

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**ÚJ MŰVI PORTO-CAVALIS SHUNT MODELL
MIKROSEBÉSZETI MÓDSZEREKKEL VALÓ KIALAKÍTÁSA
ÉS MICROCIRCULATIÓS, MICRO-RHEOLOGIAI VIZSGÁLATAI**

Dr. Klárik Zoltán

Témavezető:

Dr. Németh Norbert



DEBRECENI EGYETEM

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

2015

Új művi porto-cavalis shunt model mikrosebészeti módszerekkel való kialakítása és microcirculatiós, micro-rheologiai vizsgálatai

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

Írta: Dr. Klárik Zoltán 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: Dr. Bereczky Zsuzsanna, PhD
Dr. Ferencz Andrea, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Szemészeti Tanszék
könyvtára
2015. június 8., 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Bogár Lajos, az MTA doktora
Dr. Szokoly Miklós, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Bogár Lajos, az MTA doktora
Dr. Bereczky Zsuzsanna, PhD
Dr. Ferencz Andrea, PhD
Dr. Szokoly Miklós, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2015. június 8., 13 óra

1. BEVEZETÉS

A művi porto-cavalis shunt-ök olyan ér-anastomosisok, amelyeket a portalis és a szisztémás vénás keringés között hoznak létre megfelelő indikációk mellett. Ezek a shunt-ök a vena portae keringéséből vezetik el részlegesen vagy teljes mértékben a vért, így csökkentve a portalis hypertensiót és szövődményeinek kialakulását. A shunt típusa szerint teljesen vagy csak részlegesen vezeti el a vért a portalis keringésből és ennek megfelelően szelektív, illetve nem-szelektív megoldásokat különböztethetünk meg.

A portalis hypertensio kezeléséhez napjainkban elsősorban farmakológiai kezelést használnak, de a sikertelen terápia és a portalis hypertensio szövődményei fokozódása esetén (varixok okozta vérzés) endoszkópos szkleroterápiát, valamint transjugularis intrahepaticus porto-szisztémás shunt-öt alkalmaznak. Sürgősségi, életmentő beavatkozások során (pl.: súlyos recurrens oesophagiás és gastric varixok vérzés) a mai napig a sebészi porto-cavalis anastomosisok készítése az elsődleges kezelési módszer, valamint a máj transplantatio recipiens műtét protokolljában a shunt-ök létrehozása az egyik előkészítő lépés.

Állatkísérleti kutatásokban is gyakran alkalmaznak művileg elkészített porto-cavalis shunt-öket különböző laboratóriumi állatokban. A mikrosebészeti technikák térhódításával az ér-anastomosis modellek már egerekben, vagy patkányokban is könnyen kialakíthatóak.

A sebészi biztonság növelése szempontjából a microcirculatio intraoperatív monitorizálása fontos információt adhat az érintett szövetek és szervek perfúziójáról különösen ér-anastomosisok készítése során. A megfelelő szöveti perfúzio biztosításában a micro-rheológiai paraméterek (a vörösvérsejt deformabilitás és vörösvérsejt aggregatio) jelentős szerepet játszanak, ezért változásainak és a microcirculációval való összefüggéseinek együttes vizsgálata hasznos lehet.

A vörösvérsejt-deformabilitása, passzív alakváltozási képessége elengedhetetlen a capillárisokon való áthaladáshoz, valamint a vörösvérsejt aggregatio, a sejtek reverzibilis összekapcsolódása befolyásolhatja az áramlás dinamikáját. Egy esetleges hosszan elnyúló ischaemia hatására a hemodinamikai változások kialakulása miatt akár irreverzibilis károsodás alakulhat ki az érintett szövetben. A kirekesztett régióban pangó vérben számos fizikai és metabolikus változás jöhet létre, amely reperfusiókor az egész szervezetre kifejtheti hatását. A mikrokörnyezeti változások fokozott aggregatiót és csökkent deformabilitás képességet okoznak, amely mikrokeringési zavarokhoz vezet. A vér pH csökkenése rontja a vörösvérsejt aggregatiót és deformabilitást, az alkalikus pH értékeknél a vörösvérsejtek elveszítik bikonkáv alakjukat, csökken a sejttérfogatuk. A vérgáz paraméterekben bekövetkező változások szintén befolyásolják a vér micro-rheologiai tulajdonságait.

Az elmúlt évtizedben, modern haemorheologiai készülékek használatával egyre szélesebb körű adat áll rendelkezésre a micro-rheologiai tulajdonságokról. Bebizonyosodott, hogy a lokális, illetve szisztémás vörösvérsejt deformabilitási és aggregációs változások különböző pathofiziológiai kórfolyamatokban (gyulladás, sepsis, ischaemia-reperfusio, metabolikus változások) nagy jelentőséggel bírnak.

A szakirodalomban azonban számos kérdéskör még tisztázatlan, illetve ellentmondásos. A művi ér-anastomosis kialakítása során bekövetkező szervi microcirculációs változások mértékéről és a műtéttel együtt járó ischaemia-reperfusio hatására bekövetkező haemorheologiai változások microcirculatiót befolyásoló tulajdonságáról kevés adat ismert. Tisztázatlan kérdéskör még, hogy mennyiben tér el a micro-rheologiai paraméterek alapértéke egymástól különböző területekről vett vérmintákban (aorto-porto-cavalis különbség).

Figyelembe véve az előbbieken leírt különbségeket, feltehetjük azt a kérdést, hogy vajon a portalis keringésből nyert vérmintákban milyen haemorheologiai (vörösvérsejt aggregatio és deformabilitás) alapértékeket

találhatunk és ezek milyen mértékben térhetnek el a szisztémás vénás és artériás alapértékektől. Az irodalomban nem található e kérdéskörben adat, azonban klinikai relevanciája jelentős lehet. Nem ismert, hogy porto-cavalis shunt készítése során fellépő ischaemia-reperfusio (az érintett vénák műtéttechnika szerinti leszorítása révén), valamint a shunt jelenléte hogyan modulálhatja a micro-rheologiai különbségeket és ezáltal az érintett szervek microcirculációját.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. A kevésbé ismert aorto-porto-cavalis haemorheologiai különbségek vizsgálata patkányon, különös tekintettel a vörösvérsejt deformabilitásra és a vörösvérsejt aggregációra.
2. Új kísérleti modell kialakítása mikrosebészeti módszerrel egy szelektív porto-cavalis shunt modell létrehozása laboratóriumi patkányban, mely során csak a vena mesenterica rostralist használjuk fel és a vena portae érintetlen marad a vena lienalis ágával együtt.
3. Több szervi (vékonybél, máj és jobb oldali vese) intraoperatív microcirculációs vizsgálatok elemzése a meso-cavalis lokalizációban elkészített end-to-side anastomosis elkészítése előtt és után.
4. A shunt-ök elkészítése után postoperatív követéses vizsgálat lehetőségének előkísérleteként az 1. és a 14. postoperatív napon haematologiai és haemorheologiai paraméterek elemzése.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteinket az 1998. évi XXVIII., „Az állatok védelméről és kíméletéről” alkotott törvény, illetve az Európai Unió 2010. évi EEC 63 direktíva előírásait betartva végeztük, a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság (DE MÁB) által 37/2007. és 6/2008. számon nyilvántartásba vett, a Hajdú-Bihar Megyei Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrzési Állomás által kiadott hatósági engedéllyel.

3.1. Aorto-porto-cavalis haemorheologiai különbségek vizsgálata

3.1.1. Kísérleti állatok és vérvételi protokoll

A kísérletben 13 (8 hím [$381,5 \pm 13,4$ g] és 5 nőstény [$292,2 \pm 20,9$ g]) patkányt (Janvier Co., Franciaország) használtunk. Általános anaesthesiában (Na-thiopentál 60 mg/kg, i.p. Thiopenthal, Biochemie GmbH, Ausztria) median laparotómiát végeztünk és óvatos, atraumatikus preparálási technika alkalmazásával az aorta abdominalis és vena cava caudalis infrarenalis szakaszát mobilizáltuk és izoláltuk.

A vérvételekhez 26 G-s tűhöz csatlakozott anticoagulanst (Na-EDTA, 1,5 mg/ml) tartalmazó fecskendőt használtunk. A vérminták vétele a következő sorrendnek megfelelően történt: vena portae, vena cava caudalis, aorta abdominalis. Minden érből 0,6-0,8 ml mennyiségű vért vettünk. A minták a lehető leggyorsabban a tanszék Haemorheologiai Kutatólaboratóriumába lettek szállítva a mérések elvégzése céljából (teljes *in vitro* idő: <30 perc volt).

3.1.2. Laboratóriumi vizsgálatok

3.1.2.1. Laktát, vér pH és vérgáz analízis

Vérgázanalizátor automata (ABL555 Radiometer Copenhagen, Dánia) által meghatározásra került a laktát koncentráció (mmol/l), a vér pH, valamint a $p\text{CO}_2$, és $p\text{O}_2$ értékek [Hgmm]. A vérmintát zárt rendszerben közvetlenül a készülékbe fecskendeztük, anélkül hogy közvetlenül érintkezett volna levegővel.

3.1.2.2. Haematologiai paraméterek

Az általános haematologiai paramétereket Sysmex F-800 haematologiai automatával (TOA Medical Electronics Corp., Japán) határoztuk meg.

3.1.2.3. Haemorheologiai paraméterek vizsgálata

Vörösvérsejt deformabilitás

LoRRca MaxSis Osmoscan (Mechatronics BV, Hollandia) készülékkel kerültek meghatározásra a vörösvérsejtek elongatiós index (EI) értékei a nyírófeszültség (SS) [Pa] függvényében.

Az EI-SS görbék összehasonlíthatóságához a Lineweaver–Burk analízist használtuk, amellyel a kalkulált maximális elongatiós index (EI max) értéket és a maximális elongatiós index feléhez tartozó nyírófeszültség (SS_{1/2} [Pa]) értékét határoztuk meg, a következő egyenlettel: $1/EI = SS_{1/2}/EI_{max} \times 1/SS + 1/EI_{max}$. A vörösvérsejt deformabilitás romlásával az EI max érték csökken, valamint az SS_{1/2} érték növekszik.

Osmoscan funkció: 250 µl vérminta 5 ml PVP oldattal kerül elegyítésre. A készülék állandó 30 Pa nyírófeszültséget generál a mintára, folyamatosan rögzítve az elongatiós indexet, miközben a médium ozmolalitása fokozatosan változik a minta, valamint 0 illetve 500 mOsm/lg ozmolalitású PVP oldat változó arányú, folyamatos adagolásával.

A készülék által mért és kalkulált paraméterek: maximális elongatiós index (EI max – megjegyzés: azonos a Lineweaver–Burk analízissel meghatározott EI_{max} értékkel), minimális elongatiós index (EI min) a legalacsonyabb ozmolalitás, ahol a vörösvérsejtek még nem rupturálódnak, valamint az EI max feléhez tartozó értékek a hyperosmolaris tartományban (EI hyper), az ezekhez tartozó ozmolalitás értékek (O EI max, O EI min, O EI hyper [mOsm/kg]) és a görbe alatti terület (Area).

Vörösvérsejt aggregatio

A vörösvérsejtek aggregatio meghatározása a Myrenne MA-1 erythrocyta aggregométer (Myrenne GmbH, Németország) készülékkel történt, amely fénytranszmissziós elven működik Schmid–Schönbein által leírt módszer alapján. A Myrenne MA-1 aggregométerrel történő mérésekhez 20 µl alvadásgátolt vérminta szükséges.

A vérminták 600 s^{-1} sebesség-gradiensén történő disaggregatióját követően a sebesség-gradiens hirtelen nullára (M mód) vagy 3 s^{-1} -re (M1 mód) csökken. A vérminta fénytranszmissziójának megváltozása alapján (disaggregatio: alacsony fénytranszmisszió, aggregatio: magasabb fénytranszmisszió), a készülék aggregációs indexet számít az aggregatio folyamat 5., illetve 10. másodpercében. Fokozott vörösvérsejt aggregatio esetén az indexek paraméterek (M 5s, M1 5s, M 10s, M1 10s) nőnek.

3.1.3. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzést SigmaStat (Systat Software Inc., San Jose, California, USA) szoftverrel végeztük.

Az aorta abdominalis, vena cava caudalis és vena portae vérminták összehasonlításához páros t-próbát vagy Wilcoxon-tesztet, illetve Student's t-próbát vagy Mann–Whitney RS tesztet végeztünk az adateloszlás normalitása alapján. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.

3.2. End-to-side porto-cavalis shunt-ök morfológiai és intraoperatív mikrokeringési vizsgálatai

3.2.1. Kísérleti állatok, anaesthesia

A műtéteket Sprague-Dawley patkányokon végeztük, általános anaesthesiában (Na-thiopentál 60 mg/kg i.p., Thiopenthal, Biochemie GmbH, Ausztria). Intraoperatív mértük a rectalis hőmérsékletet (SEN-06-RTH1, Experimetria Kft. Magyarország). A mikrosebészeti beavatkozásokhoz Leica

Wild M650 operáló mikroszkópot használtunk. A műtétek alatt video- és fotódokumentációt készítettünk.

3.2.2. Műtéti technika

Előkísérletes tanulmányként három állaton (300-350 g, hím) anatómiai vizsgálatokat végeztünk, mely során feltártuk és mobilizáltuk a portalis rendszer fő ágait és a vena cava caudalis suprarenalis szakaszát, valamint elkészítettük a Lee és Fisher által leírt modellt. Az end-to-side anastomosis kialakítása során törekedtünk felmérni a feszülésmentesség műtétechnikai feltételeit.

Tíz állaton ($340,9 \pm 25,52$ g, hím) mikrosebészeti módszerekkel elkészítettünk egy szelektív porto-cavalis shunt modellt, ahol a vena mesenterica rostralist használtuk fel az end-to-side anastomosis elkészítéséhez úgy, hogy a vena portae, illetve a vena gastrolienalis ága érintetlen maradt.

Median laparotomiát és a belek anteponálását követően, a v. portae-t és az ágait kipreparáltuk. A v. cava caudalist a két v. renalis között szintén mobilizáltuk. Mikrosebészeti csipeszekkel a v. mesenterica rostralist izoláltuk és elválasztottuk a v. colica ágaitól egészen a v. gastrosplenica beszájadásáig. Szükség esetén a v. colica mediát, illetve a v. pancreaticoduodenalis inferiort 8/0-s sodrott selyemfonállal lekötöttük és átvágtuk.

A v. portae kettéválásánál a v. mesenterica rostralis proximális részét lekötöttük. Atraumatikus klippeket helyeztünk fel a distális v. mesenterica rostralisra, illetve a v. cava caudalisra distálisan és proximálisan. Az átvágott vena mesentericát fiziológiás sóoldatban hígított Na-heparinos (10%) oldattal átmostuk és a vénát feszülésmentesen a v. cava felé pozicionáltuk.

A v. cava caudalis elülső falán elliptikus venotomiát végeztünk, melynek hossza megegyezett a v. mesenterica maximális átmérőjével. A venotomia helyét igyekeztünk minél laterálisabban végezni a v. cava-n. Először az anastomosis hátsó fala került megvarrásra tova futó varratsorral 10/0 poliamid monofil varróanyaggal, majd az elülső falat készítettük el egyszerű csomós

öltésekkel (6-7 db) ugyanazzal a varróanyaggal. A klippek felengedését követően, az anastomosis átjárhatóságát teszteltük (Acland-teszt), és ha szükséges volt, a kisebb vérzéseket tamponáltuk.

Az intraoperatív vizsgálatokat (3.2.3, 3.2.4. fejezetek) követően a beleket visszahelyeztük a hasüregbe, majd a hasfalat két rétegben zártuk.

3.2.3. Morphologiai elemzés

Az operáló mikroszkóphoz csatlakoztatott kamera segítségével videofelvételt készítettünk, majd off-line elemeztük az erek geometriáját: a v. cava caudalis, és a v. mesenterica rostralis külső átmérőjét, valamint az anastomosis elkészítése után a beszádadási szög és az anastomosis alatt és felett mért érátmérőket. A képelemzést Adobe Photoshop CS5 software segítségével végeztük. Az elemzés során, a képen adott volt 1 mm-es távolsághoz tartozó pixelszám (a micro-ér klipp festett barázdái közti távolság 0,5 mm) és így a két fal közti távolság pixelszáma alapján számoltuk ki a metrikus értéket.

3.2.4. Intraoperatív microcirculációs vizsgálat

Laser Doppler szöveti áramlásmérőt (LD-1 Laser Doppler Flowmeter, Experimetria Kft., Magyarország, laser hullám hossza = 780 nm $\pm$ 10 nm, energiája a mérőfej végénél = 0,5-1,0 mW, laser Doppler signal = 10 Hz -19 kHz) használtunk, amelynek a „standard pencil” mérőfejét (MNP100XP, Oxford Optronix Kft. UK) a máj középső lebenyének elülső felszínére, egy jejunum kacs antimesenteralis szélére, majd a jobb vese elülső-középső felszínére helyeztük. A mérőfej a készülékhez tartozó állványhoz volt rögzítve, amely fixen tartotta az adott mérési ponton. A légzés, illetve perisztaltika okozta artefaktumok elkerülése végett a „pencil” mérőfejet kicsit a felszínhez érintettük, kerülve a jelentősebb impressziót.

A jel stabilizációját követően a BFU értékeket 20 másodpercen keresztül regisztráltuk, amelyet a számítógéppel később off-line analizáltunk. Az összehasonlításhoz e mérési szakaszok BFU értékeinek átlagát vettük.

A laser Doppleres mérések a shunt készítése előtt, röviddel a klippek felhelyezése után, majd a klippek levétele előtt és után (reperfusio 0. perc), valamint a reperfusio 30. percében történtek mindhárom szerv vonatkozásában.

3.2.5. Laboratóriumi vizsgálatok

A kísérletsorozat utolsó két állatában külön-külön az 1. és a 14. postoperatív napon is végeztünk további vizsgálatokat. Ezen állatok a műtétet követően 5 ml 0,9%-os NaCl oldatot kaptak (s.c.), valamint Flunixin (20 mg/kg, s.c.) postoperatív fájdalomcsillapításra.

Altatásban re-laparotomia során vért vettünk a vena cava caudalisból és a 3.1.2.2. és 3.1.2.3. fejezetben leírt módszerek szerint a vérmintából meghatározásra kerültek a micro-rheologiai paraméterek.

3.2.6. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzést ebben a tanulmányban is SigmaStat szoftverrel végeztük. Az intraoperatív laser Doppler áramlásmérő különböző mérési helyről kapott összehasonlító adatait páros t-próbát vagy Wilcoxon-teszttel, illetve Student's t-próbával, vagy Mann–Whitney RS teszttel hasonlítottuk össze. A csoporton belüli változások (mérési hely) analizálására egyirányú ANOVA-tesztet használtunk (Dunn- és Bonferroni-módszer). A szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. Aorto-porto-cavalis haemorheologiai különbségek vizsgálata

4.1.1. Laktát koncentráció, vér pH és vér gáz értékek

A laktát koncentráció kis mértékben, de szignifikánsan magasabb volt az artériás vérmintákban (vs. szisztémás vénás vérminták: $p=0,001$ t-próbával, $p=0,007$ páros t-próbával; és vs. portális vénás vérminták: $p=0,064$ t-próbával és $p=0,073$ páros t-próbával) (12. ábra). A vér pH értéke is nagyobb volt az artériás vérmintákban (vs. szisztémás vénás vérminták: $p=0,002$ t-próba és $p<0,001$ páros t-próbával; vs. portális vénás vérminták $p=0,008$ t-próbával és $p=0,006$ páros t-próbával), amíg a szisztémás vénás és a portális vénás mintákban majdnem azonosak voltak.

A vérgáz paraméterek élettanilag a vártak szerint alakultak. A pO_2 az artériás vérben volt a legmagasabb (vs. szisztémás vénás vérminták: $p<0,001$ t-próbával és páros t-próbával; és vs. portális vénás vérminták: $p<0,001$ t-próbával és páros t-próbával), míg a pCO_2 a szisztémás vénás vérben (vs. szisztémás vénás vérminta: $p=0,028$ t-próbával és $p=0,016$ Wilcoxon-teszt; és vs. portális vénás vérminta: $p=0,063$ t-próbával és $p=0,082$ páros t-próbával).

4.1.2. Haematológiai paraméterek

A fehérvérsejtszám kisebb volt az artériás vérmintákban, mint a szisztémás vénás ($p=0,013$ Mann–Whitney-teszttel és $p<0,001$ páros t-próbával) és portális vénás vérmintákban ($p=0,009$ t-próbával és $p=0,002$ páros t-próbával). Bár nem szignifikánsan, de a vörösvérsejtszám és a haematocrit értékei kismértékben magasabbak voltak a szisztémás és a portális vénás vérmintákban. Az MCV nem különbözött jelentősen, a vénás mintákban kissé alacsonyabb volt. A thrombocyta szám kismértékben nagyobb volt a szisztémás vénás és portális vénás vérmintákban. A többi vizsgált haematológiai paraméter értékeiben nem volt számottevő különbség.

4.1.3 Haemorheologiai paraméterek

4.1.3.1. Vörösvérsejt deformabilitás

Bár a szórás átfedésben volt, a különbségek tisztán megfigyelhetőek voltak az EI-SS görbék között: a legmagasabb EI értékeket a szisztémás vénás vérmintákban, a legalacsonyabbat az artériás vérmintákban mértük, míg a portális vénás értékek a kettő közé estek.

Az EI max értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak az artériás vérmintákban, mint a szisztémás vénás vérmintákban ($p=0,004$ Mann–Whitney-teszttel és $p=0,003$ Wilcoxon-teszttel). Az $SS_{1/2}$ értékek magasabbak voltak az artériás vérmintákban, mint a szisztémás vénás vérmintákban ($p=0,023$ páros t-próba). Az artériás és portális vénás vérminták közti különbség nem volt szignifikáns.

A minimális elongatiós index értékek kismértékben magasabbak voltak a szisztémás és portális vénás vérmintákban. A maximális EI értékek nem különböztek egymástól, csak a vénás vérmintákban volt kissé emelkedett. EI hyper mérsékelten volt nagyobb mindkét vénás mintában az artériás vérmintákhoz képest.

Az ozmolaritás EI max-nál kismértékben ugyan, de magasabb volt a szisztémás vénás vérmintákban, mint az artériásban. A legalacsonyabb a portális vénás mintákban volt, megközelítve a szignifikancia szintet a szisztémás vénás vérmintához hasonlítva ($p=0,072$ páros t-próbával).

4.1.3.2. Vörösvérsejt aggregatio

Az artériás vérben az 5. másodpercben mért vörösvérsejt aggregatio index M paraméterei bizonyultak a legalacsonyabbnak ($1,15 \pm 0,46$) a szisztémás vénás ($1,26 \pm 0,52$) és a portális vénás ($1,21 \pm 0,58$) vérmintákhoz képest, de a különbség nem volt szignifikáns.

Az 5 másodperces M1 paraméter az artériás vérmintákban ($2,03 \pm 0,88$) volt magasabb, mint a szisztémás vérmintában ($1,87 \pm 0,85$). A legmagasabb

M1 értékeket a portalis vénás vérmintákban mértük ($2,95 \pm 2,03$; $p=0,055$ vs. szisztémás vénás, t-próba).

A 10. másodperces M index értékek jelentős különbséget mutattak. A vena cava caudalisból vett mintában volt a legalacsonyabb ($2,27 \pm 0,83$), amely szignifikánsnak bizonyult az artériás ($4,38 \pm 2,51$; $p=0,001$ Mann–Whitney-teszt) és a portalis vénás ($4,71 \pm 1,98$; $p<0,001$ Mann–Whitney-teszt) mintákhoz képest.

A 10. másodperces M1 értékek esetén nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. Az artériás vérmintákban ($5,27 \pm 3,13$) mérsékelten magasabbak voltak a szisztémás vénás értékekhez képest ($5,03 \pm 2,24$), míg a legmagasabb értékeket a portalis vénás mintákban mértük ($6,18 \pm 4,24$).

4.1.4. Megbeszélés és következtetések

Jelen tanulmányunkban célunk volt feltárni a lehetséges aorto-porto-cavalis vörösvérsejt deformabilitás, vörösvérsejt aggregatio különbségeket, a haematologiai paraméterek, a vér pH, laktát koncentráció, a $p\text{CO}_2$ és $p\text{O}_2$ értékek együttes vizsgálatával. Az ozmotikus gradiens ektacytometria (osmoscan) adatok nem mutattak jelentős aorto-porto-cavalis különbséget. Azt azonban meg lehetett figyelni, hogy a vena portae-ből vett vérmintákból szabálytalanabb görbéket kaptunk 350-400 mOsm/kg felett. Tekintettel arra, hogy nagyon kevés adat áll még rendelkezésünkre az új osmoscan funkcióról, eddig nem találtunk magyarázatot erre az eredményre az irodalomban.

A vörösvérsejt aggregatio és a vörösvérsejt deformabilitás számottevő aorto-porto-cavalis különbségeket mutathat patkányban. Ezért a megfelelő kontroll vizsgálatok elengedhetetlenek a kísérletes sebészeti és mikrosebészeti kutatási modellekben (pl. művi porto-cavalis shunt modellek), a lokális és szisztémás haemorheologiai változások pontosabb feltárásához és elemzéséhez. További összehasonlító vizsgálatok szükségesek, hogy jobban megértsük e különbségeknek a hátterét és *in vivo* jelentőségét.

4.2. End-to-side porto-cavalis shunt-ök morphologiai és intraoperatív microcirculációs vizsgálatai

4.2.1. Technikai kivitelezés és morphologiai elemzés

Az elkészített meso-cavalis lokalizációjú end-to-side porto-cavalis anastomosisok (n=10) jól funkcionáltak: az anastomosisnál nagyobb vérzés nem volt tapasztalható, átjárhatóságuk megtartott volt és stenosis sem alakult ki.

A műtéti idő $48,75 \pm 11,26$ perc volt (kirekesztési idő: alkalmanként 15-25 perc). A műtétek leghosszabb szakaszát az erek preparálása és megfelelő pozicionálása tette ki, amely biztosította az erek feszülésmentességét, megelőzve a szakadást az anastomosis készítése során. A beavatkozással együtt járó, szükségszerű érleszorítások végén az érintett szervek színének változása jól megfigyelhető volt. A vékonybélben vénás pangás volt látható, míg a máj halvány vörössé vált.

A vena mesenterica rostralis és a vena cava caudalis anastomosis alatti és feletti szakaszának a külső átmérője tágultabbá vált az anastomosis elkészítését követően a műtét előtti állapotokhoz képest. A vena mesenterica rostralis dilatációja nem volt szignifikáns, de a vena cava caudalis shunt feletti ($p < 0,001$ vs. alap; $p = 0,05$ vs anastomosis) és alatti ($p < 0,001$ vs. alap; $p = 0,004$ vs. anastomosis) szakaszánál mért átmérő jelentősen tágultabb volt.

4.2.2. Intraoperatív mikrokeringési vizsgálatok

A máj ($32,64 \pm 13,68$), jejunum ($35,83 \pm 13,67$) vagy a vese ($36,14 \pm 17,71$) műtét előtti mikrokeringést leíró BFU értékei nem mutattak szignifikáns különbséget. A várakozásoknak megfelelően a klippek felhelyezését követően a vékonybél és a vese BFU értékei csökkentek, amely kifejezettebb volt a jejunum kacson. Leszorítást követően a vékonybél értékei ($17,61 \pm 9,09$) szignifikáns mértékben csökkentek az alapértékhez képest ($p < 0,001$), valamint a máj ($29,13 \pm 14,45$, $p < 0,001$) és a vese ($24,75 \pm 10,86$, $p = 0,001$) értékeihez képest is

alacsonyabbak voltak. A vese BFU értékei is szignifikánsan csökkentek az alapértékhez képest ($p < 0,001$).

A klippek felengedése előtt a BFU csökkenés még inkább kifejezettebbé vált, megtartva a hasonló relációt az érintett szervek értékei között (jejunum: $12,03 \pm 9,19$, $p < 0,001$ vs. alap és máj, $p = 0,036$ vs. vese; máj: $23,26 \pm 13,37$, $p < 0,001$ vs. alap, $p = 0,02$ vs. vese; vese: $16,07 \pm 10,91$, $p < 0,001$ vs. alap).

A klippek felengedését követően a BFU értékek normalizálódni kezdtek, de nem egyforma mértékben. A vese BFU értékei közel teljes mértékben helyreálltak ($31,87 \pm 12,59$), amíg a vékonybél ($21,26 \pm 17,07$, $p < 0,001$ vs. alap, $p < 0,001$ vs. vese) és a máj ($24,43 \pm 12,06$, $p < 0,001$ vs. alap, $p < 0,001$ vs. vese) értékei jóval a vese értékei mögött maradtak.

A vizsgált reperfusio időtartam alatt a vékonybél értékei alacsonyabbak voltak a máj értékeihez képest, bár a p érték nem érte el a szignifikancia szintet, csak megközelítette azt (0. reperfusio: $p = 0,059$; 30' reperfusio: $p = 0,051$).

4.2.3. Haematológiai paraméterek

A vörösvérsejtszám, haemoglobin koncentráció, valamint a haematocrit az első postoperatív napra és a második hét elteltével csökkent a Tanszék Haemorheológiai Kutatólaboratóriumának adatbázisából származó hasonló súlyú, korú és azonos nemű állatok kontroll értékeihez viszonyítva.

4.2.4. Haemorheológiai paraméterek

4.2.4.1. Vörösvérsejt aggregatio

Az aggregatio fokozódott az első postoperatív napra, különösen az aggregációs folyamat 10. másodpercében mért M és M1 index paraméterek esetén. Az 5. és 10. másodpercben mért M értékek alacsonyabbak voltak a kontroll értékekhez képest a 14. postoperatív napon, míg az M1 paraméter a kontrollhoz hasonló volt.

4.2.4.2. Vörösvérsejt deformabilitás

A vörösvérsejtek deformabilitás romlása jól látszott az 1. és 14. napon vizsgált állatok értékeiben. A kontroll értékekhez viszonyítva az EI (3 Pa-nál), az EI_{max} és az SS_{1/2} értékek csak kisebb eltérést mutattak az 1. postoperatív napon, míg a 14. napon már jelentősebb deformabilitás romlás mutatkozott.

4.2.5. Megbeszélés és következtetések

Az ér-anastomosisok biztonságos elkészítésére nagy figyelmet fordító kísérletes sebészeti kutatásoknak komoly klinikai jelentősége van, hiszen a sebészi biztonság növelésének, az erek morfológiai változásainak és az anastomosisok hosszú távú hatékonyságának figyelembe vétele elengedhetetlen a beavatkozások során. Ezeknek a szempontoknak a tanulmányozása szükséges a dekompresszálo porto-cavalis shunt-ök tulajdonságainak jobb megértéséhez is.

Az általunk leírt szelektív porto-cavalis shunt műtéti technikájában különbözik az eddigi ismert meso-cavalis shunt modellektől. A műtéti protokoll tervezésénél legfőbb célunk az volt, hogy egy olyan állapotot alakítsunk ki, ami minimalizálja a képletek közötti feszülést. Ezért további ér (vena duodenalis) lekötésekre volt szükség, hogy a vena mesenterica rostralis teljesen mobilissá váljon és így az erek approximálása kevésbé feszült. A megfelelő mikrosebészeti technika alkalmazásával az erek nem nyúltak meg és az anastomosisok biztonságosan elkészülhettek. A modell előnye a parciális és szelektív tulajdonságában (a vena gastrolialis érintetlen marad), valamint az erek jó hozzáférhetőségében rejlik. Hátránya az időigényesség, ami az erek megfelelő, csavarodásmentes pozicionálásához szükséges. Intraoperatív megfigyelhető volt, hogy a máj, vékonybél és vese felszínén mért mikrokeringési értékek nem egyforma mértékben rendeződtek a műtét végére.

A shunt-ök elkészítését követően kialakuló komplikációk következtében számos májat érintő kórfolyamat tanulmányozható. A májtól elvezetett vena portae rendszer része a szisztémás keringésbe kerül és hepaticus

encephalopathiát okoz a máj morphologiai, illetve funkciójának deprivációja mellett. A postoperatív követéses vizsgálatok során az első napon vett vérmintákban jelentős eltéréseket találtunk a kontroll értékekhez képest, amelyek ugyan a 14. napon bizonyos paraméterek estén (vörösvérsejtszám, Htc, MCV, M1 5 sec és 10 sec aggregatio index, valamint EI 3 Pa-nál) megközelítették a kontroll értékeket, de még mindig rosszabb eredményeket kaptunk. Két hét elteltével az állat viselkedése is megváltozott, kevés táplálékot fogyasztott, amely súlyos súlyvesztéssel járt. Mindezt a shunt jelenlétéből következő metabolikus zavar magyarázhatja, következményes encephalopathiával, amely további vizsgálatokat igényel.

Összefoglalva, egy olyan szelektív porto-cavalis shunt modellt alakítottunk ki laboratóriumi patkányban, ahol a vena mesenterica rostralis és a vena cava caudalis között egy end-to-side anastomosist készítettünk mikrosebészeti technika alkalmazásával, stabil és könnyen kivitelezhető geometriával. A modell alkalmas lehet a hepaticus encephalopathia tanulmányozására amellet, hogy a máj atrophija feltehetően kisebb mértékű lehet a részben megtartott perfusio révén. Az intraoperatív laser Doppleres mérések kiértékelése hasznos információt adott a műtéti technika optimalizálásához (leszorítási idők, feszülésmentesség).

5. FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Először írtuk le patkányokban az aorto-porto-cavalis micro-rheologiai alap különbségeket. A legalacsonyabb elongációs index értékeket az artériás vérmintákban mértük, a legmagasabbat a szisztémás vérmintákban. A portalis vérminták értékei e kettő közé estek. Az aggregációs folyamat 10. másodpercében mért M index paraméter szignifikánsan alacsonyabb volt a szisztémás vénás vérmintákban, mint az artériásban és a portalis mintákban. Az aggregatio 5. másodpercében a legmagasabb M1 index értékeket a portalis vénás vérmintákban mértük. Az adatok a mintavételi hely standardizálásának fontosságára hívhatják fel a figyelmet, és hozzájárulhatnak az ischaemia-reperfusio, illetve különféle arterio-venosus és porto-cavalis shunt-ök készítése révén kialakuló rheologiai eltérések jobb megértéséhez.
2. Kialakítottunk egy új, mikrosebészeti módszerekkel biztonságosan elkészíthető meso-cavalis lokalizációjú end-to-side porto-cavalis shunt modellt patkányon, a shunt-ök morphologiai, intraoperativ microcirculatiós és postoperativ haemorheologiai változások tanulmányozására.
3. Az intraoperativ többszervi microcirculatiós változások vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a vénák (vena cava caudalis és vena mesenterica rostralis) szükségszerű atraumatikus leszorítása különböző mértékű microcirculatiós zavart hoz létre: a legnagyobb mértékű romlást a vékonybél, valamint a máj paraméterei mutatták. A reperfusiót követően az érintett szervek értékei normalizálódtak az alapértékeikhez viszonyítva, de nem egyforma mértékben. Az erek intraoperativ morphologiai változásainak vizsgálata során a vena cava caudalis shunt alatti és feletti szakaszának külső átmérője jelentősen tágultabbá vált. Az intraoperativ laser Doppleres

mérések kiértékelése hasznos információt adhat a műtéti technika további optimalizálásához (leszorítási idők, feszülésmentesség).

4. A postoperatív követéses laboratóriumi vizsgálatok előzetes eredményei szerint a haematologiai és haemorheologiai értékek a porto-cavalis shunt jelenlétében romlottak (1. és 14. postoperatív napok között).

Összegzésképp az eredmények adatokat szolgáltatottak a porto-cavalis shunt-ök intraoperatív morphologiai, microcirculációs és haemorheologiai változásainak jobb megítéléséhez, a shunt-ök átjárhatósága, geometriája és hosszú távú hatékonysága szempontjából.



Nyilvántartási szám: DEENK/53/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Klárik Zoltán
Neptun kód: QGSWF7
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10047803

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

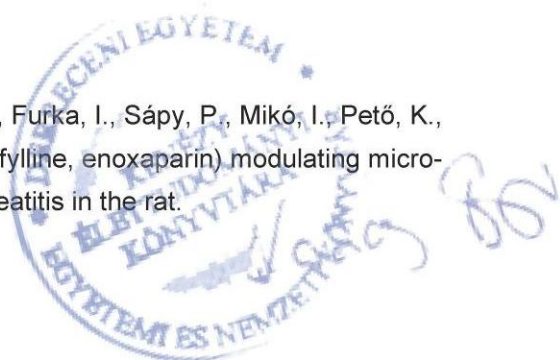
1. **Klárik, Z.**, Tóth, E., Kiss, F., Mikó, I., Furka, I., Németh, N.: A modified microsurgical model for end-to-side selective portacaval shunt in the rat. Intraoperative microcirculatory investigations.
Acta Cir. Bras. 28 (9), 625-631, 2013.
IF:0.57
2. **Klárik, Z.**, Kiss, F., Mikó, I., Németh, N.: Aorto-porto-caval micro-rheological differences of red blood cells in laboratory rats: Further deformability and ektacytometrial osmoscan data.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 53 (3), 217-229, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2012-1531>
IF:2.215





További Közlemények

3. Tóth, C., **Klárík, 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)
4. Tóth, C., Kiss, F., **Klárík, 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)
5. Németh, N., Kiss, F., **Klárík, Z.**, Tóth, E., Mester, A., Furka, I., Mikó, I.: Simultaneous investigation of hemodynamic, microcirculatory and arterio-venous micro-rheological parameters in infrarenal or suparenal aortic cross-clamping model in the rat. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 57 (4), 339-353, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-131724>
IF:2.215 (2013)
6. Németh, N., Kiss, F., **Klárík, Z.**, Pető, K., Ványolos, E., Tóth, L., Furka, I., Mikó, I.: Testicular ischemia-reperfusion may alter micro-rheological parameters in laboratory rats. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 57 (3), 243-253, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-131664>
IF:2.215 (2013)
7. Szentkereszty, Z., Kotán, R., Kiss, F., **Klárík, Z.**, Pósn, J., Furka, I., Sáp, P., Mikó, I., Pető, K., Németh, N.: Effects of various drugs (flunixin, pentoxifylline, enoxaparin) modulating micro-rheological changes in cerulean-induced acute pancreatitis in the rat. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 57 (4), 303-314, 2014.
IF:2.215 (2013)





8. Németh, N., Kiss, F., **Klárík, Z.**, Mikó, I.: Comparative osmotic gradient ektacytometry data on inter-species differences of experimental animals.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 57 (1), 1-8, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2012-1620>
IF:2.215 (2013)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,847

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 2,785

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

Debrecen, 2015.03.03.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Németh Norbert egyetemi docens, Tanszékvezető Úrnak, aki a kezdetektől fogva biztató szavaival támogatta és segítette kutatómunkámat, valamint oktatói tevékenységemet. Köszönöm segítőkész tanácsait és dolgozatom alapos és kritikus átnézését.

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Furka Istvánnak, aki kimagasló szakmai tapasztalatával segítette kutatásomat és személyesen vezetett be a mikrosebészet világának rejtelmeibe.

Külön köszönet illeti Prof. Dr. Mikó Irén egyetemi tanár Úrnőt, akinek a tanszékvezetői tevékenysége alatt csatlakoztam a tanszékhez és így megteremtette számomra a lehetőséget, hogy elkezdhessem a kutatásomat és szakmai támogatásával segítette oktató munkámat.

Köszönet illeti Dr. Pető Katalin adjunktusnőt, aki munkám során szakmai-baráti segítséget nyújtott.

Köszönetet mondok Dr. Tóth Enikő egyetemi gyakornoknak és Dr. Kiss Ferenc tanársegéd Úrnak, akik nagyon sokat segítettek a laboratóriumi mérésekben és a műtétek előkészítésében.

Nem lehet szavakba foglalni azt a rengeteg segítséget, amelyet a Tanszék valamennyi munkatársától kaptam kutatásom során, kiemelve Gödényné Rozáliát, aki türelmességével és kedvességével segítette munkámat.

Nem utolsósorban szeretném megköszönni Szüleimnek, Testvéreimnek, Keresztanyámnak és egész Családomnak, hogy áldozatos szeretetükkel, segítségükkel lehetővé tették a tanulmányaimhoz a nyugodt háttérrel. Valamint hálás köszönettel tartozom Kedvesemnek, aki a mindennapok során kísérte végig PhD éveimet.