

# HEMOREOLÓGIAI PARAMÉTEREK PROGNOSZTIKAI JELENTŐSÉGE ÉS MÉRÉSÜK MÓDSZERTANA

Ph.D. értekezés

Szerző: Dr. Kenyeres Péter

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola  
Kísérletes Kardiológia program

Programvezető: Prof. Dr. Tóth Kálmán

Témavezetők: Prof. Dr. Tóth Kálmán

Prof. Dr. Bogár Lajos

Dr. Késmárky Gábor

Pécsi Tudományegyetem

I. sz. Belgyógyászati Klinika

Pécs

**2010.**

# I. A HEMATOKRIT-VÉRVISZKOZITÁS ARÁNY PROGNOSZTIKAI JELENTŐSÉGE ÉS FELHASZNÁLÁSA AZ OPTIMÁLIS HEMATOKRIT MEGÍTÉLÉSÉBEN

## *Bevezetés*

A fejlett országokban a szív-érrendszeri kórképek és szövődményeikből eredő megbetegedések vezetnek a morbiditási és mortalitási statisztikákat. Ezen megbetegedések „klasszikus” rizikófaktorai, mint a cukorbetegség, a magasvérnyomás, a diszlipidémiák, a dohányzás vagy az elhízás, régóta ismertek. További vizsgálatok más tényezők szerepét is felvetették a betegségek kialakulásában. A hemoreológiai faktorok jelentőségére elsősorban az utóbbi két évtized kutatásai hívták fel a figyelmet. A hemoreológiai paraméterek a vér áramlási viszonyait, a vér elemeinek fizikai tulajdonságait jellemzik. Ezen tényezők romlása a mikrokeringés, a szövetek vérellátásának károsodásához, valamint a szívre háruló munka fokozódásához vezetnek. A legtöbb információ a hematokrit, a plazma- és a teljes vér viszkozitás, valamint a fibrinogén szerepével kapcsolatban áll rendelkezésre, a klinikumban is elsősorban ezen paraméterek használatosak.

Anémia, azaz alacsony hematokrit esetén a vér nem tud megfelelő mennyiségű oxigént felvenni és szállítani, a hematokrit csökkenésével a szív eredetű halálozás nő. A hematokrit emelkedésével az oxigénkötő kapacitás lineárisan, míg a vér viszkozitása exponenciálisan nő, és bár a vér oxigénben gazdagabb lesz, a megnövekedett áramlási ellenállás, a véráramlás lelassulása miatt az eredő oxigénellátás romlik. A hemoreológia egyik sokat kutatott területe, hogy mely hematokrit tekinthető optimálisnak. A vér oxigénszállító intenzitása a véráramlás intenzitásától és az oxigénszállító hemoglobin koncentrációjától függ. Előbbi a Hagen-Poiseuilles törvény alapján írható le, utóbbit praktikus okokból a hematokrit értékkel közelíthetjük. Amennyiben az áramlást jellemző geometriai paraméterek és az áramlást létrehozó nyomásgradiens rögzítettek, az oxigénszállítás intenzitása a hematokrit-vérviszkozitás aránnyal (Htk/VV) jellemezhető.

$$Q_{O_2} \approx c Q_{\text{vér}} Hb \approx c \frac{\Delta P \pi r^4}{8 \eta l} Htk = C \frac{Htk}{\eta}$$

Logikusnak tűnik, hogy ha a kardiovaszkuláris betegségek elsősorban a perfúzió károsodásával hozhatók összefüggésbe, akkor a hematokrit-vérviszkozitás arány egy erősebb prediktor lehet, mint a korábban vizsgált paraméterek. Mindazonáltal az irodalomban kevés tanulmány foglalkozik ezen paraméterrel. Munkám során a hematokrit-vérviszkozitás arány klinikai használhatóságát vizsgáltam.

## *Célkitűzések*

Tanulmányozni kívántuk, hogy a hematokrit-vérviszkozitás arány milyen összefüggést mutat a kardiovaszkuláris morbiditással és mortalitással.

A hematokrit-vérviszkozitás görbe felvétele sok mérést igényel, a minta- és az időigénye nagy. Egy olyan módszert kerestünk, mellyel az összefüggést a klinikum számára is használható módon, gyorsan, egyszerűen lehet mérni. Ezen belül a hematokrit-vérviszkozitás

görbe maximumához tartozó virtuális optimális hematokrit érték meghatározását is célul tűztük ki.

Tanulmányozni kívántuk, hogy az elméleti módon számított virtuális optimális hematokrit a klinikai betegek empirikus adataival milyen viszonyban áll.

## ***1. Az alacsony hematokrit-vérviszkozitás arány, mint rizikótényező a koszorúérbetegek halálozásában***

### ***Betegek és módszerek***

Tanulmányunkban 68 koszorúér-beteget vizsgáltunk, akik 1996-97 során egyetemünkön elektív koronarográfián estek át. A koronarográfia femorális artériás behatolásból, standard Judkins módszer szerint történt, és nem történt sem tágítás, sem stent-beültetés. A fő ágak szűkületének súlyosságát 0-tól 4-ig terjedő skálával jellemeztük, ezek összege képezte a koronarográfiás szkórt (maximum 12 pont). A beavatkozás előtt a betegektől vett vérmintákból a következő paramétereket határoztuk meg: összkoleszterin és triglicerid szint, HDL/LDL koleszterin arány, fibrinogénszint, hematokrit kapilláris centrifugával, plazma pizkositás (PV) és 90 1/s sebességgrádiens melletti teljes vér viszkozitás (VV) Hevimet 40 kapilláris viszkoziméterrel 37 °C-on. A bal kamrai ejekciós frakciót és cardiac indexet echo- illetve impedancia-kardiográfiával mértük. Ezen kívül figyelembe vettük a betegek nemét, életkorát, testtömeg indexét és a dohányzásra, magasvérnyomásra, cukorbetegsége, illetve korábbi szívinfarktusra vonatkozó anamnéziséit.

2006. februárjában a helyi önkormányzati nyilvántartástól megtudtuk az időközben elhunyt betegek nevét. Az életben maradt betegeket levélben megkérdeztük a szívproblémák miatti kórházi bennfekvések számáról. Az elhunytak halálukáról a betegek kezelőorvosától szereztünk információt.

Az utánkövetés során szívbetegségben elhunyt betegeket (n=10) „C”, a nem szívbetegség miatt elhunytakat (n=2) és a túlélőket (n=66) együttesen „NC” csoportként jelöltük. A dichotom jellemzőknél Pearson khi-négyzet próbát, illetve szükség szerint Fischer egzakt tesztet, míg a folytonos változók analízisének Student t-próbát használtunk. A paraméterek kardiális mortalitásra vonatkozó jóslóerejének megítéléséhez kiszámoltuk az egyes ROC-görbék (receiver operating characteristic) alatti területet (AUC). Valamennyi paraméternél alsó és felső félcsoportokba soroltuk a betegeket, és az egyes paraméterek túlélésre gyakorolt hatását Kaplan-Meier túlélésvizsgálattal elemeztük. A nem szív eredetű halálozást cenzorálnak tekintettük. A túlélőknél lineáris kétváltozós korrelációvizsgálattal demonstráltuk az összefüggés szorosságát a paraméterek értéke és a koszorúér-betegség súlyossága között; ez utóbbit a szívproblémák miatti kórházi felvételek számával jellemeztük. A statisztikai elemzést az SPSS 11.0 programcsomaggal végeztük.

### ***Eredmények***

A „C” csoportba tartozó betegek átlagos életkora szignifikánsan magasabb (62,3±10,1 vs 53,3±8,9 év), a triglicerid szintje (1,8±0,5 vs 2,6±1,6 mmol/l) és Htk/VV aránya (87±5 vs 93±9 Pa<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) alacsonyabb volt, mint az „NC” csoporté. A ROC görbék szerint a hagyományos paraméterek nem tudták előre jelezni a kardiális halálozást, a Htk/VV arány viszont alkalmas volt erre (AUC: 0,716, p=0,028). Legjobb határpontnak a 88,8 Pa<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> Htk/VV arány tűnt

(specifititás 70%, szenzitivitás 70%). A Kaplan-Meier analízis a felső és alsó félcsoport között csak a fibrinogén ( $p=0,03$ ) és a Htk/VV arány ( $p=0,009$ ) esetén talált szignifikáns különbséget. Harmincnégy beteg válaszolt a hospitalizációt érintő kérdőívre. A vizsgált paraméterek (kor, BMI, triglicerid, Htk, PV, VV, Htk/VV arány, cardiac index, bal kamrai ejekciós frakció) közül egyik sem korrelált szignifikáns mértékben a kórházi bennfekvések számával, de a Htk/VV arány esetén egy nyilvánvalóan távol eső pont kizárása után ez elérte a szignifikancia határát (Pearson  $r: -0,377$ ,  $p=0,03$ ).

### **Diszkusszió**

A fibrinogén szerepével kapcsolatban az irodalmi eredményekhez hasonló következtetésre jutottunk. Tanulmányunkban mindazonáltal nem sikerült igazolni számos klasszikus kardiovaszkuláris rizikófaktor jósló értékét. Ennek egyik oka az lehet, hogy egy viszonylag súlyosan érintett betegcsoportot vizsgáltunk. Feltételezésünk szerint ezen atherogenesisben fontos rizikótényezők jobbra már az utánkövetés kezdete előtt kifejtették hatásukat, és a definitív coronaria stenosis létrehozása után későbbi befolyásuk már kevésbé volt jelentős. Ezenfelül a vizsgált paraméterek csak az adott pillanatot tükrözték, és nem volt tudomásunk sem korábbi abnormalitásokról, melyeket az időközben beállított kezelés már maszkírozhatott, sem a paraméterek későbbi alakulásáról. Megjegyzendő, hogy a „C” és „NC” csoport értékei közötti különbségek a legtöbb rizikótényező esetén a várt tendenciát mutatták, és feltehetően a viszonylag kis mintaméret miatt nem érték el a szignifikancia határát. Hasonlóképp, a rizikótényezők és a hospitalizációk száma közötti összefüggés is a várakozásoknak megfelelően alakult. Eredményeinkből látszott a tendencia, miszerint mind a magas (44% feletti), mind az alacsony (36% alatti) Htk-tal rendelkező betegeknel gyakrabban fordul elő kórházi felvétel, mint a köztes értékekkel rendelkezőknél. Többváltozós lineáris regressziós analízissel egyik vizsgált paraméter sem bizonyult független rizikótényezőnek a hospitalizáció kérdésében. Ezen eredményt azonban fenntartásokkal kell kezelni. Egyrészt a minta elemszáma ehhez kicsi, ami hiányzó értékek miatt a statisztika szempontjából még tovább csökkent. Másrészt a paraméterek közt jelentős interferencia volt. Ilyen interferencia jól ismert például a BMI és a lipid paraméterek, a fibrinogén és a PV, a Htk és a VV, vagy a kor és a cardiac index között.

Egyéb, a vizsgálat értékét korlátozó tényezőkre is fel kell hívnunk a figyelmet. Több mint egy évtizede a koronarográfia hazánkban és régióinkban sokkal kevésbé hozzáférhető vizsgálat volt, mint manapság, így általában csak a legsúlyosabb eseteknél került elvégzésre. A vizsgált betegek több mint fele súlyos háromérbetegségben szenvedett (koronarográfias szkór 11-12). Az eloszlás ennyire torz volta miatt nem is készítettünk olyan statisztikát, melyben a koronarográfias szkór direkt változóként szerepel. Amikor a túlélést vizsgáltuk, csak a szívbetegség miatti halálozást, mint kemény végpontot vettük figyelembe, és figyelmen kívül hagytunk olyan információkat, mint későbbi koronarográfia és stent-beültetés vagy revaszkularizációs műtét, jóllehet ezek valószínűleg szintén befolyásolták a túlélést.

Végezetül annyi újdonságot állíthatunk, hogy a kedvezőtlen Htk/VV arány koszorúér-betegeknel magasabb kardiális halálozási kockázatot jelent. A Htk egy gyakran, a VV egy ritkán vizsgált paraméter ezen betegeknel. A kockázat megítélésénél célszerű lenne a kettő hányadosát is figyelembe venni. Az elgondolás igazolásához a jövőben nagyobb elemszámú és prospektív utánkövetéses vizsgálatokra lesz szükség.

## **2. Új módszer a hematokrit-vérviszkozitás arány és a virtuális optimális hematokrit meghatározására**

### **Bevezetés**

A hematokrit és a vérviszkozitás között Mátrai szerint exponenciális kapcsolat áll fenn, így a hematokrit és a hematokrit-vérviszkozitás arány közötti összefüggés egy  $x/e^x$  típusú függvényvel jellemezhető. A lokális maximum értéke mutatja az elérhető maximális oxigénszállítási intenzitást, melyet az optimális hematokrit révén érhetünk el.

A vér alakos elemek plazmában való szuszpenziója, így viszkozitását a szuszpendáló közeg viszkozitása is alapvetően befolyásolja. A vér nem Newtoni folyadék, így viszkozitása függ a sebességgrádiensről. Alacsony sebességgrádiensnél a viszkozitás meredeken nő, ennek hátterében elsősorban vörösvérsejt aggregátumok képződése áll. Magas sebességgrádiensek felé a viszkozitásgörbe egy határértékhez tart, melynek egyik fontos meghatározója a vörösvérsejtek deformálhatósága. Munkacsoportunk a klinikai rutinban a 90 1/s sebességgrádiensnél mért viszkozitásiértéket alkalmazza, ahol az említett faktorok hatása kiegyensúlyozottnak tekinthető; a korábbi tanulmányban is ezen értéket használtuk. A Htk/VV görbék lefutása és a csúcsokhoz tartozó optimális hematokritok értelemszerűen szintén függenek az alkalmazott sebességgrádiensről. A különböző sebességgrádiensen felvett görbék összességét nevezzük Htk/VV profilnak.

Célunk a Htk/VV profil felvételére, az optimális hematokrit meghatározására alkalmas mérési módszer kidolgozása volt.

### **Módszerek és minták**

Méréseinkhez 7 egészséges önkéntes heparinnal antikoagulált teljes vérért használtunk. A vérmintából a kontroll frakció mellett 10, 25, 40, 55 és 70% hematokritra beállított frakciókat hoztunk létre. A hematokritot kapilláris centrifugával határoztuk meg. A plazma és teljes vér viszkozitás méréséhez Hevimet 40 (Hemorex Kft, Budapest) kapilláris viszkozimétert használtunk, mely a sebességgrádiens-viszkozitás összefüggést a Casson-formula segítségével közelíti. A kontroll frakció paramétereiből a Mátrai-összefüggés felhasználásával is származtattuk a 10, 25, 40, 55 és 70% hematokritnál várt viszkozitást.

### **Eredmények és diszkusszió**

A különböző hematokritú frakciók mért és származtatott viszkozitásának összehasonlításakor a következőket tapasztaltuk. A 70% hematokritú frakciónál a kalkulált viszkozitás szignifikánsan alatta marad a mértnek 50 1/s vagy ennél nagyobb sebességgrádienseken. E tendencia már 30 1/s-nál is megfigyelhető volt. A 10 1/s-on mért és számított viszkozitásiértékek közötti eltérés ugyan nem volt szignifikáns, de a szórása bármely hematokrit esetén nagyon magas volt. Ez a jelenség enyhébb mértékben a 30 1/s-hoz tartozó értékeknél is megfigyelhető volt.

A kapilláris viszkoziméter működési elve miatt a magas viszkozitású, 70% hematokritú mintáknál a tényleges mérési tartomány 10-100 1/s környékére esik, amely a Casson görbe meredek szárát jelenti, és az itt elhelyezkedő pontok jelentős sztochasztikus hibával terheltek. A magas sebességgrádiensek extrapolációjakor és az aszimptota számításakor ez a bizonytalanság halmozottan jelenik meg. Hasonlóképpen, ha a mért pontok döntően a lapos, aszimptotikus szárra esnek (pl. 40% Htk, kb. 40-240 1/s mérési tartomány), akkor az alacsony sebességgrádiensekhez tartozó meredek szár extrapolációja lesz hibákkal

terhelt. Rotációs viszkoziméter alkalmazásával, ahol az alkalmazott sebességgrádiens jobban kézben tartható, ezen hibák feltehetőleg alacsonyabbak lennének.

Bizonyított, hogy egyetlen konstans-párt (küszöbfeszültség és Casson-viszkozitás) használva a Casson egyenlet segítségével nem lehetséges a teljes sebességgrádiens tartományon jól leírni a teljes vér viszkozitást. A hematokrit-vérviszkozitás közötti kapcsolat is bonyolultabb egy exponenciális összefüggésnél (befolyásolja többek között a vörsejtek nyírással párhuzamosan változó aggregációja és alakfaktora, vagy a vörsejtek belső viszkozitásának és a szuszpendáló plazma viszkozitásának aránya). A származtatás tökéletlensége miatt tehát nem meglepő, hogy a kalkulált és mért értékek csak két ponton (a kontroll frakció hematokritján (kb 40-50% közötti Htk), és a 0% hematokriton) egyeznek meg, ezektől távolodva fokozódó mértékben eltérnek egymástól.

Eredményeink szerint a 10% és kb. 60% közötti hematokritú minták, 10 1/s-nál magasabb sebességgrádiens mellett mért viszkozitása 95%-os valószínűséggel  $\pm 10\%$ -on belül van a kalkulált értékekhez képest. Ekkora pontatlanság valószínűleg biológiai értelemben sem számottevő. A klinikailag releváns hematokrit és sebességgrádiens tartományban tehát a két módszer által adott eredmények kielégítő egyezést mutatnak. A Htk/VV esetén ugyanezen eredmények érvényesek ellentétes előjellel.

Méréssel csak a Htk/VV görbe előzetesen definiált hematokritokhoz tartozó pontjait tudjuk felvenni. Az optimális hematokritot ezzel a módszerrel nem lehet eltalálni, csak megbecsülni, melyik két előre definiált hematokrit között várható. A frakciók hematokritjának beállítása időigényes. A görbe finomítása a frakciók számának növelésével lehetséges, ez azonban a vér- és időigény arányos növekedésével jár.

Ezzel szemben a kalkulációs módszerrel a teljes Htk/VV profil származtatható egyetlen mérésből. Nem igényel mintaelőkészítést, a hematokrit beállítását; a vér- és időigény lényegesen kisebb. A hematokrit, plazma- és teljes vér viszkozitás eredmények, amiket a rutin klinikai mérések során kaptunk, alkalmasak a Htk/VV profil felvázolására is. Ez lehetőséget teremt a korábbi adatok új szempont szerinti retrospektív feldolgozására. A kalkulációs módszer hátránya, hogy a Htk/VV görbe egyetlen mérés pontosságától függ. Míg a mért Htk/VV görbénél a különböző frakciók viszonyítási alapul szolgálnak egymás helyességét illetően, a számított görbénél ez a belső kontroll hiányzik.

A Htk/VV értéket tetszőleges Htk mellett zárt képlet segítségével számíthatjuk, így differenciálszámítás segítségével a görbe maximumpontja is meghatározható.

$$Htk_{opt} = \frac{Htk_0}{\ln \frac{VV_0}{PV}} \quad (\text{ahol } Htk_0, VV_0: \text{ a kiinduló vérminta hematokrit- és viszkozitás-értéke})$$

Tartsuk szem előtt, hogy a Htk/VV görbe és az ebből származtatott optimális hematokrit csak kontrollált Hagen-Poiseuille áramlási viszonyok és előre definiált sebességgrádiens mellett értelmezhető in vitro paraméterek. Nem szabad összekevernünk a holisztikus (vagy legalábbis szituatív) szemléletet tükröző, klinikailag releváns in vivo optimális hematokrittal. A különbséget hangsúlyozandó, a bemutatott paraméterre a későbbekben virtuális optimális hematokritnak ( $Htk_{opt,v}$ ) néven hitkozunk.

### ***3. A virtuális és a globális optimális hematokrit kapcsolata akut koronária szindrómán átesett betegek esetén***

#### ***Bevezetés***

Az előzőekben kifejtettük a virtuális optimális hematokrit ( $H_{tk_{opt,v}}$ ) jelentését és meghatározásának módját. Klinikai szempontból az optimális hematokritot, vagy globális optimális hematokritot ( $H_{tk_{opt,g}}$ ) nehezebb meghatározni. Jelentheti ez a minél alacsonyabb mortalitást, a legjobb életminőséget, utalhat a sportteljesítmény maximalizálására, vagy éppen előnyben részesíthetjük egy kritikus vérellátású terület minél jobb perfúzióját. Bármely megközelítést vesszük is alapul, a vér áramlását egy komplex in vivo rendszerben vizsgáljuk, ahol a Hagen-Poiseuille áramlás feltételei nem teljesülnek, és a sebességgrádiensek dinamikusan változnak. Ilyen körülmények között a  $H_{tk}/VV$  modell érvényessége korlátozott.

Tanulmányunkban a globális és a virtuális optimális hematokritok közötti kapcsolatot vizsgáltuk.

#### ***Betegek és módszerek***

Retrospektív vizsgálatunkban 122 akut iszkémiás koronária szindrómán átesett beteg adatait használtuk fel (férfi 57%, átlag életkor:  $50 \pm 12$  év). A betegeknél hemoreológiai vizsgálatok történtek a kórházba kerülés napján, 2 és 6 nappal később, valamint a 6 és 12 hónapos kontroll vizsgálat kapcsán. Ennek során meghatároztuk a hematokritot, a plazma és teljes vér viszkozitást. A  $H_{tk_{opt,v}}$  számítása a korábban leírt képlettel történt. A  $H_{tk_{opt,g}}$  objektív mérésére nem volt lehetőségünk. Azon feltételezés alapján, hogy a szervezet homeosztázisa egyensúlyi állapotban optimális viszonyt igyekszik fenntartani, – a megközelítés korlátozott érvényességének elismerése mellett – a globális optimális hematokritot az empirikus hematokritnak feleltettük meg.

#### ***Eredmények és diszkusszió***

Megvizsgáltuk a  $H_{tk_{opt,g}}$  és a különböző sebességgrádienseken számított  $H_{tk_{opt,v}}$ -k közötti korrelációt. A magas sebességgrádiensekhez tartozó korrelációk erősebbnek adódtak. A keringési rendszert számos különböző sebességgrádienssel jellemezhető érszakasz alkotja. Ezekben ugyanannak a vérnek kell folynia, habár a  $H_{tk_{opt,v}}$ -uk eltérő lenne. A  $H_{tk_{opt,g}}$  ezek kompromisszumaként jön létre. Feltehetőleg ebben azon érszakaszok súlya a nagyobb, melyek hemodinamikailag is nagyobb jelentőséggel bírnak, azaz a legnagyobb rezisztenciát jelentő arterioláké és kapillárisoké. Az említett érszakaszokon a sebességgrádiens a párszáz-párezer  $1/s$  tartományba tehető. A legerősebb korrelációkat éppen itt találtuk.

A hospitális időszakra vonatkozó korrelációk gyengébbnek adódtak. Az akut iszkémiás koronária szindróma ellátása során a betegek infúziókat kaptak, mely hemodilúciót okozott. Az empirikus hematokrit és a homeosztázis által fenntartani kívánt  $H_{tk_{opt,g}}$  közötti kapcsolat gyengül, így gyengülnek azon korrelációk is, melyek a két paraméter egyenlőségét használják ki. Az utánkövetéses időszakban (6 és 12 hónapos értékek) már nem történik zavaró külső behatás, a korrelációk erősebbek.

Bár a hospitális időszakban az empirikus hematokrit csökkent, a  $H_{tk_{opt,v}}$ -k lényegében változatlanok maradtak. A  $H_{tk_{opt,v}}$ -k változatlansága nem feltétlenül jelenti a  $H_{tk_{opt,g}}$  változatlanságát. A hemodinamikai viszonyok, a sebességgrádiensek változása esetén a  $H_{tk_{opt,v}}$ -k átsúlyozódnak, a kompromisszumos érték áthelyeződhet. AICS-ben a perctérfogat

csökkenése miatt keringési redisztribúció történik. Az „optimális” állapot eléréséhez a hemoreológiai viszonyok változásának is elsősorban az alacsonyabb elenállású centrális régiók perfúzióját kell szolgálnia. A betegek immobilizációjával szintén csökken a véráramlási sebessége és az átlagos sebességgrádiens is. Mivel alacsonyabb sebességgrádiensekhez alacsonyabb  $H_{tk_{opt,v}}$  tartozik (a vérviszkozitás a sebességgrádiens csökkenésével nő, a  $H_{tk_{opt,v}}$  képlet nevezőjében szereplő  $\ln(VV/PV)$  kifejezés értéke nő, így a  $H_{tk_{opt,v}}$  csökken) így a  $H_{tk_{opt,g}}$  valószínűleg inkább csökken.

Régóta ismert, hogy a férfiak hematokritja magasabb, mint a nőké, melynek hátterében elsősorban a nők rendszeres, menstruációs vérvesztését feltételezzük. A  $H_{tk_{opt,v}}$ -k tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget. Elképzelhető, hogy a két nem között a  $H_{tk_{opt,g}}$  tekintetében sincs különbség, és az észlelt eltérés evolúciós maradvány (az agresszívebb, és így a precivilizált korokban sérülésre hajlamosabb hímeknél a szervezet nagyobb vértartalékot képez). Másfelől lehet, hogy a férfiak  $H_{tk_{opt,g}}$ -ja azonos  $H_{tk_{opt,v}}$ -k mellett is magasabb a nőkénél, ha a férfiakban magasabb sebességgrádiensek dominálnak.

A betegek plazmaviszkozitása és a  $H_{tk_{opt,v}}$ -k között szignifikáns pozitív korrelációt találtunk. A  $H_{tk_{opt,v}}=H_{tk}/\ln(VV/PV)$  képlet szerint ha  $PV$  nő,  $H_{tk_{opt,v}}$  csökken, így az említett korreláció szinte matematikai szükségszerűség, és nem jelenti, hogy az összefüggés biológiailag is helytálló. A  $H_{tk_{opt,v}}$  és az empirikus hematokrit közti pozitív korrelációra is tekinthetnénk hasonlóképp. Jelen kísérleti beállítás nem alkalmas az optimális hematokrit adekvát mérésére, és így a fenti korrelációk validálására. Ha azonban igaz az, hogy a magasabb plazmaviszkozitás mellett magasabb a  $H_{tk_{opt,v}}$ , és a magasabb  $H_{tk_{opt,v}}$  miatt magasabb lesz a  $H_{tk_{opt,g}}$  és az empirikus hematokrit, akkor azt várjuk, hogy magasabb plazmaviszkozitás magasabb empirikus hematokritot eredményez. Vizsgálatunkban a két paraméter között valóban szignifikáns korrelációt találtunk, márpedig a plazmaviszkozitás és empirikus hematokrit valódi mért, és nem származtatott paraméterek; a jelenség tőlünk függetlenül létezik. A vázolt teória magyarázatul szolgálhat erre, ám még így sem szükségszerűen helytálló. Lehet, hogy a plazmaviszkozitás és az empirikus hematokrit együttes változása mögött valamely közös ok (pl. dohányzás) áll, és a  $H_{tk_{opt,v}}$  logikai kapcsoló szerepére nincs szükség. A teória megerősítéséhez vagy megcáfolásához újabb tanulmányokra van szükség.



## II. MÓDSZERTANI MEGFONTOLÁSOK A HEMOREOLÓGIAI PARAMÉTEREK MÉRÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE KAPCSÁN

### 4. A minta előkészítés hatása a hemoreológiai paraméterekre

#### Bevezetés

A vérvétel és a minták feldolgozása gyakran eltérő helyen történik. A szállítás és a limitált feldolgozó kapacitás miatt a tényleges mérésig hosszabb-rövidebb idő telik el, ami alatt a vért eredeti környezetéből kiszakítva tárolják. Az afiziológiás körülmények között az alkotóelemek tulajdonságai megváltozhatnak, az ezeket leíró paraméterek hamis képet mutathatnak az eredeti állapotról. Tanulmányunkban választ kerestünk arra, hogy milyen időtartamú tárolás esetén hagyható még figyelmen kívül ez a zavaró tényező a hemoreológiai mérések kapcsán.

Bizonyos mérésekhez a mintákat afiziológiás előkészítéssel visszük keresztül. Gyakran szükséges centrifugálni, mely során a sejtekre percek alatt akár több ezer g-nek megfelelő gyorsulás hat. Vörösvérsejt filterabilitás vagy aggregabilitás (standard kísérleti elrendezés mellett mért aggregáció) méréséhez a sejteket többszöri mosás után a plazmától jelentősen eltérő összetételű közegben szuszpendáljuk. Tanulmányunkban az említett előkészítések hatását is vizsgáltuk.

#### A vörösvérsejt deformabilitás változásai

A vörösvérsejt deformabilitását LORCA (Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer, Mechatronics BV, Hollandia) berendezéssel mértük, és a 0,30-30 Pa nyírófeszültségen mért elongációs indexszel (EI) jellemeztük (a módszer a következő fejezetben kerül részletes leírásra).

Egyik nyírófeszültségen mért elongációs index sem változott szignifikánsan 1 illetve 2 óra szobahőmérsékleten való tárolás során. Három óra elteltével az 1,69 Pa és magasabb nyírófeszültségek mellett mért EI azonban már szignifikáns csökkenést mutatott. Hat óra elteltével a fenti eltérés még markánsabb lett, és már 0,95 Pa mellett is szignifikáns csökkenés látszott. Egy nap 4°C-on való tárolás nem okozott szignifikáns eltérést. Két nap után a következő látszott: az EI alacsony nyírófeszültségeken (9,49 Pa alatt) tendenciózusan növekedett, míg magas nyírófeszültségeken (9,49 Pa felett) csökkent. Az egy hetes tárolás során ez a tendencia szignifikánsná erősödött.

A vörösvérsejt deformabilitását alapvetően három tényező határozza meg. A többi tényező változatlansága esetén a *belső viszkozitás* növekedése illetve a *membrán merevségének* fokozódása a deformabilitás csökkenéséhez, míg a *felület-térfogat arány* növekedése a deformabilitás javulásához vezet. A tárolás során ez a három tényező nem izoláltan, hanem egyszerre, eltérő dinamikával változik. Az említett tényezők jelentősége valószínűleg eltérő különböző nyírófeszültségek esetén.

Irodalmi adatok a változás hátterében számos mechanizmust vetnek fel:

- Energetikai kimerülés, ion és vízvesztés (belső viszkozitás növekedése mellett a felület-térfogat arány növekedése)

- Felszaporodó tejsav miatt a rigiditás növekedése
- Membránösszetétel változása: szialsav eltávolítása, foszfolipidek átrendeződése és fázisszeparációja, membrán és citoszkéletális proteinek degradációja, echinocyták képződés, vezikulák lehasadása
- Immunogenitás változása és immunkárosodás

A centrifugálás okozta mechanikus stressz hatásának vizsgálatához a frakciókat 10 percig 2500 g mellett centrifugáltuk, ezután ismét felkevertük őket. Háromszori centrifugálás sem okozott kimutatható deformabilitás változást.

A pufferes mosás vizsgálatára a mintákat 2500 g-n 10 percig centrifugáltuk, a felülúszót és a határreteget eltávolítottuk, a vörösvérsejteket foszfát pufferben (PBS) reszuszpendáltuk. A mosást három alkalommal végeztük el. Az előkészítés hatására a 0,95 Pa-nál nagyobb nyírófeszültségeknél mért EI szignifikánsan csökkent.

Itt a fentiek alapján a centrifugálás és az eltelt rövid idő hatása elhanyagolható. Az sem okoz eltérést, ha a mosópuffer nem tökéletesen izoozmotikus a sejtekkel, mivel a végső ozmotikus egyensúly a deformabilitásmérés során használt szuszpendáló közegben alakul ki. Sejtünk szerint a mosással eltávolítjuk a plazmafehérjéket és a sejtmembránhoz lazán kötődő proteinek egy részét is, és ez a deformálhatóság csökkenését okozza. Eredményeinknek ellentmond az a tanulmány, amely a tárolt vér transzfúzió előtti átmosásakor további deformabilitás változást nem talált.

### ***A vörösvérsejt aggregáció változásai***

A méréseket két műszerrel végeztük párhuzamosan:

A LORCA a vérmintát Couette-áramlásban 500 1/s sebességgradiensben diszaggregálja, majd a nyírás hirtelen megszűnik. A mintára bocsátott és onnan visszaverődő vörös lézervény intenzitását regisztráljuk, ez a vörösvérsejt aggregációjával párhuzamosan csökken. A 2 perc alatt elért intenzitáscsökkenésre, mint maximálisan elérhetőre tekintünk. Az aggregációs index (AI) a görbe első 10 másodperce alatti terület és ezen maximálisan elérhető intenzitáscsökkenés aránya. Küszöbgradiensnek azt a legkisebb sebességgradienst nevezzük, amely képes a diszaggregáció fenntartására.

A Myrenne MA-1 aggregométer (Myrenne GmbH, Németország) a vérmintát kónuszlemez rendszerrel 600 1/s sebességgradiensben diszaggregálja. M üzemmódban a nyírás hirtelen megszűnik, M1 üzemmódban 3 1/s-os lassú nyírás marad fenn. A berendezés a mintán át bocsátott infravörös fény intenzitását méri. Az aggregációs indexek a görbe első 10 másodperce alatti területet korrekció nélkül mutatják.

A LORCA esetén sem az aggregációs index, sem a küszöbgradiens nem mutatott szignifikáns változást 2, 4 vagy 6 óra szobahőmérsékleten való tárolás során. 4°C-on tárolva az 1, 2 és 7 nap után is az AI kiszámíthatatlan ingadozása látszott: bár az átlagos változás nem volt szignifikáns, a variancia jelentősen megnőtt. A küszöbgradiens ezzel szemben szignifikánsan csökkent. A Myrenne esetén mind az M, mind az M1 index jelentősen csökkent már 2 óra szobahőmérsékleten való tárolás után is, ez a későbbiekben még szembetűnőbbé vált.

A fibrinogén degradációja, valamint a stomatocyták képződés az aggregáció csökkenti. Hosszabb távú tárolás során a sejt felszíni negativitás csökkenése és az echinocyták képződés az aggregációt fokozza. Patkányoknál az aggregáció kezdeti csökkenését az aggregáció későbbi

fokozódása követte. A nagyobb testű élőlényeknél ez a folyamat valószínűleg lassabban zajlik le, és kísérletünkben embernél ennek csak az elejét észleltük.

A LORCA és Myrenne közti korreláció igen gyengének adódott. A különbség okaként a következőket feltételezzük: 1, LORCA AI-t a korrekció miatt valószínűleg kevésbé befolyásolják a minta kezdeti optikai sajátosságai (pl. változás a fényelnyelés spektrumában, a szabad hemoglobin, vagy a minta hematokritja). 2, a LORCA 37°C-on mér, míg a Myrenne szobahőmérsékleten, márpedig a hőmérséklet befolyásolja az aggregációt és a deformabilitást is. 3, a LORCA a visszavert, míg a Myrenne az áteresztett fény intenzitását rögzíti.

Kimutatták, hogy a tárolás miatti változások gyorsabban jönnek létre, ha a vörösvérsejteket hagyják kiülepedni, mintha rendszeresen felkeverik a plazmában; a jelenség okaként a gyorsabb lokális glükóz fogyasztás és metabolitfelszaporodás feltételezik a relatíve kisebb kompartmentben. Ennek vizsgálatára a 2, 4 és 6 óráig szobahőmérsékleten állva tárolt frakciókkal párhuzamosan másokat folyamatos keverés mellett inkubáltunk. LORCA AI esetén nem találtunk eltérést, míg a Myrenne indexek tendenciózusan tovább csökkentek az álló frakciókhoz képest. A forgatás miatt a vörösvérsejtek többet érintkeztek a cső falával, és ez valószínűleg markánsabb hatást jelentett, mint amit a megváltozott metabolikus környezet jelentett volna. Kísérletünkben polipropilén csöveket használtunk, más anyag, pl. üveg esetleg más eredményre vezethetett volna.

### ***A viszkozitás változásai***

A plazma és teljes vér viszkozitás méréséhez Hevimet 40 (Hemorex Kft, Budapest) kapilláris viszkozimétert használtunk. A mérések 37 °C-on történtek. A frakciók hematokrit értékét kapilláris hematokrit centrifugával határoztuk meg (Hereaus Instruments, Németország).

Sem az alacsony (10 1/s), sem a közepes (90 1/s), sem a magas (240 1/s) sebességgradiensén mért vérviszkozitás-értékek nem változtak szignifikánsan 1, 2, 3 ill. 6 óra szobahőmérsékleten való tárolás során. A Casson-viszkozitás és a küszöbfeszültség, valamint a plazmaviszkozitás esetén sem mutatkozott szignifikáns eltérés. A változás konfidencia intervalluma a 10 1/s mellett mért vérviszkozitás és a Casson-viszkozitás esetén is mind abszolút, mind relatív értelemben igen széles volt, és hasonlót tapasztaltunk a küszöbfeszültségnél is. A 90 és 240 1/s melletti vérviszkozitás, valamint a plazmaviszkozitás változása szűk konfidencia intervallummal rendelkezett, az eltérések a berendezés pontatlanságával is magyarázhatóak, melyet a gyártó 3%-nak adott meg. A 4°C-on való tárolásnál a 90 és 240 1/s melletti vérviszkozitás már 24 óra elteltével szignifikánsan magasabbnak mutatkozott. A 10 1/s melletti vérviszkozitásnál ez a tendencia csak 48 óra elteltével vált szignifikánssá, valószínűleg a paraméter jelentős szórása miatt. A plazmaviszkozitás 24 óra elteltével már jelentősen emelkedett. A Casson viszkozitás és a küszöbfeszültség ugyan nem változott szignifikánsan, de az igen széles konfidencia intervallum miatt ez a jelenség korlátozottan értékelendő.

A teljes vér viszkozitás legfontosabb meghatározói: a plazmaviszkozitás, a hematokrit, a vörösvérsejt aggregáció és deformabilitás. A hematokrit a teljes kísérlet során változatlan maradt. A plazmaviszkozitást főként a szolubilis makromolekulák, különösképp a fibrinogén határozzák meg. Ezen molekulák degradációjával inkább a plazmaviszkozitás csökkenését várnánk, nem a tapasztalt emelkedést, de elképzelhető olyan konformációváltozás is, mely a viszkozitást emeli. Mivel a plazmát nem izoláltan tároltuk, elképzelhető, hogy a vörösvérsejtek felszínéről vagy belsejéből kiszabadulhattak a viszkozitást növelő fehérjék. Alacsony sebességgradiensén a vörösvérsejt aggregáció igen számottevő, ez felelős a vér

viszkózitásának jelentős részéért. Az alacsony sebességgrádiensen mért megnövekedett viszkózitás az aggregáció fokozódását sugallná. Ez egyezik más szerzők tapasztalataival, de ellentmond az optikai módszerrel mért eredményeinknek. A 90 1/s mellett mért teljes vér viszkózitás érték a mért pontokból interpolációval számítható, míg a 10 és 240 1/s-os értékek kevésbé pontos, extrapolált értékek. A Casson viszkózitás és a küszöbfeszültség függvényillesztéssel kapott, származtatott paraméterek. Ahogy várható, ezen paraméterek változása jóval szélesebb konfidencia intervallumot mutatott.

### **Összefoglalás**

A teljes vér és plazma viszkózitás 6 órás szobahőmérsékleten való tárolás után is stabilnak tekinthető. Az 1 napos 4°C-on való tárolás kerülendő. A vörösvérsejt deformabilitás 2 órás szobahőmérsékleten, vagy 1 napos 4°C-on való tárolás mellett nem változik szignifikánsan. Ennél hosszabb tárolás az eredményeket már befolyásolhatja. A centrifugálás a deformabilitást nem befolyásolja, a pufferes mosás viszont jelentősen megváltoztatja az eredményeket. A LORCA aggregációs index és küszöggrádiens 6 órás szobahőmérsékleten való tárolás mellett is stabil, de 1 napos 4°C-os tárolás után már megbízhatatlan. A Myrenne M és M1 index már 2 óra szobahőmérsékleten való tárolás után is megváltozik.

## **5. Módszertani megfontolások ektacytometria kapcsán: adatredukció**

### **Bevezetés és módszerek**

A deformálhatóság a vörösvérsejtek fontos jellemzője, mely lehetővé teszi, hogy a sejtek saját átmérőjükönél kisebb kapillárisokon is keresztül tudjanak haladni. A deformabilitás mérésének egyik módszere az ektacytometria, mely során a sejteket kontrollált nyírófeszültségeknek teszik ki, és az alakváltozás mértékét számszerűsítik. Laboratóriumunkban LORCA készüléket használunk. A berendezésben egy álló belső és egy forgó külső cylinder található, melyek közt Couette-áramlás, kvázi-homogén sebességgrádiens jön létre. A vizsgálandó vörösvérsejtekből egy ismert viszkózitású vivőoldattal igen híg szuszpenziót készítünk (25 µl vér/5 ml oldat, kb. 0,2% hematokrit). Ha a külső viszkózitás a sejt belső viszkózitásánál nagyobb, a vörösvérsejtek homogén nyírómezőben ellipszoiddá deformálódnak, a membrán „lánckerékszerű mozgással” örvénylik a citoplazma körül, és a sejt hossz tengelye szöget zár be a mező tengelyével. A deformálódott sejtek lézersugár előtt haladnak el, mely diffrakciót szenved rajtuk. A diffrakciós kép izointenzív pontjai ellipszist alkotnak. A deformációt az elongációs indexszel (EI) számszerűsítjük, mely az említett ellipszis hosszabb (A) és rövidebb (B) tengelyeivel számítható  $(A-B)/(A+B)$  képlet szerint. A cylinder fordulatszámának változtatásával a nyírófeszültség (SS – shear stress) széles tartománya mellett határozható meg az elongációs index; az SS-EI pontok halmazát nevezzük ektacytogramnak.

Egy ilyen halmazt nehéz kezelni, értelmezni és a görbéket egymással statisztikailag összehasonlítani. Az SS és EI között az ektacytogramon determinisztikus kapcsolat látszik. Hasznos lenne, ha az összefüggést kevés és lehetőleg szemléletes paraméterrel információvesztés nélkül lehetne leírni, és segítségükkel az eredeti adatokat reprodukálni. Tanulmányunkban két, az irodalomban használt adatredukciós módszer alkalmazhatóságát és korlátait vizsgáltuk.

Nyers mérési adatként egy reprezentatív ektacytogramot adó mintát használtunk. Az elongációs indexet a jó felbontás érdekében 100 nyírófeszültség mellett határoztuk meg 0,30 és 30 Pa között logaritmikus léptékben. Az adathalmazra Wolfram Mathematica 6.0 programcsomag segítségével illesztettük a később részletezett regressziós görbéket. Az algoritmus megkeresi a paraméterek azon értékeit, melyek mellett az adatpontok és a regressziós görbe közti reziduálisok négyzetösszege minimális. Az illesztés erősségét az  $r^2$  értékkel jellemeztük, mely az adathalmaz teljes varianciájából a regressziós görbe által megmagyarázott arány. A szisztematikus eltérések megítéléséhez megvizsgáltuk a reziduálisok elrendeződését a nyírófeszültségek függvényében.

### ***A Lineweaver-Burke illesztés***

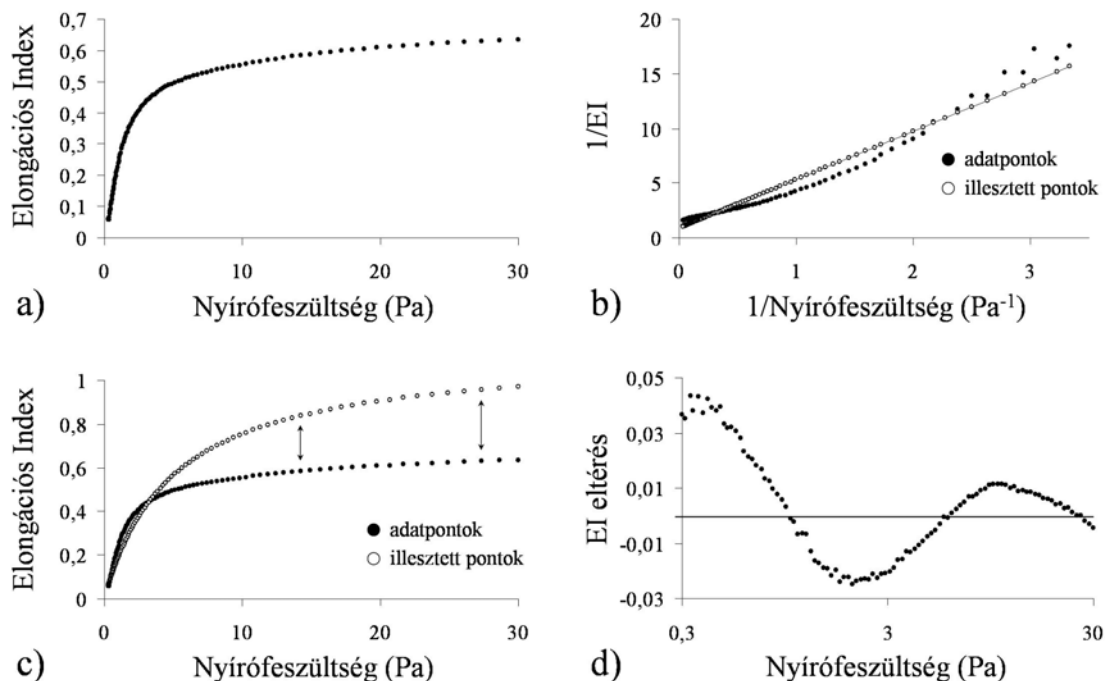
Ha a nyírófeszültség és az elongációs index is lineáris skálázású, a konkáv ektacytogram az első rendű enzimkinetika diagramjára emlékeztet, mely a Lineweaver-Burke reciprok transzformációval oldható meg. A Lineweaver-Burke módszernél analóg módon az  $1/EI$ -t az  $1/SS$  függvényében ábrázoljuk, és a kapcsolatot lineáris regresszióval írjuk le (1/a ábra). Az  $EI_{max}$  a végtelen nyírófeszültségnél létrejövő deformációt, az  $SS_{1/2}$  az  $EI_{max}/2$  deformációt létrehozó nyírófeszültséget jelenti.

$$\frac{1}{EI} = \frac{SS_{1/2}}{EI_{max}} \frac{1}{SS} + \frac{1}{EI_{max}} \qquad EI = EI_{max} \frac{SS}{SS + SS_{1/2}}$$

A regresszió során alkalmazott legkisebb négyzetek módszere a pontok és az egyenes közötti abszolút eltérést minimalizálja. Ugyanazon abszolút különbség, ami magas  $1/SS$  magas  $1/EI$  értékeinél kis relatív eltérést jelent, az alacsony  $1/SS$  alacsony  $1/EI$  értékeinél óriási relatív eltérést okozhat; ám erre a regresszió érzéketlen. Az alacsony ( $1/SS$ ;  $1/EI$ ) pontok jelentőségét a módszer „elhanyagolja”. Minél közelebb esik az alacsony nyírófeszültségekhez tartozó  $EI$  a nullához, annál magasabb az  $1/EI$ , ami „félrehúzza” a regressziós egyenest. Mindezek eredményeként az  $EI_{max}$  általában jelentősen felülbecsült, akár az 1-et is meghaladhatja (1/b-c ábra), ami pedig a paraméter értékének teoretikus maximuma. Az illeszkedés javítható, ha a magas  $1/EI$ -vel járó alacsony nyírófeszültségeket (pl. 1 Pa alatt) kizárjuk az elemzésből. Ez mindenképp információvesztést jelent, és értelemszerűen ezen pontok a regressziós paraméterekkel nem is reprodukálhatóak megbízhatóan.

A módszer nem alkalmazható 0 vagy negatív  $EI$  értékeket tartalmazó adathalmazok kezelésére (negatív  $EI$  a sejtek reziduális orientációjából származó, általában artefakt jelenség).

A Lineweaver-Burke összefüggés nem-reciprociális formájával (lásd fenn) is elvégezhető a függvényillesztés. Ebben az esetben a magas ( $SS$ ;  $EI$ ) pontok jobb egyezést adnak, az  $EI_{max}$  megítélése jóval pontosabb. Ekkor azonban hasonló okok miatt sajnos az alacsony ( $SS$ ,  $EI$ ) pontok lesznek „elhanyagolva”. A reziduálisok vizsgálata a regressziós görbe és az adatpontok közötti szisztematikus eltérést mutatja (1/d ábra). Alacsony nyírófeszültségeknél az illesztett függvény az  $EI$ -t felülbecsüli, amely az  $EI$  értékek alacsony volta miatt arányaiban igen jelentős lehet. A magas nyírófeszültségeknél a reziduálisok negatívba hajlanak, így az  $EI_{max}$  alulbecsült lesz. Nulla vagy negatív  $EI$ -k kezelésére ez a módszer sem alkalmas. A nem-reciprociális függvényillesztés az eredeti Lineweaver-Burke módszernél jobban közelíti az  $EI_{max}$ -ot, de az alacsony nyírófeszültségek modellezésében nem jobb. Ezenkívül a nem-lineáris függvény illesztése bonyolultabb feladat.



**1. ábra:** A Lineweaver-Burke illesztés. **(a)** Lineáris-lineáris skálázású, konkáv ektacytogram. **(b)** Reciprok transzformáció utáni lineáris regressziós egyenes illesztése. **(c)** A visszatranszformált regressziós görbe az  $EI_{max}$ -ot jelentősen felülbecsüli. **(d)** A non-reciprocális függvény illesztése után maradó reziduálisok alakulása.

### A Streekstra-Bronkhorst illesztés

Ha az ektacytogramon az elongációs indexet lineárisan, míg a nyírófeszültséget logaritmikusan skálázzuk, egy S alakú görbét kapunk (2/a ábra). Streekstra és Bronkhorst ezt egy  $x^m/(x^m+1)$  típusú függvénnyel közelítette. Az alapfüggvényt konstansokkal bővítve lehet jól illeszkedő helyzetbe nyújtani és tolni.

$$EI = (EI_{max} - EI_{min}) \frac{\left(\frac{SS}{SS_{1/2}}\right)^m}{\left(\frac{SS}{SS_{1/2}}\right)^m + 1} + EI_{min}$$

Az  $EI_{max}$  és az  $EI_{min}$  a görbe felső és alsó aszimptotái, az  $EI_{max}$  a végtelen, az  $EI_{min}$  a zérus nyírófeszültségnél kapott deformációt jelöli. Az  $SS_{1/2}$  az  $(EI_{min}+EI_{max})/2$  közepes deformációhoz szükséges nyírófeszültséget jelöli, az  $m$  pedig a görbe meredekségével kapcsolatos paraméter. A Streekstra-Bronkhorst módszer képes a negatív EI értékek kezelésére is.

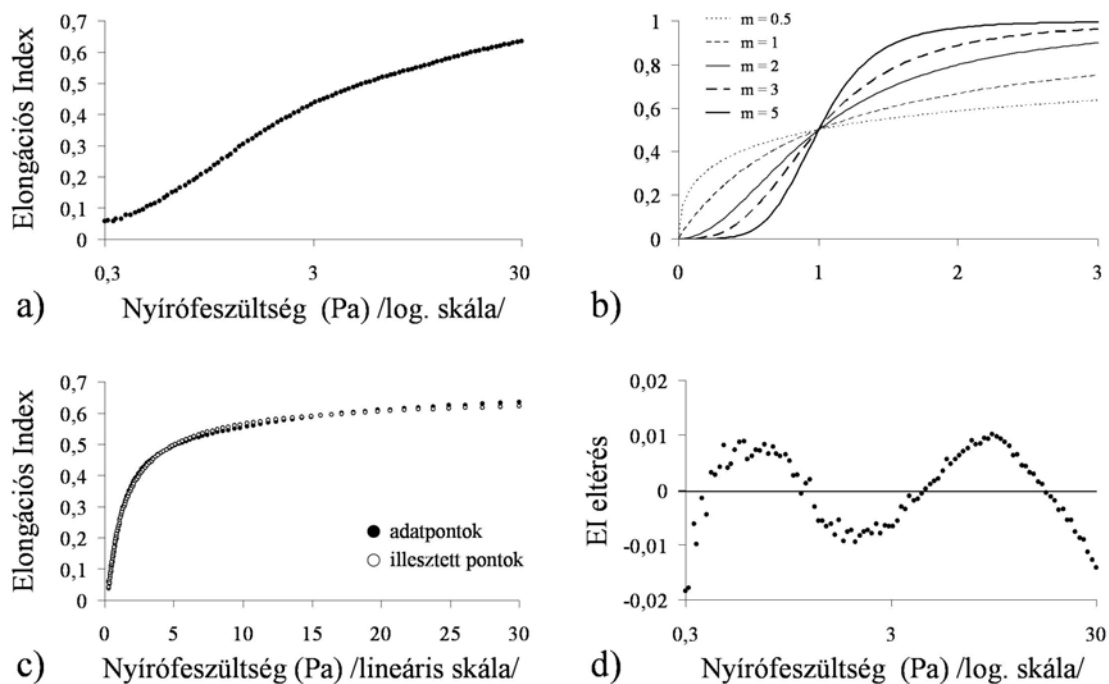
A képlet elvi felépítése hibás. Mivel a  $\log SS$ -EI grafikon az S-alakú, a formulában  $\log SS$  és  $\log SS_{1/2}$  kifejezést kellett volna alkalmazni az  $SS$  és  $SS_{1/2}$  helyett. A jelen formula a lineáris-lineáris skálázású konkáv ektacytogramot írja le. Az ennek ellenére erős illeszkedés oka az  $x^m/(x^m+1)$  függvény flexibilitásában rejlik, mely  $m \leq 1$  esetén konkáv,  $m > 1$  esetén viszont S alakú (2/b ábra). Méréseink során az ektacytogramokra illesztett görbék  $m$

paraméterei 1 alattinak adódtak, bizonyítva, hogy az illesztés valójában a konkáv görbékhez történt (2/c ábra). Az  $m$  a fentiek tükrében semmilyen szemléletes jelentéssel nem bír, az illeszkedéshez szükséges kényszerparaméter.

A reziduálisok vizsgálata a mért pontok és a regressziós görbe közt szisztematikus eltérést mutat: mind az  $EI_{\max}$ , mind az  $EI_{\min}$  érték alulbecsült (2/d ábra).

A logaritmusok hozzátételével módosítottuk a Streekstra-Bronkhorst képletet, de ennek illesztése további nehézségeket rejt (1 Pa alatti SS értékeknél a függvény értelmezhetetlen, ennek áthidalása átmeneti átskálázással lehetséges). A módosított függvénnyel az eredetihez hasonló erősségű illeszkedést lehet elérni, mindazonáltal itt is mutatkoznak szisztematikus hibák. Mivel a módszerünk érdemben nem ad jobb eredményt, mint a Streekstra-Bronkhorst illesztés, viszont körülményesebb, mi is az eredeti formula használatát javasoljuk.

Az illesztés paraméterei a vörösvérsejt intrinsic tulajdonságait hivatottak jellemezni, így elviekben függetlennek kell lenniük attól, hogy a mérést milyen nyírófeszültség tartományban végezzük. Ennek ellenőrzésére az eredeti adathalmazról levágtuk az alacsony illetve a magas nyírófeszültségekhez tartozó tartományokat, és így is elvégeztük az illesztést. A paraméterek jelentős mértékben változnak. A paraméterek helyes megítéléséhez fontos, hogy a görbe nevezetes szakaszai meglegyenek.



**2. ábra:** A Streekstra-Bronkhorst illesztés. (a) A log-lineáris skálázású, S-alakú ektacitogram. (b) A flexibilis  $y \rightarrow x^m / (x^m + 1)$  függvény az  $m$  különböző értékeinél. (c) A regressziós görbe a lineáris-lineáris ektacytogramra illesztve. (d) Az illesztés után maradó reziduálisok alakulása.

### ***Általános megjegyzések***

Az  $r^2$  értékkel a korrelációs görbe illeszkedésének szorosságát jellemezzük, amely mindkét módszernél kiemelkedően magas volt. Ez annak is köszönhető, hogy az ektacytogram precíz, zajmentes görbe, a sejthető determinisztikus alapvonalától való sztochasztikus eltérése minimális. Pont ez ad lehetőséget arra, hogy a kifejezetten kicsi szisztematikus eltéréseket is felfedezzük. A magas  $r^2$  azért szavatol, hogy a regressziós görbe jól leírja azon mérési pontokat, amelyekre illesztették, a paraméterek segítségével ezen pontok jó közelítéssel reprodukálhatóak. Mivel sem a regressziós görbe, sem az ektacytogram nem tesz hirtelen kilengéseket, a regressziós függvénnyel a mérési tartományon belülre eső egyéb pontok is jó pontossággal képezhetőek. A magas  $r^2$  nem jelenti azt, hogy a regressziós függvény alkalmas a mérési tartományon kívül eső pontok helyes jóslására, pl. a maximális deformáció meghatározására. Erre hívja fel a figyelmet a paraméterek mérési tartománytól való függősége. A becslés pontossága valószínűleg javítható, ha a deformáció jelenségéről több információnk van, azaz a mérési tartományt kiszélesítjük. Ennek lefelé az szabhat gátat, hogy a minimális nyíróerők mellett már a Brown-mozgás is arányaiban jelentékennyé válhat, romlik a jel/zaj arány, pontatlanabb lesz a mért EI érték. A nyírófeszültség túlzott növelése esetén pedig a sejtek szenvednének irreverzibilis károsodásokat, maga a mért rendszer változna meg.

A legkisebb négyzetek módszere a reziduálisok minimalizálásánál a reziduális abszolút nagyságát veszi figyelembe. Azonos súllyal esik latba, a 0,08 és 0,10, illetve a 0,58 és 0,60 közötti eltérés. Előbbinél ez relatív értelemben 20%, utóbbinál 3,3% eltérést jelent. Vitatható azonban az is, hogy az EI esetén van-e értelme olyan kifejezéseknek, mint relatív eltérés, relatív hiba, vagy standardizált differencia, melyeket az irodalomban is gyakran használnak. A fenti fogalmak arányskálákon használatosak. Az elongációs index sokkal inkább egy alul és felül korlátos intervallumskála, amelyen azonos nagyságú léptékek biológiailag nem is azonos nagyságú változást jelentenek. Az EI-ből könnyen képezhetjük a diffrakciós ellipszis két átmérőjének arányát  $A/B=(1+EI)/(1-EI)$  szerint. A kört jelölő nulláról a 0,3-ra növekedő EI egy olyan ellipszist jelent, ahol az átmérők aránya 1,86, míg a 0,8-ról 0,9-re változó EI a 9-szeresről 19-szeresre nyúló átmérőarányt takar. Az arányok szemszögéből értelmezhetetlen egy negatív és pozitív EI összehasonlítása is.

### ***Összefoglalás***

A Lineweaver-Burke transzformáció a maximális deformáció értékét felülbecsüli, ha 1 Pa-nál kisebb nyírófeszültségeken is történik mérés. A nem-reciprociális formula bár alulbecsüli, jobban közelíti az  $EI_{max}$ -ot, viszont figyelmen kívül hagyja az alacsony nyírófeszültségeket. A Streekstra-Bronkhorst illesztés jobb hatásfokú adatredukciót biztosít. Bár a formula elméleti felépítése részben téves, a gyakorlati használhatósága nem kérdőjelezhető meg. A módszer segítségével az információ kevés paraméterrel konzerválható és reprodukálható. A paramétereknek szemléletes jelentés tulajdonítható, ám ezek pontatlanok lehetnek. A maximális és minimális deformáció kissé alulbecsült.



## 6. Módszertani megfontolások ektacytometria kapcsán: a közegviszkozitás szerepe

### Bevezetés

Az ektacytometria a vörösvérsejtek deformációjának számszerűsítésére használatos módszer. Az elongációs index a *deformáció* mértékét jellemzi. A *deformabilitás* fogalmat akkor használjuk, ha a mérést standard környezeti tényezők (hőmérséklet, közegviszkozitás, ozmolaritás, pH, stb.) mellett végezzük. Azonos minta, azaz azonos deformabilitású sejtek deformációja eltérő lehet, ha a mérés körülményei megváltoznak.

Szuszpendáló közegként polivinilpirrolidon (PVP) por foszfátpufferes oldatát használjuk. Az oldat elkészítése és a viszkozitás beállítása technikailag nehézkes, így a deformabilitásmérés standard körülményei nehezen biztosíthatók. Az irodalomban a különböző szerzők eltérő viszkozitású közeget használnak, ezért a kapott deformációk egymással korlátozottan hasonlíthatók össze. Tanulmányunkban megvizsgáltuk, hogy a közeg viszkozitásának változása hogyan befolyásolja a deformációt.

A berendezés a közeg viszkozitása alapján állítja be a cylinder fordulatszámát, hogy a kívánt nyírófeszültséget létrehozza, A közegviszkozitás helytelen megadása helytelen nyírófeszültséghez és téves elongációs indexhez vezet. Megvizsgáltuk, hogyan lehet az ilyen eredményeket retrospektív módon korrigálni.

### Minták és módszerek

Méréseinkhez 11 egészséges önkéntes heparinnal antikoagulált vérért használtuk. Öt különböző PVP oldatot készítettünk, melyek viszkozitását Oswald viskoziméterrel 13,5, 17,5, 20,9, 25,1 és 37,8 mPas-nak mértük. A méréseket a vérvételtől számított 2 órán belül végeztük. Az elongációs indexet 0,30 és 30 Pa között logaritmikus léptékben 25 nyírófeszültségen mértük.

Mindegyik mintából mindegyik közegben készítettünk szuszpenziót. Minden keveréket háromszor mértünk le anélkül, hogy közben kicseréltük volna őket. A viszkozitást egy alkalommal helyesen adtuk meg, a másik két alkalommal egy másik közeg viszkozitás értékét tápláltuk be, lehetőség szerint egy kisebb és egy nagyobb viszkozitását.

A LORCA a Couette-áramlás sebességgradiensét a  $\gamma = SS_{\text{nominális}} / \eta_{\text{nominális}}$  formula szerint állítja be, mely  $SS_{\text{valós}} = \gamma * \eta_{\text{valós}} = SS_{\text{nominális}} * \eta_{\text{valós}} / \eta_{\text{nominális}}$  nyírófeszültséget eredményez. Ha a viszkozitást helyesen adjuk meg,  $\eta_{\text{nominális}} = \eta_{\text{valós}}$ , így  $SS_{\text{valós}} = SS_{\text{nominális}}$ , ha azonban a viszkozitást tévesen adjuk meg a valódi nyírófeszültség eltérő lesz, és téves ektacytogramot kapunk. Elsőként a téves ( $SS_{\text{nominális}}$ ; EI) adatpontokat helyes ( $SS_{\text{valós}}$ ; EI) pontokká konvertáltuk, majd interpolációval kiszámoltuk a standard SS értékekhez tartozó EI-eket. A legalsó illetve legfelső nyírófeszültségek interpolációval nem számíthatóak, ezeket kihagytuk. A helyesen mért és a helytelenül mért, transzformációval korrigált pontok egyezését Bland-Altman analízissel vizsgáltuk minden nyírófeszültségen.

Ugyanazon minta különböző médiumban felvett ektacytogramjait együttesen ábrázoltuk. A különbségeket szemikvantitatíven értékeltük, és megadtuk a Streekstra-Bronkhorst paraméterek változását is.

### Eredmények és diszkusszió

A konvertált téves és a helyes adatpontok összevetése során nem találtunk szisztematikus torzítást, és a sztochasztikus hiba is a LORCA mérési pontosságán belül

maradt. A helyes és téves mérések ugyanazon viszkozitású közegben történtek, a fizikai körülmények azonosak voltak, így azonos valós nyírófeszültség mellett azonos EI várható. Az egyetlen különbséget a SS nominális értéke jelentette. Nem meglepő, hogy ezt a szigorúan matematikai jellegű hibát tökéletesen korrigálni lehetett. A módszer azonban csapdát rejt. Kísérletünkben 25 ponton mértünk a jó felbontás érdekében, így az interpoláció pontos volt. Ha kevesebb pont áll rendelkezésünkre (a LORCA alapbeállítások szerint 9 pontot vesz fel), ez pontatlanabb lehet. Emellett a szélső adatpontok nem interpolálhatók, így elvesznek.

A téves ektacytogramokat jellemző Streekstra-Bronkhorst paraméterek konverzióját is megvizsgáltuk. A hibás mérések során kapott  $EI_{max}$  és  $EI_{min}$  értékeket változatlanul hagytuk, hisz a végtelen és nulla nyírófeszültségnél mérhető értéknek azonos fizikai körülmények közt azonosnak kell lennie. A  $SS_{1/2}$  értéket a korábbiakhoz hasonlóan  $SS_{1/2} * \eta_{valós} / \eta_{nominális}$  szerint képeztük. Az  $m$  paramétert is változatlanul hagytuk. A Bland-Altman analízis szerint a konvertált hibás paraméterek eltérnek a helyes paraméterektől. Ha a nominális viszkozitás a valósnál magasabb volt, az  $EI_{max}$ -ot alul-, az  $EI_{min}$ -t és a  $SS_{1/2}$ -t pedig felülbecsültük. Ha a nominális viszkozitás a valósnál alacsonyabb volt, a torzítás fordított irányú volt. Épp ezért, ha lehetséges, inkább az eredeti adatokat és ne az adatredukciós paramétereket konvertáljuk!

Tanulmányunkban a magasabb viszkozitású közeghez tartozó ektacytogramok általában a magasabb EI értékek felé tolódtak. A Streekstra-Bronkhorst  $EI_{max}$  és  $m$  paraméterek szignifikáns pozitív, míg az  $SS_{1/2}$  szignifikáns negatív korrelációt mutattak a közegviszkozitással. Az  $EI_{min}$  is tendenciózusan nőtt a magasabb viszkozitások felé. Megkíséreltünk egy transzformációs szabályt létrehozni, mellyel akár a nyers EI, akár a Streekstra-Bronkhorst paraméterek tetszőleges viszkozitáshoz kiszámolhatók. Az EI és a viszkozitás kapcsolatát egy  $1/x$  típusú hiperbola és kapcsolódó konstansai segítségével többekévé le lehetett írni, ha a mérések átlagát vettük alapul. Ez a szabály a konstansaival egyedi esetre vetítve azonban használhatatlannak bizonyult, az egyéni eseteknél számolt konstansok pedig rendkívül eltérően viselkedtek, így a modellt elvetettük.

A különböző minták ektacytogramjai eltérően viselkedtek a különböző viszkozitású médiumokban. Néhány mintánál az ektacytogramok magas nyírófeszültségeknél széttérnek, más esetekben ez nem számottevő. Hasonlóan, az alacsony nyírófeszültségeknél is eltérő mértékben látható a görbék összetartása. Az esetek többségében a görbék párhuzamosan futnak, egyes esetekben azonban kereszteződés figyelhető meg. Ez rámutat arra, hogy különböző szerzők különböző viszkozitású közegben történt mérései nehezen vethetők össze egymással. Szintén hibára számíthatunk, ha korábbi méréseinket egy utóbb készített és eltérő viszkozitású közegben mért eredményeinkkel akarjuk összehasonlítani. A mérési módszer standardizálása ezért igen fontos. Másfelől az a tény, hogy a minták eltérően viselkednek a közegviszkozitással kapcsolatban, az ektacytometria újfajta alkalmazásának adhat teret. A Pekingi Egyetem munkacsoportjai az alacsony viszkozitású ektacytometriát már sikerrel alkalmazták a membránfluiditás vizsgálatában. A magas viszkozitású ektacytometria a vörösvérsejtek stressztűréséről adhat információt, és valószínűleg a belső viszkozitáshoz közeli átmeneti zóna alkalmazása is hasznos információt szolgáltat. Ahogy az ozmotikus gradiens ektacytometria sokat elárult a sejtek tulajdonságairól, úgy a „viszkozitás gradiens ektacytometria” is egy potenciális jövőbeli alkalmazási terület lehet.

## ***ÚJ EREDMÉNYEK***

Tanulmányaink az alábbi új eredményekre vezettek:

1. A hematokrit-vérviszkozitás arány segítséget nyújthat a kardiális morbiditás és mortalitás előrejelzésében.
2. A bemutatott módszerrel kevés mintából gyorsan és egyszerűen felrajzolható a hematokrit-vérviszkozitás profil, és számítható a maximális oxigénszállító intenzitást adó virtuális optimális hematokrit.
3. Bízató eredményeket találtunk arra vonatkozóan, hogy a virtuális optimális hematokrit segítséget nyújthat a beteg globális optimális hematokritjának felmérésében, amennyiben lehetőség van a hemodinamikai viszonyok feltérképezésére.
4. Megmutattuk, hogy a hemoreológiai mérések elvégzése előtt a minták mennyi ideig tárolhatóak az eredmény torzulása nélkül:
  - Teljes vér viszkozitás és plazma viszkozitás: 6 óra szobahőmérsékleten. A 4°C való 24 órás tárolás kerülendő.
  - Vörös versejt aggregáció: LORCA-nál 6 óra, Myrenne-nél kevesebb mint 2 óra szobahőmérsékleten. A 4°C való 24 órás tárolás kerülendő.
  - Vörösvérsejt deformabilitás: 2 óra szobahőmérsékleten, vagy 24 óra 4°C-on.
5. Rámutattunk az ektacitometriás eredmények adatredukciójára használt módszerekkel kapcsolatos néhány hibalehetőségre:
  - Az eredeti Lineweaver-Burke transzformáció használata esetén az 1 Pa alatti értékeket ne használjuk! Ezen pontokat a nem-reciprociális formula is rosszul becsüli.
  - A Streekstra-Bronkhorst illesztés is szisztematikus hibákat hordoz. A maximális és minimális deformáció kissé alulbecsült.
6. Bemutattunk egy módszert, mellyel az ektacytometria során a közegviszkozitás téves megadásából eredő hiba korrigálható.
7. Megmutattuk, hogy a deformabilitás és a közegviszkozitás közötti kapcsolat egyéneenként változó, így ezen összefüggés vizsgálata információt adhat az egyénről.

## ***KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS***

Szeretnék köszönetet mondani programvezetőmnek, Prof. Dr. Tóth Kálmánnak, témavezetőmnek Dr. Késmárky Gábornak, valamint Prof. Dr. Bogár Lajosnak, amiért segítettek a kutatás irányvonalának megtalálásában, és tudományos fejlődésemet menedzseltek. PhD-s elődeimnek, Dr. Fehér Gergelynek és Dr. Koltai Katalinnak az elinduláshoz szükséges információkért, és mert megtanítottak kritikusan szemlélni a dolgokat. Fiatal munkatársaimnak, Dr. Rábai Miklósnak és Tóth Andrásnak a mérések kivitelezésében, értékelésében és az eredmények formába öntésében nyújtott segítségével, és hogy végighallgatták a fárasztó gondolataimat is. Dr. Juricskay Istvánnak a matematikai és fizikai kérdések terén nyújtott hasznos tanácsaiért. Tapasztóné Fazekas Kornéliának és Nagy Lászlóné Erzsinek a laboratóriumi munkához nyújtott fáradhatatlan asszisztenciáért. Családomnak és barátaimnak a támogatásért és a bátorításért, hogy ez a dolgozat megszülessen.

## **RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

PV	Plazmaviszkozitás
VV	Teljes vér viszkozitás
Htk	Hematokrit
Htk <sub>opt,v</sub>	Virtuális optimális hematokrit
Htk <sub>opt,g</sub>	Globális optimális hematokrit
Htk/VV	Hematokrit-vérviszkozitás arány
EI	Elongációs index
SS	Nyírófeszültség
PVP	Polivinilpirrolidon
AI	Aggregációs index
$\eta$	Viszkozitás
$\gamma$	Nyírási sebességgrádiens

## **A SZERZŐ KÖZLEMÉNYEI**

### ***Teljes közlemények***

BOGAR L, JURICKAY I, KESMARKY G, KENYERES P, TOTH K. Erythrocyte transport efficacy of human blood: a rheological point of view. *Eur J Clin Invest* 2005;35:687-90.

Impakt faktor: 2,684

BOGAR L, JURICKAY I, KESMARKY G, FEHER G, KENYERES P, TOTH K. Gender differences in hemorheological parameters of coronary artery disease patients. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006;35:99-103.

Impakt faktor: 1,242

BOGAR L, MOLNAR Z, TARSOLY P, KENYERES P, MARTON S. Serum procalcitonin level and leukocyte antisedimentation rate as early predictors of respiratory dysfunction after oesophageal tumour resection. *Crit Care* 2006;10:R110.

Impakt faktor: 4,55

FEHER G, KOLTAI K, PAPP E, ALKONYI B, SOLYOM A, KENYERES P, KESMARKY G, CZOPF L, TOTH K. Aspirin resistance: possible roles of cardiovascular risk factors, previous disease history, concomitant medications and haemorrheological variables. *Drugs Aging* 2006;23:559-67.

Impakt faktor: 2,2

BOGAR L, MOLNAR Z, KENYERES P, TARSOLY P. Sedimentation characteristics of leucocytes can predict bacteraemia in critical care patients. *J Clin Pathol* 2006;59:523-5.

Impakt faktor: 2,245

KENYERES P, JURICKAY I, TARSOLY P, KÉSMÁRKY G, MÜHL D, TÓTH K, BOGÁR L. Az alacsony hematokrit/viszkozitás arány, mint a koszorúérbetegségek halálózási rizikótényezője. *Hematol Transzfúziológia* 2006;39:174-8.

KENYERES P, JURICKAY I, TARSOLY P, KESMARKY G, MUHL D, TOTH K, BOGAR L. Low hematocrit per blood viscosity ratio as a mortality risk factor in coronary heart disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008;38:51-6.

Impakt faktor: 1,242

KOLTAI K, FEHER G, KENYERES P, LENART I, ALEXY T, HORVATH B, MARTON ZS, KESMARKY G, TOTH K. Relation of platelet aggregation and fibrinogen levels to advancing age in aspirin- and thienopyridine-treated patients. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008;40:295-302.

Impakt faktor: 1,242

KESMARKY G, KENYERES P, RABAI M, TOTH K. Plasma viscosity: a forgotten variable. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008;39:243-6.

Impakt faktor: 1,242

HORVATH B, SZAPARY L, DEBRECENI L, FEHER G, KENYERES P, FULOP A, BATTYANI I, TOTH K. Effect of Sclerovit on endothelial dysfunction, hemorheological parameters, platelet aggregation, plasma concentration of homocysteine and progression of atherosclerosis in patients with vascular diseases. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009;42:19-28.

Impakt faktor: 0,977

NEMETH N, BASKURT O, MEISELMAN HJ, KISS F, UYUKLU M, HEVER T, SAJTOS, E, KENYERES P, TOTH K, FURKA I, MIKO I. Storage of laboratory animal blood samples causes hemorheological alterations: Inter-species differences and the effects of duration and temperature. *Korea-Australia Rheol J* 2009;21:127-33.

Impakt faktor: 0,717

RÁBAI M, TÓTH A, KENYERES P, MÁRK L, MÁRTON ZS, JURICKSKAY I, SÜMEGI B, TÓTH K. Vörösbor és alkoholmentes vörösborkivonat kedvező in vitro haemorheológiai hatásai. *Érbetegségek* 2009;2:45-52.

BÓDIS B, TSCHÜRTZ N, MAUER ZS, KESZTHELYI ZS, NAGY ZS, KENYERES P, MEZŐSI E, BAJNOK L. Az éhomi vércukorszint prediktív értéke a szénhidrátanyagcsere-zavarok előfordulása szempontjából. *Diab Hung* 2010;2:151-8.

RABAI M, TOTH A, KENYERES P, MARK L, MARTON ZS, JURICKSKAY I, TOTH K, CZOPF L. In vitro hemorheological effects of red wine and alcohol free red wine extract. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010;44:227-36.

Impakt faktor: 0,977

KENYERES P, RABAI M, TOTH A, NEMETH N, MIKO I, KESMARKY G, JURICKSKAY I, ALEXY T, TOTH K. The impact of sample preparation and storage of human blood on measured hemorheological parameters. *KA Rheol J*; under publication.

Impakt faktor: 0,717

KENYERES P, RABAI M, TOTH A, KESMARKY G, MARTON ZS, TOTH K. Methods to simplify, correct and compare ektacytometric results. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010; accepted for publication.

Impakt faktor: 0,977

Kumulatív impakt faktor: 20,035.

### ***Előadáskivonatok, poszterek***

BOGAR L, KESMARKY G, KENYERES P, SZELIG L, FEHER G, TOTH K. Haematocrit and blood viscosity ratio indicates rheological oxygen carrying capacity and optimal haematocrit of human blood. 13<sup>th</sup> European Conference on Clinical Hemorheology, June 26-29, 2005, Siena, Italy. Abstract book 17.

KOLTAI K, FEHÉR G, KENYERES P, HORVÁTH B, ALEXY T, MÁRTON ZS, KÉSMÁRKY G, TÓTH K. Thrombocitaaggregáció-gátló terápiák hatékonysága, a fibrinogénszint és az életkor közötti összefüggés 5136 érbetegben. A Magyar Kardiológusok Társasága 2006. évi Tudományos Kongresszusa, 2006. május 11-13., Balatonfüred. *Card Hung Suppl A* 2006;36:A70.

HORVÁTH B, SZAPÁRY L, DEBRECENI L, FEHÉR G, KENYERES P, FÜLÖP A, BATTYÁNI I, TÓTH K. A Sclerovit hatása az endothelfunkcióra, hemoreológiai paraméterekre, a thrombocyta aggregációra, a vér homocisztein-koncentrációjára és az atherosclerosis progressziójára igazolt vaszkuláris betegekben. Magyar Belgyógyász Társaság Dunántúli Szekciójának LIII. Vándorgyűlése, 2006. június 1-3., Sopron. *Magyar Belorv Arch Suppl 2* 2006;59:77-78.

KOLTAI K, FEHER G, KESZTHELYI ZS, KENYERES P, KESMARKY G, VEKASI J, TOTH K. Smoking and lower aspirin dosage are associated with higher prevalence of aspirin resistance in type-2 diabetic patients. World Congress of Cardiology, September 2-7, 2006, Barcelona, Spain. *Eur Heart J* 2006;27 (Abstract Suppl.)

KOLTAI K, FEHER G, KENYERES P, ALEXY T, HORVATH B, MARTON ZS, KESMARKY G, TOTH K. Association between the effectiveness of different antiplatelet therapies, fibinogen levels and ageing in 5136 vascular patients. World Congress of Cardiology, September 2-7, 2006, Barcelona, Spain. *Eur Heart J* 2006;27 (Abstract Suppl.)

KOLTAI K, FEHÉR G, KENYERES P, KESZTHELYI Z, RAPP H, KÉSMÁRKY G, TÓTH K. Roziglitazon-kezelés hatásai a hemoreológiai paraméterekre, a thrombocyta-aggregabilitásra és más kardiovaszkuláris rizikófaktorokra. Magyar Belgyógyász Társaság 41. Nagygyűlése, 2006.11.09-11. Budapest. *Magyar Belorv Arch Suppl 4* 2006;59:81.

CZOPF L, KENYERES P, FEHÉR G, TÓTH K. Arteriográfiás mérések értékelése kezelt értegeknél. Magyar Belgyógyász Társaság 41. Nagygyűlése, 2006.11.09-11. Budapest. *Magyar Belorv Arch Suppl* 4 2006;59:52-53.

KENYERES P, KÉSMÁRKY G, TÓTH K. In vitro öregedés hatása a vörösvérsejt aggregációra. 5. Magyar Mikrokeringés Kongresszus, 2007. április 20-21., Balatonkenese. *Érbetegségek Suppl* 1 2007;9.

KÉSMÁRKY G, KENYERES P, TÓTH K. Plazmaviszkozitás: egy mellőzött paraméter. 5. Magyar Mikrokeringés Kongresszus, 2007. április 20-21., Balatonkenese. *Érbetegségek Suppl* 1 2007;13.

SCHUMACHER E, VIGH É, BÍRÓNÉ MOLNÁR V, KENYERES P, FEHÉR G, KÉSMÁRKY G, GARAI J, TÓTH K. A kávésav in vivo hemorheológiai és trombocita aggregáció gátló hatásának vizsgálata. 5. Magyar Mikrokeringés Kongresszus, 2007. április 20-21., Balatonkenese. *Érbetegségek Suppl* 1 2007;16.

RAPP H, FEHÉR G, KENYERES P, KÉSMÁRKY G, KÁLAI T, HIDEG K, TÓTH K. A 4-hidroxi-kumarin és származékainak hatása a vörösvérsejt deformabilitásra és a trombocita aggregációra. 5. Magyar Mikrokeringés Kongresszus, 2007. április 20-21., Balatonkenese. *Érbetegségek Suppl* 1 2007;18.

KOLTAI K, FEHÉR G, KENYERES P, HORVÁTH B, RAPP H, HALMOSI R, KÉSMÁRKY G, TÓTH K. Hemoreológiai paraméterek és a trombocita aggregabilitás szezonális változásai acetyl-szalicilsavval kezelt értegekben. Magyar Belgyógyász Társaság Dunántúli Szekciójának LIV. Vándorgyűlése, 2007. június 14-16., Balatonalmádi. *Magyar Belorv Arch Suppl* 1 2007;60:36.

KESMARKY G, KENYERES P, TOTH K. Plasma Viscosity: a Forgotten Variable? 14<sup>th</sup> Conference of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation, June 27-30, 2007, Dresden, Germany. Abstract book.

KENYERES P, KESMARKY G, TARSOLY P, JURICKSKAY I, TOTH K, BOGAR L. The Impact of Hemorheological Oxygen Carrying Capacity on Cardiac Morbidity and Mortality. 14<sup>th</sup> Conference of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation, June 27-30, 2007, Dresden, Germany. Abstract book.

KOLTAI K, FEHER G, KENYERES P, MARTON ZS, HALMOSI R, TIBOLD A, KESMARKY G, CZOPF L, TOTH K. Seasonal variations of hemorheological parameters and platelet aggregation in aspirin treated vascular patients. Congress of the European Society of Cardiology, September 1-5, 2007, Vienna, Austria. *Eur Heart J* 2007;28 (Abstract Suppl.).

KENYERES P, RÁBAI M, TARSOLY P, KÉSMÁRKY G, TÓTH K, BOGÁR L. Az alacsony hematokrit-vérviszkozitás arány, mint rizikótényező a koszorúérbetegség halálzásában. A Magyar Kardiológusok Társasága 2008. évi Tudományos Kongresszusa, 2008. május 7-10., Balatonfüred. *Card Hung Suppl* B 2008;38:B29.

KESMARKY G, RABAI M, KENYERES P, MARTON ZS, TOTH K. Whole blood viscosity: Is it useful or useless in clinical practice? 13<sup>th</sup> International Congress of Biorheology and 6<sup>th</sup> International Conference on Clinical Hemorheology, July 9-13, 2008, State College, USA. *Biorheol* 2008;45:56.

KENYERES P, RABAI M, TARSOLY P, KESMARKY G, TOTH K, BOGAR L. Rheological oxygen carrying capacity as a mortality risk factor in coronary heart disease. 13<sup>th</sup> International Congress of Biorheology and 6<sup>th</sup> International Conference on Clinical Hemorheology, July 9-13, 2008, State College, USA. *Biorheol* 2008;45:57.

KENYERES P, RABAI M, TOTH A, KESMARKY G, MARTON ZS, TOTH K. Methods to simplify, correct and compare ektacytometric results. 13<sup>th</sup> International Congress of Biorheology and 6<sup>th</sup> International Conference on Clinical Hemorheology, July 9-13, 2008, State College, USA. *Biorheol* 2008;45:138.

RABAI M, TOTH A, KENYERES P, MARTON ZS, KESMARKY G, TOTH K. Rheological benefit of red wine and its alcohol free extract. 13<sup>th</sup> International Congress of Biorheology and 6<sup>th</sup> International Conference on Clinical Hemorheology, July 9-13, 2008, State College, USA. *Biorheol* 2008;45:147.

KOLTAI K, FEHER G, KENYERES P, HALMOSI R, TIBOLD A, KESMARKY G, CZOPF L, TOTH K. Seasonal variations in hemorheological parameters and platelet aggregation - a possible association with meteorological factors? 25th Conference of the European Society for Microcirculation, August 26-29, 2008, Budapest, Hungary. *J Vasc Res* 2008;45:42.

KENYERES P, RABAI M, TOTH A, KESMARKY G, TOTH K. The impact of in vitro aging on erythrocyte aggregation. 25th Conference of the European Society for Microcirculation, August 26-29, 2008, Budapest, Hungary. *J Vasc Res* 2008;45:78.

KENYERES P, RÁBAI M, TÓTH A, KÉSMÁRKY G, BOGÁR L, TÓTH K. Egy új megközelítés az optimális hematokrit értelmezésében akut koronária szindrómás betegek adatai alapján. A Magyar Kardiológusok Társasága 2009. évi Tudományos Kongresszusa, 2009. május 6-9., Balatonfüred. *Card Hung Suppl* A 2009;39:A66.

RÁBAI M, PÁLFI A, BARTHA É, KENYERES P, TÓTH A, MAGYAR K, SÜMEGI B, TÓTH K. Vörösbor és alkoholmentes vörösborkivonat protektív hatásai állatkísérletes és in vitro hemoreológiai modellekben. A Magyar Kardiológusok Társasága 2009. évi Tudományos Kongresszusa, 2009. május 6-9., Balatonfüred. *Card Hung Suppl A* 2009;39:A74.

RÁBAI M, TÓTH A, KENYERES P, MÁRK L, MÁRTON ZS, JURICKAY I, SÜMEGI B, TÓTH K. Vörösbor és alkoholmentes vörösborkivonat kedvező in vitro haemorheológiai hatásai. 6. Magyar Mikrokeringés Kongresszus, 2009. május 22-23., Balatonkenese. *Érbetegségek* 2009;2:45.

KENYERES P, RÁBAI M, TÓTH A, TÓTH K. Új módszer a hematokrit-vérviszkozitás arány, és a virtuális optimális hematokrit meghatározására. 6. Magyar Mikrokeringés Kongresszus, 2009. május 22-23., Balatonkenese. *Érbetegségek* 2009;2:59.

KENYERES P, RABAI M, TOTH A, TOTH K. New method to determine hematocrit to blood viscosity ratio and virtual optimal hematocrit. 15<sup>th</sup> Conference of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation, June 28-July 1, 2009, Pontresina/St. Moritz, Switzerland. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009;42:191.

RABAI M, KENYERES P, TOTH A, PALFI A, BARTHA E, MAGYAR K, SUMEGI B, TOTH K. In vitro hemorheological and cardioprotective effects of red wine and alcohol free red wine extract. 15<sup>th</sup> Conference of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation, June 28-July 1, 2009, Pontresina/St. Moritz, Switzerland. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009;42:191-2.