

**Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés**

**Haemorheologiai faktorok és a microcirculatio vizsgálata  
kísérletes végtagi ischaemia-reperfusiós modelleken**

**Dr. Németh Norbert**

**Témavezető:**

**Med. habil. Dr. Mikó Irén**  
**az orvostudomány kandidátusa**

**Programvezető:**

**Prof. Dr. Fésüs László**  
**akadémikus, az orvostudomány doktora**

**Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum**  
**Általános Orvostudományi Kar**  
**Sebészeti Műtéttani Intézet**

**Debrecen**

**2003**

# Tartalomjegyzék

	<i>oldalszám</i>
<b>1. BEVEZETÉS</b>	1.
<i>Célkitűzések</i>	4.
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	5.
<b>2.1. Haemorheologiai alapok</b>	6.
<b>2.2. Szabadgyök-reakciók</b>	13.
2.2.1. Fiziológias szabadgyök-reakciók és antioxidáns mechanizmusok	14.
2.2.2. A szabadgyökök szerepe az ischaemia-reperfúziós károsodásokban	16.
2.2.2.1. A xantin-oxidáz enzim	17.
2.2.3. A vörösvérsejtek érintettsége a szabadgyök-reakciókban	19.
<b>2.3. Az ischaemia-reperfúzió hatása a vázizomra és annak microcirculációjára</b>	20.
<b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	22.
<b>3.1. A vörösvérsejt deformabilitás meghatározása</b>	22.
3.1.1. A vörösvérsejt deformabilitás mérése filtrométerrel	23.
3.1.1.1. Kezdeti relatív filtrációs sebesség (initial relative filtration rate)	25.
3.1.1.2. Relatív sejt-tranzitidő (relative cell transit time)	26.
3.1.2. Mintaelőkészítés	27.
3.1.3. A deformabilitás mérés kivitelezése	27.
<b>3.2. Teljes vér és plazma viszkozitás mérése</b>	28.
<b>3.3. A fibrinogén szint meghatározása</b>	30.
<b>3.4. Haematológiai paraméterek meghatározása</b>	30.
<b>3.5. A kísérletes modellek leírása</b>	32.
<b>3.5.1. Haemorheologiai mérések fajspecifikus adaptációja</b>	32.
3.5.1.1. Kísérleti állatok az összegző-összehasonlító elemzéshez	33.
3.5.1.2. Egy hetes követéses vizsgálat kivitelezhetőségének vizsgálata	33.
3.5.1.3. Deformabilitás méréshez hígítási sor készítése	35.
<b>3.5.2. Végtagi ischaemia-reperfúzió haemorheologiai vizsgálata patkányban</b>	35.
3.5.2.1. Műtéti protokoll	35.
3.5.2.2. Laboratóriumi vizsgálati protokoll	37.
<b>3.5.3. Végtagi ischaemia-reperfúzió microcirculációs vizsgálata patkányban</b>	37.
3.5.3.1. Műtéti protokoll	38.
3.5.3.2. A laser Doppler szöveti áramlásmérés elve és az „occlusió”-teszt	39.
3.5.3.3. A rögzített laser Doppler jel analízise	42.
<b>3.5.4. Prolongált végtagi ischaemia-reperfúzió haemorheologiai vizsgálata keverék kutyán</b>	43.
<b>3.6. Adatok rögzítése, archiválása</b>	45.
<b>3.7. Statisztikai analízisek</b>	45.
<b>4. EREDMÉNYEK</b>	46.
<b>4.1. Haemorheologiai mérések fajspecifikus adaptációja</b>	46.
4.1.1. Haemorheologiai paraméterek összegző-összehasonlító elemzése	46.
4.1.2. Egy hetes követéses vizsgálat kivitelezhetőségének vizsgálata	48.
4.1.3. Deformabilitás méréshez hígítási sor készítése	49.
<b>4.2. Végtagi ischaemia-reperfúzió haemorheologiai vizsgálata patkányban</b>	50.
4.2.1. Vörösvérsejt deformabilitás	50.
4.2.2. Haematológiai paraméterek	51.
<b>4.3. Végtagi ischaemia-reperfúzió microcirculációs vizsgálata patkányban</b>	55.
<b>4.4. Prolongált végtagi ischaemia-reperfúzió haemorheologiai vizsgálata keverék kutyán</b>	58.
4.4.1. Vörösvérsejt deformabilitás	58.
4.4.2. Teljes vér viszkozitás	59.
4.4.3. Plazma viszkozitás	61.
4.4.4. Fibrinogén szint	62.
4.4.5. Haematocrit	64.
4.4.6. A kirekesztett vénás vér tulajdonságai az ischaemia-reperfúziós csoportban	64.

	<i>oldalszám</i>
<b>5. MEGBESZÉLÉS</b>	67.
5.1. Haemorheologiai mérések fajspecifikus adaptációja	67.
5.2. Végtagi ischaemia-reperfusio haemorheologiai vizsgálata patkányban	73.
5.3. Végtagi ischaemia-reperfusio microcirculációs vizsgálata patkányban	77.
5.4. Prolongált végtagi ischaemia-reperfusio haemorheologiai vizsgálata keverék kutyán	80.
<i>Elért fontosabb eredmények és következtetések összegzése</i>	85.
<b>6. ÖSSZEFOGLALÁS / SUMMARY</b>	87.
<b>7. IRODALOMJEGYZÉK</b>	89.
<b>8. Függelék</b>	99.
8.1. Az értekezés alapjául szolgáló <i>in extenso</i> közlemények	99.
8.2. Az értekezéssel összefüggő egyéb közlemények és könyvfejezet	99.
<b>9. Köszönetnyilvánítás</b>	100.
<b>10. Melléklet</b> (az értekezéshez felhasznált, megjelent <i>in extenso</i> közlemények másolata)	102.

## Gyakrabban használt rövidítések jegyzéke:

I/R	- ischaemia-reperfusio
vvs	- vörösvérsejt
RCTT	- relative cell transit time (relatív sejt-tranzitidó)
TVV	- teljes vér viszkozitás
PV	- plazma viszkozitás
Htc	- haematocrit
Fbg	- fibrinogén
MCV	- mean corpuscular volume (átlagos vörösvérsejt térfogat)
MPV	- mean platelet volume (átlagos thrombocyta térfogat)
PBS	- phosphate buffered saline
ROI	- reaktív oxigén intermedierek
XO	- xantin-oxidáz
XD	- xantin-dehidrogenáz
LPO	- lipidperoxidáció
SOD	- szuperoxid-dizmutáz
GP	- glutation-peroxidáz
LD	- laser Doppler

„...*Csupán folyókat cserélnek,  
De egyivé iramlanak,  
Minden céljai a vérnek.*

*A Vér tudja ő útjait,  
Céljait, titkait tudja:  
Éljen az Ember, Vér, s a Hit.”*  
(Ady Endre: Vér: Ős Áldozat)

## 1. BEVEZETÉS

Az élő testben keringő folyadékok *sine qua non*-ja a mechanikai stresszre bekövetkező deformáció, amely jellemzésével általánosan az áramlásban, rheologia (a *rheo* görög eredetű szó, jelentése *folyni*) foglalkozik. A folyadékokon belül a vér áramlásánál foglalkozó tudományág a haemorheologia. Az embereket évezredek óta foglalkoztatják a vér, mint folyadék tulajdonságai. Az ókori görögök is kiemelt figyelmet fordítottak a test különböző folyadékainak viselkedésére és feltételezett szerepeire. Az orvostudományban korszakok óta ismert és használt eljárásként a vérlebocsátás, az „érmetszés”, valamint a *Hirudo medicinalis* alkalmazása is „haemorheológiai” terápiának tekinthető (hypovolaemiás haemodilutio).

A XVII.-XIX. század fizikai felismerései és törvényei megalapozták a rheológiai tudományok fejlődését is. A haemorheológiai kutatások alapköveinek Jean-Léonard Marie Poiseuille (1799-1869), illetve Robin Fåhræus (1888-1968) munkássága tekinthető.<sup>112</sup> A szervezett rheológiai kutatások kezdete 1929-től számítható, amikor megalakult az Amerikai Rheológiai Társaság. Az első nemzetközi rheológiai kongresszust 1948-ban tartották. Alfred Levin Copley (1910-1992) 1951-ben az érfal, valamint a vér alakos és plazmatikus komponensei áramlásának összefoglaló leírására javasolta a haemorheologia fogalmának

bevezetését. A kórosan megváltozott vér rheologiai tulajdonságainak első vizsgálatai is Copley nevéhez fűződnek.<sup>38</sup> Hazánkban Mátrai Árpád munkássága alapozta meg a haemorheologiai kutatásokat, melyben a magyar tudósok jelentős eredményeket értek el. A Magyar Haemorheologiai Társaság 1993-ban alakult meg Pécsen.

A haemorheologia multidiszciplináris, átfogó jellege miatt rendkívül heterogén alkalmazási és kutatási területet jelent, beleértve az alapkutatásokat, a cardiologiai, neurologiai-cerebrovascularis, diabetologiai betegségeket, az arteriosclerosis, a haematologia, az oncologia, a paediatría, a gynecologia és szülészeti, valamint a szemészet bizonyos témaköreit is. Ezeken belül is nagy jelentőséggel bírnak a különféle eredetű ischaemiák, illetve ischaemia-reperfúziós károsodások, beleértve a cardio-cerebrovascularis történéseket, a traumatologiai, sebészi jellegű érelzáródásokat, érelzárásokat, továbbá a szövet- és szervtranszplantációt. E széles körű, multidiszciplináris jelleg ellenére a haemorheologiai kutatások gondolatisága és irányzata egységes. A mérés-technikai standardizáció igénye mind hazai, mind nemzetközi téren napjainkban is erős.<sup>157, 158</sup> Hazánk viszonylatában ez a standardizáció megoldhatónak látszik, hiszen a rheologiai kutatásokat és klinikai méréseket végző laboratóriumokban a haemorheologiai műszerek nagyjából megegyezők. Ebben az egységesítési munkában a Magyar Haemorheologiai Társaságnak meghatározó szerepe van.

A heveny végtagi ischaemiák a klinikumban napjainkban is komoly gondot jelentenek. Bár az utóbbi évtizedekben az érsebészet nagymértékű fejlődésen ment keresztül, az akut végtagi ischaemiák és ischaemia-reperfúziós károsodások pathomechanizmusa még nem teljesen feltárt. Különösen igaz ez a haemorheologiai faktorok tekintetében, hiszen a megváltozott tulajdonságú keringő vér maga is okozhat ischaemiás folyamatot, de a változás ez utóbbi következménye is lehet. Továbbá az ischaemia idejére „kirekesztett” vér rheologiai tulajdonságai is számos kérdést vetnek még fel.

Az ischaemia és az azt követő reperfusio a szervekben, szövetekben számos folyamatot indíthat el, amelyek hatással lehetnek a vér rheologiai faktoraira, a mikrokeringés morfológiai és funkcionális állapotára a lokális szövetkárosodás mellett. A pH változása, a szabadgyök-reakciók, a felszabaduló mediátorok, az adott régióban jelentkező, vagy a teljes testet érintő, a haemodynamikai egyensúlyban fellépő eltérések, a folyadékterek átrendeződése, vagy kóros elváltozásai mind befolyással bírhatnak a haemorheologiai állapotra, annak számos paraméterén keresztül.

A haemorheologiai faktorok vizsgálata így számos folyamatban értékes információt nyújt, de az experimentumban különböző állatmodelleken való alkalmazhatósága több problémát vet fel, beleértve a vizsgálatokhoz szükséges vér mennyiségét, az egyes fajok közötti eltérő jellegzetességeket, és egyéb mérés technikai különbségeket.

Intézeti kutatásaink során több állatfajjal dolgozunk. A rheologiai paraméterek vizsgálhatósága és követhetősége tekintetében fajonként kellett a haemorheologiai méréseinket adaptálni. A laboratóriumi kisállatokon (egér, patkány) való alkalmazhatóságának igénye főként végtagi ischaemia-reperfúziós modellek, továbbá lép autotranszplantátumok funkciójának követéses vizsgálatai kapcsán merült fel.

További vizsgálati témakörünk a szöveti mikrokeringés. A microcirculatio szintjén bekövetkező változások vizsgálata fontos és dinamikus fejlődő kutatási területet jelent, a haemorheologiai faktorok vizsgálatával együtt átfogó képet nyújthat a különböző, mikrokeringést is érintő fiziológiai vagy pathológiai folyamatok tanulmányozásában.

A mikrokeringés vizsgálatára számos invazív és non-invazív, direkt és indirekt eljárás ismert, melyek egyik elterjedt módszere a laser Doppleres szöveti áramlásmérés. Ismert standardizációs és összehasonlíthatósági nehézségei miatt szükségessé vált egy jól reprodukálható, standardizálható és összehasonlítható eredményeket nyújtó szöveti

áramlásmérő vizsgálati teszt kialakítása az ischaemia, illetve az ischaemia-reperfusio microcirculációra gyakorolt hatásainak elemzésére.

## Célkitűzések

1. A rheologiai mérések adaptációja különböző laboratóriumi állatfajokra (egér, patkány, nyúl, keverék kutya, sertés), elemezve az összehasonlítás kérdését, feltárni esetleges fajspecifikus tulajdonságot a haemorheologiai paraméterek tükrében.
2. Olyan beállítási módszer kidolgozása a Carat FT-1 típusú filtrométeren, amely lehetővé teszi kis laboratóriumi állatokon (egér, patkány) történő követéses vizsgálatok kivitelezését.
3. Rövid időtartamú, 1 órás ischaemia és az azt követő reperfusio a vörösvérsejtek deformabilitási tulajdonságára gyakorolt hatásának elemzése patkánymodellben 1 hetes követéses vizsgálat során, összehasonlítva azt egyes haematologiai paraméterekkel is. A károsodás kimutatásán kívül a modellben alkalmazott xantin-oxidáz inhibitor, az allopurinol preventív alkalmazásának feltételezhető előnyének elemzése.
4. Az 1 órás ischaemia közvetlen, a szöveti microcirculációra gyakorolt hatásának elemzése laser Doppler szöveti áramlásméréssel. Ismerve a mérőmódszer előnyeit és hátrányait, egy speciális mérőtesztet és kiértékelési módszer kidolgozása, amely a mikrokeringésben bekövetkezett akut válaszokat, válaszadó képességet tükrözi. Az új módszer alkalmazhatóságának vizsgálata patkány végtagi ischaemiás modellen.
5. Egyik munkacsoportunk keverék kutyákon kialakított végtagi ischaemia-reperfusió modelljén az ischaemia-reperfusio lokális és szisztémás haemorheologiai hatásainak követése.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Általánosan elfogadott, hogy a különböző eredetű érelzáródások, legyen az erek pathológiás, vagy traumás occlusiója, obturációja, illetve sebészeti időleges elzárása, az érintett szövetek/szervek elváltozását, ischaemia-reperfusió károsodását idézhetik elő. Paradox módon az ischaemiás szövet keringésének újraindulása, azaz reperfusiója további károsodásokhoz vezethet, mint amelyek az ischaemia alatt jöttek létre. Ez a jelenség ischaemia-reperfusio (I/R) néven ismert. A vörösvérsejtek, fehérvérsejtek, thrombocyták, a leukocytá-endothelium-, a thrombocytá-endothelium interakciók, az érpermeabilitás változásai,<sup>82, 89, 111</sup> a génextpresszió eltérései<sup>16, 41, 75</sup> és egyéb folyamatok szerepe mellett, illetve ezekhez kapcsolódva, a létrejövő elváltozások nagy része a reaktív oxigén intermedierek (ROI), a szabadgyök-reakciók direkt vagy indirekt károsító hatásaira vezethetőek vissza.<sup>7, 116</sup>

Bár nagyléptékű előrehaladás figyelhető meg az érbetegségek kezelésében, az akut ischaemia egyike marad a leggyakoribb és legkomolyabb eseteknek, mely fenyegeti a szervek és végtagok funkciójának fenntartását, mégis a károsodások pontos pathomechanizmusa ma sem teljesen tisztázott.<sup>15, 139, 140</sup> Az ischaemia-reperfusio következményei és a távoli szöveti destrukciók nem ritkán letális szövődményeket is magukban foglalnak.<sup>61, 145</sup>

A különféle eredetű végtagi ischaemiák restorációja során nem elhanyagolható a károsodás mértéke – amely elsősorban az ischaemia időtartama által determinált –, valamint az sem, hogy az érintett régió keringési, mikrokeringési állapota milyen mértékben károsodott, illetve milyen effektivitással áll helyre.

A microcirculatio funkcionális és morfológiai állapota mellett a keringő vér rheológiai tulajdonságai fontos szerepet játszanak a különböző fiziológias és pathológias folyamatokban. A rheológiailag megváltozott tulajdonságú vér hatással lehet az egész szervezetre, annak

szövetekre, szerveire, akár a változásokat előidéző károsodott régiótól távol is. A haemorheologiai paraméterek és a microcirculatio vizsgálata fontos és értékes információt nyújthat mind a keringésről, mind pedig az ischaemia-reperfusio során létrejött változásokról. Reid és Dormándy munkacsoportjának 1976-os úttörő jelentőségű közleménye nyomán<sup>135</sup> a vörösvérsejt deformabilitás ismert módszerré vált, és összefüggései, kapcsolatai az ischaemia-reperfusió folyamatokkal számos tudományos tapasztalatot hozott, kiegészítve további haemorheologiai paraméterek vizsgálatával.<sup>34, 47, 50, 73, 81, 126</sup>

## 2.1. Haemorheologiai alapok

A folyadékok lamináris áramlását egymáson párhuzamosan elcsúszó síkokkal szemléltethetjük. Az egyik síkra tangenciálisan ható  $F$  nyíróerő hatására a folyadék egyes rétegei különböző sebességgel mozdulnak el. Az  $F$  nyíróerő az  $A$  felszínen  $F/A$  nagyságú nyírófeszültséget hoz létre, amely gyengítve terjed át a folyadékban lévő viszkozus ellenállás miatt. A lamináris áramlás a folyadékrétegek nyírási sebességével, sebesség-gradiensével jellemezhető. Ez a sebesség-gradiens ( $D$ ) az áramló folyadékrétegek sebességkülönbsége ( $dv$ ) és a köztük lévő távolság ( $dx$ ) hányadosaként definiálható ( $D=dv/dx$ , [ $s^{-1}$ ]). Adott hőmérsékleten az áramlást fenntartó nyírófeszültség és a létrehozott sebesség-gradiens hányadosaként az illető folyadék belső súrlódását jellemző fizikai mennyiséget, a viszkozitás definiálhatjuk ( $Ns/m^2$ , [Pas]). A folyadékok azonos nyírófeszültség hatására másképpen reagálhatnak. A folyadékok egy csoportjánál a nyírófeszültség és a sebesség-gradiens kapcsolata lineáris, azaz bármilyen nagyságú nyírófeszültség alkalmazásakor ugyanakkora viszkozitás mérhető. Ezeket a folyadékokat *newtoni*-nak nevezzük. Ide tartozik például a víz, az olajok (általában), a vérplazma és a szérum is. A folyadékok egy másik csoportjában a viszkozitás nyírófeszültség-függő, és döntő többségükre jellemző, hogy az áramlás csak egy bizonyos nyírófeszültség elérésekor indul meg, melyet küszöbfeszültségnek nevezünk. Ezek a

folyadékok a *nem-newtoni* folyadékok, melyek Casson-típusú folyási görbét mutatnak. Ide sorolhatóak általában a szuszpenziók, így a teljes vér is.

Az emberi érrendszerben annak különböző területein eltérő nyomásviszonyokat, eltérő nyírófeszültség profilt és felület/térfogat arányt találunk. Így nem meglepő, hogy a vér rheológiailag eltérő módon viselkedik a keringés különböző szakaszain. A rheologia egyik alaptörvénye a Poiseuille-törvény, amely jó közelítéssel alkalmazható az emberi érrendszerre is. Kimondja, hogy valamely érszakasz áramlását ( $Q$ ) elsősorban az ér sugara ( $r$ ), a perfúziós nyomás ( $\Delta p$ ), az érszakasz hossza ( $l$ ), valamint a vér viszkozitása ( $\eta$ ) határozza meg:

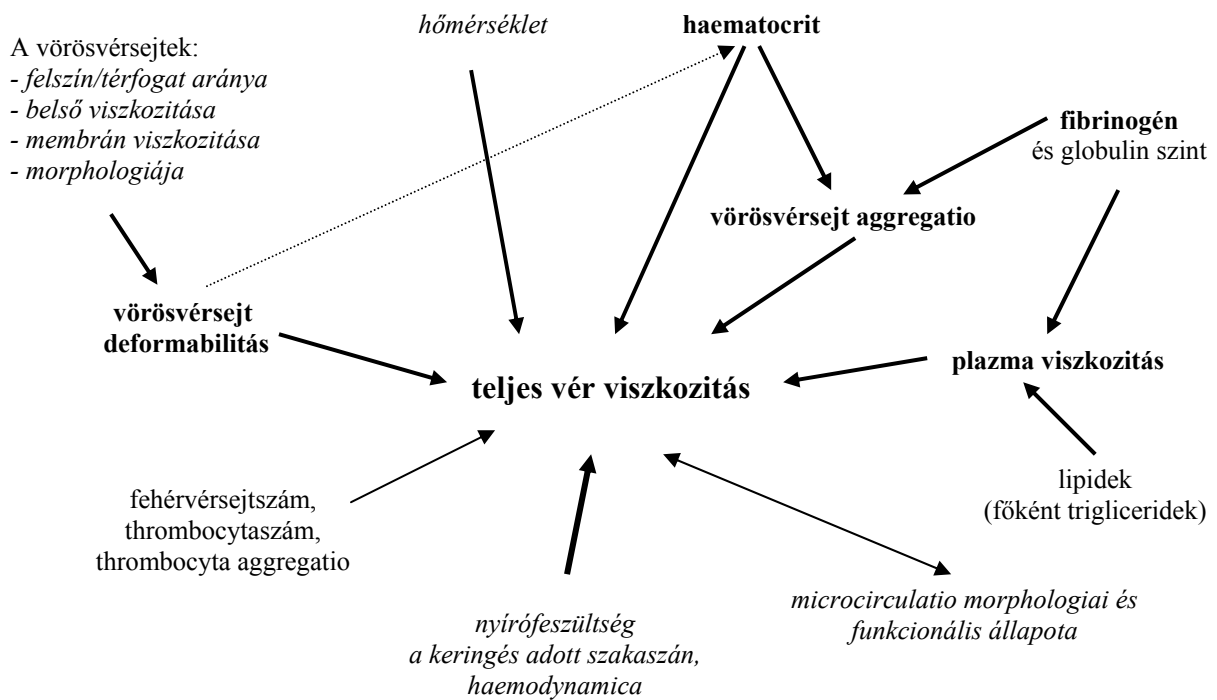
$$Q = \Delta p \frac{r^4 \pi}{8 l \eta}$$

Az összefüggésből az is látszik, hogy a vér áramlását kismérvű a vér haemorheológiai tulajdonságai, nagyrészt haemodynamikai tényezők, mint a perfúziós nyomás, illetve az erek vasodilatator és vasoconstrictor mechanizmusai határozzák meg. Normál viszonyok között a haemorheológiai paramétereknek valóban alárendelt szerepe van haemodynamikai jellemzőkkel szemben, azonban kóros körülmények között, amikor a haemodynamikai rezerv kimerül, ezek a faktorok döntő tényezőkké lépnek elő, pozitív vagy negatív befolyásolóként.

A teljes vér viszkozitás sebesség-gradiens függő, a laboratóriumi mérések során meghatározott viszkozitás adott nyírófeszültség és sebesség-gradiens értékeknél érvényes (pl.  $90 \text{ s}^{-1}$ , amely a nemzetközi gyakorlatnak megfelelően elfogadható és összehasonlítható), amely tényről soha nem szabad megfeledkeznünk. Alacsony sebesség-gradiensnél az áramló vérben vörösvérsejt aggregátumok alakulnak ki, míg magas sebesség-gradiens esetén a vörösvérsejtek egyenként, diszoid alakjukban, megnyúltan láthatóak a vérben.

A teljes vér viszkozitását, mint a vér „imprint” rheológiai paraméterét számos tényező határozza meg: hőmérséklet, haematocrit, vörösvérsejt deformabilitás és aggregatio, plazma viszkozitás, továbbá bizonyos mennyiségen felül a fehérvérsejt- és thrombocytaszám is, de

kulcsfontosságú jelentőséggel bír a fibrinogén és globulinszint mértéke is, melyek közvetlen hatással vannak a plazma viszkozításra, emellett a fibrinogén a vörösvérsejtek aggregációs hajlamára is, mint ahogy ez az 1. sz. ábrán is látható.<sup>20, 170</sup>



**1. ábra**

A haemorheologiai faktorok összefüggései, a teljes vér viszkozitás meghatározói

[Bogár L.: Diagnosztika, In: Bernát S.I., Pongrácz E. (szerk.): A klinikai haemorheologia alapjai. Kornétás Kiadó, Budapest, 1999. pp. 33-50. alapján]

A teljes vér viszkozitás nagymértékben függ a *haematocrit*től, hiszen minden szuszpenzió rheologiai tulajdonsága alapvetően determinált a benne lévő részecskék koncentrációja által. Mivel az alakos elemek között a vörösvérsejtek száma nagyságrendekkel meghaladja a többiét, így a viszkozitás egyik fő meghatározójának a vörösvérsejtszám tekinthető. A 20-60%-os haematocrit tartományban egyenes arányosság állapítható meg a haematocrit érték és a vér viszkozitásának logaritmus között. Minél lassúbb az áramlás, annál jelentősebb a haematocrit hatása a vér viszkozítására.

*A plazma viszkozitás meghatározója* egyrészt elsődleges komponense a víz, valamint a benne oldott nagy molekulájú anyagok. Ezek közül kiemelt jelentőségű a fibrinogén, amely nagy, elongált térszerkezetű molekula. Befolyásoló szerepe lehet egyes globulin frakcióknak és bizonyos koncentráció viszonyok esetén a lipidfrakcióknak, elsősorban a triglicerideknek is. A plazma viszkozitását (így a vérét is) a hőmérséklet is befolyásolja, 20 és 40 °C közötti tartományban növelve a hőmérsékletet °C-onként 2,4%-al csökken a plazma viszkozitás.<sup>97</sup>

*A vörösvérsejt aggregatio* a sejtek átmeneti, reverzibilis összetapadását jelenti. Az aggregatio első szakasza a „pénztekercs”-képződés, majd ezek a változó hosszúságú pálcákká kapcsolódott gömb alakú aggregatumokba tömörülnek. Ez nyugalmi vérmintában közel 5 perc alatt lezajlik. A második szakasz hosszú ideig, 60-180 percig tart, ekkor az egyenlő méretű aggregációs gömbök állandó sebességgel süllyednek a plazmában. A végső, harmadik szakaszban a süllyedési sebesség lelassul, majd megáll. Az aggregatio haematocrit és fibrinogén (és bizonyos globulin) függő, hiszen a nagyméretű elágazó molekulák alkalmasak a sejtek közötti hidak kialakítására. Ezzel összefüggésben említhető, hogy a vérsejt süllyedés, azaz vörösvérsejtek aggregációjának megfigyeléses vizsgálata, a gyulladással járó betegségek nagy szenzitivitású, de kis specificitású tesztje. Az 1920-as és '30-as években állapították meg először az összefüggést az akut fázis reakció és a vérsejt süllyedés között.

A haemorheológiai faktorok között fontos szerepet játszanak a vörösvérsejtek alakváltoztató képességét leíró paraméterek. Szerzett és örökletes tényezők a sejtösszetevőkre gyakorolt hatásai által befolyásolhatják a *vörösvérsejtek deformabilitását*. Deformabilitásnak nevezzük a vörösvérsejtek azt a tulajdonságát, hogy véráramlás közben a külső nyíróerő hatására passzív alakváltozáson mennek át.

A nagy nyíróerők nagy sebesség-gradienst hoznak létre az arteriákban, köztük elsősorban az arteriolákban, a rezisztenciaerekben, ahol a vörösvérsejtek megnyúlt sejtalakkal áramlanak. Az áramlás irányába történő megnyúlás csökkenti a teljes vér viszkozitását, illetve az

alakváltozás lehetővé teszi azt is, hogy a vörösvérsejtek a méretüknél szűkebb capillarison is átjussanak. Az élő szervezetben vannak olyan capillarison, melyek átmérője sokkal kisebb, mint maguké, a vörösvérsejteké. A myocardium és a vázizom capillarisai között 3-4  $\mu\text{m}$  belső átmérőjük is előfordulnak.<sup>8, 86</sup> Ezért, ha egy vörösvérsejtnek rossz az alakváltoztató képessége, akkor az adott kisméretű capillarisonak megfelelő vérellátási területre nehezen vagy egyáltalán nem jut el. A jó deformabilitási tulajdonság nemcsak a megfelelő perfúzió biztosításához elengedhetetlen, hanem a sejt élettartamát is befolyásolja, hiszen a nehezen, vagy egyáltalán nem deformálható sejteket a lép sequestrálja és eliminálja.<sup>64</sup>

A vörösvérsejt az áramlás során folyadékcseppként viselkedik. Ez azt jelenti, hogy a vér még 90%-os haematocrit közelében is folyékony marad. A vörösvérsejtek rendkívül képlékenyek, 0,5 Pa-nál nagyobb nyírófeszültség hatására változatos formákat képesek kialakítani.<sup>33</sup> Membránfelületük akkora gömbalakot tud beburkolni, amely a normál haemoglobin tartalom 2,5-szeresét képes lenne befogadni. Ilyen laza kitöltöttség teszi lehetővé a nagyfokú alakváltoztató képességet.

A vörösvérsejtek deformabilitását meghatározó tényezők a következők<sup>20, 156</sup>:

- Abszolút térfogat, felület/térfogat hányados (indirekt módon az ATP-tartalom is)
- belső viszkozitás (döntően a haemoglobin-oldat tulajdonságainak függvénye)
- morfológiai tényezők
- a sejtmembrán elasztikus és viszkózus tulajdonságai, cytoskeletális kapcsolata

A vér rheológiailag eltérően viselkedik a keringés különböző szakaszain. Funkcionális szempontból az érrendszert általában 4 különböző részre lehet osztani: (1) magas nyomású arteriák, (2) ellenállás erek (kis arteriák és arteriolák), (3) capillarison és venulák (kicserélődési erek), (4) alacsony nyomású kapacitás erek.

A magas nyomású arteriákban az áramlás pulztilis jellegű. Itt különösen a systole alatt magas a nyírófeszültség és a sebesség-gradiens ( $150 \text{ s}^{-1}$ ).

Az ellenállás erek szintjén viszonylag magas nyírófeszültség (0,5-2 Pa) és igen magas sebesség-gradiens ( $900-8000 \text{ s}^{-1}$ ) figyelhető meg. A kicserélődési erek haemodynamikai és haemorheologiai szempontból nem egységesek.

A capillariskban a nyírófeszültség (1-10 Pa) és a sebesség-gradiens ( $1000 \text{ s}^{-1}$ ) igen magas, míg a venulákban a nyírófeszültség a legalacsonyabb az érrendszerben (0,01-0,1 Pa).

Az alacsony nyomású kapacitás erekben található az összes vér mennyiségének közel 80%-a. Haemorheologiai jelentőségét az a tény adja, hogy bennük az áramlás lassúbb, a sebesség-gradiens igen alacsony ( $100-160 \text{ s}^{-1}$ ), a nyírófeszültség szintén alacsony (0,01-0,5 Pa). Ezen a szakaszon a vörsejtek és az érfal felszabaduló mediátorok útján időben hosszabb hatást fejthetnek ki kölcsönösen egymásra.<sup>20, 170</sup>

A vér folyási tulajdonságai alapján az érpálya 3 részre osztható:

- tömeges folyás szakasza (az érátmérő  $> 300 \mu\text{m}$ )
- átmeneti zóna (az érátmérő  $300-8 \mu\text{m}$ )
- egyenkénti folyás szakasza (az érátmérő  $< 8 \mu\text{m}$ )

A *tömeges folyás szakasza* magában foglalja a magas nyomású rendszert, nagyobb ellenállás ereket és a venákat. Ezen a szakaszon a vér rheologiai viselkedését elsősorban a vörsejtek közötti interakciók határozzák meg.

Az *átmeneti zónát* további két részre lehet osztani. (I) ahol az érátmérő  $300-30 \mu\text{m}$ , illetve (II)  $30-8 \mu\text{m}$  között van. (ad I) A véráramlásra a parabolikus sebességprofil jellemző, továbbá az érfalhoz közel viszonylag sejtszegény széli réteg alakul ki, melynek vastagsága függ a véráramlás sebességétől. Így egy lassabb áramlású és alacsonyabb haematocritú széli zóna és egy gyorsabb áramlású, de magasabb haematocritú belső zóna alakul ki, amely a *haematocrit*

*dinamikus redukciójához* vezet (Fåhræus-effektus).<sup>52, 156</sup> Mivel a vér viszkozitása erősen függ a haematocrittól, ennek következménye, hogy az áramló vér látszólagos viszkozitása a cső átmérőjével egyenes arányban változik (Fåhræus-Lindqvist-effektus).<sup>51, 156</sup> (ad II) Az átmeneti zóna distalisabb részében, ahol az erek átmérője 8-30 µm, a vörösvérsejtek közötti, valamint a vörösvérsejtek és az érfal közötti interakciók nagy szerepet kapnak. Jellemző erre az érszakaszra az is, hogy az erek fokozatos eloszlása során az egyes ágak haematocritja különböző lesz; amely ág a nagyobb vérmennyiséget kapja az egyben a magasabb haematocritú is, és fordítva. Ez a folyamat a *fázisszeparáció*, amely nagy számú csökkent haematocritú és kisebb számú magasabb haematocritú kiseret eredményez. A fázisszeparáció folyamata és a Fåhræus-effektus a kiserek területén (10-20 µm) a haematocrit mintegy 50%-os redukciójához vezet a nagyerekhez viszonyítva. Ám ennek ellenére a teljes vér viszkozitás jelentősen nem csökken. Ez azzal magyarázható, hogy a fehérvérsejtek a vörösvérsejtekhez viszonyítva az érkeresztmetszet lényegesen nagyobb részét foglalják el, kisebb sebességgel haladnak, ezért feltarthatják áramlásuk közben a vörösvérsejteket, így azok kénytelenek „szerelvényként” torlódni a fehérvérsejtek mögött, aminek következtében megnő a haematocrit. A fehérvérsejtek endotheliumhoz való kötődése csökkenti az érkeresztmetszetet, amely szintén az áramlási ellenállás növekedéséhez vezet. Ezek a folyamatok közel kiegyenlítik egymást, meghatározzák a microcirculatio adott területre jellemző profilját az erek funkcionális és morfológiai állapota mellett.<sup>156, 170</sup>

*Az egyenkénti folyás szakaszára* jellemző, hogy az erek átmérője hasonló vagy kisebb a rajtuk átáramló vörösvérsejtek átmérőjénél. Ily módon az áramlást leginkább az egyes sejtek mechanikai tulajdonságai, azaz deformabilitási képességei, valamint az érfallal való interakciójuk befolyásolja.

## 2.2. Szabadgyök-reakciók

A szabadgyök-reakciók jelentőségének felismerése az orvostudományban igen nagy lépést jelentett. Mára modern, gyorsan fejlődő területté nőtte ki magát a különféle elváltozások, betegségek pathomechanizmusainak, a szervezet védekező rendszerének megismerése terén. Már 1939-ben izoláltak szarvasmarha vörösvérsejtjeiből egy proteint, amelyet réztartalma és lokalizációja miatt erythrocyupreinek neveztek el. További 30 évet váratott magára, amíg McCord és Fridovich feltárta az erythrocyuprein enzimtermészetét és az általa katalizált reakciót.<sup>106</sup> Tulajdonképpen ekkortól számíthatjuk a szabadgyök pathologia kezdetét.

A szabadgyökök olyan molekulák, vagy molekula-fragmentek, amelyek külső orbitáljukon (lehet más orbitálok is) egy vagy több (pl. kettős szabadgyök [molekuláris oxigén]) párosítatlan elektront tartalmaznak. A párosítatlan elektron párképződésre hajlamos, ezért a szabadgyökök kémiaiailag igen reaktívak, így élettartalmuk rövid.

A 70-es évek közepe óta ismert csak, hogy szabadgyökök keletkeznek az élő, aerob szervezetben fiziológias folyamatok során is, illetve exogén vagy endogén pathológias folyamatokban.<sup>42, 43, 130</sup> Biológiai szempontból a legfontosabbak az oxigénből eredő szabadgyökök (reaktív oxigén intermedierek, ROI). A legfontosabb ROI-eknek tekinthetőek a szuperoxid anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), a hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) és a hidroxil-gyök ( $OH^{\cdot}$ ). Ezek károsító hatásai miatt az aerob szervezetek csak úgy tudnak életben maradni, ha a keletkező szabadgyökökkel szemben hatékony védekező mechanizmusokkal rendelkeznek.

A szabadgyök-reakciók általában láncreakciók. Ezekben a láncreakciókban a gyökök az *initiatio*-nak nevezett lépcső(k) során keletkeznek, azután reagálnak a *propagatio*-s fázis sorozatain keresztül, amikor számos szabadgyök konzerválódik, és végül valamilyen *terminatio*-s folyamatban megsemmisülnek. A gyökök képződését egyes fémionok, elsősorban a vas és a réz katalizálni képesek (pl. Fenton-reakció). A szabadgyökök

károsíthatják a biológiai rendszereket, oxidálhatják a hormonokat, inaktiválhatják az enzimeket, károsíthatják a strukturális proteineket és a sejtmembrán szerkezetét, lipidek peroxidációját okozzák, roncsolják a DNS-t. Sejtszinten a szabadgyökök – illetve ezek túlsúlyával jellemezhető állapot, az oxidatív stressz – mutációkhoz, kromoszóma eltérésekhez, sejtöregedéshez, apoptosishoz, necrosishoz vezethetnek.<sup>54</sup>

### ***2.2.1. Fiziológiás szabadgyök-reakciók és antioxidáns mechanizmusok***

Az élő szervezetben ellenőrzötten lezajló szabadgyök-reakcióknak fontos szerepe van a különböző sejtek, subcellularis organellek, enzimek működésében, a biomolekulák szintézisében, illetve lebomlásában. Így meghatározó szerepet játszanak a phagocytosisban (neutrophil és eosinophil granulocyták, mononuclearis phagocyták), a thrombocyták működésében, a mitochondriális, microsomalis elektrontranszport-láncok és peroxisomák működésében, de fontos szerepet töltenek be a biomolekulák szintézisében, degradációjában, illetve autooxidációjában (arachidonsav-metabolizmus, mellékvesekéreg hormonjainak szintézise, melaninok működése, biomolekulák autooxidációja), továbbá szerepük van a reprodukcióban és a magzati fejlődésben. Összességében tehát a szabadgyökök cellularis forrásai igen sokrétűek lehetnek (I. táblázat).

Normál körülmények között ezek a reakciók kontrolláltan zajlanak, az élő szervezet jelentős antioxidáns és scavenger védelmi rendszerekkel rendelkezik. Általánosságban a gyököket befogó, gátló vegyületeket scavengereknek, míg a ROI-ek toxikus hatásaival szemben védő vegyületeket, molekulákat antioxidánsnak nevezünk. Ez a funkció leginkább a lipidperoxidáció (LPO) initiációs és propagációs fázisainak gátlásában nyilvánul meg, ami korai terminációhoz vezet.

## I. táblázat: A szabadgyökök sejtes forrásai

Plazmamembrán	lipoxigenáz prostaglandin-szintetáz NADPH-oxidáz (phagocyták) lipidperoxidáció
Solubilis enzimek és proteinek	haemoglobin triptofán-dioxigenáz xantin-oxidáz
Mitochondriális elektrontranszport	ubiquinon NADH-dehidrogenáz dihidro-orotsav-dehidrogenáz
Peroxisomák	oxidázok flavoproteinek
Endoplasmaticus reticulum és nukleáris membrán-elektrontranszport	citokróm P <sub>450</sub> citokróm b <sub>5</sub>
Kis molekulák	redukált flavinok thiolok divalens fémek adrenalin antibiotikumok
Környezeti faktorok	nagy energiájú irradatio légszennyező anyagok toxikus kemikáliák

[Fehér J., Vereczkei A.: Szabadgyök-reakciók jelentősége az orvostudományban.  
Biogal Gyógyszergyár, Debrecen, 1985. pp 32. alapján]

Az antioxidánsok a LPO különböző fázisaiban hatnak:

- az initiatio gátlásával (pl. E-vitamin),
- a hidroperoxidok keletkezésének gátlásával (pl. E-vitamin, C-vitamin),
- a már létrejött hidroperoxidok elbontásával új gyöktermék keletkezése nélkül (pl. glutation-peroxidáz, thiolok),
- fémkelátor tulajdonságukkal (pl. D-penicillinamin),
- a szabadgyökök megkötésével – scavenger hatás (pl. E-vitamin, A-vitamin).

A sejtes védekezés enzimei közül a szuperoxid-dizmutáz (SOD) és a kataláz dizmutáció révén, míg a glutation-peroxidáz, (GP) oxido-redukciós reakció katalízise révén fejt ki antioxidáns hatását. A SOD a szuperoxid-gyök, míg a kataláz és GP hidrogén-peroxid

semlegesítését végzi. A sejteken belül fontos szerepe van a mitochondriumok citokróm-oxidáz rendszerének is, valamint a sejtmembrán-struktúra általi kontrollnak.

Az extracelluláris tér kevésbé védett a szabadgyök hatásokkal szemben. A védelem legfontosabb eleme itt a coeruloplasmin, mely a lipidperoxidációt katalizáló ferro-vasat ferrivassá alakítja át. A glükóz és a bilirubin is rendelkezik bizonyos fokú antioxidáns tulajdonsággal.

Pathológiás körülmények között a fennálló egyensúly eltolódásával a szabadgyökök kifejtethetik károsító hatásukat.<sup>54</sup>

### ***2.2.2. A szabadgyökök szerepe az ischaemia-reperfúziós károsodásokban***

A cellularis hypoxia kulcs-szignál, a különböző transzkripciós regulátorok aktivációjához vezet, mint például a nukleáris faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), aktivátor protein-1 (AP-1) és néhány mitogén aktivált protein-kináz (MAPK) útvonalak. Az ischaemia során az enzimaktivitásokban, a mitochondriális funkcióban, a cytoskeletalis struktúrában, az iontranszportban változások jönnek létre, amelyeket a reperfúzió során felszabaduló szabadgyökök exacerbálhatnak.<sup>28, 55, 138</sup>

Granger és munkatársai 1981-ben bizonyították először a szabadgyök-reakciók szerepét macska intestinalis ischaemia modellükön.<sup>62</sup> A hypoxiás sejt energiatartalma gyorsan csökken, és mivel a kation-gradiens fenntartása energiadependens folyamat, így valószínű, hogy a hypoxia kalcium influxhoz vezet, és ez aktiválhatja a kalmodulin által regulált proteolitikus enzimeket. Ezeknek szerepe lehet a xantin-dehidrogenáz enzim oxidáz formává való irreverzibilis konverziójában. Hypoxia során az ATP defoszforilálódik, ami az AMP-szintet nagymértékben növeli a sejtekben. Az AMP ezután tovább katabolizálódik adenzinná, inozinná és végül hipoxantinná. Ez szubsztrátja a xantin-oxidáznak. Még egy szubsztrátra szükség van, mégpedig az oxigénre, amely nagyrészt a reperfúziókor kerül az

ischaemiás szövetbe, és szuperoxid képződést indukál (2. ábra). Hypoxia hatására a légzőláncban is keletkezhet szuperoxid anion, miközben a mitochondrium membránjában elhelyezkedő elektrontranszport-lánc tagjai (NAD, FAD, koenzim Q, citokróm b) redukálódnak.<sup>54, 85, 90</sup> A felszabaduló szabadgyökök tovább aktiválják a redox-szenzitív transzkripciós faktorokat (NF- $\kappa$ B), és triggerelhetik az interleukin-1 $\beta$ , a tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) és más gyulladásos mediátorok felszabadulását.

Az ischaemia-reperfusio során keletkezett szuperoxid reagálhat az endotheliumhoz kapcsolt nitrogén-oxiddal (NO) – amely macrophagok, endothel-sejtek, cytokinek és endotoxinok által aktivált indukálható nitrogén-oxid szintáz (iNOS) és constitutív NOS (cNOS) által termelődik az ischaemia-reperfusió folyamatokban is – peroxinitritet (OONO-) képezve, amely rendkívül toxikus, és a NO hatékonyságát is csökkenti.<sup>116</sup>

### **2.2.2.1. A xantin-oxidáz enzim**

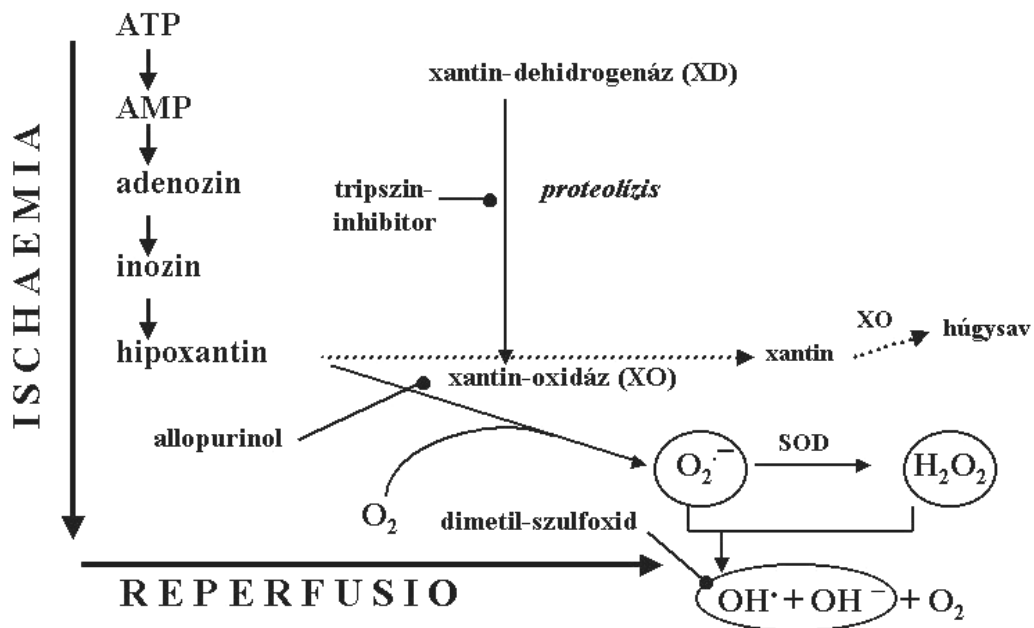
A purin nukleotidok katabolizmusa számos enzimatis lépésben zajlik. A folyamat utolsó két lépése a hipoxantin-xantin és a xantin-húgysav átalakulás, amely a xantin-oxidáz (xantin-oxigén oxidoreduktáz, XO) által katalizált (2. ábra).

A XO egyike a legjelentősebb szuperoxid és hidrogén-peroxid forrásoknak. A xantin-dehidrogenáz/xantin-oxidáz transzformáció irreverzibilis, ha proteolitikus úton zajlik, és reverzibilis, ha a szulfhidril-csoportok oxidációja során történik.

A természetes XO protein egy dimer, kb. 300 kDa-os molekulasúlyú, és minden alegysége egy FAD-ból, molibdénből, vasból és szulfidból álló belső elektrontranszport-láncot tartalmaz. A molibdén a hipoxantin és xantin, míg a FAD az elektron-donáció helye az akceptor felé. Az akceptor leggyakrabban a NAD<sup>+</sup>, amely NADH-vá redukálódik. Az enzim működése szuperoxid anion felszabadulását vonja maga után. A keletkezett szabadgyökök relatív mennyisége számos tényezőtől függ, mint a pH, oxigén- és szubsztrátkoncentráció. Az

XD-XO transzformáció számos tényező által bekövetkezhet, mint a proteolízis, a 37°C való melegítés, hűtés -20°C-ra, anaerobiosis, kezelés szerves oldószerekkel. Ezen behatások mindegyike két kategóriára osztható, mint (I) proteolízis és (II) oxidáció (vagy a thiol csoportok keresztkötése). Ezek a hatások nagy valószínűséggel a flavin konformációs változását idézik elő, amely következtében képtelenné válik természetes szubsztrátjával, a NAD<sup>+</sup>-dal való interakcióra.<sup>19, 105</sup>

Az *allopurinol* és metabolitja az oxipurinol, a XO enzim effektív inhibitora, s így hatékony szer a szabadgyökök keletkezésével szemben ischaemia-reperfusio során.<sup>114</sup> A allopurinol közvetlen scavenger hatása vitatott,<sup>93, 137</sup> úgy tűnik azonban, hogy ezzel a tulajdonsággal nem rendelkezik.<sup>35, 164</sup>



2. ábra

Az ischaemia-reperfusió károsodás szabadgyökös mechanizmusa

[Fehér J., Vereczkei A.: Szabadgyök-reakciók jelentősége az orvostudományban. Biogal Gyógyszergyár, Debrecen, 1985. pp. 80-82. alapján]

### **2.2.3. A vörösvérsejtek érintettsége a szabadgyök-reakciókban**

Az emberi vörösvérsejtek rendkívül érzékenyek a szabadgyök károsodásokkal szemben,<sup>102</sup> hiszen folyamatosan magas oxigénkoncentrációnak vannak kitéve, membránjuk sok, a peroxidációra hajlamos többszörösen telítetlen zsírsavat tartalmaz, ezen kívül gazdagok vasban, ami a szabadgyök-reakciók egyik katalizátora.<sup>12, 142, 159</sup> A vörösvérsejt nem képes reszintézissel pótolni károsodott alkotóelemeit, membránfehérjéik szintén érzékenyek az oxidatív hatásra, a haemoglobin maga pedig mint oxidáz/peroxidáz szerepelhet. A vörösvérsejteket mind extra-, mind intracellularis gyökhatások érik. A sejten belül az oxihemoglobinnak állandó, kismértékű átalakulása methemoglobinnál szuperoxid gyök képződéséhez vezet.<sup>77</sup> Normális körülmények között egyensúly alakul ki, a spontán termelődő szuperoxid gyök (10<sup>7</sup>/nap, haemoglobin, szabad porfirinek által) és a vörösvérsejt antioxidáns védekező rendszere között. Extracellularisan a macrophagok, granulocyták által termelt hidrogén-peroxid és szuperoxid gyök hat a vörösvérsejtre, valamint az ischaemia-reperfúziós károsodás során aktiválódott xantin-oxidáz enzim működése során felszabaduló reaktív gyökök. Ezért a vörösvérsejt metabolikus aktivitásának jelentős részét az oxidatív stressz elleni védekezésre fordítja. Ebben a védekezésben az ismert védekező rendszereken kívül maga a haemoglobin is rendelkezésére áll, amely kiegészíti a sejt citoszol védelmét a ROI-ekkel szemben. A ROI-ek két módon fenyegetik a sejtet, részben a sejtmembrán direkt károsítása révén, részben Heinz-testek képzésével. A Heinz-testek formájában precipitált globin a diszulfid-hidakkal a vörösvérsejt membránjaihoz kötődve a sejtet rigiddé teszik, elősegítik a haemolysist.<sup>54</sup>

A vörösvérsejtek oxidatív stressz hatására létrejövő lipidperoxidációja kimutatható lipid fluorescens technikákkal és a vörösvérsejtek SOD aktivitásának mérésével.<sup>77</sup>

Az oxidatív stressz a vörösvérsejtekben számos ponton idézhet elő változásokat, melyeket a II. sz. táblázat foglalja össze.<sup>120</sup>

## II. táblázat: Az oxidatív stressz hatására létrejövő változások a vörösvérsejtben

Érintett sejtalkotórész	Károsodás
haemoglobin	változások az oxidációs-redukciós állapotban methaemoglobin reverzibilis és irreverzibilis hemichrom Heinz-test formáció
membránlipidek	lipidperoxidáció lipid lebomlás lipid adduct formáció változások a foszfolipidekben
proteinek	cytoskeleton polimerizáció, degradáció ion pumpa inaktiváció szulfhidril-csoport oxidáció/gátlás haemoglobin lebomlási termékek kötése

### 2.3. Az ischaemia-reperfusio hatása a vázizomra és annak microcirculációjára

Az ischaemia-reperfusió károsodás a microcirculatio területén vasospasmussal, az endothelium duzzadásával, fokozott capillaris permeabilitással, interstitialis oedema kialakulásával, subsequentialis thrombus formációval, „no-reflow” jelenséggel jellemezhető. <sup>5, 6, 111</sup>

Intravitális vizsgálati technikákkal ischaemiát követően számos jellegzetes változást figyeltek meg a capillarisok területén <sup>23, 183, 184</sup>.

- lassult, vagy megtorpant áramlás megemelkedett capillaris haematocrittal (60-80%) közvetlenül az ischaemia után
- fehérvérsejtek megjelenése, rolling-ja, adherentiája az endotheliumhoz, maguk mögött feltartva a vörösvérsejteket
- magas haematocritú (~90%) és alacsony haematocritú (~10%) capillarisok váltakozása a „no-reflow” területeken „pénztekercs”-képződéssel
- a funkcionális capillaris denzitás csökkenése

Ezekben a folyamatokban molekuláris szinten a korábbiakban röviden vázolt mechanizmusok - főként szabadgyök-reakciók, a sejtek kalcium tartalmának növekedése, membránkárosodás - játszanak szerepet.

Az izomszövet/izomsejtek ischaemia és a reperfusio okozta morfológiai elváltozásai a mitochondriumok duzzadásától a lamina basalis, a sarcolemma és a mitochondrium-membran fragmentációján át, a neuromuscularis junctio ultrastrukturális elváltozásait is beleértve a necrosisig terjednek, amely széles skálájú megjelenési forma erősen függ az ischaemia és a reperfusio időtartamától.<sup>116, 169</sup>

A vázizomzat viszonylag rezisztens az anoxiával szemben, tolerálva még 2 órás ischaemiát is.<sup>146</sup> Egyes tanulmányok irreverzibilis változások létrejöttét mutatták ki 4 és 6 óra ischaemia során.<sup>15, 127</sup> A pontos idő, amikor az ischaemiás károsodás irreverzibilissé válik azonban nem ismert, és sok tényezőtől függhet, így elsősorban az ischaemia mértékétől és idejétől, a collateralisok állapotától, az esetleges prekondicionálás mértékétől, illetve a hőmérséklettől is.<sup>55, 67, 116, 129</sup>

Mindezek ismeretében terveztük meg kísérleteinket, azok eredményeinek, illetve módszereinek esetleges gyakorlati, klinikai hasznosítása céljából.

Célunk

- a végtagi ischaemia-reperfusio
  - haemorheológiai és
  - mikrokeringési vonatkozásainak részletesebb feltárása,
- az állatkísérletes modellekhez nélkülözhetetlen fajspecifikus haemorheológiai különbségek vizsgálatával kiegészítve.

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

A haemorheologiai paraméterek közül jelen értekezésben ismertetett faktorokként a vörösvérsejt deformabilitást, a teljes vér és plazma viszkozitást, egyes haematologiai paramétereket és a fibrinogén szintet vizsgáltuk. Az értekezés első, nagy részét kitevő metodikai anyagnak megfelelően először a mérés technikai eljárások, majd ezek ismeretében és használatával megtervezett metodikai adaptációs és ischaemia-reperfüziós kísérletek kerülnek ismertetésre.

#### **3.1. A vörösvérsejt deformabilitás meghatározása**

Az 1960-as évektől vált általánossá a vörösvérsejt deformabilitás meghatározására a szűrőmembránok alkalmazásának módszere. A kezdetben használt papíryanagú filtereket felváltották a polimerekből készült, 3, 5 és 8  $\mu\text{m}$  átmérőjű és 10  $\mu\text{m}$  hosszúságú, hengeres csatornákat tartalmazó szűrőmembránok. A módszer fizikai alapja az, hogy ha ezeken a filtereken vérsejt-szuszpenziót áramoltatunk át, úgy a pórusok eltömődése miatt a szűrőmembrán átteresztőképessége folyamatosan csökken, így a sejtek szűrhetőségét a filtrációs nyomás és áramlás folyamatos mérésével lehet jellemezni.

A filtrációs elven működő deformabilitás méréshez vörösvérsejt-szuszpenziót kell készíteni, amely haematocritjának (mérési Htc) ajánlott standardja 5 %. Ennek elkészítéséhez közel 600  $\mu\text{l}$  vörösvérsejt-szuszpenziót használunk, ami a mintaelőkészítési folyamat alapján és az aktuális haematocrit érték ismeretében közel 2-2,5 ml teljes vért jelenthet.

A laboratóriumi kisállatoknál egyértelmű, hogy ennek a vérmennyiségnek a használata komoly akadályokba ütközik, ismerve ezen állatok vérmennyiségét, a vérvesztés következményeit, a vérvételi technika nehézségeit, nem beszélve a követéses vizsgálatok ebből a tényből eredő korlátairól.

### 3.1.1. Vörösvérsejt deformabilitás mérése filtrométerrel

A klasszikusnak tekinthető *Reid-Dormandy*-féle filtrációs eljárás konstans (10%) haematocritú vörösvérsejt-szuszpenzió szűrését jelenti 5  $\mu\text{m}$  pórusátmérőjű filteren.<sup>135</sup> Az elvet továbbfejlesztve Dormándy János Mátrai Árpáddal és munkatársaival elkészítette a *St. George's Filtrometer*,<sup>48</sup> aminek elvét alkalmazza a hazai fejlesztésű Carat FT-1 (3. ábra) illetve M200 típusú filtrométer (Carat Diagnosztika Kft., Budapest).

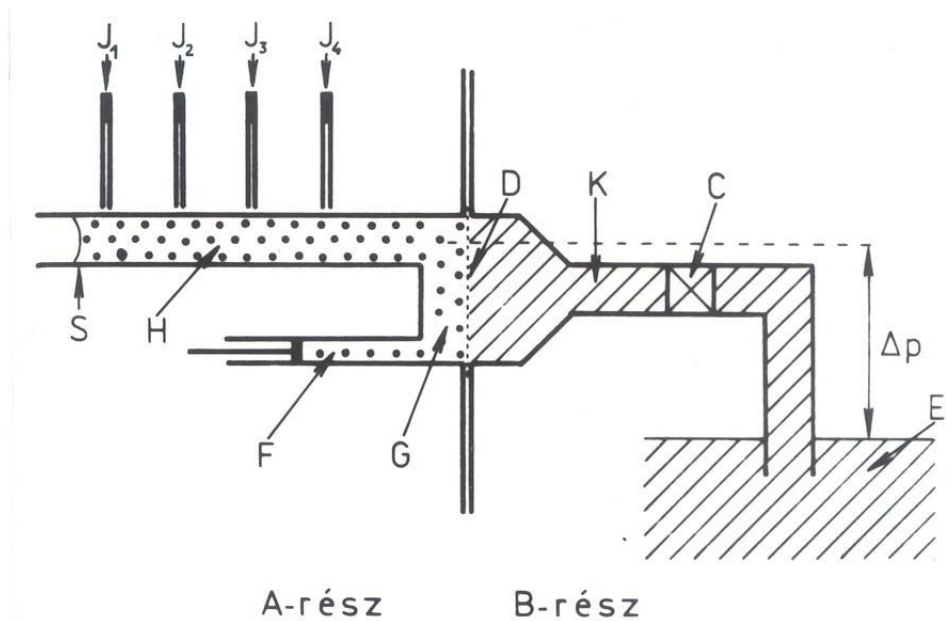
A berendezés vízszintes áramlási terét egy függőlegesen elhelyezett Nuclepore<sup>®</sup> polycarbonat anyagú szűrőmembrán két részre osztja: a szűrő előtti (**A**) és utáni (**B**) térre (4. ábra). Az **F** töltőcsövön keresztül folyadékot (először kalibrációs oldat, majd sejtuszuszenzió) injektálunk a **G** jelű szűrőkamrába és a **H** mérőcsőbe, egészen az **S** jelű pontig. A szűrési folyamat és a mérés a **C** csap megnyitásával indítható, aminek hatására a  **$\Delta p$**  hidrosztatikai nyomáskülönbség (általában 4 vízcm) hatására a folyadékáramlás megindul a mérőcsőből a szűrőmembránon keresztül az **E** tartály felé. A folyadékoszlop meniscusa a  **$J_1$ - $J_4$**  fotodetektorok kapcsolójaként működik, miközben a folyadékoszlop a membrán irányába elmozdul. A detektorrendszerrel összekötött kristályvezérlésű óra, illetve szoftver msec-os pontossággal méri a három időintervallumot ( $J_1$ - $J_2$ ,  $J_2$ - $J_3$ ,  $J_3$ - $J_4$ ) a detektorok között, miközben a meniscus elhalad előttük.<sup>20</sup>

A mérési folyamat első fázisaként kalibrációt végzünk, leggyakrabban pufferezett sóoldattal (foszfát puffereelt sóoldat, phosphate buffered saline, PBS – méréseink során ezt alkalmaztuk), majd a mérendő sejtuszuszenziót töltjük a készülékbe és megindítjuk a mérést. A sejtuszuszenzió közege szintén PBS, így a kalibrációs méréshez viszonyított (relatív) filtrációs sebesség meghatározható. Az FT-1 típusú filtrométerhez kapcsolt számítógép és szoftver a fenti adatokat rögzíti, és a megadott paraméterek alapján meghatározza a kezdeti relatív filtrációs sebességet (initial relative filtration rate, IRFR) és a relatív sejt-tranzitidőt (relative cell transit time, RCTT).



**3. ábra**

A Carat FT-1 filtrométer  
[Carat Diagnosztika Kft., Budapest]



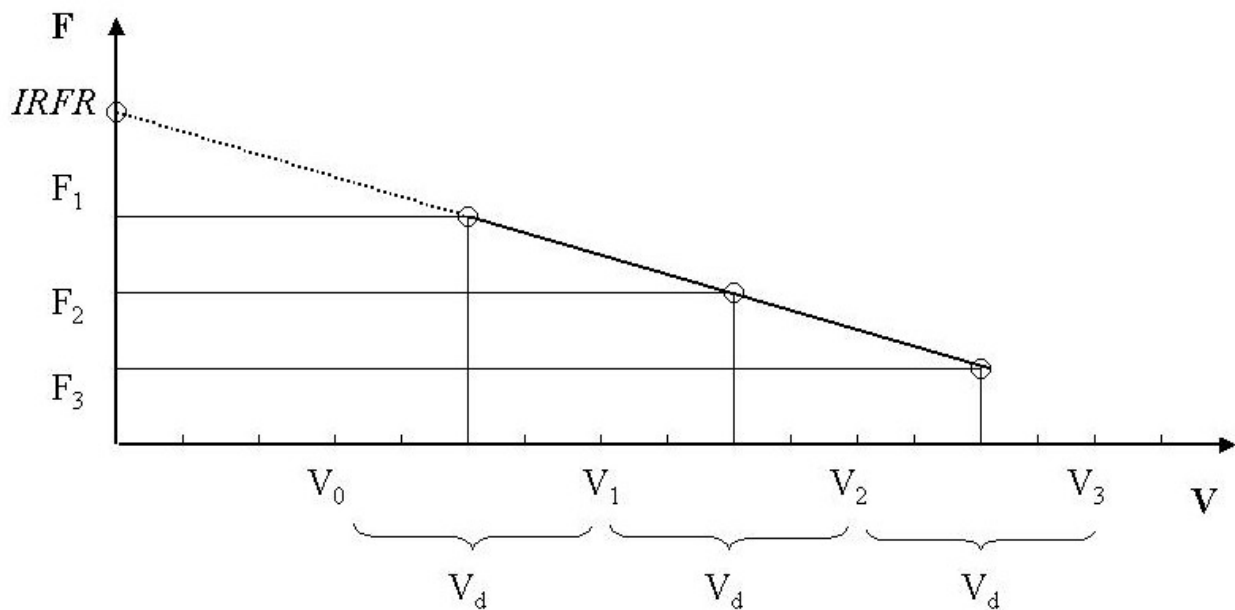
**4. ábra**

A filtrométer működési elve

[Bogár L.: Diagnosztika, In: Bernát S.I., Pongrácz E. (szerk.): A klinikai haemorheologia alapjai. Kornétás Kiadó, Budapest, 1999. pp. 46. alapján]

### 3.1.1.1. Kezdeti relatív filtrációs sebesség (initial relative filtration rate, IRFR)

Technikailag nehezen érhető el, hogy olyan vörösvérsejt szuszpenziót készítsünk, amely szennyeződésektől mentes. Elsősorban a kis számban jelenlévő fehérvérsejtek okozhatnak pórus-eltömődést, ami növeli a szűrőmembrán filtrációs ellenállását. Így a filtráció jellemzését, azaz a filtrációs sebességet a szűrési folyamat indulási pillanatánál célszerű számítani. A sejtszuszpenzió átszűrődése alatt a relatív filtrációs sebesség a szűrő pórusainak fokozatos, progresszív eltömődése miatt lineárisan csökken. Ennek következtében az egymást követő 20  $\mu\text{l}$  térfogatú folyadékszegmensek relatív filtrációs sebességéből lineáris extrapolációval meghatározható a kezdeti relatív filtrációs sebesség (5. ábra).



**5. ábra**

Az IRFR meghatározása

$V_0$ : a mérés kezdetéig a szűrőn átáramló minta térfogata (15  $\mu\text{l}$ );  $V_d$ : azon egymást követő térfogatszegmensek (20  $\mu\text{l}$ ), amelyek tranzitidejét méri a készülék ( $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$ );  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ : relatív filtrációs sebességek

A relatív filtrációs sebességek meghatározása:

$$F_1 = \frac{f_{1m}}{f_{1c}}$$

ahol:  $f_{1m}$  = az első detektált térfogatszegmens filtrációs sebessége méréskor  
 $f_{1c}$  = az első detektált térfogatszegmens filtrációs sebessége kalibráláskor

$$f_{1m} = \frac{V_d}{T_{1m}} \qquad f_{1c} = \frac{V_d}{T_{1c}}$$

ahol:  $T_{1m}$  = mérési  $T_1$  tranzitidő  
 $T_{1c}$  = kalibrálási  $T_1$  tranzitidő

Mindezek ismeretében:

$$F_1 = \frac{f_{1m}}{f_{1c}} = \frac{\frac{V_d}{T_{1m}}}{\frac{V_d}{T_{1c}}} = \frac{T_{1c}}{T_{1m}} = T_{1r}$$

Az  $F_1$  relatív filtrációs sebesség egyenlő a készülék által kiszámított  $T_{1r}$  relatív tranzitidővel.

Ezek alapján  $F_1 = T_{1r}$ ,  $F_1 = T_{1r}$ ,  $F_1 = T_{1r}$  értékekből az IRFR meghatározható.

### 3.1.1.2. Relatív sejt-tranzitidő (relative cell transit time, RCTT)

A vörösvérsejtek szűrhetőségét olyan dimenzió nélküli viszonyzámmal jellemezhetjük, amely egyetlen vörösvérsejt szűrőpóruson történő áthaladási idejét a vele egyenlő térfogatú szuszpenziós közeg tranzitidejéhez viszonyítva adja meg. Az IRFR és a szuszpenzió sejtkoncentrációja ( $H_{tc}$ ) ismeretében a relatív sejt-tranzitidő az alábbiak szerint adható meg:

$$RCTT = \frac{1}{\frac{IRFR}{H_{tc}} - 1} + 1$$

### **3.1.2. Mintaelőkészítés**

A vörösvérsejt deformabilitási vizsgálatokhoz szükséges vért nagy laboratóriumi állatoknál (keverék kutya, sertés) közvetlenül, zárt rendszerben Na-heparint tartalmazó Vacutainer-csövekbe bocsátottuk le (143 IU, BD Vacutainer<sup>®</sup>, 288285, 7 ml, Belliver Industrial Estate, UK). Laboratóriumi kisállatoknál (egér, patkány, nyúl) heparinozott fecskendőbe (10-20 IU/ml) vettük a vérmintát, majd a feldolgozás idejére Vacutainer-csőbe helyeztük. A vérmintát 10 percig 2500 g mellett centrifugáltuk, majd a plazmát és a „buffy coat”-ot eltávolítottuk. Ezt követően a sejtsuszpenziót kétszer mostuk foszfát pufferben (PBS; pH=7,4, osmolaritás=295±5 mOsm/l). Az utolsó centrifugálás után a szuszpenziót 1:1 arányban PBS oldattal hígítottuk, majd meghatároztuk a haematocrit értékét Janetzky-kapilláris centrifugával (5 perc). A kapott haematocritnak megfelelően a mintát PBS-sel tovább hígítottuk a méréshez szükséges sejtsuszpenzió-haematocritra (1-5%).

### **3.1.3. A deformabilitás mérés kivitelezése**

A St. George's Blood Filtration elvén működő<sup>48</sup> Carat FT-1 típusú filtrométerrel (Carat Diagnosztika Kft., Budapest) határoztuk meg az erythrocyták deformálódási képességét. A vörösvérsejt deformabilitás mérés standardizációs törekvését követtük az FT-1 típusú filtrométeren, miszerint a méréseket a mintavételtől számított 2 órán belül elvégeztük, a mérések kontrollált 22±1 °C-os környezetben történtek, a vörösvérsejt-suszpenziót 5 µm átlagos pórusátmérőjű polycarbonat filteren áramoltattuk át (Nuclepore<sup>®</sup>, Whatman Inc.) állandó (negatív) áramlási nyomás mellett (4 vízcm).

Az ismertetett metodika szerint a folyadékoszlop haladási sebességét 4 pár fényforrás-fotodetektor jeléből számítja ki a kapcsolt szoftver, és meghatározza az initial relative filtration rate (IRFR) és a relative cell transit time (RCTT) paramétereket, melyek közül az

RCTT használható a változások jobb leírására nagyobb tartományban való változása és haematocrit-függősége révén.

### 3.2. Teljes vér és plazma viszkozitás mérése

A vért zárt rendszerben, Na-heparinnal gyárilag bevont falú Vacutainer-csőbe (143 IU, BD Vacutainer<sup>®</sup>, 288285, 7 ml, Belliver Industrial Estate, UK) bocsátottuk le. A vérvételek során ügyeltünk a tartós strangulatio elkerülésére. A minták előkészítését légkondicionálással biztosított szobahőmérsékleten ( $22 \pm 1$  °C) végeztük, a mérések a vérvételtől számított 2 órán belül minden esetben megtörténtek. *Hevimet-40 kapilláris viszkozimétert* (6. ábra) használtunk a mérésekhez (Hemorhex Kft., Budapest).



**6. ábra**

Hevimet-40 kapilláris viszkoziméter  
[Hemorhex Kft., Budapest]

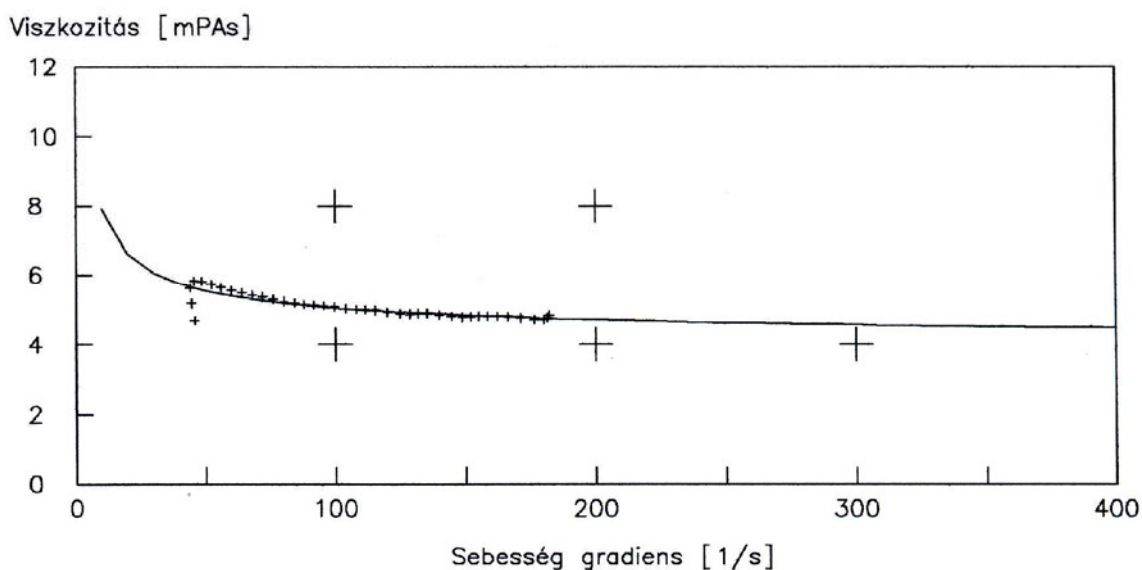
A készülék magyar technikai fejlesztés (Dr. Mátrai Árpád, Dr. Fendler Kornél) és továbbfejlesztés (Dr. Kollár Lajos, Kenedi István) terméke. A készülék két, temperált olajfürdőbe (37 °C) merülő kapilláris csőből áll (hossz: 500 mm, belső átmérő: 0,6 mm), amelyek mentén 40-40 pár fotodetektor található. A mérések bármelyik oldalon elvégezhetőek. A nyomás-gradiens a mintafolyadék saját hidrosztatikus nyomásából ered. A folyadék kapillárisba töltését követően (~0,6-0,7 ml) a készülék opto-elektronikusan rögzíti a meniscus pontos helyzet-idő diagramját, amit egy interface-n keresztül a csatlakozó computerbe továbbít. Az egyes sebességértékekből ki lehet számítani a mérőcső belső fala és a minta között keletkező sebesség-gradiens értékeket, ezekhez hozzá lehet rendelni az aktuális hidrosztatikai nyomásból eredő nyírófeszültségeket. E két származtatott paraméter (nyírófeszültség, sebesség-gradiens) hányadosai adják az áramlás során számítható viszkozitási értékeket.<sup>20</sup> A folyási görbéből a kapcsolt szoftver számolja a viszkozitási értékeket a folyadék folyástani alaptulajdonságát figyelembe véve: newtoni, és nem-newtoni (Casson-típusú folyási görbe) folyadék (7. ábra). Előbbiek közé sorolható a plazma és a szérum, utóbbiakhoz a vér (viszkozitása nyírófeszültség-függő).

A teljes vér viszkozitásának jellemzésére a hazai és nemzetközi konvencióknak megfelelő,  $90 \text{ s}^{-1}$  sebesség-gradiensnél mért értékeket [mPas] használtuk. Figyelembe kell venni azonban azt a tényt, hogy a keringés különböző szakaszain a sebesség-gradiens nagymértékben változik. Alacsonyabb sebesség-gradiensnél meghatározó jelentősége van a sejtek közötti interakciónak, a vörösvérsejt aggregációnak, amely haematocrit és fibrinogén függő. E szempontból, kiegészítő információként a keverék kutyákon kivitelezett végtagi ischaemia-reperfusio modellben feldolgoztuk a  $10 \text{ s}^{-1}$  sebesség-gradiensnél (a készülék által dokumentált legalacsonyabb sebesség-gradiens) mért teljes vér viszkozitási értékeket is.

A teljes vér viszkozitás nagymértékben haematocrit függő. A vérviszkozitási adatokat feldolgoztuk Mátrai és munkatársai<sup>104</sup> által ajánlott matematikai formula segítségével 40%-os haematocritra korrigált formában:

$$\frac{\text{TVV}_{40\%}}{\text{PV}} = \left( \frac{\text{TVV}_{\text{Htc}}}{\text{PV}} \right)^{\frac{40\%}{\text{Htc}}}$$

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



**7. ábra**

A teljes vérre jellemző (Casson-típusú) folyási görbe viszkoziméterben történő mérés során

### 3.3. A fibrinogén szint meghatározása

A vizsgálatokhoz a vért zárt rendszerben Na-citrátot tartalmazó csövekbe bocsátottuk le (0,129 M, BD Vacutainer<sup>®</sup>, 15063, 2 ml, Belliver Industrial Estate, UK).

Clauss módszerén (1957) alapuló eljárás szerint a fibrinogén szint meghatározását Sysmex CA-500 típusú automata coagulométerrel végeztük (TOA Medical Electronics Co., Ltd., Japan). Az eljárás egy módosított thrombinidő-meghatározás. Az 1:9 arányban imidazol-pufferrel hígított plazmához thrombinoldat hozzáadása után a fibrinalvadék kialakulásának ütemét turbidimetriás módon rögzíti a műszer. A készülék a felvett görbe alapján meghatározza a fibrinogén koncentrációt [g/l].

### 3.4. Haematológiai paraméterek meghatározása

Az általános haematológiai paramétereket Sysmex F-800 típusú automatával (microcell counter) határoztuk meg (TOA Medical Electronics Co., Ltd., Japan). A készülék

K<sub>3</sub>-EDTA-val (7,5%, 0,040 ml, BD Vacutainer<sup>®</sup>, 388625, 2 ml, Belliver Industrial Estate, UK) anticoagulált vérből 20 µl-nyi minta aspirációjával fotometriás elven meghatározza a haemoglobin koncentrációt (Hgb [g/dl]), valamint impedancia-elven történő sejtszeparálás (leukocyták: ~ 30-300 fl [lizáló oldat adása után: Sysmex Quicklyser, TOA Medical Electronics Co., Ltd., Japan] erythrocyták: ~ 25-250 fl, thrombocyták: ~ 2-30 fl) alapján a quantitativ értékeket, további származtatott paramétereket megadva (III. táblázat).

### III. táblázat: A Sysmex F-800 haematologiai automatával meghatározott paraméterek

<b>Főbb paraméterek</b>	<b>A készülék által használt rövidítés</b>	<b>Mérték-egység</b>
Fehérvérsejtszám	WBC	G/l
Vörösvérsejtszám	RBC	T/l
Haemoglobin-szint	Hgb	g/dl
Haematocrit	Hct	%
Átlagos vvs térfogat (mean corpuscular volume)	MCV	fl
Átlagos vvs haemoglobin tartalom (mean corpuscular hemoglobin)	MCH	pg
Átlagos vvs haemoglobin koncentráció (mean corpuscular hemoglobin concentration)	MCHC	g/dl
Thrombocytaszám	Plt	G/l
Lymphocytá %	Lymph%	%
Monocytá+granulocytá %	Mo+Gr%	%
Átlagos thrombocytá térfogat (mean platelet volume)	MPV	fl

A mérések kivitelezésénél figyelembe vettük a gyártó kutatócsoportjának ajánlásait állatvér vizsgálatokra.<sup>115</sup> A haematologiai paraméterek normál tartományát a Sysmex F-800-as haematologiai automata kézikönyve által megadott adatok alapján fogadtuk el.

CD outbred patkányok esetében figyelembe vettük a Charles Rivers Laboratory online adatait is [<http://www.criver.com/techdocs/hematol/index.html>].

### **3.5. A kísérletes modellek leírása**

Kísérleteinket az 1998. évi XXVIII., „Az állatok védelméről és kíméletéről” alkotott törvény előírásait betartva végeztük, a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság engedélyeivel.

Az értekezés szerzője kísérleteinek engedélyszáma: 6/2000. DE MÁB.

Az értekezés fő témáját nyújtó végtagi ischaemia-reperfúziós kísérletekbe vont *laboratóriumi patkányokat* 22-24 °C-os helyiségben, standard méretű és kivitelezésű ketrecekben a műtétig kettesével tartottuk. A helyiségekben a napi fényciklus 12 óra volt (6.00-18.00). Minden állatnak konvencionális ételt és vízhez való szabad hozzáférést biztosítottunk. A posztoperatív periódusban a patkányokat egyéni ketrecekben helyeztük el.

A patkánykísérletekben az anatómiai nevek használatánál Rudolf Hebel és Melvin W. Stromberg: „Anatomy and embryology of the laboratory rat” nomenclaturáját vettük figyelembe.<sup>70</sup>

A *keverék kutyákat* 2-4 hét megfigyelés után (amely magába foglalja a szükséges állatorvosi kezelést, oltásokat és karantént is) vontuk be a kísérletekbe (engedélyszám: 50/2001. DE MÁB). A kísérletbe vont állatokat egyedi ketrecekben tartottuk, normál vegyes étrendet, vízhez való szabad hozzáférést, és az állat igényei szerinti szabad mozgás lehetőségét biztosítva. A 18-22 °C-os helyiségekben a fényciklus napszaknak megfelelő volt. A kísérletes műtéteket követően az állatok posztoperatív egyedi ketrecekbe kerültek, a szükséges állatorvosi felügyelet biztosítása mellett.

#### **3.5.1. Haemorheológiai mérések fajspecifikus adaptációja**

Különböző állatfajokban összehasonlítottunk egyes haemorheológiai paramétereket (3.5.1.1.). Elővizsgálatot végeztünk a standard metodikai leírásban használt mennyiségű vér

vétele esetében (3.5.1.2.), majd újabb állatoktól nagyobb mennyiségű vért vettünk, a mintákból hígítási sort készítettünk (5-4-3-2-1%) a filtrometriás vizsgálatokhoz (3.5.1.3.).

### **3.5.1.1. Kísérleti állatok az összegző-összehasonlító elemzéshez**

Több kísérletsorozatban (engedélyszámok: 6/2000., 14/2000., 15/2000., 50/2001., 6/2002. DE MÁB, az egyes kísérletek nem kerülnek leírásra jelen munkában) felhasznált eltérő fajú, az ép, kontroll csoportokhoz tartozó, vegyes nemű, középes súlyú állatok kizárólag a különféle műtéti beavatkozások előtt vett vérmintáinak erythrocyta deformabilitási, valamint vérvizkozitási paramétereit összegeztük:

- A/J inbred egér (23-28 g,  $25,72 \pm 4,66$  g; n=20)
- CD outbred [Crl:CD<sup>®</sup> BR] patkány (250-350 g,  $292,6 \pm 23,4$  g; n=36)
- nyúl (3,2-3,8 kg,  $3,61 \pm 0,19$  kg; n=32)
- keverék kutya (20-25 kg,  $23,8 \pm 4$  kg; n=62)
- juvenilis Durok/Cornwall sertés (30-35 kg,  $32 \pm 2,04$  kg; n=13)

A vizsgálatokhoz szükséges vér vétele:

- patkányban a vena femoralisból, illetve a vena saphenából,
- egerekben intracardialis punctióval,
- nyulakban a lateralis fülvénából,
- kutyákban a vena cephalicából,
- sertésekben a vena femoralisból

történt az aktuális kísérleti protokollok szerint.

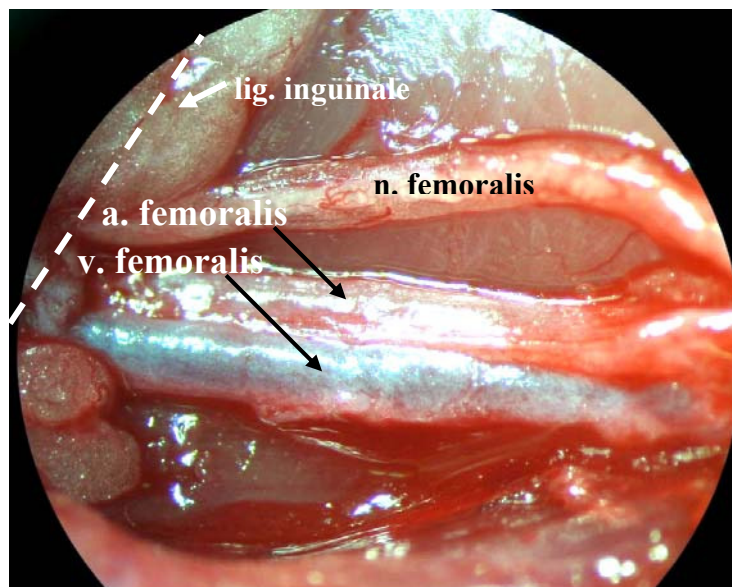
### **3.5.1.2. Egy hetes követéses vizsgálat kivitelezhetőségének vizsgálata**

Hús CD outbred középsúlyú (250-350 g) hím patkányt (Crl:CD<sup>®</sup> BR, Charles Rivers Laboratories) használtunk 1 hetes összehasonlító alapvizsgálatra.

Altatást követően (Na-pentobarbital [35 mg/kg i.p., Nembutal<sup>®</sup>, 6 g/100ml, Phylaxia-Sanofi Ltd.], atropinum-sulfuricum [0,01 mg/kg s.c., Atropinum sulphuricum inj., 2 mg/ml, Paines&Byrne Ltd.]) bal oldalon a combhajlat leborotválása és Betadin<sup>®</sup>-os fertőtlenítése után

a ligamentum inguinale-val párhuzamos metszést ejtettünk. Mikrosebészeti módszerrel, Leica Wild M3B operációs mikroszkópot használva (Leica Co., Japan, N: 16x, 40x), feltártuk a femoralis ereket (8. ábra), majd a vena epigastrica superficialis beszájadzása és a ligamentum inguinale vetülete közötti szakaszon a vena femoralis 25 G-s tűvel történő punctiójával 2-2,5 ml vért vettünk. A vérvételt követően 3 ml testhőmérsékletű fiziológias sóoldatot juttattunk az állatba intraperitonealisan. Az érfalon ejtett szűrt sérülést mikrosebészeti módszerekkel 2-3 öltéssel (10-0 Prolene<sup>®</sup>) elláttuk, a fascia lata-t és a bőrt külön rétegekben 4-0-s Dexon<sup>®</sup>-nal zártuk, a sebet Betadin<sup>®</sup>-nal kezeltük. Az állatnak a posztoperatív szakaszban vízhez és táplálékhoz való szabad hozzáférést biztosítottunk, a sebet naponként kontrolláltuk. Egy hét elteltével a hasonló módon feltárt jobb oldali vena femoralison megismételtük a vérvételt, és pentobarbitálos túlaltatással extermináltuk az állatokat.

Az alap és az 1 hét múlva vett vérmintákból meghatároztuk a haematologiai paramétereket és 5%-os haematocritra hígított vörösvérsejt-szuszpenziót használva elvégeztük a deformabilitási méréseket.



**8. ábra**

A femoralis erek mikrosebészeti feltárása  
[Leica Wild M3B operációs mikroszkóp, N: 40x]

### ***3.5.1.3. Deformabilitás méréshez hígítási sor készítése***

Tíz CD outbred patkányt (250-320 g) Na-pentobarbitállal (35 mg/kg, i.p.) altattunk, majd jobb oldalon a comb borotválása és Betadin<sup>®</sup>-os fertőtlenítése után feltártuk az arteria és a vena femoralist. A vena femoralist 22 G-s tűvel pungáltuk és 3-4 ml vért vettünk, majd a bőrseb egy-egy ötléssel való zárása után pentobarbitállal történő túlaltatással extermináltuk az állatokat.

A vérmintákat egyenként öt részre osztottuk és a vörösvérsejt deformabilitás méréshez előkészítettük a már ismertetett módon; 5, 4, 3, 2, illetve 1%-os haematocritú vörösvérsejtszuszpenzióként, majd elvégeztük a filtrációs méréseket.

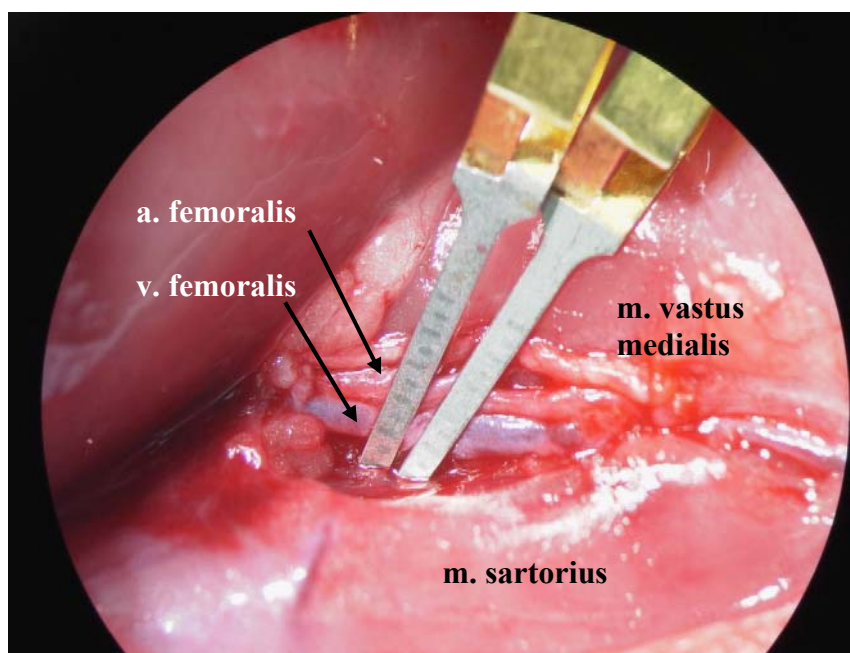
### ***3.5.2. Végtagi ischaemia-reperfusio haemorheologiai vizsgálata patkányban***

#### **3.5.2.1. Műtéti protokoll**

A fentebb leírt és kidolgozott metodikai adaptáció birtokában 1 órás végtagi ischaemia-reperfusio haemorheologiai, vörösvérsejt deformabilitási követéses vizsgálatát végezhetjük el, amelyben 26 középsúlyú (250-350 g) hím CD outbred patkányt használtunk.

Az anaesthesia során Na-pentobarbitalt (35 mg/kg, i.p.) és atropint (0,01 mg/kg, s.c.) használtunk. A műtéti területen az állatok teste alá fűthető padot helyeztünk konstans, 37 °C-os testhőmérséklet fenntartása érdekében, melyet a rectumba helyezett szondával kontrolláltunk a kísérlet operatív ideje alatt (Haemosys-konfiguráció, Experimetria Kft.).

Jobb oldalon a laterális nyaki és bal oldalon a combhajlati terület borotválása és Betadin<sup>®</sup>-os fertőtlenítése után a jobboldali vena jugularis externát Steffens nyomán,<sup>153</sup> módosított módszerrel kanuláltuk minden állatban. Ezt követően az állatokat random négy csoportba soroltuk.



**9. ábra**

A femoralis erek klipekkel történő leszorítása  
 [Leica Wild M3B operációs mikroszkóp, N:16x]

*A kontroll állatoknál más műtéti beavatkozás nem történt (Kontroll csoport, n=6).*

*Az áloperált csoportban bal oldalon a ligamentum inguinale-val párhuzamosan ejtett metszésből feltártuk a femoralis ereket és collateralis ágait. A műtétek során mikrosebészeti technikát alkalmaztunk a struktúrák sérüléseinek elkerülésére, Leica Wild M3B operációs mikroszkópot használva (Leica Co., Japan). A műtéti területet 1 óra időtartamra nedves, testhőmérsékletű steril gézzel fedve nyitottan hagytuk (Áloperált csoport, n=6).*

*Az ischaemia-reperfüziós csoportban az arteria és a vena epigastrica superficialis ligatúráját követően microvascularis klipekkel 1 óra időtartamra leszorítottuk az arteria és a vena femoralist (Ischaemia-Reperfusio csoport, I/R, n=6) (9. ábra). A distalis régiók keringésének eltűnését laser Doppler szöveti áramlásméréssel monitoroztuk (LD-01 Laser Doppler Flowmeter, Experimetria Kft.). Az 1 órás ischaemiás periódust követően a klipeket eltávolítottuk.*

Az *allopurinollal előkezelt ischaemia-reperfusió*s csoport állatainál az előbbi csoportéval azonos beavatkozást végeztük el, azonban a protokollt 30 perccel az ischaemia indukciója előtt intraperitonealisan alkalmazott 50 mg/kg allopurinol előkezeléssel (125 mg allopurinol [Egis Rt., constr. Nr.: 4546404960] 20 ml 0,9 %-os NaCl oldatban) egészítettük ki (Allopurinol+Ischaemia-Reperfusio, AP+I/R, n=8).

Minden csoportban alapmintaként 0,6-0,7 ml vért vettünk a kanülált vena jugularisból, mely ép kontrollként szolgált. A vérvétel után közvetlenül 2 ml fiziológiás sóoldatot juttattunk intraperitonealisan az állatokba (az AP+IR csoportban az oldat tartalmazta az allopurinolt). A műtéteket követően a vénás kanült eltávolítottuk, a combhajlatban a fascia lata-t és a bőrt egyszerű csomós öltésekkel (4-0 Dexon<sup>®</sup>) zártuk, majd a sebet Betadine<sup>®</sup> oldattal kezeltük.

### **3.5.2.2. Laboratóriumi vizsgálati protokoll**

A műtétet követő 1 héten át naponta 0,6-0,7 ml vért vettünk a contralateralis vena saphenából,<sup>71</sup> és meghatároztuk a haematologiai paramétereiket, valamint 1%-os vörösvérsejtszuszpenziót készítve megmértük a vörösvérsejt deformabilitási paramétereiket is. Az állatok anticoagulans szert nem kaptak. Az 1 hetes posztoperatív periódus végén az állatokat pentobarbitálos túlaltatással extermináltuk.

### **3.5.3. Végtagi ischaemia-reperfusio microcirculációs vizsgálata patkányban**

Az előző modellhez hasonló, 1 órás ischaemia microcirculációra kifejtett hatását kívántuk vizsgálni laser Doppleres áramlásméréssel egy, a mérési metodika standardizációs nehézségei kiküszöbölése céljából általunk kifejlesztett speciális teszttel.

### **3.5.3.1. Műtéti protokoll**

Tizenkét hím CD outbred patkányt (250-350 g) használtunk fel az 1 órás ischaemiát követő korai microcirculációs változások laser Doppleres vizsgálatára.

Az anasthesia kivitelezése Na-pentobarbitállal (35 mg/kg, i.p.) történt atropinnal kiegészítve (0,01 mg/kg, s.c.). A műtői hőmérsékletet a kísérleti protokoll teljes ideje alatt kontrolláltan 23-25 °C-on tartottuk. Az állatok teste alá fűthető padot helyeztünk a konstans 37 °C-os testhőmérséklet fenntartása érdekében, melyet a rectumba helyezett szondával kontrolláltunk a kísérlet teljes ideje alatt (Haemosys-konfiguráció, Experimetria Kft.).

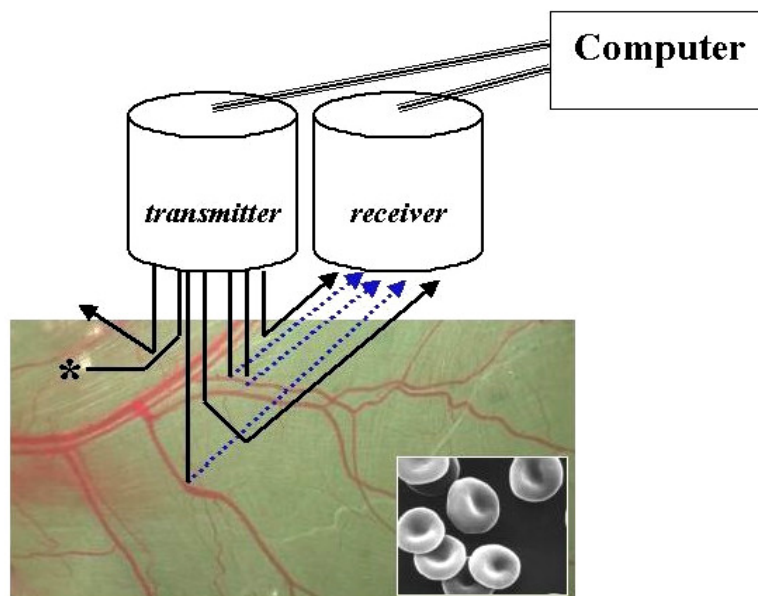
Mindkét oldalon a combhajlati régió borotválása és Betadin<sup>®</sup>-os fertőtlenítése után mikrosebészeti módszerekkel feltártuk az arteria és a vena femoralist, valamint a Scarpa-háromszögben található collateralis ágait. Láthatóvá tettük a musculus quadriceps femoris medialis vastusát és a musculus sartoriust. Két lekötés között átvágtuk az arteria és vena epigastrica superficialist, a femoralis erekből való kilépéshez közel. Öltéssel lekötöttük a hasfalban az arteria és vena epigastrica caudalist (inferiort). Ezután kétoldali alsó haránt laparotomiát végeztünk, és feltártuk az arteria és vena iliaca externát.

A laser Doppler készülék standard pencil mérőfejét a m. vastus medialisra helyeztük a vena saphena közelében, majd a jel stabilizálódása után elvégeztük a lentebb ismertetésre kerülő „occlusiós”-tesztet. Ezt követően a bal oldali arteria és vena femoralis óvatos, mikrosebészeti módszerrel történő szétválasztása után azokat microvascularis klipekkel 1 óra időtartamra leszorítottuk, a műtéti területet steril, nedves gézlappal fedtük. Az állat folyamatos megfigyelése és az 1 óra letelte után a klipeket eltávolítottuk. A laser Doppleres méréseket ismét elvégeztük mindkét oldalon, a jobb oldalt használva kontrollként. Az állatok anticoagulans szert nem kaptak. A metszéseket néhány öltéssel (4-0-s Dexon<sup>®</sup>) zártuk, majd az állatokat pentobarbitálos túllaltatással extermináltuk.

### 3.5.3.2. A laser Doppler szöveti áramlásmérés elve és az „occlusiós”-teszt

#### A szöveti áramlásmérés elve

A szöveti microcirculatio objektív, non-invasív és jól reprodukálható mérési eljárásainak kutatása során fejlesztették ki a laser Doppleres szöveti áramlásmérést. Technikáját 1975-ben Stern közölte,<sup>154</sup> majd Holloway és Watkins 1977-es közleménye nyomán<sup>72</sup> széles körben kezdték alkalmazni a klinikai- és a kutatómunkában is.



10. ábra

#### A laser Doppler szöveti áramlásmérő működési elve

A módszer előnye az egyszerűsége, objektivitása, és a non-invasív karaktere. Az eljárás az ultrahang diagnosztikában jól ismert Doppler-elven alapszik (10. ábra). A száloptikán keresztül (transmitter) kibocsátott laserfény-nyaláb a vizsgált szövetekben döntően szóródik, kisebb részben elnyelődik. A vizsgált területen belül mozgó vörösvérsejtekről visszaverődő nyalábban hullámhossz-változás következik be (Doppler-shift). A hullámhosszban bekövetkezett amplitúdó- és frekvenciaváltozás összefüggésben van a vörösvérsejtek számával és sebességével, de nem függ a mozgásuk irányától. A fogadó szálon (receiver) visszaérkező fénynyaláb ezen változásait a készülék elektromos jellé konvertálja és analizálja. Ezek az információk aztán grafikus és analízáló szoftverek segítségével értékelhetők. A használt laserfény frekvenciája meghatározza a penetráció mértékét. A laser Doppler készülékek leggyakrabban 633-810 nm frekvenciájú lasersugarat állítanak elő. Ez megközelítően egy 1-1,5 mm<sup>3</sup>-nyi szövetdarabot képes a hatósugarába vonni, ezen belül méri a mikrokeringést. Egyik laser Doppler készülék sem képes azonban abszolút értékben kifejezni az adott szövet véráramlását (pl. ml/min/100g szövet), hiszen azok anatómiai felépítése eltérő, így mindig az adott szövethez kellene kalibrálni. Ezért egy relatív paramétert, a perfúziós egységet fejezi ki (Blood Perfusion Unit, BPU vagy Blood Flow Unit, BFU), amelynek abszolút, valós dimenziója nincs. A készülék gyárilag kalibrált egy belső standardhoz (Motility Standard; ismert koncentrációjú latex gömbök oldatában létrejövő Brown-mozgás alapján).

Számos tényező befolyásolhatja a méréseket: (I) a **vizsgált szövet** alapján: anatómiai felépítés, microvascularis architectura, a vizsgált felület száradása, hűlése, testhelyzet, nem, kor, hormonális és idegi hatások, vasoaktív anyagok; (II) a **készülék** oldaláról: a mérések nem megfelelő standardizációja, a vizsgáló fej elmozdulása, szennyeződése, a száloptika megnyúlása, megtörtetése; (III) **külső tényezők**: hőmérséklet, légmozgás, vibráció, stb.<sup>53, 124</sup>

Az összehasonlító vizsgálatok, mint például beavatkozás előtt és után történő mérések összevetése ezekből eredően nehezen valósítható meg. A laser Doppler módszer rendkívül érzékenyen jelzi a mikrokeringésben bekövetkezett akut változásokat. A klinikumban alkalmazott postocclusiv, reaktív hyperaemia teszt, a vasoconstrictor-reflex teszt, lokális, vagy szisztémás hőhatás vizsgálata, a reflexes vasodilatatio vizsgálatai, vagy a légzési teszt jó példák erre.<sup>53</sup> A szisztémásan, vagy lokálisan, akár iontophoresissal bejuttatott vasoaktív szerek hatása szintén jól vizsgálható. Akut keringési változásnak tekinthető az erek közvetlen leszorítása és felengedése is. Humán, klinikai vizsgálatokban már igen nagyszámú mérés történt, jól bevált és beállított vizsgálati protokollokkal, amelyek biztosíthatják a standardizációt és az összehasonlíthatóságot.<sup>4, 36</sup>

Állatkísérletekben az adott mérések standardizációja rendkívül nehéz a különböző állatfajok és kísérleti protokollok miatt. Az összehasonlító, illetve követéses vizsgálatok pontosságának igénye felveti egy jól reprodukálható, könnyen elvégezhető módszer kidolgozását.

#### *Az „occlusió”-teszt*

Kifejlesztettünk egy speciális tesztet, az úgynevezett **„occlusió”-tesztet** a standardizációs és összehasonlíthatósági nehézségek kiküszöbölése érdekében kísérletes végtagi ischaemiás modellen.

Egy-csatornás laser Doppler készüléket (LD-01 Laser Doppler Flowmeter, Experimetria Kft., laser-sugár standard hullámhossza = 780 nm ± 10 nm, energiája a mérőfej végénél = 0,5-1,0 mW, laser Doppler signal = 10 Hz – 19 kHz) használtunk a kísérleteinkben. Az állványon rögzített laser Doppler mérőfejet (NP-100 Standard Pencil Probe, Oxford Optronix-Experimetria Kft.) (11. ábra) a m. vastus medialisra helyeztük érközelben.

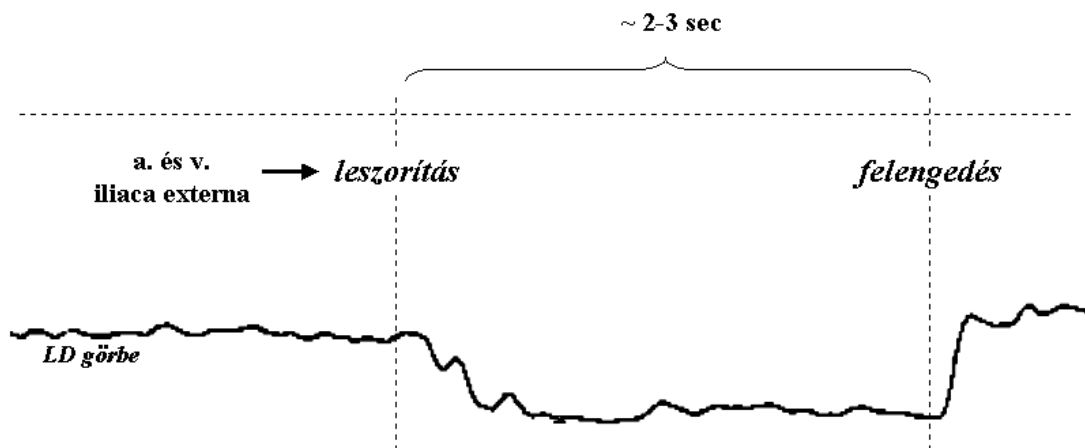


**11. ábra**

A laser Doppler készülék standard pencil mérőfeje

A laser Doppler jel stabilizálódása után 2-3 másodperc időtartamra atraumatikus eszközzel leszorítottuk, majd felengedtük az arteria és a vena iliaca externát, míg a laser Doppler szignált folyamatosan rögzítettük (Haemosys software-hardware konfiguráció, Experimetria Kft.) (12. ábra).

A 3.5.3.1. fejezetben leírt beavatkozások előtt és után, mindkét oldalon 3-3 tesztet végeztünk. Az egymást követő „occlusió”-tesztek közötti időtartam 10 másodperc volt. Az ischaemiás oldalon így a mérések a reperfusio első 5-10 percében történtek, beleszámítva a mérőfej rögzítését és a jel stabilizálódását is.



12. ábra

Az „occlusiós”-teszt kivitelezése

### 3.5.3.3. A rögzített laser Doppler jel analízise

Az „occlusiós”-tesztek elvégzése után az alábbi módon végeztük el az analízist:

- Megmértük a leszálló (descendáló, Desc, D) és a felszálló (ascendáló, Asc, A) görbeszakaszok időbeni hosszát, amelyek leírják a keringés eltűnését és újraindulását.
- Szoftveres átlagvonal illesztése után meghatároztuk a le- és felszálló szakaszok kezdete és 50%-os amplitúdó értékei között mért időintervallumokat ( $T_{50}$ ) az ischaemiás és a kontroll oldalon, beavatkozások előtt és után.
- Ezt követően kiszámoltuk a leszálló/felszálló görbeszakaszok  $T_{50}$  értékeinek arányát (D/A index  $[D/A_i] = T_{50Desc}/T_{50Asc}$ ).

Ezek alapján a perfúziós egységek relativitásától függetlenül elemezhetjük a laser Doppleres adatokat. Az adatgyűjtő és feldolgozó szoftver analízáló funkciójában a felvett görbék adatai leolvashatóak (idő, amplitúdó) és konvertálhatóak.

#### **3.5.4. Prolongált végtagi ischaemia-reperfusio haemorheologiai vizsgálata keverék kutyán**

Intézetünkben dolgozó egyik munkacsoport kidolgozott egy modellt nagy laboratóriumi állatokon (keverék kutya) a hosszabb idejű (3h) végtagi ischaemia-reperfusio hatásainak tanulmányozására.<sup>163</sup> A kísérleti modell kialakítása, leírása, klinikai vonatkozásai mellett külön témakörökként fogalmazódnak meg a haematologiai, haemostaseologiai, haemorheologiai, rutin kémiai és morfológiai paraméterek vizsgálatai. E munkacsoport eredményeiből csak az ischaemia-reperfusio lokális és szisztémás haemorheologiai vonatkozásai tartoznak értekezésem témájához, a műtéti modell röviden kerül ismertetésre.

A modell előnye, hogy a rendelkezésre álló nagyobb vérmennyiség miatt kiterjedtebb laboratóriumi vizsgálatokat lehet végezni, valamint elemezhetőek a kirekesztett végtagban, az ischaemia idejére stasis alatt lévő vér tulajdonságai is, melyről az irodalomban kevés adat van.

Huszonnégy, 3-4 éves hím és nőstény keverék kutyában (18-26 kg; 23,79±4,05 kg) anaesthesiát (ketamin 10 mg/kg + xilazin 1 mg/kg, i.m., a műtéti periódusban óránként felezett dózisban) követően kipreparálásra és kanülálásra került a bal oldali vena jugularis externa. Az állatok random 4 csoportot alkottak:

- I. nem-hűtött áloperált csoport (NH ÁL; n=6): jobb oldalon feltárásra került az arteria és a vena femoralis. A seb nedves steril gézlapos fedését követően, 7 óra múlva sebzés történt.
- II. hűtött áloperált csoport (H ÁL; n=5): a preparálás a nem-hűtött áloperált csoporthoz hasonlóan történt. A femoralis erek műtéti feltárását és a seb lefedését követően 3 óra időtartamra a comb köré jégtömlők lettek helyezve. A comb és a lábszár bőrfelületén mért hőmérséklet 4-5 °C volt. A jégtömlők eltávolítását követően 4 óra múlva történt a sebzés.

- III. nem-hűtött ischaemia-reperfusio csoport (NH I/R; n=5): a műtétiileg feltárt arteria és vena femoralis atraumatikus érleszorító eszközzel történő lezárása 3 óra időtartamú volt. Ezzel egyidőben a lágyrészek kirekesztése – a kiperarált femoralis erek alatt – a comb körül megfeszített acélhurokkal történt. Az érleszorító eszközök eltávolítása 3 óra ischaemia letelte után, az acélhurok eltávolítása csak újabb 4 óra elteltével, azaz a reperfusio negyedik órája végén történt.
- IV. hűtött ischaemia-reperfusio csoport (H I/R; n=8): az ischaemia-reperfusio és a hűtés kivitelezése az előzőekben ismertetett módon történt.

Vérminták vételének idejét, helyét és rendjét a IV. számú táblázat tartalmazza.

**IV. táblázat:** A vérvételek ideje és helye az Áloperált és az I/R csoportban

A vérvételek ideje		A vérvétel helye
<i>Áloperált csoport</i>	<i>I/R csoport</i>	
műtét előtt	műtét előtt	v. cephalica
–	közvetlenül a leszorított erek felengedése előtt	a kirekesztett végtag v. femoralisa
az épreparálást követő 3. óra letelte után (3h)	A 3 órás ischaemia letelte után a reperfusio kezdetekor (3h)	v. jugularis externa
ezt követő 30. percen (3h+30')	a reperfusio 30. perce (3h+30')	v. jugularis externa
további 30 perc eltelte után (3h+60')	a reperfusio 60. perce (3h+60')	v. jugularis externa
1., 2., 3., 4. és 5. posztoperatív napon		v. cephalica

Jelen értekezésben kizárólag a nem-hűtött csoportokban – **Áloperált-** és **I/R csoport** megnevezéssel – a szisztémás keringésből és a kirekesztett végtagból nyert vérmintákból haemorheologiai faktorokként a haematocrit, az 5%-os sejtszuspenzióban mért vörösvérsejt deformabilitás, a teljes vér és plazma viszkozitás, valamint a fibrinogén szint változásai kerülnek összegzésre.

### 3.6. Adatok rögzítése, archiválása

A műtéti dokumentációkon (altatási lap, műtéti jegyzőkönyv, utókezelési lap) kívül az adatokat Pentium II, illetve III-as PC-n rögzítettük a laboratóriumi mérési jegyzőkönyvek folyamatos vezetése mellett. A fotódokumentáció RICOH RDC-7 digitális fényképezőgéppel történt.

### 3.7. Statisztikai analízisek

Eredményeinket átlag  $\pm$  standard hiba (S.E.M.) formájában tüntettük fel a végtagi ischaemia-reperfusió modellekben, míg átlag  $\pm$  szórás (S.D.) adatokat használtunk a fajspecifikus összehasonlításnál és az adaptációs kísérleteinknél, valamint az 1 hetes követéses végtagi ischaemia-reperfusio modell haematologiai paramétereinél.

A statisztikai elemzéshez SigmaStat for Windows szoftvert (SigmaStat 1.0, 1992-1994., Jandel Scientific Co., Németország) és nem-parametrikus tesztekkel használtunk.

*A fajspecifikus haemorheologiai adaptációnál az 1 hetes, két mintavételes vizsgálatnál a haematologiai és RCTT értékeket páros t-teszttel, illetve Wilcoxon signed rank teszttel hasonlítottuk össze.*

*A hígítási sor* elemeinek Htc-tal való összefüggését lineáris regresszió analízissel végeztük, az egyes elemeket Student's t-teszttel hasonlítottuk össze.

*A patkány végtagi I/R kísérleteknél egyirányú variancia analízissel (ANOVA) a csoportokon belül Wilcoxon tesztet, a csoportok között Mann-Whitney rank sum tesztet használtunk.*

*A keverék kutyákon végzett végtagi I/R modellkísérletekben a csoportokon belüli összehasonlítást ANOVA és Dunnett's tesztel végeztük, a csoportok között Mann-Whitney és Kruskal-Wallis tesztet használtunk.*

A statisztikailag szignifikáns eltérést  $p < 0,05$  szintnél fogadtuk el.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Haemorheologiai mérések fajspecifikus adaptációja

#### 4.1.1. Haemorheologiai paraméterek összegző-összehasonlító elemzése

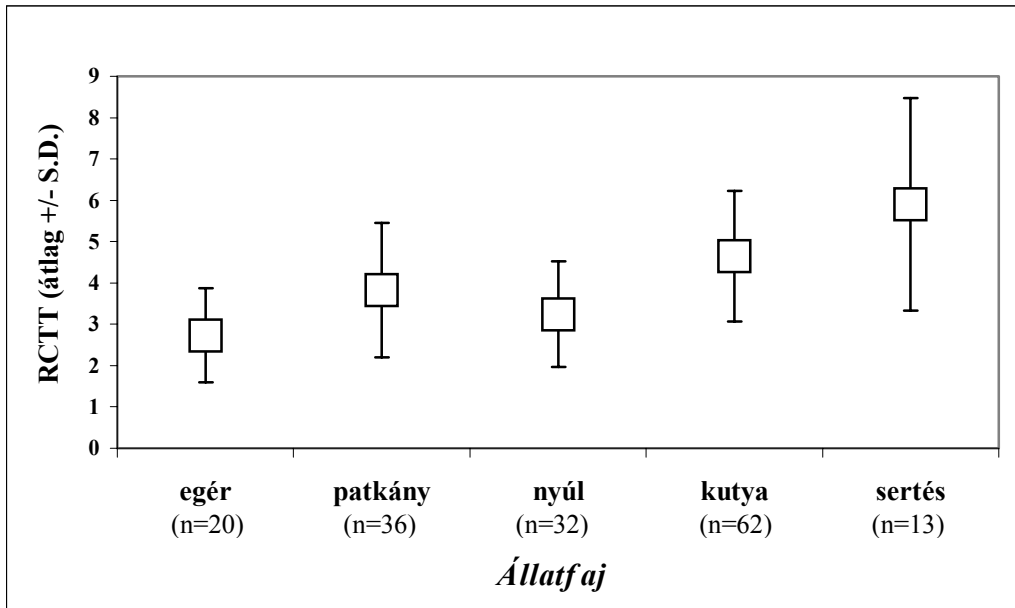
##### Vörösvérsejt deformabilitás

A kontroll csoportokat képező különböző fajú állatok RCTT értékeit összehasonlítva (3.5.1.1. fejezet) figyelemre méltó különbségeket tapasztaltunk.

Az egértől a sertésig csaknem lineárisan emelkedő RCTT értékeket találtunk, ha a fajokat méretük alapján csoportosítottuk (A/J inbred egér:  $2,73 \pm 1,14$ ; CD outbred patkány:  $3,83 \pm 1,63$ ; keverék kutya:  $4,64 \pm 1,58$ ; juvenilis sertés:  $5,9 \pm 2,57$ ). Ez alól a nyúl volt kivétel ( $3,24 \pm 1,28$ ), ahol a mért értékek a patkányénál kisebbek voltak (13. ábra).

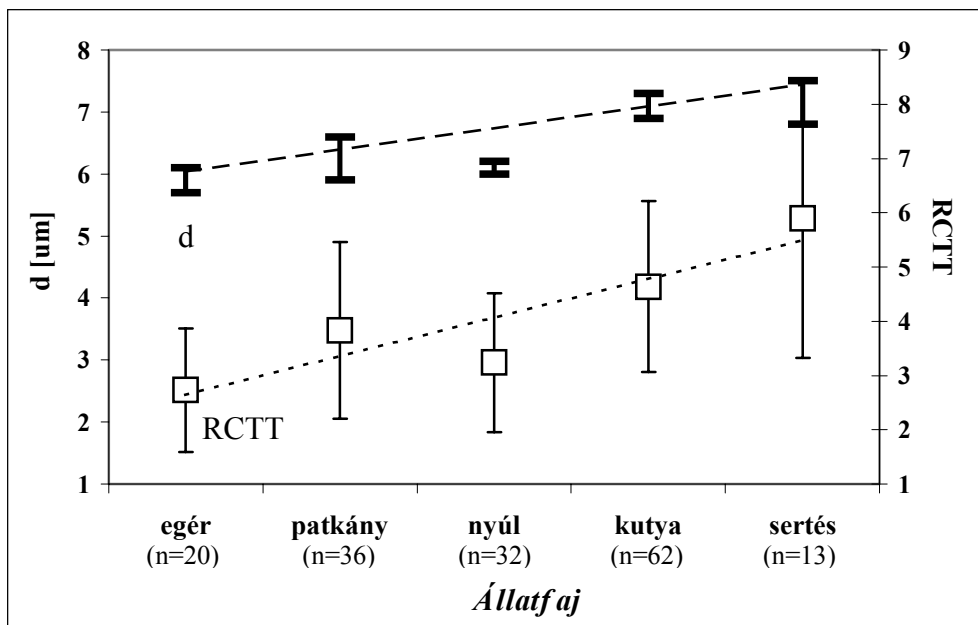
Összehasonlítva ezt az RCTT eloszlást a Sysmex F-800 típusú haematologiai automatával mért átlagos vörösvérsejt térfogattal (mean corpuscular volume, MCV [fl]), az egértől ( $49,49 \pm 0,99$  fl) a kutyáig hasonló tendencia mutatkozott azzal a kivétellel, hogy a nyúlnál mért MCV értékek ( $70,54 \pm 2,8$  fl) nagyobbak a patkányénál ( $57,53 \pm 2,81$  fl), és majdnem azonosak a kutya értékeivel ( $70,95 \pm 6,89$  fl), míg a juvenilis sertés MCV értéke meglepően alacsonynak bizonyult ( $58,81 \pm 1,89$  fl).

Összevetve eredményeinket az idevonatkozó irodalmi, vörösvérsejt átmérőkre (d [ $\mu\text{m}$ ]) vonatkozó – faji összehasonlító – adatokkal<sup>150</sup> azt találtuk, hogy az általunk mért RCTT értékek eloszlása vonatkozásában szoros hasonlóság mutatkozik (14. ábra), mely szerint a vörösvérsejt deformabilitás összefüggésben állhat a sejtmérettel.



13. ábra

A relative cell transit time (RCTT) paraméter általunk mért normál értékeinek eloszlása a különböző állatfajokban



14. ábra

A vörösvérsejt átmérők ( $d$  [ $\mu\text{m}$ ]) normál tartománya különböző állatfajokban\* összehasonlítva az általunk mért RCTT értékekkel

[\*Sós J., Sósné Lódi I.: A kísérleti állatok biológiai és fiziológiai standard értékei. In: Kovách Arisztid (szerk.): A kísérleti orvostudomány vizsgáló módszerei. I. kötet. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1954. pp. 109. alapján]

### Teljes vér és plazma viszkozitás

Patkány, nyúl, keverék kutya és sertés véreből meghatározott teljes vér- és plazma viszkozitás értékek összegzését az V. sz. táblázat tartalmazza kizárólagosan tájékozódás jelleggel. Az egyes fajok között a plazma viszkozitás tekintetében lényeges eltérést nem találtunk. A teljes vér viszkozitás kiugróan magas volt patkányok esetében, ami a 40%-os haematocritra való korrekció után is megmaradt.

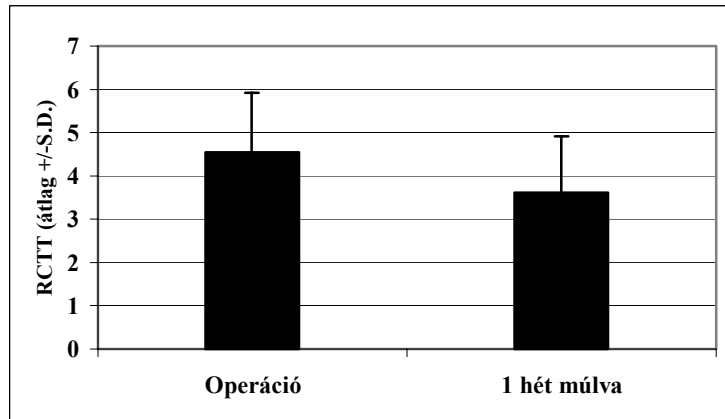
**V. táblázat:** A különböző állatfajok általunk mért viszkozitási paramétereit

<b>Faj</b>	<b>Teljes vér viszkozitás* [mPas]</b>	<b>Plazma viszkozitás [mPas]</b>	<b>Korrigált teljes vér viszkozitás** [mPas]</b>
patkány	7,259 ± 1,540	1,443 ± 0,190	6,839 ± 1,785
nyúl	4,591 ± 1,362	–	–
keverék kutya	5,558 ± 0,830	1,426 ± 0,188	4,075 ± 0,743
sertés	5,351 ± 0,672	1,561 ± 0,133	5,080 ± 0,667

átlag ± S.D.    \* 90 s<sup>-1</sup> sebesség-gradiensnél    \*\* 40%-os haematocritra korrigált értékek

#### **4.1.2. Egy hetes követéses vizsgálat kivitelezhetőségének vizsgálata**

A vörösvérsejt deformabilitás standard metodikai leírásnak megfelelő méréséhez CD patkánytól (3.5.1.2. fejezet, n=20) 1 hetes idő-különbséggel vett vérmintákból (2-2,5 ml), 5%-os mérési haematocrit értékeknél meghatározott RCTT deformabilitási paraméter szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott ( $p=0,0098$ ), míg a haematologiai paraméterek nem jeleztek szignifikáns különbséget, azaz a haematologiai restitúcióhoz a 7 nap elegendőnek tűnt kísérletünkben, de az RCTT értékek különböztek a kiindulási állapottól (15. ábra). Retrospektíven ez támasztotta alá az alacsonyabb mérési haematocritú (1-2%) vizsgálatok helyénvalóságát kevesebb vér vételével.

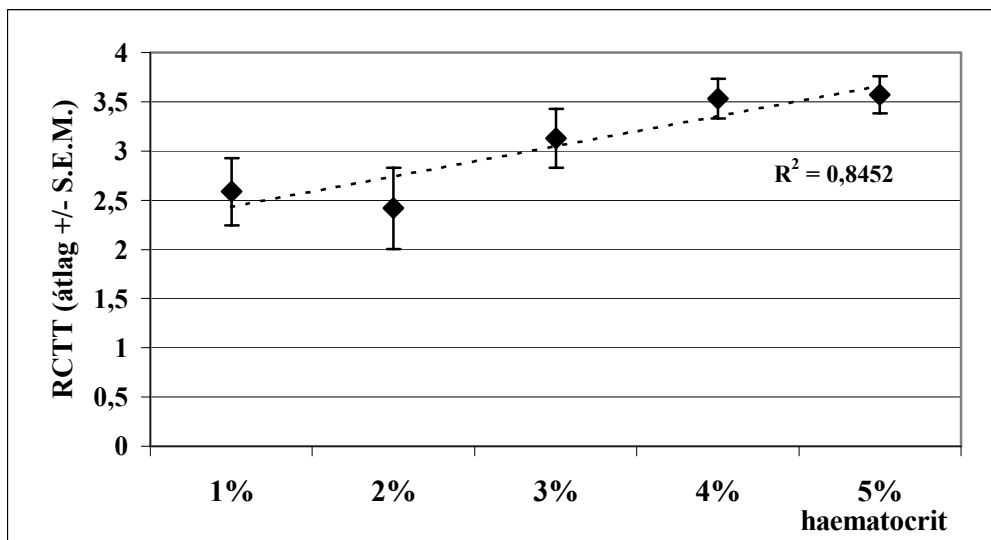


**15. ábra**

CD outbred patkányok (n=20) relative cell transit time (RCTT) értékei műtéti vérvételkor és 1 hét elteltével (2-2,5 ml)

#### 4.1.3. Deformabilitás méréshez hígítási sor készítése

A patkányvérből (n=10) készített 1, 2, 3, 4 illetve 5%-os vörösvérsejt-szuspenziókból álló hígítási sor elemzésénél (3.5.1.3. fejezet) az általunk vizsgált tartományban közel lineáris összefüggést találtunk (lineáris regresszió=0,216) a mért RCTT értékek és a haematocrit között (16. ábra).



**16. ábra**

A relative cell transit time (RCTT) és a vörösvérsejt-szuspenzió haematocrit értékeinek összefüggése patkány vérmintából készített 1-5%-ra hígított mintákban (n=10)

A szomszédos elemek között ugyan szignifikáns különbséget nem találtunk, azonban a szélső elemek között már szignifikáns különbség jelentkezett (1% vs. 4%  $p=0,0186$ , vs. 5%  $p=0,0116$ ; 2% vs. 4%  $p=0,018$ , vs. 5%  $p=0,0115$ ). Így például az 5%-os szuszpenzió mért adatait nem lehet együtt kezelni, a 2, vagy 1%-nál mért eredményekkel, de azonos koncentrációjú sejtsuszpenziónál kapott eredményeket lehet együttesen értékelni.

A mérések 5%-os haematocritú sejtsuszpenziókkal stabilnak bizonyultak az általunk vizsgált állatfajokon, azaz a mintánként végzett mérések (3-3) eredményei tekintetében a szórás mértéke nem haladta meg a 10%-ot. Azoknál a speciesteknél, ahol követéses vizsgálatok, vagy testméret-evidencia alapján kevesebb vér vételére kell szorítkoznunk, az 5%-on kívül stabil volt nyúlnál a 2%-os, illetve patkánynál az 1%-os sejtsuszpenzió végzett mérés. Egereknél az optimális szintén az 1%-os mérési haematocrit, bár a szórás és a sikertelen mérések száma elég nagy volt.

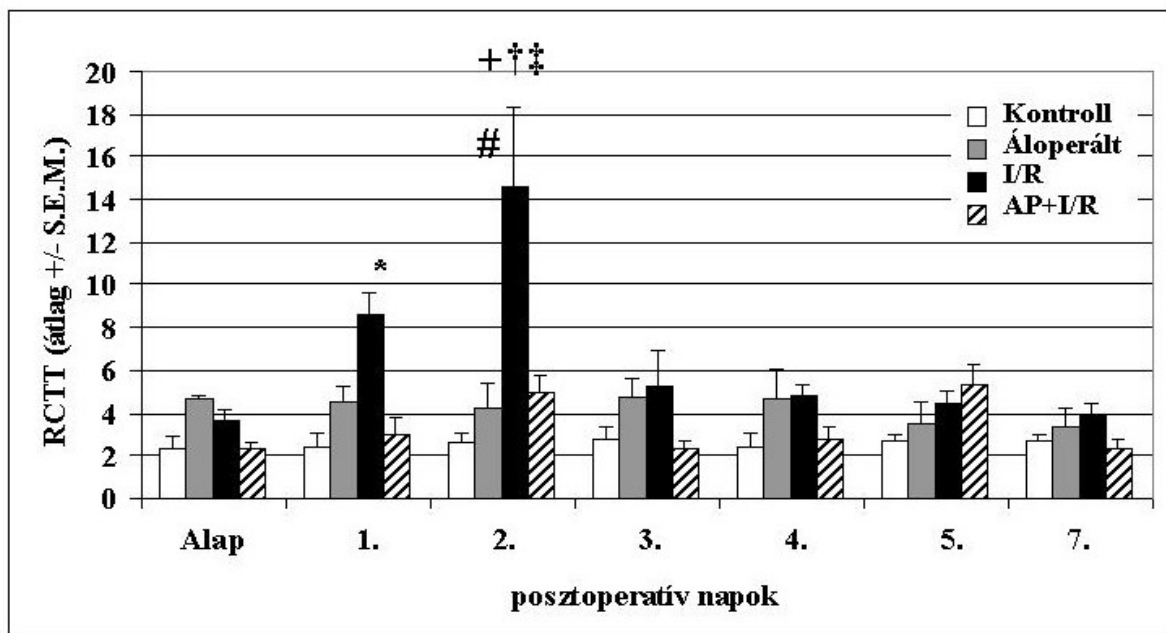
## **4.2. Végtagi ischaemia-reperfusio haemorheológiai vizsgálata patkányban**

A kísérletbe vont 24 állatból 3 elhullás volt a műtétet követően: ebből 1 állat a kontroll csoportból a 4. posztoperatív-, 1 állat az áloperált csoportból az 1. posztoperatív-, és 1 állat az allopurinollal előkezelt ischaemia-reperfusió csoportból a 2. posztoperatív napon. Egy esetben seb-infectio volt megfigyelhető autophagiára utaló jelekkel a femoralis régió varratvonalára körül. Ezeket az állatokat kizártuk az értékelésből.

### **4.2.1. Vörösvérsejt deformabilitás**

Az relatív sejt-tranzitidő (relative cell transit time, RCTT) az Ischaemia-Reperfusio csoportban (I/R) figyelemre méltóan emelkedett szintet mutatott az 1. posztoperatív- ( $8,552 \pm 1,116$ ; vs. I/R alap:  $p=0,006$ ; vs. Kontroll:  $p=0,0002$ ) és a 2. posztoperatív napon

( $14,616 \pm 3,766$ ; vs. I/R posztoperatív 1. nap:  $p=0,0006$ ; vs. I/R posztoperatív 3. nap:  $p=0,0184$ ; vs. Kontroll:  $p<0,0001$ ; vs. Áloperált:  $p=0,008$ ; vs. AP+I/R:  $p=0,0025$ ), míg a Kontroll és az Áloperált csoport nem mutatott szignifikáns eltérést. Az allopurinollal előkezelt csoport (AP+I/R) RCTT értékei enyhe emelkedést mutattak a 2. és 5. posztoperatív napokon, amely eltérés azonban nem bizonyult szignifikánsnak. A Kontroll és az Áloperált csoport alap- és 1. posztoperatív napi értékei között szignifikáns eltérést találtunk ( $p=0,0018$ ,  $p=0,0495$ , egyenként), amely különbség a 2. posztoperatív naptól eltűnt. Ennek magyarázata a random válogatott állatok esetleges eltérő életkora, súlya, egyéni sajátja lehet (17. ábra).



17. ábra

Az RCTT értékek időbeni változása 1 órás végtagi ischaemiát követően patkányban, 1%-os vörösvérsejt szuszpenzióból mérve

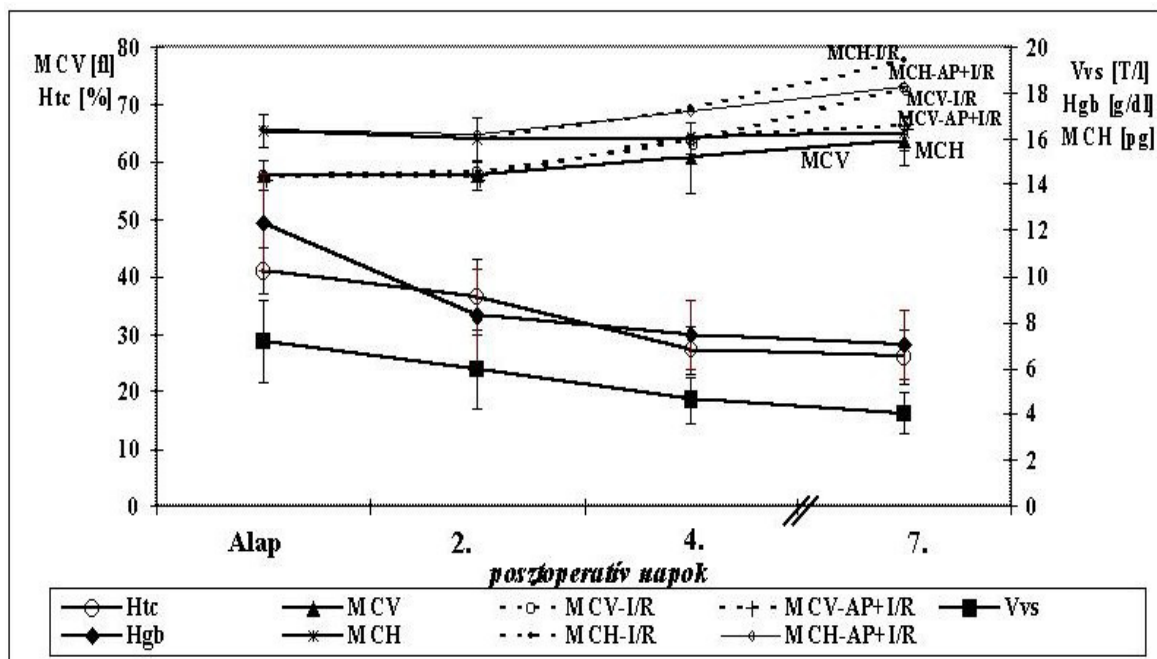
I/R: Ischaemia-Reperfusio csoport, AP+I/R: Allopurinol+Ischaemia-Reperfusio csoport  
 I/R csoportban: \*  $p<0,001$ ; +  $p<0,0001$  vs. Kontroll; #  $p<0,001$  vs. 1. posztoperatív nap;  
 †  $p<0,01$  vs. Áloperált; ‡  $p<0,01$  vs. AP+I/R

#### 4.2.2. Haematologiai paraméterek

A vörösvérsejtszám (vvs, [T/l]), a haemoglobin szint (Hgb, [g/dl]) és a haematocrit (Htc, [%]) tekintetében az egyes csoportok között szignifikáns eltérés nem volt. Ezek a

paraméterek fokozatosan csökkentek, a normál tartomány alsó határát a 4. posztoperatív napon lépve túl. (A normál tartományt a Charles Rivers Laboratory online adatai [<http://www.criver.com/techdocs/hematol/index.html>] és a Sysmex F-800-as haematologiai automata gyártójának munkacsoportja által megadott adatok<sup>115</sup> alapján fogadtuk el.)

Az átlagos vörösvérsejt térfogat (MCV, [fl]) és az átlagos vörösvérsejt haemoglobin tartalom (MCH, [pg]) értékek a normál tartományban maradtak, bár mindkettő enyhe emelkedést mutatott a posztoperatív periódusban. Szignifikáns különbségeket nem találtunk az egyes csoportok között a 7. posztoperatív nap kivételével, ahol az MCV és MCH kifejezetten megnövekedett az I/R, és mérsékelten, de szignifikánsan emelkedett az AP+I/R csoportban a Kontroll csoporthoz viszonyítva (MCV<sub>I/R</sub>:  $p=0,0151$ ; MCH<sub>I/R</sub>:  $p=0,0003$ ; MCH<sub>AP+I/R</sub>:  $p=0,0042$ ) (18. ábra).

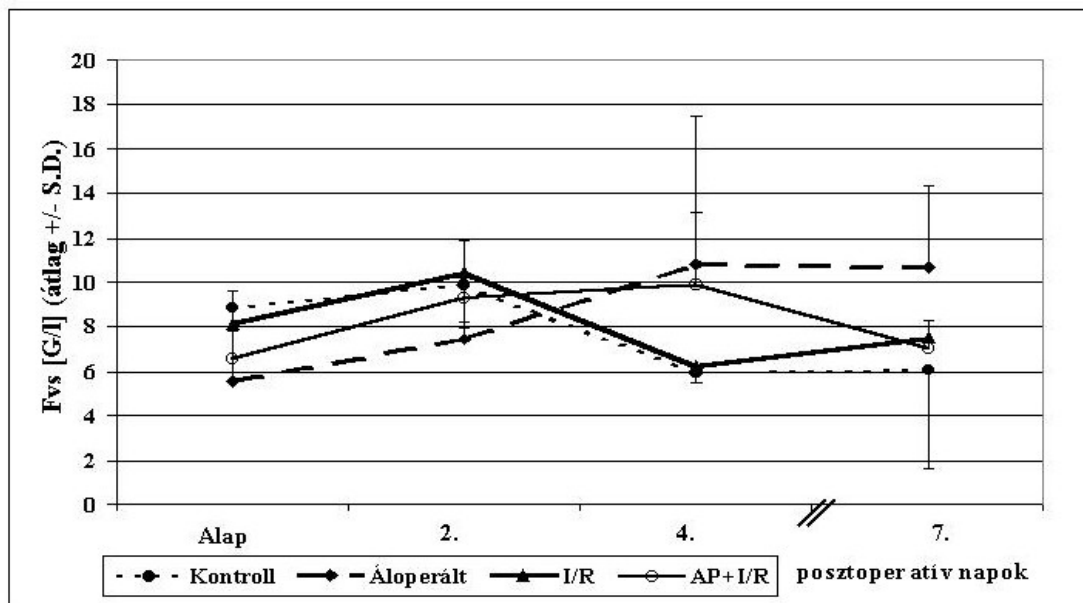


18. ábra

A vörösvérsejtszám (Vvs [T/l]), a haematocrit (Htc [%]), a haemoglobin szint (Hgb [g/dl]), átlagos sejttérfogat (MCV [fl]), átlagos haemoglobin tartalom (MCH [pg]) változása 1 órás végtagi ischaemiát követően patkányban

I/R: Ischaemia-Reperfusio csoport, AP+I/R: Allopurinol+Ischaemia-Reperfusio csoport

A *fehérvérsejtszám* (Fvs, [G/l]) nem mutatott karakterisztikus és szignifikáns változásokat. Az I/R és a Kontroll csoportban a 2. posztoperatív naptól a fehérvérsejtszám csökkent, míg az Áloperált és AP+I/R csoportokban határozott, de mérsékelt emelkedés mutatkozott (19. ábra).



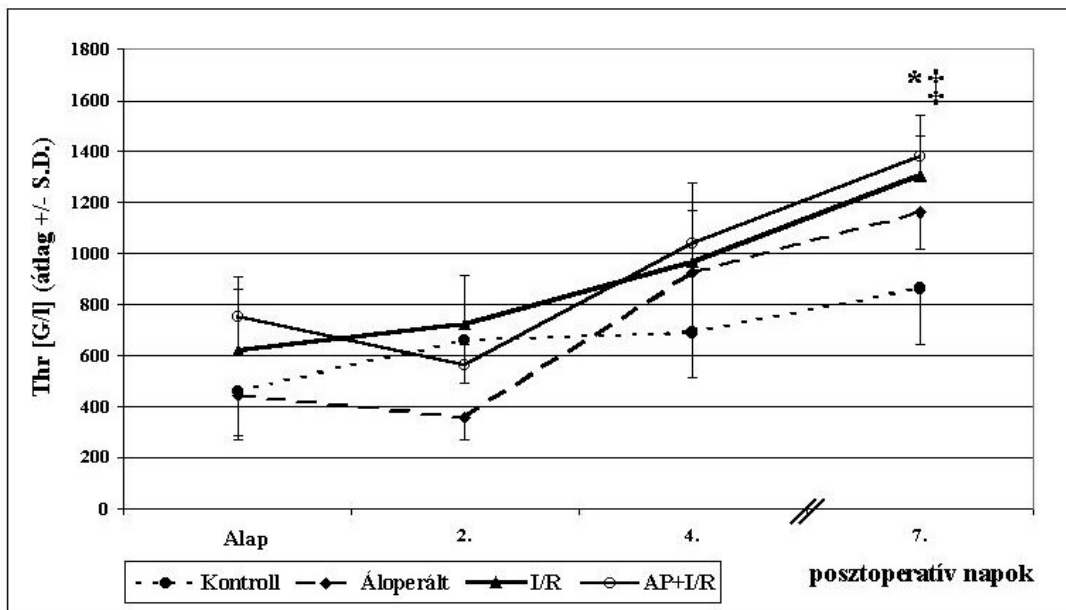
**19. ábra**

A fehérvérsejtszám (Fvs [G/l]) változása az idő függvényében  
1 órás végtagi ischaemiát követően patkányban

I/R: Ischaemia-Reperfusio csoport, AP+I/R: Allopurinol+Ischaemia-Reperfusio csoport

A *thrombocytaszám* (Thr, [G/l]) folyamatos emelkedés mutatott minden csoportban, szignifikánsan magas értékeket eredményezve az I/R és az AP+I/R csoportokban a 7. posztoperatív napon (Kontroll vs. I/R:  $p=0,0026$ ; Kontroll vs. AP+I/R:  $p=0,0369$ ) (20. ábra).

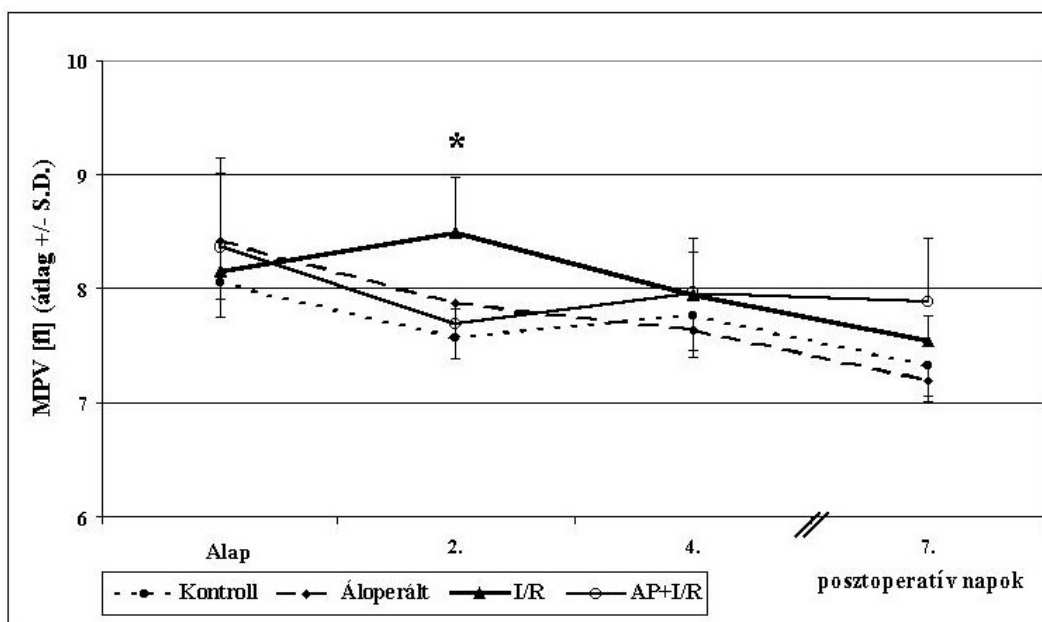
Az *átlagos thrombocyta térfogat* (MPV, [fl]) a 2. posztoperatív napon az I/R csoportban volt szignifikánsan megemelkedett a Kontroll csoporthoz viszonyítva ( $p=0,0011$ ), majd később a kiindulási értékek irányába tért vissza, ezt követően a Kontroll és az Áloperált csoportokkal együtt a 4-7. napon további csökkenést mutatott. Az AP+I/R csoportban a 4-7. nap között egy kismértékű emelkedés mutatkozott, amely nem volt szignifikáns, és egy mérsékelt, késleltetett válaszhoz hasonlít az I/R csoporttal összehasonlítva (21. ábra).



20. ábra

A thrombocytaszám változásai (Thr, [G/l]) az idő függvényében  
1 órás végtagi ischaemiát követően patkányban

I/R: Ischaemia-Reperfusio csoport, AP+I/R: Allopurinol+Ischaemia-Reperfusio csoport  
\* $p < 0,003$  ; ‡ $p < 0,05$  vs. Kontroll



21. ábra

Az átlagos thrombocytá térfogat (mean platelet volume, MPV, [fl])  
változásai az idő függvényében 1 órás végtagi ischaemiát követően patkányban

I/R: Ischaemia-Reperfusio csoport, AP+I/R: Allopurinol+Ischaemia-Reperfusio csoport  
\* $p = 0,0011$  vs. Kontroll

### 4.3. Végtagi ischaemia-reperfusio microcirculációs vizsgálata patkányban

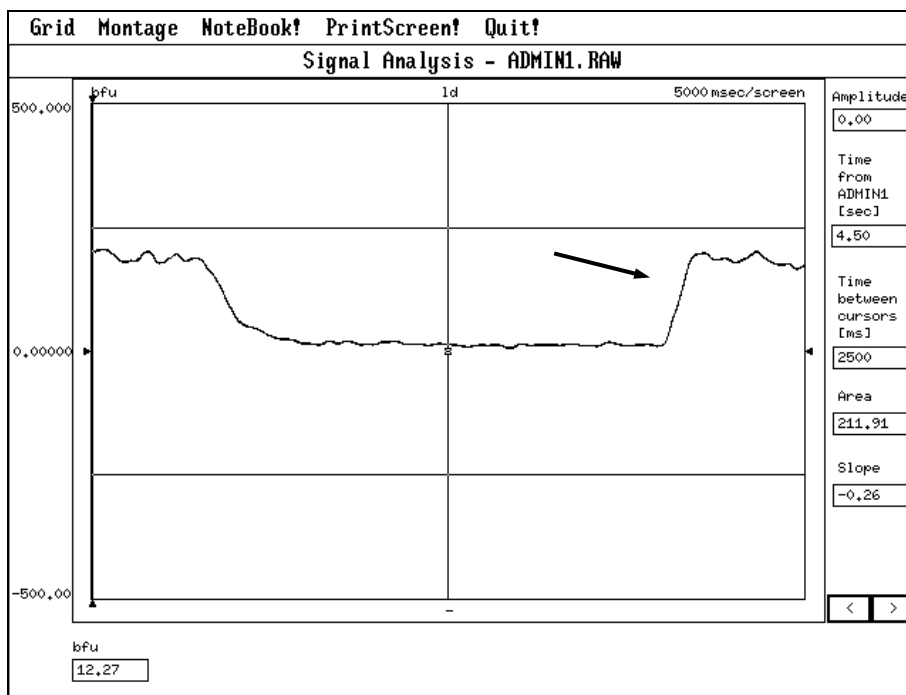
Minden állat túlélte a közel 90 perces kísérleti periódust. A laser Doppler mérőfej fixálása és stabil illesztése a mérési területre átlagosan 3-5 percet vett igénybe. Maga az „occlusió”-teszt rövid idő alatt kivitelezhető, a mérőfej beállításával együtt sem lépi túl az 5-10 perces időtartamot, azaz a vizsgálatokat a reperfusio első 10 percében el tudtuk végezni. A vizsgálatok során eredményesen törekedtünk kiküszöbölni a légzési és más izommozgások által okozott artefactumokat néhány eset kivételével, melyek adatait az értékelésből töröltük.

Karakterisztikus és figyelemre méltó különbségek figyelhetők meg az 1 órás ischaemiás periódust követően az „occlusió”-teszt során rögzített laser Doppler görbe le- és felszálló szakaszain (leszálló: Desc, D; felszálló: Asc, A) összehasonlítva a Kontroll oldallal, illetve a beavatkozás előtti állapottal. A leginkább figyelemreméltó különbség a felszálló görbeszakaszokon látszik, jelentős megnyúlást mutatva az Ischaemiás oldalon (22/A,B ábra).

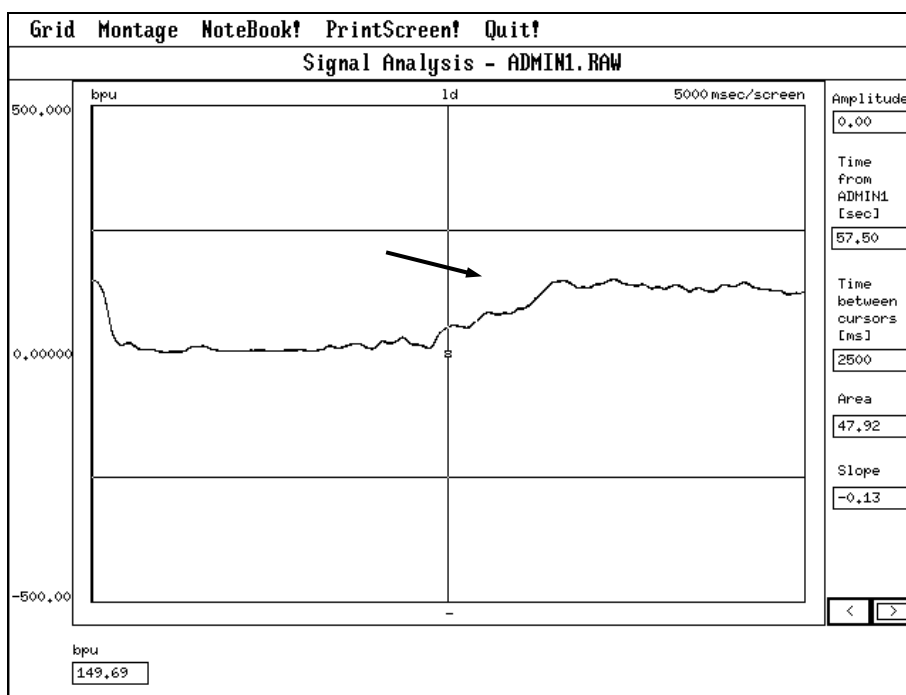
A feldolgozott és számszerűsített adatokból kimutatható volt, hogy nincs szignifikáns különbség a fel- és leszálló szakaszok 50%-os amplitúdójánál mért idő értékekben ( $T_{50}$ ) a beavatkozások előtt.

Az 1 órás ischaemia után a felszálló görbeszakasz  $T_{50}$  értéke ( $T_{50Asc}$ ) ( $430,3 \pm 43,73$  msec) szignifikánsan hosszabb volt, összehasonlítva az ischaemiás inzultus előtti állapottal ( $171,5 \pm 23,22$  msec,  $p=0,0007$ ), vagy a Kontroll oldallal ( $190,33 \pm 32,02$  msec,  $p=0,0017$ ).

A leszálló szakaszok szintén karakterisztikus változásokat mutattak az ischaemiásan érintett oldalon. A  $T_{50}$  érték ( $T_{50Desc}$ ) ( $127,4 \pm 14,82$  msec) itt szignifikánsan rövidebb volt, mint a Kontroll oldal (Kontroll, beavatkozás előtt =  $236,00 \pm 26,33$ ,  $p=0,0016$ ; beavatkozás után =  $255,83 \pm 43,03$ ,  $p=0,0049$ ), vagy az azonos oldal beavatkozás előtti állapotának értékeihez képest ( $233,83 \pm 26,91$  msec,  $p=0,0029$ ) (23. ábra).



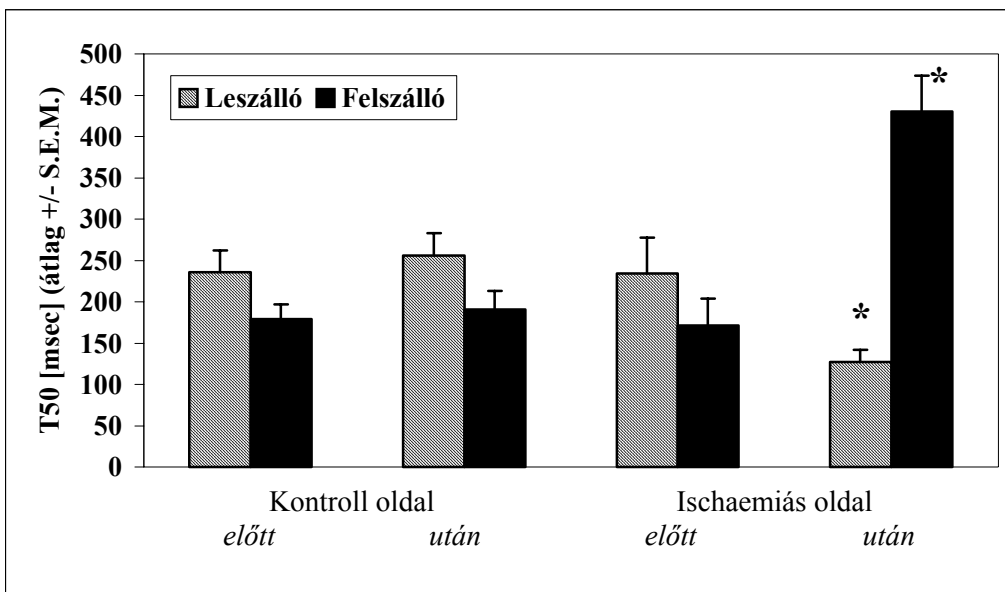
A



B

22. ábra

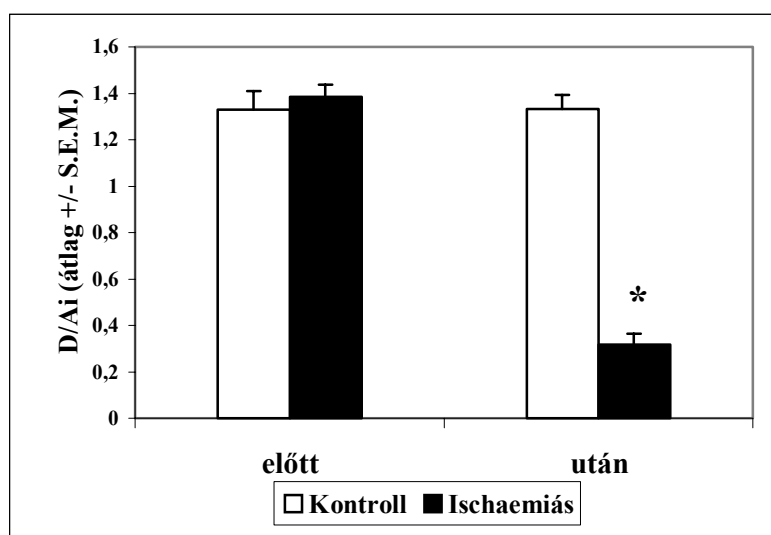
Az „occlusiós”-tesztek során rögzített laser Doppler jel analízisekor (Haemosys szoftver) kinyomtatott két karakterisztikus görbe 1 órás végtagi ischaemia előtt és után patkányban  
**A:** a normál állapotnak megfelelő „occlusiós”-teszt görbe a Kontroll oldalon, illetve a beavatkozás előtt,  
**B:** az 1 órás ischaemiát követő állapotra jellemző görbe. A nyilak a felszálló görbeszakaszra mutatnak: az ép állapothoz képest jelentős megnyúlás figyelhető meg az ischaemiásan károsodott oldalon.



23. ábra

A leszálló és felszálló szakaszok T<sub>50</sub> [msec] értékeinek változása a Kontroll és az Ischaemiás oldalon a beavatkozások előtt és után 1 órás végtagi ischaemiás modellben, patkányon

\* $p < 0,05$  vs. leszálló, vs. Kontroll



24. ábra

A D/A index ( $D/A_i = T_{50Desc}/T_{50Asc}$ ) értékeinek változása 1 órás végtagi ischaemiás modellben, patkányon

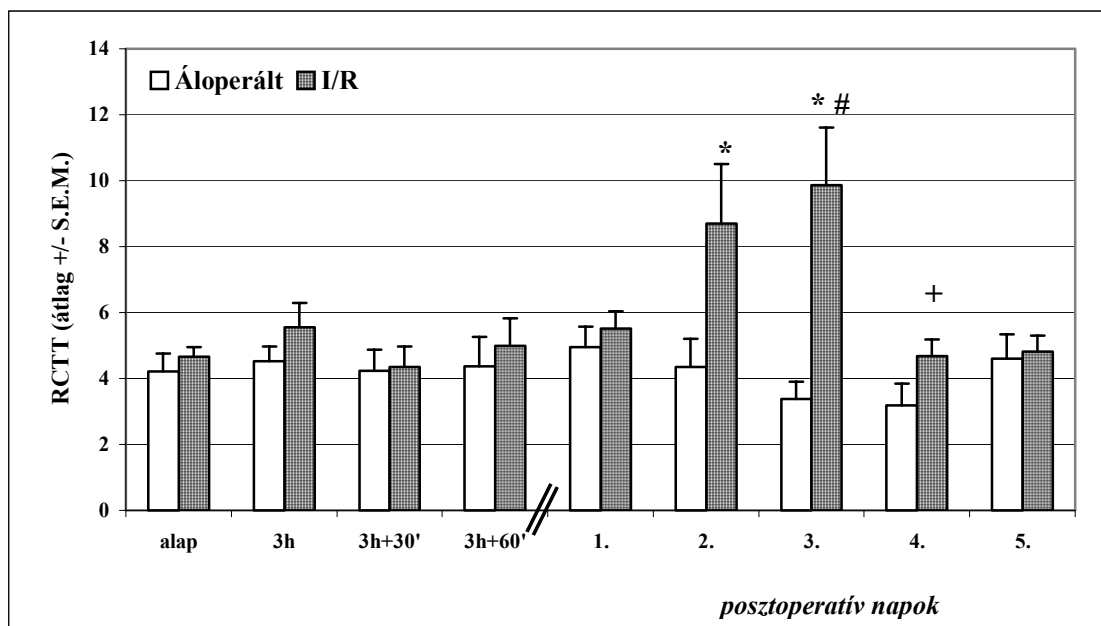
\* $p < 0,05$  vs. előtt, vs. Kontroll

A D/A index ( $D/A_i = T_{50Desc}/T_{50Asc}$ ) tekintetében ez azt jelenti, hogy az index 1,00 feletti értékekről 1,00 alatti értékekre váltott (D/Ai Kontroll oldal, előtt =  $1,329 \pm 0,08$ ,  $p < 0,0001$ ; D/Ai Kontroll oldal, után =  $1,332 \pm 0,06$ ,  $p = 0,0014$ ; D/Ai Ischaemiás oldal, beavatkozás előtt =  $1,386 \pm 0,05$ ,  $p = 0,0012$  vs. D/Ai az 1 órás ischaemia után =  $0,316 \pm 0,048$ ) (24. ábra).

#### 4.4. Prolongált végtagi ischaemia-reperfusio haemorheologiai vizsgálata keverék kutyán

##### 4.4.1. Vörösvérsejt deformabilitás

Az Áloperált csoport RCTT értékei a műtéti periódus alatt, valamint az 5. posztoperatív napig jelentős változásokat nem mutattak, bár a 3-4. napon mérsékelt, de nem jelentős csökkenés látszott.



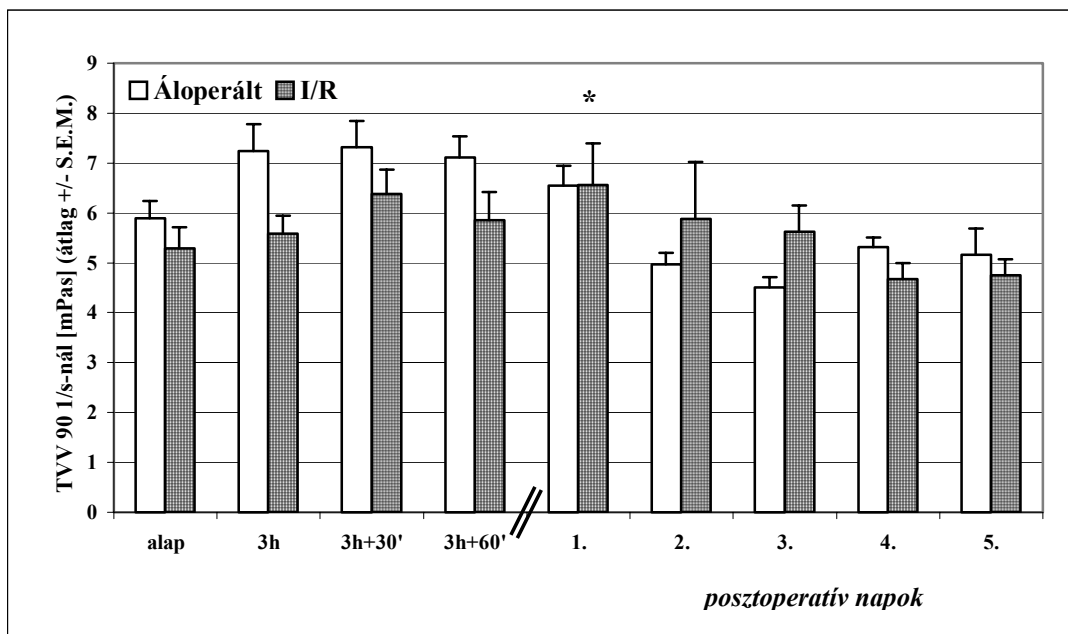
25. ábra

A relative cell transit time (RCTT) értékek változása az Áloperált és az Ischaemia-Reperfúziós (I/R) csoportban 3 órás végtagi ischaemiát követően keverék kutyán  
 \*  $p < 0,05$  vs. alap, #  $p < 0,05$  vs. Áloperált, +  $p < 0,05$  vs. 3. nap

Az Ischaemia-Reperfüsiós csoport (I/R) deformabilitási paraméterei a műtéti periódus során lényeges változást nem mutattak. A posztoperatív időszakban kiugróan magas RCTT értékeket találtunk a 2. és 3. posztoperatív napon ( $8,698 \pm 1,803$ ;  $9,861 \pm 1,741$ ), amely emelkedés az alapértékhez ( $4,656 \pm 0,286$ ) képest szignifikáns volt ( $p < 0,0001$ ). A 3. posztoperatív napon az Áloperált csoport értékeihez ( $3,38 \pm 0,53$ ) képest is szignifikáns különbséget találtunk ( $p = 0,0023$ ). Ez a 2. és 3. napon jelentkező RCTT kiugrás a 4-5. napra mérséklődni látszott, a 4. posztoperatív napon mért értékek ( $4,67 \pm 0,505$ ) szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak a 3. napon mért értékekhez képest ( $p = 0,0086$ ) (25. ábra).

#### 4.4.2. Teljes vér viszkozitás

A  $90 \text{ s}^{-1}$  sebesség-gradiensnél mért teljes vér viszkozitás értékeket vizsgálva, az Áloperált csoportban a műtéti periódus alatt mérsékelt viszkozitás emelkedést találtunk, amely egészen az 1. posztoperatív napig tartott, majd a 2. posztoperatív napra lecsökkent.

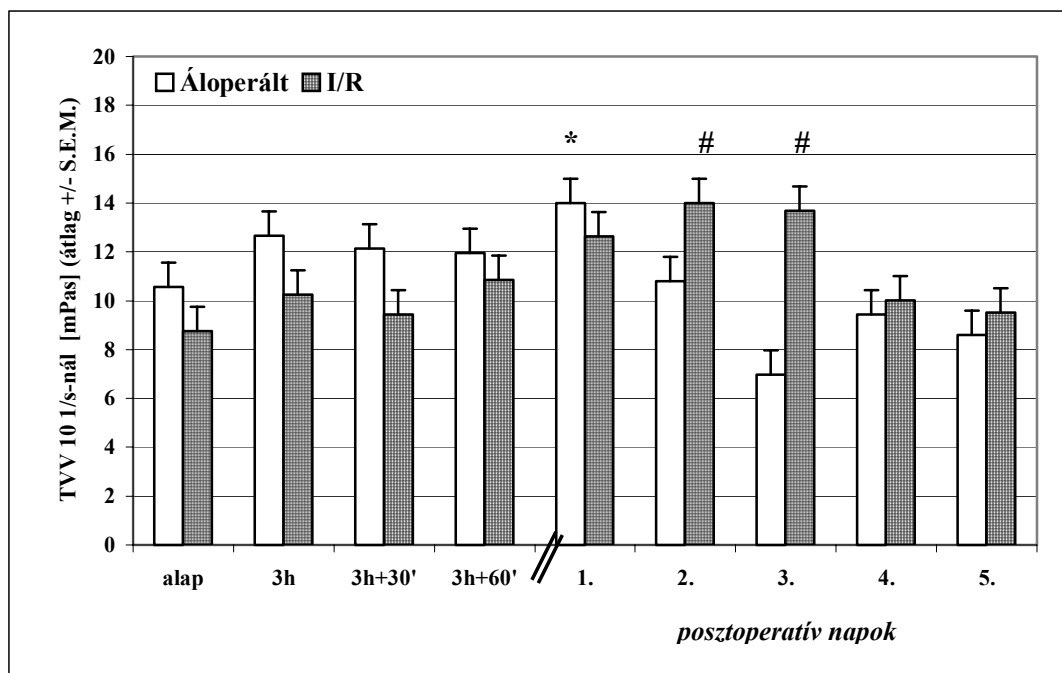


26. ábra

A  $90 \text{ s}^{-1}$  sebesség-gradiensnél mért teljes vér viszkozitás (TVV) értékek változása az Áloperált és az Ischaemia-Reperfüsiós (I/R) csoportban 3 órás végtagi ischaemiát követően keverék kutyán  
\*  $p < 0,05$  vs. alap

Az I/R csoport teljes vér viszkozitása a 3 órás ischaemiás periódust követő 30. percben vett mintában volt magasabb, majd csúcspontját az 1. posztoperatív napon elérve ( $6,558 \pm 0,891$  mPas;  $p=0,0377$  vs. alap) a 2-5. posztoperatív napig mérsékelt ütemű csökkenést mutatott (26. ábra).

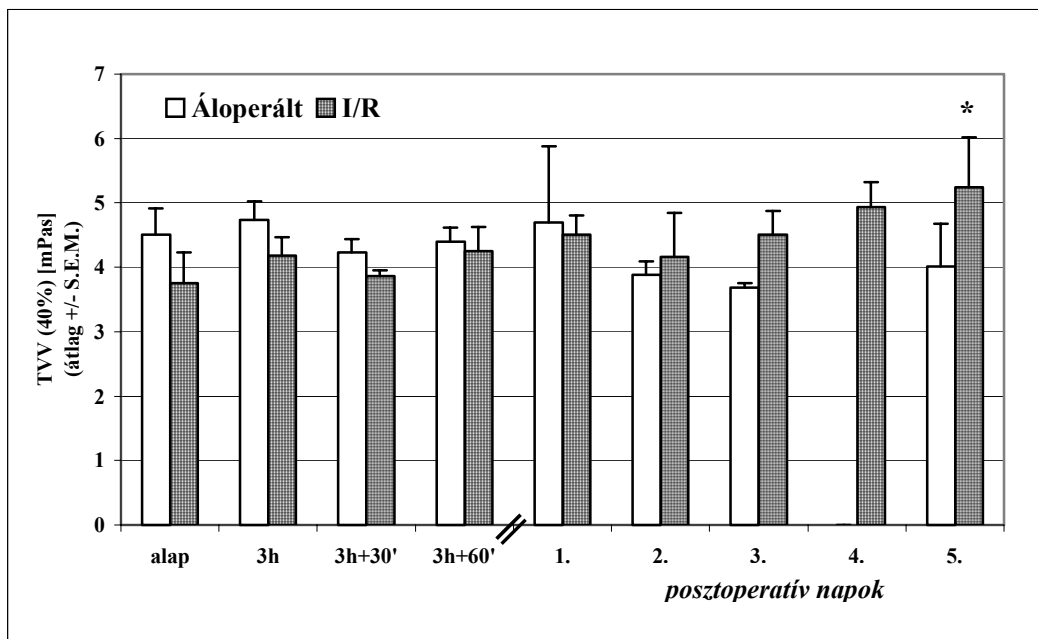
A  $10 \text{ s}^{-1}$  sebesség-gradiensnél mért teljes vér viszkozitás az 1. posztoperatív napon emelkedett értékeket mutatott mindkét csoportban, szignifikáns változás csak az Áloperált csoportban volt megfigyelhető (alap vs. 1. nap:  $p=0,0232$ ). Ebben a csoportban a viszkozitás értékek a 2. posztoperatív napra lecsökkentek az alapértékekhez közeli tartományba, majd a 3-5. napon hullámzó lefutású görbét követve további, mérsékelt csökkenést mutattak. Az I/R csoportban a 2-3. posztoperatív napon szignifikánsan magasabb értékeket találtunk az Áloperált csoportokhoz viszonyítva ( $p<0,05$ ,  $p<0,02$ , egyenként) (27. ábra).



27. ábra

A  $10 \text{ s}^{-1}$  sebesség-gradiensnél mért teljes vér viszkozitás (TVV) értékek változása 3 órás végtagi ischaemiát követően keverék kutyán  
 \*  $p<0,05$  vs. alap, #  $p<0,05$  vs. Áloperált

A 40%-os haematocritra korrigált teljes vér viszkozitás értékek változása jól követte a plazma viszkozitás és a fibrinogén szint változásokat (lásd később). A posztoperatív periódusban csökkenést mutató haematocrit (lásd később) teljes vér viszkozitást befolyásoló hatásának korrekciója után a teljes vér viszkozitás értékek a posztoperatív periódusban az I/R csoportban emelkedett értékeket mutattak. A legmagasabb értékek az 5. posztoperatív napon mutatkoztak a ( $5,55 \pm 0,257$  mPas, vs. Áloperált:  $p=0,0409$ ; vs. alap:  $p=0,0148$ ) (28. ábra).



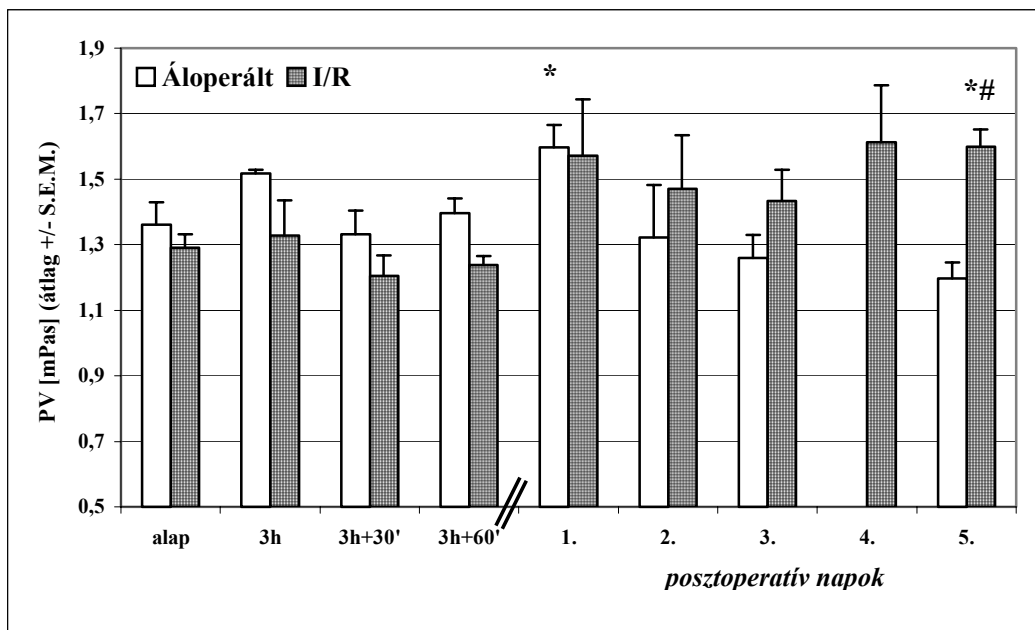
**28. ábra**

A 40%-os haematocritra korrigált teljes vér viszkozitás (TVV) értékek változása 3 órás végtagi ischaemiát követően keverék kutyán  
\*  $p < 0,05$  vs. alap, vs. Áloperált

#### 4.4.3. Plazma viszkozitás

A csoportok plazma viszkozitás (PV) értékeinek kezdeti homogenitása már a 3 órás műtéti periódus végére megváltozott.

Az Áloperált csoportokban plazma viszkozitás emelkedést találtunk a 3 órás periódus végén, a legmagasabb értékek az 1. posztoperatív napon mutatkoztak ( $1,597 \pm 0,068$  mPas, vs. alap:  $p=0,0459$ ), majd a PV a 2-5. posztoperatív napon a kiindulási értékek alá csökkent.



**29. ábra**

A plazma viszkozitás (PV) értékek változása az idő függvényében  
3 órás végtagi ischaemiát követően keverék kutyán  
\*  $p < 0,05$  vs. alap, #  $p < 0,05$  vs. Álóperált

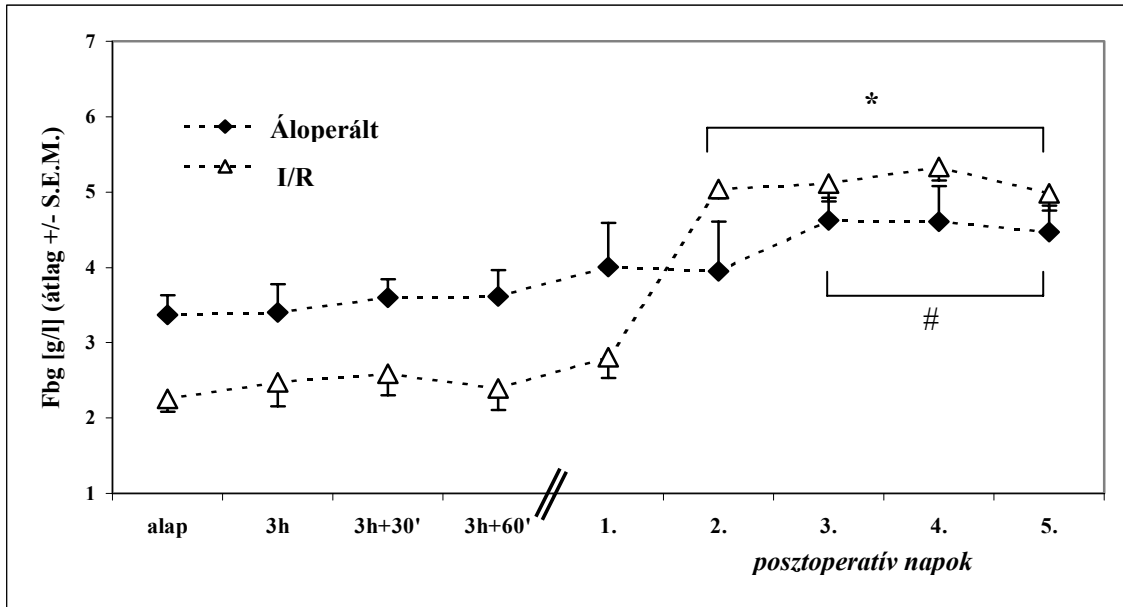
Az I/R csoport PV értékei az 1. posztoperatív napra megemelkedtek ( $1,572 \pm 0,171$  mPas) a kiindulási értékekhez képest ( $1,29 \pm 0,041$  mPas), majd a 2-3. posztoperatív napra tapasztalt mérsékelt csökkenés után a 4-5. posztoperatív napon szembetűnő emelkedést mutattak (5. nap: vs. Álóperált:  $p = 0,0007$ , vs. alap:  $p = 0,0014$ ) (29. ábra).

#### 4.4.4. Fibrinogén szint

A műtési periódus alatt jelentős fibrinogén szint változás nem volt megfigyelhető. Az 1. posztoperatív naptól kezdődően minden csoportban folyamatos emelkedést találtunk, amely a 3-5. posztoperatív napra stabilizálódni látszódott. A legnagyobb mértékű fibrinogén szint emelkedés az I/R csoportban mutatkozott, ahol az 1. és 2. posztoperatív nap értékei között közel kétszeres változást találtunk ( $2,806 \pm 0,271 \rightarrow 5,034 \pm 0,12$  g/l;  $p < 0,0001$ ).

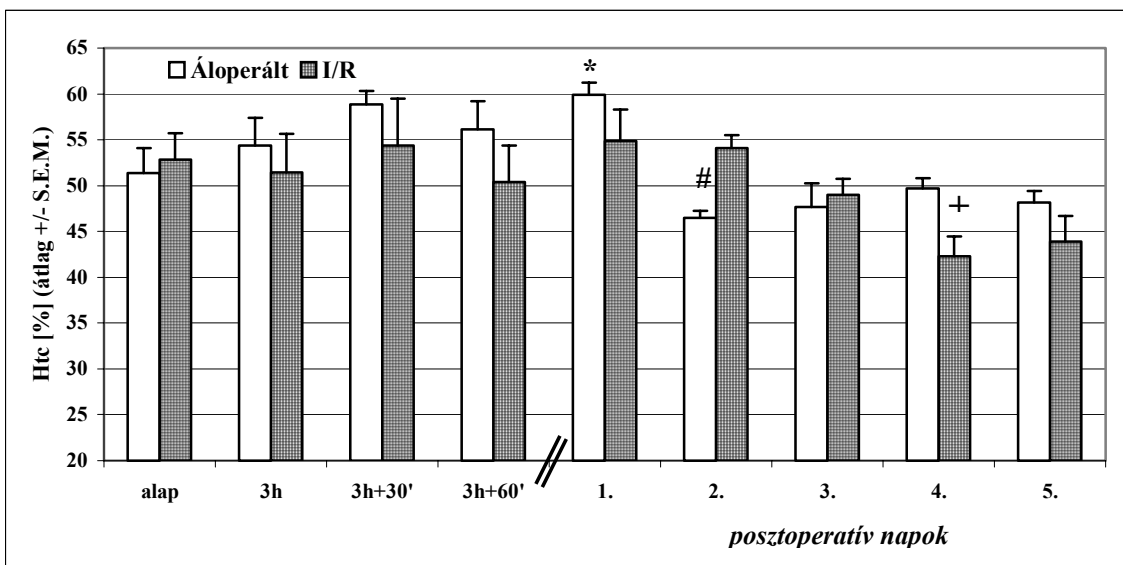
Az I/R csoportban mért fibrinogén szintek a 2-5. napon szignifikánsan magasabbak voltak a kiindulási értékekhez képest ( $p < 0,0001$ ,  $p = 0,001$ ,  $p = 0,0003$ ,  $p = 0,0011$ , egyenként),

míg az Áloperált csoport esetében ez a jelentős eltérés csak a 3. naptól volt megfigyelhető, de az 5. napig szignifikánsan magasabbnak bizonyult az alapértékekhez képest ( $p=0,0154$ ,  $p=0,0373$ ,  $p=0,0315$ , egyenként) (30. ábra).



30. ábra

A fibrinogén szint (Fbg) változása  
3 óras végtagi ischaemiát követően keverék kutyán  
\*  $p < 0,001$  vs. I/R alap, #  $p < 0,05$  vs. Áloperált alap



31. ábra

A haematocrit (Htc) változása az idő függvényében  
3 óras végtagi ischaemiát követően keverék kutyán  
\*  $p < 0,05$  vs. alap, #  $p < 0,05$  vs. 1. nap, +  $p < 0,05$  vs. 3. nap

#### **4.4.5. Haematocrit**

A haematocrit értékek mérsékelt emelkedést mutattak a műtéti időszakban mindkét csoportban, amely arányaiban a 3 órás periódust követő 30. percben (3h+30') volt a legnagyobb.

Az 1. posztoperatív napra a kiindulási állapothoz képest mindkét csoportban emelkedett haematocritot mértünk, amely az Áloperált csoportban volt a legnagyobb mértékű ( $p=0,0428$ ). A 2-5. posztoperatív napon a haematocrit értékek lecsökkentek, amely tendenciózus csökkenés az I/R csoportban lassabban manifesztálódott. A legnagyobb mértékű, szignifikáns haematocrit érték csökkenés az 1. és a 2. posztoperatív nap között az Áloperált csoportban volt megfigyelhető ( $p=0,0335$ ).

A 2- 3. posztoperatív nap között jelentős változást nem találtunk, míg a 3-4. nap között az I/R csoportban szignifikáns haematocrit csökkenés mutatkozott ( $p=0,0277$ ) (31. ábra).

#### **4.4.6. A kirekesztett vénás vér tulajdonságai az ischaemia-reperfüziós csoportban**

Az I/R csoport műtét előtt és a kirekesztett végtagból vett (vénás) vérmintáinak haemorheologiai paramétereit a VI. sz. táblázat foglalja össze.

Az RCTT, a  $90 \text{ s}^{-1}$  sebesség-gradiensnél mért teljes vér viszkozitás, valamint a haematocrit értékek a kirekesztett régióból vett mintákban mérve szignifikánsan magasabbnak bizonyultak az alapértékekhez képest ( $p=0,0011$ ,  $p=0,036$ ,  $p=0,0001$ , egyenként). A 40%-os haematocritra korrigált teljes vér viszkozitás, valamint az alacsonyabb sebesség-gradiensnél ( $10 \text{ s}^{-1}$ ) mért vérminták teljes vér viszkozitása szignifikánsan nem különbözött egymástól (adat nincs feltüntetve).

A plazma viszkozitás és a fibrinogén szint emelkedett értékeket mutattak a kirekesztett végtagból vett mintákban az alapértékekhez képest, de a különbség nem volt szignifikáns.

**VI. táblázat:** A kirekesztett végtagból vett vérminták rheológiai paramétereinek változása 3 órás végtagi ischaemiát követően keverék kutyán

	<b>alap</b>	<b>kirekesztett vér</b>	<i>p</i>
	(átlag ± S.D.)		<i>érték</i>
relative cell transit time (RCTT)	4,656 ± 0,949	9,018 ± 3,515	0,0011
teljes vér viszkozitás (TVV) 90 s <sup>-1</sup> -nál [mPas]	5,278 ± 0,837	6,766 ± 1,189	0,036
40% Htc-ra korrigált TVV [mPas]	3,753 ± 1,061	4,237 ± 0,640	n.s.
plazma viszkozitás [mPas]	1,29 ± 0,092	1,65 ± 0,331	n.s.
haematocrit [%]	52,84 ± 7,042	67,98 ± 4,4	0,0001
fibrinogén [g/l]	2,255 ± 0,387	2,825 ± 0,789	n.s.
n=5	szignifikancia szint p<0,05	Wilcoxon signed rank teszt	

Összehasonlítva ezeket az eredményeket a közvetlenül felengedés után vett szisztémás vérminták paramétereivel (32. ábra), további eltérések figyelhetőek meg:

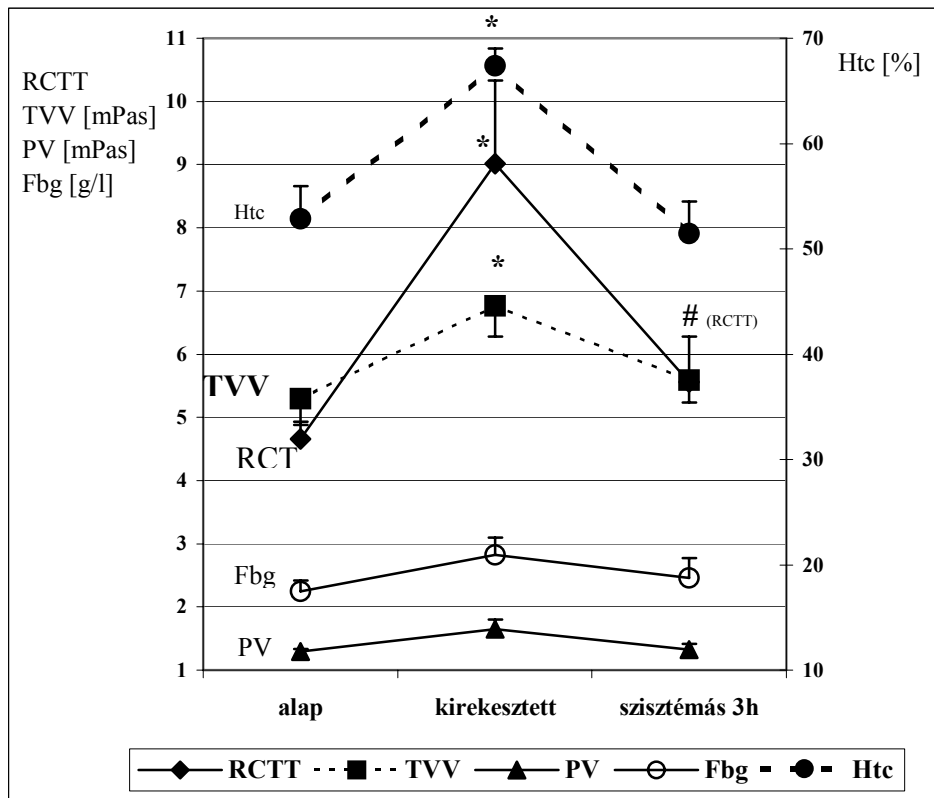
Az *RCTT* értékek a kirekesztett végtagokból vett mintákban szignifikánsabban magasabbak voltak a felengedés utáni (3h) szisztémás értékekhez viszonyítva is ( $p=0,034$ ).

A 90 s<sup>-1</sup>-nál mért teljes vér viszkozitás értékek vonatkozásában ez a különbség nem volt megfigyelhető, bár a szisztémás vérminták értékei alacsonyabbak voltak a kirekesztett minták értékeinél. A korrigált viszkozitás értékek nem mutattak jelentős eltérést.

A plazma viszkozitás változása tendenciózus jellegű volt, szignifikáns különbséget nem találtunk. A változások jól követték a teljes vér viszkozitásnál ismertetett eltéréseket.

A fibrinogén szint jelentős változást nem mutatott, bár mérsékelt emelkedés volt megfigyelhető a kirekesztett mintákban.

A haematocrit is a kirekesztett mintákban mutatott mérsékelt emelkedést.



32. ábra

A haemorheologiai paraméterek változása 3 órás végtagi ischaemiát követően a kirekesztett végtagból és a szisztémás keringésből nyert vérmintákban keverék kutyán

RCTT = relative cell transit time, TVV = teljes vér viszkozitás, PV = plazma viszkozitás, Fbg = fibrinogén szint, Htc = haematocrit

átlag ± S.E.M., \*p<0,05 vs. alap, # p<0,05 vs. kirekesztett

## 5. MEGBESZÉLÉS

### 5.1. *Haemorheologiai mérések fajspecifikus adaptációja*

Számos tanulmány foglalkozik a különböző speciestek haemorheologiai faktorainak összehasonlításával humán adatok és állatfajok (emlősök, madarak, halak, kétéltűek) vonatkozásában.<sup>10, 13, 29, 32, 60, 83, 117, 176, 177, 179</sup> A különböző állatfajokon végzett haemorheologiai mérések eredményei alátámasztják azt a megállapítást, hogy összehasonlító vizsgálatokat csak a fajspecifikus tulajdonságok, adott fajra adaptált, standardizált méréses technikai módszerek használatával lehet végezni.

A kísérletes orvostudományban leggyakrabban használt állatfajokon (egér, patkány) végzett *több napos, vagy több hetes követéses vizsgálatok* egy része is az értékes információkat nyújtó haemorheologiai faktorok vizsgálatának fontos szerepét támasztja alá.

A haemorheologiai paraméterek közül a *vörösvérsejt deformabilitás* specifikus információt ad a vörösvérsejtek mechanikai állapotáról, melyeket örökletes vagy szerzett tényezők alakíthatnak ki. A vörösvérsejt deformabilitási vizsgálatokhoz szükséges és a kis laboratóriumi állatok esetén rendelkezésre álló, lebocsátható vérmennyiség közötti incongruentia szükségessé tette az általunk használt filtrációs metodika revideálását, illetve a szükséges változtatások elvégzését.

A deformabilitás mérésre alkalmas *filtróméterek* közül Magyarországon a leginkább használatosak a Carat FT-1 és M-200 típusú filtróméterek, melyek alkalmazása centrumokhoz kötött (Pécs, Budapest, Szeged, Debrecen). A vörösvérsejt számos alkotóelemén bekövetkezett elváltozás hatással lehet az egész sejt deformabilitási képességére.<sup>156, 170</sup>

A különféle pathológiás folyamatokban számos kísérletes adat bizonyítja a vörösvérsejt deformabilitás változásának jelző értékét. Így adatok vannak a deformabilitás

megváltozásáról sepsisben,<sup>87, 132</sup> ischaemia-reperfusio okozta károsodásokban, oxidatív stresszben,<sup>34, 73, 74, 120</sup> splenectomia következményeként,<sup>14, 58, 161</sup> tumoros állapotokban,<sup>18, 37, 79</sup> valamint diabetesben,<sup>9, 141, 143</sup> cardio- és cerebrovascularis kórképekben.<sup>39, 162, 171</sup> Ezeken kívül jelentősége van gerontologiai kutatásokban is.<sup>77</sup>

Összehasonlítva számos, intézetünk kísérleteinél használt különböző állatfaj (egér, patkány, nyúl, keverék kutya, sertés) deformabilitás értékeit szembetűnő különbségeket találtunk, amelyek összefüggésbe hozhatóak a vörösvérsejtek méreteivel. Ez az összefüggés a legszembeötlőbb a sejtek átmérőjében volt.<sup>150</sup>

Az általunk, haematologiai automatával (amely impedancia elven történő sejtszeparálás alapján válogatja szét a sejteket adott mérettartomány szerint) mért átlagos vörösvérsejt térfogatok (MCV) jó megközelítéssel követték az RCTT értékeket. Ez azt sugallja, hogy a nagyobb sejt méret a deformabilitás csökkenését vonhatja maga után.

Hasonló következtetésre jutott Katyukhin és munkacsoportja 1998-ban, akik több emlősfaj vérsejtjeinek méreteit, deformabilitását,  $Ca^{2+}$ - és  $Na^+/K^+$ -ATP-áz aktivitását hasonlították össze.<sup>83</sup> Chen és munkatársai 1994-ben egér, patkány és ember viszonylatában az MCV értékek között szignifikáns különbséget találtak (egér < patkány < ember), ami korrelációba vonható a haemodynamikai jellemzőkkel is, mint a vörösvérsejt áramlási sebességgel.<sup>29</sup>

Méréseink során sertésben alacsonyabb MVC értékeket találtunk, mint amit az RCTT értékek alapján várhattunk volna. Erre magyarázatot nem találtunk. Az állatok vörösvérsejtszáma nem volt alacsony, általános állapotuk jó volt, anaemiára utaló jelek nem voltak, így okként feltételezhetjük a Durok/Cornwall fajta juvenilis adottságait.

A vörösvérsejtek deformabilitásának meghatározó tényezői közé tartoznak a felület/térfogat arány és morfológiai jellemzők is, így valószínűsíthető, hogy ezeken a faktorok belül is több tényező együttesen határozza meg a fajspecifikus deformabilitási adottságokat.

A Carat FT-1 filtrométerünkben 5 µm átmérőjű pórusokat tartalmazó szűrőmembránt használtunk. Baskurt hasonló elvű eljárás szerint végzett vizsgálatai is azt támasztják alá, hogy a vörösvérsejtek deformabilitási tulajdonságai döntően a sejtek méretével korrelálnak.<sup>13</sup> Vizsgálatait Cell Transit Analyzer-en (CTA) végezte, amely szintén filtrációs technikát alkalmaz 5 µm átmérőjű pórusokat tartalmazó filteren keresztül. Jelen munkában alkalmazott filtrométer és más, filtrációs elven működő eszköz számára nemcsak 5 µm-es, hanem 3, illetve 8 µm átmérőjű pórusokat tartalmazó filterek is forgalomban vannak, utóbbiak által kiszélesítve a palettát a fehérvérsejtek deformálhatóságának vizsgálatára is.<sup>118</sup> A 3 µm-os filterek lehetővé teszik a kisállatok vérének más standardokhoz viszonyított deformabilitási vizsgálatait, bár a mérőmódszer szenzitivitása erőteljesen változhat a sejt-/pórusméret arány következtében.<sup>11</sup> Ezirányú vizsgálataink folyamatban vannak.

*A teljes vér és plazma viszkozitás* eredményeket összehasonlítva szintén különbségeket találtunk a vizsgált fajok között.

A legszembetűnőbb eltérést a patkányban mért teljes vér viszkozitás jelentette, amely rendkívül magasnak bizonyult, és a 40%-os haematocritra való korrekció után is megmaradt. A plazma viszkozitásuk nem tért el jelentősen a többi fajétól, a mérések során a küszöbfeszültség nem esett hibatartományba (15-20 mPa fölé), így valószínűsíthető, hogy egyéb faktorok alakíthatták így a képet, pl. aggregatumok, illetve a fibrinogén molekulák és a vörösvérsejtek egymás közötti kölcsönhatásának faji jellegzetessége.

Baskurt és munkacsoportja a fajok közötti vörösvérsejt aggregációs különbségeket vizsgálva szignifikáns eltéréseket talált (nyúl~tengerimalac<patkány<ember<ló).<sup>10</sup> Ez azonban nem feltétlenül vonja maga után a teljes vér viszkozitás növekedését, hiszen az aggregációs folyamatok meghatározott körülmények között következnek be (sebesség-gradiens, fibrinogén, haematocrit függő).

Vizsgálataink tájékozódó jellegét erősíti az egyes fajok esetén különböző helyről történt vérvétel módja, mely az adott kísérleti protokoll függvénye volt.

A faji különbségek összehasonlítása után *adott fajon* belül kívántuk a megfelelő *módszertani adaptációt* elvégezni. Az eredetileg használt metodikai leírás szerint meghatározott vérmennyiség biztosítása kis laboratóriumi állatoknál (egér, patkány) komoly nehézségekbe ütközik, patkányok esetén is ekkora mennyiségű (2-2,5 ml) vér vétele csak egyszeri alkalommal lehetséges állatkíméleti szempontból. A patkányok vérmennyisége 5,5-6,5 ml/100g-ra tehető,<sup>46</sup> az egy alkalommal maximálisan lebocsátható, az állat életét közvetlenül még nem fenyegető mennyiségű vér közepsúlyú (250-350 g-os) állatok esetén 2,5-3 ml.<sup>99</sup> Így a vizsgálatokhoz egy alkalommal szükséges, az eredeti metodika szerint meghatározott mennyiség is komoly vérveszteségnek tekinthető patkány esetében.

*A több napos követéses vizsgálatok* szükségessége magában foglalja a gyakoribb, akár naponkénti vérvételek igényét is. Előkísérletünk során 1 hetes időkülönbséggel 2-2,5 ml vért vettünk patkányoktól és a mintákból készített 5%-os szuszpenzióból meghatároztuk a deformabilitási paramétereket. A vizsgálat során a haematologiai paraméterek jelentős eltérést nem mutattak, az RCTT értékek azonban szignifikánsan alacsonyabban voltak, azaz a vörösvérsejtek deformabilitása lényegesen jobb volt. Az 1 hetes periódust túléltek az állatok, a haematologiai restitúcióhoz a 7 nap elegendőnek tűnik. A 2-2,5 ml vér vétele egy haemopoieticus indukciót jelenthetett, mely következtében a keringésben nagyobb számú, fiatal, jó mechanikai tulajdonságokkal rendelkező vörösvérsejt jelenhetett meg. Ez magyarázhatja a javuló deformabilitási paramétereket a 7. napi mintákban.

Ezek a megfigyelések több következtetés vonnak maguk után. Követéses vizsgálatot a standard metodikai leírás szerint meghatározott vérmennyiséggel patkányban nem lehet végezni, még akkor sem, ha az adott kísérlet során a vérvételek 1 hetes időintervallumban követik egymást. A javuló RCTT értékek a tervezett kísérletekben álnegatív eredményeket

adhatnak. Ehhez a megállapításhoz figyelembe kell venni azt is, hogy állatkíméleti szempontból több héten keresztül húzódó vizsgálatokat nem végeztünk. Követéses vizsgálatok, és kifejezetten az ischaemia-reperfúzióval összefüggő kísérletek során igény lenne a naponkénti vizsgálatokra is, ezért a laboratóriumi tesztek céljából lebocsátott vérmennyiség csökkentése elengedhetetlen. A vörösvérsejt deformabilitás metodikája teoretikusan lehetővé teszi a szükséges vérmennyiség csökkentését abban az esetben, ha a szuszpenziót 5%-nál kevesebb haematocritúra, akár 1%-osra hígítjuk. Ez azonban nehézségeket idézhet elő a mérésekben. Megváltozott fizikai viselkedést feltételezhetünk a filtrométerben mozgó sejtsuszpenzió és a filter viszonylatában, hiszen körülbelül 80%-kal kisebb koncentrációjú sejtsuszpenzió halad át a pórusokon, mint az eredeti leírásnak megfelelően. 10%-os haematocrit alatt a vörösvérsejt-suszpenzió newtoni tulajdonságot mutat.<sup>21</sup> A fehérvérsejtek pórusblokkoló részecskéként viselkednek, egy vörösvérsejthez képest 200-1000-szeres áramlásslassulást okoznak,<sup>31</sup> valamint nem elhanyagolható a vörösvérsejtek pórusokon belüli interakciója sem. Ismert, hogy 10-30% közötti sejtsuszpenzió haematocrit növekedés az RCTT értékek emelkedését vonja maga után.<sup>21</sup> Feltételezhető, hogy az 5%-nál alacsonyabb haematocritú szuszpenzióknál kevesebb pórusokon belüli interakcióra és pórusblokkoló részecskére (pl. fehérvérsejt) lehet számítani.

Kísérleteink egyik szakaszában vörösvérsejt-suszpenzióból hígítási sort készítettünk, hogy megvizsgáljuk a szuszpenzióban mért RCTT értékeket a haematocrit függvényében 1-5%-ig. Az általunk vizsgált tartományban csökkenő tendenciát találtunk az RCTT értékekben az 1%-os szuszpenzió irányába. Az összefüggés közel lineáris volt. A kapott szignifikáns különbségek azt sugallják, hogy a különböző haematocritú szuszpenzióknál mért értékeket nem lehet együtt kezelni, ám a következőket azonos koncentrációjú szuszpenzióknál mért eredményeknél erre lehetőség van.

Munkánk eredményeként tehát *lehetőségünk nyílt 1%-os vörösvérsejt-szuszpenzió használatával meghatározni a vörösvérsejt deformabilitási paramétereiket, amelyhez 0,5-0,6 ml vér vétele elegendő lehet. Így patkányban alkalmassá válik a módszer a filtrométerrel történő vörösvérsejt deformabilitási követéses vizsgálatok elvégzésére*, amelyre az irodalomban nem találtunk példát. Megjegyeznénk, hogy ezzel a beállítással egerekben is tudjuk vizsgálni a vörösvérsejt deformabilitást, azonban a kicsiny testtömegük miatt követéses, több vérvételt igénylő vizsgálatot végezni nem tudunk.

E módszertani résznél kell megemlíteni a vörösvérsejt deformabilitási mérések körülményeit. A filtrációs mérések pontosságát nagyban befolyásolja a mérési környezet hőmérséklete. A hőmérséklet emelésével 5-45 °C között a vörösvérsejtek szűrhetősége javul, 45 °C felett viszont nehezen filtrálhatóvá válik.<sup>49</sup> A módszertani ajánlások szerint elegendő az állandó szobahőmérséklet biztosítása ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ).<sup>158</sup>

A vörösvérsejtek környezetének pH-ja és ozmotikus nyomása is befolyásolja szűrhetőségüket. A 7,4-es pH-tól illetve a 295 mOsm/l-es optimumtól bármilyen irányba való eltérés csökkentheti a vörösvérsejtek deformabilitását.<sup>180</sup> Az intracellularis ATP tartalom csökkenése a sejt volumen dinamikus szabályozási folyamatainak hanyatlása miatt vezethet a csökkent deformabilitáshoz.<sup>180</sup> A vérvétel után a vörösvérsejtek energiatartalékai ütemes fogyatkozást mutatnak, kiváltképpen, ha eredeti környezetüktől megfosztva, például PBS-sel készített szuszpenzióként tároljuk őket. Így ajánlott a vérlebocsátás után a vizsgálatokat 120 percen belül elvégezni.<sup>158</sup> Elterjedt a glükózt is tartalmazó PBS oldat alkalmazása, amely megnöveli a mintavétel és a mérés közötti megengedhető időintervallumot.

Az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak alapján minden mérésnél *biztosítottuk a standard metodikai előírás szerinti mérési környezetet és feltételeket*, a vérvételtől a minták tárolásán és előkészítésén keresztül a filtrométeren való mérésig.

Összefoglalva, (I) a haemorheológiai paraméterek fajspecifikus különbségeket mutatnak. A filtrométerrel történő vörösvérsejt deformabilitás mérés alkalmas az erythrocytákat ért hatások tanulmányozására. (II) Az általunk eszközölt mérési beállításokkal lehetőség nyílt ezen készülékkel a változások követéses vizsgálatára patkányban.

## **5.2. Végtagi ischaemia-reperfusio haemorheológiai vizsgálata patkányban**

Az 1%-os deformabilitás mérési beállítást használtuk 1 hetes követéses vizsgálatban patkány hátsó végtagi ischaemia-reperfusio vonatkozásában. A metodikai eljárás kivitelezhető volt, bár a naponkénti vérvételek hatására a haematológiai paraméterek mérsékelt tendenciát mutattak az anaemia felé.

A rövid időtartamú, 1 órás ischaemia és az azt követő reperfusio jól kimutatható változásokat eredményezett a vörösvérsejtek deformabilitásában –valószínűleg a szabadgyökök károsító hatásának tudható be– amely allopurinol előkezeléssel kivédhető volt. Ahogy az áttekintő fejezetben említésre került, a szabadgyökök, főként a reaktív oxigén intermedierek (ROI) különböző mechanizmusokkal károsíthatják a vörösvérsejteket, azok rigiditását, pusztulását okozva.

McCord szerint a toxikus oxigén metabolitok legnagyobb részben a korábban ischaemiás szövetek reperfusiójakor keletkeznek. Feltételezte, hogy ezek a metabolitok xantin-oxidáz(XO)-dependens folyamatok során szabadulnak fel. A teória szerint az ischaemia a sejtek ATP tartalmának csökkenését okozza, amely a hipoxantin-xantin, xantin-húgysav átalakuláson megy keresztül, amelyet a XO katalizál. Normális körülmények között a szövetekben az enzim közel 90%-a xantin-dehidrogenáz (XD) formájában van jelen. Az ischaemia alatt a XD XO-zá konvertálódik, amely a reperfusio során megjelenő oxigént használja elektron-akceptorként, és szuperoxid aniont generál (2. ábra). A XD/XO konverzió kalcium és proteáz-dependens folyamat.<sup>105</sup> Az ischaemia-reperfusio során a XO működése

mellett<sup>107, 147</sup> szuperoxid gyökök keletkeznek a megzavart működésű nitrogén-oxid-szintáz,<sup>76</sup> aktivált neutrophilek,<sup>181</sup> valamint a mitochondrialis elektrontranszport-lánc, és az arachidonsav metabolizmus által is.<sup>61</sup> Továbbá Vega és munkatársai kimutatták, hogy az ischaemiás (5h) izomszövetből felszabadult és vérkeringésbe került XO-t a máj felveszi, ahol hatással van a Kupffer-sejtek és polymorphonuclearis neutrophilek aktivációjára, így közvetetten részt vehet a végtagi reperfúziót esetenként követő multiple organ failure kialakításában.<sup>178</sup>

Az allopurinol (tautomerikus keveréke az 1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-olnak és az 1,5-dihidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-onnak) inhibitora a xantin-oxidáz enzimnek, amely blokkolásán keresztül csökkenti a szuperoxid gyökök keletkezésének mértékét. A szabadgyök képződés csökkentésének képessége alapján az allopurinol alkotóeleme a transzplantációra szánt szervek prezervációjához használt University of Wisconsin (UW) oldatnak.<sup>151, 173</sup> Az allopurinol fehér por, amely vízben gyengén, kálium-, vagy nátrium-hidroxidot tartalmazó oldatokban azonban jól oldódik. Kísérletünkben az allopurinolt folyamatos keverés és enyhe melegítés mellett fiziológiás sóoldattal elegyítettük, vállalva a lehetséges nem oldott allopurinol jelenlétét is. Ezt az elegyet intraperitonealisan alkalmaztuk 50 mg/kg dózisban, amely ebben a beadási módban és mennyiségben számos irodalmi adattal alátámasztható.<sup>3, 65, 134, 165</sup> Az intraperitonealisan alkalmazott allopurinol hatással lehet a neutrophilek mobilizációjára, amely a XO inhibícióból következő csökkent szabadgyök képződésre vezethető vissza.<sup>35</sup>

A fiziológiás sóoldatban való alkalmazás mellett szól, hogy el akartuk kerülni a fölösleges, sav-bázis egyensúlyt érintő hatást, amelyet a lúgos allopurinol oldat jelentett volna, és ami tovább befolyásolhatná a vörösvérsejt deformabilitást, hiszen a pH fiziológiás értéktől való bármilyen irányú változása hatással van a vörösvérsejtek flexibilitására.<sup>94, 144, 180</sup> Az elkészített allopurinolt tartalmazó folyadék optimális turbiditásnál mért pH-ja 6,9 volt. Az

allopurinol előkezelést fél órával az ischaemiás inzultus előtt alkalmaztuk. Az allopurinol plazma felezési ideje 1-2 óra, míg fő metabolitja, az oxipurinol (alloxantin) – amely szintén XO gátló tulajdonságú – plazma felezési ideje 15 órára tehető. Következésképpen a XO inhibíció hatékony lehetett az ischaemiás inzultust követő reperfusio alatt, közel egy napig.

Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az ischaemia-reperfusio által okozott vörösvérsejt deformabilitást allopurinollal mérsékelni tudtuk. A szabadgyökök vörösvérsejten belüli (pl. XO), illetve kívüli (fehérvérsejtek) forrásától függően a ROI-ek eltérően módosíthatják az erythrocyták rheológiáját, a deformabilitás változáson, illetve az aggregatio befolyásolásán keresztül,<sup>12</sup> de nem elhanyagolható a nitrogén-oxid, illetve annak toxikus ROI-ekkel képzett származékainak hatása sem.<sup>22</sup>

A posztoperatív periódusban *a fehérvérsejtszám* változása nem volt karakterisztikus, sem szignifikáns. A fehérvérsejtek szerepe az ischaemia-reperfusio pathogenesisében jól ismert.<sup>7, 116</sup> A méréseink során felmerülhetett egy probléma, ami a rágcsálók vérének apertura-impedancia elven működő haematologiai automatával (mint az általunk használt Sysmex F-800 is) történő vizsgálatánál jelentkezhett, amely a fehérvérsejtek quantitativ és qualitativ paramétereinek szórásában és variabilitásában nyilvánul meg.<sup>115</sup> A 2. posztoperatív napot követően az ischaemia-reperfusiós és a kontroll csoport egymáshoz hasonló változásokat mutatott, a fehérvérsejtszám csökkent, míg az áloperált csoportban növekedést találtunk, amit az allopurinollal előkezelt ischaemia-reperfusiós csoport hasonló tendenciával követett a 4. napig. Ezt követően ez utóbbi csoportban is fehérvérsejtszám csökkenést találtunk. Ezek az eredmények sugallhatják a fehérvérsejtek eltérő distribúcióját az ischaemiás szövetben.

A sebészeti beavatkozások utáni reakciók hasonlatosak lehetnek az akut fázis történésekhez, amelyben fehérvérsejtszám emelkedés figyelhető meg.<sup>91</sup> A kontroll állatok esetén a sebészi trauma minimális volt, amit az eredményeink is tükröznek. Az ischaemiás

csoporthoz meghatározó volt a beavatkozások által okozott traumatizáció, továbbá az ischaemia által érintett szövet reperfüziójakor a leukocyták adherentiája, migrációja figyelhető meg,<sup>116</sup> mely mértékétől függően befolyásolhatja fehérvérsejtek keringésben való megoszlását. Az áloperált csoportban bőrmetszés, az erek preparálása és a műtéti terület 1 órányi időtartamra nyitottan hagyott állapotát követő sebzés történt, míg az allopurinollal előkezelt csoportban hasonló beavatkozást végeztünk, mint az ischaemia-reperfüziós csoportban. Rác és munkatársai szintén rövid időtartamú végtagi vázizom ischaemiát vizsgáltak. Azt találták, hogy az 1 és 2 órás ischaemiát követő korai reperfüziós időszakban a granulocyták endotheliumhoz történő nagy számban való kitapadása zajlik.<sup>133</sup> Dammers és munkatársai patkányban 1, illetve 2 órás végtag ischaemiát követő reperfüzió alatt a bőr vénuláiban szignifikáns mértékű leukocytá rolling és adhering jelenséget figyeltek meg intravitális video-mikroszkópiával, míg az izomban ez a szignifikáns változás nem volt kimutatható. A hisztológiai vizsgálat a myocyták duzzadását és a szárazanyag tartalom megváltozását mutatta ki.<sup>40</sup>

*A thrombocytaszám* minden csoportban emelkedett, de az ischaemia-reperfüziós csoportok (I/R, AP+I/R) szignifikánsan magasabb értékeket mutattak a 7. posztoperatív napon, a kontroll értékekkel összehasonlítva. A thrombocytaszám emelkedés részét képezheti a sebészi-traumát követő akut fázis történéseknek, mint a megemelkedett fehérvérsejtszám, fibrinogén és globulin szint, a csökkenő vörösvérsejtszám, vagy éppen haemoconcentratio.<sup>91</sup> Nem zárható ki a naponkénti, perifériás vérvételek befolyásoló hatása sem. Ismert, hogy ischaemiát követően szignifikáns interakció figyelhető meg a thrombocyták és az endothelium között, amely ischaemia indukálta expresszióból származó P-selectinek által regulált.<sup>119</sup>

Kísérleteinkben további érdekes megfigyelés volt az *átlagos thrombocytá térfogat (MPV)* növekedése (szignifikáns a 2. posztoperatív napon volt), majd csökkenése az ischaemia-reperfüziós csoportban, míg a többi csoportban a thrombocytaszám emelkedésével

egy időben MPV csökkenés volt megfigyelhető. 1974-ben írták le először a thrombocytaszám és térfogat inverz viszonyát,<sup>121</sup> azt sugallva, hogy szorzatuk, az ún. „platelet mass” (thrombocytaszám x MPV) közel állandó.<sup>166</sup> Adataink összességében a „platelet mass” növekedését mutatták minden csoportban, de legkifejezettebben az ischaemia-reperfúziós csoportban. A thrombocyták átlagos élettideje 8 napra tehető. Kísérletünkben az MPV emelkedés az ischaemiás hatást követő első 48 órában jelentkezett, reprezentálva az inzultus előtt már keringésben lévő, és az esetleg újonnan keringésbe kerülő (*de novo* szintézisből, vagy storage pool-okból) thrombocytákat. Általánosan elfogadott, hogy a thrombocytá méret és denzitás a thrombopoiesis által determinált, és a már keringésben lévő thrombocyták méretben jelentősen nem változnak.<sup>100, 167</sup> A megnövekedett megakaryocytá méret és ploiditás együtt jár az MPV növekedésével.<sup>17</sup> Az MPV növekedését írták le akut myocardialis infarctusban,<sup>27, 172</sup> akut cerebralis ischaemiában és TIA-ban is.<sup>44, 122, 168</sup>

A nagyobb thrombocyták aktívabbak, több prothromboticus faktort termelnek és könnyebben aggregálódnak.<sup>69, 101</sup> Kiemelhető továbbá, hogy az aktivált thrombocytákból felszabaduló ágensek csökkenthetik a vörösvérsejtek deformabilitását.<sup>125</sup>

### **5.3. Végtagi ischaemia-reperfusio microcirculatiós vizsgálata patkányban**

A szöveti microcirculatio számos módszerrel vizsgálható, melyek egy része költséges és bonyolult eljárás, illetve bizonyos fokú invazivitást igényel.<sup>174</sup> A laser Doppleres vizsgálatok igen elterjedtek az experimentumban és a klinikumban is, azonban a módszer alkalmazása standardizációs és összehasonlíthatósági problémái miatt a kiértékelések során eltérő nézeteket szülhet. Korábbi, más kísérleti méréseink során (adatok nincsenek feltüntetve) az eltérő műtéti körülmények, valamint a más-más állatfajokon való munka ezeket a nehézségeket alátámasztja.

A vizsgálatok során rögzített laser Doppler jel analízise több információt adhat, mint az áramlási relatív egységek (pl. blood flow unit, BFU; blood perfusion unit, BPU) számszerű értékelése. A frekvencia, a jelátlag és a hullámforma-analízis<sup>149, 152, 160</sup> segíthet különbséget tenni például az arteriális és venás congestio között, információt adhat a vasomotióról,<sup>187</sup> indirekt módon a capillarisok állapotáról, vagy segíthet akár a „slow-reflow”, illetve „no-reflow” területek feltérképezésében is.<sup>5, 110, 111, 131</sup>

A laser Doppleres vizsgálatok során elengedhetetlen a megfelelő stabil mérési körülmények, az optimális mérési geometria megteremtése, hogy minimalizálni lehessen a légző-, vagy izommozgás által okozott artefactumok lehetőségét.

A laser Doppler mérőfej rögzítésének nehézségét számos módon próbálták megoldani, beleértve a sebészi varratok,<sup>92</sup> szövetragasztók,<sup>78</sup> sztereotaktikus pozicionáló,<sup>45</sup> speciális mérőfej tartó,<sup>2</sup> ellensúlyos kar,<sup>123</sup> latex rögzítő,<sup>182</sup> valamint speciális, hőkontrollált optikus rögzítő egység használatát.<sup>128</sup> Kísérleteinkben a műtőasztal oldalához stabilan illeszkedő rögzítő állványt használtunk, ami a vizsgálandó területnek megfelelően került beállításra.

A laser Doppleres áramlásmérés hatékonysága erősen függ a vizsgált szövet anatómiai sajátosságaitól, microvascularis architektúrájától. Az „occlusiós”-tesztjeink során méréseinket érközelben végeztük a m. quadriceps femoris medialis vastusán.

Az általunk kifejlesztett „occlusiós”-teszt *előnye* az egyszerűség, a gyors kivitelezhetőség, illetve az ismételhetőség, melyet adataink kismértékű szórása is bizonyít. E módszer szerint a kapott adatok függetleníthetők a kiindulási és végponti relatív áramlási egységektől (BFU, BPU), amelyeket a módszer ismertetésekor említett nagyszámú tényező befolyásolhat.

Módszerünknek néhány *hátránya* van. A mérések során az arteria és a vena saphena közelsége zavarhatja a microcirculatio korrekt elemzését. Továbbá, maga a pentobarbitállal végzett anaesthesia is hatással lehet a microcirculatióra arteriovenosus shunt-ök megnyitása

által, ami a funkcionális capillaris denzitás és a szöveti oxigenizáció csökkenését eredményezheti.<sup>57</sup> Ráadásul a preparálás során fellépő légyszövet-trauma hatása sem zárható ki.<sup>185</sup> A standard, azonos körülmények között végzett mérések során nyert adatok összehasonlító elemzése azonban véleményünk szerint elvégezhető.

Kísérletünkben 1 óra időtartamú ischaemia okozta mikrokeringési változásokat sikerült kimutatnunk. Az „occlusiós”-teszt során rögzített áramlási görbe leszálló szakasza szignifikánsabban rövidebbnek, a felszálló szakasza szignifikánsabban hosszabbnak bizonyult a normál viszonyokhoz hasonlítva, a D/A index értékei 1,00 alá estek (D/Ai – shift). Ez azt sugallja, hogy ischaemiás behatást követően a reperfusio első perceiben a keringés könnyebben áll le, illetve nehezebben indul újra „occlusiós”-tesztjeink során. Ennek magyarázata lehet a capillarisok funkcionális állapotának változása mellett a microvascularis haematocrit eloszlási különbségei, illetve a csökkent vörösvérsejt deformabilitás.<sup>109</sup>

Adataink azt mutatják, hogy az 1 órás ischaemia kóros irányban befolyásolta a microcirculatiót a vizsgált izomszövetben, habár ez a viszonylag rövid időtartamú ischaemia nem feltétlenül okoz olyan sok karakterisztikus változást, mint amelyek a hosszabb időtartamú ischaemia következményei lehetnek.<sup>116</sup> Ugyanakkor számos tanulmány a rövid időtartamú, 1 órás ischaemia károsító effektusát is bizonyítja,<sup>40, 133</sup> sőt, adatok vannak sokkal rövidebb idejű, 10, 15, 30 perces időtartamú ischaemiás folyamatok károsító hatására is.<sup>23, 84</sup> Figyelembe kell venni azonban azt a tényt, hogy az időfaktorral való körültekintő bánásmód biztosítéka lehet a sikeres sebészi beavatkozásoknak.

A reperfusio ideje alatt történő laser Doppleres mérések (pl. az „occlusiós”-teszt alkalmazásával) időbeni kiterjesztése, a microcirculatiós változások hosszabb távú követéses vizsgálata indokolt lehet a jövőben. Azonban a feltárt szöveti felszín száradása, hőmérsékletének csökkenése időben gátat szabhat ennek, továbbá nem elhanyagolható

magának a laser-sugárnak az energiatartalma sem (0,5 mW), amely hosszabb idejű, folyamatos alkalmazáskor befolyásolhatja a capillarisok állapotát.

A microcirculációs vizsgálatok fejlődése, a kutatásban való kiemelt szerepe és kiterjedt alkalmazása megkívánja az egyes módszerek közötti összehasonlító vizsgálatokat, illetve több eljárás együttes alkalmazását.

Több kutató egyszerre több microcirculációs mérési módszert használ az összehasonlítóbb következtetések levonása érdekében.<sup>59, 96, 108, 175</sup> Elterjedtek továbbá a két-, vagy többcsatornás laser Doppler készülékek, melyek hatékonysága jobbnak tűnik az egy-csatornás változatnál, főként, ha azok hőkontrollált mérések kivitelezésére alkalmasak.<sup>148</sup>

*A bemutatott módszerünk alkalmas lehet a jövőben a különböző sebészeti beavatkozások microcirculációs hatásának gyors, intraoperatív elemzésére, amelynek nagy jelentősége lehet a szövetátültetéseknél – például a szabadlebenyek alkalmazásánál –, kiegészítő információt nyújtva, és ezáltal is növelve a sebészi biztonságot.*

Eredményeink még előzetesek, kezdeti sikereink, továbbá a mérés biztonságának megteremtése és további matematikai analízise (pl. az adatok Fourier-transzformációja) indokolja ezirányú vizsgálataink folytatását.

#### ***5.4. Prolongált végtagi ischaemia-reperfusio haemorheológiai vizsgálata keverék kutyán***

A végtagi ischaemia következtében az érintet régió szövein kívül, távoli szervek, szövetek is károsodást szenvedhetnek, mely károsodások reperfusiókor, illetve azt követően jöhetnek létre.<sup>1</sup>

Az első közlemény, amely azt sugallta, hogy az akut veseelégtelenség megjelenése összefüggésben lehet az ischaemiásan károsodott végtag sikeres revascularisatiójával, 1960-ban Haimovici által került lejegyzésre.<sup>66</sup> Felismerésre került azonban, hogy ez a reperfuzió

károsodás hasonló (egyazon) jelenség, mint a Bywaters és Beall által 1941-ben leírt „crush”-szindróma.<sup>26</sup>

Az akut ischaemiának kitett végtag reperfúziója strukturális és funkcionális változásokat idézhet elő a gastrointestinalis traktusban is, megváltoztatva a vékonybél fal permeabilitását.<sup>186</sup>

Ezekben a folyamatokban a haemorheológiai faktoroknak is szerepük lehet,<sup>98</sup> egész testet érintő hatásuk miatt, főként, ha a kirekesztett régióból felszabaduló vér tulajdonságaira gondolunk,<sup>56, 88, 97</sup> továbbá döntő szerepe van az ischaemiás elváltozást megelőzően a vér haemorheológiai állapotának is.<sup>103</sup>

Kísérletünkben a 3 órás végtagi ischaemia haemorheológiai faktorokra kifejtett hatását vizsgáltuk. Elemeztük a *vörösvérsejt deformabilitási* paramétereket, a *teljes vér és plazma viszkozitást*, a *fibrinogén szint-* és a *haematocrit* változását mind a szisztémás vérminták, mind a lokálisan vett vérminták vizsgálatával.

Szignifikáns vörösvérsejt deformabilitás romlást találtunk az ischaemiát követő korai posztoperatív periódusban (2-3. nap). A  $90 \text{ s}^{-1}$  sebesség-gradiensnél mért teljes vér viszkozitás az 1. posztoperatív napra emelkedett meg, az alacsonyabb sebesség-gradiensnél ( $10 \text{ s}^{-1}$ ) mért teljes vér viszkozitás emelkedés a 2-3. posztoperatív napon is mutatkozott. A haematocrit az 1. posztoperatív napon mutatott emelkedése után lecsökkent, a fibrinogén szint az 1-2. napon nagymértékű emelkedést mutatott, mely magasabb értékek az 5. posztoperatív napig megfigyelhetőek voltak. Ez utóbbi változásokat jól követte a plazma viszkozitás emelkedése.

A *vörösvérsejt deformabilitás* romlása a korai posztoperatív időszakban a korábban bemutatott patkány végtagi ischaemia-reperfúziós modellünk eredményeihez hasonlóan alakult, ahol az RCTT értékek nagymértékű emelkedését az 1-2. napon mutattuk ki. Feltételezhetően a szabadgyökök károsító hatása következtében válhattak rigidebbé a vörösvérsejtek (5.3. fejezet).

A teljes vér viszkozitás 1. posztoperatív napon megfigyelt emelkedése összefüggésbe hozható a *haematocrit* növekedésével – amelyet az általános műtéti megterhelés is okozhatott, hiszen mind az áloperált, mind az ischaemia-reperfúziós csoportban megfigyelhető volt –, az 1. nap után talált viszkozitás csökkenés az egy időben mért alacsonyabb haematocrittal. Ezért van nagy jelentősége a haematocritra való korrekciónak,<sup>104</sup> hiszen a Htc-on kívül számos más paraméter is meghatározza a teljes vér viszkozitást (1. ábra). A 40%-os Htc-ra való korrekció után a teljes vér viszkozitás a posztoperatív periódusban közel állandónak bizonyult, enyhe emelkedést mutatva, amely szignifikánsan magasabb értékeket eredményezett az ischaemia-reperfúziós csoportban az 5. posztoperatív napra.

További figyelemre méltó adat az alacsonyabb sebesség-gradiensnél mért viszkozitás értékek változása. A 2-3. napon az ischaemia-reperfúziós csoportban találtunk szignifikánsan magasabb értékeket. Ismert, hogy alacsony sebesség-gradiensnél a vörösvérsejtek aggregációja a teljes vér viszkozitás meghatározó elemmé válik.

Az általunk használt viszkoziméter a mérések során a  $10 \text{ s}^{-1}$  sebesség-gradienst határozza meg, illetve dokumentálja legalacsonyabb értéként, de a keringési rendszer paramétereit figyelembe véve ez nem tekinthető elég alacsonynak az aggregációra való következtetéshez. Ezek alapján a  $10 \text{ s}^{-1}$ -nél mért adatok kizárólag kiegészítő információként értékelhetőek.

A haemoconcentratio, a teljes vér és *plazma viszkozitás*, valamint a *fibrinogén szint növekedése* a fehérvérsejt- és thrombocytaszám változásaival együtt a sebészi beavatkozás következménye lehet.<sup>91</sup> Ezek a változások összességében a nagyobb megterhelést jelentő, összetett pathomechanizmusú ischaemia-reperfúziós károsodás során, illetve azt követően voltak nagyobbak.

A 3 óra időtartamra *kirekesztett végtagból vett lokális vérminták* rheológiai paraméterei a kiindulási értékhez képest a vörösvérsejt deformabilitás, a teljes vér viszkozitás és a haematocrit tekintetében voltak szignifikánsabban magasabbak.

A közvetlenül a leszorított erek felengedése után vett *szisztémás vérmintákban* ezek a változások mérséklődtek.

Az ischaemia ideje alatt az érpályában lévő vér összetétele változhat. A stasis során megnövekedhet a haematocrit, a folyadékterek átrendeződése – a megnövekedett plazmafehérje koncentráció emelheti a plazmaviszkozitást –, a vörösvérsejtek térfogat- és deformabilitás változása, aggregációja következtében emelkedhet a vérviszkozitás. Kayar és munkatársai patkánykísérletükben kimutatták, hogy közvetlenül 10 perces végtagi ischaemia után az érintett végtag vena femoralisából vett vérminták vörösvérsejt deformabilitási értékei szignifikánsan romlottak,<sup>84</sup> majd 15 perc reperfuziót követően ez már nem volt megfigyelhető. A kirekesztett végtagban lezajló anaerob folyamatok a vér összetételét, pH-ját megváltoztathatják, ami befolyásolja a vörösvérsejtek deformabilitását.<sup>25, 180</sup> Az ATP cellularis depléciója erősen összefügg az ischaemiás folyamat irreverzibilitásával,<sup>24</sup> a kísérleti modellünkben is alkalmazott 3 óra időtartamú ischaemia hatással lehet a mitochondriumok működésére, az ATP- és a foszfo kreatin-szint csökkenését eredményezheti.<sup>68, 136</sup> A vörösvérsejtekben az ischaemia során nagymértékben csökken az ATP tartalom, így energiadepléciós állapotba kerülnek. A kation-gradiens, és következésképpen a sejt volumen fenntartása energiaigényes folyamat, a csökkent energiatartalmú sejtek nehezen, vagy egyáltalán nem képesek fenntartani volumenüket, a sejt felület/térfogat aránya megváltozik, így deformabilitásuk csökken.<sup>20, 170</sup>

A prolongált ischaemiás modellben vizsgált számos paraméterek közül itt csak két kiemelt csoport (nem-hűtött áloperált és I/R) haemorheologiai paraméterei kerültek elemzésre, kizárólag a végtagi normothermiás ischaemia hatásainak tanulmányozására.

Meg kell említeni, hogy a többi vizsgált paraméter közül az átlagos vörösvérsejt térfogat és haemoglobin tartalom, a thrombocytaszám és az átlagos thrombocyta térfogat nem mutatott szignifikáns eltéréseket, szemben a korábban bemutatott patkány végtagi ischaemia-

reperfüziós modellel. Ennek magyarázatai lehetnek a faji eltérések, a genetikai inhomogenitás (inbred patkány versus keverék kutya), valamint a vérvételi technika különbözősége. Ezen utóbbi viszonylatában a patkányoknál a naponkénti vérvétel nagyobb megterhelést jelentett a beavatkozással járó általános stresszhatást is beleértve, mint a testtömegükben és testarányaikban, továbbá viselkedésükben is más paraméterekkel bíró kutyák esetében.

Mind patkány, mind keverék kutya esetében a bemutatott kísérleteinkben az ischaemiát *érleszorítással* idéztük elő. Fontos szempont kísérleteink vonatkozásában, hogy a bármilyen okból megváltozott rheológiájú vér érfalán mutatott nyírófeszültsége eltérően befolyásolhatja az endothel-sejtek működését. A mechanoszenzor molekulákat aktiválva jelátviteli folyamatokat indít el, mely több gén és fehérje expressziójához vezet. Membránfehérjék, mint a vascular endothelial growth factor (VEGF), az integrinek, G-proteinek és ion-csatornák mechanoszenzitívek, a jelátviteli molekulák foszforilációs kaszkádjaikat indíthatják el.<sup>30, 80, 95</sup> Ezek egyrészt vasoaktív anyagok, mint a nitrogén-oxid (NO) felszabadulásához is vezethetnek, mely anyagok értónusra gyakorolt hatásukkal tovább módosíthatják a vér áramlási tulajdonságait az adott keringési szakaszon.<sup>63</sup> A létrejövő endothelialis dysfunctio további folyamatokat indukálhat az érfalban és nagymértékben befolyásolhatja az adott régió keringését, mikrokeringését.<sup>113, 155</sup>

Látható, hogy egy rendkívül összetett, sokirányú folyamatgyűttes befolyásolhatja a mikrokeringést és a haemorheologiai paramétereket akut végtagi ischaemia-reperfüzio során a vizsgálatainkba vont különböző állatfajokon.

A pathophysiologiai folyamatok további vizsgálata az újabban és újabban felmerülő kérdések tisztázására mindenképpen a kísérleti munka folytatását indokolja majd azzal a céllal, hogy a kísérletekből levont eredmények kellő interpretálása után a klinikum számára akár bevezethető diagnosztikai és terápiás lehetőségeket tudjunk ajánlani, vagy biztosítani.

## ELÉRT FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK ÖSSZEGZÉSE

1. Haemorheologiai vizsgálatainkat összehasonlító jelleggel több állatfajra – egér, patkány, nyúl, kutya, sertés – kiterjesztettük.
2. Az egyes faktorok tekintetében lényeges faji különbségek mutatkoznak. Szembetűnő az eltérés a vörösvérsejt deformabilitás filtrációs technikával mért jellemzői tekintetében, ami összefüggésben állhat a vörösvérsejtek méretével.
3. Méréstechnikai adaptációs munkánk során sikerült az FT-1 filtrométerrel történő vörösvérsejt deformabilitás mérést 1 hetes követéses vizsgálatban patkányokon alkalmazni kismennyiségű vér naponkénti vétele mellett.
4. Patkányban 1 órás végtagi ischaemiát követően a vörösvérsejt deformabilitás szignifikáns romlását mutattuk ki a korai posztoperatív időszakban (1-2. nap) 1 hetes vizsgálati periódus során. A mutatkozó változás allopurinol előkezeléssel kivédhető volt. Így feltételezhető, hogy a vörösvérsejt deformabilitás romlását az ischaemia-reperfusio során keletkező szabadgyökök okozzák.
5. Patkányban 1 órás végtagi ischaemia és az azt követő reperfusio után az átlagos vörösvérsejt térfogat, a thrombocytaszám és az átlagos thrombocyta térfogat jelentősen emelkedett a posztoperatív periódusban.
6. Keverék kutyában 3 órás végtagi ischaemia és az azt követő reperfusio után, a 2-3. napon a vörösvérsejt deformabilitás jelentősen romlott. A teljes vér- és plazma viszkozitás, valamint a fibrinogén szint a posztoperatív napokon változó mértékű, de folyamatos emelkedést mutatott. Az eltérések egy része összefüggésbe hozható a beavatkozások által okozott sebészi traumával, más része a szabadgyökök okozta károsodásokkal.

7. A kirekesztett régióból a keringés újraindulásakor a lokális anyagcsere folyamatok és fizikai viszonyok hatására megváltozott, rheologiailag lényegesebben rosszabb minőségű vér áramlik a test többi részébe, amely kóros érrendszer esetén távolabbi szervekben, szövetekben idézhet elő károsodásokat.
8. Kidolgoztunk egy jól reprodukálható, egyszerű tesztet („occlusiós”-teszt) laser Doppleres szöveti áramlásmérés technikát alkalmazva. Értékelésével következtetni lehet a szöveti mikrokeringés akut változásaira, és ezekre vonatkozó válaszadó képességére ischaemiás károsodást követően. A teszt alkalmazásával patkányban 1 órás végtagi ischaemiát követően a harántcsíkolt izomszövet mikrokeringésének szignifikáns romlását mutattuk ki a reperfusio első perceiben.
9. A haemorheológiai faktorok és a szöveti microcirculatio vizsgálata a végtagi ischaemia-reperfusió károsodások pathophysiologiai történéseivel kapcsolatban értékes információkat nyújthat.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A végtagi ischaemia-reperfusio (I/R) a haemorheológiai faktorokra és a mikrokeringésre kifejtett hatása, az akut-, a műtét alatti- és a korai posztoperatív időszakban fellépő változásai még nem teljesen tisztázottak. Az állatkísérletes modellek alkalmazásánál a fajspecifikus eltérések és a mérési módszerek adaptációjának hiánya miatt a követéses vizsgálatok során számos technikai probléma merül fel. Ezért célul tűztük ki a fajspecifikus összehasonlító és módszertani adaptációk elvégzése után az akut, sebészi jellegű végtagi I/R haemorheológiai és microcirculációs paraméterekre kifejtett hatásának vizsgálatát különböző állatfajokon.

Egér, patkány, nyúl, keverék kutya és sertés vonatkozásában vizsgáltuk a vörösvérsejt deformabilitás, valamint a teljes vér- és plazma viszkozitás eltéréseit. A vörösvérsejt deformabilitás tekintetében jelentős faji diverzitást találtunk, mely összefüggést mutat a vörösvérsejtek méretével.

A vörösvérsejt deformabilitás méréséhez szükséges relatív nagy vérmennyiség laboratóriumi kisállatok esetében komoly akadályt állít a követéses vizsgálatok kivitelezésének. A filtrációs technika adaptációja során sikeresen alkalmaztuk az 1%-os vörösvérsejt-szuszpenziót a standard 5%-os helyett, mely segítségével jól követhető változásokat tudtunk kimutatni 1 órás végtagi ischaemiát követően patkányban az 1. és 2. posztoperatív napon, 1 hetes követéses vizsgálat során.

A szöveti mikrokeringés vizsgálatánál, a laser Doppleres áramlásmérés során kidolgoztuk az „occlusiós”-tesztet, mely segítségével patkányban az 1 órás végtagi ischaemiát követő reperfusio első perceiben jelentős eltéréseket találtunk, az ép állapothoz képest a vázizom microcirculációjában.

Keverék kutyákon a 3 órás végtagi I/R lokális és szisztémás haemorheológiai vizsgálata során jelentős eltéréseket találtunk a vörösvérsejt deformabilitás, a teljes vér- és plazma viszkozitás, a fibrinogén szint és a haematocrit tekintetében az ischaemia alatt álló végtagból vett vérmintákban, a reperfusio első óráiban és a posztoperatív időszakban egyaránt. Vizsgálataink hiánypótló információkat nyújtottak a kísérletes végtagi ischaemia-reperfusio lokális és szisztémás, műtét alatti és műtétet követő haemorheológiai változásairól. A vörösvérsejt deformabilitás mérés módszertani adaptációja és a kidolgozott laser Doppleres „occlusiós”-teszt alkalmas lehet az ischaemia-reperfusio állatkísérletes modelleken való további vizsgálatára.

## SUMMARY

Effects of limb ischemia-reperfusion (I/R) on hemorheological factors and microcirculation, and its acute, intraoperative and early postoperative changes have not been completely clarified yet. Due to the species specific alterations and the absence of adaptation on measuring techniques, several technical problems and questions are raising during the animal experiments. Therefore, our aim was to perform species specific comparative analyses and methodical adaptations, and after this phase, to investigate the effects of limb I/R on hemorheological and microcirculatory parameters in different mammalian species.

Species specific alterations of red blood cell deformability and whole blood- and plasma viscosity were investigated on mice, rats, rabbits, mongrel dogs and pigs. Significant species specific diversity was found in red blood cell deformability, which changes were connected with the cell size.

The relative large quantity of required blood sample for measuring the red blood cell deformability raise serious difficulties for follow-up studies on small experimental animals. During our adaptation of filtration technique we successfully used 1% red blood cell suspension instead of the standard 5% suspension. Using this technique significant and well detectable changes were found after 1-hour limb ischemia on 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> postoperative day, during the 1-weekly follow-up period in the rat.

We harvested the „occlusion“-test using laser Doppler flowmetry for investigation of tissue microcirculation. Using this simple and quick test we successfully showed significant changes in the microcirculation of skeletal muscle after 1-hour limb ischemia compared to the normal state.

Investigating the local and systemic hemorheological effects of 3-hour ischemia and the following reperfusion on mongrel dogs, significant alterations were found on red blood cell deformability, whole blood- and plasma viscosity accompanying by changes in fibrinogen level and hematocrit in the samples taken from the excluded limb region – just before the end of ischemic period –, in the first hours of the reperfusion and even on postoperative days. Our investigations gave supplementary information on local and systemic, intra- and postoperative alterations of hemorheological factors caused by experimental limb ischemia-reperfusion. Methodical adaptation on measuring of red blood cell deformability and the harvested laser Doppler „occlusion“-test can be applicable for further investigative usage on experimental ischemia-reperfusion models.

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Adishesiah M., Round J.M., Jones D.A.: Reperfusion injury in skeletal muscle: a prospective study in patients with acute limb ischaemia and claudicants treated by revascularization. *Br. J. Surg.*, 1992;79:1026-1029.
2. Ahn H., Lindhagen J., Nilsson G.E., Oberg P.A., Lundgren O.: Assessment of blood flow in the small intestine with laser Doppler flowmetry. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1986;21:863-870.
3. Albuquerque R.G., Sanson A.J., Malangoni M.A.: Allopurinol protects enterocytes from hypoxia-induced apoptosis in vivo. *J. Trauma.*, 2002;53:415-420.
4. Alexander M.A., Schabauer M.D., Rooke T.W.: Cutaneous laser Doppler flowmetry: applications and findings. *Mayo Clin. Proc.*, 1994;69:564-574.
5. Allen D.M., Chen L.E., Seaber A.V., Urbaniak J.R.: Pathophysiology and related studies of the no reflow phenomenon in skeletal muscle. *Clin. Orthop.*, 1995;314:122-133.
6. Ames A., Wright R.L., Kowada M., Thurston J.M., Majno G.: Cerebral ischemia – the no reflow phenomenon. *Am. J. Pathol.*, 1968;52:437-453.
7. Anaya-Prado R., Toledo-Pereyra L.H., Lentsch A.B., Ward P.A.: Ischemia/reperfusion injury. *J. Surg. Res.*, 2002;105:248-258.
8. Bagge U., Brånemark P.I.: White blood cell rheology. An intravital study in man. *Adv. Microcirc.*, 1977;7:1-17.
9. Barnes A.: Rheology of diabetes mellitus. In: Lowe G.D.O. (ed.): *Clinical Blood Rheology*. Boca Raton, CRC Press, 1988, pp. 275-309.
10. Baskurt O.K., Bor-Kucukatay M., Yalcin O., Meiselman H.J.: Aggregation behaviour and electrophoretic mobility of red blood cells in various mammalian species. *Biorheology*, 2000;37:417-428.
11. Baskurt O.K., Fisher T.C., Meiselman H.J.: Sensitivity of the cell transit analyser (CTA) to alterations of red blood cell deformability: role of cell size-pore size ratio and sample preparation. *Clin. Hemorheol.*, 1996;16:753-765.
12. Baskurt O.K., Temiz A., Meiselman H.J.: Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties. *Free Rad. Biol. Med.*, 1998;24:102-110.
13. Baskurt O.K.: Deformability of red blood cells from different species studied by resistive pulse shape analysis technique. *Biorheology*, 1996;33:169-179.
14. Baskurt O.K.: The role of spleen in suppressing the rheological alterations in circulating blood. *Clin. Hemorh. Microcirc.*, 1999;20:181-188.
15. Belkin M., Brown R.D., Wright J.G., LaMorte W.W., Hobson II, R.W.: A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Am. J. Surg.*, 1988;156:83-86.
16. Besnard S., Silvestre J.S., Duriez M., Bakouche J., Lemaigre-Dubreuil Y., Mariani J., Levy B.I., Tedgui A.: Increased ischemia-induced angiogenesis in the staggered mouse, a mutant of the nuclear receptor Roralpha. *Circ. Res.*, 2001;89:1209-1215.
17. Bessman J.D.: The relationship of megakaryocyte ploidy to platelet volume. *Am. J. Hematol.*, 1984;16:161-170.
18. Bhanushali A.A., Raghunathan R., Kalraiya R.D., Mehta N.G.: Cancer-related anemia in a rat model: alpha2-macroglobulin from Yoshida sarcoma shortens erythrocyte survival. *Eur. J. Haematol.*, 2002;68:42-48.

19. Bindoli A., Cavallini L., Rigobello M.P., Coasin M., Di Lisa F.: Conversion of rat xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase during oxidative stress. In: L'Abbate A. and Ursini F. (eds.): The role of oxygen radicals in cardiovascular diseases. A conference in the European Concerted Action on Breakdown in Human Adaptation – Cardiovascular Diseases, Asolo, Italy 2-5 December, 1986. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1988, pp. 51-69.
20. Bogár L.: Diagnosztika. In: Bernát S. I., Pongrácz E. (eds.): A klinikai haemorheologia alapjai. Kornétás Kiadó, Budapest, 1999, pp. 33-50.
21. Bogár L.: Az emberi véresejtek filtrációs sajátosságai. Kandidátusi értekezés, Pécs, 1988.
22. Bor-Kucukatay M., Wenby R.B., Meiselman H.J., Baskurt O.K.: Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2003;284:H1577-H1584.
23. Boros M., Takaichi S., Hatanaka K.: Ischemic time-dependent microvascular changes and reperfusion injury in the rat small intestine. *J. Surg. Res.*, 1995;59:311-320.
24. Brandao M.L., Roselino J.E.S., Piccinato C.E., Cherri J.: Mitochondrial alterations in skeletal muscle submitted to total ischemia. *J. Surg. Res.*, 2003;110:235-240.
25. Brun J.: Hormones, metabolism and body composition as major determinants of blood rheology: potential pathophysiological meaning. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 2002;26:63-79.
26. Bywaters E.G.L., Beall J.: Crush injuries and renal function. *Br. Med. J.*, 1941;1:427-432.
27. Cameron H.A., Philips R., Ibbotson R.M., Carson P.H.M.: Platelet size in myocardial infarction, *Br. Med. J.*, 1983;287:449-451.
28. Chandrasekar B., Smith J.B., Freeman G.L.: Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor- $\kappa$ B and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine. *Circulation*, 2001;103:2296-2302.
29. Chen D., Kaul D.K.: Rheologic and hemodynamic characteristics of red cells of mouse, rat and human. *Biorheology*, 1994;31:103-113.
30. Chien S., Li S., Shyy Y.J.: Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. *Hypertension*, 1998;31:162-169.
31. Chien S., Schmalzer E.A., Lee M.M.L., Impelluso T., Skalak R.: Role of white blood cells in filtration of blood cell suspension. *Biorheology*, 1983;20:11-27.
32. Chien S., Usami S., Dellenback R.J., Bryant C.A.: Comparative hemorheology – hematological implications of species differences in blood viscosity. *Biorheology*, 1971;8:35-57.
33. Chien S.: Principles and techniques for assessing erythrocyte deformability. *Blood Cells*, Springer Verlag, Berlin, New York, 1977, pp. 71-99.
34. Ciuffetti G., Mercuri M., Mannarino E.C., Lombardini R., Pasqualini L., Lupattelli G., Santambrogio L.: Free radical production in peripheral vascular disease. A risk for critical ischaemia? *Int. Angiol.*, 1991;20:81-87.
35. Ciz M., Cizova H., Lojek A., Kubala J., Papezikova I.: Ischemia/reperfusion injury of rat small intestine: The effect of allopurinol dosage. *Transplantation Proceedings*, 2001;33:2871-2873.
36. Clinton M.S., Sepka R.S., Bristol D., Pederson W.C., Barwick W.J., Serafin D., Klitzman B.: Establishment of normal ranges of laser Doppler blood flow in autologous tissue transplants. *Plast. Reconstr. Surg.*, 1991;87:299-309.
37. Cohen M.H.: Influence of tumor burden on red blood cell deformability in small cell lung cancer patients. *Ann. Clin. Res.*, 1981;13:387-391.

38. Copley A.L.: The phenomenon of thixotropy in hemophilic and heparinized blood. *Science*, 1941;94:543-544.
39. Csornai M., Pongrácz E.: Cerebrovascularis betegségek. In: Bernát S. I., Pongrácz E. (eds.): *A klinikai haemorheologia alapjai*. Kornétás Kiadó, Budapest, 1999, pp. 115-126.
40. Dammers R., Wehrens X.H.T., oude Egbrink M.G.A., Slaaf D.W., Kurvers H.A.J.M., Ramsay G.: Microcirculatory effects of experimental acute limb ischaemia-reperfusion. *Br. J. Surg.*, 2000;88:816-824.
41. Deindl E., Buschmann I., Hoefler I.E., Podzuweit T., Boengler K., Vogel S., van Royen N., Fernandez B., Schaper W.: Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ. Res.*, 2001;89:799-786.
42. Del Maestro R.F.: An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol. Scand., Suppl.*, 1980;492:153-168.
43. Demopoulos H.B.: The basis of free radical pathology. *Fed. Proc.*, 1973;32:1859-1861.
44. D'Erasmo E., Alberti G., Celi F.S., Romagnolie E., Veici E., Mazzuoli G.F.: Platelet count, mean platelet volume and their relation to prognosis in cerebral infarction. *J. Intern. Med.*, 1990;227:11-14.
45. DiResta G.R., Corbally M.T., Sigurdson E.R., Haumschild D., Ridge R., Brennan M.F.: Infrared laser Doppler flowmeter in the determination of small bowel perfusion after ischemic injury: Comparison with the clearance of locally generated hydrogen and fluorescein angiography. *J. Pediatr. Surg.*, 1994;29:1352-1355.
46. van Dongen J.J., Remie R., Rensema J.W., van Wunnik G.H.J. (eds): *Manual of microsurgery on laboratory rat. Part 1: General information and experimental techniques*. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1990, p 289.
47. Dormandy J., Ernst E., Bennett D.: Erythrocyte deformability in the pathophysiology of the microcirculation. *Ric. Clin. Lab., Suppl. 1*, 1981;11:1135-1138.
48. Dormandy J., Flute P., Matrai A., Bogar L., Mikita J.: The new St. George's blood filterometer. *Clin. Hemorheol.*, 1985;5:975-983.
49. Dormandy J.A.: *Red Cell Deformability and filterability*. Martinus Nijhoff Publisher, Boston, 1983.
50. Dormandy J.A.: Significance of hemorheology in the management of the ischemic limb. *World J. Surg.*, 1983;7:319-325.
51. Fåhræus R., Lindqvist T.: Viscosity of blood in narrow capillary tubes. *Am. J. Physiol.*, 1931;96:562-568.
52. Fåhræus R.: The suspension stability of blood. *Physiol. Rev.*, 1929;9:241-274.
53. Farkas K.: Lézer Doppler-áramlásmérés: Új módszer a mikrocirkuláció vizsgálatára. *Lege Artis Medicinae*, 1998;8:4-12.
54. Fehér J., Vereckei A.: *Szabadgyök-reakciók jelentősége az orvostudományban*. Biogal Gyógyszergyár, 1985.
55. Ferencz A., Szanto Z., Borsiczky B., Kiss K., Kalmar-Nagy K., Szeberenyi J., Horvath O.P., Roth E.: The effects of preconditioning on the oxidative stress in small-bowel autotransplantation. *Surgery*, 2002;132:877-884.
56. Forconi S., Guerrini M., Ravelli P., Rossi C., Ferrozzi C., Pecchi S., Biasi G.: Arterial and venous blood viscosity in ischemic lower limbs in patients affected by peripheral obliterative arterial disease. *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)*, 1979;20:379-384.

57. Franke N., Endrich B., Laubenthal H., Peter K., Messmer K.: The effect of pentobarbital on the microcirculation of skeletal muscles and the subcutis. An animal experimental study. *Anästh. Intensivther. Notfallmed.*, 1982;17:11-14.
58. Furka I., Mikó I., Serfőző J., Frenzl I., Hauck M.: Autotransplantation of the spleen. In: Montorsi M., Zennaro F. (eds): *Second World Week of Professional Updating in Surgery and in Surgical Oncological Disciplines of the University of Milan. Lecture Book Vol. II.* Bologna, Monduzzi Editore, 1990, pp. 767-
59. Furnas H., Rosen J.M.: Monitoring in microvascular surgery. *Ann. Plast. Surg.*, 1991;26:265-272.
60. Gaetgens P., Will G., Schmidt F.: Comparative rheology of nucleated and non-nucleated red blood cells. II. Rheological properties of avian red cell suspension in narrow capillaries. *Pflügers Arch.*, 1981;390:283-287.
61. Grace P.A.: Ischaemia-reperfusion injury. *Br. J. Surg.*, 1994;81:637-647.
62. Granger D.N., Rutili G., McCord J.M.: Superoxide radicals in feline intestinal ischaemia. *Gastroenterology*, 1981;81:22-29.
63. Griffith T.M.: Endothelial control of vascular tone by nitric oxide and gap junctions: a haemodynamic perspective. *Biorheology*, 2002;39:307-318.
64. Groom A.C.: Microvascular transit of normal, immature and altered red blood cells in spleen versus skeletal muscle. In: Cokelet G.R., Meiselman H.J., Brooks D.E. (eds): *Erythrocyte Mechanics and Blood Flow.* Alan R. Liss, New York, 1980. pp. 229-259.
65. Gurke L., Erhard P., Marx A., Harder F., Seelig J., Heberer M.: Kinetics of high-energy phosphates in allopurinol-pretreated ischaemic and post-ischaemic skeletal muscle: an in vivo magnetic resonance spectroscopy study. *Eur. Surg. Res.*, 1997;29:101-106.
66. Haimovici H.: Arterial embolism with massive ischaemic myopathy and myoglobinuria. *Surgery*, 1960;47:739-747.
67. Hamel A.L., Moe J.H.: Effect of total ischemia on hind limbs of dogs subjected to hypothermia. *Surgery*, 1964;55:274-280.
68. Hartung K.J., Jung K., Minda R., Kuncz W.: Mitochondrial respiratory function as indicator of the ischemic injury of the rat kidney. *Biophys. Biochim. Acta*, 1985;44:1435-1443.
69. Haver V.M., Gear A.R.L.: Functional fractionation of platelets. *J. Lab. Clin. Med.*, 1981;97:187-204.
70. Hebel R., Stromberg M.W.: *Anatomy and embryology of the laboratory rat.* Würthsee: BioMed Verlag, 1986.
71. Hem A., Smith A.J., Solberg P.: Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink. *Lab. Anim.*, 1998;32:364-368.
72. Holloway G.A., Watkins D.W.: Laser Doppler measurement of cutaneous blood flow. *J. Invest. Dermatol.*, 1977; 69:306-309.
73. Holmberg A., Sandhagen B., Bergqvist D.: Hemorheologic variables in critical limb ischemia before and after infrainguinal reconstruction. *J. Vasc. Surg.*, 2000;31:691-695.
74. Horvath B., Marton Zs., Halmosi R., Alexy T., Szapary L., Vekasi J., Biro Zs., Habon T., Késmárky G., Toth K.: Scavenger effect of different cerebrovascular drugs. *Clin. Neuropharmacol.*, 2002;25:37-42.
75. Huang J., Qi R., Quackenbush J., Dauway E., Lazaridis E., Yeatman T.: Effects of ischemia on gene expression. *J. Surg. Res.*, 2001;99:222-227.

76. Huk I., Nanobashvili J., Neumayer C., Punz A., Mueller M., Afkhampour K., Mittlboeck M., Losert U., Polterauer P., Roth E., Patton S., Malinski T.: L-arginine treatment alters the kinetics of nitric oxide and superoxide release and reduces ischaemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *Circulation*, 1997;96:667-675.
77. Imre S., Csornai M., Balazs M.: High sensitivity to autoxidation in neonatal calf erythrocytes: possible mechanism of accelerated cell aging. *Mech. Ageing Dev.*, 2001;122:69-76.
78. Inoue K., Hosotani R., Tatemoto K., Yajima H., Tobe T.: Effect of natural peptide YY on blood flow and exocrine secretion of pancreas in dogs. *Dig. Dis. Sci.*, 1998;33:828-832.
79. Ivarsson L.: Pulmonary metastasis formation after trauma: an experimental study on the relevance of rheological disturbances of blood. *Acta. Chir. Scand., Suppl.*, 1976;463:1-46.
80. Jalali S., Li Y.S., Sotoudeh M., Yuan S., Li S., Chien S., Shyy J.Y.: Shear stress activates p60src-Ras-MAPK signaling pathways in vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1998;18:227-234.
81. Jivegard L., Belboul A., Holm J., Al-Khaja N., Bergman P., Roberts D.: Acute embolic lower limb ischaemia is associated with decreased red cell deformability. *Eur. J. Vasc. Surg.*, 1990;4:129-133.
82. Kadambi A, Skalak TC.: Role of leukocytes and tissue-derived oxidants in short-term skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 2000;278:H435-H443.
83. Katyukhin L.N., Kazennov A.M., Maslova M.N., Matskevich Yu. A.: Rheologic properties of mammalian erythrocytes: relationship to transport ATPases. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 1998;120:493-498.
84. Kayar E., Mat F., Meiselman H.J., Baskurt O.K.: Red blood cell rheological alterations in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Biorheology*, 2001;38:405-414.
85. Kekesi V., Zima E., Barat E., Huszar E., Nagy A., Losonczy L., Merkely B., Horkay F., Juhasz-Nagy S.: Pericardial concentrations of adenosine, inosine and hypoxanthine in an experimental canine model of spastic ischaemia. *Clin. Sci. (Lond.)*, Suppl. 48, 2002;103:198S-201S.
86. Kesmarky G., Toth K., Habon L., Vajda G., Juricskay I.: Hemorheological parameters in coronary artery disease. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 1998;18:245-251.
87. Kirschenbaum L.A., Aziz M., Astiz M.E., Saha D.C., Rackow E.C.: Influence of rheologic changes and platelet-neutrophil interactions on cell filtration in sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 2000;161:1602-1607.
88. Kksal C., Ercan M., Bozkurt A.K.: Hemorheological variables in critical limb ischemia. *Int. Angiol.*, 2002;21:355-359.
89. Kohtani T., Abe Y., Sato M., Miyauchi K., Kawachi K.: Protective effects of anto-neutrophil antibody against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Eur. Surg. Res.*, 2002;34:313-320.
90. Konya L., Kekesi V., Juhasz-Nagy S, Feher J.: The effect of superoxide dismutase in the myocardium during reperfusion in dog. *Free Radic. Biol. Med.*, 1992;13:527-532.
91. Koppensteiner R.: Blood rheology in emergency medicine. *Semin. Thromb. Hemost.*, 1996;22:89-91.

92. Krohg-Sorensen K., Line P.D., Kvernebo K.: The significance of probe design in evaluation of colonic perfusion with laser Doppler flowmetry. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1993;28:381-386.
93. Kurose I., Granger D.N.: Evidence implicating xanthine oxidase and neutrophils in reperfusion-induced microvascular dysfunction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1994;723:158-179.
94. Kuzman D., Znidarcic T., Gros M., Vrhovec S., Svetina S., Zeks B.: Effect of pH on red blood cell deformability. *Pflugers Arch., Suppl. 5*, 2000;440:193-R194.
95. Labrador V., Chen K.D., Li Y.S., Muller S., Stoltz J.F, Chien S.: Interactions of mechanotransduction pathways. *Biorheology*, 2003;40:47-52.
96. Liss A.G., Liss P.: Use of a modified oxygen microelectrode and laser-Doppler flowmetry to monitor changes in oxygen tension and microcirculation in a flap. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2000;105:2072-2078.
97. Lowe G. D. O., Barbenel J. C.: Plasma and blood viscosity. In: Lowe G. D. O. (ed): *Clinical Blood Rheology, Vol. I*, CRC Press, Boca Raton, 1988. pp. 11-44.
98. Lowe G.D., Fowkes F.G., Dawes J., Donnan P.T., Lennie S.E., Housley E.: Blood viscosity, fibrinogen, and activation of coagulation and leukocytes in peripheral arterial disease and the normal population in the Edinburgh Artery Study. *Circulation*, 1993;87:1915-1920.
99. Lumley J.S.P., Green C.J., Lear P., Angell-James J.E. (eds): *Essentials of experimental surgery*. Butterworths, Science and Technology Books, St. Luis, 1997. pp 30.
100. Martin J.F., Pennington D.G.: The relationship between the age and density of circulating 51-Cr labelled platelets in the sub-human primate. *Throm. Res.*, 1983;30:157-164.
101. Martin J.F., Trowbridge E.A., Salmon G., Plumb J.: The biological significance of platelet volume: its relationship to bleeding time, platelet thromboxane B<sub>2</sub> production and megakaryocyte nuclear DNA concentration. *Thromb. Res.*, 1983;32:443-460.
102. Marton Zs., Halmosi R., Horvath B., Alexy T., Kesmarky G., Vekasi J., Battyany I., Hidegh K., Toth K.: Scavenger effect of experimental and clinically used cardiovascular drugs. *J. Cardiovasc. Pharm.*, 2001;38:745-753.
103. Matrai A., Kollar L.: Importance of the preoperative haemoglobin concentration in arterial surgery. *Eur. Surg. Res.*, 1987;19:1-5.
104. Matrai A., Whittington R.B., Ernst E.: A simple method of estimating whole blood viscosity at standardized hematocrit. *Clin. Hemorheol.*, 1987;7:261-265.
105. McCord J.M.: Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.*, 1985;312:159-163.
106. McCord J.M., Fridovich I.: Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Med.*, 1969;244:6049-6055.
107. McCutchan H.J., Schwappach J.R., Enquist E.G., Walden D.L., Terada L.S., Reiss O.K., Leff J.A., Repine J.E.: Xanthine oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contributes to reperfusion injury of ischemic skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 1990;258:H1415-H1419.
108. Menger M.D., Barker J.H., Messmer K.: Capillary blood perfusion during postischemic reperfusion in striated muscle. *Plast. Reconstr. Surg.*, 1992;89:1104-1114.
109. Menger M.D., Feifel G., Messmer K.: Distribution pattern of capillary and venular red blood cell velocity following ischemia-reperfusion in striated muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1992;317:765-769.

110. Menger M.D., Pelikan S., Steiner D., Messmer K.: Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of 'reflow-paradox'. *Am. J. Physiol.*, 1992;263:H1901-H1906.
111. Menger M.D., Steiner D., Messmer K.: Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of 'no-reflow'. *Am. J. Physiol.*, 1992;263:H1892-H1900.
112. Mikita J., Bogár L., Mátrai Á.: The roots, concept, subject, and history of hemorheology, current tasks and further perspectives. *Orv. Hetil.*, 1989;130:491-495.
113. Mombouli J.V., Vanhoutte P.M.: Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1999;31:61-74.
114. Moorhouse P.C., Grootveld M., Halliwell B., Quinlan J.G., Gutteridge J.M.: Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett.*, 1987;213:23-28.
115. Nagao A., Ishii T., Takechi H.: Study of blood cell counting of mouse, rat and rabbit using semiautomated hematology instrument system. *Sysmex Journal*, 1987;10:236-243.
116. Nanobashvili J., Neumayer C., Fuegl A., Sporn E., Prager M., Polterauer P., Malinski T., Huk I.: Ischaemia/reperfusion injury of skeletal muscle: mechanism, morphology, treatment strategies, and clinical applications. *Eur. Surg.*, 2002;34:83-89.
117. Nash G.B., Eggington S.: Comparative rheology of human and trout red blood cells. *J. Exp. Biol.*, 1993;174:109-122.
118. Nash G.B., Jones J.G., Mikita J., Dormandy J.A.: Methods and theory for analysis of flow of white cell subpopulations through micropore filters. *Br. J. Haematol.*, 1988;70:165-170.
119. Nishijima K., Kiryu J., Tsujikawa A., Honjo M., Nonaka A., Yamashiro K., Tanihara H., Tojo S.J., Ogura Y., Honda Y.: In vivo evaluation of platelet-endothelial interactions after transient retinal ischemia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001;42:2102-2109.
120. Novák Z.: Az oxidatív stressz hatása a haemorheologiai paraméterekre, In: Bernát S.I., Pongrácz E. (eds): *A klinikai haemorheologia alapjai*, Kornétás Kiadó, Budapest, 1999, pp. 26-27.
121. O'Brien J.R., Jamieson S.: A relationship between platelet volume and platelet number. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 1974;31:363-364.
122. O'Malley T., Langhorne P., Elton R.A., Stewart C.: Platelet size in stroke patients. *Stroke*, 1995;26:995-999.
123. Obata T., Hirata T., Yamanaka Y., Uchida Y.: Blood flow rate in jejunal ischemia-reperfusion injury. *Experientia*, 1995;51:762-764.
124. Obeid A.N., Barnett N.J., Dougherty G., Ward G.: A critical review of laser Doppler Flowmetry. *J. Med. Eng. Technol.*, 1990;14:178-181.
125. Palinski W., Torsellini A., Doni L.: Influence of platelet activation on erythrocyte deformability. *Thromb. Haemostasis*, 1983;49:84-86.
126. Parise P., Berrettini M., Graselli S., de Cunto M., Nenci G.G.: Failure to demonstrate beneficial effect of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) infusion on red blood cell deformability in patients with peripheral vascular disease: a possible role of the leukocytes. *Angiology*, 1992;43:320-327.
127. Perry M.O.: Acute limb ischemia. In: Rutherford R.B. (ed): *Vascular surgery*. W.B. Saunders, Philadelphia, 1995, pp. 641-647.

128. Phillips A.R.J., Farrant G.J., Abu-Zidan F.M., Cooper G.J.S.: A method using laser Doppler flowmetry to study intestinal and pancreatic perfusion during an acute intestinal ischemic injury in rats with pancreatitis. *Eur. Surg. Res.*, 2001;33:361-369.
129. Presta M., Ragnotti G.: Quantification of damage to striate muscle after normothermic or hypothermic ischemia. *Clin. Chem.*, 1981;27:297-302.
130. Pryor W.A.: Free radical reactions and their importance in biochemical systems. *Fed. Proc.*, 1973;32:1862-1869.
131. Punch J., Rees R., Cashmer B., Wilkins E., Smith D.J., Till G.O.: Xanthine oxidase: its role in the no-reflow phenomenon. *Surgery*, 1992;111:169-176.
132. Puranapanda V., Hinshaw L.B., O'Rear E.A., Chang A.C., Whitsett T.L.: Erythrocyte deformability in canine septic shock and the efficacy of pentoxifylline and a leukotriene antagonist. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1987;185:206-210.
133. Racz I.B., Illyes G., Sarkadi L., Hamar J.: The functional and morphological damage of ischemic reperfused skeletal muscle. *Eur. Surg. Res.*, 1997;29:254-263.
134. Ramachandran A., Balasubramanian K.A.: Protease activation during surgical stress in the rat small intestine. *J. Surg. Res.*, 2000;92:283-290.
135. Reid H.L., Dormandy J.A., Barnes A.J., Lock P.J., Dormandy T.L.: Impaired red cell deformability in peripheral vascular disease. *Lancet*, 1976;1:666-668.
136. Reimer R.K., Jennings R.B., Tatum A.H.: Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic functional and ultrastructural studies. *Am. J. Cardiol.*, 1983;52:72A-81A.
137. Ricardo S.D., Bertram J.F., Ryan G.B.: Podocyte architecture in puromycin aminonucleoside-treated rats administered tungsten or allopurinol. *Exp. Nephrol.*, 1995;3:270-279.
138. Roth E.: Oxygen free radicals and their clinical implications. *Acta Chir. Hung.*, 1997;36:302-305.
139. Rozsos I., Kollar L., Kiss T., Tanto Z., Molnar L.: Data on possibilities of rehabilitation of lower limb amputates. *Orv. Hetil.*, 1991;132:2045-2048.
140. Rutherford R.B.: Nutrient bed protection during lower extremity arterial reconstruction. *J. Vasc. Surg.*, 1987;5:529-534.
141. Sabo A., Jakovljevic V., Stanulovic M., Lepsanovic L., Pejin D.: Red blood cell deformability in diabetes mellitus: effect of phytomenadione. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, 1993;31:1-5.
142. Saltman P.: Oxidative stress: A radical view. *Semin. Hematol.*, 1989;26:249-256.
143. Schmid-Schönbein H., Volger E.: Red cell aggregation and red cell deformability in diabetes. *Diabetes, Suppl. 2*, 1976;25:897-902.
144. Sevic E.M., Jain R.K.: Effect of red blood cell rigidity on tumor blood flow: increase in viscous resistance during hyperglycemia. *Cancer Res.*, 1991;51:2727-2730.
145. Sise M.J., Shackford S.R.: Definitive care phase: Vascular injuries. In: Greenfield L.J., Mulholland M.W., Oldham K.T., Zelenock G.B., Lillemoe K.D. (eds): *Surgery. Scientific principles and practice*. Lippincott Williams&Wilkins, 2001., pp. 362-363.
146. Sjostrom M., Neglen P., Friden J., Eklof B.: Human skeletal muscle metabolism and morphology after temporary complete ischemia. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1982;12:69-79.
147. Smith J.K., Carden D.L., Korthuis R.J.: Role of xanthine oxidase in postischemic microvascular injury in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 1989;257:H1782-H1789.
148. Smoot E.C., Bergman B.A., Roth A.: Assessment of flap perfusion in a porcine model with heated laser Doppler probe. *J. Reconstr. Microsurg.*, 1992;8:131-135.
149. Soderstrom T., Svensson H., Koop T., Moller K.O.: Processing of laser-Doppler signals from free flaps. *Technol. Health Care*, 1999;7:219-223.

150. Sós J., Sósné Lódi I.: A kísérleti állatok biológiai és fiziológiai standard értékei. In: Kovách Arisztid (ed): A kísérleti orvostudomány vizsgáló módszerei. I. kötet. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1954, p. 109.
151. Southard J.H., Belzer F.O.: Organ preservation. *Annu. Rev. Med.*, 1995;46:235-247.
152. Stack B.C. Jr, Futran N.D., Ridley M.B., Schultz S., Sillman J.S.: Signal averaging and waveform analysis of laser Doppler flowmetry monitoring of porcine myocutaneous flaps: I. Acute assessment of flap viability. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1995;113:550-557.
153. Steffens A.B.: A method for frequent sampling of blood and continuous infusion of fluids in the rat without disturbing the animal. *Physiol. Behav.*, 1969;4:833-836.
154. Stern M.D.: In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature*, 1975;254:56-58.
155. Sternbergh W.C., Adelman B.: The temporal relationship between endothelial cell dysfunction and skeletal muscle damage after ischemia and reperfusion. *J. Vasc. Surg.*, 1992;16:30-39.
156. Stoltz J.F., Singh M., Riha P.: Hemorheology in Practice, IOS Press, Netherlands, 1999, pp. 9-52.
157. Stoltz J.F.: Clinical hemorheology: Past, present, perspectives. *Clin. Hemorheol.*, 1996;16:87-104.
158. Stuart J.: International Committee for Standardization in Haematology: Guidelines for measurement of blood viscosity and erythrocyte deformability. *Clin. Hemorheol.*, 1986;6:439-454.
159. Sukalski K.A., LaBerge T.P., Johnson W.T.: In vivo oxidative modification of erythrocyte membrane proteins in copper deficiency, *Free Rad. Biol. Med.*, 1997;22:835-842.
160. Svensson H., Holmberg J., Svedman P.: Interpreting laser Doppler recordings from free flaps. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.*, 1993;27:81-87.
161. Szabo Gy., Miko I., Szikszai Z., Imre S., Furka I.: The importance of red blood cell deformability measuring for following the function of autotransplanted spleen chips. *Acta Chir. Austriaca, Suppl.* 159, 1999;31:17-18.
162. Szikszai Z., Fekete I., Imre S.G.: A comparative study of hemorheological parameters in transient ischemic attack and acute ischemic stroke patients: Possible predictive value. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 2003;28:51-57.
163. Szokoly M., Ács G., Németh N., Nagy D., Furka I., Mikó I.: Correlation between clinical cases and an experimental amputate model. *Eur. Surg. Res.*, 2003;35:314.
164. Terada L.S., Rubinstein J.D., Lesnefsky E.J., Horwitz L.D., Jeff J.A., Repine J.E.: Existence and participation of xanthine oxidase in reperfusion injury of ischemic rabbit myocardium. *Am. J. Physiol.*, 1991;260:H805-H810.
165. Terzi C., Kuzu A., Aslar A.K., Kale I.T., Tanik A., Koksoy C.: Prevention of deleterious effects of reperfusion injury using one-week high-dose allopurinol. *Dig. Dis. Sci.*, 2001;46:430-437.
166. Thompson C.B., Jakubowski J.A.: The pathophysiology and clinical relevance of platelet heterogeneity. *Blood*, 1988;72:1-8.
167. Thomson C.B., Loce D.G., Quinn P.G., Valeri C.R.: Platelet size does not correlate with platelet age. *Blood*, 1983;62:487-494.
168. Toghi H., Suzuki H., Tamura K., Kimura B.: Platelet volume, aggregation and adenosine triphosphate release in cerebral thrombosis. *Stroke*, 1991;22:17-21.
169. Tombol T., Pataki G., Nemeth A., Hamar J.: Ultrastructural changes of the neuromuscular junction in reperfusion injury. *Cells Tissues Organs*, 2002;170:139-150.

170. Tóth K., Juricskay I.: Rheologiai alapfogalmak. In: Bernát S. I., Pongrácz E. (eds): A klinikai haemorheologia alapjai. Kornétás Kiadó, Budapest, 1999, pp. 13-24.
171. Tóth K., Késmárky G.: Kardiológiai betegségek. In: Bernát S. I., Pongrácz E. (eds): A klinikai haemorheologia alapjai. Kornétás Kiadó, Budapest, 1999, pp. 95-114.
172. Trowbridge E.A., Slater D.N., Kishk Y.T., Woodcockand B.W., Martin J.F.: Platelet production in myocardial infarction and sudden cardiac death. *Thromb. Haemost.* 1984;52:167-171.
173. Tsuchida T., Kato T., Yamaga M., Ikebe K., Oniki Y., Irie H., Takagi K.: The effect of perfusion with UW solution on the skeletal muscle and vascular endothelial exocrine function in rat hindlimbs. *J. Surg. Res.*, 2003;110:266-271.
174. Tsuchiya M.: Introductory remarks. In: Tsuchiya M., Wayland H., Oda M., Okazaki I. (eds): Intravital observation of organ microcirculation. Proceedings of Tokyo Symposium, June 18, 1983. Excerpta Medicina, Amsterdam-Oxford-Princeton, 1983, pp.V-VI.
175. Tysl K., Ellis C.G.: Simultaneous assessment of red cell perfusion in skeletal muscle by laser Doppler flowmetry and video microscopy. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.*, 1985;4:397-406.
176. Usami S., Chien S., Gregersen M.I.: Viscometric characteristic of blood of the elephant, man, dog, sheep, and goat. *Am. J. Physiol.*, 1969;217:884-890.
177. Usami S., Magazinovic V., Chien S., Gregersen M.I.: Viscosity of turkey blood: rheology of nucleated erythrocytes. *Microvasc. Res.*, 1970;2:489-499.
178. Vega V.L., Mardones L., Maldonado M., Nicovani S., Manriquez V., Roa J., Ward P.H.: Xanthine oxidase released from reperfused hind limbs mediate Kupffer cell activation, neutrophil sequestration, and hepatic oxidative stress in rats subjected to tourniquet shock. *Shock*, 2000;14:565-571.
179. Waugh R., Evans E.A.: Viscoelastic properties of erythrocyte membranes of different vertebrate animals. *Microvasc. Res.*, 1976;12:291-304.
180. Weed R.I., La Celle P.L., Merrill E.W.: Metabolic dependence of red blood cell deformability. *J. Clin Invest.*, 1969;48:795-809.
181. Welbourn C.R., Goldman G., Paterson I.S., Valeri C.R., Shepro D., Hechtman H.B.: Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br. J. Surg.*, 1991;78:651-655.
182. Wheatley A.M., Almond N.E., Stuart E.T., Zhao D.: Interpretation of the laser Doppler flow signal from the liver of the rat. *Microvasc. Res.*, 1993;45:290-301.
183. Wolfrad A., Csaszar J., Gera L., Petri A., Simonka J.A., Balogh A., Boros M.: Endothelin-a receptor antagonist treatment improves the periosteal microcirculation after hindlimb ischemia and reperfusion in the rat. *Microcirculation*, 2002;9:471-476.
184. Yamakawa T., Niimi H.: Intravital microscopic study of coronary microcirculation during acute ischemia. In: Tsuchiya M., Wayland H., Oda M., Okazaki I. (eds): Intravital observation of organ microcirculation. Proceedings of Tokyo Symposium, June 18, 1983. Excerpta Medicina, Amsterdam-Oxford-Princeton, 1983, pp. 205-219.
185. Yamauchi J., Vollmar B., Wolf B., Menger M.D.: Role of TNF- $\alpha$  in local surgical trauma-induced microvascular dysfunction. *Dig. Surg.*, 1999;16:400-406.
186. Yassin M.M.I., Barros D'Sa A.A.B., Parks T.G., McCaigue M.D., Leggett P., Halliday M.I., Rowlands B.J.: Lower limb ischaemia-reperfusion injury alters gastrointestinal structure and function. *Br. J. Surg.*, 1997;84:1425-1429.
187. Yuen J.C., Feng Z.: Distinguishing laser Doppler flowmetric responses between arterial and venous obstructions in flaps. *J. Reconstr. Microsurg.*, 2000;16:629-635.

## 8. FÜGGELÉK

### 8.1. Az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények:

1. **Nemeth N.**, Lesznyak T., Brath E., Acs G., Nagy A., Pap-Szekeres J., Furka I., Miko I.: Changes in microcirculation after ischemic process in rat skeletal muscle. *Microsurgery*, 2003;23:419-423. **IF: 0,803**
2. Miko I., Brath E., **Nemeth N.**, Toth F.F., Sipka S., Kovacs J., Sipka S. Jr., Fachel J., Furka A., Furka I., Zhong R.: Hematological, hemorheological, immunological and morphological studies of spleen autotransplantation in mice: preliminary results. *Microsurgery*, 2003;23:483-488. **IF: 0,803**
3. **Németh N.**, Ács G., Lesznyák T., Bráth E., Imre S., Urbán F., M. Menzel, Furka I., Mikó I.: Vörösvérsejt deformabilitás mérési tapasztalataink különféle laboratóriumi állatfajokon. *Magy. Állatorvosok*, 2004; **IF: 0,051** – *in press*
4. **Nemeth N.**, Lesznyak T., Acs G., Furka I., Imre S., Miko I.: Relation of short-term hind limb ischemia and red blood cell deformability at special settings for follow-up in rats. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, **IF: 0,623** – *submitted*

### 8.2. Az értekezéssel összefüggő egyéb közlemények és könyvfejezet

1. Mikó I., Furka A., Ács G., **Németh N.**, Sipka S., Oláh A.V., Bráth E., Furka I.: Laboratory follow up of spleen autotransplants after experimental spleen injuries. *Eur. Surg., Suppl.* 189, 2002;34:10-12.
2. Csízy I., Furka I., Cserni T., Józsa T., Oláh Cs., Pető K., **Németh N.**, Mikó I.: Szöveti microcirculatio mérése kísérletes ureter-neoimplantatiók során. *Orv. Hetil.*, 2003;144:129-132.
3. Pap-Szekeres J., Cserni G., Furka I., Svebis M., Cserni T., Brath E., **Nemeth N.**, Miko I.: Transplantation and microsurgical anastomosis of free omental graft. Experimental animal model of a new operative technique in dogs. *Microsurgery*, 2003;23:414-418. **IF: 0,803**
4. **Nemeth N.**, Szokoly M., Acs G., Brath E., Lesznyak T., Furka I., Miko I.: Systemic and regional hemorheological consequences of warm and cold hind limb ischemia-reperfusion in a canine model. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, **IF: 0,623** – *in press*
5. 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 M. (ed.): *Proceedings of the 37<sup>th</sup> Congress of the European Society for Surgical Research*, Monduzzi Editore, 2002, pp. 281-284.

*In extenso közlemények impakt faktora összesen: 3,083*

## 9. Köszönetnyilvánítás

Kutatómunkám során, amelyet nappali Ph.D. ösztöndíjasként végezhettem a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Sebészeti Műtéttani Intézetében, nap mint nap segítő-gondoskodó bánásmódban részesülhettem, amelyért az Intézet minden munkatársának köszönetért tartozom.

Külön köszönet illeti az intézet vezetőjét, *Dr. Mikó Irént*, témavezetőmet, aki minden lehetőséget megadott, hogy kutató- és oktatómunkát végezhessek, laboratórium vezetői feladattal bízott meg kimutatva bizalmát felém, emberileg támaszom és lelkesítőm lett. E néhány sor adta lehetőség kevés a köszönetem kifejezésére.

Méltó köszönet jár *Prof. Dr. Furka Istvánnak*, aki atyai szeretetével és útmutatásaival segítette munkámat, egyéniségével színesítette a mindennapokat.

Köszönet illeti *Dr. Ács Gábor* adjunktus urat és *Dr. Szokoly Miklós* főorvos urat (Országos Baleseti és Rehabilitációs Intézet) szakmai-baráti segítségéért, *Dr. Sefcsik István* főállatorvos urat messzemenő készségéért és segítségéért az állatkísérletekkel kapcsolatban.

*Dr. Imre Sándor* tanár úr sokat jelentő diszkussziói, baráti beszélgetései és technikai segítsége alapvető fontosságú volt munkám során és az értekezés elkészítésénél.

Köszönettel tartozom a Magyar Haemorheologiai Társaságnak, elnökének *Prof. Dr. Tóth Kálmánnak*, valamint *Prof. Dr. Bogár Lajosnak* és lelkes munkatársaiknak önzetlen támogatásukért.

Külföldi kollaborációs partnereket, akik segítsége sokat jelentett munkám elkészítésénél, szintén köszönet illet: *Matthias Menzel* professzort (Universitätsklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Martin-Luther Universität, Halle-Wittenberg, Halle/Saale, Németország), *Oguz K. Baskurt* professzort (Department of Physiology, Akdeniz University, Faculty of Medicine, Antalya, Törökország).

Munkám nem jöhetett volna létre közvetlen munkatársaim segítségével, akiknek külön köszönetet mondok: *Dr. Lesznyák Tamás, Dr. Pető Katalin, Dr. Bráth Endre, Szabó Györgyi, Gulyás Adrienn és Bertáné Zsótér Judit*. Továbbá hálás köszönetemet fejezem ki technikai segítségéért *Dr. Csabina Sándornak*.

Sorrendiség állítása nehéz és sok tekintetben nem is lehetséges. Hálámat fejezem ki *szüleimnek* a tanulmányaim során nyújtott támogatásukért, és *feleségemnek*, támogató türelméért az időigényes munkák miatt!

Végül, nem-szentimentális köszönet illeti munkáim alapját nyújtó kísérleti állatokat, kicsiket és nagyokat...

## **10. Melléklet**

**Az értekezéshez felhasznált, megjelent *in extenso* közlemények másolata**