

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

***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

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	1
1. BEVEZETÉS	2
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1. Haemorheologia	4
2.1.1. Teljes vér és plazma viszkozitás.....	6
2.1.2. Vörösvérsejt deformabilitás	7
2.1.3. Vörösvérsejt aggregatio.....	8
2.1.4. Haemorheologiai paraméterek vizsgálatának jelentősége.....	10
2.2. Kísérleti állatmodellek fontossága	11
2.3. Bilhaemia.....	12
2.3.1. A bilhaemia epidemiológiája.....	12
2.3.2. A bilio-venosus fistula okai.....	12
2.3.3. A bilhaemia diagnosztizálása	15
2.3.4. Fajok közötti különbségek élettani szempontból	16
2.4. Antitrombotikus szerek	19
2.4.1. Vérlemezkegátló készítmények.....	19
2.4.2. Véralvadásgátló készítmények	22
2.4.3. A heparin haemorheologiai hatásai	24
2.4.4. Kettős vérlemezke- és véralvadásgátló készítmény (APAC).....	25
3. CÉLKITŰZÉSEK	27
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	28
4.1. Az epe hatása a hemodinamikai és micro-rheologiai paraméterekre bilhaemia során. 28	
4.1.1. Kísérleti állatok és mintavételi protokoll	28
4.1.2. Laboratóriumi vizsgálatok.....	32
4.1.3. Statisztikai analízis	35
4.2. Kettős thrombocyta- és véralvadásgátló (APAC) szer hatása a vörösvérsejtek deformabilitására és aggregációjára sertésmodellben	36
4.2.1. Kísérleti állatok és mintavételi protokoll	36
4.2.2. Laboratóriumi vizsgálatok.....	40
4.2.3. Statisztikai analízis	42
5. EREDMÉNYEK	43
5.1. Az epe hatása a hemodinamikai és micro-rheologiai paraméterekre bilhaemia során. 43	
5.1.1. Hemodinamikai paraméterek.....	43
5.1.2. Haematologiai paraméterek.....	44
5.1.3. Vörösvérsejt hagyományos és ozmotikus gradiens deformabilitás.....	44

5.1.4. Vörösvérsejt aggregatio.....	46
5.2. Kettős thrombocyta- és véralvadásgátló (APAC) szer hatása a vörösvérsejtek deformabilitására és aggregációjára sertésmodellben.....	48
5.2.1. Az APAC hatása a haemorheológiai paraméterekre	48
5.2.2. Az APAC és a frakcionálatlan heparin összehasonlítása	51
6. MEGBESZÉLÉS.....	55
6.1. Az epe hatása a hemodinamikai és micro-rheológiai paraméterekre bilhaemia során. 55	
6.2. Kettős thrombocyta- és véralvadásgátló (APAC) szer hatása a vörösvérsejtek deformabilitására és aggregációjára sertésmodellben.....	61
7. FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	67
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	68
9. SUMMARY	69
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	70
10.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke.....	70
10.2. Hitelesített publikációs lista	89
11. TÁRGYSZAVAK.....	92
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	93
13. FÜGGELÉK.....	94

Rövidítések jegyzéke

AI: aggregációs index

APAC: kettős vérlemezke- és véralvadástgátló készítmény

bpm: ütés/perc

CBC: teljes vérkép

EI hyper: maximális elongációs index fele a magas ozmolalitású környezetben

EI max: maximális elongációs index az alacsony ozmolalitású környezetben

EI min: minimális elongációs index az alacsony ozmolalitású környezetben

EI: elongációs index

EI_{max}: maximális elongációs index

Fvs: fehérvérsejt

Hct: haematocrit

Hgb: haemoglobin

HR: szívfrekvencia

MAP: artériás középnyomás

MCH: átlagos vörösvérsejt haemoglobin tartalom

MCHC: átlagos vörösvérsejt haemoglobin koncentráció

MCV: átlagos vörösvérsejt térfogat

O (EI max): EI max-hoz tartozó ozmolalitás érték

O hyper: EI hyper-hez tartozó ozmolalitás érték

O min: EI min-hez tartozó ozmolalitás érték

SS_{1/2}: maximális elongációs index feléhez tartozó nyírófeszültség

Thr: thrombocyta

UFH: frakcionálatlan heparin

Vvs: vörösvérsejt

*“...de egyet teszek: ami mögöttem van, azt elfelejtve,
ami pedig előttem van, annak nekifeszülve futok egyenest a cél felé...”
(Filippi 3:14)*

1. BEVEZETÉS

A haemorheologia a vér sejtes és plazmatikus komponenseinek áramlási tulajdonságaival foglalkozó tudományág.¹ Különböző tényezőket foglal magában, beleértve a vér viszkozitását, a vörösvérsejtek deformabilitását és aggregabilitását, valamint a vérsejtek és a plazma közötti kölcsönhatásokat. Ezek a tulajdonságok kulcsfontosságúak a megfelelő vérkeringés fenntartásához és a szövetek megfelelő oxigénellátásának biztosításához.^{2,3} A rendellenes haemorheologiai tulajdonságok a véráramlás károsodásához vezethetnek, ami a trombotikus események és más szív- és érrendszeri szövődmények kockázati tényezője lehet.⁴

Bizonyos állapotok, például az embólia, stroke, trombózis befolyásolják a haemorheologiai paramétereket.^{5,6} Ezen állapotok mihamarabbi felismerése és kezelése nagyon fontos. Azon személyek esetében, kiknél a hajlamosító tényezők valamelyike megtalálható, a megelőzés az elsődleges szempont, melyre számos, a betegségre specifikus terápia került kidolgozásra.^{7,8} A használt gyógyszerek köre folyamatosan bővül, így lehetőség van a potenciálisan legalkalmasabb szer kiválasztására. Azonban, mint a legtöbb gyógyszer, így a véralvadást és thrombocytá-aggregációt gátló készítmények is hatással lehetnek a haemorheologiai változókra.^{9,10,11}

A szív- és érrendszeri betegségeken kívül egyéb kórképekben, például tumoros elváltozásokban^{12,13}, policisztás ovárium szindrómában¹⁴, magas vérnyomás betegségben¹⁵, krónikus májbetegségeken (CLD)^{16,17}, mint a májsugorodás vagy a nem alkoholos eredetű zsírmáj (NAFLD), megváltozhatnak a véráramlásra jellemző micro-rheologiai paraméterek. A gyakoribb májbetegségeken és sérüléseken kívül ritka kórképekben is, mint amilyen a bilhaemia, megváltozhatnak a haemorheologiai 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.^{18,19} A trombotikus szövődmények, így a portális véna trombózisa, a bilhaemia által kiváltott prokoaguláns állapot miatt léphetnek fel.^{18,20} Ezzel szemben vérzéses szövődmények a csökkent alvadási faktortermelés, a K-vitamin-hiány és a vérlemezkék diszfunkciójának együttes hatásaiból eredhetnek.^{18,19,20}

Jelenleg kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésünkre azzal kapcsolatban, hogy a bilhaemia és a thrombocyta- és véralvadásgátló készítmények hogyan hatnak a haemorheológiai 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. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

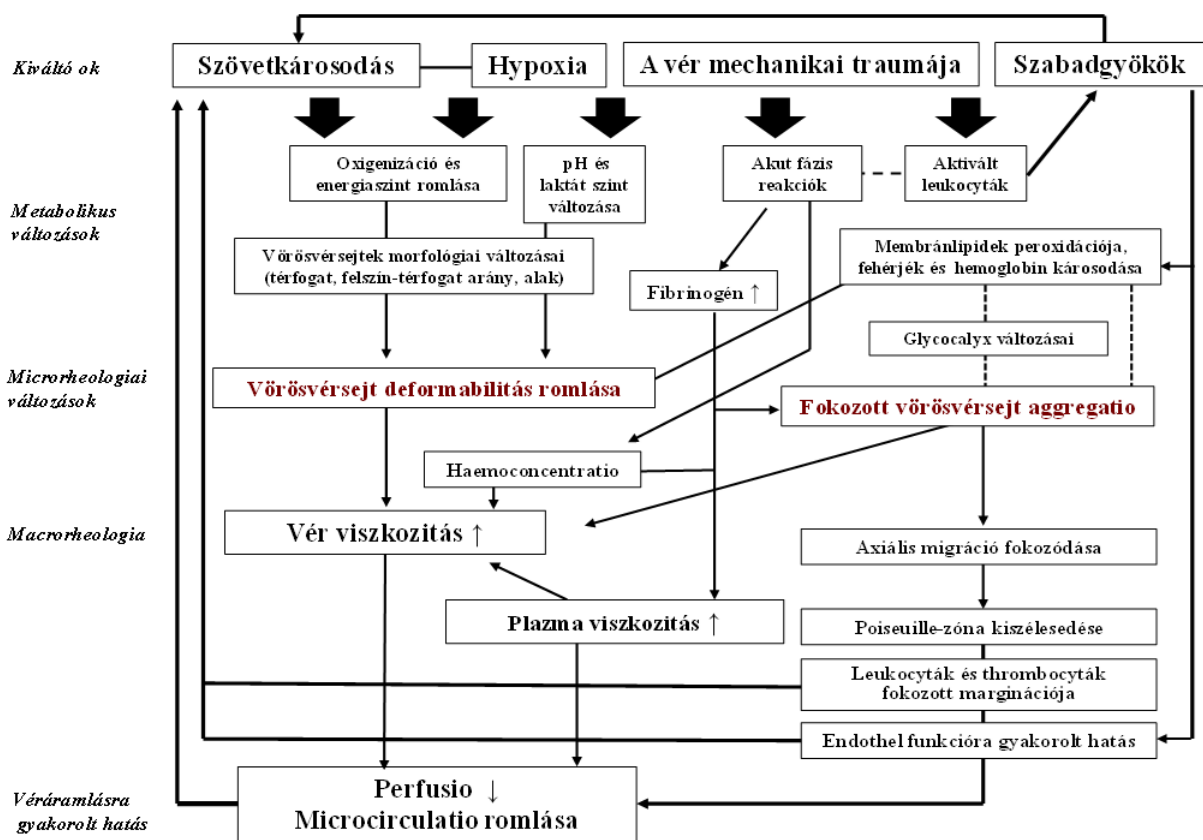
2.1. Haemorheologia

Napjainkban egyre szélesebb körben végeznek haemorheologiai kutatásokat, ennek ellenére számos megválaszolatlan kérdéssel állunk szemben. A haemorheologiai paraméterek *in vivo* változásainak vizsgálatához az állatmodellek alkalmazása elengedhetetlen. A klinikai és az orvosbiológiai kutatásokban vizsgált új hatóanyagok és a különböző betegségek számos micro-rheologiai eltérést okozhatnak a kísérleti állatmodellekben, ezért a vér rheológiájának széleskörű vizsgálata jelentőséggel bír a klinikum részére. Mint minden szervezetben, így az állatok szervezetében is összetett folyamatok, változások mennek végbe, melynek tanulmányozása komplex megközelítést igényel.

Az 1. ábrán megfigyelhető a haemorheologiai paraméterek károsodásának következtében kialakuló mikrokeringési romlásnak a sematikus, összefoglaló folyamata.²¹ A szövetkárosodás, hypoxia, a vér mechanikai traumája és a szabadgyökök metabolikus változásokon keresztül befolyásolják a micro- és macro-rheologiai paramétereket, ezáltal a microcirculatio romlását és a perfúzió csökkenését eredményezve, melyek a kiváltó okokat felerősítik.

A pH, H⁺ és a laktát koncentráció változása befolyásolja a vörösvérsejtek morfológiai és mechanikai tulajdonságait, ennek következtében pedig a megváltozott morfológiai tulajdonságokkal rendelkező sejtek deformabilitása és aggregációja is romlik.^{22,23} Hypoxia során szintén az előbb leírtakhoz hasonló változások figyelhetők meg a deoxigenált sejtek megváltozott felület/térfogat aránya miatt.^{24,25,26} A vér mechanikai traumája, mely ugyancsak a perfusio csökkenését és a microcirculatio romlását eredményező kaszkád iniciáló faktorai közé tartozik, kialakulhat többek között érelzáródás következtében, illetve intravascularis beavatkozások során alkalmazott graftok, műbillentyűk beültetésével is.^{2,27}

A vörösvérsejtek deformabilitásának károsodása és a fokozott vörösvérsejt aggregatio hozzájárulhat a vér viszkozitásának növekedéséhez, a microcirculatio romlásához és az áramlási ellenállás fokozódásához.^{28,29} Ha az erythrocyta aggregatio fokozódik, a vörösvérsejtek tengelyirányú vándorlása az érben kifejezettebbé válik.³⁰ A vér rheológiai tulajdonságainak megváltozása hatással van az endothel felszínén lévő nyírófeszültség-profilra, melynek következtében a megváltozott áramlás további progressziót okozhat a pathofiziológiai folyamatokban.^{2,31}



1. ábra

A vér fluiditását befolyásoló tényezők és hatásaik. A szövetkárosodás, hypoxia, a vér mechanikai traumája és a szabad gyökök metabolikus változásokon keresztül befolyásolják a micro- és macro-rheológiai paramétereket, ezáltal a microcirculatio romlását és a perfusio csökkenését eredményezve, melyek a kiváltó okokat felerősítik (Németh és mtsai, 2018 alapján)

2.1.1. Teljes vér és plazma viszkozitás

A teljes vér viszkozitása a vér egészének áramlási ellenállását jelenti, amelyet a vér sejtjes összetevői (főként a vörösvérsejtek) és a plazma közötti kölcsönhatások befolyásolnak.^{3,32}

A teljes vér nem-newtoni folyadék, ami azt jelenti, hogy viszkozitása a nyírási sebességgel változik. Alacsony nyírási sebességnél a vörösvérsejtek hajlamosak aggregálódni, növelve a viszkozitást, míg magas nyírási sebességnél szétesnek és az áramlással együtt haladnak, csökkentve a viszkozitást.^{3,33}

A teljes vér viszkozitását befolyásoló elsődleges tényezők közé tartozik a haematocrit (a vér térfogatának vörösvérsejtek által elfoglalt aránya), a vörösvérsejtek deformabilitása (szuszpendált részecskék saját belső súrlódása), a vörösvérsejtek aggregációja (szuszpendált részecskék mérete) és a plazma viszkozitása (szuszpenziós folyadék tulajdonsága). A haematocrit növekedése jelentősen megemelheti a vér viszkozitását, egy egységnyi növekedés akár 4%-os viszkozitás növekedést is okozhat.^{3,34}

Az emelkedett teljes vér viszkozitása különböző kardiovaszkuláris betegségekkel hozható összefüggésbe, és független előre jelzője lehet a kardiovaszkuláris eseményeknek. Kulcsfontosságú szerepet játszik a microcirculációban, és hozzájárulhat olyan állapotokhoz, mint a trombózis és az ischaemia.^{32,35}

A plazma viszkozitása a plazma áramlási ellenállásának jellemzésére szolgál, amely a vér folyékony komponensének jellemzőit tükrözi a sejtjes elemek eltávolítása után.³

A plazma viszkozitása általában alacsonyabb, mint a teljes vér viszkozitása, mivel nem tartalmaz sejtjes összetevőket. Newtoni folyadéknak tekinthető, ami azt jelenti, hogy viszkozitása a nyírási sebességtől függetlenül állandó marad.³

A plazma viszkozitását olyan tényezők befolyásolják, mint a fehérjekoncentráció (különösen a fibrinogén és az immunglobulinok), a hidratáltsági állapot és a hőmérséklet. A fehérjék magasabb szintje a plazma viszkozitásának növekedéséhez vezethet.^{3,36}

A plazma viszkozitásának mérése hasznos a gyulladással vagy megnövekedett fehérjeszinttel járó állapotok, például a myeloma multiplex vagy a Waldenström-macroglobulinaemia diagnosztizálásában. Az emelkedett plazma viszkozitás akut fázis reakciót is jelezhet különböző betegségekben.^{37,38,39}

2.1.2. Vörösvérsejt deformabilitás

A vörösvérsejt deformabilitás a sejtek azon képességére utal, hogy mechanikai terhelés hatására alakot tudnak változtatni anélkül, hogy felszakadnának. Ez a tulajdonság döntő fontosságú az erythrocyták hatékony mozgásához a mikrokeringés területén, ahol a kapillárisok átmérője kisebb lehet, mint maguk a sejtek.^{40,41}

A deformabilitást több tényező befolyásolja, többek között a citoskeleton szerkezet, a sejtmembrán tulajdonságai és a citoplazma viszkozitás. A citoskeleton, amely olyan fehérjékből áll, mint a spektrin és az aktin, szerkezeti támaszt és rugalmasságot biztosít, lehetővé téve az alakváltozásokat.⁴⁰ A sejtmembrán viszkoelasztikus tulajdonságai jelentősen hozzájárulnak a deformálhatósághoz. A membrán összetételének változásai befolyásolhatják, hogy a vörösvérsejtek milyen könnyen tudják megváltoztatni alakjukat.⁴¹ A citoplazma viszkozitása, amelyet a haemoglobin koncentrációja és más oldott anyagok befolyásolnak, szintén szerepet játszik a deformálhatóságban.⁴⁰

A vörösvérsejtek hatékonyan tudnak áthaladni a szűk kapillárisokon, biztosítva a megfelelő oxigénzállítást a szövetekbe.^{40,41} A deformálhatóság befolyásolja a vér viszkozitását és áramlási ellenállását, különösen alacsony nyírési körülmények között. A megnövekedett merevség a véráramlás és a szöveti perfusio károsodásához vezethet.^{40,41}

A megváltozott vörösvérsejt deformabilitás különböző kóros állapotokhoz társulhat. Sarlósejtes anaemiában a vörösvérsejtek merev, sarlós alakjuk miatt jelentősen csökkent deformálhatóságot mutatnak, ami vaso-occlusiv krízisekhez vezethet.^{40,42} A csökkent deformabilitást cukorbetegségben és más gyulladásozó állapotokban is megfigyelték, ami hozzájárulhat az olyan szövödményekhez, mint a perifériás érbetegség.^{41,43} A tárolt vörösvérsejtek deformabilitása a tárolás során csökkenhet (ún. „tárolási elváltozás”), ami a transfúzió során befolyásolhatja a funkcionalitásukat.^{41,42,44}

A vörösvérsejtek elnyúlási képessége létfontosságú tulajdonság, amely lehetővé teszi a hatékony vérkeringést és az oxigénszállítást. Értékelése kritikus fontosságú a különböző egészségügyi állapotok megértéséhez és a klinikai eredmények javításához a transfúziós orvoslásban.

2.1.3. Vörösvérsejt aggregatio

A vörösvérsejt aggregatio a sejtek reverzibilis összekapcsolódása alacsony nyíróerő mellett vagy stasisban. Ez egy fiziológiás jelenség, amely normál körülmények között is előfordul, és különböző tényezők befolyásolhatják, beleértve a nagy molekulatömegű plazmafehérjék, például a fibrinogén jelenlétét.⁴⁵

Az aggregatio létrejöttét két elmélet magyarázza. A „bridging modell” szerint a sejtek összekapcsolódása a fibrinogén és más makromolekulák nem-kovalens keresztkötései révén jön létre. Ezen elmélet szerint, a sejtfelszín közelében a protein vagy polimer koncentrációnak magasnak kell lenni. A „depletion modell” szerint a vörösvérsejtek aggregációját feltehetően a nagy molekulatömegű molekulák, például a fibrinogén sejtek közötti kimerülése okozza, ami egy gradienst, összeszippantó erőt hoz létre, melynek hatására a sejtek összecsapzódnak. A sejtek egyedi diszkoid alakja lehetővé teszi, hogy rouleaux-alakzatokba, azaz aggregált sejtek halmazába rakódjanak.^{2,46,47}



2. ábra

Az aggregatio során kialakuló rouleaux-alakzatok fáziskontraszt mikroszkópos képe
(Başkurt és mtsai, 2013)

Az erythrocyta aggregatio a vér viszkozitásának fő meghatározója alacsony nyírási sebességnél. Hatással van a microcirculatio hemodinamikai mechanizmusaira is, mint például a Fåhræus-effektus.⁴⁵ A fokozott aggregatio megzavarhatja a véráramlást, különösen a microcirculatio szintjén, mivel a vörösvérsejtek egyedi sejtekként, nem pedig aggregátumként tudnak áthaladni a szűk kapillárisokon.⁴⁴

A megváltozott vörösvérsejt aggregatio betegségek indikátora, valamint a klinikai állapot alakulását befolyásoló tényező is lehet.⁴⁵ Fokozott aggregatio fordul elő különböző kóros állapotokban, beleértve a fertőzéseket, gyulladással járó rendellenességeket, cukorbetegséget és daganatos megbetegedéseket. Az aggregációs index értékek különböző betegségekben prognosztikai jelentőséggel bírnak.⁴⁵

2.1.4. Haemorheológiai paraméterek vizsgálatának jelentősége

A haemorheológiai paraméterek kritikus fontosságúak a véráramlás és annak a különböző egészségügyi állapotokra gyakorolt hatásának megértéséhez.

A haemorheológiai paraméterek, így a vörösvérsejtek deformabilitása és aggregációja, a teljes vér és plazma viszkozitás, előre jelezhetnek számos betegséget, köztük a mélyvénás trombózist (DVT) és más tromboembóliás eseményeket. E paraméterek változásai az ilyen betegségek fokozott kockázatát jelezhetik, különösen olyan páciensek esetében, akiknek olyan alapbetegségeik vannak, mint a hiperlipidémia és a metabolikus szindróma.⁴⁸

Ezek a paraméterek betekintést nyújtanak a mikrokeringés állapotába. A vörösvérsejtek deformabilitásának és aggregációjának változásai gyulladós vagy ischaemiás állapotokat tükrözhetnek, így értékesnek bizonyulnak az olyan betegségek diagnosztizálásában és monitorozásában, mint a szepszis vagy a szervi ischaemia-reperfusio károsodások.^{26,48}

A haemorheológiai vizsgálatok segítenek a különböző rendellenességek hátterében álló pathofiziológiai mechanizmusok tisztázásában. A vér viszkozitása és a szív- és érrendszeri egészség közötti kapcsolat jól dokumentált, ami arra utal, hogy az emelkedett viszkozitás hozzájárulhat a magas vérnyomáshoz és a szív- és érrendszeri betegségekhez.²⁶

A betegek haemorheológiai profiljának megértésével a klinikusok hatékonyabban alakíthatják ki a kezeléseket. E paraméterek monitorozása például irányíthatja az antikoagulánsok vagy más, a véráramlás javítását és a trombotikus kockázatok csökkentését célzó terápiák alkalmazását.⁴⁸

Összefoglalva, a haemorheológiai paraméterek létfontosságúak a betegség kockázatának előrejelzéséhez, a mikrokeringési funkció értékeléséhez, a betegség mechanizmusainak megértéséhez, a kezelési döntések irányításához és a klinikai kutatások következtetésének biztosításához.

2.2. Kísérleti állatmodellek fontossága

Az állatmodellek több okból is fontos szerepet játszanak a klinikai vizsgálatokban és az orvosbiológiai kutatásokban. Elengedhetetlenek az új gyógyszerek biztonságosságának és hatékonyságának értékeléséhez, mielőtt azokat embereken tesztelnék. Értékes betekintést nyújtanak a farmakokinetikába (hogyan dolgozza fel a szervezet a gyógyszert) és a farmakodinamikába (a gyógyszer szervezetre gyakorolt hatása).^{49,50} Ez a preklinikai fázis segít azonosítani a lehetséges toxicitásokat és terápiás hatásokat, biztosítva, hogy csak a legígéretesebb gyógyszerjelöltek kerüljenek tovább az emberi vizsgálatokba.

Az állatmodellek lehetővé teszik a kutatók számára, hogy a betegségek pathofiziológiáját ellenőrzött környezetben tanulmányozzák. Az egyes humán betegségek jól reprodukálhatók bizonyos fajokban, mely lehetővé teszi a betegség mechanizmusainak vizsgálatát, új kezelések tesztelését, és feltárhatják a betegség lefolyását befolyásoló genetikai tényezőket.^{50,51} Ezek az ismeretek kritikus fontosságúak a hatékony terápiák kifejlesztésében.

Bár egyetlen állatmodell sem tudja tökéletesen leképezni az emberi biológiát, bizonyos fajok (pl. egerek, patkányok és sertések) jelentős fiziológiai és genetikai hasonlóságokat mutatnak az emberrel. Ez teszi őket hasznossá annak előrejelzésére, hogy az emberek hogyan fognak reagálni az új gyógyszerekre vagy kezelésekre.⁵² A sertést gyakran használják a szív- és érrendszeri kutatásokban az emberhez való anatómiai hasonlósága miatt.

Az állatmodellek megkönnyítik a transzlációs kutatást azáltal, hogy áthidalják a laboratóriumi eredmények és a klinikai alkalmazások közötti szakadékot. Segítenek az *in vitro* vizsgálatok eredményeinek validálásában, és átfogóbb képet adnak arról, hogy a kezelések hogyan működhetnek az élő szervezetekben.^{50,52}

Az állatkísérletek a klinikai kutatások szerves részét képezik a gyógyszerbiztonsági vizsgálatokban, a betegség mechanizmusainak megértésében és a terápiákra adott emberi válaszok előrejelzésében betöltött szerepük miatt.

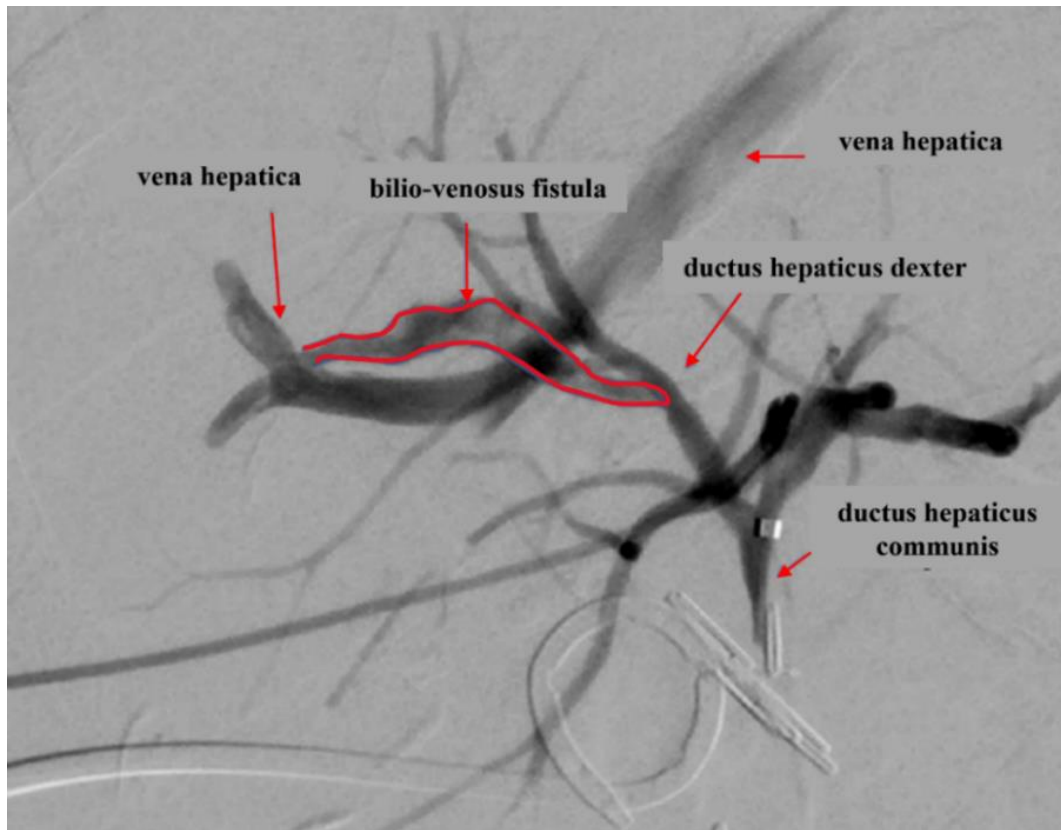
2.3. Bilhaemia

2.3.1. A bilhaemia epidemiológiája

A bilhaemia, más néven bilhemia, egy ritka állapot, amely akkor fordul elő, amikor az epe az epevezeték és a máj vénás rendszere közötti bilio-venosus fistula (BVF) miatt a véráramba kerül.⁵³ A bilhaemia számos szövődménye ismert. A bilhaemia előfordulásának pontos gyakorisága nem ismert, mivel az állapot enyhébb formáit nem tudják diagnosztizálni. A bilhaemia az epekövesség (cholelithiasis) ritka mellékhatása is lehet⁵⁴, és pathogenezisében szerepet játszik a ductus choledochusban mérhető jellegzetes nyomás, amely 10-15 és 20 Hgmm között változhat (amikor az Oddi-féle sphincter összehúzódik). A bilhaemiát először 1559-ben dokumentálták, és azóta mintegy 100 esetet írtak le, bradycardia és vérnyomáscsökkenés mellett. Fontos megkülönböztetni a bilhaemiát a haemobiliától, amely az epevezeték a hepaticus erekkel összekötő sipoly okozta vérzés az epeutakba.^{54,55,56,57} Az artériás rendszerben uralkodó magas nyomás miatt normál körülmények között arterio-biliaris sipolyban nem lehetséges bilhaemia kialakulása.^{54,58,59,60}

2.3.2. A bilio-venosus fistula okai

A bilio-venosus fistulák (3.ábra) leggyakoribb oka a súlyos májsérülés. A BVF ritka, de veszélyes mellékhatása a gyermekek tompa májsérülésének, amely gyakran fordul elő gépjárműbalesetek során és az esetek jelentős részében sebészeti beavatkozásra van szükség a kialakult kóros állapot megszüntetésére és a további szövődmények megelőzésére.⁵³ Ezek a sérülések az epevezeték és a májvéna közötti összeköttetéshez vezethetnek, amely sipoly kialakulását okozhatja, ennek szövődményeként bilhaemia alakulhat ki, ami életveszélyes lehet.^{54,61} A BVF-ek diagnosztizálása és kezelése különösen nagy kihívást jelenthet, mivel a jellegzetes tünetek ritkák és a kóros állapot késői felismerése szövődményekhez, például fertőzéshez vagy további vérzéshez vezethet.⁶²

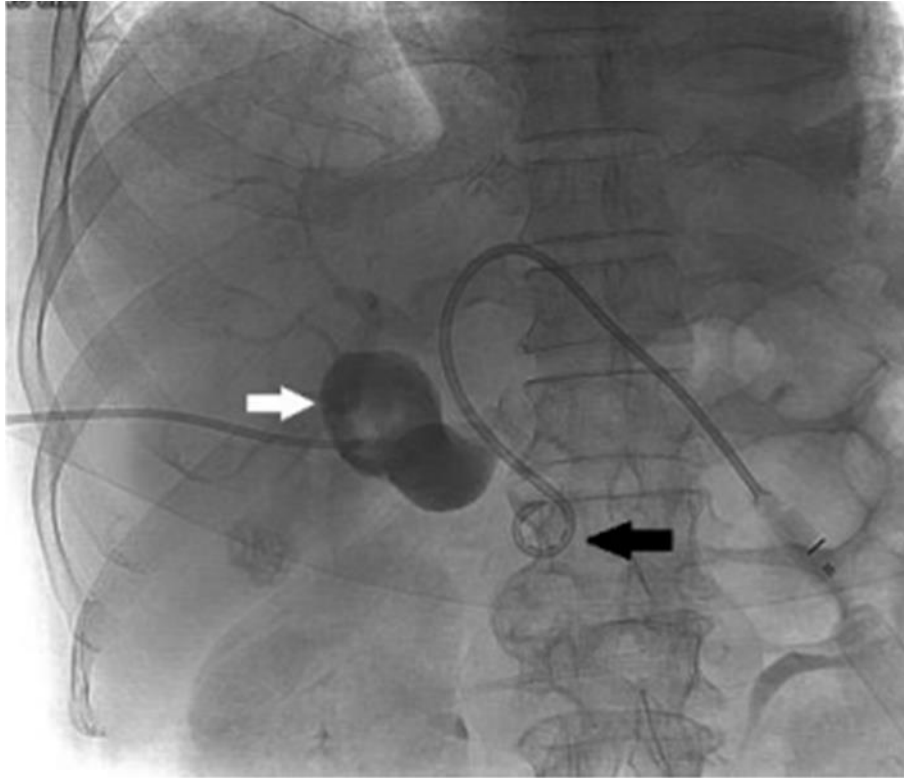


3. ábra

A vena hepatica és a ductus hepaticus dexter közötti bilio-venosus fistula cholangiogramja (Çakır és mtsai, 2018 alapján)

A BVF kialakulása a traumán kívül a 4. ábrán látható percutan transhepaticus epeúti drainage (PTBD) ritka szövődményeként is előfordulhat.⁶³ Ez az eljárás, bár hatékony az epeúti elzáródás kezelésében, esetenként sipoly kialakulásához vezethet, amennyiben az epeúti katéter a közeli érrendszeri struktúrákba fúródik. Egy tanulmány szerint a BVF a PTBD esetek kevesebb, mint 0,5%-ában fordul elő, ami rávilágít ritkaságukra, de egyben az állapot lehetséges súlyosságára is, ha mégis előfordul.⁶² Bár a BVF gyakran önmagától megszűnik, jelentős klinikai kihívást jelenthet, különösen akkor, ha súlyos bilhaemia vagy haemobilia alakul ki.^{62,64}

Egy figyelemre méltó eset egy epehólyag-eltávolítást követő BVF kialakulásáról számolt be, amely végül a beteg halálához vezetett, rávilágítva ennek az állapotnak a súlyosságára.^{65,66}



4. ábra

Percutan transhepaticus epeúti drainage a ductus hepaticus sinisteren keresztül, a ductus hepaticus communistól distalisan (fekete nyíl) és percutan transhepaticus epehólyag drainage (fehér nyíl) (Ahn és mtsai, 2016)

A véráramban lévő epe jelenlétével jellemezhető bilhaemia epekővel is társulhat. Az epekövek akadályozhatják az epe normális áramlását, ami megnövekedett nyomást eredményezhet az epeúti rendszerben, és ezt követően szivárgást a vénás rendszerbe. A betegek olyan tüneteket mutathatnak, mint a hasi fájdalom, sárgaság és az epeúti elzáródás egyéb jelei. A bilhaemia kezelése gyakran magában foglalja a kiváltó ok kezelését, például az epekő eltávolítását, a tünetek enyhítése és a további egészségügyi kockázatok megelőzése érdekében.^{55,67}

Bár a BVF elsődleges oka a súlyos májsérülés, ezenkívül más orvosi eljárások és állapotok is hozzájárulhatnak a kialakulásához. A BVF kezelése gyakran multidiszciplináris megközelítést igényel, beleértve a sebészi beavatkozást, radiológiai eljárásokat és a beteg állapotának gondos megfigyelését a súlyos szövődmények megelőzése érdekében.

2.3.3. A bilhaemia diagnosztizálása

A bilhaemia legkönnyebben a haemobilia vizsgálatára használt módszerekkel diagnosztizálható.⁶⁸ Ezek a diagnosztikai technikák döntő fontosságúak az epe jelenlétének azonosításához a véráramban, amely különböző alapbetegségekből, többek között epeúti elzáródásból vagy sérülésből eredhet. A rendelkezésre álló képalkotó eljárások közül a hasi komputer tomográfiát (CT) szokták alkalmazni, ez azonban más módszerekhez képest kevésbé érzékeny a bilhaemia kimutatására.

A mágneses rezonanciás cholangiopancreatographia (MRCP) egy nem invazív képalkotó eljárás, mely különösen érzékeny az epeutak láthatóvá tételére, és hatékonyan azonosítja az olyan rendellenességeket, mint az elzáródások vagy szivárgások, amelyek bilhaemiához vezethetnek. Az MRCP részletes képet ad az epeutakról és a környező struktúrákról anélkül, hogy kontrasztanyagra lenne szükség, amely káros lehet a májműködési zavarban szenvedő betegek számára. Tanulmányokban leírták, hogy az MRCP nagyobb érzékenységgel képes kimutatni az epeúti patológiákat, mint a CT, így bizonyos klinikai helyzetekben előnyben részesíthető.⁶⁹

A transabdominalis ultrahang vizsgálat szintén érzékeny az epeúti vérzés kimutatására, és gyorsan elvégezhető betegágy mellett. Különösen hasznos sürgősségi körülmények között, ahol a gyors diagnózis kritikus. Az ultrahangvizsgálat segíthet láthatóvá tenni a folyadékgyülemet, az epekövet és az epeúti rendszerben lévő gyulladást. A kutatások azt mutatják, hogy az ultrahangvizsgálat hatékony az epeúti elzáródás vizsgálatában, és irányt mutathat a további kezeléshez.⁶⁹

A kontrasztanyaggal megerősített mágneses rezonanciás cholangiographia (CEMRC) egy non-invazív eljárás, mely során hepatocyt-specifikus kontrasztanyag (dinátrium-gadoxetát, Gd-EOB-DTPA) alkalmazásával meghatározható az epeszivárgás pontos helye, és vizsgálható a máj kiválasztó funkciója és az epeutak anatómiája.^{70,71,72,73} A legtöbb

szakirodalmi adat a májdaganatokban és a műtét utáni epeszivárgás vizsgálatában betöltött szerepéről ír^{70,74}, azonban egy retrospektív tanulmány hangsúlyozza hasznosságát a tompa májsérülések kimutatásában is.⁷⁵

Az endoscopos retrograd cholangiopancreatographia (ERCP) egy invazív eljárás, mely lehetővé teszi az epe- és hasnyálmirigy-járatokon belüli közvetlen vizualizálást és beavatkozást. Az ERCP nemcsak diagnosztikai célokra, hanem terápiás beavatkozásokra is alkalmazható, például elzáródások eltávolítására vagy stentek elhelyezésére az epeúti szivárgás enyhítésére. Az epeúti rendellenességek diagnosztizálásában és kezelésében arany standardnak számít, különösen akkor, ha terápiás megközelítésre van szükség.^{62,76}

Míg a CT-vizsgálatok értékesnek bizonyulnak a különböző hasi állapotok értékelésében, az epeúti vérzés kimutatására vonatkozó érzékenyséjük korlátozott. Az MRCP és a transabdominalis ultrahangvizsgálat a CT-hez képest pontosabb eredményeket adhat az epeúti rendellenességek azonosításában. Ez különösen fontos azokban az esetekben, amikor az időben történő diagnózis döntő fontosságú a beteg kezelése szempontjából, mivel a késedelem olyan szövődményekhez vezethet, mint a szepszis vagy a májelégtelenség.

A bilhaemia diagnózisa a képalkotó technikák kombinációján alapul, az MRCP és az ultrahangvizsgálat a CT-hez képest nagyobb érzékenységet biztosít. A CEMRC lehetővé teszi a pontos lokalizációt, míg az ERCP kiegészíti ezeket a módszereket, mivel diagnosztikai és terápiás lehetőségeket is kínál.

2.3.4. Fajok közötti különbségek élettani szempontból

A haemorheológiai paraméterek változásának dinamikája a hemodinamikai változásokkal együtt fajok közötti különbségeket is mutathat, mivel a hemodinamika^{77,78}, az epe összetétele^{79,80,81,82} és a haemorheológiai paraméterek fajonként^{2,83} és bizonyos betegségekben^{84,85} különbözőséget mutathatnak.

A normál artériás középnyomás (MAP) felnőtteknél jellemzően 70 és 100 Hgmm között változik, átlagosan 93-100 Hgmm körüli értékeket lehet mérni.⁸⁶ Ez az érték döntő fontosságú a szervek megfelelő vérellátásának biztosításához.⁸⁷ A sertések MAP-értéke általában magasabb, gyakran 111 Hgmm körül van, a fajtától és az életkortól függő eltérésekkel. Vizsgálatok kimutatták, hogy sertésekben a bal kamra szisztolés nyomása elérheti a 109 Hgmm értéket.⁸⁸ Az emberek és a patkányok MAP-értékei hasonlóak, míg a sertések MAP-értékei valamivel magasabbak.^{88,89}

A felnőttek nyugalmi pulzusszáma általában 60 és 100 ütés/perc (bpm) között van, mely tartományt az erőnléti szint és az életkor befolyásolhatja. A sertések szívfrekvenciája 91 és 167 bpm között mozog, egyes fajtáknál 116 bpm körüli átlaggal.⁸⁸ Ez a magasabb pulzusszám a méretükből és az anyagcsere-szükségleteikből adódik. A patkányok nyugalmi pulzusszáma jelentősen magasabb, jellemzően 305 és 500 bpm között van, ami a kisebb testtömegű, magasabb anyagcserével rendelkező emlősökre jellemző.⁹⁰

Az epe összetétele jelentősen eltér az emberek, sertések és patkányok között, ami tükrözi az eltérő emésztési és anyagcsereigényeiket (I. táblázat). Az ember túlnyomórészt kólsavat (CA) és kenodezoxikólsavat (CDCA) termel, amelyek dihidroxilált epesavak. Ezek az epesavak főként glicinnel és taurinnal konjugálódnak. Az emberi epét magasabb hidrofobicitási index jellemzi, ami a hidrofób és potenciálisan toxikusabb epesavak nagyobb mértékű jelenlétére utal más fajokhoz képest. Ez az összetétel döntő fontosságú a hatékony zsíremulgeáláshoz és felszívódáshoz, valamint az epesav-homeosztázis fenntartásához.^{82,91} A sertések is termelnek CA-t és CDCA-t, de nagyobb arányban tartalmaznak hiokólsavat (HCA) és származékait, amelyek a plazmájukban lévő összes epesav több mint 75%-át alkotják. A HCA és konjugált formái (pl. a glikohiokólsav és a taurohiokólsav) fontos szerepet játszanak a glükózanyagcserében és a homeosztázisban.⁹¹ Az emberhez hasonlóan a glicin amidáció dominál, de az epesavprofil összességében kevésbé toxikus, mint az emberé, ami eltérő

metabolikus alkalmazkodást tükröz.^{82,91} A patkányok elsősorban murikólsavat (MCA), valamint CA-t és CDCA-t termelnek. Epesavprofiljukat a tri-OH epesavak nagyobb mértékű jelenléte jellemzi, amelyek általában hidrofilebbek és kevésbé toxikusak, mint az emberben találhatóak.^{82,91} Patkányokban a taurin amidáció dominál, ami kevésbé hidrofób és a táplálkozási szokásaiknak jobban megfelelő epesavösszetételt eredményez.^{82,91}

I. táblázat: Az ember és sertés epehólygában található epe összehasonlítása (Kobayashi és mtsai, 1998 alapján)

Paraméter	Humán	Sertés
Viszkozitás	3,5±1,8	3,5±2,2
pH	6,8±0,5	6,9±0,6
Na (mEq/L)	307±241	269±97
K (mEq/L)	13,4±6,3	11,7±2,4
Cl (mEq/L)	158±212	81,4±113,8
HCO ₂ (mEq/L)	8,6±5,8	13,1±9,9
Ca (mg/dl)	47±17,3	31,1±11
P (mg/dl)	6,8±6,7	2,9±1,9
Mg (mg/dl)	25,2±14,2	7,5±2,2
Cholesterol (mg/dl)	219±234	335±201
Totál bilirubin (mg/dl)	668±340	36,1±15
Indirekt bilirubin (mg/dl)	343±192	20,4±8
Glikokólsav (mg/dl)	64936±85268	734±164

Az epevezeték és az epehólyag (cholecysta) anatómiája is jelentős különbségeket mutat. Az emberi epeutak rendszeréhez tartozik a ductus hepaticus communis, amelyet a ductus hepaticus dexter és sinister összefolyása alkot. A ductus choledochus átmérője általában 6-8 mm, és a ductus pancreaticus majossal együtt nyílik a papilla duodeni majorba (Vater-papilla).⁹² A sertések epevezetékrendszere hasonló az emberéhez, a közös epevezeték szintén a nyombélbe

nyílik. Az anatómia azonban némileg eltérhet az elágazási mintázat és a ductusok mérete tekintetében.^{92,93} A patkányok eltérő epeúti anatómiát mutatnak. Teljesen hiányzik az epehólyagjuk, ami jelentős eltérés mind az embertől, mind a sertéstől. A máj által termelt epe tárolás nélkül közvetlenül a nyombélbe folyik.^{92,94}

2.4. Antitrombotikus szerek

A haemorheológiai paraméterek, mint például a vörösvérsejtek deformabilitása és aggregatiója, számos pathofiziológiás kórképben megváltozhatnak, azonban külső befolyásoló tényezők is hatással lehetnek ezen változókra, többek között a preanalitikai tényezők, de a patológiás állapotok kezelésére használt terápiák is.^{95,96,97} Ezen terápiák közé sorolható az antitrombotikus szerek alkalmazása is, melynek haemorheológiai hatásai részben ismertek^{9,10,11}, azonban az orvos- és egészségtudomány folyamatos fejlődésének köszönhetően gyakran jelennek meg újabb készítmények, melyeknek micro-rheológiai paramétereire gyakorolt hatásai még feltáratlanok.

2.4.1. Vérlemezkegátló készítmények

A vérlemezkegátló szerek csökkentik a vérlemezkek összetapadási (aggregációs) képességét, ami a vérrögök kialakulásának egyik kulcsfontosságú lépése. Azáltal, hogy beavatkoznak ebbe a folyamatba, segítenek megelőzni a trombusok kialakulását az artériás keringésben, azokon a helyeken, ahol a véráramlás a plakkok felszakadása vagy az erek sérülése miatt károsodhat.^{98,99,100}

Ezeket a szereket elsősorban a trombotikus események megelőzésére használják a magas kockázatú betegeknél, például azoknál, akiknek a kórtörténetében már volt szívinfarktus vagy stroke, vagy akik olyan eljárásokon esnek át, mint az angioplasztika vagy stent behelyezése. A kettős thrombocyta-aggregatio-ellenes kezelés (DAPT), amely az aszpirint

P2Y₁₂-gátlóval kombinálva, bizonyítottan jelentősen csökkenti az ismétlődő kardiovaszkuláris események kockázatát.¹⁰¹

A vérlemezke-aggregatio megakadályozásával a thrombocyta-aggregatio-gátló szerek segítenek csökkenteni az ischaemiás szövődmények, például a szívinfarktus és a stroke kockázatát, különösen az atherosclerosisban szenvedő vagy sebészeti beavatkozáson átesett betegek esetében.¹⁰⁰

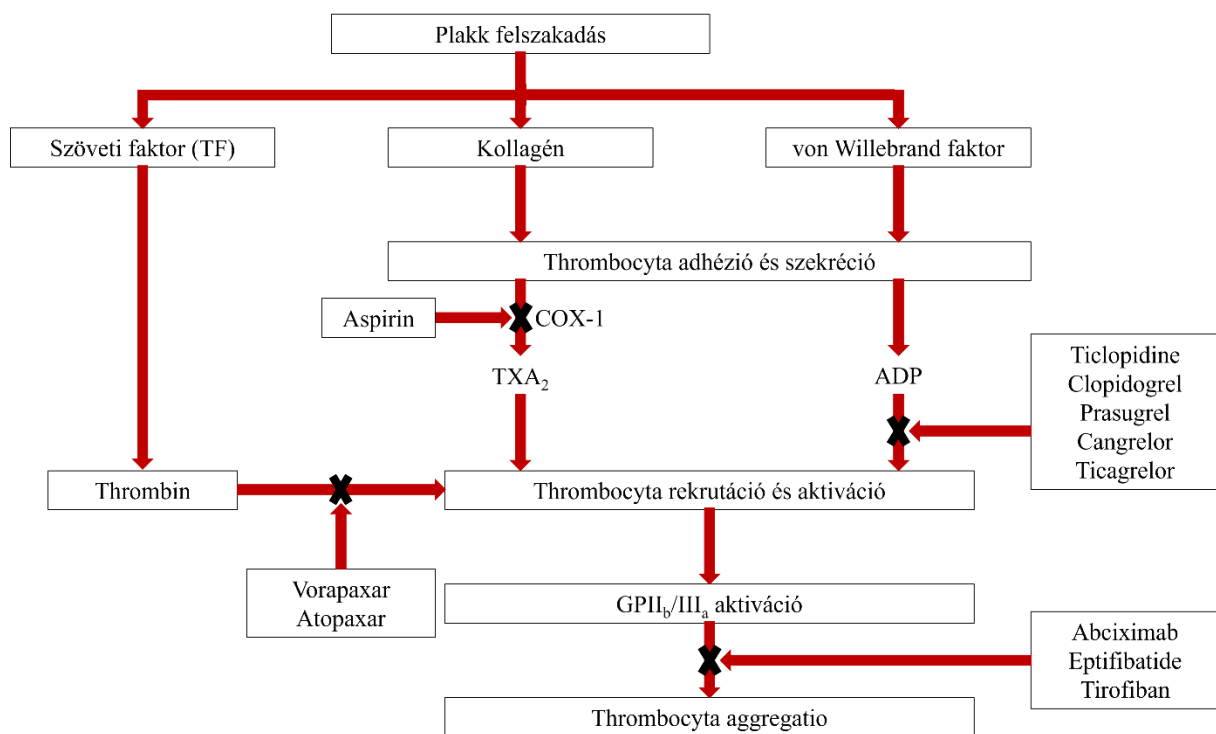
A thrombocytagátló vagy thrombocyta-aggregatio gátló gyógyszerek hatásmechanizmusuk és kémiai szerkezetük alapján több csoportba sorolhatók, melyet a II. táblázat foglal össze.¹⁰²

II. táblázat: A vérlemezkegátló készítmények osztályozása (Das és mtsai, 2010 alapján)

Csoport megnevezése	Gyógyszer készítmény
Ciklooxygenáz (COX) gátlók	Aspirin Indobufen
ADP receptor antagonisták	Ticlopidine Clopidogrel Prasugrel Cangrelor Ticagrelor Elinogrel
Glikoprotein II _b /III _a gátlók	Abciximab Tirofiban Eptifibatide Defibrotide
Foszfodiészteráz gátlók	Dipyridamole Cilostazol
Proteáz-aktivált-receptor-1 (PAR-1) antagonisták	Vorapaxar Atopaxar
Tromboxán-A ₂ (TxA ₂) szintézist gátló	Terutroban
Thrombocyta adhézió gátlók	ARC1779 DZ-697b
Nitrogén-oxid felszabadító aspirin	NCX-4016
Kollagén-thrombocyta interakció gátló	PR-15 Monoklonális antitestek Aptamerek

Néhány vérlemezkegátló készítmény hatáshelyét mutatja be a 5. ábra.¹⁰³ Az egyes csoportok különböző hatásmechanizmus szerint gátolják a vérlemezke-aggregatiót. A ciklooxygenáz (COX) gátlók a tromboxán A₂ termelődését akadályozzák a ciklooxygenáz enzim

irreverzibilis gátlásával¹⁰⁴, az ADP receptor antagonisták a P2Y₁₂ receptort gátolják a vérlemezkéken¹⁰⁵, míg a glikoprotein II_b/III_a gátlók közvetlenül a glikoprotein II_b/III_a receptort gátolják.¹⁰⁶ A foszfodiészteráz gátlók a foszfodiészteráz III-at gátolják, ami a cAMP-szint emelkedéséhez és a vérlemezkeaktiváció gátlásához vezet.^{107,108} A proteáz-aktivált-receptor-1 (PAR-1) antagonisták szelektíven antagonizálják a PAR-1 receptort, amely a humán vérlemezkék fő thrombin receptora.^{109,110}



5. ábra

Vérlemezkegátló készítmények hatáshelye

TXA₂: tromboxán A₂, COX-1: ciklooxygenáz-1, ADP: adenzindifoszfát, vWF: von Willebrand faktor, GP: glikoprotein, PAR-1: proteáz-aktivált receptor-1
(Weitz, 2022 alapján)

A thrombocytagátló vagy thrombocytá-aggregatio gátló gyógyszerek alkalmasak a trombotikus rendellenességek megelőzésére és kezelésére, különösen koszorúér-betegségben, akut koszorúér-szindrómában és ischaemiás stroke-ban szenvedő betegeknél.^{100,101} A thrombocytagátló vagy thrombocytá-aggregatio gátló szer kiválasztása a konkrét klinikai helyzettől, a beteg állapotától, valamint a lehetséges kockázatoktól és előnyöktől függ.

2.4.2. Véralvadásgátló készítmények

A véralvadásgátlók elsődleges feladata, hogy megakadályozzák a vérrögök kialakulását az erekben. Ez különösen fontos olyan állapotokban, ahol fokozott a vérrögek képződés kockázata, például pitvarfibrilláció, mélyvénás trombózis (DVT) és bizonyos műtétek után.^{111,112,113}

A véralvadásgátlók úgy hatnak, hogy megszakítják az alvadási kaskádban, vagyis a vérrögek képződéshez vezető folyamatban részt vevő különböző útvonalakat. Közvetlenül hathatnak bizonyos alvadási faktorokra, vagy közvetve a természetes véralvadásgátlók, például az antithrombin aktivitásának fokozásával.¹¹⁴

A vérrögek képződés megakadályozásával az antikoagulánsok jelentősen csökkentik a súlyos szövődmények, így a stroke, a szívroham és a tüdőembólia kockázatát. Különösen előnyösek a trombusképződésre hajlamosító állapotú betegek számára.¹¹⁵

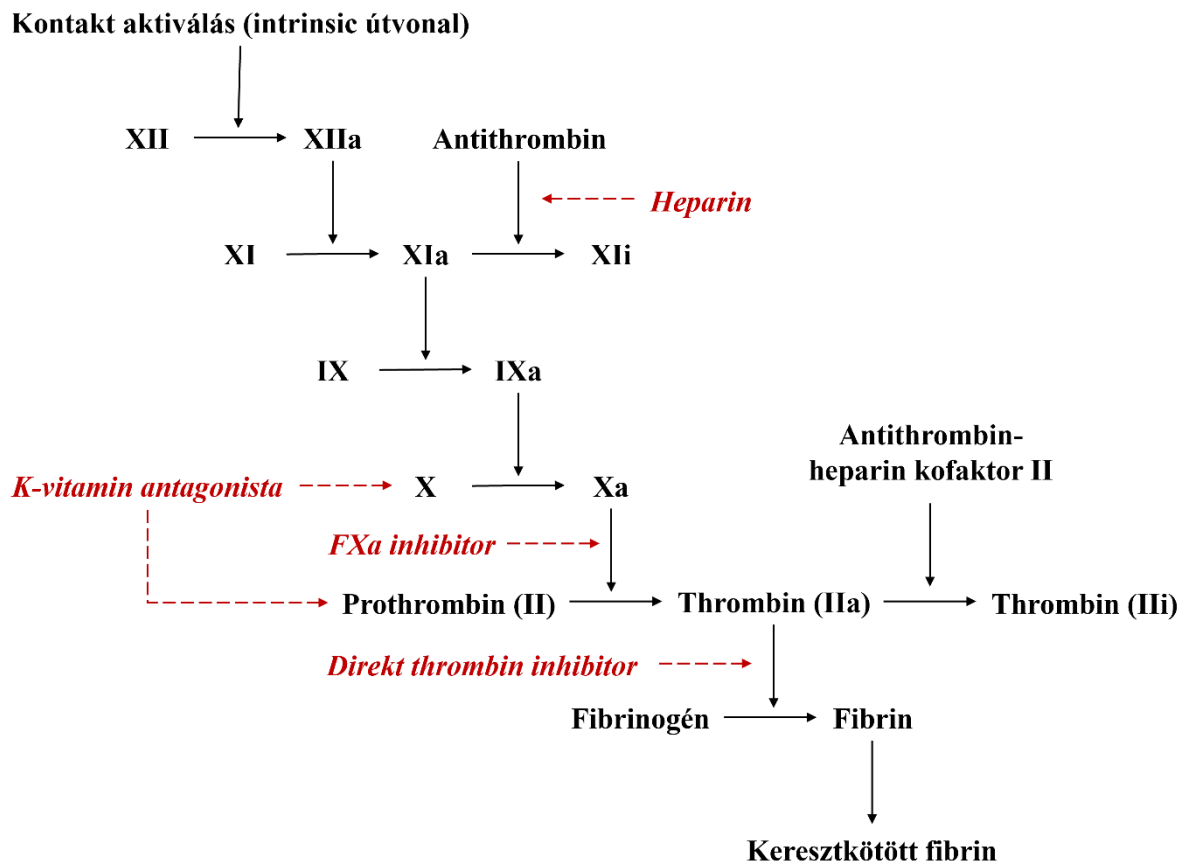
A véralvadásgátló gyógyszerek hatásmechanizmusuk és kémiai szerkezetük alapján több csoportba sorolhatók, melyet a III. táblázat foglal össze.¹¹⁶

III. táblázat: A véralvadásgátló készítmények osztályozása (Adya és mtsai, 2016 alapján)

Csoport neve	Alkalmazás módja	
	Parenterális	Orális
Heparin	Frakcionálatlan heparin Alacsony molekulásúlyú heparin Enoxaparin Dalteparin Heparinoid Danaparoid	
K vitamin antagonisták (kumarin)		Warfarin Acenocoumarol Phenindione
Direkt thrombin inhibitor	Hirudin Argatroban	Dabigatran Melagatran
Xa faktor inhibitor	Fondaparinux Idraparinux	
Direkt Xa faktor inhibitor		Rivaroxaban Apixaban

A heparinokat és a K-vitamin antagonistákat leginkább a vénás tromboembólia kezelésében, míg a direkt thrombin és az Xa faktor inhibitorokat a szövődményes és beavatkozást igénylő betegeknél alkalmazzák.¹¹⁷

A véralvadási kaszkád intrinsic útvonalt és a véralvadásgátlók hatáshelyét mutatja be a 6. ábra.¹¹⁶



6. ábra

A véralvadási kaszkád intrinsic útvonala és a véralvadásgátlók hatáshelye

F: faktor, a: aktív forma, i: inaktív forma

(Adya és mtsai, 2016 alapján)

A frakcionálatlan heparin (UFH), az alacsony molekulású heparin (LMWH), a heparinoid és az Xa faktor inhibitor véralvadási faktorokat (XIIa, IXa, XIa, Xa) és a thrombint inaktiválják a heparin pentaszacharid szekvenciájának thrombinhoz való kötődése után. Az enoxaparin gátolja a P-szelektin expresszióját is, és dóziszfüggő módon csökkenti az ICAM1 és

az MMP expresszióját, ezáltal csökkenti a gyulladást.¹¹⁸ A Danaparoid (Heparinoid) nagyobb Xa kötődési specificitással rendelkezik, mint az LMWH. A K-vitamin antagonisták a K-vitamint aktív KH₂-vitaminná alakító K-vitamin epoxid reduktázt gátolják, amely a II, VII, IX és X alvadási faktorok számára szükséges a γ -karboxilációhoz. A direkt thrombin inhibitor az antitrombotikus hatást a thrombin aktív helyéhez való közvetlen és reverzibilis kötődése révén fejti ki, ami a fibrinképződés, a vérlemezkék és az V, VIII, XIII faktorok, valamint a C-protein aktiválódásának gátlásához vezet. A Dabigatran (Direkt thrombin inhibitor) mind a szabad, mind a vérröghez kötött thrombinhoz kötődik, és közvetve, a szöveti plazminogén-aktivátor (tPA) szintjének növelésével és a thrombin által aktiválható fibrinolízis inhibitor (TAFI) gátlásával elősegíti a fibrinolízist is.¹¹⁶

Az antikoaguláns szereket preventív céllal alkalmazzák bizonyos sebészi beavatkozások után vagy hosszabb ideig mozgásképtelen betegeknél a posztoperatív tromboembóliás szövődmények megelőzésére^{111,112,113,115}, illetve terápiás céllal a már meglévő tromboembóliás állapotok kezelésében, segítve a meglévő vérrögök növekedésének megakadályozását, és lehetővé téve, hogy a szervezet természetes fibrinolitikus folyamatai feloldják azokat.¹¹⁹

2.4.3. A heparin haemorheologiai hatásai

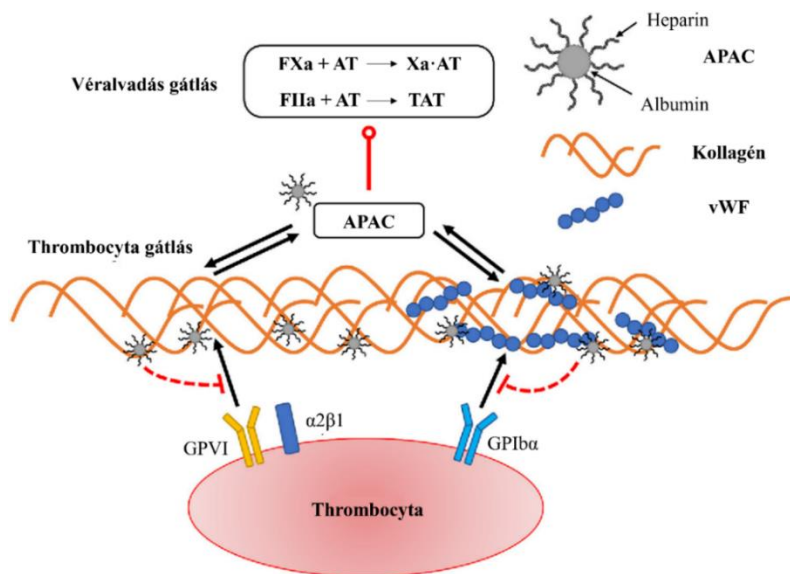
A frakcionálatlan heparin, a klinikai gyakorlatban gyakran alkalmazott antitrombotikus szer, alacsony nyírási sebességnél növeli a vörösvérsejtek szedimentációs rátáját és a teljes vér viszkozitását, ami a vörösvérsejtek aggregációjának növekedésére utal.¹⁰ Ezen tulajdonsága ellenére a heparint számos intravaszkuláris eljárás során alkalmazzák a kanülökben, de a frakcionálatlan heparin az extrakorporális membránoxigenizáció (ECMO) és a kardiovaszkuláris műtétek során is a jelenlegi nemzetközi standard antikoaguláns.¹²⁰

A vörösvérsejtek túlzott aggregációja elzárhatja a kis ereket, különösen a microcirculatio szintjén, ami csökkentheti a szövetekbe jutó oxigén és tápanyagok mennyiségét.^{44,121,122}

A vörösvérsejt aggregatio jelentős hatással van az *in vivo* hemodinamikára, és hátrányosan befolyásolhatja a vörösvérsejtek eloszlását és az áramlás dinamikáját a microcirculációban.^{123,124,125} Amellett, hogy a kapillárisok megtelnek és idővel diszfunkcionálissá válnak¹²⁵, a vörösvérsejt-aggregatio a vér viszkozitását is megváltoztatja és csökkenti a funkcionális kapillárisok sűrűségét.¹²⁴ A vér látszólagos viszkozitása a csökkenő nyírási sebességgel nő.^{126,127} A vörösvérsejt aggregatio létfontosságú szerepet játszik a vér viszkozitásának meghatározásában alacsony nyírási sebességnél.^{127,128}

2.4.4. Kettős vérlemezke- és véralvadásgátló készítmény (APAC)

A heparin a hízósejtekből származik, heparin-proteoglikánok (HEP-PG) formájában, az érfalakon ugyanazon a helyen, mint a szöveti faktor. A szövetkárosodás során a hízósejtek aktiválódnak, és az UFH-nál nagyobb molekulatömegű heparin-proteoglikánokat szabadítanak fel^{129,130,131}, amelyek thrombocytagátló vagy thrombocytá-aggregatio gátló (kollagén és thrombin felé) és véralvadásgátló tulajdonságokkal rendelkeznek.^{129,130} A félszintetikus kettős thrombocytá- és véralvadásgátló, az APAC, az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (United States Food and Drug Administration, FDA) által még nem engedélyezett vizsgálati gyógyszer, egy heparin-proteoglikán-mimetikum, a hemosztázis rendszerre gyakorolt kettős hatással (thrombocytagátló vagy thrombocytá-aggregatio gátló - és antikoaguláns hatás) rendelkező, kifejezetten érrendszeri beavatkozásokra szabott heparin-proteoglikán-mimetikum. Az APAC hízósejtekből származó heparin-proteoglikánokból áll, frakcionálatlan heparin félszintetikus konjugátum és fehérjemag formájában. Az APAC a természetben előforduló HEP-PG-ket utánozva antitrombotikus és gyulladáscsökkentő hatású, és a közelmúltban végzett kiterjedt *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok alátámasztották az APAC ígéretes és egyedülálló képességét a helyi antitrombotikus hatás kiváltására.^{132,133,134,135} Az APAC hatásmechanizmusát az 7. ábra szemlélteti.¹³⁶



7. ábra

Az APAC thrombocytopenia- és véralvadásgátlóként való működésének vázolata.

FXa: aktivált X faktor, FIIa: aktivált II faktor, AT: antithrombin, APAC: kettős vérlemezke- és véralvadásgátló, vWF: von Willebrand faktor, GPVI: thrombocytopenia receptor glikoprotein VI, GPIIb: GPIIb-IX-V komplex glikoprotein komponense (Chen és mtsai, 2018 alapján)

Citráttal alvadásgátlott humán plazmában vagy teljes vérben *in vitro* az APAC koncentrációfüggő módon gátolja a kollagén által kiváltott thrombocytopenia-aggregációt^{131,137}, mérsékli az intrinsic útvonalon indított koagulációt, meghosszabbítja az aktivált parciális tromboplastin időt (APTT), és teljes vérben csökkenti a thrombocytopenia- és fibrinlerakódást a trombogén felületeken a von Willebrand faktor (vWF) által kiváltott mechanizmus révén.¹³⁶

Sertés, pávián és egér trombózismodellekben az APAC antitrombotikus ágensként hat azáltal, hogy a vWF-ral és a lamininnel kolokalizálódik a friss sérülés helyén.^{131,138} Az ischaemiás akut vesekárosodás patkánymodelljében az APAC vaszkuloprotektív hatását mutatták ki.¹³⁹ A szív- és érrendszeri betegségek összetettsége szükségessé tette a különböző mechanizmusú antitrombotikus szerek - thrombocytopenia-gátló vagy thrombocytopenia-aggregatio gátló, antikoaguláns és fibrinolitikus szerek - kombinált alkalmazását.^{136,140,141} A gyógyszerek fokozhatják a hatékonyságot, de az alkalmazott gyógyszerek számával nő a vérzésveszély.^{136,142,143} Ezért egyetlen olyan antitrombotikus készítmény alkalmazása, amely egyszerre rendelkezik szelektált thrombocytopenia-gátló vagy thrombocytopenia-aggregatio gátló - és antikoaguláns funkcióval, nagy hatással lehet ezen a területen.^{136,143}

3. 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-rheológiai 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.

4. 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).

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

4.1.1. Kísérleti állatok és mintavételi protokoll

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

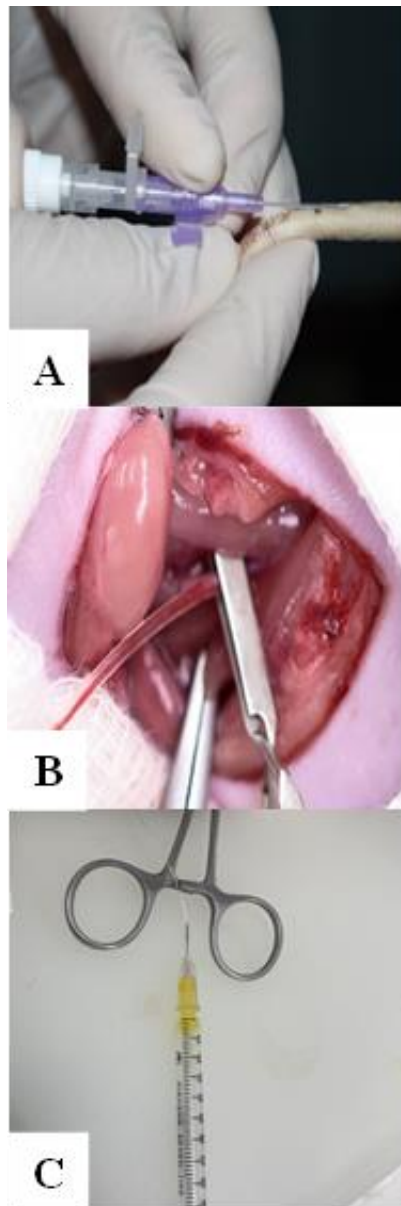
A patkányokat standard ketrecekben (Eurostandard IV, Tecniplast, Buguggiate, Olaszország) tartottuk, 22±2 °C hőmérsékleten, 55±10%-os páratartalom mellett, 12-12 órás világos/sötét ciklusban, vízhez és standard patkánytáphoz szabadon való hozzáféréssel.

A sertéseknek a ketrecek szellőztetését (15-20x légcseré/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.

4.1.1.1. 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 (8. ábra, A) a vérvételhez, folyadékterápiához és az epe beadásához. A jobb oldali arteria carotis communis kipreparáltuk és kanüláltuk (8. ábra, B)

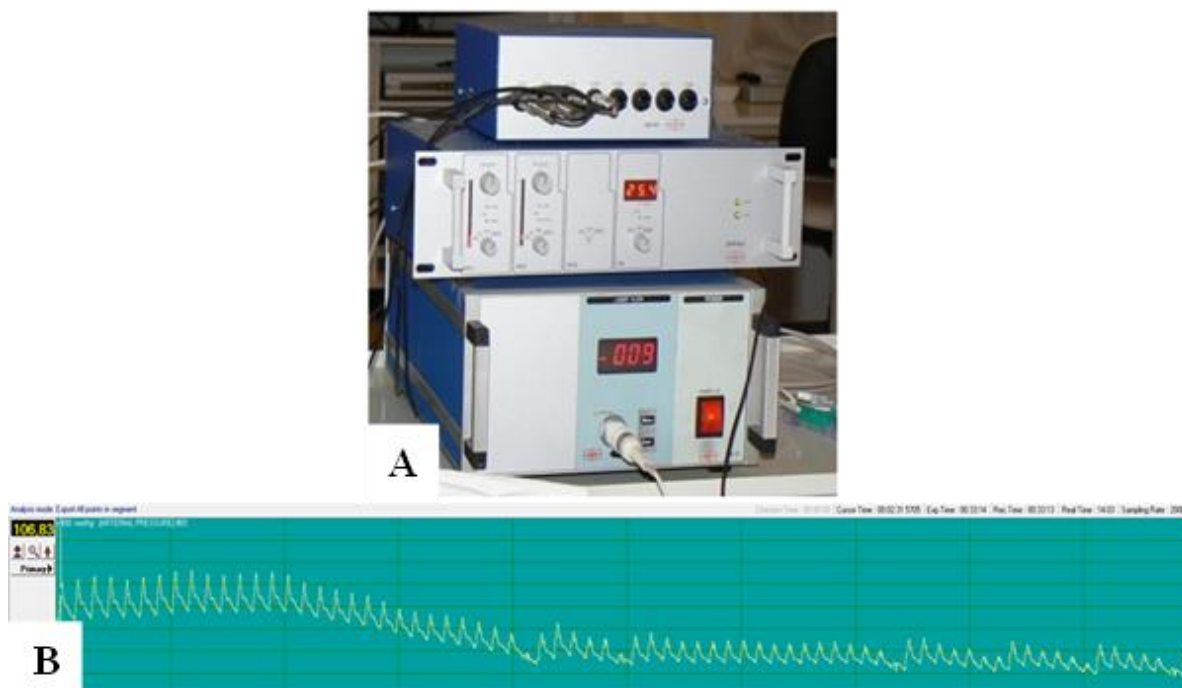
(O.D. 0,965 mm, Polyethylene Tubing Clay Adams, 427411, BD Intramedic™, Sollentuna, Svédország).



8. ábra

A 26 G vastagságú kanül behelyezése a laterális farokvénába (A), az arteria carotis communisba helyezett kanül (B), a ductus choledochusba behelyezett kanülhöz csatlakoztatott 27 G vastagságú tű az 1 ml-es fecskendővel, benne némi epével (C)

A kanült, centrális ligatúrával történő rögzítése után, a 9. ábrán látható invazív hemodinamikai monitorozó rendszerhez (Hemosys monitor system LD-01, Experimetria Kft., Budapest, Magyarország) csatlakoztattuk (9. ábra, A), mely az invazív vérnyomást folyamatos nyomásgörbe formájában rögzítette (9. ábra, B).



9. ábra

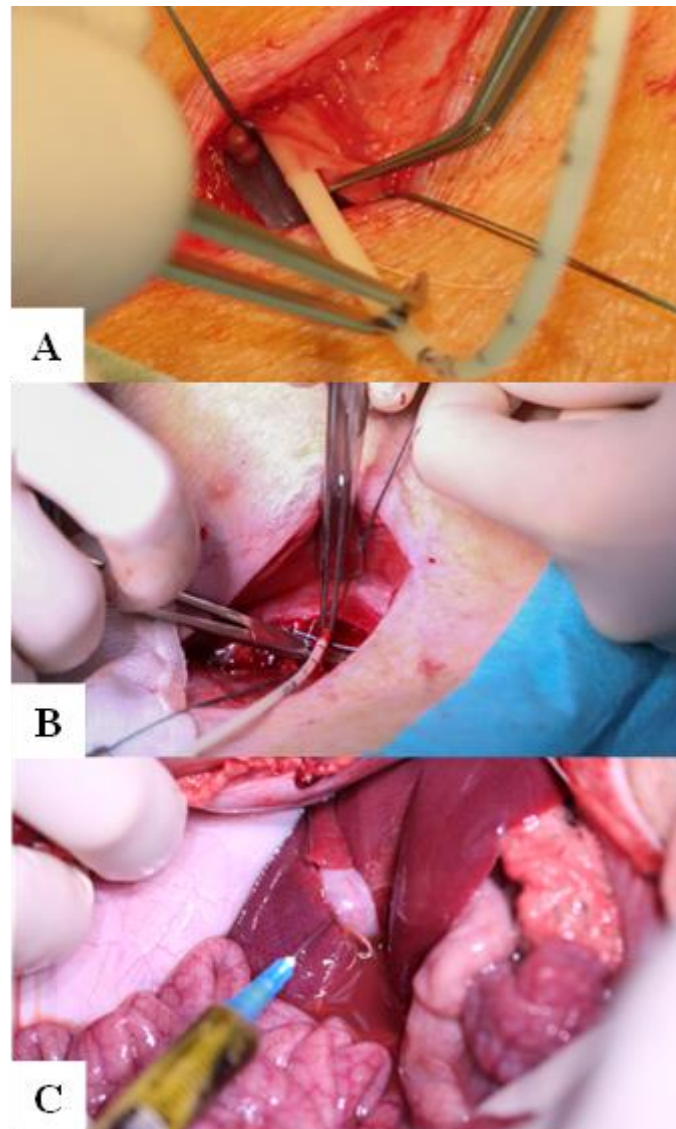
A vérnyomás és a szívfrekvencia monitorozásához használt Hemosys monitor system LD-01 hemodinamikai monitorozó rendszer (A) és a mérés során kapott reprezentatív vérnyomás görbe (B)

Az epegyűjtéshez median laparotomiát végeztünk, a ductus choledochust mikrosebészeti technikával kipreparáltuk és megnyitottuk, majd kanüláltuk (Micro-Renathane®, MRE-025 típus, 0,25 mm külső átmérő * 0,12 mm belső átmérő; Braintree Scientific Inc.).^{144,145} Egy 1 ml-es fecskendőt 27 G tűvel csatlakoztattunk a kanülhöz (8. ábra, C). Az epét 1 órán keresztül gyűjtöttük, ami körülbelül 250 µl extrahált epetérfogatot eredményezett.

4.1.1.2. 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 (Diazepeks 5 mg/ml, AS Grindeks, Riga, Lettország). Altatást követően az állatokat intubáltuk, és ahogy a 10. ábra „A” részén is látható, a jobb oldali vena jugularis

externat kanüláltuk (Certofix Trio, 7F, B.Braun Trading Ltd., Budapest, Magyarország) a vérvétel, folyadékterápia és epeadagolás céljából.



10. ábra

A jobb oldali vena jugularis externa kanülálása (A), az arteria femoralis kanülálása (B), az epe gyűjtése az epehólyag közvetlen punkciójával felső median laparotomiát követően (C)

A bal oldali arteria femoralisba helyezett kanülhöz (10. ábra, B) (Certofix Trio, 7F) a 9. ábra „A” részén látható invazív hemodinamikai rendszert (Hemosys monitor rendszer LD-01) csatlakoztattuk és az invazív vérnyomást folyamatos nyomásgörbe formájában rögzítettük (9. ábra, B).

Az epét az epehólyag közvetlen punkciójával nyertük felső median laparotomián keresztül (10. ábra, C). Ehhez 23 G vastagságú tűt és 5 ml térfogatú fecskendőt használtunk, és 5 ml epét gyűjtöttünk.

4.1.1.3. 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.

4.1.2. Laboratóriumi vizsgálatok

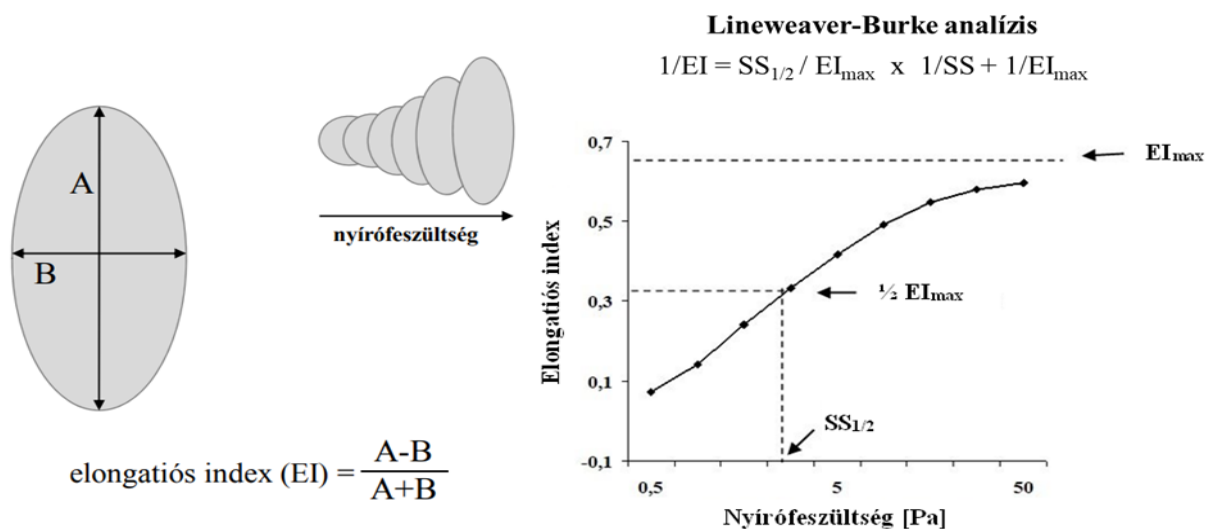
4.1.2.1. Haematologiai paraméterek

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]).

4.1.2.2. Vörösvérsejt hagyományos és ozmotikus gradiens deformabilitás

A vörösvérsejtek deformabilitásának meghatározásához a LoRRca Maxis Osmoscan ektacytométert (RR Mechatronics International B.V., Zwaag, Hollandia) használtuk.² A

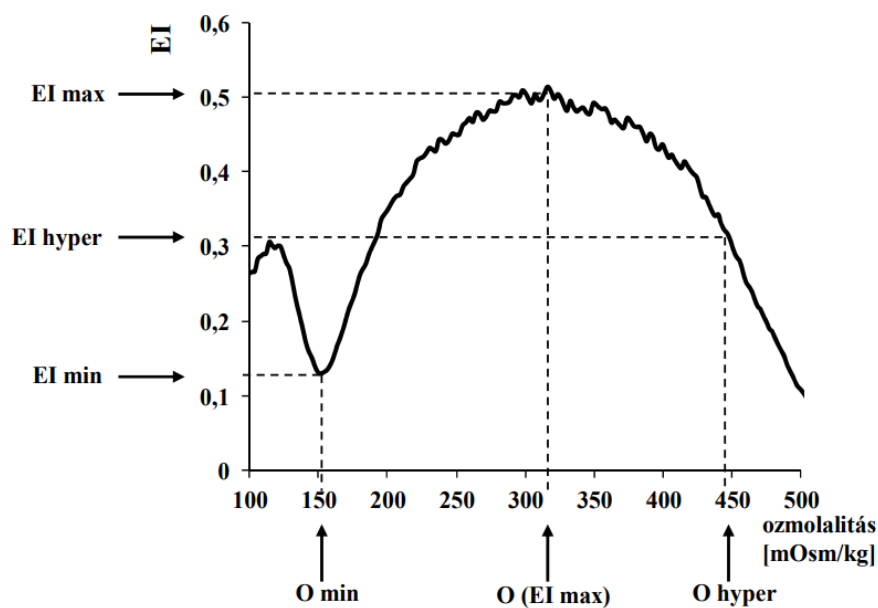
készülék egy statikus hengerből (*bob*) és egy forgatható hengerköpenyből (*cup*) áll (Coutte-rendszer). A vérmintát a *bob* és a *cup* közötti 0,3 mm-es résbe juttatjuk be. A mérés fényreflektancián alapul, a vérmintákat nyírásnak kitéve és lézerral megvilágítva a visszavert fény diffrakciós mintázatot 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) (11. ábra).¹⁴⁶ Az eredmények értékelése során az alacsonyabb EI vagy EI_{max} , és a magasabb $SS_{1/2}$ értékek a vörösvérsejtek csökkent deformálhatóságát jelezték.



11. ábra

Az elongációs index meghatározása a mérések során készített diffrakciós mintázat alapján, valamint ábrázolása a nyírófeszültség függvényében és parametrizálása a Lineweaver-Burke egyenlet segítségével (Başkurt és mtsai, 2009)

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 ozmolalítású (500 mOsm/kg) PVP-oldatokat kever a mintával, így a szuszpendáló közeg ozmolalítása folyamatosan változik. Az EI meghatározása állandó nyírófeszültség (30 Pa) mellett történik. Az elongatiós indexet folyamatosan regisztrálja a készülék az adott ozmolalítás érték függvényében. A mérés eredménye egy jellegzetes EI-ozmolalítás (O) görbe, melynek számos jellemző pontja van. Az alacsony ozmolalítás tartományban a minimális nyúlási index (EI min) és a hozzá tartozó ozmolalításérték (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 ozmolalítás tartományban pedig az EI hyper (a magas ozmolalítású környezetben a maximális nyúlási index fele) és az O hyper (12. ábra). Minden EI-O görbe alatti területet kiszámítottuk (Area).^{2,83,147} További paramétereket, mint ΔEI (a maximális és minimális EI értékek abszolút különbsége), ΔO (az ozmolalítás 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.⁸³

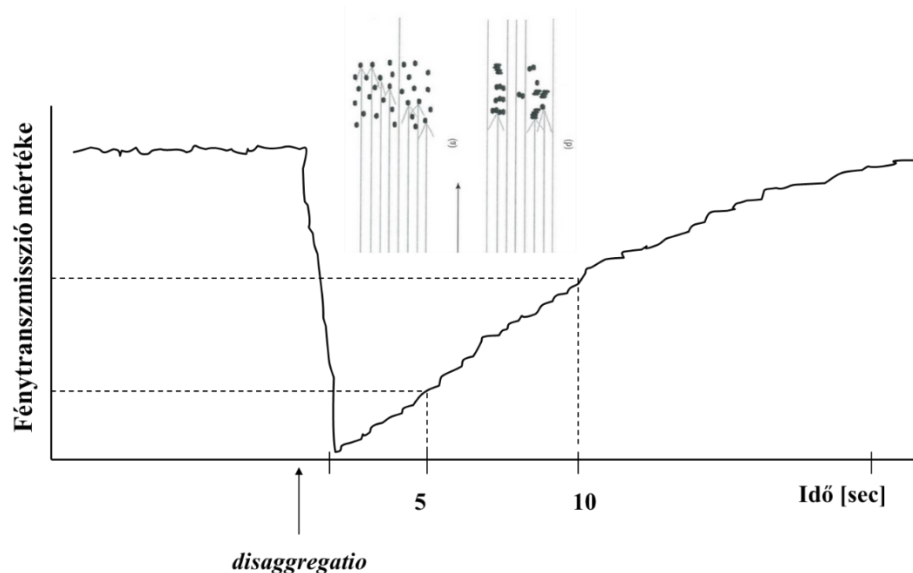


12. ábra

Osmoscan mérés során kapott elongatiós index-ozmolalítás görbe reprezentatív képe és a görbe jellemzésére szolgáló paraméterek (Clark és mtsai, 1983 alapján)

4.1.2.3. 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 μl antikoagulált vérre volt szükség. Ahogy a 13. ábra is szemléletes, 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 aggregatiót jelentenek.^{2,148}



13. ábra

A Myrenne MA-1 aggregométer működési elve

4.1.3. 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 varianciával (one-way ANOVA) vagy Kruskal-Wallis teszttel hasonlítottuk össze. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ értéknél határoztuk meg.

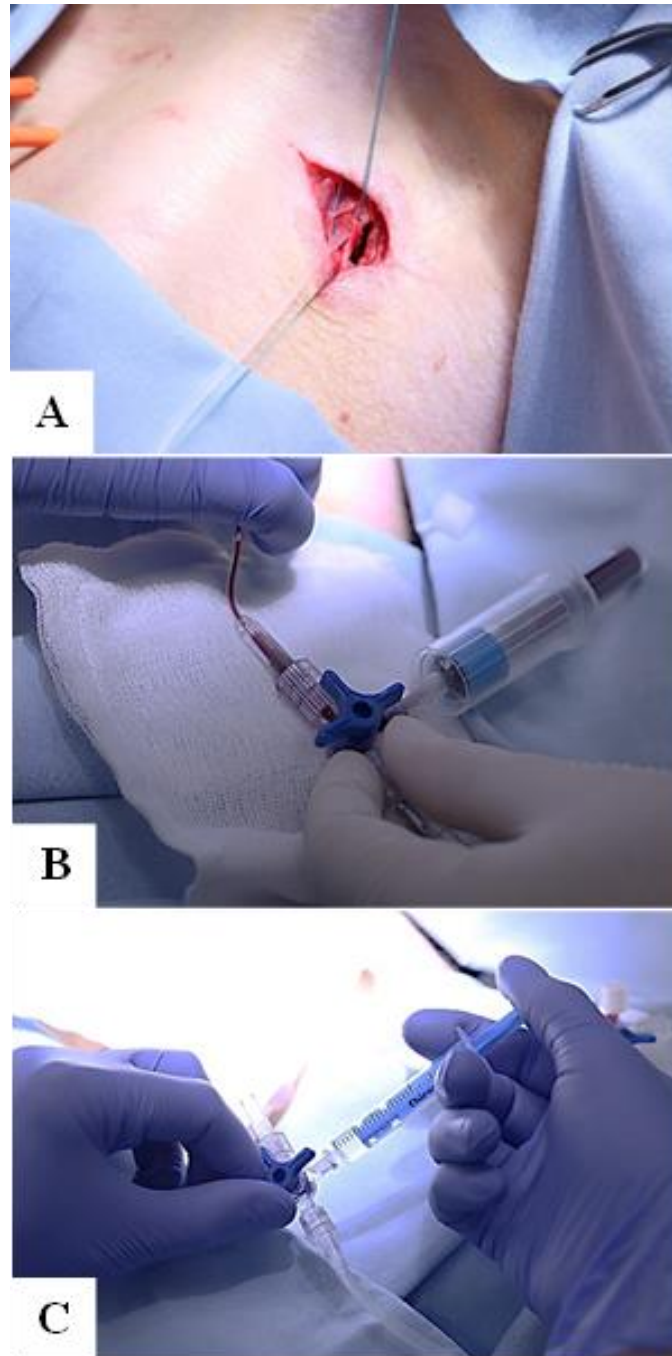
4.2. Kettős thrombocyta- és véralvadásgátló (APAC) szer hatása a vörösvérsejtek deformabilitására és aggregációjára sertésmodellben

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

4.2.1. Kísérleti állatok és mintavételi protokoll

4.2.1.1. Az APAC hatása a haemorheologiai paraméterekre

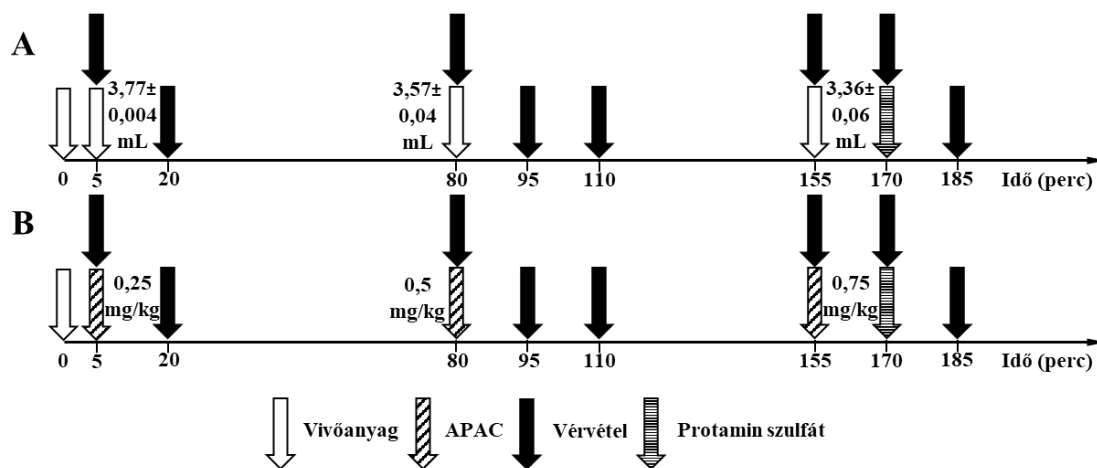
A kutatásba 12-13 hetes nőtény Hypor sertések ($n=5$ /csoport; testtömeg: $23,6 \pm 1,58$ kg) kerültek bevonásra. Altatásban, a 4.1.1.2. fejezetben leírt altatási protokoll szerint, mindkét oldali vena jugularis externaba kanült (Certofix Trio, 7F, B.Braun Trading Ltd., Budapest, Magyarország) helyeztünk (14. ábra, A). A 14. ábrán látható módon a jobb oldali vénán keresztül történtek a vérvételek vacutainer csövekbe (BD Vacutainer® csövek, 1,8 mg/ml K_3 -EDTA; Becton, Dickinson and Company, USA) (14. ábra, B), míg a vivőanyagot (1 mL 137 mM NaCl és 10 mM Na_2HPO_4 , 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 (14. ábra, C). A kanülálást követően a vizsgálat során mindkét oldalon (jobb és bal oldali vena jugularis externa) folyamatos folyadékpótlást biztosítottunk fizioológias sóoldattal ($1080,4 \pm 45,9$ ml, „Baxter” Nátrium-klorid 0,9%, pH= 4,5-7, ozmolaritás: 308 mOsm/l, Baxter Hungary Kft.).



14. ábra

A vena jugularis externa kanülálása (A), a zárt vértételi rendszerben történő mintavétel a kanülált vénán keresztül (B) és a vivőanyag, illetve a vizsgált készítmény beadásának folyamata (C)

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 vizsgálati protokollt a 15. ábra szemlélteti.



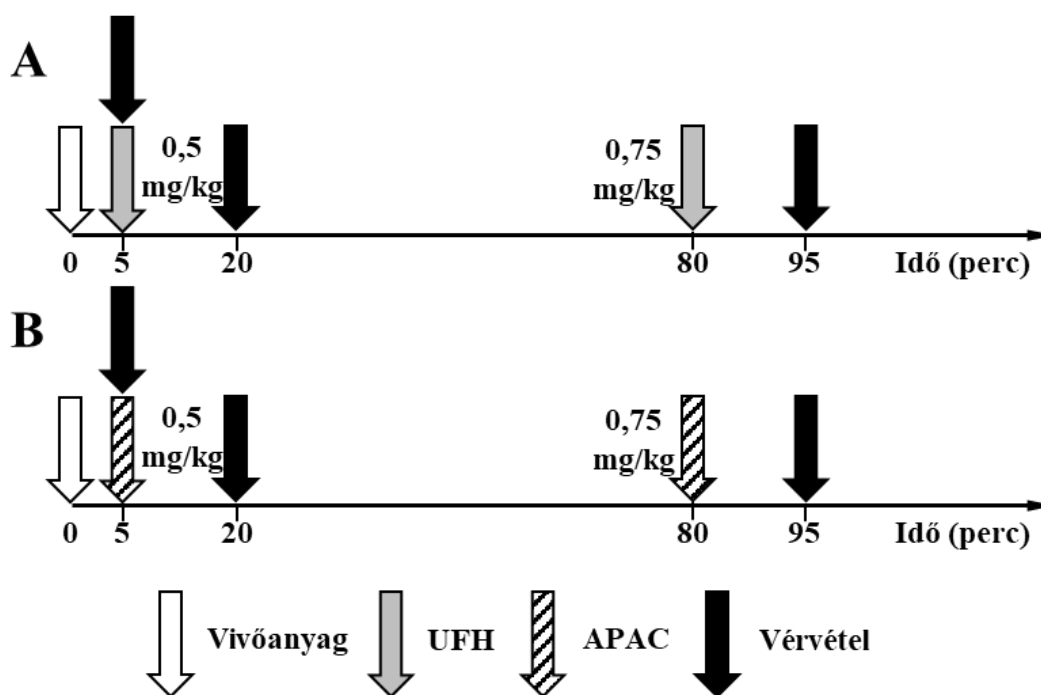
15. ábra

Az APAC haemorheológiai hatásainak vizsgálatához alkalmazott protokoll a mintavételek és az intravénásan adott bolusok idejével a Kontroll csoportban (**A**) és az APAC csoportban (**B**) APAC: kettős thrombocyta- és vérárvadásgátló készítmény

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.¹⁴⁹ Ezt követően az APAC-ot 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg és 0,75 mg/kg eszkalálódó dózisban adtuk be intravénásan. A jelenlegi becsült klinikai i.v. bolus adagolás kompatibilis a 0,25-0,5 mg/kg dózisokkal (kb. 45-90 NE/kg heparin), míg a 0,75 mg/kg a toxikológiai program alapján a maximális megengedhető mennyiséget meghaladja.¹⁵⁰ 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 F2084FI1, 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.

4.2.1.2. 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 dózisu készítmények hatását hasonlítottuk össze. A vizsgálati protokollt a 16. ábra szemlélteti.



16. ábra

Az UFH és az APAC összehasonlítása során alkalmazott protokoll a mintavételek és az intravénásan adott bolusok idejével az UFH csoportban (A) és az APAC csoportban (B) APAC: kettős thrombocyta- és véralkotó gátló készítmény, UFH: frakcionálatlan heparin

Először a vivőanyagot adtuk be, ezt követően az APAC vagy az UFH alacsony (0,5 mg/kg), majd magasabb (0,75 mg/kg) bolus dózisékat. Az első vérmintát 5 perccel a vivőanyag beadása után vettük, és alapértéknek tekintettük; a további mintavételek 15 perccel a vizsgált anyagok beadása után történtek.

4.2.2. Laboratóriumi vizsgálatok

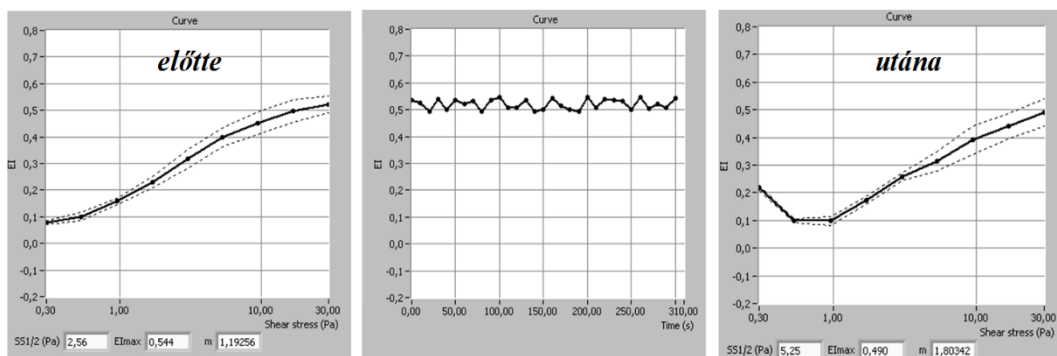
4.2.2.1. Haematologiai paraméterek

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 4.1.2.1. fejezetben ismertetett módszer szerint a Sysmex K-4500 haematologiai automatával határoztuk meg.

4.2.2.2. Vörösvérsejt hagyományos deformabilitás és membrán (mechanikus) stabilitás

A vörösvérsejt hagyományos deformabilitás méréseket a 4.1.2.2. fejezetben leírt módszerrel 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 (17. ábra). A kiértékelés során a mechanikus stressz előtt és után mért deformabilitás értékek arányait (előtte/utána arány) hasonlítottuk össze.¹⁵¹

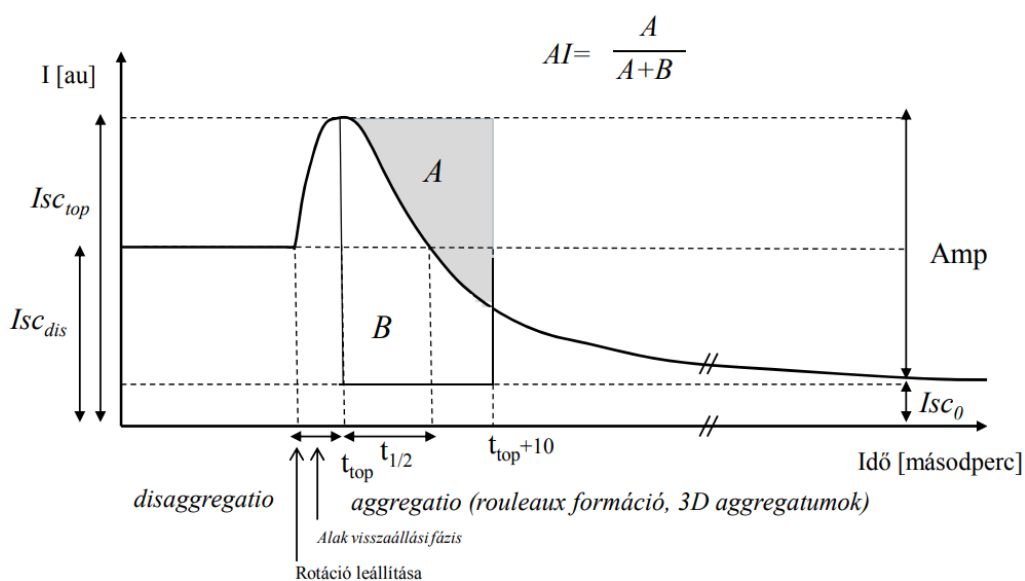


17. ábra

A membrán (mechanikus) stabilitási teszt előtt és után mért elongációs index-nyírófeszültség görbék, középen pedig a mechanikus stressz alatt mért elongációs index értékek

4.2.2.3. Vörösvérsejt aggregatio

A vörösvérsejtek aggregációját a LoRRca MaxSis Osmoscan ektacytométer (Mechatronics BV, Hollandia) készüléssel vizsgáltuk. A mérés során a lézerrel megvilágított mintáról visszaverődő lézerfényt (laser backscattering method) detektálja a készülék, mely során egy jellegzetes intenzitás-idő görbét kapunk (18. ábra). 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.² 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]).^{2,152} A mérésekhez 750-1000 μ l teljes vérre volt szükség. A készülék temperálható, 37 °C-on történtek a vizsgálatok.



18. ábra

A syllectometria elvén alapuló aggregatio mérés során kapott intenzitás-idő görbe és a meghatározható paraméterek (Hardeman és mtsai, 2007 alapján)

4.2.3. Statisztikai analízis

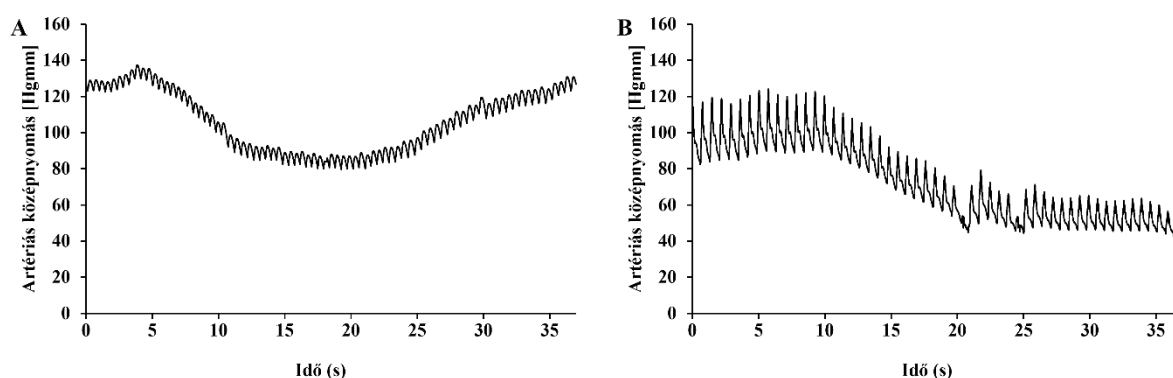
A statisztikai elemzések elvégzésére a SigmaStat Software 3.1.1.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) programot használtuk. Az adatokat átlag \pm S.D. formában fejeztük ki. Az esetszámot a G*power statisztikai programmal becsültük meg. A Kolmogorov-Smirnov-féle normalitásvizsgálat eredményei alapján 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.

5. EREDMÉNYEK

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

5.1.1. Hemodinamikai paraméterek

A 19. ábra az artériás középnyomás (MAP) változásának reprezentatív görbéit mutatja az *in vivo* epe befecskendezését követően patkányok (19. ábra, A) és sertések (19. ábra, B) esetében.



19. ábra

Az artériás középnyomás reprezentatív görbéi az epe beadása után patkányokban (A) és sertésekben (B)

Az egyszeri dózisú epe bolus beadása után az artériás középnyomás 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 (IV. táblázat).

IV. táblázat: Az artériás középnyomás (MAP) és a szívfrekvencia (HR) csökkenésének mértéke, a csökkenés és a normalizálódás időtartamával

Faj		Patkány		Sertés	
Paraméter		MAP	HR	MAP	HR
Csökkenés mértéke (%)		15,2±6,9	4,6±2,1	32,1±14 *	25,2±11,6 *
Csökkenéshez szükséges idő (s)		10,6±2,6		48,3±18,9 *	
Normalizálódáshoz szükséges idő (s)	50 %	24,4±7		83,3±25,2 *	
	80 %	34,8±8,4		110,3±22 *	
	100 %	45±9,5		130±20 *	

MAP: artériás középnyomás, HR: szívfrekvencia; Átlag ± S.D.; * p < 0,05 vs. patkány.

5.1.2. Haematologiai paraméterek

A V. táblázat összefoglalja az általános mennyiségi és minőségi haematologiai paramétereket. 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 μ l epe; $p=0,015$ vs. 5 μ l epe; $p=0,048$ vs. *in vivo* 200 μ l/kg epe) és a haematocrit értékek ($p<0,001$ vs. 1 μ l epe; $p=0,006$ vs. 5 μ l epe; $p<0,001$ vs. *in vivo* 200 μ 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.

V. táblázat: A haematologiai paraméterek változása az epe-vér szuszpenziókban (*in vitro*, 1 μ l vagy 5 μ l epe 500 μ l vérben), bilhaemiában (*in vivo*, 200 μ l/kg epe i.v.), összehasonlítva az alap értékekkel (intakt teljes vér)

	Intakt teljes vér		<i>in vitro</i> 1 μ l epe		<i>in vitro</i> 5 μ l epe		<i>in vivo</i> (bilhaemia)	
	Patkány	Sertés	Patkány	Sertés	Patkány	Sertés	Patkány	Sertés
Vvs [$10^{12}/L$]	8,25 \pm 0,33	6,95 \pm 0,64	8,76 \pm 0,58	6,42 \pm 0,71*	8,6 \pm 0,43	6,52 \pm 0,65	8,68 \pm 0,5	7,01 \pm 1,18
Fvs [$10^9/L$]	7,08 \pm 1,31	24,78 \pm 2,74	6,98 \pm 2,48	25,01 \pm 2,96	6,63 \pm 1,93	24,57 \pm 2,75	6,71 \pm 1,92	21,78 \pm 4,3
Hgb [g/L]	147,7 \pm 5,5	123,8 \pm 14,9	159 \pm 8,5*	115,1 \pm 13,4	156,4 \pm 7,2*	116,9 \pm 12,6	160,6 \pm 7,8*	123,9 \pm 19,9
Hct [%]	44,35 \pm 1,33	41,09 \pm 4,67	48,34 \pm 2,61*	38,09 \pm 4,22	47,57 \pm 2,19*	38,76 \pm 3,95	48,64 \pm 2,65*	40,86 \pm 6,91
MCV [fL]	53,82 \pm 1,33	59,04 \pm 2,26	55,24 \pm 1,76	59,33 \pm 1,92	55,36 \pm 1,67	59,48 \pm 2,01	56,03 \pm 1,74*	59,07 \pm 2,06
MCH [pg]	17,31 \pm 1,9	17,79 \pm 0,78	18,19 \pm 1,01	17,93 \pm 0,92	18,21 \pm 0,71	17,93 \pm 0,93	18,51 \pm 0,69	17,88 \pm 0,93
MCHC [g/L]	321,5 \pm 32,8	301,2 \pm 4,9	329 \pm 10,5	302 \pm 7	328,8 \pm 3,7	301,4 \pm 6,8	330,2 \pm 4,4	302,9 \pm 8,1
Thr [$10^9/L$]	744,6 \pm 175,1	409,9 \pm 94,3	808,5 \pm 114,9	441,9 \pm 78,8	785,8 \pm 110,5	427,6 \pm 66,5	862,7 \pm 148,9	385,6 \pm 110,7

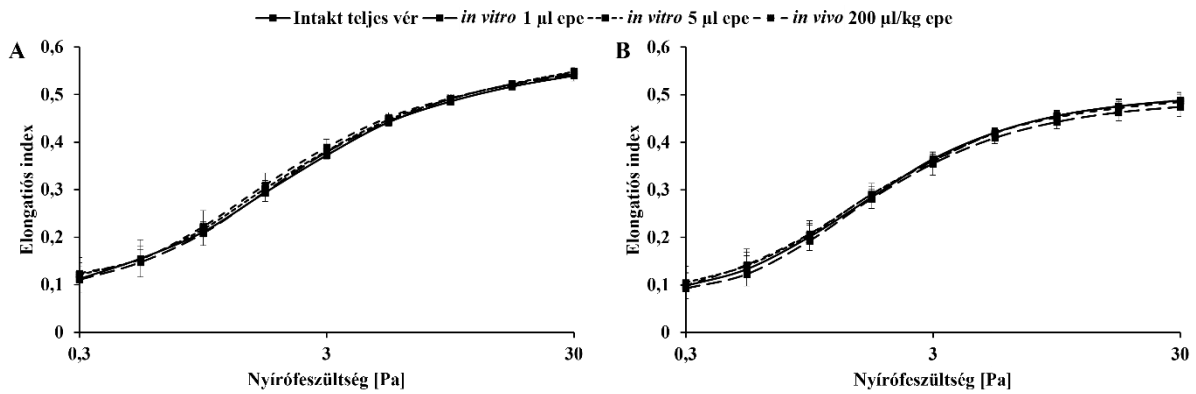
Vvs: vörösvérsejtszám, Fvs: fehérvérsejtszám, Hgb: haemoglobin tartalom, Hct: haematocrit koncentráció, MCV: átlagos vörösvérsejt térfogat, MCH: átlagos vörösvérsejt haemoglobin tartalom, MCHC: átlagos vörösvérsejt haemoglobin koncentráció, Thr: thrombocyták száma. Átlag \pm S.D.; * $p < 0,05$ vs. intakt teljes vér

5.1.3. 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 Pa), amit a magasabb nyírófeszültség-tartományban (>3 Pa) normalizálódás követett az intakt teljes vérhez képest. Sertésekben 1 µl epe *in vitro* beadását követően az EI értékek csökkenése volt megfigyelhető, míg 5 µl epe *in vitro*, illetve 200 µl/kg epe *in vivo* beadását követően az alacsony nyírófeszültségi tartományban (<3 Pa) az EI értékek növekedése, magas nyírófeszültségi tartományban (>3 Pa) pedig csökkenése volt tapasztalható az intakt teljes vérhez képest.

A 20. ábra az elongációs index értékeit (EI) a nyírófeszültség (SS) függvényében ábrázolja, a hagyományos és az ozmotikus gradiens deformabilitási vizsgálatok numerikus adatait a VI. és VII. táblázat összegzi.



20. ábra

Elongációs index a nyírófeszültség (SS [Pa]) függvényében patkányok (A) és sertések (B) esetében, az epe-vér szuszpenziókban (*in vitro*, 1 µl vagy 5 µl epe 500 µl vérben), bilhaemiában (*in vivo*, 200 µl/kg epe i.v.), összehasonlítva az alap értékekkel (intakt teljes vér). Átlag ± S.D.

VI. táblázat: A vörösvérsejtek konvencionális deformabilitási paramétereinek változása az epe-vér szuszpenziókban (*in vitro*, 1 µl vagy 5 µl epe 500 µl vérben), bilhaemiában (*in vivo*, 200 µl/kg epe i.v.), összehasonlítva az alap értékekkel (intakt teljes vér)

	Intakt teljes vér		<i>in vitro</i> 1 µl epe		<i>in vitro</i> 5 µl epe		<i>in vivo</i> (bilhaemia)	
	Patkány	Sertés	Patkány	Sertés	Patkány	Sertés	Patkány	Sertés
EI 3 Pa-nál	0,372±0,01	0,365±0,01	0,379±0,02	0,355±0,02	0,381±0,01	0,361±0,02	0,389±0,02*	0,36±0,02
EI _{max}	0,568±0,01	0,521±0,02	0,574±0,01	0,503±0,02	0,573±0,02	0,517±0,03	0,571±0,02	0,512±0,02
SS _{1/2} [Pa]	1,611±0,21	1,403±0,27	1,609±0,23	1,347±0,26	1,544±0,24	1,355±0,29	1,463±0,34	1,31±0,23
EI _{max} /SS _{1/2} [Pa ⁻¹]	0,358±0,04	0,383±0,07	0,362±0,05	0,385±0,07	0,381±0,05	0,383±0,08	0,404±0,07	0,402±0,06

EI 3 Pa-nál: 3 Pa nyírófeszültségen mért elongációs index érték, EI_{max}: maximális elongációs index érték, SS_{1/2}: a maximális elongációs index érték feléhez tartozó nyírófeszültség, EI_{max}/SS_{1/2}: az EI_{max} és az SS_{1/2} aránya. Átlag ± S.D.; * p < 0,05 vs. intakt teljes vér

VII. táblázat: A vörösvérsejtek ozmotikus gradiens deformabilitási (osmoscan) paramétereinek változása az epe-vér szuszpenziókban (*in vitro*, 1 µl vagy 5 µl epe 500 µl vérben), bilhaemiában (*in vivo*, 200 µl/kg epe i.v.), összehasonlítva az alap értékekkel (intakt teljes vér)

	Intakt teljes vér		<i>in vitro</i> 1 µl epe		<i>in vitro</i> 5 µl epe		<i>in vivo</i> (bilhaemia)	
	Patkány	Sertés	Patkány	Sertés	Patkány	Sertés	Patkány	Sertés
EI min	0,156± 0,012	0,147± 0,013	0,154± 0,007	0,142± 0,014	0,159± 0,016	0,139± 0,006	0,158± 0,014	0,145± 0,008
EI max	0,525± 0,023	0,528± 0,005	0,532± 0,024	0,528± 0,004	0,528± 0,019	0,528± 0,004	0,532± 0,03	0,521± 0,008
EI hyper	0,263± 0,012	0,264± 0,003	0,266± 0,012	0,264± 0,002	0,264± 0,01	0,264± 0,002	0,266± 0,015	0,261± 0,004
O min [mOsm/kg]	136± 6,03	182± 7,86	137,17± 7,17	182± 5,76	139,33± 6,92	179± 4,69	142,67± 5,68	183± 8,16
O (EI max) [mOsm/kg]	277± 17,4	357,88± 10,09	281,67± 21,84	354,13± 6,56	280,33± 26,11	355,43± 9,69	288,17± 16,14	352,25± 10,86
O hyper [mOsm/kg]	428,33± 3,14	492,83± 9,95	431± 4,16	487± 6,16	435,25± 6,24	489,8± 8,26	439,5± 3,7	491± 8,17
Area	141,85± 9,56	135,03± 3,71	143,17± 7,33	134,33± 1,82	139,9± 7,71	135,1± 3,13	141,92± 14,12	132,84± 4,01
ΔEI	0,369± 0,017	0,381± 0,016	0,379± 0,021	0,386± 0,015	0,369± 0,009	0,388± 0,009	0,374± 0,019	0,377± 0,015
ΔO	141± 12,92	175,88± 10,29	144,5± 17,76	172,13± 5	141± 20,83	176,43± 6,5	145,5± 14,15	169,25± 7,2
rEI	3,38± 0,18	3,62± 0,35	3,46± 0,16	3,75± 0,37	3,34± 0,24	3,79± 0,19	3,38± 0,17	3,62± 0,25
rO	2,04± 0,07	1,97± 0,08	2,05± 0,11	1,95± 0,04	2,01± 0,12	1,99± 0,03	2,02± 0,1	1,93± 0,06
ΔEI/ΔO	2,6x10 ⁻³ ± 3x10 ⁻⁴	2,2x10 ⁻³ ± 2x10 ⁻⁴	2,7x10 ⁻³ ± 4x10 ⁻⁴	2,2x10 ⁻³ ± 1x10 ⁻⁴	2,7x10 ⁻³ ± 4x10 ⁻⁴	2,2x10 ⁻³ ± 9x10 ⁻⁵	2,6x10 ⁻³ ± 3x10 ⁻⁴	2,2x10 ⁻³ ± 1x10 ⁻⁴
rEI/rO	1,66± 0,11	1,84± 0,19	1,69± 0,14	1,93± 0,19	1,66± 0,06	1,91± 0,1	1,68± 0,14	1,88± 0,13

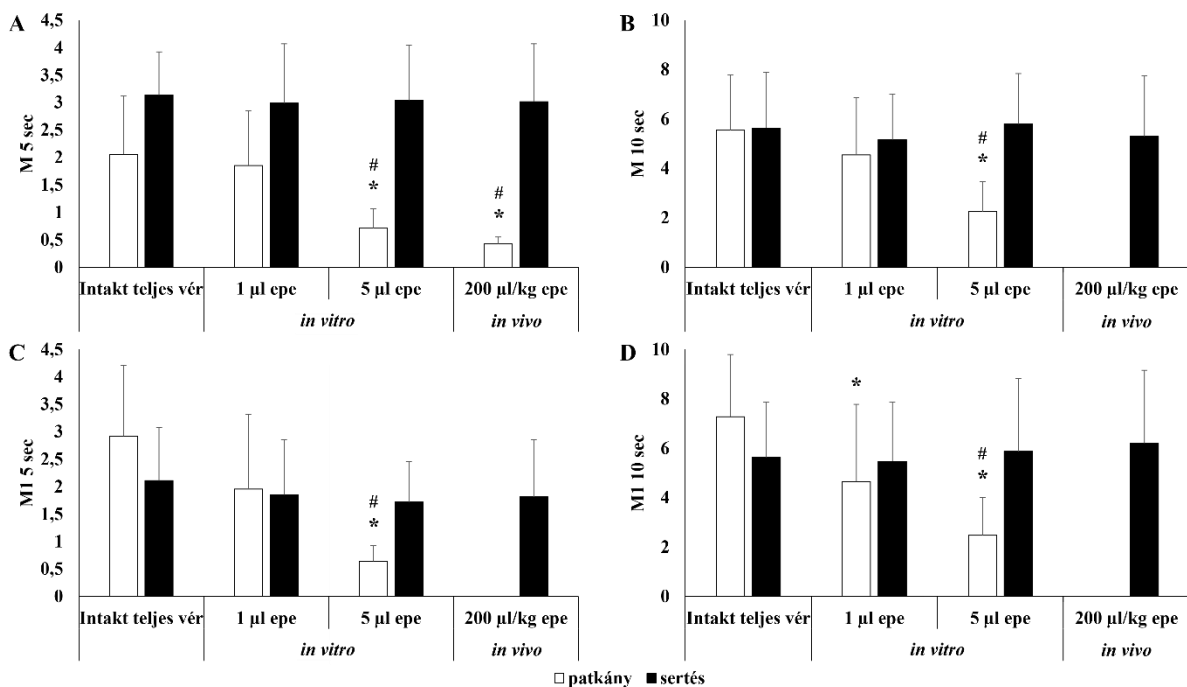
EI min: minimális elongatiós index; O min: a minimális elongatiós index értékhez tartozó ozmolalítás; EI max: maximális elongatiós index; O EI max: a maximális elongatiós index értékhez tartozó ozmolalítás; O hyper: ozmolalítás a hyperozmoláris tartományban a maximális elongatiós index felénél; EI hyper: a maximális elongatiós index érték fele a hyperozmoláris régióban; ΔEI: az EI min és EI max értékek abszolút különbsége; ΔO: az O min és az O (EI max) közötti különbség; és arányértékek: rEI (EI max/EI min), rO (O (EI max)/O min), ΔEI/ΔO és rEI/rO. Átlag ± S.D.

5.1.4. Vörösvérsejt aggregatio

Az aggregatio vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a patkány vörösvérsejtek érzékenyebben reagáltak mind az *in vitro*, mind az *in vivo* adott epére, ahogy ez a 21. ábrán is megfigyelhető.

Patkányoknál a két *in vitro* és az *in vivo* dózist összehasonlítva az *in vitro* 5 µl epe szignifikánsan csökkentette az aggregációs index értékeket az intakt teljes vérhez ($p < 0,001$) és az *in vitro* 1 µl 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 az aggregatio a detektálási határ alá csökkent.

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 (21. ábra).



21. ábra

Aggregációs index értékek a disaggregatio utáni 5. illetve 10. másodpercben stasisban (M 5 sec, M 10 sec) és 3 s^{-1} mellett (M1 5 sec, M1 10 sec) mérve. Átlag \pm S.D.; * $p < 0,05$ vs. intakt teljes vér; # vs. 1 µl epe

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

5.2.1. Az APAC hatása a haemorheológiai paraméterekre

5.2.1.1. Haematológiai 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 haematológiai 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. A VIII. táblázat a kísérleti protokoll szerint gyűjtött teljes vérminták kiválasztott haematológiai paramétereinek változásait mutatja.

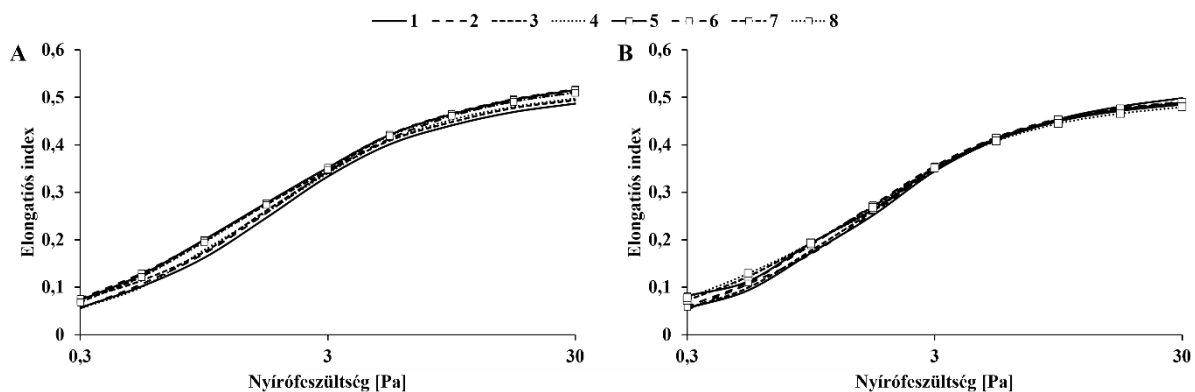
VIII. táblázat: A haematológiai változók a Kontroll csoportban és az APAC csoportban az eskalációs dózisséma mentén (ADVIA 120 hematológiai automatával mérve)

Mintavétel ideje	Csoport	Vvs (T/L)	Hgb (g/L)	Hct (%)	MCV (fL)	Thr (G/L)
5 perccel a vivőanyag beadása után	Kontroll	6,16±0,28	95,4±5,0	32,66±1,29	53,04±0,91	478,80±49,06
	APAC	5,70±0,37	89,4±5,6	29,22±1,75 [#]	52,82±2,08	458,20±57,68
75 perccel a 0,25 mg/kg dózis beadása után	Kontroll	6,19±0,35	96,2±6,8	32,28±2,10	52,22±0,99	481,80±56,15
	APAC	5,69±0,57	92,4±6,3	29,94±2,32	52,80±1,90	462,80±66,09
75 perccel a 0,5 mg/kg dózis beadása után	Kontroll	6,42±0,29	100,2±4,1	33,54±1,30	52,24±0,95	485,30±35,00
	APAC	6,06±0,51	97,6±7,0	31,92±2,23	52,82±2,00	443,00±54,08
15 perccel a protamin-szulfát beadása után	Kontroll	6,57±0,28	102,0±4,0	34,30±1,17	52,20±1,01	490,80±37,24
	APAC	6,15±0,55	98,0±7,8	32,30±2,65	52,60±2,10	432,00±18,92 [#]

Vvs: vörösvérsejtszám, Hgb: haemoglobin tartalom, Hct: haematocrit koncentráció, MCV: átlagos vörösvérsejt térfogat, Thr: thrombocyta szám, APAC: kettős thrombocyta- és véralvadásgátló készítmény. Átlag ± S.D.; # $p < 0,05$ vs. Kontroll csoport

5.2.1.2. Vörösvérsejt deformabilitás

Az 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 22. ábra a kapott EI-SS görbéket szemlélteti.



22. ábra

Elongációs index értékek a nyírófeszültség függvényében a Kontroll csoportban (A) és az APAC csoportban (B). A vérévétel időpontjai: 1) 5 perccel a vivőanyag beadása után; 2) 15 perccel a 0,25 mg/kg dózis után; 3) 75 perccel a 0,25 mg/kg dózis után; 4) 15 perccel a 0,5 mg/kg dózis után; 5) 30 perccel a 0,5 mg/kg dózis után; 6) 75 perccel a 0,5 mg/kg dózis után; 7) 15 perccel a 0,75 mg/kg dózis után; 8) 15 perccel a protamin-szulfát beadása után

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 ($p=0,024$). A IX. táblázatban látható, hogy 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).

IX. táblázat: A vörösvérsejtek deformabilitási paramétereinek változása a Kontroll csoportban és az APAC csoportban

Mintavétel ideje	Csoport	EI 3 Pa-nál	EI_{max}	$SS_{1/2}$ (Pa)	$EI_{max}/SS_{1/2}$
5 perccel a vivőanyag beadása után	Kontroll	0,33±0,01	0,53±0,04	1,95±0,41	0,28±0,04
	APAC	0,34±0,02	0,55±0,02	1,98±0,40	0,28±0,05
75 perccel a 0,25 mg/kg dózis beadása után	Kontroll	0,34±0,02	0,53±0,02	1,75±0,29	0,31±0,05
	APAC	0,35±0,01	0,53±0,02	1,75±0,27	0,31±0,04
75 perccel a 0,5 mg/kg dózis beadása után	Kontroll	0,35±0,01	0,55±0,01	1,67±0,16	0,33±0,03
	APAC	0,36±0,02	0,53±0,02 [#]	1,58±0,39	0,35±0,06
15 perccel a protamin-szulfát beadása után	Kontroll	0,35±0,01	0,54±0,01	1,69±0,24	0,33±0,05
	APAC	0,35±0,02	0,52±0,03 ^{*#}	1,55±0,28 [*]	0,34±0,05 [*]

EI 3 Pa-nál: 3 Pa nyírófeszültségen mért elongációs index érték, EI_{max} : maximális elongációs index érték, $SS_{1/2}$: a maximális elongációs index érték feléhez tartozó nyírófeszültség, $EI_{max}/SS_{1/2}$: az EI_{max} és az $SS_{1/2}$ aránya, APAC: kettős thrombocyta- és véralvadásgátló készítmény. Átlag ± S.D.; $p < 0,05$ * vs. 5 perccel a vivőanyag beadása után, # vs. Kontroll csoport

5.2.1.3. Vörösvérsejt membrán (mechanikus) stabilitás

A membrán stabilitás vizsgálat során a mechanikus stressz előtti és utáni értékek egymáshoz viszonyított arányait a X. táblázat foglalja össze. 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.

X. táblázat: A vörösvérsejtek deformabilitási paramétereinek változása a Kontroll csoportban és az APAC csoportban

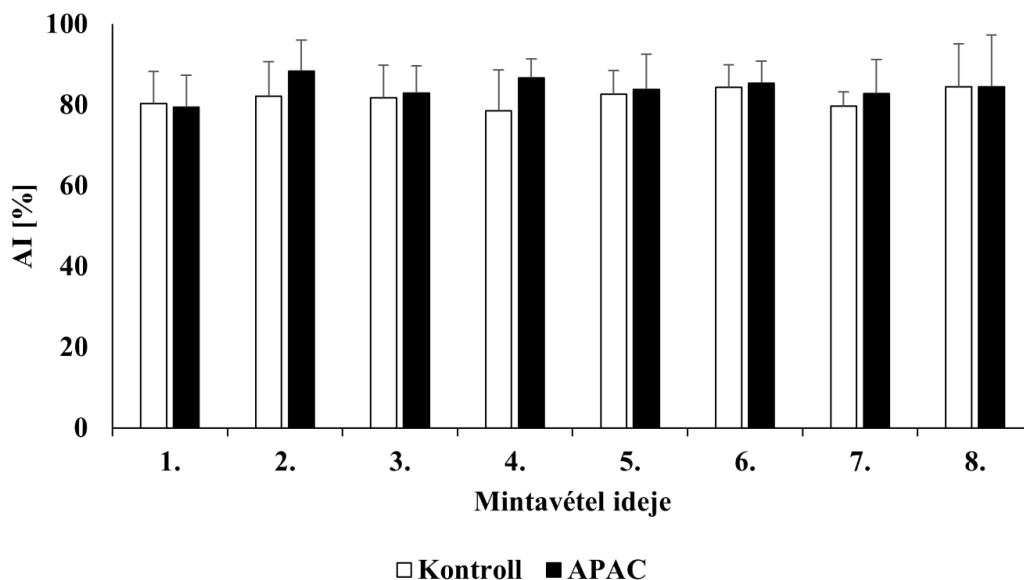
Mintavétel ideje	Csoport	EI 3 Pa-nál	EI_{max}	$SS_{1/2}$ [Pa]	$EI_{max}/SS_{1/2}$ [Pa^{-1}]
5 perccel a vivőanyag beadása után	Kontroll	0,93±0,03	1,01±0,04	1,29±0,25	0,82±0,21
	APAC	0,98±0,08	0,99±0,06	1,58±0,18	0,64±0,07
75 perccel a 0,25 mg/kg dózis beadása után	Kontroll	0,91±0,05	1,04±0,04	1,54±0,37	0,71±0,21
	APAC	0,97±0,02 [#]	1,01±0,04	1,52±0,5	0,74±0,27
75 perccel a 0,5 mg/kg dózis beadása után	Kontroll	0,93±0,04	1±0,02	1,54±0,23	0,66±0,11
	APAC	0,95±0,06	1,03±0,02	1,45±0,28	0,73±0,17
15 perccel a protamin-szulfát beadása után	Kontroll	0,95±0,03	1,04±0,03	1,27±0,17	0,83±0,13
	APAC	0,94±0,06	1,03±0,04	1,24±0,26	0,87±0,25

EI 3 Pa-nál: 3 Pa nyírófeszültségen mért elongációs index érték, EI_{max} : maximális elongációs index érték, $SS_{1/2}$: a maximális elongációs index érték feléhez tartozó nyírófeszültség, $EI_{max}/SS_{1/2}$: az EI_{max} és az $SS_{1/2}$ aránya, APAC: kettős thrombocyta- és véralvadásgátló készítmény. Átlag ± S.D.; $p < 0,05$ # vs. Kontroll csoport

5.2.1.4. 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 dózisok beadása után a Kontroll csoporthoz képest, de ez az enyhe növekedés nem volt szignifikáns, amint az a 23. ábrán megfigyelhető.



23. ábra

A disaggregációt követően mért aggregációs index értékek a Kontroll csoportban és az APAC csoportban. A vérvétel időpontjai: 1) 5 perccel a vivőanyag beadása után; 2) 15 perccel az első dózis (0,25 mg/kg) után; 3) 75 perccel az első dózis (0,25 mg/kg) után; 4) 15 perccel a második dózis (0,5 mg/kg) után; 5) 30 perccel a második dózis (0,5 mg/kg) után; 6) 75 perccel a második dózis (0,5 mg/kg) után; 7) 15 perccel a harmadik dózis (0,75 mg/kg) után; 8) 15 perccel a protamin-szulfát beadása után. AI: aggregációs index, APAC: kettős thrombocyta- és véralvadásgátló készítmény

5.2.2. Az APAC és a frakcionálatlan heparin összehasonlítása

5.2.2.1. Haematológiai 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 haematológiai értékek szignifikánsan megváltoztak, biológiailag mind a fajra vonatkozó normál laboratóriumi tartományon belül maradtak.¹⁶⁵ A kiválasztott mennyiségi és minőségi haematológiai változókat a XI. táblázat foglalja össze.

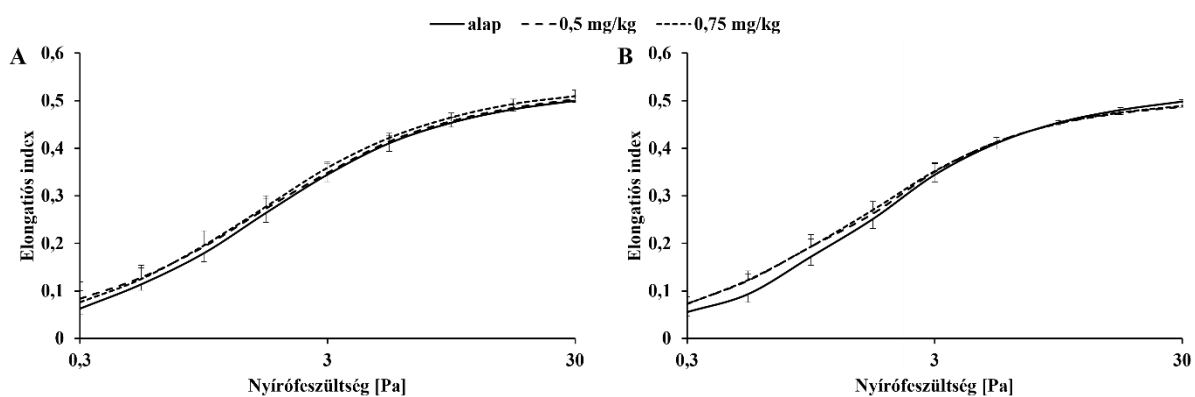
XI. táblázat: A haematologiai változók az UFH csoportban és az APAC csoportban (Sysmex K-4500 haematologiai automatával mérve)

Dózis	Csoport	Vvs [T/L]	Hgb [g/L]	Hct [%]	MCV [fL]	Thr [G/L]
alap	UFH	5,62±0,18	91,1±6,8	31,37±1,70	55,61±2,77	359,00±22,92
	APAC	5,64±0,46	90,8±2,0	31,53±0,33	55,01±0,65	457,50±24,30
0,5 mg/kg	UFH	5,88±0,19*	94,1±7,6*	32,20±1,71*	55,95±2,54	382,33±31,72*
	APAC	6,02±0,42*	97,4±2,9*	34,38±0,69*	55,81±0,74*	361,13±13,17*
0,75 mg/kg	UFH	5,80±0,32	96,0±9,7*	33,27±2,07*#	56,19±2,84*	381,67±40,50
	APAC	6,23±0,48*#	101,5±5,3*#	35,58±0,96*#	56,14±0,72*#	364,00±19,99*

Vvs: vörösvérsejtszám, Hgb: haemoglobin tartalom, Hct: haematocrit koncentráció, MCV: átlagos vörösvérsejt térfogat, Thr: thrombocyta szám, APAC: kettős thrombocyta- és véralvadástgátló készítmény, UFH: frakcionálatlan heparin. Átlag ± S.D.; p < 0,05 * vs. alap, # vs. 0,5 mg/kg

5.2.2.2. 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. Az UFH és az APAC beadása után mért vörösvérsejt deformabilitást reprezentáló görbékét a 24. ábra mutatja.



24. ábra

Elongációs index értékek a nyírófeszültség függvényében az UFH csoportban (A) és az APAC csoportban (B)

A XII. táblázat az EI-SS görbék parametrizálásával kapott adatokat foglalja össze. 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 ($p=0,009$).

XII. táblázat: A vörösvérsejtek deformabilitási paramétereinek változása az UFH csoportban és az APAC csoportban

Dózis	Csoport	EI 3 Pa-nál	EI_{max}	$SS_{1/2}$ [Pa]	$EI_{max}/SS_{1/2}$ [Pa^{-1}]
alap	UFH	0,34±0,02	0,54±0,01	1,75±0,28	0,31±0,05
	APAC	0,34±0,02	0,55±0,02	1,98±0,40	0,28±0,05
0,5 mg/kg	UFH	0,35±0,02	0,54±0,01	1,65±0,32	0,33±0,06
	APAC	0,35±0,02	0,53±0,01*	1,72±0,24*	0,31±0,05
0,75 mg/kg	UFH	0,36±0,01*	0,54±0,01	1,64±0,31	0,34±0,05*
	APAC	0,35±0,02	0,53±0,02* ⁺	1,60±0,29*	0,34±0,06

EI 3 Pa-nál: 3 Pa nyírófeszültségen mért elongációs index érték, EI_{max} : maximális elongációs index érték, $SS_{1/2}$: a maximális elongációs index érték feléhez tartozó nyírófeszültség, $EI_{max}/SS_{1/2}$: az EI_{max} és az $SS_{1/2}$ aránya, APAC: kettős thrombocyta- és véralvadásgátló készítmény, UFH: frakcionálatlan heparin. Átlag ± S.D.; $p < 0,05$ * vs. alap, + vs. UFH

5.2.2.3. 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 (XIII. táblázat). 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.

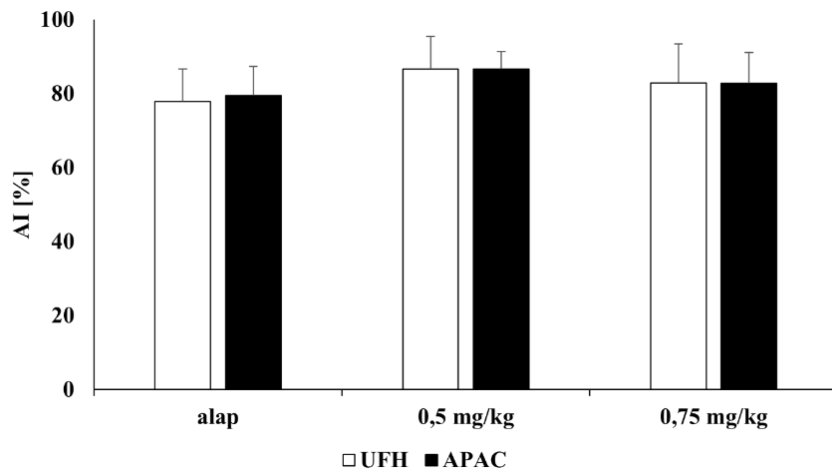
XIII. táblázat: A vörösvérsejtek deformabilitási paramétereinek változása az UFH csoportban és az APAC csoportban

Dózis	Csoport	EI 3 Pa-nál	EI_{max}	$SS_{1/2}$ [Pa]	$EI_{max}/SS_{1/2}$ [Pa^{-1}]
alap	UFH	0,94±0,08	0,99±0,06	1,62±0,54	0,68±0,27
	APAC	0,98±0,08	0,99±0,06	1,58±0,18	0,64±0,07
0,5 mg/kg	UFH	0,92±0,03	0,99±0,03	1,79±0,55	0,6±0,21
	APAC	0,93±0,05	1,02±0,02	1,58±0,57	0,72±0,29
0,75 mg/kg	UFH	0,92±0,07	1,02±0,01	1,69±0,75	0,7±0,29
	APAC	0,97±0,09	1,01±0,02	1,54±0,35	0,69±0,19

EI 3 Pa-nál: 3 Pa nyírófeszültségen mért elongációs index érték, EI_{max} : maximális elongációs index érték, $SS_{1/2}$: a maximális elongációs index érték feléhez tartozó nyírófeszültség, $EI_{max}/SS_{1/2}$: az EI_{max} és az $SS_{1/2}$ aránya, APAC: kettős thrombocyta- és véralvadásgátló készítmény, UFH: frakcionálatlan heparin. Átlag ± S.D.

5.2.2.4. 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. Amint a 25. ábra mutatja, mindkét szernél hasonló változások voltak megfigyelhetők a vizsgált dózisoknál, amelyek sem a szerek, sem a dózisok esetében nem voltak szignifikánsak.



25. ábra

A disaggregatiót követően mért aggregatiós index értékek az UFH és az APAC csoportban.
AI: aggregatiós index, APAC: kettős thrombocyta- és véralvadásgátló készítmény, UFH: frakcionálatlan heparin

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. 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 konvencionális 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.¹⁵⁴ 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.^{155,162} Ezen vizsgálatok kimutatták, hogy a szívbetegségek az epesavak rendellenes anyagcseréjének következményei lehetnek.^{156,157,158} 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.^{159,160,161} Továbbá a cirrhoticus cardiomyopathia - a májzsugorodás gyakori következménye, a QT-intervallum megnyúlása, valamint szisztolés vagy diasztolés elégtelenség jellemzi - során az epesavak szintén befolyásolhatják a kardiovaszkuláris funkciót.^{162,163}

Annak magyarázatára, hogy az epesavak hogyan okozhatnak bradycardiat három elméletet állítottak fel ¹⁶⁴:

- (1) monoréteget hoznak létre a sejtmembrán felszínén, ezáltal mechanikai interferenciát okoznak¹⁶⁵,
- (2) csökkentik a kalcium lassú befelé irányuló áramlását, így megakadályozva a membránt az akciós potenciálok vezetésében¹⁶⁶, és
- (3) antimuscarin antagonistaként működnek, mivel a fizosztigmin felerősítheti vagy ellensúlyozhatja a hatásukat.¹⁶⁵

Ezenkívül az epehólyag-gyulladás olyan idegi reflexeket válthat ki, amelyek csökkentik a vérnyomást és a pulzusszámot, és esetleg ischaemiás károsodást vagy szívmegállást okozhatnak.¹⁶⁰ A szívfrekvenciát és az artériás vérnyomást befolyásolhatja a koszorúér-szűkület, amelyet az epehólyag tágulása és a koszorúér-véráramlás változása közötti kapcsolat idéz elő.¹⁶⁷

Az icterus, más néven sárgaság számos haemorheológiai eltérést okozhat. Ezen elváltozások közé sorolható a vörösvérsejtek deformabilitásának csökkenése, az erythrocyta-aggregatio növekedése és a vér viszkozitásának romlása. E haemorheológiai hatások mögöttes okai multifaktoriálisak, felölelve az oxidáns-antioxidáns státusz változásait, az endotoxémia jelenlétét és a sárgaságban szenvedő betegeknél gyakran megfigyelhető hiperlipidémiát.^{168,169,170}

További kutatások kimutatták, hogy a sárgaság jelentősen befolyásolhatja az erythrocyták tulajdonságait, ami a vér rheológiájának megváltozásához vezethet, ezáltal súlyosbítva az olyan állapotokat, mint a májelégtelenség, a hepaticus encephalopathia és a portalis hypertonia.¹⁷¹ Ezeket az állapotokat a vér megnövekedett viszkozitása és megváltozott áramlási tulajdonságai jellemzik, ami megnehezítheti az érintett betegek klinikai kezelését. A

sárgaságban a vörösvérsejtek csökkent deformálhatósága akadályozhatja a microcirculációt, ami szöveti hypoxiához és további szövődményekhez vezethet.

E megállapított hatások mellett a bilhaemia specifikus haemorheológiai következményei még nagyrészt feltáratlanok. Míg az epesavak jelenléte a véráramban köztudottan számos élettani folyamatot befolyásol, a bilhaemia haemorheológiai hatásait jelenleg nem ismerjük.

Cholestasis során az epesavak vagy konjugált epesók az epeutak elzáródása következtében felhalmozódnak a májban. Bár az epesavakat alaposan tanulmányozták, a cholestasissal járó májkárosodás hátterében álló molekuláris mechanizmusok továbbra is kevésbé ismertek. Az obstruktív cholestasis különböző formáit meghatározó nekrotikus területeken jelentős gyulladással infiltráció figyelhető meg.¹⁷² Ez a gyulladás súlyosbíthatja a májkárosodást, és hozzájárulhat az olyan májbetegségek progressziójához, mint a primer biliáris cholangitis (PBC) és a primer sclerotizáló cholangitis (PSC).^{173,174}

A cholestasis jelentősen befolyásolhatja a vér viszkozitását, amely a véráramlás egyik meghatározó paramétere.^{170,175} Az epesavak és a bilirubin felhalmozódása a véráramban az erythrocyták tulajdonságainak megváltozásához vezethet, amely a vér viszkozitásának és az áramlási dinamikának a megváltozását eredményezi.¹⁷⁰ A bilirubin és az epesavak fokozzák az erythrocyták aggregációját¹⁷⁵ és csökkentik az elnyúlási képességüket¹⁷⁶, mely tényezők fontos szerepet töltenek be a megfelelő keringés és a szövetek oxigénellátásának fenntartásában.

A cholestasisban megfigyelt fokozott erythrocyta-aggregatio több tényezőnek tulajdonítható, beleértve a hiperlipidémiát, az endotoxémiát és az oxidáns-antioxidáns egyensúly megváltozását.^{175,177,178,179} Ezek a tényezők pro-inflammatorikus környezetet hozhatnak létre, amely a vér rheológiai tulajdonságainak további romlását eredményezheti. A csökkent vörösvérsejt deformabilitás akadályozhatja az erythrocytákat a szűk kapillárisokon való áthaladásban, ami szöveti hypoxiához vezethet és súlyosbíthatja a májműködési zavarokat.

Humán vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy a cholestatikus sárgaság során a bilirubin és az epesavak emelkedett szintje hátrányosan befolyásolhatja az erythrocyták működését.¹⁷⁰

Annak ellenére, hogy a cholestasisnak a haemorheológiára gyakorolt hatásait már feltárták, jelenleg nem állnak rendelkezésre adatok a bilhaemia haemorheologiai hatásairól.

Kimutatták, hogy az epesavak eryptosist, vagyis az erythrocyták sejthalálát okozzák.¹⁸⁰ 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 sejt felszínén a foszfatidil-szerin expozíciója jellemez.^{180,181} Továbbá azt is bizonyították, hogy az epesó-asszociált hemolízis részben kalcium-mediált.^{181,182} Az epesavak koncentrációja, amelyek az eryptosis kiváltásához szükségesek, nagyobbak, mint a hemolízishez szükségesek.¹⁸⁰

A humán epe- és vörösvérsejt-lipidek változását a testmozgás is befolyásolja.¹⁸³ Ezenkívül a vörösvérsejtek megnövekedett eloszlási szélességét (RDW) összefüggésbe hozták a terhességi intrahepaticus cholestasisal, amely az epeáramlást károsító rendellenesség.¹⁸⁴

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.¹⁸¹ Az epesók nagy dózisban hemolízist okoznak azért, hogy a sejtmembrán lipid összetevőit ko-micellizálják.¹⁸¹ Azonban egyelőre nem meghatározott mechanizmusok révén az epesók alacsonyabb koncentrációban is hemolízishez vezethetnek.¹⁸¹ Az epesók jelenlétében a kalciumfelvétel 4-25-szörösére emelkedhet, és a felszívódó kalcium mennyisége az epesók koncentrációjától függ.¹⁸¹ Ennek a növekedésnek a mértékét az ATP-csökkenésnek vagy a trifluoperazinnal való expozíciónak tulajdonították, amelyek csökkentik a vörösvérsejtek kalciumpumpa-aktivitását.¹⁸¹ Továbbá a kalcium növeli az epesók hemolitikus

aktivitását, ez a hatás 100 mM KCl/50 mM NaCl-t tartalmazó pufferben a legnagyobb.¹⁶⁵ Összefoglalva, az epesók koncentrációja határozza meg a vörösvérsejtek kalciumfelvételének mértékét, amelyet az epesav koncentrációja befolyásol.

Az epesavak serkentetik a nátriumfelvételt és/vagy az intracelluláris kálium exportját az erythrocytákba, ami lízist eredményezhet.¹⁸⁵ Ezen túlmenően a ceramid és a Ca²⁺ bejutása is hasonló hatással bír, mint az epesavak az eryptosis stimulálásában.¹⁸⁰

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.⁸¹ 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.⁸² Az epesavak összetétele és a bélben lévő kalcium-ionofór aktivitása közötti lehetséges összefüggést sugallta egy sertéseken végzett vizsgálat, amely az epesavak bélnedvszekrációs aktivitása és az epesavak tulajdonságai közötti kapcsolatra vonatkozott.¹⁵⁷

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.^{186,187} Továbbá a különböző fajok eltérnek egymástól az epesavtranszporterek, valamint az epesavak szintézisében és metabolizmusában részt vevő enzimek expressziójában és aktivitásában.^{186,188} A kalciumtranszport és az ionofór-aktivitás két olyan fiziológiai és farmakológiai folyamat, amelyet az epesavösszetétel fajspecifikus eltérései befolyásolhatnak.⁸¹ 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 haemorheologiai és mikrokeringési különbségekhez.

A fajok között tapasztalt haemorheologiai különbségeket különböző tényezők befolyásolhatták, beleértve az epesavak összetételét is. Az epesavak döntő szerepet játszanak a lipidek emésztésében és felszívódásában, de hatásuk túlmutat a gyomor-bél traktuson, és befolyásolhatják a vér rheologiai tulajdonságait is. A különböző fajok különböző típusú és koncentrációjú epesavakat termelnek, ami befolyásolhatja a lipidanyagcserét és a keringésben lévő lipidprofilokat. Az egyes epesavak magasabb koncentrációját tartalmazó fajoknál megváltozhat a plazma lipid koncentráció, ami hatással lehet a vér viszkozitására. Bizonyos lipidek emelkedett koncentrációja növelheti a plazma viszkozitását, ezáltal befolyásolhatja a haemorheologiai paramétereket. Az epesavak hatással lehetnek a membránok fluiditására és felületi töltésére, a vörösvérsejtek aggregációjára és deformálhatóságára. Ezek a változások a vér viszkozitásának és áramlási jellemzőinek eltéréseihez vezethetnek a különböző fajok között. Ezeknek az összefüggéseknek a megértése kulcsfontosságú a fajok közötti élettani válaszok értelmezéséhez és az állatkísérletek alapján az emberi egészség tanulmányozására alkalmas modellek kidolgozásához.

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.

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

A különböző hatásmechanizmusú antitrombotikus szerek kombinációjával járó vérzéses 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.^{131,136,139} Az APAC azon képessége, hogy szelektíven célba veszi az endothelialis sérülést és a sérülés helyén marad, még nagyon nagy áramlási körülmények között is, annak köszönhető, hogy egyedülálló módon képes kolokalizálódni a kollagénnel, lamininnel és von Willebrand-faktorról, amelyek csak az endothelium sérülésnél jelennek meg.¹³⁸ Ez a lokalizált hatás fontos a vérzésveszély csökkentése szempontjából a lehetséges jövőbeli klinikai alkalmazás során. Adataink szerint az APAC micro-rheologiai 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-rheológiai változásokat okozott, amelyek *in vivo* fiziológiailag nem voltak jelentősek. Bár a haematológiai paraméterekben tapasztaltunk némi változást, de ettől függetlenül a fajra vonatkozó biológiailag normális laboratóriumi tartományon belül maradtak.¹⁵³ 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.¹⁰

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az UFH-val szemben az APAC reno-protéktív volt akut ischaemiás vesekárosodásban.¹³⁹ Hasonló előzetes kísérleti adatok jelentek meg szívinfarktus és stroke esetében is.¹³² 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.¹³⁹ A kollagén indukálta thrombocytá-aggregatiót az UFH nem befolyásolja, sőt fokozza, míg az APAC dóziszfüggő módon mérsékli a vérlemezke-aggregatiót és a kollagénfelületeken való lerakódást.^{129,131,139} A vérlemezke-indukált trombozist az APAC nagy nyírási sebességek mellett megakadályozza, míg UFH jelenlétében ezek az erek elzáródnak. Kollagénnel bevont arteriovenosus-shunt modellben^{131,139} 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.^{136,189}

Mivel az APAC csak fokális antikoaguláns/antitrombotikus hatással rendelkezik, rövid szisztémás antikoaguláns hatásidővel, ezért ígéretes gyógyszerre teszi több klinikai szcenárió szempontjából, beleértve az intraoperatív alkalmazást és a rövid érrendszeri beavatkozások (pl.

endovaszkuláris neurointervenciók, kardiovaszkuláris beavatkozások) során történő alkalmazást.¹³² Az APAC potenciális erősségei, tekintettel a jövőbeli klinikai alkalmazására, nemcsak egyedülálló kombinált thrombocyta- és véralvadásgátló hatásában rejlenek, hanem az endothelium sérülésének helyén kifejtett célzott hatásában is.¹³⁴

A hatékony acetilszalicilsav (ASA) gátlással rendelkező betegeknél alacsonyabb plazma fibrinogén szintet és vörösvérsejt aggregációs értékeket mértek a nem hatékony acetilszalicilsav-gyógyszerrel (ASA-rezisztencia) rendelkező betegekhez képest.¹⁹⁰ Az erythrocyták fraktáldimenziója csökken az aszpirinkoncentráció növekedésével, így az aggregatio mértéke is csökken.¹⁹¹ Ugyanakkor az aszpirinkoncentráció és a nyíróerő növekedésével nő a vörösvérsejtek deformabilitási indexe, azaz javul a nyúlási képességük.¹⁹¹ Az ASA az APAC-kal együtt fokozza a vérlemezke aggregatio-gátló potenciált, bár az APAC nem befolyásolja közvetlenül a tromboxán útvonalat.¹³⁶

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 aggregációjának serkentésében játszott nyilvánvaló szerepe érdekes kérdéseket és potenciális aggodalmakat vet fel. A vörösvérsejt aggregációt számos tényező befolyásolja, mint például a haematocrit, a szabad gyökök és a fibrinogén szintje.¹⁹² 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 aggregációját, amely fajok közötti különbségeket is mutat.¹⁹²

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 nyírási viszkozitása gyakran fokozott vörösvérsejt aggregációval jár együtt, ez a megfigyelés különösen fontos a heparin terápiában részesülő betegek esetében.¹⁰ Az olyan alapbetegségek, amelyek már befolyásolják a vörösvérsejt aggregációt, pl. sarlósejtes anaemia vagy cukorbetegség, potenciálisan hatással lehetnek a heparin által kiváltott vörösvérsejt aggregációra.¹⁹³

Ezen túlmenően a vörösvérsejtek aggregációjának 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.¹⁰ 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.¹⁰ 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 vérlemezkészám csökkenése a mintákban kapcsolatban lehet a "relatív" *in vitro* csökkenéssel, amely feltehetően a heparinnak a vérlemezkék felszíni tulajdonságainak megváltoztatásában játszott szerepével függ össze.¹⁹³

Egy kulcsfontosságú tanulmány rávilágított a heparin által kiváltott vörösvérsejt aggregatio kialakulásáért felelős mechanizmusra.¹⁹³ E kutatás szerint a heparinnak a szomszédos sejtek szialinsav-maradványaihoz való kötődése az, ami az erythrocyta aggregatiót okozhatja.¹⁹³ Ez a molekuláris kölcsönhatás értékes betekintést nyújt a jelenség biológiai alapjaiba, mivel rávilágít a heparin szerepére a vörösvérsejtek felületi tulajdonságainak megváltoztatásában és egymáshoz való tapadásuk elősegítésében.

Lényeges azonban megjegyezni, hogy bár ezek az eredmények bepillantást engednek a mechanizmusokba, a klinikai következmények teljes spektruma továbbra is összetett és sokrétű. További vizsgálatokra van szükség annak feltárására, hogy mely specifikus állapotok és betegpopulációk esetében lehet a heparin által kiváltott vörösvérsejt aggregatióknak a legjelentősebb hatása. A heparin adagolásának klinikai kontextusának és a vér rheológiájára gyakorolt hatásával kapcsolatos potenciális kockázatok megértése létfontosságú a betegellátás optimalizálásához és a terápiás stratégiák testre szabásához.

A szív- és érrendszeri betegségek növekvő előfordulása, valamint az új és egyre összetettebb kardiovaszkuláris és neurovaszkuláris eljárások bevezetése rávilágít annak kritikus fontosságára, hogy új antitrombotikus kezeléseket találjunk a speciális klinikai igényekre. Az APAC ideális antitrombotikus gyógyszer lehet a jövőbeni klinikai felhasználásra, mivel farmakológiai hatását pontosan ott fejti ki, ahol szükséges, ezáltal optimalizálva az ischaemiát és az antikoaguláns hatások közötti egyensúlyt. Bár ebben a szakaszban kihívás megbecsülni az APAC jövőbeni klinikai előnyeit, tagadhatatlan, hogy további kutatásokra van szükség ezen

a területen, és ez a gyógyszer új lehetőségeket rejthet a jobb betegellátás érdekében az érrendszeri beavatkozások vagy más klinikai scénáriók során.¹³⁴

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 haemorheológiai paraméterek akut változásainak kimutatására.

7. 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 vérlemezkeshám 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.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A különböző betegségek és kezelések hatással vannak mind a haematologiai, mind a haemorheologiai paraméterekre, azonban ritka kórképek esetében kevésbé állnak rendelkezésünkre haemorheologiai adatok az adott betegség vonatkozásában. Többek között ide tartozik a bilhaemia is, mellyel kapcsolatban ismert, hogy az epe hatással van a szívfrekvenciára és az artériás középnyomásra, ezért célunk volt ezen állapot hatásának vizsgálata a micro-rheologiai paraméterekre patkány és sertés modellben. Ezen kívül célul tűztük ki egy új, klinikai alkalmazás előtt álló kettős, thrombocyta- és véralvadásgátló készítmény (APAC) hatásainak vizsgálatát a haematologiai és haemorheologiai paraméterekre.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a bilhaemia közvetlenül befolyásolja a hemodinamikai paramétereket és micro-rheologiai romlást okoz. A már korábban leírt artériás középnyomás és a szívfrekvencia csökkenését tapasztaltuk mindkét faj tekintetében, melynek nagysága és dinamikája fajok közötti különbségeket mutatott. Az epe nem volt hatással a vörösvérsejtek deformabilitására, viszont az aggregációra kifejtett hatása eltérő volt a fajok között. A patkányok vörösvérsejtjei érzékenyebben reagáltak az epe beadását követően *in vitro* és *in vivo* egyaránt. *In vitro* egy lehetséges dózisfüggő hatást is megfigyeltünk.

Bár az orvoslás mindennapjaiban az thrombocyta- és véralvadásgátló készítmények széles palettája érhető el, a kardiovaszkuláris betegségek összetettsége és a fokozott vérzéses szövődmények elkerülése végett, mégis fontos új, potenciálisan előnyösebb készítmények alkalmazása a populáció megfelelő csoportjainál. Tanulmányunk volt az első, amely egy ilyen szer, az APAC beadásának micro-rheologiai összefüggéseit vizsgálta és hasonlította össze a klinikumban már alkalmazott frakcionálatlan heparinnal (UFH). Eredményeink alapján elmondható, hogy az UFH és az APAC hasonló micro-rheologiai tulajdonságokkal rendelkezik. Az APAC alkalmazása előnyös lehet olyan betegeknek, akiknél az alkalmazott terápia több, különböző hatásmechanizmusú készítményből áll, hogy a szerek között esetlegesen fellépő szinergista hatás és a fokozott vérzésnek a kockázata elkerülhető legyen.

9. SUMMARY

Different diseases and treatments have an impact on both haematological and haemorheological parameters, but for rare diseases there is less haemorheological data available. This includes, among others, bileaemia, for which bile is known to affect heart rate and mean arterial pressure, and we aimed to investigate the effect of this condition on micro-rheological parameters in rat and pig models. In addition, we aimed to investigate the effects of a new dual antiplatelet and anticoagulant preparation (APAC), which is about to be clinically applied, on haematological and haemorheological parameters.

Our results suggest that bilhaemia directly affects haemodynamic parameters and causes micro-rheological deterioration. We observed a decrease in mean arterial pressure and heart rate in both species, with interspecies differences in magnitude and dynamics. Bile had no effect on red blood cell deformability, but its effect on aggregation time differed between species. Rat red blood cells were more sensitive to bile administration both *in vitro* and *in vivo*. A possible dose-dependent effect was also observed *in vitro*.

Although a wide range of antiplatelet and anticoagulant drugs are available in everyday medicine, due to the complexity of cardiovascular disease and the need to avoid increased bleeding complications, it is important to use new, potentially more beneficial drugs in appropriate population groups. Our study was the first to investigate the micro-rheological correlates of the administration of such an agent, APAC, and to compare it with unfractionated heparin (UFH) already used in the clinic. Our results suggest that UFH and APAC have similar micro-rheological properties. The use of APAC may be advantageous in patients with multiple agents with different mechanisms of action to avoid potential synergistic effects between agents and the risk of increased bleeding.

10. IRODALOMJEGYZÉK

10.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Copley AL. The history of clinical hemorheology. *Clin Hemorheol.* 1985;(5):765–811.
2. Başkurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ. *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*; IOS Press, 2007.
3. Nader E, Skinner S, Romana M, Fort R, Lemonne N, Guillot N, Gauthier A, Antoine-Jonville S, Renoux C, Hardy-Dessources MD, Stauffer E, Joly P, Bertrand Y, Connes P. Blood rheology: key parameters, impact on blood flow, role in sickle cell disease and effects of exercise. *Front Physiol.* 2019;10:1329.
4. Hitsumoto T. Relationship between cardiovascular risk factors and hemorheology assessed by microchannel method in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Int.* 2017;8(3):316-322.
5. Lowe GDO. Thrombosis and hemorheology. In: *Clinical Hemorheology. Developments in Cardiovascular Medicine*; Chien S, Dormandy J, Ernst E, Matrai A (eds); Springer, 1987, pp. 195-226.
6. Rasyid A, Timan IS, Riyanto DL, Harris S, Kurniawan M, Mesiano T, Hidayat R, Wiyarta E. Coagulation and hemorheology profile of patient with stroke and COVID-19: A case series during second wave pandemic. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2022;82(3):249-254.
7. Falsetti L, Guerrieri E, Zaccone V, Viticchi G, Santini S, Giovenali L, Lagonigro G, Carletti S, Gialluca Palma LE, Tarquinio N, Moroncini G. Cutting-edge techniques and drugs for the treatment of pulmonary embolism: current knowledge and future perspectives. *J Clin Med.* 2024;13(7):1952.
8. Shahid J, Kashif A, Shahid MK. A Comprehensive review of physical therapy interventions for stroke rehabilitation: impairment-based approaches and functional goals. *Brain Sci.* 2023;13(5):717.
9. Hitosugi M, Niwa M, Takatsu A. Changes in blood viscosity by heparin and argatroban. *Thromb Res.* 2001;104(5):371-374.

10. Kameneva MV, Antaki JF, Watach MJ, Borovetz HS, Kormos RL. Heparin effect on red blood cell aggregation. *Biorheology*. 1994;31(3):297-304.
11. Nemeth N, Başkurt OK, Meiselman HJ, Miko I. Species-specific effects of anticoagulants on red blood cell deformability. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2009;43(3):259-261.
12. Marcinkowska-Gapińska A. Hemorheological picture in cancerous diseases. *Letters in Oncology Science*. 2019;16(4):36–42.
13. Tikhomirova I, Petrochenko E, Malysheva Y, Ryabov M, Kislov N. Interrelation of blood coagulation and hemorheology in cancer. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2016;64(4):635-644.
14. Barath B, Varga A, Matrai AA, Deak-Pocsai K, Nemeth N, Deak A. Estradiol valerate affects hematological and hemorheological parameters in rats. *Metabolites*. 2022;12(7):602.
15. Hitsumoto T. Clinical impact of hemorheology on subclinical myocardial injury in patients with hypertension. *J Clin Med Res*. 2018;10(12):928-935.
16. Jang B, Han JW, Sung PS, Jang JW, Bae SH, Choi JY, Cho YI, Yoon SK. Hemorheological alteration in patients clinically diagnosed with chronic liver diseases. *J Korean Med Sci*. 2016;31(12):1943-1948.
17. Joshi D, Akram M, Das K, Kala M. A Cross-sectional study of the haematological profile of patients with chronic liver disease (CLD). *Cureus*. 2023;15(6):e40003.
18. Flores B, Trivedi HD, Robson SC, Bonder A. Hemostasis, bleeding and thrombosis in liver disease. *J Transl Sci*. 2017;3(3):10.15761/JTS.1000182.
19. Amitrano L, Guardascione MA, Brancaccio V, Balzano A. Coagulation disorders in liver disease. *Semin Liver Dis*. 2002;22(1):83-96.
20. Melkamu A, Woldu B, Sitotaw C, Seyoum M, Aynalem M. The magnitude and associated factors of coagulation abnormalities among liver disease patients at the University of Gondar Comprehensive Specialized Hospital Northwest, Ethiopia, 2022. *Thromb J*. 2023;21(1):35.

21. Nemeth N, Deak A, Szentkereszty Z, Peto K. Effects and influencing factors on hemorheological variables taken into consideration in surgical pathophysiology research. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2018;69(1-2):133-140.
22. Reinhart WH, Chien S. Red cell rheology in stomatocyte-echinocyte transformation: roles of cell geometry and cell shape. *Blood.* 1986;67(4):1110-1118.
23. Meiselman HJ. Morphological determinants of red cell deformability. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1981;156:27-34.
24. Cicha I, Suzuki Y, Tateishi N, Maeda N. Changes of RBC aggregation in oxygenation-deoxygenation: pH dependency and cell morphology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284(6):H2335-2342.
25. Connes P, Tripette J, Mukisi-Mukaza M, Başkurt OK, Toth K, Meiselman HJ, Hue O, Antoine-Jonville S. Relationships between hemodynamic, hemorheological and metabolic responses during exercise. *Biorheology.* 2009;46(2):133-143.
26. Nemeth N, Miko I, Furka A, Kiss F, Furka I, Koller A, Szilasi M. Concerning the importance of changes in hemorheological parameters caused by acid-base and blood gas alterations in experimental surgical models. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2012;51(1):43-50.
27. Toth Cs, Kiss F, Klarik Z, Gergely E, Toth E, Peto K, Vanyolos E, Miko I, Nemeth N. Following-up changes in red blood cell deformability and membrane stability in the presence of PTFE graft implanted into the femoral artery in a canine model. *Korea-Aust Rheol J.* 2014;26(2):209-215.
28. Lipowsky HH. Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation.* 2005;12(1):5-15.
29. Jung F, Rampling M. Role of blood viscosity in the microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016;64(3):251-254.
30. Yalcin O, Wang Q, Johnson PC, Palmer AF, Cabrales P. Plasma expander viscosity effects on red cell-free layer thickness after moderate hemodilution. *Biorheology.* 2011;48(5):277-291.

31. Chandran KB, Rittgers SE, Yoganathan AP. Rheology of blood and vascular mechanics. In: Chandran KB, Rittgers SE, Yoganathan AP, editors. *Biofluid Mechanics*. Boca Raton: CRC Press, 2012, pp. 109-154.
32. Pop GA, Duncker DJ, Gardien M, Vranckx P, Versluis S, Hasan D, Slager CJ. The clinical significance of whole blood viscosity in (cardio)vascular medicine. *Neth Heart J*. 2002;10(12):512-516.
33. Mehri R, Mavriplis C, Fenech M. Red blood cell aggregates and their effect on non-Newtonian blood viscosity at low hematocrit in a two-fluid low shear rate microfluidic system. *PLoS One*. 2018;13(7):e0199911.
34. Renoux C, Faivre M, Bessaa A, Da Costa L, Joly P, Gauthier A, Connes P. Impact of surface-area-to-volume ratio, internal viscosity and membrane viscoelasticity on red blood cell deformability measured in isotonic condition. *Sci Rep*. 2019;9(1):6771.
35. Cekirdekci EI, Bugan B. Whole blood viscosity in microvascular angina and coronary artery disease: Significance and utility. *Rev Port Cardiol (Engl Ed)*. 2020;39(1):17-23.
36. Kesmarky G, Kenyeres P, Rabai M, Toth K. Plasma viscosity: a forgotten variable. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2008;39(1-4):243-6.
37. Watson J, Salisbury C, Whiting P, Banks J, Pyne Y, Hamilton W. Added value and cascade effects of inflammatory marker tests in UK primary care: a cohort study from the Clinical Practice Research Datalink. *Br J Gen Pract*. 2019;69(684):e470-e478.
38. Watson J, Jones HE, Banks J, Whiting P, Salisbury C, Hamilton W. Use of multiple inflammatory marker tests in primary care: using Clinical Practice Research Datalink to evaluate accuracy. *Br J Gen Pract*. 2019;69(684):e462-e469.
39. Mehta J, Singhal S. Hyperviscosity syndrome in plasma cell dyscrasias. *Semin Thromb Hemost*. 2003;29(5):467-71.
40. Huisjes R, Bogdanova A, van Solinge WW, Schiffelers RM, Kaestner L, van Wijk R. Squeezing for life - properties of red blood cell deformability. *Front Physiol*. 2018;9:656.
41. Barshtein G, Pajic-Lijakovic I, Gural A. Deformability of stored red blood cells. *Front Physiol*. 2021;12:722896.

42. Lamoureux ES, Islamzada E, Wiens MVJ, Matthews K, Duffy SP, Ma H. Assessing red blood cell deformability from microscopy images using deep learning. *Lab Chip*. 2021;22(1):26-39.
43. Barshtein G, Gural A, Arbell D, Barkan R, Livshits L, Pajic-Lijakovic I, Yedgar S. Red blood cell deformability is expressed by a set of interrelated membrane proteins. *Int J Mol Sci*. 2023;24(16):12755.
44. Tripette J, Alexy T, Hardy-Dessources MD, Mougengel D, Beltan E, Chalabi T, Chout R, Etienne-Julan M, Hue O, Meiselman HJ, Connes P. Red blood cell aggregation, aggregate strength and oxygen transport potential of blood are abnormal in both homozygous sickle cell anemia and sickle-hemoglobin C disease. *Haematologica*. 2009;94(8):1060-1065.
45. Başkurt OK, Meiselman HJ. Erythrocyte aggregation: basic aspects and clinical importance. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2013;53(1-2):23-37.
46. Simmonds MJ, Meiselman HJ, Başkurt OK (2013): Blood rheology and aging. *J Geriatr Cardiol*. 10(3):291-301.
47. Başkurt OK, Neu B, Meiselman HJ. Determinants of red blood cell aggregation. In: Başkurt OK, Neu B, Meiselman HJ, eds. *Red Blood Cell Aggregation*, CRC Press, Boca Raton, 2012. pp. 9-29.
48. Vayá A, Suescun M. Hemorheological parameters as independent predictors of venous thromboembolism. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2013;53(1-2):131-41.
49. Singh VK, Seed TM. How necessary are animal models for modern drug discovery? *Expert Opin Drug Discov*. 2021;16(12):1391-1397.
50. Mukherjee P, Roy S, Ghosh D, Nandi SK. Role of animal models in biomedical research: a review. *Lab Anim Res*. 2022;38(1):18.
51. Domínguez-Oliva A, Hernández-Ávalos I, Martínez-Burnes J, Olmos-Hernández A, Verduzco-Mendoza A, Mota-Rojas D. The importance of animal models in biomedical research: current insights and applications. *Animals (Basel)*. 2023;13(7):1223.
52. Robinson NB, Krieger K, Khan FM, Huffman W, Chang M, Naik A, Yongle R, Hameed I, Krieger K, Girardi LN, Gaudino M. The current state of animal models in research: A review. *Int J Surg*. 2019;72:9-13.

53. Haberlik A, Cendron M, Sauer H. Biliovenous fistula in children after blunt liver trauma: proposal for a simple surgical treatment. *J Pediatr Surg.* 1992;27(9):1203-1206.
54. DiCocco JM, Fabian TC. Biliovenous fistula. In: *Encyclopedia of intensive care medicine*; Vincent JL, Hall JB (eds.); Springer, 2012, pp. 303–305.
55. Antebi E, Adar R, Zweig A, Barzilay J, Mozes M. Bilemia: an unusual complication of bile ducts stones. *Ann Surg.* 1973;177(3):274-275.
56. Navuluri R. Hemobilia. *Semin Intervent Radiol.* 2016;33:324–331.
57. Yopp A. Hemobilia and bilhemia. In: *Blumgart's surgery of the liver, biliary tract and pancreas, 2-Volume Set*; Jarnagin WR (ed.); Elsevier, 2017; pp. 1915-1927.e2
58. Gable DR, Allen JW, Harrell DJ, Carrillo EH. Endoscopic treatment of posttraumatic "bilhemia": case report. *J Trauma.* 1997;43(3):534-536.
59. Glaser K, Wetscher G, Pointner R, Schwab G, Tschmelitsch J, Gadenstätter M, Bodner E. Traumatic bilhemia. *Surgery.* 1994;116(1):24-27.
60. Sandblom P, Jakobsson B, Lindgren H, Lunderquist A. Fatal bilhemia. *Surgery.* 2000;127(3):354-357.
61. Turk E, Temir ZG, Karkiner A, Memis A, Topalak O, Evciler H, Ucan B, Karaca I. Bilhemia, an unusual complication after blunt liver trauma in a child: case report and review of the literature. *Eur J Pediatr Surg.* 2010;20(3):212-214.
62. Madhusudhan KS, Dash NR, Afsan A, Gamanagatti S, Srivastava DN, Gupta AK. Delayed Severe Hemobilia Due to Bilio-venous Fistula After Percutaneous Transhepatic Biliary Drainage: Treatment With Covered Stent Placement. *J Clin Exp Hepatol.* 2016;6(3):241-243.
63. Ahn SH, Ki SH, Oh CY, Cho WH, Lee JH, Lee YS, Lee HJ. Peritonitis caused by internal migration of the percutaneous transhepatic biliary drainage catheter. *Korean J Pancreas Biliary Tract.* 2016;21(2):107-111.
64. Çakır MS, Guzelbey T, Kınacı E, Sevinc MM, Kilickesmez O. Delayed bilhemia complicating percutaneous transhepatic biliary drainage: successful treatment with primary coil embolization. *Radiol Case Rep.* 2018;14(2):269-272.

65. Ayoola R, Jamindar P, Williams R. Venobiliary fistula with haemobilia: a rare complication of percutaneous liver biopsy. *BMJ Case Rep.* 2017;2017:bcr2016218930.
66. Maxeiner H. Iatrogene biliovenöse fistel. *Z Rechtsmed* 1984;91:235–246.
67. Lu D, Zhou ZY, Lv WF, Xue K, Chai J. Treatment of biliary-pleural fistula as a severe complication after percutaneous transhepatic biliary drainage. *World J Surg Surg Res.* 2022;5(1):1386.
68. Baillie J. Hemobilia. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2012;8(4):270-272.
69. Zeng J, Fan J, Zhou H. Bile acid-mediated signaling in cholestatic liver diseases. *Cell Biosci.* 2023;13:77.
70. Aduna M, Larena JA, Martín D, Martínez-Guereñu B, Aguirre I, Astigarraga E. Bile duct leaks after laparoscopic cholecystectomy: value of contrast-enhanced MRCP. *Abdom Imaging.* 2005;30(4):480-487.
71. Alegre CA, Molina GJF, Escribano FJ, Gallardo MI, Triviño TFA. Early phase detection of bile leak after hepatobiliary surgery: value of Gd-EOB-DTPA-enhanced MR cholangiography. *Abdom Imaging.* 2012;37(5):795-802.
72. Ergen FB, Akata D, Sarikaya B, Kerimoglu U, Hayran M, Akhan O, Hussain HK. Visualization of the biliary tract using gadobenate dimeglumine: preliminary findings. *J Comput Assist Tomogr.* 2008;32(1):54-60.
73. Kantarcı M, Pirimoglu B, Karabulut N, Bayraktutan U, Ogul H, Ozturk G, Aydinli B, Kizrak Y, Eren S, Yilmaz S. Non-invasive detection of biliary leaks using Gd-EOB-DTPA-enhanced MR cholangiography: comparison with T2-weighted MR cholangiography. *Eur Radiol.* 2013;23(10):2713-2722.
74. Bridges MD, May GR, Harnois DM. Diagnosing biliary complications of orthotopic liver transplantation with mangafodipir trisodium-enhanced MR cholangiography: comparison with conventional MR cholangiography. *AJR Am J Roentgenol.* 2004;182(6):1497-1504.
75. Wong YC, Wang LJ, Wu CH, Chen HW, Fu CJ, Yuan KC, Lin BC, Hsu YP, Kang SC. Detection and characterization of traumatic bile leaks using Gd-EOB-DTPA enhanced magnetic resonance cholangiography. *Sci Rep.* 2018;8:14612.

76. Spinn MP, Patel MK, Cotton BA, Lukens FJ. Successful endoscopic therapy of traumatic bile leaks. *Case Rep Gastroenterol.* 2013;7(1):56-62.
77. De Nisco G, Chiastra C, Hartman EMJ, Hoogendoorn A, Daemen J, Calò K, Gallo D, Morbiducci U, Wentzel JJ. Comparison of swine and human computational hemodynamics models for the study of coronary atherosclerosis. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:731924.
78. Längin M, Konrad M, Reichart B, Mayr T, Vandewiele S, Postrach J, Mokelke M, Radan J, Brenner P, Bauer A, Abicht JM. Hemodynamic evaluation of anesthetized baboons and piglets by transpulmonary thermodilution: normal values and interspecies differences with respect to xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 2020;27(5):e12576.
79. Coleman R, Iqbal S, Godfrey PP, Billington D. Membranes and bile formation. Composition of several mammalian biles and their membrane-damaging properties. *Biochem J.* 1979;178(1):201-208.
80. Kobayashi T, Taniguchi S, Ye Y, Niekrasz M, Nour B, Cooper DKC. Comparison of bile chemistry between humans, baboons, and pigs: implications for clinical and experimental liver xenotransplantation. *Lab Anim Sci.* 1998;48:197–200.
81. Si GL, Yao P, Shi L. Rapid Determination of bile acids in bile from various mammals by reversed-phase ultra-fast liquid chromatography. *J Chromatogr Sci.* 2015;53(7):1060-1065.
82. Song E, Segal I, Hodkinson J, Kew MC. Sinus bradycardia in obstructive jaundice--correlation with total serum bile acid concentrations. *S Afr Med J.* 1983;64(14):548-551.
83. Thakare R, Alamoudi JA, Gautam N, Rodrigues AD, Alnouti Y. Species differences in bile acids I. Plasma and urine bile acid composition. *J Appl Toxicol.* 2018;38(10):1323-1335.
84. Nemeth N, Kiss F, Miszti-Blasius K. Interpretation of osmotic gradient ektacytometry (osmoscan) data: a comparative study for methodological standards. *Scand J Clin Lab Invest.* 2015;75(3):213-222.
85. Gholampour S, Mehrjoo S. Effect of bifurcation in the hemodynamic changes and rupture risk of small intracranial aneurysm. *Neurosurg Rev.* 2021;44(3):1703-1712.

86. Moon CM, Kim SK, Heo SH, Shin SS. Hemodynamic changes in the portal vein with age: evaluation using four-dimensional flow MRI. *Sci Rep.* 2023;13(1):7397.
87. Smith RP, Argod J, Pépin JL, Lévy PA. Pulse transit time: an appraisal of potential clinical applications. *Thorax.* 1999;54(5):452-457.
88. Meng L, Yu W, Wang T, Zhang L, Heerdt PM, Gelb AW. Blood pressure targets in perioperative care. *Hypertension.* 2018;72(4):806-817.
89. Lelovas PP, Kostomitsopoulos NG, Xanthos TT. A comparative anatomic and physiologic overview of the porcine heart. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2014;53(5):432-438.
90. Charkoudian N, Gusman E, Joyner MJ, Wallin BG, Osborn J. Integrative mechanisms of blood pressure regulation in humans and rats: cross-species similarities. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;298(3):R755-759.
91. Stettler GR, Moore EE, Moore HB, Lawson PJ, Fragoso M, Nunns GR, Silliman CC, Banerjee A. Thrombelastography indicates limitations of animal models of trauma-induced coagulopathy. *J Surg Res.* 2017;217:207-212.
92. Sun J, Li MY, Zhou H, Chong J, Zhang JW, Yu B, Chen DW, Ge LP. Importance of gut microbiota for bile acid composition and concentration in pigs. *Front Anim Sci.* 2022;3:951840.
93. Higashiyama H, Uemura M, Igarashi H, Kurohmaru M, Kanai-Azuma M, Kanai Y. Anatomy and development of the extrahepatic biliary system in mouse and rat: a perspective on the evolutionary loss of the gallbladder. *J Anat.* 2018;232(1):134-145.
94. Buddingh KT, Nieuwenhuijs VB, van Buuren L, Hulscher JB, de Jong JS, van Dam GM. Intraoperative assessment of biliary anatomy for prevention of bile duct injury: a review of current and future patient safety interventions. *Surg Endosc.* 2011;25(8):2449-2461.
95. Cullen JM, Stalker MJ. Liver and Biliary System. In: Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 2; Maxie MG (ed.); Saunders Ltd., Anglia; 2016, pp. 258–352.

96. Matrai AA, Varga G, Tanczos B, Barath B, Varga A, Horvath L, Bereczky Z, Deak A, Nemeth N. In vitro effects of temperature on red blood cell deformability and membrane stability in human and various vertebrate species. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2021;78(3):291-300.
97. Singh M, Stoltz JF. Influence of temperature variation from 5 degrees C to 37 degrees C on aggregation and deformability of erythrocytes. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2002;26(1):1-7.
98. Uyklu M, Cengiz M, Ulker P, Hever T, Tripette J, Connes P, Nemeth N, Meiselman HJ, Başkurt OK. Effects of storage duration and temperature of human blood on red cell deformability and aggregation. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2009;41(4):269-278.
99. Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, Buring J, Hennekens C, Kearney P, Meade T, Patrono C, Roncaglioni MC, Zanchetti A. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet.* 2009;373(9678):1849-1860.
100. Dai Y, Ge J. Clinical use of aspirin in treatment and prevention of cardiovascular disease. *Thrombosis.* 2012;2012:245037.
101. Steg PG, Dorman SH, Amarenco P. Atherothrombosis and the role of antiplatelet therapy. *J Thromb Haemost.* 2011;9 Suppl 1:325-232.
102. Eikelboom JW, Hirsh J, Spencer FA, Baglin TP, Weitz JI. Antiplatelet drugs: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest.* 2012;141(2 Suppl):e89S-e119S.
103. Das P, Oliphant CS, Beach E, Thapa R. Emerging antiplatelet agents, differential pharmacology, and clinical utility. *J Blood Med.* 2010;1:79-91.
104. Weitz JI. Antiplatelet, anticoagulant, and fibrinolytic drugs. In: *Harrison's principles of internal medicine*; Jameson J, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J (eds.); McGraw-Hill Education, 2022; pp. 924-939.
105. Warner TD, Nylander S, Whatling C. Anti-platelet therapy: cyclo-oxygenase inhibition and the use of aspirin with particular regard to dual anti-platelet therapy. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;72(4):619-633.

106. Kubica J, Kozinski M, Navarese EP, Tantry U, Kubica A, Siller-Matula JM, Jeong YH, Fabiszak T, Andruszkiewicz A, Gurbel PA. Cangrelor: an emerging therapeutic option for patients with coronary artery disease. *Curr Med Res Opin.* 2014;30(5):813-828.
107. Hashemzadeh M, Furukawa M, Goldsberry S, Movahed MR. Chemical structures and mode of action of intravenous glycoprotein IIb/IIIa receptor blockers: A review. *Exp Clin Cardiol.* 2008;13(4):192-197.
108. Goto S. Cilostazol: potential mechanism of action for antithrombotic effects accompanied by a low rate of bleeding. *Atheroscler Suppl.* 2005;6(4):3-11.
109. Harker LA, Kadatz RA. Mechanism of action of dipyridamole. *Thromb Res Suppl.* 1983;4:39-46.
110. Heuberger DM, Schuepbach RA. Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases. *Thromb J.* 2019;17:4.
111. Künze G, Isermann B. Targeting biased signaling by PAR1: function and molecular mechanism of parmodulins. *Blood.* 2023;141(22):2675-2684.
112. Ahmad Y, Lip GY. Anticoagulation in atrial fibrillation. *Arrhythm Electrophysiol Rev.* 2012;1(1):12-16.
113. Thaler J, Pabinger I, Ay C. Anticoagulant treatment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: the present state of the art. *Front Cardiovasc Med.* 2015;2:30.
114. Wagner J, Lock JF, Kastner C, Klein I, Krajinovic K, Löb S, Germer CT, Wiegering A. Perioperative management of anticoagulant therapy. *Innov Surg Sci.* 2019;4(4):144-151.
115. Adams RLC, Bird RJ. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology (Carlton).* 2009;14(5):462-470.
116. Lichota A, Szewczyk EM, Gwozdziński K. Factors affecting the formation and treatment of thrombosis by natural and synthetic compounds. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):7975.
117. Adya KA, Inamadar AC, Palit A. Anticoagulants in dermatology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2016;82(6):626-640.

118. Alquwaizani M, Buckley L, Adams C, Fanikos J. Anticoagulants: A review of the pharmacology, dosing, and complications. *Curr Emerg Hosp Med Rep.* 2013;1(2):83-97.
119. Criado PR, Rivitti EA, Sotto MN, Valente NY, Aoki V, Carvalho JF, Vasconcellos C. Livedoid vasculopathy: an intriguing cutaneous disease. *An Bras Dermatol.* 2011;86(5):961-977.
120. Heestermans M, Poenou G, Hamzeh-Cognasse H, Cognasse F, Bertoletti L. Anticoagulants: A short history, their mechanism of action, pharmacology, and indications. *Cells.* 2022;11(20):3214.
121. Rajsic S, Breitkopf R, Jadzic D, Popovic KM, Tauber H, Treml B. Anticoagulation strategies during extracorporeal membrane oxygenation: A narrative review. *J Clin Med.* 2022;11(17):5147.
122. Bosek M, Wybranowski T, Napiórkowska-Mastalerz M, Pyskir J, Cyrankiewicz M, Pyskir M, Pilaczyńska-Cemel M, Szolna-Chodór A, Wrembel M, Kruszewski S, Przybylski G. The impact of COVID-19 on cellular factors influencing red blood cell aggregation examined in dextran: possible causes and consequences. *Int J Mol Sci.* 2023;24(19):14952.
123. Bosek M, Ziomkowska B, Pyskir J, Wybranowski T, Cyrankiewicz M, Napiórkowska M, Kruszewski S. Relationship between red blood cell aggregation and dextran molecular mass. *Sci Rep.* 2022;12:19751.
124. Bishop JJ, Nance PR, Popel AS, Intaglietta M, Johnson PC. Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(1):H222-236.
125. Kim S, Popel AS, Intaglietta M, Johnson PC. Effect of erythrocyte aggregation at normal human levels on functional capillary density in rat spinotrapezius muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290(3):H941-947.
126. Mchedlishvili G, Gobejishvili L, Beritashvili N. Effect of intensified red blood cell aggregability on arterial pressure and mesenteric microcirculation. *Microvasc Res.* 1993;45(3):233-242.
127. Chien SC. Chapter 26 – Biophysical behaviour of red cells in suspensions. 1975.

128. Lowe GDO, Barbenel JC. Plasma and blood viscosity. In: *Clinical blood rheology*; Lowe GDO (ed); CRC Press, 1988, pp. 1–10.
129. Murali C, Nithiarasu P. Red blood cell (RBC) aggregation and its influence on non-Newtonian nature of blood in microvasculature. *J Mech Mater Struct.* 2017;1:20160157.
130. Kauhanen P, Kovanen PT, Lassila R. Coimmobilized native macromolecular heparin proteoglycans strongly inhibit platelet-collagen interactions in flowing blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(11):E113-119.
131. Lassila R, Lindstedt K, Kovanen PT. Native macromolecular heparin proteoglycans exocytosed from stimulated rat serosal mast cells strongly inhibit platelet-collagen interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(12):3578-3587.
132. Olsson E, Asko-Seljavaara S, Lassila R. Topically administered macromolecular heparin proteoglycans inhibit thrombus growth in microvascular anastomoses. *Thromb Haemost.* 2002;87(2):245-251.
133. Denorme F, Frösen J, Jouppila A, Lindgren A, Resendiz-Nieves JC, Manninen H, De Meyer SF, Lassila R. Pretreatment with a dual antiplatelet and anticoagulant (APAC) reduces ischemia-reperfusion injury in a mouse model of temporary middle cerebral artery occlusion-implications for neurovascular procedures. *Acta Neurochir (Wien).* 2024;166(1):137.
134. Lassila R, Jouppila A. Mast cell-derived heparin proteoglycans as a model for a local antithrombotic. *Semin Thromb Hemost.* 2014;40(8):837-844.
135. Pepe M, Peruzzi M, Biondi-Zoccai G, Giordano A. Antithrombotic therapy for vascular disease and intervention: the best is yet to come? *J Cardiovasc Pharmacol.* 2021;78(3):334-335.
136. Tchougounova E, Pejler G. Regulation of extravascular coagulation and fibrinolysis by heparin-dependent mast cell chymase. *FASEB J.* 2001;15(14):2763-2765.
137. Chen J, Verni CC, Jouppila A, Lassila R, Diamond SL. Dual antiplatelet and anticoagulant (APAC) heparin proteoglycan mimetic with shear-dependent effects on platelet-collagen binding and thrombin generation. *Thromb Res.* 2018;169:143-151.

138. Vögtle T, Sharma S, Mori J, Nagy Z, Semeniak D, Scandola C, Geer MJ, Smith CW, Lane J, Pollack S, Lassila R, Jouppila A, Barr AJ, Ogg DJ, Howard TD, McMiken HJ, Warwicker J, Geh C, Rowlinson R, Abbott WM, Eckly A, Schulze H, Wright GJ, Mazharian A, Fütterer K, Rajesh S, Douglas MR, Senis YA. Heparan sulfates are critical regulators of the inhibitory megakaryocyte-platelet receptor G6b-B. *Elife*. 2019;8:e46840.
139. Barreiro KA, Tulamo R, Jouppila A, Albäck A, Lassila R. Novel locally acting dual antiplatelet and anticoagulant (APAC) targets multiple sites of vascular injury in an experimental porcine model. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2019;58(6):903-911.
140. Tuuminen R, Jouppila A, Salvail D, Laurent CE, Benoit MC, Syrjälä S, Helin H, Lemström K, Lassila R. Dual antiplatelet and anticoagulant APAC prevents experimental ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. *Clin Exp Nephrol*. 2017;21(3):436-445.
141. Sikka P, Bindra VK. Newer antithrombotic drugs. *Indian J Crit Care Med*. 2010;14(4):188-195.
142. Watson RD, Chin BS, Lip GY. Antithrombotic therapy in acute coronary syndromes. *BMJ*. 2002;325(7376):1348-1351.
143. Holmes DR Jr, Kereiakes DJ, Kleiman NS, Moliterno DJ, Patti G, Grines CL. Combining antiplatelet and anticoagulant therapies. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(2):95-109.
144. Lamberts M, Olesen JB, Ruwald MH, Hansen CM, Karasoy D, Kristensen SL, Køber L, Torp-Pedersen C, Gislason GH, Hansen ML. Bleeding after initiation of multiple antithrombotic drugs, including triple therapy, in atrial fibrillation patients following myocardial infarction and coronary intervention: a nationwide cohort study. *Circulation*. 2012;126(10):1185-1193.
145. Garrido M, Escobar C, Zamora C, Rejas C, Varas J, Párraga M, San Martín S, Montedónico S. Bile duct ligation in young rats: A revisited animal model for biliary atresia. *Eur J Histochem*. 2017;61(3):2803.
146. Rolf LL Jr, Bartels KE, Nelson EC, Berlin KD. Chronic bile duct cannulation in laboratory rats. *Lab Anim Sci*. 1991;41(5):486-492.

147. Başkurt OK, Hardeman MR, Uykulu M, Ulker P, Cengiz M, Nemeth N, Shin S, Alexy T, Meiselman HJ. Parameterization of red blood cell elongation index--shear stress curves obtained by ektacytometry. *Scand J Clin Lab Invest.* 2009;69(7):777-788.
148. Clark MR, Mohandas N, Shohet SB. Osmotic gradient ektacytometry: comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance. *Blood* 1983;61:899–910.
149. Vayá A, Falcó C, Fernández P, Contreras T, Valls M, Aznar J. Erythrocyte aggregation determined with the Myrenne aggregometer at two modes (M0, M1) and at two times (5 and 10 sec). *Clin Hemorheol Microcirc.* 2003;29(2):119-27.
150. Roberts PS, Hughes HN, Fleming PB. The effects of hepes buffer on clotting tests, assay of factors V and VIII and on the hydrolysis of esters by thrombin and thrombokinas. *Thromb Haemost.* 1976;35(1):202-210.
151. Craige S, Jouppila A, Humphries B, Lassila R. Safety and functional pharmacokinetic profile of APAC, a novel intravascular antiplatelet and anticoagulant. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2021;78(3):453-462.
152. Nemeth N, Sogor V, Kiss F, Ulker P. Interspecies diversity of erythrocyte mechanical stability at various combinations in magnitude and duration of shear stress, and osmolality. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016;63(4):381-398.
153. Hardeman MR, Dobbe JGG, Ince C. The laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2001;25:1–11.
154. Thorn CE, Bowman AS, Eckersall D. Hematology of pigs. In: Schalm's veterinary hematology; Brooks MB, Harr KE, Seelig DM, Wardrop KJ, Weiss DJ (eds); John Wiley & Sons, 2022; pp. 1019–1025.
155. Wolfensohn S, Lloyd M. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*; 4th ed.; Willey Blackwell, 2013.
156. Chong Nguyen C, Duboc D, Rainteau D, Sokol H, Humbert L, Seksik P, Bellino A, Abdoul H, Bouazza N, Treluyer JM, Saadi M, Wahbi K, Soliman H, Coffin B, Bado A, Le Gall M, Varenne O, Duboc H. Circulating bile acids concentration is predictive of coronary artery disease in human. *Sci Rep.* 2021;11:22661.

157. Maenz DD, Forsyth GW. Calcium ionophore activity of intestinal secretory compounds. An in vitro porcine model for the effects of bile acids, hydroxy-fatty acids and dioctyl sulfosuccinate. *Digestion*. 1984;30(3):138-150.
158. Zhang BC, Chen JH, Xiang CH, Su MY, Zhang XS, Ma YF. Increased serum bile acid level is associated with high-risk coronary artery plaques in an asymptomatic population detected by coronary computed tomography angiography. *J Thorac Dis*. 2019;11(12):5063-5070.
159. Desai MS, Penny DJ. Bile acids induce arrhythmias: old metabolite, new tricks. *Heart*. 2013;99(22):1629-1630.
160. Li Y, Li J, Leng A, Zhang G, Qu J. Cardiac complications caused by biliary diseases: A review of clinical manifestations, pathogenesis and treatment strategies of cholecardia syndrome. *Pharmacol Res*. 2024;199:107006.
161. Zhang R, Ma WQ, Fu MJ, Li J, Hu CH, Chen Y, Zhou MM, Gao ZJ, He YL. Overview of bile acid signaling in the cardiovascular system. *World J Clin Cases*. 2021;9(2):308-320.
162. Vasavan T, Ferraro E, Ibrahim E, Dixon P, Gorelik J, Williamson C. Heart and bile acids - Clinical consequences of altered bile acid metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864(4 Pt B):1345-1355.
163. Voiosu A, Wiese S, Voiosu T, Bendtsen F, Møller S. Bile acids and cardiovascular function in cirrhosis. *Liver Int*. 2017;37(10):1420-1430.
164. Akhtar DN, Iqbal DMJ, Farooq DH. Jaundice and sinus bradycardia 100 years of an unsolved mystery. *Pak Heart J*. 2012;43(1-2).
165. Joubert P. An in vivo investigation of the negative chronotropic effect of cholic acid in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1978;5(1):1-8.
166. Binah O, Rubinstein I, Bomzon A, Better OS. Effects of bile acids on ventricular muscle contraction and electrophysiological properties: studies in rat papillary muscle and isolated ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1987;335(2):160-165.

167. Vacca G, Battaglia A, Grossini E, Mary DA, Molinari C. Reflex coronary vasoconstriction caused by gallbladder distension in anesthetized pigs. *Circulation*. 1996;94(9):2201-2209.
168. Albargawi M, Abdulaal I. Significant high lipid profile in a woman with obstructive jaundice. *JCEM Case Rep*. 2023;1(4):luad080.
169. Chmiel B. Odkształcalność krwinek czerwonych w żółtaczce mechanicznej [Red blood cell's deformability in obstructive jaundice]. *Wiad Lek*. 2001;54(5-6):262-267.
170. Mark M, Walter R, Contesse J, Reinhart WH. Impairment of blood rheology by cholestatic jaundice in human beings. *J Lab Clin Med*. 2003;142(6):391-398.
171. Huang L, Yu Q, Peng H. Hemorheological alteration in patients with cirrhosis clinically diagnosed with portal vein system thrombosis after splenectomy. *Med Sci Monit*. 2021;27:e931157.
172. Woolbright BL, Jaeschke H. Therapeutic targets for cholestatic liver injury. *Expert Opin Ther Targets*. 2016;20(4):463-475.
173. Cai SY, Boyer JL. The role of bile acids in cholestatic liver injury. *Ann Transl Med*. 2021;9(8):737.
174. Evangelakos I, Heeren J, Verkade E, Kuipers F. Role of bile acids in inflammatory liver diseases. *Semin Immunopathol*. 2021;43(4):577-590.
175. Li W, Liang Z. Clinical significance of serum total bile acid and hemorheology indexes in intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *J Clin Med Prac*. 2014;23:70-72.
176. Singh M, Kumaravel M. Influence of jaundice on aggregation process and deformability of erythrocytes. *Clin Hemorheol Microcirc*. 1995;15:273-290.
177. Brun JF. Hormones, metabolism and body composition as major determinants of blood rheology: potential pathophysiological meaning. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2002;26(2):63-79.
178. Nemeth N, Peto K, Magyar Z, Klarik Z, Varga G, Oltean M, Mantas A, Czigany Z, Tolba RH. Hemorheological and microcirculatory factors in liver ischemia-reperfusion injury-an update on pathophysiology, molecular mechanisms and protective strategies. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):1864.

179. Szanto S, Mody T, Gyurcsik Z, Babjak LB, Somogyi V, Barath B, Varga A, Matrai AA, Nemeth N. Alterations of selected hemorheological and metabolic parameters induced by physical activity in untrained men and sportsmen. *Metabolites*. 2021;11(12):870.
180. Lang E, Pozdeev VI, Gatidis S, Qadri SM, Häussinger D, Kubitz R, Herebian D, Mayatepek E, Lang F, Lang KS, Lang PA. Bile acid-induced suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38(4):1500-1509.
181. Oelberg DG, Dubinsky WP, Sackman JW, Wang LB, Adcock EW, Lester R. Bile salts induce calcium uptake in vitro by human erythrocytes. *Hepatology*. 1987;7(2):245-252.
182. Samartsev VN, Khoroshavina EI, Pavlova EK, Dubinin MV, Semenova AA. Bile acids as inducers of protonophore and ionophore permeability of biological and artificial membranes. *membranes (Basel)*. 2023;13(5):472.
183. Simko V, Kelley RE. Effect of physical exercise on bile and red blood cell lipids in humans. *Atherosclerosis*. 1979;32(4):423-434.
184. Vural YZ, Gencosmanoglu TG, Daglar K, Yılmaz E, Kara O, Uygur D. Elevated red blood cell distribution width is associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Ginekol Pol*. 2017;88(2):75-80.
185. Child P, Rafter J. Calcium enhances the hemolytic action of bile salts. *Biochim Biophys Acta*. 1986;855(3):357-364.
186. Li J, Dawson PA. Animal models to study bile acid metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(5):895-911.
187. Setchell KD, Rodrigues CM, Clerici C, Solinas A, Morelli A, Gartung C, Boyer J. Bile acid concentrations in human and rat liver tissue and in hepatocyte nuclei. *Gastroenterology*. 1997;112(1):226-235.
188. Thakare R, Alamoudi JA, Gautam N, Rodrigues AD, Alnouti Y. Species differences in bile acids II. Bile acid metabolism. *J Appl Toxicol*. 2018;38(10):1336-1352.
189. Druid H, Rammer L. Protective effect on postischemic renal edema by anticoagulation. *Nephron*. 1992;60(3):319-323.
190. Feher G, Koltai K, Kesmarky G, Toth K. Hemorheological background of acetylsalicylic acid resistance. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2008;38(3):143-152.

191. Elblbesy MA, Hereba AR, Shawki MM. Effects of aspirin on rheological properties of erythrocytes in vitro. *Int J Biomed Sci.* 2012;8(3):188-193.
192. Barath B, Somogyi V, Tanczos B, Varga A, Bereczky Z, Nemeth N, Deak A. Examination of the relation between red blood cell aggregation and hematocrit in human and various experimental animals. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2021;78(2):187-198.
193. Jan KM. Electrochemical basis of heparin-induced red blood cell aggregation. In: *Bioelectrochemistry: ions, surfaces, membranes*; Blank M (ed); American Chemical Society, 1980, pp. 143-149.

10.2. 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.



11. TÁRGYSZAVAK

haemorheologia

hemorheology

vörösvérsejt deformabilitás

red blood cell deformability

vörösvérsejt aggregatio

red blood cell aggregation

hemodinamika

hemodynamics

fajok közötti különbségek

interspecies diversity

bilhaemia

bilhaemia

thrombocytaaggregatio-gátló

antiplatelet

véralvadásgátló

anticoagulant

12. 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 rezidenst, 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

13. FÜGGELÉK

Az értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények másolatai