

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**PERIFÉRIÁS ÉRSZAKASZ MŰVI GRAFTTAL
VALÓ PÓTLÁSÁNAK KLINIKAI TAPASZTALATAI ÉS KÍSÉRLETES
VÉRÁRAMLÁSTANI, MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATAI**

Dr. Tóth Csaba Zsigmond

Témavezető:

Dr. Németh Norbert



DEBRECENI EGYETEM

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

2015

Perifériás érszakasz művi grafftal való pótlásának klinikai tapasztalatai és kísérletes véráramlástanai, morfológiai vizsgálatai

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Tóth Csaba Zsigmond okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája
(Klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Dr. Németh Norbert, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Fülesdi Béla, az MTA doktora
Prof. Dr. Kollár Lajos, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Szemészeti Tanszék
könyvtára
2015. május 18., 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Soltész Pál, az MTA doktora
Dr. Arató Endre, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Fülesdi Béla, az MTA doktora
Prof. Dr. Kollár Lajos, PhD
Prof. Dr. Soltész Pál, az MTA doktora
Dr. Arató Endre, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2015. május 18., 13 óra

Rövidítések jegyzéke

ABI = ankle brachial index
AFS = arteria femoralis superficialis
AI = aggregációs index
Amp = amplitúdó
ANOVA = analyses of variance
APTI = aktivált parciális thromboplastin idő
CTA = komputertomográf angiográfia
DSA = digitális szubtrakciós angiográfia
EI = elongációs index
Fbg = fibrinogén
Fvs = fehérvérsejt
Hgb = haemoglobin
Htc = haematocrit
LMWH = low molecular weight heparin
MCH = mean corpuscular hemoglobin
MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV = mean corpuscular volume
MPV = mean platelet volume
MRA = mágneses rezonancia angiográfia
NO = nitrogén-monoxid
O = osmolalitás
PAD = peripheral arterial disease
PI = prothrombin idő
PTA = percutan transluminális angioplastica
PTE = polietilén-tereftalát
PTFE = politetrafluoroetilén
PVP = polyvinylpyrrolidone
RDW-CV = red cell distribution width coefficient of variation
SS = shear stress
TASC = TransAtlantic Inter-Society Consensus
TEA = thrombendarterectomia
Thr = thrombocyta
TIA = transitoricus ischaemiás attack
TTV = thrombotic threshold velocity
VSM = vena saphena magna
Vvs = vörösvérsejt

1. BEVEZETÉS

Napjaink érsebészeti gyakorlatában a nyitott műtéteknek, mint például bypass operációknak még mindig nagy jelentősége van. Ezekben az esetekben a beteg valamely epifasciális vénáját használják vagy művi érgraft beültetését alkalmazzák, mely utóbbi készülhet polietilén-tereftaláttól (PTE, Dacron) vagy politetrafluoretilénből (PTFE). Kimutatták, hogy azokban az esetekben, amikor a betegek saját vénája kerül felhasználásra, a nyitvamaradási arány kétszer vagy akár többször is magasabb, mint művi graftok alkalmazása esetén.

Az elmúlt 10-15 év során az infrainguinális bypass műtétek számának csökkenését lehet megfigyelni. A valódi ok nem ismert, de a rizikófaktorok csökkenése, a műtéttechnikai módosítások és az endovascularis technikák fejlődése (akár többszörös, vagy <15-20 cm hosszúságú elzáródás, illetve krónikus teljes occlusio esetén is) szolgálhat erre magyarázatul. Az általános vélemény szerint a krónikus teljes illetve 20 cm-nél nagyobb occlusio, a nyitott műtét az első választás. A vena saphena magna a „gold standard” infrainguinális bypass műtétek esetén. Amennyiben ez a véna gyengébb minőségű vagy korábban már eltávolításra került (pl. coronaria bypass graft készítés céljából, vagy varicectomia során) az ellenoldali alkalmazása merül fel inkább, mintsem más, például alkari vénáké, amelyek felhasználása esetén kisebb nyitvamaradási arányról számolnak be. A térd feletti műtéti beavatkozásoknál inkább a művi érgraft választandó, hiszen a betegség progressziója miatt szükséges lehet újabb beavatkozásokra a térd alatt, ahol inkább a vénás graftok alkalmazása preferált. Vénás graft hiányában a művi megoldások alkalmazása javallott. Ebben az esetben az úgynevezett vénás „cuff” elkészítése javasolt a művi graft distalis anastomosisánál. A Joint Vascular Research Group randomizált klinikai vizsgálata szerint a vénás szegment alkalmazásával PIII szinten jelentősen nagyobb nyitvamaradási arányt írtak le a graftoknál, mint a Miller-cuff nélküli femoro-distalis PTFE graft beültetések esetén. A művi graftok száma csökkent a claudicatio intermittens, illetve kritikus végtag ischaemia megoldási lehetőségei

között. Az alacsony nyitvamaradási arány és a graft jelenlétével összefüggő infekciók a főbb ellenérvek.

Az első néhány postoperatív nap mindig kritikus. A korai thrombosis problémája a kis átmérőjű művi graftok esetén még mindig nagy kihívást jelent az érsebészetben. A művi graft fala sokkal rigidebb, a háromfázisú arteriális véráramlású nyomásgörbe nem figyelhető meg rajta. Művi graft beültetése után számos korai és késői komplikáció merülhet fel. Korai komplikációk: varratelégtelenség, vérzés, graft infekció, sebfertőzés, ér- és idegsérülések, a graft korai elzáródása. Késői szövődmények: pseudoaneurysma képződés a varratelégtelenség miatt, graft obstructio, a neointima okozta stenosis vagy occlusio és késői graft infectio. A véráramlási karakterisztika megváltozik az anastomosisoknál és azokon belül, a sejtek mechanikai károsodása léphet fel, s a depozitumok gyakran újabb operációt indikálnak. Nem teljes mértékben tisztázott még, hogy a megváltozott érgeometria és áramlási tulajdonságok mikor érnek el olyan mértéket, amely már thromboticus szövődmény kialakulásához vezethet.

Ezért e kérdéskör klinikai tapasztalatainak elemzése és kísérletes modellben való további, a véráramlástani tényezőket befolyásoló paraméterekre is fókuszáló részletes vizsgálatai indokoltak.

Különböző szintetikus ér-graftok implantációja kapcsán a bio- és haemocompatibilitás kiemelten fontos tényezők, ugyanakkor a keringő vörösvérsejtekre ható mechanikus stressz megkérdőjelezhetetlen haemorheologiai nézőpontot jelent, főleg a kis átmérőjű graftok esetén. Művi kis átmérőjű graftok implantációja után a korai elégtelenség aránya sajnos még mindig magas a klinikai gyakorlatban. A graft átmérője, hosszúsága, geometriája, pozíciója, anastomosis viszonyai, esetleges torzulása, csavarodása, valamint a lumen beszűkülése a neointima kialakulása és proliferációja, és/vagy thrombus képződés révén; mind hatással vannak a mechanikus stressz mértékének kialakításában.

Feltételeztük, hogy a micro-rheologiai paraméterek, beleértve a vörösvérsejt deformabilitás- és a membrán (mechanikus) stabilitási jellemzőket, romlást mutathatnak a korai postoperatív időszakban, és jelentőségük lehet a lehetséges komplikációk előrejelzésében, illetve kimutathatóságában.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Célunk az volt, hogy vizsgáljuk a kis kaliberű művi PTFE graft arteria femoralis szakaszba való beültetésének és jelenlétének hatását a haematologiai, coagulációs és haemorheologiai paraméterekre, különös tekintettel a vörösvérsejt aggregációra, deformabilitásra és membrán (mechanikus) stabilitásra kéthetes követéses időszakra vonatkozóan beagle kutyákon.
2. A vörösvérsejt mechanikus stabilitási teszt alkalmazásakor vizsgálni kívántuk a különböző nyírófeszültség nagyság és expozíciós idő hatását a mintákra, a sublethális vérsejt trauma micro-rheologiai hatásának jobb tanulmányozhatósága céljából.
3. A kéthetes követéses periódus végén a graftokat magába foglaló érszakaszok geometriai és histomorphologiai elemzése.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok és műtéti protokoll

Az 1998. évi XXVIII., „Az állatok védelméről és kíméletéről” szóló törvény előírásait betartva, a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság (DE MÁB) által 20/2011. számon nyilvántartásba vett hatósági engedéllyel végeztük a kísérletet, az érsebészeti jellegű követéses vizsgálatra alkalmas állatfajon.

Kilenc felnőtt beagle kutya (szárm. hely: Wobe Kft., Magyarország, testtömeg: $10,8 \pm 1,3$ kg) került kétórás altatásra (10 mg/kg ketamin + 0,1 mg/kg xylazin, i.m.).

Az Érgraft csoportban (n=5) a bal oldalon feltárással került az arteria femoralis, amelyből egy 3,5 cm-es szakasz eltávolítása után, annak helyére azonos hosszúságú, 3 mm külső átmérőjű politetrafluoroetilén graft (PTFE, Atrium Co.) került beültetésre. A beültetés 6/0-s polypropylen varróanyag használatával, end-to-end anastomosissal történt (11. ábra). Az érkirekesztés időtartama $25 \pm 3,1$ perc volt. A Kontroll csoportban (n=4) csak altatás történt.

Anticoaguláns kezelésként a műtét alatt intravénásan 1000 NE Napheparint, az 1. és a 3. postoperatív napokon pedig subcután 500 NE enoxaparin (Clexane[®]) alkalmaztunk mindkét csoportban. Fájdalomcsillapításként 1 ml/10 ttkg metamizolt (1 g / 2 ml Algopyrin[®]) alkalmaztunk intramusculárisan, közvetlenül az operáció után és az 1. postoperatív napon.

3.2. Postoperatív fizikális vizsgálatok

Bőrhőmérséklet mérése a műtét végén, valamint az 1., 3., 5., 7. és 14. postoperatív napon történt a műtött és nem műtött (kontroll oldal) végtagon, mindkét csoportban. Az abszolút értékeken kívül kiszámításra került a műtött és nem műtött végtag bőrhőmérsékletének egymáshoz viszonyított arányszáma is. A naponkénti sebellenőrzés és a kapcsolódó sétáltatás során a járás obszerválása történt lehetséges fájdalomra, keringési problémára utaló jeleket figyelve.

3.3. Laboratóriumi vizsgálatok

A vérvételek a mérésekhez a műtét előtt, valamint az 1., 3., 5., 7., és 14. postoperatív napok reggelén, a vena cephalica punctiója révén, zárt rendszerrel történtek mindkét csoportban. A laktát, vér pH, haematologiai és haemorheologiai vizsgálatokra K₃-EDTA-t (1,8 mg/ml, Vacutainer[®]), a coagulációs vizsgálatokra Na-citrátot (0,129 M, Vacutainer[®]) tartalmazó csövekbe vettük a vért.

3.3.1. Laktát koncentráció és vér pH

A laktát koncentráció (mmol/l) és a vér pH meghatározására vérgáz analizátor automatát használtunk (ABL555 Radiometer Copenhagen, Denmark). A vérminták, zárt rendszerben közvetlenül a készülékbe fecskendeztük, kerülve a levegővel való közvetlen érintkezést.

3.3.2. Coagulációs idő paraméterek és fibrinogén koncentráció

A vér coagulációs időparaméterek, mint a prothrombin idő (PI [s]), az aktivált parciális thromboplastin idő (APTI [s]), továbbá a fibrinogén koncentráció (Fbg [g/dl]) meghatározása Sysmex CA-500 automata coagulométerrel történt (TOA Medical Electronics Co., Japán).

3.3.3. Haematologiai paraméterek

Sysmex F-800 típusú haematologiai automatával (TOA Medical Electronics Co., Japán) határoztuk meg az általános mennyiségi és minőségi haematologiai paramétereket.

3.3.4. Vörösvérsejt deformabilitás és mechanikai stabilitás teszt

A vörösvérsejt deformabilitást és a membrán stabilitást LoRRca MaxSis Omoscan (Mechatronics BV, Hollandia) ektacytométerrel mértük.

A *deformabilitás méréshez* a vérmintát (5 µl) nagy viszkozitású isotoniás polyvinyl-pyrrolidon oldatban (1 ml; viszkozitás: 28,8 mPas, osmolalitás: 305 mOsm/kg, pH: 7,36) szuszpendáltuk, majd a mintát a statikus belső és a forgó külső cylinder közötti térbe töltöttük. A rendszer meghatározott sebesség-gradienssel forgómozgást végez, eközben a mintára lézernyaláb vetül. A nyírófeszültség a viszkózus közegben áttevődik a vörösvérsejtekre, amelyek az erő irányába rendeződnek és elnyúlnak. Az elongatio során a lézernyaláb sejtekről (sejt-közeg határról) való szóródási iránya megváltozik. A megjelenő diffrakciós mintát kamera rögzíti és a készülék szoftvere analizálja a diffraktogram hosszát (a) és szélességét (b), amelyből adott nyírófeszültség mellett kiszámolja az elongatiós indexet (EI): $EI = (a-b)/(a+b)$.

Adott nyírófeszültségnél a nagyobb elongatiós index a sejtek jobb elnyújthatóságát, jobb deformabilitását jelzi. Az elongatiós index – nyírófeszültség görbék összehasonlítására a Lineweaver–Burke-féle analízist használtuk. A kalkuláció során meghatározásra került a maximális elongatiós index (EI_{max}) és ennek feléhez tartozó nyírófeszültség (shear stress, SS) érték ($SS_{1/2}$ [Pa]) $1/EI = SS_{1/2}/EI_{max} \times 1/SS + 1/EI_{max}$. Deformabilitás romlást jelez az EI_{max} csökkenése és az $SS_{1/2}$ emelkedése.

A *membrán stabilitás (mechanikus stabilitás) teszt* során két hagyományos deformabilitás mérés történik, amelyek között adott nagyságú és időtartamú nyírófeszültséggel zajlik a mechanikus stressz előidézése. Az expozíciós idő és a nyírófeszültség nagysága változtatható. Vizsgálataink során két kombinációt alkalmaztunk: 60 Pa 300 másodpercig vagy 100 Pa 300 másodpercig. A kapott elongatiós index-nyírófeszültség görbék analízise a fentiekben ismertetett módon történik. Kiszámítottuk továbbá a mechanikus stressz előtti és utáni értékek egymáshoz viszonyított arányát is.

Az *ozmotikus gradiens ektacytometria (osmoscan) mérésekhez* 250 µl mennyiségű vért szuszpendáltunk 5 ml PVP oldatban. A módszer során az elongatiós index mérése állandó nyírófeszültség mellett (30 Pa) történik,

miközben a szuszpendáló közeg osmolalitása változik. Ezt a vér-PVP szuszpenzió, valamint 0 és 500 mOsmol/kg osmolalitású PVP oldat folyamatos adagolásával éri el a készülék. Az így kapott elongatiós index-osmolalitás görbék az alábbi paraméterekkel jellemezhetőek: maximális EI (EI max) –ami nem azonos a Lineweaver-Burke féle analízissel nyert EI_{max} értékkel–, az EI max felét adó EI érték a hyperosmolaris irányban (EI hyper), minimális EI érték a hypoosmolaris irányban (EI min), az ezekhez tartozó osmolalitás értékek (O EI max, O EI hyper, O EI min), valamint a görbe alatti területből számolt Area.

3.3.5. Vörösvérsejt aggregatio

Myrenne MA-1 erythrocyta aggregométert használtunk a vörösvérsejt aggregatio meghatározására (Myrenne GmbH, Németország). A módszer a vörösvérsejt aggregatio létrejöttkor a vérminta fényáteresztő képesség változásának mérésén alapul (Schmid–Schönbein-módszer). A mérésekhez mindössze 20 μ l anticoagulált vérminta szükséges.

A mérések során a készülék 600 s^{-1} sebesség-gradiens disaggregatiót végez, majd a sebesség-gradiens hirtelen nullára (M mód) vagy 3 s^{-1} -re (M1 mód) csökken. Stasisnál, illetve alacsony sebesség-gradiensnél megindul a vörösvérsejt aggregatioja. A vérminta fényáteresztő képességének változása alapján (disaggregatio: alacsony fénytranszmisszió, aggregáló vörösvérsejt: nagyobb fénytranszmisszió), a készülék aggregatiós indexet számít a folyamat 5., illetve 10. másodpercében. Fokozott vörösvérsejt aggregatio esetén ezek az index paraméterek (M 5s, M1 5s, M 10s, M1 10s) növekednek.

3.4. Szövetani vizsgálatok

A 14. postoperatív napon általános anaesthesiában feltárással került mindkét oldali femoralis regio és a graft a proximális és disztális anastomosissal és néhány mm-es ép érszakasszal együtt *en block* excisióra került. Az ellenoldali intakt arteria femoralis egy 3-4 cm-es szakasza szintén kimetszésre került. A

mintákat 10%-os formalinban fixáltuk, majd a hagyományos dehidrációs és beágyazási protokoll után mikrotómmal 5 µm-es metszetek készültek, majd haematoxylin-eosin festés és CD31 immunohisztokémiai jelölés készült.

3.5. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzést SigmaStat (Systat Software Inc., San Jose, California, USA) szoftverrel végeztük. Az adatokat átlag ± szórás (S.D.) formájában jelenítettük meg. Bár az esetszám állatkíméleti szempontok miatt viszonylag alacsony volt, a csoportok közötti összehasonlításhoz Student-féle t-tesztet vagy Mann–Whitney RS tesztet, a csoportokon belül elemzésre egyirányú ANOVA tesztet (Dunn vagy Bonferroni módszer) használtunk, függően az adateloszlástól. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ értéknél állítottuk be.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Postoperatív fizikális vizsgálatok, bőrhőmérséklet

Mindegyik kísérleti állat túlélte a műtétet, a kéthetes periódus során nem volt elhullás. Sem korai, sem késői műtéti komplikációt nem tapasztaltunk. Az állatok mozgása normális, zavartalan volt a kéthetes követési periódus alatt, végtagkeringési problémára utaló jelet nem láttunk. A műtött és a nem műtött végtag hőmérsékletének aránya gyakorlatilag változatlan volt a megfigyelési időszak alatt.

4.2. Laktát koncentráció és vér pH

A laktát koncentráció a Kontroll csoportban az 1. és a 3. postoperatív napra kismértékben emelkedett. A második hét végére csökkent ($p=0,029$ vs. alap). Az Érgraft csoportban már az 1. napra jelentősen csökkent a laktát koncentráció, és a követéses periódus alatt mindvégig szignifikánsan elmaradtak a Kontroll csoport értékeitől (1. nap: $p<0,001$, 3. nap: $p=0,023$, 5. nap: $p=0,035$). A vér pH egyik csoportban sem változott jelentősen. Kontroll csoportban kismértékű csökkenés látszott az 1. és 3. napon.

4.3. Haematologiai paraméterek

A fehérvérsejtszám az 1. postoperatív napra mindkét csoportban megemelkedett ($p<0,001$ vs. alapértékek), az Érgraft csoportban nagyobb mértékben ($p=0,002$ vs. Kontroll). A Kontroll csoportban a sejtszám hamar normalizálódott, míg az Érgraft csoport értékei emelkedettek maradtak az első hét végéig (3. napon: $p=0,019$, 5. napon: $p=0,0015$, 7. napon: $p=0,016$ vs. alap). A monocyta-granulocyta arány 60-70% között maradt, kivételt az 5. és a 7. nap jelentett, amikor az értékek ennél magasabbak voltak ($81,73 \pm 3,78$ % és $74,3 \pm 3,98$ %).

A thrombocyta szám az Érgraft csoportban folyamatosan emelkedett a megfigyelési időszak alatt. Az emelkedés szignifikáns volt a 3. postoperatív

naptól mind az alapértékekhez (5. napon: $p=0,015$, 7. napon: $p=0,001$, 14. napon: $p<0,001$), mind a Kontroll csoport értékeihez viszonyítva (3. napon: $p=0,03$, 5. napon: $p=0,046$, 14. napon: $p=0,003$).

A vörösvérsejtszám kismértékben csökkent a kéthetes követéses periódus során a kontroll csoportban (az 1. postoperatív napon $p=0,002$, a 7. napon, $p=0,018$, a 14. napon $p=0,003$ az alapértékekhez képest). Az érgraft csoportban hasonló tendencia mutatkozott (a 3. napon $p=0,021$, az 5. napon $p=0,033$, a 7. napon $p<0,001$, a 14. napon $p=0,038$ az alapértékekhez képest), mérsékelten alacsonyabb értékeket mutatva a kontroll csoporthoz képest a 3. napon ($p=0,046$), valamint a 7. napon ($p=0,049$).

A haematocrit értékek a vörösvérsejtek számbeli változását is tükrözve csökkentek a követéses periódus során mindkét csoportban. A Kontroll csoportban: az alapértékekhez képest $p<0,001$ az 1. napon, $p=0,006$ a 3. napon, $p=0,011$ a 7. napon és $p=0,002$ a 14. napon; az Érgraft csoportban: $p=0,016$ az 1. napon, $p=0,029$ a 3. napon, $p=0,036$ az 5. napon és $p<0,001$ a 7. napon. Az Érgraft csoport értékei alulmaradtak a Kontroll csoportéhoz képest a 3., 5. és 7. napon ($p=0,014$, $p=0,018$ és $p=0,029$).

Az MCV értékek nem mutattak jelentős eltéréseket. Az Érgraft csoportban kismértékben alacsonyabb értékeket mértünk az 1. postoperatív héten a Kontrollhoz képest (a 3. napon $p=0,017$ és az 5. napon $p=0,083$).

A Kontroll csoport haemoglobin koncentrációja kismértékben csökkent a követéses periódus végére (az alapértékekhez képest $p=0,015$ a 7. napon és $p=0,003$ a 14. napon). Az Érgraft csoportban a haemoglobin csökkenés markánsabbnak mutatkozott (az alapértékekhez képest $p=0,003$ az 5. és 7. napon, valamint $p=0,028$ a 14. napon). A Kontroll csoporthoz viszonyítva ezek az értékek szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak ($p=0,004$ a 3. napon, $p=0,002$ az 5. napon és $p=0,016$ a 7. napon).

Az MCH értékek nem mutattak jelentős változásokat, kivéve a numerikusan szignifikáns különbségre a két csoport között az 5. napon ($p=0,05$) és a 14. napon. ($p=0,003$).

Az Érgraft csoport MCHC értékei csökkentek a megfigyelési időszak végére ($p=0,054$ vs. alap, és $p=0,007$ vs. Kontroll). Az RDW-CV% nem mutatott jelentősebb változást.

4.4. Coagulációs idő paraméterek és fibrinogén koncentráció

A prothrombin idő nem változott jelentősen egyik csoportban sem. Az aktivált partialis thromboplastin idő kétszer is megemelkedett az Érgraft csoportban: a 3. ($p=0,048$ vs. alap) és a 7. postoperatív napon ($p=0,012$). A fibrinogén koncentráció szintén az Érgraft csoportban növekedett, leginkább a korai postoperatív időszakban: az 1. napi magasabb értékek után fokozatosan csökkenés volt megfigyelhető a második hét végéig. Az értékek ugyan a fiziológias határok között mozogtak, de szignifikáns különbségeket egészen az 5. napig találtunk (az 1. napon: $p<0,001$ vs. alap és vs. Kontroll; a 3. napon: $p=0,023$ vs. alap és $p=0,002$ vs. Kontroll; az 5. napon: $p=0,043$ vs. alap és $p=0,002$ vs. Kontroll).

4.5. Vörösvérsejt deformabilitás és membránstabilitás

A hagyományos ektacytometriás mérések során az elongációs index értékek kerültek meghatározásra a nyírófeszültség függvényében. Ezekből a görbékkel kalkulált EI_{max} folyamatos csökkenést mutatott legnagyobb mértékben az Érgraft csoportban. A 7. postoperatív napon a legalacsonyabb értékeket itt mutatta ($p<0,001$ vs. alap; $p<0,001$ vs. Kontroll). A kalkulált $SS_{1/2}$ [Pa] értékek szignifikánsan magasabbak voltak az Érgraft csoportban a 3. napon ($p=0,029$ vs. Kontroll), majd a 7. napra csökkent ($p=0,025$ vs. alap és $p=0,042$ vs. Kontroll), a 14. napra újra megemelkedett ($p=0,011$ vs. Kontroll). A deformabilitás romlással általában EI_{max} csökkenés és $SS_{1/2}$ emelkedés társul.

Amennyiben mindkét érték csökken, az jelezheti az elongációs index-nyírófeszültség görbék morfológiai változását. Így összességében az adatok deformabilitás romlásra jutnak.

Az ozmotikus gradiens ektacytometriás (osmoscan) mérések során nyert paraméterek közül a maximális elongációs index (EI max) alacsonyabb volt az Érgraft csoportban, ahogy az a hagyományos ektacytometriás mérések eredményeiben is látszott. A minimális elongációs index érték (EI min), azaz a pont, amikor a sejtek rupturálódni kezdenek hypoosmolaris környezetben, kissé és nem szignifikáns mértékben magasabbak voltak az 1., a 3., 5. és 14. napon az Érgraft csoportban. Ezzel párhuzamosan a vonatkozó ozmolalitás értékek a Kontroll csoporthoz viszonyítva hasonlóak, kismértékben alacsonyabbak vagy éppen magasabbak voltak, különösebb összefüggés nélkül. Az elongációs index-osmolalitás görbe alatti területéből kalkulált area parameter szignifikáns mértékű csökkenést mutatott az Érgraft csoportban a legalacsonyabb értékeket a 7. napon mutatva (a 3. napon $p=0,005$, az 5. napon $p=0,017$ és a 7. napon $p=0,061$ vs. Kontroll; ugyanekkor $p=0,056$ vs. alap).

A membránstabilitás vizsgálatához kétféle protokollt használtunk, 60 Pa nyírófeszültség 300 másodpercig, illetve 100 Pa nyírófeszültség 300 másodpercig. Az alkalmazott mechanikus stressz előtt és után elvégzett normál ektacytometriás mérések eredményei kerültek összehasonlításra.

A mechanikus stressz után, ahogyan az várható is volt, az elongációs index értékek minden esetben szignifikánsan alacsonyabbak voltak a stressz előtti állapothoz képest ($p<0,001$, a 0,95-30 Pa nyírófeszültség tartományban). Ugyanakkor az abszolút elongációs index értékek, valamint a különbség a mechanikus stressz alkalmazása előtti és utáni értékek között eltért a csoportok között. Ez a különbség sokkal kifejezettebb volt, amikor a 100 Pa-os protokollt alkalmaztuk.

A membránstabilitás vizsgálatok az Érgraft csoportban egyrészt alacsonyabb deformabilitási profilt, másrészt a mechanikus stressz hatására

létrejövő beszűkült deformabilitás-változási képességet jeleztek. Az elongációs index-nyírófeszültség görbék morphológiája szintén nagyobb mértékben változott az Érgraft csoportban: 0,95 Pa alatt a görbék torzultak, magas elongációs index értékeket mutatva a legalacsonyabb nyírófeszültség tartományban (0,3 – 0,5 Pa).

Az ektacytometriás méréseknél a legnagyobb változásokat a 7. napon láthattuk. A mechanikus stabilitás eredményeit tovább elemezve a legszembetűnőbb mértékű különbségeket is ezen a napon láttuk.

4.6. Vörösvérsejt aggregatio

Az aggregációs index (AI) az aggregatio nagyságát reprezentálja a vizsgált 120 másodperces időszak alatt, az amplitúdó (Amp) a syllectogramm magasságát jelzi a kiindulási értékekhez képest, míg a $t_{1/2}$ [s] azt az időpontot jelöli, amikor az aggregációs folyamat eléri a teljes aggregációs index értékek felét. Az AI értékek kismértékben emelkedtek az Érgraft csoportban az 1., 3. és az 5. postoperatív napokon, az Amp értékek párhuzamos növekedésével (a 7. napon $p=0,008$ vs. Kontroll). Az 5. napig a $t_{1/2}$ értékek gyorsabb kinetikájú aggregációra utaltak az Érgraft csoportban.

A Myrenne készülékkel mért $M 5 s$ és $M 10 s$ értékek az aggregációs folyamat 5. és 10. másodpercében jelzi a létrejövő vörösvérsejt aggregatio mértékét $0\ 1/s$ sebesség-gradiens mellett. Az Érgraft csoportban ezek az értékek szignifikáns mértékű emelkedést mutattak az 1. postoperatív héten. Az $M 5 s$ index értékek szignifikánsan nőttek az 1. postoperatív napra ($p=0,011$ vs. alap, $p=0,03$ vs. Kontroll), a 3. napon ($p<0,001$ vs. alap és vs. Kontroll) az 5. napon ($p=0,021$ vs. alap) és a 7. napon ($p<0,001$ vs. alap és vs. Kontroll). Az $M 10 s$ index értékek mutatták a legnagyobb mértékű különbséget a két kísérleti csoport között (az 1. napon $p=0,029$ vs. alap; a 3. napon: $p<0,001$ vs. alap és vs. Kontroll; az 5. napon: $p=0,006$ vs. alap és $p<0,001$ vs., Kontroll; és a 7. napon: $p=0,006$ vs. alap).

4.7. Szövettani vizsgálatok

A 14. napon a reoperáció során vett érszakaszok elemzésekor azt találtuk, hogy a Kontroll oldali arteria femoralis átmérője $3,56 \pm 0,13$ mm volt, a graft átmérője $3,62 \pm 0,17$ mm. Közvetlenül az érgraft felett és alatt mért érátmérők jelentősen különböztek egymástól: a graft felett $3,5 \pm 0,41$ mm, a graft alatt $2,75 \pm 0,28$ mm volt ($p < 0,001$ vs. graft, $p = 0,024$ vs. graft felett és $p = 0,016$ vs. kontroll oldali arteria).

A szövettani vizsgálatok során az anastomosis vetületében a szervülés jeleit mutató thrombus látszott, beszűkítve, elzárva az érlument. Fibrin hálóba, illetve fiatal kötőszövetbe ágyazott, reaktív endothellel bélelt változatos alakú és tágasságú, vörösvérsejtekkel kitöltött újonképzett kapilláris hálózat volt megfigyelhető. Ez az eredeti arteria intimás belfelszínéhez látszott kötőszövetesen rögzülni, illetve az anastomosis vonalában a graft a tunica adventitia hegesen kiszélesedett felfekvési területének vetületében volt megfigyelhető.

A graft belfelszínén a vérrög kötőszövetes rögzülése nem volt ennyire egyértelmű, itt „szabad” belfelszínnek is láthatók voltak. Distalis irányba haladva a vérrög friss területei voltak láthatóak. Az anastomosis vonalában az adventitiában a varrósál körül idegentest típusú, óriássejteket tartalmazó vegyes lobos gyulladással szorított szövet volt megfigyelhető, amely folytatólagosan a graft körül is egy rövid szakaszon jelen van.

Az anastomosis területében a lamina elastica interna kiszélesedése megfigyelhető volt, de endothel bélelés nem minden esetben látszott: a thrombus mintha ezen intimális kiszélesedés folytatása lenne.

A graft hálószerű falában vörösvérsejtek, valamint chronicus és acut lobsejtek voltak láthatóak. A graft endothelisatiója nem történt meg, amit a CD31 immunhistokémiai vizsgálat is alátámasztott. Pseudointima képződés egyes szakaszokon azonban jól látható volt különböző thromboticus elemekből felépülve.

A kontroll oldali érkezt arteria részletek szabályos szöveti szerkezetet mutattak. Megállapítható volt tehát, hogy a graft beszűkülése-elzáródása létrejöttében döntően thrombosis, kisebbrészt intima hyperplasia játszott szerepet. A thrombosis kialakulásában az intima sérülés mellett az anastomosis varrat által indukált gyulladás is szerepet játszhatott.

5. MEGBESZÉLÉS

A kiskaliberű érgraftok a perifériás érbetegségek sebészi kezelésében még napjainkban is fontos szerepet játszanak, ugyanakkor a velük összefüggő, korai graft elzáródás komoly klinikai problémát jelent. A kis graft átmérő mellett fontos kérdés a biomechanikus szövet remodeláció valamennyi nyírófeszültséggel, feszüléssel összefüggő biomechanikai és áramlástanai tényezővel együtt. Az arteriás graft szervülése komplex és hosszú folyamat, amely számtalan tényezőtől függ.

Kísérleteinkben az első két postoperatív hét változásaira fókuszáltunk. A coagulációs idő paraméterek és a vörösvérsejt aggregatio változásainak nagy része az 1. héten lezajlott. Gyulladásos folyamatok, akut fázis reakciók haemorheológiai változásokhoz vezethetnek a megemelkedett fibrinogén koncentráció, a hemokoncentráció és a szabadgyökök okozta károsodások eredőjeként. A korán megemelkedett, majd csökkenő fibrinogén koncentráció, a coagulációs idő paraméterek és a thrombocyta szám eltérései sugallhatják a thromboticus szövődmény kialakulását a 3–7. postoperatív nap között.

A graft elzáródásához vezető folyamatok összetettek, hiszen a kis átmérőjű, az érfalnál merevebb falú tubus haemodinamikai hatása felszínének tulajdonságai, haemokompatibilitási mértéke, a véralvadási kaszkádrendszer aktiválódása és a vérsejtek mechanikus károsodása mind szerepet játszik ebben. Az intima károsodása mellett az anastomosis készítéshez használt varróanyag által kiváltott szöveti reakció is hozzájárulhatott a thrombus kialakulásához. A lokális haemodinamikai változások kialakulásánál nem elhanyagolható az a tény sem, hogy a merevebb graftot magába foglaló érszakasz a műtét után elmozdulhat, csavarodhat, megtörhet az állat mindennapi mozgása során. Fontos megjegyezni azonban, hogy nem láttunk végtagkeringési zavarra utaló jelet, nem látszott duzzadás, nem jelzett az állat fájdalmat, a járása zavartalan volt és a bőrhőmérséklet a műtött és nem műtött végtagon közel azonos volt.

Feltételezhető, hogy a szűkülő vagy már elzáródott graft keringését a gluteális régió felőli érösszeköttetések részben kompenzálhatták.

Az általános haematologiai és coagulációs paraméterek változásai mellett a vörösvérsejt aggregatio korai emelkedését is megfigyelhettük. A vörösvérsejt aggregatio számos cellularis (sejt morphologia, deformabilitás, membrán mechanikai sajátságok, sejt felszíni glycocalyx) és plasmaticus faktorok (pl. fibrinogén koncentráció) által determinált. Az ischaemia-reperfusio és általában a gyulladásos folyamatok során felszabaduló szabadgyökök, a mechanikus sejtkárosodás, a vörösvérsejt deformabilitásban bekövetkező változások, a fibrinogén koncentráció eltérései, valamint a mikrokörnyezeti tényezők (pH, osmolalitás) együttesen befolyásolják a vörösvérsejt aggregatio mértékét.

Mindemellett a sejtmembrán mechanikai sajátságai is meghatározó szerepet játszanak. A mechanikus károsodás mechanizmusa magába foglalja a sejtek túlfeszülését és fragmentációját (haemolysis), amely a plazmában szabad haemoglobin megjelenéséhez, valamint membrán-microparticulumok felszabadulásához vezet. A plazmában a szabad haemoglobin haptoglobinhoz kötődik, amely komplexről ismert, hogy a reticuloendothelialis rendszer távolítja el folyamatosan a keringésből. Ha a nyírófeszültség nagysága és expozíciós ideje nem ölt olyan mértéket, amely már haemolysishez vezet, hanem csupán a sejtek micro-rheologiai tulajdonságainak zavarában nyilvánul meg (csökkent deformabilitás, fokozott aggregatio), a sublethalis trauma zónájáról beszélünk.

A thrombus képződés kapcsán, annak lument szűkítő hatása miatt növekedhet az átáramló vörösvérsejtekre ható nyírófeszültség mértéke is. A kísérletünk végén a graftok eltávolításra kerültek és longitudinális thrombusokat találtunk a graftokban. Feltételezzük, hogy a thrombus képződés már a korai postoperatív napokban megkezdődhetett és a 7. napra érhetett el azt a mértéket, amikor már micro-rheologiai változásokat is előidézett. Az Érgraft csoportban nemcsak csökkent deformabilitást láthattunk ekkor, hanem a vörösvérsejtek a mechanikus stresszel szembeni csökkent rezisztenciáját.

A PTFE graft beültetése az arteria femoralis érszakasz pótlására jelentős változásokat eredményezett tehát a haemorheologiai, haematologiai és coagulációs paraméterekben. A kis átmérőjű érgraftok korai thromboticus szövődményeihez vezető tények feltárása további tanulmányokat igényel, keresve a graft geometriai (hosszúság, átmérő, alak, pozíció) és az ezzel összefüggő haemodinamikai és haemorheologiai faktorok optimális kombinációját.

6. FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Állatkísérletes modellben kéthetes követéses vizsgálat során kimutattuk, hogy az arteria femoralis érszakasz 3,5 cm hosszúságú, 3 mm átmérőjű PTFE grafttal való pótlásakor, az első postoperatív héten nagyrészt lezajlanak a haematologiai, vörösvérsejt aggregációs és coagulációs időparaméterek szignifikáns változásai. A legnagyobb emelkedést az aktivált parciais thromboplasin idő mutatta a 3. és 5. postoperatív napon.
2. Az Érgraft csoportban a vörösvérsejt aggregatio az 1–3. napon volt jelentősen fokozott. A Kontroll csoporthoz viszonyítva a vörösvérsejt deformabilitás szignifikáns mértékű romlást mutatott a 3., az 5. és főként a 7. postoperatív napon a PTFE graft beültetését követően.
3. A vörösvérsejt mechanikus stabilitási teszt ezeken a napokon jól kimutatható különbségeket mutatott: az Érgraft csoportban a deformabilitás kisebb mértékben csökkent a membránstabilitás teszt során, amely a sejtek mechanikus stresszel szembeni csökkent tűrőképességét tükrözheti, együttesen az eleve rosszabb deformabilitási értékekkel.
4. A 7. nap során mért legrosszabb deformabilitási paraméterek egybeeshettek a graftot kritikusan szűkítő, illetve elzáró thrombus kialakulásával, amelyet az utólag végzett szövettani vizsgálatok megerősítettek. Ez felhívhatja a figyelmet a vörösvérsejt deformabilitás és vörösvérsejt mechanikus stabilitás mérésének fontosságára az érgraft beültetését követő korai postoperatív napok monitorozásakor. Ezért a részletes micro-rheologiai vizsgálatok ajánlottak lehetnek a különböző méretű és geometriájú graftok követéses vizsgálataiban.

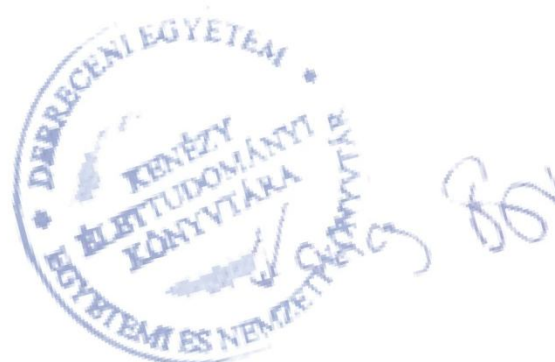


Nyilvántartási szám: DEENK/57/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tóth Csaba
Neptun kód: XLQEQ1
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

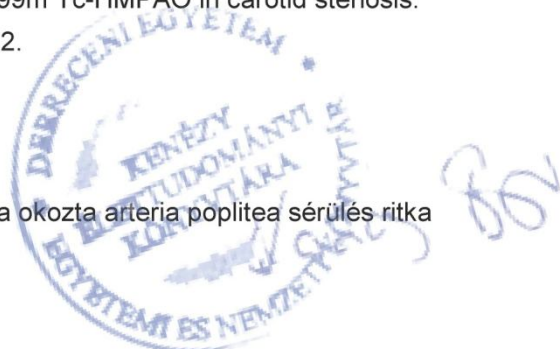
1. **Tóth, C.**, Klárik, Z., Kiss, F., Tóth, E., Hargitai, Z., Németh, N.: Early postoperative changes in hematological, erythrocyte aggregation and blood coagulation parameters after unilateral implantation of polytetrafluoroethylene vascular graft in the femoral artery of beagle dogs. *Acta Cir. Bras.* 29 (5), 320-327, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502014000500006>
IF:0.57 (2013)
2. **Tóth, C.**, Kiss, F., Klárik, Z., Gergely, E., Tóth, E., Pető, K., Ványolos, E., Mikó, I., Németh, N.: Following-up changes in red blood cell deformability and membrane stability in the presence of PTFE graft implanted into the femoral artery in a canine model. *Korea-Aust. Rheol. J.* 26 (2), 209-215, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13367-014-0023-3>
IF:0.632 (2013)





További Közlemények

3. Daróczy J., Kovács L.A., **Tóth C.**, Szolnok G., Csernus M., Hunyadi J., Sugár I., Bihari I., Mecsek L., Szokoly M.: A nem gyógyuló (krónikus) bőrsébek ellátásának irányelve II. rész. *Érbetegségek*. 21 (4), 123-135, 2014.
4. **Tóth C.**, Lőrincz Á., Olvasztó S., Garai I., Kálvin B.: A 18-Fluorodeoxyglucose PET szerepe a graftsuppuratio pontosabb diagnózisában. *Érbetegségek*. 16 (3), 79-84, 2009.
5. Garai I., **Tóth C.**, Szabados L., Sóvágó J., Tóth L., Csiki Z.: A metabolikus képalkotás - PET, PET/CT - onkosebészeti vonatkozásai =Metabolic imaging - PET, PET/CT - in oncology. *Magyar Seb.* 61 (4), 217-224, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/maseb.61.2008.4.2>
6. Papp L., Litauszky K., Bodnár F., Olvasztó S., Kosztyu L., **Tóth C.**: A rupturált abdominalis aorta aneurysma (RAAA) kezelési elveiről: Szükséges-e a szemléletváltozás az endovascularis érában. *Anaesthesiol. Intenziv Ther.* 37 (1), 8-16, 2007.
7. Litauszky K., **Tóth C.**, Bodnár F., Magyar T., Papp L.: Az arteria carotis extracranialis szakaszának aneurysmáiról-electiv és rupturált aneurysma-esetünk kapcsán. *Érbetegségek*. 14 (4), 139-144, 2007.
8. Garai I., Varga J., Szomják E., **Tóth C.**, Csiki Z., Olvasztó S., Galuska L.: Az agyi vérátfolyás rezerv kapacitásának mérése 99mTc HMPAO-val carotis angioplasztikán átesett betegeknél. *Érbetegségek*. 10 (3), 63-68, 2003.
9. Garai I., Varga J., Szomják E., **Tóth C.**, Bánk J., Ficzer A., Olvasztó S., Galuska L.: Quantitative assessment of blood flow reserve using 99m Tc-HMPAO in carotid stenosis. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 29 (2), 216-220, 2002.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00259-001-0688-y>
IF:3.568
10. **Tóth C.**, Olvasztó S., Dinya T.: Femurcondylus exostosis okozta arteria poplitea sérülés ritka esete:(Esetismertetés). *Magyar Seb.* 54, 115-117, 2001.





11. Olvasztó S., Litauszky K., Rácz T., Kosztyu L., **Tóth C.**, Antek C.: Fejlődés és szemléletváltás az arteria carotis sebészetében Debrecenben.
Magyar Seb. 54, 105-109, 2001.
12. Garai I., Szomják E., **Tóth C.**, Varga J., Bánk J., Ficzere A., Olvasztó S., Csiki Z., Galuska L.:
Kvantitatív agyi vérátfolyás rezerv vizsgálatok 99mTc-HMPAO SPECT-tel nyaki verőér szűkületben.
Érbetegségek. 8 (3), 75-79, 2001.
13. Litauszky K., Olvasztó S., Rácz T., Kosztyu L., **Tóth C.**: Leriche syndroma és zsigeri arteriás kompresszió együttes kezelési stratégiája..
Érbetegségek. 7 (4), 123-126, 2000.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 4,77

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 1,202

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.03.06.



Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Németh Norbert Tanár Úrnak, a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Sebészeti Műtéttani Tanszék vezetőjének, hogy tanszékén az értekezés alapjául szolgáló kísérletet elvégezhettem. Végig nagy segítségemre volt, a haemorheológiában kiemelkedő tudományos munkássága, tapasztalata, ötletei alapvetően hozzájárultak a közlemények, illetve az értekezés megszületéséhez.

Köszönet illeti támogatásukért és segítségükért Dr. Lampé Zsoltot, a Kenézy Gyula Kórház és Rendelőintézet Főigazgatóját és Dr. Mikó Lászlót, a kórház Orvosigazgatóját.

Köszönöm Dr. Damjanovich László Professzor Úrnak, a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Sebészeti Intézet igazgatójának útmutatását, javaslatait.

Külön köszönetemet fejezem ki a Sebészeti Intézet, Érsebészeti Tanszékén dolgozó Dr. Olvasztó Sándor Főorvos Úrnak, akitől az érsebészeti tudásom jelentős részét sajátítottam el. Csaknem húsz éve számíthatok szakmai segítségére, tanácsaira. Kiváló emberi és szakmai kvalitásai megkérdőjelezhetetlenek.

Hálás köszönetem a Kenézy Kórház Végtagsebészeti Osztály, a Sebészeti Intézet Érsebészeti Tanszék és a Sebészeti Műtéttani Tanszék összes dolgozójának munkájukért, segítségükért, támogatásukért.

Utoljára, de nem utolsósorban hálás vagyok a Családomnak mindenért, amit tőlük kaptam!