

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**HAEMORHEOLOGIAI VIZSGÁLATOK
A KÍSÉRLETES SEBÉSZETI ÉS MIKROSEBÉSZETI KUTATÁSOK
SZOLGÁLATÁBAN**

Dr. Németh Norbert



2016

**Debreceni Egyetem
Általános Orvostudományi Kar
Sebészeti Intézet, Sebészeti Műtéttani Tanszék**

Gyakoribb rövidítések jegyzéke

AI	aggregációs index
BFU	blood flux unit
EI	elongációs index
Fbg	fibrinogén koncentráció
Fvs	fehérvérsejt
GoE	gonadectomia
Hgb	haemoglobin
Htc	haematocrit
I/R	ischaemia-reperfusio
MCH	átlagos corpuscularis haemoglobin tartalom (mean corpuscular hemoglobin)
MCHC	átlagos corpuscularis haemoglobin koncentráció (mean corpuscular hemoglobin concentration)
MCV	átlagos corpuscularis térfogat (mean corpuscular volume)
O	ozmolalitás
PV	plazma viszkozitás
SS	nyírófeszültség (shear stress)
Thr	thrombocyta
TVV	teljes vér viszkozitás
Vvs	vörösvérsejt
XD	xantin dehidrogenáz
XO	xantin oxidáz

1. BEVEZETÉS

Napjainkra igen terjedelmes tudásanyag gyűlt össze a keringési rendszer anatómiájáról, élettanáról és kórélettanáról, mégis az áramlástan, rheologiai tulajdonságok még mindig számos megválaszolatlan kérdést vetnek fel.

A haemorheologia a vér sejt és plazmatikus komponensei makro- és mikroszkópikus dimenziójú áramlástanának, valamint a vérrel kontaktusban lévő érfal rheológiájának összefoglaló megjelölése – így definiálta e tudományt Alfred L. Copley, 1951-ben. E diszciplína, ami a sebészet számára is igen fontos, sok évszázados gyökerekre vezethető vissza. A vér és a vérzés, az élet és a halál a keringési rendszer működésével illetve leállításával való összefüggései az ókor (s talán még régebbi korok) embereit is intenzíven foglalkoztatták. A keringési rendszer anatómiája, élettana és kórélettana megismerésének több dogma kialakításával, elvetésével, újabb és újabb felfedezésekkel tarkított története sok századon keresztül húzódó folyamat volt.

A biorheologia és a haemorheologia máig fejlődő területet jelent. Az 1960-1980 közötti időszak a vér vizsgálatára alkalmas viszkoziméterek megjelenésével és a filtrációs módszerek kifejlesztésével nagy lendületet adott a klinikai és alapkutatásoknak egyaránt. Az utóbbi két évtizedben további felpezsdülés látszik a vörösvérsejt deformabilitás és aggregatio meghatározására alkalmas modern micro-rheologiai mérőműszerek és laboratóriumi technikák kifejlesztése révén.

A klinikai és alapkutatások során az egyre szélesebb körben végzett haemorheologiai vizsgálatok ellenére a kórfolyamatokban kimutatott eltérések valódi *in vivo* jelentősége a mai napig sem tisztázott pontosan. Megválaszolatlan kérdések vannak az időfaktor, a lokális-szisztémás rheologiai és a szimultán microcirculációs történések vonatkozásában. Hol van e változások reverzibilitásának-irreverzibilitásának határa? Nem ismertek minden részletében azok a mechanizmusok, amelyek révén az érrendszer különböző szintjein az endothel felszínen kialakuló nyírófeszültség-profil szabályozó jelleget ölt, vagy az érpályán belül az alakos elemek eloszlását, adott esetben endothelium felé való sodródását alakítják. Nem teljes mértékben tisztázott még, hogy a különböző sebészeti beavatkozások miatt –szükségszerűen– megváltozott érgeometria és áramlási tulajdonságok mikor érnek el olyan mértéket, amely már thromboticus szövődmény kialakulásához vezethet. A megelőzési és terápiás lehetőségek továbbra is részletesebb elemzésre várnak. További kérdéskör a különböző, szükségszerű sebészeti beavatkozások hatása: érleszorítás-felengedés, érvarratok behelyezése vagy érprothesisek beültetése. Nem teljesen tisztázottak mindezek haemorheologiai és mikrokeringési hatásai, s nem ismert pontosan e beavatkozások additív jellege sem. A változások mértékének és *in vivo* jelentőségének részletesebb vizsgálata közelebb vihet a célzott haemorheologiai terápiás lehetőségek kidolgozásához is, amelyre sajnos még mindig nincs elegendő meggyőző adat.

Az orvosbiológiai kutatásokban ma még nélkülözhetetlen, de megfelelő indokoltsággal, szigorú szabályok szerint és az állatkíméleti elvek betartásával végzett állatkísérletek során számos kihívással kell szembenézni. A mérés-technikai körülmények meghatározása, a módszertani adaptációs problémák megoldása, az eredmények extrapolálhatóságát, összehasonlíthatóságát is megalapozó komparatív mérések elvégzése, a fajspecifikus különbségek feltárása, mind része ennek a munkának.

Tudományos kutatómunkám az elmúlt másfél évtizedben (a PhD disszertáció elkészítése után az elmúlt 12 évben) a haemorheologiai és microcirculációs vizsgálatokra fókuszált, döntően az ischaemia-reperfüziós kísérletes sebészeti kutatások szolgálatában.

2. A KUTATÁSOK CÉLKITŰZÉSEI

A célkitűzések három fő téma köré csoportosultak.

I. *Haemorheológiai módszertani összehasonlító vizsgálatok, mérés-technikai standardizáció*

- I.1. A *vérvételi lokalizáció* megválasztásának fontosságát kívántuk elemezni, a lehetséges *arterio-venosus* illetve *aorto-porto-cavalis micro-rheológiai különbségek* vizsgálatával Sprague-Dawley patkányokban.
- I.2. A vörösvérsejt deformabilitás *ektacytometriás* mérés-technikai adaptációja során a mintavételnél alkalmazott *anticoagulánsok* vörösvérsejt deformabilitásra kifejtett hatását kívántuk vizsgálni CD patkányok és beagle kutyák vérmintáin.
- I.3. A *vérminták tárolási idejének és hőmérsékletének* micro-rheológiai hatásait vizsgáltuk CD patkányok és beagle kutyák szobahőmérsékleten és hűtéssel tárolt vérmintáin.
- I.4. *Különböző g erővel végzett centrifugálás micro-rheológiai hatásának vizsgálata* különböző fajok (patkány, kutya, sertés és ember) vérmintáin.
- I.5. A vörösvérsejt deformabilitás *filtrometriás* mérés-technikai adaptációja során a *kismennyiségű vérminta* felhasználási lehetőségének és a *sejtméret-pórusméret arány* problémájának elemzése inbred A/J egerek, outbred CD patkányok, keverék és beagle kutyák vérmintáin.
- I.6. Az *ektacytometriás vizsgálatoknál* a mérésekhez alkalmazott *szuszpendáló közeg viszkozitásának* hatása a deformabilitás mérés érzékenységére jelentős lehet, ezért ennek objektív összehasonlító elemzését tűztük ki célul Sprague-Dawley patkányok és beagle kutyák vérmintáin.
- I.7. Az *ozmotikus gradiens ektacytometria* mérések standardizációja kapcsán az *alkalmazott nyírófeszültség* hatásának elemzése CD patkány, beagle kutya, sertés és humán vérmintákon, és az *elongatiós index – ozmolalítás görbék* részletes elemzésével nyert *új leíró paraméterek kidolgozása*.

II. *Faji- és nemi haemorheológiai különbségek vizsgálatai*

- II.1. A módszertani standardok figyelembe vételével a *faji különbségek* részletes haemorheológiai vizsgálata a teljes vér- és plazma viszkozitás, haematocrit/viszkozitás arány, a vörösvérsejt deformabilitás (filtrometria, hagyományos és ozmotikus gradiens ektacytometria, membránstabilitás) és vörösvérsejt aggregatio összehasonlító elemzésével kísérleti/laboratóriumi állatfajok (egér, patkány, kutya, sertés) vérmintáin.
- II.2. A *nemi különbségek* haemorheológiai vizsgálatát kívántuk elvégezni a teljes vér- és plazma viszkozitás, a fibrinogén koncentráció, a vörösvérsejt deformabilitás és a vörösvérsejt aggregatio tekintetében CD patkányokon és beagle kutyákon, „laboratórium-specifikus” adatbázis létrehozásával.
- II.3. Vizsgálni kívántuk a *gonadectomia* haemorheológiai következményeit hím és nőstény Sprague-Dawley patkányokon, három hónapos utánkövetéssel.

III. *Az ischaemia-reperfusio haemorheológiai és microcirculációs vonatkozásai*

- III.1. A *szisztémás és lokális haemorheológiai változások* vizsgálatát tűztük kis célul végtagi-, izomlebeny, bél- és here ischaemia-reperfusio és cerebralis hypoperfusio során CD patkány-, beagle kutya- és sertés modelleken.
- III.2. A *végtagi ischaemia-reperfusio* feltételezhetően eltérő haemorheológiai hatásait kívántuk kimutatni *hím és nőstény ép*, valamint *gonadectomisált* Sprague-Dawley patkányokban.
- III.3. Az *aorta abdominalis infra- és suprarenalis leszorítása-felengedése* kapcsán együttesen kívántuk vizsgálni a máj, a bél és a vese mikrokeringését a sav-bázis- és a micro-rheológiai paraméterek arterio-venosus változásaival patkánymodellben.
- III.4. Perifériás érszakaszon mikrosebészeti módszerekkel kialakított *arterio-venosus ér-anastomosis* (CD patkány), és *művi ér-graft implantáció* (beagle kutya) *követéses vizsgálatát* kívántuk elvégezni a megváltozott keringési viszonyok micro-rheológiai paraméterekre kifejtett hatásának elemzése és a *lehetséges postoperatív szövődmények* kialakulásának előrejelzése céljából.

3. AZ ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Kísérleteinket az 1998. évi XXVIII., „Az állatok védelméről és kíméletéről” alkotott törvény és az Európai Unió 2010. évi EEC 63 direktíva előírásait betartva végeztük a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság (DE MÁB) által nyilvántartásba vett, a Hajdú-Bihar megyei Állategészségügyi- és Élelmiszer Ellenőrzési Állomás által kiadott hatósági engedélyek alapján. Az engedélyszámok az adott kísérletek leírásánál kerülnek feltüntetésre.

A Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Tudományos Bizottság Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága (DE OEC RKEB/IKEB) engedélyével („Haemorheologiai paraméterek változásainak vizsgálata haematologiai betegségek válogatott eseteiben“, RKEB/IKEB 3625-2012 regisztrációs számú protokollal, NSZSZ ügyiratszám: IX-R-052/00944-2-2012) egészséges önkéntesektől származó vérmintákat vizsgálhattunk egyes módszertani összehasonlító tanulmányok elvégzéséhez.

A különböző kísérletek és vizsgálatok elvégzésekor az akkor rendelkezésre álló eszközpark, az adott kísérleti protokoll és a kísérleti/laboratóriumi állat vérvételi lehetőségeinek sajátossága szerinti kiterjesztésben kerültek meghatározásra az egyes paraméterek.

3.1. Haemorheologiai módszerek

3.1.1. Kapilláris viszkozimetria

A vér és a plazma viszkozitását Hevimet-40 kapilláris viszkoziméterrel (Hemorex Kft., Budapest) végeztük. A készülék magyar technikai fejlesztés (Dr. Mátrai Árpád, Dr. Fendler Kornél) és továbbfejlesztés (Dr. Kollár Lajos, Kenedi István) eredménye. A rendszer két temperált olajfürdőbe (37 °C) merülő kapilláris csőből áll (hossz: 500 mm, belső átmérő: 0,6 mm), amelyek mentén 40-40 pár fotodetektor található. A nyomás-gradiens a mintafolyadék saját hidrosztatikus nyomásából ered. A folyadék (~0,6-0,7 ml anticoagulált vérminta vagy plazma) kapillárisba töltését követően a készülék opto-elektronikusan rögzíti a folyadékoszlop tetején képződő meniscus helyzet-idő diagramját a felülről érkező és róla visszaverődő fény helyzetének detektálásával. Az adatokból a csatlakozó komputer kiszámítja a kapilláris belső fala és a minta között keletkező sebesség-gradiens értékeket, amelyekhez hozzárendeli az aktuális hidrosztatikai nyomásból eredő nyírófeszültséget. E két származtatott paraméter hányadosai adják az áramlás során számítható dinamikus viszkozitás értékeket newtoni és nem-newtoni (Casson-típusú folyási görbe) folyadékokra nézve, utóbbit a sebesség-gradiens függvényében megadva ($10\text{-}240\text{ s}^{-1}$).

A teljes vér viszkozitásának jellemzésére a hazai és nemzetközi konvencióknak megfelelően leggyakrabban a 90 s^{-1} sebesség-gradiensnél mért értékeket [mPas] használtuk. A haematocrit/viszkozitás adatok elemzésével foglalkozó tanulmányunkban felhasználtuk a 10 s^{-1} és a 200 s^{-1} értékeknél nyert adatokat is.

A vérviszkozitás haematocrit-függő, ezért ahol valamennyi szükséges paraméter rendelkezésre állt, a vérviszkozitást Mátrai és munkatársai által ajánlott matematikai formula segítségével 40%-os haematocritra korrigált formában is megadtuk:

$$\text{TVV}_{40\%} / \text{PV} = (\text{TVV}_{\text{Htc}} / \text{PV})^{40\%/\text{Htc}}$$

ahol $\text{TVV}_{40\%}$ = a 40%-os haematocritra korrigált teljes vér viszkozitás; TVV_{Htc} = az adott haematocritú minta teljes vér viszkozitása; PV = a minta plazma viszkozitása; Htc = a minta haematocritja, amely képletből a $\text{TVV}_{40\%}$ kifejezhető.

3.1.2. Filtrometria

A filtrometriás méréseket Carat FT-1 típusú filtrométerrel végeztük (Carat Diagnosztika Kft., Budapest), amely a St. George's Filtrometer hazai továbbfejlesztésű változata. A berendezés vízszintes áramlási terét egy függőlegesen elhelyezett Nuclepore® polycarbonat

anyagú szűrőmembrán két részre osztja: a szűrő előtti és utáni térre. A töltőcsövön keresztül injektáljuk a mintát a szűrőkamrába és a mérőcsőbe. A szűrési folyamat és a mérés a csap megnyitásával indítható, aminek hatására a Δp hidrosztatikai nyomáskülönbség (általában 4 vízcm) hatására a folyadékáramlás megindul a mérőcsőből a szűrőmembránon keresztül a tartály felé. A folyadékoszlop meniscusának fotodetektorok előtt való elhaladása eredményezi a helyzet-idő adatokat. A mérési folyamat első fázisaként kalibrációt végzünk, leggyakrabban pufferezt sóoldattal (normál foszfát puffer, phosphate buffered saline, PBS), majd a mérendő sejtsuszpenziót töltjük a készülékbe és megindítjuk a mérést. A sejtsuszpenzió közege szintén PBS, így a kalibrációs méréshez viszonyított (relatív) filtrációs sebesség meghatározható. A sejtsuszpenzió átszűrődése alatt a relatív filtrációs sebesség a szűrő pórusainak fokozatos eltömődése miatt csökken. Ennek következtében az egymást követő 20 μ l térfogatú folyadékszegmensek relatív filtrációs sebességéből lineáris extrapolációval meghatározható a kezdeti relatív filtrációs sebesség (initial relative filtration rate, IRFR). A vörösvérsejt szuszpenzió haematocritjának ismeretében a relatív sejt-tranzitidő (relative cell transit time, RCTT) kifejezhető:

$$RCTT = [(IRFR^{-1} - 1)/Htc] + 1$$

A standardok szerint a méréseket a vérvételtől számított 2 órán belül, 22 ± 1 °C-os környezetben, 5% haematocritú vörösvérsejt-PBS szuszpenzió (ozmolalitás: 295 ± 5 mOsm/kg; pH: 7,4), 4 vízcm filtrációs nyomás mellett, 5 μ m pórusátmérőjű Nuclepore® filter alkalmazásával kell végezni. A mérések kivitelezéséhez a vörösvérsejt-PBS szuszpenzió készítésénél (többszöri centrifugálás, PBS-ben történő mosás) mechanikusan és akár ozmotikusan is sérülhetnek a sejtek. Standardizálási nehézséget jelent a sejt méret-pórus méret arány kérdése, amely a műszer érzékenységét is jelentősen meghatározza. A haematocrit mellett fontos befolyásoló tényező még a filtereken lévő pórusok száma, mérete és esetleges éles széle, amely a sejtek mechanikai sérülését okozhatja, valamint a szuszpenzió ozmolaritása és pH-ja. A minta előkészítés során nem lehet teljesen leukocytá- és thrombocytá-mentes szuszpenziót készíteni, így ezek befolyásoló hatásával (filtrációs sebesség csökkenés, pórus-eltömődés) számolni kell. A metodika különböző laboratóriumi állatfajokra történő adaptációja során fontos kérdés továbbá a mérésekhez szükséges mintamennyiség. A filterméterbe való betöltéshez, két- vagy háromszori méréshez szükséges mennyiségű standard 5%-os vörösvérsejt-PBS szuszpenzió elkészítéséhez ugyanis mintegy 2-2,5 ml vér vételére van szükség.

3.1.3. Hagyományos és ozmotikus gradiens ektacytometria

A vörösvérsejt deformabilitás ektacytometriás (lézer diffrakciós ektacytometria) elven való mérése azon alapszik, hogy a vörösvérsejtek nyíróerő hatására való elongálódása során a vörösvérsejt-szuszpendáló közeg határától az eltérő denzitás miatt visszaverődő lézernyalábok az elnyúlás mértékében szóródnak. A rögzített diffraktogrammból kifejezhető az elongációs index (EI) a nyírófeszültség (shear stress, SS [Pa]) függvényében. Adott nyírófeszültségnél a magasabb EI értékek jobb elnyújthatóságot, jobb deformabilitást tükröznek.

A módszer nagy előnye, hogy a vörösvérsejt deformabilitás meghatározásához igen kis mennyiségű vér szükséges (5-6 μ l). A mérésekhez az antikoagulált vérmintát (5-6 μ l natív vér, K_3 -EDTA 1,5-1,8 mg/ml) magas viszkozitású (általában 20 mPas feletti, de preferáltan 30 mPas körüli) makromolekula vagy polimer oldatban (0,6-1 ml, 70 kDa dextrán vagy 360 kDa polyvinyl-pyrrolidon, PVP; pH=7,3-7,4) szuszpendáljuk közvetlenül a mérések előtt. Az oldat magas viszkozitása szükséges a sejtek erőhatás irányába való orientációjához és a nyíróerő membránra való áttevődéséhez, az elongációhoz.

Az ektacytométerek különböző felépítésűek lehetnek mérőkamrájuk geometriája és mérési technikájuk szerint.

A *Rheoscan-D200 slit-flow ektacytometerrel* (Sewon Meditech Inc., Korea) történő mérésekhez egyszerűhasználatos mérőkamrára van szükség, amelyben két hengeres tartályt 200-220 µm magasságú, 40 mm hosszúságú rés köt össze. Az egyik tartály gumidugóval fedett. A mintát (6 µl vér 600 µl szuszpenziós oldatban) a fedetlen tartályba kell tölteni. A készülék a gumidugót tüvel átszűrja, amin át vákuumot generál néhány másodpercre. Ennek hatására a viszkózus minta egy része áthalad a résen kezdetben gyors, majd a vákuum megszűnésével lassuló áramlási sebességgel. Az áramlási csatornára vetül a lézer, a túloldalon CCD kamera rögzíti a diffraktogramot, amelyet a fent ismertetett módon analizál. A nyírófeszültség kiszámítása (0,5-20 Pa tartományban) a nyomásértékekből és a rés geometriájából adódik. A minta viszkozitás adataira itt nincs szükség a kalkulációhoz. A készülék nem temperált.

A *LoRRca MaxSis Osmoscan rotációs ektacytometeres* (Mechatronics BV, Hollandia) mérések során a mintát (5 µl vér 1 ml szuszpenziós oldatban) a statikus belső (bob) és a forgó külső (cup) cylinder közötti térbe (szélesség: 0,3 mm) töltjük (Couette-rendszer). A cup meghatározott szögsebességgel forgómozgást végez, eközben a mintára lézernyaláb vetül. A nyírófeszültség (beállítható 0,3-75 Pa között, leggyakrabban: 0,53-30 Pa tartományban) a forgás sebességéből, a Couette-rendszer geometriájából (rés köpeny) és a minta viszkozitásából számítható ki. Ehhez a mérések elején pontosan meg kell adni az oldat viszkozitását. A készülék temperált, a mérések 37 °C-on történnek.

Az elongációs index (EI) – nyírófeszültség (SS) adatok összehasonlítása történhet egy adott nyírófeszültség értéknél mért EI megadásával, vagy a teljes EI-SS görbe parametrizálásával. Ehhez a Lineweaver-Burke féle analízist használtuk: meghatározásra került a maximális elongációs index (EI_{max}) és ennek feléhez tartozó nyírófeszültség (shear stress, SS) érték ($SS_{1/2}$ [Pa]) az alábbi képlet alapján: $1/EI = SS_{1/2}/EI_{max} \times 1/SS + 1/EI_{max}$

Deformabilitás romlást jelez az EI_{max} csökkenése és az $SS_{1/2}$ emelkedése. További elemzéshez az EI_{max} és az $SS_{1/2}$ egymáshoz viszonyított aránya is használható.

A kereskedelmi forgalomban elérhető különböző geometriájú ektacytométerek (Rheodyn SSD rotációs-, LORCA-, RheoScan-D slit flow ektacytometer) összehasonlító elemzését és az elongációs index – nyírófeszültség görbék parametrizálásának standardizációs összehasonlítását nemzetközi munkacsoportban végeztük. A mérések ismételtősége mindhárom készüléknél elfogadható volt (variációs koefficiens, CV <5%) 1 Pa nyírófeszültség felett. Ez alatt (0,5 Pa) csak a LORCA mérések CV% értéke maradt 5% alatt. A vörösvérsejtek 0,001-0,005% glutaraldehiddel való elegyítésével, a rigid és ép sejtek 40%-os mixturájával, vagy 48 °C-on 9 percig tartó hőkezeléssel előidézett deformabilitás romlást mindhárom készülék jó érzékenységgel mutatta ki. A legmagasabb standardizált differencia értékeket a LORCA és a Rheoscan-D készülékek adták. (A megállapítások alapjául szolgáló közlemények: (1) Baskurt OK, Hardeman MR, Uyuklu M, Ulker P, Cengiz M, Németh N, Shin S, Alexy T, Meiselman HJ, *Biorheology* 2009;46:251-264.; (2) Baskurt OK, Hardeman MR, Uyuklu M, Ulker P, Cengiz M, Németh N, Shin S, Alexy T, Meiselman HJ, *Scan J Clin Lab Invest* 2009;69:777-788.)

A LoRRca készülékkel végezhető *ozmotikus gradiens ektacytometria (osmoscan) mérésekhez* 250 µl mennyiségű vért szuszpendálunk 5 ml PVP oldatban. A módszer során az EI mérésé állandó nyírófeszültség mellett (leggyakrabban 30 Pa) történik, miközben a szuszpendáló közeg ozmolalitása változik. Ezt a vér-PVP szuszpenzió, valamint 0 és 500 mOsm/kg ozmolalítású PVP oldat folyamatos adagolásával éri el a készülék. Az így kapott jellegzetes elongációs index-ozmolalítás görbék az alábbi paraméterekkel jellemezhetőek:

- maximális EI (EI_{max}) – ami nem azonos a parametrizációval nyert EI_{max} értékkel
- az EI_{max} felét adó EI érték a hyperozmolaris irányban (EI hyper)
- minimális EI érték a hypoozmolaris irányban (EI min)
- az ezekhez tartozó ozmolalítás értékek: O (EI max), O hyper, O EI min [mOsm/kg]
- a görbe alatti területből számolt Area

3.1.4. Vörösvérsejt membrán (mechanikus) stabilitási teszt

A *membrán stabilitás (mechanikus stabilitás) teszt* során két hagyományos deformabilitás mérés történik, amelyek között adott nagyságú és időtartamú nyírófeszültséggel zajlik a mechanikus stressz előidézése. Az expozíciós idő és a nyírófeszültség nagysága változtatható. A kapott EI-SS görbék analízise a fentiekben ismertetett módon történik. Kiszámítottuk továbbá a mechanikus stressz előtti és utáni értékek egymáshoz viszonyított arányát is.

3.1.5. Fénytranszmissziós aggregometria

A Myrenne MA-1 erythrocyta aggregometer (Myrenne GmbH, Németország) fénytranszmissziós elven, Schmid-Schönbein által leírt módszer szerint működik. A készülék vérmintát befogadó része egy 2°-os csiszolt üveg lencséből és egy ráhajtható üveg tárgylemezből áll (cone-plate rendszer). A mintegy 20 µl anticoagulált (K₃-EDTA, 1,5-1,8 mg/ml) vérmintát a lencse közepére cseppentjük, majd a tárgylemez ráhajtatásával a minta kör alakban szétterül, szélé felé növekvő vastagságban a lencse domborulata mentén. A tárgylemez felett egy infravörös dióda, a lencse alatt egy infravörös detektor helyezkedik el. A lencse egy rotor által forgatható egységbe van ágyazva, amely meghatározott szögsebességgel forgómozgást végez 600 s⁻¹ sebesség-gradienst generálva a mintára, amelyben így a vörösvérsejtek diszaggregálódnak, a minta fénytranszmissziója csökken. Amint a rotor leáll, a sejtek aggregálódni kezdenek, köztük a plazma fázis szélessége nő, így a fényáteresztőképesség is fokozódik. A diszaggregált állapothoz képest a folyamat 5. vagy 10. másodpercében meghatározott intenzitás adatokból származtathatóak az aggregációs index értékek. A mérésekhez két üzemmód választható: amennyiben a rotor teljesen leáll, azaz a sebesség-gradens 0 s⁻¹, M módról, ha lassan forog 3 s⁻¹ sebesség-gradiens mellett, M1 módról beszélünk. Így összesen négy index paraméter határozható meg: M 5 s, M1 5 s, M 10 s, M1 10 s. Fokozott vörösvérsejt aggregatio esetén ezek az index paraméterek növekednek. A készülék nem temperált.

3.1.6. Syllectometrián alapuló aggregometria

A *LoRRca* készülékkel történő mérések az aggregálódó vörösvérsejteket tartalmazó vérmintáról visszaverődő lézer szóródásának elemzésén alapul (syllectometria). A mérőkamrába 1 ml anticoagulált vérmintát kell tölteni. A mérések 37 °C-on történnek. A külső henger (cup) forgómozgásával (beállítható, rutinszerűen: 10 s, 500 s⁻¹) a mintában lévő vörösvérsejtek diszaggregálódnak, majd a rotor leállításával aggregálódni kezdenek. A statikus hengerből eredő lézer mintáról visszaverődő nyalábjaait szintén a belső cylinderbe épített két fotodióda érzékeli. A folyamat mintegy 120 másodpercig követhető, jellegzetes intenzitás-idő görbét rögzítve.

A készülék által meghatározott legfontosabb paraméterek:

- *aggregációs index (AI, [%])*: az intenzitásmaximum megjelenésétől a 10. másodpercig visszaverődő fény intenzitásváltozásából ($I_{sc_{top}} - I_{sc_0}$) származó görbe feletti terület (*A*) görbe feletti és alatti terület (*B*) összegéhez viszonyított aránya: $AI = A/(A+B)$.
- *amplitudo (Amp, [au])*: a maximális és minimális intenzitás értékek közötti különbség a vizsgált 120 másodperc során.
- *fél-amplitudo idő ($t_{1/2}$, [s])*: a maximális és minimális intenzitás értékek közötti különbség felének eléréséhez szükséges idő a maximális intenzitás értékek megjelenésétől.

Fokozott vörösvérsejt aggregatio esetén az AI, az Amp növekszik, a $t_{1/2}$ általában csökken.

A kereskedelmi forgalomban elérhető különböző geometriájú és működési elvű, vörösvérsejt aggregatio meghatározására szolgáló készülékek (Myrenne MA-1 aggregometer, LORCA ektacytometerrel végzett syllectometria, RheoScan-A aggregometer) összehasonlítható

elemzését nemzetközi munkacsoportban végeztük. A mérések varianciája mindhárom készüléknél elfogadható tartományon belül van ($CV < 5\%$). Az aggregációs folyamat időparamétereit jellemző értékeknél találtunk magasabb varianciát. Az aggregatio csökkentését (plazma hígítás) vagy fokozását (1% dextran 500) a legérzékenyebben a Myrenne és a LORCA készülékek tudták kimutatni. (A megállapítás alapjául szolgáló közlemény: Baskurt OK, Uyuklu M, Ulker P, Cengiz M, Németh N, Alexy T, Shin S, Hardeman MR, Meiselman HJ, Clin Hemorheol Microcirc 2009;43:283-298.)

3.2. Haematologiai, haemostaseologiai és egyéb laboratóriumi vizsgálatok

A haematologiai paraméterek, a laktát koncentráció, a vér pH és a vérgáz paraméterek vizsgálatához K_3 -EDTA-t (1,8 mg/ml, BD Vacutainer[®]), a coagulációs idő paraméterek és a fibrinogén koncentráció meghatározásához Na-citrátot (0,129 M, BD Vacutainer[®]) tartalmazó csövekbe vettük a vért.

Sysmex F-800 típusú haematologiai automatával (TOA Medical Electronics Co., Japán) határoztuk meg az általános haematologiai paramétereket: fehérvérsejtszám (Fvs [$10^3/\mu\text{l}$]), vörösvérsejtszám (Vvs [$10^6/\mu\text{l}$]), haemoglobin koncentráció (Hgb [g/dl]), haematocrit (Htc [%]), átlagos vörösvérsejt térfogat (mean corpuscular volume, MCV [fl]), átlagos vörösvérsejt haemoglobin tartalom (mean corpuscular hemoglobin, MCH [pg]), átlagos vörösvérsejt haemoglobin koncentráció (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC [g/dl]), thrombocyta szám (Thr [$10^3/\mu\text{l}$]), lymphocyta és monocyta+granulocyta %, vörösvérsejt eloszlási szélesség variációs koefficiens (red cell distribution width coefficient of variation, RDW-CV [%]) és átlagos thrombocyta térfogat (mean platelet volume, MPV [fl]).

A laktát koncentráció (mmol/l) és a vér pH meghatározására vérgáz analizátor automatát használtunk (ABL555 Radiometer Copenhagen, Denmark).

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

3.3. Hemodinamikai és mikrokeringési vizsgálatok

Adott kísérleteknél a szívfrekvencia [1/min] és az arteriás középnyomás [Hgmm] mérését hemodinamikai monitorozó rendszerrel végeztük (Haemosys konfiguráció, Experimetria Kft.). A rendszerrel a rectalis hőmérsékletet is mértük.

A mikrokeringés vizsgálatára laser Doppler-es szöveti áramlásmérőt használtunk (LD-01 Laser Doppler Tissue Flowmeter Experimetria Kft.; standard pencil probe MNP100XP, Oxford Optronix Ltd., UK). A készülék relatív áramlási egységet mér (blood flux unit, BFU), ami a mozgó vörösvérsejtekről visszaverődő lézer (hullámhossz = $780 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$, energia a mérőfej végénél = 0,5-1,0 mW, LD szignál = 10 Hz - 19 kHz) hullámhossz-változásának detektálásán alapszik. A transzmitter száloptikán keresztül kibocsátott laser fénynyaláb visszaverődik vagy részlegesen elnyelődik a vizsgált szövetekben, mintegy 0,5-1 mm mélységben. A mozgásban lévő vörösvérsejtekről szóródó fénynyaláb hullámhosszában változás történik (Doppler-shift), amelyet a mérőfejben elhelyezkedő fogadó száloptika segítségével érzékel a készülék. Az elektronikus jelle alakított információt szoftver analizálja tovább. A bekövetkezett változás nagysága arányos a vizsgált régióban lévő mozgó vörösvérsejtek számával és sebességével, de nem függ a mozgásuk irányától.

A mérések során a jel stabilizálódása után a BFU adatokat off-line elemeztük 20 másodperces stabil periódusok átlagértékeit használva.

4. HAEMORHEOLOGIAI MÓDSZERTANI ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATOK, MÉRÉSTECHNIKAI STANDARDIZÁCIÓ

4.1. A vérvétel helyének jelentősége (arterio-venosus és aorto-porto-cavalis különbségek)

Háttér, célkitűzés:

Klinikai vizsgálatok igazolták a macro-rheologiai paraméterek arterio-venosus különbségeit vascularis kórképekben, a micro-rheologiai változókról azonban kevés klinikai vagy experimentális adat ismert. Az állatkísérletes modellekben gyakran van szükség különböző anatómiai lokalizációjú erekből történő vérvételekre a lokális és szisztémás rheologiai változások vizsgálatához, többek között ischaemia-reperfusio során, amikor a kirekesztett régióban pangó vérben olyan metabolikus változások jöhetnek létre, amelyek reperfusiókor az egész szervezetre kifejthetik hatásukat.

Számos módszertani tanulmány utal arra, hogy a vér oxigenizáltsága befolyásolhatja a vizsgált haemorheologiai paramétereket, amely így fontos mérés technikai standardizációs szempont. A fiziológiás artériás és vénás parciális vérgáz értékek különbségei jól ismertek, azonban a micro-rheologiai paraméterek általános arterio-venosus illetve aorto-porto-cavalis különbsége még nem tisztázott teljesen, s kimutathatósága nagymértékben függ az alkalmazott mérőmódszer érzékenységétől is.

A kérdéskör vizsgálatára két tanulmányt végeztünk, különböző mérőműszerekkel.

Anyagok és módszerek 1:

Első kísérletünkben (engedélyszám: 37/2007., 6/2008. DE MÁB) 12 nőstény CD patkánytól (testsúly: $328,91 \pm 53,68$ g) altatásban (Na-thiophental, 60 mg/kg, i.p.) 26 G-s tűvel pungálva vért vettünk párhuzamosan az aorta abdominalis-ból és a vena cava caudalis-ból Na-EDTA-t (1,5 mg/ml) tartalmazó fecskendőkbe. A vérgáz paraméterek ($p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$ [Hgmm]) és a vér pH mellett az általános haematologiai paraméterek, a vörösvérsejt deformabilitás (RheoScan-D200 slit-flow ektacytometer; PVP viszkozitás: 30,51 mPa.s, ozmolalitás = 327 mOsm/kg; pH = 7,37) és a vörösvérsejt aggregatio (Myrenne MA-1 erythrocyta aggregometer) került meghatározásra.

Eredmények 1:

Az élettani viszonyoknak megfelelően a $p\text{O}_2$ értékek az aortából, a $p\text{CO}_2$ értékek a vena cava caudalis-ból nyert vérmintákban voltak magasabbak ($p < 0,001$), míg a vér pH értékek nem mutattak jelentős aorto-cavalis különbséget. A fehérvérsejtszám, a vörösvérsejtszám és a haematocrit értékek nem szignifikáns mértékben, de magasabbak voltak a vénás vérmintákban. A 3, 5, 10 és 20 Pa nyírófeszültség mellett mért elongációs index értékek a vénás vérmintákban kismértékben magasabbak voltak az artériás adatokhoz képest. Az aggregációs index értékek az artériás vérmintákban voltak magasabbak (M1 5 s, $p = 0,003$).

Anyagok és módszerek 2:

A másik tanulmányban (engedélyszám: 37/2007. DEMÁB, 6/2008. DEMÁB), miután beszerzésre kerülhetett a LoRRca MaxSis Omoscan készülék, pontosabb és szélesebb körű analízisre nyílt lehetőség. A kísérletben 13 Sprague-Dawley patkányt (Janvier Co., Franciaország) használtunk fel: 8 hím ($381,5 \pm 13,4$ g) és 5 nőstény ($292,2 \pm 20,9$ g) nemi eloszlásban. Általános anaesthesiában (Na-thiopentál 60 mg/kg, i.p.) median laparotomiát végeztünk és atraumatikus preparálási technika alkalmazásával feltártuk a vena portae-t, valamint az aorta abdominalis és a vena cava caudalis infrarenalis szakaszát.

A vérvételekhez ebben a kísérletben is 26 G-s tűhöz csatlakoztatott anticoagulanst (Na-EDTA, 1,5 mg/ml) tartalmazó fecskendőt használtunk. A vérminták vétele a következő sorrendnek megfelelően történt: 1. vena portae, 2. vena cava caudalis, 3. aorta abdominalis. Minden érből 0,6-0,8 ml mennyiségű vért vettünk. A mintákat a lehető legrövidebb időn belül lemértük (teljes *in vitro* idő: <30 perc).

Eredmények 2:

A laktát koncentráció kismértékben, de szignifikánsan magasabb volt az artériás vérmintákban (vs. szisztémás vénás vérminták: $p=0,001$; vs. portális vénás vérminták: $p=0,064$). Vér pH értéke magasabb volt az artériás vérmintákban (vs. szisztémás vénás vérminták: $p=0,002$; vs. portális vénás vérminták $p=0,008$), amíg a szisztémás vénás és a portális vénás mintákban majdnem azonosak voltak.

A vérgáz paraméterek az élettanilag vártak szerint alakultak. A pO_2 az artériás vérben volt a legmagasabb (vs. szisztémás vénás vérminták: $p<0,001$; és vs. portális vénás vérminták: $p<0,001$), míg a pCO_2 a szisztémás vénás vérben (vs. szisztémás vénás vérminta: $p=0,028$; és vs. portális vénás vérminta: $p=0,063$). A fehérvérsejtszám kisebb volt az artériás vérmintákban, mint a szisztémás vénás ($p=0,013$) és portális vénás vérmintákban ($p=0,009$). Bár nem szignifikánsan, de a vörösvérsejtszám és a haematocrit értékei kismértékben magasabbak voltak a szisztémás és a portális vénás vérmintákban. A thrombocyta szám kismértékben nagyobb volt a szisztémás vénás és portális vénás vérmintákban. A többi vizsgált haematologiai paraméter értékeiben nem volt számottevő különbség.

A legmagasabb EI értékeket a szisztémás vénás vérmintákban, a legalacsonyabbat az artériás vérmintákban mértük, míg a portális vénás értékek a kettő közé estek. A 3 Pa nyírófeszültségnél mért EI értékek az artériás vérmintákban szignifikánsan alacsonyabbak voltak a szisztémás vénás ($p=0,036$) és portális vérmintákhoz képest ($p=0,039$). Az EI_{max} értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak az artériás vérmintákban, mint a szisztémás vénás vérmintákban ($p=0,004$). Az $SS_{1/2}$ értékek magasabbak voltak az artériás vérmintákban, mint a szisztémás vénás vérmintákban ($p=0,023$). Az artériás és portális vénás vérminták közti különbség nem volt szignifikáns.

A portális vénás vérmintákban kismértékben torzuló EI-ozmolalitás görbékét láttunk fluktuáló értékekkel és kevésbé meredek lefutással a magasabb ozmolalitás értékeknél (350-400 mOsm/kg). A minimális elongációs index értékek kismértékben magasabbak voltak a szisztémás és portális vénás vérmintákban. A maximális EI értékek nem különböztek egymástól, csak a vénás vérmintákban voltak kissé emelkedettek. Az EI hyper mérsékeltén nagyobb volt mindkét vénás mintában az artériás vérmintákhoz képest. Az EI max-nál mérhető ozmolalitás kismértékben ugyan, de magasabb volt a szisztémás vénás vérmintákban, mint az artériásban. A legalacsonyabb a portális vénás mintában volt ($p=0,072$).

Az artériás vérben az 5. másodpercben mért vörösvérsejt aggregációs index M paraméterei bizonyultak a legalacsonyabbnak a szisztémás vénás és a portális vénás vérmintákhoz képest, de a különbség nem volt szignifikáns. Az 5 másodperces M1 paraméter az artériás vérmintákban volt magasabb, mint a szisztémás vérmintában. A legmagasabb M1 értékeket a portális vénás vérmintákban mértük ($p=0,055$ vs. szisztémás vénás). Az M 10 s index értékek már jelentős különbséget mutattak. A vena cava caudalisból vett mintában volt a legalacsonyabb, amely szignifikánsnak bizonyult az artériás ($p=0,001$) és a portális vénás ($p<0,001$) mintákhoz képest. A 10. másodperces M1 értékek esetén nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. Az artériás vérmintákban mérsékeltén magasabbak voltak a szisztémás vénás értékekhez képest, míg a legmagasabb értékeket a portális vénás mintákban mértük.

Konklúzió:

Összegzésképpen elmondható, hogy az ektacytometerrel meghatározott vörösvérsejt deformabilitás és a fénytranszmissziós elven működő aggregometerrel mért vörösvérsejt aggregatio patkány aorta abdominalis-ból, vena cava caudalis-ból illetve vena portae-ből nyert vérmintákban nem azonos, alátámasztva a mintavételi lokalizáció pontos megtervezésének fontosságát az adatok összehasonlíthatósága szempontjából.

A fejezet alapjául szolgáló közlemények: (1) Hevér T, Kiss F, Sajtos E, Mátyás L, Németh N, Korea-Aust Rheol J 2010;22:59-64.; (2) Klárik Z, Kiss F, Mikó I, Németh N, Clin Hemorheol Microcirc 2013;53:217-229.

4.2. Az anticoagulánsok hatása a micro-rheológiai paraméterekre

Háttér, célkitűzés:

Az általánosan javasolt anticoaguláns szer a legtöbb haemorheológiai vizsgálathoz (vörösvérsejt deformabilitás, vörösvérsejt aggregatio meghatározás különböző módszerei) a etilén-diamin-tetraacétsav kálium sója (K₃-EDTA, 1,5-1,8 mg/ml). Azonban erek kanulálásakor, intravasculáris beavatkozásoknál, ér-anastomosisok készítésekor az állatkísérletekben is szükséges lehet a heparin nátrium-sójának lokális vagy szisztémás alkalmazása. Így ezekben a kísérletes modellekben a heparin is elfogadott és szükséges anticoaguláns a haemorheológiai vizsgálatokhoz. A heparin vörösvérsejt deformabilitásra kifejtett hatásairól kevés adat áll rendelkezésre, s feltételezésünk szerint eltérő mértékű változásokat okozhat az állatfajokban.

Anyagok és módszerek:

Nőstény CD patkányoktól (n=5, 300,4±30,9 g) altatásban (60 mg/kg pentobarbital, i.p.) a szív punctiója révén, és nőstény beagle kutyáktól (n=5, 12±2,13 kg) a vena cephalica-ból zárt vérvételi rendszerben vért vettünk 1,5 mg/ml K₃-EDTA-t és 10 U/ml Na-heparin-t tartalmazó Vacutainer[®] csövekbe. A méréseket a vérvételt követően 1 órán belül elvégeztük. Meghatároztuk a haematológiai paramétereket (Sysmex F-800 microcell counter), valamint a vörösvérsejt deformabilitást slit-flow ektacytometerrel.

Eredmények:

Ahogy várható volt, a thrombocytaszám jelentősen alacsonyabb volt mindkét faj Na-heparinos vérmintáiban a K₃-EDTA-s mintákhoz képest, míg a többi haematológiai paraméter nem mutatott számottevő eltérést. A vörösvérsejt deformabilitást jellemző elongációs index adatokban azonban jelentős különbség mutatkozott a két vizsgált állatfaj vérmintái között. Patkányoknál az EI identikus volt a Na-heparinos és a K₃-EDTA-s vérmintákban, míg beagle kutyáknál a heparinos vérminta EI értékei 2,5 és 10 Pa nyírófeszültség tartományban szignifikánsan alacsonyabbak voltak a K₃-EDTA-s vérmintáknál.

Konklúzió:

Az adatok a különböző anticoaguláns szereket tartalmazó vérminták haemorheológiai összehasonlíthatóságának nehézségeire, lehetséges faji különbségeire, a megfelelő mintavételi protokoll megtervezésére és az adekvát kontroll vizsgálatokra hívhatják fel a figyelmet. Az ezirányú összehasonlító vizsgálatok folytatása többféle anticoaguláns szer alkalmazásával és szélesebb körű faji összehasonlítással -beleértve a humán vérminták micro-rheológiai elemzését is- indokolt lehet.

A fejezet alapjául szolgáló rövid közlemény: Németh N, Baskurt OK, Meiselman HJ, Mikó I, Clin Hemorheol Microcirc 2009;43:257-259.

4.3. A tárolási idő és hőmérséklet eltérő hatása különböző állatfajok vérmintáin

Háttér, célkitűzés:

Számos alkalommal merül fel a vérvétel és az elvégzett laboratóriumi mérések között eltelt idő, az *in vitro* tárolás („*in vitro* aging”) befolyásoló hatásának problémája. Ez nemcsak a mindennapi analitikai munka során fontos kérdés, hanem a vérminták egyes laboratóriumok közötti transzportja szempontjából is (akár másik országba/államba). Ilyenkor nemcsak az idő, hanem a hőmérséklet és annak állandósága is alapvető fontosságú a későbbi megbízható mérések szempontjából. A vörösvérsejtek tárolása során metabolikus depléció, megzavart ion homeostasis (lassuló majd leálló ion pumpák), protein és lipid módosulások (oxidáció, degradáció, keresztkötések) jönnek létre, amelyek a sejt volumen, így a felszín-térfogat arány, az intracellularis haemoglobin koncentráció változása, továbbá a protein és lipid módosulások miatt a membrán viszkoelasztikus tulajdonságaiban bekövetkező változások módosíthatják a vörösvérsejtek deformabilitását.

A haemorheologiai paraméterek kapcsán metodika-függő klinikai laboratóriumi adatok már elérhetőek, humán vérminták vizsgálatára ajánlások ismertek. Állatkísérletes vonatkozásban azonban a különböző fajok vérmintáinak érzékenységről e téren is alig ismertek adatok egyes haematologiai paraméterek kivételével.

Anyagok és módszerek 1:

Vizsgálatunk során (engedélyszám: 37/2007. DE MÁB) nőtény CD patkányoktól ($n=5$, 329 ± 83 g) terminális vérvételként a reggeli órákban altatásban (Na-pentobarbitál, 35 mg/kg, i.p.) a szív direkt punkciójával, és nem-terminális vérvételként beagle kutyáktól ($n=5$, $12,1\pm 2,13$ kg) a vena cephalica-ból zárt vérvételi rendszerbe (BD Vacutainer[®], K₃-EDTA) 7-8 ml vért vettünk. Meghatározásra kerültek a haematologiai paraméterek (Sysmex F-800 automata), a vér- és plazmaviszkozitás (Hevimet-40 kapilláris viszkoziméter), a vörösvérsejt deformabilitás (RheoScan-D200 slit-flow ektacytometer) és a vörösvérsejt aggregatio (Myrenne MA-1 erythrocyta aggregometer). Az első méréseket 10-15 perccel a vérvétel után elvégeztük (0. óra). A vérminták egy részét 4-8 °C-on hőszigetelt dobozban elhelyezett tört jeget tartalmazó tasakok mellett tároltuk 24, 48, illetve 72 óráig. A dobozon belüli hőmérsékletet monitoroztuk (0. óra: 4,4 °C, 24. óra: 6,1 °C, 48 óra: 6,8 °C, 72. óra: 9,8 °C). A mérések előtt a hűtve tárolt vérmintákat 20 percig szobahőmérsékleten hagytuk és óvatosan átforgattuk. A vérminták másik felét szobahőmérsékleten (22-23 °C) tároltuk, és 2, 4, 6, 24, 48 és 72 óra elteltével mértük.

Eredmények 1:

A haematologiai paraméterek közül a vörösvérsejt átlagos térfogat (MCV [fl]) értékek az első 6 órán belül egyik faj vérmintájában sem mutattak jelentős változást szobahőmérsékleten való tárolás esetén. 24 óra elteltével már mindkét faj esetén jelentősen nőtt az MCV értéke, legnagyobb mértékben patkányoknál (közel 25%-os növekedés). Hűtéssel történt tárolásnál az MCV növekedése mindkét állatfajnál kiküszöbölhető volt a vizsgált 72 óra alatt.

Az 1 ml vagy afölötti szükséges mintamennyiség miatt (4.1.1. fejezet) a filtrometriás- és viszkozitás méréseket csak a beagle kutyák hűtéssel tárolt mintáinál tudtuk elvégezni. A teljes vér viszkozitásában (sebesség-gradiens: 90 s^{-1}) a hűtéssel történő tárolás esetén 24 óra elteltével tapasztaltunk emelkedést, amely változás az alapértékhez képest szignifikáns mértékűnek bizonyult. A plazma viszkozitás ezzel párhuzamosan csökkent, 48 óra elteltével mutatott szignifikáns eltérést. A filtrometriás vörösvérsejt deformabilitás mérések során meghatározott kezdeti relatív filtrációs ráta (IRFR) értékeiben a tárolás során folyamatos csökkenés mutatkozott, amely a 72 óra elteltével szignifikánsan mértéket ért el. A relatív sejt-tranzitidő (RCTT) értékek emelkedtek, mértéke már a tárolás 24. órájában szignifikáns volt, romló vörösvérsejt deformabilitásra utalva.

A vörösvérsejt deformabilitás ektacytometriás mérését és az aggregációs vizsgálatokat minden mintán el tudtuk végezni. A patkány vérminták vörösvérsejt deformabilitás értékekben a szobahőmérsékleten való tárolás során az első 6 órában változást nem tapasztaltunk, de ezt követően jelentős és folyamatos elongációs index csökkenés mutatkozott. 24 óra elteltével a 10-20 Pa közötti nyírófeszültség tartományban volt jelentős romlás, majd 48 és 72 óra múlva az alacsonyabb nyírófeszültség értéknél is szignifikáns EI romlást tapasztaltunk az alapértékekhez képest ($p<0,001$). Hűtéssel való tárolásnál ez a romlás kivédhető volt. A beagle kutyák vérmintáiban az EI értékek állandónak mutatkoztak az első 6 órában, szobahőmérsékleten. A változások mértéke mérsékeltebb volt: 24 és 48 óra elteltével EI emelkedés, majd 72 óra elteltével szignifikánsan csökkenés volt megfigyelhető, amely hűtéssel elkerülhető volt.

Beagle kutyák vérmintáiban a tárolási idő függvényében fokozatos vörösvérsejt aggregációs index (M 5 s, M1 5 s) csökkenést tapasztaltunk (két óránként 6-8%-os csökkenés), amely 24 óra elteltével is folytatódott. A hűtés lassította, de nem akadályozta a folyamatot.

Patkány vérminták aggregációs index értékeiben (M 5 s, M1 5 s) már 2 óra elteltével 40-60%-os csökkenését észleltük, amely csökkenés tovább folytatódott 6 óra elteltével is. Meglepő módon 24 óra tárolás után az aggregációs index értékek növekedni kezdtek, megközelítve, majd elérve a kiindulási értékeket. A 4-8 °C-on történő tárolással az aggregációs index értékek mindvégig alacsonyabbak maradtak az alapértékekhez képest.

Ezt a paradox jelenséget -megerősítésképpen- együttműködésben az Antalya-i Egyetem haemorheologiai kutatólaboratóriumában hasonló fénytranszmissziós aggregometerrel is kimutattuk. Mikroszkópos vizsgálattal kimutatható volt, hogy a jelenség háttérében az echinocytá sejtalakok nagymennyiségű képződése állhat, ami jellemző a környezeti hatásokra igen érzékeny patkány vörösvérsejtekre. Ismert, hogy ezek a sejtalakok nehezen aggregálódnak. Az idő előrehaladásával és a sejtek duzzadásával e formák száma kevesebb lett. A discocytá, stomatocytá és a sphero-stomatocytá alakok már könnyebben aggregálódnak, paradox módon így „normalizálva” az aggregációs index értékeket.

Konklúzió 1:

Adataink a vérminták tárolása és a haemorheologiai laboratóriumok közötti esetleges szállítása kapcsán nyújthatnak támpontot. A tárolási idő és hőmérséklet kapcsán mutatkozó nagyfokú különbség a két vizsgált laboratóriumi állatfaj vérmintájának érzékenységében jelentősen befolyásolhatja a kísérletekben nyert eredmények értékelhetőségét. Beagle kutya és patkány vérmintáknál a deformabilitási méréseket 4-6 órán belül el kell végezni, de a legjobb 2 órán belül. Az aggregációs méréseket patkány vérminták esetén lehetőleg közvetlenül a vérvételt követően el kell végezni.

Anyagok és módszerek 2:

Nemzetközi munkacsoportban humán vérmintákon is elemeztük a tárolási idő és hőmérséklet hatását. Tíz egészséges férfi önkéntestől (életkor: 25-52 év) az antecubitális vénák egyikéből vért vettünk (Na-heparin, 15 U/ml), majd a mintákat 20 részre, almintákra osztottuk (2 ml/alminta): 10 szobahőmérsékleten (25 ± 2 °C), 10 hűtőben (4 ± 2 °C) került tárolásra 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 illetve 24 óra időtartamra. A vörösvérsejt deformabilitást LORCA ektacytométerrel, a vörösvérsejt aggregációt a Myrenne MA-1 készülékkel analóg fotometriás aggregometerrel mértük. Az összehasonító elemzéshez az elongációs index – nyírófeszültség görbék parametrizálásával nyert $SS_{1/2}$ értékeket (a maximális elongációs index értékek feléhez tartozó nyírófeszültség) és az aggregációs folyamat 10. másodpercénél meghatározott M index értéket használtuk.

Eredmények 2:

Az $SS_{1/2}$ értékek 6 órán keresztül stabilak voltak mind szobahőmérsékleten, mind hűtőben való tárolás során. Nyolc órás tárolásnál az értékek szignifikánsan megemelkedtek ($p < 0,01$), ezzel párhuzamosan a maximális elongációs index (EI_{max}) értékek jelentősen csökkentek ($p < 0,01$). Ezt követően az $SS_{1/2}$ az EI_{max} értékekkel együtt csökkent. A hűtés a folyamatot kismértékben lassította. A vörösvérsejt aggregatio M indexe a 4. órát követően a tárolási idővel csökkent, amelyet a hűtés jelentősen lassított.

Konklúzió 2:

Egészséges humán vérminták ektacytometriás deformabilitás értékei 6 órán, a fénytranszmissziós elvű aggregációs mérések szobahőmérsékleten 4 órán belül stabilak. Az aggregációs mérések ideje hűtéssel mintegy 12 óráig prolongálható, deformabilitás méréseknél 6 órán túl már romlásra kell számítani.

A fejezet alapjául szolgáló közlemények: (1) Németh N, Baskurt OK, Meiselman HJ, Kiss F, Uyuklu M, Hevér T, Sajtos E, Kenyeres P, Tóth K, Furka I, Mikó I, Korea-Aust Rheol J 2009;21:127-133.; (2) Uyuklu M, Cengiz M, Ulker P, Hevér T, Tripette J, Connes P, Németh N, Meiselman HJ, Baskurt OK, Clin Hemorheol Microcirc 2009;41:269-278.

4.4. A centrifugálás eltérő hatása különböző állatfajok vérmintáin

Háttér, célkitűzés:

A laboratóriumi mérésekhez való mintaelőkészítés során a centrifugálás (különböző hőmérséklet, idő és g erő kombinációiban) a mindennapok része. Haemorheológiai méréseknél a különböző vörösvérsejt-autológ plazma és vörösvérsejt-puffer szuszpenziók készítéséhez elengedhetetlen a minták többszöri centrifugálása, a sejtek „mosása” különböző pufferekben. A centrifugálás során jelentős mechanikus stressz érheti a sejteket. A vörösvérsejtek potenciális károsodása nagyban függ az alkalmazott mechanikus stressz nagyságától és időtartamától. A centrifugálás során a vörösvérsejtek víztartalma csökkenhet, amely az átlagos corpuscularis haemoglobin koncentráció emelkedéséhez, így deformabilitás romláshoz és a nyírófeszültséggel szembeni kisebb tűrőképességhez vezet. A mechanikus károsodásban a centrifugálás során fontos tényező a sejtekre ható nyomás is (tubusfal-sejt és sejt-sejt közötti relációban). Maga a plazma, a plazmaproteinek fontos szerepet játszanak a vörösvérsejtek mechanikus stresszel szembeni ellenállóképességük tekintetében, a haemolysis ellen való védelemben.

Kevés adat ismert azonban a különböző idejű és erejű centrifugálás haemorheológiai paraméterekre kifejtett hatásáról. A cellularis és plazmatikus összetevők különbségeinek tükrében feltételeztük, hogy a centrifugálás micro-rheológiai hatása is eltérő mértékű lehet a kísérleti/laboratóriumi állatfajok (pl. patkány, kutya, sertés) és az ember vérmintáiban.

Anyagok és módszerek:

A vizsgálatokhoz (engedélyszám: 19/2011. DE MÁB) az alábbi állatfajok egészséges egyedek vérmintáit használtuk fel: 8 hím Sprague-Dawley patkány ($408 \pm 59,7$ g, 6-8 hónapos), 7 nőstény beagle kutya ($12,6 \pm 1,3$ kg, 17-19 hónapos) és 9 nőstény Hungahib sertés ($16,2 \pm 1,9$ kg, 10-12 hetes). A humán vérminták 15 egészséges önkéntestől származtak (11 nő, 4 férfi, életkor: 26-40 év) (engedélyszám: DE OEC RKEB/IKEB 3625-2012). A vérvételek a reggeli órákban történtek patkányoktól altatásban (60 mg/kg Thiopenthal, i.p.) terminális vérvételként a szívből, beagle kutyáktól a vena cephalica punkciójával, sertésből bódításban (10 mg/kg ketamin + 1 mg/ xylazin kg, i.m.) a vena saphena medialis punkciójával. Emberben a vena mediana cubiti-ből vették a vért. A punkciók mindegyik faj esetében 21 G-s tűvel történtek, zárt vérvételi rendszerben (BD Vacutainer[®], K₃-EDTA, 1,8 mg/ml). Röviddel a vérvételeket követően a mintákat négy részre osztottuk: alapmérésekre és három különböző beállítású centrifugálás vizsgálatára. A szinte végtelen kombinációjú centrifugálási beállítások közül az alábbiakat választottuk: 500 g, 1000 g vagy 1500 g mellett 10 percig, 15 °C-on (Hettich Universal 32 R centrifuga, Hettich Co., Németország). A centrifugált mintákat a mérések előtt óvatosan átforgattuk a homogenizálás érdekében. Meghatározásra kerültek a haematológiai paraméterek (Sysmex F-800-as automata), a vörösvérsejt aggregatio (Myrenne MA-1 aggregometer), a vörösvérsejt deformabilitás, ozmotikus gradiens ektacytometriás paraméterek, valamint a membránstabilitás (alkalmazott mechanikus stressz: 100 Pa, 300 s) (LoRRca MaxSis Osmoscan). A méréseket 1-2 órán belül el tudtuk végezni.

Eredmények:

A centrifugálás a kutya vérmintákban okozott kismértékben sejtduzzadást (az MCV 2-5%-kal nőtt). Jellemző változás volt mindegyik faj valamennyi centrifugált vérmintáiban, hogy az MCHC kismértékben növekedett, legnagyobb mértékben a humán vérmintákban (4-12%). A különbségek azonban nem érték el a szignifikáns mértéket.

A centrifugálás egyik beállítás mellett sem okozott kimutatható deformabilitás változást. Az ozmotikus gradiens ektacytometriás paraméterek sem változtak jelentősen. A membránstabilitási teszt során a humán vérminták kivételével egyik fajnál sem mutatkozott jelentős differencia az alapminták és a különböző beállításokkal centrifugált vérminták

membránstabilitási értékei között. Az emberi mintákban a magasabb g erő mellett végzett centrifugálás hatására a membránstabilitási teszt során alkalmazott mechanikus stressz hatására már kevésbé romlott a deformabilitás.

A vörösvérsejt aggregációs index értékek változásai voltak a leginkább szembetűnőek. A patkány vérminták valamennyi index értéke az alkalmazott g erő növelésével csökkent. Az 1500 g -vel végzett centrifugálásnál ez a csökkenés 50%-nál nagyobb mértékű volt ($p < 0,001$). A kutya vérmintákban hasonló irányú, de jóval kisebb csökkenés mutatkozott leginkább a 5. másodperces index értékekben (M1 5 s 1500 g -nél: $p < 0,001$). Ezzel szemben a sertés vörösvérsejtek aggregációs index értékei növekedtek a centrifugálás hatására, már az 500 g erőt alkalmazó beállításnál is. M-módban, azaz stasisnál végzett méréseknél az alapmintákhoz képest közel kétszeresére nőttek az index értékek valamennyi centrifugált mintában (M 5 s, M 10 s, $p < 0,001$). M1-módban, azaz 3 s^{-1} sebesség-gradiensnél végzett aggregációs méréseknél (M1 5 s, M1 10 s) ez a növekedés kisebb mértékben ugyan, de megfigyelhető volt. A legstabilabbnak a humán vérminták bizonyultak: a centrifugálás hatására egyik index paraméter sem mutatott számottevő változást.

Összegzés, konklúzió:

Az eredmények alapján elmondható, hogy az 500 g , 1000 g vagy 1500 g erővel 10 percig 15 °C-on végzett centrifugálás hatására a vörösvérsejt deformabilitás (beleértve az ozmotikus gradiens ektacytometriás paramétereket is), valamint a membránstabilitás (5 perces, 100 Pa nyírófeszültség alkalmazása után) nem változik jelentősen patkány, kutya, sertés és emberi vérmintákban. A vörösvérsejt aggregációban azonban különböző mértékű és irányú változások várhatóak. Patkány és kutya vörösvérsejt aggregációs index értékei (M 5 s, M1 5 s, M 10 s, M1 10 s) az alkalmazott g erő növelésével csökkennek, a sertések értékei már 500 g -nél jelentősen megemelkednek (1500 g -ig már alig változnak), míg a humán vörösvérsejtek értékei stabilak maradnak.

A fejezet alapjául szolgáló közlemény: Kiss F, Tóth E, Miszti-Blasius K, Németh N, Clin Hemorheol Microcirc 2016;62(3):215-227.

4.5. Filtrometria: sejtméret-pórusméret arány befolyásoló hatása

Háttér, célkitűzés:

A vörösvérsejt deformabilitás filtrometriával való meghatározása a klinikai haemorheologiai laboratóriumokban is széles körben ismert módszer, amelynek magyar (pécsi és debreceni) vonatkozásai is vannak. A vizsgálatokhoz szükséges mennyiségű, a standard előírások szerinti 5%-os haematocritú vörösvérsejt szuszpenzió előállításához 2-2,5 ml vér vétele szükséges. Állatkísérletes vonatkozásban –főleg a laboratóriumi kisállat modelleken– ez a vérmennyiség komoly problémát jelent. Ezért korábbi vizsgálatainkban a szuszpenzió Htc-ját 5%-ról 1%-ra csökkentettük, s így lehetővé vált patkányokon utánkötéses vizsgálatok kivitelezése is, alkalmanként 0,5 ml vér vételével. Azonban a módszer magában rejti annak veszélyét, hogy a különböző haematocritú szuszpenziók adatai között jelentős különbségek adódhatnak. Fontos szempont emellett az adott állatfaj vörösvérsejtjeinek alakja, mérete és az alkalmazott filterek pórusátmérője (sejtméret-pórusméret arány), amelyek befolyásolhatják a mérések érzékenységét.

A kérdéskört több állatfaj különböző haematocritú vörösvérsejt-suszpenzióit használva vizsgáltuk eltérő pórusátmérű filterekkel.

Anyagok és módszerek:

Összehasonlító vizsgálataink során (engedélyszám: 13/2003. DE MÁB) elsőként hím A/J egerek ($n=16$; $25,71 \pm 3,86 \text{ g}$), CD patkányok ($n=16$; $278,6 \pm 37,34 \text{ g}$) és keverék kutyák ($n=12$; $19,95 \pm 4,84 \text{ kg}$) vérmintáiból normál foszfátpufferben (PBS; $\text{pH}=7,4$, ozmolalitás=300 mOsm/kg) 1, 2, 3, 4 és 5%-os haematocritú vörösvérsejt szuszpenziót készítettünk. Minden mintában meghatároztuk a haematologiai paramétereket (Sysmex F-800 microcell counter).

A mintákat Carat FT-1 filtrometerrel mértük 3 és 5 μm pórusátmérőjű polikarbonát filteren, állandó nyomás mellett (4 vízcm). Meghatározásra került a kezdeti relatív filtrációs sebesség (initial relative filtration rate, IRFR), valamint a szuszpenzió haematocritjának ismeretében a relatív sejt-tranzitidő (relative cell transit time, RCTT) (3.1.2. fejezet).

Eredmények:

Mindhárom fajban a legmagasabb IRFR értékeket az 1%-os, a legalacsonyabbakat az 5%-os szuszpenziókban mértük. A különbség a standardnak tekintett 5%-os mintához képest szignifikánsnak bizonyult egér esetén a 1 és 2%-os mintában, patkánynál az 1, 2 és 3%-os mintákban mind a 3, mind az 5 μm -es filterrel mérve. Kutyánál az 5 μm -os filterrel csak az 1%-os, míg 3 μm -os filterrel az 1, 2 és 3 %-os szuszpenziók értékei is jelentősen különböztek a standardtól. Azonban az RCTT értékek nem változtak konzekvensen. Egerek és patkányok vérmintáiban a legalacsonyabb RCTT értékeket az 1%-os, a legmagasabbakat az 5%-os haematocritú mintákban mértük 5 μm pórusátmérőjű filteren, míg keverék kutyák vérmintáiban az 1 és 2%-os haematocritú szuszpenziók RCTT értékei jelentősen nagyobbak voltak, mint a 3-5%-os mintákban. A 3 μm pórusátmérőjű filteren végzett méréseknél ez a jelenség mindhárom faj vérmintában megfigyelhető volt.

Egy másik kísérletsorozatban beagle kutyáknál ($n=5$; $13,25 \pm 1,76$ kg) is tovább vizsgáltuk a sejtméret-pórusméret arány kérdését, amely során különbséget találtunk a keverék kutya adatokhoz képest is: az RCTT 1-2%-os haematocritú szuszpenziókban keverék kutyáknál tapasztalt emelkedése beagle kutyák vérmintáiban nem volt egyértelműen megfigyelhető, függetlenül attól, hogy az átlagos vörösvérsejt térfogat értékekben nem volt különbség ($70 \pm 2,33$ vs. $70,03 \pm 3,26$ fl).

Az IRFR és RCTT paraméterek egymáshoz való viszonyát ezután matematikai elemzésnek vetettük alá (IRFR-RCTT adatpár görbék különböző haematocrit mellett). Kimutattuk a filtrációs mérések lehetséges torzító hatását (amely abból következik, hogy az RCTT-t adó egyenletben a Htc nevezőként szerepel). Ez főként laboratóriumi kisállatok (egér, patkány) vérmintáinak vizsgálatakor jelentkezhet, e módszerrel nehezen meghatározható sejtméret-pórusméret határ alatt.

Konklúzió:

Az adatok alapján megállapítható volt, hogy a jól összehasonlítható mérésekhez 3 μm pórusátmérőjű filter esetén egérben, patkányban, keverék- és beagle kutyában csak 3-5% haematocritú, 5 μm pórusátmérőjű filter esetén egérben és patkányban 1-5% haematocritú, keverék- és beagle kutyában 3-5% haematocritú vörösvérsejt szuszpenzió használata ajánlott. A fejezet alapjául szolgáló közlemények: (1) [Németh N](#), Gulyás A, Bálint A, Petó K, Bráth E, Kiss F, Furka I, Baskurt OK, Mikó I, *Microsurgery* 2006;26:33-37.; (2) [Németh N](#), Baskurt OK, Meiselman HJ, Furka I, Mikó I, *Korea-Aust Rheol J* 2009;21:155-160.

4.6. Ektacytometria: a szuszpendáló közeg viszkozitásának hatása

Háttér, célkitűzés:

Ahhoz, hogy a vörösvérsejtek elongálódni tudjanak az ektacytometriás méréseknél, nyíróerőnek kell őket kitenni, ami a vérplazmához képest magas viszkozitású makromolekula (polyvinyl-pyrrolidon, PVP vagy dexrán-70) oldatban valósul meg. Ez a szuszpendáló közeg adja át a nyíróerőt a vörösvérsejt membránnak. Ha a viszkozitás alacsony, akkor erő hatására a sejtek elnyúlás nélkül, pörgő mozgást végeznek a mintában, jelentősen megváltoztatva a mérések szenzitivitását is. A kereskedelmi forgalomban is elérhető (készen megrendelhető) vagy elkészíthető PVP oldatok viszkozitása humán vonatkozásban akár nagymértékben is befolyásolhatja a vörösvérsejt deformabilitási méréseket.

Állatkísérletes vonatkozásban nem ismertek erre vonatkozó összehasonlító adatok. Feltételeztük, hogy a PVP oldatok viszkozitásának növelésével a vörösvérsejt deformabilitás változásai is érzékenyebben mutathatóak ki.

Anyagok és módszerek:

Összehasonlító vizsgálatunk során (engedélyszám: 37/2007. DE MÁB) 10 hím (12,9±1,6 kg) és 10 nőstény (12,3±2,3 kg) inbred beagle kutyától a vena cephalica, valamint 10 hím (455,6±38,1 g) és 10 nőstény (284,8±14,3 g) Sprague-Dawley patkánytól a lateralis farokvéna punctiója révén vért vettünk (K₃-EDTA, 1,5 mg/ml) a vörösvérsejt deformabilitás meghatározásához (RheoScan-D200 slit-flow ektacytometer). Párhuzamos mérésekhez 15, 20 és 30 mPas viszkozitású, izotóniás PVP (360 kDa, osmolalitás= ~295 mOsm/kg, pH=~7,4) oldatot használtunk.

Eredmények:

A mérésekkel szignifikáns különbségeket találtunk ugyanazon vérminták eltérő viszkozitású PVP oldat alkalmazásával meghatározott vörösvérsejt elongációs index (EI) értékeiben. A legmagasabb EI értékeket, azaz a nyíróerő hatására legnagyobb mértékben bekövetkező deformabilitást mindkét vizsgált állatfaj vérmintáin a 30 mPas viszkozitású PVP oldat alkalmazásával mértük. A hím-nőstény összehasonlításban is a legnagyobb különbség a nagyobb viszkozitású közegben mutatkozott, azaz a mérések itt érzékenyebbek voltak. A 20 mPas viszkozitású közegben az EI-nyírófeszültség görbe bár alacsonyabb értékeket adott, stabil és jól értékelhető adatokat biztosított. A 15 mPas-os mintákban a görbék lefutásában a 2 Pa alatti és a 10-15 Pa feletti nyírófeszültség tartományban enyhe fokú torzulást tapasztaltunk.

A mérések reprodukálhatósága is eltérő volt az egyes mintákban. A legnagyobb variabilitást mindkét állatfajnál a 30 mPas viszkozitású közegben történt méréseknél tapasztaltuk 2-3 Pa alatt, jellemzően a 0,5-1 Pa nyírófeszültség tartományban. A nyíróerő növekedésével a CV% értékek 5% alá csökkentek, leghamarabb a 30 mPas-os oldat használatával (patkány: 4 Pa, kutya: 3 Pa). Ugyanez a 15, illetve 20 mPas-os oldatok esetén csak a nagyobb nyírófeszültség értékek elérésével volt látható (patkány: 6-7 Pa, kutya: 5-6 Pa).

Konklúzió:

Az adatok az ektacytometriás méréseknél alkalmazott PVP oldatok elkészítésekor adódó viszkozitás különbségek okozta szignifikáns mértékű elongációs index eltérésekre hívhatják fel a figyelmet, támpontot nyújtva a kísérletek eredményeinek összehasonlíthatóságához.

A fejezet alapjául szolgáló közlemény: Kiss F, Sajtos E, Mátyás L, Magyar Zs, Furka I, Mikó I, Németh N, Korea-Aust Rheol J 2010;22:113-118.

4.7. Új adatelemzési és interpretálási módszer az ozmotikus gradiens ektacytometria mérésekhez

Háttér, célkitűzés:

A vörösvérsejtek deformabilitását jelentősen befolyásolják a mikrokörnyezeti tényezők, mint a pH és az ozmolaritás. Utóbbi főként a sejtek térfogat változásából adódóan okoz deformabilitási eltéréseket, amint a sejtek zsugorodnak vagy duzzadnak a változás nagyságától és irányától függően az optimális állapothoz képest. Az ozmotikus gradiens ektacytometriát (osmoscan) az 1980-as évek elején fejlesztették ki, amely a vörösvérsejt deformabilitást méri állandó nyírófeszültség alkalmazása mellett, míg az osmolalitás fokozatosan változik. A mérések során jellegzetes elongációs index (EI)-ozmolalitás (O) görbét nyerünk. Az osmoscan görbe maximumpontja azt az osmolalitást reprezentálja, amely értéknél a vörösvérsejtek a lehető legnagyobb mértékben tudnak elongálódni az adott nyírófeszültség hatására.

Ezekhez a mérésekhez nagy precizitású ektacytometriás mérések kellenek, amelyek nagy fejlődést mutattak az 1990-es években. Mégis jónéhány év telt el, mire a legújabb rotációs ektacytometriás méréseknél is beépítésre került az osmoscan funkció.

Az ozmotikus gradiens ektacytometria igen érzékeny módszer a vörösvérsejt deformabilitás analizisére, egyúttal az optimális osmolalitás tartomány vizsgálatára is lehetőséget ad normál és pathophysiologiás körülmények között. Az EI-O görbék alakja igen

nagy variabilitást mutathat függően a celluláris tulajdonságoktól (mechanikai sajátságok, denzitás, morphologia). Haematologiai betegségekben, amikor a vörösvérsejtek morphológiája, struktúrája és a sejtfelszín/térfogat arány megváltozik, ez a módszer is informatív kiegészítője lehet a diagnosztikus paramétereknek (hereditaer spherocytosis, elliptocytosis, stomatocytosis, sarlósejtes anaemia).

Ugyanakkor a módszertani körülmények eltérőek lehetnek, hiszen az eredményeket befolyásolja az alkalmazott nyírófeszültség nagysága. Az irodalomban elérhető legtöbb adat olyan mérésekből származik, amelyeknél 20 vagy 30 Pa nagyságú nyírófeszültséget alkalmaztak, különösebb magyarázat nélkül. Felmerül a kérdés, hogy mennyire összehasonlíthatóak ezek az adatok. Nem ismert, hogy az osmoscan eredmények 1, 2, 3, 5, 10, 20 vagy 30 Pa nyírófeszültségnél mennyiben különböznek egymástól. Mennyire összehasonlítható a magasabb nyírófeszültség mellett nyert eredmény az *in vivo* viszonyokkal, ahol 10 Pa feletti nyírófeszültség ritkaság? Ezirányú optimalizációról Heo és mtsai, 2015-ben megjelent munkája és szintén ebben az évben közölt tanulmányunkon kívül összehasonlító analízisről szóló nem tudunk az irodalomban.

Mennyiben változik az osmoscan görbék karakterisztikája és a görbékől származtatott paraméterek értékei a mérésekhez alkalmazott nyírófeszültség függvényében? Az eltérések mutatnak-e különbséget kísérleti/laboratóriumi állatfajok és az ember összehasonlításában? Az osmoscan görbék morphologiai változásai miként interpretálhatóak? A görbék mely paraméterei bírnak jelző értékkel bizonyos deformabilitás romlás esetén? Milyen új paraméterek kalkulálhatóak az EI-O adatsorokból, amelyek a vörösvérsejt deformabilitás romlást érzékenyen jelezhetik? Vizsgálatainkat e kérdések megválaszolására terveztük.

Anyagok és módszerek:

Az összehasonlító haemorheologiai vizsgálatokra megadott engedély birtokában (19/2011. DEMÁB) a reggeli órákban vérvétel történt 9 hím CD outbred patkányból ($371,9 \pm 28,3$ g) a laterális farokvéna punctiója révén, 6 hím és nőtény beagle kutyából ($11,2 \pm 1$ kg) a vena cephalicából, valamint 15 nőtény juvenilis Hungahib sertésből ($18,2 \pm 2,7$ kg) a vena saphena medialis punctiójával. A vérmintákat zárt vérvételi rendszerben vettük le (Vacutainer[®], K₃-EDTA, 1,8 mg/ml) 22 G-s tű használatával, kivéve patkányok esetén, ahol 25 G-s tűvel közvetlenül az anticoagulant tartalmazó fecskendőbe vettük a vért. A human vérminták 15 önkéntes, egészséges felnőtt férftól és nőtől (26-40 éves) származtak (engedélyszám: DE OEC RKEB/IKEB 3625-2012). A vérminták vétele a reggeli órákban történt, az antecubitalis vénák egyikéből. Az anticoagulans K₃-EDTA volt.

A tanulmány egyik alfejezetében 5 egészséges önkéntes (a fenti csoportból) vérmintája centrifugálásra került (800 g, 10 perc, 15 °C), a sejteket izotóniás foszfát pufferben (PBS) mostuk, majd 40% haematocritú (v/v) vörösvérsejt-PBS szuszpenziót készítettünk, amelyeket 0,001 % vagy 0,005 % glutáraldehiddel (GA) kezeltünk. A célunk az volt, hogy a rigiddé tett sejtek deformabilitás romlásának mértékét meghatározzassuk, vizsgálva azt, hogy ez mennyiben manifesztálódik az osmoscan adatokban. Kerestük a legérzékenyebb klasszikus vagy új osmoscan paramétereket, amelyek a legjobban képesek leírni e különbségeket.

A mérések során meghatározásra került az elongatiós index az ozmolalitás függvényében, ezek adatsorából kalkulálja a készülék a 3.1.3. fejezetben ismertetett leíró paramétereket, mint az osmoscan görbe nevezetes pontjai (maximális elongatiós index, a hypoosmolaris tartományban meghatározható minimális elongatiós index, a maximális elongatiós index hyperosmolaris tartományba eső 50%-os értéke, az ezekhez tartozó ozmolalitás értékek), valamint a görbe alatti terület Area parameter.

Ezek ismeretében az osmoscan görbék morphológiáját és főképpen a minimális és maximális elongatiós index közötti görbeszakasz jellegzetességeit továbbfelemezve kalkuláltuk az alábbi új, az irodalomban eddig nem használt paramétereket:

- ΔEI = a maximális és a minimális EI értékek közötti különbség
- ΔO = a maximális és a minimális EI értékekhez tartozó ozmolalitás értékek különbsége
- $\Delta EI / \Delta O$
- $EI \max / EI \min$ = a maximális és a minimális EI értékek egymáshoz viszonyított aránya (rEI)
- $O (EI \max) / O \min$ = a maximális és minimális EI értékekhez tartozó ozmolalitás értékek egymáshoz viszonyított aránya (rO)
- rEI / rO

Eredmények:

Az EI-O görbék a legszabályosabb és legstabilabb lefutást a 20 és 30 Pa nagyságú nyírófeszültség érték alkalmazásával mutatták. A 10 Pa alatt a görbék maximum pontja fokozatosan balra és lefelé tolódott és a hyperosmoticus tartományban gyakran unduláció jelent meg az EI adatokban. Alacsonyabb nyírófeszültség alkalmazása mellett ez a jelenség még kifejezettebbé vált, és nagyságát tekintve jól látszott a fokozatosság is. Ez a tendencia 2-3 Pa-ig konzekvensnek tűnt. 1 Pa-ig végzett mérések esetén a görbék extrém mértékben váltak irregulárisá, főként a kutya, sertés és human vérmintában - gyakorlatilag értékelhetetlen görbeszakaszokat is adva. Patkányok esetében még az 1 Pa-ig végzett mérések is stabilnak tűntek.

A klasszikus osmoscan paraméterek jól tükrözték ezeket a különbségeket. A maximális elongációs index (EI max) értékek 20 és 30 Pa nyírófeszültség mellett a kutya és a sertés vérmintákban mutatták a legalacsonyabb értékeket. Ennél magasabb érték adódott patkány vérmintában, míg a legmagasabb értékeket a human vérminták mutatták. Ezek a fajok közötti különbségek eltűnni látszódtak, ahogy a mérésekhez alkalmazott nyírófeszültség is csökkent. Az EI max értékekhez tartozó ozmolalitás a legmagasabb értékeket a sertés vérmintában mutatta, ennél alacsonyabbat mértünk a human, a kutya és a patkány vérmintákban, ebben a sorrendben. Az EI max értékek 20 és 30 Pa összehasonlításában nem mutattak említésre méltó különbséget, habár 20 Pa-nál igen kismértékű csökkenés ugyan, de már látszott. Az O (EI max) esetén az adatok már jelentősebben különböztek, már 20 és 30 Pa között is. Az O (EI max) csökkenése az alkalmazott nyírófeszültség esetében (1-30 Pa) közel lineáris volt (patkány $R^2=0,907$, kutya $R^2=0,955$, sertés $R^2=0,979$, humán $R^2=0,986$).

A hyperosmolaris tartomány paraméterei a maximális EI értékek által meghatározottak, hiszen ennek felét jelenti az EI hyper. Az adatok egyértelműen mutatták az előzőekben leírt változásokat, a sertés vérmintákban jól látszott az osmoscan görbék magasabb ozmolalitás értékek felé való eltolódása. A minimális elongációs érték és a hozzátartozó ozmolalitás jelzi azt a pontot, amely alatt a legtöbb vörösvérsejt rupturált, amint tovább csökken az ozmolalitás. Amikor az osmoscan görbék morphológiája szabályos volt, ez a pont egyértelműen meghatározóvá vált, de 3-5 Pa alatt a görbék ezen szakaszának lefutása szabálytalanná vált, így a paraméterek meghatározása is bizonytalan volt.

Az alkalmazott nyírófeszültség csökkentésével az elongációs index-ozmolalitás görbék alatti terület (Area) is egyre zsugorodott. 10 Pa és ennél kisebb nyírófeszültség értékeknél az Area értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a 30 Pa-hoz képest valamennyi vizsgált faj vérmintáiban. A fennálló fajok közötti különbség egészen 2 Pa-ig jól követhető volt: a legmagasabb értékeket a human és a patkány, a legalacsonyabbakat a kutya és a sertés vérminták adták.

Az általunk kalkulált új paraméterek közül a ΔEI értékek közel azonosak voltak patkány, kutya és human vérmintákban 20 és 30 Pa mellett végzett méréseknél, míg a sertés adatok ennél jóval alacsonyabbak voltak, hiszen az EI max is sokkal alacsonyabb, míg az EI min magasabb volt sertésekben.

Az alkalmazott nyírófeszültség csökkenésével a fajok közötti különbség egyre kifejezettebbé vált, a human adatok nagyarányú csökkenést mutattak. Ez a csökkenő

tendencia még kifejezettebb volt a ΔO estében. A legmagasabb értékeket a sertés vérminták adták, mindvégig jelezve az osmoscan görbék szélesebb mivoltát a többi fajhoz képest. E két paraméter aránya ($\Delta EI/\Delta O$), ezért a legalacsonyabb a sertés vérmintában volt.

Az EI max / EI min (rEI), valamint az ezekhez tartozó ozmolalítás értékek (O (EI_{max}) / O min, rO) és ezek egymáshoz viszonyított aránya (rEI/rO) a legnagyobb különbségeket 5 Pa alatt mutatta. Míg a rO értékek inkább fokozatos csökkenést mutattak a nyírófeszültség csökkenésével, addig a rEI értékek a legmagasabb értékeket 2-5 Pa között mutatták, mint kiugró csúcst képezve. A rEI/rO értékek 3 Pa-ig csökkentek, majd 1 Pa-nál újra emelkedni látszódtak, vélhetően az osmoscan görbék irregularitása miatt.

A rigiddé tett vörösvérsejtek osmoscan vizsgálatai során, amelyet 5 önkéntes vérmintáján végeztünk, a natív mintákhoz hasonlítva vörösvérsejtek deformabilitási paraméterei nem mutattak kiugró mértékű változást a minta előkészítés során, a 40%-os vörösvérsejt PBS szuszpenzióban. Habár sem a mennyiségi, sem a minőségi haematologiai paraméterek nem változtak a glutáraldehides kezelés során (0,001 % vagy 0,005 % GA), a deformabilitás értékek -ahogy az várható is volt- fokozatos és nagymértékű csökkenést mutattak, mind a natív, mind a kezelés nélküli vörösvérsejt szuszpenzió adatokhoz képest. Az osmoscan mérések során is egyértelműen kimutatható volt a deformabilitás romlással párhuzamosan csökkenő EI max és O (EI max) értékek, az Area zsugorodása: az egész osmoscan görbe balra lefelé tolódása révén.

A glutáraldehides kezelés tehát koncentráció függően szignifikáns mértékű vörösvérsejt deformabilitás romlást idézett elő egyértelműen romló osmoscan eredmények mellett. Vizsgálva, hogy mely paraméterekkel fejezhető ki legérzékenyebben a deformabilitás romlás, kiszámításra kerültek a Cohen-módszer szerint kalkulált standardizált differencia értékek az alábbiak szerint: standardizált differencia = $\frac{\text{átlag}_{\text{kontroll}} - \text{átlag}_{\text{kezelt}}}{\sqrt{\sum(S.D.^2_{\text{kontroll}}; S.D.^2_{\text{kezelt}})}}$ Minél magasabb az adott összehasonlításban a standardizált differencia értéke, annál érzékenyebb az adott módszer vagy paraméter a fennálló különbségek kimutatására.

Deformabilitás romlás (pl. 0,005 % GA kezelés révén) a legnagyobb érzékenységgel a 3 Pa-nál mért EI (6,19), az $SS_{1/2}$ (4,53), és a $EI_{\text{max}} / SS_{1/2}$ (4,24) paraméterekkel volt kimutatható. Sorrendben magas standardizált differencia értékeket (>2) találtunk az osmoscan adatokban leginkább az újonnan kalkulált paraméterek esetén: ΔO (3,57) > rO (3,37) > rEI/rO (3,19) > $\Delta EI/\Delta O$ (2,54) > Area (2,43) > EI max (2,26) > ΔEI (2,02) (38. ábra). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az osmoscan görbék új kalkulált paraméterei a klasszikus paramétereknél érzékenyebben jelzik a vörösvérsejt deformabilitásában bekövetkező romlást.

Összegzés, konklúzió:

Az elongációs index – ozmolalítás görbékben rejlő információtartalom jobb kiaknázása érdekében új kalkulált paramétereket alkalmaztunk. A főbb eredményeket az alábbiakban foglalhatjuk össze: (1) Az osmoscan adatok 20 vagy 30 Pa nyírófeszültség alkalmazása mellett nem térnek el szignifikánsan egymástól. (2) 20 Pa nyírófeszültség alatt az EI max, az O (EI max), az EI min és az Area paraméterek közel lineárisan csökkennek a nyírófeszültség függvényében, különböző meredekséggel a vizsgált fajok vérmintáiban. (3) 3 Pa nyírófeszültség alatt a mérések egyre nagyobb mértékben válnak instabillá. (4) Az új kalkulált paraméterek, mint a minimális és maximális EI abszolút és relatív különbsége (ΔEI , rEI) a hozzátartozó ozmolalítás értékek (ΔO , rO), valamint ezek egymáshoz viszonyított arányszámái ($\Delta EI/\Delta O$ és rEI/rO) alkalmasnak tűnnek az osmoscan görbék részletesebb analizésére. A paraméterek vörösvérsejt deformabilitás változás során mutatott erejét vizsgálva glutáraldehiddel rigiddé tett vörösvérsejteket a legmagasabb standardizált differencia értékeket a ΔO , a rO, a rEI/rO és a $\Delta EI/\Delta O$ paraméterek esetén találtuk.

A fejezet alapjául szolgáló közlemény: Németh N, Kiss F, Miszti-Blasius K, Scand J Clin Lab Invest 2015;75:213-222.

5. FAJI- ÉS NEMI HAEMORHEOLOGIAI KÜLÖNBSÉGEK VIZSGÁLATA

5.1. Fajok közti haemorheologiai eltérések és hasonlóságok

Háttér, célkitűzés:

A vér áramlástan tulajdonságainak faji diverzitása nagy. Az irodalomban fellelhető komparatív haemorheologiai közlemények főként a magvatlan bikonkáv vörösvérsejtekkel rendelkező emlősök haemorheologiai különbségeivel foglalkoznak. Ezek a komparatív vizsgálatok a humán haemorheologiai pathológiás eltérések jobb megértését is szolgálhatják (pl. vörösvérsejt morfológiai eltérések kapcsán) amellet, hogy a kísérletes orvostudomány számára nyújtanak összehasonlító adatokat.

A Tanszék Haemorheologiai Kutatólaboratóriumában 2002 óta folynak a szisztematikus összehasonlító vizsgálatok különböző kísérleti/laboratóriumi állatfajok (inbred egér, outbred patkány, outbred nyúl, keverék és beagle kutya, sertés), valamint az utóbbi néhány évben humán vérminták haemorheologiai paramétereinek elemzésére. Egy részüket az előző fejezetekben ismertetett mérés technikai tanulmányok keretében, másokat célzott kérdéskörrel, adott haemorheologiai paraméter fajok közötti különbségeinek feltárása érdekében végeztük.

A teljes vér- és plazma viszkozitás, a vörösvérsejt deformabilitás, valamint a vörösvérsejt aggregatio vonatkozásában jelentős faji különbségek voltak kimutathatóak. A vizsgált fajok teljes vér viszkozitása nem minden tekintetben áll összhangban a haematocrittal vagy a plazma viszkozitással, amely felveti a viszkozitás-Htc kapcsolat fajspecifikus sajátosságainak lehetőségét, valamint alátámasztja a micro-rheologiai paraméterek eltérő mértékű viszkozitás-befolyásoló hatását.

A vér oxigénszállító kapacitása szempontjából fontos paraméter a teljes vér viszkozitás haematocrithez való viszonya, amely jó közelítéssel exponenciális karakterisztikájú görbével jellemezhető. A haematocrit/viszkozitás hányados a haematocrit függvényében parabolikus profilt mutat. A görbe csúcsa az „optimális haematocrit”-nak felel meg, ahol a lehető legmagasabb haematocrit a lehető legalacsonyabb viszkozitással párosul az oxigénszállító kapacitás és a vér fluiditása szempontjából. Számos kórképben megfigyelték, hogy az „optimális haematocrit” jelentősen eltolódik az élettani értékekhez képest.

Állatkísérletes vonatkozásban erről kevés adat ismert: főként konstans haematocrit értékek melletti haematocrit/viszkozitás adatok érhetőek el, illetve számolhatóak ki. A haematocrit, a vörösvérsejt alak és térfogat, valamint a vér- és plazma viszkozitásban megfigyelhető faji különbségek alapján feltételezhető, hogy az „optimális haematocrit” különbözhet a laboratóriumi állatfajok között.

Anyagok és módszerek:

A kérdéskör részletesebb vizsgálatára kísérletünkben (engedélyszám: 6/2006. és 37/2007. DE MÁB) 12 CD patkánytól (458±37 g) altatásban (35 mg/kg Na-pentobarbital, i.p.) a szívből 10-14 ml vért vettünk 10 U/ml Na-heparin tartalmazó fecskendőbe, és 12 beagle kutyától (10,7±1,9 kg) a vena cephalica punkciójával 14 ml vért bocsátottunk le Na-heparinnal bevont falú Vacutainer[®] csövekbe (10 U/ml). Mindegyik vérmintát 7 részre osztottuk. Ebből az első számított a natív vérmintának, a többiből centrifugálással (500 g, 5 perc) nyert autológ plazma hozzáadásával vagy elvételével különböző haematocritú mintákat készítettünk (haematocrit: 20-65%). Célunk minél szélesebb haematocrit tartomány vizsgálata volt. A haematologiai paraméterek meghatározása mellet a teljes vér- és plazma viszkozitást Hevimet-40 kapilláris viszkoziméterrel mértük. A vörösvérsejt deformabilitást Rheoscan-D200 ektacytometerrel, a vörösvérsejt aggregatiót Myrenne MA-1 aggregometerrel határoztuk meg.

Eredmények:

A haematocrit és plazma viszkozitás nem mutatott különbséget a patkány és kutya vérminták között (44,46±2,98% vs. 45,91±4,57%, p=0,377; 1,1±0,07 mPas vs. 1,11±0,06 mPas, p=0,735), patkányban kisebb átlagos vörösvérsejt térfogat (53,68±2,19 fl

vs. $70,03 \pm 3,26$ fl, $p < 0,001$) és nagyobb vörösvérsejtszám volt mérhető ($8,21 \pm 0,65 \times 10^6/\mu\text{l}$ vs. $6,6 \pm 0,64 \times 10^6/\mu\text{l}$, $p < 0,001$), mint beagle kutyákban.

A vörösvérsejt aggregatio index értékek jelentősen nagyobbak voltak beagle kutyában, mint patkányban (M 5 s: $16,98 \pm 2$ vs. $3,77 \pm 1,51$, $p < 0,001$; M1 5 s: $21,94 \pm 1,67$ vs. $12,08 \pm 3,64$, $p < 0,001$). A vörösvérsejt deformabilitás elongatiós index értékei (3 Pa-nál) patkányban bizonyultak szignifikánsan magasabbnak a kutya értékeihez képest ($0,371 \pm 0,009$ vs. $0,244 \pm 0,032$, $p < 0,001$). Mindez jobb vörösvérsejt deformálhatóságra, de kevésbé kimutatható aggregatiós készségre utalhat a patkányok vérmintáiban.

Patkányoknál jóval magasabb viszkozitás értékeket mértünk, a viszkozitás-haematocrit görbék meredeksége nagyobb volt, mint beagle kutyáknál. A görbék illesztett lineáris és exponenciális függvények matematikai analízisével hasonlítottuk össze. A különbségek az elemzett 10, 90 és 200 s^{-1} sebesség-gradiens értékeknél szignifikánsnak bizonyultak (42%, 30%, 26%; $p < 0,001$).

A haematocrit/viszkozitás görbék Gauss-típusú illesztett függvény matematikai analízisével hasonlítottuk össze. A 10 s^{-1} sebesség-gradiensnél mért értékeknél nem volt csúcsa a görbéknek: a haematocrit/viszkozitás arány közel lineáris csökkenést mutatott a haematocrit függvényében (patkány: $r = -0,786$, $p < 0,001$; beagle kutya: $r = -0,581$, $p < 0,001$). 90 és 200 s^{-1} sebesség-gradiensnél mért értékeknél illeszthető volt a Gauss-görbe (90 s^{-1} patkány: $r = 0,349$, $p = 0,0119$; beagle kutya: $r = 0,376$, $p = 0,0009$; 200 s^{-1} patkány: $r = 0,361$, $p = 0,0091$; beagle kutya: $r = 0,531$, $p < 0,001$), amelyből kalkulálható volt az „optimális haematocrit” érték: 90 s^{-1} sebesség-gradiensnél patkányban 36,5%, beagle kutyában 39,7%; míg 200 s^{-1} sebesség-gradiensnél patkányban 43,2%, beagle kutyában 42,4%.

Összehasonlító jelleggel a haematocrit értékek eloszlását négy tartományra (quadrans I-IV) osztottuk. Az adatokból jól látszik, hogy patkánynál az alacsonyabb sebesség-gradiens értékeknél a haematocrit viszkozitásnövelő hatása erőteljesebb, mint beagle kutyánál. Ez a fokozottabb aggregatio tényét veti fel. Azonban a Myrenne MA-1 aggregométerrel mért aggregatiós index értékek a beagle kutyáénál alacsonyabbak voltak. Ráadásul a patkány elongatiós index értékek magasabbak, azaz a vörösvérsejtjeik elnyújthatósága nagyobb mértékű volt. Ezt a megfigyelést más munkacsoportok adatai is megerősítik.

A Myrenne készülék az aggregatiós folyamat 5. és 10. másodpercében mért fényáteresztőképességből számolja ki az aggregatiós index értékeket. Ez a tény magyarázhatja azt, hogy ha az aggregatiós folyamat gyors, akkor ezek az index értékek már nem tükrözik meggyőzően az adott faj vörösvérsejtjeinek aggregatiós készségét, hiszen a mért időpont(ok)ban a folyamat nagy része már le is zajlott. A meghatározott időpontban történő aggregatiós mérésekkel szemben a folyamat kinetikáját is követő és elemző módszerek, mint a LORCA készülékkel használható syllectometria bővebb információval szolgálhat egy adott faj vörösvérsejt aggregatióról. Az előző vizsgálat után néhány évvel beszerzett rotációs ektacytometer erre lehetőséget adott.

Összehasonlító haemorheologiai méréseket különböző mérőmódszerekkel, számos tanulmányban végeztünk: haematologiai paraméterek, vörösvérsejt deformabilitás adatok (hagyományos és ozmotikus gradiens ektacytometria, membránstabilitás), valamint fénytranszmissziós és syllectometriás módszerekkel mért vörösvérsejt aggregatiós értékek különböző kísérleti/laboratóriumi állatfajok (egér, patkány, kutya, sertés) és ember vonatkozásában.

Összegzés, konklúzió:

A vörösvérsejt deformabilitás mérések adatainak összevetésével a vizsgált fajok között az alábbi összehasonlítás adható meg: EI_{\max} sertés < patkány < ember < kutya < egér, $SS_{1/2}$ sertés < egér < patkány < ember < kutya. A vörösvérsejt membránstabilitásban jelentős faji különbség mutatkozik az alkalmazott mechanikus stressz nagyságától és expozíciós idejétől

függően. Kimutattuk, hogy a mechanikus stressz a közeg ozmolalitásától függően javítja (200 mOsm/kg-nál) vagy rontja (250-300 mOsm/kg-nál) a deformabilitást. Ennek mértéke szintén faji különbségeket mutat: patkány és sertés vérmintákban kifejezetten javult a deformabilitás alacsony ozmolalitású közegben mérve.

A vizsgált speciemek ozmotikus gradiens ektacytometriás (osmoscan) paramétereinek összehasonlításában a legszembetűnőbb különbséget a sertésvérminták elongációs index – ozmolalitás görbéinek jobbra tolódása, azaz magasabb ozmolalitás tartományban való elhelyezkedése jelentette. A maximális elongációs indexhez tartozó ozmolalitás értéke jóval 300 mOsm/kg felett volt (20 Pa-nál mérve: $401,2 \pm 28,9$, 30 Pa-nál $409,7 \pm 29,3$ mOsm/kg). Inbred egereknél is 300 mOsm/kg feletti értékeket mérhettünk a legmagasabb elongációs indexnél. Ugyanakkor az egerek elongációs index értékei magasabbak voltak, mint a sertéseknél, de mindkettőnek jóval magasabb volt az O (EI max) értéke patkánnyal, kutyával vagy emberrel való összehasonlításban.

A vörösvérsejt aggregatio tekintetében a dinamikus paramétereket is figyelembe véve elmondható, hogy a patkányban a leggyorsabb és legnagyobb mértékű az erythrocyta aggregatio. Egérben jóval lassabban meg végbe a folyamat, míg a kutya, a sertés a vizsgált paraméterek nagyságrendje tekintetében az emberrel komparabilis.

A fejezet alapjául szolgáló közlemények: (1) Németh N, Alexy T, Furka A, Baskurt OK, Meiselman HJ, Furka I, Mikó I, *Biorheology* 2009;46:155-165.; (2) Németh N, *Magyar Állatorvosok Lapja* 2011;133:612-619.; (3) Németh N, Kiss F, Klárik Z., Mikó I, *Clin Hemorheol Microcirc* 2014;57:1-8.; (4) Németh N, Kiss F, Miszti-Blasius K, *Scand J Clin Lab Invest* 2015;75:213-222.; (5) Kiss F, Klárik Z, Tóth E, Pető K, Mikó I, Németh N, *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2015;99:1074-1083.; (6) Kiss F, Tóth E, Miszti-Blasius K, Németh N, *Clin Hemorheol Microcirc* 2016;62:215-227.; (7) Németh N, Sógor V, Kiss F, Ülker P, *Clin Hemorheol Microcirc* 2016 – ePub, doi: 10.3233/CH-152031.

5.2. Laboratóriumi állatfajok haemorheologiai nemi különbségei

5.2.1. Alapkülönbségek

Háttér, célkitűzések:

A klinikumban az utóbbi években egyre több irodalmi adat érhető el a nemi különbségek haemorheologiai jellemzőiről. Férfiaknak magasabb a vér és a plazma viszkozitása, a haematocritja és a fibrinogén koncentrációja a nőkéhez képest, akiknek vörösvérsejt deformálhatósága nagyobb, aggregációs készsége kisebb mértékű. Ez egészségeseknél nem jelenthet „jobb” vagy „rosszabb” összehasonlítást, hiszen a teljes keringési rendszer felépítése, a hemodinamikai sajátságok, a metabolikus tényezők sok más élettani folyamat mellett összefüggésben vannak a rheologiai faktorokkal. Ugyanakkor a cardio-cerebrovasculáris betegségek rizikófaktorainak tekintetében haemorheologiai nemi és életkorbeli különbségek mutatkoznak. A klinikai vizsgálatok tervezésénél, de az experimentális orvostudományban a kísérleti csoportok nemi összetételének meghatározásánál is ezt a kérdést figyelembe kell venni. Állatkísérletes vonatkozásban alig ismert ezirányú adat, rendszerezett összehasonlító tanulmányt nem találtunk.

Feltételeztük, hogy a különböző laboratóriumi állatfajokban a faji sajátságok mellett a haemorheologiai nemi különbségek is jelentősek lehetnek, befolyásolva a kísérleti csoportok nemi összetételének kialakítását és az eredmények értékelhetőségét. Célul tűztük ki egy „laboratórium-specifikus”, reprezentatív adatbázis elkészítését a nemi különbségek haemorheologiai elemzésére, a kutatólaboratóriumunkban 2002-2008 között mért kontroll adatok és kiegészítő összehasonlító vizsgálatok alapján.

Eredmények:

A rheologiai szempontból fontos haematologiai paraméterek közül a fehérvérsejtszám CD patkányok esetén szignifikáns nemi különbséget adott, a hímeknél magasabb értékeket mutatva ($p=0,003$). Beagle kutyáknál nem volt nyilvánvaló különbség. A thrombocyta szám

mindkét vizsgált állatfajban a nőstény állatokban mutatkozott magasabbnak, amely azonban beagle kutyák esetén volt szignifikáns ($p=0,001$). A vörösvérsejtszám mindkét fajnál a hímeknél volt nagyobb ($p<0,001$, $p=0,001$), emelkedett haematocrit értékek ($p=0,001$, $p=0,007$) mellett. Az átlagos vörösvérsejt haemoglobin tartalom szignifikánsan nagyobb volt mindkét faj nőstény állataiban ($p=0,002$, $p<0,001$).

A teljes vér viszkozitás 90 s^{-1} sebesség-gradiensnél mért értékei patkányokban a nőstényeknél voltak magasabbak, de a vizsgált esetszámmal nem érték el a szignifikancia szintet. Beagle kutyák esetén a hímek mutattak kismértékben magasabb értékeket. A plazma viszkozitás a nőstény patkányokban volt szignifikánsan magasabb a hímekhez képest, magasabb fibrinogén koncentráció mellett. Beagle kutyáknál a plazma viszkozitás és a fibrinogén koncentráció közel hasonló volt hímekben és nőstényekben.

A vörösvérsejt deformabilitás filtrometriás méréseinél azt találtuk, hogy a kezdeti relatív filtrációs sebesség (IRFR) és a relatív sejt-tranzitidő (RCTT) értékei mindkét faj hím és nőstény egyedeiben közel estek egymáshoz. Kutyáknál lehetett a hímeknél kismértékben alacsonyabb IRFR-t és magasabb RCTT-t megfigyelni, de szignifikáns különbség nem mutatkozott a vizsgált esetszámban.

Az ektacytometeres (Rheoscan D-200 slit flow ektacytometer) vizsgálatok során azt találtunk, hogy CD patkányoknál a nőstények rendelkeztek magasabb elongációs index értékekkel. Beagle kutyák esetén a hímek mutattak magasabb értékeket, bár a különbség nem érte el a szignifikancia szintet. A különbségeket az elongációs index – nyírófeszültség görbék és parametrizált összehasonlító adatai is jól mutatták.

A vörösvérsejt aggregatio tekintetében a helyzet fordított volt: patkányoknál a nőstényekben mértünk magasabb aggregációs index értékeket, míg beagle kutyáknál a hímekben voltak magasabb az értékek. A nemi különbségek beagle kutyák 10 secundos M index értékei kivételével szignifikánsak voltak.

Konklúzió:

A laboratóriumi állatfajok nemi haemorheologiai különbségei jelentősek lehetnek, a humán adatokkal nem korrelálnak. A kísérletek tervezésekor és az adatok értékelésekor mindezek figyelembe vétele fontos, hiszen a talált nemi haemorheologiai különbségek megközelíthetők, vagy akár el is fedhetik az adott kísérletekben vizsgált változások valódi mértékét.

A fejezet alapjául szolgáló közlemény: Németh N, Kiss F, Furka I, Mikó I, Clin Hemorheol Microcirc 2010;45:263-272.

5.2.2. A gonadectomia hatása

Háttér, célkitűzés:

A micro-rheologiai faktorok (vörösvérsejt aggregatio, vörösvérsejt deformabilitás) nemi különbségeire utaló adatok felvetették a kérdést, hogy a nemi hormonszint-változások, így a művi gonadectomia (GoE) okozhat-e további eltéréseket, s mennyiben egyenlítődnek ki a nemek között talált rheologiai különbségek. E kérdéskörnek további fontos klinikai relevanciája lehet. A nemi hormonok, elsősorban az oestrogen ischaemia-reperfúzióval szembeni védő hatását számos tanulmány támasztja alá. Ezt a hatást a tesztosteron vonatkozásában is kimutatták már. A gonádok fiziológiás (pl. menopausa) vagy patológiás hormonális funkcióváltozása összetett hatást gyakorol számos élettani paraméterre, haematologiai változókra (pl. fehérvérsejt- és thrombocyta szám), vér coagulációs paraméterekre, az endothel-funkciókra, a komplex neuroendocrin és immunrendszerre. Nemcsak a fiziológiás változások, mint a menopausa, de a trauma, lézió vagy leggyakrabban tumorok miatt végzett sebészi orchidectomia és ovariectomia következtében kialakult hormonális eltérések vagy hormon-szubsztitúció tekintetében is kevésbé ismertek és ellentmondásosak a haemorheologiai változások.

Anyagok és módszerek:

A kísérletben (engedélyszám: 37/2007. DE MÁB) 20 azonos korú hím (455,16±38,23 g) és 16 nőstény (286,63±13,32 g) Sprague-Dawley patkányt vizsgáltunk. Nőstényekben az oestrus ciklus aktuális fázisának megítélésére hüvelykeneteket vettünk (Giemsa-festés, leukocyták és hámsejtek arányának vizsgálata). Valamennyi nőstény állat a kísérlet kezdetén pro-oestrus fázisban volt.

A Kontroll hím (n=10) és Kontroll nőstény (n=6) csoportokban a vérvételeken kívül beavatkozás nem történt. A GoE hím csoportban (n=10) altatásban (60 mg/kg Thiopenthal[®], i.p.) a scrotum megnyitását követően mindkét oldali here és a mellékhere eltávolításra került, majd a bőrsbet zártuk (4/0 Dexon[®]). GoE nőstény csoportban (n=10), altatásban 2 cm-es alsó median laparotomia során mindkét oldali ovarium és a tuba uterina a cornu uteri-k distalis felével együtt eltávolításra került, majd réteges sebzés következett. A műtét előtt, az 1., 2. és 3. postoperatív hónapban vérvétel történt a farokvéna punctiójával (0,6-0,8 ml alkalmanként, anticoagulans: 1,5 mg/ml Na-EDTA). A műtétet követően, valamint az 1. postoperatív napon mindegyik csoport állatai fájdalomcsillapítót kaptak (2,5 mg/kg Flunixin[®], s.c.).

A vérmintákból meghatározásra kerültek a haematologiai paraméterek, a vörösvérsejt deformabilitás ektacytometriás módszerrel (Rheoscan D-200 slit flow ektactometer, szuszpenziós oldat: PVP 360 kDa, viszkozitás = 28,8 mPas, ozmolalitás = 305 mOsm/kg; pH = 7,36) és a vörösvérsejt aggregatio fénytranszmissziós módszerrel (Myrenne MA-1 aggregometer). A plazma mintákból elektrokemilumineszcenciás módszerrel történt a tesztosteron és oestrogen (E2) szint mérése.

Eredmények:

A kiindulási testúlyhoz képest a kontroll nőstények nem mutattak számottevő változást, míg a kontroll hímek súlya növekedett a 3 hónapos követési periódus során (relatív változás mértéke az alap vs. 3. hónap tekintetében: 1,25±0,12, p=0,024). A GoE nőstények testsúlya fokozatos és szignifikáns mértékű növekedést mutatott (1. hónap: 1,22±0,19, 2. hónap: 1,29±0,23, 3. hónap: 1,32±0,21), amely szignifikáns volt az alapértékekhez képest (p<0,001) és a kontroll nőstények azonos hónapi (1. hónap: p=0,011, 2. hónap: p=0,016, 3. hónap p=0,011) és GoE hímek adataihoz képest is (1. hónap: p=0,038, 2. hónap: p=0,007, 3. hónap p=0,004). A GoE hímek testsúlya a kontroll hímekéhez hasonló maradt.

Ovariectomiát követően az oestrogen szint 40-50%-kal csökkent (alap: 24,79±15,7 pg/ml, 1. hónap: 13,9±2,34 pg/ml, 2. hónap: 16±2,4 pg/ml, 3. hónap: 14,8±5,1 pg/ml). Orchidectomia után a tesztosteron szint a mérés határ szintje alá esett (alap: 8,56±3,67 nmol/l, 1. hónaptól: <0,069 nmol/l).

A rheologiai szempontból fontos haematologiai paraméterek közül a fehérvérsejtszám a GoE csoportokban mutatott jelentős változást: az 1. postoperatív hónapban emelkedett (p=0,006 vs. alap, p<0,001 vs. Kontroll) majd a 2. postoperatív hónapban (GoE nőstények: p=0,049 vs. Kontroll) és a 3. hónapban (GoE hímek: p=0,002 vs. Kontroll) is magasabb értéket mutatott. A vörösvérsejtszám és a haematocrit kismértékben a hímekben volt mindvégig magasabb, függetlenül a gonadectomiától. A thrombocyta szám a GoE hímekben szignifikánsan emelkedett az 1. és 3. postoperatív hónapban az alapértékekhez (p=0,022, p=0,007) és a GoE nőstény csoporthoz képest (p<0,001, p=0,005).

A vörösvérsejt deformabilitás kiindulási értékei jól tükrözték a korábban leírt nemi különbségeket, amelyek megtartottak maradtak a kontroll csoportokban. A GoE csoportokban ezek a különbségek konvergálnak látszottak egymáshoz. A GoE hímekben és nőstényekben magasabb elongációs index értékeket mutatott az 1. postoperatív hónapban (EI 3 Pa-nál: p=0,002, p=0,004 vs. alap), majd a 2., és kifejezettebben a 3. hónapban is magasabb értékeket találtunk (p<0,001, p=0,019 vs. alap). A görbék parametrizálásával nyert adatok megerősítették a különbségeket. A gonadectomizált hímek EI_{max} és annak feléhez tartozó

SS_{1/2} értékek szignifikáns mértékben csökkentek a második és harmadik postoperatív hónapra, jelentős vörösvérsejt deformabilitás változásra utalva.

A vörösvérsejt aggregatio a 2. postoperatív hónapban szignifikáns növekedést mutatott mind a GoE nőstény, mind a GoE hím csoportban. A legnagyobb mértékű aggregációs index emelkedés a GoE nőstényeknél volt megfigyelhető, szignifikáns mértékben különbözve a Kontroll adatoktól (M 5 s: p=0,003; M1 5 s és M 10 s: p<0,001; M1 10 s: p=0,002). A 3. postoperatív hónapra az aggregációs index értékek kismértékben csökkentek, de a GoE nőstényekben még mindig szignifikánsan magasabbak voltak a Kontroll értékekhez képest (M 10 s: p=0,034; M1 10 s: p<0,001).

Konklúzió:

A gonadectomia hatására a micro-rheologiai paraméterek tehát eltérő mértékben változtak hím és nőstény patkányokban. Az oestrogen szint csökkenése nagyobb arányú romlást okozott a vörösvérsejt aggregációban és deformabilitásban, mint a testosteron szint csökkenése. A változások a 2. és a 3. postoperatív hónapban voltak a legnagyobb mértékűek. A fejezet alapjául szolgáló közlemény: Németh N, Kiss F, Magyar Zs, Miszti-Blasius, Furka I, Clin Hemorheol Microcirc 2012;50:231-243.

6. AZ ISCHAEMIA-REPERFUSIO HAEMORHEOLOGIAI ÉS MICROCIRCULATIÓS VONATKOZÁSAI

6.1. Szisztémás és lokális haemorheologiai változások vizsgálata

Az ischaemia-reperfusio összetett módon van hatással a vér macro- és micro-rheologiai paramétereire. Kutatómunkánk során több kísérletes modellt alkalmaztunk, kimutatva a vörösvérsejt deformabilitás szignifikáns mértékű romlását 1 órás végtagi ischaemiát követően patkányokban az 1. és 2. postoperatív napokon, amely a xantin-oxidáz inhibitor allopurinollal kivédhető volt. A 2001-2004 között végzett végtagi ischaemia-reperfusió haemorheologiai kutatásaink eredményeinek főbb következtetéseit az alábbiakban lehetett összefoglalni:

- A vörösvérsejt deformabilitás szignifikáns mértékben romlik ischaemia-reperfusio során és azt követően az 1-3. postoperatív napon. A károsító hatások egy része kivédhető antioxidáns szerek alkalmazásával.
- Az időfaktor (ischaemia időtartama) és a hőmérséklet (lokális hűtés hatása) meghatározó tényezők a változások nagysága tekintetében.
- A lokális és szisztémás micro-rheologiai változások valódi mértéke azonban még mindig kevésbé ismert, s főként a mikrokeringési zavarok összefüggéseiben további, komplex vizsgálatok szükségesek.

Kimutattuk, hogy végtagi ischaemiát követően a csökkenő vér pH és lokális haemoconcentratio a reperfusio első órájában arterio-venosus különbségeket mutathat. A lokális és szisztémás rheologiai különbségek és változások újabb vizsgálatait (2015-ig) további adatokat nyújtottak végtagi-, izomlebens-, bél- és here ischaemia-reperfusio és cerebralis hypoperfusio során patkány-, kutya- és sertés modelleken, valamint az aorta abdominalis infra- és suprarenalis leszorítása-felengedése kapcsán együttesen vizsgált máj-, bél- és vese mikrokeringési változások, valamint sav-bázis- és micro-rheologiai paraméterek arterio-venosus elemzésével patkánymodellen.

6.1.1. Végtagi ischaemia-reperfusio haemorheologiai hatásának nemi különbségei és gonadectomia után kimutatható eltérései

Háttér, célkitűzés:

A haemorheologiai faktorok nemi különbségeinek, a gonadectomia micro-rheologiai paraméterekre kifejtett hatásainak, továbbá az ischaemia-reperfusio során bekövetkező változások eddigi ismeretében felmerült a kérdés, hogy a létrejövő haemorheologiai eltérések

mennyire mutathatnak nemi különbségeket. További kérdés, hogy gonadectomiát követően kialakuló ischaemia-reperfusio során várható-e additív jellegű különbség?

Célul tűztük ki az 1 órás végtagi ischaemia és az azt követő reperfusió micro-rheologiai hatásának vizsgálatát hím és nőstény patkányokban, elemezve a gonadectomia után létrehozott I/R befolyásoló hatását.

Anyagok és módszerek:

Kísérleteink során (engedélyszám: 37/2007., 17/2008. DE MÁB) Sprague-Dawley patkányokat az alábbi csoportokba soroltuk: I. Kontroll hím (n=8, 573,6±82 g) és II. Kontroll nőstény csoportok (n=8, 326±11,8 g): 2 órás altatás és a többi csoporthoz hasonlóan vérvételek történtek. III. Ischaemia-Reperfusió (I/R) hím (n=7, 586,2±54,1 g) és IV. I/R nőstény csoportok (n=7, 306,7±14,9 g): altatásban a bal hátsó végtag 1 órás ischaemiáját tourniquet-vel idéztük elő. Az ischaemia meglétét LD-01 laser Doppler szöveti áramlásmérővel igazoltuk. Az ischaemia előtt és után, valamint az 1., 2., 3. és 7. postoperatív napon a lateralis farokvénából vért vettünk (0,3-0,5 ml; Na-EDTA 1,5 mg/ml). V. Gonadectomia és végtagi Ischaemia-Reperfusió (GoE+I/R) hím (n=10, 508,8±33,2 g) és VI. GoE+I/R nőstény csoportok (n=10, 384,8±43,3 g): a gonadectomiát követő 3. hónapban történt az ischaemia-reperfusio és a vérvételek kivitelezése. A műtétet követően, valamint az 1. postoperatív napon az állatok analgeticumként Flunixin®-t kaptak (2,5 mg/kg, s.c.). A vérmintákból meghatároztuk a haematologiai paramétereket, a vörösvérsejt deformabilitást (Rheoscan D-200 slit flow ektacytometer) és a vörösvérsejt aggregációt (Myrenne MA-1 aggregometer). A változások kimutathatóságának mértékét a Cohen-módszer szerint kalkulált standardizált differencia kiszámításával is elemeztük.

Eredmények:

A hím GoE+I/R csoportban találtuk a legmagasabb fehérvérsejtszám emelkedést (1. postoperatív nap: $p < 0,001$ vs. alap, vs. Kontroll hím és vs. GoE+I/R nőstény, $p = 0,002$ vs. I/R hím). Ezek a különbségek a vizsgált postoperatív időszakban végig megmaradtak. A GoE+I/R nőstényekben hasonló, de kisebb mértékű fehérvérsejtszám emelkedés volt megfigyelhető (1. és 2. postoperatív nap: $p < 0,001$ vs. alap, vs. Kontroll nőstény, vs. I/R nőstény; 3. nap: $p = 0,007$ vs. alap, $p = 0,008$ vs. Kontroll nőstény; 7. nap: $p = 0,003$ vs. alap, $p < 0,001$ vs. Kontroll és I/R nőstény).

A vörösvérsejt deformabilitás tekintetében a Kontroll csoportokban egyik nemnél sem mutatkozott számottevő változás. Az I/R csoportokban az 1-3. postoperatív napokon látszott jelentős vörösvérsejt deformabilitás romlás, amely nőstényeknél nagyobb mértékű volt. A 3 Pa nyírófeszültségnél mért elongációs index értékek a GoE+I/R nőstény csoportban szignifikánsan alacsonyabbak voltak közvetlenül az ischaemia után ($p = 0,003$ vs. alap, $p < 0,001$ vs. I/R nőstény, $p = 0,016$ vs. GoE+I/R hím). Az 1. postoperatív napon az I/R nőstény és mindkét GoE+I/R csoportban az EI értékek tovább csökkentek, hímeknél szignifikáns különbséget mutatva az ép és gonadectomisált csoportok között is ($p = 0,025$). A 3. postoperatív napon további romlás mutatkozott az I/R hímeknél, s legnagyobb mértékben az I/R nőstényeknél ($p < 0,001$ vs. alap és Kontroll nőstények). A 7. napra az értékek normalizálódtak.

A kalkulált EI_{max} és $SS_{1/2}$ értékek ezeknek megfelelően változtak, megerősítve az elongációs index adatokat. A postischaemiás vérminták közül a GoE+I/R nőstényeknél mutatkozott az alapértékekhez viszonyított legmagasabb standardizált differencia érték (1,09), míg az 1-3. postoperatív napokon az I/R nőstény csoport vérmintáiban találtuk a legnagyobb értékeket (1,06, 0,97 és 2,28).

A vörösvérsejt aggregatio a GoE+I/R nőstény csoport postischaemiás mintáiban szignifikánsan emelkedett volt (M 5 s: $p < 0,001$ vs. I/R nőstény; M 10 s: $p = 0,019$ vs. alap). Az 1. postoperatív napon mind a négy ischaemia-reperfusió csoportban szignifikánsan

megemelkedtek az aggregációs index értékek, az alapértékekhez viszonyítva. A 3. napon az I/R hím csoportban egy újabb aggregatio fokozódás mutatkozott, amely a 7. napon már nem látszott.

Összegzés, konklúzió:

A változások összegzéseként elmondható, hogy az 1 órás végtagi ischaemia-reperfusio haemorheológiai hatásai nemi különbségeket mutattak patkányokban. Jelentős vörösvérsejt deformabilitás romlást az 1-3. postoperatív napokon figyelhettünk meg, legnagyobb mértékben nőstényekben a 3. napon. A gonadectomia további „rheológiai rizikófaktort” jelenthet a micro-rheológiai paraméterek változásainak tükrében. Gonadectomisált nőstényekben az ischaemiát követően találtunk romlott vörösvérsejt deformabilitást fokozott vörösvérsejt aggregációval párosulva.

A fejezet alapjául szolgáló közlemény: Németh N, Kiss F, Hevér T, Bráth E, Sajots E, Furka I, Mikó I, Clin Hemorheol Microcirc 2012;50:197-211.

6.1.2. Latissimus dorsi izomlebens ischaemia-reperfusio haemorheológiai hatásai

Háttér, célkitűzés:

A rekonstrukciós sebészetben megfelelő indikációval jól alkalmazható latissimus dorsi izomlebens ischaemia-reperfusiójának haemorheológiai hatásairól kevés adat ismert. Célul tűztük ki az 1 órás ischaemia és az azt követő reperfusio hatásának elemzését egy hetes követéses vizsgálat során canis modellen.

Anyagok és módszerek:

A vizsgálatokat beagle kutyákon végeztük (engedélyszám: 6/2006. DE MÁB). Altatásban (ketamin 10 mg/kg és xylazin 1 mg/kg, i.m.) mindkét oldalon a musculus latissimus dorsi-t ellátó thoracodorsalis ér-idegképleteket kipreparáltuk, az izmot a mellkasfalról leválasztottuk, a perforans ágakat coaguláltuk. Bal oldalon a lebens (~25x10 cm) érnélét atraumatikusan 1 órára leszorítottuk. A jobb oldali lebens kontrollként szolgált. A lebens mikrokeringését laser Doppler szöveti áramlásmérővel monitorozuk. A leszorítás előtt, majd a reperfusio 5., 15., 30., 45. és 60. percében a vena thoracodorsalisból vért vettünk (24 G-s branül, alkalmanként 0,5 ml), párhuzamosan a kontroll oldalról is, a haematológiai paraméterek és a vörösvérsejt aggregatio fénytranszmissziós meghatározására. Mindkét oldalon a lebenyek belső felületről izombiopsziát vettünk a leszorítás előtt, után és a reperfusio 60. percében, valamint párhuzamosan a kontroll oldalon is. A méréseket és a mintavételeket követően a lebenyeket 0-s polyamid varróanyaggal (Ethilon) eredeti pozíciójukban rögzítettük, majd a bőrsébet egyszerű csomós öltésekkel zártuk (3/0-s Prolene).

A postoperatív napok során az állatok fájdalomcsillapítót és antibiotikumot (Demalgonil, Baytril) kaptak, és napi sebkontrollt, szükség esetén seb tolett-et végeztünk (Betadinos kezelés). Vérvételek az 1., 3., 5. és 7. postoperatív napon történtek a v. cephalica-ból (22 G-s tű, K₃-EDTA-s Vacutainer vérvételi csövek). A 7. postoperatív napon altatásban reoperációt végeztünk, feltárjuk mindkét oldalon a lebenyeket, és elvégeztük a mikrokeringési méréseket, a lebenyt drénáló v. thoracodorsalis-ból vért vettünk, majd izombiopsziák vétele történt. Ezt követően az állatok túlaltatásra kerültek.

Eredmények:

A fehérvérsejtszám az ischaemiás oldalon emelkedett a reperfusio 5. és 30. percére az alaphoz (5': p=0,019, 30': p=0,042) és a kontroll oldalhoz viszonyítva (5': p=0,01, 30': p=0,011). A haematocrit az ischaemiás oldalon a reperfusio 30. percére szignifikánsan nőtt (p=0,007) és a 60. percben is jelentősen magasabb volt, mint a kontroll oldalon (p=0,031). A vörösvérsejt aggregációs index emelkedése korábban mutatkozott: az ischaemia végére, valamint a reperfusio 5. percére szignifikáns mértékben mind az alapértékekhez (p<0,001, p=0,007), mind a kontroll oldalhoz képest (p<0,001, p=0,047).

Összegzés, konklúzió:

A vizsgálatok alapján az 1 órás ischaemiának kitett *in situ* izomlebeny reperfúziójának első 5 percében fokozott aggregatio volt mérhető (tovább ~30 percig), amely nem a lokális vénás haematocrit emelkedésének volt köszönhető. Mindez a lebenyek összetett eredetű mikrokeringési zavarára utalhat. Az I/R egyértelműen károsította a lebenyeket. A vizsgált oxidatív stressz markerek közül a glutathion-peroxidáz aktivitás nem mutatott jelentős változást a 7. postoperatív napra, de a redukált glutathion mennyiség mindkét oldali lebenyben csökkent. A karbonil-tartalom már az ischaemia végére megemelkedett a leszorított lebenyekben, és további növekedést mutatott a reperfusio 60. percére. A 7. napra már mindkét oldali lebenyben jelentősen fokozott volt. A thiobarbiturát reaktív anyag tartalom a reperfusio végére emelkedett meg a leszorított oldali lebenyben. A 7. napra szignifikáns különbség adódott a kontroll oldalhoz képest. Ekkorra a szövettani vizsgálatok jelentős leukocytá infiltrációt, degeneratív rostok jelenlétét és a myocyták eosinophyliáját mutatták ki.

A fejezet alapjául szolgáló közlemény: Tamás R, Németh N, Bráth E, Sásvári M, Nyakas C, Debreczeni B, Mikó I, Furka I, *Microsurgery* 2010;30:282-288.

6.1.3. Vékonybél ischaemia-reperfusio micro-rheologiai hatásai*Háttér, célkitűzés:*

A lokális és szisztémás korai micro-rheologiai változások vizsgálatát tűztük ki célul portális, cavalis vérminták vizsgálatával 30 perces vékonybél ischaemia és az azt követő reperfúziós során patkánymodellben.

Anyagok és módszerek:

Az intestinalis ischaemia-reperfusio lokális és szisztémás haemorheologiai hatásait CD patkányon (n=10, 360,6±46,07 g) elemeztük (engedélyszám: 6/2006. DE MÁB). Az Ischaemia-Reperfusió csoportban altatásban (60 mg/kg Thiopenthal[®], i.p.) az arteria mesenterica superior 30 percre atraumatikus klippekkel leszorítottuk. Kismennyiségű (egyenként ~0,2 ml; Na-EDTA 1,5 mg/ml) vérmintákat vettünk a vena cava caudalis-ból és a vena portae-ből az ischaemia előtt, 1-1 perccel a klippek felengedése előtt és után, valamint a reperfusio 15., 30. és 60. percében a haematologiai paraméterek, a vörösvérsejt deformabilitás slit flow ektacytometriás és a vörösvérsejt aggregatio fénytranszmissziós meghatározására. A Kontroll állatokban leszorítás nem történt, a vérvételeket az Ischaemia-Reperfusió csoportnál ismertett időpontokban végeztük.

Eredmények:

A haematocrit értékek mind a cavalis, mind a portális vérmintákban nagyobbak voltak az Áloperált csoport értékeihez képest. Az emelkedés a reperfusio első 15 percében volt a legszembetűnőbb mértékű. A vörösvérsejt deformabilitása az ischaemiát követően jelentősen romlott. A maximális elongációs index feléhez tartozó nyírófeszültség értékek (SS_{1/2} [Pa]) a vena cava vérmintákban szignifikánsan magasabbak voltak a Kontroll csoporthoz képest a reperfusio 60. percére (p<0,001). A vena portae vérmintákban szignifikánsan rosszabb vörösvérsejt deformabilitást találtunk az ischaemia végén (p=0,014) és a reperfusio kezdetén (p=0,009). A reperfusio 30. percében érte el a deformabilitás-romlás a csúcspontját, majd a 60. percre mérséklődött, de még ekkor is szignifikánsan különbözött a kontroll értékektől. A vörösvérsejt aggregatio mértéke a reperfusio 60. percére közel 2,5-szer nagyobb volt a lokális vena portae vérmintákban, mint a szisztémás vena cava vérmintákban.

Összegzés, konklúzió:

A bél mucosa ischaemiás károsodását szövettani vizsgálatokkal igazoltuk (Chiu-féle pontozási rendszer 3. és 4. fokozata látszott: jelentős subepitheliális elemelkedés, denudált villusok, a lamina propria infiltrációja, dilatált capillarisek). A kialakuló károsodással párhuzamosan micro-rheologiai eltérések voltak megfigyelhetőek, hasonló mértékben a

cavalis (szisztémás) és a portális (lokális) mintákban. Utóbbi esetén a deformabilitás romlás mértéke kifejezettebb volt.

A fejezet alapjául szolgáló közlemény: Bráth E, Németh N, Kiss F, Sajtos E, Hevér T, Mátyás L, Tóth L, Mikó I, Furka I, *Microsurgery* 2010;30:321-326.

6.1.4. Supra- és infrarenalis aorta leszorítás hatása

Háttér, célkitűzés:

Az aorta leszorítására -annak mellkasi vagy hasi szakaszán- különböző érsebészeti kórképek (pl. aorta aneurysma) és traumás sérülések műtéti megoldásának szükséges velejárájaként kerülhet sor. A beavatkozás eredményét nagymértékben meghatározza a leszorítás helye és ideje. Az aorta kirekesztése során, függően a leszorítás szintjétől és időtartamától, jelentős ischaemia-reperfüziós károsodás jöhet létre az érintett szervekben a keringésdinamikai és haemostaseológiai eltérések kialakulása mellett. A hemodinamikai, micro-rheológiai, sav-bázis változások és az érintett szerveken kialakuló microcirculációs zavarok együttes vizsgálatára patkány modellben volt lehetőségünk.

Anyagok és módszerek:

Huszonegy hím Sprague-Dawley patkányt vontunk be a kísérletbe ($554,04 \pm 27,77$ g). Altatásban (60 mg/ttkg Thiopental, i.p.) feltárássra és kanülálásra került a jobb oldali a. carotis communis. A kanülön keresztül az állatok 100 NE/kg Na-heparint kaptak a kísérlet során. Ezután median laparotomiát végeztünk, az aorta abdominalist és a v. cava caudalist óvatos preparálással közelítettük meg. A kísérleti állatokat három csoportba soroltuk.

- I. Kontroll csoport (n=7): csak preparálás és a kanülálás történt.
- II. Infrarenalis aorta leszorítás csoport (IRA-L, n=7): az aorta abdominalisra 60 percre atraumatikus klippet helyeztünk fel az a. renalis-ok szintje alatt.
- III. Suprarenalis aorta leszorítás csoport (SRA-L, n=7): a 60 perces aorta leszorítást az a. renalis-ok szintje felett elhelyezett atraumatikus klippel végeztük.

Az ischaemia előtt (Alap) és után (I-60), valamint a reperfusio 30. (R-30) és 60. percében (R-60) a szívfrekvencia és az arteriás középnyomás mérése történt az a. carotis communisba helyezett kanülön keresztül. A máj középső lebenyének elülső felszínén, egy jejunum kacs antimesenterialis szélén és a bal vese középső régiójának elülső felszínén a 4.3. fejezetben részletezett laser Doppler-es szöveti áramlásmérővel monitoroztuk a mikrokeringést ugyanezekben az időpontokban. A vérvételeket a hemodinamikai és mikrokeringési mérések után végeztük. Minden csoportban a kanülált artériából és a vena cava caudalis leszorítás helyétől disztálisan 26 G-s tűvel való punkcióval kismennyiségű (0,6 ml) vérmintákat vettünk (anticoaguláns: 1,5 mg/ml K₃-EDTA).

Eredmények:

A szívfrekvencia vonatkozásában nem volt jelentős eltérés, míg az artériás középnyomás értékek számottevő különbséget mutattak, a suprarenalis csoportban komoly hemodinamikai instabilitást jelezve (az ischaemia végén vs. Alap, vs. Kontroll és vs. IRA-L csoport: $p < 0,001$; R-30: vs. Kontroll és vs. IRA-L $p < 0,001$), ahol a reperfusio 60. percére három elhullás is történt.

A laser Doppleres mikrokeringési paraméter (blood flux unit, BFU) a májon alig mutatott eltérést. Az értékek ugyan kismértékben csökkentek a leszorítás végére, de a reperfusio során már megközelítették az alapértékeket. A vékonybélnél az ischaemia alatt a BFU értékek mind a supra-, mind az infrarenalis csoportban jelentősen csökkentek. A reperfusio kezdetén megfigyelhető volt egy kismértékű fokozódás, amely a Kontroll értékekhez viszonyítva szignifikáns mértékűnek bizonyult a reperfusio 30. percében (IRA-L csoportban: $p < 0,001$; SRA-L csoportban: $p = 0,006$). A vese vonatkozásában, ahogy az várható volt, a mikrokeringési értékek eltérő mértékben változtak a két leszorított csoportban. A SRA-

L csoportban kifejezetten alacsony értékeket mértünk az ischaemia végére ($p < 0,001$ vs. Alap, Kontroll, IRA-L), de az értékek a reperfusio során is alacsonyabbnak bizonyultak az IRA-L csoporthoz képest.

Jelentős metabolikus eltéréseket lehetett megfigyelni, a micro-rheologiai értékekkel szimultán változtak az ischaemia végére és a reperfusio során. Az infrarenalis csoportban is mutatkozó pH csökkenésnél és laktát koncentráció emelkedésnél nagyobb mértékű változásokat láttunk. A pH csökkenés a suprarenalis csoportban már az ischaemia végén, majd a reperfusio 30. percére jelentős volt, legnagyobb mértékben a vénás vérmintákban (a reperfusio 30. percében vs. Alap: $p < 0,001$; vs. Kontroll: $p < 0,001$; vs. IRA-L csoport: $p < 0,001$). Ezzel párhuzamosan nőtt a laktát koncentráció, a vénás mintákban nagyobb mértékben ($p < 0,001$ vs. Alap, vs. Kontroll és IRA-L csoport).

A vörösvérsejt deformabilitást jellemző, 3 Pa nyírófeszültségnél meghatározott elongációs index szignifikánsan csökkent az ischaemia végére a suprarenalis csoportban leginkább az artériás vérmintákban ($p = 0,048$ vs. Kontroll). Az elongációs index – nyírófeszültség görbék parametrizálásából nyert EI_{max} és ennek feléhez tartozó nyírófeszültség ($SS_{1/2}$) aránya a reperfusio 30. percére mutatott szignifikáns mértékű romlást ($p = 0,012$ vs. I-60 értékek, $p = 0,024$ vs. Kontroll).

A vörösvérsejt aggregatio mérése során ebben a modellben a nagy szórás és a gyakori zéró értékű adatok miatt (amelyeket az elemzésből kihagytunk) nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbségeket.

Összegzés, konklúzió:

Az eredményeket összefoglalva elmondható, hogy az aortaleszorítás során a legmarkánsabb keringésdinamikai változások a suprarenalis csoportban mutatkoztak a reperfusio alatt, amelyet a vékonybél felszínén a mikrokeringési értékek fokozódása, a vesében azok csökkenése követett. A legnagyobb pH csökkenés és laktátkoncentráció növekedés a suprarenalis csoportban volt kimutatható. A vörösvérsejt deformabilitási paraméterek romlása már az ischaemia végére, majd a reperfusio során szignifikáns mértékű volt. Ebben a kísérletben a vörösvérsejt deformabilitás nagyobb mértékű romlást mutatott, mint a vörösvérsejt aggregatio. Összességében a hemodinamikai és sav-bázis értékekben jelentkező eltérések sokkal kifejezettebbek voltak, mint a micro-rheologiai változások.

A fejezet alapjául szolgáló közlemény: Németh N, Kiss F, Klárik Z, Tóth E, Mester A, Furka I, Mikó I, Clin Hemorheol Microcirc 2014;57:339-353.

6.1.5. Here ischaemia-reperfusio

Háttér, célkitűzés:

A különböző szervek ischaemia-reperfusiójának mikrokeringési és haemorheologiai hatásait vizsgálva foglalkoztunk a here károsodásával is. Az akut testicularis ischaemia leggyakrabban a funiculus spermaticus torsiója miatt (intra-, extravaginalis vagy mesorchialis típusok) jön létre. A súlyos fájdalom mellett az ischaemia és a reperfusio károsíthatja a spermatogenezist, továbbá a vér-here gát sérülése által lokális keringészavarok mellett immunreakciót is generál nemcsak az ipsi-, hanem a contralateralis hereállomány károsodásához vezetve.

A testicularis ischaemia-reperfusio mikrokeringési zavarainak haemorheologiai megközelítéséről kevés adat lelhető fel az irodalomban. Patkánykísérletben célul tűztük ki e kérdéskör vizsgálatát.

Anyagok és módszerek:

A kísérletbe (engedélyszám: 17/2008. DE MÁB) vont 14 felnőtt (7-8 hónapos) hím Sprague-Dawley patkányt ($563 \pm 94,3$ g) random két csoportba soroltuk. Az Ischaemia-Reperfusio csoportban ($n=7$) általános anaesthesiában (60 mg/kg Thiopental, i.p.) a scrotumot borotválás majd Betadine-os lemosás után a bal here felett mintegy 2 cm hosszú

incisióval megnyitottuk. A bal here óvatosan antepositióra került és testhőmérsékletű fiziológiás sóoldattal átitatott steril textillel körbevontuk. A ductus deferens a spermaticus vascularúrával együtt atraumatikusan (kisméretű Blalock típusú érleszorító alkalmazásával) leszorításra került 30 percre. A jobb here intakt maradt. Az ischaemiát követően a mikrokeringési vizsgálatok elvégzése után repositio történt, majd 3/0-s Dexon-nal csomós öltésekkel rétegesen zártuk a sebet, majd a sebvonalat fertőtlenítettük. A Kontroll csoportban (n=7) csak anaesthesia és vérvételek történtek. Mindkét csoport állatai fájdalomcsillapítóként Flunixin-t kaptak (2,5 mg/kg, s.c.). A laboratóriumi vizsgálatokhoz 0,2-0,3 ml vért vettünk a lateralis farokvéna 26 G-s tűvel való pungálásával (anticoagulans: 1,5 mg/ml K₃-EDTA) az ischaemia előtt (alap), az ischaemiát követően (I-30), a reperfusio 60. percében és az 1. postoperatív nap reggelén. A mikrokeringést laser Doppleres szöveti áramlásmérővel a bal herén az ischaemia előtt és végén, valamint altatásban az 1. postoperatív napon mindkét herén mértük. A here felszínére helyezett szondával ugyanekkor hőmérsékletmérés is történt. Az utolsó vértételt követően (altatásban) a scrotum megnyitásra került, majd a microcirculációs méréseket követően bilaterális orchidectomiát végeztünk szövettani vizsgálatok céljából. Az állatok túlaltatásra kerültek.

Eredmények:

A BFU értékek a leszorítás alatt lecsökkentek ($p < 0,001$ vs. alap). Az ischaemiát követően és az 1. napon is még a kiindulási értékektől valamint az ép, jobb oldali here értékeihez képest is szignifikánsan elmaradtak ($p < 0,001$). Az ischaemiás here hőmérséklete csak kismértékben csökkent. Az 1. postoperatív napra azonban jelentősen megemelkedett az alaphoz ($p = 0,002$) és az ellenoldali, intakt heréhez képest ($p = 0,039$), annak ellenére, hogy ennek a testisnek a hőmérséklete is emelkedett az alapértékekhez képest ($p = 0,02$).

A fehérvérsejtszám az 1. napra szignifikáns mértékben megemelkedett a Kontroll csoporthoz képest ($p = 0,001$). A monocyta-granulocyta arány alapértékekkel szembeni növekedése már az ischaemiát követően kimutatható volt ($p = 0,018$), amely a reperfusio 60. percére ($p < 0,001$), majd az 1. napig fokozódott ($p < 0,001$). A thrombocyta szám is megemelkedett az 1. napra ($p = 0,002$ vs. alap, $p < 0,001$ vs. Kontroll csoport). A I/R csoport vörösvérsejtszám és a haematocrit változásai enyhe haemoconcentrációt jeleztek az 1. napra.

Az alaphoz képest alacsonyabb elongációs index volt mérhető az I/R csoportban a reperfusio 60. percére (1 Pa-nál: $p = 0,028$, 3 Pa-nál: $p = 0,048$). Az 1. napra az értékek alacsonyak maradtak ($p = 0,037$ vs. Kontroll). Az EI_{max} kismértékben csökkent, az SS_{1/2} értékek enyhe fokú emelkedést mutattak, de nem érték el a szignifikáns mértéket.

A vörösvérsejt aggregatio index paraméterei az ischaemia végén vett vérmintákban alacsonyabbak voltak az alapértékekhez képest (M 5 s: $p = 0,003$, M1 5 s: $p = 0,004$, M 10 s: $p < 0,001$ vs. alap). A reperfusio 60. percére az értékek emelkedni kezdtek (kivéve az M 5 s indexet), az 1. napra jelentősen magas értékeket elérve mindegyik aggregatio index paraméter esetén ($p < 0,001$ vs. alap és vs. Kontroll). A Kontroll csoport értékei gyakorlatilag változatlanok maradtak.

A szövettani vizsgálatok a here körüli szöveti rétegek és az epididymis közepes mértékű gyulladással indurációját írták le.

Konklúzió:

Az adatok a mikrokeringési zavarokkal párhuzamosan a szisztémás vénás vérből is kimutatható micro-rheologiai eltérésekre hívják fel a figyelmet. Ebben a modellben a vörösvérsejt deformabilitás csak kismértékben romlott, az aggregatio azonban jelentősebb mértékben fokozódott.

A fejezet alapjául szolgáló közlemény: Németh N, Kiss F, Klárik Z, Pető K, Ványolos E, Tóth L, Mikó I, Furka I, Clin Hemorheol Microcirc 2014;57:243-253.

6.1.6. Cerebralis hypoperfusio

Háttér, célkitűzés:

A lokális keringésdinamikai változások és a haemorheologiai paraméterek kapcsolatának egy másik aspektusát sertés modellen vizsgáltuk, a cerebralis hypoperfusio vonatkozásában.

Az agyi véráramlás meghatározásában az arteriás, vénás és intracraniális nyomás, a cerebralis erek tónusa és a keringő vér rheologiai tulajdonságai játszanak fő szerepet. Akut hemodinamikai változások (arteriás, vénás és a vénás sinusok oldalán), keringési shock, traumás agysérülés, cerebralis oedema, pulmonaris hypertensio, cerebralis vasoconstrictio (pl. hyperventillatio miatt kialakuló arteriás hypocapnia következtében), metabolikus zavarok, gyulladáso és szabadgyökös károsodások a cerebralis perfusiót nagymértékben befolyásolhatják.

Ebben a kísérletben vizsgálni kívántuk, hogy a különböző keringésdinamikai hatások milyen mértékben befolyásolják a cerebralis perfusiót és a haemorheologiai faktorokat.

Anyagok és módszerek:

A kísérletbe (engedélyszám: 6/2002. DE MÁB) 12 juvenilis (3 hónapos) hím és nőstény Durok/Cornwall sertést ($32 \pm 2,04$ kg) vontunk be. Altatásban (premedikáció: 2 mg/kg azaperon, i.v.; indukció: 10 mg/kg ketamin, i.v.; fenntartás: 0,4 mg/kg/h midazolam + 0,2-0,4 µg/kg/h sufentanil + 0,3 mg/kg/h pancuronium, i.v.). Tracheostomia inferior készült a kontrollált lélegeztetéshez, majd a bal oldali arteria és vena femoralis kipreparálásra és kanülálásra került a vérnyomás, szívfrekvencia direkt meghatározására, folyadékbevitel és mintavételezés céljából. A koponya frontalis régióján a bőr és a scalp lefejtése után három fűrt lyuk készült az os frontale-n, amelyeken keresztül kanülok és szenzorok (szöveti oxigén tenzió - Licox oxygen sensor system, GMS, Németország; thermodilutiós próba - QFlow 400 System, Hemedex Inc., USA; glükóz, laktát, piruvát meghatározására microdialysis katéter - CMA600 Microdialysis Analyzer, Svédország) kerültek bevezetésre, csontcementes tömítés mellett. A sinus sagittalis superior-ba kanült vezetünk be. A jobb hemispheriumba intracranialis nyomásmérő transzducer (Codman, Johnson&Johnson, USA), a sinus sagittalis superior-ba kanül került bevezetésre cerebrovenosus vér vétele céljából.

Nyugalmi periódust követően 30 perc hyperventillatio (HV, $p_a\text{CO}_2=30$ és 20 Hgmm), majd norepinephrin adásával (5-10 µg/kg/min) 30 perc arteriás hypertensio (HT, cerebralis perfusió nyomás: CPP>160 Hgmm), ezt követően esmolol alkalmazásával (1-1,5 mg/kg/min) 60 perc hypotensio (HoT, CPP: ~30 Hgmm) következett protokoll szerint, 30-30 perces közbeiktatott stabilizációs szakaszokkal. A regionális cerebrális véráramlási adatok a hemodinamikai változásokat jól tükrözték (kiindulási érték: $32,4 \pm 3,44$, HV: $18,8 \pm 4,21$, HT: $33,9 \pm 2,75$ és HoT: $5,5 \pm 4,9$ ml/100g/min).

Minden szakasz elején és végén párhuzamosan vért vettünk a kanült a. és v. femoralisból, valamint a sinus sagittalis superiorból. Meghatározásra kerültek a haematologiai paraméterek, a teljes vér és plazma viszkozitás, valamint filtrometriás módszerrel (5%-os szuszpenzió, 5 µm pórusátmérőjű filter) a vörösvérsejt deformabilitás. A kísérlet végén az állatok túlaltatásra kerültek.

Eredmények:

A vérviszkozitás egyik vérmintában sem változott számottevően a hyperventillációs szakasz végére. A hypertenziós szakasz végére kismértékben emelkedett mindhárom vérminta típusban, a hypotenziós szakasz végére az értékek az arteriás és sinus mintákban csökkentek, a vénásban növekedtek. A haematocrit a vér viszkozitással azonos irányú változásokat mutatott, míg a plazma viszkozitás nem változott jelentősen a kísérlet során.

A vörösvérsejt deformabilitás filtrometriás módszerrel történt meghatározásakor azt találtuk, hogy a relatív sejt-tranzitidó (RCTT) szignifikánsan megnyúlt a hyperventillációs

szakasz végére a szisztémás vénás vérmintákban ($p=0,041$ vs. artériás alap, $p=0,044$ vs. vénás kiindulási érték, $p=0,024$ vs. artéria, $p=0,005$ vs. sinus). A hipertenziós szakaszban az artériás vérmintákban volt emelkedettebb az RCTT ($p=0,028$ vs. kiindulási érték). A hypotenziós szakaszban a sinus sagittalis superiorból nyert vérmintákban volt mérhető az alapértékekhez képest több mint kétszeres RCTT emelkedés ($p=0,038$ vs. artériás alap, $p=0,005$ vs. sinus kiindulási érték), jelentősen romló deformabilitásra utalva. Ennek háttérében ugyanekkor a felgyülemlett laktát ($2,28\pm 0,17$ mmol/l vs. kiindulási $1,08\pm 0,21$ mmol/l) és pH csökkenés ($7,321\pm 0,025$ vs. kiindulási $7,377\pm 0,005$) lehetett az oka.

Összegzés, konklúzió:

A hyperventillációval, artériás hyper- vagy hypotensióval előidézett cerebrális hemodinamikai változások hatással vannak a keringő vér rheologiai tulajdonságaira. Az eredményekből az látszott, hogy nemcsak az ischaemia, hanem a hypoperfusio is ronthat a haemorheologiai paramétereken, elsősorban a vörösvérsejt deformabilitáson a felhalmozódó metabolitok és lokális acidózis hatására.

Az ischaemia-reperfusio és a hypoperfusio hatására létrejövő lokális és szisztémás haemorheologiai változások pontosabb megismeréséhez és megértéséhez azonban további vizsgálatok szükségesek. Érzékeny mérő módszerek és a szöveti mikrokeringés lehetőség szerinti párhuzamos vizsgálata segíthetnek abban, hogy pontosabb képet kaphassunk az *in vivo* rheologiai viszonyokról.

A fejezet alapjául szolgáló közlemény: Németh N, Soukup J, Menzel M, Henze D, Clausen T, Rieger A, Holz C, Scharf A, Hanisch F, Furka I, Mikó I, Clin Hemorheol Microcirc 2006;35:59-65.

6.2. Vascularis beavatkozások haemorheologiai hatásainak vizsgálatai

A hemodinamikai változások, a nyírófeszültség nagysága és expozíciós ideje, a vér oxigenizáltsági állapota és a metabolikus tényezők a vér micro-rheologiai tulajdonságait befolyásolhatják. Mindezek alapján felmerül a kérdés, hogy az érrendszeren végzett különböző sebészeti beavatkozások, mint ér-anastomosis készítés, ér-graft beültetés, mennyiben befolyásolják a vörösvérsejt deformabilitást és aggregációt. A gondolatot megfordítva, vajon lehet-e ezen paraméterek vizsgálatával következtetni az anastomosis illetve az ér-graft funcionális állapotára?

A témakörben két tanulmányt végeztünk: (1) mikrosebészeti módszerekkel kialakított új arterio-venosus shunt modell hemodinamikai, microcirculációs és micro-rheologiai tulajdonságait elemeztük patkányban, (2) perifériás érszakasz művi grafftal való pótlásának véráramlástan hatását követtük beagle kutyákon.

6.2.1. Művi arterio-venosus shunt jelenléte

Háttér, célkitűzés:

A jól működő, perifériás erek között elkészített érett művi arterio-venosus (AV) shunt fontos szerepet játszik uraemiás betegek haemodialysisénél az érpályához való megfelelő, rendszeres hozzáférés biztosításával. Az anastomosisok készítésénél a szövödmények elkerülése, a shunt hosszútávú nyitvamaradása szempontjából is a sebészi biztonságra való törekvésnek óriási szerepe van. A shunt-ök geometriájának, áramlási viszonyainak, histomorphologiai sajátosságainak tanulmányozására különböző állatkísérletes modellek alkalmasak az egértől a sertésig. A shunt jelenlétéből éséréséből adódó akut/krónikus hemodinamikai összefüggései a micro-rheologiai paraméterek lokális-szisztémás változásaival azonban kevésbé ismertek.

Egy új shunt modell kialakítását tűztük ki célul patkányok saphena erei között, amely a teljes keringést nem terheli meg, mint más modellek (pl. femoralis arterio-venosus shunt), de alkalmas a lokális véráramlástan és az érintett végtag microcirculációs paramétereinek tanulmányozására a shunt érése során.

Anyagok és módszerek:

Kísérleteinket (engedélyszám: 37/2007., 6/2008. DE MÁB) 22 hím és nőstény CD outbred patkányon ($336,8 \pm 71,75$ g) végeztük az alábbi kísérleti csoportokban. I. Kontroll csoport ($n=6$): műtét nem történt, normál kontrollként szolgáló csoport. A mintavételek és a lenti vizsgálatok történtek. II. AV shunt csoport ($n=16$): altatásban (60 mg/kg, Thiopenthal, i.p.) a bal femoralis régió medialis területe feltárássra került, majd a v. saphena medialis és az a. saphena között end-to-side anastomosis került kialakításra mikrosebészeti módszerekkel, 10/0-s monofilament polyamid varróanyaggal (Black Nylon). Az átjárhatóság ellenőrzése után a sebzés 5/0-s polyglycolsav varróanyaggal (Dexon) történt. A jobb oldali végtag intakt maradt a további vizsgálatokra.

A postoperatív napokon az állatok mozgása és a mancs színe rendszeres megfigyelésre került. A shunt-ök érését biztosító időszakot követően a postoperatív 8-12. hét között újra elaltattuk az állatokat. A műtött és nem műtött végtag, valamint a kontroll csoport végtagjainak mikrokeringését laser Doppler scanner-rel vizsgáltuk (Perimed, Periscan PIM II Laser Doppler Perfusion Imager, Perimed AB, Svédország). A jobb oldali arteria carotis communis preparálásra és kanülálásra került az artériás középnyomás és szívfrekvencia mérése céljából (Haemosys rendszer, Experimetria Kft.). Az ép és a műtött saphena erek áramlását Transonic T206 készülékkel (Transonic Systems Inc., USA; probe: 1RB2759) mértük (véráramlás ml/min-ben kifejezve). A méréseket követően $0,2-0,3$ ml-nyi vért vettünk (26 G-s tű, anticoagulans: K_3 -EDTA, $1,5$ mg/ml) a v. saphena medialis-ból és az a. saphena-ból a shunt területén és az ellenoldali ép végtagon egyaránt, majd az állatok exterminálásra kerültek. A shunt és az ellenoldali erek szövettani vizsgálatok céljából kerültek kimetszésre.

Eredmények:

A laser Doppleres mérések során a vizsgált bőrfelszín régió (region of interest, ROI) BFU értékeiből adódó összesített számadatok a műtött végtag combján kismértékű növekedést mutattak (shunt oldal: $2,09 \pm 0,15$, nem műtött oldal: $2,06 \pm 0,21$, Kontroll: $1,96 \pm 0,06$). A mancsok területén azonban alacsonyabb értékek ($1,26 \pm 0,08$), mutatkoztak a nem műtött oldalhoz ($1,49 \pm 0,18$) és a Kontroll csoporthoz képest ($1,46 \pm 0,07$).

A Kontroll és az AV shunt csoport között nem volt különbség az artériás középnyomás ($129,2 \pm 15,5$ és $139,1 \pm 17,8$ Hgmm) és a szívfrekvencia között ($403,1 \pm 97,8$ és $399,7 \pm 102,2$ min^{-1}). A későbbi szövettani vizsgálatokkal is igazolt érett shunt-ök artériás és vénás szárainak véráramlási értékei a nem műtött oldali erekhez képest nagyobbak voltak ($p < 0,001$ és $p = 0,006$), de a Kontroll csoport értékeitől elmaradtak. Egyúttal az áramlási értékek arterio-venosus aránya is csökkent.

A micro-rheologiai paraméterek elemzésekor azt találtuk, hogy a vörösvérsejt aggregációs index (MI 10 s) a shunt-ök régiójából vett vérmintákban magasabb volt a nem műtött oldali és a Kontroll csoport AV adataihoz képest. A vörösvérsejt deformabilitás vizsgálatok (slit flow ektacytometer) az ép oldalon mutatkozó kismértékű, de jól kivehető arterio-venosus különbség a shunt oldalról vett vérmintákban elmosódott, alacsonyabb elongációs index értékeket mutatva mind az artériás, mind a vénás vérmintákban.

Konklúzió:

Az arteria saphena és a vena saphena medialis között mikrosebészeti módszerekkel létrehozott end-to-side anastomosiok utánkövetéses vizsgálata során is jól követhető volt az arterio-venosus micro-rheologiai paraméterek változása, kiegyenlítődése.

A fejezet alapjául szolgáló közlemény: Hevér T, Németh N, Bráth E, Tóth L, Kiss F, Sajtos E, Mátyás L, Szaszko J, Drimba L, Peitl B, Csiki Z, Mikó I, Furka I, Microsurgery 2010;30:649-656.

6.2.2. Vascularis graft jelenléte

Háttér, célkitűzés

A nyitott műtétek közül a bypass operációk, graft beültetések még mindig nagy jelentőséggel bírnak az érsebészeti gyakorlatban. A korai postoperatív időszak azonban mindig kritikus. Különböző szintetikus ér-graftok beültetése kapcsán a bio- és haemocompatibilitás mellett, a keringő vörösvérsejtekre ható mechanikus stressz is alapvető fontosságú haemorheologiai nézőpontot jelent, főleg a kis átmérőjű graftok esetén. A korai thrombosis problémája a kis átmérőjű művi graftok esetén még mindig nagy kihívást jelent. Nem teljes mértékben tisztázott még, hogy a megváltozott véráramlási tulajdonságok mikor érnek el olyan mértéket, amely már thromboticus szövődmény kialakulásához vezethet.

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

Anyagok és módszerek:

A kísérleteket hím és nőstény beagle kutyákon ($10,8 \pm 1,3$ kg) végeztük (engedélyszám: 20/2011. DE MÁB). A Kontroll csoportban ($n=4$) 2 órás altatás történt (10 mg/kg ketamin + 0,1 mg/kg xylazin, i.m.). Az Érgraft csoportban ($n=5$) altatásban feltárással került a bal oldali arteria femoralis, amelyből 3,5 cm-es excíziót végeztünk, helyére azonos hosszúságú, 3 mm átmérőjű politetrafluoretilén (PTFE) graft került beültetésre end-to-end anastomosisokkal, 6/0-s polypropylen varróanyag használatával. Az érkirekesztés időtartama $25 \pm 3,1$ perc volt. Anticoaguláns kezelésként a műtét alatt intravénásan 1000 NE Na-heparint, az 1. és a 3. postoperatív napokon pedig subcutan 500 NE enoxaparint (Clexane) alkalmaztunk mindkét csoportban. Fájdalomcsillapításként 1 ml/10 kg metamizolt használtunk (1g/2ml Algopyrin, i.m.), közvetlenül az operáció után és az 1. postoperatív napon. A műtétet követően, valamint az 1., 3., 5., 7. és 14. postoperatív napon mindkét hátsó végtag bőrhőmérsékletét mértük, az állatok mozgását-járását figyeltük, a vena cephalica-ból vérvétel történt haematologiai, haemostaseologiai és komplett haemorheologiai vizsgálatokra.

Eredmények:

A kéthetes követési időszak alatt sem korai, sem késői műtéti komplikációt nem tapasztaltunk: az állatok mozgása zavartalan volt, végtagkeringési problémára utaló jelet nem láttunk, a műtött és a nem műtött végtag bőrhőmérsékletének aránya nem változott. A haematologiai paraméterek az akut fázis történéseit tükrözték az első postoperatív héten megemelkedett fehérvérsejt- és thrombocytaszámmal. A haematocrit és a vörösvérsejtszám csökkent a követéses periódus során mindkét csoportban. Az aktivált partialis thromboplastin idő a 3. postoperatív napon ($p=0,048$ vs. alap) és a 7. napon ($p=0,012$) megemelkedett az Érgraft csoportban. A fibrinogén koncentráció szintén az Érgraft csoportban növekedett a korai postoperatív időszakban. Az 1. napi magasabb értékek után fokozatosan csökkenés volt megfigyelhető a második hét végéig.

Az Érgraft csoport aggregációs index (AI%) értékei kismértékben nőttek az 1., 3. és az 5. postoperatív napokon az Amp értékek párhuzamos emelkedésével (a 7. napon $p=0,008$ vs. Kontroll). Az 5. napig a $t_{1/2}$ értékek gyorsabb kinetikájú aggregációra utaltak az Érgraft csoportban. Az Érgraft csoport fénytranszmissziós elven mért M 5 s és M 10 s aggregációs index értékei szignifikáns mértékű emelkedést mutattak az 1. postoperatív héten. Az M 10 s index értékek mutatták a legnagyobb mértékű különbséget a két csoport között (az 1. napon $p=0,029$ vs. alap; a 3. napon: $p<0,001$ vs. alap és vs. Kontroll; az 5. napon: $p=0,006$ vs. alap és $p<0,001$ vs., Kontroll; és a 7. napon: $p=0,006$ vs. alap).

A hagyományos ektacytometriás mérések során a kalkulált EI_{max} folyamatos csökkenést mutatott, legnagyobb mértékben az Érgraft csoportban, ahol a 7. postoperatív napon mutatta a

legalacsonyabb értékeket ($p < 0,001$ vs. alap; $p < 0,001$ vs. Kontroll). Az $SS_{1/2}$ [Pa] értékek szignifikánsan magasabbak voltak az Érgraft csoportban a 3. napon ($p = 0,029$ vs. Kontroll), majd a 7. napra csökkentek ($p = 0,025$ vs. alap és $p = 0,042$ vs. Kontroll), a 14. napra újra megemelkedtek ($p = 0,011$ vs. Kontroll). Összességében az adatok vörösvérsejt deformabilitás romlásra utaltak.

Az ozmotikus gradiens ektacytometriás (osmoscan) mérések során nyert paraméterek közül a maximális elongációs index alacsonyabb volt az Érgraft csoportban, ahogy az a hagyományos ektacytometriás mérések eredményeiben is látszott. A minimális elongációs index értékek kismértékben, de nem szignifikánsan voltak magasabbak az 1., 3., 5. és 14. napokon az Érgraft csoportban. Ezzel párhuzamosan a vonatkozó ozmolalitás értékek a Kontroll csoporthoz viszonyítva hasonlóak, kismértékben alacsonyabbak vagy éppen magasabbak voltak, különösebb összefüggés nélkül. Az Érgraft csoport Area parameter (az elongációs index-ozmolalítás görbe alatti területéből kalkulált változó) a legalacsonyabb értékeket a 3-7. napokon mutatta (a 3. napon $p = 0,005$, az 5. napon $p = 0,017$ és a 7. napon $p = 0,061$ vs. Kontroll; ugyanekkor $p = 0,056$ vs. alap).

A membránstabilitás vizsgálatához kétféle protokollt használtunk, 60 Pa nyírófeszültség 300 másodpercig, illetve 100 Pa nyírófeszültség 300 másodpercig. Az alkalmazott mechanikus stressz előtt és után elvégzett normál ektacytometriás mérések eredményei kerültek összehasonlításra. A mechanikus stressz után az elongációs index értékek minden esetben szignifikánsan alacsonyabbak voltak a stressz előtti állapothoz képest ($p < 0,001$, a 0,95-30 Pa nyírófeszültség tartományban). Ez a különbség sokkal kifejezettebb volt, amikor a 100 Pa-os protokollt alkalmaztuk. A membránstabilitás vizsgálatok az Érgraft csoportban egyrészt alacsonyabb deformabilitási profilt, másrészt a mechanikus stressz hatására létrejövő beszűkülő deformabilitás-változási képességet jeleztek. Az ektacytometriás méréseknél a legnagyobb változásokat a 7. napon láthattuk. A mechanikus stabilitás eredményeit tovább elemezve a legszembetűnőbb mértékű különbségeket is ezen a napon láttuk.

Összegzés, konklúzió:

A kísérletben kimutattuk, hogy unilateralisan az arteria femoralis érszakasz 3,5 cm hosszúságú, 3 mm átmérőjű PTFE grafftal való pótlásakor, az első postoperatív héten nagyrészt lezajlanak a haematologiai, vörösvérsejt aggregációs és coagulációs időparaméterek változásai. Az Érgraft csoportban a vörösvérsejt aggregatio az 1-3. napon volt jelentősen fokozott, míg a vörösvérsejt deformabilitás a 3., az 5. és főként a 7. postoperatív napon mutatott szignifikáns mértékű romlást. A vörösvérsejt mechanikus stabilitási teszt ezeken a napokon jól kimutatható különbségeket adott az Érgraft csoportban a sejtek mechanikus stresszel szembeni csökkent tűrőképességét mutatva, együttesen az eleve rosszabb deformabilitási értékekkel. A 7. nap során mért legrosszabb deformabilitási paraméterek egybeeshettek a grafft kritikusán szűkítő, illetve elzáró longitudinális thrombus kialakulásával, amelyet az utólag végzett szövettani vizsgálatok megerősítettek. Feltételezhető, hogy a vérrög-képződés már a korai posztoperatív napokban megkezdődhetett és a 7. napra érhetett el azt a mértéket, amely már micro-rheologiai változásokhoz vezetett. Ez felhívhatja a figyelmet a vörösvérsejt deformabilitás és vörösvérsejt mechanikus stabilitás mérésének fontosságára az érgraft beültetését követő korai postoperatív napok monitorozásakor.

A fejezet alapjául szolgáló közlemények: (1) Tóth Cs, Kiss F, Klárik Z, Gergely E, Tóth E, Petó K, Ványolos E, Mikó I, Németh N, Korea-Aust Rheol J 2014;26:209-215.; (2) Tóth Cs, Klárik Z, Kiss F, Tóth E, Hargitai Z, Németh N, Acta Cir Bras 2014;29:320-327.

7. MEGBESZÉLÉS, ÖSSZEGRZÉS

A haemorheologiai paraméterek klinikai és kísérletes vizsgálatai számos kórképben és pathophysiologiai folyamat kapcsán nyújtanak információt a vér alakos és plazmatikus komponensei áramlási tulajdonságairól a keringés különböző szakaszain. Az elmúlt évtizedek során a meghatározásukra alkalmas mérőműszerek látványos fejlődésen mentek keresztül. A viszkozimetria különböző formái, majd a filtrometria, a fénytranszmissziós aggregometria és az ektacytometria megjelenésével a klinikai haemorheologia nagyléptékű fejlődése valósulhatott meg.

A mérésekhez megfelelő standardokra van szükség, hogy az eredmények megbízhatóan kerülhessenek értékelésre, összehasonlításra. Az első haemorheologiai nemzetközi méréstechnikai útmutató 1986-ban jelent meg „*Guidelines for measurement of blood viscosity and erythrocyte deformability*” címmel. 2005-ben a Magyar Haemorheologiai Társaság égisze alatt is megjelent egy magyar nyelvű útmutató a hazánkban elérhető műszerekre vonatkozó módszertani ajánlasként. Az 1986 óta eltelt időben számos új műszer jelent meg, több méréstechnikai tanulmány is készült, ezért 2007-ben egy új nemzetközi munkacsoport alakult (Committee for Guidelines of Assessment of Hemorheological Parameters), amelynek Magyarországról én lehettem a meghívott tagja. A munkacsoport üléseket, workshop-okat rendezett, további kiegészítő összehasonlító méréstechnikai tanulmányokat végzett, majd az International Society for Clinical Hemorheology és a European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation égisze alatt elkészítette az új haemorheologiai laboratóriumi méréstechnikai összefoglaló cikket „*New guidelines for hemorheological laboratory techniques*” címmel, amely 2009-ben jelent meg.

A kísérletes haemorheologia azonban nemcsak humán vérmintákat használ fel, hanem az adott kérdéskör megválaszolására a laborállat-tudományi elveknek megfelelően kiválasztott kísérleti/laboratórium állatfajok vérmintáit vizsgálja. Az eredmények alapján is látszik, hogy a kísérletes haemorheologia kihívásai igen összetettek, és számos kérdés még nem tisztázott. Az eredmények megfelelő értékeléséhez, összehasonlíthatóságához, extrapolálhatóságához pedig ezek elengedhetlenek.

Az összehasonlító és méréstechnikai vizsgálatok tapasztalatai a kísérletes haemorheologiai kutatások megbízhatóbb méréseit és eredményeinek pontosabb értékelhetőségét segíthetik. Az eredmények alapján a kísérletes haemorheológiában számos szempont és tényező azonosítható, amelyek a humán vérminták rheologiai méréseire szóló ajánlásoktól eltérnek:

- A kísérleti/laboratóriumi állatok haemorheologiai paraméterei jelentősen különbözhetnek egymástól, amely fajspecifikus illetve inter-species különbségek nem tekinthetők konzekvensnek, kimutathatóságuk metodika-függő.
- A kísérleti/laboratóriumi állatok haemorheologiai paraméterei nemi különbséget mutatnak, amelyek nem azonos irányúak az emberben adódó különbségekkel.
- Az adott metodika szerinti szükséges vérminta és az adott kísérleti állattól egyszeri vagy ismételt vérvételekkel levehető vérmennyiség közötti diszkrepancia (főleg rágcsálók esetén) a méréstechnika lehetőség szerinti módosítását igényelheti, amelyekhez standardizációs, összehasonlító vizsgálatok mindig szükségesek.
- A vérvételeknél szem előtt kell tartani, hogy a micro-rheologiai paraméterek arterio-venosus illetve aorto-porto-cavalis különbségeket mutathatnak.
- Általános méréstechnikai szempontok közül: az alkalmazott anticoagulans (pl. K₃-EDTA, Na-heparin) és a minta tárolási ideje és hőmérséklete (“*in vitro* aging”), valamint a centrifugálás micro-rheologiai paraméterekre kifejtett hatása különbözhet a fajok között.
- Módszerspecifikus méréstechnikai szempontok közül: jelentős érzékenységbeli különbség adódhat a sejtméret-pórusméret arány révén filtrometriás méréseknél, az

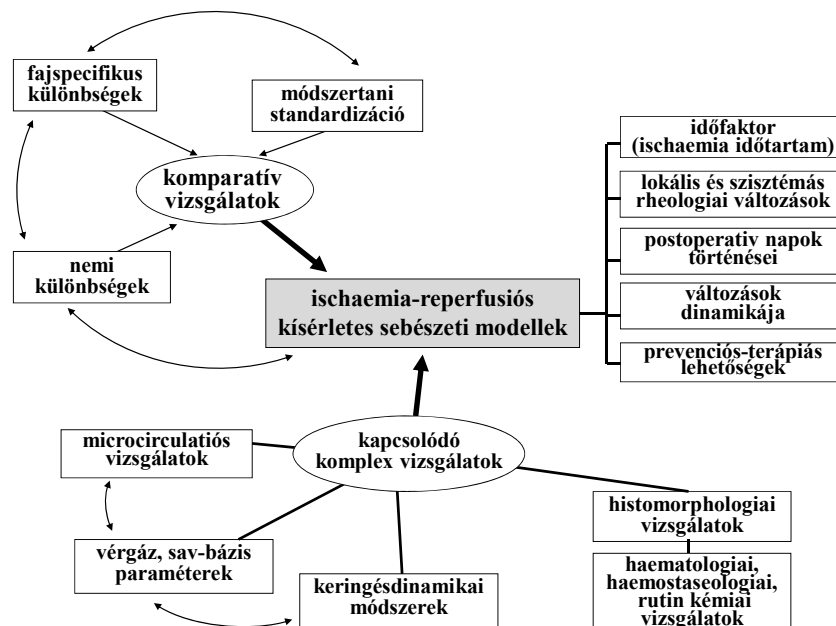
alkalmazott szuszpenziós oldat eltérő viszkozitása miatt ektacytometriás méréseknél, az applikált nyírófeszültségtől függően az osmoscan teszt, és a mechanikus stressz nagysága és időtartama révén a membránstabilitási teszt során.

Az eredmények felhívhatják a figyelmet a különböző állatfajok vérmintáinak haemorheológiai méréseinél a humán laboratórium standardoktól sok esetben eltérő szempontokra és buktatókra. A haemorheológiai, és kiemelten a micro-rheológiai paraméterek (vörösvérsejt deformabilitás, vörösvérsejt aggregatio) összehasonlító vizsgálatainak adatokat szolgáltathatnak a faji- és nemi különbségek, valamint a mintavételi, mintakezelési, mintatárolási, mintaelőkészítési standardok kialakításához, figyelembe véve az adott mérőműszerek érzékenységét, módszerspecifikus vonatkozásait is.

A humán laboratóriumi haemorheológiai mérés technikai útmutatókhoz hasonló, állatkísérletekre és haemorheológiai kísérletes sebészeti kutatásokra vonatkozó ajánlás nem ismert. Az eltérések, hasonlóságok, speciális kihívások és az eddig felhalmozódott eredmények és tapasztalatok alátámasztják egy experimentális haemorheológiai mérés technikai útmutató előkészítését.

A jól értékelhető kísérletes haemorheológiai eredmények hozzájárulhatnak számos pathophysiologiai folyamat és kórkép során kialakuló microcirculációs zavarok jobb megértéséhez, prognosztizálásához és a terápiás lehetőségeinek vizsgálatához.

A haemorheológiai összehasonlító vizsgálatok, a fajok közti általános és nemi különbségek feltárása, a szükség szerinti módszertani adaptációs munkák jelenthetik a megbízható haemorheológiai mérések hátterét adott kísérletes modellhez (1. ábra).



1. ábra

Az ischaemia-reperfúziós kísérletes sebészeti kutatások fő haemorheológiai kérdéskörei, és a megválaszolásukat segítő vizsgálatok

Az I/R haemorheológiai és mikrokeringési hatása máig nem tisztázott teljesen. A már visszafordíthatatlan károsodáshoz vezető ischaemia időtartama adott szerv, szerv-rendszer tekintetében pontosan még nem azonosítható. A reperfusio körülményei (hőmérséklet, intermittálás), a változások mértéke, a lokális és szisztémás eltérések különbségei, kiegyenlítődésük dinamikája részben nyitott kérdés még (1. ábra). A preventív és terápiás

lehetőségek szempontjából mindezek pontosabb megismerése, feltárása nagy jelentőséggel bír. Bár a pathomechanizmus számos eleme és tényezője azonosítható, azok egymást potenciózó hatásáról, a micro-rheologiai változások irreverzibilitásának határáról, a változások *in vivo* jelentőségéről kevés és ellentmondásos adat áll rendelkezésre.

Kísérleteink eredményeit tekintve is összetett a kép, hiszen nem minden esetben találtunk egy-egy tényezőt (pl. vér sav-bázis paraméterek) elsődleges meghatározó jellegűnek, míg más modellben igen. A vörösvérsejt deformabilitási és aggregációs változások együttesen, hasonló nagyságrendben, de egymástól eltérő mértékben is megjelenhetnek különböző szervek ischaemia-reperfusiója során. A I. táblázat különböző időtartamú és lokalizációjú ischaemia-reperfusio haemorheologiai főbb eredményeit, megállapításait foglalja össze kísérletes modelleken.

I. táblázat: Ischaemia-reperfusió kísérletes modelljeink főbb eredményei, megállapításai

Szerv/régió	Faj	Az ischaemia időtartama	Főbb eredmények, megfigyelések
Hátsó végtag	patkány	1 óra	A vörösvérsejt deformabilitás 1-2. postoperatív napra bekövetkező szignifikáns mértékű romlása kivédhető allopurinolos előkezeléssel.
	patkány	1 óra	A vörösvérsejt deformabilitás romlása nemi különbségeket mutat a korai postoperatív napok során, amelyet az előzetes gonadectomia módosít, kifejezettebb postischaemiás változásokat előidézve.
	patkány	1 óra	A postischaemiás microcirculációs romlás kimutatására kidolgozott laser Doppler-es teszttel a korai változások intraoperatív vizsgálhatóak.
	patkány	2 óra	A csökkenő pH és lokális haemoconcentratio a reperfusio első órájában arterio-venosus különbségeket mutathat.
	kutya	3 óra	Szignifikánsan romló vörösvérsejt deformabilitás mutatható ki a 2-3. postoperatív napokon. Haemoconcentratio az 1. napra, emelkedő fibrinogén koncentráció és plazma viszkozitás az 1-5. napon jelentkezik. A haemorheologiai és haemostaseologiai változások lokális hűtés alkalmazása mellett kifejezettebbek.
Vese	kutya	45 perc	A reperfusio első 30 percében mutatkozó vörösvérsejt deformabilitás rosszabbodás nem, de az 1-2. postoperatív napra jelentkező romlás allopurinollal kivédhető.
Máj	kutya	3x15 perc	Pringle (Báron) manőver során a lokális haematocrit, a vörösvérsejt aggregatio és fehérvérsejtszám jelentősen nő a portális vérmintákban a leszorítás háromszori ismétlése után.
Vékonybél	patkány	30 perc	A portális és cavalis vénás vérmintákban romlott vörösvérsejt deformabilitás volt kimutatható a reperfusio első 30 percében. A vörösvérsejt aggregatio a portális mintákban fokozottabb volt.
	kutya	30 perc	A vörösvérsejt deformabilitás a 3. postoperatív napra rosszabbodott.
Musculus latissimus dorsi lebeny	kutya	1 óra	A kontroll oldali izomlebennyel összehasonlítva a lokális haematocrit a reperfusio első órájában fokozatosan nőtt a lebeny vénájában (v. thoracodorsalis), míg a vörösvérsejt aggregatio fokozódás a reperfusio első 15 percében volt kifejezettebb.
Testis	patkány	30 perc	A vörösvérsejt deformabilitás kismértékben romlott, az aggregatio azonban jelentős mértékben fokozódott az 1. postoperatív napra.
Supra- vagy infrarenalis aorta abdominalis leszorítás	patkány	1 óra	A vörösvérsejt deformabilitás romlás bár jól kimutatható volt a reperfusio első órájában, a metabolikus (laktát koncentráció emelkedés és a pH csökkenés) és keringésdinamikai változások a micro-rheologiainál nagyobb mértékűek voltak.

A haemorheologiai paraméterek vizsgálata azonban önmagában nem elegendő egy olyan összetett történésorozat, mint az ischaemia-reperfusio tanulmányozásához. Keringésdinamikai, microcirculációs, haematologiai, haemostaseologiai, rutin kémiai, enzimológiai és hisztomorfológiai vizsgálatok segítenek a megértésben (1. ábra). Egy állatmodellen –függően a laboratóriumi állat fajától és figyelembe véve a vonatkozó laborállat-tudományi szempontokat– nem minden esetben lehet ennyi vizsgálati módszert alkalmazni, már csak a szükséges mintamennyiségek, illetve adott esetben az invazivitás mértéke, valamint a követéses vizsgálatok tekintetében sem.

Az eredmények értékelésénél figyelembe kell venni azt a tényt is, hogy a jelenleg elérhető haemorheologiai vizsgálómódszerek *ex vivo* vérmintákon, és sok esetben szélsőséges mikro környezetben vizsgálják a sejteket (pufferek, magas viszkozitású makromolekula oldatok, extrafiziológiás nyírófeszültség értékek). Így a valódi *in vivo* micro-rheologiai történések rejtve vannak még. Az intravitális videomikroszkópos módszerek is az áramlási sebességet, a capillarisok állapotát, akár a benne lévő aggregátumok azonosításával, vagy jelölt sejtek (ez sem élettani már) eloszlási dinamikáját képesek vizsgálni. Jelenleg nem ismert olyan vizsgálómódszer, amely *in vivo*, valós időben és adott keringési területen lokálisan képes lenne mérni a vörösvérsejtek deformabilitásának valamelyik eddig ismert vagy akár új paraméterét, illetve elemezni tudná az *in vivo* aggregatiót az *ex vivo* vizsgálatok részletességével. Az ilyen műszer technikai kihívást jelent, nemcsak az esetlegesen új módszer kialakítása, hanem a keringési rendszerbe való bejuttatása és pozicionálása kapcsán is (invazivitás mértéke, érátmérő limitáció, vérsejtek mechanikus károsodása, haemocompatibilitás). A jövő talán új módszereket is hoz, amelyekhez újabb mérés-technikai szempontok, standardizációs és összehasonlíthatósági kérdések adódnak majd.

8. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK, GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁG

Kutatómunkánk során haemorheologiai mérés technikai összehasonlító és módszertani standardizációs vizsgálatokat, humán vérminták és különböző kísérleti/labortóriumai állatfajok haemorheologiai komparatív vizsgálatait végeztünk, és ezen tapasztalatok szerzésével majd alkalmazásával különböző szervek, szervrendszerek ischaemia-reperfüsiója során kialakuló véráramlási és mikrokeringési változásait elemeztünk kísérletes sebészeti és mikrosebészeti modelleken.

Az eredmények alapján az egyes témakörök főbb megállapításai az alábbiakban fogalmazhatóak meg.

Haemorheologiai módszertani összehasonlító vizsgálatok, mérés technikai standardizáció:

1. Az állatkísérletek során a megfelelő vérvételi lokalizáció megválasztásához összehasonlító adatokat szolgáltatunk, kimutatva CD patkányoknál a vörösvérsejt deformabilitás és a vörösvérsejt aggregatio jelentős arterio-venosus, illetve aorto-porto-cavalis micro-rheologiai alap különbségeket. A legalacsonyabb elongációs index értékeket az artériás vérmintákban mértük, a legmagasabbat a szisztémás vérmintákban. A portális vérminták értékei e kettő közé estek. Az aggregációs index alacsonyabb volt a szisztémás vénás vérmintákban, mint az artériásban és a portális mintákban. Az adatok a mintavételi hely standardizálásának fontosságára hívhatják fel a figyelmet, és hozzájárulhatnak az ischaemia-reperfüsió, illetve különféle arterio-venosus és porto-cavalis shunt-ök készítése révén kialakuló rheologiai eltérések jobb megértéséhez.
2. A vörösvérsejt deformabilitás ektacytometriás (slit flow) meghatározása kapcsán először mutattuk ki, hogy a mintavételnél alkalmazott anticoagulánsok (K₃-EDTA, Na-heparin) mérési eredményekre kifejtett hatása különbözhet a laboratóriumi állatfajokban. CD patkányok esetén nem találtunk különbséget, beagle kutyák heparinnal anticoagulált vérmintáiban azonban szignifikánsan alacsonyabb elongációs index értékeket mértünk.
3. Adatokat szolgáltatunk CD patkányok és beagle kutyák vérmintáinak szobahőmérsékleten vagy hűtéssel történő tárolása során bekövetkező micro-rheologiai változások mértékéről. Először mutattuk ki patkány vérminta szobahőmérsékleten való tárolása során jelentkező bifázisos jellegű vörösvérsejt aggregációs index csökkenést és a látszólagos „normalizálódást”. Ajánlható, hogy kutya és patkány vérmintáknál a deformabilitási méréseket 4-6 órán belül el kell végezni, de a legjobb 2 órán belül. Az aggregációs méréseket patkány vérmintákon lehetőleg közvetlenül a vérvételt követően el kell végezni. Humán vérminták deformabilitás értékei 6 órán, az aggregációs mérések szobahőmérsékleten 4 órán belül stabilak. Az aggregációs mérések ideje hűtéssel mintegy 12 óráig prolongálható, deformabilitás méréseknél 6 órán túl már romlásra kell számítani.
4. Centrifugálás micro-rheologiai hatásait vizsgálva azt találtuk, hogy az 500 g, 1000 g vagy 1500 g erővel 10 percig 15 °C-on végzett centrifugálás hatására a vörösvérsejt deformabilitási és ozmotikus gradiens ektacytometriás paraméterek, valamint a membránstabilitás (100 Pa nyírófeszültség 5 perci alkalmazása után) nem változik jelentősen patkány, kutya, sertés és emberi vérmintákban. A vörösvérsejt aggregációban különböző mértékű és irányú változások várhatóak. Patkány és kutya értékei az alkalmazott g erő növelésével csökkennek, a sertések értékei már 500 g-nél jelentősen megemelkednek, míg a humán vörösvérsejtek értékei stabilak maradnak.
5. A vörösvérsejt deformabilitás filtrimetriás meghatározásához módszertani adaptációt és standardizációs vizsgálatokat végeztünk a kismennyiségű vérminta (0,5 ml) felhasználási lehetőségének megítélésére. A sejtméret-pórusméret arány tekintetében adatokat szolgáltatunk a módszer érzékenységének meghatározásához. Először mutattuk ki a módszerben rejlő vörösvérsejt méret- és haematocrit-függő torzító hatást, amelyhez matematikai analízist végeztünk a biztonságosan értékelhető eredményeket nyújtó sejtméret-pórusméret arány meghatározásához.

6. Kimutattuk, hogy az ektacytometriás mérések során alkalmazható, különböző viszkozitású PVP oldatok használata jelentősen befolyásolhatja a mért deformabilitási értékeket. Egyes állatfajok (kutya, patkány) vérmintáin a mérések érzékenysége azonos viszkozitású oldatban is eltérő lehet.
7. Az ozmotikus gradiens ektacytometria (osmoscan) módszertani összehasonlító vizsgálatában patkány, kutya, sertés és humán vérmintákon elemeztük az alkalmazott nyírófeszültség hatását a kapott eredményekre. Az osmoscan adatok 20 vagy 30 Pa alkalmazása mellett nem térnek el szignifikánsan egymástól, 20 Pa alatt a paraméterek közel lineárisan csökkennek a nyírófeszültség függvényében, de különböző meredekséggel a vizsgált fajok vérmintáiban. 3 Pa nyírófeszültség alatt a mérések egyre nagyobb mértékben válnak instabillá. Az elongatiós index – ozmolalítás görbéiben rejlő információtartalom jobb kiaknázása érdekében új, a vörösvérsejt deformabilitás változást nagyobb érzékenységgel jelző kalkulált paramétereket tudunk alkalmazni: a minimális és maximális EI abszolút és relatív különbsége (ΔEI , rEI), a hozzátartozó ozmolalítás (ΔO , rO), valamint ezek egymáshoz viszonyított arányszámai ($\Delta EI/\Delta O$ and rEI/rO).

Faji- és nemi haemorheologiai különbségek vizsgálatai:

8. A faji különbségek haemorheologiai vizsgálata során kimutattuk, hogy CD patkányoknál jobb vörösvérsejt deformálhatóság és alacsonyabb vörösvérsejt aggregációs készség mérhető jelentősen magasabb vér viszkozitás értékekkel, mint beagle kutyáknál. E két állatfajban a haematocrit/viszkozitás arány összehasonlításában először mutattuk ki az „optimális haematocrit” értékeket különböző sebesség-gradiens mellett.
9. A vörösvérsejt deformabilitás mérések adatainak összevetésével a vizsgált fajok között az alábbi relációt adhattuk meg: EI_{max} sertés < patkány < ember < kutya < egér, $SS_{1/2}$ sertés < egér ~ patkány < ember < kutya. Először mutattuk ki, hogy a vörösvérsejt membránstabilitásban jelentős faji különbség mutatkozik az alkalmazott mechanikus stressz nagyságától és expozíciós idejétől függően. A mechanikus stressz a közeg ozmolalításától függően javítja (200 mOsm/kg-nál) vagy rontja (250-300 mOsm/kg-nál) a deformabilitást. Ennek mértéke szintén faji különbségeket mutat: patkány és sertés vérmintákban kifejezetten javult a deformabilitás alacsony ozmolalítású közegben mérve.
10. A vizsgált specíesek ozmotikus gradiens ektacytometriás paramétereinek összehasonlításában a legszembetűnőbb különbséget a sertésvérminták elongatiós index – ozmolalítás görbéinek jobbra tolódása, azaz magasabb ozmolalítás tartományban való elhelyezkedése jelentette. A maximális elongatiós indexhez tartozó ozmolalítás értéke jóval 300 mOsm/kg felett volt. Inbred egereknél is 300 mOsm/kg feletti értékeket mérhettünk a legmagasabb elongatiós indexnél. Ugyanakkor az egerek elongatiós index értékei magasabbak voltak a sertésekénél, de mindkettőnek jóval magasabb volt az O (EI_{max}) értéke patkánnyal, kutyával vagy emberrel való összehasonlításban.
11. A vörösvérsejt aggregatio tekintetében a dinamikus paramétereket is figyelembe véve elmondható, hogy a patkányban a leggyorsabb és legnagyobb mértékű az erythrocyta aggregatio. Egérben jóval lassabban megy végbe a folyamat, míg a kutya, a sertés a vizsgált paraméterek nagyságrendje tekintetében az emberrel komparabilis.
12. Folyamatosan bővülő laboratórium-specifikus adatbázist hoztunk létre a nemi különbségek haemorheologiai vizsgálatára különböző laboratóriumi állatfajok vonatkozásában. Először mutattuk ki, hogy a vörösvérsejt deformabilitás CD patkányoknál a nőstényekben jobb, magasabb aggregációs index értékekkel. Beagle kutyáknál a hímek rendelkeznek jobb vörösvérsejt deformabilitási adatokkal, de fokozottabb vörösvérsejt aggregációs készséggel.
13. A gonadectomia haemorheologiai hatásait vizsgálva először mutathattuk ki, hogy a micro-rheologiai paraméterek eltérő mértékben változnak hím és nőstény Sprague-Dawley patkányokban. Az oestrogen szint csökkenése nagyobb arányú romlást okozott a vörösvérsejt deformabilitásban és aggregációban, mint a testosteron szint csökkenése.

Az ischaemia-reperfusio haemorheologiai és microcirculációs vonatkozásai:

14. A vörösvérsejt deformabilitás és aggregatio jelentős mértékű lokális változásait mutathattuk ki végtagi-, vékonybél-, izomlebeny- és here ischaemia-reperfusio során, valamint cerebralis hypoperfusio alatt CD patkány-, beagle kutya- és sertés modelleken. A változások nagysága függött az ischaemia időtartamától, a keringésből kirekesztett régió anatómiai jellemzőitől, valamint a lokális metabolikus változások mértékétől. Kísérletes modelljeinken kívül az irodalomban erre vonatkozóan kevés adat ismert.
15. Először mutattuk ki, hogy a végtagi ischaemia-reperfusio hatására létrejövő vörösvérsejt deformabilitásban és vörösvérsejt aggregatcióban bekövetkező változások mértéke különbözik hím és nőstény Sprague-Dawley patkányokon, mely különbségek eltérő mértékűek gonadectomiát követően.
16. A supra- és infrarenalis szintű aorta abdominalis időleges leszorítás hatását vizsgálva a legmarkánsabb keringésdinamikai változások a suprarenalis csoportban mutatkoztak a reperfusio alatt, amelyet a vékonybél felszínén a mikrokeringési értékek fokozódása, a vesében azok csökkenése követett. A legnagyobb pH csökkenés és laktát koncentráció-növekedés a suprarenalis csoportban volt kimutatható. A vörösvérsejt deformabilitási paraméterek romlása már az ischaemia végére, majd a reperfusio során szignifikáns mértékű volt. Ebben a kísérletben a vörösvérsejt deformabilitás nagyobb mértékű romlást mutatott, mint a vörösvérsejt aggregatio. Összességében a hemodinamikai és sav-bázis értékek eltérései sokkal kifejezettebbek voltak, mint a micro-rheologiai változások.
17. Az arteria saphena és a vena saphena medialis között mikrosebészeti módszerekkel létrehozott end-to-side anastomosisok követéses vizsgálata során kimutattuk az arterio-venosus micro-rheologiai paraméterek változásának kiegyenlítődését patkányban.
18. Kéthetes követéses vizsgálat során kimutattuk, hogy az arteria femoralis érszakasz 3,5 cm hosszúságú, 3 mm átmérőjű PTFE grafftal való pótlásakor, az első postoperatív héten nagyrészt lezajlanak a haematologiai, vörösvérsejt aggregációs és coagulációs időparaméterek szignifikáns változásai beagle kutyákban. A vörösvérsejt aggregatio az 1-3. napon volt jelentősen fokozott, a vörösvérsejt deformabilitás szignifikáns mértékű romlást a 3., az 5. és főként a 7. postoperatív napon mutatott. A vörösvérsejt mechanikus stabilitási teszt ezeken a napokon jól kimutatható különbségeket mutatott: az Érgraft csoportban a deformabilitás kisebb mértékben csökkent a membránstabilitás teszt során, amely a sejtek mechanikus stresszel szembeni csökkenést tükrözheti, együttesen az eleve rosszabb deformabilitási értékekkel. A 7. nap során mért legrosszabb deformabilitási paraméterek egybeeshettek a grafftot kritikusan szűkítő, illetve elzáró thrombus kialakulásával, amelyet az utólag végzett szövettani vizsgálatok megerősítettek. Ez felhívhatja a figyelmet a vörösvérsejt deformabilitás és vörösvérsejt mechanikus stabilitás mérésének fontosságára az érgraft beültetését követő korai postoperatív napok monitorozásakor. Ezért a részletes micro-rheologiai vizsgálatok ajánlottak lehetnek a különböző méretű és geometriájú grafftok követéses vizsgálataiban.

Összességében, a sebészeti, mikrosebészeti ischaemia-reperfusió állatkísérletes modelleken a megbízható, jól összehasonlítható eredmények biztosítása érdekében a bemutatott mérés-technikai standardizációs és összehasonlító haemorheologiai vizsgálatok hasznosítható adatokat szolgáltathatnak. Az ischaemia-reperfusió kísérletek eredményei hozzájárulhatnak a klinikum számára is fontossággal bíró lokális-szisztémás rheologiai és mikrokeringési elváltozások jobb megértéséhez, a prevenció és terápia lehetőségének optimalizálásához, bővítéséhez.

9. Közlemények

9.1. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

1. **Németh N**, Lesznyák T, Szokoly M, Bráth E, Pető K, Szabó G, Gulyás A, Kiss F, Imre S, Furka I, Mikó I: A haemorheologiai vizsgálatok jelentősége kísérletes végtagi ischaemia-reperfüsiós károsodások kapcsán. *Magyar Sebészet* 2005;58(2): 144-147.
IF: - Citáció: 2; független: 1
2. **Németh N**, Soukup J, Menzel M, Henze D, Clausen T, Rieger A, Holz C, Scharf A, Hanisch F, Furka I, Mikó I: Local and systemic hemorheological effects of cerebral hyper- and hypoperfusion in a porcine model. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006;35(1-2):59-65.
IF: 1,242 Citáció: 13; független: 7
3. **Németh N**, Gulyás A, Bálint A, Pető K, Bráth E, Kiss F, Furka I, Baskurt OK, Mikó I: Measurement of erythrocyte deformability and methodological adaptation for small-animal microsurgical models. *Microsurgery* 2006;26(1):33-37.
IF: 0,882 Citáció: 9; független: 4
4. Szokoly M, **Németh N**, Hamar J, Furka I, Mikó I: Early systemic effects of hind limb ischemia-reperfusion on hemodynamics and acid-base balance in the rat. *Microsurgery* 2006;26(8):585-589.
IF: 0,882 Citáció: 11; független: 3
5. **Németh N**, Alexy T, Furka A, Baskurt OK, Meiselman HJ, Furka I, Mikó I: Inter-species differences in hematocrit to blood viscosity ratio. *Biorheology* 2009;46(2):155-165.
IF: 1,279 Citáció: 25; független: 12
6. **Németh N**, Baskurt OK, Meiselman HJ, Kiss F, Uyuklu M, Hevér T, Sajtos E, Kenyeres P, Tóth K, Furka I, Mikó I: Storage of laboratory animal blood samples causes hemorheological alterations: Inter-species differences and the effects of duration and temperature. *Korea-Aust Rheol J* 2009;21(2):127-133.
IF: 0,965 Citáció: 24; független: 10
7. **Németh N**, Baskurt OK, Meiselman HJ, Furka I, Mikó I: Hemorheological measurements in experimental animals: Further consideration of cell size - pore size relations in filtrometry. *Korea-Aust Rheol J* 2009;21(3):155-160.
IF: 0,965 Citáció: 5; független: -
8. Baskurt OK, Hardeman MR, Uyuklu M, Ulker P, Cengiz M, **Németh N**, Shin S, Alexy T, Meiselman HJ. Comparison of three commercially available ektacytometers with different shearing geometries. *Biorheology* 2009;46(3):251-264.
IF: 1,279 Citáció: 34; független: 23
9. Baskurt OK, Uyuklu M, Ulker P, Cengiz M, **Németh N**, Alexy T, Shin S, Hardeman MR, Meiselman HJ. Comparison of three instruments for measuring red blood cell aggregation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2009;43(4):283-298.
IF: 1,78 Citáció: 21; független: 8
10. Uyuklu M, Cengiz M, Ulker P, Hevér T, Tripette J, Connes P, **Németh N**, Meiselman HJ, Baskurt OK: Effects of storage duration and temperature of human blood on red cell deformability and aggregation. *Hemorheol Microcirc* 2009;41(4):269-278.
IF: 1,78 Citáció: 27; független: 18
11. Baskurt OK, Hardeman MR, Uyuklu M, Ulker P, Cengiz M, **Németh N**, Shin S, Alexy T, Meiselman HJ. Parameterization of red blood cell elongation index-shear stress curves obtained by ektacytometry. *Scand J Clin Lab Invest* 2009;69(7):777-788.
IF: 1,38 Citáció: 48; független: 24
12. **Németh N**, Baskurt OK, Meiselman HJ, Mikó I: Species-specific effects of anticoagulants on red blood cell deformability. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009;43(3):257-259.
IF: 1,78 Citáció: 9; független: 2
13. Tamás R, **Németh N**, Bráth E, Sásvári M, Nyakas C, Debreczeni B, Mikó I, Furka I: Hemorheological, morphological, and oxidative changes during ischemia-reperfusion of latissimus dorsi muscle flaps in a canine model. *Microsurgery* 2010;30(4):282-288.
IF: 1,555 Citáció: 17; független: 13
14. Bráth E, **Németh N**, Kiss F, Sajtos E, Hevér T, Mátyás L, Tóth L, Mikó I, Furka I: Changes of local and systemic hemorheological properties in intestinal ischemia-reperfusion injury in the rat model. *Microsurgery* 2010;30(4):321-326.
IF: 1,555 Citáció: 10; független: 5

15. Hevér T, Kiss F, Sajtos E, Mátyás L, **Németh N**: Are there arterio-venous differences of blood micro-rheological variables in laboratory rats? *Korea-Aust Rheol J* 2010;22(1):59-64.
IF: 0,948 Citáció: 6; független: 3
16. Hevér T, **Németh N**, Bráth E, Tóth L, Kiss F, Sajtos E, Mátyás L, Szaszko J, Drimba L, Peitl B, Csiki Z, Mikó I, Furka I: Morphological, hemodynamical and hemorheological changes of mature artificial saphenous arterio-venous shunt in the rat model. *Microsurgery* 2010;30(8):649-656.
IF: 1,555 Citáció: 6; független: 3
17. Kiss F, Sajtos E, Mátyás L, Magyar Zs, Furka I, Mikó I, **Németh N**: Testing red blood cell deformability of laboratory animals by slit-flow ektacytometry in various viscosity media: inter-species and gender differences. *Korea-Aust Rheol J* 2010;22(2):113-118.
IF: 0,948 Citáció: 7; független: 1
18. **Németh N**, Kiss F, Furka I, Mikó I: Gender differences of blood rheological parameters in laboratory animals. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010;45(2-4):263-272.
IF: 2,838 Citáció: 21; független: 12
19. **Németh N**: A haemorheologia jelentősége az állatkísérletekben és lehetséges kapcsolata az állatorvos-tudományhoz. *Magyar Állatorvosok Lapja* 2011;133(10): 612-619.
IF: 0,201 Citáció: 4 ; független: -
20. **Németh N**, Kiss F, Hevér T, Bráth E, Sajtos E, Furka I, Mikó I: Hemorheological consequences of hind limb ischemia-reperfusion differ in normal and gonadectomised male and female rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 2012;50(3):197-211.
IF: - Citáció: 10; független: 7
21. **Németh N**, Kiss F, Magyar Zs, Miszti-Blasius K, Furka I: Following-up hemorheological consequences of gonadectomy in male and female rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 2012;50(4):231-243.
IF: - Citáció: 4; független: 3
22. **Németh N**, Mikó I, Furka A, Kiss F, Furka I, Koller Á, Szilasi M: Concerning the importance of changes in hemorheological parameters caused by acid-base and blood gas alterations in experimental surgical models. *Clin Hemorheol Microcirc* 2012;51(1):43-50.
IF: - Citáció: 15; független: 7
23. 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* 2013;53(3):217-229.
IF: 2,215 Citáció: 6; független: 1
24. **Németh N**, Kiss F, Furka I, Mikó I: A haemorheologiai vizsgálatok kísérletes sebészeti vonatkozásairól. *Magyar Sebészet* 2013;66(3):161-165.
IF: - Citáció: 7; független: 2
25. **Németh N**, Kiss F, Klárik Z, Mikó I: Comparative osmotic gradient ektacytometry data on inter-species differences of experimental animals, *Clin Hemorheol Microcirc* 2014;57(1):1-8.
IF: 2,242 Citáció: 10; független: 6
26. Tóth Cs, Kiss F, Klárik Z, Gergely E, Tóth E, Pető K, Ványolos E, Mikó I, **Németh N**: Following-up changes in red blood cell deformability and membrane stability in the presence of PTFE graft implanted into the femoral artery in a canine model. *Korea-Aust Rheol J* 2014;26(2):209-215.
IF: 0,875 Citáció: 2 ; független: 1
27. Tóth Cs, Klárik Z, Kiss F, Tóth E, Hargitai Z, **Németh N**: Early postoperative changes in hematological, erythrocyte aggregation and blood coagulation parameters after unilateral implantation of polytetrafluoroethylene vascular graft in the femoral artery of beagle dogs. *Acta Cir Bras* 2014;29(5):320-327.
IF: 0,661 Citáció: 2; független: 2
28. **Németh N**, Kiss F, Klárik Z, Pető K, Ványolos E, Tóth L, Mikó I, Furka I: Testicular ischemia-reperfusion may alter micro-rheological parameters in laboratory rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 2014;57(3):243-253.
IF: 2,242 Citáció: 5; független: -
29. **Németh N**, Furka I, Mikó I: Hemorheological changes in ischemia-reperfusion: an overview on our experimental surgical data. *Clin Hemorheol Microcirc* 2014;57(3):215-225.
IF: 2,242 Citáció: 13; független: 9

30. **Németh N**, Kiss F, Klárik Z, Tóth E, Mester A, Furka I, Mikó I: Simultaneous investigation of hemodynamic, microcirculatory and arterio-venous micro-rheological parameters in infrarenal or suprarenal aortic cross-camplng model in the rat. *Clin Hemorheol Microcirc* 2014;57(4):339-353.
IF: 2,242 Citáció: - ; független: -
31. **Németh N**, Kiss F, Miszti-Blasius K: Interpretation of osmotic gradient ektacytometry (osmoscan) data: A comparative study for methodological standards. *Scand J Clin Lab Invest*. 2015;75(3):213-222.
IF: 1,899 Citáció: 2 ; független: 2
32. Kiss F, Klárik Z, Tóth E, Pető K, Mikó I, **Németh N**: The investigation of inter-species diversity of erythrocyte aggregation properties by two different photometric methods in four animal species, *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2015;99(6):1074-1083.
IF: 1,406 Citáció: 2 ; független: 2
33. Kiss F, Tóth E, Miszti-Blasius K, **Németh N**: The effect of centrifugation at various g force levels on micro-rheological properties of rat, dog, pig and human red blood cells. *Clin Hemorheol Microcirc* 2016;62(3):215-227.
IF: 2,242 Citáció: 1; független: 1
34. **Németh N**, Sógor V, Kiss F, Ülker P: Interspecies diversity of erythrocyte mechanical stability at various combinations in magnitude and duration of shear stress, and osmolality. *Clin Hemorheol Microcirc* 2016 – *ePub ahead of print (2016. január 27.)*, doi: 10.3233/CH-152031
IF: 2,242 Citáció: -; független: -

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktor értéke összesen: 44,322

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények citációi összesen: 378, ebből független: 192

9.2. Az értekezésben nem szereplő saját közlemények

Könyvfejezetek:

1. **Németh N**, Tóth E, Nemes B: Agents targeting ischemia-reperfusion injury. In: Huifang C, Shiguang Q (szerk.), *Current Immunosuppressive Therapy in Organ Transplantation*. Hauppauge; New York: Nova Science Publishers, 2015. pp. 487-533.
Citáció: -; független: -
2. Mikó I, **Németh N**, Furka I: Spleen autotransplantation in mice. In: Huifang C, Shiguang Q (szerk.), *Experimental Organ Transplantation*. Hauppauge; New York: Nova Science Publishers, 2013. pp. 107-120.
Citáció: -; független: -

In extenso közlemények:

1. Mikó I, Bráth E, **Németh N**, Tóth FF, Sipka S, Kovács J, Sipka S Jr, Facht J, Furka A, Furka I, Zhong R: Hematological, hemorheological, immunological, and morphological studies of spleen autotransplantation in mice: preliminary results. *Microsurgery* 2003;23(5):483-488. (*PhD értekezés alapjául szolgált, 2004*)
IF: 0,711 Citáció: 19; független: 6
2. **Németh N**, Lesznyák T, Bráth E, Ács G, Nagy Á, Pap-Szekeres J, Furka I, Mikó I: Changes in microcirculation after ischemic process in rat skeletal muscle. *Microsurgery* 2003;23(5):419-423. (*PhD értekezés alapjául szolgált, 2004*)
IF: 0,711 Citáció: 14; független: 8
3. **Németh N**, Ács G, Lesznyák T, Bráth E, Imre S, Urbán F, Menzel M, Furka I, Mikó I: A vörösvérsejtek deformabilitásáról nyert mérési tapasztalatok laboratóriumi állatfajokon. *Magyar Állatorvosok Lapja* 2004;126(4):225-230. (*PhD értekezés alapjául szolgált, 2004*)
IF: 0,158 Citáció: 8; független: 2
4. Pap-Szekeres J, Cserni G, Furka I, Svébis M, Cserni T, Bráth E, **Németh N**, Mikó I: Transplantation and microsurgical anastomosis of free omental grafts: experimental animal model of a new operative technique in dogs. *Microsurgery* 2003;23(5):414-418.
IF: 0,711 Citáció: 6; független: 4
5. Csízy I, Furka I, Cserni T, Józsa T, Oláh C, Pető K, **Németh N**, Mikó I: Szöveti microcirculatio mérése kísérletes ureter-neoimplantációk során. *Orvosi Hetilap* 2003;144(3):129-132.
IF:- Citáció: 6; független: 1

6. Clausen T, Scharf A, Menzel M, Soukup J, Holz C, Rieger A, Hanisch F, Brath E, **Németh N**, Mikó I, Vajkoczy P, Radke J, Henze D: Influence of moderate and profound hyperventilation on cerebral blood flow, oxygenation and metabolism. *Brain Res* 2004;1019(1-2):113-123.
IF: 2,389 Citáció: 38; független: 37
7. **Németh N**, Szokoly M, Ács G, Bráth E, Lesznyák T, Furka I, Mikó I: Systemic and regional hemorheological consequences of warm and cold hind limb ischemia-reperfusion in a canine model. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004;30(2):133-145.
IF: 0,63 Citáció: 22; független: 8
8. Cserni T, Szekeres JP, Furka I, **Németh N**, Józsa T, Mikó I: Hydrostatic characteristics of the ileocolic valve and intussuscepted nipple valves: an animal model. *J Invest Surg* 2005;18(4):185-191.
IF: 0,857 Citáció: 5; független: 3
9. Pap-Szekeres J, Cserni G, Furka I, Svébis M, Cserni T, Bráth E, **Németh N**, Mikó I: A new concept for esophageal resection - prevascularization: an experimental study. *Dis Esophagus* 2005;18(4):274-280.
IF: 0,936 Citáció: 4; független: 4
10. Mikó I, Serfőző J, Kappelmayer J, Sipka S, Furka A, Imre S, Galuska L, Kovács J, Bráth E, Pető K, **Németh N**, Furka I: Megmenthető-e a sérült lép? 20 év kutatási eredményei. 2005;58(2):69-73.
IF: - Citáció: 6; független: 4
11. Bráth E, **Németh N**, Papp L, Békési L, Varga S, Tóth A, Mikó I, Furka I: Mikrosebészeti oktatás a kutatás és a klinikai gyakorlat szolgálatában. *Magyar Sebészet* 2005;58(2):111-115.
IF: - Citáció: 5; független: 3
12. Pap-Szekeres J, Pető K, **Németh N**, Cserni G, Furka I, Svébis M, Cserni T, Bráth E, Mikó I: Extraabdominalisan átültetett cseplesz lebeny mikrocirkulációjának intraoperatív vizsgálata laser Doppler flowmetria segítségével kutyán. 2005;58(2):116-119.
IF: - Citáció: 2; független: 1
13. Lesznyák T, **Németh N**, Bráth E, Pető K, Pekár G, Nagy D, Ács G, Dinya Z, Pap Szekeres J, Mikó I, Furka I: A vese neovascularizációja a nagycseplesz felhasználásával omentális angiogén faktor előkezeléssel. 2005;58(2):129-133.
IF: - Citáció: 3; független: 3
14. Pető K, Oláh VA, Bráth E, **Németh N**, Gulyás A, Szilasi M, Sárvári M, Furka I, Mikó I: Ischaemia-reperfüziós vesekárosodás és az Allopurinol védő hatásának kimutatása vizelet NAG követésével. 2005;58(2):134-137.
IF: - Citáció: 6; független: 4
15. Szokoly M, **Németh N**, Bráth E, Ács G, Hamar J, Mikó I, Furka I: Kísérletes „funkcionális amputációs modell” lehetősége az ischaemia-reperfüzio tükrében. 2005;58(2):138-143.
IF: - Citáció: 2; független: 1
16. Furka I, Bráth E, **Németh N**, Mikó I: Gondolatok a mikrosebészeti oktatásról. Mire volt elég az 5460 óra a mikrosebészeti alapoktatásban? *Magyar Sebészet* 2006;59(3):147-151.
IF: - Citáció: 4; független: 3
17. Furka I, Bráth E, **Németh N**, Mikó I: Learning microsurgical suturing and knotting techniques: comparative data. *Microsurgery* 2006;26(1):4-7.
IF: 0,882 Citáció: 21; független: 18
18. Mikó I, **Németh N**, Sipka S Jr, Bráth E, Pető K, Gulyás A, Furka I, Zhong R: Hemorheological follow-up after splenectomy and spleen autotransplantation in mice. *Microsurgery* 2006;26(1):38-42.
IF: 0,882 Citáció: 18; független: 8
19. Sipka S Jr, Bráth E, Tóth FF, Fábrián Á, Krizsán C, Baráth S, Sipka S, **Németh N**, Bálint A, Furka I, Mikó I: Distribution of peripheral blood cells in mice after splenectomy or autotransplantation. *Microsurgery* 2006;26(1):43-49.
IF: 0,882 Citáció: 11; független: 7
20. **Németh N**, Lesznyák T, Szokoly M, Furka I, Mikó I: Allopurinol prevents erythrocyte deformability impairing but not the hematological alterations after limb ischemia-reperfusion in rats. *J Invest Surg* 2006;19(1):47-56.
IF: 1,107 Citáció: 28; független: 15
21. Alexy T, **Németh N**, Wenby RB, Bauersachs RM, Baskurt OK, Meiselman HJ: Effect of lanthanum on red blood cell deformability. *Biorheology* 2007;44(5-6):361-373.
IF: 1,488 Citáció: 7; független: 6

22. Henze D, Menzel M, Soukup J, Scharf A, Holz C, **Németh N**, Hanisch F, Clausen T: Endothelin-1 and cerebral blood flow in a porcine model. *J Clin Neurosci* 2007;14(7):650-657.
IF: 0,801 Citáció: 4; független: 4
23. Mikó I, Bráth E, **Németh N**, Furka A, Sipka S Jr, Pető K, Serfőző J, Kovács J, Imre S, Benkő I, Galuska L, Sipka S, Ács G, Furka I: Spleen autotransplantation. Morphological and functional follow-up after spleen autotransplantation in mice: a research summary. *Microsurgery* 2007;27(4):312-316.
IF: 1,07 Citáció: 21; független: 13
24. **Németh N**: Microsurgery and music: Parallel ideas and philosophy? *Microsurgery* 2007;27(3):155-157.
IF: 1,07 Citáció: 2; független: 1
25. Pető K, **Németh N**, Bráth E, Takács IE, Baskurt OK, Meiselman HJ, Furka I, Mikó I: The effects of renal ischemia-reperfusion on hemorheological factors: preventive role of allopurinol. *Clin Hemorheol Microcirc* 2007;37(4):347-358.
IF: 0,977 Citáció: 20; független: 10
26. Soukup J, Rieger A, Holz C, Mikó I, **Németh N**, Menzel M: Temperature gradient between brain tissue and arterial blood mirrors the flow-metabolism relationship in uninjured brain: an experimental study. *Acta Anaesth Scand* 2007;51(7):872-879.
IF: 1,719 Citáció: 3; független: 3
27. Furka A, **Németh N**, Gulyás A, Bráth E, Pető K, Takács EI, Furka I, Sáyó P, Mikó I: Hemorheological changes caused by intermittent Pringle (Baron) maneuver in beagle canine model. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008;40(3):177-189.
IF: 1,814 Citáció: 15; független: 4
28. Cserni T, Paran S, Kanyári Z, O'Donnell AM, Kutasy B, **Németh N**, Puri P: New insights into the neuromuscular anatomy of the ileocecal valve. *Anat Rec* 2009;292(2):254-261.
IF: 1,49 Citáció: 9; független: 9
29. Baskurt OK, Boynard M, Cokélet GC, Connes P, Cooke BM, Forconi S, Liao F, Hardeman MR, Jung F, Meiselman HJ, Nash G, **Németh N**, Neu B, Sandhagen B, Shin S, Thurston G, Wautier JL: New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009;42(2):75-97.
IF: 1,78 Citáció: 271; független: 158
30. Connes P, **Németh N**, Meiselman HJ, Baskurt OK: Effect of tourniquet application during blood sampling on RBC deformability and aggregation: Is it better to keep it on? *Clin Hemorheol Microcirc* 2009;42(4):297-302.
IF: 1,78 Citáció: 3; független: 1
31. **Németh N**: Blood stream in the art: Thoughts on music and hemorheology. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009;41(4):221-227.
IF: 1,78 Citáció: 1; független: 1
32. Szokoly M, **Németh N**, Furka I, Mikó I: Hematological and hemostaseological alterations after warm and cold limb ischemia-reperfusion in a canine model. *Acta Cir Bras* 2009;24(5):338-346.
IF: 0,479 Citáció: 6; független: 3
33. Kiss F, **Németh N**, Sajtos E, Bráth E, Pető K, Baskurt OK, Furka I, Mikó I: Examination of aggregation of various red blood cell populations can be informative in comparison of splenectomy and spleen autotransplantation in animal experiments. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010;45(2-4):273-280.
IF: 2,838 Citáció: 4; független: 3
34. Sajtos E, **Németh N**, Kiss F, Bráth E, Pető K, Hevér T, Mátyás L, Furka I, Mikó I: Application of leukocyte antisedimentation rate calculation in investigation of spleen salvaging experimental surgical techniques. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010;45(2-4):289-294.
IF: 2,838 Citáció: 1; független: -
35. Mikó I, **Németh N**, Sajtos E, Bráth E, Pető K, Furka A, Szabó G, Kiss F, Imre S, Furka I: Splenic function and red blood cell deformability: The beneficial effects of spleen autotransplantation in animal experiments. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010;45(2-4):281-288.
IF: 2,838 Citáció: 8; független: 2
36. Kiss F, Sajtos E, Hevér T, **Németh N**: The power of slit-flow ektacytometry measurements for testing normal and heat treated red blood cells using various viscosity media in laboratory animals. *Korea-Aust Rheol J* 2010;22(1):81-86.
IF: 0,948 Citáció: -; független: -

37. Alexy T, Baskurt OK, **Németh N**, Uyuklu M, Wenby RB, Meiselman HJ: Effect of lanthanides on red blood cell deformability and response to mechanical stress: Role of lanthanide ionic radius. *Biorheology* 2011;48(3-4):173-183.
IF: 1,93 Citáció: 3; független: 1
38. Bráth E, Mikó I, **Németh N**, Kovács J, Pető K, Furka I: Effects of allopurinol and preconditioning on apoptosis due to ischemia-reperfusion on a double jejunum-segment canine model. *Acta Cir Bras* 2011;26(3):186-193.
IF: 0,584 Citáció: 5; független: 5
39. Kotán R, **Németh N**, Kiss F, Posán J, Miszti-Blasius K, Tóth L, Furka I, Mikó I, Sály P, Szentkereszty Zs: Micro-rheological changes during experimental acute pancreatitis in the rat. *Clin Hemorheol Microcirc* 2012;51(4):255-264.
IF: - Citáció: 5; független: 4
40. Sajtos E, Bálint A, Bráth E, **Németh N**, Pető K, Kovács J, Galuska L, Varga J, Fodor Z, Furka I, Mikó I: Long-term following-up of viability of spleen autotransplants in the Beagle canine model. *Acta Cir Bras* 2012;27(2):95-101.
IF: 0,626 Citáció: 6; független: 5
41. Furka I, **Németh N**, Mikó I.: A lép a sebészi kísérletek tükrében. *Magyar Sebészet* 2013;66(3):156-160.
IF: - Citáció: -; független: -
42. Furka A, **Németh N**, Pető K, Szentkereszty Z, Tóth L, Furka I, Mikó I, Sály P: Adatok a ligamentum hepatoduodenale időleges lezorítása által kiváltott májenzim- és szövettani változások vizsgálatához kísérletes modellen. *Magyar Sebészet* 2013;66(3):166-170.
IF: - Citáció: -; független: -
43. Pető K, **Németh N**, Lesznyák T, Furka I, Mikó I: A DE OEC Sebészeti Műtéttani Tanszék oktatási tevékenységének főbb mutatói 2000-2013 között. *Magyar Sebészet* 2013;66(3):171-176.
IF: - Citáció: -; független: -
44. Klárik Z, Tóth E, Kiss F, Furka I, Mikó I, **Németh N**: A modified microsurgical model for end-to-side selective portacaval shunt in the rat: intraoperative microcirculatory investigations. *Acta Cir Bras* 2013;28(9):625-631.
IF: 0,57 Citáció: 2; független: 2
45. **Németh N**: Gondolatok a zene és az orvostudomány kapcsolatáról: Vérkeringés és a képszerű zenei kifejezőmód. *Danubius Noster* 2013;2:115-123.
IF: - Citáció: -; független: -
46. **Németh N**, Furka I, Mikó I.: Educational and research activity of the Department of Operative Techniques and Surgical Research, Institute of Surgery at the Medical and Health Science Center, University of Debrecen in Hungary. *Acta Cir Bras* 2013;28(5):403-406.
IF: 0,57 Citáció: 1; független: 1
47. **Németh N**, Kiss F, Pető K, Mikó I, Furka I: Experiences and concerns on teaching basics of hemorheology at the Department of Operative Techniques and Surgical Research in Debrecen, Hungary. *Clin Hemorheol Microcirc* 2014;58(4):555-558.
IF: 2,242 Citáció: -; független: -
48. Szentkereszty Zs, Kotán R, Kiss F, Klárik Z, Pósn J, Furka I, Sály P, Mikó I, Pető K, **Németh N**: Effects of various drugs (flunixin, pentoxifylline, enoxaparin) modulating micro-rheological changes in cerulein-induced acute pancreatitis in the rat. *Clin Hemorheol Microcirc* 2014;57(4):303-314.
IF: 2,242 Citáció: 1; független: 1
49. Szluha K, Lazányi K, Furka A, Kiss F, Szabó I, Pintye É, Mikó I, **Németh N**: Early micro-rheological consequences of single fraction total body low-dose photon irradiation in mice. *Clin Hemorheol Microcirc* 2014;57(3):227-242.
IF: 2,242 Citáció: 1; független: 1
50. Ványolos E, Pető K, Viszlai A, Mikó I, Furka I, **Németh N**, Orosi P: Usage of ultraviolet test method for monitoring the efficacy of surgical hand rub technique among medical students. *J Surg Educ* 2015;72(3):530-535.
IF: 1,379 Citáció: 1; független: 1
51. Kiss F, Molnár L, Hajdú E, Deák Á, Molnár Á, Berhész M, Szabó J, **Németh N**, Fülesdi B. Skin microcirculatory changes reflect early the circulatory deterioration in a fulminant sepsis model in the pig. *Acta Cir Bras* 2015;30(7):470-477.
IF: 0,661 Citáció: -; független: -

52. Klárik Z, Tamás R, Tóth E, Kiss F, Kovács ÉL, Jäckel M, Furka I, **Németh N**: Intra- and postoperative evaluations of microcirculation and micro-rheological parameters in a rat model of musculocutaneous flap ischemia-reperfusion. *Acta Cir Bras* 2015;30(8):551-560.
IF: 0,661 Citáció: - ; független: -
53. **Németh N**, Berhés M, Kiss F, Hajdú E, Deák Á, Molnár Á, Szabó J, Fülesdi B: Early hemorheological changes in a porcine model of intravenously given *E. coli* induced fulminant sepsis. *Clin Hemorheol Microcirc* 2016;61(3):479-496.
IF: 2,242 Citáció: 1; független: 1
54. Józsa T, Klárik Z, Kiss F, Tóth E, Mester A, Hargitai Z, Changchien YC, Fossum M, **Németh N**: Morphological and microcirculatory evaluation of the rat testis after detorsion with or without a capsular release with a tunica vaginalis flap. *Asian J Androl* 2016;18:462-466.
IF: 2,596 Citáció: -; független: -
55. **Németh N**, Fülesdi B: Concerning hemorheological disturbances in sepsis. *De omnibus dubitandum est...* J Series on Biomechanics, 2016;30(1): - in press
IF: - Citáció: -; független: -

Szerkesztőségi közlemények (Editorial):

1. Mikó I, Furka I, **Németh N**: Frontiers in microsurgery: the 7th Congress of the International Society for Experimental Microsurgery. *Microsurgery* 2006;26(1):38-42.
IF: - Citáció: 3; független: -
2. **Németh N**: Crossroads of Experimental Microsurgery. A Preface to the Special Issue of the 9th Congress of the International Society for Experimental Microsurgery. *Microsurgery* 2010;30(4):253-255.
IF: - Citáció: 1; független: -
3. **Németh N**: The common denominator is microsurgery. *Microsurgery* 2014;34(5):337-338.
IF: - Citáció: -; független: -
4. **Németh N**: A tribute to the „Father” of Experimental Microsurgery, Professor Sun Lee (1920-2015). *Microsurgery* 2016;36(2):97-98.
IF: - Citáció: 1; független: 1

Proceedings könyvfejezet:

1. Bráth E, Furka I, **Németh N**, Szabó Gy, Pető K, Ács G, Lesznyák T, Cserni T, Pap Szekeres J, Mikó I.: Changes in the deformability of red blood cells caused by mesenteric ischemia-reperfusion injury. An experimental animal study. In: Boros Mihály (szerk.), *Proceedings of the 37th Congress of the European Society for Surgical Research*. Szeged/Hungary, 23-25 May 2002. 409 p. Bologna: Monduzzi International Proceedings Division, 2002. pp. 281-284.

Rövid közlemény:

1. Mikó I, Furka A, Ács G, **Németh N**, Sipka S, Oláh AV, Bráth E, Furka I: Laboratory follow up of spleen autotransplants after experimental spleen injuries. *Eur Surg – Acta Chir Austr* 2002;34(Suppl 189):10-12.
IF: - Citáció: 2; független: -

Szerkesztői munka:

1. Mikó I, **Németh N** (szerk.), *Tények és Képek Sebészeti Műtéttani Tanszék 2010/2011. tanév*. Debrecen: Debrecen University Press, 2011. 118 p.
2. Mikó I, Furka I, **Németh N** (szerk.), Sun Lee: *My Fifty Years of Microsurgical Organ Transplant Research*. Debrecen: Debrecen University Press, 2012. 110 p.

9.3. Összefoglaló scientometriai adatok

Összesített impakt faktor: 98,363. Az MTA doktori értekezés alapját képező közleményeket közlő folyóiratok impakt faktor értéke összesen: 44,622. A PhD értekezés (2004) alapját adó közlemények impakt faktora összesen: 1,58. A PhD értekezésben nem szereplő első és utolsó szerzős közlemények impakt faktora összesen: 47,499.

Összes citáció: 1017, ebből független: 576. Disszertációk és egyéb idézők nélkül: 937, ebből független 525. A PhD értekezésben nem szereplő első és utolsó szerzős közlemények citációja összesen: 264, ebből független: 127.

Németh Norbert tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztály (2016.05.26.)

Tudományos és oktatási közlemények	Száma		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk²	86	---	---	---
szakcikk, összefoglaló nemzetközi folyóiratban	---	68	500	877
szakcikk, összefoglaló, hazai idegen nyelvű	---	0	0	0
szakcikk, összefoglaló, magyar nyelvű	---	15	19	42
rövid közlemény	---	3	2	9
II. Könyv	2	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, tankönyv szerkesztőként	2	---	---	---
idegen nyelvű	---	1	---	---
magyar nyelvű	---	1	---	---
Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	2	---	---	---
idegen nyelvű	---	2	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény³	1	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.-III.)		0	0	0
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)⁴	91	---	521	928
V. További tudományos művek	10	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkekét és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkekét is	---	9	4	9
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	0	0	0
Jelentés, guideline	---	1	0	0
VI. Idézett absztraktok⁵	0	---	0	0
Idézettség száma^{1,4}	---	---	525	937
Hirsch index¹	16	---	---	---

VII. Sokszerzős vagy csoportos (multicentrikus) közlemény	0	---	---	---
a) Szerző⁴	---	0	0	0
b) Kollaborációs közreműködő⁴	---	0	0	0

Speciális tudományometriai adatok	Adat
Első szerzős folyóiratcikkek száma	26
Utolsó szerzős folyóiratcikkek száma	13
Az utolsó tudományos fokozat/cím (PhD) elnyerése utáni (2004 -) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	78
Magyar nyelven megjelent tudományos teljes folyóiratcikkek száma	15
Az utolsó 10 év (2006-2016) tudományos, teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	69
idézések száma	802
A legmagasabb idézettségű közlemény idézettsége (az összes idézettség százalékában)	266 (28,39%)
WOS/Scopus azonosítóval idézettség	742
Folyóiratcikkek, 15-29 szerzővel	1

Megjegyzések:

Az MTMT nem tudja szolgáltatni a kérelmezőnek kizárólag külföldi intézményből publikált folyóiratcikkeinek számát és független hivatkozásainak számát. Ezeket az adatokat a pályázónak kell összegyűjtenie és feltöltenie a Doktori Tanács elektronikus rendszerébe.

¹ a disszertáció és egyéb típusú idézők nélkül

² lektorált, tudományos folyóiratban (részletek)

³ konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben, egyéb konferenciakötetben

⁴ a sokszerzős és/vagy csoportos szerzőségű közlemények idézettsége nem számítható be az összes értékekbe, ezeket a speciális tudományometriai adatok között tünteti fel az összesítés

⁵ Nem idézett absztrakt itt nem kerül be az összesítésbe.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Őszinte köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Mikó Irénnek és Prof. Dr. Furka Istvánnak (Debreceni Egyetem ÁOK Sebészeti Műtéttani Tanszék), akik nemcsak főnökeim, témavezetőim voltak, de tanítóim és szakmai utam folyamatos segítői, emberileg is támaszaim. Hivatali utódként sokat jelent számomra, hogy együtt dolgozunk tovább.

Sokat tanulhattam Prof. Dr. Antal Miklóstól (Debreceni Egyetem ÁOK Anatómia, Szövet- és Fejlődéstan Intézet), aki még hallgató koromban megszerettette velem az oktatást és a kutatást.

Köszönettel tartozom munkatársaimnak és a tudományos kutatásokban együttműködő kollegáknak: Dr. Pető Katalinnak, Dr. Takács E. Ildikónak, Dr. Lesznyák Tamásnak, Dr. Szokoly Miklósnak, Dr. Tamás Róbertnek, Dr. Furka Andreának és Dr. Bráth Endrének. Ph.D. hallgatóimnak: Dr. Hevér Tímeának, Dr. Kiss Ferencnek, Dr. Klárik Zoltánnak és Dr. Tóth Csaba Zsigmondnak. Köszönetet mondok a Debreceni Egyetem ÁOK Sebészeti Műtéttani Tanszék valamennyi munkatársának.

A haemorheologiai kutatások területén nyújtott segítségért köszönetemet fejezem ki a Magyar Haemorheologiai Társaságnak. A nemzetközi együttműködésben végzett további kutatásokat és elmélyült szakmai kapcsolatokat őszintén köszönöm Prof. Dr. Oguz K. Baskurt-nak (1956-2013, Antalya - Isztambul, Törökország) és Prof. Dr. Herbert J. Meiselman-nak (Los Angeles, USA).

A mikrosebészeti kutatások területén végzett kutatások, szakmai kapcsolatok és megbízatások létrejöttét szívből köszönöm Prof. Dr. Sun Lee-nek (1920-2015, San Diego, USA), Prof. Dr. Corradino Campisi-nek (Genova, Olaszország), Prof. Dr. Robert Zhong-nak (1946-2006, London/Ontario, Kanada) és Prof. Dr. Huifang Chen-nek (Montreal, Kanada).

Szóval nem fejezhető ki a hála és köszönet Szüleimnek és Nagymamámnak. Édesapám emlékét szeretettel őrizve köszönök Nekik mindent! Hálásan és sok szeretettel köszönöm Feleségem és két Kislányunk szeretét, türelmét és támogatását!

Támogatások, amelyek nélkül nem születhettek volna meg az eredmények (időrendben):

ETT 6003/1/2001 (t.v.: Mikó I.), OMFB00430/2001 (t.v.: Mikó I.), OTKA M-4 041600 (t.v: Furka I.),
 OTKA T-032571 (t.v.: Mikó I.), GVOP-3.2.1.-2004-04-0289/3.0 (t.v: Furka I.)
 Kiegészítő Posztdoktori Ösztöndíj (KPÖ 0147/2006., Németh N.), Török-Magyar Tét (BILAT TR-03/2006.,
 t.v.: Mikó I.), Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj (61/2007., Németh N.), OTKA K-67779 (t.v.: Mikó I.),
 OTKA F-68323 (t.v.: Németh N.), MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (2010-2013, Németh N.),
 DE OEC Bridging Fund 2012 (t.v.: Németh N.), Baross Gábor Program (OMFB-00411/2010., t.v.: Németh N.).