

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Laboratóriumi állatok micro-rheologiai tulajdonságainak összehasonlító standardizációs vizsgálatai kísérletes sebészeti kutatásokhoz

Dr. Kiss Ferenc

Témavezető:
Dr. Németh Norbert, Ph.D.



**DEBRECENI EGYETEM
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

2011

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1. Haemorheologiai paraméterek	5
2.1.1. A vörösvérsejt deformabilitás	7
2.1.1.1. Laboratóriumi módszerek a vörösvérsejt deformabilitás meghatározására	8
2.1.2. A vörösvérsejt aggregatio	10
2.1.2.1. Laboratóriumi módszerek a vörösvérsejt aggregatio meghatározására	11
2.2. Fajspecifikus haemorheologiai különbségek kísérleti és laboratóriumi állatokban	12
2.3. A haemorheologia jelentősége a kísérletes sebészeti kutatásokban. A laboratóriumi mérések standardizációs kérdései	14
3. CÉLKITŰZÉSEK	20
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	21
4.1. Nemi különbségek haematologiai és haemorheologiai elemzése laboratóriumi állatokon	21
4.1.1. Kísérleti állatok és vérvételi protokoll	21
4.1.2. Haematologiai paraméterek meghatározása	22
4.1.3. Haemorheologiai paraméterek vizsgálata	23
4.1.3.1. A teljes vér és plazma viszkozitás meghatározása	23
4.1.3.2. A fibrinogén koncentráció mérése	24
4.1.3.3. A vörösvérsejt deformabilitás meghatározása	24
4.1.3.3.1. Filtrometria	24
4.1.3.3.2. Ektacytometria	25
4.1.3.4. A vörösvérsejt aggregatio meghatározása	27
4.1.4. Statisztikai analízis	27
4.2. A tárolási idő és hőmérséklet hatása laboratóriumi állatok vérmintáinak haematologiai és haemorheologiai paramétereire	28
4.2.1. Kísérleti állatok és mintavétel	28
4.2.2. Tárolási és mintaelőkészítési protokoll	28
4.2.3. Laboratóriumi mérések	29
4.2.4. Statisztikai analízis	29
4.3. Különböző viszkozitású szuszpendáló oldatok hatása laboratóriumi állatok vörösvérsejt deformabilitás mérésének érzékenysége	30
4.3.1. Nemi különbségek további ektacytometriás vizsgálatai	30
4.3.1.1. Kísérleti állatok és mintavétel	30
4.3.1.2. Mintaelőkészítés és vörösvérsejt deformabilitás mérés	30
4.3.2. Ektacytometriás mérések érzékenységének vizsgálata laboratóriumi állatok hőkezelt vörösvérsejtjeivel	31
4.3.2.1. Kísérleti állatok és mintavétel	31
4.3.2.2. Mintaelőkészítés és hőkezelés	31
4.3.2.3. Haematologiai és morphologiai vizsgálatok	32
4.3.2.4. A vörösvérsejt deformabilitás meghatározása	32
4.3.2.5. Statisztikai analízis	32
5. EREDMÉNYEK	34
5.1. Nemi különbségek haematologiai és haemorheologiai elemzése laboratóriumi állatokon	34
5.1.1. Haematologiai paraméterek	34
5.1.2. Haemorheologiai paraméterek	34
5.1.2.1. Teljes vér és plazma viszkozitás	34
5.1.2.2. Vörösvérsejt deformabilitás	36

5.1.2.3. Vörösvérsejt aggregatio.....	38
5.2. A tárolási idő és hőmérséklet hatása laboratóriumi állatok vérmintáinak haematologiai és haemorheologiai paramétereire	40
5.2.1. Haematologiai paraméterek.....	40
5.2.2. Haemorheologiai paraméterek	41
5.2.2.1. Teljes vér és plazma viszkozitás	41
5.2.2.2. Vörösvérsejt deformabilitás	42
5.2.2.3. Vörösvérsejt aggregatio.....	44
5.3. Különböző viszkozitású szuszpendáló oldatok hatása laboratóriumi állatok vörösvérsejt deformabilitás mérésének érzékenységére	46
5.3.1. Nemi különbségek további ektacytometriás vizsgálatai	46
5.3.2. Ektacytometriás mérések érzékenységének vizsgálata laboratóriumi állatok hőkezelt vörösvérsejtjeivel.....	50
4.3.2.1. Haematologiai és morfológiai változások	50
5.3.2.2. A vörösvérsejt deformabilitás változásai	51
6. MEGBESZÉLÉS.....	56
6.1. Nemi különbségek haemorheologiai jellemzői	56
6.2. A mintatárolási idő és hőmérséklet hatása a haemorheologiai paraméterekre.....	59
6.3. Az ektacytometriás mérések érzékenysége	61
6.4. Az eredmények hasznosíthatósága a kísérletes sebészeti kutatásokban	65
7. FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA	67
9. Irodalomjegyzék.....	70
9.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke	70
9.2. Az értekezés alapjául szolgáló <i>in extenso</i> közlemények.....	79
9.3. Az értekezés témájával összefüggő <i>in extenso</i> közlemények	79
9.4. Egyéb <i>in extenso</i> közlemények	79
10. Tárgyszavak.....	81
11. Köszönetnyilvánítás	82
12. Függelék.....	83

*„Az vagy, mit teremtesz,
ott tartasz, mit megjártál.
Minden lépés előre visz,
támadj fel, ha elbuknál!”
(ismeretlen szerző)*

1. BEVEZETÉS

A haemorheologia a vér áramlásával foglalkozó tudományág,⁴⁰ amelynek a keringés anatómiájára és élettanára vonatkozó gyökereit már az ókori és középkori írásokban is fellelhetjük. A modern mérőműszerek révén, igazi fejlődésnek azonban a múlt század utolsó évtizedeiben indult.^{40,118}

A koraközépkor dogmatikus évszázadait követően a reneszánsz idején indult meg, az állat és vele párhuzamosan a humán élettan és anatómia megismerésével az orvostudomány újabb kori fejlődése. A XVII. században William Harvey (1578-1657) a vér keringéséről és annak irányáról tett felfedezése fordulópontot jelentett, ledöntve a több mint tizennégy évszázados galenusi dogmákat. A vér és a keringés a tudomány érdeklődésének középpontjába került. A XVII. század második felében Anthonie Philips van Leeuwenhoek (1632-1723) kezdetleges mikroszkópjával végzett megfigyelései alapján a tudománytörténelemben először írta le pontosan a vérben lévő vörösvérsejteket, és a mai modern berendezések pontosságához hasonlóan az átmérőjüket is kiszámolta (1/3000 hüvelyk, azaz hozzávetőlegesen 8 μm !).¹¹⁸ A XIX. századtól az empirikus megfigyeléseken túl, a fizika fejlődésével együttesen, lehetővé vált a jelenkori haemorheológiát mai napig is meghatározó elméletek megszületése, mint amilyen az egyenes csőben áramló folyadékok rheológiai viszonyait leíró Poiseuille-törvény, vagy a 300 μm -nél kisebb átmérőjű erekben megfigyelhető axiális áramlásból következő Fåhræus-Lindqvist effektus.^{14,118,136}

A technika fejlődésének eredményeképpen, a XX. század közepétől lehetőség nyílt olyan mérőberendezések megalkotására, amelyek a vörösvérsejtek tulajdonságainak

vizsgálatába egyre jobb betekintést nyújtottak és a kialakuló standardoknak köszönhetően lehetővé vált a különböző laboratóriumok kutatási eredményeinek összehasonlíthatósága.^{52,71}

A modernkori haemorheologia atyjaként Alfred Lewin Copleyt (1910-1992) tekintjük, aki 1951-ben definiálta e diszciplína fogalmát a vér alakos és plazmatikus komponenseinek, valamint a vérrel kontaktusban lévő érfal makro- és mikroszkópikus áramlástanának tudományaként.^{40,118}

Mára, a korszerű rheológiai mérő módszerek elterjedésével igazi multidiszciplináris területté vált a haemorheologia az alap- és alkalmazott kutatásoktól a klinikai vizsgálatokig.^{136,141} A vizsgált problémák nagy része természetszerűen klinikai kérdéskörök, amelyekre a választ gyakran a kísérletes orvostudományban használt állatmodellek képesek adni. A vér rheológiai paraméterei (vér és plazma viszkozitás, haematocrit, vörösvérsejt deformabilitás, vörösvérsejt aggregatio, fibrinogén) kóros, gyakran jelző értékű változásokat mutatnak cardiovascularis^{24,28,44,141,142,161} és cerebrovascularis kórképekben,^{68,138,139,151,152} peripheriás érbetegségekben,^{43,53,121} gerontológiai vonatkozásokban,^{67,68,78,79,89} anyagcsere betegségekben,^{29,131,150} gyulladásos-, ischaemia-reperfúziós^{4,19,27,43,55,75,102,107} és septicus folyamatokban,^{9,19} továbbá a lépfunkció csökkenésekor vagy elvesztésekor.^{77,90,91,92,126}

A kutatások során az eredmények validálásának, értékelhetőségének és extrapolálhatóságának az alappilléret képezi, hogy a kialakított kutatási modell tervezése és kivitelezése korszerű laborállat-tudományi elvek szerint^{83,149} és standardizált körülmények között történjen. Ebbe beleértendő a megfelelő laboratóriumi/kísérleti állatfaj megválasztása, az esetszám és a nemi arányok, a vérvétel helyének, mennyiségének, valamint a mintakezelési és mintaelőkészítési körülmények meghatározása is. Ezen elvek és standardok nélkül a különböző laboratóriumi állatfajokból, más-más kutató csoportoktól származó kutatási eredmények biztonsággal nem hasonlíthatóak össze, és nem extrapolálhatóak megfelelően a humán klinikai gyakorlatból felmerülő kérdésekre.

Problémát jelent, hogy a mai napig nem áll rendelkezésre a humán klinikai gyakorlathoz hasonló standardizált protokoll, amit az állatkísérleteknél alkalmazni lehetne a haemorheológiai paramétereket meghatározó laboratóriumi berendezések és methodikák kapcsán,^{7,21,66} s amely több laboratóriumi állatfajra adaptálva lenne, s figyelembe venné a faji- és a nemi különbségeket is.^{156,157}

Kutatásaink egy része a megfelelő állatkísérletes haemorheológiai mérés technikai standardok kialakítására irányult mintakezelési és műszer-érzékenységi összehasonlító vizsgálatokkal a különböző haemorheológiai mérőműszereken. A cél, a biztonságosan kivitelezhető és értékelhető laboratóriumi vizsgálatok biztosítása volt a kísérletes sebészeti kutatásokban alkalmazott állatmodellekhez.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Haemorheológiai paraméterek

Bár Jean Louis Marie Poiseuille (1797-1869) munkássága során a vér áramlásával kapcsolatosan kívánt kísérleteket végezni, a vér megalvadásából adódó kudarcai miatt vizsgálatait víz felhasználásával fejezte be. Munkája eredményeként megalkotta a rheologia egyik alaptörvényét. Poiseuille-től függetlenül Gotthilf Heinrich Ludwig Hagen (1797-1884) is felismerte az összefüggést, ezért ma Hagen-Poiseuille törvényként is ismert.^{40,118}

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

ahol Q a folyadék áramlási sebessége, Δp a cső/érszakasz két vége közötti nyomás-gradiens, r a cső/érszakasz keresztmetszeti sugara, l a hossza, η a folyadék viszkozitása.

Poiseuille kutatásai alapján a törvény bár csak newtoni folyadékokra és merevfalú csövekre vonatkozik, mégis jó közelítéssel használható a nem-newtoni folyadékként viselkedő vérre a nagyerek területén.^{118,136,140}

Az egyenletből jól látszik, hogy physiologiás körülmények között a vér áramlását leginkább a perfúziós nyomás, illetve az erek vasodilatator és vasoconstrictor mechanizmusai határozzák meg, és a teljes vér viszkozitás, valamint az azt meghatározó haemorheológiai faktork kisebb jelentőséggel bírnak. Azonban pathologiás helyzetben, amikor a haemodynamikai rezerv kimerül, a haemorheológiai jellemzők alárendelt szerepükből meghatározó paraméterekké lépnek elő.^{26,45,136,140}

A teljes vér viszkozitást számos extrinsic és intrinsic paraméter határozza meg, melyek a keringés különböző szakaszain az eltérő áramlási viszonyoknak megfelelően különböző mértékben jelentenek befolyásoló tényezőt (I. táblázat).

I. táblázat: A teljes vér viszkozitást meghatározó főbb faktork

extrinsic faktork	intrinsic faktork	
az áramló vérre ható sebesség-gradiens	<i>plazmatikus faktork</i>	<i>celluláris faktork</i>
érpálya és mikrokeringés morphológiai jellemzői	plazma viszkozitás: - fibrinogén koncentráció - lipid koncentráció	vörösvérsejtek száma és mérete
hőmérséklet		vörösvérsejt deformabilitás
		vörösvérsejt aggregatio
		fehérvérsejt szám
		thrombocytá szám
		thrombocytá aggregatio

Az extrinsic csoportba tartoznak azon teljes vér viszkozitást befolyásoló paraméterek, amelyek nem a keringő vér tulajdonságaiból származnak. Ilyen tényezők a hőmérséklet, az ér-pálya és mikrokeringés funkcionális és morphológiai állapota. Mivel a vér nem-newtoni folyadék, azaz viszkozitása sebesség-gradiens-függő (Casson-típusú folyadék), a vérre ható nyíróerőből adódó sebesség-gradiens is az extrinsic faktork közé sorolható.

A teljes vér viszkozitást meghatározó intrinsic faktork magának az áramló vérnek a tulajdonságaira vonatkoznak, melyek részben plazmatikus, részben celluláris tényezők.

A plazmatikus tényezők között magának a plazmának a viszkozitása szerepel, melyet a benne lévő proteinek -leginkább fibrinogén, továbbá globulinok-, és a lipid frakciók, főleg trigliceridek koncentrációja befolyásol.^{26,38,76,136}

A celluláris faktorok a vér alakos elemeinek mennyisége és azok tulajdonságait leíró paraméterek. Így az alakos elemeknek megfelelően három további csoportra bontható, mint a fehérvérsejtek száma, a vérlemezkék száma és aggregációs készsége, illetve a vörösvérsejtek száma és mérete, mely a haematocrit értékében összegződik. Fontosak továbbá a vörösvérsejtek micro-rheologiai tulajdonságait leíró deformabilitási és aggregációs paraméterek.

A vér viszkozitását legmegbízhatóbban kapilláris, illetve rotációs viszkoziméterekkel lehet meghatározni különböző sebesség-gradiens tartományokban.^{1,7,26,62}

2.1.1. A vörösvérsejt deformabilitás

A vörösvérsejtek deformálhatósága alatt a sejtekre ható nyíróerő hatására létrejövő passzív alakváltozás mértékét értjük. Ez a passzív alakváltozás a magas áramlási sebességű érszakaszokon (tömeges áramlás zónája, érátmérő $> 300\ \mu\text{m}$) növeli a vér fluiditását, azaz csökkenti a viszkozitást.^{25,38,136,140,159}

A $300\ \mu\text{m}$ átmérő alatti erek esetén (tranziens zóna, érátmérő $8\text{-}300\ \mu\text{m}$) az axiális áramlási profil mellett megjelenik a Fåhræus-Lindqvist effektus is, azaz az érátmérővel egyenes arányban csökkenő viszkozitás jelensége, az érfal mentén kialakuló sejtszegény plazmaréteg (Poiseuille-zóna) mellett.^{38,118}

A megfelelő deformabilitásnak az úgynevezett egyenkénti áramlás zónában (érátmérő $< 8\ \mu\text{m}$) van még nagyobb jelentősége, hiszen a szervezetben számos helyen (szívizom, agy) a $3\text{-}5\ \mu\text{m}$ vagy annál kisebb átmérőjű microcapillarison csak a megfelelően elnyújtható vörösvérsejtek tudnak áthaladni.^{41,136} A deformabilitás paraméter meghatározásának

jelentősége ebben rejlik, hiszen a bármilyen okból károsodott, rigidebbé váló vörösvérsejtek a szöveti microcirculatio területén okoznak további zavarokat.^{25,41,72,82,116,117,132}

A vörösvérsejteknek a deformabilitását számos celluláris faktor határozza meg, melyek igen érzékenyek a sejtek homeostasisának változásaira. A deformálhatóság egyik fő meghatározója maga a cytoskeleton, és azon belül is a spektrin, ami a membrán band-3 proteinjéhez kapcsolódik.¹³⁶ A bikonkáv morphologia, a sejt volumen (emberben átlagosan 90 fl), a sejt felszín (emberben: $\sim 140 \mu\text{m}^2$) és a felszín-térfogat arány további fontos meghatározója a deformabilitásnak.^{39,87,136} Ennek fenntartásában fontos szerepet játszanak a vörösvérsejt-membránban elhelyezkedő ATP függő Ca^{2+} pumpák.^{14,74,93-96,143} A belső viszkozitást döntően a haemoglobin-tartalom határozza meg, de jelentős befolyásoló tényező a sejtmembrán saját viszkozitása is (emberben: $0,7 \mu\text{Pa.s.m}$).^{39,87}

2.1.1.1. Laboratóriumi módszerek a vörösvérsejt deformabilitás meghatározására

A filtrációs elven működő, az 1980-as években kifejlesztett Reid-Dormándy filtrométer, robbanásszerű fejlődéshez vezetett a haemorheológiai kutatásokban.^{26,62,63,97} Hazai viszonylatban is fontos szerepet játszott és játszik ez a módszer, annak magyar (pécsi és debreceni) vonatkozásából adódóan is, hiszen ebből lett kifejlesztve a St. George's filtrometer.⁴² Ennek továbbfejlesztett változata a magyar Carat FT-1 filtrométer (Carat Diagnosztika Kft.).^{21,26}

Az elmúlt 30 év technikai fejlődését követően a laser-diffrakció elven működő vörösvérsejt deformabilitást, elongatiót meghatározó készülékek hódítottak teret az utóbbi években. Ezek közül a piacon elérhető a dél-koreai gyártású Rheoscan-D200 slit-flow ektacytometer (Sewon Meditech Inc., Dél-Korea)¹³⁰ és a holland gyártású laser-assisted optical rotational red cell analyser (LoRRca; Mechatronics BV, Hollandia).⁶² A harmadik ismert készülék, a Rheodyn-SSD.^{10,62}

A Carat FT-1 *filtrómeter* a vörösvérsejtek deformabilitásának meghatározásához egy 5%-os haematocritú vörösvérsejt - foszfátpuffer (PBS) szuszpenziót áramoltat át egy 5 μ m pórusátmérőjű filteren, konstans 4 vízcm-es negatív nyomással.^{21,42} A készülék *előnye*, hogy a pórusokon történő filtráció a microcapillarisokon áthaladó vörösvérsejtekre ható erőket jó megközelítéssel szimulálja. *Hátránya*, hogy a mérések kivitelezéséhez vörösvérsejt szuszpenziót kell készíteni többszörös PBS-ben történő mosással és centrifugálással.²¹ Ennek következtében a mintaelőkészítés során sérülhetnek a vörösvérsejtek mind mechanikusan, mind ozmotikusan, továbbá az esetleges pH változások hatásán, mely a PBS oldat hibájából vagy akár a hosszú idejű mintaelőkészítésből is adódhat. A mérések kivitelezésénél, az eredmények értékelésénél nehézséget okozhat, hogy a reprezentatív mérésekhez teljesen fehérvérsejt- és thrombocyta-mentes szuszpenziók szükségesek, melyet a methodikából adódóan nem lehet tökéletesen kivitelezni. Ezen corpusculumok a méréseket befolyásolhatják: a fehérvérsejtek a filter pórusait, lényegesen nagyobb méretük miatt eldugaszolhatják.^{25,26} A methodika további standardizálási nehézségét jelenti a sejtméret-pórusméret arány kérdése, amely a műszer érzékenységét is jelentősen meghatározza.^{99,102,105} Fontos befolyásoló tényező a pórusokon található filterek száma, egységes mérete és esetleges éles széle, mely a sejtek mechanikai sérülését okozhatja. A methodika különböző laboratóriumi állatfajokra történő adaptációja sem teljes mértékben kivitelezhető, mert a mérésekhez kb. 2-2,5 ml teljes vér szükséges. Ez kis laboratóriumi állatokból (egér, patkány) vagy egyáltalán nem biztosítható, vagy pathológiás mennyiségűnek minősül, mely szignifikánsan befolyásolja az állat physiologiai paramétereit, követéses vizsgálatok pedig egyáltalán nem kivitelezhetőek.^{83,149}

A laser-diffrakciós elven működő *ektacytometerek* nagy *előnye*, hogy a vörösvérsejt deformabilitás meghatározásához számottevően kevesebb vér mennyiségét igénylik (Rheoscan: 5-6 μ l, LoRRca: 10 μ l), így a methodika könnyen adaptálható kis laboratóriumi

állatfajokra is, és a követéses vizsgálatok is tervezhetőek. A mintaelőkészítés a vérminta kapcsán elhanyagolható, és a vizsgálatok teljes vér felhasználásával történnek, ami további előnyt jelent a mérések során. A methodika *hátránya*, hogy a mérések a physiologiástól kb. 5-6-szor nagyobb viszkozitású közegben történnek, melynek az eddigi kutatások alapján nincs hatása a sejtekre, mert maga az oldat izotóniás és isoosmoláris, ám mégis eltér a physiologias körülményektől. A magas viszkozitású közeg -mely általában polyvinyl-pyrrolidon (PVP) vagy dextrán oldat- alkalmazása nélkül a mérések során a nyíróerő nem adódna át a vörösvérsejtekre, amelyek így nem elongálódnának.^{7,49,50,62,97}

2.1.2. A vörösvérsejt aggregatio

A bikonkáv erythrocyták másik fontos micro-rheologiai tulajdonsága a sejtek reverzibilis összekapcsolódása, aggregációja. A folyamat létrejön, amikor a disaggregáló erők eredője kisebb, mint az aggregációs erők értéke. Előbbiek az aktuális sebesség-gradienstől függenek, de a vörösvérsejtek közötti elektrosztatikus repulziós erő és a sejtmembrán elasztikus energiája is befolyásoló tényező. Az aggregatiót létrehozó erők gyengék, azokat döntően a fibrinogén molekulák nem kovalens kötődése,³¹ valamint a sejteket körülvevő glycocalyx összetételétől is függő, úgynevezett depletiós zóna és a plazma fázis makromolekula-koncentrációjának különbségéből eredő osmotikus gradiens által létrehozott összetartó erők alakítják.^{14,34,108}

Az aggregációs folyamat első 10-15 másodpercében a vörösvérsejtek lineáris, vonalszerű összetapadása történik: úgynevezett pénztekercs, „rouleaux” formát alkotnak. Ezt követően a lineáris aggregátumok 3 dimenziós alakzatokat formálnak.^{34,108,120}

A vörösvérsejtek aggregációját, annak mértékét plazmatikus és celluláris faktorok határozzák meg. A plazmatikus faktorok a fibrinogén koncentráció, illetve *in vitro* körülmények között más makromolekulák, mint a dextrán. Ezek nagy, elágazó térszerkezetű

molekulák, melyek a glycocalyx réteg miatt nem tudnak a sejtmembránig penetrálni, így létrejöhet a depletiós zóna.^{34,108,120} A celluláris faktorok közé tartozik a vörösvérsejtek alakja, deformálhatósága és az igen nehezen meghatározható glycocalyx összetétel.^{108,123,124}

A vörösvérsejtek aggregabilitása kifejezés a vörösvérsejtek aggregációs készségére utal, melyet csak celluláris faktorok befolyásolnak, és független a plazma tulajdonságaitól. Az aggregabilitás összehasonlító jelleggel meghatározható különböző makromolekula oldatokban, *in vitro*.¹⁶

A fokozott vörösvérsejt aggregatio következményeként a tömeges áramlási szakaszban nő a particulum-méret, következményes viszkozitás emelkedéssel az alacsonyabb sebesség-gradiens tartományokban. A mikrokeringésben nagyobb disaggregáló energiára van szükség az aggregatumok feltöréséhez. Az arteriolákban a kifejezettebb axiális áramlás révén csökken az érfal mentén a súrlódási ellenállás, valamint csökkenhet a szöveti haematocrit, növekedhet a vascularis tónus. Mindezek eredőjeként nő az áramlási ellenállás.^{18,82,116}

2.1.2.1. Laboratóriumi módszerek a vörösvérsejt aggregatio meghatározására

A klinikai gyakorlatban rutinszerűen elterjedt Westergreen módszer indirekt módon a vörösvérsejtek aggregációján is alapszik, hiszen a stasis alatt kialakuló aggregatumok süllyedésének mértéke függ az aggregatio sebességétől és mértékétől. A fokozott vörösvérsejt aggregatio nagyobb mértékű vérsejt-süllyedésben nyilvánul meg.^{7,26}

Az aggregatio mértékéről indirekt információ nyerhető az alacsony sebesség-gradiensnél (jellemzően 1 s^{-1} alatt) mért vér viszkozitás adatokból is, amely tartományban az aggregatumok létrejötte nagymértékben növeli a vér viszkozitását, kialakítva a nem-newtoni folyadékokra jellemző tulajdonságokat.^{7,14,26,38}

A technika fejlődésével egyre inkább a direkt módszerek kerültek előtérbe. A fénytranszmissziós elven alapuló, német gyártmányú Myrenne MA1 *aggregometer*

(Myrenne GmbH, Németország) az egyik legelterjedtebb vörösvérsejt aggregometer.¹²⁷ A készülék a vörösvérsejt aggregációt stasisnál és alacsony sebesség-gradiens (3 s^{-1}) mellett határozza meg mindössze 20-30 μl anticoagulált vérmintából. *Előnye*, hogy egyszerű, a mindennapi klinikai gyakorlatban is könnyen használható. *Hátránya*, hogy az aggregatio első 10 másodpercéről ad csak információt, a mérések hőkontroll nélkül zajlanak, és a vérminta érintkezik az oxigénnel, amely befolyásolhatja a mérési eredményeket.¹⁴⁸

A vörösvérsejt deformabilitás meghatározására is alkalmas *LoRRca készülék* (Mechatronics BV, Hollandia) aggregációt meghatározó funkciója a laser-backscattering elven működik. Egy méréshez 0,7-1 ml vér szükséges. A műszer a vörösvérsejt aggregatio teljes folyamatát vizsgálja számos dinamikus paraméter kalkulálásával. A mérések hőkontrollált körülmények között történnek, a vérminta levegővel minimálisan érintkezik.⁶²

A micro-rheológiai paramétereket (vörösvérsejt deformabilitás és vörösvérsejt aggregatio) meghatározó tényezők összetettsége révén a humán adatokhoz képest jelentős haemorheológiai eltérések mutatkoznak az orvostudományban máig nélkülözhetetlen állatkísérletekben vizsgált fajok vonatkozásában. Ezek feltérképezése és megértése fontos a kutatások tervezésénél és az eredmények értékelhetőségénél, extrapolálhatóságánál.

2.2. Fajspecifikus haemorheológiai különbségek kísérleti és laboratóriumi állatokban

Az irodalomban számos közlemény található, melyek főleg az emlősök fajspecifikus haemorheológiai különbségeivel foglalkozik az aktuálisan ismert és elérhető mérőmódszerek lehetőségeit részben vagy teljesen kihasználva.^{6,8,12,17,30,32,33,35,59,64,74,86,103,109,114,115,134,146,153,156}

Az összehasonlító haemorheologia célja részben a laboratóriumi állatok és részben az embertől filogenetikailag távol álló, de egyes physiológiai paramétereiben igen diverz állatfajok haemorheológiai profiljának feltérképezése és a különbségek hátterében álló összefüggések megfejtése. Ezek a humán haemorheológiai változások, pathológiás eltérések

megértését is szolgálhatják amellet, hogy a kísérletes orvostudomány számára nyújtanak alapinformációkat.¹⁵⁷

Az állatvilágban az emlősök egyik fő rheologiai sajátossága a sejtmag nélküli, bikonkáv alakú vörösvérsejtek jelenléte.^{57,60} Az ovalocytá alakkal és magvas vörösvérsejttel rendelkező halakhoz, kétélűekhez, hüllőkhöz és madarakhoz képest az emlősök erythrocytái nagyobb mértékben képesek a deformabilitásra és különböző mértékben ugyan, de létrejön a vörösvérsejtek aggregációja.^{94,108,157}

Az emlősök vörösvérsejt deformálhatóságát és azok fajspecifikus sajátságait az irodalomban számos módszerrel vizsgálták már (filtráció, laser-diffrakciós módszerek, mikropipettás aspirációs technika). Általánosságban elmondható, hogy a sejtméret-pórusméret arány révén behatárolt filtrációs mérések kivételével,^{25,102,105} a vörösvérsejtek elongációját vizsgáló laser-diffrakciós elven történő deformabilitás értékekben a fajok közötti különbségek kisebb mértékűek, mint a vörösvérsejt aggregációs paraméterekben tapasztalható nagyfokú különbségek.¹⁵⁷

Egyes fajok, mint a birka, a kecske vagy a szarvasmarha vörösvérsejt aggregációja nem vagy csak nagyon kis mértékben mérhető,^{114,115,156} míg más fajoknál -mint a ló, a macska, az antilop- azonban nagymértékű vörösvérsejt aggregatio mutatható ki.^{8,115,119,120,156} E különbségek hátterét nem lehet csak filogenetikai sajátságokkal magyarázni,^{8,12,60} bár erre vonatkozóan számos elmélet született, melyek a genetikai, a környezeti (északi és déli sarkon élő fókák, hideg- és melegvízű tengerekben élő állatok)^{15,86} és az életmódbeli (mozgékony vagy kevésbé mozgékony)¹¹⁵ tényezőknek is nagy szerepet tulajdonítanak.¹⁵

A mai napig nem ismert azonban egységes magyarázat az ember és az egyes emlős állatfajok haemorheologiai különbségeinek megértésére.¹⁵ Számos állatfajban írtak le olyan vér viszkozitási, vörösvérsejt deformabilitási és aggregációs értékeket, melyek humán vonatkozásban már pathológiás mértékűek lennének. Erre jó példa a lovak említett nagyfokú

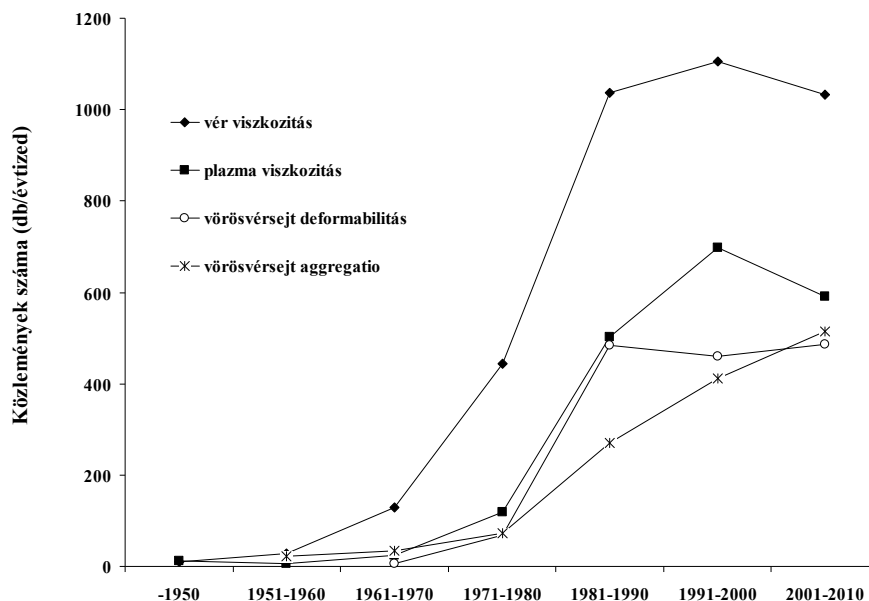
vörösvérsejt aggregációja, a patkány alacsony mértékű, illetve a juh erythrocytáinak mérhetetlenül alacsony aggregációja (Myrenne készülékkel mért M aggregációs index átlagérték emberben: 15-18; lóban: 30-35; patkányban: 2-3; juhban: 0-1).^{8,156,157}

A humán klinikai gyakorlatban létező mérés technikai útmutatók^{7,21,66} igényével, állatkísérletes vonatkozásban még nem érhető el ajánlás a fajonkénti standardizált haemorheologiai profil és a módszerfüggő mérés technikai vonatkozások tekintetében. A fajokra jellemző rheologiai mintázaton túl, az eredmények összehasonlíthatósága tekintetében az is nagy jelentőséggel bír, hogy az egyes állatfajok haemorheologiai paramétereit azonos mértékű és minőségű behatások milyen irányba és milyen mértékben változtatják meg. Hiszen valószínűsíthető, hogy az egyes fajok nem feltétlenül mutatnak azonos fokú érzékenységet a környezeti, vagy *in vivo* pathophysiologias hatásokra.¹⁵⁷

Ez a kérdéskör, azaz a megbízható laboratóriumi háttér biztosítása a jelző értékű haemorheologiai változásokat mutató pathophysiologiai folyamatok tanulmányozásában (mint a sepsis, a légfunkció változásának követése, anyagcsere betegségek, ischaemia-reperfusio) igen nagy jelentőségű, hiszen az újabb és újabb mérő módszerek kifejlesztésével és elterjedésével a haemorheologiai kutatások egyre szélesebb körben zajlanak számos kísérleti (kísérletbe vont) és laboratóriumi (kísérleti célra tenyésztett) állatfajon. Ezekben a kutatásokban a kísérletes sebészeti modelleknek nagy jelentősége és létjogosultsága van.

2.3. A haemorheologia jelentősége a kísérletes sebészeti kutatásokban. A laboratóriumi mérések standardizációs kérdései

A PubMed adatbázisában a 2010. december 31-ig megjelent közlemények között a vér viszkozitás, a plazma viszkozitás, a vörösvérsejt deformabilitás és a vörösvérsejt aggregatio kulcsszavak angol megfelelőire keresve növekvő számú haemorheologiai témájú cikkek találhatóak: az 1980-as évektől az ezredfordulóig meredeken emelkedő számban (1. ábra).

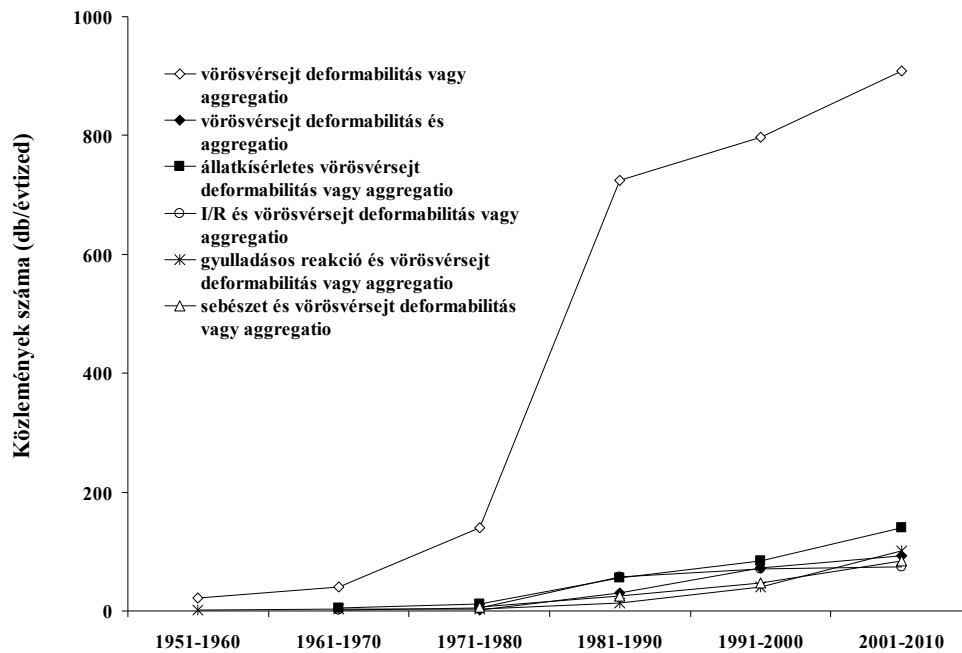


1. ábra

A viszkozitással és a vér micro-rheológiai paramétereivel foglalkozó közlemények száma évtizedenkénti bontásban a PubMed adatbázisa alapján (2010. december 31-ig megjelent közlemények)

A viszkozitási paraméterek vizsgálatával foglalkozó közlemények már az 1950-es években is megjelentek, míg a vér micro-rheológiai paramétereit ismertető publikációk csak nagyjából két évtizeddel később születtek, melynek háttérében az újabb laboratóriumi berendezések kifejlesztése és továbbfejlesztése áll.^{36,66,97} Az utóbbi két évtizedben ugrásszerűen megnőtt a vörösvérsejt deformabilitással és a vörösvérsejt aggregációval foglalkozó közlemények száma is a fénytranszmissziós aggregometria és az ektacytometria technikák megjelenésével.^{7,62,127}

A micro-rheológiai tanulmányok között azonban a vörösvérsejt deformabilitás és a vörösvérsejt aggregatio együttes vizsgálata már jóval ritkább (2. ábra). Ennek oka valószínűleg a mérőműszerek magas költsége, így kevés laboratórium van, ahol több, egymást kiegészítő haemorheológiai módszer áll rendelkezésre.^{52,62}



2. ábra

A vér micro-rheologiai paramétereivel foglalkozó közlemények száma tematikus és évtizedenkénti bontásban a PubMed adatbázisa alapján (2010. december 31-ig megjelent közlemények)
I/R = ischaemia-reperfusio

Tematikus bontásban az 1980-as évektől növekedett a különböző sebészeti témakörű vagy állatkísérletes közlemények száma. Elmondható, hogy a micro-rheologiai paraméterekkel foglalkozó klinikai vizsgálatok és állatkísérletes kutatások száma rohamosan emelkedik. A tudományág viszonylagos fiatal korából adódóan, illetve a precíziós és kevés vérmintát igénylő -kis laboratóriumi állatokon is, akár követéses vizsgálatok kivitelezéséhez is megfelelően alkalmazható- laboratóriumi methodikák újszerűsége miatt még számos módszertani összehasonlító kérdés vár tisztázásra.

Ezek a kérdések egyrészt a pathophysiologiai folyamatok hatására kialakuló haemorheologiai változások mértékének kimutathatóságára vonatkoznak, amelyeket a nem megfelelő mérőmódszer alkalmazása, nem kellően alapos kísérlet-tervezési szempontok,

vérminta vételi és mintakezelési körülmények, valamint az egyre összetettebb részleteiben megismert faji- és nemi különbségek is befolyásolhatnak.

A haemorheologiai változások mértékének kimutathatóságát néhány példával szeretném szemléltetni.

Klinikai tapasztalatokból és kérdésekből kiinduló sebészeti kutatásokban egyre több adat utal a korai postoperatív napok eseményei és a szövődmények kialakulása kapcsán a haemorheologiai faktorok és a következményes microcirculációs változások jelentős szerepére.^{41,58,72,82}

Baskurt és munkatársai patkányon coecum ligációval és punctióval előidézett sepsis modellen azt találták, hogy 18 órával a sepsis indukálását követően az aortából származó vérmintákban a vörösvérsejt deformabilitás 14,5-15,8%-kal volt rosszabb a kontroll állatok vérmintáihoz képest.⁹

Kayar és munkatársai patkányon az arteria femoralis occlusio által kiváltott ischaemiás károsodást vizsgálva azt találták, hogy már a 10 perces leszorítás következtében a kirekesztett végtagban rekedt vérben a vörösvérsejtek deformabilitása közel 10%-kal romlik, a vörösvérsejtek aggregációja pedig hozzávetőlegesen 25%-kal emelkedik a szisztémás keringésben mért adatokhoz képest.⁷⁵ A változások hátterében döntően a lokális metabolikus változások^{29,154} és a szabadgyökök okozta vörösvérsejt károsodások állhatnak.^{19,20,46}

A Sebészeti Műtéttani Tanszék kutatásaiban Németh és munkatársai patkányon és keverék kutyán végzett követéses végtagi ischaemia-reperfúziós kutatásai során azt találták, hogy patkányon a femoralis erek 1 órás leszorításával előidézett ischaemiát követően a vörösvérsejtek filtrálhatóságát leíró paraméter, a relatív sejt-tranzitidő (RCTT) értéke az 1. postoperatív napon 3,6-szor, a 2. napon 5,9-szer és a 3. napon 2-szer volt magasabb, mint a kontroll állatokban, lényegesen rosszabb vörösvérsejt deformabilitásra utalva. A romlás allopurinol -az ischaemia-reperfúziós folyamatokban az egyik legfőbb szabadgyökforrás, a

xantin-oxidáz enzim inhibitora- adásával kivédhető volt.¹⁰⁶ Keverék kutyáknál a femoralis erek leszorításával előidézett 3 órás végtagi ischaemia hatására az RCTT értékét a 2. postoperatív napon 2-szer és a 3. napon 3,3-szor találták rosszabbnak, mint a kontroll állatokban. A micro-rheológiai paraméterek a reperfusio során, napokkal az ischaemiás hatást követően sem rendeződnek, sőt további romlást is mutathatnak.¹⁰⁷

Pető és munkatársai keverék kutyákon folytattak vese ischaemiás kutatásokat. Kísérletükben egyoldali renalis ischaemiát idéztek elő az arteria renalis 45 perces atraumatikus leszorításával. Szisztémás vérminták laboratóriumi feldolgozása során azt találták, hogy már az ischaemia 30. percében az RCTT értéke 50,2%-kal, az 1. postoperatív napon 73,2%-kal, a 2. napon kb. 110%-kal volt nagyobb, mint a kontroll állatokban. A tapasztalt vörösvérsejt deformabilitás romlás a további postoperatív napokon rendeződött, illetve allopurinol használatával ebben a modellben is kivédhető volt a károsodás mértéke.¹¹²

Bráth és munkatársai patkányon mesenterialis ischaemia-reperfusió károsodást vizsgáltak az arteria mesenterica superior 30 perces leszorításával. A vörösvérsejtek deformabilitása az ischaemiát követően a vena cava caudalis mintáiban 7,3%-kal, a vena portae mintáiban 14,5%-kal romlott. A vörösvérsejt aggregatio mértéke a reperfusio 60. percére 2,5-szer nagyobb volt a lokális vena portae vérmintákban, mint a szisztémás vena cava vérmintákban.²⁷

A vér micro-rheológiai paraméterei tehát érzékenyen változnak az ischaemia-reperfusio okozta károsodásokra, és kritikus fontosságúak az 1-3. postoperatív napok a microcirculációt befolyásoló haemorheológiai változások tekintetében is.

A micro-rheológiai paraméterek pontos és reprezentatív módon történő meghatározásához azonban nélkülözhetetlenek a modern haemorheológiai laboratóriumi készülékeknek és az egyes laboratóriumi metodikáknak a különböző állatfajokra történő adaptációja és standardizációja.¹⁰²

Fontos kérdéskört jelent a vérvétel anatómiai lokalizációja (arterio-venosus, porto-cavalis, capillaris különbségek),^{55,65,133,135} a levett vérmennyiség élettani következményei⁸³ és a vérminta anticoagulálásához alkalmazott szer (heparin és K₃-EDTA eltérő micro-rheológiai hatásai).^{7,104} Kritikus fontosságú a vérvétel és a mérés között eltelt idő, és az *in vitro* tárolás hőmérsékletének haemorheológiai paraméterekre kifejtett hatása. Erre vonatkozóan metodikafüggő humán laboratóriumi adatok elérhetőek,^{147,162} azonban az állatkísérletekhez a különböző fajok vérmintáinak érzékenységeinek vonatkozásában kevés adat áll rendelkezésre.

A faji haemorheológiai különbségekről egyre több ismeret áll rendelkezésre (2.2. fejezet), azonban a laboratóriumi állatok nemi különbségei kevésbé ismertek. Humán vonatkozásban jól kimutathatóak a nemi haemorheológiai különbségek, amelyek szignifikánsak lehetnek.^{5,24,47,61,73,80} E kérdéskör vizsgálata a kísérletes modellekben kialakított csoportok nemi eloszlását tekintve fontos, ezért kezdtük meg ezen adatok szisztematikus gyűjtését és elemzését.

Az egyes mérőműszerek eltérő érzékenységgel mutathatnak ki változásokat a laboratóriumi állatfajok vérmintáiban.^{102,105} Az ektacytometriás méréseknél alkalmazott, kereskedelmi forgalomban is elérhető vagy elkészíthető PVP oldatok viszkozitása humán vonatkozásban jelentősen befolyásolhatja a vörösvérsejt deformabilitási méréseket (2.1.1.1. fejezet), azonban ennek mértéke függ az oldatok összetételétől.^{7,62,63} Állatkísérletes vonatkozásban nem ismertek erre vonatkozó összehasonlító adatok. Feltételezhető, hogy a mérésekhez alkalmazott PVP oldatok viszkozitásának növelésével a vörösvérsejt deformabilitás faji- és nemi különbségei is érzékenyebben kimutathatóak mind normál, mind az összehasonlító vizsgálatokhoz alkalmazott hőkárosított vörösvérsejtek vonatkozásában.¹⁰

Feltételezhető, hogy e mérés technikai körülményekből adódó különbségek megközelíthetők, vagy akár el is fedhetik a bemutatott pathophysiológiai folyamatokban kimutatható jelentős, gyakran szignifikáns haemorheológiai változások mértékét.

Összehasonlító vizsgálataink célkitűzéseit a fenti gondolatok alapján fogalmaztuk meg.

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. A laboratóriumi állatfajok közül a CD outbred patkány és az inbred beagle kutya fő haemorheológiai paramétereinek (teljes vér viszkozitás, plazma viszkozitás, vörösvérsejt deformabilitás és vörösvérsejt aggregatio) lehetséges nemi különbségeinek elemzését tűztük ki célul, a Sebészeti Műtéttani Tanszék haemorheológiai kutató-laboratóriumában vizsgált egészséges állatok alapadataiból.
2. Állatkísérletekben a vérminták tárolásának haemorheológiai vonatkozásairól kevés irodalmi adat érhető el, ezért vizsgálni kívántuk a rheológiai paraméterek különböző hőmérsékletű tárolás hatására bekövetkező lehetséges változásait a tárolási idő függvényében CD patkány és beagle kutya vérmintákban.
3. A vörösvérsejt deformabilitás korszerű meghatározására alkalmas slit-flow ektacytometriával különböző viszkozitású vörösvérsejt-szuszpendáló közegek alkalmazásával nyert adatok összehasonlító elemzését kívántuk elvégezni Sprague-Dawley patkányok és beagle kutyák faji- és nemi haemorheológiai különbségeinek érzékenyebb kimutathatósága céljából.
4. Az ép és a hőkezelt vörösvérsejtek deformabilitási paramétereinek összehasonlító vizsgálatait kívántuk elvégezni, a slit-flow ektacytometria érzékenységeinek különböző viszkozitású szuszpendáló közegek alkalmazása esetén történő meghatározásával Sprague-Dawley patkányok és beagle kutyák vérmintáin.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Nemi különbségek haematologiai és haemorheologiai elemzése laboratóriumi állatokon

4.1.1. Kísérleti állatok és vérvételi protokoll

Vizsgálataink során felnőtt, közép súlyú, hím és nőstény CD outbred patkányok és inbred beagle kutyák haemorheologiai paramétereit hasonlítottuk össze a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Sebészeti Műtéttani Tanszékének kutatási programjaiba vont állatai közül, az egészséges kontroll csoportok adatainak felhasználásával.

Az adatokat nyújtó kísérletek Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság (DE MÁB) által nyilvántartott engedélyszámai: 6/2000., 7/2006., 34/2007., 37/2007. DE MÁB.

A meghatározott paraméterek száma a laboratóriumi műszerpark folyamatos fejlesztése révén egyre bővült, ezért az összehasonlításban az egészséges kontroll állatok esetszámai az egyes haemorheologiai paraméterek kapcsán különbözőek, azokat az adott paraméter ismertetésénél pontosan feltüntettük.

A vérvételek beagle kutyáknál zárt rendszerben, Vacutainer® csövek használatával történtek a vena cephalica punctiójával 22 G-s vérvételi tűvel. Patkányok esetén a vérmintát fecskendővel nyertük a lateralis farok vena (24-26 G-s tű) punctiójával vagy általános anaesthesiában szív punctio (22 G-s tű) révén.

Haematologiai, vörösvérsejt aggregációs és ektacytometrián alapuló vörösvérsejt deformabilitási mérésekhez anticoagulánsként K₃-EDTA-t használtunk (kutya: 7,5%, 0,04 ml, BD Vacutainer® csövek; CD patkány: 1,5 mg/ml koncentrációban fecskendőben).

Vér viszkozitás és filtrometrián alapuló vörösvérsejt deformabilitási mérésekhez Na-heparin anticoagulánst használtunk (beagle kutya: 143 IU, BD Vacutainer®; CD patkány: 10-15 U/ml fecskendőben).

A fibrinogén koncentrációt Na-citráttal anticoagulált vérminták plazmájából határoztuk meg (kutya és patkány: 0,129 M, BD Vacutainer® csövek).^{7,21,66}

4.1.2. Haematologiai paraméterek meghatározása

A mennyiségi és minőségi haematologiai paramétereket Sysmex F-800 microcell counter-rel (TOA Medical Electronics Co., Ltd., Japán) határoztuk meg. A vizsgálatokhoz 70 µl anticoagulált vér szükséges. A berendezés a vérminta aspirációját követően fotometriás elven meghatározza a haemoglobin koncentrációt (Hgb [g/dl]), majd apertura-impedancia elven meghatározza a kvantitatív értékeket (leukocyták: ~30-300 fl, erythrocyták: ~25-250 fl, thrombocyták: ~2-30 fl). A gép által mért többi paraméter a fenti adatokból történik kalkuláció révén (II. táblázat).

A vér alakos elemeinek mérete nagymértékű fajspecifitása miatt^{35,48,57,64} a méréseink során figyelembe vettük a gyártó cég kutató-laboratóriumának ajánlását a sejtméret-tartományok beállításának vonatkozásában.⁹⁸

Összehasonlító vizsgálatainkhoz 82 hím és 86 nőstény beagle kutya, valamint 106 hím és 43 nőstény CD patkány adatait hasonlítottuk össze.

II. táblázat. A Sysmex F-800 haematologiai automatával meghatározott paraméterek

Főbb paraméterek	A készülék által használt rövidítés	Mértékegység
Fehérvérsejt szám	WBC	G/l
Vörösvérsejt szám	RBC	T/l
Haemoglobin koncentráció	Hgb	g/dl
Haematocrit	Hct	%
Átlagos vörösvérsejt térfogat (mean corpuscular volume)	MCV	fl
Átlagos vörösvérsejt haemoglobin tartalom (mean corpuscular hemoglobin)	MCH	pg
Átlagos vörösvérsejt haemoglobin koncentráció (mean corpuscular hemoglobin concentration)	MCHC	g/dl
Thrombocyta szám	Plt	G/l
Lymphocyta %	Lymph%	%
Monocyta+granulocyta %	Mo+Gr%	%
Átlagos thrombocyta térfogat (mean platelet volume)	MPV	fl

4.1.3. Haemorheologiai paraméterek vizsgálata

4.1.3.1. A teljes vér és plazma viszkozitás meghatározása

A teljes vér és plazma viszkozitást (TVV, PV [mPa.s]) Hevimet-40 kapilláris viszkoziméterrel (Hemorex Kft., Budapest) mértük.

A magyar fejlesztésű viszkoziméter két darab, egyenként 500 mm hosszúságú és 0,6 mm belső átmérőjű függőleges kapilláris mérőkamrából áll, melyek temperált olajfürdőbe vannak ágyazva, biztosítandó a mérések során az állandó 37 °C-ot. A mérésekhez 1 ml anticoagulált teljes vér vagy plazma szükséges.²¹

A viszkozitásmérések során a nyomás-gradienst a folyadéknak a hidrosztatikai nyomása biztosítja. A mérések kezdeti időpillanatában a berendezés opto-elektronikusan érzékeli a minta-folyadék meniscusának helyzetét, majd a minta kapillárisból történő kifolyásakor a süllyedő meniscus lokalizációját a cső fala mentén elhelyezkedő 40 pár fotodetektor rögzíti az idő függvényében. A berendezés a helyzet-idő adatokból egy folyási görbét rajzol, melyből szoftveres módon sebességértékeket rendel a különböző időpillanatokhoz. Ezt követően a sebességértékekből kalkulálja a mérőcső belső fala és a minta között keletkező sebesség-gradiens értékeket, melyekhez hozzárendeli az időpillanatnak megfelelő hidrosztatikai nyomásból származó nyírófeszültség értékeket. A két származtatott paraméter kalkulációjakor a szoftver figyelembe veszi a mintára beállított folyástani sajátságot (newtoni vagy nem-newtoni folyadék), majd a nyírófeszültség és a sebesség-gradiens hányadosaként kiszámítja az adott sebesség-gradienshez tartozó viszkozitásértéket [mPa.s].^{21,24}

Az összehasonlító elemzéshez 32 hím és 27 nőstény beagle kutya, valamint 20 hím és 12 nőstény CD patkány plazma viszkozitás és 90 s⁻¹ sebesség-gradiensnél mért vér viszkozitás adatait használtuk fel.

4.1.3.2. A fibrinogén koncentráció mérése

Sysmex CA-500 coagulometer (TOA Medical Electronics Co., Ltd., Japán) segítségével határoztuk meg a fibrinogén koncentrációt (Fbg [g/l]) Clauss módszere alapján.³⁷ Az automata módosított thrombinidő-meghatározási protokollal turbidimetriás elven méri a fibrinalvadék kialakulásának mértékét, és ebből kalkulálja a fibrinogén koncentrációt az alábbi mintaelőkészítési protokoll mellett: 10 µl plazma minta + 90 µl Owren puffer (Dade® CA System Buffer, Dade Behring GmbH, Németország) + 50 µl reagens (Fibri-Prest® Automate, Diagnostica Stago Co., Franciaország), 180 sec inkubálással.

Az összehasonlító vizsgálatokhoz 32 hím és 27 nőstény beagle kutya, illetve 20 hím és 12 nőstény CD patkány adatait használtuk.

4.1.3.3. A vörösvérsejt deformabilitás meghatározása

4.1.3.3.1. Filtrometria

A mérésekhez Carat FT-1 filtrométert (Carat Kft., Budapest) használtunk, mely a St. George's filtrometria technikáján alapszik.^{42,25}

A vizsgálatokhoz vörösvérsejtek normál foszfátpufferben (PBS; osmolaritás: 295 ± 5 mOsm/kg; pH: 7,4) elkészített 5%-os szuszpenziói szükségesek, melyek elkészítéséhez 1-1,5 ml vér szükséges. A vörösvérsejt-PBS szuszpenzió konstans negatív filtrációs nyomással (4 cmH₂O) 5 µm átlagos pórusméretű polycarbonát Nucleopore® filteren halad keresztül.²¹ A fotodetektorokkal történő helyzet-idő érzékelés alapján meghatározható filtrációs sebességből a kapcsolt szoftver kiszámolja a kezdeti relatív filtrációs ráta (initial relative filtration rate, IRFR) és a szuszpenzió haematocritjának ismeretében a relatív sejt-tranzitidő (relative cell transit time, RCTT) dimenzió nélküli viszonyszámokat.²⁴⁻²⁶

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

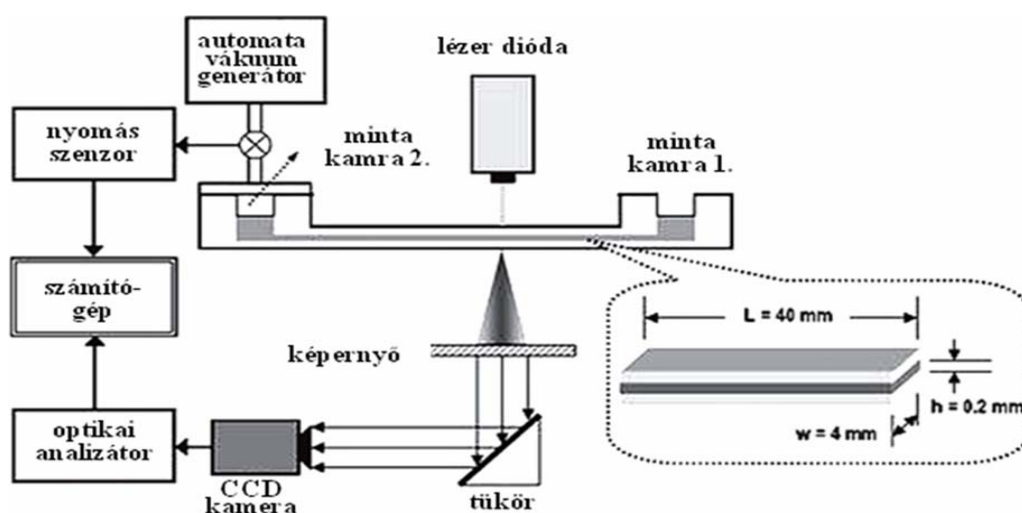
Az összehasonlító vizsgálatainkhoz 32 hím és 27 nőstény beagle kutya, valamint 20 hím és 12 nőstény CD patkány adatait használtuk.

4.1.3.3.2. Ektacytometria

A vörösvérsejt deformabilitás ektacytometriás méréséhez Rheoscan-D200 slit-flow ektacytometert (Sewon Meditech Inc., Dél-Korea) használtunk. A készülékben vákuum-generált nyírófeszültség (SS; 0,5-20 Pa) hatására 200-220 μm magasságú, 40 mm hosszúságú résben áramlik a minta (3. ábra). A mérés a nyíróerő hatására elongálódó vörösvérsejtekről szóródó laser diffrakciós mintázatának elemzésén alapul.^{62,129,130}

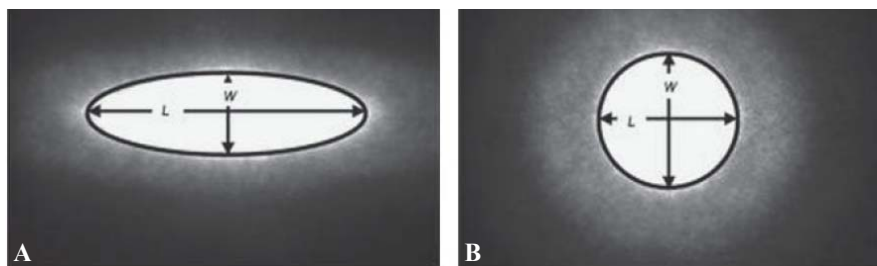
A biztonságosan kivitelezhető mérések 6 μl anticoagulált teljes vérmintával biztosíthatóak. A mintaelőkészítés során a 6 μl mintát 600 μl , magas -általában 20 mPa.s feletti- viszkozitású, isotoniás polyvinyl-pyrrolidon (PVP, 360 kDa) oldatba mértük. A magas viszkozitású közegre azért van szükség, hogy a mérések során az alkalmazott nyírófeszültség sejtekre történő átadása megtörténjen, lehetővé téve azok elongációját.⁶²

A készülék a laser-diffractogram elemzésével határozza meg a vörösvérsejtek elongációs index (EI) értékét adott nyírófeszültség (SS) érték mellett (4. ábra), és az EI értékkel a vörösvérsejtek deformabilitásának mértéke jellemezhető. Az EI a sejt deformálhatóságával arányosan nő.



3. ábra

A slit-flow ektacytometer működési elve^{62,130}



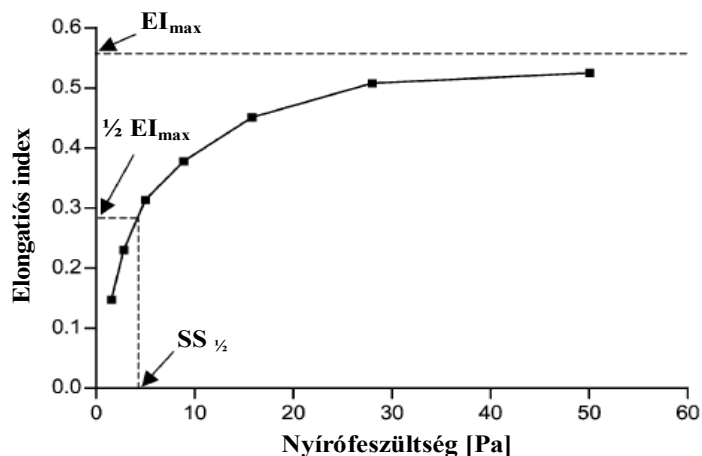
4. ábra

Laser diffraktós mintázat 20 Pa **(A)** és 0,3 Pa **(B)** nyírófeszültségnél⁶²
 L: a deformált sejtek hosszúsága, W: a szélessége. Az elongációs index (EI) = (L-W)/(L+W)

Az EI értékek jellegzetes mintázatot írnak le az SS függvényében. Az EI-SS görbék összehasonlíthatóságához a 3 Pa-nál mért EI értékeket elemeztük, továbbá a görbék könnyebb és számszerűsített összehasonlíthatóságához Lineweaver-Burk analízissel meghatároztuk a maximális elongációs index (EI_{max}) és az ennek feléhez tartozó nyírófeszültség ($SS_{1/2}$ [Pa]) értékeket is (5. ábra):^{11,13}

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

Az $SS_{1/2}$ érték növekszik a vörösvérsejt deformabilitás csökkenésével.^{7,11,13}



5. ábra

Az elongációs index (EI) - nyírófeszültség (SS) görbék parametrizálása¹³
 EI_{max} = az elméleti maximális elongációs index; $SS_{1/2}$ = nyírófeszültség a maximális deformatio felénél

Az összehasonlító vizsgálatainkhoz 24 hím és 22 nőstény beagle kutya, valamint 15 hím és 18 nőstény CD patkány adatait használtuk.

4.1.3.4. A vörösvérsejt aggregatio meghatározása

A mérésekhez Myrenne MA-1 erythrocyta aggregometert (Myrenne GmbH, Németország) használtunk. A vörösvérsejt aggregatio folyamatának mérése a Schmid-Schönbein által leírt módszer alapján, fénytranszmissziós elven történik.¹²⁷

A berendezés nem hőkontrollált, vizsgálatainkat szobahőmérsékleten (22 ± 1 °C) végeztük. A mérésekhez 20 µl anticoagulált vérminta szükséges.

A készülék vérmintát befogadó része egy átlátszó üveg tárgylemezből és a sebesség-gradienst létrehozó rotor által forgatott, 2°-os csiszolt üveg lencséből áll. A tárgylemez felett infravörös dióda, a lencse alatt egy infravörös detektor helyezkedik el.

M és M1 módban a tárgylemez és a kúp közé helyezett 20 µl vérmintát 600 s^{-1} sebesség-gradienssel néhány másodpercig disaggregálja a készülék, majd a sebesség-gradiens hirtelen nullára (M mód) vagy igen alacsony értékre, 3 s^{-1} -ra (M1 mód) csökken, miközben a vérminta fénytranszmissziójának megváltozása alapján aggregációs indexet számít az aggregációs folyamat 5., illetve 10. másodpercében. Fokozott aggregatio esetén mind az M, mind az M1 emelkedik.^{7,127}

Az összehasonlító vizsgálatainkhoz 18 hím és 42 nőstény beagle kutya, valamint a 38 hím és 18 nőstény CD patkány adatait használtuk.

4.1.4. Statisztikai analízis

A bemutatott eredményeket átlag $\pm$ szórás (átlag $\pm$ S.D.), továbbá median és 25/75 percentilis értékek formájában adtuk meg. Az összehasonlításhoz Student t-próbát vagy Mann-Whitney rank sum tesztet végeztünk az adatok normalitása alapján. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.¹⁶⁰

4.2. A tárolási idő és hőmérséklet hatása laboratóriumi állatok vérmintáinak haematologiai és haemorheologiai paramétereire

4.2.1. Kísérleti állatok és mintavétel

Kísérleteinket az 1998. évi XXVIII., „Az állatok védelméről és kíméletéről” alkotott törvény előírásait betartva végeztük, a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság (DE MÁB) által 37/2007. számon nyilvántartásba vett, a Hajdú-Bihar megyei Állategészségügyi- és Élelmiszer Ellenőrzési Állomás által kiadott hatósági engedéllyel.

A vizsgálatokba egészséges nőtény CD outbred patkányokat (n=5, testsúly: 329 ± 83 g) és beagle kutyákat (n=5, testsúly: $12,1 \pm 2,13$ kg) vontunk be.

Patkányoktól általános anaesthesiában (Na-pentobarbital, 35 mg/kg, i.p.) szív punctio révén, beagle kutyáktól a vena cephalica punctiójával zárt rendszerben 6-8 ml vérmintát vettünk állatonként, K₃-EDTA-t tartalmazó vérvételi csövekbe (7,5% 0,04 ml, BD Vacutainer®). Beagle kutyáktól további 6 ml vért vettünk Na-heparint tartalmazó vérvételi csövekbe (143 IU, BD Vacutainer®) a viszkozitási vizsgálatokhoz.

4.2.2. Tárolási és mintaelőkészítési protokoll

A vérmintákat egyenként 10 részre osztottuk. Hét részmintát szobahőmérsékleten tároltunk (22-23 °C) légkondicionált laboratóriumunkban, és a haemorheologiai paraméterek meghatározását az alábbi időpontokban végeztük: 0. óra (10-15 perccel a vérvétel után), majd 2, 4, 6, 24, 48, 72 órákat követően.

A maradék három almintát a laboratóriumok közötti mintaszállítás lehetőségének körülményeit szimulálva nedves jégen tároltuk egy zárt dobozban. A jeget nylon zacskóban helyeztük el, melyen a mintákat tartó állvány állt, így elkerülhettük a minták közvetlen érintkezését a jéggel. A zárt dobozban a hőmérsékletet a vizsgálat teljes időtartama alatt folyamatosan monitoroztuk (0. óra: 4,4 °C; 24. óra: 6,1 °C; 48. óra: 6,8 °C; 72. óra: 9,8 °C).

A méréseket a mintavételt követően 24, 48, és 72 órával végeztük. A laboratóriumi méréseket megelőzően a mintákat 20 percre szobahőmérsékletre helyeztük.

4.2.3. Laboratóriumi mérések

A haematologiai paramétereket a 4.1.2. fejezetben leírtaknak megfelelően Sysmex F-800-as haematologiai automatával határoztuk meg mindegyik vérminta valamennyi almintájából. Az eredmények közül az átlagos vörösvérsejt térfogat (mean cell volume, MCV [fl]) változásának értékeit ismertetjük.

A teljes vér és plazma viszkozitás meghatározás a 4.1.3.1. fejezetben bemutatott Hevimet-40 kapilláris viszkoziméterrel történt. A méréseket csak a beagle kutyák hűtve tárolt mintái esetén végeztük, mert patkányoknál nem volt biztosítható a vizsgálatokhoz elegendő vérmennyiség. A beagle kutyák hűtve tárolt vérmintáin a vörösvérsejt deformabilitás filtrimetriás meghatározására (IRFR, RCTT) is lehetőség volt (4.1.3.3.1. fejezet).

Ektacytometriás elven (Rheoscan-D200 slit-flow ektacytometer) a K_3 -EDTA-val anticoagulált szobahőmérsékleten vagy hűtve tárolt vérmintákból kerültek meghatározásra a vörösvérsejt deformabilitást leíró elongációs index (EI) értékek, majd az EI-SS görbék parametrizálását végeztük el a 4.1.3.3.2. fejezetben leírtak szerint.

A vörösvérsejtek aggregációjának vizsgálata Myrenne MA-1 aggregometerrel a 4.1.3.4. fejezetben leírtaknak megfelelően történt.

4.2.4. Statisztikai analízis

Az eredményeket átlag $\pm$ szórás (átlag $\pm$ S.D.) formájában adtuk meg. A változások elemzését a friss vérminták 0. órájához viszonyítva egyirányú ANOVA teszttel (Dunn- és Bonferroni-módszer), a szobahőmérsékleten és hűtve tárolt minták vizsgált paraméterei között jelentkező különbségek elemzését Student t-próbával vagy Mann-Whitney rank sum teszttel végeztük az adateloszlás normalitása szerint, $p < 0,05$ szignifikancia szint mellett.¹⁶⁰

4.3. Különböző viszkozitású szuszpendáló oldatok hatása laboratóriumi állatok vörösvérsejt deformabilitás mérésének érzékenységére

4.3.1. Nemi különbségek további ektacytometriás vizsgálatai

4.3.1.1. Kísérleti állatok és mintavétel

Kísérleteinket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság (DE MÁB) által 37/2007. számon nyilvántartásba vett hatósági engedéllyel végeztük 10 hím ($455,6 \pm 38,1$ g) és 10 nőstény ($284,8 \pm 14,3$ g) egészséges, 8 hónapos Sprague-Dawley (SD) patkány, továbbá 10 hím ($12,9 \pm 1,6$ kg) és 10 nőstény ($12,3 \pm 2,3$ kg), egészséges, 3-4 éves beagle kutya bevonásával.

A vérvételek a reggeli órákban (8 és 10 óra között) történtek. Patkányok esetén a lateralis farok vena 26 G-s tűvel történő punctiójával 0,5 ml vérmintát vettünk Na-EDTA-t (1,5 mg/ml) tartalmazó a fecskendőbe. Kutyák esetén a vérvétel zárt vérvételi rendszerben történt a vena cephalica punctiója révén (K₃-EDTA, 7,5% 0,04 ml; BD Vacutainer[®]).

Mindegyik vérminta ektacytometriás vörösvérsejt deformabilitási vizsgálatát párhuzamosan elvégeztük három, különböző viszkozitású polyvinyl-pyrrolidon (PVP) oldat használatával.

4.3.1.2. Mintaelőkészítés és vörösvérsejt deformabilitás mérés

Normál foszfát puffer (PBS) felhasználásával 14,57; 20,11 és 30,51 mPa.s viszkozitású polyvinyl-pyrrolidon (PVP, 360 kDa; Sigma Aldrich Co.) oldatokat készítettünk. A továbbiakban 15, 20 és 30 mPa.s viszkozitású PVP-PBS oldatokként kerülnek említésre. Az oldatok osmolaritása 295-327 mOsmol/kg, a pH értékük 7,34-7,37 volt.

A további mintaelőkészítés és a vörösvérsejt deformabilitás meghatározása a 4.1.3.3.2. fejezetben leírtak szerint történt.

4.3.2. Ektacytometriás mérések érzékenységének vizsgálata laboratóriumi állatok hőkezelt vörösvérsejtjeivel

4.3.2.1. Kísérleti állatok és mintavétel

A 37/2007. DEMÁB számon nyilvántartásba vett hatósági engedéllyel vizsgálatainkhoz 8 nőstény, egészséges Sprague-Dawley patkányt (testsúly: $334 \pm 55,8$ g, testhőmérséklet: $38,4 \pm 0,34$ °C) és 8 nőstény, egészséges beagle kutyát (testsúly: $11,05 \pm 1,41$ kg, testhőmérséklet: $38,5 \pm 0,25$ °C) vontuk be.

Patkányok esetén a vérvétel általános anaesthesiában történt (Na-thiopenthal 60 mg/kg, i.p., Thiopenthal[®], Biochemie GmbH, Ausztria): median laparotomiát végeztünk, majd 26 G-s tű és a hozzá csatlakoztatott anticoagulanst (Na-EDTA, 1,5 mg/ml) tartalmazó fecskendő segítségével 1,5 ml vérmintát vettünk a vena cava caudalis punctiója révén. A vérvételt követően az állatokat exsanguináltuk.

Beagle kutyáktól a vena cephalica punctiójával zárt vérvételi rendszerrel vettük a vért (K₃-EDTA, 7,5% 0,04 ml; BD Vacutainer[®]).

4.3.2.2. Mintaelőkészítés és hőkezelés

A natív vérminták ektacytometriás vizsgálata után a mintákat 1000 g erővel 10 percig 15 °C-on centrifugáltuk, majd a vörösvérsejteket normál PBS-sel kétszer mostuk (700 g, 10 perc, 15 °C).

A mosott vörösvérsejtekből 10% haematocrit értékű vörösvérsejt-PBS szuszpenziókat készítettünk. Mindegyik szuszpenzióban ektacytometriás módszerrel meghatároztuk a vörösvérsejt deformabilitást. Ezt követően a szuszpenziókat 48 °C-os vízfürdőbe helyeztük 9 percig, miközben a mintákat enyhén mozgattuk.¹⁰

A hőkezelést követően a mintákat azonnal szobahőmérsékletre (22 °C) hűtöttük, majd újra meghatároztuk a minták vörösvérsejt deformabilitását.

4.3.2.3. Haematologiai és morphologiai vizsgálatok

A natív és a vörösvérsejt-PBS szuszpenziók haematologiai paraméterei közül a haematocrit (Htc [%]) és a vörösvérsejt átlagos térfogat (MCV [fl]) értékeket elemeztük.

A vörösvérsejt-PBS szuszpenziókban a hőkezelés hatására bekövetkező vörösvérsejt morphologiai változások megfigyelésére a mintákat zsírtalanított tárgylemezre cseppentettük, majd fedőlappal borítottuk. A vizsgálatához Nikon Eclipse E200 mikroszkópot használtunk hozzacsatlakoztatott Nikon CoolPix 4500 fényképezőgéppel.

4.3.2.4. A vörösvérsejt deformabilitás meghatározása

A natív minták, a normál és hőkezelt vörösvérsejt-PBS szuszpenziók vörösvérsejt deformabilitás meghatározása a 4.1.3.3.2. fejezetben leírtak szerint történt, párhuzamosan 15, 20 és 30 mPa.s viszkozitású PVP-PBS szuszpenziós oldatok alkalmazásával.

4.3.2.5. Statisztikai analízis

Az adatokat átlag $\pm$ szórás (S.D.) formájában tüntettük fel.

A 15, 20 és 30 mPa.s viszkozitású PVP médiumok használatával meghatározott eredmények értékeinek -csoporton belüli- összehasonlításához egyirányú ANOVA tesztet használtunk (Dunn- és Bonferroni-módszer).

A hím és nőstény állatok eredményei közötti különbséget az adateloszlás normalitásának függvényében Student t-próbával vagy Mann-Whitney rank sum tesztel elemeztük. Mindkét faj hím és nőstény állatainál megadtuk a variációs koefficiens (CV%).

A natív minták és a vörösvérsejt-PBS szuszpenziók eredményeinek összehasonlításához Student t-próbát vagy Mann-Whitney rank sum tesztet használtunk. A hőkezelés előtti és utáni eredmények összehasonlítása a normalitás alapján páros t-próbával vagy Wilcoxon signed rank tesztel történt.

A szignifikancia szintet $p < 0,05$ értéknél állítottuk be.

A hőkezelés előtt és után mért adatok vonatkozásában kiszámításra került a standardizált differencia értéke is. A normál sejtek és a hőkezelt, rigidebb vörösvérsejtek deformálhatósága közötti különbség jól kimutatható.

Minél nagyobb ez a különbség adott műszer esetén, annál érzékenyebb maga a készülék. Az erre szolgáló összehasonlító paraméter a Cohen-módszer szerint kalkulált *standardizált differencia*.^{10,137}

$$\text{standardizált differencia} = \text{átlag}_{\text{kontroll}} - \text{átlag}_{\text{kezelt}} / \text{„pooled” S.D.}$$

A „pooled”, azaz összegzett S.D.: a kontroll és a kezelt adatok négyzetre emelt standard deviáció értékeinek átlagából vont négyzetgyök.¹³⁷

5. EREDMÉNYEK

5.1. Nemi különbségek haematologiai és haemorheologiai elemzése laboratóriumi állatokon

5.1.1. Haematologiai paraméterek

A mennyiségi és minőségi haematologiai paramétereket a III. táblázat foglalja össze.

A fehérvérsejt szám (Fvs [$\times 10^3/\mu\text{l}$]) patkányok esetén szignifikáns nemi különbséget jelzett, a hímeknél magasabb értékeket mutatva. Beagle kutyák tekintetében nem volt nyilvánvaló nemi különbség.

A thrombocyta szám (Thr [$\times 10^3/\mu\text{l}$]) mindkét vizsgált állatfajnál a nőstény állatokban mutatkozott magasabbnak, amely patkányok esetén bizonyult szignifikánsnak.

A vörösvérsejt szám (Vvs [$\times 10^6/\mu\text{l}$]) mindkét fajnál a hímeknél volt szignifikánsan nagyobb, emelkedett haematocrit értékek (Htc [%]) mellett.

A haemoglobin koncentráció (Hgb [g/dl]) és az átlagos vörösvérsejt térfogat értékekben (MCV [fl]) nem tapasztaltunk szignifikáns nemi különbségeket.

Az átlagos corpuscularis haemoglobin tartalom (MCH [pg]) szignifikánsan nagyobb volt mindkét faj nőstény állataiban. Az átlagos corpuscularis haemoglobin koncentráció (MCHC [g/dl]) azonban csak a beagle kutyáknál mutatott magasabb értékeket a nőstény állatokban, szignifikáns mértékű nemi különbséget jelezve (III. táblázat).

5.1.2. Haemorheologiai paraméterek

5.1.2.1. Teljes vér és plazma viszkozitás

A 90 s^{-1} sebesség-gradiensnél mért teljes vér viszkozitás értékek (TVV [mPa.s]) patkányoknál a nőstényeknél voltak magasabbak, de nem érték el a szignifikancia szintet. Beagle kutyák esetén a hímek mutattak kismértékben magasabb vér viszkozitás értékeket.

A plazma viszkozitás (PV [mPa.s]) a nőstény patkányokban volt szignifikánsan magasabb a hímekhez képest, a szignifikánsan magasabb fibrinogén koncentráció (Fbg [g/dl])

mellett. Beagle kutyák hím és nőstény egyedeiben mind a plazma viszkozitás, mind a fibrinogén koncentráció hasonló volt (IV. táblázat).

III. táblázat: Hím és nőstény CD patkányok és beagle kutyák haematologiai paraméterei

Paraméter	Faj	Hímek	Nőstények	p érték
Fvs [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	CD patkány	6,52 $\pm$ 2,78 6,2 (4,4/8,45)	5,26 $\pm$ 2,3 5,31 (3,37/6,93)	0,003
	Beagle kutya	10,59 $\pm$ 2,39 10,2 (8,9/11,92)	11,05 $\pm$ 2,31 11,8 (9,05/12,9)	n.s.
Thr [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	CD patkány	739,6 $\pm$ 268,7 755,5 (622/886)	850,6 $\pm$ 314,1 810 (627/1087)	n.s.
	Beagle kutya	397,6 $\pm$ 148,9 389 (299/491,5)	443,8 $\pm$ 122,1 486,5 (375/521)	0,001
Vvs [$\times 10^6/\mu\text{l}$]	CD patkány	7,79 $\pm$ 1,55 7,89 (7,16/8,81)	6,77 $\pm$ 1,81 7,2 (6,21/7,8)	<0,001
	Beagle kutya	6,75 $\pm$ 0,94 6,76 (6,2/7,34)	6,53 $\pm$ 0,63 6,56 (6,09/6,99)	0,015
Hgb [g/dl]	CD patkány	12,22 $\pm$ 2,25 12,3 (11,25/13,65)	11,77 $\pm$ 1,53 11,77 (10,7/12,5)	n.s.
	Beagle kutya	14,27 $\pm$ 1,81 14,35 (12,9/15,5)	14,19 $\pm$ 1,22 14 (13,3/15)	n.s.
Htc [%]	CD patkány	43,55 $\pm$ 6,67 43,8 (40,57/47,8)	41,44 $\pm$ 5,79 41,7 (38,07/44,25)	0,001
	Beagle kutya	48,48 $\pm$ 6,01 47,7 (43,97/53,07)	46,28 $\pm$ 5,6 46,4 (43,02/50,47)	0,007
MCV [fl]	CD patkány	56,61 $\pm$ 5,98 55,7 (53,55 /57,95)	56,69 $\pm$ 2,69 56,3 (54,65/57,97)	n.s.
	Beagle kutya	71,01 $\pm$ 3,49 71,1 (68,3/73,35)	71,54 $\pm$ 2,36 71,4 (69,6/73,7)	n.s.
MCH [pg]	CD patkány	15,74 $\pm$ 0,96 15,7 (15,2/16,3)	16,14 $\pm$ 1,01 16,2 (15,62/16,7)	0,002
	Beagle kutya	20,97 $\pm$ 1,57 21,1 (20,15/22,2)	21,76 $\pm$ 1,08 21,75 (20,85/22,6)	<0,001
MCHC [g/dl]	CD patkány	27,94 $\pm$ 1,98 28,2 (27,2/29,2)	28,51 $\pm$ 1,71 28,7 (27,7/29,8)	n.s.
	Beagle kutya	29,54 $\pm$ 1,79 29,7 (28,7/30,6)	30,46 $\pm$ 1,21 30,65 (29,5/31,4)	<0,001

átlag $\pm$ S.D.

median (25% / 75%)

CD patkány: hím n=106, nőstény n=43; beagle kutya: hím n=82, nőstény n=86

n.s. = nem szignifikáns

IV. táblázat: Hím és nőstény CD patkányok és beagle kutyák teljes vér viszkozitás, plazma viszkozitás, fibrinogén koncentráció értékei és filtrációs paraméterei

Paraméter	Faj	Hímek	Nőstények	<i>p</i> érték
TVV [mPa.s] (90 s ⁻¹)	<i>CD patkány</i>	6,03 ± 1,71 5,6 (4,61/6,98)	6,34 ± 0,77 6,34 (5,47/6,94)	n.s.
	<i>Beagle kutya</i>	4,53 ± 1,13 4,29 (3,66/5,06)	4,41 ± 1,07 4,0 (3,64/4,87)	n.s.
PV [mPa.s]	<i>CD patkány</i>	1,22 ± 0,18 1,22 (1,07/1,34)	1,49 ± 0,17 1,44 (1,35/1,52)	0,011
	<i>Beagle kutya</i>	1,19 ± 0,19 1,11 (1,04/1,3)	1,20 ± 0,27 1,08 (1,02/1,22)	n.s.
Fbg [g/dl]	<i>CD patkány</i>	1,52 ± 0,43 1,29 (1,25/1,53)	1,87 ± 0,08 1,88 (1,76/1,94)	n.s.
	<i>Beagle kutya</i>	2,03 ± 0,32 2,01 (1,77/2,29)	2,04 ± 0,54 1,96 (1,68/2,24)	n.s.
RCTT	<i>CD patkány</i>	3,71 ± 0,73 3,67 (2,78/4,02)	3,63 ± 0,54 3,66 (2,91/3,99)	n.s.
	<i>Beagle kutya</i>	4,62 ± 1,15 4,54 (3,82/5,15)	4,22 ± 1,31 3,97 (3,48/4,53)	n.s.
IRFR	<i>CD patkány</i>	0,883 ± 0,026 0,882 (0,869/0,899)	0,878 ± 0,024 0,874 (0,859/0,892)	n.s.
	<i>Beagle kutya</i>	0,841 ± 0,065 0,843 (0,827/0,870)	0,846 ± 0,033 0,861 (0,828/0,876)	n.s.

átlag ± S.D.

median (25% / 75%)

CD patkány: hím n=20, nőstény n=12; beagle kutya: hím n=32, nőstény n=27

TVV = teljes vér viszkozitás; PV = plazma viszkozitás; Fbg = fibrinogén koncentráció

RCTT = relative cell transit time (relatív sejt-tranzitidő)

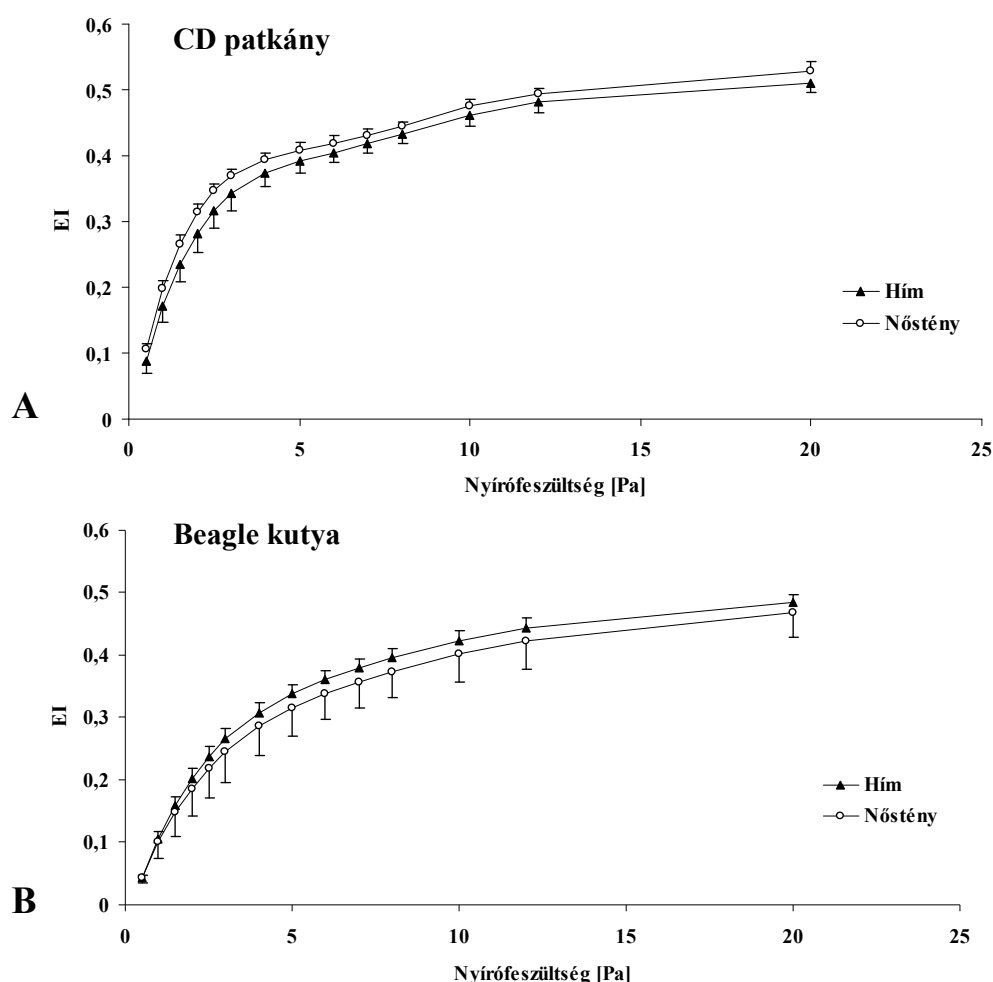
IRFR = initial relative filtration rate (kezdeti relatív filtrációs ráta)

n.s. = nem szignifikáns

5.1.2.2. Vörösvérsejt deformabilitás

A vörösvérsejt-PBS szuszpenziók filtrációs paraméterei nem mutattak szignifikáns különbségeket a nemek között, bár mindkét faj esetén a nőstényeknek enyhén alacsonyabb volt a relatív sejt-tranzitidő (RCTT) értéke a hím állatokkal összevetve, kismértékben jobb vörösvérsejt deformabilitásra utalva. A nemenkénti átlagértékek különbsége CD patkányoknál 2,2%, míg beagle kutyáknál 8,7%-nak felelt meg (IV. táblázat).

Az ektacytometer használatával kifejezettebb nemi különbségeket találtunk. CD patkányoknál a nőstények rendelkeztek jobb, vagyis magasabb elongációs index (EI) értékekkel, míg beagle kutyáknál a hímekben találtunk magasabb EI értékeket (6. ábra).



6. ábra

Az elongációs index (EI) értékek a nyírófeszültség (SS [Pa]) függvényében hím és nőstény CD patkányokban (A) és beagle kutyákban (B).

CD patkány: hím n=15, nőstény n=18; beagle kutya: hím n=24, nőstény n=22
átlag $\pm$ S.D.

Az EI-SS görbék összehasonlítására alkalmas paramétereket az V. táblázat foglalja össze. Patkányokban a 3 Pa nyírófeszültségnél mért EI értékek szignifikánsan magasabbak voltak a nőstények esetén, míg az EI_{max} értéke nem mutatott szignifikáns nemi eltérést. Az

SS_{1/2} [Pa] értékek alacsonyabbak voltak a nőstényekben, bár a különbség nem érte el a szignifikáns mértéket.

Beagle kutyák esetén az összehasonlító paraméterek is arra utaltak, hogy a patkányokkal ellentétben, a hímek rendelkeztek jobb vörösvérsejt deformabilitási mutatókkal, bár a különbség nem érte el a szignifikáns szintet.

V. táblázat: Hím és nőstény CD patkány és beagle kutya elongatiós index (EI)-nyírófeszültség (SS) görbéinek összehasonlító paraméterei

Paraméter	Faj	Hímek	Nőstények	p érték
EI 3 Pa-nál	CD patkány	0,343 ± 0,025 0,343 (0,323/0,362)	0,357 ± 0,017 0,360 (0,342/0,371)	0,015
	Beagle kutya	0,339 ± 0,014 0,336 (0,330/0,352)	0,335 ± 0,012 0,336 (0,326/0,345)	n.s.
EI _{max}	CD patkány	0,570 ± 0,026 0,569 (0,550/0,580)	0,566 ± 0,018 0,567 (0,555/0,580)	n.s.
	Beagle kutya	0,565 ± 0,012 0,566 (0,557/0,573)	0,564 ± 0,013 0,566 (0,559/0,573)	n.s.
SS _{1/2} [Pa]	CD patkány	2,3 ± 0,6 2,06 (1,89/2,49)	2,02 ± 0,36 1,9 (1,75/2,34)	n.s.
	Beagle kutya	2,18 ± 0,28 2,2 (2,01/2,37)	2,25 ± 0,24 2,27 (2,06/2,43)	n.s.

átlag ± S.D.

median (25% / 75%)

CD patkány: hím n=15, nőstény n=18; beagle kutya: hím n=24, nőstény n=22

EI = elongatiós index; EI_{max} = maximális EI; SS_{1/2} = az EI_{max} feléhez tartozó nyírófeszültség érték

n.s. = nem szignifikáns

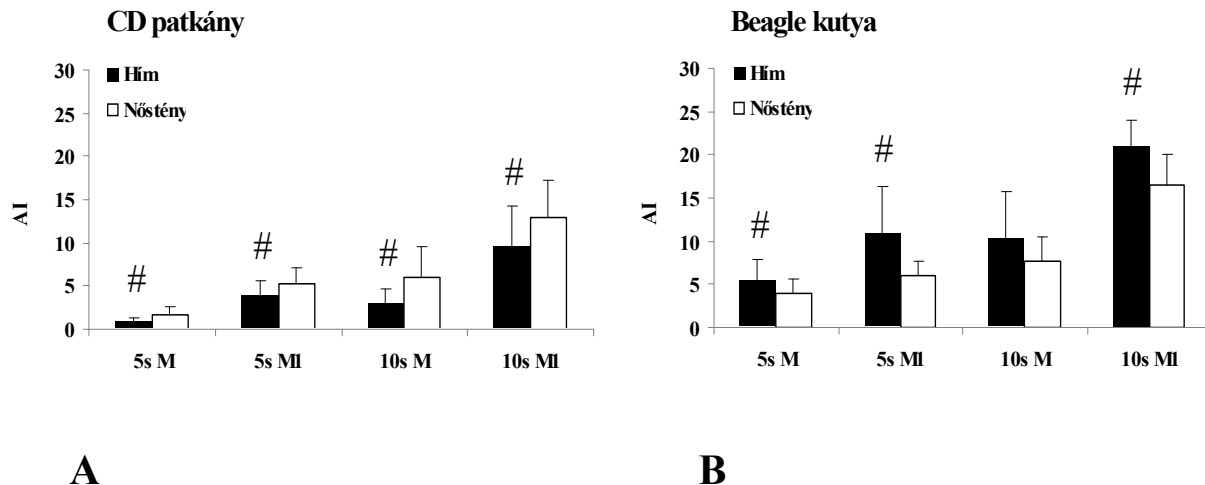
5.1.2.3. Vörösvérsejt aggregatio

Patkányoknál a vörösvérsejt aggregációs index értékek várható közép és 25/75 percentilis értékei 5 secundummal a disaggregatiót követően (M érték, 0 s⁻¹ sebesség-gradiens mellett) hímeknél 0,9 (0,62/1,1), nőstényeknél 1,6 (1,04/2,45) értékeket mutatott (77,8%-os különbség). Az M1 paraméter esetén (3 s⁻¹ sebesség-gradiens mellett) a hímeknél 3,8 (2,8/4,9), nőstényeknél 4,75 (3,3/7,1) értékeket mértünk (25%-os különbség). A 10 secundum

üzem módban mért M paraméter hímeknél 2,7 (1,7/3,7), nőstényeknél 5,05 (3,48/8,0) volt (87%-os eltérés). Az M1 paraméter hímeknél 9,5 (5,5/12,9), nőstényeknél 12,95 (9,0/16,6) értékeket jelzett (36,3%-os különbség) (7. A ábra).

Beagle kutyáknál az 5 secundos vörösvérsejt aggregációs index M paraméter hímekben 5,85 (3,7/7,25), nőstényekben 3,6 (2,6/5,4) értéket adott (39,5%-os eltérés), míg az M1 paraméter értékei hímekben 10,8 (7,5/13,2), nőstényekben 6,3 (4,75/7,3) volt (41,7%-os különbség). A 10 secundos M értékek hímeknél 7,45-nek (5,85/16,3), nőstényeknél 7,75-nek (4,95/9,1) bizonyultak (4%-os eltérés), míg az M1 paraméter hímeknél 20,3 (19,05/23,7), nőstényeknél 16,95 (13,75/18,7) értékeket adott (16,5%-os különbség) (7. B ábra).

Összességében CD patkányoknál a nőstények rendelkeztek magasabb aggregációs index értékkel, míg beagle kutyák esetén a hímeknél mértünk nagyobb értékeket.



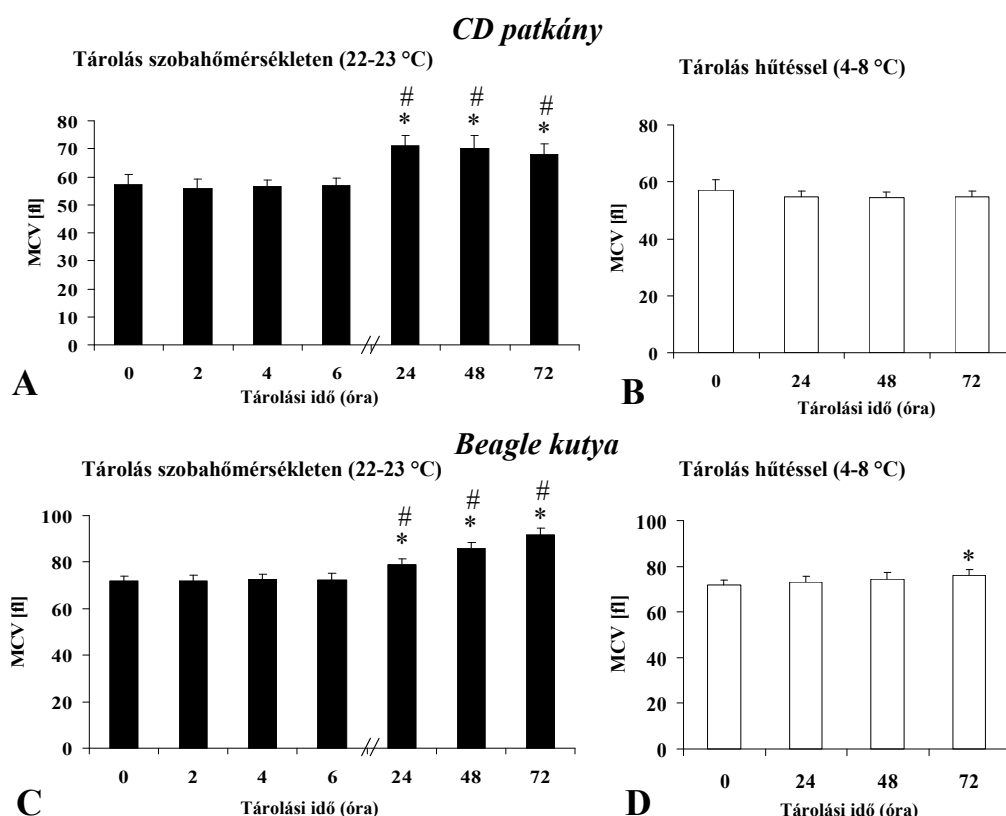
7. ábra
Hím és nőstény CD patkányok (A) és beagle kutyák (B)
vörösvérsejt aggregációs index (AI) M és M1 értékek
5 és 10 másodperces (s) üzemmódban mérve
CD patkány: hím n=38, nőstény n=18; beagle kutya: hím n=18, nőstény n=42
átlag ± S.D. # p<0,05 vs. nőstény

5.2. A tárolási idő és hőmérséklet hatása laboratóriumi állatok vérmintáinak haematologiai és haemorheologiai paramétereire

5.2.1. Haematologiai paraméterek

A haematologiai paraméterek közül a vörösvérsejt átlagos térfogat (MCV [fl]) értékek szobahőmérsékleten való tárolás esetén az első 6 órán belül egyik faj vérmintájában sem mutattak jelentős változást. 24 óra elteltével mindkét fajnál nőtt az MCV értéke, patkányoknál 25%-kal (8. A ábra). A beagle kutyák MCV értéke 24 óra elteltével is folyamatosan nőtt a vizsgálati időtartam alatt (24 óra: 9%, 48 óra: 19%, 72 óra: 28%) (8. C ábra).

Hűtéssel történt tárolásnál az MCV értékének növekedése mindkét állatfajnál kiküszöbölhető volt a vizsgált 72 óra alatt, bár kutyák esetén 72 óra elteltével 5%-os emelkedést tapasztaltunk (8. B és D ábrák).



8. ábra

CD patkányok (A,B) és beagle kutyák (C,D) szobahőmérsékleten és hűtve tárolt vérmintáinak átlagos vörösvérsejt térfogat (MCV) változásai a tárolási idő függvényében
 átlag $\pm$ S.D. * $p < 0,05$ vs. alapérték (0. óra); # $p < 0,05$ vs. hűtés
 CD patkány: $n=5$; beagle kutya: $n=5$

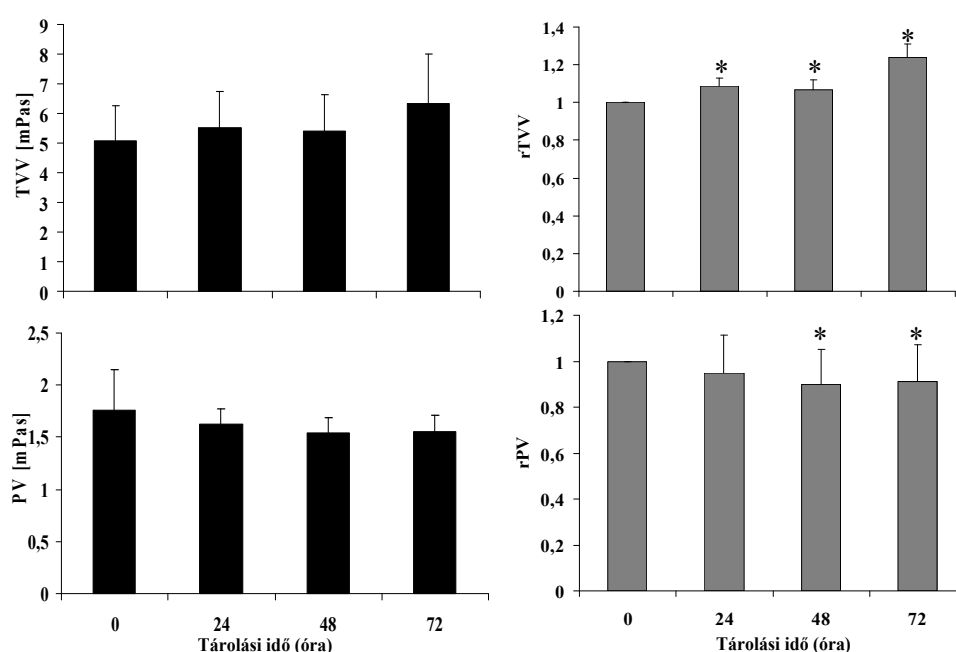
5.2.2. Haemorheológiai paraméterek

5.2.2.1. Teljes vér és plazma viszkozitás

A viszkozitás méréseket a szükséges vérminta mennyiség miatt csak a beagle kutyák hűtéssel tárolt mintáinál lehetett elvégezni.

A teljes vér viszkozitásában a hűtés biztosításával történő tárolás esetén már 24 óra elteltével emelkedést tapasztaltunk, amely a relatív értékek (alapértékhez viszonyított változás) esetében szignifikáns mértékű volt (9. ábra).

A plazma viszkozításban ellentétes irányú tendenciát figyelhattunk meg, amely a relatív értékek tekintetében 48 óra elteltével mutatott szignifikáns csökkenést.



9. ábra

Beagle kutyák hűtve tárolt vérmintáinak
teljes vér viszkozitás (TVV) és plazma viszkozitás (PV) értékeinek
abszolút és relatív változásai a tárolási idő függvényében
átlag $\pm$ S.D. * $p < 0,05$ vs. alapérték (0. óra); $n=5$
 $rTVV$ és rPV = a TVV, illetve a PV értékek alaphoz viszonyított változásai

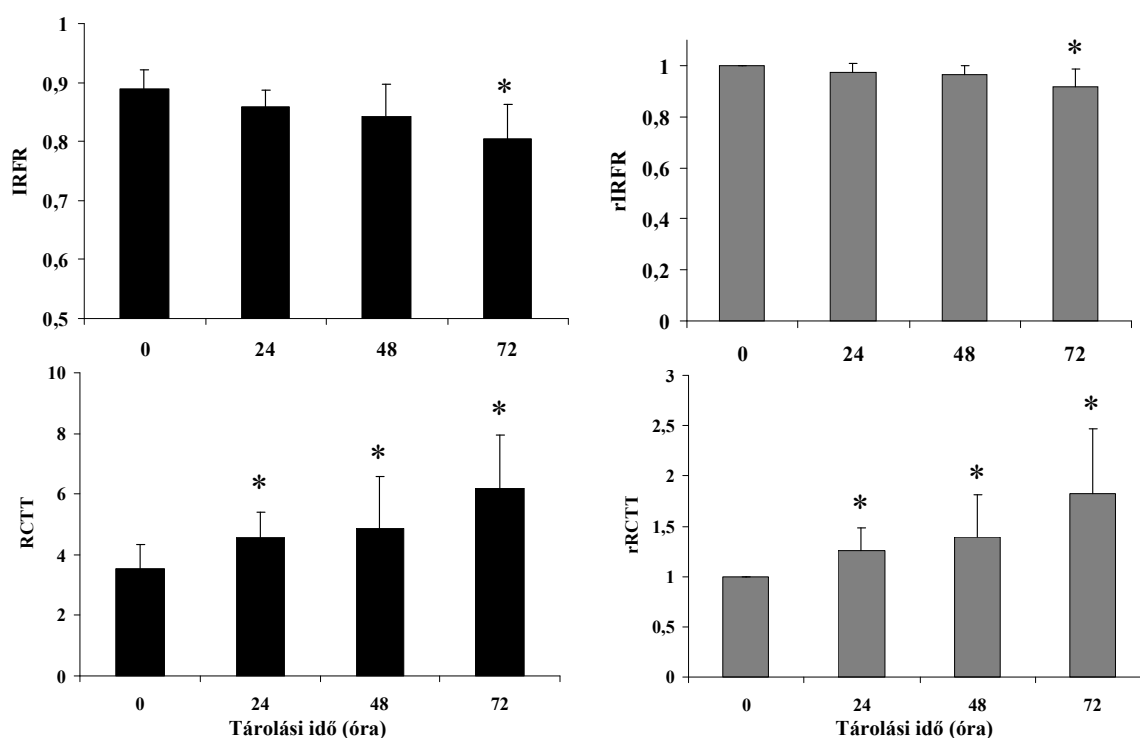
5.2.2.2. Vörösvérsejt deformabilitás

A filtrációs elven történő vörösvérsejt deformabilitási méréseket a szükséges vérminta mennyiség miatt csak a beagle kutyák hűtéssel tárolt mintáiban mértük.

A kezdeti relatív filtrációs ráta (IRFR) értékeiben a tárolás során folyamatos csökkenést figyelhattunk meg, mely a 72 óra elteltével szignifikánsan rosszabb értékhez vezetett a kiindulási értékhez képest.

A relatív sejt-tranzitidő (RCTT) értékek a tárolás során emelkedést mutattak, melynek mértéke már a tárolás 24. órájában is szignifikáns mértékűnek bizonyult.

E két paraméter változásai a hűtés ellenére romló vörösvérsejt deformabilitásra utaltak a tárolási idő előrehaladtával (10. ábra).

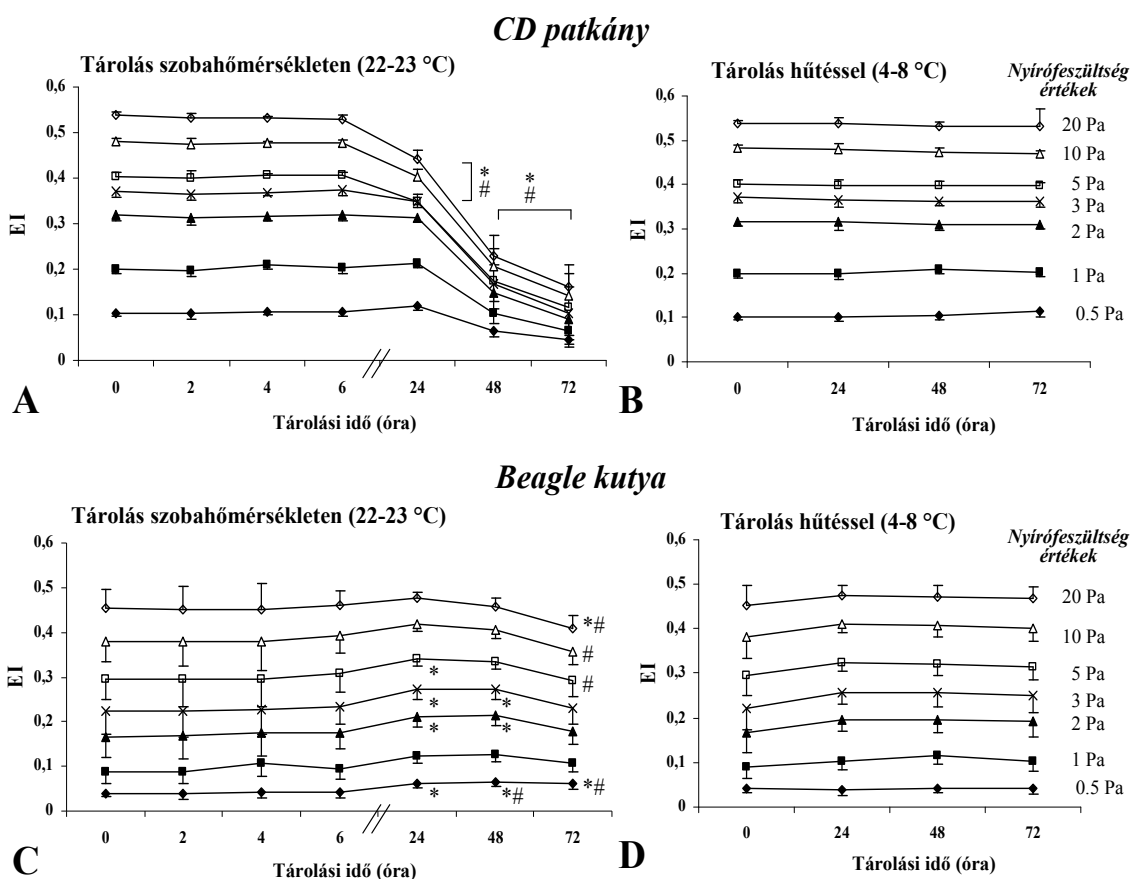


10. ábra

Beagle kutyák hűtve tárolt vérmintáinak
kezdeti relatív filtrációs ráta (IRFR) és relatív sejt-tranzitidő (RCTT)
abszolút és relatív változásai a tárolási idő függvényében
átlag $\pm$ S.D. * $p < 0,05$ vs. alapérték (0. óra); $n=5$
rIRFR és rRCTT = az IRFR, illetve a RCTT értékek alaphoz viszonyított változásai

A 11. ábrán a két vizsgált faj ektacytometerrel 0,5, 1, 2, 3, 5, 10 és 20 Pa nyírófeszültség értékeknél meghatározott elongációs index (EI) adatai látszanak.

A szobahőmérsékleten tárolt patkány vérminták esetén az első 6 órában változást nem tapasztaltunk, de ezt követően jelentős és folyamatos EI csökkenés mutatkozott. 24 óra elteltével a változások még csak a vizsgált legmagasabb nyírófeszültségeknél (10, 20 Pa) meghatározott EI értékekben mutatkoztak, de 48 és 72 óra elteltével mindegyik nyírófeszültség tartományban szignifikáns deformabilitás romlást tapasztaltunk (11. A ábra). Hűtéssel való tárolásnál ez a romlás kivédhető volt (11. B ábra).



11. ábra

CD patkányok (A,B) és beagle kutyák (C,D) szobahőmérsékleten és hűtve tárolt vérmintáinak különböző nyírófeszültség értékeknél (0,5, 1, 2, 3, 5, 10 és 20 Pa) meghatározott elongációs index (EI) értékei a tárolási idő függvényében
 átlag $\pm$ S.D. * $p < 0,05$ vs. alapérték (0. óra); # $p < 0,05$ vs. hűtés
 CD patkány: $n = 5$; beagle kutya: $n = 5$

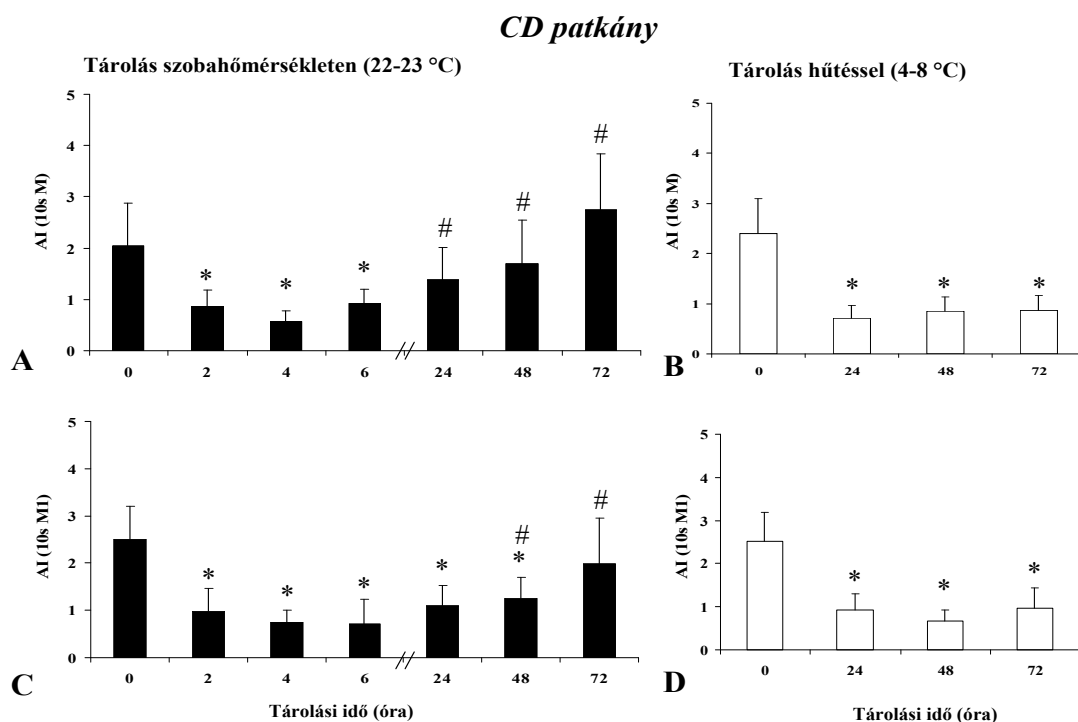
A beagle kutyák vérmintái esetén is az EI értékek stabilnak mutatkoztak az első 6 órában. A patkány mintáknál tapasztaltakkal ellentétesen, enyhe EI emelkedést észleltünk. 24 és 48 óra elteltével ez az emelkedés az alacsonyabb nyírófeszültség tartományokban volt jellemző, míg 72 óra elteltével szignifikánsan csökkent EI értékek voltak mérhetőek mindegyik vizsgált nyírófeszültség tartományban (11. C ábra). Hűtéssel megakadályozható volt az EI értékekben tapasztalt változás (11. D ábra).

5.2.2.3. Vörösvérsejt aggregatio

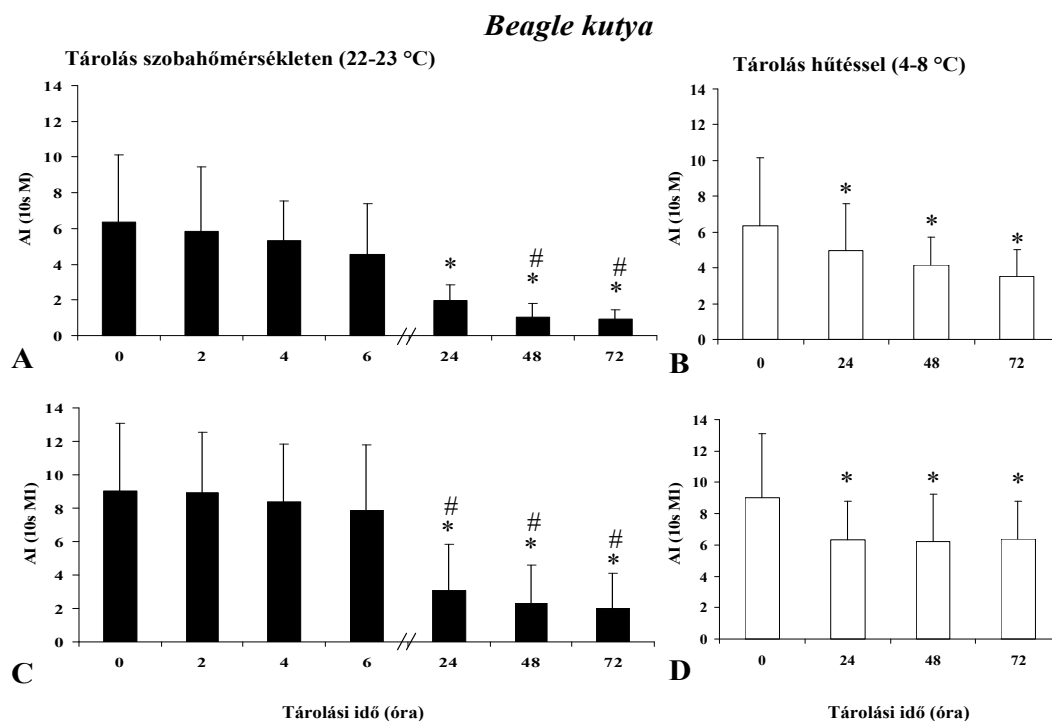
A 12. és 13. ábrákon a vörösvérsejt aggregációs index értékek 10 secundumos üzemmódban mért M és M1 paraméterei láthatóak.

A szobahőmérsékleten tárolt patkány vérminták vörösvérsejt aggregációs index értékeiben bifázisos jelegű változást tapasztaltunk mind az M, mind az M1 paraméterek vonatkozásában (12. A és 12. C ábrák). Már 2 óra elteltével az aggregációs index értékek szignifikáns, 40-60%-os csökkenését észleltük, amely csökkenés tovább folytatódott 4, illetve 6 óra elteltével. Azonban 24 óra tárolás után az aggregációs index értékek növekedni kezdtek, megközelítve, majd elérve, és az M1 index paraméter esetében 72 óra múltán meghaladva a kiindulási értékeket. A 4-8 °C-on történő hűtve tárolással az M és M1 értékek szignifikánsan alacsonyabbak maradtak a kiindulási értékekhez képest (12. B és 12. D ábrák).

Beagle kutyák vérmintáiban a tárolási idő függvényében fokozatos vörösvérsejt aggregációs index csökkenést tapasztaltunk. 6 óra elteltéig sem az M, sem az M1 paraméternél nem észleltünk szignifikáns változást, de 24 óra elteltével jelentős csökkenést tapasztaltunk (13. A és 13. C ábrák). 24 órán túli tárolásnál a hűtés lassította, de nem akadályozta meg az aggregációs index csökkenést (13. B és 13. D ábrák).



12. ábra
 Szobahőmérsékleten és hűtve tárolt CD patkány vérminták
 vörösvérsejt aggregációs index M (A,B) és M1 (C,D) értékeinek változása az idő függvényében
 átlag ± S.D. * p<0,05 vs. alapérték (0. óra); # p<0,05 vs. hűtés; n=5

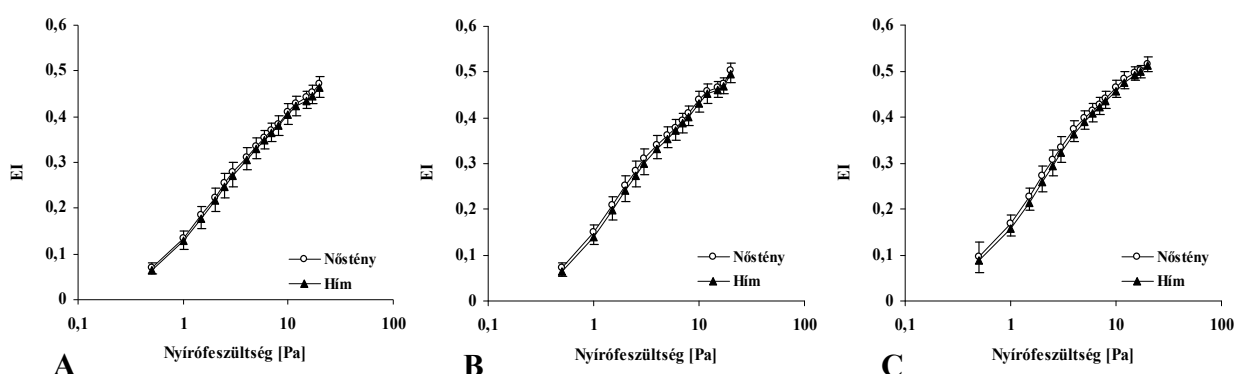


13. ábra
 Szobahőmérsékleten és hűtve tárolt beagle kutya vérminták
 vörösvérsejt aggregációs index M (A,B) és M1 (C,D) értékeinek változása az idő függvényében
 átlag ± S.D. * p<0,05 vs. alapérték (0. óra); # p<0,05 vs. hűtés; n=5

5.3. Különböző viszkozitású szuszpendáló oldatok hatása laboratóriumi állatok vörösvérsejt deformabilitás mérésének érzékenységére

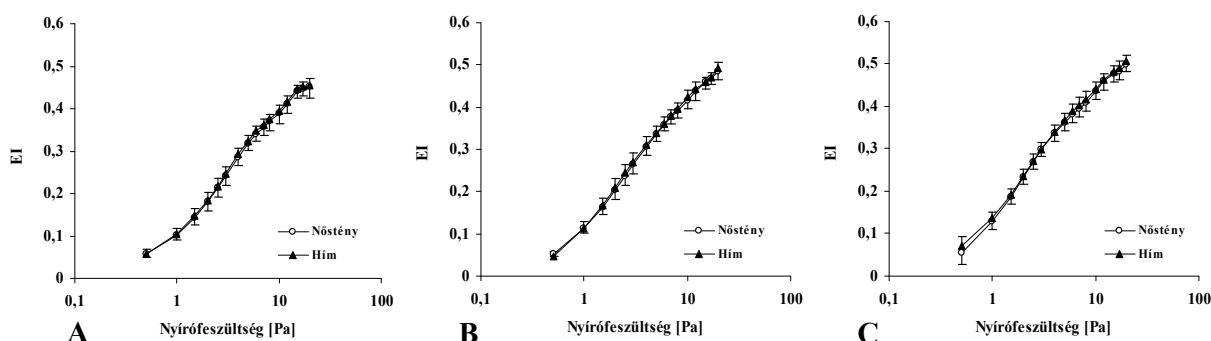
5.3.1. Nemi különbségek további ektacytometriás vizsgálatai

Az 14. és 15. ábrák adatai mutatják, hogy mind a Sprague-Dawley (SD) patkányok, mind beagle kutyák elongatiós index értékei a 15 mPa.s viszkozitású PVP oldat alkalmazásakor bizonyultak a legalacsonyabbaknak, míg a legmagasabb értékeket a 30 mPa.s viszkozitású közeg használatával mérhettük. Általánosságban elmondható, hogy a 15 és 20 mPa.s-os oldatokban meghatározott elongatiós index értékek közötti különbség nagyságrendileg hasonló volt a 20 és 30 mPa.s-os oldatok használatával kapott eredmények közötti különbségével.



14. ábra

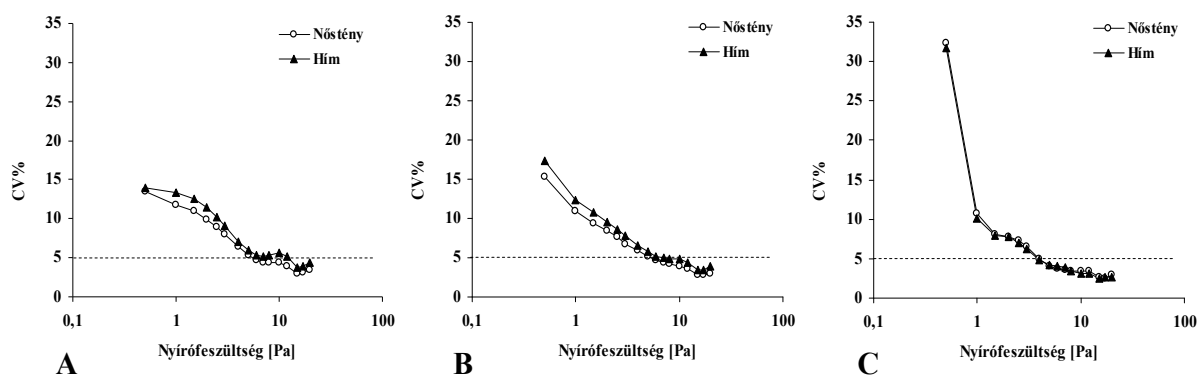
Hím és nőstény SD patkányok elongatiós index (EI) értékei a nyírófeszültség függvényében 15 (A), 20 (B) és 30 (C) mPa.s viszkozitású PVP oldatok alkalmazásakor
átlag $\pm$ S.D.; n=10-10



15. ábra

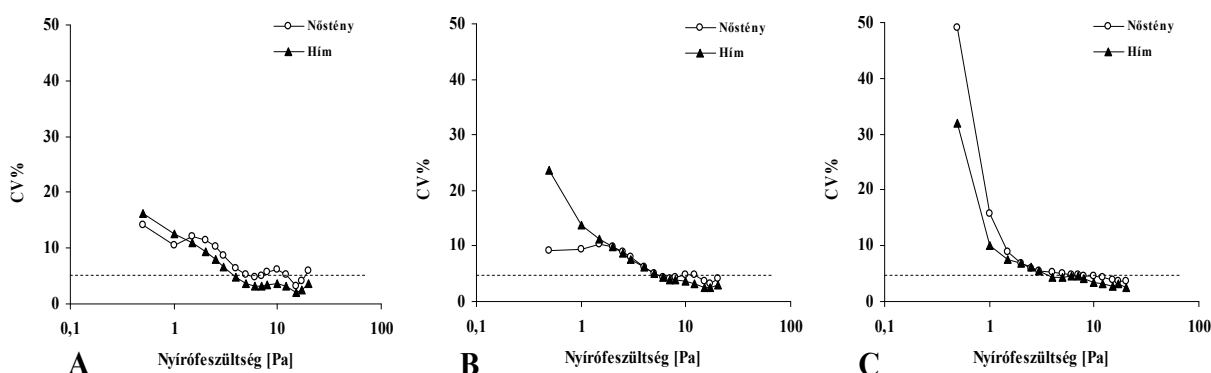
Hím és nőstény beagle kutyák elongatiós index (EI) értékei a nyírófeszültség függvényében 15 (A), 20 (B) és 30 (C) mPa.s viszkozitású PVP oldatok alkalmazásakor
átlag $\pm$ S.D.; n=10-10

A legnagyobb variabilitást mindkét állatfajnál a 30 mPa.s viszkozitású közegben történt méréseknél tapasztaltunk. A CV% mindkét állatfajnál a 2-3 Pa alatti, jellemzően a 0,5-1 Pa nyírófeszültség tartományokban volt a legnagyobb. A nyíróerő növekedésével a CV% értékek 5% alá csökkentek, leghamarabb a 30 mPa.s-os oldat használatával (SD patkány: 4 Pa; kutya: 3 Pa), míg a 15, illetve 20 mPa.s-os oldatok esetén csak a nagyobb nyírófeszültség értékek elérésével (SD patkány: 6-7 Pa; kutya: 5-6 Pa). A CV% értékekben kismértékű faji- és nemi különbségeket is megfigyelhettünk (16. és 17. ábra).



16. ábra

Hím és nőstény SD patkányok elongációs index (EI) értékeink variációs koefficiense (CV%) a nyírófeszültség függvényében 15 (A), 20 (B) és 30 (C) mPa.s viszkozitású PVP oldatoknál átlag $\pm$ S.D.; n=10-10; a szaggatott vonal az 5%-os értékhatárt jelzi



17. ábra

Hím és nőstény beagle kutyák elongációs index (EI) értékeink variációs koefficiense (CV%) a nyírófeszültség függvényében 15 (A), 20 (B) és 30 (C) mPa.s viszkozitású PVP oldatoknál átlag $\pm$ S.D.; n=10-10; a szaggatott vonal az 5%-os értékhatárt jelzi

Az EI-SS görbék részletes elemzése szerint SD patkányoknál a nőstények, míg beagle kutyaénál a hímek rendelkeztek magasabb elongációs index értékekkel (14. és 15. ábra).

A görbék összehasonlító adatai szignifikáns különbséget mutatnak az egyes szuszpenziós oldatok alkalmazásával végzett mérési eredmények között, nemi különbségeket is jelezve (VI. táblázat).

VI. táblázat: Hím és nőstény SD patkányok (n=10-10) és beagle kutyák (n=10-10) vörösvérsejt deformabilitását bemutató összehasonlító paraméterek eltérő viszkozitású PVP oldatok alkalmazásával, az eredeti elongációs index (EI)-nyírófeszültség (SS) görbék alapján

Paraméter	Faj	Nem	A PVP oldat viszkozitása		
			15 mPa.s	20 mPa.s	30 mPa.s
EI 3 Pa-nál	SD patkány	hím	0,271 ± 0,02 *	0,299 ± 0,02 *	0,322 ± 0,02
		nőstény	0,277 ± 0,02 *	0,308 ± 0,02 *#	0,334 ± 0,02 #
	Beagle kutya	hím	0,246 ± 0,01 *	0,271 ± 0,02 *	0,299 ± 0,01
		nőstény	0,240 ± 0,02 *	0,264 ± 0,02 *	0,297 ± 0,01
EI _{max}	SD patkány	hím	0,539 ± 0,01 *	0,570 ± 0,01 *	0,592 ± 0,02
		nőstény	0,538 ± 0,01 *	0,562 ± 0,01 *#	0,585 ± 0,02
	Beagle kutya	hím	0,611 ± 0,05	0,631 ± 0,03 *	0,604 ± 0,02
		nőstény	0,598 ± 0,03	0,618 ± 0,02	0,602 ± 0,02
SS _{1/2} [Pa]	SD patkány	hím	3,22 ± 0,62 *	3,06 ± 0,65 *	2,76 ± 0,47
		nőstény	3,01 ± 0,46 *	2,72 ± 0,42 *#	2,48 ± 0,42 #
	Beagle kutya	hím	4,89 ± 1,2 *	4,54 ± 0,93 *	3,37 ± 0,49
		nőstény	4,86 ± 0,81 *	4,44 ± 0,52 *	3,46 ± 0,42

átlag ± S.D.

* p<0,05 vs. 30 mPa.s, # vs. hím

EI = elongációs index; EI_{max} = maximális EI; SS_{1/2} = az EI_{max} feléhez tartozó nyírófeszültség érték

Mindkét faj és mindkét nem esetén a 15 és 20 mPa.s viszkozitású közeg alkalmazása esetén a 3 Pa-nál meghatározott EI értékek szignifikánsan alacsonyabbak ($p < 0,001$) voltak a 30 mPa.s viszkozitású közeg használatakor mért EI értékekhez képest, 7,7-23,8%-os eltérést is mutatva ugyanazon vérminta eredményei között.

Szignifikáns mértékű nemi különbségeket patkányok esetében találtunk, azt is csak a 20, illetve a 30 mPa.s viszkozitású PVP oldatok alkalmazásakor ($p = 0,027$ és $p = 0,01$).

A kalkulált $EI_{\max}$ értékek folyamatos emelkedését lehetett megfigyelni a patkány vörösvérsejtek vizsgálatakor, ahogy az egyre nagyobb viszkozitású közegben végeztük el a méréseket. A 15 és 20 mPa.s-os közegek esetén szignifikánsan alacsonyabb $EI_{\max}$ értékeket kaptunk a 30 mPa.s-os oldatnál mért eredményekhez képest. Ezzel ellentétesen, kutyák esetén ezt a fokozatos változást nem tapasztaltuk, a legmagasabb $EI_{\max}$ értékeket a 20 mPa.s-os közegnél észleltük, ami hím állatoknál szignifikánsan magasabb volt a 30 mPa.s-os oldatnál mért adatokhoz képest ($p = 0,007$).

$SS_{1/2}$ értékek [Pa] mindkét állatfajnál csökkentek a szuszpenziós közeg viszkozitásának emelésével. A 15 és a 20 mPa.s-os oldatok esetén az $SS_{1/2}$ értéke szignifikánsan magasabb volt a 30 mPa.s-os oldatnál mértekkel összevetve (SD patkány hímeknél: $p = 0,001$ és $p = 0,04$, nőstényeknél: $p < 0,001$ és $p = 0,037$; beagle kutya hímeknél: $p < 0,001$ és $p < 0,001$, nőstényeknél: $p < 0,001$ és $p = 0,004$).

Szignifikáns nemi különbséget csak patkányoknál találtunk a 20, illetve a 30 mPa.s viszkozitású oldatok használatával ($p = 0,017$ és $p = 0,005$).

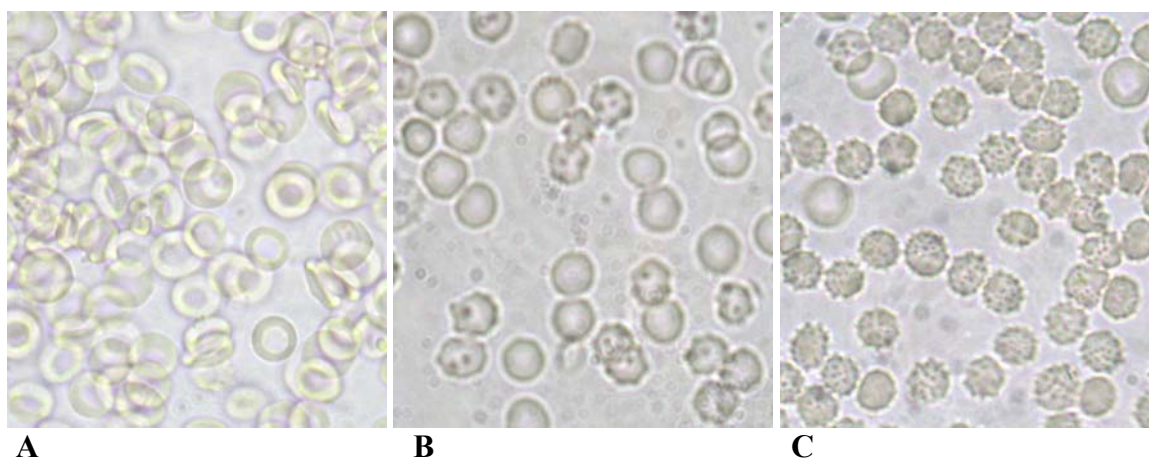
5.3.2. Ektacytometriás mérések érzékenységének vizsgálata laboratóriumi állatok hőkezelt vörösvérsejtjeivel

4.3.2.1. Haematológiai és morphológiai változások

Az SD patkányok natív vérmintáinak haematocrit (Htc) értéke $44,56 \pm 2,67\%$, a vörösvérsejtek átlagos térfogata (MCV) $56,96 \pm 1,96$ fl volt. A mintaelőkészítést követően a vörösvérsejt-PBS szuszpenziók: Htc értéke $9,93 \pm 0,29 \%$, MCV értéke $54,9 \pm 1,59$ fl volt.

A szuszpenziók vörösvérsejtjei legnagyobb részben megtartott morphológiával rendelkeztek, csak néhány echinocytoid alak volt mikroszkóppal megfigyelhető.

A hőkezelés hatására az echinocyta és fragmentálódott sejtalakok számának növekedését észleltük a normál discoid alakok csökkenésével párhuzamosan (18. ábra).



A

B

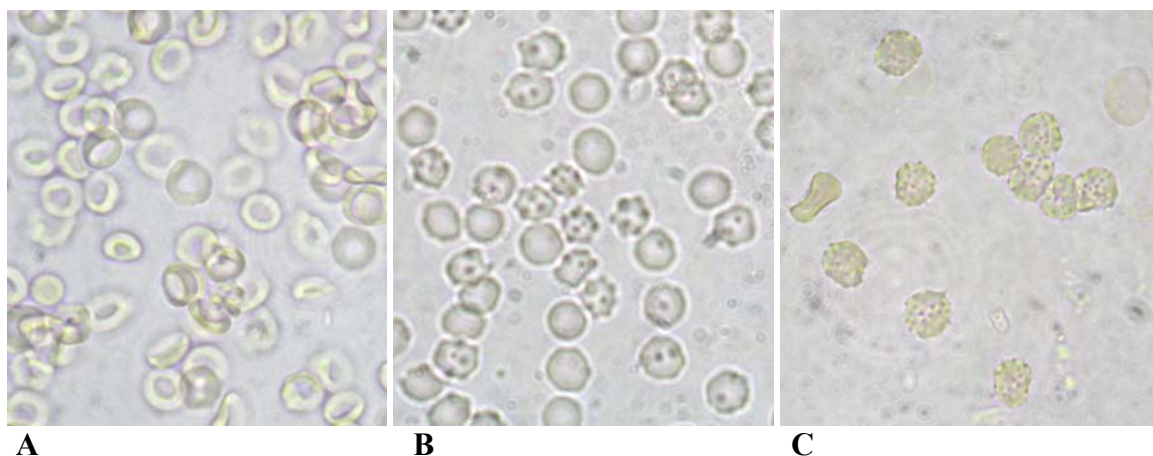
C

18. ábra

SD patkány vörösvérsejtek mikroszkópos képe
natív (A), mintaelőkészítés után PBS szuszpenzióban (B) és hőkezelést követően (C)
Eredeti nagyítás: 200x

Beagle kutyák natív vérmintáinak Htc-ja $54,58 \pm 2,83\%$, MCV-a $71,95 \pm 1,07$ fl volt. A mintaelőkészítést követően a vörösvérsejt-PBS szuszpenziók Htc értéke $9,98 \pm 0,26\%$ -nak, MCV értéke pedig $71,22 \pm 1,23$ fl-nek bizonyult.

Mikroszkóppal számos echinocytoid alakot figyelhattunk meg, már a mintaelőkészítés után a szuszpenziókban. A hőkezelés révén, hasonlóan a patkány vérmintákhoz, az abnormális morphológiájú sejtek nagyszámú jelenléte volt jellemző (19. ábra).



19. ábra

Beagle kutya vörösvérsejtek mikroszkópos képe
natív (A), mintaelőkészítés után PBS szuszpenzióban (B) és hőkezelést követően (C)
Eredeti nagyítás: 200x

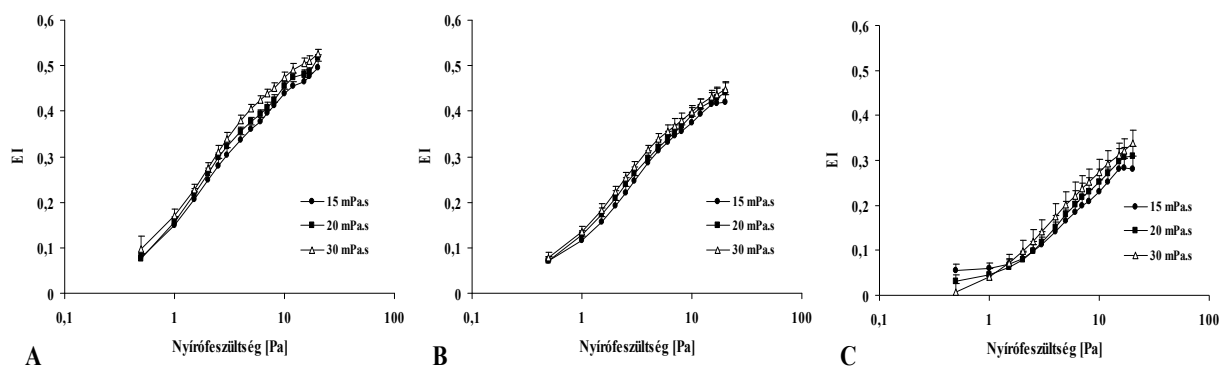
5.3.2.2. A vörösvérsejt deformabilitás változásai

Mindkét faj vérmintáiban az elongációs index értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a vörösvérsejt-PBS szuszpenziók esetén a natív, normál vérminták mérési eredményeihez képest (20. és 21. ábra).

A különbségek a kalkulált paraméterek tekintetében is jól megfigyelhetők voltak, szignifikánsan alacsonyabb EI_{max} és szignifikánsan magasabb $SS_{1/2}$ értékek jellemezték a szuszpenziókat (VII. és VIII. táblázat).

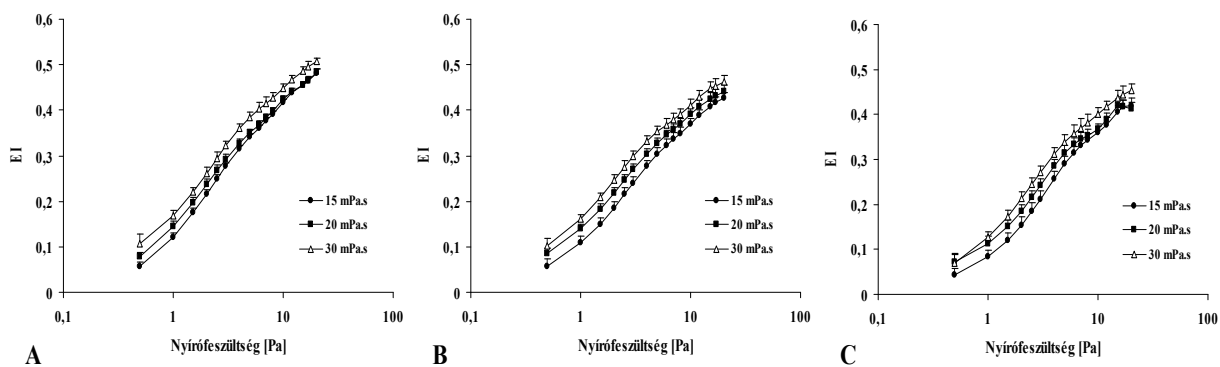
A szignifikáns különbségeket mindhárom PVP oldat használatával észlelhattük, a mérési eredményekben szembetűnő különbségeket mutatva a 15, 20, illetve 30 mPa.s viszkozitású oldatok alkalmazása között.

A hőkezelést követően az EI értékek jelentősen alacsonyabbnak mutatkoztak mindegyik PVP oldat használata során, a korábban tapasztaltaknak megfelelően a legalacsonyabb értékeket a 15 mPa.s, a legmagasabbakat a 30 mPa.s viszkozitású oldat alkalmazásakor kaptuk.



20. ábra

SD patkányok natív vérmintáinak (A) és vörösvérsejt-PBS szuszpenzióinak hőkezelés előtti (B), illetve hőkezelés utáni (C) elongációs index (EI) értékei a nyírófeszültség függvényében 15, 20 és 30 mPa.s viszkozitású PVP oldatok alkalmazásakor
 átlag $\pm$ S.D.; n=8



21. ábra

Beagle kutyák natív vérmintáinak (A) és vörösvérsejt-PBS szuszpenzióinak hőkezelés előtti (B), illetve hőkezelés utáni (C) elongációs index (EI) értékei a nyírófeszültség függvényében 15, 20 és 30 mPa.s viszkozitású PVP oldatok alkalmazásakor
 átlag $\pm$ S.D.; n=8

VII. táblázat. SD patkányok (n=8) natív vérmintáinak és vörösvérsejt-PBS szuszpenzióinak (vvs-PBS) hőkezelés előtti, illetve hőkezelés utáni deformabilitást leíró elongációs index (EI)-nyírófeszültség (SS) görbék összehasonlító paraméterei, 15, 20 és 30 mPa.s viszkozitású PVP oldatok alkalmazásakor

Paraméter	Minta	A PVP oldat viszkozitása		
		15 mPa.s	20 mPa.s	30 mPa.s
EI 3 Pa-nál	natív minta	0,304 ± 0,01 *	0,323 ± 0,01 *	0,339 ± 0,01
	vvs-PBS előtte	0,246 ± 0,01 ⁺ *	0,262 ± 0,01 ⁺ *	0,278 ± 0,01 ⁺
	vvs-PBS utána	0,112 ± 0,01 ⁺ *#	0,117 ± 0,02 ⁺ *#	0,141 ± 0,01 ⁺ #
EI _{max}	natív minta	0,558 ± 0,02 *	0,578 ± 0,02 *	0,604 ± 0,03
	vvs-PBS előtte	0,515 ± 0,04 ⁺	0,513 ± 0,03 ⁺	0,523 ± 0,04 ⁺
	vvs-PBS utána	0,336 ± 0,06 ⁺ *#	0,498 ± 0,05 ⁺	0,512 ± 0,06 ⁺
SS _{1/2} [Pa]	natív minta	2,69 ± 0,54	2,61 ± 0,37	2,57 ± 0,55
	vvs-PBS előtte	3,44 ± 0,69 ⁺ *	3,02 ± 0,53 ⁺	2,84 ± 0,62
	vvs-PBS utána	5,92 ± 1,53 ⁺ *#	16,38 ± 12,68 ⁺ #	27,48 ± 22,15 ⁺ #

átlag ± S.D.

* p<0,05 vs. 30 mPa.s, + vs. natív, # vs. hőkezelés előtt

VIII. táblázat. Beagle kutyák (n=8) natív vérmintáinak és vörösvérsejt-PBS szuszpenzióinak (vvs-PBS) hőkezelés előtti, illetve hőkezelés utáni deformabilitást leíró elongációs index (EI)-nyírófeszültség (SS) görbék összehasonlító paraméterei, 15, 20 és 30 mPa.s viszkozitású PVP oldatok alkalmazásakor

Paraméter	Minta	A PVP oldat viszkozitása		
		15 mPa.s	20 mPa.s	30 mPa.s
EI 3 Pa-nál	natív minta	0,276 ± 0,01 *	0,293 ± 0,01 *	0,321 ± 0,01
	vvs-PBS előtte	0,240 ± 0,01 ⁺ *	0,270 ± 0,01 ⁺ *	0,299 ± 0,01 ⁺
	vvs-PBS utána	0,212 ± 0,01 ⁺ *#	0,243 ± 0,01 ⁺ *#	0,272 ± 0,01 ⁺ #
EI _{max}	natív minta	0,587 ± 0,02 *	0,546 ± 0,02 *	0,561 ± 0,01
	vvs-PBS előtte	0,532 ± 0,05 ⁺	0,496 ± 0,03 ⁺	0,507 ± 0,02 ⁺
	vvs-PBS utána	0,600 ± 0,07 ⁺ *#	0,529 ± 0,05 ⁺ #	0,546 ± 0,03 ⁺ #
SS _{1/2} [Pa]	natív minta	3,73 ± 0,52 *	2,76 ± 0,4 *	2,34 ± 0,23
	vvs-PBS előtte	3,99 ± 1,14 *	2,57 ± 0,37 *	2,18 ± 0,32
	vvs-PBS utána	7,2 ± 3,25 ⁺ *#	3,83 ± 1,1 ⁺ #	3,31 ± 0,59 ⁺ #

átlag ± S.D.

* p<0,05 vs. 30 mPa.s, + vs. natív, # vs. hőkezelés előtt

Patkányok esetén (20. ábra, VII. táblázat) a hőkezelés hatására az EI-SS görbék lefutása az 1 és 2 Pa közötti nyírófeszültség tartományban jelentősen eltért a normálistól a 15 és 20 mPa.s-os közegek használatakor, míg a 30 mPa.s viszkozitású oldattal az alacsony nyírófeszültség tartományban is a megszokott görbealakot láthattuk.

A 3 Pa nyírófeszültségnél meghatározott EI értékek szignifikánsan alacsonyabbak ($p < 0,001$) voltak a hőkezelést követően. Az $EI_{\max}$ értékek mindhárom közegben történt méréseknél alacsonyabbá váltak a hőkezelés hatására, de a csökkenés csak a 15 mPa.s-os közeg használatakor mutatott szignifikáns különbséget. Az $SS_{1/2}$ értékek hőkezelés hatására történő emelkedése mindhárom PVP oldat esetében szignifikáns ($p < 0,001$) volt.

A hőkezelés előtti és utáni állapot meghatározott mérési eredményei a legnagyobb különbséget a 30 mPa.s viszkozitású közeg használatakor mutatták (VII. táblázat).

Bár a legalacsonyabb EI értékeket a 15 mPa.s-os oldatnál figyelhettük meg, a standardizált differencia itt mutatta a legnagyobb variabilitást (22. A ábra). Az 1 Pa alatti nyírófeszültség tartományban a legalacsonyabb értékeket a 15 és 20 mPa.s viszkozitású közegeknél kaptuk. 3 Pa nyírófeszültségig a standardizált differencia értékek emelkedtek, majd ezt követően csökkenő tendenciát mutattak. A 30 mPa.s viszkozitású közeg alkalmazása mellett mért értékek viszonylagosan stabilak voltak, nem mozogtak olyan széles tartományban, mint a másik két oldat alkalmazásánál. Az 5 Pa feletti nyírófeszültség tartományban a 20 és 30 mPa.s közegekkel mért értékek nagyban hasonlítottak egymásra (22. A ábra).

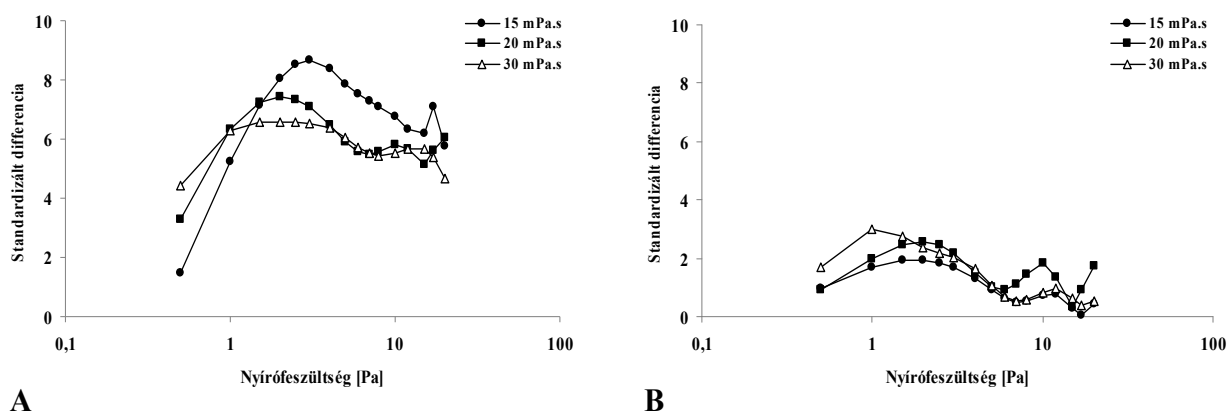
Beagle kutyák vérmintáinál is megfigyelhettük, hogy a 3 Pa nyírófeszültségnél meghatározott EI értékek szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak a vörösvérsejt-PBS szuszpenziók esetén, a natív vérminták értékeihez képest ($p < 0,001$) (21. ábra, VIII. táblázat).

A kalkulált $EI_{\max}$ értékek szintén szignifikánsan alacsonyabbak voltak mindhárom PVP oldat használatakor ($p=0,007$, $p<0,001$ és $p<0,001$), míg az $SS_{1/2}$ értékeiben tapasztalt emelkedés már nem mutatott szignifikáns különbséget a natív vérmintákkal összehasonlítva.

A hőkezelés mindegyik paraméterben szignifikáns csökkenéshez vezetett, bár a változás mértéke nem volt olyan kifejezett, mint a patkány vörösvérsejtek esetén. Az EI értékekben a legnagyobb különbséget ($p<0,001$) 3 Pa nyírófeszültségnél figyelhettük meg. Az $EI_{\max}$ emelkedését, feltehetőleg az elongatiós index görbék megváltozott lefutása eredményezhette. Az $SS_{1/2}$ értékek emelkedése mindhárom PVP közeg esetén bár kisebb fokú volt, mint amit patkány vörösvérsejteknél tapasztaltunk, de szignifikáns különbségként mutatkozott a hőkezelés előtti állapothoz viszonyítva ($p<0,001$).

A standardizált differencia értékek jelentősen alacsonyabbak voltak, mint a patkányoknál. A 2 Pa alatti nyírófeszültség tartományban a legmagasabb értékeket a 30 mPa.s viszkozitású közegnél láttuk, majd a magasabb nyírófeszültség értékeknél már mindhárom közeg esetén egymáshoz közeli eredményeket kaptunk (22. B ábra).

A standardizált differencia adatok arra utalnak, hogy a patkány vörösvérsejtek jóval érzékenyebben reagáltak a hőkezelésre, mint a beagle kutyák vörösvérsejtjei.



22. ábra

SD patkányok (A) és beagle kutyák (B) vörösvérsejt-PBS szuszpenzióinak hőkezelés előtt és után 15, 20 és 30 mPa.s viszkozitású PVP oldatok alkalmazásakor mért elongatiós index értékeiből kalkulált standardizált differencia a nyírófeszültség függvényében

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. Nemi különbségek haemorheológiai jellemzői

A nemi különbségek haemorheológiai vonatkozásairól egyre több, a klinikumból származó irodalmi adat érhető el. A férfiakban a teljes vér és plazma viszkozitás, a haematocrit és a fibrinogén koncentráció magasabb, a vörösvérsejtek nagyobb fokú aggregációs készséggel és kisebb fokú deformálhatósággal jellemezhetőek, mint azonos korú nőkben.^{3,5,24,53,73,80}

Az életkor előrehaladtával és a nemi hormonok szintjében bekövetkező változásokkal a haemorheológiai státusz további különbségeket mutathat.^{61,78,79} Physiológiai változások, mint a menstruációs ciklus, a terhesség vagy a menopausa, valamint a nemi hormonok koncentrációjának nem élettani változása (pl. hormontermelő daganatok, hormonkezelés, gonadectomia utáni állapot) is különböző mértékben lehet hatással a haemorheológiai paraméterekre.^{29,61,111,155}

Állatkísérletes vonatkozásban a fajok közötti haemorheológiai különbségekről az újabb és újabb mérőmódszerek kifejlesztésével és elterjedésével egyre több ismeret áll rendelkezésre,^{6,8,17,35,103,114,146,156} a nemi különbségekről azonban kevés adat ismert, és rendszerezett összehasonlító tanulmányt sem találtunk.

Feltételeztük, hogy különböző laboratóriumi állatfajokban a haemorheológiai nemi különbségek akár szignifikáns szintet is elérhetnek, aminek komoly jelentősége lehet a kísérleti modellek csoportjainak megtervezésénél, befolyásolva az eredmények értékelhetőségét és összehasonlíthatóságát.

A haemorheológiai laboratóriumokban a technikák és a rendelkezésre álló mérőmódszerek széles tárháza ismert és elfogadott,^{7,62,97} mely mérőműszerek érzékenysége is eltérő, ezért egységes referenciaértékeket nehéz meghatározni.

Ezért célkitűzéseink között a „laboratórium-specifikus” adatbázisunk adatainak részleges összegzése szerepelt a nemi különbségek haemorheológiai elemzésére, a Debreceni

Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Sebészeti Műtéttani Tanszék haemorheologiai kutató-laboratóriumában vizsgált egészséges állatok alapadataiból.

Ebből az adatbázisból a disszertációban a CD outbred patkányok és inbred beagle kutyák adatai kerültek bemutatásra. A főbb eredményeink szerint: (I) a vörösvérsejt szám és a haematocrit értékek a hím állatokban mutatkoztak magasabbnak mindkét állatfajnál, (II) a vörösvérsejt aggregatio mértéke patkányoknál a nőstényekben, míg beagle kutyáknál a hímekben bizonyult nagyobbak, ezzel szemben (III) jobb vörösvérsejt deformálhatósággal patkányoknál a nőstények, a kutyáknál a hímek rendelkeztek.

A talált fajspecifikus különbségek megerősítették korábbi eredményeinket,¹⁰³ miszerint beagle kutyákban magasabb fehérvérsejt szám, haemoglobin, haematocrit, MCV, MCH és MCHC, valamint nagyobb aggregációs index értékek mérhetőek, míg a vörösvérsejt szám, a thrombocytá szám, a teljes vér viszkozitás tekintetében a CD patkányok rendelkeztek magasabb értékekkel, ugyanakkor jobb vörösvérsejt deformálhatósági paraméterekkel. Ezek az eredmények jól korrelálnak az irodalomban fellelhető adatokkal.^{59,105,114,156,157}

A haemorheologiai nemi különbségekben mutatkozó eltérések mértéke a két faj összehasonlításában azonban nem korrelált egymással. A humán adatokkal ellentétesen a magasabb vörösvérsejt aggregációs készség nem társult csökkent vörösvérsejt deformabilitással hímekben. Egységes magyarázatot az eltérésekre nem találtunk, valószínűleg e két micro-rheologiai paramétert meghatározó számos plazmatikus és celluláris faktorok összetett különbségei, és egymásra gyakorolt hatása állhat a háttérben.

A vörösvérsejt deformabilitást főként celluláris faktorok határozzák meg, mint a felszín-térfogat arány, a belső viszkozitás, a sejtmembrán saját viszkozitása, valamint a sejt alakja.^{25,87,93-95,113,136} A fajok közötti különbségekre magyarázatul szolgálhat e faktorok változatossága, eltérések a vörösvérsejtek számában és méretében, a sejtek haemoglobin tartalmában, illetve a sejt morphologiai-geometriaai sajátosságaiban.^{98,134,157}

Nemi különbségek a vörösvérsejtek számában és a haematocrit értékében is megfigyelhetők voltak: mindkét állatfajnál a hímek rendelkeztek magasabb értékkel, míg a vörösvérsejtek átlagos térfogata lényegében azonos volt a két nemben.

A vörösvérsejt aggregációt a celluláris faktorokon túl (sejtalak, deformálhatóság és sejtfelszíni glycocalyx molekuláris struktúrája), plazmatikus faktorok is befolyásolják, melyek közül a fibrinogén játszik fontos szerepet.^{108,119,123}

Patkányoknál a nőstényekben mértünk szignifikánsan magasabb fibrinogén koncentrációt a hímekhez képest, amit nagyobb plazma viszkozitás értékek kísérték. Részben ezzel magyarázható a nőstényeknél tapasztalt emelkedett vörösvérsejt aggregációs index. Azonban beagle kutyáknál a fibrinogén koncentráció nem mutatott jelentős nemi különbséget, a vörösvérsejtek aggregációs index értékében mégis szignifikáns nemi különbséget találtunk. Feltételezhető, hogy a fibrinogén molekulák kötődésében mutatózó különbségek,^{2,3,31} a sejtfelszíni glycocalyx összetétele, így a depletiós zóna és az electrostaticus repulsio eltérő mértéke,^{69,70} illetve további, még feltáratlan celluláris és plazmatikus tényezők összessége együttesen alakíthatta a különbségeket.^{15,108} Ezek tisztázására újabb, kifinomultabb érzékenységgű műszerek szükségesek.

Ezekon felül a jövőben tervezett összehasonlító vizsgálataink során számos egyéb tényezőt is figyelembe kívánunk venni, melyek szintén szignifikáns különbségeket eredményezhetnek, még akár egy azonos kísérleti csoporton belül is egy hosszabb időtartamú utánkövetéses vizsgálat során. Ilyen tényezők lehetnek például a nőstény állatok oestrus ciklusa, az állatok öregedésével járó élettani hatások változása.^{84,158} Ezen befolyásoló faktorok minimálisra történő csökkentésének érdekében, a kísérletes modellek tervezésénél javasolt törekedni az egynemű és azonos korú egyedekből álló csoportok kialakítására.

6.2. A mintatárolási idő és hőmérséklet hatása a haemorheológiai paraméterekre

Előfordul, hogy a klinikai laboratóriumi mérések során a vérmintából meghatározott paraméterek nem tekinthetők reprezentatívnak, ha a kelletténél hosszabb idő telik el a vérvétel és a paraméterek meghatározása között (a minták „*in vitro* öregedése”), vagy ha a minta tárolása, annak hőmérséklete helytelen.^{7,52,66,147}

A kérdéskörnek a kutatómunkában is nagy jelentősége van, hiszen a helytelen mintakezelés és mintatárolás hatása elfedheti a kísérleti modellben indukált különbségeket, vagy éppen nem valós szignifikáns eredményeket produkálhat a kísérleti csoportok között.

A humán gyakorlatban ennek elkerülésére különböző mérés technikai útmutatók állnak rendelkezésünkre.^{7,21,66} Állatkísérletes vonatkozásban a mintatárolás haemorheológiai hatásairól kevés adat található, azok alkalmazhatósága is metodikafüggő.^{56,162}

Ezért vizsgálni kívántuk a mintatárolás idejének és hőmérsékletének lehetséges befolyásoló hatásait a teljes vér és plazma viszkozitásra, a vörösvérsejtek átlagos térfogatára, deformálhatóságára és aggregációjára CD patkány és beagle kutya vérmintákban.

A szobahőmérsékleten végzett mintatárolás egyértelmű választásnak tűnt a mindennapok során végzett laboratóriumi munka körülményeit szimulálva, ahol különösebb speciális feltételek nem szükségesek a 20-25 °C-os szobahőmérséklet fenntartásához. A hőmérsékleti környezet másik csoportjánál a hűtve tárolást választottuk, ahol egy zárt dobozban nedves jégre helyeztük a vérmintákat (4-8 °C). Ezzel a laboratóriumok közötti mintatranszport lehetséges körülményeit kívántuk részlegesen szimulálni.

Eredményeink szerint, a mintatárolás ideje és hőmérséklete jelentősen befolyásolja a micro-rheológiai paramétereket, patkányok vérmintáiban rövidebb időn belül és jelentősebb mértékben, mint beagle kutya vérminták esetén.

Szobahőmérsékleten a vörösvérsejtek átlagos térfogata (MCV) 6 órán belül egyik állatfajnál sem változott jelentősen, azonban 24 óra múlva már jelentősen emelkedett

értékeket tapasztaltunk. A hűtéssel biztosított alacsonyabb hőmérsékleten történő tárolással a vizsgálati időtartam végéig, azaz 72 óráig kiküszöbölhető volt az MCV értékének változása.

Az eredmények jól korrelálnak az irodalmi adatokkal: Medaille és mtsai kutya vörösvérsejtek MCV értékének emelkedését írták le 24-48 óráig tartó szobahőmérsékleten végzett tárolás esetén,⁸⁵ Furlanello és mtsai a hűtéssel kiküszöbölték az MCV növekedését kutya vérmintákban.⁵⁶ Az MCV érték hasonló változását figyelték meg Olsen és mtsai törpe-sertés vérminták vizsgálatával. Az általunk tapasztalt MCV változások a hőmérséklet és az idő függvényében megfelelnek az irodalomban leírt korábbi eredményeknek.¹¹⁰

Szobahőmérsékleten a vörösvérsejtek deformálhatósága (EI) szintén nem mutatott 6 óráig változást, de ezt követően a patkány sejteknél progresszív csökkenés jelentkezett, míg kutyák esetén enyhe EI emelkedést figyelhattunk meg a 24. és a 48. órákban. Hűtéssel az MCV értékekhez hasonlóan, itt is mindkét állatfaj vérmintáinál biztosíthattuk az elongációs index értékek stabilitását a 72 órás vizsgálati időtartam egészére.

A vörösvérsejt aggregációs változókból tapasztalt eltérések viszont ennél sokkal összetettebbnek bizonyultak. Patkányoknál a szobahőmérsékleten tárolt mintákban 2 és 6 óra között jelentős, 40-60%-os csökkenés jelentkezett, melyet 24 óra után a kontroll értékeket megközelítő emelkedés követett. Beagle kutyáknál ez a jelenség nem volt megfigyelhető, a tárolási idővel az aggregációs index értékek folyamatosan csökkentek, amit az alacsonyabb hőmérsékleten történő tárolás sem védett ki.

Az észlelt micro-rheológiai változások egy részének magyarázatául szolgálhatnak a vörösvérsejt deformabilitást meghatározó faktorok, mint a sejtmembrán felületének a sejt térfogatához viszonyított aránya, valamint a sejt alakja.^{87,136} A felszín-térfogat arányának bármilyen irányú változása, a sejt morfológiájában bekövetkező kisebb eltérések is befolyásolhatják a vörösvérsejt deformabilitást.⁸⁸ Feltételezhető, hogy a szobahőmérsékleten tárolt vérminták MCV érték növekedése szerepet játszhatott a vörösvérsejtek

deformálhatóságának csökkenésében is.^{22,88,122} Tozzi-Ciancarelli és mtsai humán vérminták vizsgálata során, szintén a vörösvérsejtek deformálhatóságának csökkenését tapasztalták.¹⁴³

A vörösvérsejtek aggregációs index változásaiban megfigyelt jelenségekre -főleg patkány esetén- nehéz magyarázatot találni.

Feltételezhető, hogy a háttérben részben a plazma proteinek degradációja, a megváltozott sejtfelszíni töltés és a glycocalyx változásai állhatnak, azonban a morfológiai változásoknak is kulcsfontosságú szerepe lehet. A patkány vörösvérsejtek rendkívül érzékenyek a fizikai és kémiai változásokra.^{69,70,144,145} Az echinocytá formák jelenléte a deformabilitás értékek romlásával jár,^{81,122} továbbá ezek a sejtalakok aggregációra nem, vagy csak nehezen képesek.⁸¹ A patkány vörösvérsejtek környezeti hatásokra való érzékenysége jelentős mértékű echinocytá-átalakuláshoz vezet, így érthető az aggregációs index csökkenése. A tárolás előrehaladtával, amikor a sejtek a hypoxia és az energia depletio miatt már nem képesek fenntartani volumenjüket, duzzadni kezdenek, s így az echinocytá alakok száma is csökken - ez paradox módon az aggregációs index növekedéséhez vezethet.

Ezek az adatok a kísérletek kivitelezésében nyújthatnak segítséget, a biztonsággal értékelhető laboratóriumi mérési adatok szempontjából.

6.3. Az ektacytometriás mérések érzékenysége

Kísérleteink előző két fázisában a laboratóriumi állatok faji- és nemi haemorheológiai különbségeit, illetve a mintakezelés befolyásoló hatásait vizsgáltuk. Munkánk harmadik részében a vörösvérsejt deformabilitás korszerű meghatározására alkalmas haemorheológiai laboratóriumi műszer, a Rheoscan-D200 slit-flow ektacytometer érzékenységét vizsgáltuk a faji- és nemi különbségek további elemzésére, feltételezésünk szerint eltérő mérési eredményeket adó, különböző viszkozitású szuszpenziós oldatok használatával.

A haemorheologiai paraméterek meghatározására számos metodika ismert és használatos, ezért a mérési protokollok standardizálása nagy jelentőséggel bír.^{7,21,66} A vörösvérsejt deformabilitás ektacytometrián alapuló meghatározására több mérőműszer ismert, melyek közül a kereskedelmi forgalomban a Rheodyn-SSD, a LoRRca és a Rheoscan-D200 készülékek érhetőek el.^{10,62}

Az ektacytometerekben a vörösvérsejteket nyíróerőnek kell kitenni ahhoz, hogy elongálódni tudjanak. Ez viszkózus makromolekula (PVP vagy dextrán-70) oldatban, szuszpendáló közegben valósul meg, ez adja át a nyíróerőt a vörösvérsejt membránnak.⁶² Ha a viszkozitás alacsony, akkor erő hatására a sejtek elnyúlás nélkül, pörgő mozgást végeznek a mintában („tank tread” mozgás), befolyásolva a mérés szenzitivitását is.^{19,63,113}

A cone-plate rheoscope technika alkalmazásával az individuálisan megfigyelt vörösvérsejtek elongációja vizuálisan elemezhető, mely révén kimutatták, hogy az alkalmazott nyíróerő és a szuszpendáló médium viszkozitása alapvetően befolyásolja a vörösvérsejtek orientálódását és elnyúlásának mértékét a mérések során.^{23,50,128}

A Rheodyn-SSD és a LoRRca készülékek meghatározott geometriával (parallel korongok, illetve Couette-rendszer) és kontrollált nyíróerő-generáló rendszerrel rendelkeznek, ezért a szuszpendáló közeg pontos viszkozitásának ismerete nélkülözhetetlen a pillanatnyi nyírófeszültség-profil megadásához.^{10,62} A Rheoscan-D200 készülékben a vörösvérsejt szuszpenzió egyszer használatos mérőkamrák mikro-csatornáján áramlik keresztül folyamatosan csökkenő nyomás mellett, melyet a vákuum-generátor és a pillanatnyi légköri nyomás határoz meg. A nyírófeszültség kalkulálásához átlagos áramlási rátát használ a szoftver, parabolikus sebesség-profil feltételezésével.¹³⁰ Ebből adódóan, a Rheoscan-D200 rendszerében a nyírófeszültség kiszámítása független a szuszpendáló közeg viszkozitási adatától. Ezért kritikus fontosságú az alkalmazott szuszpendáló közeg viszkozitásának

standardizálása, hiszen a sejtek irányultságát és elongációját biztosító nyíróerő-áttevődés ettől függ.^{23,49,62}

Annak ellenére, hogy a PVP oldatokban ritkán vörösvérsejt morfológiai változások létrejöhetnek („teniszlabda” formák kialakulása),^{54,101} a standard PVP oldatok (osmolaritás: 280-330 mOsm/kg; pH ~7,4) használata a legelterjedtebb a mérések kivitelezésében. Bár a szükséges PVP oldatok könnyen előállíthatóak, előre meghatározott viszkozitású szuszpenziós oldatokat az ektacytometereket gyártó cégek is kereskedelmi forgalomba bocsátanak. A nem megfelelő viszkozitású PVP oldat megvásárlása és használata torz eredményekhez vezethet. Ezért tartottuk fontosnak, a kereskedelmi forgalomban is elérhető vagy a laboratóriumokban elkészíthető 20, illetve 30 mPa.s viszkozitású PVP oldatok alkalmazásával mért vörösvérsejt deformabilitási adatok összehasonlítását, kiegészítve a kevésbé viszkózus 15 mPa.s-os oldat vizsgálatával.

Feltételeztük, hogy az egyes szuszpendáló médiumok alkalmazásával nyert eredmények között a humán adatokhoz hasonlóan^{62,63} jelentős különbség lehet, s amely eltérő mértékben mutatkozhat hím és nőstény Sprague-Dawley patkányok és beagle kutyák vérmintáiban az ismert faji különbségek tekintetében.^{103,156,157}

A mérésekkel szignifikáns különbségeket találtunk ugyanazon vérminták eltérő viszkozitású médium alkalmazásával meghatározott vörösvérsejt deformabilitási értékeiben. A legalacsonyabb elongációs index értékeket a 15 mPa.s viszkozitású oldat használatával kaptuk, a legmagasabb értékeket és jól kimutatható, a korábbi vizsgálatainkhoz képest részletesebb nemi különbségeket a 30 mPa.s viszkozitású PVP oldat alkalmazásával nyertük.

A 15 mPa.s viszkozitású közeg esetén kalkulált viszonylag alacsony CV% értékek valószínűsíthető oka lehet, hogy a mért elongációs index értékek alacsony és szűk értéktartományban mozogtak. A méréseket 5%-os CV érték alatt tekintettük stabilnak. A 30 mPa.s viszkozitású oldat használata során ez a feltétel patkányoknál 4 Pa, kutyáknál már

3 Pa nyírófeszültség feletti tartományban teljesült, míg a kevésbé viszkózus közegek esetén ez a határérték magasabb nyírófeszültség értékek irányába tolódott el.

Az ektacytometriás mérések érzékenységének összehasonlító vizsgálatait a vörösvérsejtek hőkezelésére bekövetkező deformabilitás romlás mértékének kimutathatóságával folytattuk.

A hőkezelés egyszerű, könnyen kivitelezhető módszer a vörösvérsejtek rigidde tételére *in vitro* vizsgálatok céljából.^{10,51,100,125} A vörösvérsejt szuszpenziók hőkezelése révén meghatározhattuk és elemezhattuk a Rheoscan-D200 ektacytometer érzékenységét, a három különböző viszkozitású oldat alkalmazásával. A standardizált differencia értékek kiszámítása a hőkezelés hatására létrejött változások kimutathatóságának és mértékének objektív összehasonlíthatóságát tette lehetővé.^{10,137}

Laboratóriumi állatok vonatkozásában hasonló, a faji-, nemi különbségeket és a műszerérzékenységet is összetett módon vizsgáló komparatív tanulmányról nem tudunk.

Mindkét állatfaj vörösvérsejt deformabilitási értékei szignifikáns különbséget mutattak a natív vérminták és a vörösvérsejt-PBS szuszpenziók összehasonlításakor is. Ennek hátterében feltehetőleg a vörösvérsejt-PBS szuszpenziók jelentősen alacsonyabb haematocrit értéke állhat. A natív vérminták legalább négyszer-öttször magasabb átlagos haematocrit értékkel rendelkeztek (patkány: 44,56%, kutya: 54,58%), mint a vörösvérsejt-PBS szuszpenziók, amiket 10%-os haematocrit értékre készítettünk elő.¹⁰

A vártaknak megfelelően mind a patkány, mind a kutya vörösvérsejtek elongációs index értékeiben szignifikáns csökkenést eredményezett a sejtek hőkezelése, de a patkány vörösvérsejtek deformabilitás romlása kifejezettebbnek bizonyult.

Patkányok esetén a 15, illetve a 20 mPa.s viszkozitású PVP oldatok használatakor az elongációs index–nyírófeszültség görbék lefutása torzulást mutatott a 2 Pa alatti tartományban. A standardizált differencia legnagyobb variabilitását a 15 mPa.s-os szuszpendáló közeg

alkalmazásakor tapasztaltuk. Annak ellenére, hogy a 1,5 Pa nyírófeszültség feletti tartományban a legmagasabb standardizált differencia értékeket a 15 mPa.s-os oldat esetén mérhettük, a 2 Pa nyírófeszültség alatti, azaz a physiologiás értelemben is nagyobb jelentőségű tartományban, a 30 mPa.s viszkozitású PVP használatakor kaptuk a magasabb, jobb értékeket. Összességében, a 15 mPa.s viszkozitású PVP oldat nem ajánlott, és még a 20 mPa.s-os oldat használatakor is torzulhat az elongációs index–nyírófeszültség görbék lefutása alacsony nyírófeszültség tartományban, rigid vörösvérsejtek vizsgálatakor.

Kutyák esetén nem tapasztaltunk olyan mértékű különbséget a hőkezelés előtti és utáni állapotok mérési eredményei között, mint a patkány vérmintákban. Az elongációs index – nyírófeszültség görbék lefutása szabályos maradt, és a standardizált differencia értékek is jelentősen alacsonyabbak voltak a patkány eredményekhez képest. A patkány mintákhoz hasonlóan a 30 mPa.s viszkozitású PVP oldattal voltak biztosíthatóak a legmagasabb standardizált differencia értékek az alacsony nyírófeszültség tartományban.

A vörösvérsejt deformabilitási módszerek további összehasonlító vizsgálataira rotációs ektacytometer (LoRRca MaxSis Osmoscan) beszerzésével nyílik lehetőség.

6.4. Az eredmények hasznosíthatósága a kísérletes sebészeti kutatásokban

A humán laboratóriumi alkalmazásra kidolgozott haemorheologiai mérés technikai útmutatókhoz^{7,21,66} hasonló, állatkísérletekre és haemorheologiai témájú kísérletes sebészeti kutatásokra vonatkozó ajánlás nem ismert.

A laboratóriumi állatfajok haemorheologiai, és kiemelten a micro-rheologiai paramétereinek (vörösvérsejt deformabilitás, vörösvérsejt aggregatio) összehasonlító vizsgálatai adatokat szolgáltathatnak a faji- és nemi különbségek, valamint a mintavételi, mintakezelési, mintatárolási, mintaelőkészítési standardok kialakításához, figyelembe véve adott mérőműszerek érzékenységét is.

A CD patkányok és beagle kutyák vérmintáiban talált szignifikáns mértékű haemorheologiai faji- és nemi különbségek megismerése segítheti a kísérleti csoportok megtervezését. Ajánlott az egynemű csoportok kialakítása, vagy az adott pathophysiologiai változás eleve nemi bontásban történő vizsgálata, hiszen a különböző egyedszámú, kevert nemű csoportok eredményei elfedhetik, torzíthatják a kísérleti csoportok közötti valós különbségeket.

A vérminták kezelésére, tárolására vonatkozó összehasonlító adatok a laboratóriumi mérések biztonságát növelhetik. A nem megfelelően kezelt, vagy a vérvétel időpontjához képest túl későn mért minta eredményei nagymértékben eltérhetnek a valós adatoktól. Különösen igaz ez a patkányok vörösvérsejt aggregációs értékeire. Az összehasonlító adataink felhasználhatóak lehetnek a laboratóriumok közötti mintaszállítás hatásának megítélésére, amely az eredmények kiértékeléséhez nyújthat támpontot.

Az ektacytometriás méréseknél a változások kimutathatósága szempontjából a 30 mPa.s viszkozitású PVP oldat használata a leginkább ajánlott. Ettől eltérő oldat alkalmazása esetén figyelembe kell venni azt a tényt, hogy más-más viszkozitású szuszpendáló közeg használatával nyert eredmények egymással nem vethetőek össze.

Ezeket a jelentős különbségeket összehasonlítva az irodalmi áttekintés 2.3. fejezetében egy-egy kiragadott példaként ismertetett kutatási eredményekkel, kijelenthető, hogy a faji- és nemi különbségek, valamint a mintakezelési, mintaelőkészítési és mérés technikai standardizációs szempontok figyelembe vétele nagy fontossággal bír már a kísérletek tervezésekor is, a megbízható és jól értékelhető eredmények biztosítása céljából.

A jól értékelhető, megbízható állatkísérletes haemorheologiai eredmények hozzájárulhatnak számos pathophysiologiai állapot és folyamat (sepsis, ischaemia-reperfusio, cardio- és cerebrovascularis kórképek, keringésdinamikai változások, művi arterio-venosus shunt-ök, extracorporalis keringés) során kialakulható microcirculációs zavarok jobb megértéséhez, prognosztizálásához és a therápiás lehetőségeinek vizsgálatához.

7. FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Kimutattuk, hogy CD patkányokban a nőstények rendelkeznek jobb vörösvérsejt deformabilitás értékekkel, míg beagle kutyáknál a hímek. Ezzel szemben a vörösvérsejt aggregatio CD patkányoknál a nőstényekben, beagle kutyáknál pedig a hímekben fokozottabb mértékű. Mindez ellentmond a humán adatoknak, hiszen az irodalomban ismert, hogy a férfiaknál mutatózó fokozottabb vörösvérsejt aggregatio „rosszabb” vörösvérsejt deformabilitási értékekkel kísért.
2. Először írtuk le, hogy CD patkány és beagle kutya vérminták tárolásával a micro-rheologiai paraméterek (vörösvérsejt deformabilitás és vörösvérsejt aggregatio) változásának mértéke különbséget mutat a két laboratóriumi állatfaj között. A vörösvérsejt deformabilitás mérések szobahőmérsékleten való tárolás mellett 4-6 órán belül stabilak, de patkány vérminták vörösvérsejt aggregatio méréseit lehetőleg már 1 órán belül el kell végezni.
3. Először írtuk le patkány vérmintában a mintatárolás során a kezdeti, 2 órán belül jelentkező, 40-60%-os aggregációs index csökkenést és 24 óra utáni paradox emelkedését. A jelenség beagle kutyák vérmintáiban nem volt kimutatható és az irodalomban fellelhető humán összehasonlító vizsgálatokban sem ismert.
4. Kimutattuk, hogy a slit-flow ektacytometriás méréseknél a 15, 20 és 30 mPa.s viszkozitású polyvinyl-pyrrolidon (PVP) oldatok alkalmazásával Sprague-Dawley patkányok és beagle kutyák vérmintáinak vörösvérsejt deformabilitás értékeinek különbözősége eltérő mértékben mutatható ki. A legnagyobb mértékben kimutatható faji- és nemi különbségeket a 30 mPa.s viszkozitású oldat használatával kaptunk.
5. Először mutattuk ki, hogy Sprague-Dawley patkányok és beagle kutyák vörösvérsejtei eltérő mértékben érzékenyek a hőkezelésre (48 °C, 9 perc). A különbségeket a 30 mPa.s viszkozitású PVP oldat használatával mutattuk ki a legérzékenyebben.

Reményeink szerint ezek az eredmények hozzájárulhatnak a faji- és nemi haemorheologiai különbségek jobb megértéséhez, valamint a mintakezelési, mintatárolási és mintaelőkészítési standardok kialakításához, s egy állatkísérletes haemorheologiai mérés technikai útmutató kidolgozásához.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A kísérletes sebészeti kutatásokban a haemorheologiai paraméterek (teljes vér és plazma viszkozitás, vörösvérsejt deformabilitás, vörösvérsejt aggregatio) számos pathophysiologiai folyamatban mutatnak szignifikáns, gyakran jelző értékű változásokat, amelyek a következményes szöveti microcirculációs zavarok kialakulása miatt nagy fontossággal bírnak.

A kísérletes modellekben a mérési eredményeket, azok értékelhetőségét és összehasonlíthatóságát nagymértékben befolyásolják a laboratóriumi állatfajok még nem minden részletében tisztázott faji- és az alig ismert nemi haemorheologiai különbségei. Jelentős befolyásoló tényező lehet még valamint a mintavétel, mintatárolás és mintakezelés hatása a micro-rheologiai paraméterekre, melyek kimutathatósága a speciális mérőműszerek érzékenységétől is függ.

Az objektíven értékelhető laboratóriumi eredmények biztosítása érdekében célul tűztük ki két laboratóriumi állatfaj -outbred patkány, és beagle kutya- haemorheologiai paramétereinek faji- és nemi különbségeinek elemzését. Célunk volt továbbá a mintatárolási idő és hőmérséklet befolyásoló hatásának és az ektacytometriás elven meghatározott vörösvérsejt deformabilitásnál használt közeg jelentőségének, és magának a méréstechnikai módszer érzékenységének a vizsgálata.

Jelentős nemi haemorheologiai különbséget tapasztaltunk a két állatfaj között vörösvérsejt aggregatio és deformabilitás tekintetében. Patkányok esetén a nőstények, beagle kutyáknál a hímek rendelkeztek jobb vörösvérsejt deformabilitási paraméterekkel, míg a vörösvérsejt aggregatio patkányoknál a nőstényekben, beagle kutyáknál a hímekben volt fokozottabb.

CD patkány és beagle kutya vérminták tárolásával a micro-rheologiai paraméterek változásának mértéke különbséget mutatott a két laboratóriumi állatfaj között. A vörösvérsejt deformabilitás mérések szobahőmérsékleten való tárolás mellett 4-6 órán belül stabilak, de patkány vérminták vörösvérsejt aggregációját lehetőleg már 1 órán belül el kell végezni.

Slit-flow ektacytometriás módszerrel kimutattuk, hogy a vörösvérsejt deformabilitás méréseknél a 15, 20 és 30 mPa.s viszkozitású polyvinyl-pyrrolidon (PVP) oldatok alkalmazásával Sprague-Dawley patkányok és beagle kutyák vérmintáinak vörösvérsejt deformabilitási értékei jelentősen különböznek egymástól. Érzékenyebben és legmegbízhatóbban kimutatható faji- és nemi különbségeket a 30 mPa.s viszkozitású oldat használatával kaptunk. A hőkezeléssel rigidddé tett vörösvérsejtek deformabilitásának legnagyobb mértékű változásait patkányoknál sikerült kimutatni.

Összefoglalásként elmondható, hogy a megfelelően extrapolálható adatok biztosításához nélkülözhetetlen a kísérleti modell megfelelő tervezése, a mérési metodika standardizálása az adott laboratóriumi állatfajra. A tapasztalt faji- és nemi haemorheologiai különbségek, valamint a hibás mintakezelésből és a nem megfelelően standardizált metodikából fakadó mérési eltérések megközelíthetők, vagy elfedhetők a kísérleti csoportok közötti valós különbségek mértékét.

SUMMARY

In experimental surgical research the hemorheological parameters (blood and plasma viscosity, red blood cell deformability, red blood cell aggregation) show significant, often signaling changes in several pathophysiological processes, which changes have big importance due to the evolving tissue microcirculatory disorders.

In the experimental models the measurement results and their estimability and comparability are highly influenced by the not totally known race and barely known gender hemorheological differences of laboratory animal races as well as the effect of sampling, sample storage and handling on the micro-rheological parameters, which demonstrability depend also on the sensitivity of the special measurement device.

For securing proper estimable laboratory results we aimed to analyze the race and gender differences of the hemorheological parameters in two laboratory animal races -outbred rat and beagle dog-, furthermore to investigate the importance of the influencing effect of sample storage time and temperature and of the medium used for ektacytometric red blood cell deformability measurement and the sensitivity of the measurement-technical method.

We experienced significant hemorheological gender differences between the two races in red blood cell aggregation and deformability. In case of rats the females, in beagle dogs males had better red blood cell deformability while the red blood cell aggregation was increased in female rats and in male beagle dogs.

By the storage of CD rat and beagle dog blood samples the magnitude of micro-rheological parameter changes showed difference between the laboratory animal races. The red blood cell deformability measurements by room-temperature storage are stable within 4-6 hours, in case of rats the red blood cell aggregation measurements have to be possibly completed already within 1 hour.

We showed using slit-flow ektacytometric method that the red blood cell deformability values of Sprague-Dawley rat and beagle dog blood samples significantly differ from each other, using 15, 20 and 30 mPa.s viscosity polyvinyl-pyrrolidone (PVP) solutions for red blood cell deformability measurements. We got more sensitively and the most securely detectable race and gender differences by using 30 mPa.s viscosity solution. We could show the largest magnitude of changes in the deformability of the heat-treated, rigid red blood cells in the rat.

As conclusion we can say, that for securing properly extrapolable data it is necessary to plan properly the experimental model, standardize the measurement method for the actual laboratory animal race. The experienced race and gender differences, so the measurement alterations deriving from fault sample handling and not properly standardized methods can reach or mask the magnitude of the real differences between the experimental groups.

9. IRODALOMJEGYZÉK

9.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Alexy T, Wenby RB, Pais E, Goldstein LJ, Hogenauer W, Meiselman HJ. An automated tube-type blood viscometer: validation studies. *Biorheology* 2005. **42**. 237-247.
2. Armstrong JK, Wenby RB, Meiselman HJ, Fisher TC. The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation. *Biophys J* 2004. **87**. 4259-4270.
3. Assayag EB, Bova I, Berliner S, Peretz H, Usher S, Shapira I, Bornstein NM. Gender differences in the expression of erythrocyte aggregation in relation to B beta-fibrinogen gene polymorphisms in apparently healthy individuals. *Thromb Haemost* 2006. **95**. 428-433.
4. Aydogan S, Yapislar H, Artis S, Aydogan B. Impaired erythrocytes deformability in H₂O₂-induced oxidative stress: protective effect of L-carnosine. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008. **39**. 93-98.
5. Baev VM. Effect of sex on rheological properties of blood in adults, *Klin Lab Diagn* 2001. **12**. 33-35.
6. Baskurt OK, Bor-Kucukatay M, Yalcin O, Meiselman HJ. Aggregation behaviour and electrophoretic mobility of red blood cells in various mammalian species. *Biorheology* 2000. **37**. 417-428.
7. Baskurt OK, Boynard M, Cokelet GC, Connes P, Cooke BM, Forconi S, Liao F, Hardeman MR, Jung F, Meiselman HJ, Nash G, Németh N, Neu B, Sandhagen B, Shin S, Thurston G, Wautier JL. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009. **42**. 75-97.
8. Baskurt OK, Farley RA, Meiselman HJ. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human and rat: a comparative study. *Am J Physiol* 1997. **273**. H2604-H2612.
9. Baskurt OK, Gelmont D, Meiselman HJ. Red blood cell deformability in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998. **157**. 421-427.
10. Baskurt OK, Hardeman MR, Uyuklu M, Ulker P, Cengiz M, Németh N, Shin S, Alexy T, Meiselman HJ. Comparison of three commercially available ektacytometers with different shearing geometries. *Biorheology* 2009. **46**. 251-264.
11. Baskurt OK, Hardeman MR, Uyuklu M, Ulker P, Cengiz M, Németh N, Shin S, Alexy T, Meiselman HJ. Parameterization of red blood cell elongation index – shear stress curves obtained by ektacytometry. *Scan J Clin Lab Inv* 2009. **69**. 777-788.
12. Baskurt OK, Marshall-Gradisnik S, Pyne M, Simmonds MBE, Christy RS, Meiselman HJ. Assesment of hemorheological profile of koala and echidna. *Zoology* 2010. **113**. 110-117.
13. Baskurt OK, Meiselman HJ. Analyzing shear stress-elongation index curves: Comparison of two approaches to simplify data presentation. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004. **31**. 23-30.
14. Baskurt OK, Meiselman HJ. Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost* 2003. **29**. 435-50.
15. Baskurt OK, Meiselman HJ. Lessons from comparative hemorheology studies. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010. **45**. 101-108.
16. Baskurt OK, Meiselman HJ. Red blood cell “aggregability”. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009. **43**. 353-354.
17. Baskurt OK. Deformability of red blood cells from different species studied by resistive pulse shape analysis technique. *Biorheology* 1996. **33**. 169-179.

18. Baskurt OK. In vivo correlates of altered blood rheology. *Biorheology* 2008. **45**. 629-638.
19. Baskurt OK. Mechanisms of blood rheology alterations. In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ. (eds) *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands 2007. 170-190.
20. Bekyarova G, Yankova T, Kozarev I, Yankov D. Reduced erythrocyte deformability related to activated lipid peroxidation during the early postburn period. *Burns* 1996. **22**. 291-294.
21. Bernát SI, Bogár L, Csornai M, Imre S, Juricskay I, Kollár L, Novák Z, Pécsvárady Zs, Pongrácz E, Rozsos I, Tóth K. Módszertani útmutató a haemorheológiai mérések végzéséhez. *Érbetegségek* 2005. **12**. Suppl 1. 27-33.
22. Betz T, Bakowsky U, Mueller MR, Lehr CM, Bernhardt I. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. *Bioelectrochemistry* 2007. **70**. 122-126.
23. Bitbol M. Red blood cell orientation in orbit $C = 0$. *Biophys J* 1986. **49**. 1055-1068.
24. Bogár L, Juricskay I, Késmárky G, Fehér G, Kenyeres P, Tóth K. Gender differences in hemorheological parameters of coronary artery disease patients. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006. **35**. 99-103.
25. Bogár L. Az emberi vörsejtek filtrációs sajátosságai. Kandidátusi értekezés, Pécs, 1988.
26. Bogár L. Diagnosztika. In: Bernát SI, Pongrácz E. (eds) *A klinikai haemorheologia alapjai*. Kornétás Kiadó, Budapest 1999. 33-50.
27. Bráth E, Németh N, Kiss F, Sajtos E, Hevér T, Mátyás L, Tóth L, Mikó I, Furka I. Changes of local and systemic hemorheological properties in intestinal ischemia-reperfusion injury in the rat model. *Microsurgery* 2010. **30**. 321-326.
28. Brown DW, Giles DW, Croft JB. Hematocrit and the risk of coronary heart disease mortality. *Am Heart J* 2001. **142**. 657-663.
29. Brun J. Hormones, metabolism and body composition as major determinants of blood rheology: potential pathophysiological meaning. *Clin Hemorheol Microcirc* 2002. **26**. 63-79.
30. Cardoso AV, Pereira MH, de Araújo Marcondes G, Ferreira AR, de Araújo PR. Microplate reader analysis of triatomine saliva effect on erythrocyte aggregation. *Materials Research* 2007. **10**. 31-36.
31. Carvalho FA, Connell S, Miltenberger-Miltenyi G, Pereira SV, Tavares A, Ariëns RAS, Santos NC. Atomic force microscopy-based molecular recognition of a fibrinogen receptor on human erythrocytes. *ACS Nano* **4**. 4609-4620.
32. Castellini M, Elsner R, Baskurt OK, Wenby RB, Meiselman HJ. Blood rheology of Weddell seals and bowhead whales. *Biorheology* 2006. **43**. 57-69.
33. Catalani G, Dottavio ME, Rasia M. Acute training in racing horses at two different levels of effort: A haemorheological analysis. *Clin Hemorheol Microcirc* 2007. **37**. 245-252.
34. Chien S, Sung LA. Physicochemical basis and clinical implications of red cell aggregation. *Clin Hemorheol* 1987. **7**. 71-91
35. Chien S, Usami S, Dellenback RJ, Bryant CA. Comparative hemorheology – hematological implications of species differences in blood viscosity. *Biorheology* 1971. **8**. 35-57.
36. Chien S. Principles and techniques for assessing erythrocyte deformability. *Blood Cells* 1977. **3**. 71-99.
37. Clauss A. Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. *Acta Haematol* 1957. **17**. 237-246.

38. Cokelet GR, Meiselman HJ. Macro- and micro-rheological properties of blood. In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ. (eds) *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands 2007. 45-71.
39. Cooke BM, Lim CT. Mechanical and adhesive properties of healthy and diseased red blood cells. In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ. (eds) *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands 2007. 91-114.
40. Copley AL. The history of clinical hemorheology. *Clin Hemorheol* 1985. **5**. 765-811.
41. Dormándy J, Ernst E, Bennett D. Erythrocyte deformability in the pathophysiology of the microcirculation. *Ric Clin Lab* 1981. **11**. (Suppl. 1) 1135-1138.
42. Dormándy J, Flute P, Mátrai Á, Bogár L, Mikita J. The new St. George's blood filterometer. *Clin Hemorheol* 1985. **5**. 975-983.
43. Dormándy JA. Significance of hemorheology in the management of the ischemic limb. *World J Surg* 1983. **7**. 319-325.
44. Famodu AA, Awodu OA. Anthropometric indices as determinants of haemorheological cardiovascular disease risk factors in Nigerian adults living in a semi-urban community. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009. **43**. 335-344.
45. Fan FC, Chen RYZ, Schuessler GB, Chien S. Effects of hematocrit variations on regional hemodynamics and oxygen transport in the dog. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1980. **238**. H545-H552.
46. Fehér J, Vereckei A. Szabadgyök-reakciók jelentősége az orvostudományban. Biogal Gyógyszergyár, 1985.
47. Feinglass J, McDermott MM, Foroohar M, Pearce WH. Gender differences in interventional management of peripheral vascular disease: evidence from a blood flow laboratory population. *Ann Vasc Surg* 1994. **8**. 343-349.
48. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott, Hagerstown, MD 2000.
49. Fisher TM, Schmid-Schönbein H. Tank tread motion of red cell membranes in viscometric flow. In: Bessis M, Shohet SB, Mohandas N. (eds) *Red Cell Rheology*. Springer Verlag, Berlin 1978. 347-358.
50. Fisher TM. Tank-tread frequency of the red cell membrane: dependence on the viscosity of the suspending medium. *Biophys J* 2007. **93**. 2553-2561.
51. Foo JJ, Chan V, Feng ZQ, Liu KK. Human red blood cells deformed under thermal fluid flow. *Biomed Mater* 2006. **1**. 1-7.
52. Forconi S. [The hemorheological laboratory in clinical medicine: the value and limitations of its methods]. *Ric Clin Lab* 1985. **15**. Suppl 1. 3-10.
53. Fowkes FG, Pell JP, Donnan PT, Housley E, Lowe GDO, Riemersma RA, Prescott RJ. Sex differences in susceptibility to etiologic factors for peripheral arteriosclerosis. Importance of plasma fibrinogen and blood viscosity. *Arterioscler Thromb* 1994. **14**. 862-868.
54. Fritz OG Jr. Anomalous diffusion of erythrocytes in the presence of polyvinylpyrrolidone. *Biophys J* 1984. **46**. 219-228.
55. Furka A, Németh N, Gulyás A, Bráth E, Pető K, Takács EI, Furka I, Sápó P, Mikó I. Hemorheological changes caused by intermittent Pringle (Baron) maneuver in experimental beagle canine model. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008. **40**. 177-189.
56. Furlanello T, Tasca S, Caldin M, Carli E, Patron C, Tranquillo M, Lubas G, Solano-Gallego L. Artifactual change in canine blood following storage, detected using the ADVIA 120 hematology analyzer. *Vet Clin Pathol* 2006. **35**. 42-46.

57. Gascoyne SC, Hawkey CM. Patterns of variation in vertebrate haematology. *Clin Hemorheol* 1992. **12**. 627-637.
58. Gori T, Dragoni S, Di Stolfo G, Forconi S. Endothelium and haemorheology. *Ann Ist Super Sanità* 2007. **43**. 124-129.
59. Gregersen MI, Bryant CA, Chien S, Dellenback RJ, Magazinovic V, Usami S. Species differences in the flexibility and deformation of erythrocytes (RBC). *Bibl Anat* 1969. **10**. 104-108.
60. Grutzner F, Deakin J, Rens W, El-Mogharbel N, Marshall Graves JA. The monotreme genome: a patchwork of reptile, mammal and unique features? *Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol* 2003. **136**. 867-881.
61. Guillet R, Driss F, Perrotin P, Pautou C, Nalpas B, Boynard M. Gender, menstrual cycle, oral contraceptives and red blood cell deformability in healthy adult subjects. *Clin Hemorheol Microcirc* 1998. **19**. 83-88.
62. Hardeman MR, Goedhart PT, Shin S. Methods in Hemorheology. In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ. (eds) *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands 2007. 242-266.
63. Hardeman MR. Személyes kommunikáció.
64. Hawkey CM, Bennett PM, Gascoyne SC, Hart MG, Kirkwood JK. Erythrocyte size, number and haemoglobin content in vertebrates. *Br J Haematol* 1991. **77**. 392-397.
65. Hevér T, Kiss F, Sajtos E, Mátyás L, Németh N. Are there arterio-venous differences of blood micro-rheological variables in laboratory rats? *Korea-Aust Rheol J* 2010. **22**. 59-64.
66. ICSH Expert Panel on Blood Rheology. Guidelines for measurement of blood viscosity and erythrocyte deformability. *Clin Hemorheol* 1986. **6**. 439-453.
67. Imre S, Csornai M, Balázs M. High sensitivity to autoxidation in neonatal calf erythrocytes: possible mechanism of accelerated cell aging. *Mech Ageing Dev* 2001. **122**. 69-76.
68. Imre S, Fekete I, Farkas T. Increased proportion of docosahexanoic acid and high lipid peroxidation capacity in erythrocytes of stroke patients. *Stroke* 1994. **25**. 2416-2420.
69. Jan KM, Chien S. Influence of ionic composition of fluid medium on red cell aggregation. *J Gen Physiol* 1973. **61**. 655-668.
70. Jan KM, Chien S. Role of surface electric charge in red blood cell interactions. *J Gen Physiol* 1973. **61**. 638-654.
71. Jung F, Kiesewetter H, Roggenkamp HG, Nüttgens HP, Ringelstein EB, Gerhards M, Kotitschke G, Wenzel E, Zeller H. [Determination of reference ranges of rheologic parameters: study at 653 randomly selected probands of the Aachen district]. *Klin Wochenschr* 1986. **64**. 375-381.
72. Jung F. From hemorheology to microcirculation and regenerative medicine: Fåhræus Lecture 2009. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010. **45**. 79-99.
73. Kameneva MV, Watach MJ, Borovetz HS. Gender difference in rheologic properties of blood and risk of cardiovascular diseases. *Clin Hemorheol Microcirc* 1999. **21**. 357-363.
74. Katyukhin LN, Kazenow AM, Maslove MN, Matskevich YA. Rheologic properties of mammalian erythrocytes: relationship to transport ATPases. *Comp Biochem Physiol B* 1998. **120**. 493-498.
75. Kayar E, Mat F, Meiselman HJ, Baskurt OK. Red blood cell rheological alteration in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Biorheology* 2001. **38**. 405-414.
76. Késmárky G, Kenyeres P, Rábai M, Tóth K. Plasma viscosity: a forgotten variable. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008. **39**. 243-246.
77. Kiss F, Németh N, Sajtos E, Bráth E, Pető K, Baskurt OK, Furka I, Mikó I. Examination of aggregation of various red blood cell populations can be informative in comparison of

78. Koltai K, Fehér G, Kenyeres P, Lénárt I, Alexy T, Horváth B, Márton Z, Késmárky G, Tóth K. Relation of platelet aggregation and fibrinogen levels to advancing age in aspirin- and thienopyridine-treated patients. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008. **40**. 295-302.
79. Kovács Á, Szikszai Z, Várady É, Imre S. Study on the hemorheological parameters of oldest-old residents in the East-Hungarian city, Debrecen. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006. **35**. 83-88.
80. Lee BK, Durairaj A, Mehra A, Wenby RB, Meiselman HJ, Alexy T. Microcirculatory dysfunction in cardiac syndrome X: role of abnormal blood rheology. *Microcirculation* 2008. **15**. 451-459.
81. Lim GHW, Wortis M, Mukhopadhyay R. Stomatocyte-discocyte-echinocyte sequence of the human red blood cell: Evidence for the bilayer-couple hypothesis from membrane mechanics. *PNAS* 2002. **99**. 16766-16769.
82. Lipowsky HH. Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation* 2005. **12**. 5-15.
83. Lumley JSP, Green CJ, Lear P, Angell-James JE (eds) *Essentials of Experimental Surgery*. Science and Technology Books, Butterworths, St. Luis, USA 1997.
84. Machiedo GW, Zaets S, Berezina T, Xu DZ, Spolarics Z, Deitch EA. Red blood cell damage after trauma-hemorrhage is modulated by gender. *J Trauma* 2004. **56**. 837-844.
85. Medaille C, Briend-Marchal A, Braun JP. Stability of selected hematology variables in canine blood kept at room temperature in EDTA for 24 and 48 hours. *Vet Clin Pathol* 2006. **35**. 18-23.
86. Meiselman HJ, Castellini MA, Elsner R. Hemorheological behavior of seal blood. *Clin Hemorheol* 1992. **12**. 657-675.
87. Meiselman HJ. Morphological determinants of red blood cell deformability. *Scand J Clin Lab Invest* 1981. **41**. Suppl 156. 27-34.
88. Meiselman HJ. Rheology of shape-transformed human red cells. *Biorheology* 1978. **15**. 225-237.
89. Michalska-Malecka K, Slowinska L, Dorecka M, Romaniuk W. Correlations in some pathogenetic factors and values of hemorheological parameters in age-related macular degeneration. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008. **39**. 209-216.
90. Mikó I, Bráth E, Németh N, Furka A, Sipka S Jr, Pető K, Serfőző J, Kovács J, Imre S, Benkő I, Galuska L, Sipka S, Ács G, Furka I. Spleen autotransplantation. Morphological and functional follow-up after spleen autotransplantation in mice: a research summary. *Microsurgery* 2007. **27**. 312-316.
91. Mikó I, Németh N, Sajtos E, Bráth E, Pető K, Furka A, Szabó G, Kiss F, Imre S, Furka I. Splenic function and red blood cell deformability: The beneficial effects of spleen autotransplantation in animal experiments. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010. **45**. 281-288.
92. Mikó I, Németh N, Sipka S Jr, Bráth E, Pető K, Gulyás A, Furka I, Zhong R. Hemorheological follow-up after splenectomy and spleen autotransplantation in mice. *Microsurgery* 2006. **26**. 38-42.
93. Mohandas N, Chasis JA, Shohet SB. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. *Semin Hematol* 1983. **20**. 225-242.
94. Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol* 1993. **30**. 171-192.

95. Mohandas N, Shohet SB. The role of membrane associated enzymes in regulation of erythrocyte shape and deformability. *Clin Hematol* 1981. **10**. 223–237.
96. Mohandas N. The red blood cell membrane. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ. (eds) *Hematology: basis, principles and practice*. Churchill-Livingstone, New York, USA 1991. 264-269.
97. Musielak M. Red blood cell-deformability measurement: review of techniques. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009. **42**. 47-64.
98. Nagao A, Ishii T, Takechi H. Study of blood cell counting of mouse, rat and rabbit using semiautomated hematology instrument system. *Sysmex Journal* 1987. **10**. 236-243.
99. Nash GB, Jones JG, Mikita J, Christopher B, Dormándy JA. Effects of preparative procedures and of cell activation on flow of white cells through micropore filters. *Br J Haematol* 1988. **70**. 171-176.
100. Nash GB, Meiselman HJ. Alteration of red cell membrane viscoelasticity by heat treatment: effect on cell deformability and suspensions viscosity. *Biorheology* 1985. **22**. 73-84.
101. Nash GB, Meiselman HJ. Effects of dextran and polyvinylpyrrolidone on red cell geometry and membrane elasticity. *Ann N Y Acad Sci* 1983. **416**. 255-262.
102. Németh N. Haemorheológiai faktorkok és a microcirculatio vizsgálata kísérletes végtagi ischaemia-reperfúziós modelleken. Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés, Debreceni Egyetem, 2004
103. Németh N, Alexy T, Furka A, Baskurt OK, Meiselman HJ, Furka I, Mikó I. Inter-species differences in hematocrit to blood viscosity ratio. *Biorheology* 2009. **46**. 155-165.
104. Németh N, Baskurt OK, Meiselman HJ, Mikó I. Species-specific effects of anticoagulants on red blood cell deformability. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009. **43**. 257-259.
105. Németh N, Gulyás A, Bálint A, Pető K, Bráth E, Kiss F, Furka I, Baskurt OK, Mikó I. Measurement of erythrocyte deformability and methodological adaptation for small-animal microsurgical models. *Microsurgery* 2006. **26**. 33-37.
106. Németh N, Lesznyák T, Szokoly M, Bráth E, Pető K, Szabó Gy, Gulyás A, Kiss F, Imre S, Furka I, Mikó I. A haemorheológiai vizsgálatok jelentősége kísérletes végtagi ischaemia-reperfúziós károsodások kapcsán. *Magy Seb* 2005. **58**. 144-147.
107. Németh N, Lesznyák T, Szokoly M, Furka I, Mikó I. Allopurinol prevents erythrocyte deformability impairing but not the hematological alterations after limb ischemia-reperfusion in rats. *J Invest Surg* 2006. **19**. 47-56.
108. Neu B, Meiselman HJ. Red blood cell aggregation. In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ. (eds) *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands 2007. 114-136.
109. Ohta K, Gotoh F, Tomita M, Tanahashi N, Kobari M, Shinohara T, Tereyama Y, Mihara B, Takeda H. Animal species differences in erythrocyte aggregability. *Am J Physiol* 1992. **262**. H1009-H1012.
110. Olsen AK, Bladbjerg EM, Jensen AL, Hansen AK. Effect of pre-analytical handling on haematological variables in minipigs. *Lab Anim* 2001. **35**. 147-152.
111. Pehlivanoglu B, Dikmenoglu N, Balkanci DZ. Effect of stress on erythrocyte deformability, influence of gender and menstrual cycle. *Clin Hemorheol Microcirc* 2007. **37**. 301-308.
112. Pető K, Németh N, Bráth E, Takács EI, Baskurt OK, Meiselman HJ, Furka I, Mikó I. The effects of renal ischemia-reperfusion on hemorheological factors: preventive role of allopurinol. *Clin Hemorheol Microcirc* 2007. **37**. 347-358.

113. Pfafferoth C, Nash GB, Meiselman HJ. Red blood cell deformability in shear flow. Effects of internal and external phase viscosity and of in vivo aging. *Biophys J* 1985. **47**. 695-704.
114. Plasenzotti R, Stoiber B, Posch M, Windberger U. Red blood cell deformability and aggregation behaviour in different animal species. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004. **31**. 105-111.
115. Popel AS, Johnson PC, Kameneva MV, Wild MA. Capacity for red blood cell aggregation is higher in athletic mammalian species than in sedentary species. *J Appl Physiol* 1994. **77**. 1790-1794.
116. Pries AR, Secomb TW, Gaetgens P. Biophysical aspects of blood flow in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 1996. **32**. 654-667.
117. Pries AR, Secomb TW. Rheology of the microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc* 2003. **29**. 143-148.
118. Rampling M.W. History of hemorheology. In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ. (eds) *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands 2007. 3-17.
119. Rampling MW, Meiselman HJ, Neu B, Baskurt OK. Influence of cell-specific factors on red blood cell aggregation. *Biorheology* 2004. **41**. 91-112.
120. Rampling MW. Red cell aggregation and yield stress. In: Lowe GDO. (ed) *Clinical Blood Rheology*. CRC Press, Boca Raton, USA 1988. 11-44.
121. Reid HL, Dormándy JA, Barnes AJ, Lock PJ, Dormándy TL. Impaired red cell deformability in peripheral vascular disease. *Lancet* 1976. **1**. 666-668.
122. Reinhart WH, Chien S. Red cell rheology in stomatocyte-echinocyte transformation: roles of cell geometry and cell shape. *Blood* 1980. **67**. 1110-1118.
123. Reinhart WH, Singh A. Erythrocyte aggregation: the roles of cell deformability and geometry. *Eur J Clin Invest* 1990. **20**. 458-462.
124. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 2007. **454**. 345-359.
125. Repin NV, Bobrova EN, Repina SV. Thermally induced transformation of mammalian red blood cells during hyperthermia. *Bioelectrochemistry* 2008. **73**. 101-105.
126. Sajtos E, Németh N, Kiss F, Bráth E, Pető K, Hevér T, Mátyás L, Furka I, Mikó I. Application of leukocyte antisedimentation rate calculation in investigation of spleen salvaging experimental surgical techniques. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010. **45**. 289-294.
127. Schmid-Schönbein H, Malotta H, Striesow F. Erythrocyte aggregation: causes, consequences and methods for assessment. *Tijdschr NVKC* 1990. **15**. 88-97.
128. Schmid-Schönbein H, Wells R. Fluid drop-like transition of erythrocytes under shear. *Science* 1969. **165**. 288-291.
129. Shin S, Hou JX, Suh JS, Singh M. Validation and application of a microfluidic ektacytometer (RheoScan-D) in measuring erythrocyte deformability. *Clin Hemorheol Microcirc* 2007. **37**. 319-328.
130. Shin S, Ku Y, Park MS, Suh JS. Slit-flow ektacytometry: laser diffraction in a slit rheometer. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2005. **65**. 6-13.
131. Shin S, Ku YH, Ho JX, Kim YK, Suh JS, Singh M. Progressive impairment of erythrocyte deformability as indicator of microangiopathy in type 2 diabetes mellitus. *Clin Hemorheol Microcirc* 2007. **36**. 253-261.
132. Simchon S, Jan KG, Chien S. Influence of reduced red cell deformability on regional blood flow. *Am J Physiol* 1987. **253**. H898-H903.

133. Simmonds MJ, Baskurt OK, Meiselman HJ, Marshall-Gradisnik SM. A comparison of capillary and venous blood sampling methods for the use in haemorheology studies. *Clin Hemorheol Microcirc* 2011. **47**. 111-119.
134. Smith JE, Mohandas N, Shohet SB. Variability in erythrocyte deformability among various mammals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1979. **236**. H725-H730.
135. Son KH, Lim CH, Song EJ, Sun K, Son HS, Lee SH. Inter-species hemorheologic differences in arterial and venous blood. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010. **44**. 27-33.
136. Stoltz JF, Singh M, Riha P. (eds) *Hemorheology in Practice*. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands 1999. 9-52.
137. Stuart J, Stone PCW, Freyburger G, Boisseau MR, Altman DG. Instrument precision and biological variability determine the number of patients required for rheological studies. *Clin Hemorheol* 1989. **9**. 181-197.
138. Szapáry L, Horváth B, Márton Z, Alexy T, Demeter N, Szóts M, Klabuzai A, Késmárky G, Juricskay I, Gaál V, Czopf J, Tóth K. Hemorheological disturbances in patients with chronic cerebrovascular diseases. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004. **31**. 1-9.
139. Szikszai Z, Fekete I, Imre S. A comparative study of hemorheological parameters in transient ischemic attack and acute ischemic stroke patients: Possible predictive value. *Clin Hemorheol Microcirc* 2003. **28**. 51-57.
140. Tóth K, Juricskay I. Rheologiai alapfogalmak. In: Bernát SI, Pongrácz E. (eds) *A klinikai haemorheologia alapjai*. Kornétás Kiadó, Budapest, 1999. 13-24.
141. Tóth K, Késmárky G. Clinical Significance of hemorheological alterations. In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ. (eds) *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands 2007. 392-432.
142. Tóth K, Késmárky G. Kardiológiai betegségek. In: Bernát SI, Pongrácz E. (eds) *A klinikai haemorheologia alapjai*. Kornétás Kiadó, Budapest, 1999. 95-114.
143. Tozzi-Ciancarelli MG, Di Massimo C, Mascioli A. Aging of human erythrocytes: the role of membrane perturbations induced by in vitro ATP-depletion. *Cell Mol Biol* 1992. **38**. 303-310.
144. Udden MM. In vitro sub-hemolytic effects of butoxyacetic acid on human and rat erythrocytes. *Toxicol Sci* 2002. **69**. 258-264.
145. Udden MM. Rat erythrocyte morphological changes after gavage dosing with 2-butoxyethanol: a comparison with the in vitro effects of butoxyacetic acid on rat and human erythrocytes. *J Appl Toxicol* 2000. **20**. 381-387.
146. Usami S, Chien S, Gregersen MI. Viscometric characteristic of blood of the elephant, man, dog, sheep, and goat. *Am J Physiol* 1969. **217**. 884-890.
147. Uyuklu M, Cengiz M, Ulker P, Hevér T, Tripette J, Connes P, Németh N, Meiselman HJ, Baskurt OK. Effects of storage duration and temperature of human blood on red cell deformability and aggregation. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009. **41**. 269-278.
148. Uyuklu M, Meiselman HJ, Baskurt OK. Effect of hemoglobin oxygenation level on red blood cell deformability and aggregation parameters. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009. **41**. 179-188.
149. van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC (eds) *Principles of Laboratory Animal Science*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands 2001.
150. Vaya A, Simo M, Santaolaria M, Todoli J, Aznar J. Red blood cell deformability in iron deficiency anaemia. *Clin Hemorheol Microcirc* 2005. **33**. 75-80.
151. Velcheva I, Antonova N, Dimitrova V, Dimitrov N, Ivanov I. Plasma lipids and blood viscosity in patients with cerebrovascular disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006. **35**. 155-157.

152. Velcheva I, Antonova N, Titianova E, Damianov P, Dimitrov N, Dimitrova V. Hemorheological disturbances in cerebrovascular diseases. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008. **39**. 391-396.
153. Waugh RE. Red cell deformability in different vertebrate animals. *Clin Hemorheol* 1992. **12**. 649-656.
154. Weed RI, La Celle PL, Merrill EW. Metabolic dependence of red blood cell deformability. *J Clin Invest* 1969. **48**. 795-809.
155. Wiewiora M, Sosada K, Slowinska L, Piecuch J, Gluck M, Zurawinski W, Turczynski B. Sex-dependent differences in rheological properties and the relation of blood viscosity to erythrocyte aggregation indices among morbidly obese patients. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010. **44**. 259-267.
156. Windberger U, Bartholovitsch A, Plasenzotti R, Korak KJ, Heinze G. Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: reference values and comparison of data. *Exp Physiol* 2003. **88**. 431-440.
157. Windberger U, Baskurt OK. Comparative Hemorheology. In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ. (eds) *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands 2007. 267-285.
158. Yerer MB, Aydogan S, Comu FM. Gender-related alterations in erythrocyte mechanical activities under desflurane or sevoflurane anesthesia. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008. **39**. 423-427.
159. Yilmaz F, Gundogdu MY. A critical review on blood flow in large arteries; relevance to blood rheology, viscosity models, and physiologic conditions. *Korea-Aust Rheol J* 2008. **20**. 197-211.
160. Young J. Understanding statistical analysis in the surgical literature: some key concepts. *ANZ J Surg* 2009. **79**. 398-403.
161. Zeltser D, Rogowski O, Berliner S, Mardi T, Justo D, Serov J, Rozenblat M, Avitzour D, Shapira I. Sex differences in the expression of haemorheological determinants in individuals with atherothrombotic risk factors and in apparently healthy people. *Heart* 2004. **90**. 277-281.
162. Zhang J, Zhang X, Wang N, Fan Y, Ju H, Yang J, Wen J, Qu X. What is the maximum duration to perform the hemorheological measurement for the human and mammals. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004. **31**. 157-160.

9.2. Az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények

1. Németh N, Baskurt OK, Meiselman HJ, **Kiss F**, Uyuklu M, Hevér T, Sajtos E, Kenyeres P, Tóth K, Furka I, Mikó I. Storage of laboratory animal blood samples causes hemorheological alterations: Inter-species differences and the effects of duration and temperature. *Korea-Aust Rheol J* 2009. **21**. 127-133. **IF: 0,965**
2. Németh N, **Kiss F**, Furka I, Mikó I. Gender differences of blood rheological parameters in laboratory animals. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010. **45**. 263-272. **IF: 2,838**
3. **Kiss F**, Sajtos E, Hevér T, Németh N. The power of slit-flow ektacytometry measurements for testing normal and heat treated red blood cells using various viscosity media in laboratory animals. *Korea-Aust Rheol J* 2010. **22**. 81-86. **IF: 0,948**
4. **Kiss F**, Sajtos E, Mátyás L, Magyar Zs, Furka I, Mikó I, Németh N. Testing red blood cell deformability of laboratory animals by slit-flow ektacytometry in various viscosity media: inter-species and gender differences. *Korea-Aust Rheol J* 2010. **22**. 113-118. **IF: 0,948**

9.3. Az értekezés témájával összefüggő *in extenso* közlemények

5. Németh N, Gulyás A, Bálint A, Pető K, Bráth E, **Kiss F**, Furka I, Baskurt OK, Mikó I. Measurement of erythrocyte deformability and methodological adaptation for small-animal microsurgical models. *Microsurgery* 2006. **26**. 33-37. **IF: 0,882**
6. **Kiss F**, Németh N, Sajtos E, Bráth E, Pető K, Baskurt OK, Furka I, Mikó I. Examination of various red blood cell populations can be informative in comparison of splenectomy and spleen autotransplantation in animal experiments. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010. **45**. 273-280. **IF: 2,838**

9.4. Egyéb *in extenso* közlemények

7. Németh N, Lesznyák T, Szokoly M, Bráth E, Pető K, Szabó Gy, Gulyás A, **Kiss F**, Imre S, Furka I, Mikó I. A haemorheologiai vizsgálatok jelentősége kísérletes végtagi ischaemia-reperfúziós károsodások kapcsán. *Magyar Sebészet* 2005. **58**. 144-147.
8. Bráth E, Németh N, **Kiss F**, Sajtos E, Hevér T, Mátyás L, Tóth L, Mikó I, Furka I. Changes of local and systemic hemorheological properties in intestinal ischemia-reperfusion injury in the rat model. *Microsurgery* 2010. **30**. 321-326. **IF: 1,555**
9. Mikó I, Németh N, Sajtos E, Bráth E, Pető K, Furka A, Szabó G, **Kiss F**, Imre S, Furka I. Splenic function and red blood cell deformability: The beneficial effects of spleen autotransplantation in animal experiments. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010. **45**. 281-288. **IF: 2,838**

10. Sajtos E, Németh N, **Kiss F**, Bráth E, Pető K, Hevér T, Mátyás L, Furka I, Mikó I. Application of leukocyte antisedimentation rate calculation in investigation of spleen salvaging experimental surgical techniques. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010. **45**. 289-294. **IF: 2,838**
11. Hevér T, **Kiss F**, Sajtos E, Mátyás L, Németh N. Are there arterio-venous differences of blood micro-rheological variables in laboratory rats? *Korea-Aust Rheol J* 2010. **22**. 59-64. **IF: 0,948**
12. Hevér T, Németh N, Bráth E, Tóth L, **Kiss F**, Sajtos E, Mátyás L, Szaszko J, Drimba L, Peitl B, Csiki Z, Mikó I, Furka I. Morphological, hemodynamical and hemorheological investigations of mature artificial saphenous arterio-venous shunt in the rat model. *Microsurgery* 2010. **30**. 649-656. **IF: 1,555**
13. Németh N, **Kiss F**, Magyar Zs, Miszti-Blasius K, Furka I. Following-up hemorheological consequences of gonadectomy in male and female rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 2011. **48**. doi: 10.3233/CH-2011-1430 **IF: 2,838**
14. Németh N, **Kiss F**, Hevér T, Bráth E, Sajtos E, Furka I, Mikó I. Hemorheological consequences of hind limb ischemia-reperfusion differ in normal and gonadectomized male and female rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 2011. **48**. doi: 10.3233/CH-2011-1427 **IF: 2,838**

Összesített IF: 24,829

Iktatószám: DEENKÉTK /174/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

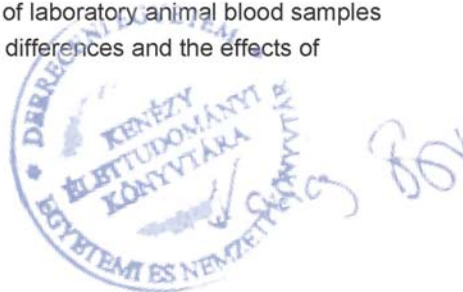
Jelölt: Kiss Ferenc

Neptun kód: FWXQXQ

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Kiss, F., Sajtos, E., Mátyás, L., Magyar, Z., Furka, I., Mikó, I., Németh, N.: Testing red blood cell deformability of laboratory animals by slit-flow ektacytometry in various viscosity media: Inter-species and gender differences.
Korea-Aust. Rheol. J. 22 (2), 113-118, 2010.
IF:0.948
2. Kiss, F., Sajtos, E., Hevér, T., Németh, N.: The power of slit-flow ektacytometry measurements for testing normal and heat treated red blood cells using various viscosity media in laboratory animals.
Korea-Aust. Rheol. J. 22 (1), 81-86, 2010.
IF:0.948
3. Németh, N., Kiss, F., Furka, I., Mikó, I.: Gender differences of blood rheological parameters in laboratory animals.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 45 (2-4), 263-272, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2010-1303>
IF:2.838
4. Németh, N., Baskurt, O.K., Meiselman, H.J., Kiss, F., Uyuklu, M., Hevér, T., Sajtos, E., Kenyeres, P., Tóth, K., Furka, I., Mikó, I.: Storage of laboratory animal blood samples causes hemorheological alterations: Inter-species differences and the effects of duration and temperature.
Korea-Aust. Rheol. J. 21 (2), 127-133, 2009.
IF:0.965



További Közlemények

5. Németh, N., **Kiss, F.**, Magyar, Z., Miszti-Blasius, K., Furka, I.: Following-up hemorheological consequences of gonadectomy in male and female rats.
Clin. Hemorheol. Microcirc. "accepted by publisher", 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2011-1430>
IF:2.838 (2010)
6. Németh, N., **Kiss, F.**, Hevér, T., Bráth, E., Sajtos, E., Furka, I., Mikó, I.: Hemorheological consequences of hind limb ischemia-reperfusion differs in normal and gonadectomised male and female rats.
Clin. Hemorheol. Microcirc. Epub ahead of print (2011)
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2011-1427>
IF:2.838 (2010)
7. Bráth, E., Németh, N., **Kiss, F.**, Sajtos, E., Hevér, T., Mátyás, L., Tóth, L., Mikó, I., Furka, I.: Changes of local and systemic hemorheological properties in intestinal ischemia-reperfusion injury in the rat model.
Microsurgery. 30 (4), 321-326, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.20707>
IF:1.555
8. Hevér, T., **Kiss, F.**, Sajtos, E., Mátyás, L., Németh, N.: Are there arterio-venous differences of blood micro-rheological variables in laboratory rats?
Korea-Aust. Rheol. J. 22 (1), 59-64, 2010.
IF:0.948
9. Hevér, T., Németh, N., Bráth, E., Tóth, L., **Kiss, F.**, Sajtos, E., Mátyás, L., Szaszko, J., Drimba, L., Peitl, B., Csíki, Z., Mikó, I., Furka, I.: Morphological, hemodynamical and hemorheological changes of mature artificial saphenous arterio-venous shunts in the rat model.
Microsurgery. 30 (8), 649-656, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.20784>
IF:1.555
10. **Kiss, F.**, Németh, N., Sajtos, E., Bráth, E., Pető, K., Baskurt, O.K., Furka, I., Mikó, I.: Examination of aggregation of various red blood cell populations can be informative in comparison of splenectomy and spleen autotransplantation in animal experiments.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 45 (2-4), 273-280, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2010-1304>

IF:2.838

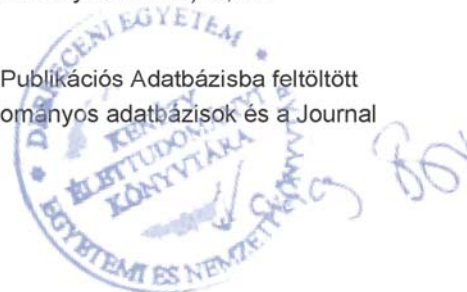
11. Mikó, I., Németh, N., Sajtos, E., Bráth, E., Pető, K., Furka, A., Szabó, G., **Kiss, F.**, Imre, S., Furka, I.: Splenic function and red blood cell deformability: The beneficial effects of spleen autotransplantation in animal experiments.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 45 (2-4), 281-288, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2010-1307>
IF:2.838
12. Sajtos, E., Németh, N., **Kiss, F.**, Bráth, E., Pető, K., Hevér, T., Mátyás, L., Furka, I., Mikó, I.: Application of leukocyte antisedimentation rate calculation in investigation of spleen salvaging experimental surgical techniques.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 45 (2-4), 289-294, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2010-1308>
IF:2.838
13. Németh, N., Gulyás, A., Bálint, A., Pető, K., Bráth, E., **Kiss, F.**, Furka, I., Baskurt, O.K., Mikó, I.: Measurement of erythrocyte deformability and methodological adaptation for small animal microsurgical models.
Microsurgery. 26 (1), 33-37, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.20207>
IF:0.882
14. Németh N., Lesznyák T., Szokoly M., Bráth E., Pető K., Szabó G., Gulyás A., **Kiss F.**, Imre S., Furka I., Mikó I.: A haemorheológiai vizsgálatok jelentősége kísérletes végtagi ischaemia-reperfúziós károsodások kapcsán.
Magyar Seb. 58 (2), 144-147, 2005.

Összesített impakt faktor: 24,829

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 5,699

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.08.01



10. TÁRGYSZAVAK

haemorheologia	hemorheology
vörösvérsejt deformabilitás	red blood cell deformability
vörösvérsejt aggregatio	red blood cell aggregation
kísérletes sebészeti kutatások	experimental surgical research
metodikai standardizáció	methodical standardization
laboratóriumi állatok	laboratory animals
faji- és nemi haemorheologiai különbségek	hemorheological interspecies and gender differences

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönet illeti Prof. Dr. Mikó Irén tanszékvezetőt, aki lehetővé tette, hogy a Sebészeti Műtéttani Tanszék kutatási témáihoz csatlakozhassak, M.D.-Ph.D. és Ph.D. kutatásaim végezhessem, és folyamatos jótanácsaival segítette értekezésem elkészítését.

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Furka István egyetemi tanár Úrnak útmutatásaiért, emberi és szakmai segítségéért.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Németh Norbert adjunktus Úrnak, aki III. éves orvostanhallgató koromban bizalommal fordult felém, és témavezetőmként segítette a Tudományos Diákköri munkámat. Köszönöm a hitét és bizalmát, hogy témavezetése mellett folytathattam nappali tagozatos Ph.D. kutatásaimat.

Köszönöm Dr. Takács Erzsébet Ildikó címzetes egyetemi docens Úrnőnek, M.D.-Ph.D. témavezetőmnek, Dr. Pető Katalin egyetemi adjunktus Úrnőnek és Dr. Bráth Endrének mind szakmai, mind emberi támogatásukat.

Külön köszönettel tartozom a Sebészeti Műtéttani Tanszék korábbi és jelenlegi Ph.D. hallgatóinak, Dr. Sajtos Erikának, Dr. Hevér Tímeának, Dr. Mátyás Lilinek és Dr. Klárik Zoltánnak, a Ph.D. kutatói munka során végzett laboratóriumi mérésekben nyújtott készséges együttműködésükért.

Köszönöm a Sebészeti Műtéttani Tanszék valamennyi munkatársának a segítségét, akik nélkül nem valósulhatott volna meg a csapatmunkát megkívánó kutatás.

Nem utolsó sorban pedig szeretném megköszönni Szüleimnek, Testvéremnek és teljes Családomnak a szeretetteljes támogatást, és hogy születésemtől kezdve, önzetlen szeretetükkel lehetővé tették hosszas tanulmányaimat. Valamint hálás köszönettel tartozom Barátaimnak és Szeretteimnek, akik egyetemi és Ph.D. éveim alatt a mindennapok során részesei voltak életemnek. Sajnos, nem mindnyájan kísérhették végig a megtett utamat, de míg mellettem lehettek, bánatomban vigaszt, örömömben őszinte, vidám társaságot nyújtottak.

12. FÜGGELÉK

Az értekezés alapján képező megjelent *in extenso* közlemények másolatai