

Humán ér pótlásra alkalmas decellularizált biológiai graft vizsgálata

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Fazekas Gábor

Témavezető:

Prof. Dr. Menyhei Gábor

Dr. Jancsó Gábor

Programvezető:

Dr. Jancsó Gábor



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Érsebészeti Klinika
Sebészeti Oktató és Kutató Intézet

Pécs, 2019.

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	5
1.1. Érsebészeti fertőzések	5
1.1.1. <i>Osztályozás</i>	5
1.1.2. <i>Kezelési lehetőségek</i>	6
1.1.3. <i>Alkalmazható grafitípusok</i>	7
2. Célkitűzések	9
3. Decellularizációs módszerek hatékonyságának összehasonlítása mechanikai tesztek, valamint fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján	11
3.1. Bevezetés	11
3.2. Anyag és módszer	13
3.2.1. <i>Sebészi előkészítés</i>	13
3.2.2. <i>Decellularizációs Módszerek</i>	14
3.2.2.1. <i>1-es Protokoll</i>	14
3.2.2.2. <i>2-es Protokoll</i>	14
3.2.2.3. <i>3-as Protokoll</i>	14
3.2.2.4. <i>4-es Protokoll</i>	15
3.2.3. <i>Fénymikroszkópos vizsgálatok</i>	15
3.2.4. <i>Elektronmikroszkópos vizsgálatok</i>	16
3.2.5. <i>Mechanikai tesztek</i>	16
3.2.5.1. <i>Nyomás-teszt</i>	16
3.2.5.2. <i>Varrat-megtartási teszt</i>	17
3.3. Eredmények	18
3.3.1. <i>Fénymikroszkópos vizsgálatok kiértékelése</i>	18
3.3.2. <i>Elektronmikroszkópos vizsgálatok eredménye</i>	21
3.3.3. <i>Mechanikai tesztek értékelése</i>	23
3.4. Megbeszélés	26

3.5. Következtetés	29
4. Decellularizált biograftok vizsgálata implantációt követően, 6 hónapos utánkövetés tükrében	30
4.1. Bevezetés	30
4.2. Anyag és Módszer	32
4.2.1. Sebészi előkészítés	32
4.2.2. Graftok decellularizálása	32
4.2.3. Állatkísérletek	33
4.2.4. Fénymikroszkópos vizsgálatok	34
4.2.5. Elektronmikroszkópos vizsgálatok	35
4.3. Eredmények	36
4.3.1. I. kísérlet: Az implantált, decellularizált sertés aorta-allograft vizsgálata	36
4.3.1.1. Fénymikroszkópos vizsgálatok kiértékelése	37
4.3.1.2. Elektronmikroszkópos vizsgálatok eredménye	39
4.3.2. II. kísérlet: Az implantált, decellularizált juh aorta-xenograft vizsgálata	40
4.3.2.1. Hisztológiai analízis	41
4.3.2.2. TEM vizsgálat értékelése	43
4.4. Megbeszélés	44
4.5. Következtetés	48
5. Az értekezés eredményei	49
6. Köszönetnyilvánítás	50
7. Irodalomjegyzék	51
8. Közlemények	56

Rövidítések jegyzéke

ECM	extracelluláris mátrix
PTFE	politetrafluoroetilén
NPWT	negative pressure wound therapy
N₂O	dinitrogén-oxid
NE	Nemzetközi Egység
PBS	foszfát pufferes sóoldat
SDS	nátrium-duodecyl-szulfát
NaN₃	nátrium-azid, Na-azid
HE	hematoxylin-eosin
MT	Masson-trichrome
TEM	transzmissziós elektronmikroszkóp
SMA	simaiizom actin
O	orcein
DNS	dezoxy-ribonukleinsav

1. Bevezetés

A tünetekkel járó alsó végtagi érszűkület megoldása több módszerrel lehetséges. Az egyre inkább teret nyerő intervencionális módszerek mellett még mindig a konvencionális érsebészeté a vezető szerep. Az elzáródás, az occlusio helyének és hosszúságának függvényében, direkt desobliteratioval (thrombendarterectomia), vagy hosszabb szakaszú elzáródás esetén, az obliterálódott érszakasz áthidalásával oldható meg. Ez utóbbi elvégezhető műér (dacron, PTFE), vagy saját, autológ vénagraft (saphena, karvéna) alkalmazásával, illetve a kettő együttes, úgynevezett composite graftként történő felhasználásával.

1.1. Érsebészeti fertőzések

1.1.1. Osztályozás

Mint ahogy a sebészet más területein is, úgy az érsebészetben is számolni kell fertőzéses szövődmények megjelenésével. A műérrel végzett áthidalások legrettegettebb szövődménye az alkalmazott érgraft infekciója, septicussá válása, melynek gyógyítása a mai napig is az érsebészet legnehezebb, igen magas morbiditással és mortalitással járó feladata. Az érsebészeti fertőzések osztályozása Szilágyi Imre nevéhez fűződik, aki azt elsőként publikálta a '70-es évek elején.¹ (1. Táblázat)

Grade I	A fertőzés csak a bőrt érinti
Grade II	A fertőzés a subcutan szöveteket is érinti, de nem érinti a rekonstrukció területét
Grade III	A fertőzés a rekonstrukció területét, a graftot és az érvarratot is érinti

1. Táblázat - Az érsebészeti fertőzések Szilágyi-szerinti beosztása¹

Enyhébb és ebből következően könnyebben kezelhető esetben pusztán csak *felületes sebfertőzés* alakul ki a beültetett érgraft érintettsége nélkül, azonban a fertőzés mélyre terjedése, a *rekonstrukció területének érintettsége*, esetleg a septicus folyamat *generalizálttá* válása igen komoly kihívás elé állítja a gyakorló érsebészt. Az infekció főbb okai közé

sorolható a műtét során bekövetkező kontamináció, a posztoperatív időszakban a műtéti területen kialakuló haematoma vagy seroma suppuratioja, a seb gangraena vagy trophicus seb talaján kialakult inficiálódása, illetve a gyulladás környezetből történő ráterjedése, pl. aorto-duodenalis fistula esetében. Ezen fertőzések kialakulhatnak a közvetlen posztoperatív időszakban, mint *korai fertőzés*, valamint jóval a műtétet követően. Ez utóbbi esetében *késői infekcióról* beszélünk.²

1.1.2. Kezelési lehetőségek

Felszínes fertőzések eredményesen kezelhetőek a mai világban minden beteg számára elérhető intelligens kötszerekkel, a megfelelő, modern sebellátási elvek betartásával, mely jelentősége a fertőzés mélyre terjedésének megakadályozása szempontjából is kiemelt fontosságú. Azonban a graftot érintő fertőzések adekvát terápiája ennél sokkal bonyolultabb, összetettebb feladat. A megfelelően megválasztott kezeléssel több szempontnak is eleget kell tennünk. Egyrészt a fertőzés tovaterjedését, generalizálttá válását, azaz a septicus állapot kialakulását kell megakadályoznunk, másrészt működő rekonstrukció esetén a revascularizált végtag vitalitásának megőrzésére kell törekednünk oly módon, hogy a fertőzött graft esetleges leválásából adódó septicus vérzést is kiküszöböljük.

Több módszert is eredményesen alkalmazhatunk a fertőzött műér kezelésében, melyeket a graft megtartása vagy eltávolítása alapján két nagy csoportra oszthatunk.² (2. Táblázat) Azonban az alábbi módszerek tükrében azt is elmondhatjuk, hogy végtagmentés és a beteg életben maradása, az esetek túlnyomó többségében csak a septicussá vált graft cseréjével biztosítható. Mint a 2. táblázat is mutatja, cseregraftként többféle opció közül választhatunk. A választást legfőképp a beteg általános állapota és az ebből eredő műtéti kockázat, a műtét elvégzéséig rendelkezésre álló idő (akut vagy elektív beavatkozásról van szó), valamint, és nem utolsósorban, az elérhető grafttípusok határozzák meg.

Graft eltávolítása	Graft megtartása
Helyreállítás nélkül (csak nem működő graft esetén jön szóba)	Lavage (szívó-öblítő drainage)
Extraanatomicus áthidalás	Izomlebens alkalmazása
Impregnált (ezüst vagy antibiotikum) műér használata	Részleges graft resectio és pótlás
Autológ graft használata (saphena, karvéna, mélyvéna, desobliterált artéria)	NPWT kezelés
Homograft beültetés	

2. Táblázat – Graftot érintő fertőzés kezelési lehetőségei ²

1.1.3. Alkalmazható grafttípusok

Cseregraftként az egyik alternatívát a különféle antisepticus anyagokkal, ezüsttel vagy antibiotikummal *impregnált graftok* felhasználása jelenti. Hazánkban széles körben elterjedt az ezüsttel impregnált graftok alkalmazása. Az ezüst több hétig is tartó antisepticus hatása mellett előnyük, hogy korlátlan mennyiségben és méretüket tekintve széles skálában állnak rendelkezésre, így akut beavatkozás során könnyen hozzáférhetőek. Hátrányuk a magas ár és az a tapasztalat, hogy sokszor maguk a silver graftok is septicussá válnak; ráadásul bizonyos országokban, mint például Németország vagy az Egyesült Államok, a használatuk manapság már nem engedélyezett, vagy soha nem is volt az. Hasonló előnyökkel és hátrányokkal bírnak az antibiotikummal impregnált graftok is.

A magas reinfekciós arány fordította a figyelmet a *biológiai graftok* irányába, melyekről közismert a fertőzésekkel szembeni magas ellenállás.

Az *autológ graft* - mely lehet mélyvéna, saphena, vagy karvéna, ill. desobliterált artéria - minden kétséget kizáróan a legjobb megoldás, azonban sok esetben nem áll megfelelő hosszúságú vagy minőségű érszakasz rendelkezésre, illetve, ha alkalmazható, igen nagy műtéti megterhelésnek teszi ki a beteget, így felhasználása csak válogatott beteganyagon jöhet szóba.

Az egyre inkább teret hódító *cadaver, cryopreservált allograftok* jó megoldást nyújtanak, azonban magas árak mellett jelenleg korlátozott mértékben állnak rendelkezésre, ráadásul előállításuk, tárolásuk speciális infrastruktúrát igényel. Alkalmazásukkor, hosszú távon, a kiváltott immunreakció következtében létrejövő graftdegenerációval is számolni kell.

A biológiai graftok harmadik csoportját a más faj egyedeiből származó, ún. *xenograftok* adják. Előnyük, hogy megfelelő biomechanikai tulajdonságokkal bírnak, biológiai mivoltukból adódóan jól ellenállnak a fertőzéseknek, és korlátlan mennyiségben előállíthatók.^{3,4,5} Hátrányuk azonban, hogy immunválaszt váltanak ki.^{3,5,6} A xenograftok immunogenitásának csökkentése a graftok decellularizálásával lehetséges.^{3,6,7} Ennek során minden sejtes elemet eltávolítunk a célszervből, vagy szövetből úgy, hogy annak kötőszövetes vázát eredeti állapotában, szerkezetében megőrizzük.^{3,6} A sejtmentesített szövet beültetését követően lehetőség nyílik a recipiens sejtek migrációjára, megtelepedésére, az új szövetben történő proliferációjára, differenciálódására, ezáltal megelőzve az implantátumra káros immunválasz kialakulását.^{3,4,7}

Az 1980-as években biztató kezdeti eredményeket mutató kísérletek folytak a xenograftok humán felhasználásával kapcsolatban, de a graftok késői degenerálódásából következő gyakori kedvezőtlen kimenetel hosszú időre háttérbe szorította a fejlesztésükkel, további felhasználással kapcsolatos kísérletezéseket, törekvéseket.^{8,9} Azonban az érsebészet és fegyvertárának jelen századunkban tapasztalt rohamos fejlődése, illetve a jelentősen megnövekedett esetszám miatt arányosan gyakrabban előforduló érsebészeti komplikáció ismételten a biológiai érgraftok fejlesztése, az ún. „tissue-engineering” irányába fordította a figyelmet.

2. Célkitűzések

Munkánk célja egy olyan biológiai graft előállítás volt, amely az előbbieken említett és széles körben használt grafttípusok előnyös tulajdonságait egyesítve, a septicus érsebészetben alternatívát nyújtó cseregraftként alkalmazható lenne.

Elvárásaink a grafttal szemben:

- megfelelő sebészi kezelhetőség
- adekvát biomechanikai paraméterek
- fertőzésekkel szembeni magas rezisztencia
- könnyű és olcsó előállítás
- korlátlan hozzáférhetőség

Az **első kísérletsorozatban** korábbi publikációkban igazoltan eredményes és ezáltal szélesebb körben alkalmazott decellularizációs módszerek összehasonlító vizsgálatát végeztük, figyelve arra, hogy az általunk kiválasztott metodikák között mind fizikai, mind kémiai, mind pedig enzimatis kezelésem, illetve ezek kombinációján alapuló protokollok is szerepeljenek. A különböző módszerek hatékonyságát fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok, valamint mechanikai tesztek alapján elemeztük. A szövettani vizsgálatok során a kezelt aortafalban megmaradó sejtes elemek mennyiségére és minőségére, valamint a kötőszöveti rostok szerkezetének és lefutásának változására voltunk kíváncsiak. A mechanikai tesztek során az egyes eljárásokkal decellularizált grafttípusok, valamint a kezelt graft és a natív aorta között készített éranastomosisok intraluminális nyomással szembeni ellenállását, tartását vizsgáltuk. Ezek alapján választottuk ki a legideálisabb decellularizációs protokollt, melyet a további kísérleteinkhez, az állatokon végzett tanulmányhoz felhasználtunk.

Tanulmányunk **második részében** az általunk legjobbnak bizonyult decellularizációs eljárással előkészített aortaszakaszokat implantáltuk steril, műtéti körülmények között sertések infrarenalis aortájába. Az állatkísérletek *első szakaszában* decellularizált *sertés*aortát, mint allograftot, majd a *második szakaszban* sejtmentesített *juha*aortát, mint xenograftot használtunk fel. A tervezett 6 hónapos utánkövetés elteltével a sertések infrarenalis aortaszakaszát az implantátummal együtt resecaltuk, majd a mintákat makroszkópos, fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatoknak vetettük alá.

Arra kerestük a választ, vajon in vivo, az implantátum által kiváltott immunológiai viszonyok között, a beültetett minták mekkora hányada marad nyitva, illetve milyen arányban fordul elő makroszkóposan is észlelhető degeneráció az utánkövetés során, mind az allo-, mind a xenotranszplantáció esetében. A különféle specifikus festésekkel elvégzett szövettani és

elektronmikroszkópos vizsgálatok célja az eredetileg sejtmentes implantátumokban és a környező aortafalban létrejövő sejtszintű és szerkezeti változások kiértékelése, a kötőszöveti rostszerkezet megtartottságának vizsgálata, az újonnan megjelenő sejtes elemek (fibroblastok, myofibroblastok, simaizomsejtek, endothel) minőségi és mennyiségi elemzése volt. Mindezek tükrében a decellularizált biológiai graft későbbi, potenciális humán felhasználhatóságára kívántunk következtetni.

3. Decellularizációs módszerek hatékonyságának összehasonlítása mechanikai tesztek, valamint fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján

3.1. Bevezetés

A transzplantáció, legyen szó szervekről vagy csak szövetekről, az utóbbi évtizedekben rohamos fejlődést mutatott, köszönhetően az egyre nagyobb szükségleteknek és az orvostudomány fejlődésének, beleértve az esztétikai sebészetet úgy, mint a végstádiumú szervelégtelenség kezelését. A növekvő igény, melyet a humán források már nem képesek teljesen kielégíteni, következtében egyre nagyobb figyelem és fejlesztés fordítódott a mesterséges szövet- és szerv előállítás, az ún. tissue-engineering irányába. Utóbbi célja olyan decellularizált biológiai anyag előállítása, amely mintegy vázként szolgál a recipiens sejtek megtelepedésének, növekedésének, differenciálódásának és a szövet kialakulásának.¹⁰ A decellularizációs eljárások során a szövet vagy szerv minden celluláris és nucleáris komponensét eltávolítjuk úgy, hogy a visszamaradó extracelluláris mátrix (ECM) biológiai aktivitását és mechanikai integritását megőrizzük, minimalizálva annak szerkezeti károsodását.^{3,6} Az eredeti szövetből így nyert sejtmentes ECM, mint „biológiai váz”, felhasználható rekonstrukciós céllal, mesterséges szövet-, illetve szervpótlásra.^{10,11} Mind az allogén, mind a xenotransplantatio legfontosabb limitáló tényezője a donor sejtek felszíni antigénjei (melyeket a fogadó szervezet immunrendszere idegenként ismer fel) által a recipiensben kiváltott donor-ellenes antitest termelődés, ami gyulladáshoz és immunológiai válaszhoz, végül az implantátum immun-mediált rejectiójához vezet.^{6,12} Ezt hivatott az implantátum decellularizálása kivédeni a sejt elemek, antigének eliminálásával. Az ECM komponensei rendszerint hasonlóak a fajok között, így még eltérő fajú recipiens esetén is jól tolerálhatóak.⁶ Az ECM recipiens sejtek általi recellularizációja szintén fontos mozzanat a nem kívánt immunreakció elkerülésére.¹⁰

Napjainkban többféle ECM váz áll rendelkezésre kereskedelmi forgalomban.¹⁰ Decellularizált szövetek és szervekből származó biológiai vázak sikeres felhasználásáról állatokon végzett tanulmányok és humán klinikai felhasználások is beszámolnak.^{6,13,14,15,16,17} Sokféle szövettípusból vagy szervből származó ECM vázat tanulmányoztak regeneratív felhasználási céllal, mint pl. inak, szalagok, idegek, vázizomzat, húgyhólyag vagy máj⁶; azonban talán legszélesebb körben a szívbillentyűk és az erek kerültek a kísérletek

célpontjába. Felhasználás előtt a vizsgált graftokat valamilyen módszerrel decellularizálják. A vonatkozó szakirodalmat áttekintve számos hatékony protokollt találtunk, melynek segítségével effektíven sejtmentesíthetőek a szövetek, azonban a decellularizáció hatékonyságában, az eredeti vázszerkezet megkímélésében, illetve a kezelésen átesett érgraft mechanikai tulajdonságaiban, az egyes eljárások között jelentős különbség mutatkozik. Célunk a leghatásosabbnak talált, széles körben elterjedt kezelési eljárások összehasonlítása volt mechanikai tesztek és szövettani vizsgálatok tükrében.

3.2. Anyag és módszer

3.2.1. Sebészi előkészítés

Jelen tanulmány megfelel a US National Institute of Health (NIH Publication No.85-23, revised 1996) által publikált Guide for the Care and Use of Laboratory Animals előírásainak, melyet a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága jóváhagyott.

A tanulmány során mindkét nemből vett, 22-25 kilogramm közötti testtömegű, Yorkshire sertéseket használtunk fel, melyek mindennemű klinikailag nyilvánvaló megbetegedéstől mentesek voltak. A sertések 15mg/ttkg ketamine-hydrochloride-ot (Vetalar, Fort Dodge) és 3 mg/ttkg xylazine-hydrochloride-ot (Sigma-Aldrich) tartalmazó, intramuscularis injekció beadásával premedikációban részesültek, majd steril műtői körülmények között lettek elaltatva. Anesztéziájuk során 3 mg/ttkg ketamine-hydrochloride és 1-2 mg/ttkg xylazine-hydrochloride óránkénti folyamatos intravénás adását alkalmaztuk. Ezt követően intratrachealis tubus behelyezése történt, majd az állatok mechanikus lélegeztetése (Harvard) a tubuson keresztül, 1 l/perc oxigénnel és 3 l/perc dinitrogén-oxiddal (N₂O) dúsított levegővel történt. A jobb oldali vena jugularis externaba vénakanült helyeztünk, melyen keresztül biztosítottuk a szükséges intravénás gyógyszerek, valamint az infúziók adását. Fiziológias sóoldat lassú, folyamatos infúziójával tartottuk fenn az állat normál hidratáltságát a műtét folyamán.

Az előkészítést követően a műtőasztalon, a sebészeti alapelveknek megfelelő lemosást és izolálást követően total median laparotomiából nyitottuk meg a hasüreget. A beleket eltartva a retroperitoneumban kipropráltuk a hasi aorta infrarenalis szakaszát. 2500 Nemzetközi Egység (NE) Natrium-heparin intravénás adását alkalmaztuk a véralvadás gátlása érdekében. A kísérleteinkhez szükséges érszakasz eltávolításának idejére az aortát DeBakey érkirekesztő segítségével rekesztettük ki. A beavatkozást követően a hasfalat loop segítségével zártuk, majd tova futó Donati bőrvarrattal fejeztük be a műtétet.

3.2.2. Decellularizációs Módszerek

Infrarenalis aorta-szegmentumokat metszettünk ki frissen az altatott sertésekből. Miután eltávolítottuk a környező kötőszövetet, makroszkóposan vizsgáltuk meg a mintákat, így kizárva minden látható pathológiás elváltozást. Miután mindent rendben találtunk, a kb. 8mm átmérőjű és 2 cm hosszú érfaldarabokat foszfát pufferes sóoldatba (PBS; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) helyeztük, azzal a mintákat mostuk, hogy minden reziduális véralkotó-elemet eltávolítsunk róluk. Minden alább részletezett protokoll szerint 8 mintát (n=8) vizsgáltunk.

3.2.2.1. 1-es Protokoll

A frissen eltávolított aorta szegmentumokat mélyfagyasztási eljárással -80° Celsius-fokra hűtöttük, majd így tároltuk a további felhasználásig.

3.2.2.2. 2-es Protokoll

Az aorta-szegmentek decellularizálása szobahőmérsékleten, 48 órán át tartó folyamatos rázás mellett, 1%-os nátrium-duodecyl-szulfát (SDS; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), és 0.05%-os nátrium-azid (NaN_3 ; Alfa Aesar GmbH & Co, Karlsruhe, Germany), PBS-ben elkészített oldatával (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) történt. Az oldatot 6 óránként újra cseréltük. A decellularizációs folyamat végén a minták 12 órás mosása következett PBS-ben, a maradék detergens és sejttörmelék teljes eltávolítása érdekében.^{18,19}

3.2.2.3. 3-as Protokoll

Az aorta-szegmentek decellularizálása 0.075%-os SDS PBS-ben készített oldatával, folyamatos, 15 órán keresztül tartó rázás mellett, 37° Celsius-fokos hőmérsékleten történt. Ezt a folyamatot, ugyanezen hőmérsékleten 5, egyenként 15 perces öblítési ciklus követte PBS-ben.³

3.2.2.4. 4-es Protokoll

Az aorta-szegmentek decellularizálása 0.25%-os Triton X-100 (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Germany) és 0.25%-os nátrium-deoxycholát (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) PBS-ben készített oldatával kezdődött. A minták folyamatos rázás melletti, 24 órás, szobahőmérsékleten történő kezelését egy 72 órás mosási ciklus követte 4° Celsius-fokon, Earle-féle Medium 199-ben (Medium 199 with Earle's salts; Biowest, Nuaille, France). A mosási ciklust követően a mintákat 100 g/mL RNase A-t (Applichem GmbH, Darmstadt, Germany), 150 IU/mL DNase I-et (Applichem GmbH, Darmstadt, Germany) és 50 mmol MgCl₂-ot (Reanal Zrt., Budapest, Hungary) tartalmazó PBS-ben kezeltük 24 órán át, 37° Celsius-fokos hőmérsékleten. A nukleáz-emésztés után a minták ismételt, 24 órás mosási cikluson estek át Earle-féle Medium 199-ben, 4°C-fokon.³

3.2.3. Fénymikroszkópos vizsgálatok

A fenti decellularizációs módszerekkel kezelt aortafal-szegmentek fixálása 10%-os neutrális formalinban, 24 órán át történt a rutin szövettani vizsgálatok elvégzése céljából. A hossz- és keresztmetszeti szövetblokkokat paraffinba ágyasztuk, majd 2-4 mikrométer vastagságú metszeteket készítettünk. Az így előkészített metszeteket 3 különböző szövetfestési-eljárásnak vetettük alá, a gyártók által javasolt protokollok alapján. A Hematoxylin-eosin (HE) festéssel a különféle decellularizációs protokollok sejtmontesítő hatását, illetve annak hatékonyságát kívántuk szemléltetni. Az Orcein (Bio-Optica, Milano, Italy) és Masson-trichrome (MT; Bio-Optica, Milano, Italy) hisztokémiai festésekkel illusztráltuk az egyes protokollok által kezelt aortafal-darabokban a kötőszöveti rostszerkezetet, annak változását, illetve az elasztikus és kollagén rostok prezervációját. A szövettani elemzésekhez a Panoramic Viewer software-t (3DHistec Ltd.) és 100-szoros nagyítást alkalmaztunk. A sejtmagok jelenléte, avagy hiánya, és az ECM szerkezetének megőrzése, összehasonlítva a natív, kezeletlen mintákkal, két független vizsgáló által került kiértékelésre.

3.2.4. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

Az érfalminták transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatát végeztük el. A vizsgálatot megelőzően a minták fixálása 2%-os formaldehidből és 2.5%-os glutáraldehidből álló oldatban, 12 órán át, 4°C-fokon történt. Ezt követően 50-60 nanométer vastagságú szeletek készültek, melyek vizsgálata JEOL JEM-1200EX II típusú TEM használatával, 80kV-on történt. A különböző kezelések hatékonysága, a sejtek és sejtmagok jelenlétének vagy hiányának, illetve az ECM szerkezetében bekövetkező változások alapján került kielemezésre, két független vizsgáló által.

3.2.5. Mechanikai tesztek

A mechanikai tesztekhez 3-4 cm hosszú érszakaszokat használtunk, melyeket a sertések infrarenalis aortájából távolítottunk el. Minden decellularizációs protokoll szerint kezelt érszakaszból négy mintát (n=4) vizsgáltunk az egyes mechanikai tesztek során. Az erek disztális végét 6/0-ás Prolene tova futó érvarrattal zártuk. Az oldalágakat, amennyiben voltak, 2/0-ás Polypropylene fonállal ligáltuk. A proximális vég kanülálása hagyományos vénakanül felhasználásával történt, majd ez a vég 2/0-ás Polypropylene fonállal került lezárásra és rögzítésre a kanülhöz. A nyomástesztekhez ballondilatációs pumpát (Cook Medical, Alabama, USA) használtunk, a tesztekéről fotódokumentációt készítettünk.

3.2.5.1. Nyomás-teszt

A nyomás-teszt során mind a 4 decellularizációs protokoll szerint kezelt érszakaszt vizsgáltuk, összehasonlítva friss, natív aorta-szegmentumokkal. A minták fentiek szerinti előkészítését (a disztális vég lezárását és a proximális vég kanülhöz való fixálását) követően, először 37°C-fokos PBS-sel átmostuk, a reziduális levegő eltávolítása céljából. Ezt követően az ereket a ballonpumpa segítségével és 37°C-fokos PBS használatával lassan feltöltöttük, az intralumináris nyomást 225 Hgmm-ig emelve. Ezt a procedúrát 5 alkalommal, egyenként 5 percig alkalmaztuk minden egyes mintán. A fotódokumentációval a megfelelő mechanikai stabilitást igazoltuk mindegyik kezelt és a natív minta esetében.

3.2.5.2. Varrat-megtartási teszt

A varrat tartásának igazolására elsőként anasztomózist készítettünk a kezelt és natív érszakaszok között, 6/0-ás Prolene, tova futó érvarrattal. Ezt követően a disztális véget, amely minden esetben a kezelt érszakasz volt, lezártuk, a proximálisat, tehát a kezeletlen szakaszt pedig a kanülhöz rögzítettük, a fentebb említetteknek megfelelően. A levegőtlenített mintákat, illetve az anasztomózisokat, a nyomás folyamatos emelésével, 37°C-fokos PBS befecskendezésével, szintén 225 Hgmm legnagyobb intralumináris nyomásnak tettük ki, fenntartva ezt a nyomást ötször 1 percig. A fotódokumentáció a kielégítő varrat-megtartást volt hivatott demonstrálni.

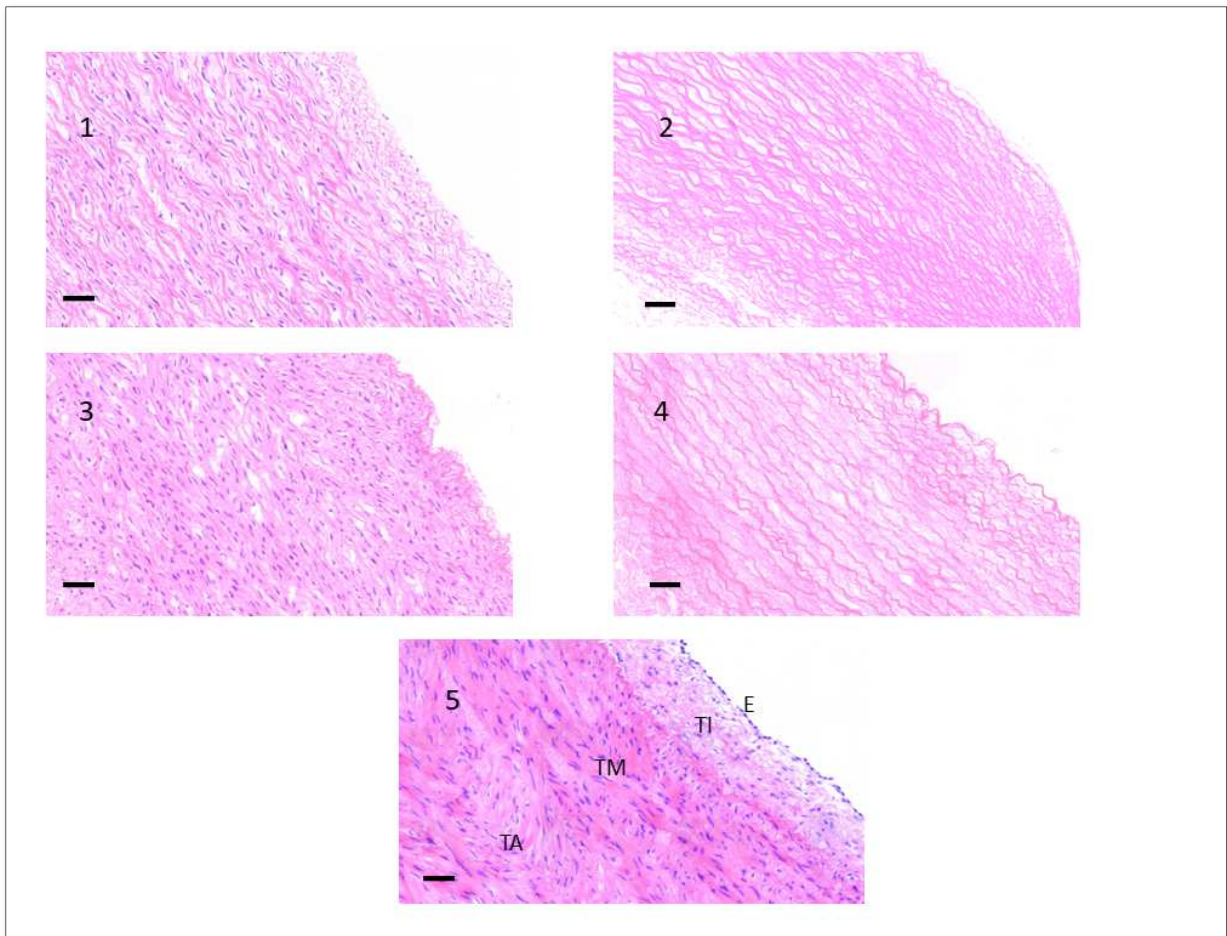
3.3. Eredmények

3.3.1. Fénymikroszkópos vizsgálatok kiértékelése

A decellularizációs metódusok hatékonyságának kiértékelése a szövettani leleteken alapult, melyek eredménye teljes mértékben egyformának bizonyult az azonos eljárással kezelt minták között. Kontrollként kezeletlen, natív aortafalat vetettünk alá ugyanazon festési módszereknek, annak meghatározásához, hogy melyik protokoll volt a legeredményesebb a sejtmentesítés vonatkozásában, illetve a kötőszöveti rostok struktúrájának megőrzésében.

Mindenekelőtt, a minták HE festését végeztük el annak igazolására, vajon a kéken festődő sejtmagok a decellularizációs eljárást követően eltűnnek-e, vagy valamilyen arányban megmaradnak a kezelt mintákban. Eredményeink azt mutatták, hogy az 1-es és 3-as Protokoll szerint kezelt szövetek nem bizonyultak hatékony sejtmentesítési eljárásoknak, melyet a mintákban a natív szövetet megközelítő arányban maradtak vissza sejtmagok. Ezekkel szemben, azonban a 2-es és 4-es Protokollal kezelt aortafalban a sejtmagok, és ebből következően a sejtes elemek komplett eltűnését észleltük, így ezek a módszerek effektívnek bizonyultak. **(1. ábra)**

Előbbiekből következően a specifikus, Orcein és MT hisztokémiai festéseket már csak ezen kettő sejtmentesítési eljárással (2-es, 4-es Protokoll) kezelt minták esetében végeztük el, majd vizsgáltuk az elasztikus és kollagén rostok szerkezetét. Összehasonlítva a natív szövettel, csak két réteg, a tunica media és adventitia volt bizonyossággal elkülöníthető a vizsgált szövettani metszetekben, valamint megfigyelhető volt a falvastagság következetes csökkenése mindegyik kezelt csoportban. Mindkét Protokoll esetében csak egy minimális változást észleltünk a rostok szerkezetében, azonban számottevő szöveti destrukció nem volt megfigyelhető. A kötőszöveti rostok lefutása döntő többségében szabályosnak és rendezettnek mutatkozott a kezelt csoportokban. Mindazonáltal, a 4-es Protokoll szerint kezelt metszetekben, a luminális felszín közelében, néhány hullámosabb lefutású és enyhén töredezett rost volt felfedezhető, ami egyértelműen a kötőszövetes váz enyhe fokú károsodására utal. **(2. ábra)**

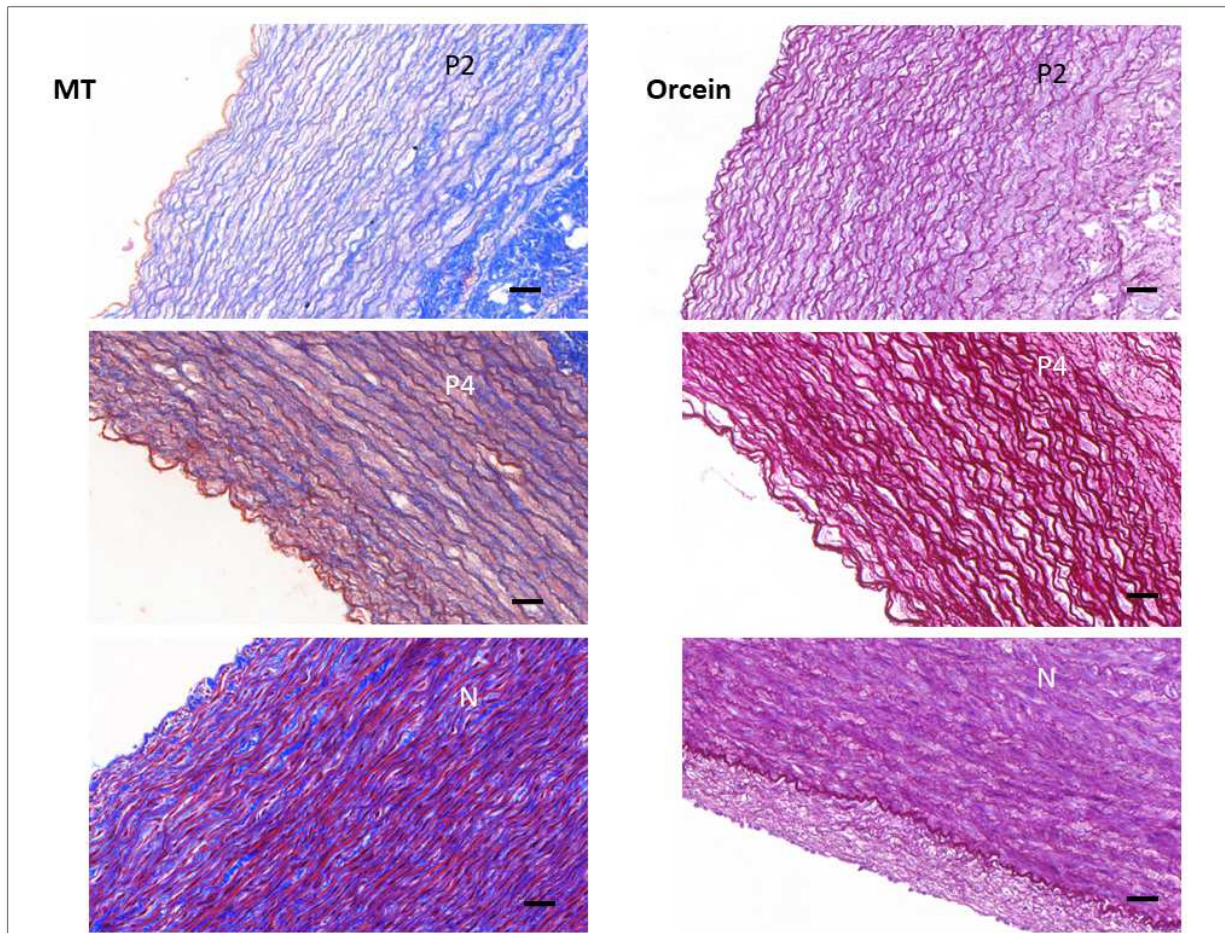


1. ábra

Decellularizált és a kontroll, natív sertés aortafal haránt metszetének Hematoxylin-eosin (HE) festése, kéken festődnek a sejtmagok. Sáv=50 μ m

- 1) 1-es Protokoll szerint kezelt aortafal, kéken festődő sejtmagokkal
- 2) 2-es Protokoll szerint kezelt aortafal, sejtmag nem látható
- 3) 3-as Protokoll szerint kezelt aortafal, kéken festődő sejtmagokkal
- 4) 4-es Protokoll szerint kezelt aortafal, sejtmag nem látható
- 5) Natív, kezeletlen aortafal

(E: endothel, TI: tunica intima, TM: tunica media, TA: tunica adventitia)



2. ábra

Decellularizált és a kontroll, natív sertés aortafal haránt metszetének Masson-trichrome (MT) és Orcein festése. Az első, MT festéssel készült oszlopban kéken festődnek a kollagén rostok, míg a második, Orcein festéssel készült oszlop metszetein a barnán festődő elasztikus rostok figyelhetőek meg. Sáv=50 μ m

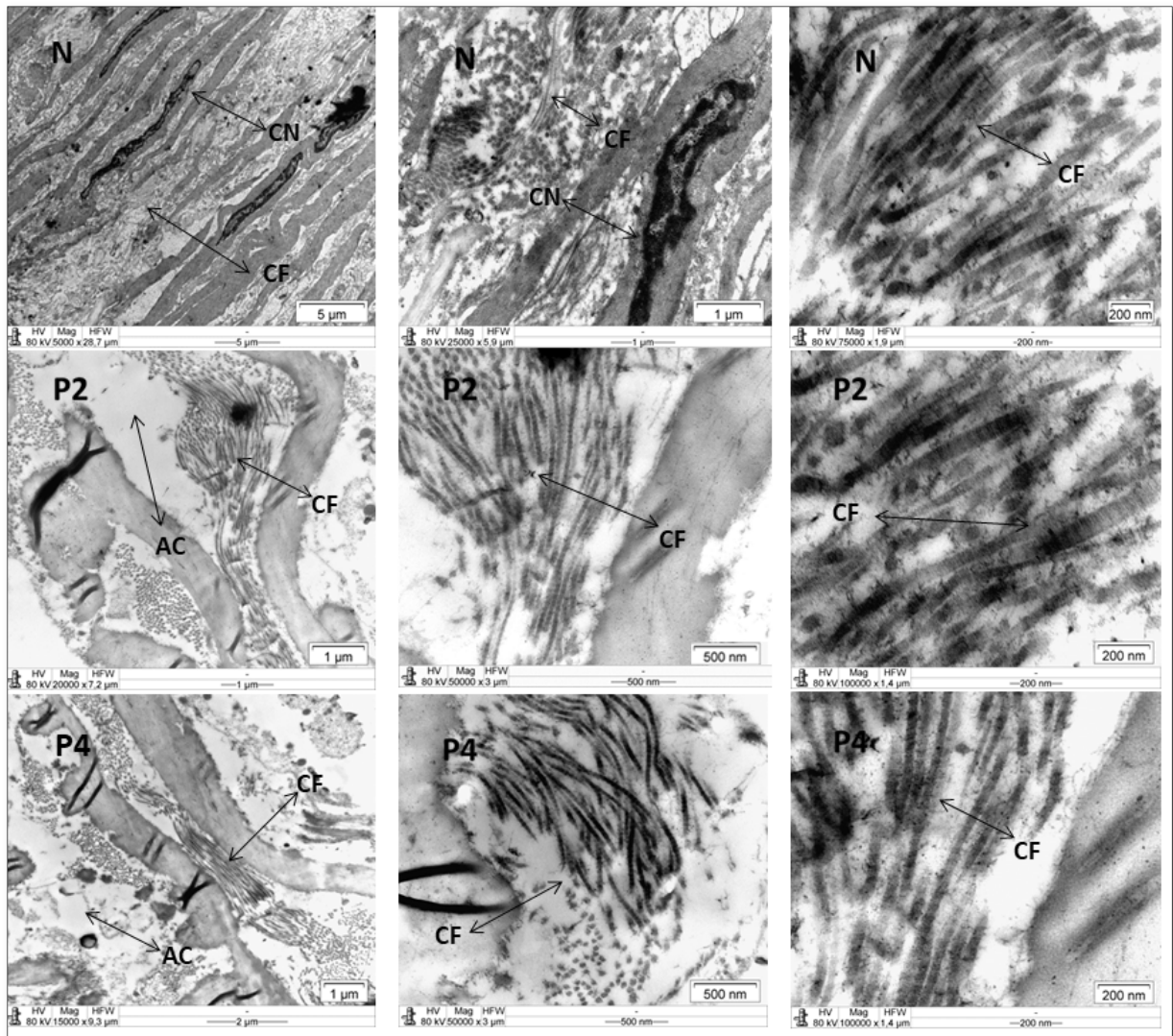
P2) 2-es Protokoll szerint kezelt aortafal

P4) 4-es Protokoll szerint kezelt aortafal

N) Natív, kezeletlen aortafal

3.3.2. Elektronmikroszkópos vizsgálatok eredménye

A 2-es és 4-es Protokoll szerint kezelt aortafal transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) képein nem volt észrevehető különbség, mindkét módszerrel kezelt metszeteken egyértelműen látszik a sejtes elemek hiánya és a kötőszöveti rostok szerkezetének megtartottsága. **(3. ábra)** Mivel a hagyományos hisztológia alapján az 1-es és 3-as Protokoll nem effektív a sejtmentesítésben, így ezen metszetek TEM vizsgálatától eltekintettünk.



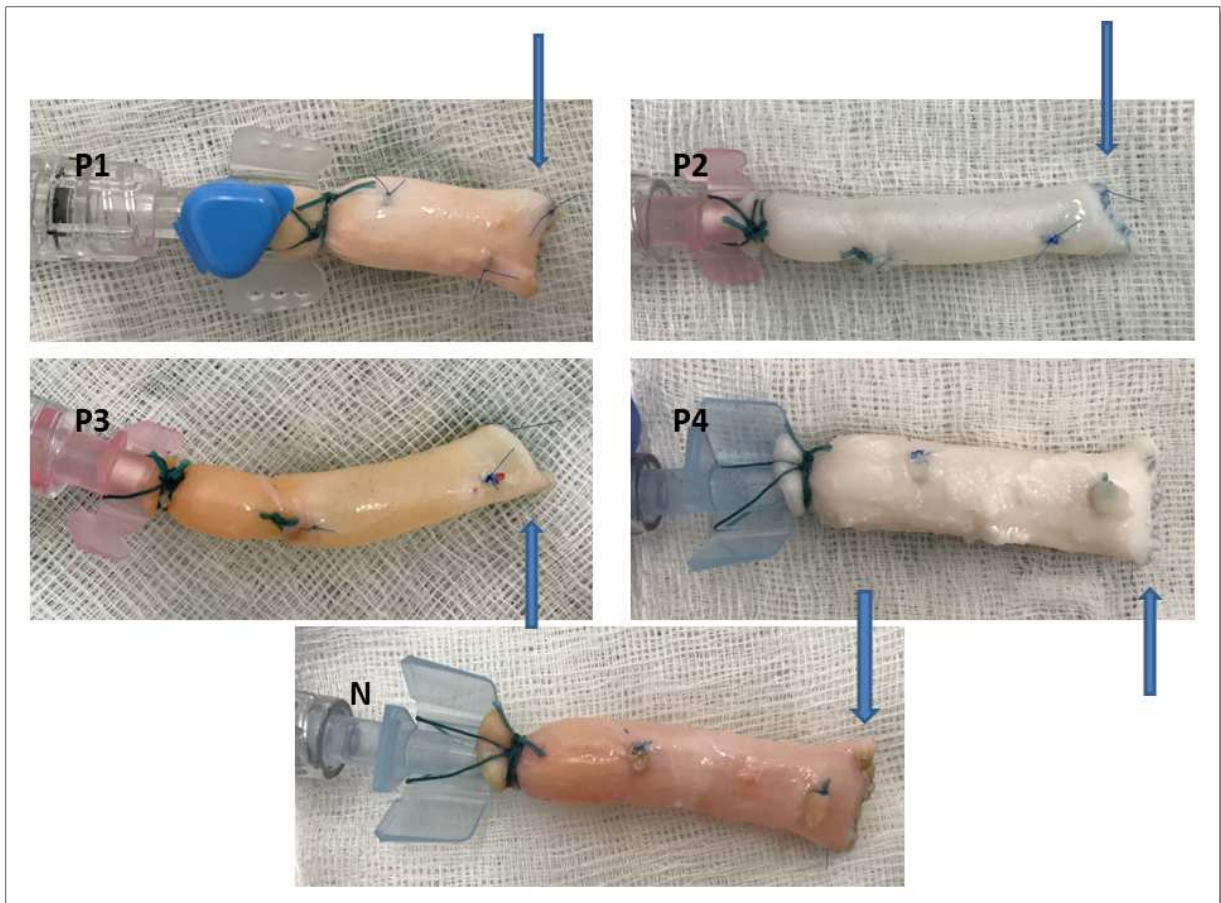
3. ábra

A natív, kezeletlen aortafal (N), és a 2-es (P2), valamint a 4-es (P4) Protokoll szerint kezelt érfal transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) képe. A natív aortából készült metszeten normál sejtek, sejtmagok és szabályos struktúrájú, rostszerkezetű ECM látható. A 2-es és 4-es Protokoll módszerével készült metszeten a sejtek és sejtmagok hiánya figyelhető meg a megőrzött szerkezetű, szabályos lefutású kollagén rostok között.

(CN: sejtmagok; CF: kollagén rostok; AC: hiányzó sejtek helye)

3.3.3. Mechanikai tesztek értékelése

A különböző decellularizációs protokollok szerint kezelt aortaszakaszok mechanikai stabilitásának megítélése érdekében, illetve a decellularizáció mechanikai stabilitásra gyakorolt hatásának felmérésére *Nyomás- és Varrat-megtartási tesztet* végeztünk, 225 Hgmm-es intraluminális nyomás alkalmazásával, ötször 1 perces ciklusokban. A kísérlet során egyetlen egy esetben sem tapasztaltunk aortafal rupturát, vagy a fal átérésztését, leakage-et, legyen szó bármely Protokoll által kezelt érszakaszról. **(4. ábra)** Ezenfelül, mindkét lokalizációjú varratsor - akár a kezelt érdarabot a disztális végén lezáró, akár a kezelt és a natív érszakasz közötti anasztomózis varratsora -, teljes mértékben ellenállt az alkalmazott intraluminális nyomásnak, minden szivárgásra, átérésztésre utaló jel nélkül. **(5. ábra)** Semmilyen jelentős különbséget nem észleltünk a különböző módszerekkel kezelt aortaszakaszok mechanikai stabilitása, viselkedése között.



4. ábra

Decellularizált és natív aortagraftok Nyomás-tesztje, 225 Hgmm-es intraluminális nyomás alatt. Semmilyen aortafal rupturára vagy áteresztésre utaló jel nem látható, valamint a graftokat lezáró varratsorok is intaktak. A kék nyilak a varratvonalakat mutatják.

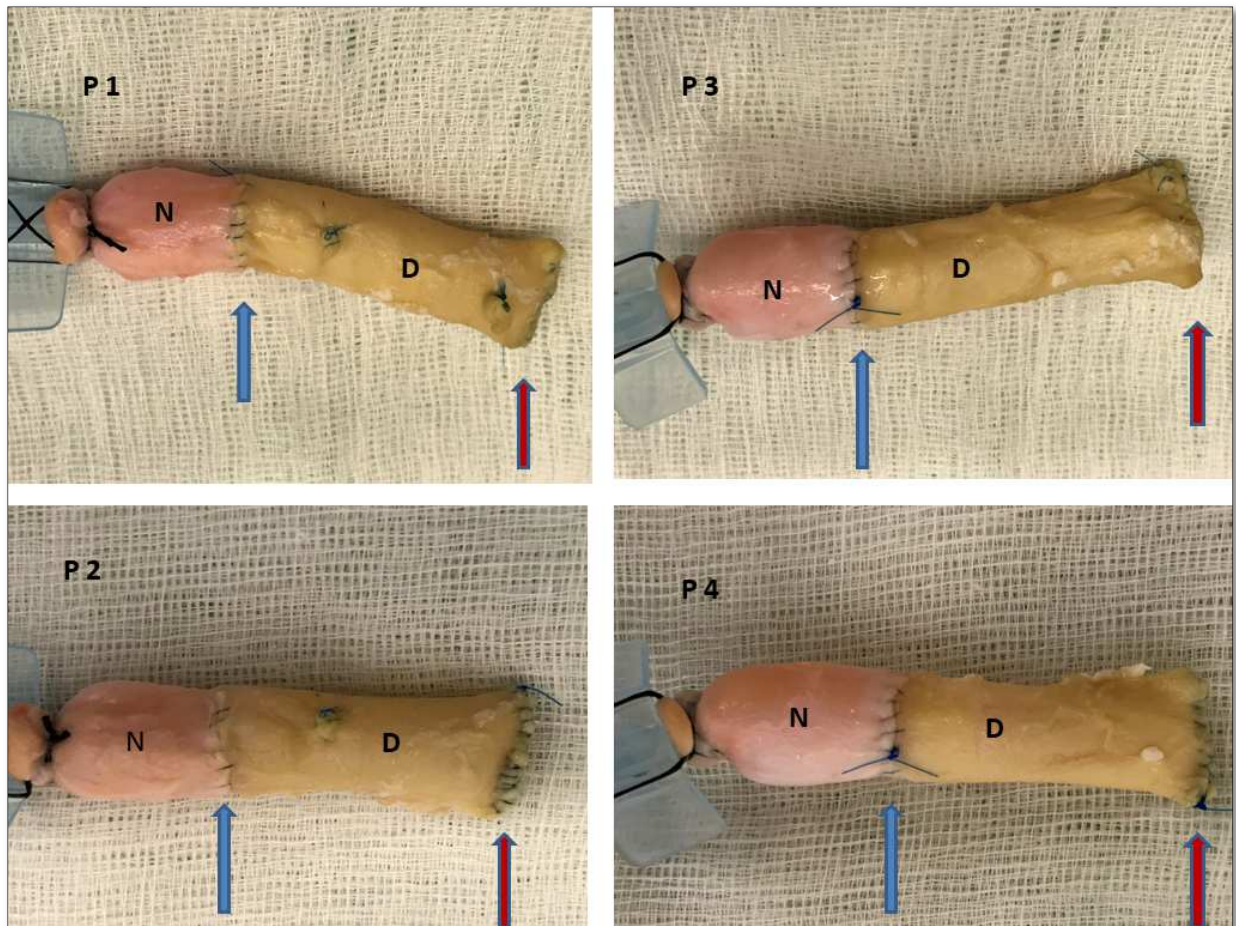
P1) 1-es Protokoll szerint kezelt aortagraft

P2) 2-es Protokoll szerint kezelt aortagraft

P3) 3-as Protokoll szerint kezelt aortagraft

P4) 4-es Protokoll szerint kezelt aortagraft

N) Natív aortagraft



5. ábra

Decellularizált (D) és natív (N) aortaszakaszok közötti anasztomózis Varrat-megtartási tesztje. Az anasztomózis és a disztális varratok 6/0-ás Prolene tovafutó érvarrattal készültek. 225 Hgmm-es intraluminális nyomás alatt is tökéletesen tartanak a varratok, minden szivárgásra, szakadásra utaló jel nélkül. A kék nyilak az anasztomózis, a pirosak a záróvarratokat mutatják.

P1) 1-es Protokoll szerint kezelt aortagraft, D-vel jelölve

P2) 2-es Protokoll szerint kezelt aortagraft, D-vel jelölve

P3) 3-as Protokoll szerint kezelt aortagraft, D-vel jelölve

P4) 4-es Protokoll szerint kezelt aortagraft, D-vel jelölve

3.4. Megbeszélés

A sejtmentesített ECM-ből álló biológiai vázak használata növekvő tendenciát mutat a rekonstruktív, helyreállító sebészetben.¹¹ Sokféle decellularizációs metodika ismert, melyek jelentős különbségeket mutatnak a sejtmentesítés hatékonyságában. A decellularizációs hatékonyság függ a szövet típusától, eredetétől, valamint attól, hogy milyen speciális fizikai, kémiai és enzimikus módszert alkalmazunk.⁶ A leghatékonyabb protokollokról általánosságban elmondható, hogy a különféle mechanizmusú kezelések, így a fizikai, kémiai és enzimikus beavatkozások kombinációja vezet a legjobb eredményhez.⁶ A kezelések általánosságban véve a sejtmembrán lízisével kezdődnek, majd a celluláris komponensek elkülönítésével folytatódnak, végül a sejt-törmelék eltávolításával fejeződnek be.⁶ Természetesen minden reagensnek az eliminálásáról is gondoskodni kell, megelőzve annak káros hatását a befogadó szövetre.⁶

A *fizikai* metódusok, mint a gyakran alkalmazott gyorsfagyasztás hatékony sejtlizáló hatással bír, azonban nem elég effektív a sejtes elemek, a sejt anyagainak eliminálásában, így azt valamely más mechanizmusú, a sejt anyagainak eltávolításában eredményes módszernek kell követnie.^{6,11} Előzőhöz hasonlóan a mechanikai agitáció, rázás sem hatásos önmagában, azonban hatékonyan tudja segíteni a kémiai kezelést a sejtlízisben és a debris eltávolításában.⁶

A *kémiai* módszerek közül az ionos és nem-ionos detergensok a legszélesebb körben használtak. Az ionos detergensok, mint az általunk is használt SDS és Na-azid, vagy a nem-ionos detergens Triton X-100 hatékonyan oldja fel a sejtmembránt és választja el a fehérjéket a DNS-től, így effektívek a sejt anyagainak a szövetből történő eltávolításában.^{11,20,21} A nem-ionos detergensok, az ionosakkal szemben azonban a fehérje-fehérje kapcsolatokat nem bontják, így alig károsítják a szövetek szerkezetét.²² A detergensok kombinálása növeli a szövetből történő fehérje-kivonás effektivitását, amely hatékonyabb sejtmentesítést eredményez.²³

A Triton X-100-ról általánosságban elmondható, hogy decellularizáció céljából a leggyakrabban alkalmazott nem-ionos detergens, aminek eredményessége változó, a kezelt szövet típus és a vele együtt alkalmazott egyéb metódus függvényében.⁶ Vékony szövetek, mint pl. szívbillentyű esetén hatékony sejtmentesítés és megőrzött szerkezet érhető el vele, ráadásul a nem kívánt immunválasz is csökken *in vivo*.^{24,25} Nem eliminálta azonban teljesen a sejtes anyagokat a vastagabb aortafal, érfal esetében.^{25,26}

Az ionos detergensok közül az SDS nagyon effektív sejtmentesítő hatással bír.^{6,11} Összehasonlítva a többi detergennel, pl. a Triton X-100-zal, ez bizonyult a

leghatékonyabbnak a sejtalkotók, sejtmaradványok és citoplazmatikus fehérjék eltávolításában, azonban az ECM szerkezetében, a kollagén rostok integritásában fokozottabb károsodást tud előidézni.^{6,11,27,28,29}

A Nátrium-azid (NaN₃) szintén hatékony ionos detergens, jól eltávolítja a sejtes összetevőket, azonban az SDS-nél komolyabb ultrastrukturális változásokat okoz a szövetek szerkezetében.^{6,11,18,19,29,30}

Többféle *enzimatis* decellularizációs technika áll rendelkezésre, ezek közül kiemelendők a proteázok, mint a tripszin, és a nukleázok. Azonban, a teljes sejtmentesség elérése csak enzimatis kezeléssel igen nehéz, ráadásul a szövetben visszamaradó enzim gyengíti a recellularizációt, vagy immunválaszt idézhet elő.¹¹ Ezek mellett az enzimek károsító hatással bírnak a szövetek extracelluláris komponenseire, főként hosszas behatási idő mellett.⁶

Így a gyakran használt tripszin károsíthatja a kollagén és elasztikus rostokat, ami a szövet mechanikai tulajdonságainak kedvezőtlen változásához vezethet.^{25,29,30} Mivel azonban a tripszin javítja a további ágensek bejutását, penetrációját a sejtbe, ezáltal hatékony segítséget nyújthat a decellularizáció első lépéseként, a teljes sejtmentesítés elérésében.³¹

A nukleázok a DNS és RNS degradációjához vezetnek hidrolízisük katalizálása által, amely segíti a nukleotidok eliminálását, hátrányuk azonban, hogy nehéz eltávolítani őket a kezelés után a szövetből, és így immunválaszt válthatnak ki.^{6,11} Előbbiek alapján mondhatjuk, hogy az enzimatis kezelések nem önállóan, hanem egyéb decellularizációs technikák kiegészítéseként alkalmazandóak, az effektus növelése céljából.

Jól ismert tény tudományos és kutatói körökben, hogy akármilyen összetételben kombináljuk az ismert decellularizációs módszereket, tökéletesen eltüntetni az összes sejtes összetevőt lehetetlen, azonban lehetőség szerinti mértékben a legminimálisabbra csökkenteni, a kötőszövetes váz szignifikáns károsodása nélkül, magasabb sikerarányt eredményezhet a kezelt szövet implantációját követően.^{6,19}

Kutatásunkban egy eredeti kísérletet tettünk az összes lényegesnek ítélt, korábban már alkalmazott decellularizációs módszer hatékony megítélésére. A protokollok kiválasztásánál arra törekedtünk, hogy lehetőség szerint minden mechanizmusú kezelési módszert teszteljünk. Legegyszerűbb kezelésnek a gyorsfagyasztási eljárást választottuk, azonban, korellálva az irodalomban találtakkal, ezen módszer abszolút nem bizonyult hatásosnak. Monofázisos kémiai kezelésnek az SDS ionos detergenst választottuk, mely a fentiek szerint hatékony sejtelimináló módszer, azonban saját kísérleteinkben csak szerény sejtmentesítő hatással bírt, ahogy azt a nagyszámú sejtmag mutatja a HE-nal festett metszetekben. További két metodika

azonban már kombinált, összetett kezelési eljárásnak vonta alá a mintákat. Ennek és a fentieknek megfelelően ezen két protokoll hatékonynak és identikusnak igazolódott, mivel minden látható sejtet és sejtes összetevőt maradéktalanul eltüntetett. Ennek megfelelően a szövettani képeken nem volt sejtes elem felfedezhető. Míg az enzimatis reagenst is tartalmazó 4-es Protokoll enyhe károsodást idézett elő az ECM rostszerkezetében (melyen állításunkat a luminális felszínhez közeli rostok enyhe fragmentálódására és hullámosabb lefutására alapozzuk a hisztológia ismeretében), addig a 2-es számú Protokoll, mely csak detergens kombinációját és mechanikai kezelést alkalmazott, nem idézett elő számottevő változást az ECM struktúrájában. Utóbbi decellularizációs protokollok alkalmazhatóságát és hatékonyságát a TEM-mel készült képek is alátámasztották, mivel a kezelt szövetek kollagén rostjainak microarchitektúrája majdnem tökéletesen azonos maradt a natív, kezeletlen aortájéval, valamint a vizsgált metszetekben nem találtunk sejtes elemeket.

A 225 Hgmm-es intraluminális nyomást - mely majdnem kétszer magasabb a fiziológiás systolés nyomásnál - alkalmazó mechanikai tesztek teljes mértékben megfelelő mechanikai stabilitást, kielégítő varrat-megtartási erőt mutattak, módszertől függetlenül az összes sejtmentesített aorta-graftnál, mindennemű rupturára vagy szivárgásra utaló jel nélkül. Ezen mechanikai tulajdonságok alapján a decellularizált graftok alkalmasak, illetve alkalmasak lehetnek implantációs céllal történő felhasználásra.

Más szerzők hasonló szövettani és mechanikai eredményeket publikáltak az általunk választottakkal azonos decellularizációs metodikák vizsgálta kapcsán. SDS/NaN₃ (2-es Protokoll), valamint Triton X-100/nátrium-deoxycholát/nukleáz (4-es Protokoll) kezelések az általuk publikált anyagban is effektívnek találtattak a sejtmentesítésben, miközben a mechanikai tulajdonságok nem mutattak eltérést a kezeletlen mintákkal összevetve.^{3,18} Ráadásúként, Weymann és társai Biocolor assay segítségével igazolták, hogy nincs szignifikáns változás az SDS/NaN₃ kezelést követően a szövetek kollagén és ellasztikus rost tartalmában, míg spektrofotometriás DNS mennyiség meghatározással ugyanezen protokoll (2-es) által szignifikánsan csökkent DNS tartalmat mutatták ki, alátámasztva ezen módszer jobb használhatóságát.¹⁸

3.5. Következtetés

Az általunk sejtmentesítés szempontjából hatékonynak talált két protokoll között nem mutatkozott számottevő különbség a decellularizáció effektívitasában, mivel mindkét módszerrel kezelt csoportban teljes sejtmentességet sikerült elérni. A 4-es protokoll mintáiban megfigyelt minimális rostkárosodás miatt azonban a 2-es protokollt találtuk hatékonyabbnak, illetve kíméletesebbnek. A mechanikai tesztek során nem igazolódtott eltérés a két protokoll által kezelt minták mechanikai viselkedésében, mely hasonló stabilitást mutatott az intraluminális nyomással szemben, mint a kezeletlen, natív aortafal. Ezek alapján a kezelt graftok mindegyike alkalmas lehet az in vivo felhasználásra. A szövettani eredmények és a mechanikai tesztek ismeretében, figyelembe véve a rövidebb inkubációs időt és költséghatékonyaságot, a 2-es számú protokollt választottuk további kísérleteinkhez, az állatokon végzett tanulmányokhoz.

4. Decellularizált biograftok vizsgálata implantációt követően, 6 hónapos utánkövetés tükrében

4.1. Bevezetés

Az érbetegségek kezelését forradalmasította a műerek megjelenése, azonban egyre növekvő számban történő alkalmazásuk miatt egyre gyakrabban fordulnak elő a protézisgennyedések, melynek megoldása napjainkban is komoly feladat elé állítja a gyakorló érsebészt. Ennek a magas morbiditással és olykor mortalitással járó komplikációnak az előfordulását merőben befolyásolja a graft anatómiai lokalizációja. Míg a testüregen kívüli graftok esetében 1,5-2%, addig a lágyéki régióban majdnem 6%, testüregen belüli lokalizációban pedig 1-5% között mozog az infekciós ráta. A graftfertőzés aránya magasabb sürgősségi műtétek után, illetve reoperációt követően.³²

A septicus graft kezelésében mindenképp helye van a graftmegtartó módszereknek, azonban az esetek nagy hányadában gyógyulás csak a septicus góc, azaz a fertőzött műér eltávolításával érhető el. Napjainkban az autológ érgraftok (alsó végtagi pozícióban a saphena, míg hasüregi pozícióban a mélyvéna) jelentik a gold standardot, azaz ezek alkalmazásával érhető el a legjobb eredmény, köszönhetően a kiváló hosszú távú nyitvamaradásnak és az alacsony reinfekciós rátának.⁵ Azonban alkalmazása jelentősen megnöveli a műtéti időt és növeli a perioperatív morbiditást, így nem alkalmazható magas operatív kockázatú betegek esetében.⁵ Ezen esetekben az ezüsttel vagy antibiotikummal impregnált graftok használata jön szóba, azonban elég változó sikerarányról számol be az irodalom a reinfekció vonatkozásában.^{33,34,35} A homograftok, vagy más néven allograftok alkalmazása ajánlott módszer septicussá vált graftok pótlására, mivel kiválóan ellenállnak a fertőzéseknek, azonban idővel a graftdegenerációból adódó következményekkel (aneurysma képződés és graftreocclusio) számolni kell, valamint hozzáférhetőségük is igen csak korlátozott.^{5,32,36} A xenograftok, azaz más faj egyedeiből származó graftok, hosszú időre kiszorultak az érsebészet fegyvertárából a gyenge hosszútávú eredmények, graftdegenerációból adódó aneurysma kialakulás és magas reocclusiós ráta miatt, azonban elérhetőségük, jó kezelhetőségük és a fertőzéseknek való jó ellenállásuk ismételten kinyitotta a kapukat a septicus érsebészetben történő felhasználás irányába.⁵

Mind az allo-, mind a xenotraszplantáció esetében számolnunk kell az immunválasz kialakulásával. A beültetést megelőzően, a donor szöveten elvégzett decellularizáció

megelőzheti, vagy legalábbis csökkentheti a graft versus host reakciót, valamint az ebből adódó graftdegenerációt és annak nem kívánt következményeit.

Tanulmányunkban a korábban hatékonynak talált decellularizációs módszerrel kezelt sertés allo-, és juh xenograftok implantációt követő viselkedését, nyitvamaradását, szerkezeti változását kívántuk vizsgálni, 6 hónapos utánekövetés során.

4.2. Anyag és módszer

4.2.1. Sebészi előkészítés

Az előkészítés első lépéseként, premedikációként 15mg/ttkg ketamine-hydrochloride (Vetalar, Fort Dodge) és 3 mg/ttkg xylazine-hydrochloride (Sigma-Aldrich) intramuscularis injekció beadásában részesültek az állatok. Az altatáshoz óránként 3 mg/ttkg ketamine-hydrochloride-ot és 1-2 mg/ttkg xylazine-hydrochloride-ot adtunk intravénásan, perfúzorban. Intubálást követően az állatok lélegeztetéséhez, 1 l/perc oxigénnel és 3 l/perc dinitrogén-oxiddal (N₂O) szupplementált levegőt alkalmaztunk. Vénabiztosításra a jobb oldali vena jugularis externaba pozícionált vénakanül szolgálta, melyen keresztül a szükséges intravénás gyógyszerek adtuk, valamint fiziológias sóoldat folyamatos infúziójában részesítettük az állatot, fenntartva a normál folyadék-háztartást.

Az előkészítést követően a műtőasztalon, bőrfertőtlenítővel történő lemosást, majd izolálást követően total median laparotomiából nyitottuk meg a hasüreget. A műtéti kirekesztés alatti vérárvadás megelőzésére 2500 NE Natrium-heparin intravénás adását alkalmaztuk. Antibiotikus profilaxisként 0.5mg Cefazoline intravénás adásában részesítettük az állatokat.

4.2.2. Graftok decellularizálása

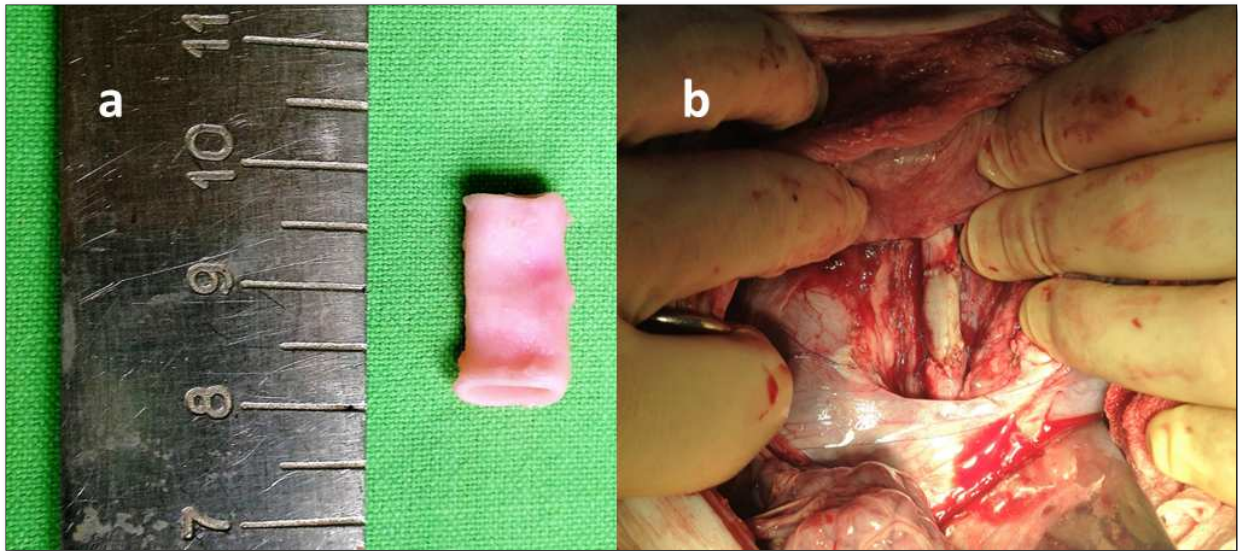
A későbbi implantációhoz felhasznált aorta-graftok decellularizálása szobahőmérsékleten, 48 órán át tartó folyamatos rázás mellett, 1%-os nátrium-duodecyl-szulfát (SDS; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), és 0.05%-os nátrium-azid (NaN₃; Alfa Aesar GmbH & Co, Karlsruhe, Germany), PBS-ben elkészített oldatával (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), a folyadék 6 óránkénti cseréjével történt. A decellularizációs folyamat végén a minták 12 órás mosása következett PBS-ben, a maradék detergens és sejttörmelék teljes eltávolítása érdekében. A decellularizált érszakaszokat további felhasználásig penicillin-streptomycin antibiotikumokat tartalmazó Earle-féle Medium 199-ben, 4°Celsius-fokon tároltuk.^{18,19}

4.2.3. Állatkísérletek

Jelen tanulmány megfelel a US National Institute of Health (NIH Publication No.85-23, revised 1996) által publikált Guide for the Care and Use of Laboratory Animals előírásainak, melyet a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága jóváhagyott.

A tanulmány során mindkét nemből véletlenszerűen választott állatokat használtunk. Kísérleteink első szakaszában, a beültetendő aorta-graftokat sertésből, míg második szakaszában juhból állítottuk elő, fent részletezett protokollnak megfelelően. 22-25 kilogramm közötti testtömegű, Yorkshire sertéseket, valamint 19-21kg súlyú Magyar Merinó juhokat használtunk fel, melyek mindennemű klinikailag nyilvánvaló megbetegedéstől mentesek voltak. Az implantálandó aorta-graftokat az első kísérletsorozatban 5 sertés, a másodikban 2 juh infrarenalis aorta-szegmentjének eltávolításával, majd azoknak decellularizációjával nyertük. Az első szakaszban 10 sertés esett át sertés aorta-graft allotranszplantációján. A második sorozatban 4 sertés műtétjét, juh aorta-graft xenotranszplantációját végeztük el.

A sertések megfelelő sebészi előkészítését követően total median laparotomiát végeztünk. A beleket eltartva, majd a hátsó fal retroperitoneumot megnyitva jutottunk a retroperitonealis térbe. A hasi aorta infrarenalis szakaszát gondosan kireperáltuk, az eret gumira vettük, majd Na-heparin intravénás adását követően DeBakey érfogó segítségével segítségével az aortát kirekesztettük. Ezt követően az aorta mintegy 1,5-2cm hosszú szakaszát resecaltuk, majd a megfelelő méretű (mind az átmérőt, mind pedig a hosszát tekintve) decellularizált biológiai allo-, illetve xenografttal, 5/0-ás Prolene tovafutó érvarrattal, end-to-end interpostiot végeztünk. **(6. ábra)** Tubingot követően a kirekesztést oldottuk, majd gondos vérzéscsillapítás után a hasfalat looppal, a bőrt tovafutó Donati-öltésekkel zártuk. Műtét végén a femoralis pulzusokat kontrolláltuk, majd extubációt és ébredést követően az operált állatokat, néhány napos szoros megfigyelés alá helyeztük. A túlélő állatokat, a posztoperatív 3. napon visszaszállítottuk eredeti környezetükbe. 6 hónapos utánkövetés lejártával a sertéseket visszaszállítottuk intézetünkbe, majd egy ismételt sebészi beavatkozás elvégzésével a hasi aortájuk infrarenalis szakaszát eltávolítottuk. Az explantált szegmentumok, melyek az eredeti, saját aortafalat, az implantált szakaszt és az anasztomózisokat is magukba foglalták, fény-, és elektronmikroszkópos vizsgálatoknak vetettük alá.



6. ábra

Decellularizált aorta-graft beültetés előtt (a) és után (b)

4.2.4. Fénymikroszkópos vizsgálatok

Tanulmányunk mindkét fázisában az alábbi módszert alkalmaztuk.

A beültetett, és az eredeti, natív szegmentumokat is tartalmazó explantált aortát a szövettani vizsgálatok céljából 24 órás fixálásnak vetettük alá, 10%-os, neutrális formalinban. Hosszanti és keresztmetszeti szövetblokkokat készítettünk, melyeket paraffinba ágyasztunk, és 2-4 microméter vastagságú metszeteket vágunk. A szeleteket 4 különböző festési eljárásnak vetettük alá, a gyártók által javasolt protokollok szerint. Rutin HE festéssel az újonnan megjelenő sejtek jelenlétét, valamint az implantált graftszakasz felszínén újonnan képződött endothel-réteget igazoltuk. Továbbiakban hisztokémiai festéseket végeztünk. Orcein festéssel az elasztikus rostokat, míg Masson-trichrome festéssel a kollagén-rostokat vizualizáltuk. A myofibroblastok és simaizom sejtek rekolonizációjának alátámasztására simaizom-sejt actin immunfestési eljárást alkalmaztunk, simaizom actin (SMA) specifikus egér monoklonális antitest (clone: 1A4, Histopathology, Ltd., Pécs, Hungary) és a HISTOLS[®] micro-polymer based peroxidase detection system (Histopathology, Ltd., Pécs, Hungary) használatával. A mintákban lévő, nem simaizom-eredetű sejtek és szöveti elemek, szolgáltak negatív kontrollként. Panoramic Viewer software-t (3DHistec Ltd.) és 100-szoros nagyítást alkalmaztunk a leletek kiértékelésére, két független patológus által validálva.

4.2.5. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

Kísérletünk mindkét szakaszában azonos módon jártunk el.

Az eltávolított minták 12 órás fixálásra kerültek, melyhez 2%-os formaldehid és 2.5%-os glutáraldehid oldatát használtuk, 4°Celsius-fokos hőmérsékleten. Ezután 50-60 nanométer vastagságú szeletek készültek, melyeket JEOL JEM-1200EX II típusú TEM használatával, 80kV-on vizsgáltunk. Célunk az implantátum ECM-ában, a sejtek megjelenését kimutatni, alátámasztva két független vizsgáló által.

4.3. Eredmények

4.3.1. I. kísérlet: Az implantált, decellularizált sertés aorta-allograft vizsgálata

A sertés aortából származó, decellularizált graftok mindegyike sebészileg könnyen kezelhető volt. Az implantáció során behelyezett varratok jól tartottak, az érfal nem volt szakadékonny. A műtétek során és a közvetlen posztoperatív időszakban jelentős vérvesztést, vérműködést, illetve graft-reocclusiót nem figyeltünk meg. A 10 sertésből 9, 108 és 123 kg közötti testtömegűek, túlélték a 6 hónapos utánkövetési időszakot. Ezen periódusban semmilyen komplikáció nem lépett fel az állatoknál; súlyvesztés, vagy egyéb, az állatok betegsége, diszkomfortjára, fájdalomra utaló jelet nem észleltünk. 1 sertés a posztoperatív második napon ileusban exitált. Az elvégzett boncolás a graftelváltozásra, vagy sebésztechnikai hibára utaló bizonyítékot nem mutatott. A második műtét során, a graftok kivételkor, kivétel nélkül, jól inkorporáltak, megfelelően pulzáló implantátumokat tapasztaltunk. Graft degeneráció, kilökődésre utaló jel, perigraft reakció makroszkóposan nem volt megfigyelhető. Minden beültetett graft a környező, saját aortafalhoz arányos növekedést mutatott hosszban és átmérőben is. (7. ábra)

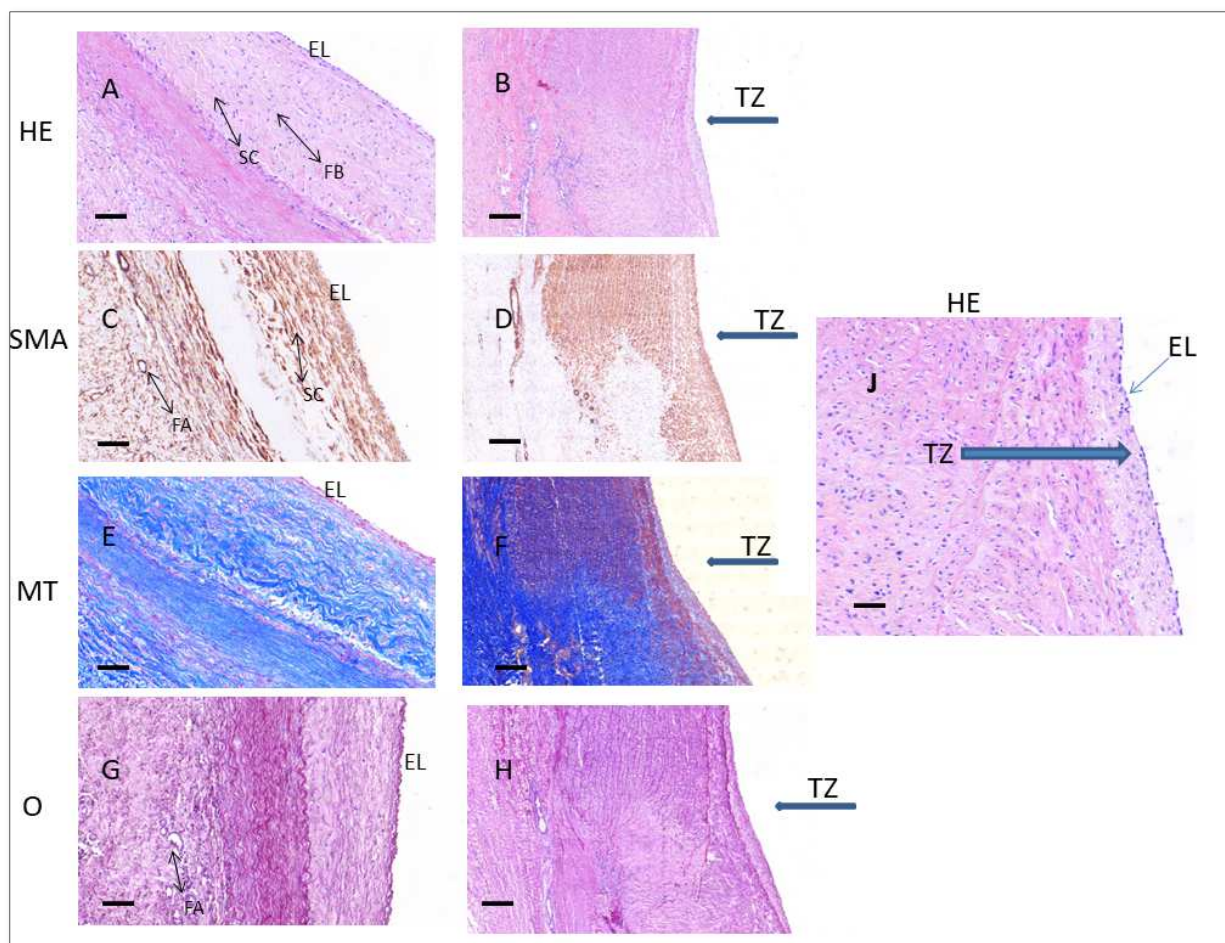


7. ábra

Explantált sertés aorta infrarenalis szakasza, mely magában foglalja az implantátumot. A fehér nyilak a varratvonalakat mutatják.

4.3.1.1. Fénymikroszkópos vizsgálatok kiértékelése

A kivételt követően, a szövettani vizsgálatok céljából haránt- és hosszmetsetek készültek a kivett graftból, és az azt övező saját érfalból. Hosszanti metseteket úgy készítettük, hogy az átmeneti zóna jól kivehető legyen a saját, és az implantált szegmentum között. HE festéssel látható a nagy mennyiségű, újonnan megjelenő sejt az implantátumban, valamint a folyamatos, szabályos, egysejtsoros, a teljes lumen felszínét borító endothel réteg. SMA festéssel a simaizom sejteket tettük láthatóvá a korábban sejtmentes, beültetett graftban. Az Orcein és MT festések segítségével a megőrzött struktúrájú elasztikus és kollagén rostszálakat szemléltettük. **(8. ábra)**



8. ábra

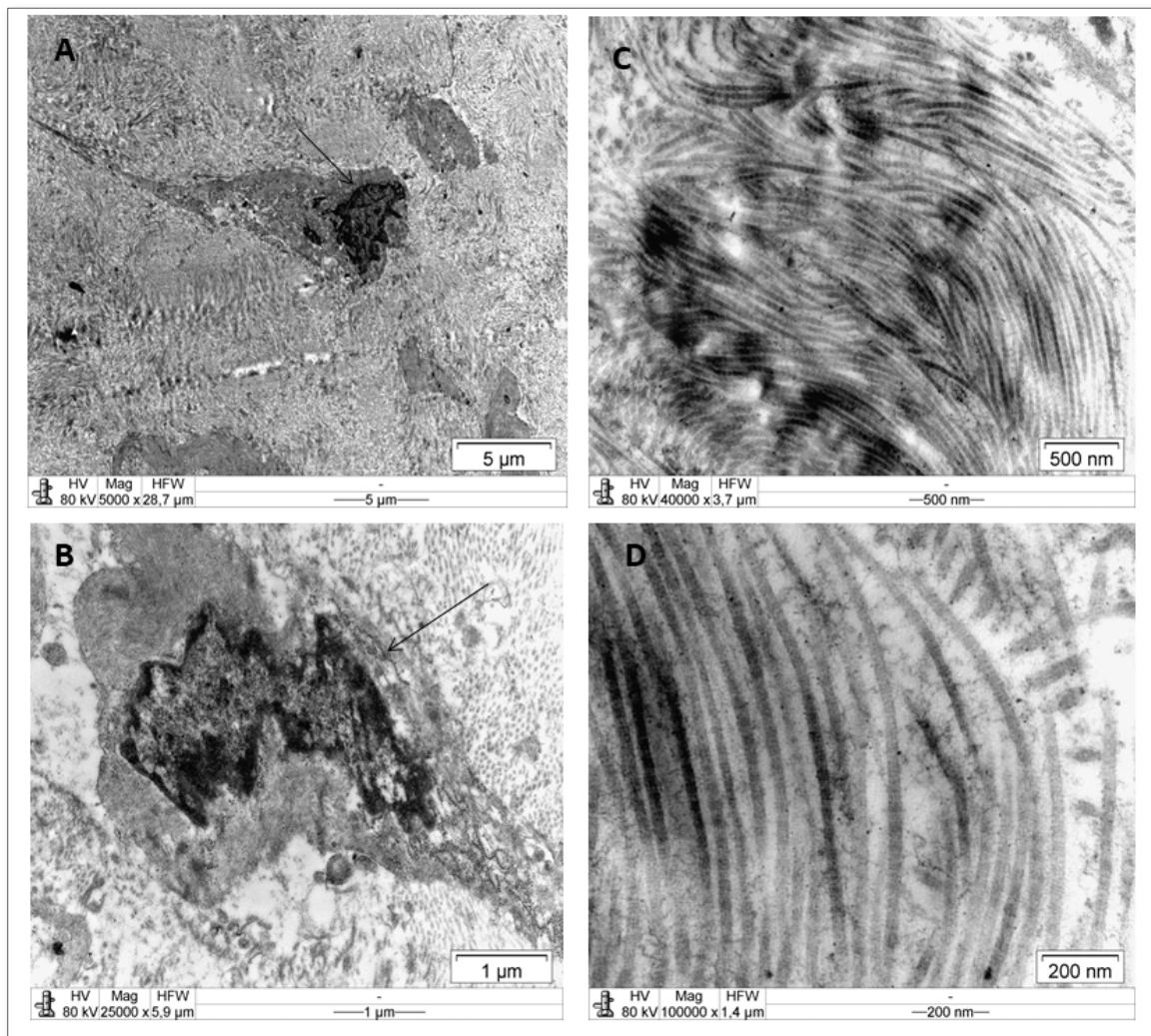
A kivett allograftok haránt (A,C,E,G) és hosszanti (B,D,F,H,J) metszetei. A hosszmetzeti képek mutatják az anasztomózis szintjében az átmeneti zónát, a saját és a beültetett ér között. A metszeteken, kiváltképp a HE-nal festetteken, jól látható a szabályos, egyrétegű endothelium, melyet a J-vel jelzett kép nagyítva mutat. A nyilak mutatják az átmeneti zónát (TZ) folyamatos endothel réteggel. Az újonnan megjelenő fibroblastok (FB) és simaizom sejtek (SC) jól kivehetők a HE-nal festett metszeteken. A SMA festés a simaizomsejtek jelentős populációját mutatja. Szabályos lefutású kollagén és elasztikus rostok festődnek a MT-mal és Orceinnel készült képeken. Tápláló artériák, vasa vasorumok (FA) jelentek meg az implantátum külső rétegében.

Festési eljárások: Hematoxylin-eosin - HE (A,B,J), Simaizom Actin - SMA (C,D), Masson-trichrome - MT (E,F), Orcein - O (G,H)

Sáv (A,C,E,G)= 100 μ m; Sáv (B,D,F,H)= 200 μ m; Sáv (J)= 50 μ m

4.3.1.2. Elektronmikroszkópos vizsgálatok eredménye

A beültetett sertés biografról, kivételt követően, TEM-mel készített képeken, a natív artériára jellemző, annak falában normálisan jelenlévő sejtípusok (fibroblastok, myofibroblastok, simaizom sejtek) ismételt megjelenését igazoltuk, a szabályos szerkezetet mutató kötőszöveti rostok között. (9. ábra)



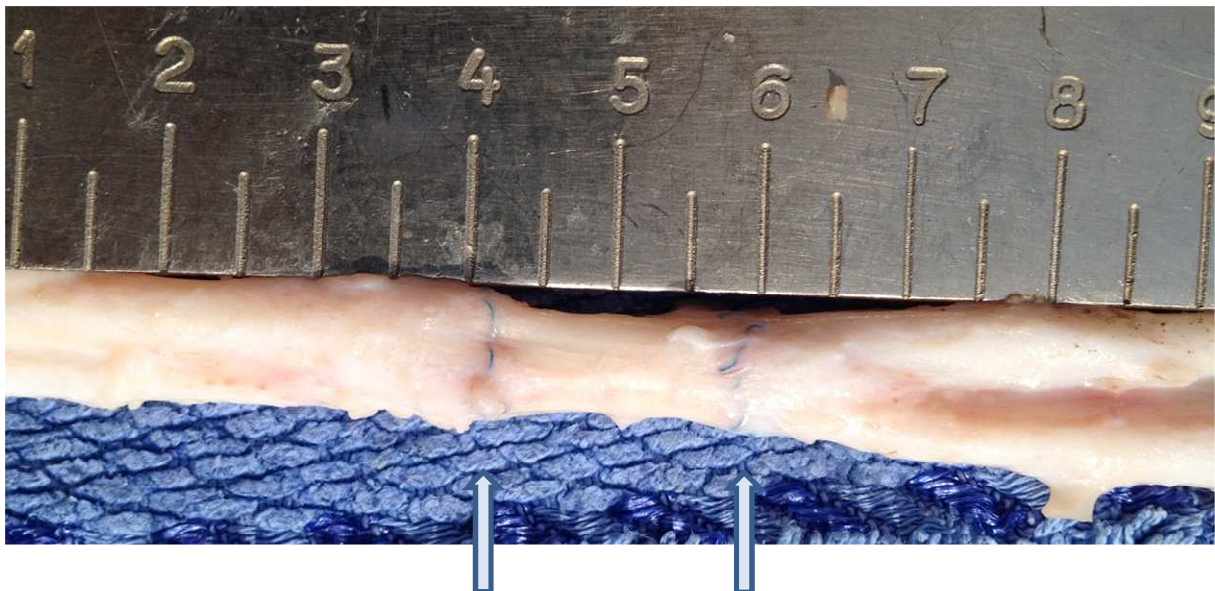
9. ábra

Az implantált sertés biograft tunica mediájáról készült TEM kép.

A és B képeken az újonnan megjelenő, normál sejt látható különböző nagyításokban (nyilak mutatják), míg C és D képek a szabályos szerkezetű kollagén rostokat szemléltetik.

4.3.2. II. kísérlet: Az implantált, decellularizált juh aorta-xenograft vizsgálata

A sejtmentesített merinói juhból származó aortagraftok kb. 2cm-es szakaszát implantáltuk a sertések infrarenalis aortájába. A műtétek közben az alkalmazott graftok jól varrhatóak voltak, az öltéseket a fal jól tartotta, a kirekesztések oldását követően jó minőségű pulzushullám tovaterjedését tapinthattuk. A perioperatív szakban vérzéses szövődményünk, hasfali sebgyógyulási zavarunk, bélparalysis nem fordult elő. 1 esetben a közvetlen posztoperatív szakban alsó testfél ischaemia alakult ki az egyik sertésnél, femoralis pulzusai eltűntek, majd az állat pár órával később exitált. Az autopsia igazolta a graftreocclusiot, melynek hátterében szűk distalis anasztomózis, azaz sebésztechnikai hiba igazolódott. A túlélő 3 állat nyomonkövetése, a műtét utáni 6 hónap eseménytelenül telt. Egyik sertés esetében sem alakult ki bármilyen általános egészségromlást jelző tünet. Második műtetre ennek megfelelően 3 állat (súlyuk 102-113kg közötti) került. A has kinyitásakor, a korábbi műtéti terület feltárását követően, tökéletesen beépült, jól vezető, patológiás elváltozásoktól mentes graftokat találtunk, melyeket a környező aortafallal egyetemben eltávolítottunk. Graft versus host reakció, intraluminális trombusképződés, illetve a graftok aneurysmatikus degenerációja nem volt észlelhető. A xenograftok átmérője és hossza is proporcionális növekedést az eredeti aortafallal. (10. ábra)

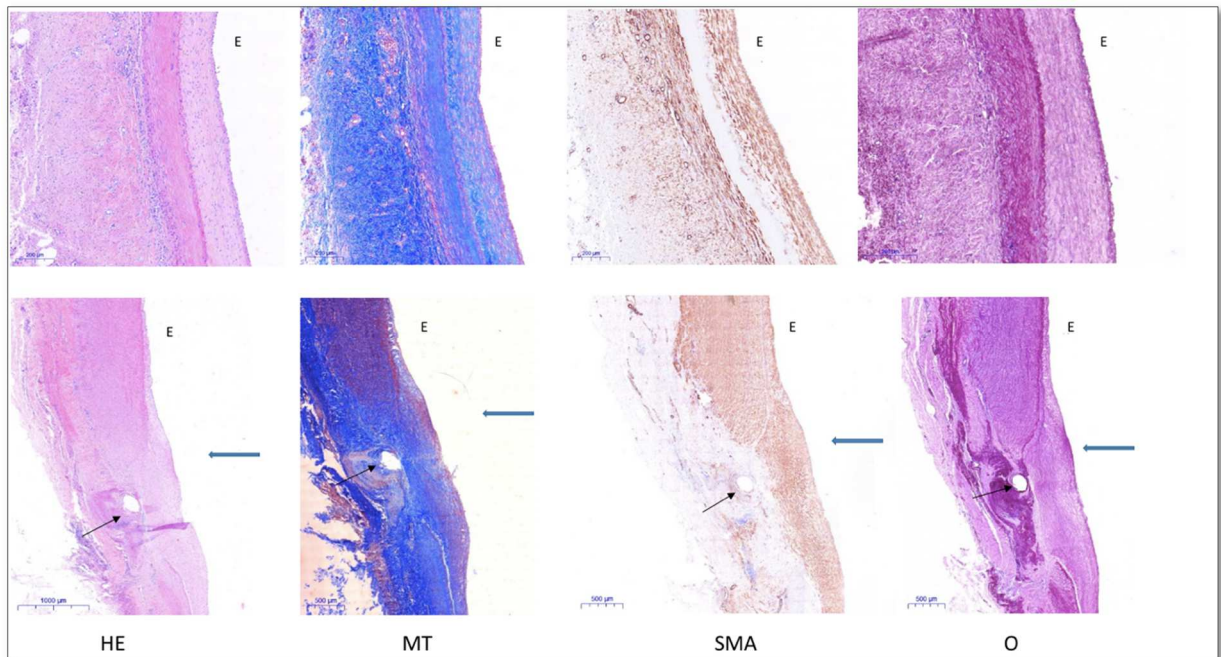


10. ábra

A második műtét során eltávolított minta, mely a sertés infrarenalis aortaszakaszát és a beültetett xenograftot tartalmazza. Fehér nyilakkal az anasztomózisokat jelöltük.

4.3.2.1. *Hisztológiai analízis*

Az eltávolított xenograftokból és a környező, natív aortafalból hosszanti- és keresztmetszeti szövetblokkokat készítettünk a hisztológiai analízishez. Minden hosszmetset esetén figyelmet fordítottunk arra, hogy az anasztomózisok régiója, a graft és a saját ér közötti átmenet is belekerüljön a metszés síkjába. Korábbi gyakorlatunknak megfelelően, első körben a HE festéssel készült metszeteket elemeztük, melyen, az eredetileg sejtmentes implantátum területén, kéken festődő sejtmagok nagy száma igazolja a beültetett graftba történő recipiens, döntően fibroblast-jellegű és simaizom sejtek migrációját, megtelepedését. Egyértelműen látható HE festéssel a folyamatos, szabályos, az eret belülről borító endothelium. A simaizom sejtek specifikus kimutatására alkalmazott SMA immunhisztokémiai eljárás szintén nagyszámú, normál megjelenésű simaizom sejtcsoportokat mutat a graftban. Az ECM kollagén és elasztikus rosthálózatának szabályos megjelenését láthatjuk az alkalmazott MT és Orcein festéssel készült metszetekben. **(11. ábra)**



11. ábra

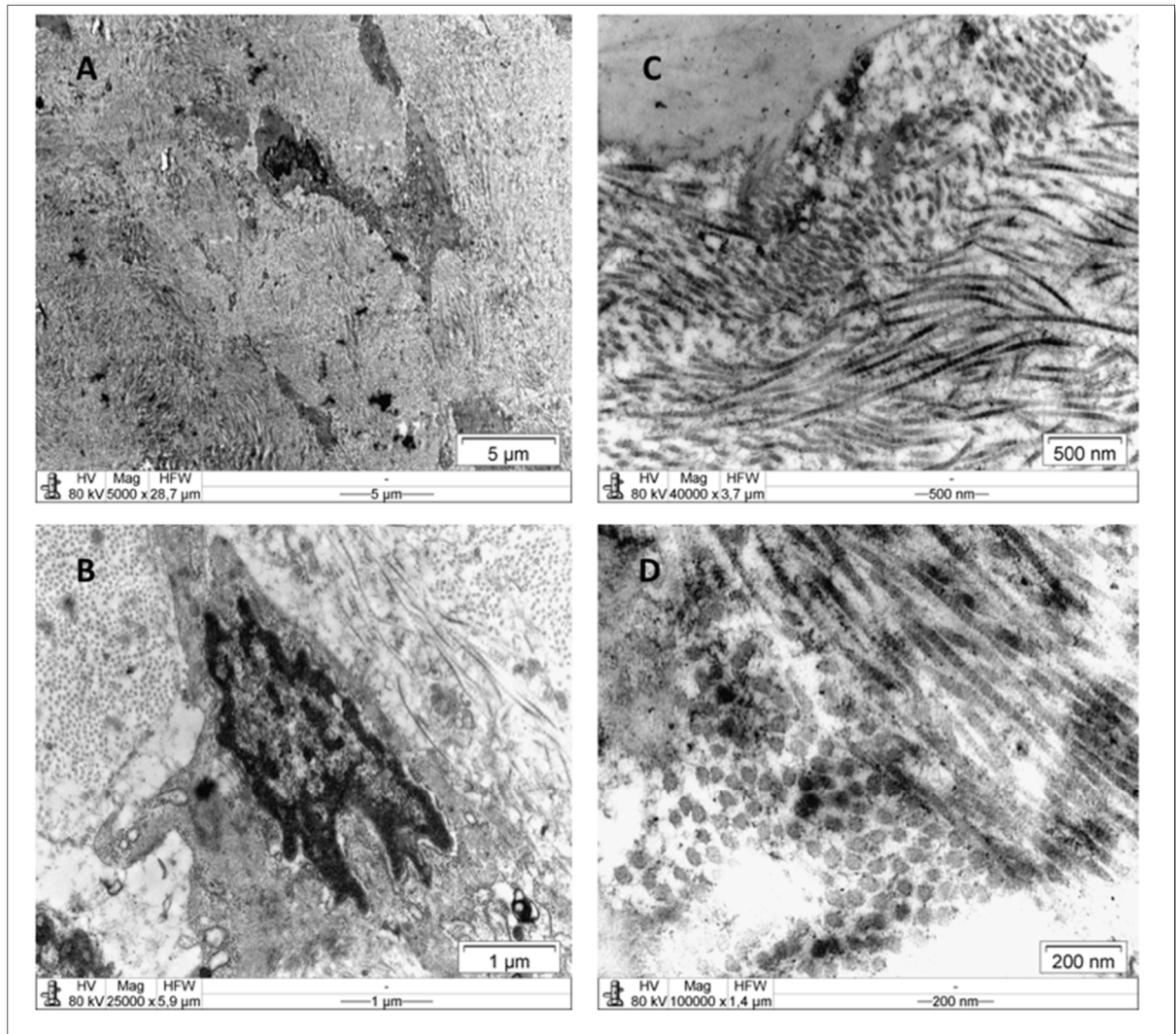
Az explantált xenograftokról készült szövettani képek. A felső sorban a juhaorta-graftok haránt, míg a második sorban a hosszanti metszetei láthatóak, mely utóbbiak a saját és az implantátum közötti átmeneti zónát mutatják (a képen kéknylak jelölik). A szabályos, folyamatos, egyrétegű endothel réteg és az újonnan megjelenő sejtek láthatóak a HE-nal festett metszeteken. SMA festéssel a simaizomsejteket, rostfestésekkel (MT és O) a kollagén és elasztikus rostokat kívántuk ábrázolni. A fekete nyilak az érvarrat helyét jelölik.

Festési eljárások:

Hematoxylin-eosin - HE, Simaizom Actin - SMA, Masson-trichrome - MT, Orcein - O

4.3.2.2. TEM vizsgálat értékelése

Az explantált xenograftot transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgálva, az eredetileg decellularizált érfalban normál megjelenésű, fibroblast és simaizom sejteket láttunk, melyek a host sejtek invázióját támasztják alá. A kollagén rostok mikroszkópos képe, szerkezete megtartott. (12. ábra)



12. ábra

A juh xenograft tunica mediájának TEM képei, explantációt követően, különböző nagyításokban. A és B képen egy, az implantátumban megjelent normál sejtről készült TEM felvétel látható, míg C és D képek a teljesen reguláris, strukturált kollagén rostokat szemléltetik.

4.4. Megbeszélés

A vascularis graftkutatás területén végzett első kutatások az előző évszázad elejére tehetőek. Alexis Carrel volt az, aki sikeres értranszplatációt hajtott végre állatmodellen, melyet 1907-ben publikált.³⁷ Charles Dubost, 1951-ben, Franciaországban elvégezte az első sikeres aorta abdominalis aneurysma resectiot cadaver artériás homograft beültetésével, amely fontos mérföldkőnek számít mind az allograft felhasználásban, mind pedig az aneurysma sebészi kezelésében.^{38,39} Ezt követően több publikáció is készült artériás homograftok felhasználásáról, azonban a pozitív korai eredményeket a késői graftdegenerációból adódó szerény hosszútávú eredmények követték.^{40,41,42} A xenograftok humán felhasználásával kapcsolatban az 1980-as években kedvező korai eredményekről számoltak be, azonban a gyakori, késői aneurysmaticus degeneráció miatt abbamaradtak az ezirányú próbálkozások.^{8,9} Az időközben megjelenő alloplasticus érgraftok (Dacron, ePTFE) és ezek impregnált változatai (albumin, kollagén, antibiotikum, ezüst) egyre népszerűbbé és elterjedtebbé váltak könnyű kezelhetőségük és a korlátlan mennyiségi és méretbeli rendelkezésre állásuk következtében. Mindazonáltal, az autológ graft maradt a gold standard a cardiovascularis sebészetben, nemcsak a primér, hanem a redo és septicus ellátásban is.

Az előbbieken említett szövődmények és az ebből következő kedvezőtlen hosszútávú eredmények miatt a biológiai graftok, mind a homograftok, mind pedig a xenograftok felhasználása és az ezirányú kutatások hosszú időre háttérbe szorultak. A komplikációk, melyek a biológiai graftok beültetését követték, hasonlóak voltak: intima hyperplasia következtében kialakuló restenosis, graftdegeneráció okozta aneurysma képződés, valamint grafttrombózis miatti reocclusio.

Tudott azonban, hogy az esetek kb. 20-40%-ában nincs rendelkezésre álló, vagy alkalmas autológ graft (többnyire vénagraft).^{36,43} A szintetikus graftok alkalmazása distalis (térd alá vezetett) bypass műtétek során szerény nyitvamaradással kecsegtet, valamint ezen alloplasztikus, kiváltképp ezek antiszeptikus anyaggal (ezüst vagy antibiotikum) impregnált változatainak a septicus környezetben való alkalmazása elég vegyes, mondhatni inkább gyenge eredménnyel alkalmazható a reinfekció vonatkozásában, ennél fogva számos érsebész elkerüli használatukat ezen speciális területeken.^{33,34,35} Főként ezen okokból kifolyólag, valamint az érsebészet rohamos fejlődése, a jelentősen megnövekedett esetszámból adódóan szaporodó szövődmények száma, illetve ezek ellátásának szükségessége fordította a figyelmet ismételten a biológiai graftok fejlesztése irányába.

Napjainkban az allograftok (vagy homograftok) fontos szerepet játszanak a septicus érsebészeti komplikációk ellátásában, döntően, amennyiben autológ megoldás nem lehetséges. Mindazonáltal, az elmúlt két évtizedben, a xenograftok (általában borjú pericardiumból származóak) bekerültek a rutin klinikai felhasználásba, nemcsak a septicus, de az asepticus cardiovascularis sebészetben is. Míg a homograftok, legyen szó artériáról vagy vénáról, többféle lokalizációban használatosak bypass graftként (akár aortoiliacalis, vagy femoro-distalis elhelyezkedésben), a xenograftok majdnem kizárólag az arteriotomiák zárásához szükséges foltként kerülnek felhasználásra, például a carotis sebészetben.^{5,36}

A xenograftoknak több előnyük is van a szintetikus graftokkal szemben: jobb kezelhetőség, magas rezisztencia a fertőzésekkel és újrafertőzésekkel szemben, minimális vérzési tendencia a varratvonalban, valamint a korlátlan elérhetőség.⁵ Ezek az előnyök azonban jelenleg csak a tapasztalatokon és nem klinikai bizonyítékokon alapulnak.⁵ A jelenleg kereskedelmi forgalomban elérhető foltok decellularizálása glutáraldehiddel történik, és rendszerint borjú pericardiumból származnak.

Számos publikáció található a pericardium xenograftok sikeres felhasználásáról a septicus érsebészetben, azonban az aorta descendens és infrarenalis szakaszának pótlásával kapcsolatos tapasztalatok ezen graftok vonatkozásában elég korlátozottak.⁴⁴

Mcmillan és munkatársai igen magas sikerarányról számolnak be közleményükben. 51 beteg esetében végeztek az inguinalis régióban kialakult septicus PTFE graft miatt folteltávolítást, majd ezt borjú pericardium folttal helyettesítették. 2.1 éves átlagos utánkövetés során 50 betegnél értek el teljes fertőzésmentességet.⁴⁵

A fertőzött aortagraftok helyettesítésére borjú pericardiumból, saját kezűleg készített graftok használata jöhet szóba, melynek alkalmazásával kapcsolatban biztató eredményekről számolnak be.

Dulbecco és csapata egy sikeres esetet közöl, amelyben a fertőzött graftot egy borjú pericardiumból készített aorto-bifemorális grafttal pótolták.⁴⁶

Czerny és munkatársai septicus aorta protézis hatékony kezeléséről írnak. A 15 beteget magába ölelő anyagban, a fertőzött graft eltávolítását követően az érpálya folytonosságát egy saját maguk által, xenopericardiumból készített tubussal állították helyre. 24 hónapos átlagos utánkövetés során 100%-os infekció és reinfekciómentességet értek el.⁴⁷

Lutz és munkatársai 13 esetben végeztek kézzel varrott borjú pericardium xenoprothesissel in situ graftcserét az aorta descendens vagy infrarenalis szakaszán kialakult aortagraft fertőzésének kezelésére. A technikai siker 100%-os volt, és az esetek 75%-ában értek el teljes gyógyulást és az infekció szanálását. A 9 hónapos átlagos utánkövetés során a beültetett

graftok mindegyike nyitva maradt, reinfekció 2 esetben alakult ki, azonban a halálozási arány meglehetősen magas, 41.7% volt.⁴⁴

Nem mehetünk el említés nélkül a legújabb fejlesztésű bioszintetikus graftok mellett sem. Ezen graftok fala egy poliészter hálóból és az azt összekötő juh-kollagénből áll. Ezen bioszintetikus graftok szintén alkalmazhatóak septicus graftok pótlására, amennyiben autológ megoldás nem jön szóba, azonban áruk jelenleg igen magas. A kezdeti klinikai kísérletezések kedvező eredményekről, alacsony reinfekciós rátáról számolnak be.^{5,48,49,50} Töpel és társai septicus infrainguinalis graft pótlására használták a bioszintetikus (Omniflow II) graftot munkáikban, reinfekció nem alakult ki az utánkötések során.^{48,49} Ezzel szemben Krasznaiék fertőzött aortagraftot pótoltak Omniflow II grafftal, 3 esetből egy betegnél alakult ki reinfekció.⁵⁰

A biológiai graftok implantációját követően kialakuló, ismert és korábban már taglalt késői komplikációk elkerülése érdekében számos experimentális próbálkozást találunk a vonatkozó szakirodalomban, amellyel a decellularizált graftok tartósságát kívánták növelni. Próbálkoztak keresztkötésekkel stabilizálni az ECM kollagénstruktúráját az aneurysmatikus degeneráció megelőzése reményében, heparint kötni a graft lumen felületéhez, vagy beborítani azt endoteliális sejtekkel a trombotikus okklúzió vagy intimális hyperplasia elkerülése érdekében.^{4,6,7,11,19} Azonban mindezen folyamatok nem jelentettek jelentős javulást a hosszútávú kimenetelben.

Saját anyagunkban decellularizált biológiai aortagraftokat alkalmaztunk implantáció céljára. Kísérletünk első szakaszában sertés aortagraftok allotranszplantációját, második fázisában pedig juh aortagraftok xenotranszplantációját végeztük el sertések infrarenalis aortájába. Mindkét kísérletsorozatról elmondhatjuk, hogy kiváló középtávú eredményeket kaptunk. A graftok, legyen szó a sejtmentesített sertés vagy juhgraftokról, sebészileg könnyen kezelhetőek, mechanikailag megfelelőek és varrhatóak voltak, az öltések jól tartottak, a varratvonalakban szignifikáns vérzés nem lépett fel, a kirekesztések oldását követően a pulzushullámot átvették, amely jól tovaterjedt a distalis, saját érszakaszra. A perioperatív időszakban szövődményünk csak egy esetben lépett fel, az állat posztoperatív ileusban exitált. A 6 hónapos utánkötés során egy szövődményünk alakult ki reocclusio miatt (juh-sertés implantált állatban), melynek hátterében sebésztechnikai hiba igazolódott. A második műtéteket követően mind a sertés-, mind a juhgraft esetében jól inkorporált, jól pulzáló graftokat találtunk, infekcióra, aneurysmatikus degenerációra utaló jelek nélkül. Reocclusio a

fent említett egy eset kivételével nem fordult elő. A szövettani képeken a két állatcsoportban szintén azonos eredményeket kaptunk: a beültetett graftszakaszokban az identikus sejtek ismételt megjelenését láttuk, valamint folyamatos, szabályos, egyrétegű endothelium volt megfigyelhető a saját és a beültetett ér lumen felületén is, intima hyperplasia nem alakult ki, ezenfelül gyulladásos sejtek invázióját sem találtuk. A TEM az implantátumok vázában normál rostszövetet és újonnan megjelenő, mitotikusan aktív sejteket mutatott.

Leszögezhetjük, hogy az utánkövetésünk fél évet ölelt át, hosszabb távú alkalmazással eddig nincs tapasztalatunk. Humán felhasználás esetén a késői, több éves kimenetele a decellularizált biológiai xenograftok alkalmazásának valószínűleg hasonló lenne, mint azt részleteztük a korábbi próbálkozások kapcsán, értem ezalatt a graftdegenerációból adódó következményeket. Azonban, a septicus érsebészetben való alkalmazás célja, hogy kihasználva a biológiai anyagok fertőzésekkel szembeni jó ellenállását, megszüntetve a fertőző gócot (a septicus graftot eltávolítva), biztosítsuk a végtagmentést, illetve javítsuk a beteg túlélési esélyét, amikor már egyéb lehetőség nincs a kezünkben. A fertőzés sikeres eradikációját és teljes gyógyulást követően, amennyiben bármilyen komplikáció lépne fel, a xenograft, akár elektív ellátás keretein belül, helyettesíthető és cserélhető egy másik graftra.

4.5. Következtetés

Mindkét kísérleti fázisban kiváló eredményt tudunk felmutatni, jelentősebb szövődmény nélkül, melyet a hisztológia is alátámasztott. Tanulmányunk 6 hónapja során (mind az allo-, mind a xenotranszplantáció esetén), a jól ismert, graft versus host reakció által kiváltott implantátum degeneráció, és annak nemkívánt következményei nem alakultak ki, illetve nem voltak mikroszkóposan sem kimutathatók. Mindezek alapján azt mondhatjuk, ismerve a biológiai graftok alkalmazásának késői következményeit, azonban figyelembe véve rezisztenciájukat az infekciókkal és reinfekciókkal szemben, hogy a decellularizált xenograftok, mint „ultimum refugium” szolgálhatnak a septicus érsebészetben, a műérgennyedéssel kezelt betegek ellátásában, amennyiben megfelelő autológ graft vagy alkalmas homograft nem elérhető.

5. Az értekezés eredményei

Az **első** kísérletsorozatban 4 fajta decellularizációs módszer összehasonlítását végeztük sertés aortán, fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok, valamint mechanikai tesztek függvényében.

Munkánk **második** részében sertések infrarenalis aortájába implantáltuk decellularizációt követően, első fázisban az előkészített sertés allo-, majd második fázisban juh xenograftot. A tervezett 6 hónapos utánkövetés után az eltávolított mintákat makroszkópos és mikroszkópos vizsgálatoknak vetettük alá.

Fontos megfigyeléseink:

1. Igazoltuk, hogy a monofázisos decellularizációs módszerek nem elegendők a teljes sejtmentesség eléréséhez a kezelt szövetekben, a komplett decellularizációhoz a különböző mechanizmusú kezelések kombinációja szükséges.
2. Alátámasztottuk azon ismert állítást, hogy az enzimatis sejtmentesítő eljárások károsan befolyásolhatják az ECM rostszerkezetének integritását.
3. Demonstráltuk, hogy a különböző sejtmentesítési eljárások nem befolyásolják jelentősen a kezelt érgraftok mechanikai paramétereit.
4. Az általunk legjobbnak bizonyult sejtmentesítési eljárással kezelt graftok megfelelnek a célkitűzésekben elvárt sajátosságoknak, így az e módszerrel decellularizált érgraftok alkalmasak lehetnek in vivo felhasználásra.
5. Elsőként végeztük el a korábbiakban effektívnek talált metódussal decellularizált sertés allo-, és juh xenograftok end-to-end transzplantációját sertések infrarenalis aortájába, 6 hónapos utánkövetéssel.
6. Az állatkísérletes modellel, illetve az explantációt követő vizsgálatokkal kapott igen kedvező eredmények megadják az alapot, természetesen további fejlesztések, vizsgálatok és szoros utánkövetés mellett, a biológiai érgraft későbbi humán kipróbálására.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőimnek, Prof. Dr. Menyhei Gábornak és Dr. Jancsó Gábornak, hogy lehetőséget biztosítottak számomra jelen kutatás elvégzéséhez, valamint a munkám során tanúsított támogatásukért és nélkülözhetetlen szakmai segítségükért.

Külön köszönettel tartozom a PTE ÁOK Sebészeti Oktató és Kutató Intézet munkatársainak, akiknek önzetlen és fáradhatatlan segítsége nagyban hozzájárult munkám elkészítéséhez. A műtétek elvégzésében nyújtott segítségért Dr. Hardi Péter, Dr. Nagy Tibor, Dr. Soltész Ingrid, Dr. Petrovics Laura, Dr. Varga Péter és Dr. Takács Ildikó kollégákat illeti köszönet, külön kiemelve a műtői személyzet: Jakabovics Adrienn, Spenglerné Átol Erika és Mák Gábor hathatós közreműködését. Köszönöm a labormunkálatok során Fajtik Csilla és Pázmándy Ágnes, valamint Márton-Vörös Kata adminisztratív segítségét.

Szeretném megköszönni Dr. Szekeres Györgynek a szövettani metszetek és Prof. Dr. Seress Lászlónak az elektronmikroszkópos leletek kiértékelésében nyújtott segítségét.

Köszönöm a PTE KK Érsebészeti Klinika valamennyi dolgozójának baráti támogatását.

Végül, de nem utolsósorban, hálás köszönettel tartozom családomnak, feleségemnek és kislányomnak, a munkám során tanúsított mérhetetlen türelmükért, és odaadó támogatásukért.

7. Irodalomjegyzék

¹ Szilagyí DE, Smith RF, Elliott JP, Vrandečić MP. Infection in arterial reconstruction with synthetic grafts. *Ann Surg.* 1972 Sep;176(3):321-33.

² Acsády Gy, Nemes A. Az érsebészet tankönyve. *Medicina.* 2007

³ Fitzpatrick JC, Clark PM, Capaldi FM. Effect of decellularization protocol on the mechanical behavior of porcine descending aorta. *Int J Biomater.* 2010, vol. 2010

⁴ Xiong Y, Chan WY, Chua AW, Feng J, Gopal P, Ong YS, Song C. Decellularized porcine saphenous artery for small-diameter tissue-engineered conduit graft. *Artif Organs.* 2013 Jun;37(6):74-87.

⁵ I. Töpel, C. Uhl, I. Ayx, M. Steinbauer: Xenografts in septic vascular surgery. *Gefasschirurgie.* 2016 (Suppl2); 21:55-58

⁶ Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 2006 Jul; 27(19): 3675–3683.

⁷ Conklin BS, Richter ER, Kreutziger KL, Zhong DS, Chen C. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. *Med Eng Phys.* 2002 Apr;24(3):173-183.

⁸ Nemes A, Acsády G, Fraefel W, Lichti H, Monos E, Oertli R, Somogyi E, Sótonyi P. Application of a vascular graft material (Solcograft-P) in experimental surgery. *Biomaterials.* 1985;6(5):303-311.

⁹ Schröder A, Imig H, Peiper U, Neidel J, Petereit A. Results of a bovine collagen vascular graft (Solcograft-P) in infra-inguinal positions. *Eur J Vasc Surg.* 1988;2(5):315-321.

¹⁰ Upadhyay RK. Role of biological scaffolds, hydro gels and stem cells in tissue regeneration therapy. *Adv Tissue Eng Regen Med Open Access.* 2017;2(I):121-135.

¹¹ Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011 Apr;32(12):3233-3243.

¹² Colaco M, Atala A. The future of transplant biology and surgery. *Interdisciplinary Medicine*; 2014.

¹³ Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant Immunol* 2004;12:367-77.

¹⁴ Kolker AR, Brown DJ, Redstone JS, Scarpinato VM, Wallack MK. Multilayer reconstruction of abdominal wall defects with acellular dermal allograft (AlloDerm) and component separation. *Ann Plast Surg* 2005;55:36-41.

¹⁵ Chen F, Yoo JJ, Atala A. Acellular collagen matrix as a possible „off the shelf” biomaterial for urethral repair. *Urology* 1999;54:407-10.

¹⁶ Lee MS. GraftJacket augmentation os chronic Achilles tendon ruptures. *Orthopedics* 2004;27:151-3.

¹⁷ Dellgren G, Eriksson M, Brodin LA, Radegran K. The extended Biocor stentless aortic bioprosthesis. Early clinical experience. *Scand Cardiovasc J* 1999;33:259-64.

¹⁸ Weymann A, Radovits T, Schmack B, Korkmaz S, Li S, Chaimow N, Pätzold I, Becher PM, Hartyánszky I, Soós P, Merkely G, Németh BT, Istók R, Veres G, Merkely B, Terytze K, Karck M, Szabó G. Total aortic arch replacement: superior ventriculo-arterial coupling with decellularized allografts compared with conventional prostheses. *PLoS One*. 2014 Jul 31;9(7)

¹⁹ Weymann A, Schmack B, Okada T, Soós P, Istók R, Radovits T, Straub B, Barnucz E, Loganathan S, Pätzold I, Chaimow N, Schies C, Korkmaz S, Tochtermann U, Karck M, Szabó G. Reendothelization of human heart valve neoscaffolds using umbilical cord-derived endothelial cells. *Circ J*. 2013;77(1):207-216.

²⁰ Giusti S, Bogetti ME, Bonafina A, Fiszer de Plazas S. An improved method to obtain a soluble nuclear fraction from embryonic brain tissue. *Neurochem Res* 2009;34(11):2022-9.

²¹ Cox B, Emili A. Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics. *Nat Protoc* 2006;1(4).1872-8.

²² Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta* 2004;1666:105-17.

-
- ²³ Alhamdani MS, Schroder C, Werner J, Giese N, Bauer A, Hoheisel JD. Single-step procedure for the isolation of proteins at near-native conditions from mammalian tissue for proteomic analysis on antibody microarrays. *J Proteome Res* 2010;9(2):963-71.
- ²⁴ Meyer SR, Chiu B, Churchill TA, Zhu L, Lakey JR, Ross DB. Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat. *J Biomed Mater Res A* 2006;79(2):254-62.
- ²⁵ Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;27:566-71.
- ²⁶ Dahl SL, Koh J, Prabhakar V, Niklason LE. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant* 2003;12:659-66.
- ²⁷ Woods T, Gratzner PF. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomaterials* 2005;26:7339-49.
- ²⁸ Lumpkins SB, Pierre N, McFetridge PS. A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogenic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Acta Biomater* 2008;4(4):808-16.
- ²⁹ Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Wolner E, Weigel G, et al. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs* 2003;26(5):421-7.
- ³⁰ Yang M, Chen CZ, Wang XN, Zhu YB, Gu YJ. Favorable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularized bovine pericardium scaffold for tissue engineered heart valves. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;91(1):354-61.
- ³¹ Yang B, Zhang Y, Zhou L, Sun Z, Zheng J, Chen Y, et al. Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16(5):1201-11.
- ³² Wilson WR, Bower TC, Creager MA, Amin-Hanjani S, O’Gara PT, Lockhart PB, Darouiche RO, Ramlawi B, Derdeyn CP, Bolger AF, Levison ME, Taubert KA, Baltimore RS, Baddour LM. Vascular Graft Infections, Mycotic Aneurysms and Endovascular Infections: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2016;134:e412-e460.

³³ Young RM, Cherry KJ Jr, Davis PM, Gloviczki P, Bower TC, Panneton JM, Hallett JW Jr. The results of in situ prosthetic replacement for infected aortic grafts. *Am J Surg.* 1999 Aug;178(2):136-140.

³⁴ Bandyk DF, Novotney ML, Johnson BL, Back MR, Roth SR. Use of rifampin soaked gelatin-sealed polyester grafts for in situ treatment of primary aortic and vascular prosthetic infections. *J Surg Res.* 2001 Jan;95(1):44-49.

³⁵ Bandyk DF, Novotney ML, Back MR, Johnson BL, Schmacht DC. Expanded application of in situ replacement for prosthetic graft infection, *J Vasc Surg.* 2001 Sep;34(3):411-419.

³⁶ Nagy Z, Oláh Z, Kókai J, Molnár AB, Laczkó Á, Szabó GV, Juhász V, Garbaisz D, Berczeli M, Sztupinszky Z, Szeberin Z. Role of the homograft bypass in extremity inferior's reconstructions. *Magy Seb.* 2017 Mar;70(1):5-12.

³⁷ Carrel A. Heterotransplantation of blood vessels preserved in cold storage. *J Exp Med.* 1907;9(2):226-228.

³⁸ Dubost C, Allary M, Oeconomos N. Treatment of aortic aneurysms; removal of the aneurysm; re-establishment of continuity by grafts of preserved human aorta. *Mem Acad Chir.* 1951;77:381-3.

³⁹ Cervantes J. Reflections on the 50th anniversary of the first abdominal aortic aneurysm resection. *World J Surg.* 2003 Feb;27(2):246-8.

⁴⁰ Barner HB, DeWeese JA, Dale WA, Mahoney EB. Aneurysmal degeneration of femoropopliteal arterial homografts. *JAMA.* 1966;196:631-634.

⁴¹ Knox WG, Miller RE. Long-term appraisal of aortic and arterial homografts implanted in years 1954-1957. *Ann Surg.* 1970;172:1076-1078.

⁴² Szilagyi DE, Rodriguez FJ, Smith RF, Elliott JP. Late fate of arterial allografts. Observation 6 to 15 years after implantation. *Arch Surg.* 1970;101:721-733.

⁴³ Salacinski HJ, Goldner S, Giudiceandrea A, Hamilton G, Seifalian AM, Edwards A, Carson RJ. The mechanical behavior of vascular grafts: a review. *J Biomater Appl.* 2001 Jan;15(3):241-278.

⁴⁴ Lutz B, Reeps C, Biro G, Knappich C, Zimmermann A, Eckstein HH. Bovine Pericardium as New Technical Option for in situ Reconstruction of Aortic Graft Infection. *Ann Vasc Surg.* 2017 May;41:118-126.

⁴⁵ McMillan WD, Leville CD, Hile CN. Bovine pericardial patch repair in infected fields. *J Vasc Surg.* 2012 Jun;55(6):1712-1715.

⁴⁶ Dulbecco E, Camporrotondo M, Blanco G, Haberman D. In situ reconstruction with bovine pericardial tubular graft for aortic graft infection. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2010;25(2):249-252.

⁴⁷ Czerny M, von Allmen R, Opfermann P, Sodeck G, Dick F, Stellmes A, Makaloski V, Bühlmann R, Derungs U, Widmer MK, Carrel T, Schmidli J. Self-made pericardial tube graft: a new surgical concept for treatment of graft infections after thoracic and abdominal aortic procedures. *Ann Thorac Surg.* 2011 Nov;92(5):1657-1662.

⁴⁸ Töpel I, Betz T, Uhl C, Wiesner M, Bröckner S, Steinbauer M. Use of biosynthetic prosthesis (Omniflow II®) to replace infected infrainguinal prosthetic grafts-first results. *Vasa.* 2012 May;41(3):215-20.

⁴⁹ Töpel I, Stigler T, Ayx I, Betz T, Uhl C, Steinbauer M. Biosynthetic Grafts To Replace Infected Prosthetic Vascular Bypasses: A Single-Center Experience. *Surg Infect (Larchmt).* 2017;18(2):202-205.

⁵⁰ Krasznai AG, Snoeijs M, Siroen MP, Sigterman T, Korsten A, Moll FL, Bouwman LH. Treatment of aortic graft infection by in situ reconstruction with Omniflow II biosynthetic prosthesis. *Vascular.* 2016 Dec;24(6):561-566.

8. Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemény:

Fazekas G, Benkő L, Kasza G, Arató E, Sínay L, Jávor S, Nagy T, Hardi P, Kollár L, Jancsó G, Menyhei G: Histological and Mechanical Assessment of Decellularized Porcine Biografts, and Its Biological Evaluation following Aortic Implantation during Mid-Term Follow-Up. *J Vasc Res.* 2018;55:287-298 (IF: **1,855**)

Egyéb publikációk:

Fazekas G, Kasza G, Arató E, Sínay L, Vadász G, Füzi Á, Hardi P, Benkő L, Nagy T, Jancsó G, Menyhei G. Cerebral hyperperfusion syndrome and blood pressure control. *Orv Hetil.* 2015 Jun 28;156(26):1049-53. (IF: **0,291**)

Nagy T, Kovács V, Hardi P, Veres TG, Takács I, Jancsó G, Sínay L, **Fazekas G**, Pintér Ö, Arató E. Inhibition of Glutathione S-Transferase by Ethacrynic Acid Augments Ischemia-Reperfusion Damage and Apoptosis and Attenuates the Positive Effect of Ischemic Postconditioning in a Bilateral Acute Hindlimb Ischemia Rat Model. *J Vasc Res.* 2015;52(1):53-61. (IF: **2,186**)

Jancsó G, Arató E, Hardi P, Nagy T, Pintér Ö, **Fazekas G**, Takács I, Menyhei G, Kollár L, Sínay L. Controlled reperfusion decreased reperfusion induced oxidative stress and evoked inflammatory response in experimental aortic-clamping animal model. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016 Sep 12;63(3):217-34. (IF: **1,679**)

Nagy T, Hardi P, Takács I, Tóth M, Petrovics L, Jancsó G, Sínay L, **Fazekas G**, Pintér Ö, Arató E. Pentoxifylline Attenuates the local and Systemic Inflammatory Response After Infrarenal Abdominal Aortic Ischemia-Reperfusion. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2017;65(3):229-240. (IF: **1,914**)

Hardi P, Nagy T, **Fazekas G**, Arató E, Menyhei G, Sétáló Jr. G, Vecsernyés M, Pintér Ö, Takács I, Bohonyi N, Jancsó G. Sodium Pentosan Polysulfate Reduced Renal Ischemia-Reperfusion-Induced Oxidative Stress and Inflammatory Responses in an Experimental Animal Model. *J Vasc Res.* 2016;53:230-242 (IF: **1,759**)

Fontanini DM, **Fazekas G**, Vallus G, Juhász Gy, Váradi R, Kövesi Zs, Kolossváry M, Szeberin Z. Thoracic aortic stentgraft implantations in Hungary from 2012 to 2016. *Orv Hetil.* 2018;159(2):53-57. (IF: 0,564)

Arató E, Kasza G, Sínay L, Benkő L, **Fazekas G**, Hardi P, Füzi A, Nagy T, Masoud S, Jancsó G, Kollár L, Menyhei G. Endovascular treatment of subclavian artery pseudoaneurysm as a delayed complication after surgery for aorto-bifemoral graft infection. *Magy Seb.* 2012 Jun;65(3):92-6.

T. Nagy, G. Kasza, L. Sínay, L. Benkő, **G. Fazekas**, P. Hardi, G. Jancsó, I. Szelechman, H. Rebeka, G. Menyhei, L. Kollár, E. Arató. Das posttraumatische Pseudoaneurysma der A. ulnaris und seine operative Versorgung – eine Fallbeschreibung. *PERFUSION* 2014;27:200–203.

Arató Endre, Kasza Gábor, Sínay László, Benkő László, **Fazekas Gábor**, Hardi Péter, Füzi Árpád, Nagy Tibor, Jancsó Gábor, Gadácsi Melinda, Jávor Szaniszló, Vadász Gergő, Rebeka Hughes, Menyhei Gábor. Az artéria ulnaris poszttraumás álaneurysmája és annak műtéti ellátása. *Érbetegségek* 2014/4:144-147.

Szelechman I, Jancsó G, Vadász G, Kasza G, Sínay L, **Fazekas G**, Hardi P, Nagy T, Benkő L, Gadácsi M, Lima N, Menyhei G, Arató E. Dilemmas of the reconstruction of the major pelvic artery due to infectious aortic graft complication. *Magy Seb.* 2015 Feb;68(1):12-7.

Holczer L, Menyhei G, Kasza G, Arató E, Füzi Á, Hardi P, **Fazekas G**, Benkő L, Kollár L. Hibrid alsó végtagi rekonstrukciók középtávú eredményeinek elemzése. *Érbetegségek* 2009/4:109-112.

Absztraktok:

Fazekas Gábor: Endoszkópos thoracalis sympathectomiával szerzett tapasztalataink. *Érbetegségek*, XVII. évfolyam, 2010/Suppl.

Fazekas Gábor: Az alsó végtagi kritikus ischaemia endovasculáris módszerrel történő kezelése kapcsán szerzett tapasztalataink diabeteses és nem diabeteses betegekben. *Érbetegségek*, XVIII. évfolyam, 2011/Suppl. 2.

Fazekas G; Arató E; Kasza G; Sínay I; Jancsó G; Hardi P; Benkő L; Vadász G; Gadácsi M; Jávor Sz; Kollár L; Menyhei G. Perioperatív tenziókontroll és carotis endarterectomiát követő hyperperfúziós szindróma. *Érbetegségek*, XX. évf. 4. szám, 2013/4.

Hardi Péter, Nagy Tibor, Veres Gyöngyvér Tünde, Kovács Viktória, **Fazekas Gábor**, Pintér Örs, Nagy Ágnes, Kovács Sándor, Szelechman Ildikó, Szekeres Eszter, Takács Veronika, Bognár Laura, Jancsó Gábor. Vese iszkémiás károsodások csökkentése penthosan polysulfate natrium (PPSN) adásával állatkísérletes modellben. *MAGYAR SEBÉSZET* 67:(3) p. 166-167. (2014)

Hardi Péter, Nagy Tibor, **Fazekas Gábor**, Pintér Örs, Nagy Ágnes, Vecsernyés Mónika, Ifj. Sétáló György, Szelechman Ildikó, Szekeres Eszter, Bognár Laura, Arató Endre, Jancsó Gábor: Pentozán-poliszulfát-nátrium hatása vese ischaemiás-reperfúziós károsodására állatkísérletes modellben. *MAGYAR SEBÉSZET* 68:(3) p. 113. (2015)

Nagy Tibor, Tóth Mónika, Hardi Péter, Nagy Ágnes, Bognár Laura, Szelechman Ildikó, Sárvári Katalin, Pintér Örs, **Fazekas Gábor**, Jancsó Gábor, Arató Endre: Az endogén antioxidáns glutation S-transzferáz etakrinsavval történő gátlása súlyosítja az ischaemia-reperfúziós károsodásokat és csökkenti a posztkonkondicionálás védőhatását alsó végtagi akut ischaemiás patkánymodellen. *MAGYAR SEBÉSZET* 68:(3) p. 114. (2015)

Fazekas Gábor, Nagy Tibor, Hardi Péter, Kasza Gábor, Arató Endre, Jancsó Gábor, Menyhei Gábor: Decellularizált sertés biograft vizsgálata. *MAGYAR SEBÉSZET* 68:(3) p. 132. (2015)

Szekeres Eszter, Vastag Fanni, Nagy Tibor, **Fazekas Gábor**, Hardi Péter: Az atherosclerosis által okozott ischaemiás károsodások lehetséges következményeinek bemutatása egy klinikai eset tükrében. *MAGYAR SEBÉSZET* 68:(3) p. 140. (2015)

Szelechman Ildikó, Jancsó Gábor, Vadász Gergely, Kasza Gábor, Sínay László, **Fazekas Gábor**, Hardi Péter, Nagy Tibor, Benkő László, Gadácsi Melinda, Lima Nikoletta, Menyhei Gábor, Arató Endre: A medencei verőér helyreállításának dilemmái szeptikus aortagraft esete kapcsán. *MAGYAR SEBÉSZET* 68:(3) p. 141. (2015)

Fazekas Gábor, Nagy Tibor, Hardi Péter, Arató Endre, Menyhei Gábor, Jancsó Gábor: Decellularizált bioérgraft vizsgálata xenotranszplantációt követően. *MAGYAR SEBÉSZET* 70(3) p. 270. (2017)

Tóth Mónika, Hardi Péter, Takács Ildikó, Petrovics Laura, Jancsó Gábor, Sínay László, **Fazekas Gábor**, Arató Endre, Pintér Örs, Nagy Tibor: A pentoxifillin szerepe ischaemiás-reperfüziós károsodásokban kétoldali akut hátsó végtagi ischaemia patkánymodelljében. *MAGYAR SEBÉSZET* 70(3) p. 257. (2017)

Fazekas Gábor, Benkő László, Füzi Árpád, Sínay László, Arató Endre, Kasza Gábor, Hardi Péter, Jancsó Gábor, Menyhei Gábor: Cerebralis hyperperfusio syndroma carotis thrombendarteriectomiát követően. *MAGYAR SEBÉSZET* 67:(2) p. 82. (2013)

Fazekas Gábor, Kasza Gábor, Benkő László, Gadácsi Melinda, Arató Endre, Menyhei Gábor: Stent graft implantációt követő szeptikus szövődmény sikeres ellátása. *Érbetegségek*, XXIV. évfolyam 2. szám, 2017/2.

Fazekas Gábor, Benkő László, Kasza Gábor, Vadász Gergely, Menyhei Gábor: Negatív nyomásterápia, mint új lehetőség a szeptikus graftok kezelésében. *Érbetegségek*, XXVI. évfolyam 2. szám, 2019/2.

Előadások:

Fazekas Gábor: Endoszkópos thoracalis sympathectomiával szerzett tapasztalataink. *Fiatal Angiológusok VII. Országos Fóruma 2010.*, Balatonkenese

Fazekas Gábor: Az alsó végtagi kritikus ischaemia endovasculáris módszerrel történő kezelése kapcsán szerzett tapasztalataink diabeteses és nem diabeteses betegeknél. *Magyar Angiológiai és Érsebészeti Társaság Kongresszusa 2011.*, Budapest
13. Pécsi Intervenciós Radiológiai Szimpózium 2013., Pécs

Fazekas Gábor, Benkő László, Füzi Árpád, Sínay László, Arató Endre, Kasza Gábor, Hardi Péter, Jancsó Gábor, Menyhei Gábor: Cerebralis hyperperfusio syndroma carotis thrombendarterectomiát követően.

Magyar Sebész Társaság Kísérletes Sebészeti Szekció XXIV. Kongresszusa 2013., Debrecen
Magyar Sebész Társaság Dél-Dunántúli Szekciójának Kongresszusa 2013., Mohács

Fazekas G, Arató E, Kasza G, Sínay L, Jancsó G, Hardi P, Benkő L, Vadász G, Gadácsi M, Jávorszki Sz, Kollár L, Menyhei G: Perioperatív tenziókontroll és carotis endarterectomiát követő Hyperperfúziós Szindróma.

Magyar Angiológiai és Érsebészeti Társaság Kongresszusa 2013., Pécs

Fazekas Gábor, Nagy Tibor, Hardi Péter, Kasza Gábor, Arató Endre, Jancsó Gábor, Menyhei Gábor: Decellularizált sertés biograft vizsgálata.

Magyar Sebész Társaság Kísérletes Sebészeti Szekció XXV. Kongresszusa 2015., Pécs

Fazekas Gábor, Kasza Gábor, Benkő László, Gadácsi Melinda, Arató Endre, Menyhei Gábor: Stent graft implantációt követő szeptikus szövődmény sikeres ellátása.

Magyar Angiológiai és Érsebészeti Társaság Kongresszusa 2017., Szombathely

Fazekas Gábor, Nagy Tibor, Hardi Péter, Arató Endre, Menyhei Gábor, Jancsó Gábor: Decellularizált bioérgraft vizsgálata xenotranszplantációt követően.

Magyar Sebész Társaság Kísérletes Sebészeti Szekció XXVI. Kongresszusa 2017., Herceghalom

Fazekas Gábor, Benkő László, Kasza Gábor, Vadász Gergely, Menyhei Gábor: Negatív nyomásterápia, mint új lehetőség a szeptikus graftok kezelésében.

Magyar Angiológiai és Érsebészeti Társaság Kongresszusa 2019., Balatonfüred

Gábor Fazekas, Gábor Menyhei:

What is the optimal timing of carotid endarterectomy in symptomatic patients
Amerikai Magyar Orvosszövetség (HMAA) Magyar Tagozatának Konferenciája,
Balatonfüred, 2015. (felkért előadás)