

Humán ér pótlásra alkalmas decellularizált biológiai graft vizsgálata

PhD Tézis

Dr. Fazekas Gábor

Doktori Iskola vezetője:

Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető:

Dr. Jancsó Gábor

Témavezető:

Prof. Dr. Menyhei Gábor

Dr. Jancsó Gábor



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

Pécs, 2019.

1. Bevezetés

A műérrel végzett rekonstrukciók legrettegettebb szövődménye az alkalmazott érgraft septicussá válása, melynek gyógyítása a mai napig is az érsebészet legnehezebb, igen magas morbiditással és mortalitással járó feladata. Enyhébb esetben 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. Ezen fertőzések kialakulhatnak a közvetlen posztoperatív időszakban, mint korai fertőzés, valamint jóval a műtétet követően, mint késői infekció.

Graft megtartó módszert is alkalmazhatunk a fertőzött műér kezelésében, azonban végtagmentés és a beteg életben maradása, az esetek túlnyomó többségében csak a septicussá vált graft eltávolításával és cseréjével biztosítható.

Cseregraftként az egyik alternatívát a különféle antisepticus anyagokkal, ezüsttel vagy antibiotikummal impregnált graftok felhasználása jelenti, míg másik lehetőség, mely jóval előnyösebb az infekció szanálása szempontjából, a biológiai graft.

Az impregnált graftok előnye, 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 az impregnált graftok is septicussá válnak.

Az autológ, biológiai graft – leggyakrabban saphena vagy mélyvéna - 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.

A cadaver, cryopreservált allograftok jó megoldást nyújtanak, azonban magas áruk 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. Hátrányuk azonban, hogy immunválaszt váltanak ki. A xenograftok immunogenitásának csökkentése a graftok decellularizálásával lehetséges. Ennek során minden sejtes elemet eltávolítunk a szövetből úgy, hogy annak kötőszövetes vázát eredeti szerkezetében megőrizzük. A

sejtmentesített szövet beültetését követően lehetőség nyílik a recipiens sejtek migrációjára, megtelepedésére, proliferációjára, differenciálódására, ezáltal megelőzve az implantátumra káros immunválasz kialakulását

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. Azonban az érsebészet és fegyvertárának jelen századunkban tapasztalt rohamos fejlődése, illetve a jelentősen megnövekedett esetszám miatt arányosan gyakrabban előforduló érsebészeti komplikáció ismételen a biológiai érgraftok fejlesztése, az ún. „tissue-engineering” irányába fordította a figyelmet.

2. Célkitűzések

Munkánk célja egy olyan biológiai graft előállítása volt, amely a különböző grafftípusok előnyös tulajdonságait egyesítve, a septicus érsebészetben alternatívát nyújtó cseregraftként alkalmazható lenne.

Az **első kísérletsorozatban** decellularizációs módszerek összehasonlító vizsgálatát végeztük fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok, valamint mechanikai tesztek alapján. 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 a decellularizált grafftípusok, valamint a kezelt graft és a natív aorta között készített éranastomosisok intraluminális nyomással szembeni ellenállását vizsgáltuk. Ezek alapján választottuk ki a legideálisabb decellularizációs protokollt, melyet az állatokon végzett tanulmányhoz felhasználtunk.

Tanulmányunk **második részében** decellularizációs eljárással előkészített aortaszakaszokat implantáltunk 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, a beültetett minták mekkora hányada marad nyitva, illetve milyen arányban fordul elő makroszkóposan is észlelhető degeneráció, mind az allo-,

mind a xenotranszplantáció esetében. A 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 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 szerv- vagy szövet-transzplantáció az utóbbi évtizedekben rohamos fejlődést mutatott. A növekvő igény, melyet a humán források már nem képesek teljesen kielégíteni, következtében egyre nagyobb figyelem fordítódott a mesterséges szövet- és szerv előállítás, az ún. tissue-engineering irányába. Ennek célja olyan decellularizált biológiai anyag előállítása, amely mintegy vázként szolgál a recipiens sejtek megtelepedésének, növekedésének, differenciálódásának és a szövet kialakulásának. A decellularizációs eljárások során a szövet vagy szerv minden celluláris és nucleáris komponensét eltávolítjuk úgy, hogy a visszamaradó extracelluláris mátrix (ECM) mechanikai integritását megőrizzük. Az eredeti szövetből így nyert sejtmentes ECM, mint „biológiai váz”, felhasználható rekonstrukciós céllal, mesterséges szövet-, illetve szervpótlásra. Mind az allogén, mind a xenotranszplantatio legfontosabb limitáló tényezője a donor sejtek felszíni antigénjei által a recipiensben kiváltott donor-ellenes antitest termelődés, ami gyulladásos reakcióhoz és immunológiai válaszhoz, végül az implantátum immun-mediált rejectiójához vezet. Ezt hivatott az implantátum decellularizálása kivédeni.

Decellularizált szövetek és szervekből származó biológiai vázak (mint pl.: mint pl. inak, szalagok, idegek, vázizomzat, húgyhólyag, máj, szívbillentyűk, erek) sikeres felhasználásáról állatokon végzett tanulmányok és humán klinikai felhasználások is beszámolnak. A vonatkozó szakirodalmat áttekintve számos hatékony sejtmentesítő protokollt találtunk, azonban a decellularizáció hatékonyságában, az eredeti vázszerkezet megkímélésében 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

A tanulmány során 22-25 kilogramm közötti testtömegű, Yorkshire sertéseket használtunk fel. A sertések anesztéziája során 3 mg/ttkg ketamine-hydrochloride és 1-2 mg/ttkg xylazine-hydrochloride óránkénti folyamatos intravénás adását alkalmaztuk, intratrachealis tubuson keresztül, 1 l/perc oxigénnel és 3 l/perc dinitrogén-oxiddal dúsított levegővel lélegeztettük. Fiziológiás sóoldat infúziójával tartottuk fenn az állat normál hidratáltságát a műtét folyamán. A hasüreget total median laparotomiából nyitottuk meg. A retroperitoneumban kipropráltuk a hasi aorta infrarenalis szakaszát. 2500 Nemzetközi Egység Natrium-heparin intravénás adását követően az aortát a szükséges érszakasz eltávolításának idejére kirekesztettük. A hasfalat loop segítségével, a bőrt tovafutó Donati varrattal zártuk.

3.2.2. Decellularizációs Módszerek

Infrarenalis aorta-szegmentumokat metszettünk ki frissen az altatott sertésekből, majd a kb. 8mm átmérőjű és 2 cm hosszú érdarabokat foszfát pufferes sóoldatba (PBS) helyeztük, azzal a mintákat mostuk, hogy minden reziduális vért eltávolítsunk róluk. Minden protokoll szerint 8 mintát vizsgáltunk.

3.2.2.1. 1-es Protokoll

A frissen eltávolított aorta szegmentumokat mélyfagyasztási eljárással -80° Celsius-fokra hűtöttük.

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), és 0.05%-os nátrium-azid (NaN_3), PBS-ben elkészített oldatával történt. Az oldatot 6 óránként cseréltük. A folyamat végén a minták 12 órás mosása következett PBS-ben, a debris eltávolítása érdekében.

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.

3.2.2.4. 4-es Protokoll

A decellularizálás 0.25%-os Triton X-100 és 0.25%-os nátrium-deoxycholát PBS-ben készített oldatával kezdődött. A minták folyamatos rázás mellett, 24 órás, szobahőmérsékleten történő kezelését egy 72 órás mosási ciklus követte 4° Celsius-fokon, Earle-féle Medium 199-ben. Ezt követően a mintákat 100 g/mL RNase A-t, 150 IU/mL DNase I-et és 50 mmol MgCl_2 -ot tartalmazó PBS-ben kezeltük 24 órán át, 37° Celsius-fokos hőmérsékleten. Végül a folyamat 24 órás mosási ciklussal Medium 199-ben, 4°C-fokon zárult.

3.2.3. Fénymikroszkópos vizsgálatok

A kezelt aortafal-szegmentek fixálása 10%-os neutrális formalinban történt, majd a hossz- és keresztmetszeti szövetblokkokat paraffinba ágyasztuk, végül 2-4 mikrométer vastagságú metszeteket készítettünk. Az metszeteket 3 különböző festésnek vetettük alá. A Hematoxylin-eosin (HE) festéssel a decellularizációs effektivitást szemléltettük. Orcein és Masson-trichrome hisztokémiával a kötőszöveti rostszerkezetet változását, illetve prezervációját vizsgáltuk.

3.2.4. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatot megelőzően a minták fixálása 2%-os formaldehidből és 2.5%-os glutáraldehidből álló oldatban 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.

3.2.5. Mechanikai tesztek

A mechanikai tesztekhez 3-4 cm hosszú érszakaszokat használtunk. Az erek disztális végét 6/0-ás Prolene tova futó érvarrattal zártuk. Az oldalágakat 2/0-ás Polypropylene fonallal ligáltuk. A proximális vég kanülálása hagyományos vénakanül felhasználásával történt, majd ez a vég 2/0-ás Polypropylene fonallal került lezárásra és rögzítésre a kanülhöz. A nyomástervezetekhez ballondilatációs pumpát használtunk, a tesztekéről fotódokumentációt készítettünk.

3.2.5.1. Nyomás-teszt

A nyomás-teszt során a kezelt érszakaszokat vizsgáltuk, összehasonlítva natív aorta-szegmentumokkal. A minták fentiek szerinti előkészítését és levegőtlenítést 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.

3.2.5.2. Varrat-megtartási teszt

Elsőként anasztomózist készítettünk a kezelt és natív érszakaszok között, 6/0-ás Prolene, tova futó érvarrattal. Ezt követően a disztális, kezelt véget lezártuk, a proximális, natív szakaszt pedig a kanülhöz rögzítettük. A levegőtlenített mintákat, illetve az anasztomózisokat, 37°C-fokos PBS befecskendezésével 225 Hgmm legnagyobb intralumináris nyomásnak tettük ki, fenntartva ezt a nyomást ötször 1 percig.

3.3. Eredmények

3.3.1. Fénymikroszkópos vizsgálatok kiértékelése

Elsőként a minták HE festését végeztük el a decellularizáció effektivitásának igazolására. Eredményeink azt mutatták, hogy az 1-es és 3-as Protokoll nem bizonyult hatékony eljárásnak, mivel a mintákban nagy arányban maradtak vissza sejtmagok. Ezzel szemben a 2-es és 4-es Protokollal kezelt aortafalban a sejtmagok komplett eltűnését észleltük.

Előbbiekből következően a specifikus, Orcein és MT hisztokémiai festéseket már csak a 2-es, 4-es Protokoll mintái esetében végeztük el. A kezelt metszetekben a falvastagság csökkenése volt megfigyelhető. Számottevő szöveti destrukció nem volt megfigyelhető, döntően szabályos szerkezetű és lefutású rostokat láttunk, azonban a 4-es Protokoll szerint kezelt metszetekben, a lumen felület közelében, néhány hullámosabb lefutású és enyhén töredezett rost volt felfedezhető, ami a kötőszövetes váz enyhe fokú károsodására utal.

3.3.2. Elektronmikroszkópos vizsgálatok eredménye

A 2-es és 4-es Protokoll szerint kezelt aortafal TEM képein nem volt észrevehető különbség, egyértelműen látszott a sejtes elemek hiánya és a kötőszöveti rostok szerkezetének megtartottsága. Az 1-es és 3-as Protokoll szerint készült minták TEM elemzésétől eltekintettünk.

3.3.3. Mechanikai tesztek értékelése

A tesztek során egyetlen esetben sem tapasztaltunk aortafal rupturát, vagy a fal átérésztését, leakage-et, legyen szó bármely Protokoll által kezelt érszakaszról. 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.

3.4. Megbeszélés

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 enzimatisz módszert alkalmazunk. A leeffektívebb protokollokról általánosságban elmondható, hogy a különféle mechanizmusú kezelések, így a fizikai, kémiai és enzimatisz beavatkozások kombinációja vezet a legjobb eredményhez.

A *fizikai* metódusok, mint a gyakran alkalmazott gyorsfagyasztás hatékony sejtlyázó hatással bír, azonban nem elég effektív a sejtes elemek eliminálásában, akárcsak a mechanikai rázás, így csak a többi kezelés kiegészítéseként ajánlott.

A *kémiai* módszerek közül az ionos detergensok, mint az SDS és Na-azid, vagy a nem-ionos detergens Triton X-100 effektívek a sejt anyagainak a szövetből történő eltávolításában, és az ECM struktúráját is csak kis mértékben károsítják. A detergensok kombinálása növeli a szövetből történő fehérje-kivonás effektívását, amely hatékonyabb sejtmentesítést eredményez.

A teljes sejtmentesség elérése csak *enzimatisz* kezeléssel igen nehéz, ráadásul az enzimek károsító hatással bírhatnak a szövetek extracelluláris komponenseire, főként hosszas behatási idő mellett, így nem önállóan, hanem egyéb decellularizációs technikák kiegészítéseként alkalmazandóak, az effektus növelése céljából.

Ismert tény, hogy a decellularizációs módszerek egyikével sem lehet tökéletesen eltüntetni az összes sejtes összetevőt, azonban a legminimálisabbra csökkenteni, a kötőszövetes váz szignifikáns károsodása nélkül, magasabb implantációs sikerarányt eredményezhet.

Kutatásunkban eredeti kísérletet tettünk az összes lényegesnek ítélt, korábban már alkalmazott decellularizációs módszer hatékony megítélésére. Látható, hogy a gyorsfagyasztás önállóan vagy a monofázisos SDS ionos detergens használat szerény sejtmentesítő hatással bír. További két, kombinált azonban hatékonynak és identikusnak igazolódott, mivel minden látható sejtet és sejtes összetevőt maradéktalanul eltüntetett. Az enzimatisz reagenst is tartalmazó 4-es Protokoll enyhe károsodást idézett elő az ECM struktúrájában. A TEM-mel készült képeken a kezelt szövetek sejtmentesnek mutatkoztak, valamint kollagén rostjainak microarchitektúrája majdnem tökéletesen azonos maradt a natív, kezetlen aortájával.

A 225 Hgmm-es intraluminális nyomást - mely majdnem kétszer magasabb a fiziológiás systolés nyomásnál - alkalmazó mechanikai tesztek megfelelő mechanikai stabilitást és varrat-

megtartási erőt mutattak az összes sejtmentesített aorta-graftnál, mindennemű rupturára vagy szivárgásra utaló jel nélkül. Ezen mechanikai tulajdonságok alapján a decellularizált graftok alkalmasak lehetnek implantáció céljára.

3.5. Következtetés

A két hatékony protokoll között nem mutatkozott számottevő különbség a decellularizáció effektivitásában, azonban a 4-es protokoll mintáiban megfigyelt minimális rostkárosodás miatt a 2-es protokollt találtuk hatékonyabbnak, illetve kíméletesebbnek. A mechanikai tesztek során nem igazolódott eltérés a két módszer szerint kezelt minták mechanikai viselkedésében. A szövettani eredmények és a mechanikai tesztek ismeretében, figyelembe véve a rövidebb inkubációs időt és költséghatékonyságot, a 2-es számú protokollt választottuk további kísérleteinkhez, az állatokon végzett tanulmányokhoz.

4. Decellularizált biograftok vizsgálata implantációt követően, 6 hónapos utánpótlás 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. A septicus graft kezelésében mindenképp helye van a graftmegtartó módszereknek, azonban az esetek nagy hányadában gyógyulás csak a fertőzött műér eltávolításával érhető el. Napjainkban az autológ érgraftok jelentik a gold standardot, azonban alkalmazásuk jelentősen megnöveli a műtéti időt és a perioperatív morbiditást, így magas kockázatú betegek esetében más utat kell választani. Szóba jön ezüsttel vagy antibiotikummal impregnált graftok használata, azonban a sikerarány ez esetben igen változó a reinfekció vonatkozásában. A homograftok alkalmazása ajánlott, mivel kiválóan ellenállnak a fertőzéseknek, azonban a graftdegenerációból adódó következményekkel hosszú távon számolni kell, valamint hozzáférhetőségük is korlátozott. 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.

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 utánkövetés során.

4.2. Anyag és módszer

4.2.1. Sebészi előkészítés

Az állatok elaltatását követően total median laparotomiából nyitottuk meg a hasüreget. A véralvadás megelőzésére 2500 NE Natrium-heparin intravénás adását alkalmaztuk. Antibiotikus profilaxisként 0.5mg Cefazoline intravénás adásában részesítettük az állatokat.

4.2.2. Graftok decellularizálása

Az aorta-szegmentek decellularizálása szobahőmérsékleten, 48 órán át tartó folyamatos rázás mellett, 1%-os nátrium-duodecyl-szulfát (SDS), és 0.05%-os nátrium-azid (NaN_3), PBS-ben elkészített oldatával történt. Az oldatot 6 óránként cseréltük. A folyamat végén a minták 12 órás mosása következett PBS-ben, a debris eltávolítása érdekében.

4.2.3. Állatkísérletek

Kísérleteink első szakaszában, a beültetendő aorta-graftokat sertésből, míg második szakaszában juhból állítottuk elő, fenti decellularizációs módszerrel. Az első szakaszban 10

sertés esett át sertés aorta-graft allotranszplantációján, míg a második sorozatban 4 sertés juh aorta-graft xenotranszplantációját végeztük el.

Total median laparotomiát követően a hasi aorta infrarenalis szakaszából az aorta mintegy 1,5-2cm hosszú szakaszát resecaltuk, majd a megfelelő méretű decellularizált biológiai allo-, illetve xenografttal end-to-end interpostiot végeztünk, majd vérzéscsillapítás után a hasfalat és a bőrt zártuk. Műtét végén a femoralis pulzusokat kontrolláltuk, majd az operált állatokat néhány napos megfigyelés után visszaszállítottuk eredeti környezetükbe. 6 hónapos utánkövetés lejártaival a sertések hasi aortájának 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.

4.2.4. Fénymikroszkópos vizsgálatok

Tanulmányunk mindkét fázisában az alábbi metódust alkalmaztuk.

A beültetett, és a natív szegmentumokat is tartalmazó explantált aortából készített hosszanti és haránt metszeteket 4 különböző festési eljárásnak vetettük alá. Rutin HE festéssel az újonnan megjelenő sejtek jelenlétét, valamint az implantált graftszakasz felszínén újdonszerű endotel-réteget igazoltuk. 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.

4.2.5. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

Kísérletünk mindkét szakaszában azonos módon jártunk el azzal a céllal, hogy az implantátum ECM-ában, az újonnan megjelenő sejteket kimutassuk.

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

szakadékony, vérzéses szövődményt, illetve graft-reocclusiot a perioperatív szakban nem figyeltünk meg. A 10 sertésből 9 túlélte a 6 hónapos utánkövetési időszakot. 1 sertés ileusban exitált.

A második műtét során, a graftok kivételekor, jól inkorporált, pulzáló implantátumokat tapasztaltunk. Graft degeneráció, perigraft reakció makroszkóposan nem volt megfigyelhető. Minden beültetett graft a környező, saját aortafalhoz arányos növekedést mutatott hosszban és átmérőben is.

4.3.1.1. Fénymikroszkópos vizsgálatok kiértékelése

Haránt- és hosszmetsetek készültek a kivett graftból, és a saját érfalból úgy, 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 rosthálózatot szemléltettük.

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 sejttípusok (fibroblastok, myofibroblastok, simaizom sejtek) ismételt megjelenését igazoltuk, a szabályos szerkezetet mutató kötőszöveti rostok között.

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

A sejtmentesített juh-aortagraftok kb. 2cm-es szakaszát implantáltuk a sertések infrarenalis aortájába. Az alkalmazott graftok jól varrhatóak voltak, a perioperatív szakban vérzéses szövődményünk, hasfali sebgyógyulási zavarunk, bélparalýsis nem fordult elő. 1 esetben a közvetlen posztoperatív szakban graftreocclusio miatti alsó testfél ischaemia következtében az állat exitált. A 3 túlélő sertés második műtete során tökéletesen beépült, jól vezető, patológiás elváltozásoktól mentes graftokat találtunk. A xenograftok átmérője és hossza is proporcionális növekedést az eredeti aortafallal.

4.3.2.1.Hisztológiai analízis

Az eltávolított xenograftokból és a környező aortafalból hosszanti- és keresztmetszeti szövetblokkokat készítettünk. HE festéssel készült metszeteken az eredetileg sejtmentes implantátum területén, kéken festődő sejtmagok nagy száma igazolja a beültetett graftba történő recipiens sejtek migrációját, valamint látható a szabályos endothelium. A simaizom sejtek specifikus kimutatására alkalmazott SMA immunhisztokémiai eljárás szintén nagyszámú, normál megjelenésű simaizom sejtszortokat mutat a graftban. Az ECM kollagén és elasztikus rosthálózatának szabályos megjelenését láthatjuk az alkalmazott MT és Orcein festéssel készült metszetekben.

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.

4.4. Megbeszélés

A vascularis graftkutatás kezdete az előző évszázad első felére tehető. Az első kísérletek homograftok felhasználásával történtek, majd a 80-as években xenografttal is történtek kísérletek, azonban a pozitív korai eredményeket a késői graftdegenerációból (aneurysmaticus degeneráció, graftthrombosis) adódó szerény hosszútávú eredmények követték. Az időközben megjelenő alloplasticus érgraftok 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 esetek kb. 20-40%-ában, azonban nincs rendelkezésre álló, vagy alkalmas autológ graft, a szintetikus graftok alkalmazása pedig distalis bypass műtétek során szerény nyitvamaradással kecsegtet, valamint ezek septicus területen használt impregnált változatai gyakran újrafertőződnek, így a figyelem ismét a biológiai graftok fejlesztése irányába fordult.

Napjainkban az allograftok (vagy homograftok) fontos szerepet játszanak a septicus érsebészeti komplikációk ellátásában, döntően, amennyiben autológ megoldás nem lehetséges, illetve a xenograftok is bekerültek a rutin cardiovascularis sebészeti felhasználásba.

A xenograftok előnyei a szintetikusakkal szemben: jobb kezelhetőség, magas rezisztencia a fertőzésekkel és újrafertőzésekkel szemben, minimális vérzési tendencia a varratvonalban, valamint a korlátlan elérhetőség. A jelenleg kereskedelmi forgalomban elérhető foltok glutáraldehiddel decellularizált borjú pericardiumból származnak.

Számos publikáció található a pericardium xenograftok sikeres felhasználásáról a septicus érsebészetben, azonban az aorta infrarenalis szakaszának pótlásával kapcsolatos tapasztalatok ezen graftok vonatkozásában elég korlátozottak. Ezen publikációk a borjú pericardiumból származó foltokkal, illetve ugyanebből saját kézzel készített graft felhasználásával kapcsolatos pozitív tapasztalatokat mutatják be.

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, kiváló középtávú eredménnyel. A graftok sebészileg könnyen kezelhetőek, mechanikailag megfelelőek és varrhatóak voltak, az öltések jól tartottak, a varratvonalakban szignifikáns vérzés nem lépett fel. A perioperatív időszakban szövődményünk csak egy esetben lépett fel, az állat posztoperatív ileusban exitált. A 6 hónapos utánkövetés 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. 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 rostszerkezetet 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 kimenetele a decellularizált biológiai xenograftok alkalmazásának valószínűleg hasonló lenne, mint 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 eradicióját 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, hisztológiával is alátámasztva, kiváló eredményt tudtunk felmutatni. Az allo-, illetve a xenotranszplantáció esetén sem alakult ki graft versus host reakció által kiváltott implantátum degeneráció, és annak valamely nemkívánt következménye. 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

1. Igazoltuk, hogy a monofázisos decellularizációs módszerek nem elegendőek 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 sajátságoknak, így az e módszerrel decellularizált érgraftok alkalmasak lehetnek in vivo felhasználásra.
5. Elsőként végeztük el a korábbiakban effektívnek talált módszerrel decellularizált sertés allo- és juh xenograftok end-to-end transzplantációját sertések infrarenalis aortájába, 6 hónapos utánkötéssel.
6. Az állatkísérletes modellel, illetve az explantációt követő vizsgálatokkal kapott igen kedvező eredmények megadják az alapot, természetesen további fejlesztések, vizsgálatok és szoros utánkötés 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. Közlemények / Publications

Az értekezés alapjául szolgáló közlemény / Publication related to the thesis:

Fazekas G, Benkő L, Kasza G, Arató E, Sínay L, Jávör 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 / Other publications:

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 posztraumás 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.

Kumulatív impakt faktor / Cumulative impact factor: 10.248

Absztraktok / Abstracts:

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; Jávör 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 patkánymodellben. *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 / Oral presentations:

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 betegekben. 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, Jávorszky 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 szövődés 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)