

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Adipocutan lebenyek életképességének vizsgálata
ischaemia-reperfúziós kísérletes sebészeti modellen**

Dr. Molnár Ábel

Témavezető:

Prof. Dr. Németh Norbert



**DEBRECENI EGYETEM
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2024**

**Adipocutan lebenyek életképességének vizsgálata
ischaemia-reperfüziós kísérletes sebészeti modellen**

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

Írta: Dr. Molnár Ábel plasztikai és égés-sebész szakorvos

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskolája
(Experimentális és Operatív Orvostudományok Programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Németh Norbert

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Arató Endre, PhD
Dr. Kelemen Ottó, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Méhes Gábor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Arató Endre, PhD
Dr. Kelemen Ottó, PhD
Prof. Dr. Jancsó Gábor, PhD
Dr. Tóth Dezső, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet
„A” épület előadóterme
2024. június 17., 11:00

1. BEVEZETÉS

A plasztikai sebészet egy rendkívül szerteágazó tudomány, mely kortól, nemtől függetlenül a teljes testfelületen végez beavatkozásokat. Nagy kihívás előtt áll, aki ezen tudományt egy rövidebb definícióval próbálná leírni, ugyanis az elmúlt évtizedekben rendkívüli mértékben differenciálódott szakmáról van szó. Nemcsak a szakterület definiálása nehéz, hanem a pontos spektrum meghatározása is, ugyanis számos más szakterülettel átfedő sebészeti tevékenységeket is magába foglal (pl. fül-orr-gégészet, fej-nyak sebészet, általános sebészet, szájsebészet). Mathes az alábbi, leginkább közelítő definíciót határozta meg a szakma rövid leírására: „*A plasztikai sebészet egy problémamegoldó sebészeti terület, amely anatómiai határok nélkül kezeli a lágyrészhányokat*”

A plasztikai sebészeti tevékenység alapvetően három csoportba sorolható. Beszélhetünk rekonstruktív, regeneratív, illetve esztétikai plasztikai sebészetről. Mindhárom ugyanazon princípiumokon alapul, úgymint a precizitás, kreativitás és atraumatikus műtéti technika.

A plasztikai sebészet rekonstruktív ágában nagy szerepe van a lebenyes szövetszövetpótló eljárásoknak. Ezeknek a lebenyeknek a vitalitása és a műtét sikeressége nemcsak a jó sebészeti technikától függ, hanem fontos szerep hárul a preoperatív tervezésre, megfelelő indikáció felállítására és a helyes postoperatív kezelésre is. Fontos kiemelni, hogy a lebenyképzés egy olyan eljárás, amely során a mobilizálendő szövet vérellátása elkerülhetetlenül károsodik. Ahogy Zoltán János professzor a magyar plasztikai sebészet egyik alapművében, a Cicatrix Optima c. könyvében is írja: „*Csak a műtéti trauma minimálisra csökkentésével lehet életben tartani azokat a szöveteket, amelyek amúgy is az életképességük határán lebegnek*”. Egy apró műtéttechnikai, vagy tervezési hiba, de akár a beteg oldaláról egy nem várt tényező a lebenyek részleges, vagy teljes elhalásához vezethet. Az esetek döntő többségében a szövődmények fellépésekor a sebész a klinikai tapasztalatát felhasználva általában a szemére hagyatkozik. Jól ismertek azok a tünetek, melyek egy lebennyel kapcsolatos szövődmény fellépését jelzik: gyulladásszerű jelek, úgymint duzzanat, bőrpír, váladékozás, továbbá a lebeny lividitása, vagy sápadt külleme, hőmérsékletének változása, kapilláris újratelődésének változása, illetve a lebeny feszülése. Ezen kézzelfogható, makroszkópos jelek megjelenése idején a háttérben húzódó etiológiai tényező már nem minden esetben eliminálható, mindennemű korrekció és próbálkozás ellenére részleges vagy teljes lebeny elhalás következhet be.

A lebenyekkel kapcsolatos mikrokeringési, rheologiai tényezők és a sebgyógyulási folyamat mechanizmusai mára mélyrehatóan ismertek. Nemcsak a folyamatok működését ismerjük már molekuláris szinten, hanem az elmúlt évtizedekben több olyan diagnosztikus eszköz került kifejlesztésre, amely a betegágy mellett a mikrokeringési paraméterek mérésére, számszerűsítésére is alkalmas. Példaként említhető a teljesség igénye nélkül a Lézer Doppler flowmetria, transcutan oxigén és szén-dioxid tensio mérés, fluoreszcens angiographia, vagy a micro-rheologiai paraméterek vérmintából történő meghatározása is. Mégis a klinikai tapasztalat az, hogy lebenyes szövetszövetpótló eljárásokkor hazánkban a plasztikai sebész inkább csak a szemére, semmint az előbb példaként említett eszközök használatára (is) hagyatkozik. Az okok ismertetése bőven meghaladná ezen disszertáció kereteit, el kell fogadnunk, hogy szakmai és gazdasági okok egyaránt szerepet játszanak a felvetett problémában. Pedig ezeknek a paramétereknek a regisztrálása és monitorozása fontos lehetőséget rejt magában: még azelőtt jelezhet egy esetleges szövődeményt, mielőtt az előbb részletezett (késői) makroszkópos jelenségek, potenciálisan irreverzibilis változások bekövetkeznének. Ezáltal megteremthetik a sebész számára a korai beavatkozás lehetőségét. Különösen fontos ez olyan eljárásokkor, amikor a lebenyes pótlás nagy felszínt érint, vagy olyan lebenyek esetében, melyek intakt bőr alatt találhatóak és ezáltal közvetlenül, fizikális jelek alapján nem vizsgálhatók („buried flaps”), illetve abban az esetben is, amikor a rekonstrukciós eljárástól további műtétek vagy kezelések függenek (különösen fontos példa a malignus tumorok postoperatív onkológiai ellátása).

Jelen disszertáció ezen vizsgálómódszerek kísérletes és gyakorlati felhasználási lehetőségeit tárgyalja a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Sebészeti Műtéttani Tanszékén végzett adipocutan lágýéklebeny modell eredményeinek tükrében.

2. CÉLKITŰZÉS

1. Olyan adipocutan lebeny modell kialakítására törekedtünk, amely alkalmas arra, hogy a lebenyek vitalitása intra- és postoperatív időszakban könnyen vizsgálható legyen és jól modellezze a klinikumban alkalmazott lebenyek viselkedését, beleértve az ischaemiás károsodást és az ebből fakadó szövődeményeket.
2. Az adipocutan lágyéklebeny 1 órás ischaemia-reperfusio folyamatának non-invazív intra- és postoperatív vizsgálatát tűztük ki célul, feltételezve, hogy a microcirculációs BFU (Blood Flux Unit) értékek eltérnek a lebenyek különböző területein és képesek előjelezni a postoperatív komplikációkat.
3. A mikrokeringés mellett micro-rheologiai paraméterek vizsgálata is célunk volt. Feltételeztük, hogy a micro-rheologiai vizsgálatok informatívak lehetnek a lebenyek preparálása, repositiója során bekövetkező hypoperfusio és/vagy ischaemia-reperfusio pathophysiológiájának jobb megértésében, összefüggésben a sebgyógyulás folyamatával is.
4. Szövetteni vizsgálatok segítségével célunk volt az ischaemia-reperfusión átesett és intakt lebenyek közötti mutatkozó mikroszkópos eltérések összehasonlítása, keresve a perfusió zavarokat mutató szöveti területek határát.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok, műtéti technika és kísérleti protokoll

Kísérletünket (engedély nyilvántartási szám: 20/2011/DEMÁB, Debreceni Egyetem Állatjóléti Bizottság) a hatályos állatvédelmi törvény (1998. évi XVIII. törvény az állatok védelméről és kíméletéről) és EU szabályozás 2010/63 irányelv) betartásával végeztük.

Tizenhét hím Crl:WI (Charles River Laboratories - Wistar han) patkányt használtunk fel kísérletünk során (Toxi-Coop Kft., Magyarország), melyek testtömege $399,5 \pm 70,7$ g volt. Az anesztézia során nátrium-thiopentált alkalmaztunk (60 mg/kg dózisban, intraperitonealis alkalmazás).

Műanyag sablon felhasználásával előzetes kirajzolás mentén mindkét oldalon ellipszis alakú adipocutan lágyéklebenyt preparáltunk, melyek területe $8,24 \text{ cm}^2$ volt. A kimetszési vonalak mellett kijelölésre kerültek a mérési pontok a hőmérsékleti és a microcirculációs paraméterek regisztrálása számára a lebeny cranialis, centralis és caudalis részén.

A kontroll csoportban (n=10) a kipreparálást követő 1 óra elteltével a lebenyeket repozícionáltuk és feszülésmentesen suturáztuk 32 db csomós öltéssel (4/0 Dexon). Az ischaemia-reperfusio (I/R) csoportban (n=7) az ellátó nyelet - mely az a. epigastrica inferior superficialist tartalmazta - microvascularis klippel lezártuk. 60 percnyi ischaemiát követően a klippeket eltávolítottuk, a lebenyeket repozícionáltuk és a kontroll csoportnál alkalmazott technikával suturáztuk.

Bőrhőmérsékleti és microcirculációs paramétereket a lebeny cranialis, centrális és caudális részén regisztráltuk (a bejelölési pontoknak megfelelően) a bemetszés előtt (alap), a preparálást követően, az ischaemia végén (I-60/R-0), 5 perccel a klippek eltávolítása után (R-5), a suturázást követően, majd az 1., 3., 5., 7., és 14. postoperatív napokon.

A napi sebellenőrzések mellett az 1., 3. és 5. postoperatív napon Flunixin-t alkalmaztunk (2 mg/kg s.c.) fájdalomcsillapítás céljából. Az autophagia megelőzésére műanyag gallért használtunk az első néhány postoperatív napon. Sutura insufficientia esetén anesthesia alkalmazása mellett debridálást és resuturát végeztünk. A 14. postoperatív napon a lebenyeket kimetszettük és szövettani feldolgozásra küldtük.

3.2. Bőrhőmérséklet és microcirculatio mérése

A bőr hőmérsékletét infravörös hőmérővel mértük. A bőr mikrokeringésének mérésére Lézer Doppler (LD) flowmétert használtunk (LD-01 Laser Doppler Tissue Flowmeter, Experimetria Ft., Magyarország), standard tűszennorral (MNP100XP pencil probe, Oxford

Optronix Ltd., UK). Az eszköz egy relatív mikrokeringési paramétert, az úgynevezett blood flux unit-ot (BFU) méri, amely az egységnyi területen (kb. 1 mm³) a véráramban lévő vörösvérsejt mennyiség elmozdulását (sebességét) integrálja. A mérőtű stabilizálását követően kb. 10-20 mp-es, műtermék nélküli mérési értékeket regisztráltuk és elemeztük az átlagos BFU értékeket.

3.3. Haematologiai és micro-rheologiai paraméterek vizsgálata

A műtétet megelőzően, majd az 1., 3., 5., 7. és 14. postoperatív napokon lateralis farokvénából vérmintákat vettünk a laborparaméterek vizsgálatára (antikoaguláns: K₃-EDTA 1.5 mg/ml). A kvalitatív és kvantitatív haematologiai paramétereket Sysmex F-800 sejtszámláló automatával végeztük (TOA Medical Electronics Corp. Lt., Japán).

A vörösvérsejt aggregatiót Myrenne MA-1 erythrocyta aggregométerrel mértük (Myrenne GmbH, Germany). A Myrenne MA-1 fénytranszmisszió alapuló mérést tesz lehetővé. A rendszer 600 s⁻¹ nyírófeszültséget kifejtve képes a vörösvérsejt aggregátumokat teljes mértékben diszperzálni. Ezt követően 5, vagy 10 s-on keresztül stasis mellett - M0 üzemmód - infravörös fénytranszmisszió révén méri az vörösvérsejt aggregatiót, melyet az aggregációs index meghatározásával számszerűsít. M1 üzemmód esetében a diszperziót követően konstans 3 s⁻¹ nyírófeszültséget kifejtve mér, hasonlóan 5, vagy 10 s időtartamig. Így összesen 4 aggregációs index paramétert képes az eszköz számolni: M5s, M10s, M15s, M110s. A magasabb index érték fokozott vörösvérsejt aggregációra utal. A mérés kivitelezéséhez 35 ml-nyi hígítatlan vérmintára van szükség.

A vörösvérsejt deformabilitást LoRRca MaxSis Osmoscan eszközzel mértük (Mechatronics BS, Hollandia). Az eszköz a deformabilitást a kibocsájtott lézerefény diffrakciója alapján méri. A működési elve, hogy az oldatra az eszköz meghatározott nyíróerőt fejt ki (ún. Couette típusú, két hengert alkalmazó rendszer), miközben folyamatos lézerefényt kibocsájtva annak visszaverődését méri. A visszaverődést CCD videokamerával rögzíti és az így kapott diffraktogramm alapján számítható az úgynevezett elongációs index (EI), mely a sejtek elnyújthatóságát számszerűsíti. Az elongációs index a diffraktogramm hosszúsági (A) és szélességi (B) adatai alapján számítható az $EI = (A-B / A+B)$ egyenlet alapján. A magasabb EI értékek a vörösvérsejtek megfelelő deformabilitására utalnak, míg a csökkent EI érték romló deformabilitást jelez (Hardeman, M.R. et al., 2007). A méréshez 5 µl vérmintát használtunk fel, melyet 1 ml izotóniás polyvinyl-pirrolidon (PVP) oldattal szuszpendáltunk (360 kDa PVP, viszkozitás 27 mPas, osmolalitás = 290-300 mOsm/kg, pH ~7.3). Az EI értéket 0.3 - 30 Pa nyírófeszültség értékek mellett határoztuk meg. Az elongációs

index ábrázolható a nyírófeszültség függvényében. Az így kapott görbe fontos információt nyújt a vörösvérsejtek deformabilitásáról.

Ezen görbe elemzésénél kiszámoltuk a vörösvérsejtek maximális elnyújthatóságának értékét (EI_{max}), továbbá ennek feléhez tartozó nyírófeszültség értékeket ($SS_{1/2}$) a Lineweaver-Burke analízisnek megfelelően: $1/EI = SS_{1/2} / EI_{max} \times 1/SS + 1/EI_{max}$. Az így kapott paraméterekből továbbá kalkulálható az $EI_{max} / SS_{1/2}$ hányados, ami lehetővé teszi a görbék összehasonlítását

3.4. Szövetteni vizsgálat

A 2 hetes követési periódust követően a patkányokat túllattuk, majd a lebenyeket kimetszettük szövetteni vizsgálatra. A kimetszett szövet tartalmazta a lebenyt, a varratvonalat, illetve a környező 2 mm-es intakt bőrt is. A kimetszett mintákat 10%-os formaldehidbe helyezve a Debreceni Egyetem Patológiai Intézetébe küldtük, ahol paraffinba ágyazva 4 μ m-es metszeteket készítettek. A feldolgozás során hematoxillin és eozin festés történt (H&E).

3.5. Statisztikai analízis

A kísérletekhez szükséges esetszám meghatározásához a Mead-egyenletet használtuk (Mead's source equation).

Az adatok átlag \pm szórás (S.D.) formájában kerültek feltüntetésre. A csoportok közötti és a csoporton belüli értékek összehasonlításra egyirányú ANOVA (Bonferroni, vagy Dunn módszer) tesztek alkalmaztunk. A csoporton belüli egyszerű összehasonlításra (adott időpontokban mért adatok összehasonlítása) Student t-tesztet, vagy Mann-Whitney non-parametrikus tesztet végeztünk az adatok eloszlásának normalitásától függően.

Statisztikailag szignifikánsnak a 0,05 alatti p értéket fogadtuk el.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Bőrhőmérséklet

A bőrhőmérsékleti értékek mérsékeltlen csökkentek a műtéti periódus alatt. Összehasonlítva a lebenyek cranialis, centralis és caudalis régióit, nem találtunk szignifikáns eltérést. A lebenyek repozicionálását követően a bőrhőmérsékleti értékek a kiindulási (alap) értékek szintjére tértek vissza. Az I/R csoportban a lokális hőmérsékleti értékek a cranialis régióban szignifikánsan magasabbak voltak a műtét végére a sebzárást követően.

4.2. Mikrokeringés

A 20-22. ábrák a BFU értékek változásait mutatják. Minden lebeny esetében a BFU értékek csökkenése volt megfigyelhető a preparálást követően. Az eltérések figyelemre méltóbbak voltak a lebenyek cranialis részén. Az ischaemiát követően a reperfusio korai szakaszában az értékek továbbra is alacsonyak maradtak. Hasonlóan alacsony értékeket figyeltünk meg a műtét végén, a sebzárást követően is. Ezek az értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak az alap értékekhez viszonyítva mindkét csoport esetében, az összes lebeny régiót tekintve.

A korai postoperatív időszakban a BFU értékek az I/R csoportban alacsonyabbak voltak a kontroll csoport értékeihez viszonyítva. Ezek a különbségek a 3. napon a cranialis régióban ($p=0,015$), a 7. és 14. postoperatív napon a centralis régióban ($p=0,035$ és $p=0,045$) voltak szignifikánsak, illetve az 5. postoperatív napon a szignifikancia küszöböt majdnem elérték (centralis terület, $p=0,061$).

4.3. Haematologiai paraméterek

A teljes fehérvérsejt szám (Fvs [G/l]) mérsékelt emelkedést mutatott a kontroll csoportban az első postoperatív napon. Ezt követően mindkét csoportban szignifikáns emelkedést láttunk az 5-14. postoperatív napok között a következők szerint. Az 5. postoperatív napon $p<0,001$ vs. alap mindkét csoportban; a 7. postoperatív napon a kontroll csoportban $p<0,002$ vs. alap, az I/R csoportban $p<0,001$ vs. kontroll; illetve a 14. postoperatív napon a kontroll csoportban $p=0,008$, az I/R csoportban $p<0,001$ vs. alap értékek. A monocyta+granulocyta arány (%) emelkedést mutatott a 3-5. postoperatív napokon (az I/R csoportban $p=0,007$ vs. alap, és $p=0,051$ vs. kontroll). Az utánkövetés második hetére az értékek normalizálódtak (7. napon az I/R csoportban $p=0,047$ vs. kontroll).

A haematokrit értékek (Htc [%]) csökkenést mutattak az első postoperatív héten, amely a rendszeres vérvételekre vezethető vissza (1. nap: I/R csoportban $p < 0,001$ vs. alap és $p = 0,031$ vs. kontroll; 3., 5. és 7. napokon: a kontroll csoportban $p < 0,001$ vs. alap). A haematokrit értékek a 14. postoperatív napra érdemi csoportok közötti különbségek nélkül az alap paraméterek szintjére rendeződtek.

A thrombocyta szám (Thr [G/l]) az első postoperatív napon az I/R csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt ($p = 0,033$ vs. alap és $p = 0,009$ vs. kontroll), majd jelentős emelkedés volt megfigyelhető a megfigyelési időszak második hetére mindkét csoportban. Az 5. postoperatív napra az emelkedés mértéke hasonló volt mindkét csoportban (kontroll: $p = 0,006$; az I/R csoportban $p < 0,001$ vs. alap). A 7. postoperatív napon az I/R csoport értékei jelentősen meghaladták a kontroll csoport értékeit ($p < 0,001$ vs. alap mindkét csoportban). A 14. postoperatív napon az I/R csoport értékei tovább emelkedtek ($p < 0,001$ vs. alap és $p = 0,003$ vs. kontroll), miközben a kontroll értékek hasonlóak voltak a 7. nap adataihoz ($p < 0,001$ vs. alap).

4.4. Vörösvérsejt aggregatio

Általánosságban emelkedett index értékeket láttunk az 1. és 3. postoperatív napokon, amelyet csökkenés követett. Az első postoperatív napon a kontroll csoportban nagyobb mértékű emelkedés volt látható (M 5s: $p < 0,001$, M1 5s: $p < 0,011$, M 10s: $p < 0,001$ és M1 10s: $p = 0,006$ vs. alap) az I/R csoport mérsékelt emelkedéséhez viszonyítva (M 5s: $p < 0,001$ vs. alap, M 10s: $p = 0,011$ vs. alap és $p < 0,001$ vs. kontroll, M1 10s: $p < 0,001$ vs. kontroll). A 3. postoperatív napra az I/R csoport értékei emelkedést mutattak (M 5s: $p = 0,002$ vs. alap, M1 5s: $p < 0,001$ vs. alap és kontroll, M 10s: $p = 0,002$ vs. alap és $p = 0,001$ vs. kontroll, M1 10s: $p = 0,002$ vs. alap és $p < 0,001$ vs. kontroll). Az I/R csoport értékei a 14. napra szignifikánsan magasabbak voltak a kontroll csoport értékeihez viszonyítva (M 5s: $p = 0,042$ vs. alap és $p = 0,012$ vs. kontroll, M1 5s: $p < 0,001$ vs. alap és $p = 0,033$ vs. kontroll).

4.5. Vörösvérsejt deformabilitás

A vörösvérsejt deformabilitási értékek vizsgálata során azt találtuk, hogy a deformabilitás az 1-5. postoperatív napokon jelentősen romlott főképpen az I/R csoportban.

Az elongációs érték csökkenése (3 Pa mellett) szignifikáns volt a 3. ($p = 0,002$ vs. alap), az 5. ($p = 0,007$ vs. kontroll), a 7. ($p < 0,001$ vs. kontroll), és a 14. ($p = 0,018$ vs. alap) postoperatív napokon. A számított EI_{max} a Kontroll csoport esetében kezdeti emelkedést

mutatott az 1. postoperatív napon ($p=0,006$ vs. alap) és csökkenést a 3. postoperatív napon ($p<0,001$ vs. alap). Eközben az I/R csoport csökkenést mutatott az 1. ($p=0,008$ vs. kontroll) és a 3. postoperatív napokon. ugyanakkor az 5. és a 7. postoperatív az EI_{max} értékek magasabbak voltak a kontroll csoport értékeihez viszonyítva ($p=0,027$ és $p=0,007$). Az $SS_{1/2}$ értékek összességében stabilak voltak a kontroll csoportban egy mérsékelt emelkedést mutató szakasz (1-3. postoperatív napok) kivételével. Az I/R csoport értékei szignifikánsan alacsonyabbak voltak az alap értékekhez viszonyítva a 3. ($p=0,05$) és az 5. ($p=0,009$) postoperatív napokon. Az előző két paraméter hányadosa ($EI_{max}/SS_{1/2}$) nem mutatott érdemi eltérést a megfigyelési időszak alatt (IV. táblázat).

4.6. Szöveti eredmények

A szövettani vizsgálat során normál gyógyulási folyamat volt megfigyelhető a varratvonal mentén kialakuló granulációs szövetrel. Az I/R csoport néhány lebenye esetében hypertrophizált inguinalis emlőmirigyek is megfigyelhetőek voltak a subcutan rétegben.

4.7. Szövődményes eset

A kontroll csoport egyik állata esetében (13. sorszám) egyoldali lebeny necrosist figyeltünk meg a jobb oldalon. Már az 1. postoperatív nap során a lebeny lividitása és oedemája szembetűnő volt. A 3. napon marginális necrosist láttunk a lebeny felső pólusánál. Az 5. napon a necrosis a lebeny kb. 70%-át érintette, mely az első postoperatív hét végére komplettálódott. A második hétre a necros levált, mely alatt granulációs szövet képződését láttuk.

Jelen állat esetében emelkedett fehérvérsejtszámot figyeltünk meg a Kontroll csoport többi állatához viszonyítva. A hemoglobin és a haematokrit értékek szintén magasabbak voltak a többi kontroll csoporthoz tartozó állathoz viszonyítva. Továbbá jelen állat mutatta a legmagasabb thrombocyta számot az összes kísérleti állat közül. Az aggregációs index értékek emelkedettek voltak az első postoperatív héten. A deformabilitás értékei pedig jelentősen romlottak az 5. és a 14. postoperatív nap között. A BFU értékek esetében kezdeti emelkedést láttunk ugyanezen állat intakt lebenyének értékeihez viszonyítva, melyet jelentős romlás követett a necrosis kialakulásával párhuzamosan. Az 5. postoperatív napon nem volt detektálható áramlás a necrotizált lebenyben. Ezt követően a granulációs szövet megjelenésével ismét normál BFU értékeket láttunk.

5. MEGBESZÉLÉS

A patkányokat széleskörűen használják a plasztikai és rekonstruktív sebészeti kutatások során. Az ilyen kísérletek természetüknél fogva szükségesek a sebészeti patofiziológiai kutatásokban, ugyanakkor a gyakorlati alkalmazhatóságuk sok esetben limitált. A patkányoknál használt adipocutan lágyéklebeny egy kifejezetten egyszerű modell, mely hasonlóságokat és különbségeket is mutat az emberi vaszkulaturával. Patkányoknál az inguinalis angioszóma vérellátását az a. epigastrica inferior superficialis adja. Ezek az erek az a. thoracoepigastrica és az a. epigastrica inferior ágaival több perforáns ág révén anasztomizálnak. Az inguinalis lebeny képzése során ezen anasztomózisok átvágásra kerülnek, így a lágyéklebeny kizárólag az a. epigastrica inferior superficialis-ból kapja a vérellátását.

A lebenyek túlélése az adekvát vérellátáson alapszik, amely megfelelő oxigenizációt és tápanyagellátást biztosít számukra. Az oxigén- és tápanyagellátás zavara ischaemiához és sejtthálához vezet. Az ischaemia időszaka alatt számos változás figyelhető meg, mely befolyásolja a lebenyeket, úgymint endothelialis károsodás, kapilláris trombózis, több egyéb tényező mellett. Utóbbiak mindegyike hatással van a sebgyógyulásra és a lebeny vitalitására is. A reperfusio folyamata során a celluláris hypoxiás károsodás mellett a gyulladáso reakciók és a szabadgyök képződés további szövetkárosodáshoz vezet, mely során haemorheológiai eltérések figyelhetők meg sok más eltérés mellett. A micro-rheológiai változások további mikrokeringési zavarokhoz vezetnek, melyek ismételten a szöveti keringés romlását eredményezik.

A sebgyógyulás első 4 hetében a kollagenogenesis gyors, melynek eredményeképpen a seb szakítószilárdsága gyorsan erősödik. Az ezt követő két fázis az érés és a remodelláció a sebgyógyulás során. A mikrokeringésnek fontos szerep jut a lebeny vitalitását tekintve a sebgyógyulás folyamatában. Ahogy Kusza és Siemionow cikkükben megemlíti „...a különböző típusú szövetek eltérő mikrokeringési válaszána ismerete fel kell, hogy keltse a mikrosebészek és egyéb szakemberek érdeklődését az ischaemia és reperfusió károsodás témakörében annak érdekében, hogy javuljanak az eredmények a nagy terhelésnek és kedvezőtlen perioperatív tényezőknek kitett páciensek esetében”.

Számos tényező vezethet a lebenyek károsodásához, ezek közül a leggyakoribb az erek műtét során elszenvedett károsodása. A lebenyek vitalitásának ellenőrzésére több vizsgálómódszer áll rendelkezésre. Ide sorolható a fluoreszcens festék használata Wood

lámpával, szöveti pH és transcutan oxigénnyomás mérés, felületi hőmérséklet mérés, Doppler Ultrahang vagy a Lézer Doppler Flowmetria (monitor, scan, confocalis laser scan). A transit-idő flowmetria, mely egy nem doppler elven működő UH technológia, nagy segédletet nyújthat a sebész számára döntéshozatalban a microvascularis szabadlebenyes beavatkozások során, mivel a rendszer képes kimutatni a nagyobb áramlást a concomittans vénákban, illetve azonosítani az anasztomózis elégtelenségét. Továbbá a Lézer Doppler Flowmetria, Intravitális Videomikroszkópia technikák a kontrasztos ultrahang technikák mellett hasznos információt nyújthatnak a lebenyek vérkeringéséről. A Lézer Doppler Flowmetria a kapilláris áramlást jellemzi azáltal, hogy a vörösvérsejtekről visszaverődő lézerefény elmozdulását méri. Számos klinikai tanulmány igazolta a hasznosságát a lebenyes rekonstrukciók során, mely által megnyílik a korai beavatkozás lehetősége a klinikus számára, hogy a lebeny esetleges elhalását megelőzze. Ebből a szempontból az intra- és postoperatív monitorizálásnak kiemelkedő jelentősége van. Korábbi állatkísérletes modellek igazolták, hogy ez a módszer alkalmas a postoperatív komplikációk követésére.

A bőr igen jól tolerálja az ischaemiás periódust. Kísérletünk során egy rövid, 1 órás ischaemiás periódust választottunk. Más tanulmányok lényegesen hosszabb, 4-8 órán keresztül tartó ischaemiás időt alkalmaztak. Fontos kiemelni, hogy a különböző szövetek ischaemia-toleranciája eltérő. Az általunk alkalmazott modellben a lágýklebenyt ellátó ér endothel rétege rövidebb toleranciával bír az ischaemiával szemben. Kísérletünk során eltéréseket találtunk a Lézer Doppler adatok elemzése során, mely arra utal, hogy még egy 1 órás ischaemia is befolyásolja (rontja) a lebeny vérellátását.

A szövettani vizsgálat során talált eltérések (hypertrophizált inguinalis emlőmirigyek a subcutan rétegben) rámutatnak az időfaktor fontosságára: az ischaemiás periódus lerövidítése létfontosságú a postoperatív komplikációk esélyének csökkentése szempontjából. Kísérletünk során hím patkányokat használtunk. A nőstény patkányokkal szemben a hím patkányok emlőmirigyei dominánsan lobuloalveolarisak és alacsonyabb ductus-számmal, de nagyobb számú alveolussal rendelkeznek, amelyeknél gyakoribb a ductalis és alveolaris epithelialis apoptosis. Ismert, hogy a sejtekben és a szövetekben a hypoxia hatásai a hypoxia-indukálta faktor 1α (HIF- 1α) által szabályozottak. Normoxia esetében ezen heterodimér transzkripciós faktor alfa egysége csökkent számban van jelen, míg a hypoxia stabilizálja a HIF- 1α -t. Az emlőmirigyekben a HIF- 1α stimulálja a glükóz felvételt a GLUT1 mechanizmuson keresztül, fokozza az anaerob glikolízist, az angiogenezist a VEGF fokozott expressziója által, továbbá fokozza az emlőmirigy fejlődését és a laktációt is.

Számos gyógyszer került kísérletes körülmények között kipróbálásra a lebe-
nyschaemia megelőzésére. Park és mtsai közleményükben arról írnak, hogy a preoperatív
alkalmazott Botulinum toxin emelheti a lebe-ny érnélben a véráramlást (áramlási
sebességet), ezáltal csökkentheti az ér eredetű lebe-nykárosodást. Sen és mtsai.
omeprazol használtak kísérletük során és azt találták, hogy a lebe-nyműtétek során a gastrin
koncentrációjának emelkedése javította a lebe-nyek túlélését. Wallmichrath és mtsai.
bemutatták, hogy a heparin és rekombináns szöveti plazminogén aktivátor védő hatást fejthet
ki a lebe-ny keringési elégtelenséggel szemben a patkányoknál végzett adipocutan
szabadlebe-nyek esetében. Uslu kísérletes modellben a dipiridamol antiaggregatio által
okozott előnyös hatását igazolta a lebe-ny túlélés szempontjából, Ersan és mtsai.
a taurin antioxidáns hatása általi előnyös hatásról számoltak be, mely csökkentette a fellépő lebe-ny
necrosist.

Farmakológiai intervenció mellett számos további technika áll(hat) a sebész
rendelkezésére ischaemia-prekondicionálás terén, amellyel számos tanulmány foglalkozik. A
prekondicionálási eljárások lényege, hogy a lebe-nyt ellátó érnélben művileg, esetenként
repetitíve előidézett ischaemia növeli az I/R károsodásokkal szembeni toleranciát a szövetek
alkalmazkodása által. Ez utóbbi háttérben számos mechanizmus állhat (pl. csökkenő
proinflammatorikus cytokin koncentráció, vasodilatációt okozó ágensek emelkedő száma,
endothel remodeláció). Az ischaemiás idő minimalizálása, a megfelelő műtéttechnika
alkalmazása mellett ezen additív prekondicionálási eljárások és gyógyszeres kezelések tovább
csökkenthetik a lebe-nyes eljárások szövődmény arányát.

Patkánymodellünkben a mikrokeringési és felületi hőmérsékleti mérések mellett
micro-rheológiai paramétereket is vizsgáltunk. Azt feltételeztük, hogy a micro-rheológiai
vizsgálatok informatívak lehetnek a tekintetben, hogy jobban megértsük a lebe-nyek
hypoperfuziójának és/vagy ischaemia-reperfuziós károsodásának patofiziológiáját.
Nagyszámú lebe-nyes patkánymodell létezik, amelyek alkalmasak gyakorlati és kísérleti
célokra egyaránt a lebe-nyek vizsgálatára. Kísérletünkben az adipocutan lágyéklebe-nyt
vizsgáltuk meg, amely vérellátását az a. és v. epigastrica inferior superficialisból kapja.

Az akut fázis reakció haematológiai és haemorheológiai jelei megfigyelhetőek voltak
mindkét csoportban, de dinamikájuk és mértékük eltérő volt. Az anesztézia, immobilizáció, a
szövet preparálása és a sebgyógyulás mindegyike hozzájárul az akut fázis reakció
kialakulásához. A gyulladáshozos reakciók tekintetében fontos megjegyezni, hogy mindegyik
állat esetében a kb. 21-22 cm összhosszúságú sebvonal még a gyógyulás fázisában volt (két
ellipszoid lebe-ny, kb. 10,8 cm körfogattal oldalanként). Az ischaemia által érintett lebe-nyek

nagyobb gyulladással reagáló reakciót váltottak ki, mely a haematologiai és micro-rheologiai változásokban is megmutatkozott; aktivált leukocyták, akut fázis reakció, amelyek ismertén befolyásolják a vörösvérsejt deformabilitást, továbbá a vörösvérsejt aggregációt.

Egy korábbi kutyákon végzett tanulmányban kimutatták, hogy a latissimus dorsi myocutan lebeny esetében alkalmazott 1 órás ischaemia szignifikánsan emelte a vörösvérsejt aggregációt és a haematokrit értéket az első órában. Ezek az elváltozások nem voltak megfigyelhetőek a lebeny-ischaemia nélküli állatokból vett vérmintákban. Az eredmények megmutatták továbbá, hogy a TBARS és a GSH koncentráció változása jól korrelált az oxidatív károsodással a reperfusio folyamata során (előbbieket lipidperoxidáció degradációs termékek, utóbbi a sejtekben fellelhető egyik legfontosabb alacsony molekulású antioxidáns). A 7. postoperatív napra az I/R lebenyek makroszkóposan induráltak voltak, szemben a kontroll állatok intakt lebenyeivel.

Klárík és mtsai. patkánymodellükben vizsgálták a haemorheologiai (vörösvérsejt deformabilitás és aggregatio) és mikrokeringési (Lézer Doppler Flowmetria) változásokat kétórás ischaemiát követően latissimus dorsi – cutan maximus musculocutan lebeny esetében. Azt találták egyéb nem specifikus akut fázis által kiváltott micro-rheologiai változások mellett, hogy az I/R a mikrokeringési paraméterek romlását eredményezte. A mikrokeringési paraméterek követése létfontosságúnak bizonyult a postoperatív komplikációk, úgymint a trombózis és következményes lebenyelhalás előjelzésében.

Ezen kutatási eredmények jól mutatják, hogy az ischaemia-reperfusio másként hat a különböző típusú lebenyekre. Ez elsősorban a szövetek eltérő ischaemiával szembeni toleranciájával magyarázható. A micro-rheologiai paraméterek szintén hasznos információt nyújtanak a lebenyes kísérletek során. Az intraoperatív alkalmazott Lézer Doppler mérés informatív lehet a postoperatív komplikációk előjelzésében, úgymint a trombózis, vagy necrosis.

Kísérletünk során lebeny elégtelenséggel is szembesültünk. A 13. számú kísérleti állat esetében bekövetkezett egyoldali necrosis háttérében trombózis állhatott, mely a korai postoperatív időszakban a lebeny érnélének torziója által következhetett be. Érdekes módon ezen állat a kontroll csoporthoz tartozott, ahol nem alkalmaztunk mikrovaszkuláris klippet, nem volt indukált ischaemia. Azt feltételezzük, hogy a repozíció során következhetett be az érnél torziója, vagy megtöretése. A laborparaméterek a makroszkóposan megfigyelhető folyamattal (gyulladás, marginális, majd kiterjedt necrosis, lelöködő nekrotikus szövet, illetve granuláció) párhuzamosan változtak. Ezen eredmények a gyulladással reagáló reakciókkal magyarázhatóak, amely során a necrosis feloldódása volt látható a megfigyelési időszak alatt.

A lebenyes szövetpótlás a plasztikai rekonstruktív sebészetben az egyik leggyakrabban végzett beavatkozás. A lebenyek életképességét számos tényező határozza meg. Tekintettel arra, hogy a lebenyképzés során, annak természetéből fakadóan romlik a mobilizált szövetek keringése, a sebésznek minden tőle telhetőt meg kell tennie, hogy optimális lebeny túlélést és sebgyógyulást érjen el. Ehhez megfelelő műtéti tervezésre, precíz műtéti technikára, és adekvát posztoperatív ellátásra van szükség.

A lebenyképzés során fontos szerepe van a kellő anatómiai ismereteknek. Az angioszómák és perforoszómák figyelembevételével történő lebeny-tervezés a sikeres rekonstrukció alapfeltétele az érnyeles lebenyek esetében. Ismert, hogy a lebenyek különböző területein a perfúzió nagy variabilitást mutat. Kísérletünk során a mikrokeringést a lebenyek különböző területein (proximalis, centrális, distalis) mértük. Az ellátó érhez mért távolság függvényében eltérő BFU értékeket kaptunk. Ez jól mutatja, hogy a megfelelő lebeny konfiguráció (hossz-szélességi arány, érnnyéltől mért távolság az anatómiai lokalizáció függvényében) és vérellátás kialakításának a lebeny-tervezésben és ezáltal a műtét sikerességében nagy szerepe van.

A lebenyek posztoperatív követésére alkalmas számos vizsgálómódszer került ismertetésre az előbbieken. A sokféle vizsgálómódszer ellenére továbbra sincs olyan gold standard eljárás, mely teljes biztonsággal tudna információt adni a lebeny vitalitásáról.

Tushar és munkatársai kísérletük során arra a következtetésre jutottak, hogy intraoperatív végzett fluoreszcens festék használatával a lebeny vitalitása pontosabban meghatározható, mintha csak a vitalitás klinikai jeleit vizsgálnánk (pozitív prediktív érték 99.03%, szemben a klinikum alapján meghatározott vitalitás 95.7% értékével). Ez jól mutatja, hogy az additív vizsgálómódszereknek nagy haszna lehet a klinikumban.

A műszeres vizsgálómódszerek mellett – ahogy vizsgálatunkból is látszik – vérvételből meghatározott paraméterek is fontos információt nyújthatnak a lebenyek vitalitásáról, az ischaemia folyamatáról. Nemcsak micro-rheologiai paraméterek, hanem más biomarkerek is jelezhetnek lebenyekkel kapcsolatos szövödményeket. Livaoglu és mtsai. nyulakon végzett kutatásuk során az ischaemia és ischaemia által módosult albumin (IMA) szintje közötti összefüggést vizsgálták meg izomlebenyek esetében. Egyenes hasizom lebenyt vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy az IMA, mint biokémiai marker követése alkalmas az ischaemiás folyamatok jelzésére izomlebeny alkalmazása során. Az IMA egyéb más ischaemiás betegségek során is jól követhető biomarker.

Függetlenül a vizsgálómódszerek működési mechanizmusától elmondható, hogy kiegészítő információval szolgálnak a sebész számára a lebeny életképességét illetően. A

módszer megválasztásánál számos tényezőt kell a sebésznek számításba venni: költség, mérési pontosság, az adatok interpretálási lehetősége, a mérés invazivitása, továbbá a mérés műszer és személyi igénye. Kísérleteink során Lézer Doppler Flowmetriát, mikro-makrokeringési és rheologiai paramétereket is vizsgáltunk. Úgy találtuk, hogy a LD eszköz intra- és postoperatív vitalitás meghatározásra is alkalmas, és előjelezheti a komplikációkat esetlegesen még a klinikai tünetek jelentkezése előtt. Az eszköz kifejezett előnye, hogy működtetése nem igényli fogyóeszköz használatát, így egyszeri beruházást követően számottevő fenntartási költségek nélkül használható. Megfelelően felhelyezett szenzor esetében szakképzett ápoló személyzetre bízható a kezelése és az adatok rögzítése, így a keringési zavarok a hospitalizált betegek esetében időben felismerhetőek. A micro-rheologiai paraméterek ismertén jól jelzik a lokális és globális keringési zavarokat. Mindezek miatt fontos kiegészítő információt nyújthatnak a sebész számára a rekonstrukciós sebészetben. A fent ismertetett módszerek klinikai gyakorlatba való bevezetésének igénye indokolja az állatkísérletek folytatását.

6. Főbb eredmények és következtetések

1. Egy könnyen kivitelezhető, jól reprodukálható bilaterális adipocutan érnyeles lebeny modellt alakítottunk ki patkányokon, amely jól modellezi a klinikumban is alkalmazott érnyeles lebenyek viselkedését, alkalmas az ischaemia-reperfusio okozta károsodások és a sebgyógyulást befolyásoló más tényezők követéses vizsgálatára.
2. A Lézer Doppler szöveti áramlásmérővel monitorozott mikrokeringési paraméterek már 1 órás ischaemiás periódust követő reperfusio során is jelezték a szöveti perfusio romlását. A sebgyógyulás különbségei a kontroll és az ischaemia-reperfusio csoportok között jól követhetőek voltak a lokális bőrhőmérséklet és a microcirculációs paraméterek vizsgálatával. A Laser Doppler szöveti áramlásmérés érzékenyen jelezte a lebeny necrosis kialakulásának kezdetét is a szövődményes esetben.
3. A korai postoperatív időszakban a lebenyek sebgyógyulása során a micro-rheológiai paraméterek változást mutattak (romló vörösvérsejt deformabilitás, fokozódó vörösvérsejt aggregatio). Az ischaemia-reperfusio a 3. és 5. postoperatív napra erősítette fel ezeket az eltéréseket. A szövődményes lebeny necrosis esetében e paraméterek romlása kifejezettebb mértékű volt.
4. A szövettani vizsgálatok során az I/R csoport egyes eseteiben hypertrophizált subcutan emlőmirigyeket találtunk, feltételezhetően a hypoxia indukálta transzkripció faktorok hatása által. Ezen elváltozások is felhívják a figyelmet az ischaemiás idő minimalizálásának jelentőségére.

7. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények hitelesített listája



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/348/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Molnár Ábel

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Magyar, Z., **Molnár, Á.**, Nachmias, B. D., Mann, D., Somogyi, V., Mester, A., Pető, K., Németh, N.:
Impact of groin flap ischemia-reperfusion on red blood cell micro-rheological parameters in a follow-up study on rats.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 79 (2), 245-255, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-170277>
IF: 2.411
2. **Molnár, Á.**, Magyar, Z., Nachmias, B. D., Mann, D., Szabó, B., Tóth, L., Németh, N.: Effect of short-term ischemia on microcirculation and wound healing of adipocutaneous flaps in the rat.
Acta Cir. Bras. 34 (12), 1-9, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-865020190120000003>
IF: 0.974

További közlemények

3. Berhész, M., Németh, N., Pető, K., Deák, Á., Hajdu, E., **Molnár, Á.**, Árkosy, P., Szabó, J., Fülecsi, B.: Hemodynamic consequences of intravenously given E. coli suspension: observations in a fulminant sepsis model in pigs, a descriptive case-control study.
Eur. J. Med. Res. 24 (1), 1-6, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s40001-019-0372-y>
IF: 1.826
4. Molnár, L., Németh, N., Berhész, M., Hajdu, E., Papp, L., **Molnár, Á.**, Szabó, J., Deák, Á., Fülecsi, B.: Assessment of cerebral circulation in a porcine model of intravenously given E. coli induced fulminant sepsis.
BMC Anesthesiol. 17 (98), 1-9, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12871-017-0389-3DOI>
IF: 1.788





5. Németh, N., Berhész, M., Kiss, F., Hajdu, E., Deák, Á., **Molnár, Á.**, Szabó, J., Fülesdi, B.: Early hemorheological changes in a porcine model of intravenously given E. coli induced fulminant sepsis.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 61 (3), 479-496, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-141914>
IF: 1.815
6. Kiss, F., Molnár, L., Hajdu, E., Deák, Á., **Molnár, Á.**, Berhész, M., Szabó, J., Németh, N., Fülesdi, B.: Skin microcirculatory changes reflect early the circulatory deterioration in a fulminant sepsis model in the pig.
Acta Cir. Bras. 30 (7), 470-477, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-865020150070000004>
IF: 0.58

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,394

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
3,385**

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, 2023.07.12.



8. Köszönetnyilvánítás

Kiemelt köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Németh Norbert Professzor Úrnak, aki a kezdetek óta szárnyai alá vett és támogatta a tudományos életben történő előre haladásomat. Az első pillanatban látta ambícióimat és rögtön teljes támogatását élvezhettem, amiért rendkívül hálás vagyok.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Debreceni Egyetem Sebészeti Műtéttani Tanszék valamennyi munkatársának, akik befogadtak és már hallgató korom óta Kollégájként kezeltek. Nélkülük nem jöhetett volna létre a disszertációm.

A tanszéki munkatársak közül külön köszönetemet szeretném kifejezni a jelen kutatásban résztvevő kollégáknak: Dr. Magyar Zsuzsannának, Dr. Somogyi Viktóriának, Dr. Deák Ádámnak, továbbá Gödény Györgyné műtői asszisztensnek és Füzesi Róbert technikai munkatársnak.

Köszönöm az együttműködést azon kollégáimnak is, akik a kutatások során a társintézmények oldaláról csatlakoztak a közös munkához (DE ÁOK Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Tanszék, Pathológiai Intézet, Élettani Intézet).

Köszönetemet szeretném kifejezni a Családomnak is karrierem támogatásában.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom munkahelyeimnek, a Bethesda Gyermekkorháznak, illetve a DE KK Bőrgyógyászati Klinikájának, amiért támogatták a tudományos irányban történő tevékenységeimet.