

Doktori (PhD) értekezés tézisei

***In vitro* és *in vivo* micro-rheologiai összehasonlító
vizsgálatok: bilhaemia és antikoagulánsok**

Mátrai Ádám Attila

Témavezető: Dr. Deák Ádám



DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2025

***In vitro* és *in vivo* micro-rheologiai összehasonlító vizsgálatok:
bilhaemia és antikoagulánsok**

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

Írta: Mátrai Ádám Attila okleveles klinikai laboratóriumi kutató

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája
(Experimentális és operatív orvostudományok programja) keretében

Témavezető: Dr. Deák Ádám

Az értekezés bírálói:

Dr. Katona Éva, PhD
Dr. Rábai Miklós, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Méhes Gábor, MTA doktora
tagok: Dr. Katona Éva, PhD
Dr. Rábai Miklós, PhD
Dr. Szabó Andrea, PhD
Dr. Fülöp Péter, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet
„A” épület előadóterme
2025. április 3. 13:00

1. BEVEZETÉS

A haemorheologia a vér sejt és plazmatikus komponenseinek áramlási tulajdonságaival foglalkozó tudományág. Különböző tényezőket foglal magában, beleértve a vér viszkozitását, a vörösvérsejtek deformabilitását és aggregabilitását, valamint a vörösvérsejtek és a plazma közötti kölcsönhatásokat. Ezek a tulajdonságok kulcsfontosságúak a megfelelő vérkeringés fenntartásához és a szövetek megfelelő oxigénellátásának biztosításához. A rendellenes haemorheológiai tulajdonságok a véráramlás károsodásához vezethetnek, ami a trombotikus események és más szív- és érrendszeri szövődmények kockázati tényezője lehet.

Bizonyos állapotok, például az embólia, stroke, trombózis befolyásolják a haemorheológiai paramétereket. Ezen állapotok mihamarabbi felismerése és kezelése nagyon fontos. Azon személyek esetében, akiknél a hajlamosító tényezők valamelyike megtalálható, a megelőzés az elsődleges szempont, melyre számos, a betegségre specifikus terápia került kidolgozásra. A használt gyógyszerek köre folyamatosan bővül, így lehetőség van a potenciálisan legalkalmasabb szer kiválasztására. Azonban, mint a legtöbb gyógyszer, így a véralvadást és thrombocyt-aggregációt gátló készítmények is hatással lehetnek a haemorheológiai változókra.

A szív- és érrendszeri betegségeken kívül egyéb kórképekben, például tumoros elváltozásokban, policisztás ovárium szindrómában, magas vérnyomás betegségben, krónikus májbetegségeken (CLD), mint a májzsugorodás vagy a nem alkoholos eredetű zsírmáj (NAFLD), megváltozhatnak a véráramlásra jellemző micro-rheológiai paraméterek. A gyakoribb májbetegségeken és sérüléseken kívül ritka kórképekben is, mint amilyen a bilhaemia, megváltozhatnak a haemorheológiai paraméterek, a májnak a véralvadásban és -szabályozásban részt vevő fehérjék szintézisében betöltött szerepe miatt.

A bilhaemia és a véralvadás közötti kölcsönhatásnak jelentős klinikai következményei lehetnek a májbetegségben vagy epevezeték-elzáródásban szenvedő betegek esetében. A véralvadási zavarok ezeknél a betegeknél trombotikus események vagy vérzéses szövődmények formájában jelentkezhetnek, a prokoaguláns és antikoaguláns faktorok közötti egyensúlytól függően. A trombotikus szövődmények, így a portális véna trombózisa, a bilhaemia által kiváltott prokoaguláns állapot miatt léphetnek fel. Ezzel szemben vérzéses szövődmények a csökkent alvadási faktortermelés, a K-vitamin-hiány és a vérlemezkék diszfunkciójának együttes hatásaiból eredhetnek.

Jelenleg kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésünkre azzal kapcsolatban, hogy a bilhaemia és a thrombocyt- és véralvadásgátló készítmények hogyan hatnak a

haemorheologiai paraméterekre. Vizsgálatunk során a bilhaemia során fellépő változásokat kívántuk megismerni patkány- és sertésmodellben, illetve egy potenciálisan új antikoaguláns készítmény hatásait feltárni és összehasonlítani a frakcionálatlan heparin által okozott változásokkal.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Célunk volt olyan patkány és sertés állatmodell kialakítása, melyek lehetőséget biztosítanak a bilhaemia széleskörű vizsgálatára.
2. A kialakított állatmodellekben tanulmányozni kívántuk a bilhaemia közvetlen hatásait a vörösvérsejtek hagyományos és ozmotikus gradiens deformabilitására, a vörösvérsejtek aggregációjára és a hemodinamikai paraméterekre.
3. Célul tűztük ki a változások dinamikájának és a fajok közötti különbségeknek a vizsgálatát.
4. Célunk volt egy olyan protokollt kidolgozni sertés modellre, ami lehetővé teszi a kettős thrombocyta- és véralvadásgátló (APAC) emelkedő dózisban történő vizsgálatát.
5. A kidolgozott protokoll szerint vizsgálni kívántuk az APAC hatásait a micro-rheologiai paraméterekre, többek között a vörösvérsejtek deformabilitására és aggregációjára.
6. Ezt követően célunk volt az APAC különböző dózisait összehasonlítani a frakcionálatlan heparin (UFH) különböző dózisaival, és következtetéseket levonni mindkét szer vonatkozásában.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérleteket az Európai Unió irányelv (63/2010 EU-irányelv) és a magyar állatvédelmi törvény (1998. évi XXVIII. törvény “Az állatok védelméről és kíméletéről”) szerint, valamint a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának jóváhagyásával végeztük (engedélyek regisztrációs számai: 17/2022/DEMÁB és 3/2021/DEMÁB).

3.1. Az epe hatása a hemodinamikai és micro-rheologiai paraméterekre bilhaemia során

3.1.1. Kísérleti állatok és mintavételi protokoll

A vizsgálatba hat egészséges, 12-14 hónapos hím Wistar (CrI:WI) patkányt (testtömeg: $458,3 \pm 24,5$ g) és hat egészséges, 12-13 hetes nőtény Hypor sertést (testtömeg: $20,8 \pm 1,7$ kg) vontunk be.

A patkányokat standard ketrecekben (Eurostandard IV, Tecniplast, Buguggiate, Olaszország) tartottuk, 22 ± 2 °C hőmérsékleten, $55 \pm 10\%$ -os páratartalom mellett, 12-12 órás világos/sötét ciklusban, vízhez és standard patkánytáphoz szabadon való hozzáféréssel.

A sertéseknek a ketrecek szellőztetését (15-20x légcsere/óra) és fűtését (központi és padlófűtés) biztosítottuk, az állatok súlyának megfelelően $22-26$ °C-os hőmérsékleti tartományban. Az állatok elhelyezése során kerültük a szélsőséges és hirtelen nagymértékű páratartalom-ingadozást, a világítás pedig 12-12 órás világos/sötét ciklusban történt. Az állatok a fajuknak megfelelő takarmánykeveréket kaptak, az itatás önitató rendszerrel történt.

3.1.1.1. Patkányokon végzett műtéti beavatkozások

Általános altatást (i.p. 100 mg/kg ketamin /CP-Ketamine hydrochloride 10%, Produlab Pharma BV, Raamsdonksveer, Hollandia/, i.p. 10 mg/kg xylazin /CP-Xylazin- hydrochloride 2%, Produlab Pharma BV, Raamsdonksveer, Hollandia/) követően egy 26 G vastagságú kanült helyeztünk be a laterális farokvénába a vérvételhez, folyadékterápiához és az epe beadásához. A jobb oldali arteria carotis communis kiperaráltuk és kanüláltuk (O.D. 0,965 mm, Polyethylene Tubing Clay Adams, 427411, BD Intramedic™, Sollentuna, Svédország).

A kanült, centrális ligatúrával történő rögzítése után invazív hemodinamikai monitorozó rendszerhez (Hemosys monitor system LD-01, Experimetria Kft., Budapest, Magyarország) csatlakoztattuk, mely az invazív vérnyomást folyamatos nyomásgörbe formájában rögzítette.

Az epegyűjtéshez median laparotomiát végeztünk, a ductus choledochust mikrosebészeti technikával kiperaráltuk és megnyitottuk, majd kanüláltuk (Micro-Renathane®, MRE-025 típus, 0,25 mm külső átmérő * 0,12 mm belső átmérő; Braintree Scientific Inc.). Egy 1 ml-es

fecskendőt 27 G tűvel csatlakoztattunk a kanülhöz. Az epét 1 órán keresztül gyűjtöttük, ami körülbelül 250 µl extrahált epetérfogatot eredményezett.

3.1.1.2. Sertéseken végzett műtéti beavatkozások

Az altatás az alábbi protokoll szerint történt: premedikáció: i.m. 1-2 mg/kg azaperon (Stresnil, Elanco GmbH, Cuxhaven, Németország), az altatás indukciójához i.m. 2 mg/kg xylazin (CP-Xylazin hydrochloride 2%), 20 mg/kg ketamin (CP-Ketamine hydrochloride 10%), a tartós altatás fenntartásához i.v. 1 mg/kg xylazin-10 mg/kg ketamin, és szükség esetén i.v. 2 mg/kg diazepam (Diazepexs 5 mg/ml, AS Grindeks, Riga, Lettország). Altatást követően az állatokat intubáltuk, a jobb oldali vena jugularis externat kanüláltuk (Certofix Trio, 7F, B.Braun Trading Ltd., Budapest, Magyarország) a vérvétel, folyadékterápia és epeadagolás céljából.

A bal oldali arteria femoralisba helyezett kanülhöz (Certofix Trio, 7F) invazív hemodinamikai rendszert (Hemosys monitor rendszer LD-01) csatlakoztattunk és az invazív vérnyomást folyamatos nyomásgörbe formájában rögzítettük.

Az epét az epehólyag közvetlen punkciójával nyertük felső median laparotomián keresztül. Ehhez 23 G vastagságú tűt és 5 ml térfogatú fecskendőt használtunk, és 5 ml epét gyűjtöttünk.

3.1.1.3. Vérvételi protokoll

A műtét és az epe beadása előtt vért vettünk a kanülált vénákból (*in vitro* vizsgálatokhoz: 1,5 ml, *in vivo* vizsgálatokhoz: 0,5 ml; véralvadásgátló: nátrium-EDTA 1,8 mg/ml). Alapméréseket végeztünk, majd vizsgáltuk az *in vitro* adott epe (500 µl teljes vér + 1 µl vagy 5 µl epe) hatását. Az *in vivo* vizsgálatokhoz a vérmintákat 5 perccel a 200 µl/kg epe intravénás bolus injekciója után vettük.

3.1.2. Laboratóriumi vizsgálatok

3.1.2.1. Haematologiai paraméterek

A haematologiai paramétereket a Sysmex K-4500 (TOA Medical Electronics Co., Ltd., Kobe, Japán) haematologiai automatával határoztuk meg. A mérés elvégzéséhez 80 µl antikoagulált vérre volt szükség. A haemoglobin tartalom (Hgb, [g/dL]) meghatározása spektrofotometriás elven történik, míg a vörösvérsejtszámot (Vvs, [$\times 10^{12}/L$]), a fehérvérsejtszámot (Fvs, [$\times 10^9/L$]), és a thrombocyta számot (Thr, [$\times 10^9/L$]) apertura-impedancia elven méri a készülék. Ezen kvantitatív paraméterekből további származtatott értékeket kalkulál, többek között a haematocrit értéket (Hct, [%]), az átlagos vörösvérsejt

térfogatot (MCV, [fL]), az átlagos vörösvérsejt haemoglobin tartalmat (MCH, [pg]) és az átlagos vörösvérsejt haemoglobin koncentrációt (MCHC, [g/dL]).

3.1.2.2. *Vörösvérsejt hagyományos és ozmotikus gradiens deformabilitás*

A vörösvérsejtek deformabilitásának meghatározásához a LoRRca Maxis Osmoscan ektacytométert (RR Mechatronics International B.V., Zwaag, Hollandia) használtuk. A készülék egy statikus hengerből (*bob*) és egy forgatható hengerköpenyből (*cup*) áll (Coutter-rendszer). A vérmintát a *bob* és a *cup* közötti 0,3 mm-es résbe juttatjuk be. A mérés fény-reflektancián alapul, a vérmintákat nyírásnak kitéve és lézerrel megvilágítva a visszavert fény diffrakciós mintázatot hoz létre, ami arányos a sejtek elnyújthatóságával. A nyírófeszültség (SS, Pa; tartomány: 0,3-30 Pa) függvényében határoztuk meg az erythrocyták deformabilitását jellemző elongációs indexet (EI). A hagyományos deformabilitás mérések elvégzéséhez 2 mL polivinilpirrolidon (PVP)-PBS oldatot (PVP: 360 kDa, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA; PVP-PBS oldat viszkozitása = 30,5 mPas, ozmolalitás = 303 mOsmol/kg, pH = 7,5) óvatosan szuszpendáltunk 10 µL mintával (teljes vér vagy vér-epe szuszpenzió). A készülék temperálható, minden mérést 37 °C-on végeztünk. Az EI-SS görbékből összehasonlítható adatokat számoltunk: EI értékek 3 Pa-nál, és a Lineweaver-Burk egyenlet ($1/EI = SS_{1/2}/EI_{max} \times 1/SS + 1/EI_{max}$) segítségével az egyes EI-SS görbéket parametrizáltuk, így megkaptuk a maximális elongációs indexet (EI_{max}), és a maximális elongációs index feléhez tartozó nyírófeszültséget ($SS_{1/2}$, Pa). Az eredmények értékelése során az alacsonyabb EI vagy EI_{max} , és a magasabb $SS_{1/2}$ értékek a vörösvérsejtek csökkent deformálhatóságát jelezték.

Az ozmotikus gradiens deformabilitás (osmoscan) méréshez 250 µL mintára és 5 ml, az előző bekezdésben részletezett izotóniás PVP-PBS oldatra volt szükség. A készülék alacsony (0 mOsm/kg) és magas ozmolalitású (500 mOsm/kg) PVP-oldatokat kever a mintával, így a szuszpendáló közeg ozmolalitása folyamatosan változik. Az EI meghatározása állandó nyírófeszültség (30 Pa) mellett történik. Az elongációs indexet folyamatosan regisztrálja a készülék az adott ozmolalitás érték függvényében. A mérés eredménye egy jellegzetes EI-ozmolalitás (O) görbe, melynek számos jellemző pontja van. Az alacsony ozmolalitás tartományban a minimális nyúlási index (EI_{min}) és a hozzá tartozó ozmolalitásérték (O min), a maximális nyúlási index (EI_{max} , ami nem azonos a Lineweaver-Burk-egyenlet szerinti EI_{max} értékkel, lásd fentebb) és az O (EI_{max}), a magasabb ozmolalitás tartományban pedig az EI hyper (a magas ozmolalitású környezetben a maximális nyúlási index fele) és az O hyper. Minden EI-O görbe alatti területet kiszámítottunk (Area). További paramétereket, mint ΔEI (a maximális és minimális EI értékek abszolút különbsége), ΔO (az ozmolalitás értékek abszolút

különbsége a maximális és minimális EI-nél), valamint arányértékeket, mint EI_{max}/EI_{min} (rEI), $O(EI_{max})/O_{min}(rO)$, $\Delta EI/\Delta O$ és rEI/rO , szintén kiszámítottuk.

3.1.2.3. Vörösvérsejt aggregatio

A vérminták aggregációs index értékének meghatározásához a Myrenne MA-1 aggregométert (Myrenne GmbH, Roetgen, Németország) használtuk. A mérés fénytranszmissziós fotometriai módszeren alapul. A vizsgálathoz 20 μ l antikoagulált vérre volt szükség. A disaggregatio (nyírási sebesség: 600 s^{-1}) utáni 5. vagy 10. másodpercben a transzmittált fényt határoztuk meg stasisban (M értékek, nyírási sebesség: 0 s^{-1}) vagy alacsony nyírási sebesség (M1 értékek, nyírási sebesség: 3 s^{-1}) mellett. A méréseket szobahőmérsékleten ($20\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) végeztük. A magasabb indexértékek (M 5 s, M1 5 s, M 10 s, M1 10 s) fokozott vörösvérsejt aggregációt jelentenek.

3.1.3. Statisztikai analízis

A kísérlethez szükséges esetszám (mintanagyság) becsléséhez a Mead-féle egyenletet (Mead's resource equation) használtuk. A statisztikai elemzéseket a SigmaStat Software 3.1.1.0. programmal végeztük (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Az adatokat átlag \pm S.D. (standard deviation, szórás) formában tüntettük fel. Az adatok eloszlásának normalitását Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk, és ennek megfelelően a csoportokon belüli különbségeket Student féle t-próbával vagy Mann-Whitney rank sum teszttel, a csoportok közötti különbségeket egyirányú variancianalízissel (one-way ANOVA) vagy Kruskal-Wallis teszttel hasonlítottuk össze. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ értéknél határoztuk meg.

3.2. Kettős thrombocyta- és véralvadásgátló (APAC) szer hatása a vörösvérsejtek deformabilitására és aggregációjára sertésmodellben

Jelen kutatás egy kooperatív tanulmány volt a Helsinki Egyetem Központi Kórházával (Prof. Dr. Riitta Lassila és Dr. Annukka Jouppila) és a Debreceni Egyetem Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszékével (Dr. Bagoly Zsuzsa).

3.2.1. Kísérleti állatok és mintavételi protokoll

3.2.1.1. Az APAC hatása a haemorheológiai paraméterekre

A kutatásba 12-13 hetes nőstény Hypor sertések ($n=5/\text{csoport}$; testtömeg: $23,6 \pm 1,58\text{ kg}$) kerültek bevonásra. Altatásban, a 3.1.1.2. fejezetben leírt altatási protokoll szerint, mindkét oldali vena jugularis externaba kanült (Certofix Trio, 7F, B.Braun Trading Ltd., Budapest, Magyarország) helyeztünk. A jobb oldali vénán keresztül történtek a vérvételek vacutainer

csövekbe (BD Vacutainer® csövek, 1,8 mg/ml K₃-EDTA; Becton, Dickinson and Company, USA), míg a vivőanyagot (1 mL 137 mM NaCl és 10 mM Na₂HPO₄, pH: 7,5) és a vizsgált anyagot (APAC; 7,84 mg/ml; Aplagon Ltd/Cadila Pharmaceuticals Ltd.) intravénásan (i.v.) a bal oldali vénán keresztül adtuk be. A kanülálást követően a vizsgálat során mindkét oldalon (jobb és bal oldali vena jugularis externa) folyamatos folyadékpótlást biztosítottunk fiziológiás sóoldattal (1080,4 ± 45,9 ml, „Baxter” Nátrium-klorid 0,9%, pH= 4,5-7, ozmolaritás: 308 mOsm/l, Baxter Hungary Kft.).

A vizelet elvezetéséhez suprapubicus cystostomia során katétert helyeztünk a hólyagba. A légzés segítésére endotrachealis tubust helyeztünk a légcsőbe (WATO EX-20Vet, Shenzhen Mindray Animal Medical Technology Co., LTD., Kína). A PaCO₂-t 35-45 Hgmm-re, a PaO₂-t pedig 100-130 Hgmm-re állítottuk be.

A vizsgálat kezdetén mindkét csoportnak vivőanyagot (1 mL 137 mM NaCl és 10 mM Na₂HPO₄, pH: 7,5) injektáltunk a bal oldali vénán keresztül, majd 5 perccel később vérvételre került sor. A vivőanyag negatív kontrollként szolgált, mivel a Na₂HPO₄ alacsony végkoncentrációja miatt várhatóan nem befolyásolta az állatok hemosztázisát. Ezt követően az APAC-ot 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg és 0,75 mg/kg eszkalálódó dózisban adtuk be i.v. A jelenlegi becsült klinikai i.v. bolus adagolás kompatibilis a 0,25-0,5 mg/kg dózissal (kb. 45-90 NE/kg heparin), míg a 0,75 mg/kg a toxikológiai program alapján a maximális megengedhető mennyiséget meghaladja. A hatóanyagot tartalmazó készítmények térfogata 4 ml volt. A Kontroll csoport állatai csak a hatóanyag nélküli vivőanyagot kapták. A beadott vivőanyag térfogata megegyezett a hatóanyagot kapott csoportnak beadott vivőanyag térfogatával (0,25 mg/kg dózis esetén 3,77±0,004 ml; 0,5 mg/kg dózis esetén 3,57±0,04 ml; 0,75 mg/kg dózis esetén 3,36±0,06 ml). A vizsgálat végén az APAC hatását 140 NE/kg protamin-szulfát (1400 antiheparin NE/ml, lot F2084FII, Leo Pharma, Dánia) beadásával semlegesítettük, visszafordítottuk, és 15 perccel később vért vettünk. A kutatás kooperatív tanulmány volt, így koagulációs biomarker-vizsgálathoz is vettünk vérmintákat a meghatározott időpontokban.

3.2.1.2. Az APAC és a frakcionálatlan heparin összehasonlítása

A kutatás ezen szakaszába újabb, 12-13 hetes nőstény Hypor sertések (n=5/csoport; testtömeg: 23,3±1,06 kg) kerültek bevonásra. A korábban leírtakkal megegyező protokoll szerint történt altatást követően a jobb oldali vena jugularis externan keresztül történtek a vérvételek vacutainer csövekbe (BD Vacutainer® csövek, 1,8 mg/ml K₃-EDTA; Becton, Dickinson and Company, USA). A vivőanyagot (1 mL 137 mM NaCl és 10 mM Na₂HPO₄, pH: 7,5) és az APAC-ot vagy UFH-t (Heparibene Na 25000 IU, Ratiopharm Arzneimittel Vertriebs

GmbH.) a bal vena jugularis externan keresztül i.v. injektáltuk. Ezen fázisban a 0,5 mg/kg (a maximális klinikai APAC-dózis, kb. 90 NE/kg heparin i.v.) és a 0,75 mg/kg dózisú készítmények hatását hasonlítottuk össze. Először a vivőanyagot adtuk be, ezt követően az APAC vagy az UFH alacsony (0,5 mg/kg), majd magasabb (0,75 mg/kg) bolus dózisát. Az első vérmintát 5 perccel a vivőanyag beadása után vettük, és alapértéknek tekintettük; a további mintavételek 15 perccel a vizsgált anyagok beadása után történtek.

3.2.2. Laboratóriumi vizsgálatok

3.2.2.1. Haematologiai paraméterek

Az APAC hatásainak vizsgálata során a kvantitatív és kvalitatív haematologiai változókat a Siemens Advia-120 haematologiai automatával a Multi Species program használatával mértük le. Az APAC és a frakcionálatlan heparin összehasonlítása során a paraméterek vizsgálatát a 3.1.2.1. fejezetben ismertetett módszer szerint a Sysmex K-4500 haematologiai automatával határoztuk meg.

3.2.2.2. Vörösvérsejt hagyományos deformabilitás és membrán (mechanikus) stabilitás

A vörösvérsejt hagyományos deformabilitás méréseket a 3.1.2.2. fejezetben leírt LoRRca MaxSis Osmoscan ektacytométerrel végeztük az ismertetett hagyományos deformabilitás mérési protokoll szerint az alábbi (PVP)-PBS oldat felhasználásával: PVP: 360 kDa, Sigma-Aldrich Co. USA; PVP-PBS oldat viszkozitás = 30,4 mPas, ozmolalitás = 302 mOsmol/kg, pH = 7,2.

A vörösvérsejt membrán (mechanikus) stabilitás mérésekhez a mintaelőkészítés a hagyományos deformabilitás méréseknél leírt módon történt. A vizsgálat során hagyományos deformabilitás mérés történt, majd ezt követően mechanikus stressznek tettük ki a sejteket 100 Pa nyírófeszültségen 300 másodpercig, melyet egy újbóli deformabilitás mérés követett. A kiértékelés során a mechanikus stressz előtt és után mért deformabilitás értékek arányait (előtte/utána arány) hasonlítottuk össze.

3.2.2.3. Vörösvérsejt aggregatio

A vörösvérsejtek aggregációját a LoRRca MaxSis Osmoscan ektacytométer (Mechatronics BV, Hollandia) készülékkel vizsgáltuk. A mérés során a lézerrel megvilágított mintáról visszaverődő lézerfényt (laser backscattering method) detektálja a készülék, mely során egy jellegzetes intenzitás-idő görbét kapunk. A korábban már említett Couette-rendszerbe kell a natív vérmintákat injektálni, amit a készülék megforgat, ezzel disaggregálva a mintát, majd a rotor ezután gyorsan leáll, lehetővé téve a vérmintáról való fényvisszaverődésnek a

detektálását. Vizsgálataink során az aggregációs index (AI [%]) paraméterek elemzését végeztük el, mely az intenzitásmaximum megjelenésétől a 10. másodpercig visszaverődő fény intenzitásváltozásából ($I_{sc_{top}} - I_{sc_0}$) származó görbe feletti terület (A) görbe feletti és alatti terület (B) összegéhez viszonyított aránya: $AI = A/(A+B)$. Ezen felül a készülék meghatározza az amplitúdót, a vizsgálat során a maximális és minimális intenzitás értékek közötti különbséget (Amp, [au]), valamint a fél-amplitúdó-időt, a maximális intenzitás értékek megjelenésétől az amplitúdó felének eléréséig szükséges időt ($t_{1/2}$, [s]). A mérésekhez 750-1000 μ l teljes vérre volt szükség. A készülék temperálható, 37 °C-on történtek a vizsgálatok.

3.2.3. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzések elvégzésére a SigmaStat Software 3.1.1.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) programot használtuk. Az adatokat átlag \pm S.D. formában fejeztük ki. Az esetszámot a G*power statisztikai programmal becsültük meg. A Kolmogorov-Smirnov-féle normalitásvizsgálat eredményei alapján a csoportok közötti különbségeket Student t-próbával vagy Mann-Whitney teszttel, az egyes vérvételek közötti különbségeket párosított t-próbával vagy Wilcoxon teszttel és ismételt mérések ANOVA (repeated measures ANOVA) vagy Friedman-teszttel elemeztük. A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az epe hatása a hemodinamikai és micro-rheologiai paraméterekre bilhaemia során

4.1.1. Hemodinamikai paraméterek

Az egyszeri dózisú epe bolus beadása után az artériás középnyomás (MAP) és a szívfrekvencia (HR) gyorsan csökkenni kezdett. A két faj tekintetében a csökkenéshez, majd az ezt követő normalizálódáshoz eltérő időre volt szükség. Patkányoknál az értékek rövid időn belül normalizálódtak, míg sertéseknél a helyreállítás sokkal lassabb volt.

4.1.2. Haematologiai paraméterek

A patkányoknál enyhe emelkedés volt megfigyelhető az intakt vérhez képest számos paraméter tekintetében, a fehérvérsejtszámot kivéve, ami kismértékű csökkenést mutatott. A haemoglobin ($p=0,002$ vs. $1 \mu\text{l}$ epe; $p=0,015$ vs. $5 \mu\text{l}$ epe; $p=0,048$ vs. *in vivo* $200 \mu\text{l/kg}$ epe) és a haematocrit értékek ($p<0,001$ vs. $1 \mu\text{l}$ epe; $p=0,006$ vs. $5 \mu\text{l}$ epe; $p<0,001$ vs. *in vivo* $200 \mu\text{l/kg}$ epe) szignifikáns változása volt tapasztalható az intakt vérhez viszonyítva. Ezzel szemben a sertéseknél a legtöbb paraméter enyhe csökkenése vagy stagnálása volt megfigyelhető az intakt vérhez képest.

4.1.3. Vörösvérsejt hagyományos és ozmotikus gradiens deformabilitás

Az elongációs index-nyírófeszültség görbék kiértékelésekor a fajok között különböző eltéréseket figyeltünk meg. Patkányoknál mind *in vitro*, mind az *in vivo* epe bolus beadása után az elongációs index értékek csökkenése, majd növekedése volt megfigyelhető az alacsony nyírófeszültség-tartományban ($<3 \text{ Pa}$), amit a magasabb nyírófeszültség-tartományban ($>3 \text{ Pa}$) normalizálódás követett az intakt teljes vérhez képest. Sertésekben $1 \mu\text{l}$ epe *in vitro* beadását követően az EI értékek csökkenése volt megfigyelhető, míg $5 \mu\text{l}$ epe *in vitro*, illetve $200 \mu\text{l/kg}$ epe *in vivo* beadását követően az alacsony nyírófeszültségi tartományban ($<3 \text{ Pa}$) az EI értékek növekedése, magas nyírófeszültségi tartományban ($>3 \text{ Pa}$) pedig csökkenése volt tapasztalható az intakt teljes vérhez képest.

4.1.4. Vörösvérsejt aggregatio

Az aggregatio vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a patkány vörösvérsejtek érzékenyebben reagáltak mind az *in vitro*, mind az *in vivo* adott epére.

Patkányoknál a két *in vitro* és az *in vivo* dózist összehasonlítva az *in vitro* $5 \mu\text{l}$ epe szignifikánsan csökkentette az aggregációs index értéket az intakt teljes vérhez ($p<0,001$) és az *in vitro* $1 \mu\text{l}$ epéhez képest (M 5 sec, M1 5 sec és M 10 sec: $p<0,001$; M1 10 sec: $p=0,017$)

mind a 4 paraméter tekintetében. A 200 µl/kg epe *in vivo* beadását követően az aggregációs index értékekben szignifikáns különbségeket figyeltünk meg a dózisok között statikus körülmények között 5 másodperccel (M 5 sec) a disaggregatio után ($p=0,002$ vs. alap, $p=0,003$ vs. 1 µl epe). A másik három paraméter (M1 5 sec, M 10 sec, M1 10 sec) esetében mérhetően alacsony értékeket kaptunk.

Sertésekben nem tapasztaltunk szignifikáns változást az aggregációs index értékekben, amikor az intakt teljes vér és az *in vitro* vagy *in vivo* epe hatását vizsgáltuk, ellentétben a patkányoknál megfigyelt szignifikáns különbségekkel.

4.2. Kettős thrombocyta- és véralvadástgátló (APAC) szer hatása a vörösvérsejtek deformabilitására és aggregációjára sertésmodellben

4.2.1. Az APAC hatása a haemorheologiai paraméterekre

4.2.1.1. Haematologiai paraméterek

Összességében a teljes vérkép (complete blood count, CBC) nem változott jelentősen, néhány paraméter tekintetében volt megfigyelhető kisebb eltérés. Minden változó a kísérlet során a biológiailag normális tartományban maradt. A haematologiai változók enyhe változását tapasztaltuk minden egyes dózis után, melyek néhány esetben statisztikailag szignifikánsak voltak (Hct: $p=0,008$; Plt: $p=0,031$), de minden esetben az értékek a biológiailag normál tartományon belül változtak.

4.2.1.2. Vörösvérsejt deformabilitás

Az mérés során kapott EI-SS görbék esetében a Lineweaver-Burk-egyenlet alapján összehasonlítottuk a 3 Pa-nál mért nyúlási index értékeket, a maximális EI-t és a maximális EI feléhez tartozó SS értékeket: $1/EI = SS_{1/2}/EI_{max} \times 1/SS + 1/EI_{max}$.

A görbék parametrizálásával kapott adatokat összehasonlítva megfigyelhető volt, hogy magasabb nyírófeszültségnél (30 Pa) a maximális EI-értékek a kezelt csoportban romlottak. 75 perccel a 0,5 mg/kg-os dózis után ezek a csökkenések szignifikáns értéket értek el a Kontroll csoporthoz képest ($p=0,024$). Néhány paraméter szignifikánsan csökkent az APAC csoportban 15 perccel a protamin-szulfát beadása után (EI_{max} : $p=0,032$ vs. Kontroll csoport; EI_{max} : $p=0,047$, $SS_{1/2}$: $p=0,026$, $EI_{max}/SS_{1/2}$: $p=0,034$ vs. 5 perccel a vivőanyag beadás után).

4.2.1.3. Vörösvérsejt membrán (mechanikus) stabilitás

A 3 Pa-on mért elongációs index értékek kismértékű csökkenése volt megfigyelhető az APAC csoportban a vivőanyag beadása után mért értékekhez képest. 75 perccel a 0,25 mg/kg

dózis beadása után szignifikáns különbség volt mérhető az APAC és a Kontroll csoport között ($p=0,043$). Ezzel szemben a maximális elongációs index értékek növekedését tapasztaltuk a vizsgált készítmény mindkét dózisa után az alapértékhez képest. A többi paraméter tekintetében az $SS_{1/2}$ esetében kismértékű csökkenést, míg az $EI_{max}/SS_{1/2}$ esetében enyhe emelkedést tapasztaltunk, mely változás egyik dózist követően sem mutatkozott szignifikánsnak.

4.2.1.4. Vörösvérsejt aggregatio

A fényvisszaverődésen alapuló vörösvérsejt-aggregatio mérés során az aggregációs index értékekben nem figyeltünk meg különbséget a csoportok között. Az APAC csoportban az aggregációs index enyhe növekedése volt megfigyelhető az egyes dózisos beadása után a Kontroll csoporthoz képest, de ez az enyhe növekedés nem volt szignifikáns.

4.2.2. Az APAC és a frakcionálatlan heparin összehasonlítása

4.2.2.1. Haematologiai paraméterek

Az APAC csoportban megfigyelt enyhe hemokoncentráció az UFH-csoportban is megfigyelhető volt mindkét adag után. Az UFH-csoportban a vérlemezkeszám relatív növekedését tapasztaltuk a kiindulási értékhez képest ($p=0,01$ vs. $0,5$ mg/kg). Ezzel szemben az APAC csoportban a vérlemezkeszám relatív csökkenését tapasztaltuk mindkét dózis után ($p<0,001$ vs. alap). Bár egyes haematologiai értékek szignifikánsan megváltoztak, biológiailag mind a fajra vonatkozó normál laboratóriumi tartományon belül maradtak.

4.2.2.2. Vörösvérsejt deformabilitás

Az EI-SS görbékét összehasonlítva, alacsony nyírófeszültségnél (<3 Pa) mindkét szer hasonló változásokat okozott, az EI értékek növekedése volt megfigyelhető. Ezzel szemben magasabb nyírófeszültségnél az APAC csoportban enyhe csökkenés, míg az UFH csoportban további javulás volt tapasztalható.

A $0,75$ mg/kg UFH adagolása szignifikáns növekedést okozott ($p<0,001$ vs. alap) a 3 Pa nyírófeszültségnél mért nyúlási index értékekben. Az APAC csoportban a görbéken a magasabb nyírófeszültségnél megfigyelhető romlás a maximális nyúlási index (EI_{max}) értékek romlásában is jelen volt. Mindkét dózis szignifikánsan csökkentette az EI_{max} értéket ($0,5$ mg/kg $p=0,024$; $0,75$ mg/kg $p=0,023$ vs. alap), ami a vörösvérsejtek nyúlásának romlását jelzi magasabb nyírófeszültségnél. A $0,75$ mg/kg dózisú APAC által okozott romlás szignifikáns volt az UFH azonos dózisához (kb. 135 NE/kg) képest ($p=0,009$).

4.2.2.3. Vörösvérsejt membrán (mechanikus) stabilitás

A mechanikus stressz előtt és után mért értékek arányait összehasonlítva szignifikáns változást a különböző dózisok, illetve a csoportok között sem tapasztaltunk. Enyhe fokú változások megfigyelhetőek voltak, de egyik vizsgált készítmény sem okozott olyan mértékű elváltozást a sejtek membránjában, összetételében, melynek következtében a mechanikus stressznek nem lettek volna képesek ellenállni.

4.2.2.4. Vörösvérsejt aggregatio

Az APAC és az UFH 0,5 mg/kg-os dózisa enyhén növelte az aggregatio mértékét a kiindulási értékhez képest. Ez a fokozódás nem volt szembetűnő a 0,75 mg/kg dózis esetében. Mindkét szernél hasonló változások voltak megfigyelhetők a vizsgált dózisoknál, amelyek sem a szerek, sem a dózisok esetében nem voltak szignifikánsak.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az epe hatása a hemodinamikai és micro-rheologiai paraméterekre bilhaemia során

Az artériás középnyomás az egyszeri epe bolus intravénás adását követően csökkenést mutatott mindkét vizsgált faj tekintetében. Patkányoknál a fehérvérsejtszám kivételével minden haematologiai paraméter növekedést mutatott *in vitro* és *in vivo* epe adását követően is, ezzel szemben a sertéseknél enyhe csökkenést vagy stagnálást figyeltünk meg. A vörösvérsejtek hagyományos és ozmotikus gradiens deformabilitásában nem észleltünk jelentős változásokat. A vörösvérsejt aggregatio nagymértékű csökkenését figyeltük meg patkányokban *in vitro* 5 µl epe beadása után. Az *in vivo* injektált epe hatására az aggregatio a detektálási határ alá csökkent. Sertésekben nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az aggregációs index értékekben.

A bilhaemia dózisának kiszámítása az 1 µl-es *in vitro* dózison alapult. Ennek megfelelően 1 µl epét adtunk 500 µl teljes vérhez, ami 0,2%-os epe-vér szuszpenziót eredményezett. A patkányok átlagos vértérfogata 54-70 ml/kg, míg a sertéseké 56-69 ml/kg. Tehát a patkányok keringő vértérfogata 25-32 ml, a sertéseké pedig 1165-1435 ml között változott. A 200 µl/kg epe *in vivo* beadását követően körülbelül 0,2-0,3%-os epe-vér arányt tudtunk elérni.

Korábbi tanulmányok igazolják, hogy az epesavak befolyásolják a vérnyomást és a szívfrekvenciát. Ezen vizsgálatok kimutatták, hogy a szívbetegségek az epesavak rendellenes anyagcseréjének következményei lehetnek. A szívfrekvencia-variabilitás, a stresszre adott érzékenység és a QT-intervallum megnyúlása olyan állapotokhoz kapcsolódhat, mint a primer epeúti cholangitis és a terhességi intrahepaticus cholestasis, amelyek növelhetik a kardiovaszkuláris szövődmények kockázatát. Továbbá a cirrhoticus cardiomyopathia - a májsugorodás gyakori következménye, a QT-intervallum megnyúlása, valamint szisztolés vagy diasztolés elégtelenség jellemzi - során az epesavak szintén befolyásolhatják a kardiovaszkuláris funkciót.

Annak magyarázatára, hogy az epesavak hogyan okozhatnak bradycardiát három elméletet állítottak fel: (1) monoreteget hoznak létre a sejtmembrán felszínén, ezáltal mechanikai interferenciát okoznak, (2) csökkentik a kalcium lassú befelé irányuló áramlását, így megakadályozva a membránt az akciós potenciálok vezetésében, és (3) antimuscarin antagonistaként működnek, mivel a fizosztigmin felerősítheti vagy ellensúlyozhatja a hatásukat.

Ezenkívül az epehólyag-gyulladás olyan idegi reflexeket válthat ki, amelyek csökkentik a vérnyomást és a pulzusszámot, és esetleg ischaemiás károsodást vagy szívmegállást

okozhatnak. A szívfrekvenciát és az artériás vérnyomást befolyásolhatja a koszorúér-szűkület, amelyet az epehólyag tágulása és a koszorúér-véráramlás változása közötti kapcsolat idéz elő.

Kimutatták, hogy az epesavak eryptosist, vagyis az erythrocyták sejthalálát okozzák. A folyamatot, amelynek során az epesav hatására a vörösvérsejtek több kalciumot vesznek fel, a kationcsatornák aktiválódása közvetíti. Ez megemeli a citoszolikus Ca^{2+} aktivitást, és végül eryptosist okoz, amelyet a sejtfelszínen a foszfatidil-szerin expozíciója jellemez. Továbbá azt is bizonyították, hogy az epesó-asszociált hemolízis részben kalcium-mediált. Az epesavak koncentrációja, amelyek az eryptosis kiváltásához szükségesek, nagyobbak, mint a hemolízishez szükségesek.

A humán epe- és vörösvérsejt-lipidek változását a testmozgás is befolyásolja. Ezenkívül a vörösvérsejtek megnövekedett eloszlási szélességét (RDW) összefüggésbe hozták a terhességi intrahepaticus cholestasissal, amely az epeáramlást károsító rendellenesség.

Egyes kutatások eredményei azt mutatják, hogy a vörösvérsejtek kalciumfelvételét befolyásolja az epesavtartalom. A humán erythrocyták *in vitro* kalciumot vesznek fel, ha epesavaknak vannak kitéve, és a felszívódó kalcium mennyisége függ az epesavak koncentrációjától. Az epesók nagy dózisban hemolízist okoznak azért, hogy a sejtmembrán lipid összetevőit ko-micellizálják. Azonban egyelőre nem meghatározott mechanizmusok révén az epesók alacsonyabb koncentrációban is hemolízishez vezethetnek. Az epesók jelenlétében a kalciumfelvétel 4-25-szörösére emelkedhet, és a felszívódó kalcium mennyisége az epesók koncentrációjától függ. Ennek a növekedésnek a mértékét az ATP-csökkenésnek vagy a trifluoperazinnal való expozíciónak tulajdonították, amelyek csökkentik a vörösvérsejtek kalciumpumpa-aktivitását. Továbbá a kalcium növeli az epesók hemolitikus aktivitását, ez a hatás 100 mM KCl/50 mM NaCl-t tartalmazó pufferben a legnagyobb. Összefoglalva, az epesók koncentrációja határozza meg a vörösvérsejtek kalciumfelvételének mértékét, amelyet az epesav koncentrációja befolyásol.

Az epesavak serkenthetik a nátriumfelvételt és/vagy az intracelluláris kálium exportját az erythrocytákba, ami lízist eredményezhet. Ezen túlmenően a ceramid és a Ca^{2+} bejutása is hasonló hatással bír, mint az epesavak az eryptosis stimulálásában.

Az epesavak összetételében jelentős eltérések vannak a patkányok, sertések és emberek között. A vizsgálatok azt mutatják, hogy a patkányokból és sertésekből származó epeminták jelentős mennyiségi különbségeket mutatnak a különböző epesavak, köztük a taurokolsav (TCA) és a glikokolsav (GCA) mennyiségében, egyes esetekben 400%-ot meghaladó eltérésekkel. Továbbá kutatások kimutatták, hogy a plazma, a vizelet és az epesavak, valamint azok metabolitjainak összetételében jelentős különbségek vannak a különböző fajok között, a

törpemalacok, a patkányok és az egerek mutatják a legkülönbözőbb epesavprofilokat az emberhez képest. Az epesavak összetétele és a bélben lévő kalcium-ionofór aktivitása közötti lehetséges összefüggést sugallta egy sertéseken végzett vizsgálat, amely az epesavak bélnedv-szekrációs aktivitása és az epesavak tulajdonságai közötti kapcsolatra vonatkozott.

Az epesavösszetétel különböző fajoknál tapasztalt eltérései mögött számos tényező állhat. Ezek a változók magukban foglalják az epesavak enterohepatikus keringésének, a bélrendszeri felszívódásnak és a máj anyagcseréjének eltéréseit. Továbbá a különböző fajok eltérnek egymástól az epesavtranszporterek, valamint az epesavak szintézisében és metabolizmusában részt vevő enzimek expressziójában és aktivitásában. A kalciumtranszport és az ionofór-aktivitás két olyan fiziológiai és farmakológiai folyamat, amelyet az epesavösszetétel fajspecifikus eltérései befolyásolhatnak. Összefoglalva, számos bonyolult és multifaktoriális változó, beleértve a bélrendszeri felszívódás, az enterohepatikus keringés, a máj anyagcseréjének, valamint az epesavtranszporterek és -enzimek expressziójának és aktivitásának eltéréseit, hozzájárul az epesavösszetétel fajok közötti különbségeihez, és így a bilhaemia okozta haemorheológiai és mikrokeringési különbségekhez.

Tanulmányunk limitáló tényezői közé tartozik, hogy csak két állatfajt vizsgáltunk. *In vitro* csak két dózist alkalmaztunk, és rövid inkubációs időt használtunk *in vivo* kísérleteinkben, így csak akut változásokat tudtunk kimutatni. A jelen kutatás másik korlátja a sertés és a patkány közötti anatómiai különbség: a sertések rendelkeznek epehólyaggal, a patkányok viszont nem. A sertéseknek az emberhez hasonlóan jól körül határolt epehólyagjuk van, de a patkányoknál ez az anatómiai struktúra hiányzik. Ez a tény befolyásolta az epe levételének módszerét: patkányoknál az epét a kanülált ductus choledochusból gyűjtöttük, sertéseknél az epét közvetlenül az epehólyagból nyertük.

5.2. Kettős thrombocyta- és véralvadásgátló (APAC) szer hatása a vörösvérsejtek deformabilitására és aggregációjára sertésmodellben

A különböző hatásmechanizmusú antitrombotikus szerek kombinációjával járó vérzésemes szövődmények fokozott kockázata felkeltette az érdeklődést a kettős thrombocyta- és véralvadásgátló (APAC) hatással rendelkező kardiovaszkuláris terápiák kifejlesztése iránt. A természetben előforduló heparin-proteoglikánokat bioszintetikus alternatívák alapjául használva a fehérjekonjugált UFH-láncok ígéretes útvonalat kínálnak. Adataink szerint az APAC micro-rheológiai tulajdonságai nem különböznek az UFH-tól, így nem vetődtek fel különleges biztonsági kérdések ezzel az új, természetben előforduló HEP-PG mimetikummal kapcsolatban.

In vivo vizsgálatunk azt mutatta, hogy az APAC eszkalált bolus dózisban jelentősen nem befolyásolta a teljes vérképet (CBC), de a protamin-szulfáttal történt semlegesítés után a vérlemezkeszám némileg csökkent. A 0,25 mg/kg-tól 0,5 mg/kg-ig (kb. 45-90 NE/kg heparin) bolusokban alkalmazott adagolási séma klinikailag releváns volt, de a legmagasabb, 0,75 mg/kg-os dózis meghaladta a megengedett maximális dózist. Az APAC egészséges önkénteseken történő beadásáról nem publikált adatokkal rendelkezünk, amelyek alapján szintén elmondható, hogy a CBC értékeit nem befolyásolta.

Mind az APAC, mind az UFH fokozta a vörösvérsejt aggregációt. Alacsony nyírófeszültségnél mindkét kezelésnél a vörösvérsejtek deformabilitásának javulása volt megfigyelhető, viszont magasabb nyírófeszültségnél a vörösvérsejtek deformabilitása romlott, ami hozzájárulhatott a fokozott vörösvérsejt aggregációhoz. A heparinhoz képest az APAC hasonló, de kisebb mértékű micro-rheologiai változásokat okozott, amelyek *in vivo* fiziológiailag nem voltak jelentősek. Bár a haematologiai paraméterekben tapasztaltunk némi változást, de ettől függetlenül a fajra vonatkozó biológiailag normális laboratóriumi tartományon belül maradtak. A heparint széles körben alkalmazzák a klinikumban a tromboembólia kezelésére és véralvadásgátlóként, például az extrakorporális membránoxigenizáció (ECMO) során. A vörösvérsejtek kezdeti hyper-aggregációja a kardiovaszkuláris betegségben szenvedő betegek többségénél megfigyelhető. A heparinnal, azaz UFH-val vagy APAC-kal történő kezelés ezeknél a betegeknél potenciálisan befolyásolhatja a vér rheológiáját.

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az UFH-val szemben az APAC reno-protéktív volt akut ischaemiás vesekárosodásban. Hasonló előzetes kísérleti adatok jelentek meg szívinfarktus és stroke esetében is. Az APAC, mint heparin proteoglikán-mimetikum gátolja az intrinsic alvadási útvonal és a thrombin által indukált alvadást, ugyanakkor a hagyományos heparinoktól eltér a vérlemezke aggregatio és a prokoaguláns aktivitás gátlásában. A kollagén indukálta thrombocytá-aggregációt az UFH nem befolyásolja, sőt fokozza, míg az APAC dóziszfüggő módon mérsékli a vérlemezke-aggregációt és a kollagénfelületeken való lerakódást. A vérlemezke-indukált trombozist az APAC nagy nyírási sebességek mellett megakadályozza, míg UFH jelenlétében ezek az erek elzáródnak. Kollagénnel bevont arteriovenosus-shunt modellben az APAC helyi adagolása csökkentette mind a thrombocytá-, mind a fibrinlerakódást. PET-vizsgálatok kimutatták, hogy az APAC az UFH-hoz képest célzottan és hosszabb retenciós idővel kötődik a sérülés helyéhez.

A hatékony acetilszalicilsav (ASA) gátlással rendelkező betegeknél alacsonyabb plazmafibrinogénszintet és vörösvérsejt-aggregációs értékeket mértek a nem hatékony

acetilszalícilsav-gyógyszerrel (ASA-rezisztencia) rendelkező betegekhez képest. Az erythrocyták fraktáldimenziója csökken az aszpirinkoncentráció növekedésével, így az aggregatio mértéke is csökken. Ugyanakkor az aszpirinkoncentráció és a nyíróerő növekedésével nő a vörösvérsejtek deformabilitási indexe, azaz javul a nyúlási képességük. Az ASA az APAC-kal együtt fokozza a vérlemezke aggregatio-gátló potenciált, bár az APAC nem befolyásolja közvetlenül a tromboxán útvonalat.

Vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a vörösvérsejtek deformabilitása javult alacsony nyírófeszültség mellett, viszont mérsékelten csökkent magasabb nyírófeszültség hatására. Sem az UFH, sem az APAC dózisének növelése nem befolyásolta ezt a hatást.

A heparin által kiváltott vörösvérsejt aggregatio továbbra is összetett és némileg rejtélyes jelenség az orvostudományban, amely terápiás vonatkozásai szempontjából kihívást jelent. Míg a heparin, egy általánosan használt véralvadásgátló és általában jótékony hatásúnak tekinthető antitrombotikus tulajdonságai miatt, a vörösvérsejtek aggregatiójának serkentésében játszott nyilvánvaló szerepe érdekes kérdéseket és potenciális aggodalmakat vet fel. A vörösvérsejt aggregatiót számos tényező befolyásolja, mint például a haematocrit, a szabad gyökök és a fibrinogén szintje. Az általunk mért haematocrit értékek tekintetében kismértékű hemokoncentráció volt megfigyelhető, ami bár matematikailag szignifikáns volt, biológiailag nem tekinthető jelentős változásnak. Korábbi vizsgálatok szerint a magasabb haematocrit szint jelentősen növeli a vörösvérsejtek aggregatióját, amely fajok közötti különbségeket is mutat.

E jelenség egyik figyelemre méltó mutatója az erythrocyták szedimentációs sebességének (ESR) emelkedése, amely a gyulladás mérésére gyakran használt paraméter. Az ESR emelkedése és a vér alacsony nyírési viszkozitása gyakran fokozott vörösvérsejt aggregációval jár együtt, ez a megfigyelés különösen fontos a heparin terápiában részesülő betegek esetében. Az olyan alapbetegségek, amelyek már befolyásolják a vörösvérsejt aggregatiót, pl. sarlósejtes anaemia vagy cukorbetegség, potenciálisan hatással lehetnek a heparin által kiváltott vörösvérsejt aggregációra.

Ezen túlmenően a vörösvérsejtek aggregatiójának heparin általi elősegítése szélesebb körű hatással lehet a microcirculációra. Az kis erekből és kapillárisokból álló mikrokeringési rendszer döntő szerepet játszik a szövetek oxigénellátásában és a tápanyagellátásban. Az általunk tapasztalt változások matematikailag szignifikánsak voltak, biológiai hatásuk azonban nem egyértelmű. Még mindig nem ismert, hogy a micro-rheológiai változások mikor okozzák a microcirculatio romlását.

A heparinnak a vér viszkozitására és az erythrocyták süllyedési sebességére gyakorolt hatása kiterjedt kutatások tárgyát képezte. Ezek kimutatták, hogy a heparin különböző

koncentrációkban befolyásolja a vörösvérsejtek aggregációját. Az adatok következetesen a vér viszkozitásának és az ESR-szintek növekedésének figyelemre méltó tendenciáját mutatják, ami egybeesik a vörösvérsejt aggregatio egyidejű növekedésével. Ez az érdekes jelenség, aggodalomra ad okot a heparinnak a vér rheológiájára gyakorolt lehetséges káros hatásaival kapcsolatban.

A heparin hatásának szemléletes példája az a megfigyelés, hogy az összes vizsgált donorvérmintában az átlagos ESR körülbelül 75%-kal emelkedett, amikor a heparin koncentrációja elérte a 100 U/ml-t. Az ESR ilyen jelentős változásai a vörösvérsejtek viselkedésének megváltozására utalnak, különösen az aggregációra való hajlamukra. Ezek az eredmények együttesen arra utalnak, hogy a heparin negatív hatással van a vörösvérsejtek aggregációjára, ami fontos tényező a klinikai következmények megértésében. A vérlemezkeszám csökkenése a mintákban kapcsolatban lehet a "relatív" *in vitro* csökkenéssel, amely feltehetően a heparinnak a vérlemezkek felszíni tulajdonságainak megváltoztatásában játszott szerepével függ össze.

A vizsgálatot limitáló tényező többek között, hogy viszonylag alacsony esetszámmal dolgoztunk és az összehasonlítás során két dózist vizsgáltunk. A kísérleteket egészséges érrendszerrel rendelkező juvenilis sertéseken végeztük. A kísérlet rövid távú vizsgálat volt, ismételt bolus adagolással, a haemorheologiai paraméterek akut változásainak kimutatására.

6. FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. Kialakítottunk olyan patkány és sertés állatmodellt, melyek lehetőséget biztosítanak a bilhaemia széleskörű vizsgálatára.
2. A vörösvérsejtek deformabilitását leíró paraméterekben nem észleltünk változást az epe beadása után. A két vizsgált faj között szignifikáns különbség volt az aggregációs index értékekben. A patkányok vörösvérsejtjei mind az *in vitro*, mind az *in vivo* epe beadása után érzékenyebbek voltak. Az *in vivo* adott epe mindkét fajban csökkenést okozott az artériás középnyomás és a szívfrekvencia értékeiben.
3. Az epe akut hemodinamikai hatásainak nagysága és dinamikája különbözött a két vizsgált faj között. Patkányoknál az értékek rövid időn belül normalizálódtak, míg sertéseknél a helyreállítás sokkal lassabb volt.
4. Kidolgoztunk egy protokollt, mely lehetővé tette a kettős thrombocyta- és véralvadásgátló (APAC) eszkalálódó dózisban történő vizsgálatát. Tanulmányunk az első, amely az APAC beadásának micro-rheologiai összefüggéseit vizsgálta. Az adatok fényében megállapítható, hogy az UFH és az APAC, a kettős thrombocyta- és véralvadásgátló hasonló micro-rheologiai tulajdonságokkal rendelkezik.
5. *In vivo* vizsgálatunk azt mutatta, hogy az APAC eszkalált bolus dózisban jelentősen nem befolyásolta a teljes vérképet, de a protamin-szulfáttal történt semlegesítés után a vérlemezkeszám némileg csökkent.
6. Az APAC fokozta a vörösvérsejt aggregációt. Alacsony nyírófeszültségnél a vörösvérsejtek deformabilitásának javulása volt megfigyelhető, viszont magasabb nyírófeszültségnél a vörösvérsejtek deformabilitása romlott, ami hozzájárulhatott a fokozott vörösvérsejt aggregációhoz.
7. A heparinhoz képest az APAC hasonló, de kisebb mértékű micro-rheologiai változásokat okozott, amelyek *in vivo* fiziológiailag nem voltak jelentősek. Bár a haematologiai paraméterekben tapasztaltunk némi változást, de ettől függetlenül a fajra vonatkozó biológiailag normális laboratóriumi tartományon belül maradtak.

7. Hitelesített publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/547/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Mátrai Ádám Attila
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10076776

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Mátrai, Á. A.**, Varga, Á., Fazekas, L., Baráth, B., Nellamkuzhi, N. J., Nghi, T. B., Németh, N., Deák, Á.: Effect of Bile on Hemodynamics and Blood Micro-Rheological Parameters in Experimental Models of Bilhemia.
Metabolites. 14 (4), 1-13, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo14040211>
IF: 3.4 (2023)
2. **Mátrai, Á. A.**, Varga, Á., Baráth, B., Ványolos, E., Orbán-Kálmándi, R. A., Lóczi, L., Bagoly, Z., Jouppila, A., Lassila, R., Németh, N., Deák, Á.: Heparin-like effect of a dual antiplatelet and anticoagulant (APAC) agent on red blood cell deformability and aggregation in an experimental model.
J Thromb Thrombolysis. [Epub ahead of print], 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11239-024-03040-8>
IF: 2.3 (2023)

További közlemények

3. Varga, Á., **Mátrai, Á. A.**, Fazekas, L., Al-Khafaji, M. Q., Ványolos, E., Deák, Á., Szentkereszty, Z., Pető, K., Németh, N.: Changes in microcirculation of small intestine end-to-end anastomoses in an experimental model.
Microvasc. Res. 156, 1-8, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2024.104731>
IF: 2.9 (2023)
4. Varga, Á., **Mátrai, Á. A.**, Baráth, B., Fazekas, L., Brasil, F. S., Mehta, A., Ványolos, E., Deák, Á., Lesznyák, T., Pető, K., Németh, N.: Local and Systemic Micro-Rheological Changes during Intestinal Anastomosis Operation: a Metabolic Dependence in an Experimental Model.
Metabolites. 14 (8), 2-15, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo14080458>
IF: 3.4 (2023)





5. Al-Smadi, M. W., Fazekas, L., Varga, Á., **Mátrai, Á. A.**, Aslan, S., Beqain, A., Al-Khafaji, M. Q. M., Baráth, B., Novák, L., Németh, N.: Minor micro-rheological alterations in the presence of an artificial saphenous arteriovenous shunt, as an arteriovenous malformation model in the rat. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 87 (1), 27-37, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-231825>
IF: 2.1 (2023)
6. Bánhegyi, R. J., Veréb, B., **Mátrai, Á. A.**, Rácz, B., Beke, S.: Daganatos betegek glykaemiás és tápláltsági állapotának vizsgálata. *Orv. hetil.* 164 (23), 900-910, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2023.32796>
IF: 0.8
7. Baráth, B., Varga, Á., **Mátrai, Á. A.**, Pocsai, K., Németh, N., Deák, Á.: Estradiol Valerate Affects Hematological and Hemorheological Parameters in Rats. *Metabolites.* 12 (7), 602, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo12070602>
IF: 4.1
8. Varga, Á., **Mátrai, Á. A.**, Baráth, B., Deák, Á., Horváth, L., Németh, N.: Interspecies Diversity of Osmotic Gradient Deformability of Red Blood Cells in Human and Seven Vertebrate Animal Species. *Cells.* 11 (8), 1-15, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells11081351>
IF: 6
9. Szántó, S., Módy, T., Némethné Gyurcsik, Z., Babják, L. B., Somogyi, V., Baráth, B., Varga, Á., **Mátrai, Á. A.**, Németh, N.: Alterations of Selected Hemorheological and Metabolic Parameters Induced by Physical Activity in Untrained Men and Sportsmen. *Metabolites.* 11, 1-12, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo11120870>
IF: 5.581





10. **Mátrai, Á. A.**, Varga, G., Tánczos, B., Baráth, B., Varga, Á., Horváth, L., Bereczky, Z., Deák, Á., Németh, N.: In vitro effects of temperature on red blood cell deformability and membrane stability in human and various vertebrate species.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 78 (3), 291-300, 2021.
DOI: <https://doi.org/10.3233/CH-211118>
IF: 2.411

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 32,992

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,7**

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

Debrecen, 2024.11.04.



8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Deák Ádám** adjunktus Úrnak a PhD tanulmányaim során nyújtott segítségét, baráti és szakmai támogatását, és nem utolsósorban a bizalmát. Köszönöm, hogy vezetése alatt végezhettem PhD kutatómunkámat.

Hálával tartozom **Prof. Dr. Németh Norbert** tanszékvezető Úrnak, aki 2018 óta, Tudományos Diákköri munkám kezdetétől, témavezetőként lelkesen támogatott és biztatott. Köszönöm, hogy kutatásaim elvégzéséhez lehetőséget biztosított és mind szakmailag, mind emberileg példát mutatott.

Köszönet illeti **Dr. Varga Gábor** gyermeksebész rezidentst, aki Tudományos Diákköri munkám során társtémavezetőként példát mutatva segítette előre tudományos tevékenységemet. Köszönöm, hogy együtt dolgozhattunk, jelentős motiváció volt számomra.

Szeretném megköszönni **Prof. Dr. Mikó Irénnek**, **Dr. Pető Katalinnak** és **Dr. Ványolos Erzsébetnek** a tanulmányaim során nyújtott szakmai tanácsait, javaslatait.

Hatalmas köszönettel tartozom **Füzesi Róbert**, **Varga Ádám** és **Dr. Fazekas László Ádám** Kollegáimnak, Jóbarátaimnak, akik mindig és mindenben mellettem álltak és biztattak. Köszönöm őszinte, igaz barátságukat és támogatásukat minden nehéz időszakban.

Köszönettel tartozom **Dr. Bedőcs-Baráth Barbara** egykori PhD hallgatónak a laboratóriumi mérések elvégzése során nyújtott segítségéért.

Köszönetet mondok a Sebészeti Műtéttani Tanszék valamennyi munkatársának, hogy baráti és támogató környezetben tölthettem mindennapjaimat és végezhettem kutatásaimat.

Köszönöm **Dr. Bagoly Zsuzsának** és a Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék valamennyi munkatársának a kutatómunkám során nyújtott segítséget.

Nem utolsósorban szeretnék köszönetet mondani **Nagyszüleimnek**, **Családtagjaimnak** és **Barátaimnak** szeretetükért, biztatásukért és önzetlen támogatásukért.

Végezetül, mérhetetlen köszönettel és hálával tartozom Szüleimnek, de legfőbbképp **Édesanyámnak**, valamint **Testvéremnek**, akik tanulmányaimhoz nyugodt háttérrel biztosítottak és minden megpróbáltatás során mellettem voltak, bíztak bennem és erőt adtak amikor szükségem volt rá.

Doktori értekezésemet szeretném elhunyt Nagyszüleim, Kocsis Mária (1948-2013) és Fekete László (1946-2017) emlékének ajánlani, akik földi életük során mindig támogattak, biztattak, és nagyban hozzájárultak ahhoz, hogy azzá váljak, aki most lehetek.

Támogatások: NKFI-1 "OTKA" K-139184 és ÚNKP-22-3-I-DE-332