

Nyelőcsőpótlás extraintestinalis anyagok felhasználásával

Doktori (PhD) értekezés

Dr Juhász Árpád

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Sebészeti Oktató és Kutatóintézet

Pécs

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Komoly Sámuel

Programvezető: Prof. Dr. Róth Erzsébet egyetemi tanár

Témavezető: Prof. Dr. Róth Erzsébet egyetemi tanár

2010.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
1.1 A nyelőcsőpótlást igénylő betegségek etiológiája	5
1.1.1 Fejlődési rendellenességek	5
1.1.2 A nyelőcső sérülései	8
1.1.3 Benignus elváltozások	10
1.1.4 Malignus elváltozások	10
1.2 A nyelőcsőpótlás „hagyományos” módjai	12
1.2.1 Pótlás gyomorral	12
1.2.2 Pótlás vékonybéllel	14
1.2.3 Pótlás vastagbéllel	16
1.3 Nyelőcsőpótló módszerek extraintestinalis anyagok felhasználásával	17
1.3.1 Pótlás műanyaggal	17
1.3.2 Pótlás composit grafftal, biopolimerekkel	18
1.3.2.1 Composit graftok	18
1.3.2.2 Biopolimerek	19
1.3.3 Pótlás tracheával	22
1.3.3.1 A trachea anatómiája és vérellátása	22
1.4 A cryopreservatio	25
1.4.1 Bevezetés	25
1.4.2 A cryopreservatio elmélete	26
1.5 Vizsgálataink célkitűzései	29

2. Kísérleteink első sorozata: állatkísérletes modellben a cryopreservált trachea alkalmazásának vizsgálata	30
2.1 Bevezetés	30
2.2 Anyag és módszer	30
2.3 Eredmények	35
2.4 Konklúzió	40
3. Kísérleteink második sorozata: az emberi trachea cryopreservatiojának vizsgálata	41
3.1 Bevezetés	41
3.2 Anyag és módszer	41
3.3 Eredmények	44
3.4 Konklúzió	46
4. Megbeszélés	48
5. Az új eredmények összefoglalása	53
6. Publikációk, előadások	54
6.1 Témában megjelent publikációk	54
6.2 Témához nem kapcsolódó publikációk	55
6.3 Témában tartott előadások	56
6.4 Témához nem kapcsolódó előadások	56
7. Köszönetnyilvánítás	58
8. Irodalomjegyzék	59

Bevezetés

Az igény a nyelőcső biztonságos pótlására egyidejű a nyelőcsősebészettel. A primer rekonstrukció, mely során a végeket egyesítjük, már pár centiméteres hiatus esetén sem oldható meg könnyen, a szövet a tengelyirányú húzással szemben rugalmatlan, a varratvonal feszülés alá kerül. A nyelőcső első, sikeres antethoracalis, gyomorcsővel történő megkerülése (Jianu 1903.) után számos sebész próbálkozott eleinte az oesophagus kóros részének megkerülésével – antethoracalis, később intrathoracalis úton -, majd a pathológiás szakasz eltávolítása után a szerv pótlásával. Az elmúlt több mint 100 évben a nyelőcső helyettesítésére számtalan alkalmazható, szakmailag helytálló módszert dolgoztak ki. Ez a tény önmagában jelzi, hogy egyik alternatíva sem tökéletes elsősorban a késői funkcionális eredmények tekintetében. A mindennapos sebészi rutin a gyomorból, jejunumból, vagy colonból képzett neo-oesophagust használja pótlásra.

Szerencsére ritkán, de előfordul, hogy ezek egyike sem alkalmas illetve nem elég hosszú az áthidalásra. Az utóbbi 50 évben számos kutatás irányult a nyelőcső extraintestinalis anyaggal történő pótlására, de human relevanciával bíró sikeres, általánosan alkalmazható módszert ezidáig nem sikerült kidolgozni.

Vajon nincs is ilyen anyag?

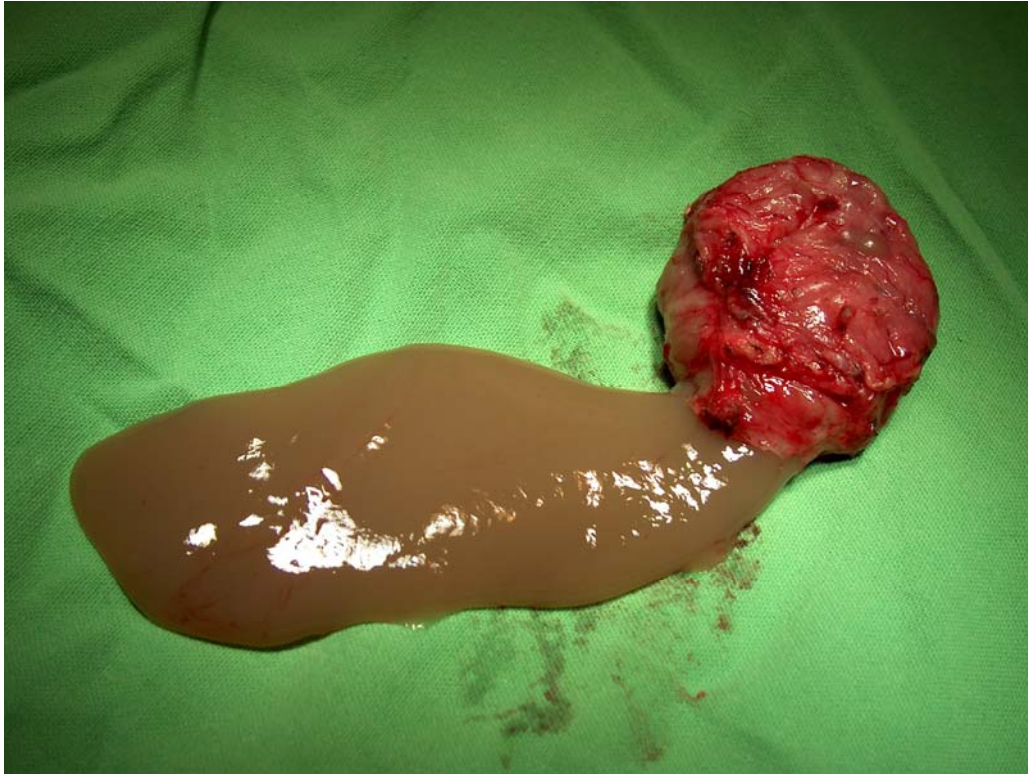
1.1 A nyelőcsőpótlást igénylő betegségek etiológiája

1.1.1 Fejlődési rendellenességek

A nyelőcső fejlődési rendellenességei két fő csoportba oszthatók: szám feletti oesophagus jelenléte, illetve a nyelőcső nem teljes kialakulása. Mindkét esetben a nyelőcső-légcső szétválás rendellenességével állunk szemben. Fejlődéstanilag az oesophagus kialakulása kettős: a felső, retrotrachealis rész a tracheával együtt fejlődik, míg az alsó, infratrachealis az előbél praegastricus szakaszából keletkezik. A 21-23 napos embrióban már megtaláljuk a légzőrendszer hámtelepét mely az előbél ventralis falát elődomborítja, majd 25-27 napos korban megkezdődik a két szervrendszer szétválása. A 36-38 napos egészséges embrióban a tüdő és a trachea már teljesen szeparálódott az előbélről [1]. A terhesség e korai fázisában a magzatot érő teratogen hatások a fejlődés éppen zajló szakaszát károsíthatják, ami természetesen egyszerre több szervrendszert is érint [2]. A létfontos szerveink kialakulása is nagyjából ebben az időszakban zajlik, így egy komoly – súlyos nyelőcső fejlődési rendellenességet is okozó – ágens általában az embrió elhalásához vezet, ezért az élve született újszülöttek között relatíve ritka az ilyen típusú rendellenesség.

A szeparálódás során egy felgyorsult osztódás az érintett szervek duplikálódását okozza. Így jönnek létre az oesophagus falában bronchogen és enterogen cysták. Az ilyen fejlődési rendellenességek aránylag ritkák, az összes mediastinalis tumorok 15,2 %-t képezik [3]. A folyamat általában benignus, felnőtt korban vagy a környező szerveket komprimálva okoz panaszt, vagy mellékletként, mint mediastinalis térfoglalást észleljük /1. ábra/. A jelenlegi szakmai irányelvek szerint érdemes a panaszt

nem okozó mediastinalis cystat is eltávolítani, mivel belfelszínén malignitás alakulhat ki [4-6].



1. ábra: műtéti preparátum – a nyelőcső középső harmadából eltávolított 40 mm átmérőjű mediastinalis enterogen cysta

A nyelőcső incomplett fejlődése során egy szakasz egyáltalán nem fejlődik ki. A tőle oralisan és aboralisan lévő részek vakon végződnek. Miután az oesophagus felső felének fejlődése a tracheával együtt zajlik, atresia esetén az oralis csonk nagyon gyakran összeköttetésben van a légzőrendszerrel [7]. Hazánkban 2500-3500 élve születésre jut 1 teljes atresia. Incomplett formája esetén az egészséges szakaszok között csak szűkületet találunk. A complete forma kezelése az ép végek közötti távolságtól függ, rövid szakasz esetén primer anasztomózis is készíthető, de már kis feszülés esetén

is mérlegelendő a pótlás általában gyomorral. Incomplett atresia esetén megkísérelhető az érintett szakasz tágítása, de a stenoticus szakasz hossza, a stenosis mértéke nagyban befolyásolja ennek kivitelezhetőségét és eredményességét [8].

1.1.2 A nyelőcső sérülései

A bázisging sérülések leggyakoribb okai [9-14] az alábbiakban foglalhatóak össze:

I. Iatrogen

1. Intraluminalis

- oesophagoscopia
- buzsírozás
- pneumaticus tágítás
- varix sclerotizálás
- nyelőcső-tubusok (nasogastricus, endoprotezis)
- endotrachealis tubus
- laser-kezelés

2. Extraluminalis

- mediastinoscopia
- intraoperatív sérülés
- irradiatio

II. Idegentest

III. Trauma

- tompa sérülés
- áthatoló sérülés
- corrosiv anyag, gyógyszer

IV. Spontán (barogen, postemeticus)

V. Tumor, környező gyulladás

Sebészi kezelésükben négy alternatíva létezik. Az egyik az ún. nem operatív kezelési mód, melynek lényege, hogy nem történik semmilyen közvetlen kísérlet a sérülés zárására, áthidalására, drainage-ára. Terápiás lépéseink iránya ebben az esetben a szervezet restitutios törekvéseinek gyógyszeres támogatása. Carentia minimum 7 napig, széles spektrumú antibiotikum adása, szoros observatio indokolt [15].

A másik kezelési alternatíva az ún. konzervatív sebészi megoldások tárháza, melyek nem annyira a sebészi technika oldaláról tekinthetők konzervatívnak, mintsem híveinek a nyelőcső perforatio kezeléséről vallott filozófiája okán. Ebbe a csoportba tartoznak a különböző exclusio módszerek, drainage-ok és stent implantatiók.

A harmadik kezelési lehetőség az ún. reconstructív sebészi megoldás, mely történhet suturával önmagában, vagy ún. megerősített sutura formájában.

A disszertáció szempontjából leglényegesebb kezelési csoport, mely egyben a legradikálisabb is a resectio azonnali vagy halasztott pótlással [16]. Ilyenkor a pótlás az előrement műtétek, vagy egyéb a gastrointestinalis tractust érintő betegségek miatt kerülhet improvizációs pályára és előfordulhat, hogy ténylegesen néhány cm hiányzik a tápcsatorna folytonosságának helyreállításához. Ilyenkor egy megbízható műanyag nyelőcső komoly könnyebbséget jelentene [17,18].

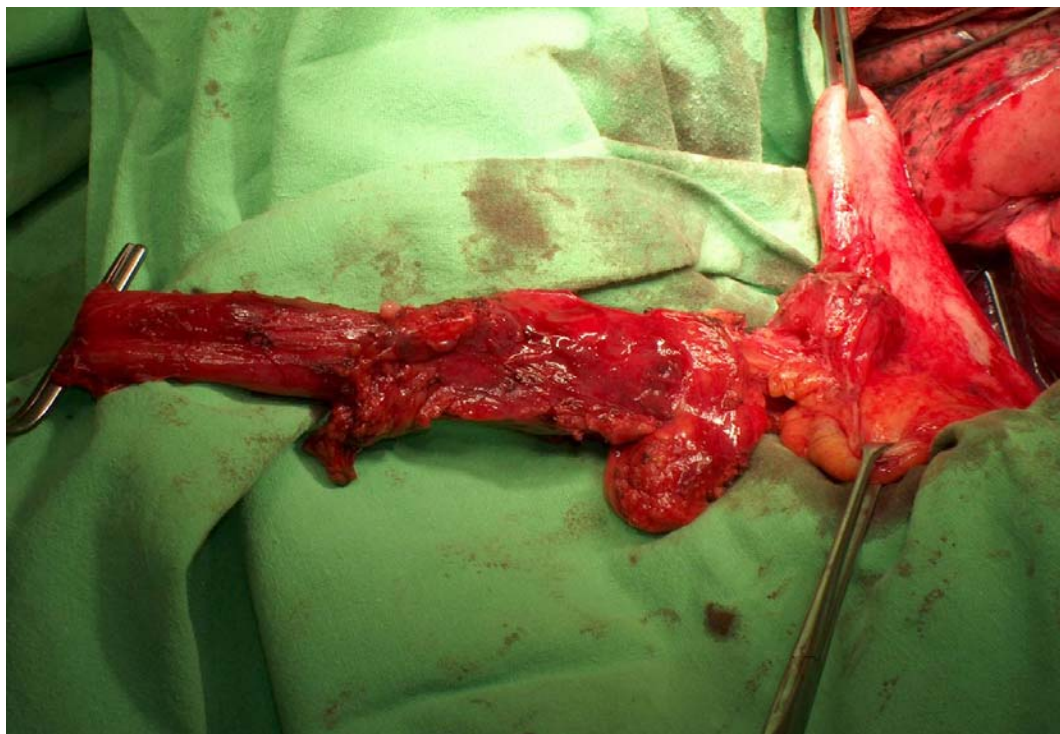
1.1.3 Benignus elváltozások

A gyulladások, diverticulumok, motilitási zavarok, benignus tumorok közül sebészi kezelést azok igényelnek, amelyek konzervatív therapia mellett is funkcionális zavart okoznak, illetve praecancerosus állapotnak tekinthetőek. A resectio az ilyen entitások között is ritkaság számba megy. Jól érzékelhető ez a nyelőcső praecancerosusnak tekintett betegségei – pl.: high grade dysplasia, Barrett-oesophagus – esetében, ahol a kezelés módjában napjainkban is vannak viták. Talán a legelfogadottabb módszer az érintett szakasz eltávolítása, a regionális nyirokcsomók eltávolításával együtt, de próbálkozások zajlanak minimálisan invazív, szervkímélő módszerek kidolgozásával is - pl.: endoszkópos mucosa-abláció, laparoscopos transhiatalis nyelőcső stripping, stb. A klasszikusnak tekinthető Merendino-féle jejunalis interpositio funkcionális szempontból vitathatatlanul a „gold-standard”, de ennek technikai kivitelezhetetlensége esetén a gastro-jejuno-duodenalis interpositioval is jó eredmények érhetőek el. [19-22].

1.1.4 Malignus elváltozások

Az összes daganatos betegség 2 %-a, a gastrointestinalis tumorok 4 %-a érinti a nyelőcsövet. Hasonlóan a többi emésztőrendszeri malignomákhoz évről-évre mérsékelten nő az újonnan felfedezett esetek száma. A korábban észlelt igen komoly planocellularis szövettani dominancia után az utóbbi évtizedben egyre nagyobb arányban találkozunk adenocarcinomával, illetve a betegek életkora a 6-7. évtizedről a

fiatalabb korosztály felé tolódik el. Ez ellentmond az agresszív savcsökkentő kezelésként, antireflux plasztikáktól várt preventív hatásnak, a nyelőcsőrák sebészi kezelése sajnos nem veszít jelentőségéből.



2. ábra: Nyelőcső neoplasia

- subtotalis oesophagectomia kétmezős lymphadenectomiával a kiscöbületi resectio helyének kijelölése pillanatában

A kezelés a nyelőcsőrák vonatkozásában is a minimálisan invazív, endoscopos, szervmegtartó módszerek irányába mozdult el. A szervmegtartó kezelés alapfeltétele volt egy igen precíz szövettani beosztás megalkotása. A nyelőcsődaganatok 1987-es UICC szerinti TNM klasszifikációja már 1990-ben módosításra szorult, amennyiben a

T1 stádiumot a mélységi terjedés alapján intraepithelialis (EP), mucosalis (MM), submucosalis (SM) alcsoportokra osztották [23]. 2007-ben japán kutatók az EP-MM stádiumot pedig M1-M2-M3-ra módosították. Igen nagy esetszámú vizsgálatok során igazolták, hogy M1-M2 állapotban nincs nyirokcsomó áttét, M3 esetében már 10 %-ra tehető a metastasis jelenléte, míg SM stádiumban ez az érték pedig megközelíti a 20 %-ot. Az M1-M2 mélységi terjedést mutató tumorok képezik tehát azt a csoportot, mely biztonsággal kezelhető endoscopos úton [24]. A szervmegtartó elvnek így az alapja a tumorok korai stádiumú diagnosztizálása, maga a szűrés. Miután hazánkban egy nyelőcsősebész szinte kizárólag T₃-T₄ stádiumú tumorokkal találkozik, sajnos nálunk egy ilyen irányú változásnak reális esélye a közeljövőben nincs, marad az R0 resectiora való törekvés /2. ábra/, és az azonnali pótlás individualisan meghozott döntés alapján [25].

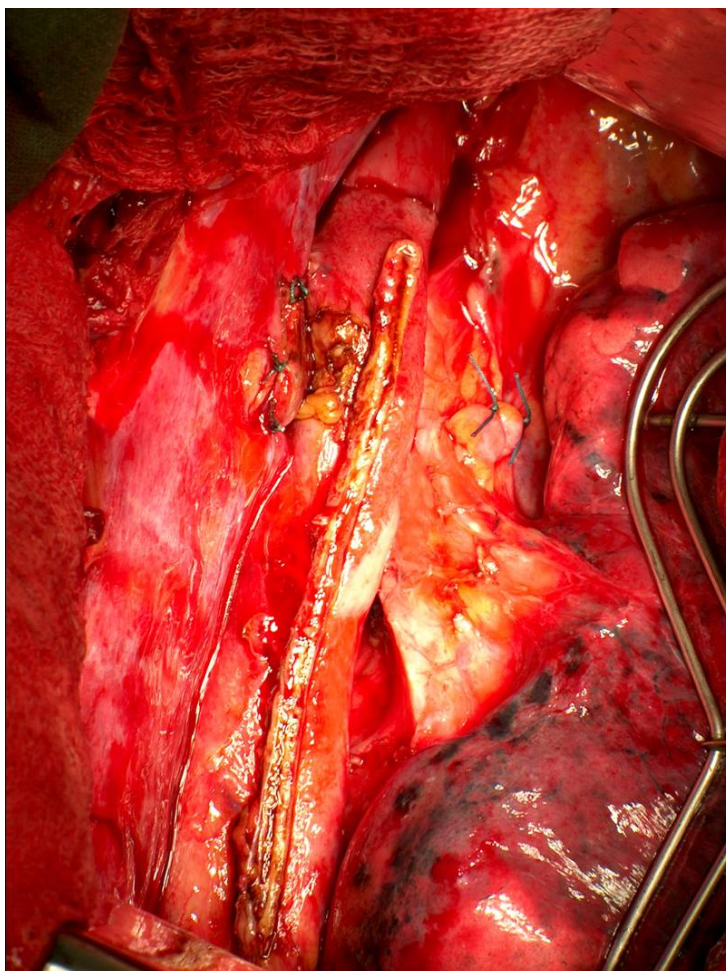
1.2 A nyelőcsőpótlás „hagyományos” módjai

1.2.1 Pótlás gyomorral

A károsodott nyelőcsőszakasz megkerülésére először a gyomrot használták fel, 1903-ban Jianu antethoracalis pozícióban fordított gyomorcsövet készített egy szűkült szakasz áthidalására. 1905-ben Beck, bár még csak állatkísérletes modellben, a pótlást már intrathoracalisan végezte el. Közel 30 évet kellett várni e műtét human alkalmazására, 1933-ban Ohsawa hajtotta végre az első sikeres intrapleurális pótlást

[26]. A várakozásnak nem sebésztechnikai, hanem anaesthesiologiai oka volt. Ez az időszak jelenti az intratrachealis narcosis „gyermekéveit”.

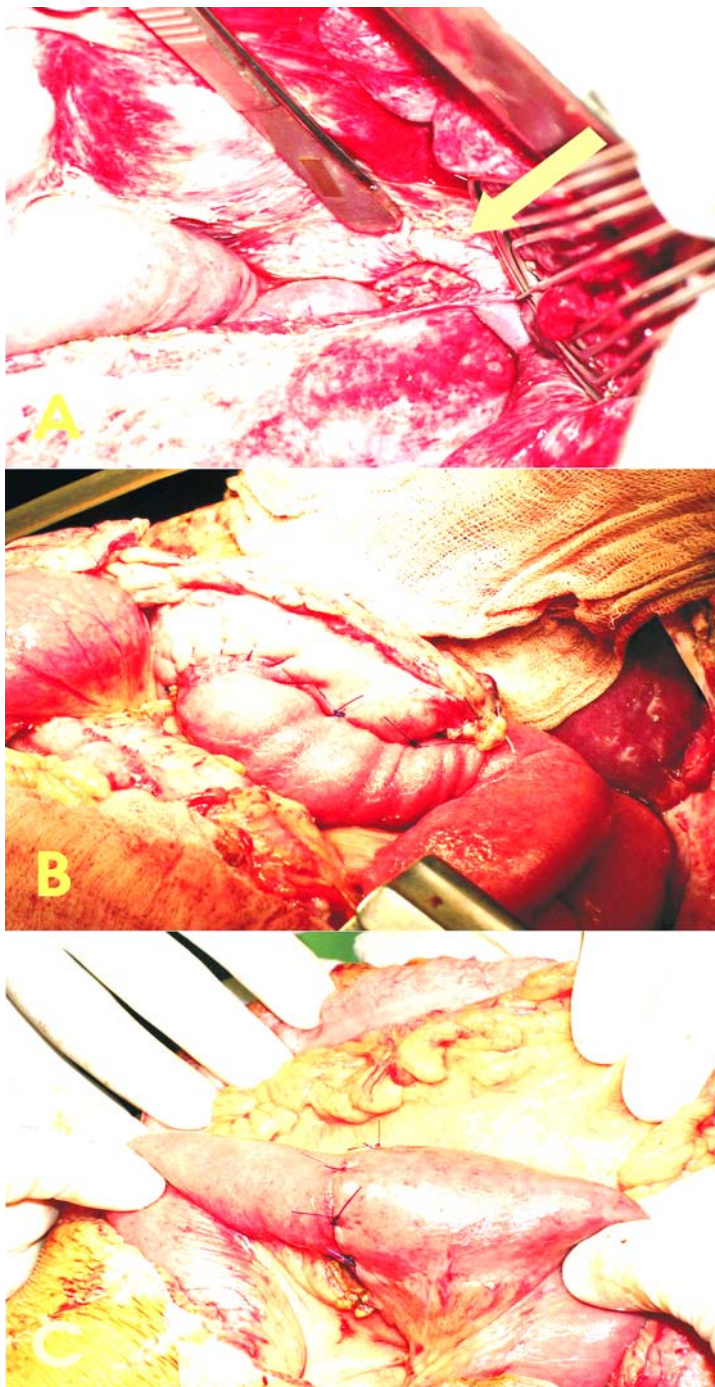
Mind a mai napig a gyomor a pótlásra felhasznált elsődleges szerv /3. ábra/. Maga a műtét technikailag egyszerűbb, mint pl. a colonnal történő pótlás. Vérellátása, intramuralis keringése kedvezőbb. Funkcionális szempontból a módszer negatívumai között a maradék nyelőcsőben kb. 40 %-ban megjelenő oesophagitist kell kiemelnünk. Ennek oka részben a denervatio dacára megmaradó savtermelés, ill. a duodeno-gastro-oesophagealis epés reflux. Ez utóbbi vonatkozásában a pylorus plasztika szükségességéről továbbra is vitatkoznak [27].



3. ábra: Nyelőcsőpótlás gyomorral

1.2.2. Pótlás vékonybéllel

A vékonybél, mint neo-oesophagus igen komoly múltra tekint vissza, Wullstein 1903-ban, majd Roux 1907-ben számoltak be sikeres műtéteikről. A vékonybéllel történő nyelőcsőpótlás isoperistalticus formája a legfiziológiásabbnak tekinthető nemcsak kalibere, falszerkezete, de peristalticus képessége okán is. Sajnos azonban a jejunum mesenterialis érárkádja kivételes esetekben (<4%) teszi lehetővé hosszú, akár cervicalis anastomosis képzésére alkalmas neo-oesophagus kialakítását. Distalis nyelőcső resectiot követően viszont az elsődleges választandó pótlási mód a Merendino névéhez fűződő jejunalis interpositio. A nyelőcső és a gyomor fundusa közé mintegy 40 cm-es hosszúságú isoperistalticus jejunumkacs kerül. Míg a vena azygos szintje alatt készített oesophago-gastricus összeköttetés szinte törvényszerű velejárója a beteg életminőségét nagyon hátrányosan befolyásoló, elsősorban alcalicus eredetű reflux oesophagitis, addig a jejunalis interpositio hatásos antireflux effektussal is rendelkezik. Természetesen előfordul, hogy elsősorban az előrement műtétek, illetve a rendkívül rövid mesenterialis érárkád miatt úgynevezett composit-megoldásra van szükség, azaz a gyomor fundusából és jejunumból készített, úgynevezett gastro-jejuno-duodenalis interpositióra. A módszer technikailag talán a legnehezebb, szemben pl. a Merendino műtéttel, ahol három anastomosist kell készíteni, itt négyet, de functionalis szempontból bizonyítottan jobb, mint a gyomorpótlás [28,29] /4. ábra/.



4. ábra: Jejunalis interpositio

A: end-to-side oesophagojejunosomia a v. pulmonalis síkjában

nyíl: v. pulmonalis

B: end-to-side jejunogastrostomia

C: end-to-end jejunojejunostomia

1.2.3 Pótlás vastagbéllel

Bár anatómiai sajátosságait tekintve a vastagbél, mint nyelőcsőpótló szerv kiváló graftnak tűnik és az idő próbáját is kiállta, ennek ellenére talán egyetlen más műtéti módszert sem övezett annyi vita, dogma, tévhit, mint a colon ilyen irányú felhasználást. Előnyként a szerv mellett szól, hogy így nem károsítjuk a gastro-duodenalis passage-n túl a vékonybél traktus integritását sem, de hátrány lehet a nagyobb átmérő illetve a vegyes baktériumflóra. Korábban elfogadott elv volt, hogy a két colonfél közül a jobb oldal az elsődlegesen választandó. Az arteria colica sinistrára nyelesített bal colonfél ugyanis a Riolani árkádnak „túlzottan kiszolgáltatott”.

1950-ben Dogliotti a jobb colonfelet – az arteria colica mediara nyelezve - praesternalisan vitte a nyakra, pár évvel később Longiro ezt a műtetet már substernalisan végezte. Belsey a pótláshoz a colon transversumot használta, az ellátó ér az arteria colica sinistra volt. Sokáig az isoperistalticus pótlási irány is vitatott volt, de szerencsére ma már ez csak sebésztörténeti vonatkozásban érdemel említést. Amennyiben kizáró ok nem áll fenn – pl.: korábbi műtét, szinkron betegség a vastagbél középső szakaszán, érmalformáció – a vastagbéllel történő pótlásnál a colon transversumot és/vagy a bal colonfelet tekintjük legideálisabb substitutios módszernek [30,31].

1.3 Nyelősőpótló módszerek extraintestinalis anyagok felhasználásával

1.3.1 Pótlás műanyaggal

A műanyagok felhasználása tubularis szervek pótlására régóta kutatás tárgya. Az érsebészetben évtizedek óta rutinszerűen alkalmazzák a kóros szakasz pótlására vagy áthidalására a különböző prothesiseket. Rövid szakaszú légcsőhiány érprothesissel történő pótlásával kapcsolatban számos kutatás történt, ellenmondásos eredményekkel [32,33]. A sikertelenség fő oka az anasztomózis-vonalakban kialakult szöveti necrosis volt, melyet a szerzők a varrat okozta ischaemiával magyaráztak. Ugyanakkor a nyelőső – egyik fő élettani tulajdonsága, nevezetesen a peristalticus képessége miatt – nem sorolható az említett tubularis szervek közé.

A circumferentia 1/3-t meg nem haladó, kisméretű, foltszerű hiány pótlására, fedésére a kutatások szerint a polytetrafluoro-etilén alkalmas lehet [34]. Elgondolkodtató tény, hogy teljes körfogatot involváló hiány esetén sikeres műtéti megoldásról szóló tudományos közleményt nem találunk.

Kutatómunkánk előkészítő fázisában állatkísérletes modellen mi is próbálkoztunk 5 cm-es nyelősőhiány 24-32 mm átmérőjű GoreTex® érprothesissel történő pótlásával (GoreTex, W.L.Gore & Associates Inc.). /5. ábra/ A megoperált 4 kutya az orális táplálás megkezdése után 1-3 nappal (posztoperatív 15-17. nap) elpusztult. A boncolás során szinte körkörös varratinsufficienciát találtunk. A kudarc legfőbb okát a nyelőső nyálkahártya lassú átkúszásában láttuk. Mire ugyanis az élettelen szövetbe helyezett varratok vélhetően gyors meglazulása bekövetkezett az

átkúszo nyálkahártyaszigetek „plug”-ként jelentkező kompenzáló hatása még nem tudott érvényesülni.



5. ábra: Intraoperatív fotó – a cervicalis oesophagus hiány pótlására beültetett GoreTex® érprothesis

1.3.2 Pótlás composit grafftal, biopolimerekkel

1.3.2.1 Composit graft

Composit grafftnak azokat a pótlásra szánt anyagokat nevezzük, ahol egy prothesist kombinálunk valamilyen fajtaazonos szövettel. Kipróbálásra kerültek poliuretánból és kollagén szövetből [35], szilikonból és porózus collagen szivacsból

[36], szilikonból és autológ mucosalis sejtekből [37], fémstentből és pericardiumból illetve fascia lataból [38] készült compositumok.

A prothesisekkel ellentétben az esetek többségében itt már megfigyeltek a belfelszínen nyelőcsőre jellemző hámosodást. A módszer elterjedésének ugyanakkor határt szabott, hogy a beépülés esetleges, standard eredmények nincsenek, a graft készítése bonyolult, illetve minden esetben megfigyelték az élettelen komponens migratioját [39]. Az elmozdulás ideje a szilárd táplálék bevezetésével függ össze, ugyanakkor az autolog neo-oesophagus teljesértékű kialakulása ekkorra nem biztos, másrészt az elmozdult rész az aboralis gastrointestinalis szakaszon ileust, perforációt okozhat.

1.3.2.2 Biopolimerek

A természetes műanyag paradoxonnak tűnő fogalom, éppen a biopolimerek azok, melyek *szerkezetüket tekintve makromolekulák, eredetüket nézve viszont természetes anyagok.*

Azzal a különleges tulajdonsággal is rendelkeznek, hogy biológiai úton lebomlanak, azaz biodegradábilisak [40]. A biológiailag teljesen lebomló polimerek alkalmazási területei egyre bővülnek. A sebészek napjainkban évente kb. 125.000.000 biológiailag lebomló varratot készítenek. A varrat megtartja sterilitását és szilárdságát, amíg szükség van rá, de feloldódik és nyom nélkül kiürül a szervezetből, ha a környező szövet meggyógyult. Évente több száz publikáció jelenik meg a lebomló polimerek új alkalmazásáról, de a gyakorlatban csak lassan valósulnak meg az elképzelések. A

jövőben elterjedő eljárások közé sorolható a gyógyszerek programozott adagolása [41,42], a különböző kapcsok készítése, az érpoótlások, a szövetek vázának kiépítése a sejtcellák beágyazásával. A felszívódási idejükben szabályozhatók, vérképződményből plasztikusan formálhatók.

Az ún. **bioplasztok** bevezetése magyar szerző, Gerendás Mihály professzor nevéhez fűződik [43]. Az általa kidolgozott ún. fibrinbioplasztok a klinikai gyakorlat próbáit is kiállták, felhasználásra kerültek, mint például májvarratok alátétjeként, vagy osteomyelitises üregek feltöltő anyagaként. A fibrinbioplasztok előnyei közül az alábbiak emelhetők ki:

- biokompatibilitás
- méretre vághatóság
- minimális duzzanat és lokális gyulladásoos reakció
- egyszerű sterilizálhatóság - autoklávozható
- kombinálhatóság antibiotikummal (pl. Gentamycin)

Biodegradábilis anyagok előállításával és állatkísérletes kipróbálásával munkacsoportunk is behatóan foglalkozott a 80-as évek végén. Műanyag nyelőcsövet állítottunk elő fibrinbioplasztból, még Gentamycinnel kombinált változatban is – 18 mm-es belső átmérővel, 2 mm falvastagsággal /6. ábra/ [44].



6. ábra: Fibrinbioplasztból készült műanyag nyelőcső

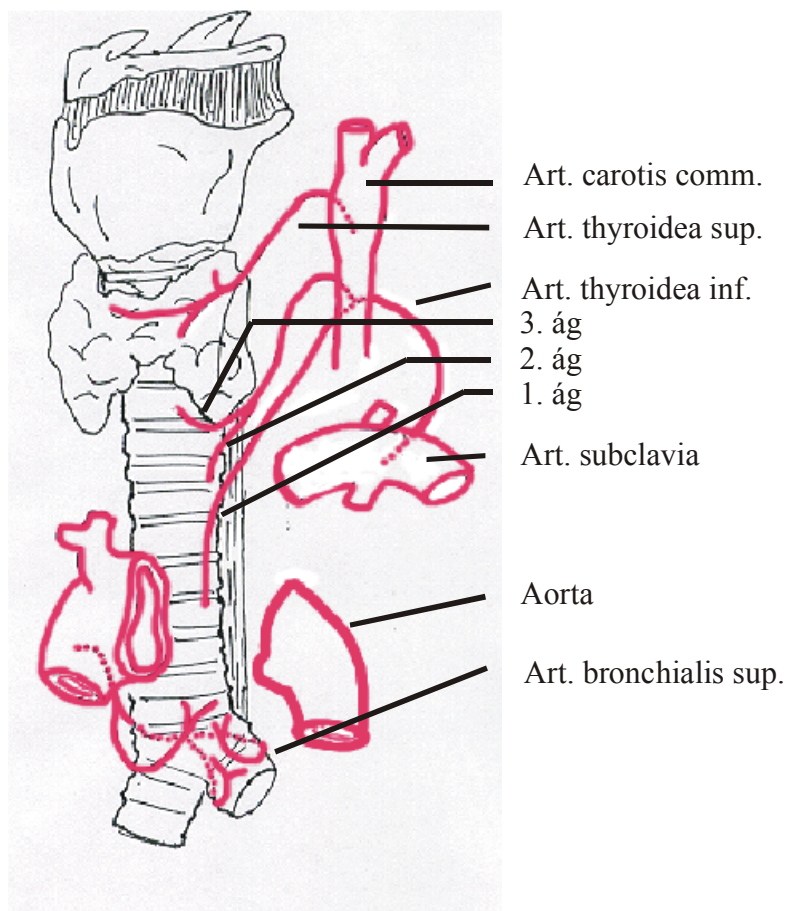
A technológia neuralgikus pontja a falí rigiditás és a varrhatóság volt. Amennyiben olyan fibrinbioplaszt hengert hoztunk létre, amely jól varrható volt és adaptálható a nyelőcsőhöz, akkor az a nyál fermentumai hatására gyorsan degradálódott, így varratelégtelességet generált. Ha viszont megfelelő falí rigiditást értünk el, amely ellenállónak bizonyult a különböző fermenthatásoknak, akkor a varrhatóság szenvedett csorbát. Összességében megállapítható, hogy ez az anyag a nyelőcsőpótlás vonatkozásában nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket.

1.3.3. Pótlás tracheával

1.3.3.1. A trachea anatómiája és vérellátása

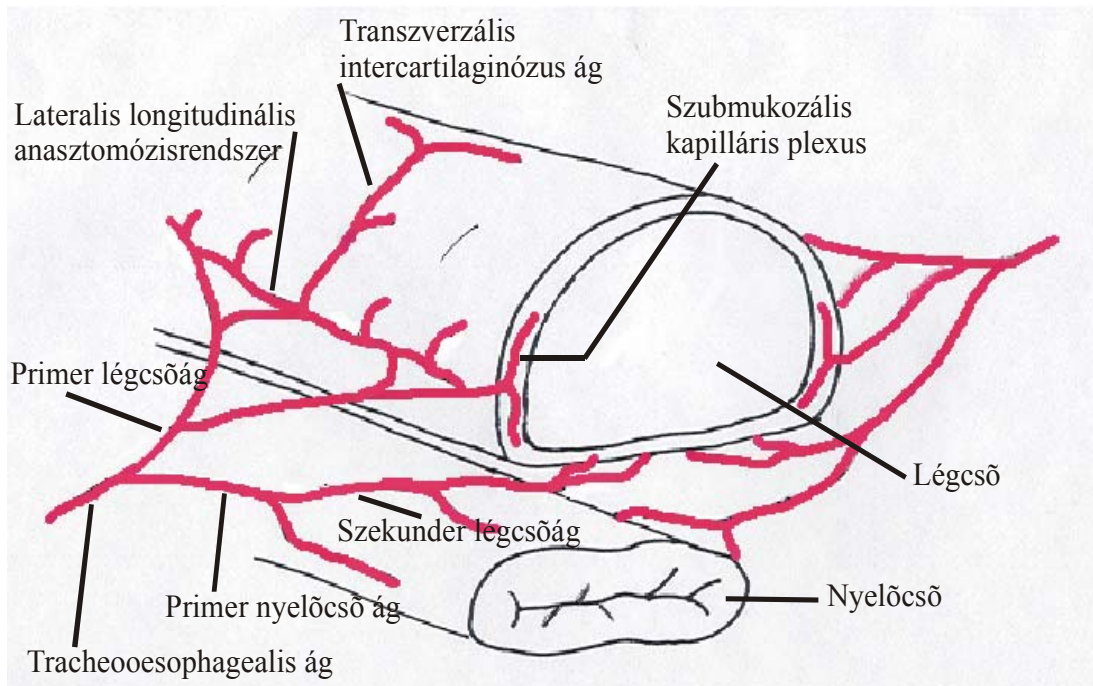
A légső alapvető anatómiai felépítésén kívül a szerv allotransplantációja szempontjából a vérellátásának az ismeretét tekinthetjük kiemelten fontosnak. Vérellátása kiterjedéséhez képest szegényes, szakaszonként különböző, de mindenhol szegmentális elrendezettséget mutat. A cervicalis szakaszon dominánsan az arteria thyroidea inferior végzi az ellátást. Az arteria carotis communis a nyelőcső alsó harmadát hátulról megkerülve 3 tracheoesophagealis ágat ad le, melyek trachealis és oesophagealis ágakra oszlanak. Az 1. ág az alsó cervicalis részt látja el, melyet a nyelőcsőhöz minimális kapcsolat fűz. A 2. arteria dominánsan a nyelőcsövet látja el a nyaki, középső régióban. A 3. ág bebukik a glandula thyroidea alá, és a felső légsőszakaszt táplálja. Megközelítőleg 40 %-ban a cervikális szakasz alsó harmadához erek futnak az arteria subclaviából. Eredésük a truncus thyrocervicalistól proximálisan helyezkedik el. Az arteria thyroidea superior közvetlenül nem ad ágakat a légsőhöz, de az arteria thyroidea inferiorral kapcsolódik, későbbi sértése esetében az ellátás számára megkerülőutat jelenthet.

A thoracalis szakasz vérellátása nagyfokú változatosságot mutat. Részt vesz a táplálásban az arteria intercostale suprema (felső 1/3), az arteria subclavia (alsó 1/3), illetve az arteria mammaria interna (kizárólag az arteria intercostale suprema hiánya esetén) /7. ábra/.



7. ábra: A légcsövet ellátó erek

Mikrovaszkuláris keringés: A tracheoesophagealis erek elsődleges tracheális és oesophagealis ágakra oszlanak. A primer nyelőcsőágak másodlagos trachealis ágakat adnak le a pars membranacea tracheaehez. A primer légcsőágak a lateralis falhoz futnak, köztük *lateralis longitudinalis anasztomózisrendszer* jön létre. Ennek sérülése az érintett szakasz nekróziséhez vezet. Ebből az árkádból transversalis intercartilaginealis arteriák indulnak az elülső falon a középvonalig, ahol kapcsolódnak az ellenoldaliakkal. Ezen transversalis erek egy bonyolult összefüggő szubmukozális kapilláris plexust képeznek [45]. /8. ábra/



8. ábra: A légcső mikrovaszkuláris keringése

A légcső, mint tubularis szerv, fizikális adottságainál fogva alkalmasnak tűnhet nyelőcsőszakasz pótlására. Ha a szervet teljesen megtisztítjuk a környező szövetektől, az előbb említett speciális vérrellátásától megfosztjuk. Ilyenkor a táplálásért felelős ellátó erek csak a végek irányából nőhetnek be. Ez maximálja a graft lehetséges hosszát, ami a tapasztalatok szerint 5-6 cm-t jelent [46]. Hosszabb transplantátum esetén számolnunk kell a középső rész necrosisával.

1.4 A cryopreservatio

1.4.1. Bevezetés

A nyelőcsőhiány pótlására a legfiziológiásabb a szerv allotransplantatioja lenne. Egy oesophagus-segmens átültetésének analógiájára sebészek állatkísérletes modellen korábban már sikerrel próbálkoztak trachea allotransplantatioval [47].

Kutatócsoportunkban merült fel a kérdés, hogy a trachea, mint tubularis szerv használható lenne-e neo-oesophagusként. Ugyanakkor mind a nyelőcső, mind a légcső vonatkozásában a legfőbb probléma a szervek immunogenitása. Maga a műtét gyakorlott sebész számára technikai nehézséget nem jelenthet, de a graft-versus-host reakció ezidáig megoldatlan probléma. A rejection kivédésének számos módja ismert. A már hagyományosnak mondható szervátültetéseknél (pl.: vese, szív, tüdő ...) a bevett gyakorlat a gyógyszeres immunsuppressio. A felhasznált szerek nemkivánt mellékhatása, hogy igen erősen ronthatja a varratvonalak gyógyhajlamát. Japán kutatók megfigyelték, hogy a légcső – amennyiben a környező szövetektől megtisztítjuk, és így szinte devascularisaljuk – antigenitásáért döntően a belfelszint borító hámréteg lesz felelős [48]. Amennyiben találunk egy olyan eljárást, mellyel ez a réteg izoláltan eltávolítható a többi alkotó komponens károsítása nélkül, a szerv transplantálhatóvá válhat.

Ilyen módszer a cryopreservatio.

1.4.2 A cryopreservatio elmélete

Cryopreservationak nevezzük azt a módszert, mely során *sejteket vagy szöveteket 0°C alatti hőmérsékleten tárolunk*. Ez a hőfok általában -196 °C, ami a folyékony nitrogén forráspontja.

Ilyen alacsony hőmérsékleten a biológiai aktivitás, a sejtek halálához vezető biokémiai folyamatok leállnak. A módszer kidolgozása James Lovelock nevéhez fűződik, aki a problémával az 1950-es évek óta foglalkozik. A fagyasztás során a célként tekintett lassuló életfunkció mellett sejtet károsító folyamatok is felléphetnek. Ide tartozik az intracellularis térben az oldott anyagok koncentrációjának megváltozása, az extra- és intracellularis jégkristályképződés, illetve a szövetek dehydratioja. A sejten belüli ionok koncentrációjának változás és a dehydratio egyenes következménye a vízmolekulák szilárd halmazállapotúvá válásának. A jégkristályok kialakulása csökkenthető a lehűlés kontrolált lassításával, kísérletekben 1 °C/perc hűtési gradiens az általánosan alkalmazott protokoll [49]. A fagyás okozta szöveti sérülések megelőzésének másik módja a *vitrifikáció*. Ennél a technikánál a hűtés előtt úgynevezett cryoprotectiv anyagot adagolunk a kezelni kívánt szövethez/sejthez. A folyékony állapotú alkotóelemek viszkozitása nő, a vízből jég helyett ún. amorf-jég jön létre. A normál jégben hosszú, összefüggő láncolatú kristály alakul ki, az amorf-jég bár már nem tekinthető folyadéknak, de kristályszerkezet a molekulák között nem jött létre. Ilyen állapotot létrehozásának egyik módja az igen hirtelen hűtés ($\Delta T=1.000.000$ Kelvin/sec), praktikusán nincs idő a kristályképződésre [50]. Az eljárás elméleti-fizikai,

gyakorlati alkalmazhatósága még nem megoldott. Cryoprotectiv anyag alkalmazásával alig rosszabb hatásfokkal érjük el ugyanezt. A kutatók számára elérhető és rutinszerűen alkalmazott anyag a *dimetil-szulfoxid*. A molekulát 1866-ban Alexander Saytzeff fedezte fel, számos orvosbiológiai felhasználhatósága mellett – gyulladáscsökkentő, antioxidáns, bőrön keresztüli kiváló penetrációja miatt gyógyszerivóanyag – 10 %-s oldatát alkalmazzák az embrionális őssejtek konzerválásához fagyasztásos-tárolás előtt [51].

A cryopreservatio human orvos-biológiai felhasználásának alapfeltétele, hogy a hűtéssel előkezelt sejt/szövet a kiolvasztás után eredeti élettani funkcióját nyerje vissza. A jégkristályképződés mikroszkópos vizsgálattal igazolhatóan sejtkárosító, egy destruált morfológiájú képlettől nem várható az egészséges sejtre jellemző működés. Ugyanakkor, ha bármilyen cryoprotectiv módszerrel a kristályképződést meg tudjuk előzni, szövettani vizsgálattal már ép szöveteket találunk. Így az 1980-as évek következő kérdése a hűtéssel előkezelt szövetek funkcionális regenerálódása lett.

A vizsgálatokban magyar kutatócsoportok élen járóak voltak, Gál István professzor és munkacsoportja az elsők között foglalkozott a cryopreservált pajzsmirigy életképességével. Kutyákon kétoldali teljes thyroidectomiát követően az eltávolított pajzsmirigyszövetet 2-3 mm-es, 2 grammos darabokra vágta, majd 5 órán át tartó cryopreservatio ($T = -196\text{ °C}$) után a mintákat a hasüregbe, a nagycepleszbe autotranplantálta. A 2 hónapos utánkövetés során megfigyelhető volt, hogy a szövetdarabok már 7 nap után pajzsmirigy-hormon szérumszintet megemelő aktivitást produkáltak, illetve a posztoperatív 4. héten elvégzett I^{131} teljes test szcintigráfia kiválóan vizualizálta a hasüregben a normális élettani aktivitást mutató

pajzsmirigyszövetet. Az eredmények ismeretében elmondhatjuk, hogy önmagában a hűtéssel történő előkezelés kutyáknál nem károsítja a sejtek vagy a szövetek élettani működését [52].

Napjainkban rutinszerűen cryopreservált sejtek közé a spermiumok, őssejtek, petesejtek illetve a 4-8 sejtből álló embriók tartoznak. A mesterséges megtermékenyítés e módoszata mára már kiforratta magát (fagyasztott human embrióból az első gyermek 1984-ben született) [53], alkalmazása biztonságos, az eddigi kb. 3millió sikeres in-vitro-fertilizáció 20 %-ban alkalmazták. A human gyógyászatban szerv cryopreservatiót ezidáig nem alkalmaztak, cryoprotectiv módszer nélkül a sikert bizonytalannak tartják, a dimetil-szulfoxid pedig a szükséges dózisban már toxicus [51,52,55].

1.5 Vizsgálataink célkitűzései

Kísérleteinkben az eddig felsorolt problémák ismeretében a hagyományos sebésztechnikai módszerekkel nem megoldható rövid szakaszú – 5-6 cm-es – nyelőcsőhiány pótlására kívántunk megoldást találni.

- Vizsgálataink első sorozatában állatkísérletes modellen nyaki nyelőcsőszakasz eltávolítás után célunk a hiány cryopreservált, fajtaazonos tracheával történő pótlása volt. Vizsgáltuk a műtét technikai alkalmazhatóságát, az állatok túlélését, a felhasznált graft alkalmasságát, a posztoperatív szövődmények kialakulását.

- Második kísérletsorozatunkban a cryopreservatio immunsuppressiv hatásának human felhasználhatóságát kívántuk vizsgálni MHC-II (HLA class II (DR)) antigen specifikus antitest felhasználásával human tracheamintákban. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a folyékony nitrogénben történő fagyasztás befolyásolja-e a szerv immunogenitását. Alcsoportokat alkotva meg kívántuk határozni a cryopreservatio optimális időtartamát.

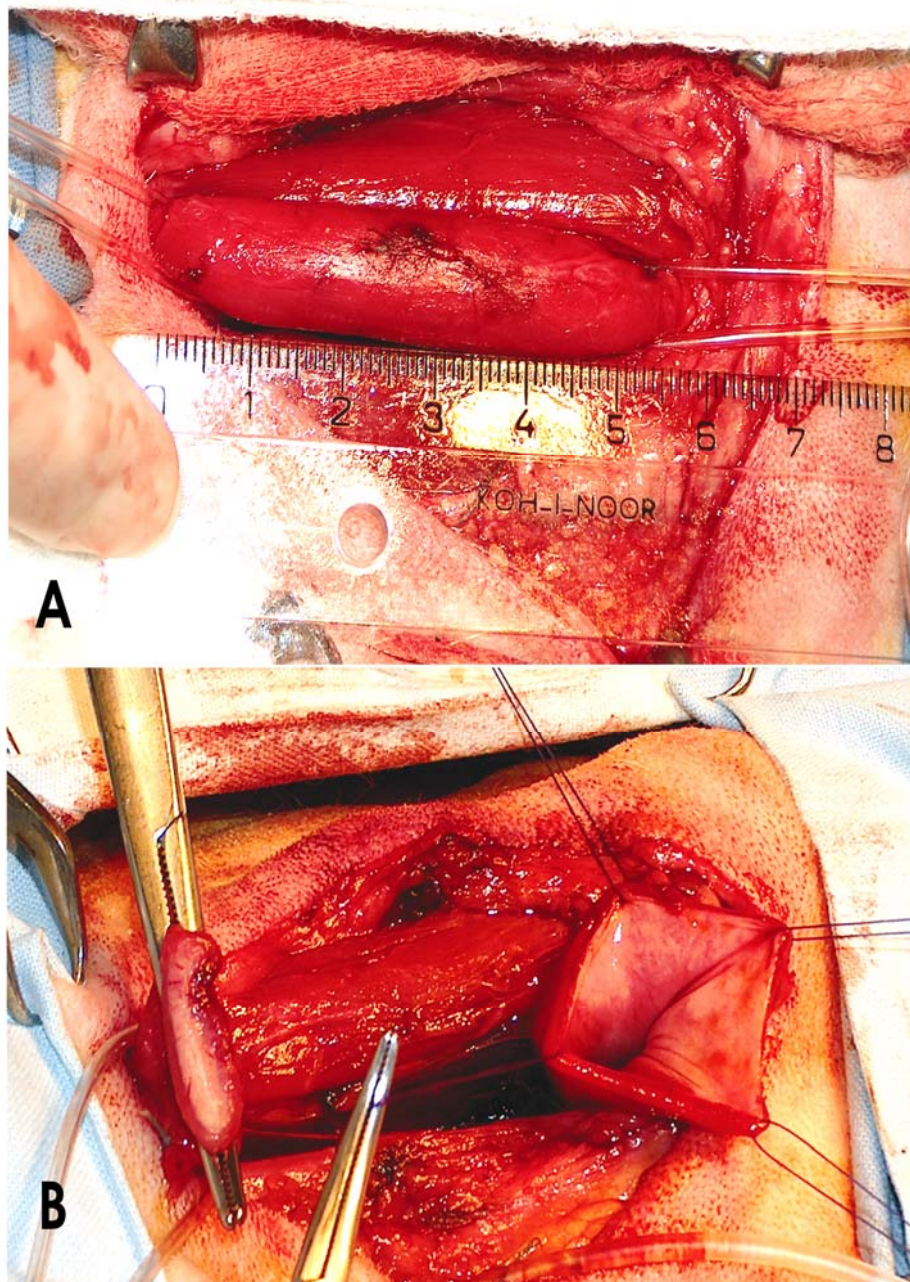
2. Kísérleteink első sorozata: állatkísérletes modellben a cryopreservált trachea alkalmazásának vizsgálata

2.1 Bevezetés

Kísérletsorozatunk első fázisában azon klinikai esetek megoldására kerestünk választ, amikor a bármely okból kialakult nyelőcsőhiány pótlására a neo-oesophagus nem megfelelő hosszúságú, szakmailag korrekt, feszülésmentes anasztomózis nem készíthető a végek között. Az ilyenkor megmaradó – általában pár centiméternyi – hiatus kitöltésére fajtaazonos trachea-szegmenst kívántunk felhasználni. A kötelezően kialakuló immunválasz, következményes rejectio kivédésére az implantációt megelőzően a graftot cryopreserváltuk. A kísérlet elvi alapját japán kutatók megfigyelései szolgáltatták, miszerint a hűtéssel történő előkezelés a szerv antigenitásáért döntően felelős belfelszíni többrétegű, csillószőrös hengerhám desquamatioját eredményezi [47,48].

2.2 Anyag és módszer

Kísérletünket 12 Beagle-kutyán (7♀, 5♂, átlagos súly: 10,75 kg) steril műtői körülmények között intramuscularis narcosisban (ketamine 10 mg/kg és primasine 1 mg/kg kombinációja) hajtottuk végre. Median nyaki metszés és a nyakizmok szétválasztása után felkerestük, kipreparáltuk, majd eltávolítottuk a nyelőcső 6cm-es szakaszát a pharyngo-oesophagealis junctiótól 2 cm-re distalisan. /9. ábra/

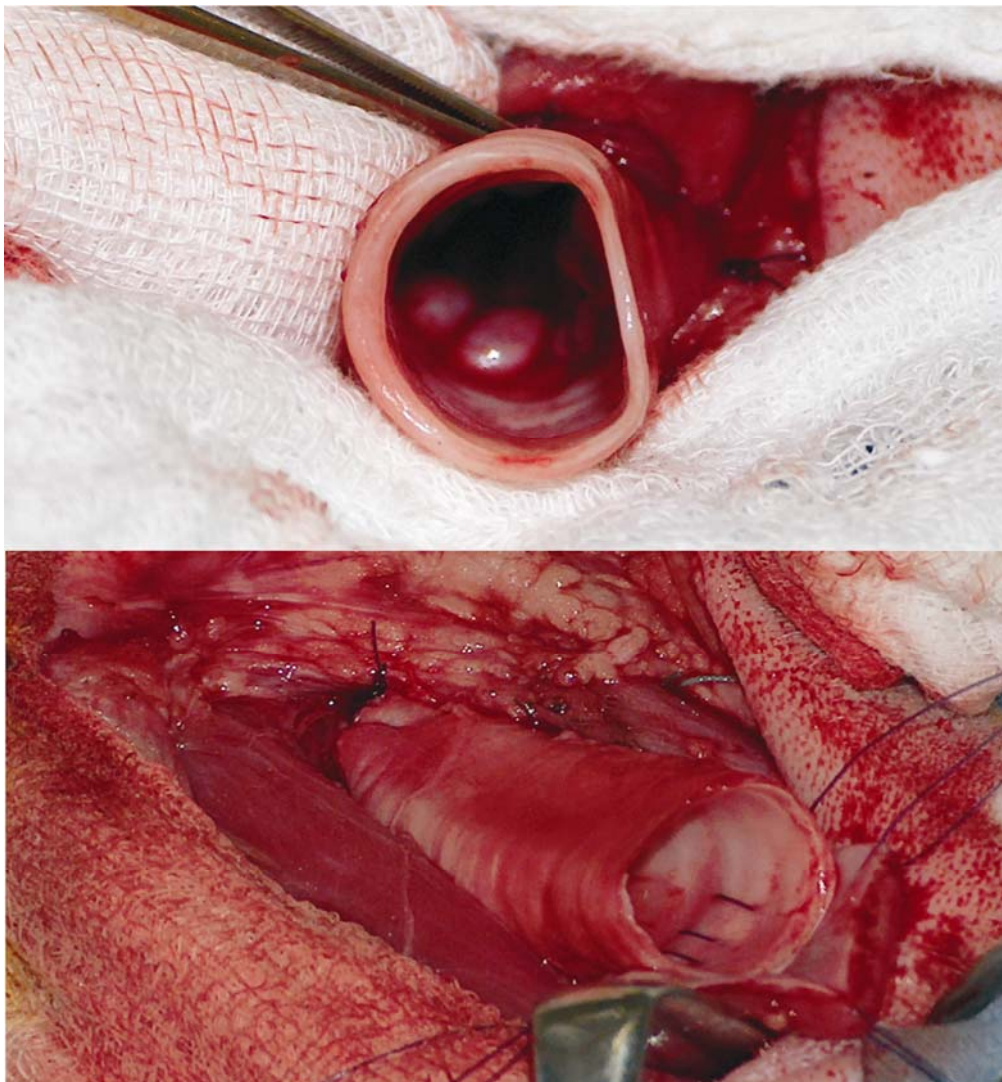


9. ábra: intraoperatív fotó - a nyelőcsőszakasz eltávolítása

A: a kipreparált és eltávolításra szánt 6 cm-es nyelőcsőszakasz

B: a rezekció utáni állapot

A hiány pótlására szintén steril körülmények között más Beagle-kutyákból eltávolított 6 cm-es tracheasegmenst - átlagos belső átmérő: 19 mm (± 1 mm) - használtunk. A kivett légcsődarabot a környező szövetektől megtisztítottuk, a perichondrium és a pars membranacea intact maradt. A graftot az implantációt megelőzően 21 napig -196 °C-on folyékony nitrogénben tároltuk. A cryopreservatio bevezetése során kontrolált, lassú hűtést vagy cryoprotectiv anyagot nem alkalmaztunk, a normál testhőmérsékletű graftot egy lépésben a folyékony nitrogénbe helyeztük. Az implantáció előtt a légcsősemenst a műtőasztal mellett indifferens hőfokú (37 °C) fiziológiás sóoldatból készített vízfürdőben lassan, átlagosan 40-45 perc alatt melegítettük testhőmérsékletűvé. A graftokból vékony szeletet távolítottunk el szövettani vizsgálatra. Az implantáció során end-to-end anasztomózist készítettünk monofilamens fonállal, egyrétegű tova futó varrattal (Biosyn[®] 3/0), majd a graftot a varratvonalakkal együtt sternohyoidalis izomlebennyel fedtük /10. ábra/.



10. ábra: : intraoperatív fotó – a cryopreservált graft implantációja

- a felső képen a caudalis, az alsó képen a cranialis
varratvonal látható

A műtét átlagosan 116 percig tartott (90-150 perc). Az állatok a műtét közben „single-shot” intravénás antibiotikum-profilaxisban részesültek (500 mg ceftriaxone, 250 mg metronidazole). A postoperatív időszakban a kutyák csak fájdalomcsillapító gyógyszert kaptak (metamizole i.m. 12 és 24 órával a műtét után); sem

gyulladáscsökkentő, sem immunsuppressív szert nem adtunk. Az első 6 posztoperatív napon parenterális táplálást alkalmaztunk (300 ml intravénás Rindex 10[®] infúzió naponta háromszor). Nasogastricus szondát nem használtunk. A 7. posztoperatív napon az állatok ihattak, a 14. naptól pépes ételt fogyaszthattak. Naponta mértük az állatok testhőmérsékletét, kötöttük a sebeket.

Laboratóriumi vizsgálatok: Vérvétel az 1., 3., 5., 7., 14., 28. és 56. napon történt, vizsgáltuk a minőségi-, mennyiségi vérképet, a haemorrheologiai paramétereiket, mértük a vörösvértest számot, a thrombocyta számot, a plasma fibrinogen szintjét. A laboratóriumi vizsgálatok a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrumának Sebészeti Műtéttani Tanszékén, Dr Németh Norbert adjunctus úr felügyelete mellett zajlottak.

Az állatokat random módon három csoportba osztottuk, majd ennek megfelelően termináció történt a 28. (1. csoport, n=4), 42. (2. csoport, n=4) illetve az 56. posztoperatív napon (3. csoport, n=4). A trachea-graftot a környező szövetekkel együtt eltávolítottuk. Vizsgáltuk a „neo-oesophagus” légtartóságát: Akiyama-fogóval az oesophagust a varratvonalaktól 2 cm-re lefogtuk, majd az így lezárt graftba víz alatt 28-30 ml levegőt injektáltunk. Fiberoscoppal megmérve a belső átmérőt kiszámítottuk a szűkület mértékét.

Szövetteni vizsgálatok: A szövetmintákból haematoxylin-eosin festéssel hisztopatológiai vizsgálat történt a Fejér Megyei Szent György Kórház Pathológiai Osztályán, Dr Szilágyi Anna főorvos asszony vezetésével. Az eljárás során a mintákat 8%-os formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyaztuk be. Az ebből készített 4µm vastagságú metszeteket festettük meg haematoxyllin-eosinnal. Kísérleteinket az

állatkísérleteket szabályozó 243/1998 miniszteri rendelet figyelembe vételével végeztük.

2.3 Eredmények

Túlélés: Érdemi posztoperatív szövődményt nem észleltünk; varratelégtelenséget vagy graft-kilökődésre utaló jelet nem tapasztaltunk, az orális táplálhatóság problémamentes volt. Két esetben sebsuppuráció lépett fel, mely a cutan és a subcutan rétegeket érintette. Az összes többi esetben a seb per primam gyógyult. /11. ábra/



11. ábra: A gyógyult műtéti seb (posztoperatív 28. nap)



12. ábra: az eltávolított graft (3. csoport, formalin-fixáció előtti állapot)

- a képen az ép nyelőcsővégek között a megrövidült
trachea-graft látható

A graft elváltozásai: Azok a graftok, melyeket az 56. napon távolítottunk el 60 mm-ről átlagosan 47 mm-re (± 3 mm) rövidültek meg /12. ábra/. A légpróba során a varratok tartottak. A belső átmérő 56 nap alatt 19 mm-ről (± 1 mm) átlagosan 15,8 mm-re ($\pm 0,6$ mm) szűkült /13. ábra/.

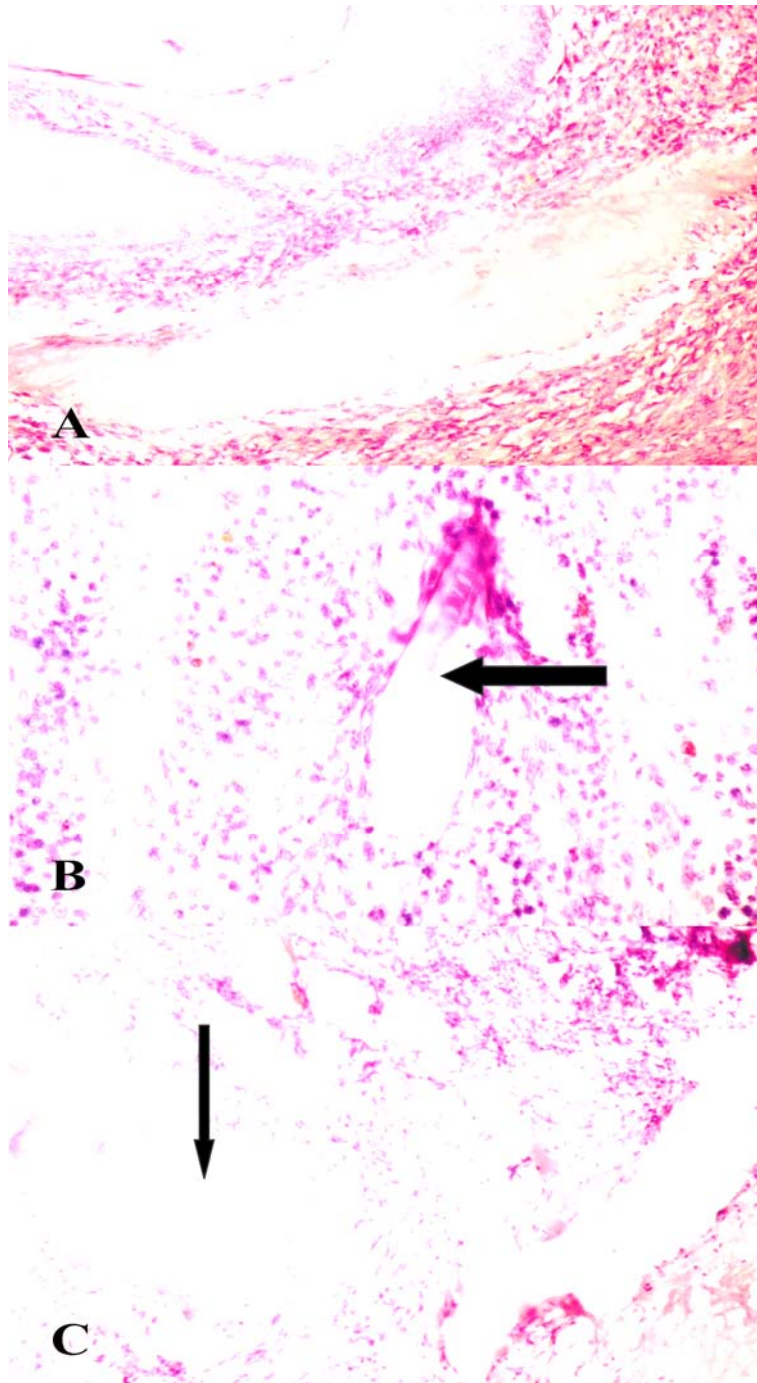


13. ábra: posztoperatív fiberscopic felvétel (3. csoport)

- a belső átmérő szűkülése

Laboreredmények: A gyulladásra utaló laborparaméterek (fehérvérsejt szám, fibrinogén szint) a várt, normális perioperatív stressznek megfelelően változtak: kezdeti emelkedés után szintjük a posztoperatív 7. napra megközelítette, a 14. napra elérte a referenciának tekintett műtét előtti szintet /I. táblázat/. A többi, vizsgált laborparaméterben érdemi változást nem tapasztaltunk.

Szövetteni eredmények: A beültetés előtti szövettani vizsgálat a belfelszíni epithelialis réteg desquamatioját igazolta. A nyelőcsőre jellemző többrétegű hengerhám a 4. hét végére teljesen átnőtte a képzett „neo-oesophagust”, az eredeti légsőhámot ekkor már nem tudtuk felfedezni a grafton /I4/A ábra/. A varratvonalak felett gyulladással alakult ki /I4/B ábra/. A trachea porcok körül gyulladással sejtek migrációját észleltük, melyet a porcszövet felszívódása követett /I4/C ábra/.



14. ábra: Szöveti eredmények

A: többrétegű hengerhámmal borított neo-oesophagus (HE, 10X)

B: fonal körüli gyulladás (HE, 10X) *nyíl: a fonal*

C: a trachea porcok desintegrációja (HE, 10X) *nyíl: a fellazult porcszövet*

I. táblázat: A kísérletbe bevont állatok laborparamétereit

LABOR PARAMÉTEREK																
Paraméter	Preop n=12		1. nap n=12		3. nap n=12		5. nap n=12		7. nap n=12		14. nap n=12		28. nap n=12		56. nap n=4	
	átlag	S.D.	átlag	S.D.	átlag	S.D.	átlag	S.D.	átlag	S.D.	átlag	S.D.	átlag	S.D.	átlag	S.D.
RBC (T/l)	6.8	0.313	6.7	0.295	6.3	0.431	6.5	0.172	6.2	0.493	6.5	0.267	6.5	0.406	7.0	0.042
HGB (g/l)	151.5	0.699	145.3	0.974	142.0	1.283	140.1	0.853	137.9	1.726	144.5	0.563	142.3	0.443	144.5	0.354
HCT (%)	49.8	2.344	48.5	3.489	44.7	4.111	46.9	2.466	44.6	5.606	47.0	1.111	46.5	2.015	48.2	0.495
WBC (G/l)	14.1	2.057	*25.6	1.581	*20.4	1.156	12.1	2.111	13.6	5.079	16.6	3.508	15.5	7.154	20.1	0.071
Mo+Gr (G/l)	10.6	1.624	23.7	1.360	18.2	1.464	10.9	1.707	11.6	5.045	15.0	3.418	13.9	2.849	18.4	0.283
Lymph (G/l)	3.4	0.921	1.9	0.370	2.2	0.311	1.2	0.450	2.0	0.400	1.6	0.253	1.6	0.597	1.7	0.212
PLT (G/l)	448.5	193.437	524.4	88.402	403.5	61.830	574.1	141.480	463.4	77.388	501.6	143.500	409.0	120.542	500.0	4.243
Fbg (g/l)	2.1	0.262	4.3	0.572	*5.0	0.191	4.9	0.750	4.0	0.361	2.6	0.344	2.6	0.674	1.0	0.200
TT (sec)	21.3	4.694	16.9	1.550	18.6	0.071	27.0	0.998	28.2	5.141	29.9	6.845	33.7	9.563	31.2	2.112
PT (sec)	7.1	0.495	8.4	3.047	9.6	3.536	8.1	3.254	8.3	6.265	9.2	3.801	10.5	4.869	15.3	2.050
APTT (sec)	16.3	6.332	15.7	3.032	19.8	6.859	17.4	4.004	16.9	2.978	18.8	6.252	16.5	1.742	25.4	3.561

RBC: vörösvértest szám, HGB: haemoglobin koncentráció, HCT: haematocrit, WBC: fehérvérsejt szám, Mo+Gr: monocyta és granulocyta szám, Lymph: lymphocyte szám, PLT: vérlemezke, Fbg: fibrinogen, TT: thrombin idő, PT: prothrombin idő, APTT: aktivált parciális thrombin idő, *: szignifikáns eltérés (p < 0,005)

2.4. Konklúzió

Az eredményeket összegezve elmondhatjuk, hogy a kutya légcsövének cryopreservatioja beváltotta a hozzá fűzött reményeket. A graft kiválóan beépült a recipiens környezetbe, a nyelőcsőre jellemző hámszövet a belfelszint benőtte, funkcionálisan a rövid szakaszú nyelőcsőhiányt a légcsődarab megfelelően tudta pótolni. A műtétet követő szoros observatio során graft-versus-host reakcióra utaló jelet nem tapasztaltunk. Miután egy előkezelés nélküli légcsőhöz képest a donor szerv csak a desquamálódott belfeszíni hámrétegének hiányában különbözik – kiindulva abból, hogy egy immunsuppressio nélküli allotransplantatio eleve kudarcra lenne ítélve – a cryopreservatiót tekintjük az elmaradt immunválasz okának [56].

Kísérletsorozatunk első fázisát sikeresnek értékeltük, kutyáknál a cryopreservált légcsősegmens biztonsággal felhasználható rövid szakaszú nyelőcsőhiány áthidalására. Vizsgálatunkban továbblépést a műtéti módszer human felhasználhatóságának kérdése jelentette.

3. Kísérleteink második sorozata: az emberi trachea cryopreservatiojának vizsgálata

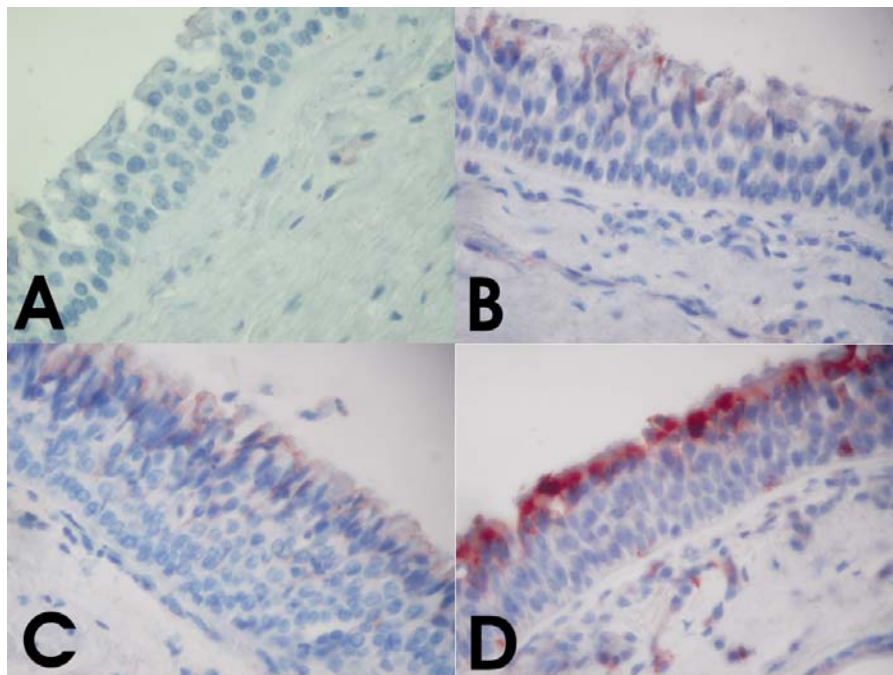
3.1 Bevezetés

Az állatokban végzett kísérletsorozatot sikeresnek értékelve kutatómunkánk második fázisában az eljárás human sebészeti felhasználhatóságára voltunk kíváncsiak. Az állatkísérletes modellből kiderült, hogy maga a műtét gyakorlott sebész számára technikai problémát emberben sem jelenthet. Másrésről a kutya és az ember immunológiája egymástól erősen eltérő, eddigi eredményeinkből human élettani következtetéseket levonni nem lehet. Ezért a vizsgálat e fázisában arra kerestük a választ, hogy a cryopreservatio befolyásolja-e az emberi trachea immunogenitását, illetve amennyiben igen, mi az előkezelés optimális időtartama.

3.2 Anyag és módszer

Tracheostomia során 50 betegből (átlagos életkor: 55 év (19-85), 34♂/16♀) a standard műtéti protokoll szerint eltávolított teljes falvastagságú trachea falat használtuk fel kísérletünkhöz. Az eltávolítást szikével végeztük, bipoláris ollót nem használtunk a termikus sérülések elkerülése érdekében. Az eltávolításra váró légcsőszakaszon a nyomási sérülések megelőzésére intubációs mandzsetta nem volt felfújva. A minták gyulladástól illetve malignus folyamattól - szövettanilag igazoltan - mentesek voltak.

Szövettani vizsgálatok: A légsődarabokat 4 részre osztottuk. Az első részt formalinba helyeztük és azonnal hisztopatológiai vizsgálatra küldtük (1. csoport). A másik három fragmentumot folyékony nitrogénbe helyeztük kettő (2. csoport), három (3.csoport) és négy hétre (4. csoport). Lassú, programozott hűtést nem alkalmaztunk, a testhőmérsékletű szervdarabokat egy lépésben a folyékony nitrogénbe helyeztük. Fokozatos felmelegítés után szövettani metszeteket készítettünk haematoxylin-eosin (HE) illetve MHC-II antigén specifikus antitest festéssel (HLA class II (DR)(NCL-LN3) antigen[®]; Novocastra Ltd.). Az immunhisztokémiai vizsgálat során a formalinban fixált, paraffinba ágyazott, majd 4µm vastagságúra lemetszett mintákat előkezelt tárgylemezre helyeztük. Az előkezeléshez 3-aminopropyltriethoxi-silane-t használtunk, majd a lemezt xylene oldattal deparaffináltuk, csökkenő töménységű (100 % → 70 %) ethanollal rehidráltuk. A metszeteket a hő-indukálta epitop kinyeréshez 0,01 mol/L koncentrációjú citrát pufferrel (pH 6,0) együtt mikrohullámú sütőben (Samsung Inc., Dél-Korea) 3x5 percig 900 Watt-on melegítettük. Az endogen peroxidase blokkolásához 3 %-os hydrogen-peroxid és tömény methanol oldatát használtuk 5 percig. A metszeteket ezt követően festettük meg az MHC-II antigén specifikus antitesttel. Az antigén-antitest komplex vizualizálásához jelölt streptavidin-biotint és amino-ethylcarbazon használtunk. Végül a környező szöveti struktúrákat Mayer-féle haematoxylinnal festettük meg. A vizsgálat a haematoxylin-eosin festéshez hasonlóan Dr Szilágyi Anna főorvos asszony felügyeletével történt. A festődés intenzitása alapján négy csoportot állítottunk fel:



15. ábra: MHC-II antigén specifikus antitest festődés alcsoportjai

0: nincs értékelhető reakció /15/A ábra/

+: néhány sejtmembránon és intracytoplasmaticusan sporadikus reakció /15/B ábra/

2+: számos sejten antigen-antitest reakció, de a festődés nem folyamatos /15/C ábra/

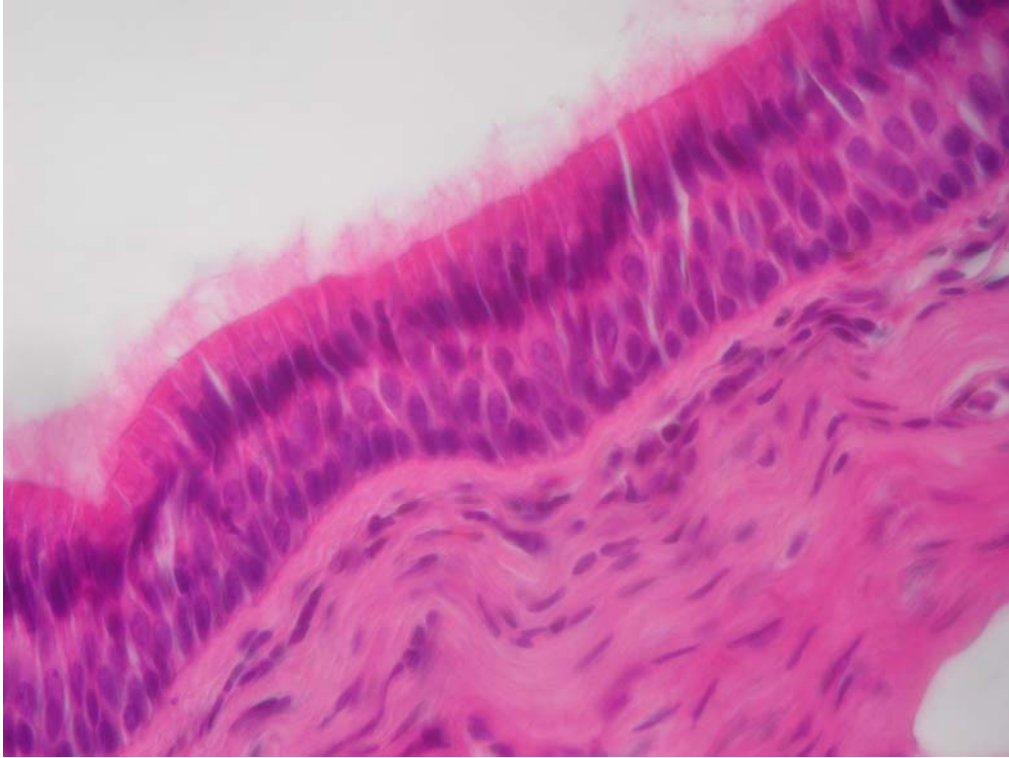
3+: összefüggő reakció, folyamatos festődés /15/D ábra/

Az osztályozás után Student T-tesztet használva csoportonként kiszámítottuk a festődés intenzitásának átlagát és a standard deviációt. A vizsgálatokat az érintett betegek teljeskörű felvilágosítása és a műtétbe történő beleegyezésük mellett végeztük el, a kutatómunka az operáció kiterjesztését nem tette szükségessé.

3.3 Eredmények

Az 50 mintából 4 nem volt szövettanilag kiértékelhető, mivel a preparátum nem tartalmazott a vizsgálathoz szükséges mennyiségű epitheliumot. Így a 46 légcsősegmensből 46x4, azaz 184 szövettani minta került feldolgozásra, statisztikai kiértékelésre. A haematoxylin-eosin festés során megfigyelhető volt, hogy a cryopreservatio nem hozott létre epithelium desquamatiót /16. ábra/. Az immunhisztikémiai reagens, gyártó által meghatározott membránfestődést okozó tulajdonságával szemben azt tapasztaltuk, hogy az MHC-II antitestek döntően az epithelialis sejtek apicalis részében, intracytoplasmaticusan helyezkednek el /15/D ábra/.

A festődés intenzitásának átlaga 1,5+ - 1,9+ között változott /II. táblázat/, egyértelműen csökkenő tendenciát mutatva (1,9+ → 1,5+), de a csoportok közötti különbség nem bizonyult szignifikánsnak.



16. ábra: trachea belfeszíni hámrétege a cryopreservatio után (HE, 40X)

➤ a metszeten jól látszik az épen maradt csillósörös hengerhám

II. táblázat: Az MHC-II antigén-specifikus antitest festődés intenzitása

Csoportszám	Intenzitás átlaga(0-3+)	S.D.
1. csoport	1.9+	0.538
2. csoport	1.7+	0.711
3. csoport	1.7+	0.763
4. csoport	1.5+	0.522

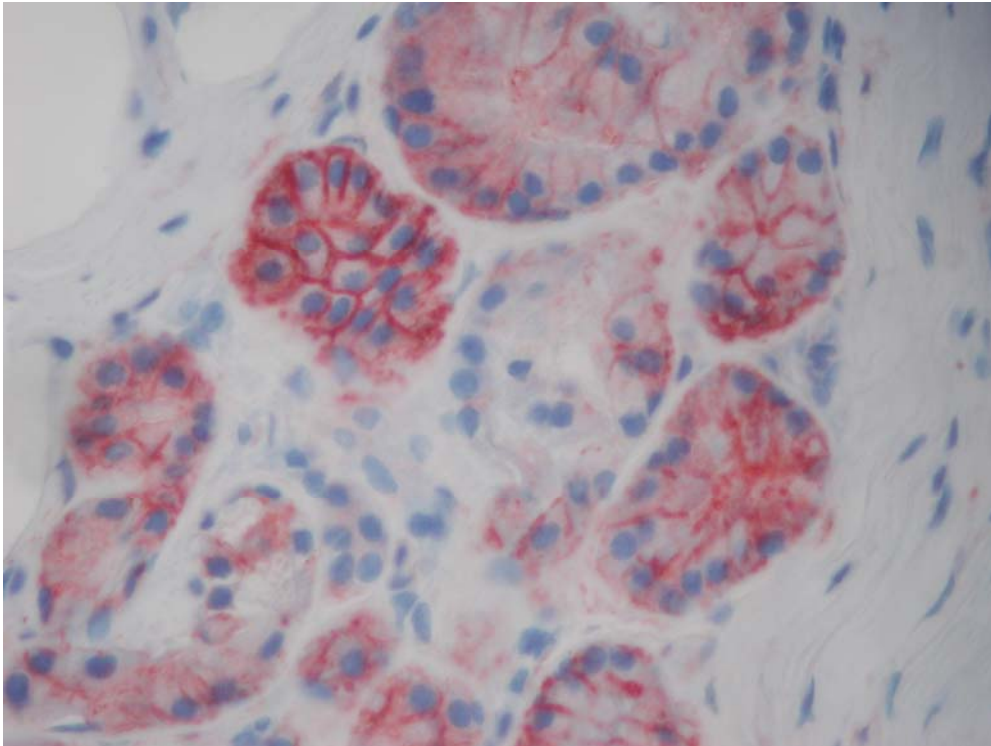
3.4 Konklúzió

Kutatómunkánk második fázisában a human trachea vizsgálata során arra voltunk kíváncsiak, hogy a cryopreservatio emberben is csökkenti-e a szerv immunogenitását. Miután in vivo vizsgálatokat végezni kutatás-etikai okok miatt nem lehet, keresni kellett egy olyan anatómiai képletet a tracheán, ami felelőssé tehető a szerv antigenitásáért és mindamellett könnyen vizualizálható, mennyisége mérhető. Választásunk az MHC-II antigénre esett.

A fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) géntermékei genetikailag meghatározott alloantigéneket tartalmazó sejtfelszíni fehérjék. Az MHC-I. osztályú molekulák - emberben történelmi hagyományok miatt human leukocyta antigénnek (HLA-A, -B, -C) nevezett képletek – minden magvas sejtünk felszínén megtalálhatóak. Az MHC-II. osztályú molekulák (emberben HLA-DR, -DP, -DQ) csak az immunválaszban részt vevő sejtek felszínén mutathatók ki.

Az emberi légcső belfelszínén a HLA class II antigének jelenlétét kutatócsoportok korábban már igazolták [57]. A human légcső cryopreservatiojának antigenitást befolyásoló hatását e felszíni antigén jelenlétének monitorizálásával kívántuk vizsgálni. Az eredmények a várakozásainktól eltérőek voltak. A hűtéssel történő előkezelés nem okozott belfelszíni hámdesquamatiót az emberi légcsövön, a többrétegű csillósörös hengerhám 4 hétig történő fagyasztás után is ép maradt. Vélhetően ezzel összefüggésben a felszíni MHC-II antigének festődésében bár egyértelmű csökkenést észleltünk, a változás a statisztikai kiértékelés alapján nem volt szignifikáns. Érdekes megfigyelés, hogy az antigén-antitest interakció döntően

intracytoplasmaticusan a sejtek apikális részében volt észlelhető, ellentétben a reagens gyári leiratával, mely membránfestődést említ. Véleményünk szerint ez a légső sajátossága, és nem reagens hiba, mivel a kontroll szöveteken (tonsilla illetve nyirokcsomó) a várt membránfestődést találtuk /17. ábra/.



17. ábra: MHC-II antigén specifikus reagens kontrol szöve (tonsilla) (HE, 40X)

4. Megbeszélés

Kutatómunkánk során az extraintestinalis szövetrel történő nyelőcsőpótlás lehetőségeivel foglalkoztunk.

Amennyiben a nyelőcső egésze vagy egy szakasza eltávolításra kerül, a szakmai irányelvek – ha a körülmények megengedik – az együlésben történő rekonstrukciót preferálják. A primer sutura csak igen rövid hiány esetén megengedett, már pár centiméteres hiatus esetén is a varratvonal feszülni fog, ami insufficienciához vezet. Ilyen esetekben a nyelőcső pótlása válik szükségessé. A nyelőcsősebészetben a gyomor, a vékonybél vagy a vastagbél neo-oesophagusként történő felhasználása szakmailag elfogadott és rutinszerűen alkalmazott módszer. Míg benignus esetekben elsődlegesen a legfiziológiásabb pótló szerv, a vékonybél használandó fel, addig daganatos megbetegedés esetén neo-oesophagus képzésre a gyomor a primeren választandó szerv. Ritkán előfordul, hogy ezek a szervek – vagy korábbi műtét, vagy szinkron betegség miatt - pótlásra alkalmatlanok illetve nem megfelelő hosszúságúak. Számos kutatócsoport foglalkozott a problémával, hogy ilyen esetben a nyelőcső mivel pótolható. Így kerültek felhasználásra prothesisek [58], composit graftok [35], biopolimerek [43], bőrcsőből [59], musculus latissimus dorsi musculocutan lebenyből [60,61], lyophilizált dura materből [62,63] készített „neo-oesophagusok”. A prothesisek vélhetően a rigiditásuk miatt, a composit graftok a túl bonyolult elkészíthetőségük miatt vezették a kutatást zsákutcába. A biopolimerekkel történő nyelőcsőpótlás ígéretesnek bizonyult. Az elmélet bár kiválónak tűnt, az igen bonyolult elkészíthetőség, a beépülés esetlegessége miatt az ezirányú felhasználhatóság nem váltotta be a hozzá fűzött

reményeket. A bőrcsőből, izomlebenyből készített graftokat a műtétet végző sebészek saját publikációikban is már eleve kényszer szülte megoldásnak tekintették, ráadásul az így képzett neo-oesophagusban több esetben megfigyeltek malignus átalakulást.

A funkcionalitás szempontjából a nyelőcső-transzplantáció lenne a legideálisabb, de napjainkban e szerv esetében a rejectio problémája még nem megoldott, a módszer sebésztechnikai oldalról is utópisztikusnak tűnik.

Így összességében elmondhatjuk, hogy siker egyiket sem koronázta, tökéletes módszert ezidáig nem sikerült kidolgozni. *Munkacsoportunk arra kereste a választ, hogy rövid szakaszú nyelőcsőhiány pótlására a légcső, mint tubuláris szerv, alkalmas lenne-e?*

Anatómiai szempontból a trachea nyelőcsőpótlásra ideális, a vérellátása szegényes, a porcos része szinte avascularis. Az utóbbi 20 évben számos kísérlet történt allogen légcsőseggel történő légcsőpótlásra, transzplantációra [46,64,65]. Megfigyelték, hogy a táplálásért felelős ellátó erek az anasztomózisok irányából nőnek be a graftba, ami a tapasztalatok szerint 5-6 cm-ben maximálja a graft lehetséges hosszát, ellenkező esetben számolnunk kell a középső rész necrosisával [47].

Japán kutatók eredményei szerint a légcső antigenitásáért, a következményes rejectioért felelős faktorok döntően a belfelszint borító epithelrétegen találhatóak. Amennyiben ezt a réteget el tudjuk távolítani, csökkenni fog a szerv immunogenitása. Állatkísérletes modellünkben a desquamatio elérésére a beültetés előtt a neo-oesophagusnak szánt légcsőseggel cryopreserváltuk. A hűtéssel történő előkezelést, mint immunsuppressív módszert, tekintettel a várható jégkristályképződésre, a kutatók nem tartják biztonságosnak. A sejt- illetve szövetkárosító kristályképződés kivédhető a

programozottan lassú lehűtéssel, vagy cryoprotectiv anyag hozzáadásával. Ezt mi nem tartottuk indokoltnak, véleményünk szerint a belfelszint borító epithelialis réteg magas folyadéktartalmú, azaz egy esetlegesen létrejövő jégkristályképződés az általunk kívánt hámdesquamatiót csak elősegítené. A műtét kivitelezése technikai nehézséget nem jelentett, a posztoperatív időszak problémamentesen zajlott. Kutyáknál a légcső átmérője valamivel kisebb, mint a nyelőcsőé. Ez az átültetés szempontjából nem jelentett hátrányt, a műtét után a nyelőcső perisztaltikus összehúzódása így nem vezetett a varratvonal feszüléséhez. Az állatok terminalizálása után a neo-oesophagus mérsékelt – centralis - szűkülését észleltük, ami azonban táplálkozási nehézséget nem okozott. Igen fontos, hogy a szűkülés mértéke szignifikánsan nem tért el egymástól a posztoperatív 6. és 8. hét között. Véleményünk szerint a normál, szilárd táplálék okozta mechanikus irritáció akadályozza meg a stenosis progressióját. A szövettani vizsgálatok szerint a graft beépült és megfelelően átvette a nyelőcső szerepét.

Mindez számunkra azt bizonyította, hogy kutyáknál a rövid – 5-6 centiméteres – nyelőcsőhiány pótlására a légcső alkalmas szerv, illetve a 21 napos cryopreservatio önmagában is alkalmas és elégséges módszer a graft antigenitásának oly mértékű csökkentésére, hogy biztonsággal megelőzzük a rejectiót.

Kutatásaink második fázisában arra voltunk kíváncsiak, hogy a módszer a human gyógyászatban is alkalmazható lenne-e. Itt a fő kérdés a hűtéssel történő előkezelés emberi trachea antigenitását befolyásoló hatása volt. 50 tracheostomian átesett beteg műtét során eltávolított légcsődarabját használtuk fel vizsgálatainkhoz. A mintákat 2,3,4 hétre folyékony nitrogénbe helyeztük. A kísérletsorozat e fázisában sem alkalmaztunk jégkristályképződést megakadályozó módszert. A kiolvasztás után

hisztológiai és immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk, a szövettani metszeteket haematoxylin-eosinnal illetve HLA class II (DR) antigén specifikus antitesttel festettük meg. A kutyánál tapasztalt változást azonban nem észleltünk, a cryopreservatio nem okozott belfelszíni epithelium desquamatiót. Bár a szerv immunológiai festődésének intenzitása jelentősen csökkent, ami várhatóan a légcső antigenitásának csökkenését is jelenti, az eltérés a hűtéssel elő nem kezelt és a 4 hétig cryopreservált csoportok között sem volt szignifikáns.

Összességében elmondhatjuk, hogy habár állatkísérletes modellen a cryopreservált trachea kiválóan alkalmas rövid szakaszú nyelőcsőhiány pótlására, emberben a hűtéssel történő előkezelés önmagában nem teszi alkalmassá a szervet az allotransplantációra. Miután a légcső anatómiai paramétereiben alkalmas szerv lenne neo-oesophagus képzésére, a műtéti módszer gyakorlott sebész kezében nehézséget nem jelenthet, a gondolatnak, hogy a human nyelőcső-hiányt légcsővel pótoljuk, volt létjogosultsága. Pozitív eredmény esetén következő lépésként terveink között szerepelt cadaver, cryopreservált légcsővekből „légcsőbank” létrehozása, mely állandó alternatív segítséget jelentene az operatőrnek, amennyiben intraoperatív rövid szakaszú nyelőcső-pótlási problémái akadnak. Ugyanakkor az általunk alkalmazott cryopreservatio a várt hatást a human légcsövön nem hozta létre.

Kutatómunkánk következő lépéseként arra kívánunk választ találni, hogy immunológiai szempontból miért viselkedik eltérően az állati, teljes légcső szegmens és az emberi trachea-darab. A cryopreservatio során az eddigi eredményekhez, mint kontrollhoz viszonyítva programozott, lassú hűtést illetve cryoprotectiv anyagot kívánunk használni. Ezen túl a kérdés már nem kutató-sebészeti probléma. Amennyiben

a jövő chirurgusaiban felmerül az igény a nyelőcső ilyen irányú pótlására, véleményünk szerint a továbblépést a gyógyszeres immunsuppressio finomodása jelentheti.

Ilyenirányú ígéretes próbálkozásról számolt be Genden és munkacsoportja, akik megfigyelték, hogy patkányoknál a trachea allografton kialakuló új belfelszíni hámréteg védő faktorként szolgál a rejectioval szemben; így csak addig (kb. 48 napig) kell immunsuppressív kezelést alkalmazni – protokolljukban Cyclosporin-A-t – ameddig a recipiensre jellemző epithelialisatio be nem fejeződik [66]. A másik út talán az őssejtkutatás lehet. A megoldás vajon egy pluripotens sejtekből arteficiálisan létrehozott nyelőcső lesz?

A bevezetőben felvetett kérdést így továbbra is nyitva kell hagyni!

5. Új eredmények összefoglalása

- állatkísérletes modellen igazoltuk, hogy a 21 napig tartó cryopreservatio a kutya légcsövön belfelszíni epithelialis réteg desquamatiót okoz, ennek következményeként a hűtéssel történő előkezelés önmagában is elégséges antigenitás csökkentő tényező a szerv sikeres allotransplantációjához

- kutyáknál a cryopreservált trachea alkalmas rövid szakaszú nyelőcsőhiány pótlására, a szerv a posztoperatív 4. hétre beépül a recipiens környezetbe, belfelszínét nyelőcsőre jellemző hám borítja

- az emberi trachea cryopreservatioja során 4 hét alatt sem alakul ki hámdesquamatio, a szerv antigenitását az előkezelés csökkenti, de szignifikánsan nem változtatja meg, ezért eredményeink birtokában igazoltuk, hogy a human trachea cryopreservatioja az általunk alkalmazott módszer esetében az antigenitást jelentősen nem befolyásolja, egy esetleges allotransplantációnál használata önmagában nem elegendő

6. publikációk, előadások

a. témában megjelent publikációk

Juhász Árpád, Botos Balázs, Sárkány Ágnes, Szontagh-Kisházi Péter, Varga István, Altorjay Áron: Mediastinális enterogen cysta sebészi kezelésének dilemmái. Orvosi hetilap 2005. Nov20;146(47):2417-2419

A Altorjay, **A Juhász**, V Kellner, G Sohar, M Fekete, I Sohar: Metabolic changes in the lower esophageal sphincter influencing the result of antireflux surgical interventions in chronic gastroesophageal reflux disease. World Journal of Gastroenterology 2005;11(11):1623-1628

Impact factor: 3,329

Á Juhász, A Szilágyi, I Mikó, I Altorjay, G Kecskés, Á Altorjay: Esophageal replacement using cryopreserved tracheal graft. Diseases of esophagus 2008(21):468-472

Impact factor: 1,027

Juhász Á, Szilágyi A, Rüll M, Róth E, Altorjay Á: A humán trachea cryopreservatioja az immunogenitás változásának tükrében. Magyar Sebészet. 2009;63(3):138-164

b. témához nem kapcsolódó publikációk

Juhász Árpád, Szilágy Anna, Első István, Tihanyi Zoltán, Paál Balázs, Altorjay Áron: Synchron nyelőcső és pajzsmirigy carcinoma. Orvosi Hetilap 2005.Aug 7;146(32):1697-9

Salló Z., Bezsilla I., Ferencs A., **Juhász Á.**, Lantos J., Róth E.: Oxidative stress parameters are valuable indicators of surgical trauma following laparoscopic or open correcting of duodenal perforation. Eur. Surg. Res. 32(S1),88;2000

Impact factor: 0,750

Altorjay A, Szilagyi A, Arato G, Balázs O, **Juhász A**, Kecskes G, Altorjay I, Kiss J, Nagy P: Morphological changes in the lower esophageal sphincter influencing the result of antireflux surgical interventions in chronic gastroesophageal reflux disease. Hepatogastroenterology 2006 May-Jun;53(69):342-7

Impact factor:0,937

Mucs M, Szekely I, Illes I, **Juhász A**, Paal B, Sarkany A, Madacsy L, Altorjay A: A truncus coeliacus kompressziós szindróma – a hasi angina „mostohagyermek”? Orvosi Hetilap 2007 Sep 1;148(37):1763-1766

Á Altorjay, Z Tihanyi, F Luka, **Á Juhász**, Zs Bencsik, M Rüll, G Kecskés, B Paál: Place and value of the recurrent laryngeal nerve (RLN) palpatory method in preventing RLN palsy during thyroid surgery. Head Neck 2009 Apr;31(4):538-547

Impact factor: 2,007

Összesített impakt faktor: 8,05

c. témában tartott előadások

Árpád Juhász: Esophageal replacement using cryopreserved tracheal graft. *11th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus. 10-13.Sept 2008 Budapest, Hungary*

Juhász Árpád: A human trachea cryopreservatioja az immunogenitás változásának tükrében. *Magyar Sebész Társaság XXII. Kísérletes Sebészeti Kongresszusa. Szeged, 2009.06.11-13.*

d. témához nem kapcsolódó előadások

Árpád Juhász: Investigation on the tissue injury at the reperfusion following a haemorrhagic shock. *9th European Congress for young doctors and medical students at the Charite, 1998. Berlin, Germany*

Árpád Juhász: Tracheal replacement by using autolog tissue. *European Congress of Medical Students and Young Physicians, 2001. Poznan, Poland*

Árpád Juhász: A case of a successfully operated 4-day-old synchron perforation of the esophagus and the duodenum treated by primer resection and substitution. *6th Annual Meeting of the European Society of Surgery, 2002. Budapest, Hungary*

Tihanyi Z, **Juhász Á**: Primer mesenchymalis gasztrointesztinális daganatok differenciáldiagnosztikája és kezelése. *Magyar Sebész Társaság 57. Kongresszusa, 2004. Pécs, Magyarország*

Juhász Árpád: Mediasztinális enterogen cysta kezelésének dilemmái. *Közép-dunántúli Orvosnapok, 2007. Székesfehérvár, Magyarország*

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom mindazoknak, akik ennek a dolgozatnak a létrejöttét segítették:

Témavezetőmnek, Prof. Dr. Róth Erzsébetnek, aki már az egyetemi évek alatt megismertette és szeretett velem a kísérletezésben rejlő izgalmat, tanácsaival, figyelmével segítette munkámat.

Dr. Szilágyi Anna főorvos asszonynak a kiváló szövettani feldolgozásokért illetve a metszetek elemzésében nyújtott segítségéért, Dr. Rüll Miklós főorvos úrnak a fül-orr-gégészeti mintákért tartozom köszönettel, nélkülük tudományos értékű dolgozat nem születhetett volna.

Köszönöm osztályunk dolgozóinak a baráti buzdítást, az őszinte érdeklődésükből fakadó kérdéseket, melyek ötleteket adtak, ezzel segítve a problémák megoldását.

Köszönettel tartozom családomnak, csak egy ilyen biztos, támogató „hátszág” mellett lehetett kiegyensúlyozott és eredményes a kutatómunka.

És legfőképpen soha el nem múló hálával tartozom mesteremnek, Prof. Dr. Altorjay Áronnak, aki türelmével, útmutató gondolataival segített át számomra megoldhatatlannak tűnő problémákon, el nem fogyó lendülete, életfilozófiája példaként szolgál számomra.

8. Irodalomjegyzék

1. M Brooker, A Zietmann: Clinical embryology. CRC Press 1998. Chapter 20 (page 84-86)
2. Berrocal T, Torre I, Gutierrez J et al: Congenital anomalies of the upper gastrointestinal tract. Radiographics, 1999(19)855-872.
3. Noguchi T, Hashimoto T, Takeno S et al: Laparoscopic resection of esophageal duplication cyst in an adult. Dis Esophagus, 2003(16)148-150
4. Juhász Á, Botos B, Sárkány Á, Szontagh-Kisházi P, Altarjay Á: Mediastinalis enterogen cysta sebészi kezelésének dilemmái. Orv Hetil. 2005 Nov 20;146(47):2417-9
5. Frering V, Velecela E, Fouque P et al: Upper digestive duplications in adults. Ann Chir. 1995(49)928-935
6. Singh S, Lal P, Sikora S et al: Squamous cell carcinoma arising from a congenital duplication cyst of the esophagus in a young adult. Dis Esophagus, 2001(14)258-261
7. Ioannides AS, Copp AJ: Embryology of oesophageal atresia. Semin Pediatr Surg. 2009 Feb;18(1):2-11
8. Ibrahim AH, Al Malki TA, Hamza AF, Bahnassy AF: Congenital esophageal stenosis associated with esophageal atresia: new concepts. Pediatr Surg Int. 2007Jun;23(6):533-7
9. Miller G: Complications of endoscopy of the upper gastrointestinal tract. Leber Magen Darm. 1987 Oct;17(5):299-304

10. Johnson SB: Esophageal trauma. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2008Spring;20(1):46-51
11. Kochhar R, Sethy PK, Kochhar S, Nagi B, Gupta NM: Corrosive induced carcinoma of esophagus: report of three patients and review of literature. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006 Apr;21(4):777-80
12. Keh SM, Onyekwelu N, McManus K, McGuigen J: Corrosive injury to upper gastrointestinal tract: still a major surgical dilemma. *World J Gastroenterol.* 2006 Aug 28;12(32):5223-8
13. Zargar SA, Kochhar R, Nagi B, Mehta S, Mehta SK: Ingestion of corrosive acids. Spectrum of injury to upper gastrointestinal tract and natural history. *Gastroenterology* 1989 Sep;97(3):702-7
14. de Schipper JP, Pull ter Gunne AF, Oostvogel HJ, van Larhoven CJ: Spontaneous rupture of the oesophagus: Boerhaave's syndrome in 2008. Literature review and treatment algorithm. *Dig Surg.* 2009;26(1):1-6
15. Altorjay Á, Kiss J, Vörös A, Bohák Á: Non-operative treatment of the oesophageal perforations. Is it justified? *Annals of Surgery* 1997.225(4):415-421
16. Altorjay Á, Kiss J, Vörös A, Szirányi E: The role of esophagectomy in the treatment of esophageal perforations. *Annals of Thoracic Surgery* 1998.65(5):1433-1436
17. Kiss J: Surgical treatment of oesophageal perforation. *British Journal of Surgery* 2008.95:805-806
18. Kiev J, Amendola M, Bouhaidar D, Sandhu BS, Zhao X, Maher J: A management algorithm for esophageal perforation. *American Journal of Surgery* 2007.194:103-106

19. Korst RJ, Altorki NA: High grade dysplasia: surveillance, mucosal ablation, or resectio? *World J Surg.* 2003 Sep;27(9):1030-4
20. Waxman I, Konda VJ: Mucosal ablation of Barrett esophagus. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009 Jun2. (Epub)
21. Horváth Örs Péter: A korai Barrett-carcinomák sebészi kezelése. *Magyar Sebészet.*2009;62(2):51-58
22. Altorjay Á, Pászti I, Kiss J, Tasnádi G: Gastrojejunal interposition for esophageal replacement. *Pediatric Surgery International* 1999.15:132-134
23. Schlemper RJ, Kato Y, Stolte M: Review of histological classification of gastrointestinal epithelial neoplasia: differences in diagnosis of early carcinomas between Japanese and Western pathologists. *J Gastroenterol.* 2001 Jul;36(7):445-56
24. Takubo K, Aida J, Sawabe M, Kurosumi M, Arima M et all: early squamous cell carcinoma of the esophagus: the Japanese viewpoint. *Histopathology.* 2007 Dec;51(6):733-42
25. Vörös A, Altorjay Á, Nagy P, Jakkel T, Bohák Á, Szántó I, Gamal EM, Kiss J: Wie radical soll das Ösophagus- und Kardiakarzinom operiert werden? *Zentralblatt Chirurgie* 2001.126:756-762
26. Deschamps C: History of esophageal surgery for benigne disease. *Chest Surg Clin N Am.* 2000 Feb;10(1):135-44
27. Raymond Maurice Kirk: *General surgical operations.* Elsevier Health Sciences, 2006. 5th edition (page 144-151)
28. Varga G, Cseke L, Kalmár K, Horváth ÖP: A duodeno-gastroesophagealis refluxbetegség sebészi kezelése: duodenal switch műtét. *Magy Seb.* 2007 Oct;60(5):243-7

29. Altorjay Á, Kiss J, Paál B, Tihanyi Z, Luka F, Farsang Z, Asztalos I, Altorjay I: The place of gastro-jejuno-duodenal interposition following limited esophageal resection. *European Journal of Cardiothoracic Surgery* 2005;28:296-300
30. Belsey R: Replacement of the esophagus with colon. *General thoracic surgery*. Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 6th edition (page2025-2033)
31. Kiss J: Gastroenterológiai sebészet. *Medicina*, 2002. (267-271.old.)
32. Cull DL, Lally KP, Mair EA, Daidone M, Parsons DS: Tracheal reconstruction with polytetrafluoroethylene graft in dogs. *Ann Thorac Surg*. 1990;50(6):899-901
33. Szántó Z, Benkő L, Gasz B, Jancsó G, Róth E: Politetrafluoroetilén alkalmazása hosszú szakaszú légcsőpótlásban. *Magyar Sebészet* 2003;56:68-72
34. Gonzale Saez LA, Arnal Monreal F, Pita Fernandez S, Machuca Sabta Cruz J: Experimental study using PTFE (Goretex) pathes for replacement of the oesophageal wall. *Eur Surg Res*. 2003 Jul-Aug;35(4):372-6
35. Takimoto Y, Nakamura T, Yamamoto Y, Kiyotani T, Teramachi M, Shimizu Y. The experimental replacement of a cervical esophageal segment with an artificial prosthesis with the use of collagen matrix and a silicone stent. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998; 116(1):98-106
36. Natsume T, Ike O, Okada T, Takimoto N, Shimizu Y: Porous collagen sponge for esophageal replacement. *J Biomed Mater Res* 1993 Jul;27(7):867-75
37. Natsume T, Ike O, Okada T, Shimizu Y, Ikada Y: Experimental studies of a hybrid artificial esophagus combined with autologous mucosal cells. *ASAIO Trans* 1990 Jul-Sep;36(3):M435-7

38. Salomon J, Nudelman I, Kissin L, Gassner S, Levy MJ: Experimental segmental replacement of esophagus by biological tissues. *Isr J Med Sci* 1977 Mar;13(3):272-7
39. Yamamoto Y, Nakamura T, Shimizu Y, Matsumoto K, Takimoto Y et al: Intrathoracic esophageal replacement in the dog with the use of an artificial esophagus composed of a collagen sponge with a double-layered silicone tube. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999 Aug;118(2):276-86
40. Kerényi G: Properties and applications of bioplast, an absorbable surgical implant material from fibrin. *Biomaterials*, 1980 Jan;1(1):30-2
41. Ranjha NM: Polymeric micelles of ammonium palmitoyl glycol chitosan and solubilization of camptothecin. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2009 Jan-Feb;63(1):81-7
42. Ya YQ, Yang FL, Hu FQ, Du YZ, Yuan H et al: Core-modified chitosan-based polymeric micelles for controlled release of doxorubicin. *Int J Pharm.* 2008 Mar 20;352(1-2):294-301
43. Kovács AB, Somogyvári K, Gerendás M: A bioplast lemezek felszívódásának vizsgálata. *Acta Vet Acad Sci Hung.* 1965;15:91-103
44. Altorjay Áron: A modern sebészet és a késői funkcionális eredmények „többismeretlenes egyenlete”. MTA Doktori Értekezés 2007.
45. Salassa J.R.: Gross and microscopical blood supply of the trachea. *The Annals of Thor. Surg.* 1997;24:100-107
46. Grillo HC. Tracheal replacement. *Ann Thor Surg.* 1990; 49:864-865
47. Aoki T, Yamato Y, Tsuchida M, Souma T, Yoshiya K, Watanabe T, Hayashi J. Successful tracheal transplantation using cryopreserved allografts in a rat model. *Eur J Cardio Thorac Surg.* 1999; 16:169-173.

48. Toyo T, Niwaya K, Sawabata N, Kushibe K, Nezu K, Taniuchi S, Kitamura S. Tracheal replacement with cryopreserved tracheal allograft – experiment in dogs. *Ann Thorac Surg.* 1998; 66:209-213.
49. Mazur P: Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 1970 May 22;168(934):939-49
50. Velikov V, Borick S, Angell A: The glass transition of water, based on hyperquenching experiments. *Science* 2001 Dec 14;294(5550):2335-2338
51. Pegg DE: Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol* 2007(368):39-57
52. Gál I, Nagy D, Furka I, Saortay S, Mikó I et al: Experimental study of autotransplantation of cryopreserved thyroid tissue in dogs. *Eur Surg Res.* 1994;26(Suppl 1):1-111
53. Leeton J: The early history of IVF in Australia and its contribution to the world (1970-1990). *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2004 Dec;44(6):495-501
54. Wusteman MC, Pegg DE, Robinson MP, Wang LH, Fithc P: Vitrification media: toxicity, permeability, and dielectric properties. *Cryobiology.* 2002 Feb;44(1):24-37
55. Wusteman MC, Robinson MP, Pegg DE: Vitrification of large tissues with dielectric warming: biological problems and some approaches to their solution. *Cryobiology.* 2004 Apr;48(2):179-189
56. Okumoto T, Yamane M, Sano Y, Aoe M, Date H, Shimizu N: Presensitization accelerates chronic allograft rejection in a heterotopic rat tracheal allograft model with immunosuppression. *Transpl Immunol.* 2007 Jun;17(4):249-54

57. Bujia J, Wilmes F, Hammer C, Kastenbauer E: Tracheal transplantation: demonstration of HLA class II subregion gene products on human trachea. *Acta Otolaryngol.* 1990;110(1-2):149-54
58. Freud E, Efrati I, Kidron D, Finally R, Mares AJ. Comparative experimental study of esophageal wall regeneration after prosthetic replacement. *J Biomed Mater Res.* 1999; 45(2):84-91.
59. Horvath OP, Cseke L, Borbely L, Vereczkei A, Hobor B, Lukacs L: Skin tube esophagus: present indications and late malignization. *Dis Esophagus* 2000;13(3):251-254
60. Yamata A, Wang K, Kobayashi H, Segawa O, Miyahara K, Sueyoshi N, Miyano T: Tubed latissimus dorsi musculocutaneous flaps for esophageal replacement in puppies: long-term follow-up. *J Pediatr Surg.* 2000; 35(11):1623-1625.
61. Hobor B, Borbely L, Halmos L, Horvath OP. The replacement of the esophagus by musculocutaneous flaps. *Acta Chir Hung.* 1997; 36(1-4):132-133.
62. Jacobs JP, Elliott MJ, Haw MP, Bailey CM, Herberhold C. Surgery for congenital heart disease. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996; 112:1549-1558.
63. Mattes P, Meister H: Esophageal replacement with lyophilized dura. *Langenbecks Arch Chir.* 1977; 343(2):93-105.
64. Macchiarini P, Manzmanian GM. Experimental tracheal and tracheoesophageal allotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995; 110:1037-1046.
65. Szántó Z: Hosszú szakaszú légcsőpótlás vizsgálata állatkísérletes modellekben. Doktori (PhD) értekezés 2004.

66. Genden EM, Govindaraj S, Chaboki H, Cleven H, Fedorova E, Bromberg JS, Majer L: Reepithelialization of orthotopic tracheal allografts prevents rejection after withdrawal of immunosuppression. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2005 Apr;114(4):279-88