

Studiul anatomo-chirurgical al perforazomului

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
Capitolul 1. Lambourile	17
1.1. Defectele țesuturilor moi	17
1.1.1. Definiție	17
1.1.2. Etiologie	17
1.1.3. Repararea defectelor de părți moi	19
1.2. Reconstrucția	19
1.3. Lambourile	21
1.3.1. Lamboul bazat pe circulație aleatorie	22
1.3.2. Lambourile axiale	22
1.3.3. Lambourile musculo-cutanate	22
1.3.4. Lamboul fasciocutanat	23
1.3.5. Lambourile bazate pe perforante	23
1.3.6. Nomenclatura	25
1.3.7. Studiul imagistic al perforantelor	27
1.4. Perforazomul	30
1.4.1. Imagistica preoperatorie a perforazomului	32
Capitolul 2. Utilizarea albastrului de metilen și a proflavinei în clinică și studiile <i>in vitro</i>	37
2.1. Mecanismele și acțiunile biologice ale albastrului de metilen și proflavinei	41
2.1.1. Albastrul de metilen	42
2.1.2. Proflavina	44
2.2. Studii <i>in vitro</i> în care s-a utilizat albastru de metilen și proflavina	46
2.2.1. Utilizarea albastrului de metilen în studii <i>in vitro</i>	46
2.2.2. Utilizarea Proflavinei în studii <i>in vitro</i>	50
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
Capitolul 1. Ipoteza de lucru/obiective	55
1.1. Obiective primare	55
1.2. Obiective secundare	56
Capitolul 2. Metodologie generală	57
2.1. Considerații etice	57
2.2. Criterii generale de includere și excludere	57
2.2.1. Anestezia	57
2.2.2. Îngrijirea postoperatorie	57
2.2.3. Evaluarea lamboului	58
2.3. Analiza morfopatologică a țesuturilor	58
2.4. Analiza statistică	59
Capitolul 3. Studiul I: Model experimental animal pentru studiul perforazomului funcțional	61
3.1. Introducere	61
3.2. Ipoteza de lucru	62
3.3. Material și metodă	62

3.3.1. Animalele incluse în studiu	62
3.3.1.1. Anestezia	62
3.3.2. Procedura chirurgicală	63
3.3.2.1. Îngrijirea postoperatorie	69
3.3.3. Evaluarea lamboului	69
3.3.4. Concentrațiile soluțiilor utilizate	71
3.4. Rezultate	71
3.5. Discuții	77
3.6. Concluzii	96
Capitolul 4. Studiul II: Studiu comparativ între albastru de metilen și proflavină atunci când sunt utilizate pe post de markeri intra-arteriali pentru perforazomul funcțional	97
4.1. Introducere	97
4.2. Ipoteza de lucru	98
4.2.1. Obiectivul primar	98
4.3. Material și metodă	99
4.3.1. Criterii generale de includere și excludere	99
4.3.2. Evaluarea lamboului	100
4.3.3. Statistica	100
4.3.4. Evaluarea histologică	100
4.4. Rezultate	101
4.4.1. Studiul In Vivo efectuat prin injectarea soluției de albastru de metilen intra-arterial șobolanilor din rasa Wistar	101
4.4.2. Studiul In Vivo efectuat pe șobolani din rasa Wistar injectați cu soluție de proflavină	115
4.4.3. Analiza statistică	125
4.5. Discuții	129
4.6. Concluzii	132
Capitolul 5. Discuții generale	135
Capitolul 6. Concluzii generale	137
Capitolul 7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	139
REFERINȚE	141

Cuvinte cheie: Defecte de părți moi, lambou bazat pe artere perforante; perforazom funcțional, colorant fluorescent; albastru de metilen; proflavina.

Studiul anatomo-chirurgical al perforazomului

- Rezumatul tezei -

Introducere

Defectele de părți moi sunt o provocare pentru chirurgul plastician deoarece acoperirea lor poate fi dificilă atât datorită complexității mecanismelor fiziopatologice care le-au provocat și cât istoricul pacientului.

În ceea ce privește lambourile, rezultatele postoperatorii favorabile sunt amenințate de prezența unei necroze totale sau parțiale care se poate datora unui flux sanguin deficitar. Acest lucru poate fi prevenit de cunoașterea exactă a fluxului la nivelul lamboului pre sau intraoperator, relevat de suprafața perforazomului funcțional.

Stadiul actual al cunoașterii

În **prima parte** a tezei se face o analiză critică a datelor și rezultatelor cercetărilor din domeniul abordat. Prin urmare, **primul capitol** prezintă informații generale despre defectele de părți moi și lambouri.

Defectul de țesuturi moi reprezintă o lipsă de substanță, care poate varia în adâncime și suprafață.

Mecanismul de producere a defectelor tisulare poate determina defecte: post-traumatice, post-combustionale, post-tumorale, post radiație, congenital, escare de decubit, cicatrici vicioase.

Aceste defecte sunt reparate prin diferite metode, alese în funcție de complexitatea și adâncimea acestora. Defectele complexe necesită utilizarea lambourilor, a căror componență și design a evoluat de-a lungul istoriei de la lambouri bazate pe circulație aleatorie la lambouri axiale, musculo-cutanate, fasciocutanate pentru a ajunge actualmente la lambouri bazate pe perforante, o variantă mai exactă a lambourilor bazate pe circulație aleatorie.

Cele mai importante avantaje ale acestui tip de lambou sunt:

1. Menținerea sursei arteriale principale, a fasciei și a musculaturii subadiacente;
2. Combinarea vascularizației bogate a unui lambou miocutanat cu morbiditatea redusă a zonei donatoare
3. Respectarea principiului "like with like";
4. Limitarea zonei donatoare la aceeași arie;
5. Posibilitatea reparării complete sau parțiale a zonei donatoare prin sutură primară;
6. Mai puțin solicitantă din punct de vedere tehnic- fără suturi micro vasculare;
7. Scurtarea timpului operator;
8. Posibilitatea ajustării volumului;
9. Libertatea de mișcare a lamboului

În ceea ce privește nomenclatura, lambourile bazate pe perforante au fost denumite în funcție de:

- o localizarea la nivelul corpului;
- o sursa de vascularizație;
- o mușchiul traversat de perforante.

Studiile actuale acordă o atenție deosebită studiului imagistic al perforantelor, necesar pentru identificarea celei mai mari perforante localizate la nivelul unei posibile zone donatoare.

Vizualizarea perforantelor poate fi făcută prin mai multe metode imagistice printre care, cel mai frecvent utilizate în studii și în clinică sunt:

- ecografie duplex color;
- angiograma tomografică computerizată;
- Dopplerul audio manual;

- angiografia prin rezonanță magnetică;
- termografia dinamică în domeniul infraroșu;
- angiografia cu ajutorul verdei de indocianină.

Deși identificarea perforantei permite croirea unui lambou bazat pe perforante, nu exclude complicațiile cel mai frecvent raportate și anume necroza parțială sau totală a lambourilor. Astfel s-a impus necesitatea determinării suprafeței cutanate irigate de o singură perforantă numită perforazom. Determinarea acestuia din urmă a fost efectuată inițial pe cadavre, cu dezavantajul absenței fluxului sanguin și astfel nu s-a putut determina suprafața exactă vascularizată de acea perforantă.

Astfel au fost definite două tipuri de perforazoame, datorită existenței unei diferențe între suprafața perforazomului determinat la nivelul cadavrelor și cele observate în cazul recoltării unui lambou : 1. Perforazomul anatomic: reprezentat de către teritoriul anatomic al unei perforante, vascularizat de o perforantă și ramurile acesteia până la linia trasată la nivelul zonei anastomotice.

2. Perforazomul funcțional: reprezentat de către teritoriul clinic sau funcțional al unei perforante, care cuprinde teritoriul anatomic și cele adiacente, aflate în legătură, perforazoame vascularizate de o singură perforantă.

Această diferență de suprafață a dus la necesitatea determinării imagistice pre- sau intraoperatorie a perforazomului. Astfel pentru aceasta au fost utilizate angio-CT-ul, angiografia intraoperatorie cu ajutorul verdei de indocianină, termografia dinamică infraroșie (DIRT).

Însă niciuna dintre tehnicile uzuale nu reușește să identifice perfect perforazomul funcțional. Din acest motiv, se conturează necesitatea dezvoltării unei metode de detectare *in vivo*, intraoperatorie a acestuia, acesta fiind și obiectivul principal al acestei teze de doctorat.

Capitolul II prezintă sumar principalele efecte ale albastrului de metilen și proflavinei respectiv concentrațiile utilizate în studii *in vitro* și în clinică.

Astfel, studiile anatomice au utilizat albastru de metilen pentru a determina suprafața perforazomului funcțional motiv pentru care a fost luat în considerare pe post de trasor tisular al fluxului sanguin alături de proflavină, amândoi fiind coloranți fluorescenți.

Există o serie de studii *in vivo* și *in vitro* în care au fost utilizați cei doi coloranți care au permis identificarea efectelor asupra țesuturilor, proprietățile acestora și efectele adverse înregistrate.

Studiile recente, s-au concentrat asupra efectelor albastrului de metilen în cazul activității crescute ale enzimelor antioxidante, cum ar fi superoxid-dismutaza. Rezultatele au demonstrat că acesta determină suprimarea formării de radicali liberi de oxigen, după fenomene ischemice, la nivelul țesuturilor. Acestea au depins de doză și de concentrație demonstrând protecția împotriva leziunilor datorate stresului oxidativ la nivel pulmonar, muscular, renal, tegumentar și nervos.

Datorită liposolubilității sale, albastru de metilen traversează cu ușurință membrana celulară, acumulându-se în matricea mitocondrială, restaurând funcțiile mitocondriale, cum ar fi îmbunătățirea activității citocrom oxidazei C, a consumului de oxigen, producția de ATP concomitent cu reducerea producției de radicali liberi de oxigen. Alte studii au arătat că injectarea intraperitoneală a acestui colorant poate reduce progresia necrozei, atunci când este injectat la mai puțin de 6 ore de la producerea arsurii.

Albastrul de metilen și proflavina sunt utilizate la nivel molecular datorită capacității lor de a colora acizii nucleici și ARN-ul. Astfel, coloranții pot fi folosiți drept agenți reducători intensi, intercalatori în structura ADN-ului și implicit în elaborarea unor senzori care au la bază aptameri, cu rol de etichetă. Caracterul reversibil al colorării minimizează interferența atunci când acizii nucleici sunt transferați la nivelul membranelor de hibridizare.

Ațiunea celor doi coloranți de intercalare a acizilor nucleici le conferă proprietăți antibacteriene. Ambii coloranți au fost utilizați contra bacteriilor gram pozitive sub forma pansamentelor.

Administrarea albastrului de metilen prezintă o farmacocinetică complexă datorită distribuției sale în diferite compartimente tisulare și o rată de evacuare redusă. Excreția lui se face necontrolat la nivel urinar, oricând între 4-24 ore de la administrare, cu un timp de înjumătățire de 5-6,5 ore.

Până în prezent, au fost raportate rare episoade de toxicitate a acestor compuși.

Fiind un colorant biocompatibil lipsit de toxicitate, cu afinitate pentru mucoase, actualmente, albastrul de metilen este folosit pentru identificarea intraoperatorie a țesutului nervos și a glandelor endocrine, iar proflavina, datorită capacității sale de agent de contrast topic, evidențiază nucleii celulari, permițând vizualizarea directă a morfologiei celulare, fără a mai fi nevoie de biopsie.

Diferiți autori au raportat utilizarea ambilor coloranți pentru proceduri de diagnostic, cum ar fi:

- ✓ endomicroscopia con focală laser in vivo;
- ✓ microscopia *in vivo* utilizată pentru identificarea esofagului Barrett;
- ✓ modificările patologice ale mucoasei orale, colonului, stomacului, duodenului, tractului gastrointestinal superior, căilor aeriene superioare, țesutului cervical, sau cervixului;
- ✓ identificarea sarcomului;
- ✓ identificarea fistulelor urinare;
- ✓ identificarea nodulului santinelă în cazul cancerelor de la nivelul capului și gâtului, cancerului mamar și gastrointestinal;
- ✓ chirurgia tiroidiană.

Efectele lor adverse pot fi evaluate mai ușor prin studiul efectelor biologice la nivel molecular și celular. Acesta reprezintă un avantaj al celor doi coloranți, alături de cel de a fi trasori tisulari.

Albastrul de metilen stabilizează metabolismul energetic și crește sinteza de adenzin trifosfat după reoxigenare, reglează inflamația și reduce apoptoza. Efectele antioxidante ale acestuia asupra mitocondriilor și respirației reduc reacția tisulară la substanțele străine care intră în contact cu țesuturile vii.

În cazul proflavinei, studiile au demonstrat interacțiunea sa cu eritrocitele, determinând formarea complexelor între proflavină și hemoglobină care implică transferul de fluorescență și energie.

Contribuția personală

A **doua parte** a tezei prezintă motivația, obiectivele, metodele utilizate pentru atingerea obiectivelor propuse și rezultatele obținute.

Capitolul I, se axează pe **Ipoteza de lucru**.

Ipoteza de lucru a acestei lucrări de doctorat constă în: injectarea intraoperatorie directă a unui colorant fluorescent cum sunt albastru de metilen și proflavina la nivelul arterei de origine a unei artere perforante, ceea ce permite determinarea perforazomului funcțional. Pentru a demonstra această ipoteza următoarele obiective au fost propuse: identificarea unui model experimental animal pentru studiul perforazomului; analiza *in vivo* a efectelor metodei experimentale alese; identificarea concentrației minime a soluției de colorant care permite vizualizarea directă a perforazomului funcțional; compararea clinică și morfopatologică a efectelor injectării celor doi coloranți în evaluarea intraoperatorie a perforazomului funcțional.

Capitolul II, dedicat metodologiei generale, prezintă considerații etice, evaluarea clinică și histopatologică a lamboului și analiza statistică efectuată.

Metodologia generală cuprinde 4 părți:

1. Elaborarea unui model experimental animal pentru identificarea și studiul perforazomului funcțional;
2. Analiza efectelor metodologiei asupra țesuturilor locale implicate în determinarea perforazomului funcțional și incluse în lamboul croit pe baza acestuia;
3. Analiza concentrațiilor minime suficiente pentru a evalua perforazomul funcțional cu ochiul liber;
4. Compararea efectelor clinice și morfopatologice a celor doi coloranți.

Considerații etice: includerea animalelor în studii a fost făcută pe baza unui protocol de studiu aprobat de către Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie Iuliu-Hațieganu, Cluj Napoca, România și de către Direcția Sanitară Veterinară și pentru siguranța Alimentelor Cluj (199/07.02.2020). În acest studiu au fost incluși un număr de 42 de șobolani rasa Wistar împărțiți în 4 loturi cu greutate cuprinse între 400-500 mg, care permit încanularea vaselor datorită calibrului lor mare.

În urma analizei efectelor celor doi coloranți în funcție de concentrație s-au folosit soluții cu concentrații cuprinse între 0,16–1,6 mg/mL pentru albastru de metilen respectiv 0,1–1 mg/mL pentru proflavină, dar care să se încadreze în spectrul vizibil.

Din studiu au fost excluși șobolanii care au prezentat tulburări circulatorii importante la nivelul membrului inferior homolateral lamboului.

Toate animalele au fost anesteziate general cu un amestec de Ketamină și Xilazină 2% 2:1 de uz veterinar, administrate intramuscular în șoldul controlateral.

Îngrijiri postoperatorii

Șobolanul este poziționat în decubit lateral, controlateral lamboului până la recuperarea completă după anestezie. Acesta este supravegheat, întors de pe o parte pe alta la fiecare 5 minute, până la reluarea spontană a poziției normale și reluarea mersului.

Evaluarea lamboului

În cazul animalelor injectate se urmărește evoluția plăgii postoperator și a membrului vascularizat de artera femurală injectată.

Monitorizarea lambourilor a fost făcută zilnic în prima săptămână și apoi la 14 zile, când se consideră că lamboul este vindecat. Începând cu a doua zi postoperator până în cea de a V zi și la sfârșitul celor două săptămâni lamboul cutanat împreună cu vasele adiacente, artera și vena femurală, au fost evaluate din punct de vedere al efectelor citologice prin examen histopatologic.

Lambourile au fost evaluate prin vizualizare directă, dacă expunerea a fost insuficientă pentru vizualizarea integrală a lamboului, cu ajutorul unui asistent se schimbă poziția animalului pentru a permite examinarea. Cu ajutorul fotografiilor digitale se evaluează și consemnează evoluția și complicațiile, zonele de dehiscentă, necroza superficială sau profundă, congestia venoasă.

Evaluarea histopatologică se practică prin recoltarea arterei femurale în segmentul incanulat, a arterei epigastrice superficiale și a ramurii sale mediale. Acestea au fost recoltate la 2-4 zile de la intervenție, perioadă în care putem observa debutul reacțiilor de lungă durată la nivelul țesutului invadat prin procedură.

Analiza statistică a fost realizată în cazul celui de al doilea studiu. A fost utilizat testul non-parametric Mann-Whitney U pentru investigarea diferențialelor dintre cele două grupuri.

În **Capitolul III**, cu privire la **Studiul perforazomului funcțional** este prezentat un **model experimental animal** pentru determinarea teritoriului irigat de o arteră perforantă *in vivo*. Această metodă presupune injectarea directă unei soluții de colorant dar și determinarea concentrației minime eficiente a soluției de colorant pentru a reduce eventualele efecte adverse.

Lamboul bazat pe artera epigastrică inferioară superficială a fost descris pentru prima dată pentru șobolanii de experiență de către Strauch și Murray în 1967. Pornind de la anatomia acestui lambou a fost studiat un model experimental *in vivo* care să permită identificarea perforazomului funcțional prin injectarea directă la nivelul arterei femurale a soluției de colorant.

Procedura chirurgicală presupune cântărirea șobolanilor în prealabil pentru a calcula cantitatea precisă de anestezie necesar. Microscopul chirurgical a fost pregătit preoperator.

Anestezia a fost efectuată de către două persoane, una dintre ele imobilizând animalul. Acesta a fost poziționat în decubit ventral până la instalarea anesteziei. Evaluarea instalării anesteziei dar și a menținerii acesteia pe parcursul întregii intervenții a fost făcută prin ciupirea membrului posterior și observarea ratei respiratorii.

Șobolanul a fost poziționat pe masa operatorie în decubit dorsal, s-a practicat o incizie convexă la nivelul marginii inferioare a angiozomului arterei epigastrice superficiale inferioare. Atunci când incizia a fost completă s-a poate observat paniculul adipos inghinal. Disecția a fost apoi continuată profund, până la nivelul fasciei musculare.

S-a retractat ligamentul inghinal, iar disecția a continuat apoi până la identificarea vaselor femurale care au fost disecate și izolate proximal până la nivelul originii arterei epigastrice profunde medial, respectiv distal de originea arterei epigastrice superficiale inferioare. Toate ramurile emise de vasele femurale de-a lungul segmentului amintit au fost izolate și disecate. Apoi s-a practicat disecția arterei epigastrice superficiale până la bifurcația ei în ramura medială și cea laterală.

După disecția tuturor ramurilor segmentului expus din artera și vena femurală, acestea au fost clampate cu excepția ramurii mediale a arterei epigastrice superficiale inferioare.

S-a practicat injectarea de ser fiziologic și soluții de albastru de metilen de concentrații diferite, respectând toate etapele descrise anterior.

După injectarea soluției de colorant, tegumentul a fost observat pentru identificarea ariei colorate. Marginile ariei colorate au fost marcate cu ajutorul unui marker non-toxic, apoi lumenul a fost spălat cu soluție de heparină diluată în ser fiziologic. Firul care fixează sonda a fost suprimat cu grijă pentru a nu leza peretele vascular apoi sonda a fost retrasă. Lumenul a fost apoi spălat încă o dată iar gaura restantă suturată. Clampii au fost îndepărtați. S-a verificat sutura peretelui arterial. În acest moment operator s-a notat ora și minutul declampării arterei femurale pentru a putea evalua timpul de ischemie.

După reluarea circulației la nivelul arterei femurale s-a croit lamboul tegumentar prin disecția insulei în profunzime și izolarea perforantei directă identificată în urma injectării. Lamboul a fost suturat la nivelul zonei donatoare.

Concentrațiile soluțiilor utilizate, în cazul albastrului de metilen au fost de 0,16; 0,32; 0,64; 1,28; și 1,6 mg/mL respectiv concentrații de 0,1; 0,5; și 1,2 mg/mL pentru proflavină cu scopul de a fi injectate la nivelul arterei femurale încanulate la nivelul șobolanilor.

Pentru a stabili concentrația minimă a soluției de colorant vizibilă la nivelul tegumentului s-au injectat soluțiile în ordine crescătoare pornind de la cea mai mică concentrație.

Rezultate

Plasarea inciziei la nivelul marginii inferioare a angiozomului medial al arterei epigastrice superficiale inferioară evită necroza și dehiscenta lamboului.

Disecția ramurilor arterei epigastrice superficiale inferioare înainte de injectarea soluției de colorant permite izolarea cu ușurință a ramurii mediale, localizată mai aproape de incizie cu o traiectorie vasculară directă, reducând la minim cantitatea de soluție injectată. Clamparea celorlalte ramuri ale arterelor femurale și ale arterei epigastrice superficiale inferioare reduce semnificativ cantitatea de soluție absorbită de către țesuturi.

S-a observat că timpul optim de ischemie a membrului posterior homolateral este sub 60 de minute, o prelungire duce la necroza membrului.

Injectarea albastrului de metilen trebuie făcută în mod continuu, pentru că o întârziere de 1-2 minute va duce la evidențierea unui alt perforazom datorită efectului vasoconstrictor asupra vaselor tip "choke".

Injectarea unui volum de 1 mL de soluție salină de albastru de metilen cu concentrația de 0,32 mg/mL, respectiv 1 mg/mL a proflavinei este suficientă pentru a colora eficient, în totalitate întregul perforazom funcțional.

Atunci când lamboul este croit strict pe baza perforazomului funcțional, în cea de-a patra zi de evoluție postoperatorie colorantul este spălat evidențiind astfel dezvoltarea unei noi rețele vasculare. Evoluția vaselor femurale și epigastrice în cea de a patra zi post-injectare este favorabilă, fără modificări deosebite, prezentând fenomene de stază cu formarea unor trombi la nivelul emergenței vaselor epigastrice.

Discuții

Modelul animal experimental pentru studiul lamboului bazat pe perforante descris anterior este diferit de cel descris în această teză, însă acesta permite studiul unei perforante directe, conform nomenclurii stabilite în anul 2002. Evaluarea cantitativă a soluției de colorant injectate nu corespunde perforantelor musculare sau septale pentru care ar fi necesară disecția ramurii laterale a arterei epigastrice superficiale.

Spre deosebire de injectarea din modelul nostru unde putem direcționa fluxul către un singur perforazom, modelele prezentate anterior fac acest lucru foarte dificil prin calibrul foarte redus al vasului principal utilizat. Astfel, deși nu descrie un model de lambou bazat pe perforante adevărate conform descrierii lui Wei, studiul actual permite identificarea perforazomului funcțional. Utilizarea acestei metode de determinare a perforazomului funcțional în cazul perforantelor indirecte poate crește cantitatea de soluție injectată, însă fără efecte adverse notabile datorită concentrației eficiente reduse.

Un alt model de studiu a lambourilor bazate pe multiple perforante, mai exact a necrozei marginale a lambourilor sub-mentoniere la porci presupune identificarea perforantelor cu ajutorul verdei de indocianină. În cazul modelului prezentat în lucrarea de față, lamboul final a avut la bază o singură perforantă pentru a ilustra specificitatea metodei.

În studiile publicate în literatură injectarea a fost efectuată intravenos, sistemic, fiind necesară o concentrație și cantitate mai mare de soluție, presupunând un timp de acțiune prelungit. Efectele sistemice ale soluției utilizate în studiul efectuat asupra porcilor, pot fi mult mai intense decât în cazul studiului asupra șobolanilor. În cadrul prezentei teze de doctorat, cantitatea de soluție absorbită sistemic este considerabil mai mică datorită faptului că circulația sanguină la nivelul teritoriului injectat este oprită prin clamparea marilor vase (ex. artera femurală), iar reluarea circulației este urmată în scurt timp de croirea lamboului.

Disecția și identificarea perforantelor a fost efectuată din profunzime spre suprafață, evitând astfel secționarea vaselor de mici dimensiuni și prevenind pierderea unei cantități importante de soluție la nivelul țesutului interstițial, absorbția acestuia, respectiv inundarea câmpului operator cu soluție.

Cerneala de India și albastru de metilen au fost utilizate în studiile anatomice anterioare ale perforazomului efectuate pe cadavre. Primul colorant a fost utilizat și pentru studii *in vivo* efectuate pe porci care au avut drept scop identificarea perforazoamelor funcționale. Acest colorant s-a dovedit ineficient datorită spasmului intens pe care îl determină la nivelul perforantelor atunci când este injectat la nivelul mamei interne, formarea de cheaguri de cerneală ce confluează spre piele. Spasmul se regăsește și în cazul albastrului de metilen, dar la nivelul vaselor de legătură dintre perforazoamele anatomice. Creșterea concentrației colorantului, atât în cazul albastrului de metilen cât și a proflavinei, determină formarea unor agregate de colorant ce pot duce la formarea unor cheaguri ca și în cazul cernelii de India.

Concluzii

În concluzie, modelul animal prezentat în acest studiu permite evidențierea intraoperatorie a perforazomului funcțional, fără expunerea animalului unor riscuri și efecte ireversibile, utilizând

cantitatea minimă de soluție injectată. Modelul expune perforante directe, ceea ce reduce cantitatea de substanță injectată.

Coloranții utilizați în studiu s-au dovedit trasori tisulari excelenți și în studii anterioare în care această proprietate a albastrului de metilen a fost demonstrată la nivelul miocardului.

Capitolul IV, dedicat **Studiului comparativ între albastrul de metilen și proflavină atunci când sunt utilizați pe post de markeri intra-arteriali pentru perforazomul funcțional**, abordează un alt obiectiv principal al tezei, respectiv evaluarea colorantului potrivit pentru evaluarea intraoperatorie a perforazomului funcțional.

Albastru de metilen este atât colorant cât și medicament bine-cunoscut. Utilizarea albastrului de metilen pe post de trasor tisular a debutat acum 30 de ani pentru evaluarea intraoperatorie a nodulilor limfatici în cazul melanoamelor de stadiu incipient. Ulterior acesta a fost asociat albastrului de metilen verdele de indocianină, acesta din urmă fiind bine-cunoscut și utilizat adesea pentru studiul perforanțelor.

Atunci când este administrat intra-arterial, albastrul de metilen nu se leagă de proteinele plasmatică, o proprietate importantă pentru extravazarea acestuia la nivel tisular dar și pentru metabolizarea și excreția lui.

Proflavina este un colorant similar, a cărei concentrație la nivelul fluxului sanguin scade la fel de rapid ca și în cazul verdelei de indocianină, în primele 3-5 minute de la administrare stabilizându-se la 30 de minute de la administrare.

În ciuda abilității albastrului de metilen și proflavinei de a se intercala la nivelul structurii ADN, nu s-a observat influența negativă asupra viabilității tisulare.

Evaluarea perforazomului funcțional se poate face numai in vivo, iar vasele de legătură de tip "choke" care fac conexiunea între perforazoamele anatomice influențează puternic întinderea perforazomului funcțional respectiv numărul unităților anatomice irigate.

Criterii generale de includere și excludere

În studiul in vivo au fost utilizați 28 masculi din rasa Wistar. Șobolanii au fost distribuiți în mod aleator în două grupuri a câte două loturi alcătuite din 7 subiecți, în funcție de tipul de colorant injectat.

Din primul grup de studiu, injectat cu soluție de albastru de metilen cu concentrație de 0,32 mg/mL, au fost excluși 3 șobolani care au prezentat fie:

- unul cu necroză parțială a lamboului atunci când această este croit pe baza a două perforante, iar una este secționată,
- al doilea-autofagia lamboului a doua zi postoperator,
- al treilea-dehiscența plăgii datorită faptului că firul de sutură a fost ros de animal.

Din grupul de șobolani injectați cu soluție de proflavină cu concentrația de 1 mg/mL, doi au fost excluși datorită dezvoltării unei necroze cartonoase a insulei tegumentare.

Evaluarea lamboului

Cele două grupuri de șobolani au fost monitorizate postoperator, iar statusul lor evaluat. Insulele tegumentare au fost recoltate după injectarea soluției la 1,2,3,4 respectiv 14 zile pentru evaluarea evoluției în dinamică a structurilor implicate în procedura de determinare perforazomului funcțional.

Statistica

Analiza statistică a evaluat media, mediana, eroarea standard. S-au comparat grupurile de șobolani utilizați în experiment din punct de vedere al greutatei cu ajutorul testului T student. Normalitatea asumpțiilor referitor la cele trei grupuri –soluții de colorant și control, a fost testată prin metoda Shapiro-Wilks. Deoarece rezultatele nu au arătat îndeplinirea asumpțiilor, analiza a fost realizată prin teste non-parametrice. Testul Mann-Whitney U a fost utilizat pentru investigarea

diferențialelor dintre grupuri. Valoarea p corectată $<0,05$ pentru determinarea care folosește două cozi a fost folosită drept criteriu de semnificație statistică.

Evaluarea histopatologică

Fragmentul încanulat de arteră femurală și vena femurală adiacentă, ramura epigastrică superficială inferioară, ramura perforantă a cărui perforazom funcțional este evaluat și tegumentul corespunzător acestuia împreună cu țesutul subcutanat sunt evaluate din punct de vedere morfologic. Mostrele au fost recoltate în primele 4 zile și a XIV a zi postoperator, în mod independent din fiecare grup experimental.

Evaluarea tegumentului și țesutului subcutanat a fost integrată într-o scală. Cantitatea de infiltrat inflamator, necroza și alte caracteristici au fost evaluate de către anatomopatolog și exprimate sub forma unui scor cuprins între 1-4.

Rezultate

Toți șobolanii incluși în studiu au prezentat o distribuție normală după cum se poate observa cu o medie de 436 g în cazul grupului injectat cu soluție de albastru de metilen respectiv 438 g în grupul injectat cu soluție de proflavină. Astfel, nu există o diferență semnificativă statistică între cele două grupuri.

Studiul efectuat prin injectarea soluției de albastru de metilen intra-arterial șobolanilor din rasa Wistar

Tegumentul se colorează în urma injectării albastrului de metilen, evidențiind localizarea perforazomului funcțional, apoi se desenează marginile acestuia, se croiește lamboului bazat pe perforazomul funcțional și se suturează la nivelul zonei donatoare. Vindecarea acestuia are loc la 14 zile, când firele de sutură sunt suprimate. Soluția de albastru de metilen concentrație injectată șobolanilor din lotul corespunzător a avut o concentrație de 0,32 mg/mL.

Evoluția clinică și histopatologică de-a lungul primelor patru zile și la 14 zile, a tuturor șobolanilor incluși în cele două grupuri, a fost favorabilă până la momentul recoltării țesuturilor pentru evaluarea histopatologică.

Studiul In Vivo efectuat pe șobolani din rasa Wistar injectați cu soluție de proflavină

Aceeași metoda amintită în cazul albastrului de metilen a fost utilizată pentru injectarea unei soluții de proflavină cu concentrația de 1 mg/mL. Evoluția clinică în cazul acestui colorant a fost favorabilă, însă unele cazuri probele histopatologice au prezentat infiltrat inflamator bogat, în cantitate mai mare decât în cazul loturilor injectate cu soluție de albastru de metilen.

Analiza statistică

Testul Shapiro-Wilk a fost utilizat pentru determinarea distribuției normale a rezultatelor histopatologice. Loturile injectate cu ser fiziologic și albastru de metilen au prezentat o distribuție anormală, în schimb în cazul proflavinei distribuția a fost una normală.

Pentru a compara efectele tisulare ale injectării celor două soluții de colorant am comparat inițial fiecare lot injectat cu soluție de colorant cu cel injectat cu ser fiziologic utilizând testul Mann-Whitney.

Discuții

Spre deosebire de verdele de indocianină, albastru de metilen și proflavina extravazează la nivelul spațiului interstițial, astfel fiind mai potrivite pentru detecția exactă a perfuziei cutanate.

S-a observat congestia vaselor, prezența unor trombi intraluminali sau leziuni endoteliale chiar și când serul fiziologic a fost injectat.

Mărimea insulei poate influența rezultatul histopatologic dat fiind concentrarea unei cantități similare de substanță pe o suprafața mai redusă astfel are loc concentrarea ei.

Testele statistice arată că injectarea soluției de albastru de metilen are efect protector asupra țesuturilor comparativ cu soluția de proflavină cu o diferență nesemnificativă statistic. Acest rezultat

poate fi explicat de efectele albastrului de metilen asupra țesuturilor reperfuzate în cazul sindromului de ischemie-reperfuzie, etapele experimentului presupunând un timp de ischemie.

Studiul ulterior ar putea stabili existența unei corelații între timpul de ischemie și cantitatea de infiltrat inflamator prezent la nivel subcutanat.

Concluzii

În concluzie, ambele soluții de colorant utilizate s-au dovedit potrivite pentru determinarea perforazomului funcțional *in vivo* îndeplinind funcția de trasori tisulari.

Discuții generale

Unul din cele mai mari dezavantaje ale lambourilor bazate pe perforante este imposibilitatea determinării preoperatorii a suprafeței exacte irigate, a cărui efect direct este riscul de necroză distală a lambourilor.

Studiile efectuate pentru determinarea perforazomului funcțional au utilizat un colorant fluorescent numit verde de indocianină. Metoda presupune injectarea sistemică, condiții speciale de determinare și echipament special costisitor.

Astfel s-au ales doi coloranți fluorescenți care să coloreze tegumentul vizibil cu ochiul liber, la concentrații reduse.

Studiile histopatologice au demonstrat că marcarea perforazomului funcțional cu concentrațiile determinate sunt toxice pentru țesuturile în care sunt injectate și în care difuzează.

Deși rezultatele sunt promițătoare, utilizarea în cazul subiecților umani necesită studii complementare pentru a valida metoda.

Concluzii generale

În această lucrare de doctorat am analizat anatomic și chirurgical perforazomul funcțional, studiind o metodă de determinare exactă a acestuia intraoperator prin injectarea unei soluții de colorant fluorescent, vizibilă cu ochiul liber.

Cei doi coloranți fluorescenți aleși pentru determinarea acestuia au fost albastru de metilen, dovedit a fi un colorant eficient în studiile anatomice efectuate anterior, și proflavina, un alt colorant fluorescent cu proprietăți și aplicații similare albastrului de metilen. Evoluția clinică și morfopatologică a lambourilor croite după determinarea perforazomului funcțional, identificat prin injectarea directă a soluțiilor de colorant a fost predominant favorabilă.

Astfel, studiul ulterior ar putea avea drept obiectiv studiul corelației între cantitatea de infiltrat inflamator și suprafața perforazomului funcțional.

Un alt studiu fiziologic *in vivo* esențial pentru utilizarea lambourilor bazate pe artere perforante ar fi analiza vaselor de legătură dintre perforazoame cu ajutorul soluției de albastru de metilen și proflavină respectiv spectroscopiei RAMAN.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Prin studiile efectuate am dorit să introducem o metodă inovativă de evaluare *in vivo* a perforazomului funcțional.

Modelul animal a permis evaluarea indirectă a vaselor de legătură prin croirea unui lambou bazat pe două artere identificate, cunoscând de la început perforazomul funcțional al acestora, și observarea evoluției lamboului.

Injectarea locală aduce avantajul injectării unui volum de soluție mult mai redus decât în studiile efectuate anterior și care sunt descrise în literatură.

Perforasomes anatomical and surgical study

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
STATE OF THE ART	
Chapter 1. The Flaps	17
1.1. Soft tissues	17
1.1.1. Definition	17
1.1.2. Ethology	17
1.1.3. Soft tissue defects repair	19
1.2. The reconstruction	19
1.3. The Flaps	21
1.3.1. Random pattern flaps	22
1.3.2. Axial flaps	22
1.3.3. Musculo-cutaneous flaps	22
1.3.4. Fascio-cutaneous flaps	23
1.3.5. Perforator flaps	23
1.3.6. Terminology	25
1.3.7. The imagistic study of perforators	27
1.4. Perforasome	30
1.4.1. The preoperator imaging of perforasome	32
Chapter 2. The use of methylene blue and proflavine in studies in vivo and vitro	37
2.1. Biologic mechanisms and actions of methylene blue and proflavine	41
2.1.1. Methylene blue	42
2.1.2. Proflavine	44
2.2. <i>In vitro</i> studies which used methylene blue and proflavine	46
2.2.1. The use of methylene blue in studies <i>in vitro</i>	46
2.2.2. The use of proflavine in studies <i>in vitro</i>	50
PERSONAL CONTRIBUTION	
Chapter 1. Hypothesis/Objectives	55
1.1. Primary objectives	55
1.2. Secondary objectives	56
Chapter 2. General methodology	57
2.1. Ethical considerations	57
2.2. General criteria of inclusion and exclusion	57
2.2.1. Anaesthesia	57
2.2.2. Postoperative care	57
2.2.3. Flap assessment	58
2.3. Histological Evaluation	58
2.4. Statistics	59

Chapter 3. First study: Intraoperative Study of the functional perforasome- animal experimental model	61
3.1. Introduction	61
3.2. Hypothesis	62
3.3. Materials and methods	62
3.3.1. The animals included in study	62
3.3.1.1. Anaesthesia	62
3.3.2. Surgical procedure	63
3.3.2.1. Postoperator care	69
3.3.3. Flap assessment	69
3.3.4. The solution concentration used	71
3.4. Results	71
3.5. Discussion	77
3.6. Conclusions	96
Chapter 4. Second Study: Methylene Blue and Proflavine as Intraarterial Marker for Functional Perforasome—Comparative Study	97
4.1. Introduction	97
4.2. Hypothesis	98
4.2.1. Primary objective	98
4.3. Materials and methods	99
4.3.1. General criteria of inclusion and exclusion	99
4.3.2. Flap Assessment	100
4.3.3. Statistics	100
4.3.4. Histological Evaluation	100
4.4. Results	101
4.4.1. In Vivo Study Performed on Wistar Rats after Infusion with Methylene Blue Dye Solution	101
4.4.2. In Vivo Study Performed on Wistar Rats after Infusion with Proflavine Dye Solution	115
4.4.3. Statistics	125
4.5. Discussion	129
4.6. Conclusions	132
Chapter 5. GENERAL DISCUSSION	135
Chapter 6. GENERAL CONCLUSIONS	137
Chapter 7. ORIGINALITY OF THE THESIS	139
REFERENCES	141

Keywords: *soft tissue defects, perforator-based flaps, functional perforasome, florescent dye, methylene blue, proflavine.*

Functional perforasomes anatomical and surgical study

- Thesis Abstract -

Introduction

Due to the etiologic mechanism complexity and personal history of the patient, soft tissue defects can become a real challenge for the plastic surgeon.

Another challenge comes from the post-operative flap evolution, which may lead to partial or total flap necrosis due to an insufficient blood flow. This can be prevented by the evaluation of the blood flow in the flap by determining the functional perforasome surface pre- or intra-operatory.

State of the art

In the first part of the thesis, a literature state-of-the-art is presented by analysing the research data and achievements in the topics of the developed work. Thereby, the first chapter introduces general information about soft tissue defects and flaps.

Soft tissue defects represent the loss of one or more layers, which may vary in surface or depth. The etiologic mechanism can produce post-traumatic, post-combustion, post-tumoral, post-radiation, congenital defects, pressure sores and also pathological scars.

The coverage of these defects can be done by different methods depending on complexity and depth. Flaps are needed in complex defects, method which evolved in design and structure over time from the random pattern flap to axial flaps, musculo-cutaneous, fascio-cutaneous and nowadays perforator flaps, a more accurate type of random pattern flap.

The most important advantages of perforator flaps are:

1. Sparing of the source artery and underlying muscle and fascia;
2. Combining the very good blood supply of a musculocutaneous flap with the reduced donor-site morbidity of a skin flap;
3. Respect the "like-with-like" principle;
4. Limiting the donor-site to the same area;
5. Possibility of completely or partially closure of the donor area through simple suture;
6. Technically less demanding, because they don't require microvascular sutures;
7. Shorter operating time;
8. The possibility of flap volume adjustment ;
9. The freedom of flap movement.

Perforator flap terminology was developed based on:

- location;
- vascular source;
- the muscle traversed by the perforator.

New studies are focused on imagistic determination of the perforator, necessary to identify the most reliable perforator located in one anatomic area which may become a donor area.

Perforator visualization can be done by many imagistic methods, the most frequent ones used both in clinical practice and exploratory studies being:

- Colour duplex ultrasonography;
- Computerised tomographic angiography;
- Audio Doppler effect;
- Magnetic resonance angiography;
- Dynamic infra-red thermography;

- Indocyanine green angiography.

Although perforator identification allows the flap design and rise, it does not exclude the most frequent complications such as partial or total flap necrosis. Thus, the identification of the surface vascularized by a single perforator named perforasome is essential in order to avoid these complications. Initially the perforasome was studied and identified on cadavers, however the exact surface cannot be determined due to the absence of the blood flow.

Thereby two types of perforasomes were defined, due to the difference between the surface identified on cadavers and the ones included in flaps with favourable postoperator evolution:

1. The anatomical territory of a perforator, or an anatomical perforasome, is defined by a line drawn through the anastomotic zone and correlates with the traditionally accepted definition of the perforasome.
2. The clinical or functional territory of a perforator encompasses the anatomical territory plus the adjacent, linked, perforasomes also perfused by this single perforator. This may be called the functional perforasome.

This difference led to the need for pre- or intraoperative imagistic assessment of the perforasomes. Thus, techniques like computerised tomographic angiography, Indocyanine green angiography, dynamic infra-red thermography were used to determine the functional perforasome.

However, none of the mentioned imagistic techniques manages to identify exactly the functional perforasome. Therefore, there is a need for a new intraoperative *in vivo* detection method of the functional perforasome this being the aim of this doctoral thesis.

The second chapter briefly presents the main effects of methylene blue and proflavine along with the concentrations used in *in vitro* and clinical studies.

Based on the results from anatomic studies which used methylene blue for perforasome identification and evaluation, it was taken in consideration as tissular tracer for blood flow together with proflavine, both being fluorescent dyes.

There are a number of *in vitro* and *in vivo* studies which used the two dyes allowing the identification of dyes effects on tissues, their proprieties and registered side effects.

Recent studies focused on methylene blue effects in cases of high activity of antioxidant enzymes, like superoxide dismutase. The results showed that the dye supresses free radicals of oxygen species formation after ischemia on tissues. The effects are dependent on doses and concentration demonstrating its protection against oxidative stress on lung, muscle, kidney, skin and nerves.

Methylene blue easily crosses cell membrane due to its liposolubility, cumulating in the mitochondrial matrix, restoring mitochondrial functions like enhancing the activity of cytochrome C oxidase, oxygen consumption, ATP production simultaneously with the reduction of radical of oxygen species. Other studies showed that intraperitoneal injection of methylene blue could reduce necrosis progression, injected in less than 6 hours after the thermal injury (burn).

Both methylene blue and proflavine are used on molecular level due to their staining capacity on nuclear acids and ARN. Thus, the dyes are intensively used as redox probes and intercalators in the DNA structure and implicitly in the development of aptamer-based sensors where they have a tagging role. The interference is minimised by the reversible character of the staining when the nucleic acids are transferred on hybridisation membranes. The antibacterial propriety is conferred by their nucleic acids intercalator actions. Both these dyes have been used against gram-positive bacteria in wound dressings.

Methylene blue presents a complex pharmacokinetics due to its distribution in different tissular compartments and a reduced clearance rate. Its excretion is without control at urinary level, between 4 to 24 hours from the administration, with a half-life of 5-6,5 hours.

Until the present day, only rare episodes of toxicity were reported for those dyes.

As a non-toxic biological stain, with an affinity for mucosal tissue, nowadays, methylene blue is used for nervous tissue and endocrine gland identification during surgery and proflavine, due to its capacity of topical contrast agent is highlighting the cellular nuclei, allowing direct visualization of cellular morphology, preventing the need for biopsies.

Different authors reported the use of both colorants for diagnostic procedures like:

- ✓ *in vivo* confocal laser endomicroscopy;
- ✓ *in vivo* microscopy to identify Barrett's oesophagus;
- ✓ pathological changes in oral mucosa, colon, stomach, duodenum, upper gastrointestinal tract and central airways, cervical tissue, cervix;
- ✓ sarcoma identification;
- ✓ urinary fistula identification;
- ✓ sentinel node head and neck cancers breast cancer and gastrointestinal identification;
- ✓ thyroid surgery.

Their side effects are evaluated easier studying their biological effects at cellular and molecular level, an advantage for the two dyes, beside their propriety of tissular tracer. Methylene blue stabilizes the energetic metabolism and enhances the adenosine triphosphate synthesis after reoxygenation, regulates inflammation and reduces apoptosis. Methylene blue antioxidant effects on mitochondria and respiration reduce tissular reaction to foreign substances which interact with living tissues. In case of proflavine, the studies reported its interaction with the erythrocytes, leading to complex formation between haemoglobin and proflavine, inducing fluorescence and energy transfer.

Personal contribution

The **second part** of the thesis presents the motivation, the objectives, the methods used to reach the proposed objectives and the results obtained.

Chapter I focuses on the thesis aim.

The aim of this doctoral thesis is the development of an experimental model to detect functional perforasome intraoperator by injecting a fluorescent dye like methylene blue and proflavine directly intraarterial at the origin artery of the perforator. In order to reach the aim the following objectives are proposed: development of an experimental animal model to study the functional perforasome; *in vivo* analysis of the method used effects; identification of minimal efficient concentration of dye solution which allows direct visualization of functional perforasome; clinical and histopathological comparison the injection of two colorants in intraoperator evaluation of functional perforasome.

Chapter II, presents the **general methodology** of the study which includes 4 parts:

1. Development of an experimental animal model to identify and study of the functional perforasome;
2. The analysis of the methodology effects on local tissues involved in functional perforasome determination and included in the flap designed based on it;
3. Minimal efficient concentration of the dye solution in order to evaluate directly the functional perforasome;
4. Comparison of the clinical and micropathological effects of two dyes.

Ethical consideration: The study was conducted in the animal research laboratory of the University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania with the ethical committee authorization No. 199/07.02.2020. Forty-two male Wistar rats were used for the study, divided in 4 lots weighting between 400-500 mg, which allows cannulation due to vessels calibre.

From the fluorescent dyes (methylene blue and proflavine), serum solutions were prepared with serum 0.9% (B. Braun Melsungen AG Germany) with concentrations between 0,16–1,6 mg/mL for methylene blue respectively 0,1–1 mg/mL for proflavine.

In order to establish the minimal dye solution concentration, we injected the dye from the lowest to the highest concentration to determine the minimal concentration needed to colour the skin.

The rats which present important circulatory impairs on their paws homolateral with the flap were excluded from the study.

All animals were anaesthetized with Ketamine and Xylazine 2% 2:1, intramuscular in the contralateral hip. The dose used was 12 UI/100gr mixture.

Postoperative care

The rat is left to recover inside its individual cage in left lateral decubitus position. The animal is monitored continuously turning it on the opposite lateral decubitus every 5 minutes, until it resumes sternal recumbency and is able to ambulate.

Flap assessment

In the injected animal, the postoperative wounds and the paw in whom femoral artery was injected and the flaps were monitored postoperatively daily for the first 7 days and then at 14th day when the flap is considered to be healed. Starting from the second postoperative day until the 5th and at the end of the second week the flaps and source vessels, femoral artery and vein were harvested for histopathological exam in order to establish the cytologic and tissular effects.

The flaps were evaluated by visual inspection, presenting a food treat over the head of the rat. If exposure was insufficient, an assistant helped by changing the position of the rat during the flap examination. Using digital photography, the evolution was monitored to evaluate the areas of wound dehiscence, flap epidermolysis, hyperaemia, congestion and necrosis.

Histopathological evaluation

Tissue samples were harvested: the femoral artery on the cannulated segment, the epigastric superficial artery, and its medial branch and island flaps in first 4 postoperative days, when long term reactions on the tissue can be evaluated.

Statistics

Statistical analysis was performed in the second study. The comparison between the two groups was performed using a nonparametric test, Mann–Whitney U Test.

First Study - Intraoperative Study of the functional perforasome - animal experimental model

Superficial inferior epigastric artery flap in rats was described for the first time in 1967 by Strauch and Murray. Starting from the anatomy of this flap an *in vivo* experimental model was developed to identify the functional perforasome by direct injection of dye solution at femoral artery level.

The rats were weighted to determine the precise amount of anaesthetic needed. The surgical microscope was prepared for the procedure.

An assistant helped with the anaesthetic administration. The rat was placed in its cage until the anaesthesia is established, evaluating its depth by toe pinching and observance of respiration rate throughout the entire procedure.

The rat was positioned on the surgical table lying on the back and paws immobilized. Using a 15-blade scalpel, the skin is incised in a convex shape, taking in consideration the lower edge of the superficial epigastric angiosome.

After the incision is completed, the panniculus cavernous layer is reached. Then the dissection is continued until the muscular fascia is reached. The inguinal ligament is retracted, and the dissection

continues with the femoral vein and artery distal to inguinal ligament until the medial profound epigastric artery origin medial, respective distal of superficial inferior epigastric artery origins are reached. All femoral branches identified after dissection are dissected and isolated. The superficial epigastric artery is dissected until it splits in the two branches.

The next step consists in placing the clamps at all dissected branches except medial branch of superficial epigastric artery.

The saline and methylene blue dye solution, with the different concentrations, was injected, following all the stages described previously. Then, the skin was visually inspected to identify the coloured area. The margins of the area are drawn with a non-toxic marker and the lumen is washed again with heparin-normal saline solution. The wire which fixed the catheter is suppressed carefully in order to avoid vascular wall lesions and the catheter is retracted, and the arterial opening is closed. All the clamps are removed. Arterial wall suture is checked. In this stage the hour and minute of femoral artery declamping is registered to evaluate ischemia time.

After restoring the circulation on femoral artery an incision is made on the marks and the skin island is designed. The subcutaneous layer is dissected, and the direct perforator is identified and isolated. The flap is raised and the initial incision is sutured. The island is reattached on its place with continuous suture.

Methylene blue and proflavine, serum solutions were prepared with serum 0.9% with concentrations of 0,16; 0,32; 0,64; 1,28; and 1,6 mg/mL for methylene blue respective 0,1; 0,5; and 1,2 mg/mL for proflavine in order to injected in rat cannulated femoral artery.

To establish the minimal dye solution concentration, we injected the dye from the lowest to the highest concentration to determine the minimal concentration needed to colour the skin.

In order to establish the minimal efficient concentration of dye, visible directly on the skin, the solution is injected starting with the lowest one.

Results

Placing the incision on the inferior edge of the medial superficial epigastric artery angiosome wound dehiscence and local necrosis is avoided.

Dissecting the branches of the superficial epigastric artery before the dye injection enables an easier isolation of the medial branch of superficial epigastric artery which is located closer to the incision having a direct vascular trajectory and thus minimising the quantity of dye injected. Also, by clamping the rest of the femoral artery branches and superficial epigastric artery the quantity of dye absorbed by tissues is significantly reduced.

We observed that the optimal time of ischaemia for the limb is under 50 minutes, a longer time of ischemia leading to limb necrosis.

When using methylene blue, the dye injection should be continuous because 1-2 minutes of delay will lead to the highlight of other perforasomes due to its vasoconstrictor effect on nitric oxide at the level of choke vessels.

Infusing 1 mL of dye solutions in rats, concentration of 0.65 mg/mL for methylene blue and 1 mg/mL for proflavine, respectively were high enough to allow the direct visualization with the naked eye.

When the flap is designed based exactly on the functional perforasome, in 4th postoperative day the dye is washed out by developing a new vascular network. Femoral and epigastric vassels evolution in the fourth day post-injection is favourable, without special modification, with stasis and thrombus at epigastric vassels emerging.

Discussion

Although the experimental *in vivo* model described does not reproduce a model which allows the study of a true perforator flap, described previously, it enables the study of a direct perforator,

accordingly to perforator flap terminology established in 2002. The quantity of dye solution necessary to evaluate the functional perforasome determined in the study does not take in consideration muscular or septal branches of the perforator. In order to achieve this, the dissection of lateral epigastric superficial artery is needed.

In contrast to our experimental model where we can direct the flux to only one perforasome, the experimental models presented previously make this difficult due to the extremely reduced calibre of the vessel which should be injected. Thus, although it does not describe a true experimental model for perforator flap accordingly Wei description, the presented study allows functional perforasome identification. The functional perforasome determined using this method, in case of indirect perforasome can rise the quantity of dye solution, without side effects due to its low efficient concentration.

Another study reported a multiperforator flap experimental model, more precisely marginal necrosis of sub-mentoniere flaps on piglets after indocyanine green perforator identification. In the study presented in this thesis, finally the flap is based on a single perforator in order to demonstrate the specificity of the method.

In literature published studies the intravenously injection was administrated systemically, thus a large quantity and concentration is necessary, with a longer action time. Systemic effects of the solution used in the piglets study, can be more intense than in the study on rats presented in this thesis due to the quantity absorbed systemically, which is noticeably smaller because all the sanguine circulation in the injected territory is absent after placing the clamps on the big vessels (ex-femoral artery) and immediately after restoring the circulation the flap is designed.

By dissecting and identifying the perforator from depth to surface, avoiding to section small vessels and by this the leaking of an important quantity of solution through interstitial tissue, its systemic absorption, respectively operatory field inundation.

Indian ink and methylene blue were used in cadaveric anatomic studies of the perforasome. The first one was used also for *in vivo* studies conducted on pigs which aimed to identify functional perforasomes. This dye proved to be inefficient for this purpose due to the intense spasm determined on the perforator when is injected on internal mammary artery and the cloth formation from ink which confluences towards the skin. The spasm is present also when methylene blue is used, only at link vessels between anatomical perforasomes. The increase of the concentration of the dye, in both methylene blue and proflavine, causes dye aggregates formation and produces clots similarly to the Indian ink.

Conclusions

In conclusion, the animal experimental model presented in this study enables the intraoperative evaluation of the functional perforasome, without exposing the animal to irreversible side effects, using the minimal quantity of dye solution injected. The model exposes direct perforators, reducing the quantity of dye injected.

The dyes used in the study proved to be good tissular tracers also in previous studies which demonstrates this propriety in methylene blue's case on myocardium.

Chapter IV, dedicated to **Methylene Blue and Proflavine as Intraarterial Marker for Functional Perforasome—Comparative Study**, covers another main objective of the thesis, which is the identification of the best tissular tracer in order to determine the functional perforasome.

Methylene blue is both a dye and a known medicine. The use of Methylene blue as a tracer has been known for almost 30 years as intraoperative lymphatic tracer in early-stage melanoma. Later on, it was associated with indocyanine green, this being a well-known and often used dye in perforator studies.

When intraarterially administered, Methylene blue does not bind to plasmatic proteins, an important propriety for its extravasation on tissular level, also its metabolization and excretion.

Proflavine is a similar dye, whose concentration in the blood flow decreases just as fast as indocyanine green, in the first 3–5 min after administration stabilizing at 30 min after administration.

Despite the ability of methylene blue and proflavine to intercalate into the DNA structure, no negative influences on tissues viability were observed.

Functional perforasome assessment can be done only *in vivo*, and the choke vessels which bind the anatomic perforasomes strongly influence the surface of functional perforasome and the number of irrigated anatomical units, respectively.

General criteria of inclusion and exclusion

Twenty-eight male Wistar rats were used for this *in vivo* study. The rats were randomly assigned in two groups of two lots of 7 subjects, based on the type of dye injected.

From the group of rats' subjects infused with MB dye solution of 0.32 mg/mL, a few were excluded for various reasons as follows:

- one with partial flap necrosis because it was raised on two perforators, and one of them was sectioned;
- the second rat due to flap autophagia in the second post-operative day;
- the third showed flap dehiscence, the suture wire being gnawed by the rat.

From the group of rats' subjects infused with PRO dye solution of 1 mg/mL, two were excluded due to the formation of some island dry necrosis.

Flap Assessment

The two groups of rats were monitored postoperatively, and their health status was assessed. Skin island specimens were harvested subsequently following the dye injection in days 1, 2, 3, 4 and 14 to assess the time-based evolution of all the structures of interest in functional perforasome evaluation.

Statistics

The statistical analysis was used for average, median and standard deviation values determination. The weight of the rats included in the groups were compared using T student test. Normality of the assumption of the three groups- colorant solution and control, was tested with Shapiro-Wilks's method. As the assumptions were not met, the analysis was made by non-parametric tests. Mann–Whitney U Test was used to determine the differences between the groups. P corrected value was <0,05 for two tails variant used, as statistical significative method.

Histological Evaluation

Tissue samples harvested were the cannulated segment of the femoral artery, femoral vein, superficial inferior epigastric artery and vein, perforator branch whose functional perforasome was evaluated while the correspondent island flaps with its subcutaneous tissue were analysed micropathological. Samples were harvested in the first four days and then in the 14th postoperative day, independently for each experimental group. The epidermis and subcutis were scored. Leucocyte infiltration, necrosis and other characteristics were assessed by a certified pathologist and expressed as score with a range of 1–4.

Results

All rats included in this study had a normal distribution of weight with a mean of 436 g for the MB group and a mean of 438 g for PRO. Thus, there was no statistically relevant difference between the two groups.

In Vivo Study Performed on Wistar Rats after Infusion with Methylene Blue Dye Solution

The skin is coloured with methylene blue in the place where the functional perforasome is highlighted, with the margins of the perforasome marked, with the perforator island flap raised and sutured in site and with the perforator island flap at 14 days after the operative procedure. For each rat included in the group of rats infused with methylene blue a dye solution with a concentration of 0.32 mg/mL was used.

The clinical and histopathological evolution of all the rats included in the two MB groups, monitored in days 1-4 and 14, was favourable until the tissue sample was harvested for histopathological evaluation.

In Vivo Study Performed on Wistar Rats after Infusion with Proflavine Dye Solution

The same method presented before for methylene blue was used to inject proflavine solution of 1 mg/mL. Despite the favourable clinical evolution in the case of this colorant, histopathological samples showed in some cases rich inflammatory infiltrate, in higher quantity than in methylene blue solution injected lots.

Statistics

The Shapiro-Wilk test was used to determine the normal distribution of histopathological results. For serum solution and methylene blue lots the distribution was non-normal, in case of proflavine the distribution was normal.

In order to compare the tissular effects of the two dyes injection, we compared initially all the lots injected with colorant solution with the ones injected with serum using the Mann–Whitney procedure.

Discussion

In contrast to the indocyanine green, methylene blue and proflavine extravasate on interstitial space, thus being more suitable to exactly evaluate skin perfusion.

Vessel congestion, intraluminal thrombus and endothelial lesions were observed, even when serum solution was injected.

The size of the island influences the histopathological result given the concentration of a similar quantity of dye is distributed on a smaller surface, thus rising its concentration.

Statistical tests showed that methylene blue has a protective effect on tissues compared to proflavine solution with a statistically insignificant difference.

This result can be explained by the protective effects of methylene blue on reperfusion tissues in the case of ischemia-reperfusion syndrome, the methodology of the study involves a time of ischemia. Further studies could establish a correlation between the time of ischemia and the amount of inflammatory infiltrate present at the subcutaneous level.

Conclusions

In conclusion, both dye solutions used proved to be suitable for the determination of functional perforasome *in vivo*, as tissue tracers.

General discussions

One of the biggest disadvantages of perforator-based flaps is the difficulty of clinically determining the exact irrigated surface, the direct effect being the risk of distal flap necrosis.

Previous studies performed to identify functional perforasome used a fluorescent dye called indocyanine green. The method involves systemic injection, special conditions of determination and special expensive equipment.

Thus, two fluorescent dyes were chosen to colour the skin visible to the naked eye, at low concentrations.

Histopathological studies have shown that the concentrations chosen to label functional perforasome are not toxic to the tissues in which they are injected and those in which they diffuse.

Although the results are promising, further studies are needed to validate the method for use in human subjects.

General conclusions

In this doctoral thesis we analysed anatomically and surgically the functional perforasome, studying a method for its exact intraoperative determination by injecting a fluorescent dye solution, visible to the naked eye.

The two fluorescent dyes selected for its determination were methylene blue, which proved to be an effective dye in previous anatomical studies, and proflavine, another fluorescent dye with properties and applications similar to methylene blue. The clinical and morphopathological evolution of the flaps designed after the determination of the functional perforasome identified by direct injection of dye solutions was predominantly favourable.

Thus, further studies could study the correlation between the amount of inflammatory infiltrate and the surface of the functional perforasome.

Another physiological *in vivo* study essential for the use of flaps based on perforator arteries would be the analysis of the connecting vessels between perforasomes using methylene blue and proflavine solution using RAMAN spectroscopy.

Originality of the thesis

We aimed to introduce a new innovative method for *in vivo* evaluation of functional perforasome through the performed studies.

The animal model allowed the indirect assessment of the connecting vessels by designing a flap based on two identified perforator arteries, knowing from the beginning their functional perforasome, and observing the evolution of the flap.

Local injection has the advantage of injecting a much lower volume of solution than in previous literature studies.