatfajok különbözőségeit is. A Tanszékünk haemorheológiai munkacsoportja által végzett standardizációs vizsgálatok ebben az OTKA pályázatban is hasznosítva lettek a mintaelőkészítés, mintakezelés vonatkozásában a pályázat előrehaladásával párhuzamosan.

Az ischaemia-reperfúziós történések ilyen irányú vizsgálatához még ezen túlmenően betervezett mérési sorozatok is csatlakoztak a nemi differenciák szerepének tisztázása céljából.

A vékonybél, a máj I/R változásai, valamint az A-V shunt és az infrarenalis aorta leszorítás eredményeinek következtetései alapján egy átfogó elemzés készült a haemorheológiai vizsgálatok, valamint a vérgáz analízisek eredményeiről.

*E témakörből 3 közlemény jelent meg: a Korea-Australia Rheology Journal, a Clinical Hemorheology & Microcirculation és a Biorheology folyóiratokban, valamint 1 közlemény megjelenés alatt van a Clinical Hemorheology & Microcirculation folyóiratban. Különböző kongresszusokon 6 előadás hangzott el: 2008-ban a 13th International Congress of Biorheology and 6th International Conference of Clinical Hemorheology, az ISEM Kongresszuson, a 10th International Congress of the Romanian Association of Plastic Surgeons 2008. évi kongresszusán Bukarestben, a 15th Conference of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation (ESCHM) 2009. évi kongresszusán Svájcban, 2010-ben a Magyar Haemorheológiai Társaság XVII. Kongresszusán Pécsen, a 3rd Eurosummer School on Biorheology and Symposium on Micro and Nanomechanics and Mechanobiology of Cells, Tissues and Systems Nemzetközi Kongresszusán Szófiában és 2011-ben az MST XXIII. Kísérletes Sebész Kongresszusán Budapesten.*

## **III. Kísérleti állatok, kutatási engedélyek**

A kísérletekhez szükséges engedélyek rendelkezésre álltak: DE MÁB 12/2003. és a 6/2006.

Az állatokat a pre- és posztoperatív szakban az intézet állatházában (KAT-VIII/1999.) tartottuk az előírásoknak megfelelően.

Az alábbi kísérleti állatokat használtuk a kutató munkához: keverék kutyák, beagle kutyák, inbred patkányok, outbred patkányok.

## **IV. A kutatás során alkalmazott vizsgáló módszerek**

### **1. Haematológiai vizsgálatok**

A vörösvérsejt, fehérvérsejt és thrombocytá szám, haemoglobin és haematocrit értékek, MCV, MCH, MCHC, MPV, továbbá a monocyták, granulocyták, valamint a lymphocyták százalékos arányának meghatározása történt Sysmex F-800 haematológiai automata (TOA Medical Electronics Co., Ltd., Japán) segítségével vérmintákból.

A készülék apertura-impedancia elven határozza meg a vörösvérsejt, fehérvérsejt és thrombocytá számokat, illetve a vörösvérsejt átlagos térfogat értékét. A haemoglobin koncentráció mérése fotometriás elven történik. A többi paraméter kalkulációját a fenti mért adatokból végzi a készülék. A vizsgálathoz 70 µl, K<sub>3</sub>-EDTA-val (1,5 mg/ml) anticoagulált vérminta szükséges.

## **2. Haemorheologiai vizsgálatok**

**2.1. Vörösvérsejtek deformabilitásának vizsgálata:** A képződött szabadgyökök károsítják a vörösvérsejtek membránját is. Az ezzel kapcsolatos változások eredményeként a vörösvérsejtek alakváltozási képessége csökken, rigiditásuk nő, melynek következtében a vörösvérsejtek kapillárisokon történő áthaladása zavart szenvedhet. A vizsgálatok kezdetben csak Carat FT-1 típusú filtrométerrel (Carat Kft., Magyarország), majd a későbbiekben Rheoscan-D200 slit-flow ektacytometerrel (Sewon Meditech Inc., Dél-Korea) és LoRRca MaxSis Omoscan ektacytometerrel (RR Mechatronics BV, Hollandia) történtek.

A filtrométer a vörösvérsejt szuszpenzió adott porúsátmérőjű filteren történő átáramlása során a szuszpenzió helyzet-idő adataiból meghatározza a kezdeti relatív filtrációs rátát, és abból származtatja a relatív sejt tranzit idő értékét. A vizsgálathoz kb. 2,5 ml, Na-heparinnal (10-15 U/ml) anticoagulált vérminta szükséges.

Az ektacytometer a nyírófeszültség hatására bekövetkező vörösvérsejt elnyúlás mértékét méri a laser-diffractogram elemzésével. Az elongációs index - nyírófeszültség görbék összehasonlítását a Lineweaver-Burk analízis révén parametrizálással lehet elvégezni, a kalkulált maximális elongációs index, illetve az annak feléhez tartozó nyírófeszültség értékek révén. A vizsgálathoz 6  $\mu$ l,  $K_3$ -EDTA-val (1,5 mg/ml) anticoagulált vérminta szükséges.

**2.2. A teljes vér és plasma viszkozitás meghatározása:** A teljes vér viszkozitását több tényező együttesen befolyásolja (haematocrit, fibrinogén és globulinok koncentrációja, vörösvérsejtek aggregációs készsége, vörösvérsejtek deformabilitása). A plasma viszkozításban a fibrinogén játsza a döntő szerepet. Pathológiás állapotokban (pl. ischaemia-reperfusio) mindkettő változása várható volt. A vizsgálatok Hevimet-40 kapilláris viszkoziméterrel (Hemorex Kft., Budapest) történtek.

A készülék a teljes vér és plazma viszkozitás értékét a hidrosztatikai nyomás révén áramló folyadék helyzet-idő adataiból felvett folyási görbéből határozza meg. A vizsgálathoz 1 ml Na-heparinnal (10-15 U/ml) anticoagulált vérminta és 1 ml plazma szükséges.

**2.3. Vörösvérsejt-aggregatio mérése:** Ischaemia-reperfusio során a vér áramlási paraméterei megváltoznak, egyéb haemorheologiai paraméterek változása mellett az oxidatív stressz hatására a vörösvérsejtek aggregációja is fokozódik. A mérések Myrenne-1 aggregométerrel (Myrenne GmbH, Németország) történtek.

A készülék fénytranszmissziós elven méri a vörösvérsejt aggregatio mértékét az aggregációs folyamat 5., illetve 10. másodpercében stasis, illetve  $3\text{ s}^{-1}$  sebesség-gradiens mellett. A vizsgálathoz 20  $\mu$ l  $K_3$ -EDTA-val (1,5 mg/ml) anticoagulált vérminta szükséges.

## **3. Haemostaseologiai vizsgálatok**

A haemostaseologiai paraméterek közül a prothrombin időt (PT), az aktivált parciális thromboplastin időt (APTT), a thrombin időt (TT) és a fibrinogén koncentrációt mértük. A mérések Sysmex CA-500 automata koagulométerrel (TOA Medical Electronics Co., Ltd., Japán) történtek.

A vizsgálathoz kb. 0,3 ml Na-citráttal (0,129 M) anticoagulált plazma szükséges.

## **4. Vérgáz analízis**

Az ABL555 Radiometer Copenhagen (WIP Kft., Budapest) készülék által meghatározott paraméterek az alábbiak voltak: vér pH,  $pCO_2$ ,  $pO_2$ , laktát koncentráció.

A mérőmódszert az A-V shunt, az aorta abdominalis és a vékonybél I/R modell egyes kísérleteinél használtuk.

## **5. Rutin kémiai vizsgálatok**

A májsebészeti modellben GOT -LDH, -AST, -ALT enzimaktivitás meghatározások történtek.

Az aorta abdominalis modellben GOT, GPT enzimaktivitás és GOT/GPT arány meghatározások történtek.

## **6. Mikrocirkulációs vizsgálatok**

### **6.1. Laser Doppler szöveti áramlásmérés**

Korábbi munkánk során kidolgoztunk egy ún. „occlusió”-tesztet, mely jól tükrözi a különböző szövetek mikrocirkulációjában az ischaemia-reperfusio hatására bekövetkező akut változásokat.

Az LD-01 Laser Doppler szöveti áramlásmérőt (Experimetria Kft., Magyarország) használtuk, amely Doppler elven méri a szöveti microcirculatio mértékét. A szöveti áramlásmérőt a here I/R modellben alkalmaztuk.

### **6.2. Laser Doppler scanner áramlásmérés**

Az A-V shunt modellnél a vizsgálatok a Laser Doppler Scanner használatával (Perimed Periscan PIM II Laser Doppler Perfusion Imager, Perimed AB, Svédország) történtek.

A berendezés működési elve a kibocsátott Laser-nyalábok mozgó vörösvérsejtekből való visszaverődésük révén bekövetkező hullámhossz-változás vizsgálatán alapul, és információt nyújt a vizsgált terület mikroeringési állapotáról, a capillarisok, arteriolák, venulák és shunt erek perfusiójáról, a dimenzió nélküli blood perfusion unit (BPU) paramétert megadva.

### **6.3. Haemodinamikai vizsgálatok**

Az A-V shunt modellnél a shunt arteriális és vénás szárán az arteria és vena saphena véráramlását (ml/min) mértük direkt módszerrel a Transonic T206R műszer használatával (Transonic Systems INC., USA, áramlásmérő IRB2759).

### **7. Morphologiai vizsgálatok**

Fénymikroszkópos vizsgálatok (Haematoxylin-eosin, Van Gieson festéssel) a máj-, a vékonybél-, a musculocutan szabadlebens és az A-V shunt modellekben.

Immunohistochemiai reakciók az apoptózis kimutatására (Apoptag Kit, Oncor Biomarker Ltd.) a máj- és a vékonybél modellekben.

Morphometriai elemzés az intima-media vastagság meghatározására az A-V shunt modellben.

## **V. Személyi háttér**

2008. augusztus 1-től az OTKA Iroda engedélye alapján a korábbi résztvevők mellé Dr. Hevér Tímea és Dr. Kiss Ferenc nappali Ph.D. hallgatók csatlakoztak a programhoz (EIK-790/1/2008.). Dr. Hevér Tímea részben új kutatási modell révén, az arterio-venosus shunt (A-V) modell kapcsán. Dr. Kiss Ferenc a sebészeti és mikrosebészeti kutatások modelleinek mikroeringési változásait igen korán jelző haemorheologiai mérési módszerek standardizációja céljából.

2010. júliusától Dr. Tóth László egyetemi adjunktus patológus csatlakozott az OTKA projecthez (EIK-42251/1/2010), akinek kiemelkedő szerepe volt a májmodell, a vékonybél modell és az A-V shunt modell szövettani feldolgozásai során.

A Tanszéken a beszámolási periódusban 1 egyéni felkészülő hallgató Dr. Bráth Endre, 1 levelező Ph.D. hallgató Dr. Furka Andrea és 2 nappali Ph.D. hallgató Dr. Hevér Tímea és Dr. Kiss Ferenc szerezte meg Ph.D. minősítését ezen pályázat kutatási eredményei alapján.

Az OTKA pályázatban korábbi végtag I/R, illetve amputatum modell kutatásait Dr. Szokoly Miklós főorvos (Budapest) folytatta. A musculocutan szabadlebens kutatásokban Dr. Tamás Róbert főorvos (Budapest) végezte egyéni felkészülésként kutatómunkáját.

Dr. Németh Norbert, a haemorheologiai munkacsoport vezetője a különböző sebészi modelleken történt haemorheologiai mérőmódszerek alkalmazása során számos mintakezeléssel, mérőmódszer standardizációval kapcsolatos megállapítás kidolgozásában vett részt.

## **VI. Kutatást befolyásoló tényezők**

1. Jelen beszámolási periódus alatt a Tanszékünk „A” épületének rekonstrukciója miatt gyakorlatilag csak a szükséges minimum feltételeket tudtuk biztosítani 2010. május-december periódusban -a régi épület részlegünk teljes „becsomagolása”, majd elhagyása miatt- az új épületrészlegünk átadásáig, majd a teljes átköltözésig és a munkakörülmények újbóli megteremtéséig.

2. A pótlólag beállított „Egyéb érmodellek” in-vitro érmodell kutatások vonatkozásában senior résztvevőnk Takács Ildikó időközben nyugdíjba vonult, így témáiból csak előadások hangzottak el és csak feltételezhető, hogy ezen eredmények közleményben való megvalósulása be fog következni az elkövetkezendő évben.

3. Az aorta abdominalis modell kutatásait a Takács tanárnő irányításával végző Mátyás Lili levelező Ph.D. hallgató 2010. március 15-től történő Tanszéki távozása miatt csak a jelzett előadások hangzottak el. Feltételezhető, hogy közlés lesz ebből a kutatásból is az elkövetkező évben. Megjegyzendő: az egyéb szervmodellek műtéteiben és laborméréseiben Mátyás doktornő aktívan részt vett, így több helyen társszerzőként szerepel 2008-ban történt kutatói csatlakozása óta.

## **VII. Megjegyzés a közleményjegyzékhez**

A lektorált absztrakt formájú publikációinknál beküldéskor feltüntettük az OTKA támogatás/ok számát, de néhány esetben a szerkesztők önkényesen azokat törölték a megjelenítés során.