

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Fasciocutan és adipocutan lebenyek regenerációjának
vizsgálata kísérletes modelleken**

Dr. Flaskó Anna Orsolya

Témavezető: Prof. Dr. Németh Norbert



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2026

Fasciocutan és adipocutan lebenyek regenerációjának vizsgálata kísérletes modelleken

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

Írta: Dr. Flaskó Anna Orsolya okleveles orvosdoktor

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája
(Experimentális és operatív orvostudományok programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Németh Norbert

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Juhász Béla, MTA doktora
Dr. Szabó Andrea, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szekanecz Zoltán, MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Juhász Béla, MTA doktora
Dr. Szabó Andrea, PhD
Dr. Ábrahám Szabolcs, PhD
Prof. Dr. Tóth Dezső, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület
2026. október 14. 13:00

BEVEZETÉS

A lebenyeket széles körben használják a medicina számos területén a különböző okokból létrejött szövethiány pótlására. Rekonstrukciónál alkalmazzák a lebenyeket az onkológiai sebészetben (pl.: fül-orr-gégészet és fej-nyaksebészet, szájsebészet, általános sebészet), a traumatológiában, az égési sebészetben és a plasztikai sebészetben is. A defektus pótlásánál nem csak a hiány egyszerű „betöltése”, hanem különböző funkcionális és esztétikai célok megvalósítása is lényeges, ezzel biztosítva megfelelő életminőséget a páciensnek.

A lebenyeket osztályozhatjuk a szöveti összetételük (pl. cutan, fasciocutan, adipocutan, myocutan, osteomusculocutan), elhelyezkedés (pl. localis, regionális, távoli), a vérellátásuk, a konfigurációjuk és a szövethiányra való átvitelük módja szerint.

Fontos leszögezni, hogy a megfelelő lebeny kiválasztása kritikus fontosságú a műtét sikeressége szempontjából. A megfelelő lebenytípus kiválasztása több szempont alapján történik, figyelembe kell vennünk a szöveti defektus lokalizációját, méretét és mélységét, a szomszédos struktúrákat, az vasculaturát, a bőr Langer-féle vonalait, az esztétikai szempontokat, illetve a betegnél előforduló egyéb társbetegségeket és befolyásoló tényezőket (dohányzás, perifériás érbetegség, érelmeszesedés, diabetes mellitus, steroidhasználat, korábbi műtétek, stb.), valamint végül, de egyáltalán nem utolsósorban a sebész szakértelmét.

Általánosan ismert sebészek között, hogy legjobb lebeny az, amelyikben a sebésznek nagy tapasztalata van, sokszor használta munkája során, így nagy biztonsággal tudja preparálni és kivitelezni. Azonban nem elég kiválasztani a megfelelő lebenyt, hiszen a teljes gyógyulásig még számos akadály kerülhet az utunkba. Éppen emiatt kulcsfontosságú a lebenyek megfelelő szöveti perfusioja, melyet befolyásol többek között a vascularis rendszer morfológiai/funkcionális állapota, a microcirculatio, a hemodinamika illetve a makro- és mikrorheológiai paraméterek is.

A szöveti perfúzió, valamint a lebenyek életképességének monitorozására számos módszer ismert, amelyek klinikai gyakorlatban és kísérleti tanulmányokban egyaránt alkalmazhatóak. Ez amiatt fontos, mivel gyakran fordulnak elő a lebeny sebészetnél különböző szövődmények. Ischaemia, ischaemia-reperfúziós károsodás (I/R), trombosis és lebeny necrosis több okból kialakulhat, többek között a lebeny nem megfelelő előkészítése, szöveti károsodás, az ellátó erek érnyelének meghajlása/torsioja, hematoma, oedema vagy fertőzés miatt.

A microcirculatio, a hemorreológia és az érnél áramlása mind összefügg. Amennyiben sérül az érnél és csökken vagy megszűnik benne az áramlás úgy a lebeny microcirculatioja romlást szenved, mely a vörösvérsejtek deformabilitásának és aggregációjának megváltozásához, a vér alakos elemeinek a számbeli megváltozásához vezet. Viszont maguknak a vörösvérsejtek ezen fizikai tulajdonságainak (aggregatio és deformabilitás) I/R károsodás vagy gyulladás miatti megváltozása a szöveti perfusio tovább romlását okozza, „ördögi körhöz” vezetve. Korábbi kutatások bebizonyították, hogy az ischaemia és reperfusio korai szakaszában a vörösvérsejtek deformabilitása romlik míg az aggregatiojuk fokozódik, éppen ezért úgy gondoljuk ezen paraméterek megfigyelése a mikrokeringés és az érnél keringésének megfigyelése mellett előre jelezhetik a postoperatív komplikációkat lebenyek alkalmazásakor.

Az állatmodellek alkalmazása elterjedt, a lebenyek ischaemia-reperfusiojának és regenerációjának tanulmányozására számos modell ismert különböző szöveti összetételű (fasciocutan, adipocutan, musculocutan stb.) lebenyekkel és különböző ischaemiás időtartamokkal. Kísérletünk során patkányok epigastrialis fasciocutan illetve adipocutan lebenyét használtuk, habár elhelyezkedésük és tápláló erük azonos, míg az fasciocutant csupán a bőr, a közvetlenül alatta lévő subcutan szövet illetve fascia alkotja, addig az adipocutan része a hasi zsírpárna is. Ezek a lebenytípusok és érnelyük jól preparálható, megfelelő méretűek illetve elhelyezkedésük miatt könnyen vizsgálhatóak műszeresen is pl. Cytocammel így

megfelelő választásnak bizonyultak kísérleteinkhez, mivel alkalmasak voltak a lebenyek patofiziológiájának, a sebgyógyulást és a regenerációs folyamatokat befolyásoló tényezőknek, valamint a különböző megelőzési lehetőségeknek és hatóanyagoknak tanulmányozására.

A rekonstrukciós sebészetben folyamatos az igény az olyan hatóanyagokra, amelyek javítják a sebgyógyulást, emiatt kísérletünkben két anyag hatásait is vizsgáltuk. Az egyik a PACAP volt, egy endogén neuropeptid, amely az adenilát-cikláz aktiválásán keresztül növeli a sejtek cAMP-szintjét, a nemzetközi irodalom alapján bizonyítottan van többféle protektív szerepe, gyulladáscsökkentő, antiapoptotikus illetve az extracelluláris mátrix alkotóelemeinek termelését is fokozza. A BGP-15 pedig egy nikotin-amidoxim-származék, melyet magyar kutatók fejlesztettek ki. Képes növelni a hőstresszfehérje-indukciót, javítja a membránfluiditást, csökkenti a reaktív oxigéngyökök termelődését illetve protektív hatást mutat gyulladásos és I/R-folyamatokban.

CÉLKITŰZÉS

1. Célunk volt olyan patkány modell kialakítása, mely különböző szöveti összetételű lebenyek vizsgálatát teszi lehetővé és mely alkalmazása során a lebenyeket érő ischaemia/reperfusio hatás általi különböző változások illetve a regeneráció során létrejövő változások jól utánkövethetők.
2. Vizsgálni kívántuk, hogyan változik a morfológiája, a szövettani illetve biomechanikai tulajdonságai a fascio- és adipocutan lebenyeknek a korai regenerációjuk során.
3. Célul tűztük ki az I/R károsodás mértékének megállapítását a perfúziós paraméterek vizsgálatával, a véráramlás, mikrokeringes függvényében adipocutan lebenyek esetében.
4. PACAP 1-38, illetve BGP-15 tartalmú gélek microrheológiai illetve hisztomorphológiai hatásának vizsgálatát I/R-nak kitett epigastriális fasciocutan lebenyek gyógyulása során.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Minden kísérletet a hatályos állatvédelmi törvény (1998. évi XVIII. törvény az állatok védelméről és kíméletéről) és EU szabályozás 2010/63 irányelv) betartása mellett, a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának jóváhagyásával (engedély nyilvántartási szám: 19/2022 /DEMÁB) végeztük el.

1.1 Kísérleti állatok kiválasztása és előkészítése a műtétekhez

A kutatásokhoz összesen 31 hím Wistar patkányt (származási hely: Toxi-Coop Zrt., Budapest, Magyarország) használtunk fel. A patkányokat hathetes korukban szállították a Tanszékünk állatházába, és a kísérlet megkezdése előtt három hétig akklimatizálódtak standard méretű ketrecekben (Eurostandard IV, Tecniplast, Buguggiate, Olaszország. Az állatházban állandó hőmérsékletet (22 C° illetve páratartalmat (55±10%-os) tartottunk fent, az állatok standard patkánytápot kaptak szabad hozzáféréssel illetve vizet önitató módon. A világításban 12-12 órás világos/sötét ciklust követtünk.

A felnőtt hím patkányok kiválasztása háttérben az állt, hogy a kísérleti sebészeti beavatkozásokhoz megfelelő méretű és anatómiájú állatmodellt kívántunk létrehozni, melyhez szükséges volt a megfelelő életkor illetve a nemi homogenitás. Mivel a lebenyeket az epigastriális régióban jelöltük ki, emiatt is elvetettük a nőstény állatok felhasználását, amelyek 6 pár mamillával rendelkeznek.

A műtétek előtt a patkányok testsúlyát lemértük, ez alapján általános anaesthesiaként 100 mg/testtömeg-kg i.p. ketamint (CP-ketaminhidroklorid 10%, Produlab Pharma BV, Raamsdonksveer, Hollandia), 10 mg/testtömeg-kg i.p. xilazin-hidrokloridot (CP-xilazin-

hidroklorid, 2%; Produlab Pharma BV, Raamsdonksveer, Hollandia) és 0,05 mg/kg Atropint s.c. (Atropinum sulfuricum 0,1%, Egis Pharmaceuticals PLC, Budapest, Magyarország) használtunk.^{80,81} A műtét során figyelemmel kísértük az állatok vitális paramétereit: a légzésszámot, a légzés mélységét, valamint a nyálkahártyák illetve a végtagok színét. Emellett a műtétek során az állatok egy melegítőpárnán voltak elhelyezve, hogy ezáltal biztosítsuk az optimális testhőmérsékletet a műtétek teljes ideje alatt.

A két műtéti csoport műtét technikájában voltak különbségek, de az elmondható minden állatról, hogy postoperative 2 ml 0,9% NaCl-t kaptak s.c. A műtétek után az állatokat egyesével tartottuk, nyakukra pedig az autophagia megelőzése céljából műanyag gallért helyeztünk. A postoperatív fájdalomcsillapításhoz nem alkalmaztunk hagyományos NSAID-okat, ahelyett az első 3 postoperatív napon tramadolt (15 mg/kg/nap, s.c.) adtunk az állatoknak. Illetve sc. fiziológiás só oldatot is kaptak az állatok, a megfelelő hidratatio elérése érdekében.

1.1.1 Patkány fasciocutan epigastrialis lebenyeknél alkalmazott műtéti technika, kísérleti és mintavételi protokoll

Fasciocutan bilaterális epigastrialis lebenyt 21 hím Wistar patkányon ($322,79 \pm 17,63$ g) hoztunk létre. Ezen állatokat a kísérlet során használt sebgél szerint 3 csoportra osztottuk: kontroll csoport, PACAP csoport illetve BGP-15 csoport. A lebenyeket standard méretű ovális sablon (felület: $5,48 \text{ cm}^2$) használatával készítettük el, így érve el minden állatnál ugyanazt a formát és méretet. A műtéti területet szőrtelenítettük, majd fertőtlenítettük és izoláltuk, ezután a sablon általi jelölésnek megfelelően elvégeztük a bőrmetszést. A lebenyeket az arteria és vena epigastricus superficialis inferiorra nyeleztük.

A bal oldali lebeny (későbbiekben ischaemiás oldal) érnyelét mikrosebészeti kapocssal 120 percig leszorítottuk és a sebágyba helyeztük, hogy ne száradjon ki, míg a jobb oldali lebenyt

(későbbiekben kontroll oldal) kipreparálás után szintén a sebágyban hagytuk. A 120 perces időintervallum letelte után az adott csoportra jellemző 0,3–0,3 ml hidroxipropil-metilcellulóz gél (HPMC) vittünk fel a sebágyakra.

A kontroll csoportban ($n = 7$) a gél nem tartalmazott hatóanyagokat. A PACAP csoportban ($n = 7$) 0,01% PACAP 1-38-at, a BGP-15 csoportban ($n = 7$) pedig 10% BGP-15-öt adtunk a gélhez. A speciális sebgéleket a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Kar Gyógyszertechnológiai Tanszékén állították elő. Ezután a kétoldali lebenyeket 32 egyszerű, csomós öltéssel varrtuk vissza eredeti helyükre (vágó tű, Silk, SMI, Steinerberg, Belgium). A csoportoknak megfelelő sebgéleket a műtét után 5 napon át vittük fel a varratok körül és a lebenyek felületén 0,15 ml-0,15 ml-t naponta a sebápolás mellett.

A műtét előtt (ezt használtuk alap értéknek) illetve a műtét utáni 1., 3. és 7. postoperatív napon az oldalsó farokvénából vettünk vért a laboratóriumi vizsgálatokhoz (0,4 ml/db; K3-EDTA, Vacutainer®, Becton Dickinson GmbH, Franklin Lakes, NJ, USA).

A műtét után egyből majd a 1., 3. és 7. postoperatív napon fényképeket készítettünk a lebenyekről. A lebenyek területét az ImageJ 1.40g ingyenes szoftver segítségével határoztuk meg, amelyet minden alkalommal az állatra helyezett vonalzóval kalibráltunk.

Emellett bőr hőmérséklet méréseket végeztünk (Ri-thermo® N professzionális klinikai thermometer, Rudolf Riester GmbH, Jungingen, Németország) mindkét lebenyen és az ép epigastriális bőrfelületen (kontroll középső régió) a műtét előtt, az ischaemia alatt, a műtét után (a lebenyek összevarrása után), valamint a műtét utáni 1., 3. és 7. napon.

A postoperatív 7. napon a kísérleti periódus végeztével az állatokat 300 mg/kg 10%-os ketaminhidroklorid és 30 mg/kg 2%-os xilazinhidroklorid intravénás injekcióval, oldalsó farokvéna branülön keresztül túllaltattuk, majd a szakítószilárdság illetve szövettani vizsgálatokhoz bőrmintákat vettünk. $0,5 \times 3$ cm-es bőrcsíkokat vágunk ki a lebenyek felső,

oldalsó és alsó részéből, belevéve a lebeny bőrterületét, a varratsort és a szomszédos ép bőrrészt a szakítószilárdság mérésekhez.

Ezen kívül szintén fél cm széles bőrcsíkokat vágunk ki a lebenyek középső részéből is, a köztük lévő ép bőrrésszel együtt, a szövettani elemzés céljából.

1.1.2 Patkány adipocutan epigastrialis lebenyeknél alkalmazott műtéti technika és kísérleti protokoll

Tíz hím Wistar patkányon (testtömeg: $362,7 \pm 17,08$ g) hoztunk létre bilaterálisan adipocutan epigastrialis lebenyeket, melyeket szintén standard méretű ovális sablon alapján méreteztünk. A szőrtelenített hasú állatokon a műtéti terület fertőtlenítése és izolálása után két oldalon készítettük el a lebenyeket (felület: $400,76 \pm 66,08$ mm²), a lebenyeket az arteria és vena epigastrica superficialisra nyeleztük.

A bal oldalon a lebeny érnyelét szintén 2 órára leszorítottuk, miközben a lebenyeket a sebágyba helyeztük. Az ischaemiás időszak után a microvascularis kapcsot eltávolítottuk, a lebenyeket repozicionáltuk és 32-32 egyszerű csomós öltéssel (4/0 Pidilen, Kollut USA) visszavarrtuk, a sebágyakat 0,3-0,3 ml hidroxipropil-metilcellulóz (HPMC) géllal kezeltük. A sebkezelést a műtét utáni 5. napig (0,15 ml/lebeny/nap) folytattuk.

Két esetben az utánkövetés során a seb debridement-jára és/vagy resuturázásra volt szükség. Ezeket a beavatkozásokat általános érzéstelenítésben végeztük el.

A műtét után, valamint a műtét utáni 1., 3., 7. és 14. napon fényképeket készítettünk a lebenyekről, hogy a területük méretének megváltozását nyomon kövessük (ImageJ 1.40 g freeware). Szintén végeztünk bőrhőmérsékleti méréseket: a műtét előtt, az ischaemia alatt, a műtét után (a lebenyek újbóli összevarrása után) és a 7. postoperatív napon a két lebenyen illetve a kontroll epigastrialis bőrfelületen (Rodent NIBP infravörös hőmérő LaserSight, AD Instruments, USA). Vérmintákat az oldalsó farokvénából vettünk a laboratóriumi vizsgálatokra

a műtét előtt, valamint az 1., 3. és 7. és 14. napon. Az utolsó napon az állatokat túlaltattuk. Ezután bőrcsíkokat nyertünk a szakítószilárdsági és szövettani vizsgálatokhoz.

1.2 Laboratóriumi vizsgálatok

1.2.1 Haematologiai paraméterek

A haematologiai paramétereket Sysmex K-4500 automatával (TOA Medical Electronics Co., Ltd., Kobe, Japán) mértük. A vizsgált paraméterek között szerepelt a fehérvérsejtek száma (WBC [G/L]), a vörösvérsejtek száma (RBC [T/L]), a hematokrit (Hct [%]) és a vérlemezkék száma (Plt [G/L]).

1.2.2 Vörösvérsejt deformabilitás

A vörösvérsejtek deformabilitását LoRRca MaxSis Omoscan ektacytometer (RR Mechatronics International B.V., Zwaag, Hollandia) segítségével határoztuk meg.

Az eszközben a vérminták nyíróerő hatásának tettük ki és lézeres diffrakciós technikával mértük a vörösvérsejtek megnyúlását. A megnyúlási indexet (EI) a nyíróerő függvényében határoztuk meg (SS, Pa; tartomány: 0,3–30 Pa). A hagyományos deformabilitási teszt során 10 µL antikoagulált teljes vér mintát, 2 mL polivinil-pirrolidon (PVP)-PBS oldattal (PVP: 360 kDa, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA; PVP-PBS oldat viszkozitása = 31,6–33,6 mPas, ozmolalitása = 290–310 mOsmol/kg, pH = 7,5) kevertünk össze. Minden mérést 37 °C-on történt. Az EI–SS görbékéből összehasonlító adatokat számítottunk, beleértve a 3 Pa-nál mért EI értékeket.

Az egyes EI–SS görbék paraméterezéséhez a Lineweaver–Burk-egyenletet használtuk ($1/EI = SS_{1/2}/EI_{max} \times 1/SS + 1/EI_{max}$), amely megadta a maximális megnyúlási indexet

(EImax) és az ennek feléhez tartozó nyírófeszültség értéket ($SS_{1/2}$ [Pa]). A vörösvérsejtek deformabilitásának romlását alacsonyabb EI vagy EImax és magasabb $SS_{1/2}$ értékek jelzik.

1.2.3 Vörösvérsejt aggregatio

A vérminták aggregációs index értékeit Myrenne MA-1 eritrocitagregométerrel (Myrenne GmbH, Roetgen, Németország) határoztuk meg.

Ez a módszer fényáteresztő fotometrián alapul és 20 μ l vérre van szükség hozzá. Miután kontrollált nyírási rendszerrel (nyírási sebesség: 600 s^{-1}) elértük a vörösvérsejtek disaggregációját, fénytransmissziót alkalmaztunk 5 vagy 10 másodpercig statikus körülmények között (M értékek, nyírási sebesség: 0 s^{-1}) vagy alacsony nyírási sebesség mellett (M1 értékek, nyírási sebesség: 3 s^{-1}). A méréseket szobahőmérsékleten (20–25 $^{\circ}C$) végeztük. Minden indexparamétert négy párhuzamos méréssel határoztunk meg, amelyek átlagát használtuk fel.

A magasabb index értékek (M 5 s, M1 5 s, M 10 s, M1 10 s) a vörösvérsejtek fokozott aggregációját jelzik.

1.3 Szakítószilárdság mérése

A szakítószilárdsági vizsgálatokhoz a terminálás után (fasciocutan lebenyeknél postoperatív 7., adipocutan lebenyeknél postoperatív 14. napon) ~5(x30) mm szélességű bőrdarabokat nyertünk mind az ischaemiás, mind a nem ischaemiás lebenyek felső, oldalsó és alsó részeiből. Az excisiókat úgy vettük, hogy mind a lebenyes területeket illetve az ép bőrterületet, valamint a kettőt elválasztó, már gyógyult varratvonalat is magukban foglalták.

A mintákat ezután egy speciális szakítószilárdság-mérő készülékbe helyeztük, (melyet az Információ Technológia Tanszék a Sebészeti Műtéttan Tanszékkel folytatott együttműködés során fejlesztett,) úgy hogy a varratvonal középen legyen.

A vizsgálat során a minták szakadásáig folyamatosan növekvő szakítóerőt (1,95 mm/s) alkalmaztunk és grammban rögzítettük, az adatokat CVS fájllokba mentődtek. Ezután a grammot newtonba konvertáltuk, ezekből az adatokból a gép által generált feszültség-nyúlás görbe lehetővé tette a legfontosabb paraméterek meghatározását, mint a maximális feszültséget, a szakadási pontot és a görbék meredekségét. A szövet szakítószilárdságára utal az maximalis erő, amit a szövetek a szakadásuk előtt még pont elbírtak.

1.4 Szövettani elemzések

A szövettani vizsgálatokhoz felhasznált bőrcsíkokat a kísérletek terminálása után nyertük úgy, hogy mindkét oldali lebeny részletet illetve a kettő között lévő bőr részt is tartalmazza. A bőrmintákat fogászati viaszra rögzítettük, majd két napig formalinban tároltuk. A fogászati viasz használata azért volt szükséges, hogy megakadályozzuk a minták zsugorodását és összegyűrődését. A fixációt követően a mintákat háromszor desztillált vízben, majd egyre nagyobb koncentrációjú alkoholban mostuk, majd paraffinba ágyasztuk. Mikrotómmal 7 μ m vastag sorozat metszetek készültek (Leica, Wetzlar, Németország). A metszeteket vízben oldott dimetil-metilén késsel (DMMB) (Sigma-Aldrich, MO, USA), hematoxin-eozinnal (H&E, Sigma-Aldrich, MO, USA), pikroszirusz vörössel (Sigma-Aldrich, MO, USA), illetve a fasciocutan lebenyek esetében még orceinnal (Sigma-Aldrich, MO, USA) festettük a gyártó utasításainak megfelelően. Ezután a metszetek DPX (Sigma-Aldrich, MO, USA) bevonatot kaptak. A DMMB-vel, H&E-vel és Orceinnal festett szövettani

metszeteket BX53 Olympus (Olympus, Tokió, Japán) fénymikroszkóppal vizsgáltuk, konstans kamera- és expozíciós beállításokkal.

A DMMB egy klasszikus, gyors módszer, amely a hízósejtekben található granulumokat metakromatikusan lila vagy ibolyaszínűre festi a magas heparin- és hisztamintartalom miatt, így a hízósejtek lila-kék granulumokként jelennek meg a világosabb háttér előtt. Ez azért lehetséges, mert a DMMB a hízósejtekre jellemző szulfátos proteoglikánokat specifikusan megfesti. A DMMB-festés után megszámloltuk az adott 10x nagyítású területre eső hízósejteket és feljegyeztük a teljes sejtszámot.

A pikrosziriusz vörössel festett mintákat polarizációs lencsével vizsgáltuk, ahol a polarizált fény síkját $\lambda/4$ -del elforgattuk, és egy BX53 Olympus mikroszkóppal (Olympus, Tokió, Japán) $\lambda/4$ kompenzátort használtunk. A fényképeket normál fényben, majd polarizált fényben készítettük, konstans kamera beállításokkal. A pikrosziriusz vörös festésnél a vékony kollagén rostok zöld, míg a vastag kollagénrostok vörös színnel festődnek. A vörös-zöld pixel intenzitás analízisére az ImageJ 1.40g freeware-t használtuk, mely semikvantitativ adatokat adott meg, amelyeket az ép bőr adataihoz viszonyítottunk.

A szövetminták H&E festése után megmértük az epidermis vastagságát (ImageJ 1.40g freeware) illetve értékeltük a szövetek morfológiáját és ott ahol volt több csoport (fasciocutan lebenyek) összehasonlítottuk a csoportok közötti különbségeket.

1.5 A lebenyek érnyelének véráramlás-vizsgálata

A Transonic T206 készülék (Transonic Systems, Ithaca, USA) segítségével mértük az adipocutan lebenyek arteria epigastrica superficialisának véráramlását. Mindkét oldali lebeny arteriájában végeztünk méréseket az ischaemiás periódus előtt és után (a visszavarrás előtt) és a 14. postoperatív napon.

A készülék szondáját közvetlenül az érnélre helyeztük, így valós idejű ml/percben kifejezett áramlásméréseket kaptunk eredményül.

1.6 A Microcirculatio vizsgálata

Az adipocutan lebenyeknél Cytocam-IDF (Braedius Medical B.V., Huizen, Hollandia) videomikroszkópot használtunk a microcirculatio értékelésére a felületi szövetrétegek beeső fénnel felülről történő megvilágításával (2-3 mm mélyen), amelynek eredményeként a hemoglobin-tartalmú vörösvérsejtek fekete vagy szürke pontokként jelentek meg a világos szöveti háttér előtt, , mivel az Incident Dark-Field technika esetén a háttérről visszaverődő szórt fény világítja meg a területet, miközben a direkt reflexiók nem jutnak az optikába.

A mikrokeringési felvételeket offline módon elemeztük, a következő paraméterekkel: a perfused vessel density (PVD [mm/mm^2]), proportion of perfused vessels (PPV [%]), illetve microvascular flow index (MFI [au]).

1.7 Statisztikai módszerek

A minták méretének, vagyis a csoportonkénti állatok számának meghatározásához a Mead-egyenletet (Mead's Source Equation) alkalmaztuk.

A statisztikai elemzésekhez a SigmaStat Software 3.1.1.0. (Sys-tat Software Inc., San Jose, CA, USA) szoftvert alkalmaztuk. Az adatok átlagként kerültek bemutatásra $\pm$ standard deviatival (SD). Ott, ahol volt több csoport is (fasciocutan lebenyes kísérletünk) a csoportok közötti összehasonlításhoz t-próbát vagy Mann–Whitney-próbát használtunk, a csoportokon belüli összehasonlításhoz egyirányú és ismételt méréses ANOVA-t vagy Kruskal–Wallis-

tesztet használtunk (az adatok eloszlásának normalitási tesztjének eredményétől függően). Emellett $<0,05$ alatti p-értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

2.1 Patkány fasciocutan epigastrialis lebenyekkel folytatott kísérleti eredményeink

2.1.1 Általános megfigyeléseink

A postoperatív megfigyelési időszak alatt nem tapasztaltunk jelentősebb trombotikus szövődményeket vagy kiterjedt lebenynecrosist.

Az első postoperatív napra a lebenyek területe szignifikánsan csökkent minden csoportban, mely csökkenés a kísérleti időszak alatt tovább folytatódott. Az egyes csoportok között nem volt szignifikáns különbség, de a 7. postoperatív napon a legnagyobb csökkenés, összehasonlítva a saját első napi értékükkel, az ischaemiás oldalon volt (kontroll: 24,27%; PACAP: 32,6%; BGP-15: 30,6%), míg a kontroll oldalon kisebb zsugorodás volt megfigyelhető (kontroll: 25,2%; PACAP: 15%; BGP-15: 13,4%). Emellett habár a kontroll csoportban mindkét oldali lebenyen hasonló méretbeli csökkenés volt, a hatóanyaggal kezelt csoportokban a nem ischaemiás oldalon kisebb csökkenés volt megfigyelhető, illetve a PACAP csoportban a műtét utáni 7. napon még méretbeli növekedés is látható volt.

2.1.2 Bőrhőmérséklet

A lebenyek bőrfelületének hőmérséklete mindkét oldalon szignifikánsan csökkent az ischaemiás időszakban, mivel magával a műtéti beavatkozással az összes lebenyt elmozdítottuk eredeti anatómiai helyzetéből. Az ischaemiás lebenyek hőmérséklete kissé

alacsonyabb volt, mint a nem ischaemiás (kontroll oldali) lebenyeké. A lebenyek újbóli pozicionálása és visszavarrása után a hőmérsékletük normalizálódott. A postoperatív napokban nem volt szignifikáns különbség a nem ischaemiás és az ischaemiás lebenyek között, azonban az ischaemiás lebenyek értékei kissé alacsonyabbak voltak.

2.1.3 Hematológiai paraméterek

A fehérvérsejtek száma főként a kontroll csoportban csökkent az első postoperatív napon. A 7. postoperatív napra az értékek a kiindulási adatokhoz közeli szintre emelkedtek. A BGP-15 csoportban a 3. postoperatív napon alacsonyabb fehérvérsejt értékeket találtunk a többi csoporthoz képest. A vörösvérsejtek száma a megfigyelési időszak alatt enyhe csökkenést mutatott, az első postoperatív napon a PACAP és a BGP-15 csoportokban megfigyelhető hemokoncentráció ellenére. A hematokrit értékek is ennek megfelelően változtak. A vérlemezkeszám folyamatosan emelkedett, a legmagasabb értékeket a BGP-15 csoportban figyeltük meg.

2.1.4 Mikroreológiai paraméterek

A vörösvérsejtek deformabilitásának romlásával csökken az elongációs index (EI). Minden csoportban enyhe csökkenést figyeltünk meg az EI értékekben 3 Pa nyírófeszültség mellett és a maximális elongációs index értékekben (EI_{max}) a postoperatív napok során. A $EI_{max}/SS_{1/2}$ csak a BGP-15 csoportban emelkedett szignifikánsan.

Az aggregációs index értékek (M 5 s, M 10 s) szignifikánsan növekedtek az 1. and 3. postoperatív napokra a kontroll és a PACAP csoportokban, míg a BGP-15 csoportnál megfigyelhető emelkedés sokkal kisebb volt és nem volt szignifikáns.

2.1.5 Szakítószilárdság

A lebenyek (vagyis igazából a varratvonal) szakítószilárdsága több mint 70%-kal csökkent az intakt bőrhöz képest) (intakt bőrcsík: $17,01 \pm 3,65$ N; varrás után szakított bőrcsík: $10,68 \pm 2,31$ N). Az oldalsó, vagyis horizontális irányú bőrcsíkok varratvonalai gyengébbek voltak, mint a vertikális irányúaké (alsó és felső). A kontrollhoz képest a PACAP-csoportban szignifikáns ($p=0,0025$) csökkenés volt megfigyelhető az ischaemiás oldal szakítószilárdságában. A görbék meredeksége szignifikánsan nőtt a PACAP-pal kezelt kontroll lebenyben az oldalsó bőrcsík esetében ($p=0,0116$ vs. BGP-15), míg az ischaemiás lebenyből vett oldalsó bőrcsíknál szignifikánsan csökkent ($p=0,0077$ vs. kontroll; $p = 0,0241$ vs. BGP-15). A BGP-15 csoportban csak az alsó vertikális bőrrészek szakításánál mért görbék meredeksége mutatott szignifikáns ($p=0,0171$) csökkenést a kontrollhoz képest.

2.1.6 Szövettani vizsgálatok

A H&E festés steril akut gyulladásos folyamatokat mutatott, domináns limfocita infiltrációval. A varratok körül mag nélküli nekrotikus habsejtek voltak láthatók, főként az ischaemiás lebenyekben. A granulációs szövetben fibrocyták és fibroblasztok voltak láthatók, a fiziológiai sebgyógyulásnak megfelelően. Az ischaemiás lebenyekben szöveti degradációt észleltünk. A PACAP csoportban emelkedett mennyiségű makrofág volt

megfigyelhető, nagyszámú fibroblaszt mellett. Szöveti degradációt nem volt kimutatható, de folyamatban lévő erőteljes szöveti átalakulást láttunk. A BGP-15 csoportban makrofágok és fibroblasztok voltak megfigyelhetők az ischaemiás lebenyekben. Bár a szöveti átalakulás nem volt erőteljesen kimutatható, szöveti degradáció nem volt látható ezekben a csoportokban. Az epidermis vastagsága a varratok feletti granulációs szövetben jelentősen megnőtt a lebenyekben, különösen az ischaemiásokban. A növekedés kisebb volt a PACAP csoportban és nagyobb a BGP-15 csoportban.

A DMMB festett metszetekben a PACAP csoport ischaemiás lebenyeiben a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan csökkent a hízósejtek száma. Másrészt a PACAP a kontroll oldali lebenycsoportban is csökkentette a hízósejtek számát. A BGP-15 csoport ischaemiás lebenyeiben szintén szignifikánsan kevesebb hízósejtet láttunk. Ezzel szemben a BGP-15 csoport kontroll oldali lebenyénél több hízósejt volt, mint a kontroll csoportban.

A pikroszirusz festés a vastag kollagénszálakat specifikusság nélkül vörös színnel, míg a vékony kollagénszálakat zöld színnel jeleníti meg polarizált fényben (a fény síkjának $\lambda/4$ -es elforgatásával). Az intakt bőrben a dermis sűrű kollagénszálak hálózatát mutatta, amely megfelel a fiziológiás, sűrű, szabálytalan kötőszövetnek. Az ischaemiás lebenycsoportban diffúzabb és vékonyabb szálhálózat volt megfigyelhető, ami a sűrű kötőszövet lazulásának felel meg a sebgyógyulás során. A PACAP és BGP-15 kezelések hatására a kollagénszálak diffúz orientációját újraalkották és a dermisnek vastagabb, sűrű kötőszövet-szerű megjelenést adtak. A BGP-15 csoportban vékonyabb, zöld színű szálak is megfigyelhetők voltak.

Az orcein festés barna színnel jelzi az elasztikus rostokat. Normál intakt bőrben, a dermisben barna színű rostok figyelhetők meg a fiziológiásan sűrű, szabálytalan kötőszövetben. Ezek a rostok különböző hosszúságúak voltak és átfedésben voltak a kollagén rostokat, ezáltal biztosítva a bőr rugalmasságát. A kontroll oldalon ezeknek az

orcein festéssel jelzett rostoknak a mennyisége kevesebb volt a PACAP-pal kezelt csoportban. A PACAP-os csoportban a fejlődő hegszövetben jelentősen több vékonyabb rugalmas rost volt megfigyelhető, mint a kontroll ischaemiás oldali lebeny csoportban. A BGP-15 kezelés után az orcein-festett rostok száma a kontroll lebeny oldalán hasonló volt a kontroll csoportéhoz, míg az ischaemiás oldalon emelkedettebb volt, és itt vastagabb rugalmas rostok voltak megfigyelhetők.

2.2 Patkány adipocutan epigastrialis lebenyekkel folytatott kísérleti eredményeink

2.2.1 Általános megfigyeléseink

A megfigyelési időszak alatt nem észleltünk trombotikus szövödményt vagy látható lebenynecrosist. A lebenyek mérete, mind területük, mind kerületük csökkent, az ischaemiás oldali lebenyek nagyobb mértékben mutattak zsugorodást (postoperatív 1. napon a terület: $p=0,007$; kerület: $p=0,024$).

2.2.2 Bőrhőmérséklet

A bőrhőmérséklet az ischaemiás periódus alatt csökkent, mivel a kipreparált lebenyek kikerültek fiziológiás helyzetükből, habár a lebenyárokba visszahelyeztük őket a 120 perc alatt.

Az eredeti helyzetükbe történő visszavarrás után az értékek normalizálódtak, és később sem mutattak jelentős változást.

2.2.3 Hematológiai paraméterek

Fehérvérsejtek száma az első postoperatív napra kissé csökkent ($p=0,022$ vs. alapérték), majd a megfigyelési időszak alatt emelkedésnek indult (14. nap: $p=0,017$ vs. alapérték).

A vörösvérsejtszám, a hemoglobin és a hematokrit értékek a műtét utáni első héten még csökkentek (7. nap: $p=0,003$, $p=0,007$ és $p=0,003$ az alapértékhez képest) majd a 14. napra normalizálódtak.

Az MCV, MCH és MCHC értékek nem mutattak jelentős változást. A vérlemezkeszám a 3. ($p=0,027$ vs. alapérték), valamint a 14. postoperatív napra emelkedett ($p<0,001$ az alapérték)

2.2.4 Mikrorheológiai paraméterek

A vörösvérsejt deformabilitási paraméterek között a 7. postoperatív napra lecsökkent a 3 Pa-nál mért elongációs index ($p=0,003$ az alapértékhez képest) majd normalizálódott a megfigyelési időszak végére.

Az EI_{max} értékek mérsékelten csökkentek, főként az 1. és 3. postoperatív napokra majd a 14. napra normalizálódtak. Az $SS_{1/2}$ értékek nem változtak szignifikánsan, azonban a 7. és 14. napra kissé emelkedtek.

Jelentős változások voltak megfigyelhetőek a vörösvérsejt-aggregációs index értékeiben. Az 1. postoperatív napra mind a négy index érték emelkedett (M 5 s: $p<0,001$, M1 5 s: $p<0,001$, M 10 s: $p=0,005$, M1 10 s: $p=0,014$ vs. alapérték) és emelkedett szinten maradt, majd a megfigyelési időszak végére ismét növekedést mutatott (M1 10 s: $p=0,022$ vs. alap).

2.2.5 Szakítószilárdság

Az intakt bőrhez képest a szakítószilárdsági értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a lebenyek varratvonalában minden lebenyrészben és irányban ($p < 0,001$).

Vízszintes húzási irányban a szakítószilárdsági értékek magasabbak voltak, mint függőleges irányban (intakt bőr szakítószilárdsága: $p = 0,008$, görbe meredekség: $p = 0,005$).

2.2.6 Szövettani vizsgálatok

A H&E festéssel végzett szövettani elemzés megmutatta a gyulladásos és gyógyulási folyamatokat az ischaemiás lebenyekben. Semelyik bőrmintában nem figyeltünk meg jelentős morfológiai változásokat. Az epithelium vastagsága illetve a granulációs szövet nem mutatott patológiai rendellenességeket. A dermis integritása is változatlan maradt.

Dimetil-metilén kék festéssel vizualizáltuk a hízósejteket, melyek metakromatikusan bíbor színnel ábrázolódnak ezzel a specialis technikával. A masztociták mennyisége az ischaemiás lebenyekben csökkent volt az ép bőrhöz és a kontralateralis kontroll oldalhoz viszonyítva.

Pikrosziruszörös festéssel láthatóvá válnak a szöveti kollagénrostok. Amikor a polarizált fény síkját $\lambda/4$ -nyel elfordítjuk, feltárul a kollagénrostok elrendeződése: a vastagabbak fényes vörös színűek, míg a vékonyabbak zöld színűek. Elemzésünk kimutatta, hogy mindkét, vagyis a vörös (vastag rostok) és zöld (vékony rostok) fényintenzitás jelentősen csökkent az ischaemiás oldalon az ép bőrhöz és a kontralaterális oldalhoz képest. A vörös fényintenzitás jelentős csökkenést mutatott ($p = 0,004$) a kontralateralis oldallal összehasonlítva.

2.2.7 A lebenyek érnyeleinek véráramlása illetve a lebenyek microcirculatioos változásai

Az ischaemiás oldali lebenyek érnyeleinek artériás véráramlása alacsonyabb volt. ($0,77 \pm 0,24$ ml/min), mint a kontroll oldalon ($0,90 \pm 0,26$ ml/min) közvetlenül az ischaemia után. A 14. postoperatív napra további csökkenés volt megfigyelhető, főleg az ischaemiás lebenyeken (kontroll oldali lebeny: $0,64 \pm 0,25$ ml/min; ischaemiás oldali lebeny: $0,60 \pm 0,17$ ml/min), habár a változások nem voltak szignifikánsak. A lebeny kipreparálása után a De Backer-féle érrendszer sűrűség csökkent az ép bőrhez képest. A 7. postoperatív napon a perfúziós értékek emelkedtek az ischaemiás oldali lebenyben majd a 14. napra lecsökkentek. A microcirculatioos értékek az első héten emelkedést mutattak az ischaemiás lebenyekben aztán a megfigyelési időszak végére lecsökkentek

FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. Sikertől kialakítanunk egy jól reprodukálható és standardizálható bilaterális epigastriális fasciocutan és adipocutan lebenymodellt patkányban. A kétféle lebenyek bár egy lokalizációból indulnak és preparálásuk is hasonló, szöveti összetételük különböző, így modellezni lehet a különböző mértékű szöveti hiány pótlására szükséges eltérő összetételű lebenyek regenerációját. Az érnél lezórításával kontrolláltan lehet I/R károsodást létrehozni a kapcsolódó kutatási célokhoz.
2. Makroszkóposan az ischaemiás oldali adipocutan lebenyek nagyobb mértékben zsugorodtak. A szövettani vizsgálat kimutatta, hogy a masztociták száma csökkent, valamint a kollagénrostok mennyisége és rendezettsége is megváltozott az ischaemiás oldali adipocutan lebenyekben.

3. Az ischaemiás oldali adipocutan lebenyek érnyelének véráramlása csökkent volt, habár nem szignifikáns módon. Megfigyeltük, hogy az adipocutan ischaemiás lebenyek microcirculációs értékei még két héttel később is alacsonyabbak voltak, mint az ischaemiának nem kitett oldaliaké. A Cytocam-IDF módszer alkalmas volt a lebenyek intra- és postoperatív életképességének figyelemmel kísérésére. Az ischaemia-reperfusio által okozott micro-rheológiai károsodás a vörösvérsejtek deformabilitásának romlásában és fokozott vörösvérsejt-aggregációban nyilvánult meg.
4. A fasciocutan lebenyeknél alkalmazott hatóanyagok különböző mértékben enyhítették a lebenyek szöveti károsodását. A gyulladáscsökkentő (PACAP 1-38, BPG-15) és a rostösszetételre gyakorolt hatásra (PACAP 1-38) utaló eredményeink hosszabb utánkövetési időszakkal járó további vizsgálatokra ösztönöznek. Az ischaemia-reperfusionnak kitett fasciocutan lebenyekben a szakítószilárdság a jobb perfúziójú területeken növekedett a fibrotikus mátrix felhalmozódásának eredményeként.



Nyilvántartási szám: DEENK/15/2026.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Flaskó Anna

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Flaskó, A.**, Fazekas, L., Kincses, G., Varga, Á., Mátrai, Á. A., Csóka, L. D., Záhorszki, S., Tóth, A. Z., Fillér, C., Juhász, T., Molnár, Á., Németh, N.: Tissue perfusion and its influencing factors in epigastric adipocutaneous flaps affected by ischemia-reperfusion in rats.
Acta Cir. Bras. 41, 1-13, 2026.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/acb410226>
IF: 1.3 (2024)
2. **Flaskó, A.**, Fazekas, L., Kincses, G., Varga, Á., Mátrai, Á. A., Cziráj, I., Dodity, N., Bácskay, I., Pető, Á., Reglődi, D., Fillér, C., Juhász, T., Németh, N.: Impacts of PACAP 1-38 and BGP-15 on the Healing of Fasciocutaneous Groin Flaps Affected by Ischemia-Reperfusion in Rats.
Biomedicines. 13 (9), 1-18, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines13092129>
IF: 3.9 (2024)

További közlemények

3. Kincses, G., Fazekas, L., Varga, Á., Mátrai, Á. A., **Flaskó, A.**, Adorján, D. M., Molnár, Á., Deák, Á., Németh, N.: A refined experimental model for local, interpolated flap, and free tissue transfer studies using musculus cutaneus maximus-based musculocutaneous flap in the rat.
Acta Cir. Bras. 40, 1-11, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/acb408125>
IF: 1.3 (2024)
4. Kincses, G., Fazekas, L., Varga, Á., Mátrai, Á. A., Nguyen, X. L., Barabási, K., **Flaskó, A.**, Juhász, T., Molnár, Á., Németh, N.: Following-Up Micro-Rheological and Microcirculatory Alterations During the Early Wound Healing Phase of Local and Rotated Musculocutaneous Flaps in Rats.
Life (Basel). 15, 1-14, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life15091424>
IF: 3.4 (2024)





5. Diószegi, Á., Vass, M., **Flaskó, A.**, Gál, K., Mechler, F., Káplár, M., Csiba, L., Soltész, P.: Analysis of the Correlation between Microvascular Involvement and Neuropathy in Association with Metabolic Disorders in Case of Diabetic Leg Syndrome.
Annals atherosc. res. 1 (2), 1-6, 2018.
6. Diószegi, Á., Vass, M., **Flaskó, A.**, Mechler, F., Káplár, M., Soltész, P.: A diabeteses láb komplex vizsgálata.
Érbetegségek. 23 (3), 47-54, 2016.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,9

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,2**

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

Debrecen, 2026.01.14.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Németh Norbert Tanszékvezető Úrnak, értékes szakmai iránymutatásáért és a folyamatos támogatásáért, emellett hálás köszönet illeti türelméért, tanácsaiért és segítségéért a kutatás és a dolgozat elkészítése során. Nélküle ez a munka nem jöhetett volna létre.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Fazekas Lászlónak, Dr. Varga Ádámnak, Dr. Mátrai Ádám Attilának, Dr. Bedőcs-Baráth Barbarának, Szuhanics Évának, Füzesi Róbertnek illetve a Sebészeti Műtéttani Tanszék valamennyi Munkatársának, hogy segítették kutatásomat munkájukkal. Köszönet illeti kutatótársamat Dr. Kincses Gergőt is.

Köszönöm az együttműködést azon Kollégáimnak is, akik a kutatások során a társintézmények oldaláról csatlakoztak a közös munkához (DE Gyógyszertechnológiai Tanszék, Anatómia Intézet).

Köszönettel tartozok volt főnökömnek Dr.habil. Szilvássy Juditnak, aki tudományos munkára ösztönzött és támogatott illetve jelenlegi főnökömnek Dr.habil. Sztanó Balázs Klinika Igazgató Úrnak, aki lehetővé tette, hogy klinikai munkám mellett a kutatással is foglalkozzak. Köszönöm továbbá a Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikán dolgozó kollégáimnak a kutatómunkám során nyújtott biztatást és támogatást.

Végül köszönetemet szeretném kifejezni Férfjemnek, Családomnak és Barátaimnak, amiért végig mellettem álltak, hittek bennem és támogattak minden nehézségben, végtelenül hálás vagyok a szeretetükért, türelmükért és bátorításukért.