

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Micro-rheologiai méréstechnikai összehasonlító
vizsgálatok különös tekintettel a vörösvérsejt
membránstabilitásra**

Somogyi Viktória

Témavezető:
Dr. Németh Norbert



DEBRECENI EGYETEM

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2018

Micro-rheologiai mérés technikai összehasonlító vizsgálatok különös tekintettel a vörösvérsejt membránstabilitásra

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

Írta: Somogyi Viktória, Biotechnológia MSc

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
(Klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Dr. Németh Norbert, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora

tagok: Dr. Juhász Béla, PhD

Dr. Nádasy György, kandidátus

A doktori szigorlat helyszíne, időpontja:

DE ÁOK Szemészeti Tanszék Könyvtár, 2018. július 9. 11 óra

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Bogár Lajos, az MTA doktora

Dr. Varga Gabriella, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Bogár Lajos, az MTA doktora

Dr. Juhász Béla, PhD

Dr. Nádasy György, kandidátus

Dr. Varga Gabriella, PhD

Az értekezés védésének helyszíne, időpontja:

DE ÁOK Belgyógyászati Intézet, „A” épület tanterme, 2018. július 9. 14 óra

1. BEVEZETÉS

A rheologia az anyagok áramlási tulajdonságaival foglalkozó tudomány. A haemorheologia úttörője Alfred L. Copley volt, aki bevezette a biorheologia (1948) és haemorheologia (1951) fogalmát. Copley az alábbiak szerint definiálta a haemorheologia fogalmát: *„A vér sejtes és plazmatikus komponensei makro- és mikroszkópikus dimenziójú áramlástanának, valamint a vérrel kontaktusban lévő érfal rheológiájának összefoglaló megjelölése”*. A rheologia célja a vér áramlástanának, azon belül is leginkább a microcirculatio területén lezajló folyamatoknak a megismerése és ezek különböző patológiás változásainak feltárása.

Napjainkban a haemorheologiai vizsgálatok és kutatások széles körben elterjedtek köszönhetően a korszerű mérőmódszerek megjelenésének. Ezen tudományterületen számos különböző elven alapuló mérőmódszer elérhető (ektacytometriás és filtrációs módszerek, aggregatio mérésére alkalmas technikák). A keringési rendszer ezen területének megismerése révén számos folyamat komplexebb feltárása válik lehetővé. A Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Sebészeti Műtéttani Tanszék Kutató Laboratóriumában a haemorheologiai és ezen belül a micro-rheologiai paraméterek széles körű vizsgálatára számos mérőműszer áll rendelkezésre. Tanszékünkön a korábbi években több méréstechnikai standardizációs tanulmány készült, illetve végeztek vizsgálatokat a haemorheologiai nemi különbségek feltárására laboratóriumi állatokon.

Az állatkísérleti mérési eredmények humán eredményekkel történő összevetéséhez elengedhetetlen a megfelelő kísérleti modell kiválasztása, a fajspecifikus különbségek feltárása, illetve a metodika kiválasztása. Nagyon fontos a kísérletek pontos megtervezése, kivitelezése, hogy a

mérések standardizált körülmények között és a megfelelő laborállattudományi elvek szerint történjenek. A különböző mérő módszerek kivitelezéséhez eltérő mintaelőkészítés, mintamennyiség szükséges és a vizsgálni kívánt paramétereket is több tényező befolyásolhatja. A fent említettek miatt nagy körültekintést igényel a megfelelő állatfaj kiválasztása, és állatkíméleti szempontból fontos definiálni, hogy mekkora a szükséges és mekkora az elérhető mintamennyiség és ennek ismeretében meghatározni, hogy a vérvétel terminális vagy nem-terminális módon megy majd végbe. Ha az állat utánkövetésére nincs szükség, és csak egyszeri vérvételről van szó, alkalmazható a terminális vérvétel. Követéses vizsgálatok esetében azonban nem-terminális vérvétel alkalmazandó, amely során nagyobb mintamennyiség levételére nincs lehetőség. A mérés technikai standardizációs munka összehasonlító vizsgálatainak elvégzéséhez az újabb módszerek elengedhetetlenek, hogy a kutatási eredmények jól értelmezhetőek és extrapolálhatóak legyenek.

Összehasonlító vizsgálataink a nemi és korfüggő különbségek feltárására, a mérés technikai módszerek optimalizációjára, az eredmények kiértékelésére és a laboratóriumi mérések biztonságának a fokozására irányultak.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Fajspecifikus különbségek tanulmányozása kísérleti állatok (patkány, sertés, kutya) és humán vérminták vörösvérsejt membránstabilitásának vonatkozásában, valamint az erythrocytáknak a fokozott nyírófeszültséggel szembeni ellenálló képességének vizsgálata különböző nyírófeszültség-expozíciós idő kombinációk esetén.
2. A vörösvérsejt ozmotikus grádiens ektacytometria méréstechnikai körülményeinek optimalizálása (az elongációs index - ozmolalitás görbék részletes elemzése). A minták elemzése 100 Pa, 300 időtartamú mechanikus stressz előtt és után 200-250-300-500 mOsm/kg szuszpenziós közeg felhasználásával. Annak vizsgálata, hogy mennyire befolyásolja az ozmolalitás a mechanikai stabilitási mérések eredményeit.
3. Nemi és korfüggő különbségek összehasonlító haemorheológiai vizsgálatának elemzése vörösvérsejt deformabilitás, vörösvérsejt aggregatio, membránstabilitás, ozmotikus grádiens ektacytometria tekintetében. A kérdéskör elemzésére célul tűztük ki 1 éves követéses vizsgálatok tervezését Crl:WI hím és nőtény patkányokban.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Membránstabilitás és osmoscan vizsgálatok különböző nyírófeszültség és időtartam kombinációk alkalmazása mellett

3.1.1. Kísérleti állatok és humán mintavétel

Az állatkísérleti engedélyt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága hagyta jóvá az EU szabályozása, és a 1998. évi XVIII. „Az állatok védelméről és kíméletéről” szóló törvény figyelembevételével (eng. szám: 19/2011/DE MÁB). A humán mintákat önkéntesektől kaptuk, a megfelelő Klinikai Etikai Engedély birtokában (eng. szám: DE OEC RKEB/IKEB 3625-2012).

A vérvételek a reggeli órákban 6 egészséges hím Sprague-Dawley outbred patkányból (kor: 4 hónapos, testtömeg: $522 \pm 42,9$ g) a laterális farokvéna punctiója révén (anesthesia: 60 mg/kg, i.p. thiopenthal), 8 egészséges hím beagle kutyából (kor: 9-11 hónapos, testtömeg: $13,75 \pm 0,78$ kg) a vena cephalica punctiójával, 11 egészséges Hungahib nőtény sertésből (kor: 10-12 hetes, testtömeg: $19,05 \pm 2,89$ kg) a vena saphenából (anesthesia: 15 mg/kg, i.m. ketamine, 1 mg/kg, i.m. xylazine) történt.

A humán mintavétel 7 önkéntes nőtől (kor: 31-48 éves) a vena mediana cubiti punctiójával történt. A vérvételek zárt rendszerben 3 ml-s K_3 -EDTA-t tartalmazó (1,8 mg/ml) Vacutainer® csövek alkalmazásával 21 G-s vérvételi tűvel. A laboratóriumi méréseket 2 órán belül elvégeztük.

Minden vérmintát mechanikai stabilitási tesztnek vetettünk alá, nyírófeszültség nagyságát és idejét a következő képpen használva: 30, 60 és 100 Pa, 100, 200 és 300 másodpercig.

A fent említett fajokból 5 egységnyi vérmintát vizsgáltunk tovább. Ezeken a mintákon a mechanikai stabilitás tesztet 100 Pa-on 300

másodpercig végeztük el, 200, 250, 300 és 500 mOsmol/kg-os PVP oldatban.

3.1.2. Haematologiai paraméterek meghatározása

A kvalitatív és kvantitatív haematologiai paramétereket Sysmex F-800 haematologiai automata (TOA Medical Electronics Corp., Ltd., Japán) segítségével detektáltuk. A készülék apertura-impedancia elven határozza meg a vörösvérsejt (Vvs), fehérvérsejt (Fvs) és thrombocyta (Thr) számot. A haemoglobin koncentráció (Hgb [g/dl]) meghatározása fotometriásan történik. A többi paramétert a fenti adatokból kalkulálja a készülék. A mérésekhez 70 µl antikoagulált vérmintára van szükség. Az eredmények közül a vörösvérsejt szám (Vvs [$10^6/\mu\text{L}$]), a haemoglobin koncentráció (Hgb [g/dl]), a haematocrit (Hct [%]), az átlagos vörösvérsejt térfogat (MCV [fl]), az átlagos vörösvérsejt haemoglobin tartalom (MCH [pg]) és az átlagos vörösvérsejt haemoglobin koncentráció (MCHC [g/dl]) értékek kerültek bemutatásra.

3.1.3. Haemorheologiai paraméterek meghatározása

3.1.3.1. A vörösvérsejt deformabilitás és membránstabilitás meghatározása

A vörösvérsejtek deformabilitását és membránstabilitását lézer diffrakciós elven működő LoRRca MaxSis Omoscan rotációs ektacytometer (Mechatronics BV, Hollandia) segítségével határoztuk meg.

Mind a deformabilitás, mind a membránstabilitás vizsgálatához 10 µl vérmintát 2 ml PVP (polyvinyl-pyrrolidon: 360 kDa, Sigma-Aldrich Co. USA; PVP-PBS oldat viszkozitása = 30,83 mPas, ozmolalitása = 298 mOsmol/kg, pH = 7,2) oldatba szuszpendáltunk.

A készülék Couette-rendszer felépítésű, egy statikus hengerből (bob) és egy külső hengerköpenyből (cup) áll. A kettő közötti résbe (kb. 0,3

mm) helyezzük a mintát Pasteur pipetta segítségével. A cup forgó mozgást végez a henger körül meghatározott szögsebességgel, eközben a mintát lézernyaláb világítja meg. A diffrakciós kép változása attól függ, milyen a vörösvérsejtek elnyúlásának a mértéke. Ezt a diffrakciós mintázatot egy CCD kamera rögzíti, amit a számítógépen található szoftver elemez. A szoftver analizálja a diffraktogramm átmérőit és a $(L-W) / (L+W)$ képlet alapján megkapjuk az elongációs indexet (EI). A képletben az L a diffrakciós minta hosszát, míg a W a diffrakciós minta szélességét jelenti. A deformabilitást az EI-SS függvényében ábrázolva kapott görbe jellemzi. E görbe parametrizálásával további paramétereket tudunk kalkulálni: EI_{max} (maximális EI értéke) és az $SS_{1/2} / EI_{max}$ (EI_{max} feléhez tartozó nyírófeszültség érték). A parametrizálás a Linewaver-Burke analízis segítségével történik: $1/EI = SS_{1/2} / EI_{max} \times 1/SS + 1/ EI_{max}$. EI_{max} csökkenése és az $SS_{1/2}$ értékek emelkedése deformabilitás romlásra utal.

A membránstabilitás mérése során meghatározott mechanikai stressz (adott, állandó nyírófeszültség és adott időtartam) előtt és után hagyományos ektacytometriás vörösvérsejt deformabilitási teszt elvégzése történik, majd a rögzített elongációs index-nyírófeszültség görbék összehasonlító analízise következik. A membránstabilitási tesztet összesen 9 kombinációban végeztük: 30, 60 és 100 Pa nyírófeszültség mellett 100, 200 és 300 secundum időtartamig.

3.1.3.2. Az ozmotikus grádiens ektacytometria meghatározása

Az ozmotikus grádiens ektacytometria (osmoscan) mérés során az ozmolaritás értéke folyamatosan nő 0 és 500 mOsmol/kg között. Az osmoscan mérésekhez különböző ozmolalitású PVP-PBS oldatokat használtunk: 200, 250, 300, és 500 mOsmol/kg (pH ~7,2 viszkozitás = 29-31 mPas). A vizsgálathoz 250 µl antikoagulált vérmintát 5 ml PVP

oldatba szuszpendáltunk. A készülék által az alábbi paraméterek kerülnek meghatározásra: EI min (legalacsonyabb elongatiós érték hypoozmotikus közegben), EI max (nem azonos a Lineweaver-Burke analízissel kapott $EI_{\max}$ értékkel; maximális elongatiós index érték adott nyírófeszültségnél), OEI min és OEI max (ozmolalitás a minimális és maximális elongatiós index értéknél), EI hyper (magasabb ozmolalítású tartományban EI max felét jelentő elongatiós index érték), AUC (görbe alatti terület). A következő tulajdonságokat a készülék által megadott paraméterek alapján számítottuk ki: ΔEI (a maximális és a minimális EI érték közötti különbség), ΔO (maximális és minimális EI mellett mért ozmolalitás értékek különbsége), $EI_{\max} / EI_{\min}$ (a maximális és minimális EI aránya) és $EI_{\max} / O_{\min}$ (maximális és minimális EI mellett mért ozmolalitás értékek aránya).

3.1.4. Statisztikai analízis

Az adatokat átlag $\pm$ szórás (S.D.) formájában jelenítettük meg. A mechanikai stressz előtti és utáni EI értékek összehasonlításához egymintás t-tesztet vagy Wilcoxon tesztet használtunk, az adatok eloszlása és a varianciák egyenlősége alapján. A különböző mechanikai stressz kombinációk deformabilitás károsodást okozó hatásának összehasonlításához one-way ANOVA tesztet Bonferroni post hoc tesztel vagy one way ANOVA tesztet Dunn tesztel használtunk. A fajok közötti összehasonlításokhoz kétmintás t-tesztet vagy Mann-Whitney tesztet használtunk az adatok normalitása alapján. Szignifikánsnak tekintettük a különbségeket $p < 0,05$ esetén.

3.2. Micro-rheologiai paraméterek nemi és korfüggő vizsgálatai

3.2.1. Kísérleti állatok és mintavételi protokoll

Kísérleteinket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság (DE MÁB) által kiadott engedély alapján (engedélyszám: 19/2011) az 1998. évi XXVIII. „Az állatok védelméről és kíméletéről” szóló törvény előírásainak megfelelően és az Európai Unió direktívák betartása mellett végeztük.

Összehasonlító vizsgálatainkba konvencionális állatházban tartott azonos életkorú Crl:WI (Toxi-Coop Ltd., Magyarország) hím (n=10) és nőstény (n=10) patkányokat vontunk be. A vizsgálatokat 3 hónapos korú állatokon kezdtük. Nőstény patkányokból vérvételek előtt minden esetben hüvelykenet mintavétel is történt. A kísérlet során rövid anaesthesia mellett (Thiopental [60mg/kg] i.p.) vérvétel az állatok 3 hónapos korában (alap, március), majd 4, 5, 9, 12, 15 és 18 hónapos korukban a laterális farok vena punctiója révén (alkalmanként ~ 0,5 ml) történt. Az állatok a kísérletek végére 18 hónaposak voltak. Antikoagulánsként K₃-EDTA-t (1,5 mg/ml) használtunk.

Az állatok a fajuknak megfelelő, kereskedelmi forgalomban kapható rágcsálótápot (Bábolna rágcsáló specifikus CRLT/N) és vizet kaptak ad libitum. Az állatok igényeinek megfelelően az állattartó terek szellőztetése, fűtése biztosított volt. Az állatok az előírásoknak megfelelően standard ketrecekben kettesével voltak elhelyezve. A hőmérséklet a követési periódus alatt 20-22 °C között volt.

Nőstényeknél hüvelykenetből vizsgáltuk az oestrus -ciklus szakaszait is. A mintavételek minden reggel 7 és 9 óra között történtek. A tárgylemezre felvitt keneteket egy éjszakán át levegőn szárítottuk. A kenetek festésére kismértékben módosított Giemsa protokollt alkalmaztunk. A festés előtt a mintákat abszolút metanol segítségével 30

másodpercig fixáltuk. A Giemsa-oldatot (J.T Bakers' szövettan/citológia Giemsa 3856.1000) 1 percig hagytuk a mintákon, majd ezt követően desztillált vízzel mosást végeztünk, egészen addig, amíg az összes festékmaradékot el nem távolítottuk. Ezután a festett mintákat egy éjszakán át levegőn szárítottuk, majd fénymikroszkóp alatt megvizsgáltuk.

A következő citológiai osztályozást használtuk: proestrus - sejtmaggal rendelkező hámsejtek, oestrus - elszarusodott pikkelyes hámsejtek, metestrus - csoportos elszarusodott pikkelyes hámsejtek és polimorfonukleáris (PMN) leukocyták és dioestrus - kerek leukocyták.

3.2.2. Haematológiai paraméterek vizsgálata

A haematológiai paramétereket a 3.1.2. fejezetben bemutatott Sysmex F-800 automatával határoztuk meg. Az alábbi paraméterek kerültek meghatározásra: vörösvérsejtszám (V_{vs} [$10^6/\mu\text{L}$]), fehérvérsejtszám (F_{vs} [$\times 10^3/\mu\text{L}$]), monocyta-granulocyta arány ($Mo+Gr$ [%]), haemoglobin koncentráció (Hgb [g/dl]), haematocrit (Hct [%]), thrombocyta szám (Thr [$\times 10^3/\mu\text{L}$]), átlagos vörösvérsejt térfogat (MCV [fl]), átlagos vörösvérsejt haemoglobin tartalom (MCH [pg]) és az átlagos vörösvérsejt haemoglobin koncentráció ($MCHC$ [g/dl]).

A vörösvérsejt deformabilitás, membránstabilitás és osmoscan mérések LoRRca MaxSis Omoscan rotációs ektacytometerrel a 3.1.3.1. és 3.1.3.2. fejezetben leírtak alapján történtek. A vizsgálatokhoz használt PVP-PBS oldat viszkozitása = 23,7-35,9 mPas, ozmolalitása = 296-319 mOsmol/kg, míg a pH = 7,0-7,2 volt. A méréseket a deformabilitási vizsgálatnál leírt feltételekkel (3.1.3.1. fejezet) végeztük. Az ozmotikus grádiens ektacytometria (osmoscan) teszt alatt az elongatiós index értékeket állandó nyírófeszültség (30 Pa) alkalmazása mellett határoztuk meg (3.1.3.2.).

3.2.3. Haemorheologiai paraméterek vizsgálata

3.2.3.1. A vörösvérsejt aggregatio meghatározása fénytranszmissziós elven

A vörösvérsejt aggregatio mértékének vizsgálatát fénytranszmissziós elven működő Myrenne MA-1 aggregometerrel (Myrenne GmbH, Németország) végeztük.

A mérésekhez szükséges 20 μ l antikoagulált vérmintát buborékmentesen egy rotor által forgatott 2°-os szögben csiszolt üveg lencsére visszük fel, amely alatt egy infravörös detektor található. A fedelet lecsukva a vérmintát egy üveg tárgylemez szétteríti a lencsén, ami fölött egy infravörös dióda van. A készülék által meghatározott aggregációs index paraméterek: M 5 s, M1 5 s, M 10 s, M1 10s. Először a mintában lévő vörösvérsejtek disaggregálódnak (600 s^{-1} sebesség-grádienssel), majd a sebesség-grádiens hirtelen nullára (stasis, M mód) vagy a nyírófeszültség alacsony értékre csökken (3 s^{-1} , M1 mód) és ezt követően a készülék az áthaladó fény intenzitását méri az aggregációs folyamat 5. és 10. másodpercében. A sematikus ábrán látható, hogy a középső görbe normál, a felső görbe emelkedett, míg az alsó görbe csökkent mértékű aggregatiót mutat. Emelkedett aggregatio esetén az index paraméterek is növekednek. A berendezés nem temperált, a mérések hőkontroll nélkül zajlanak.

3.2.4. Statisztikai analízis

Az adatokat átlag $\pm$ szórás (S.D.) formájában ábráztuk. Az adatok normalitásának függvényében a csoportok közötti összehasonlításhoz t-tesztet vagy Mann-Whitney Rank-Sum tesztet alkalmaztunk, míg a csoportokon belüli értékek összevetéséhez egyirányú ANOVA tesztet (Bonferroni vagy Dunn post hoc teszt) használtunk. A szignifikancia

szintet $p < 0,05$ értéknél határoztuk meg. A statisztikai elemzést SigmaStat (Systat Software Inc., San Jose, California, USA) szoftverrel végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Osmoscan és membránstabilitás vizsgálatok különböző nyírófeszültség és időtartam kombinációk mellett

4.1.1. Haematologia és deformabilitási paraméterek leírása

A vörösvérsejt szám a patkányokban mutatkozott a legmagasabbnak, majd ezt követték a kutya, a sertés és humán minták, ahol a legalacsonyabb értékeket kaptuk. Míg az átlagos vörösvérsejt térfogat (MCV [fl]) értékek esetében a következő sorrend adható meg: humán>kutya>sertés>patkány. A kutya átlagos corpuscularis haemoglobin koncentrációján (MCHC [g/dl]) kívül, minden paraméter szignifikánsan különbözött a humán értékektől (patkány hemoglobin koncentrációja esetében: $p=0,032$; a többi paraméter esetén: $p<0,001$).

A vörösvérsejt deformabilitást leíró EI-SS görbék alapján látható, hogy a fajok közötti különbségek, mind a görbék alakjában, mind az EI értékekben láthatóak. Általában a legmagasabb EI értékeket patkány, míg a legalacsonyabbakat humán vérmintákban mértük. A kutya minták EI-SS görbék alakja hasonlított leginkább a humán mintákéra, de magasabb értékekkel. A patkány és sertés minták elongációs index értéke párhuzamosan futott alacsonyabb nyírófeszültség szint mellett, majd 3 Pa felett a sertés görbék meredeksége egyenletesebbé vált. A kalkulált paraméterek jól tükrözik az EI-SS görbék fajok közötti különbségeit. Minden értéket, kivéve a kutya minták $SS_{1/2}$ és $EI_{max} / SS_{1/2}$ eredményeit, szignifikánsan különböztek a humán értékektől ($p<0,001$).

4.1.2. Vörösvérsejt membránstabilitás

A legkifejezettebb faji különbségeket 100 Pa 300 s mechanikus stressz alkalmazása során figyeltük meg. Kisebb nyírófeszültség és

rövidebb időtartam alkalmazása alatt a különbségek csökkentek a vizsgált fajokban, de nem azonos módon.

A 30 Pa mechanikai stressz során a patkány vörösvérsejtek nem mutattak szignifikáns EI romlást, mivel a mechanikai teszt utáni és előtti EI értékek aránya - mint reprezentatív paramétere az EI károsodás nagyságának - közel 1 volt és az értéke nem változott, ahogy az expozíciós idő emelkedett.

A kutyák esetén jobb deformabilitást tapasztaltunk - magasabb EI értékekkel - 30 Pa mechanikai stressz alkalmazása után. 100 s időintervallumnál szignifikánsabban magasabb elongációs index értékeket mértünk általában 10-30 Pa nyírófeszültség közötti tartományban, míg 200 és 300 s időintervallum esetében minden nyírófeszültségnél. A javulás nagysága jelentős mértékben függött az expozíciós időtől (10 Pa alatt).

Sertéseknél a 30 Pa nyírófeszültség mellett 100 másodpercig végzett mechanikai stressz (legalacsonyabb kombináció) már szignifikáns mértékben csökkentette az EI értékeket a 10-30 Pa közötti tartományban, de a nagysága - EI utána/előtte - független volt az expozíciós időtől.

A humán vörösvérsejtek enyhe, de nem nyilvánvaló deformabilitás javulást mutattak, amely 100 és 200 s időtartamnál is megfigyelhető.

60 Pa-nál alkalmazott mechanikai stressz jelentős romlást eredményezett az EI értékekben minden nyírófeszültségnél, kivéve kutyáknál, ahol a mintákban ez a nyírófeszültség jelentős változásokat okozott az EI értékekben. Az elongációs index romlásának a nagysága alapvetően független volt az expozíció időtartamától. Enyhe különbség mutatkozott humán mintákban, valamint patkányokban alacsonyabb nyírófeszültségek esetében.

A legmagasabb mechanikai stressz 100 Pa 300 s volt. Az EI-SS görbék alakja 0,95 Pa alatt rendkívül szabálytalan, ez főleg a humán és

legkevésbé a patkány minták esetén figyelhető meg. A legnagyobb mértékű deformabilitás csökkenést a humán vörösvérsejtek mutatták 300 s-ig alkalmazott 100 Pa-os nyírófeszültség hatására, a 0,95-10 Pa közötti tartományban az elongációs index 17,6-42,4%-kal és a 10-30 Pa közötti tartományban 5,5-12,6%-kal csökkent (kivéve a 0,95 Pa nyírófeszültséget, $p < 0,001$ minden vizsgált nyírófeszültség érték pontnál: 1,69; 3; 5,33; 9,49; 16,87 és 30 Pa). Ugyanezek az értékek patkánynál 8,6-21,5% és 2-5,2% ($p < 0,001$ minden vizsgált nyírófeszültség értéknél), kutyánál 14,5-20,8% és 9,2-12,3% ($p < 0,001$ minden nyírófeszültségnél, kivéve 0,95 Pa: $p = 0,007$), míg sertésnél 10,6-26,8% és 3,3-7% ($p < 0,001$ a legtöbb nyírófeszültségnél, kivéve 16,87 és 30 Pa-nál $p = 0,002$ és $p = 0,024$).

Mind a négy faj esetében az $EI_{\max} / SS_{1/2}$ értékek csökkentek az expozíciós idő növelésével 100 Pa nyírófeszültség mellett. 30 Pa-on való mérés esetében az értékek nem változtak az expozíciós idővel. A kutya vérmintákban enyhe javulást tapasztaltunk. 60 Pa nyírófeszültség alkalmazása mellett az értékek patkányokban mérsékelten csökkentek, kutyákban emelkedtek és csökkentek humán és sertés vérben.

4.1.3. A vörösvérsejt membránstabilitási adatok ozmolalitás függő változásai

Az ozmolalitás mind hypo-, mind hyperozmolaris irányban változik, ami nagymértékben befolyásolta a mechanikai stabilitási teszt eredményeit (100 Pa 300 s). Érdekes módon, hypoozmoláris PVP-PBS oldat (200 mOsmol/kg) alkalmazásával végzett méréseknél mind a 4 faj esetében javult a deformabilitás, leginkább patkány és sertés mintákban. 500 mOsmol/kg-nál nem láthatók nyilvánvaló változások, a zsugorodott sejtek által okozott szabálytalan görbék miatt.

A vizsgált fajok ozmotikus gradiens ektacytometriás (osmoscan) paramétereinek összehasonlításában jelentős különbségek figyelhetők

meg. A legmagasabb értékeket alacsony ozmolalitásnál figyeltük meg, bár a 250 és 300 mOsmol/kg adatok is hasonló eredményt mutattak, a hyperozmoláris állapot az értékek csökkenését váltotta ki, sertésnél viszont enyhe emelkedés látható. Patkány mintákban a különbség a 250 és 500 mOsmol/kg értékek között volt a legkisebb, és alig változott, míg a kutya vérminták a 200-300 mOsmol/kg tartományban viszonylag stabilak maradtak, és magasabb ozmolalitás esetén az értékek csökkentek. A humán értékek változtak a legkisebb tartományban, de nyilvánvaló irányba: az ozmolalitás növekedésével az értékek csökkentek.

4.2. A haematologiai és haemorheologiai paraméterek nemi és korfüggő vizsgálatai

4.2.1. Testtömeg változások és az oestrus ciklus

Az állatok testtömege a vártnak megfelelően jelentősen gyarapodott a követéses időszak során. Jól látható, hogy az állatok 5 hónapos korától kezdve szignifikáns különbség jelentkezett a nőstény és hím állatok testsúlya között. A nőstények testsúlya átlagosan 89,9 %-kal, a hímeké 133,4 %-kal nőtt a követéses időszak végére, az állatok 18 hónapos korára.

A nőstények oestrus ciklusának változását %-os arányban tüntettük fel.

4.2.2 Haematologiai paraméterek

A fehérvérsejtszám a nőstényekben folyamatosan csökkent, míg a hím patkányokban 5 hónapos koruk után jelentősen lecsökkent, majd ezt követően kismértékű növekedést tapasztaltunk. Hímeknél mindvégig magasabb fehérvérsejt számot mértünk.

A monocyta-granulocyta arány (Mo+Gr [%]) mind a nőstény mind a hímek 12 hónapos koráig folyamatos növekedést mutatott.

A haemoglobin (Hgb [g/dl]), a vörösvérsejtszám (Vvs [$10^6/\mu\text{l}$]) és a haematocrit (Htc [%]) értékek a követéses időszakban a hímeknél magasabbak voltak, a 18. hónapra tovább emelkedtek. A vörösvérsejt szám értékekben szignifikáns nemi különbségeket tapasztaltunk (4. hónapban: $p=0,007$; 5. hónapban: $p<0,001$; 9. hónapban: $p<0,001$; 15. hónapban: $p<0,001$; 18. hónapban: $p=0,013$).

A thrombocyta szám (Thr [$\times 10^3/\mu\text{l}$]) esetében a hímeknél mértünk szignifikánsan magasabb értékeket az állatok 5. ($p<0,001$), 15. ($p=0,048$) és 18. ($p=0,036$) hónapos korában.

A haemoglobin koncentráció (Hgb [g/dl]) szignifikánsan nagyobb volt a hímekben az állatok 3 ($p=0,047$), 4 ($p=0,002$), 5 ($p=0,016$), 9 ($p<0,001$) és 15 ($p<0,001$) hónapos korára. Az értékek a 15. hónapban (március) voltak a legmagasabbak. Az eredmények a nőstényekhez és a saját alap értékekhez képest is szignifikánsnak bizonyultak (hím vs. nőstény: $p<0,001$; hím vs. alap (3 hónapos kor): $p=0,015$).

A haematocrit (Hct [%]) esetében is a hímekben mértünk magasabb értékeket. Az augusztusi és decemberi hónapokban mindkét csoportban csökkenést tapasztaltunk. Majd a 15. hónapra emelkedtek a haematocrit értékek, ami a 18. hónapra még tovább emelkedett.

Az átlagos vörösvérsejt térfogat (MCV [fl]) értékekben szignifikáns mértékű nemi különbséget az állatok 4, 9 és 18 hónapos korában mértünk ($p<0,001$; $p=0,035$; $p=0,002$).

A 12. hónapban az átlagos corpuscularis haemoglobin tartalom (MCH [pg]) a nőstényekben magasabb volt, szignifikáns nemi különbséget mutatva ($p=0,05$).

Az átlagos corpuscularis haemoglobin koncentráció (MCHC [g/dl]) értékek növekedtek a 9. és 12. hónapban, míg a 15. és 18. hónapban mindkét csoportban csökkenést tapasztaltunk.

4.2.3. Haemorheologiai paraméterek

4.2.3.1. A vörösvérsejt aggregatio

A vörösvérsejt aggregációs index értékek a hímekben, kezdetben alacsonyabbak voltak, mint nőstényekben. Eleinte magasabb M1 5 s és M1 10 s aggregációs index értékeket találtunk nőstényekben és magasabb M 5 s és M 10 s értékeket hímekben. Az állatok 4. és 5. hónapos korára (tavaszi hónapok) azonban jelentősen nőttek (áprilisban hím vs. nőstény M 5 s: $p=0,011$; M1 5 s: $p=0,001$; M 10 s: $p<0,001$; M1 10s: $p<0,001$; májusban M 5 s: $p<0,001$; M1 5 s: $p<0,001$; M 10 s: $p<0,001$; M1 10 s: $p<0,001$). A téli időszakban nőstényekben újra aggregációs index emelkedés, hímekben csökkenés volt megfigyelhető. A megfigyelési időszak végén az M 10 s és M1 10 s értékek magasabbak voltak a fiatalabb korú patkányokhoz viszonyítva mindkét nemből. Összességében a négy paraméternél jellegzetes egyirányú változást nem látunk. Növekedés, csökkenés egyaránt megfigyelhető a követéses időszak alatt.

4.2.3.2. Vörösvérsejt deformabilitás, sejt membrán stabilitás (normál és ozmotikus grádiens ektacytometria)

A LoRRca készülékkel meghatározott deformabilitás paraméterek nőstényekben a 3 Pa nyírófeszültségnél mért értékek szignifikánsan magasabbak voltak, mint a hímekben. Az állatok 9 hónapos korában az eredmények csökkenő tendenciát mutattak. A hímek rendelkeztek alacsonyabb EI_{max} értékekkel, szignifikáns nemi különbségeket is jelezve az 5., 9. és 12 hónapban ($p<0,001$; $p<0,001$; $p=0,029$). Az $SS_{1/2}$ értékek [Pa] esetében emelkedést tapasztaltunk a követéses időszak végére. $EI_{max}/SS_{1/2}$ a 3. és 9. hónap közötti időszakban a hímekben szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk (3. hónap: $p=0,004$; 4. hónap: $p=0,001$; 5. hónap: $p<0,001$; 9. hónap: $p<0,001$). A 12 és 18. hónap között jelentősen lecsökkentek az értékek mindkét csoportban.

A membránstabilitási adatok a követési periódus végére mutattak különbségeket, az alkalmazott mechanikus stressz hatására nagyobb mértékű deformabilitás romlás volt ekkor mérhető.

Az osmoscan paraméterek közül az EI max csökkenő értékeket mutatott az állatok 5-12 hónapos kora között, hímekben alacsonyabb értékeket mértünk. Az O min [mOsmol/kg] és az O EI_{max} [mOsmol/kg] a hím csoportban mindvégig alacsonyabbak voltak, mint a nőstény csoportban. O EI_{max} változások esetében szignifikáns nemi különbségeket mutatva a 4., 5., 9. és 15. hónapokban ($p=0,009$; $p=0,002$; $p=0,027$; $p=0,024$). EI min értékek szignifikánsan emelkedtek a követési időszak végére mindkét nemben, főként hímekben, míg a kezdeti EI min értékek kissé alacsonyabbak voltak. Mivel az EI max bizonyos időszakban csökkent, az EI hyper értékek szintén tükrözik, mivel az EI hyper kapcsolódik az EI max-hoz. Az O hyper értékek esetén szabálytalan változásokat figyelhetünk meg, a követési időszak végére jelentősen csökkent az alap értékhez képest (3. hónap). Hímekben az AUC a 9. és 12. hónapban volt a legalacsonyabb. A ΔEI és ΔO és ezek aránya további információval szolgálhat az osmoscan görbe hypoozmoláris részéről (EI min és EI max, O min és O EI max között). Ennek következtében további paramétereket is számítottunk. A hímek 9 és 12 hónapos, míg a nőstények 12 hónapos korában a ΔEI értékek esetén szignifikáns mértékű csökkenést tapasztaltunk. ΔO értékek nőstényekben magasabbak voltak. A ΔEI és ΔO értékek aránya azonban csaknem változatlan maradt.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Membránstabilitás és osmoscan vizsgálatok különböző nyírófeszültség és időtartam kombinációk mellett

Az irodalomban nagyon kevés adat áll rendelkezésre a vörösvérsejt mechanikai stresszről. A vörösvérsejtek mechanikai stabilitása elengedhetetlen a keringésben való túléléshez. Fiziológiai körülmények között az erythrocytákra ható nyíróerő általában 5 Pa alatt van és nem haladja meg a 10 Pa értéket. Azonban, patofiziológiai folyamatok vagy nem fiziológiás keringési állapotok okozhatják a nyírófeszültség növekedését, ami az erythrocyták membránkárosodásához vezethet. A mechanikai károsodás mértéke – amely subletalis és később haemolyticus traumát okoz a vörösvérsejteknek - attól függ, hogy mekkora a nyírófeszültség nagysága és expozíciós ideje, valamint a sejtek mechanikai stabilitása. Az örökletes membrán rendellenességek és a vörösvérsejtek emzimopátiái vagy bármely olyan patofiziológiai folyamat, amely a vörösvérsejtek károsodását okozza, károsítja a membránt. A mechanikai sérülés végpontja a sejtek lízise, ami a membrán felszakadásával jár. A mechanikai trauma, amely még nem okoz haemolysist, de a sejtek micro-rheologia paramétereinek a romlását eredményezi, mint például deformabilitás, aggregatio, azt sublethalis traumának nevezzük. Brinsfield és munkatársai említették ezt először 1962-ben, amikor azt tapasztalták, hogy kísérleti állatokban csökkent a vörösvérsejt szám 10-48 órán át tartó extracorporalis keringés után. Ez vörösvérsejt deformabilitás romlást és fokozott aggregatiót okoz, amely negatív hatással van a microcirculációra és a szöveti perfúzióra. Számos kaszkádszerű mechanizmuson keresztül és leukocyta és thrombocyta funkciók hatására a supra-fiziológiai nyírófeszültség megváltoztatja a haemodinamikai paramétereket, ami tovább növeli a nyírófeszültséget és a folyamat circulus vitiosus-szá válik. A patofiziológiai folyamatok

vizsgálatára, amelyek megváltoztathatják a nyíróerőket a keringésben és az intravaszkuláris eszközök kifejlesztésének tesztelésére (például stentek, graftok, vaszkuláris protézisek, mesterséges szelepek és szívek, extracorporealis keringés eszközei, speciális intravaszkuláris keringést segítő eszközök) *in vivo* vizsgálatok szükségesek.

Széles körben megvizsgálták, hogy más fiziológiai paraméterekhez hasonlóan a haemorheológiai jellegek is mutatják a fajok közötti különbségeket. A vörösvérsejt deformabilitást számos celluláris faktor határozza meg, és a mechanikai stabilitás fenntartásának egyik legfontosabb eleme a spektrin alapú membrán skeleton. A vörösvérsejtek mechanikai stabilitásában mutatókozó kölcsönhatások közötti különbségek részben a spektrin-hálózat kvantitatív és kvalitatív különbségeivel és a fehérjefoszforiláció szintjével magyarázhatók, főként a 4.1R-es fehérje esetében, amely modulálja a spektrin és aktin affinitását és a vörösvérsejtek membránstabilitását. Azonban figyelembe kell venni, hogy a mechanikai stabilitás mérés nem végezhető *in vivo*, és bár minden mérés a protokoll szerint 2 órán belül befejeződött, a különböző fajok vörösvérsejtjei eltérő módon érzékenyek az *in vitro* körülményekre. A vörösvérsejtek metabolikus állapotában bekövetkező változások a membrán merevedését is okozhatják a csontrendszeri foszforiláció csökkenése miatt.

A kutya erythrocyta-deformabilitásának javulására vonatkozó megállapításaink szerint, a közelmúltban Meram és munkatársai beszámoltak arról, hogy nagyon rövid (néhány másodperces) 5-20 Pa-os nyírófeszültség akár 8%-kal is javíthatja vörösvérsejtek deformálódását, ezen adatok vonatkoztathatóak emberi vörösvérsejtekre is. Simmonds és mtsai szintén megfigyelték az emberi vörösvérsejtek jobb deformálhatóságát fiziológiai nyírófeszültség mellett, és azt találták, hogy a humán erythrocyták sub-haemolyticus küszöbértéke 30-40 Pa 300

másodperces expozíció mellett.⁸³ Azonban Arwatz és Smits, egy általuk készített Taylor-Couette készülék alkalmazásával 50 másodpercig tartó 50 Pa nyírófeszültség terhelés mellett 1-2% haemolysist, 50 Pa-nál 300 másodperc esetében 5%-os haemolysist, és 200 Pa-on 300 másodperc használatával 10-12%-os haemolysist találtak. Kísérletünk adatai alapján az expozíciós idő és mechanikai stressz erősségének növelésével az elongációs idő-nyírófeszültség görbék egyre szabálytalanabb mintázatot vettek fel a 0,95 Pa nyírófeszültség alatti tartományban. Ezen változások valószínűleg a növekvő mértékű erythrocyta fragmentáció és haemolysis.

Az irodalomban nem találtunk magyarázatot a mechanikai stabilitás ozmolaritás függése során készült megfigyelésekre, valamint a fajok között észlelt különbségekre. Hypotóniás környezetben a sejtek megduzzadnak, alakjuk gömbszerűvé válik, a felszín-térfogat arányuk ennek megfelelően megváltozik, aminek eredményeképpen csökkent a deformabilitásuk és megnő a membránok nyújtása, terhelése. Ha nyírófeszültség éri ebben az állapotban a sejteket, a discoid alakhoz képest megváltozik a rájuk ható nyíróerő eloszlása. Ebben az állapotban pozitív szelekció is megfigyelhető mivel a rigidebb sejtek előbb haemolizálnak, míg a fiatalabb sejtek ellenállóbbak ezen változásokkal szemben. A sejtek elasztikus tulajdonságai (membrán) és mechanikai nyíró hatás sokkal kifejezettebb ilyen körülmények között (alacsony ozmolalitás melletti mechanikai nyíró hatás).

A patkány és a sertés erythrocyták kisebb MCV értékkel rendelkeznek, kifejezettebb változást mutattak a 200 mOsmol/kg-on végzett mechanikai stabilitás teszten humán és kutya erythrocytákhoz képest. Korábban szignifikáns különbséget figyeltünk meg az elongációs index-ozmolalitás (osmoscan) görbék között, jobbra tolódtak a patkány, kutya és humán görbékhez képest. Az osmoscan mérés során az

elongációs index értékeket az alkalmazott ozmolalitás függvényében ábrázoljuk. Az osmoscan görbe maximumpontja azt az ozmolalitást reprezentálja, amely értéknél a vörösvérsejtek a lehető legnagyobb mértékben tudnak elongálódni az adott nyírófeszültség hatására. A fajok közti micro-rheologiai diverzitás miatt (sejtek mérete, száma, alakja, deformabilitása, aggregációja) a vörösvérsejtjeik máshogy reagálnak a különböző külső hatásokra, beleértve az őket körülvevő környezet ozmolalitását is. Feltételezhető, hogy ennek a diverzitásnak köszönhető a görbék jobbra tolódása is, amennyiben egyes fajok vörösvérsejtjei kevésbé érzékenyek a magasabb ozmolalitású környezettel szemben, így az elongatio maxima is a magasabb ozmolalitású tartományba esik, mint egér és sertés vérminták esetén. A haemorheologiai faktorok fajok közötti különbözősége sokrétűbbnek tűnik, ahogy újabb és újabb technikákkal vizsgáljuk.

5.2. Nemi és korfüggő haemorheológiai paraméterek

Az irodalmi adatok és saját eredményeink szerint a vörösvérsejt deformabilitási és aggregációs értékek a különböző fajok között eltérést mutatnak. Azonban a nemi és életkorral kapcsolatos különbségekről kevés adat áll rendelkezésünkre. Korábban patkányokon és kutyákon tanulmányoztuk a vörösvérsejt deformabilitást és aggregációt. Patkányok esetében a nőstény állatokban mértünk magasabb vörösvérsejt deformabilitás index értékeket, míg kutyáknál a hím állatok rendelkeztek magasabb elongációs index értékekkel. A vörösvérsejt aggregatio tekintetében humán eredmények esetén más tendenciát figyelhetünk meg. Számos tanulmány szerint férfiakban az erythrocyták nagyfokú aggregációs képességgel és kisebb fokú deformálhatósággal jellemezhetőek.

A vörösvérsejt deformabilitást meghatározza az intracelluláris viszkozitás, a sejtmembrán saját viszkozitása, a felület-térfogat arány és a morfológia. A vörösvérsejt aggregatio mértékét számos celluláris (a sejt alakja, deformabilitása, a glycocalyx összetétele) és plazmatikus faktor (fibrinogén és más makromolekulák) határozza meg a nyíróerő mellett. Ezen felül hormonális és anyagcsere tényezők is befolyásolhatják ezeket a paramétereket.

Számos tanulmány kimutatta, hogy a haemorheológiai tényezőket jelentősen befolyásolja az öregedés. Az irodalmi adatok többsége emelkedett plazma és teljes vér viszkozitásról, fokozott vörösvérsejt aggregációról és károsodott deformabilitásról számol be idős korban. Azonban a korfüggő haemorheológiai eredményekről ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre. Néhány szerző nem talált összefüggést, vagy arra a következtetésre jutottak, hogy nem a kor, hanem bizonyos rizikó faktorok felelősek a változásokért, beleértve az elhízást, a magas vérnyomást, a dohányzást vagy bizonyos gyógyszereket. Az eltérés

nemcsak az egészségi állapottól függ, hanem a különböző mérőmódszerektől, a nemtől és a kortól is. Kameneva és munkatársai statisztikailag szignifikáns különbségeket mutattak ki a férfi és női haemorheologiai paraméterek között. Férfiakban magasabb haematocrit és vérviszkozitás, nagyobb vörösvérsejt aggregabilitást, valamint alacsony deformabilitást értékeket mértek. Kísérleti és klinikai adatok alapján Simmonds és munkatársai egy cikkben összegezték az öregedés és ehhez kapcsolódó mechanizmusok által megváltozó vér rheológiáját, beleértve a felerősödő oxidatív stresszt és pro-inflammatorikus körülményeket idős egyéneknél. A nemi és korfüggő haemorheologiai szempontok még nem voltak teljesen ismertek patkányokban.

Az eredmények értékelése során számos befolyásoló és limitációs tényezőt figyelembe kell venni a fajspecifikus tulajdonságokat, az oestrus ciklust és a szezonális hatásokat.

A patkányok oestrus ciklusának meghatározására egy egyszerű, régóta használatos módszert alkalmaztunk, a hüvely keneteket fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk. Az állatokat konvencionális állatházban tartottuk, így a Lee-Boot hatás kizárható (amikor is a nőtény közösen vannak tartva hím patkányok nélkül, és ennek következtében az oestrus ciklusuk lelassul vagy leáll), de a Whitten hatás nem (hím patkány feromonjai indukálják az oestrus ciklus összehangolódását felnőtt nőtényekben). A menstruációs ciklus főmlősökben megváltoztathatja a haematologiai paramétereket, a vörösvérsejt és a fehérvérsejt számot. Ezen felül az oestrus ciklus különböző fázisai (dioestrus vs. többi fázis) megváltoztathatják beagle kutyákban a haematologiai értékeket (haemoglobin, vörösvérsejt, eozinofilok). Cetin és munkatársai vizsgálták a vér paramétereket nem, vemhesség és szezonális hatások tekintetében Angora nyúlakban, szignifikáns különbségeket találtak a nem, a fiziológiai állapot és az évszakok hatása között. A nőtény patkányok

oestrus ciklusa körülbelül 3-5 napig tart (polyoestrusos állatok). Az öregedés meghosszabbíthatja vagy lerövidítheti a patkányok ivari ciklusát. Emiatt nem lehet közvetlenül összekapcsolni ezeket a haemorheologiai eredményeket az oestrus ciklussal. Ez a vizsgálatunk egyik lehetséges limitációja. A szezonális hatás nem zárható ki, azonban ezt a feltevést nem tudtuk alátámasztani. A kísérletek elején, márciusban az állatok 3 hónaposak voltak.

Hím állatokban az aggregációs indexek legnagyobb növekedését a 4., 5. hónap környékén (tavaszi időszakban) észleltük, melyet csökkenés követett. A téli időszakban a tendencia megfordult és a hímek értékei magasabbak lettek a nőstényekénél. Ezzel párhuzamosan változott a leukocytá szám is. A vizsgálataink további korlátja az alacsony mintavételi szám. Nem terveztük a vérvételek gyakoriságának emelését a vérvesztés hatásai valamint a regenerálódási idő miatt.¹⁰⁹ A kísérleti időszak során az állatok jólétét tartottuk a legfontosabbnak. Mindezek mellett a kutatásokban általánosan 3-4, maximum 6 hónapos patkányokat vizsgálnak. A vérvételeket rövid ideig tartó altatás során végeztük el. A limitált vérmennyiség miatt nem volt lehetőségünk további paraméterek analízisére, mint pl. a fibrinogén koncentráció, rutin kémiai analízis, enzim és haemosztázis vizsgálatára.

„A legtöbb kutató a humán és patkány korát azok élettartamának korrelációjával számolják ki, ami nem elfogadható, mivel egy specifikus kutatáshoz, a patkányok egy meghatározott fejlődési szakaszát vizsgálják. Ezért figyelembe kell venni a patkányok életének megfelelő fázisait is az életkor pontos korrelációjához”. A laboratóriumi patkányok átlagosan 2-3,5 évig élnek. A teljes élettartamukat tekintve kb. 26,7 emberi nap felel meg a patkányok egy napjának, tehát kb 13,8 patkány nap felel meg egy emberi évnek. Azonban a „pubertás”, felnőtt kor, reprodukív kor, az öregedés, az öregkor korrelációja különbözhet.

A kísérleti állatainkat 18 hónapig követtük, ami egy 45 éves embernek feleltethető meg. Ez azt jelenti, hogy az elvégzett vizsgálatainkban észlelt haemorheológiai változások egy középkorú ember eredményeivel korrelálnak. További vizsgálatot tervezünk a követési idő megnövelésével, rendszeres vérnyomás monitorozással egybekötve.

6. FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. A vizsgált fajok (patkány, sertés, kutya és ember) vonatkozásában jól azonosítható különbségeket találtunk a vörösvérsejt membránstabilitás adatokban. Megállapítottuk, hogy a különböző nyírófeszültség-expozíciós idő kombinációk alkalmazásával végzett mechanikai stabilitási tesztek során a sertés vörösvérsejtek voltak a legérzékenyebbek. A mérések során azt találtuk, hogy amíg a mechanikai stressz nagysága és időtartama emelkedett az elongatíós index-nyírófeszültség görbék alakja 0,95 Pa alatt egyre inkább szabálytalanná vált, és nagysága különbözött a fajok között.
2. Az ozmolalitás változások mind hypo- mind hyperozmoláris irányban erősen befolyásolják a mechanikai stabilitási eredményeket minden vizsgált fajban. Először írtuk le, hogy hypoozmoláris tartományban a mechanikai stressz után az EI értékek javulnak legnagyobb mértékben patkány és sertés vérminták esetén. Ez a jelenség nem volt megfigyelhető 250, 300 vagy 500 mOsmol/kg-nál.
3. Az irodalomban először hosszútávú követéses vizsgálat során elemeztük Crl:WI patkányokban a micro-rheologiai paraméterek (vörösvérsejt aggregatio, deformabilitás) életkorral összefüggő változásait a nemi különbségek tekintetében. A vörösvérsejt aggregatio szabálytalan változásokat mutatott a követési időszak alatt, míg a vörösvérsejt deformabilitás és a vörösvérsejt membránstabilitási értékek az életkorral romlást mutattak legnagyobb mértékben hím állatokban.



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/95/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Somogyi Viktória
Neptun kód: BQCY0K
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10053947

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Somogyi, V.**, Pető, K., Deák, Á., Tánczos, B., Németh, N.: Effects of aging and gender on micro-rheology of blood in 3 to 18 months old male and female Wistar (CrI:WI) rats.
Biorheology. [Epub ahead of print], 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/BIR-17148>
IF: 1.078 (2016)
2. Németh, N., **Somogyi, V.**, Kiss, F., Ulker, P.: Interspecies diversity of erythrocyte mechanical stability at various combinations in magnitude and duration of shear stress, and osmolality.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 63 (4), 381-398, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-152031>
IF: 1.679





További közlemények

3. Mester, A., Magyar, Z., Molnár, Á., **Somogyi, V.**, Tanczos, B., Pető, K., Németh, N.: Age- and gender-related hemorheological alterations in intestinal ischemia-reperfusion in the rat.
J. Surg. Res. 225, 68-75, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2017.12.043>
IF: 2.187 (2016)
4. Magyar, Z., Mester, A., Nadubinszky, G., Varga, G., Souleiman, G., **Somogyi, V.**, Tanczos, B., Deák, Á., Bidiga, L., Mihai, O., Pető, K., Németh, N.: Beneficial effects of remote organ ischemic preconditioning on micro-rheological parameters during liver ischemia-reperfusion in the rat.
Clin. Hemorheol. Microcirc. "Accepted by Publisher", 2018.
IF: 1.679 (2016)
5. Pető, K., Németh, N., Mester, A., Magyar, Z., Souleiman, G., **Somogyi, V.**, Tanczos, B., Deák, Á., Bidiga, L., Frecska, E., Nemes, B. Á.: Hemorheological and metabolic consequences of renal ischemia-reperfusion and their modulation by N,N-dimethyltryptamine on a rat model.
Clin. Hemorheol. Microcirc. [Epub ahead of print], 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-170361>
IF: 1.679 (2016)
6. Mester, A., Magyar, Z., **Somogyi, V.**, Tanczos, B., Stark, Y., Cherniavsky, K., Bidiga, L., Pető, K., Németh, N.: Intestinal ischemia-reperfusion leads to early systemic micro-rheological and multiorgan microcirculatory alterations in the rat.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 68 (1), 35-44, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-170278>
IF: 1.679 (2016)
7. Mikó, I., Németh, N., **Somogyi, V.**, Kiss, F., Tóth, E., Pető, K., Furka, A., Ványolos, E., Tóth, L., Varga, J., Szigeti, K., Benkő, I., Oláh, A., Furka, I.: Comparative erythrocyte deformability investigations by filtrometry, slit-flow and rotational ektacytometry in a long-term follow-up animal study on splenectomy and different spleen preserving operative techniques: partial or subtotal spleen resection and spleen autotransplantation.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 66 (1), 83-96, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-160231>
IF: 1.679 (2016)
8. Magyar, Z., Molnár, Á., Nachmias, B. D., Mann, D., **Somogyi, V.**, Mester, A., Pető, K., Németh, N.: Impact of groin flap ischemia-reperfusion on red blood cell micro-rheological parameters in a follow-up study on rats.
Clin. Hemorheol. Microcirc. [Epub ahead of print], 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-170277>
IF: 1.679 (2016)





9. **Somogyi, V.**, Tánczos, B., Deák, Á.: Data interpretation of erythrocyte membrane mechanical stability test using the laser-assisted optical rotational cell analyzer.
Series of Biomechanics. 30 (1), 27-34, 2016.
10. Németh, N., Pető, K., Deák, Á., **Somogyi, V.**, Varga, G., Tánczos, B., Balog, K., Csiszkó, A., Godó, Z., Szentkereszty, Z.: Hemorheological factors can be informative in comparing treatment possibilities of abdominal compartment syndrome.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 64 (4), 765-775, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-168027>
IF: 1.679
11. Vass, M., Diószegi, Á., Németh, N., **Somogyi, V.**, Baráth, S., Szalai, E., Módos, L., Soltész, P.: Rheopheresis in vascular diseases.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 64 (4), 977-987, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-168004>
IF: 1.679
12. Pázmándi, K. L., Agod, Z., Kumar, B. V., Szabó, A., Fekete, T., **Somogyi, V.**, Veres, Á., Boldogh, I., Rajnavölgyi, É., Lányi, Á., Bácsi, A.: Oxidative modification enhances the immunostimulatory effects of extracellular mitochondrial DNA on plasmacytoid dendritic cells.
Free Radic. Biol. Med. 77, 281-290, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.028>
IF: 5.736

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 22,433

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
2,757

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

Debrecen, 2018.04.25.



7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Németh Norbert tanszékvezető, egyetemi docensnek, aki szakértelmével, támogatásával segítette kutatómunkámat. Köszönöm, hogy minden felmerülő kérdéssel bármikor fordulhattam hozzá, és idejét nem kímélve segítette az előrehaladásomat.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Furka Istvánnak és Prof. Dr. Mikó Irénnek, akik hozzáértő tanácsaikkal segítették a munkámat és oktatói tevékenységemet.

Szeretném megköszönni a segítségét, szakmai és baráti támogatását Dr. Deák Ádám adjunktus úrnak, aki tanácsaival segített átható képet kapni a laborállatokkal való bánásmódról, a vérvétel technikájáról.

Köszönöm Dr. Pető Katalin adjunktusnőnek emberi és szakmai segítségét és támogatását.

Hatalmas köszönet illeti Dr. Mester Anita és Tánczos Bence PhD hallgatókat, akik nem csak, mint munkatársak, hanem mint barátok segítettek a mérések elvégzésében, a legnehezebb pillanatokban is támogattak, biztattak.

Szeretném megköszönni Férjemnek, hogy az elmúlt években végig kitartott mellettem, türelemmel, megértéssel viselkedett, és a végsőkéig támogatott, hogy a kitűzött célt elérjem. Köszönöm Szüleimnek, hogy szeretetükkel, támogatásukkal segítettek tanulmányaimat, nélkülük nem tarthatnék ma itt.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a segítségét, barátságát a Sebészeti Műtéttani Tanszék minden volt és jelenlegi dolgozójának, akik végigkísérték a PhD hallgatóként itt töltött éveimet.