

**Nyelőcsőpótlás extraintestinalis anyagok
felhasználásával**

Doktori (PhD) thesis

Dr Juhász Árpád

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Sebészeti Oktató és Kutatóintézet

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Komoly Sámuel

Programvezető: Prof. Dr. Róth Erzsébet egyetemi tanár

Témavezető: Prof. Dr. Róth Erzsébet egyetemi tanár

Pécs

2010.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
1.1 Célkitűzések	5
2. Kísérleteink első sorozata: állatkísérletes modellben a cryopreservált trachea alkalmazásának vizsgálata	6
2.1 Bevezetés	6
2.2 Anyag és módszer	6
2.3 Eredmények	8
2.4 Konklúzió	8
3. Kísérleteink második sorozata: az emberi trachea cyopreservatiojának vizsgálata	9
3.1 Bevezetés	9
3.2 Anyag és módszer	9
3.3 Eredmények	9
3.4 Konklúzió	10
4. Megbeszélés	10
5. Az új eredmények összefoglalása	13
6. Publikációk, előadások	14
7. Köszönetnyilvánítás	17

1. Bevezetés

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

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

Dolgozatomban, a nyelőcső pótlás igénylő betegségeinek és a pótló módszerek áttekintése után, arra kerestem a választ, hogy a légcső alkalmas lenne-e rövid szakaszú nyelőcsőhiány pótlására, illetve milyen előkezelés teheti erre felhasználhatóvá.

1.1. Célkitűzések

- Vizsgálataink első sorozatában állatkísérletes modellen nyaki nyelősőszakasz eltávolítás után célunk a hiány cryopreservált, fajtaazonos tracheával történő pótlása volt. Vizsgáltuk a műtét technikai alkalmazhatóságát, az állatok túlélését, a felhasznált graft alkalmasságát, a posztoperatív szövődmények kialakulását.
- Második kísérletsorozatunkban a cryopreservatio immunsuppressív hatásának human felhasználhatóságát kívántuk vizsgálni. MHC-II (MHC = fő hisztokompatibilitási komplex) antigen specifikus antitest felhasználásával vizsgáltuk a human tracheát; kíváncsiak voltunk, hogy a folyékony nitrogénben történő fagyasztás befolyásolja-e a szerv immunogenitását. Alcsoportokat alkotva meg kívántuk határozni a cryopreservatio optimális időtartamát.

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

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

2.2 Anyag és módszer Kísérletünket 12 Beagle-kutyán (7♀, 5♂, átlagos súly: 10,75 kg) steril műtői körülmények között intramuscularis narcosisban (ketamine 10 mg/kg és primasine 1 mg/kg kombinációja) hajtottuk végre. Median nyaki metszés és a nyakizmok szétválasztása után felkerestük, kipreparáltuk, majd eltávolítottuk a nyelöcső 6cm-es szakaszát a pharyngo-oesophagealis junctiótól 2 cm-re distalisan. A hiány pótlására szintén steril körülmények között más Beagle-kutyákból eltávolított 6 cm-es tracheasegmenst - átlagos belső átmérő: 19 mm (±1 mm) - használtunk. A kivett légsődarabot a környező szövetektől megtisztítottuk, a perichondrium és a pars membranacea intact maradt. A graftot az implantációt megelőzően 21 napig -196 °C-on folyékony nitrogénben tároltuk. A cryopreservatio bevezetése során kontrolált, lassú hűtést vagy cryoprotectiv anyagot nem

alkalmaztuk, a normál testhőmérsékletű graftot egy lépésben a folyékony nitrogénbe helyeztük. Az implantáció előtt a légsősegmenst a műtőasztal mellett indifferens hőfokú (37 °C) fiziológiás sóoldatból készített vízfürdőben lassan, átlagosan 40-45 perc alatt melegítettük testhőmérsékletűvé. A graftokból vékony szeletet távolítottunk el szövettani vizsgálatra. Az implantáció során end-to-end anasztomózist készítettünk monofilamens fonallal, egyrétegű tovaftó varrattal (Biosyn® 3/0), majd a graftot a varratvonalakkal együtt sternohyoidalis izomlebennyel fedtük.

A műtét átlagosan 116 percig tartott (90-150 perc). Az állatok a műtét közben „single-shot” intravénás antibiotikum-profilaxisban részesültek (500 mg ceftriaxone, 250 mg metronidazole). A postoperatív időszakban a kutyák csak fájdalomcsillapító gyógyszert kaptak (metamizole i.m. 12 és 24 órával a műtét után); sem gyulladáscsökkentő, sem immunsuppressív szert nem adtunk. Az első 6 postoperatív napon parenterális táplálást alkalmaztunk (300 ml intravénás Rindex 10® infúzió naponta háromszor). Nasogastricus szondát nem használtunk. A 7. posztoperatív napon az állatok ihattak, a 14. naptól pépes ételt fogyaszthattak. Naponta mértük az állatok testhőmérsékletét, köztük a sebeket. Vértétel az 1., 3., 5., 7., 14., 28. és 56. napon történt, vizsgáltuk a minőségi-, mennyiségi vérképet, a haemorrheologiai paramétereiket, mértük a vörösvértest számot, a thrombocyta számot, a plasma fibrinogen szintjét. Az állatokat random módon három csoportba osztottuk, majd ennek megfelelően termináció történt a 28. (1. csoport, n=4), 42. (2. csoport, n=4) illetve az 56. posztoperatív napon (3. csoport, n=4). A trachea-graftot a környező szövetekkel együtt eltávolítottuk. Vizsgáltuk a „neo-oesophagus” légtartóságát: Akiyama-fogóval az oesophagust a varratvonalaktól 2 cm-re lefoglattuk, majd az így lezárt graftba víz alatt 28-30 ml levegőt injektáltunk. Fiberoscoppal megmérve a belső átmérőt kiszámítottuk a szűkület mértékét. A szövetmintákból haematoxyllin-eosin festéssel metszeteket készítettünk.

Kísérleteinket az állatkísérleteket szabályozó 243/1998 miniszteri rendelet figyelembe vételével végeztük.

2.3 Eredmények Túlélés: Érdemi posztoperatív szövödményt nem észleltünk; varratelégtelenséget vagy graft-kilökődésre utaló jelet nem tapasztaltunk, az orális táplálhatóság problémamentes volt. Két esetben sebsuppuráció lépett fel, mely a cutan és a subcutan rétegeket érintette. Az összes többi esetben a seb per primam gyógyult. A graft elváltozásai: Azok a graftok, melyeket az 56. napon távolítottunk el 60 mm-ről átlagosan 47 mm-re (± 3 mm) rövidültek meg. A légpróba során a varratok tartottak. A belső átmérő 56 nap alatt 19 mm-ről (± 1 mm) átlagosan 15,8 mm-re ($\pm 0,6$ mm) szűkült. Laboreredmények: A gyulladós laborparaméterek (fehérvérsejt szám, fibrinogén szint) a várt, normális perioperatív stressznek megfelelően változtak: kezdeti emelkedés után szintjük a posztoperatív 7. napra megközelítette, a 14. napra elérte a referenciának tekintett műtét előtti szintet. A többi, vizsgált laborparaméterben érdemi változást nem tapasztaltunk. Szövettani eredmények: A beültetés előtti szövettani vizsgálat a belfelszíni epithelialis réteg desquamatioját igazolta. A nyelvcsőre jellemző többrétegű hengerhám a 4. hét végére teljesen átnőtte a képzett „neo-oesophagust”, az eredeti légcsőhámot ekkor már nem tudtuk felfedezni a grafton. A varratvonalak felett gyulladós granulatio alakult ki. A trachea porcok körül gyulladós sejtek migratioját észleltük, melyet a porcszövet felszívódása követett.

2.4 Konklúzió Kísérletsorozatunk első fázisát sikeresnek értékeltük, kutyáknál a cryopreservált légcsősegmens biztonsággal felhasználható rövid szakaszú nyelvcsőhiány áthidalására.

3. Kísérleteink második sorozata: az emberi trachea cryopreservatiojának vizsgálata

3.1 Bevezetés A vizsgálat e fázisában arra kerestük a választ, hogy a cryopreservatio befolyásolja-e az emberi trachea immunogenitását, illetve amennyiben igen, mi az előkezelés optimális időtartama.

3.2 Anyag és módszer Tracheostomia során 50 betegből (átlagos életkor: 55 év (19-85), 34♂/16♀) teljes falvastagságú trachea falat távolítottunk el. Az eltávolítást szikével végeztük, bipoláris ollót nem használtunk a termikus sérülések elkerülése érdekében. Az eltávolításra váró légcsőszakaszon a nyomási sérülések megelőzésére intubációs mandzsetta nem volt felfújva. A minták gyulladástól illetve malignus folyamattól - szövettanilag igazoltan - mentesek voltak. A légcsődarabokat 4 részre osztottuk. Az első részt formalinba helyeztük és azonnal hisztopatológiai vizsgálatra küldtük (1. csoport). A másik három fragmentumot folyékony nitrogénbe helyeztük kettő (2. csoport), három (3.csoport) és négy hétre (4. csoport). Lassú, programozott hűtést nem alkalmaztunk, a testhőmérsékletű szervdarabokat egy lépésben a folyékony nitrogénbe helyeztük. Fokozatos felmelegítés után szövettani metszeteket készítettünk haematoxylin-eosin (HE) illetve MCH-II antigén specifikus antitest festéssel (HLA class II (DR)(NCL-LN3) antigen[®] ; Novocastra Ltd.). A festődés intenzitása alapján négy csoportot állítottunk fel. Az osztályozás után Student T-tesztet használva csoportonként kiszámítottuk a festődés intenzitásának átlagát és a standard deviációt. A vizsgálatot az érintett betegek teljeskörű felvilágosítása után beleegyezésük mellett végeztük el.

3.3 Eredmények Az 50 mintából 4 nem volt szövettanilag kiértékelhető, mivel a preparátum nem tartalmazott a vizsgálathoz szükséges mennyiségű epitheliumot. Így a 46 légcsősegmensből 46x4, azaz 184 szövettani minta került feldolgozásra, statisztikai kiértékelésre. A haematoxylin-eosin festés során megfigyelhető volt, hogy a cryopreservatio nem hozott létre epithelium desquamatiót. Azt tapasztaltuk, hogy az MHC-II antitestek döntően az epithelialis sejtek apicalis részében, intracytoplasmaticusan helyezkednek el.

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

3.4 Konklúzió A hűtéssel történő előkezelés nem okoz belfelszíni hámdesquamatiót az emberi légcsövön, a többrétegű csillószőrös hengerhám 4 hétig történő fagyasztás után is ép maradt. Vélhetően ezzel összefüggésben a felszíni MHC-II antigének festődésében bár egyértelmű csökkentést észleltünk, a változás a statisztikai kiértékelés alapján nem volt szignifikáns.

4. Megbeszélés

Kutatómunkánk során az extraintestinalis szövetrel történő nyelőcsőpótlás lehetőségeivel foglalkoztunk.

Amennyiben a nyelőcső egésze vagy egy szakasza eltávolításra kerül, a szakmai irányelvek az együlésben történő rekonstrukciót preferálják. A primer sutura csak igen rövid hiány esetén megengedett, már pár centiméteres hiatus esetén is a varratvonal feszülni fog, ami insufficienciához vezet. Ilyen esetekben a nyelőcső pótlása válik szükségessé. Ritkán előfordul, hogy a konvencionális pótló szervek (gyomor, vékonybél, vastagbél) felhasználásra alkalmatlanok illetve nem megfelelő hosszúságúak. Számos kutatócsoport

foglalkozott a problémával, hogy ilyen esetben a nyelőcső mivel pótolható, siker egyiket sem koronázta, tökéletes módszert ezidáig nem sikerült kidolgozni.

Munkacsoportunk arra kereste a választ, hogy rövid szakaszú nyelőcsőhiány pótlására a légcső, mint tubuláris szerv, alkalmas lenne-e?

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

Japán kutatók eredményei szerint a légcső antigenitásáért, a következményes rejectióért felelős faktorok döntően a belfelszint borító epithelrétegen találhatóak. Amennyiben ezt a réteget el tudjuk távolítani, csökkenni fog a szerv immunogenitása. Állatkísérletes modellünkben a desquamatio elérésére a beültetés előtt a neo-oesophagusnak szánt légcsőseggel cryopreserváltuk.

A szövettani vizsgálatok szerint a graft beépült és megfelelően átvette a nyelőcső szerepét. Mindez számunkra azt bizonyította, hogy **kutyáknál a rövid – 5-6 centiméteres – nyelőcsőhiány pótlására a légcső alkalmas szerv, illetve a 21 napos cryopreservatio önmagában is alkalmas és elégséges módszer a graft antigenitásának oly mértékű csökkentésére, hogy biztonsággal megelőzzük a rejectiót.**

Kutatásunk ezt követő fázisában arra voltunk kíváncsiak, hogy a módszer a human gyógyászatban is alkalmazható lenne-e. Itt a fő kérdés a hűtéssel történő előkezelés emberi trachea antigenitását befolyásoló hatása volt. A kutyánál tapasztalt változást azonban nem észleltünk, a cryopreservatio nem

okozott belfelszíni epithelium desquamatiót. Bár a szerv immunológiai festődésének intenzitása jelentősen csökkent, ami várhatóan a légcső antigenitásának csökkenését is jelenti, az eltérés a hűtéssel elő nem kezelt és a 4 héti cryopreservált csoportok között sem volt szignifikáns.

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

Kutatómunkánk következő lépéseként arra kívánunk választ találni, hogy immunológiai szempontból miért viselkedik eltérően az állati, teljes légcső szegmens és az emberi trachea-darab. A cryopreservatio során az eddigi eredményekhez, mint kontrollhoz viszonyítva programozott, lassú hűtést illetve cryoprotectiv anyagot kívánunk használni. Ezen túl a kérdés már nem kutató-sebészeti probléma. Amennyiben a jövő chirurgaiban felmerül az igény a nyelőcső ilyen irányú pótlására, véleményünk szerint a továbblépést a gyógyszeres immunsuppressio finomodása jelentheti. A másik út talán az őssejtkutatás lehet. A megoldás vajon egy pluripotens sejtekből arteficiálisan létrehozott nyelőcső lesz?

5. Az új eredmények összefoglalása

- állatkísérletes modellen igazoltuk, hogy a 21 napig tartó cryopreservatio a kutya légsövön belfelszíni epithelialis réteg desquamatiót okoz, ennek következményeként a hűtéssel történő előkezelés önmagában is elégséges antigenitás csökkentő tényező a szerv sikeres allotransplantációjához
- kutyáknál a cryopreservált trachea alkalmas rövid szakaszú nyelőcsőhiány pótlására, a szerv a posztoperatív 4. hétre beépül a recipiens környezetbe, belfelszínét nyelőcsőre jellemző hám borítja
- az emberi trachea cryopreservatioja során 4 hét alatt sem alakul ki hámdesquamatio, a szerv antigenitását az előkezelés csökkenti, de szignifikánsan nem változtatja meg, ezért eredményeink birtokában igazoltuk, hogy a human trachea cryopreservatioja az általunk alkalmazott módszer esetében az antigenitást jelentősen nem befolyásolja, egy esetleges allotransplantációnál használata önmagában nem elegendő

6. publikációk, előadások

témában megjelent publikációk

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

A Altorjay, A **Juhász**, V Kellner, G Sohar, M Fekete, I Sohar: Metabolic changes in the lower esophageal sphincter influencing the result of antireflux surgical interventions in chronic gastroesophageal reflux disease. World Journal of Gastroenterology 2005;11(11):1623-1628 **Impact factor: 3,329**

Á Juhász, A Szilágyi, I Mikó, I Altorjay, G Kecskés, Á Altorjay: Esophageal replacement using cryopreserved tracheal graft. Diseases of esophagus 2008(21):468-472 **Impact factor: 1,027**

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

témához nem kapcsolódó publikációk

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

Salló Z., Bezsilla I., Ferencs A., **Juhász Á.**, Lantos J., Róth E.: Oxidative stress parameters are valuable indicators of surgical trauma following laparoscopic or open correcting of duodenal perforation. Eur. Surg. Res. 32(S1),88;2000 **Impact factor: 0,750**

Altorjay A, Szilagyí A, Arató G, Balázs O, **Juhász A**, Kecskés G, Altorjay I, Kiss J, Nagy P: Morphological changes in the lower esophageal sphincter influencing the result of antireflux surgical interventions in chronic gastroesophageal reflux disease. Hepatogastroenterology 2006 May-Jun;53(69):342-7 **Impact factor:0,937**

Mucs M, Székely I, Illés I, **Juhász A**, Paál B, Sárkány A, Madácsy L, Altorjay Á: A truncus coeliacus kompressziós szindróma – a hasi angina „mostohagyermek”? Orvosi Hetilap 2007 Sep 1;148(37):1763-1766

Á Altorjay, Z Tihanyi, F Luka, **Á Juhász**, Zs Bencsik, M Rüll, G Kecskés, B Paál: Place and value of the recurrent laryngeal nerve (RLN) palpatory method in preventing RLN palsy during thyroid surgery. Head Neck 2009 Apr;31(4):538-547 **Impact factor: 2,007**

Összesített impakt faktor: 8,05

témában tartott előadások

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

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

témához nem kapcsolódó előadások

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

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

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

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

Juhász Árpád: Mediasztinális enterogen cysta kezelésének dilemmái. *Középdunántúli Orvosnapok, 2007. Székesfehérvár, Magyarország*

7. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

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