

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Haemorheologiai paraméterek fizikai és metabolikus hatásokra történő változásainak  
összehasonlító vizsgálatai**

**Tánczos Bence**

**Témavezető: Dr. Deák Ádám**



**DEBRECENI EGYETEM**

**Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola**

**Debrecen, 2022**

**Haemorheológiai paraméterek fizikai és metabolikus  
hatásokra történő változásainak összehasonlító vizsgálatai**

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

Írta: Tánczos Bence okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája  
(Klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Dr. Deák Ádám

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Bogár Lajos, MTA doktora  
Dr. Pál Balázs, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Illés Árpád, MTA doktora  
tagok: Dr. Szabó Andrea, PhD  
Dr. Trencsényi György, PhD

Az értekezés védésének időpontja: DE ÁOK, Urológiai Tanszék előadó  
2022. 11. 28-án (hétfőn) 13 órakor

## 1. BEVEZETÉS

A vér különleges szerepet tölt be az evolúciós értelemben vett magasabb rendű élőlények szervezetében. Lehetővé teszi a tápanyagok, hormonok, jelátviteli molekulák eljutását a célszervekhez, fontos szerepe van az immunrendszer, és az immunválasz kialakításában részt vevő elemek funkciójának betöltésében. A fentebb említett okok miatt különleges fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkezik (nem-Newtoni folyadék, pH puffer). Érthető módon az emberiséget már a tudomány hajnala óta érdekelte ennek a különös és különleges „szövetnek” a működése és a szervezetben betöltött szerepe.

A vér számos alakos eleme közül fontos kiemelni a vörösvérsejtek jelentőségét és különleges tulajdonságait. Fő feladatuk az oxigén és szén-dioxid szállítása a szövetek és a tüdő között. Ahhoz, hogy a legkisebb szövetek megfelelő oxigén ellátását biztosítsák (és ezzel az ideális szöveti perfúziót) az erythrocyták, és megfelelően tudjanak közlekedni a szervezet kapillárisaiban, képesnek kell lenniük a nagy mértékű alakváltozásra, deformálhatóságra. Ezt a tulajdonságukat a (1) cytosceletalis fehérjéknek, (2) az intracelluláris ion és vízháztartás kontrollálásának, (3) és a sejtmembrán felület-térfogat arányának köszönhetik. Ezeket a tényezőket negatívan befolyásolhatják az öröklött haemoliticus anémiák (sarló sejtveszégénység, thalassaemia) valamint fizikai és hatások, az oxidációs és gyulladási folyamatok.

Ismert továbbá, hogy a vér áramlási tulajdonságai nagy különbségeket mutatnak a különböző fajok között.

A fentebb említett okok miatt fontos mind a módszertani, mind fajok és nemek közötti összehasonlító haemorheológiai vizsgálatok végzése.

## 2. CÉLKITŰZÉS

A haemorheológiai faktorokra ható tényezők és az ezekhez kapcsolódó metodika tekintetében több kísérleteket végeztünk:

1. Metodikai jellegű kísérletünkben a vörösvérsejt membrán (mechanikai) stabilitási vizsgálatok során kapott eredmények és azok kiértékelési módszereinek összehasonlítása natív és kémiaailag csökkentett deformabilitású patkány vérminták esetén. Az irodalomban használatos paraméterek kiértékelése és összevetése újabb, informatívabb értékelési módszerrel.
2. Második kísérletünk célja volt az *in vitro* hőkezelés és lassú melegítés hatására bekövetkező microrheológiai paraméterekben történő változások összehasonlító elemzése humán, patkány, kutya és sertés vérmintákban, valamint a kezelések hatásának elemzése a vérminták rheológiai paramétereire, a fajok közötti különbségek feltárása céljából.
3. Harmadik kísérletünkben a tizenhat hét atherogen diéta okozta megnövekedett koleszterinszint hatásának tanulmányozása a haematológiai, macrorheológiai (teljes vér és plazma viszkozitás) és microrheológiai (vörösvérsejt aggregatio, deformabilitás és membránstabilitás) paraméterekre nyúl modellben.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Kutatási engedélyek

Az állatokon végzett kísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság jóváhagyásával és a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal engedélyével, a magyar (1998-as XXVIII. Törvény az állatok védelméről és kíméletéről) és Európai Unió (2010/63/EU Irányelv) jogszabályok és etikai elvek szerint végeztük. A humán vérminták esetében a Debreceni Egyetem Regionális Kutatás Etikai Bizottság engedélyével rendelkezünk.

Az egyes kísérletek engedélyszámai:

- 1) Vörösvérsejt membránstabilitási teszt adatértelmezési módszereinek összehasonlító vizsgálatai: 19/2011/DEMÁB
- 2) A hőmérséklet emelés hatása a vörösvérsejtek stabilitására, összehasonlító elemzés: 25/2016/DEMÁB, 7/2014/DEMÁB, 13/2014/DEMÁB
- 3) Koleszterin dús diéta haemorheologiai hatásai: 25/2013 DEMÁB

A humán vérmintákra vonatkozó Klinikai Etikai Engedély szám a hőmérséklet emelés hatása a vörösvérsejtek stabilitására, összehasonlító elemzésénél: DE-RKEB 3189-2010.

#### 3.2. Kísérleti protokollok

##### *3.2.1. Vörösvérsejt membránstabilitási teszt adatértelmezési módszereinek összehasonlító vizsgálatai*

Ebben a kutatásban öt, egészséges hím, CD outbred patkányt vontunk be (testtömeg:  $478 \pm 12,6$ g). A vérvételek (0,5-0,7 mL) a laterális farokvénából történtek, altatásban (60 mg/ttkg thiopental i.p.), 1,8 mg/mL K3-EDTA-t tartalmazó BD Vacutainer© csövekbe (Becton, Dickinson and Company, USA) 26G vastagságú tűvel. A laboratóriumi méréseket 2 órán belül elvégeztük. Az állatokból csak vérminta vétele történt, az altatáson kívül semmilyen más beavatkozáson nem estek át.

A membránstabilitási mérések összevetése céljából, a vérmintákból három különböző vizsgálati mintát készítettünk (0,2 mL minta végtérfogat): natív vér, csökkentett haematocrit értékű minta (haemodilutum) és csökkentett deformabilitású minta (rigiddé tett sejtek):

- 1. *mintatípus*: natív vérminta, ami semmilyen kémiai vagy fizikai kezelést nem kapott,
- 2. *mintatípus*: 20 % (V/V) foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldattal (PBS) hígított keverék (200 $\mu$ L vérminta + 40  $\mu$ L PBS),
- 3. *mintatípus*: paraformaldehid (PFA) – glutáraldehid (GFA) keverékkel rigiddé tett vörösvérsejtek. Ebben az esetben készítettünk egy 2%-os PFA-GFA törzsoldatot. Ebből az oldatból 1  $\mu$ L-t adtunk 2 mL polyvinil-pyrrolidion (PVP) oldathoz, hogy  $1 \times 10^{-5}$  % (V/V) oldatot kapjunk, amiben szuszpendáltuk a vörösvérsejteket, közvetlenül ektacyometriás mérés előtt.

Megmértük az általános haematológiai paramétereket (vörösvérsejt szám (Vvs [T/L]), haematocrit értéket (Htc [%]), haemoglobin koncentrációt (Hgb [g/dL]), átlagos vörösvérsejt térfogat (MCV [fL]), átlagos vörösvérsejt haemoglobin tartalom (MCH [pg]), átlagos vörösvérsejt haemoglobin koncentráció (MCHC [g/dL]) és thrombocytá szám (Thr [G/L])) valamint a vörösvérsejt deformabilitás és membránstabilitás értékeket.

### **3.2.2. A hőmérséklet emelés hatása a vörösvérsejtek membránstabilitására**

A kísérletbe 7 egészséges – 25 és 35 év közötti – férfit vontunk be. Mintavétel történt továbbá 7 hím Sprague-Dawley patkányból (testtömeg  $312,7 \pm 70$  g), 6 hím beagle kutyából (testtömeg:  $18,05 \pm 2,05$  kg) és 6 nőstény Hungahib-39 sertésből (testtömeg:  $15,1 \pm 1,2$  kg).

A mintavételek férfiak esetében a vena mediana cubitiból történtek 21 G tűvel, 1,8 mg/mL K3-EDTA-t tartalmazó BD Vacutainer© csövekbe. A Sprague-Dawley patkányból a vena caudalisból (altatás: 60 mg/ttkg thiopental i.p.), hat hím beagle kutyából a vena cephalicából (altatás: 10 mg/ttkg ketamin + 1 mg/ttkg xylazin + 0,25 mg/ttkg diazepam i.m.) és 6 nőstény Hungahib-39 sertésből a vena saphenából (altatás 15 mg/ttkg ketamin + 1 mg/ttkg xylazin, i.m. A mintákat az összehasonlíthatóság miatt ugyanolyan típusú, 1,8 mg/mL K3-EDTA-t tartalmazó BD Vacutainer© csövekbe vettük le, mint a humán mintákat.

Első lépésben megmértük a minták natív haematocrit értékét. Ezután szeparáltuk az alakos elemeket a vérplazmától egy 1000g erősségű, 10 percig tartó centrifugálással. Következő

lépésben eltávolítottuk a plazma és fehérvérsejtek tartalmazó („buffy coat”) frakciót, majd 1:1 arányban foszfát-pufferelt fiziológias sóoldattal (PBS) hígítottuk a mintát. Majd egy újabb 1000g-s 10 perces centrifugálást követően eltávolítottuk a folyékony frakciót, és haematocrit mérést végeztünk. Az így kapott haematocrit értéket 100%-nak véve, 10%-os haematocrit szuszpenziókat készítettünk PBS-es, majd ellenőrző méréseket végeztünk kétszer, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a minta tényleges 10% haematocritra van beállítva.

A kapott „törzsoldatokat” három fele osztottuk, és melegvizes fürdőbe (GFL Water Bath 1031, Scharlab Hungary Ltd., Hungary) merítettük őket 10 percre: 37°C, 40°C és 43°C-on. A mintákat egy 37°C-ra beállított száraz termosztátban tároltuk a mérések elvégzésig.

A LoRRca Maxsis Osmoscan ektacytometeren deformabilitási és membránstabilitási méréseket 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 és 45°C-on is elvégeztük ezzel szimulálva az inkrementális hőmérsékletNB emelkedés hatását a vérmintákra. Minden hőmérsékleten történt méréshez, új (37°C-on inkubált) mintát használtunk.

### **3.2.3. Koleszterin dús diéta haemorheologiai hatásai**

A Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiái Intézettel, kollaborációban, a kísérletbe tizenkét, 20 hetes, hím, Kaliforniai-Új-zélandi fehér hibrid nyulat (CAL/NZW) vontunk be (Jurasko Kft. Debrecen, Magyarország). Az állatok testtömege a kísérlet kezdetén a kontroll csoportban  $2898 \pm 111$ g (6 nyúl), míg a hypercholesterinaemiás (HC) csoportban  $2923 \pm 133$ g volt (6 nyúl).

Az állatokat konvencionális állatházi körülmények között, 12-12 óra világos-sötét ciklust biztosítottunk. A kéthetes akklimatizációs időszak alatt az állatok normál nyúl tápot és vizet kaptak, *ad libitum*. Az akklimatizációs időszak után két 6-6 fős csoportra osztottuk az egyedeket.

Ezt követően egy tizenhat hetes periódus következett, amely során a kontroll csoport állatai normál nyúltápot kaptak, amíg a HC csoport állatai speciális 1% koleszterinnel és 1% telített zsírsavval kiegészített tápot kaptak. A speciális, úgynevezett „atherogen” tápot a Debreceni Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszertechnológiai Tanszéke készített el.

A tizenhat hét után, vérmintákat vettünk az állatokból és elvégeztük a tervezett haematologiai és haemorheologiai méréseket.

A vérmintákat a nyúl fülénájából (vena marginalis) vettük, 3mL térfogatú 1,8 mg/mL K3-EDTA antikoagulánst tartalmazó BD Vacutainer® csövekbe, és 20°C-on tartottuk a mérések elvégzésig. Minden laboratóriumi mérésre két órán belül került sor, elkerülve ezzel a minták károsodását.

Megmértük az általános haematologiai paramétereket, a teljes vér és plazma viszkozitást, valamint a vörösvérsejt deformabilitás és membránstabilitás értékeket.

### **3.3. Laboratóriumi mérések, mintaelőkészítés**

#### ***3.3.1. Haematologiai paraméterek***

A kvalitatív és kvantitatív haematologiai paramétereket Sysmex K-4500 automatával (TOA Medical Electronics Co. LTd., Kobe, Japan) határoztuk meg: a vörösvérsejt számot ( $V_{vs}$  [T/L]), a haematocrit értéket ( $Htc$  [%]), a haemoglobin koncentrációt ( $Hgb$  [g/dL]), az átlagos vörösvérsejt térfogatot ( $MCV$  [fL]), az átlagos vörösvérsejt haemoglobin tartalmat ( $MCH$  [pg]) az átlagos vörösvérsejt haemoglobin koncentrációt ( $MCHC$  [g/dL]) és a thrombocyta számot ( $Thr$  [G/L]).

#### ***3.3.2. Vörösvérsejt deformabilitás és membránstabilitás***

A vörösvérsejt deformabilitási és mechanikai stabilitási méréseket egy LoRRca MaxSis Osmoscan ektacytométeren (Mechatronics BV, Hollandia) végeztük. Ehhez 10  $\mu$ L vért használunk fel, amit szuszpendálunk 2 mL polyvinyl-pyrrolidon (PVP) /foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldatban (PBS) oldatban.

A LoRRca ektacytometer, lézer diffrakciós elven méri a vörösvérsejtek nyíróerő hatására bekövetkező alakváltozását. A vörösvérsejt-PVP szuszpenziót egy folyamatosan forgó üveghengerbe úgynevezett „cup” -ba injektáljuk, amiben elhelyezkedik a lézerdíódát tartalmazó „bob”. A „bob” és „cup” között levő 3 milliméteres résbe juttatott minta egyenletes forgása hozza létre azt a folyadékköpenyt, melyet megvilágít a „bob”-ban levő lézerdíóda (630nm). A lézer a nyírás alatt levő vörösvérsejtekről visszaverődve (diffrakció) egy diffrakciós képet hoz létre, amit a műszer elemez.

A vörösvérsejt deformabilitás meghatározásánál az elongációs index (EI) értékeket az alkalmazott nyírófeszültség (SS [Pa], 0,3-30 Pa intervallum) függvényében elemeztük. Az így kapott elongációs index-nyírófeszültség görbék összehasonlíthatósága végett, a 3 Pa

nyírófeszültségnél mért elongációs index, a maximális elongációs index ( $EI_{max}$ ), az ehhez tartozó nyírófeszültség ( $SS_{1/2}$ ) és ezeknek az arányát ( $EI_{max}/SS_{1/2}$ ) használtuk fel. Az adatok elemelzhetősége érdekében a Lineweaver-Burk illesztést alkalmaztuk az alábbi képlet szerint:

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

A vörösvérsejt-membránstabilitás elemzéseknél a fent említett módon mért paramétereket mértük, annyi változtatással, hogy az alap deformabilitás meghatározása után, egy 100 Pa-os, 300 másodpercig tartó mechanikai stressznek tettük ki a mintát, majd végeztünk még egy deformabilitást mérés és az így kapott adatokat hasonlítottuk össze.

### 3.3.3. Teljes vér- és plazma viszkozitás

A teljes vér és plazma viszkozitás méréseket Hevimet-40 kapilláris viszkoziméterrel  $90s^{-1}$  nyírófeszültség mellett végeztük. A mérések kivitelezéséhez 0,6-0,7 mL teljes vér vagy vérplazma szükséges.

A készülék kétféle beállítás mellett vizsgálja a vérmintákat. A Cassoni-mérés a teljes vérhez használatos, és az eredmények kalkulálásánál figyelembe veszi, hogy nem-Newtoni folyadék mérése történik. A gravitációs elven működő készülék állandó nyírófeszültség mellett figyel a (hőkontrollált) kapillárisban levő folyadékoszlop lefutási idejét, így kiszámítva a viszkozitást, amit mPas (1 mPas = 1 centipoise [cP]) mértékegységben ad meg.

Mivel a vér viszkozitás haematocrit-függő, ezért a kapott eredmények összehasonlíthatósága miatt alkalmaznunk kell a Mátrai-formulát:

$$VV_1 = PV \left( \frac{VV_0}{PV} \right)^{\frac{Htk_1}{Htk_0}}$$

amelyben a  $VV_1$  a korrigált haematocrit érték,  $PV$  a plazma viszkozitás,  $VV_0$  a mért teljes vér viszkozitás,  $Htk_1$  az a haematocrit érték, amire korrigálni akarunk, ez esetünkben 40% és a  $Htk_0$  a natív haematocrit érték.

### 3.3.4. Vörösvérsejt aggregációs mérések

A Myrenne MA-1 erythrocyta aggregometer (Myrenne GmbH, Németország) az aggregatiót, fény-transzmissziós elvén méri. A készülék a mintán áthaladó infravörös fény intenzitás változásából határozza meg a vörösvérsejtek aggregálódásának mértékét. A  $20\mu L$  vérmintát az eszköz disaggregálja ( $600 s^{-1}$  nyírófeszültséggel), majd 5 és 10 másodperc után

megkapjuk az aggregációs index értékeket, M (stasis vagy  $0 \text{ s}^{-1}$ ) és M1 (alacsony nyírófeszültség  $3\text{s}^{-1}$ ) mellett.

A LoRRca Maxsis Omoscan ektacytometer (Mechatronics BV, Hollandia), vörösvérsejt aggregációt syllectometriás elven vizsgálja. Az eszköz Couette-rendszert használva, lézerdiffrakciós elven méri a mintákat (syllectometriás aggregometria). A vérmintáról disaggregáció után visszaverődő lézerefény intenzitás-változás függvényéből egy intenzitás-idő görbét hoz létre az eszköz, így az ektacytometer a Myrenne készülékkel ellentétben nem csak statikus aggregációs index adatokat prezentál, hanem az esemény dinamikájáról is eredményeket szolgáltat.

### 3.3.5. Statisztikai elemzések

A statisztikai elemzésekhez GraphPad Prism 8.0-ás szoftvert használtunk (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Általánosságban, az adatok eloszlásának függvényében a csoportok közötti és csoportokon belüli eltérések elemzésére egy- illetve kétirányú ANOVA módszereket, a csoportok között adott időpontban egyszerű összehasonlításként t-tesztet vagy Mann-Whitney tesztet is használtunk. A mechanikai stressz előtti és utáni EI értékek összehasonlítására páros t-tesztet vagy Wilcoxon-tesztet használtunk, szintén az adatok eloszlásától függően.

Mindegyik tanulmányban a  $p < 0,05$  értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

A mechanikai stabilitási tesztek vonatkozásában azt vizsgálva, hogy a változásokat melyik paraméter mutatja ki a legérzékenyebben, a standardizált differencia értékeket számítottuk ki a következő képlet alapján:

$$(\text{átlag}_x - \text{átlag}_y) / \sqrt{\sum (S.D._x^2; S.D._y^2)}$$

ahol:  $\text{átlag}_x$  és  $\text{átlag}_y$  a vizsgálat csoportok átlaga;  $S.D._x$  és  $S.D._y$  pedig a csoportok szórása.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Vörösvérsejt membránstabilitási teszt adatértelmezési módszereinek összehasonlító vizsgálatai

A kutatás célja az volt, hogy megállapítsuk, hogy a haemodilutio, illetve a kevésbé deformálhatóvá vált vörösvérsejtek milyen jellegzetes változásokat mutatnak, illetve mely paraméter mutatja legérzékenyebben az elváltozásokat. A PBS-oldattal történő haemodilutum készítést (0,2 % (V/V)) ellenőrző mérésekkel igazoltuk, a mért Htc [%]  $19,75 \pm 6,58$ ; a vörösvérsejt szám [T/L]  $18,45 \pm 3,03$  és a haemoglobin koncentráció [g/dL]  $19,2 \pm 3,07$  értékekre csökkentek a natív vérmintákhoz képest.

A membránstabilitási teszt előtti deformabilitás méréseket standard deformabilitás mérésnek tekintettük a vizsgálatok során. A konstans Htc csoport EI értékei alacsonyabbak voltak a natív vérmintákhoz képest. A 3 Pa nyírófeszültségnél mért elongatios index ( $p = 0,049$  vs. natív) és  $EI_{max}$  csökkent ezekben a mintákban, az  $SS_{1/2}$  nem mutatott szignifikáns eltérést. A PFA-GA kezelt csoport esetében, a szer okozta rigidség miatt, csökkent deformabilitás mutatkozott: alacsonyabb EI értékek (EI 3Pa-nál:  $p = 0,008$  vs. natív;  $p = 0,004$  vs. hígított), csökkentek az  $EI_{max}$  értékek ( $p = 0,017$  vs. natív), növekedtek az  $SS_{1/2}$  értékek ( $p = 0,016$  vs. natív;  $p = 0,012$  vs. hígított) és csökkent az  $EI_{max}/SS_{1/2}$  arány is ( $p = 0,004$  vs. Htc;  $p = 0,017$  vs. konstans Htc).

A vörösvérsejt membránstabilitási mérésnél alkalmazott mechanikai stressz (100Pa 300s) utáni EI értékekben az előzőekhez képest is szignifikáns csökkenést észleltünk a minták kezelési formájától függően.

A natív és konstans Htc minták között jelentős különbségeket nem találtunk. A PFA-GA kezelt minták esetén a legnagyobb eltérések az  $SS_{1/2}$  és  $EI_{max}/SS_{1/2}$  mechanikai stressz utáni és előtti értékek összehasonlításakor mutatkoztak. Ezek az eltérések szignifikánsak voltak a natív vérmintával összevetett abszolút ( $p < 0,001$ ) és relatív ( $p < 0,001$ ) értékekben is. A görbék lefutása között jelentős különbségeket regisztráltunk. Mivel az EI utána/előtte vs. nyírófeszültség görbék nem minden esetben mutattak lineáris karakterisztikát, így többféle görbe illesztési módszert is alkalmaztunk.

A natív és PFA-GA kezelt minták esetében a vizsgált paraméterek többsége 3,0 fölötti standardizált differencia mutatott. A stabilitás teszt előtti értékek mellett, a legnagyobb standardizált differencia a következő esetekben találtuk:  $EI_{max}$  utána/előtte arány (3,09)  $< SS_{1/2}$

utána/előtte arány (3,65) <  $EI_{\max}/SS_{1/2}$  utána/előtte arány (3,83) <  $EI_{\max}$  stressz után (4,4) <  $SS_{1/2}$  stressz után (4,79) < elongatiós index értéke 3 Pa nyírófeszültségnél, utána/előtte arány (5,27) <  $EI_{\max}/SS_{1/2}$  stressz után (5,38) < elongatiós index értéke 3 Pa nyírófeszültségnél, stressz után (6,02).

A konstans Htc vérminták és a PFA-GA kezelt vérminták mutattak alacsonyabb EI értékeket állandó nyírófeszültség mellett a 300 másodperces mechanikai stressz periódus alatt. Minden esetben a stressz periódus első 30 másodpercében egy enyhe emelkedés volt az EI értékekben, ezt követően az értékek nem növekedtek jelentősen. A meredekség ( $m$ ) értéke az EI- $t$  görbéknek szignifikáns különbséget mutatott ( $p = 0,037$  vs. Htc). Továbbá az  $m$  standard eltérés értéke 1,58 volt.

## **4.2. A hőmérséklet emelés hatása a vörösvérsejtek membránstabilitására**

### **4.2.1. Haematologiai paraméterek**

A patkány, kutya és sertés minták szignifikánsan tértek el a humán mintákhoz képest. A fehérvérsejt szám alacsonyabb volt a patkányoknál ( $p < 0,05$ ), míg a kutyák ( $p = 0,0095$ ) és sertések ( $p = 0,001$ ) esetén magasabb értékeket találtunk. A vörösvérsejt szám minden faj esetében magasabb volt az emberénél ( $p < 0,001$  vs. patkány és kutya,  $p = 0,0144$  vs. sertés). Ezzel szemben az embernél mértük a magasabb MCV értékeket ( $p < 0,001$  vs. patkány, kutya és sertés). A Htc értékek alacsonyabbak voltak a patkánynál ( $p < 0,001$ ) és sertésnél ( $p = 0,0371$ ), a kutyák esetén viszont magasabbak ( $p < 0,001$ ) a humán mintákhoz képest. A thrombocyta szám mindegyik állatfajnál magasabb értékeket mutatott az emberével összevetve (mindegyik faj:  $p < 0,001$  vs. humán). A 3 Pa nyírófeszültségnél mért elongatiós index értékek szignifikáns eltérést mutattak minden vizsgált állatfaj esetében a humán mintákkal összevetve (mindegyik faj:  $p < 0,001$  vs. humán). Az  $EI_{\max}$  értékek a kutya ( $p = 0,019$  vs. patkány,  $p < 0,001$  vs. sertés) és sertés ( $p < 0,001$  vs. humán és patkány) esetén mutattak alacsonyabb mértéket. Az  $SS_{1/2}$  értéke minden állatfajnál alacsonyabb volt a humán mintákhoz képest (patkány:  $p < 0,001$ ; kutya  $p = 0,007$ ; sertés:  $p < 0,001$  vs. humán). Az  $EI_{\max}/SS_{1/2}$  arány mindegyik faj esetén magasabb értékeket számítottunk (patkány:  $p < 0,0001$ ; kutya; sertés:  $p = 0,004$ ) a humán mintákhoz képest. A vörösvérsejt deformabilitás ( $EI_{\max}$ ,  $EI_{\max}/SS_{1/2}$ ) csökkenő tendenciát mutatott a teljes vérmintákban, a vizsgált hőmérséklet emelkedésével (37-45°C). 37-39°C között a csökkenés

mértéke minimális volt, azonban 39°C-nál magasabb hőmérsékleteken kifejezetten látványossá vált. Az elongációs index 3 Pa nyírófeszültségnél és az  $EI_{\max}$  csökkent a hőmérséklet emelkedésével, míg az  $SS_{1/2}$  növekedett. Az  $EI_{\max}/SS_{1/2}$  arány eltérő mértékben csökkent a vizsgálat fajok tekintetében. A hőkezelés hatására a humán PBS-vér szuszpenziók voltak a legérzékenyebbek, míg a kutyák mintáiban következett be a legkisebb mértékű változás.

#### **4.2.2. Vörösvérsejt membránstabilitási vizsgálatok**

A 37°C-on inkubált PBS-vvs szuszpenziók mechanikai stressz utáni EI értékeiben a patkány, kutya és sertés minták értékei csökkentek, ezzel szemben a humán mintáknál emelkedés volt tapasztalható. A 40 és 43°C-os inkubációt követően a patkány és kutya minták értékei is emelkedtek, míg a sertés minták értékei alacsonyak maradtak.

### **4.3. Koleszterin dús diéta haemorheologiai hatásai**

#### **4.3.1. Testtömeg változások**

A testtömeg adatok a kísérlet tizenhatodik hetére szignifikáns különbségeket mutattak a kísérleti csoportok között. A kontroll csoport testtömege  $3087 \pm 56$ g ( $p = 0,004$  vs. alap), a HC csoport  $4121 \pm 61$ g ( $p = 0,002$  vs. alap,  $p < 0,001$  vs. kontroll) volt.

#### **4.3.2. Haematologiai eredmények**

Jól látható, hogy a fehérvérsejt szám, a vörösvérsejtek átlagos térfogata és thrombocytá szám szignifikánsan magasabb volt a HC csoportban a tizenhatodik hét végére. A vörösvérsejtek átlagos haemoglobin tartalmában nem történt számottevő változás. A vörösvérsejt szám, a haemoglobin és a vörösvérsejtek átlagos haemoglobin koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt a HC csoportban a kontrollhoz képest.

#### **4.3.3. Haemorheologiai eredmények**

A teljes vér viszkozitás értékeket 40% haematocrit értékre korrigáltuk. A HC csoport értékei szignifikánsan magasabbak voltak a kontroll csoporthoz viszonyítva. A plazma viszkozitásban nem mutatkozott számottevő különbség.

A Myrenne aggregometer alapján a HC aggregációs index értékei minden mérési módban emelkedtek a kontroll csoporthoz képest. Ez az emelkedés szignifikáns volt mind stasis

(M 5s:  $p < 0,001$ , M 10s:  $p < 0,001$ ) mind alacsony nyírófeszültség ( $3 \text{ s}^{-1}$ , M1 10s  $p = 0,0251$ ) mellett.

A LoRRca által mért aggregációs indexek alapján elmondhatjuk, hogy az aggregációs index (AI [%]) a HC csoportban a kontrollhoz képest szignifikánsan magasabb ( $p = 0,0003$ ), míg az amplitúdó (Amp [au]) szignifikánsan alacsonyabb ( $p < 0,0001$ ). A  $t^{1/2}$  [s] érték – amely a vörösvérsejt aggregatio kinetikáját írja le – nem mutatott jelentős eltérést a két csoport között.

Az elongációs index – nyírófeszültség (EI-SS) görbék alapján a HC csoport szignifikánsan alacsonyabb deformálhatóságot mutatott a kontrollhoz képest.

Az egyedi EI-SS görbékből számított paraméterek hasonló különbségeket mutatnak. Az  $EI_{\max}$  értékek szignifikánsan magasabbak voltak a kontroll csoportban a HC-hoz képest. A 3 Pa nyírófeszültségnél mért EI adatok alacsonyabbak voltak a HC csoportban. Az  $SS_{1/2}$  értékek magasabbak, míg az  $EI_{\max}/SS_{1/2}$  arány szignifikánsan alacsonyabb volt a HC csoportban a kontrollal összevetve.

A vörösvérsejt membránstabilitás méréseknél alkalmazott 300 másodpercen keresztül tartó, 100 Pa-os mechanikai stressz előtt és után végzett deformabilitás mérések görbéi és eredményei jelentős különbségeket mutatnak a két csoport között.

A HC csoport, már az alkalmazott mechanikai stressz előtt is jelentősen alacsonyabb deformabilitás görbét mutatott a kontroll csoporthoz képest és ez a tendencia a mechanikai stressz után is megmaradt a HC csoportnál. Az előtte-utána görbék közötti különbségek is sokkal nagyobbak voltak a HC csoportban, ami az erythrocyták rosszabb stressztűrő képességét jelezte.

A görbékből számolt mérési adatok azt mutatták, hogy a hypercholesterinaemiás csoport már az alkalmazott stressz előtt szignifikánsan alacsonyabb EI értékek mellett, alacsonyabb  $EI_{\max}$  értékeket, de magasabb  $SS_{1/2}$  eredményeket mutat a kontrollhoz képest. Ezek az értékbeli különbségek a stressz után is megmaradtak, a HC csoport  $SS_{1/2}$  adatai esetében még jelentősebbé váltak.

## 5. MEGBESZÉLÉS

### 5.1. Vörösvérsejt membránstabilitási teszt adatértelmezési módszereinek összehasonlító vizsgálatai

A vörösvérsejt deformabilitásra és aggregációra ható tényezők közé soroljuk a vörösvérsejteket érő mechanikai traumát, a sav-bázis értékek változását, a szabadgyökös reakciókat, a patofiziológiás folyamatok során létrejövő metabolikus változásokat, az ischaemia-reperfusio és a sepsis hatására. A vörösvérsejteket érő mechanikai trauma mértéke nagymértékben függ a stressz erősségétől és időtartalmától. A vörösvérsejt mechanikai stabilitás mérése hasznos vizsgálati módszer a kutatásban és a diagnosztikában, ennek ellenére az adatok elemzésével és interpretálásával kapcsolatban kevés cikk található az irodalomban.

Szluha és munkatársai kutatásukban, egér modellen vizsgálták az alacsony dózísú egyszeri, teljes testet érő proton-besugárzás microrheológiai hatásait. Tanulmányukban a szerzők a teljes EI-SS görbékét mutatták be, és adott nyírófeszültség melletti EI értékeket, valamint az  $EI_{max}$  és  $SS_{1/2}$  adatokat hasonlították össze.

Tóth és munkatársai állatmodellen végzett kísérleteik alapján tanulmányukban rámutattak arra, hogy a kisebb méretű graftok elégtelensége a vörösvérsejtek deformabilitás és membránstabilitás értékeinek változásában is láthatóak voltak. Leírták, hogy a mechanikai stressz előtti és utáni EI-SS görbék között kisebb volt a különbség a graft csoportban. A vörösvérsejtek mechanikai stabilitásbeli változások mellett, ezeket kísérő haematológiai és haemostaseológiai változásokat is találtak. A szerzők a mechanikai stressz előtti és utáni EI-SS görbékét hasonlították össze, kétféle mechanikai stressz-nyírési időtartalom kombinációt alkalmazva (60 Pa 300s és 100 Pa 300s).

A haemorheológiai paraméterek, mint a teljes vér és a plazma viszkozitás, vörösvérsejt aggregatio, deformabilitás és ozmotikus grádiens deformabilitás (osmoscan) a különböző fajok és nemek között is mutatnak különbségeket. Megállapították továbbá azt, hogy a vörösvérsejt membránstabilitás az ember és egyéb fajok között eltérő, amely eltérés valószínűleg nyírófeszültség és ozmolaritás függő. Ezekben a kutatásokban a szerzők, mélyebbre menő adatelemzési és összehasonlító módszereket alkalmaztak: az EI értékek mechanikai stressz előtti és utáni arányait is kiszámolták, illetve az  $EI_{max}/SS_{1/2}$  értékek relatív változásait is összehasonlították a teljes EI-SS görbék vonatkozásában.

A szakirodalomban kevés adat található a mechanikai nyírási fázisról, annak ellenére, hogy ennek elemzése értékes adatokat nyújthat a sejteket érő mechanikai és dinamikai változásokról. Baskurt és Meiselman kutatásában azt találta, hogy a nyírási fázis elején, az EI értékek emelkedést mutatnak. Ennek oka valószínűleg a nyírófeszültség hatására a sejtekből történő nitrogén-monoxid vagy ATP felszabadulás lehet.

A Tanszékünkön folyó kutatási és laboratóriumi diagnosztikai mérések alatt számos „viselkedésformát” tapasztaltunk a mechanikai stressz fázis alatt: (1) alacsony, majdnem lineárisan csökkenő értékek a nyírási fázisban; (2) kezdeti emelkedés, majd csökkenés az EI értékekben; (3) egy stabil fázis után bekövetkező hirtelen csökkenés; (4) bizonyos esetekben semmilyen tendenciózus változást nem találtunk az értékekben. Ezen tapasztalatok alapján úgy gondoljuk, hogy célszerű nem csak a mechanikai stressz előtti és utáni görbéket összehasonlítani, hanem érdemes figyelni és értékelni a vörösvérsejtek mechanikai stressz alatti viselkedését is.

## **5.2. A hőmérséklet emelés hatása a vörösvérsejtek membránstabilitására**

A hyperthermiás vagy lázas állapot sokféle változást képes okozni *in vivo*. Ezek a patofiziológias elváltozások függenek a megemelkedett testhőmérséklettől, így más és más eltérések jelentkezhetnek például hóguta, termoregulációs betegségek vagy láz során. Hyperthermiás állapot esetén az érrendszerben bekövetkező változások viszonylag gyorsan jelentkezhetnek. Szélsőséges esetben a szív, a tüdő, a máj és a vese, akár visszafordíthatatlan morfológiai változásokat szenvedhetnek el, ami az adott szerv leállításához vezethet. Az eddigi adatok alapján ilyen esetekben, úgy tűnik, legkevésbé érintett szerv a lép lehet. A myocardium sejteiben a simafelszínű endoplasmaticus reticulum kitágul, az interfascicularis térben ödéma jön létre, ami a kontraktilitás romlásához vezet.

A vörösvérsejtek microrheológiai paraméterei jelentős változásokon esnek át a hőmérséklet növekedésével. Normál körülmények között a vörösvérsejteket nagymértékű deformálhatóság jellemzi, ami láz vagy lázas állapot esetén nagymértékű romlást mutat.

Jelen kutatás alapfelvetése az volt, hogy a hőkezelés vagy különböző hőmérsékleteken történő mérések hatására a vörösvérsejtek deformabilitásában változások jöhetnek létre. Ezek a változások különböző fajok közötti eltéréseket mutathatnak. A kapott eredmények és azok elemzése a következőket támasztották alá: (1) a PBS-vvs szuszpenziókban (10% Htc) a rövid ideig tartó hőkezelés (37°C, 40°C és 43°C) tendenciózusan romló vörösvérsejt deformabilitást

okozott; (2) ezek a változások a fajok között eltérő mértékűek voltak; (3) a vörösvérsejtek sokkal érzékenyebben reagáltak a hőmérséklet változásra a szuszpenziókban, a teljes vér-PVP keverékekhez képest; (4) a folyamatosan emelkedő hőmérsékleteken történt mérések fordított arányban befolyásolták a deformabilitást és ezek a vizsgált fajok között különböző mértékű változásokat okoztak; (5) a membránstabilitás teszt nem egyöntetű eredményt hozott, egyes a hőmérséklet növekedésével kapcsolatos méréseknél.

A fajok között levő vörösvérsejt deformabilitás eltérés egy komplex és még nem teljesen tisztázott témakör, mivel a sejtmorfológia, membránösszetétel, viszkoelaszticitás, sejtterfogat és a sejt felület-terfogat arány szélsőséges határok között mozog a különböző fajokban.

A tárolás és a mérések hőmérséklete szignifikánsan befolyásolja a vörösvérsejt aggregációt és deformabilitás értékeket. Baskurt és Mat, patkány sepsis modellen elvégzett ektacytometriás mérések során azt tapasztalták, hogy a 37°C-on elvégzett tesztek szignifikáns különbségeket mutattak a kontrollhoz képest, mely különbségek alacsonyabb hőmérsékleteken nem voltak kimutathatók. Singh és Stoltz humán vérmintákban kimutatták, hogy az 5°C és a 37°C elvégzett vörösvérsejt aggregatio és deformabilitás mérések eredményei szignifikánsan eltérnek. Ennél magasabb hőmérsékleteken még nem történtek hasonló vizsgálatok.

A hőmérséklet hatással van a vörösvérsejtek fehérjéire és a sejtmembránjára is. Gershfeld és munkatársai leírták, hogy egy 30 órán keresztül tartó, különböző hőmérsékletű inkubálási periódus alatt, a humán vörösvérsejtek haemolysise hőmérséklet függő és ez a folyamat következménye a sejtmembrán úgynevezett „unilamellar-multibilayer” transzformációjának. Ez azt jelenti, hogy a sejtmembrán stabil unilamellar állapotban van 37°C-on, viszont a hőmérséklet emelkedésével egy ún. multibilayer szerkezetű transzformálódik, amivel olyan sejt felszíni régiók válnak elérhetővé a külső környezet számára, amelyek lipidszegények és ezért a sejt elveszíti cytosolt és haemolysis jön létre.

Ismeretes, hogy a nitrogén-monoxid képes javítani a vörösvérsejt deformabilitást, A vörösvérsejtek képesek a nitrogén-monoxid termelésére, aminek egyik fő oka az érpályában őket érő nyírófeszültség. Kutatásunk során azt találtuk, hogy a PBS-vvs szuszpenziókban, a mechanikai stressz utáni mérésekben 37°C-on javultak az EI értékek a humán minták esetében, míg hasonló tendencia csak 40°C és 43°C-on volt megfigyelhető a patkányból és kutyából származó mintákban.

Fiziológias körülmények között a vörösvérsejtek nitrogén-monoxid termelése és az ezzel járó deformabilitás javulás az általunk vizsgáltnál (100 Pa) alacsonyabb nyírófeszültség értékeknél is észlelhető volt tekintve, hogy az érpályában ritka a 10 Pa feletti nyírófeszültség értéke. Feltételezhető, hogy a vvs-PBS szuszpenziókban levő alacsony (10%) haematocrit érték mellett, a nyíróerők eloszlása és átvitele az erythrocyták között eltér a normális vér hasonló tulajdonságaitól. Továbbá ismeretes, hogy a nitrogén-monoxid termelése növekszik a hőmérséklet növekedésével az élő szervezet szerveiben és szöveteiben.

Kutatásunk legfőbb limitációs tényezője lehet, hogy a kezeléseket és a méréseket *in vitro* végeztük, így nem tudjuk közvetlenül rávetíteni *in vivo* kutatásra az eredményeket. A hőstressz a hőkezelt PBS-vvs szuszpenziók esetén rövid ideig tartott, a teljes vérminták esetén pedig a melegítést csak a mérések időtartama alatt alkalmaztuk. Ezzel szemben, a maghőmérséklet megemelkedése, például láz esetén, akár napokig is eltarthat, ami a módon összetett válaszreakciókat vált ki. A melegített teljes vérmintákat egy PVP-PBS oldatba kevertük el, hogy a mérések kivitelezhetőek legyenek, ez esetünkben további eltérést jelent a fiziológias körülményektől.

### **5.3. Koleszterin dús diéta haemorheológiai hatásai**

A hypercholesterinaemiás nyúl modell a humán atherosclerosis és lipidmetabolizmussal kapcsolatos kóros állapotok, betegségek kutatásának széleskörben elfogadott modellje. A metabolikus betegségekkel foglalkozó szakirodalomban ismeretes, hogy a nyúl érzékenyen reagál a táplálékból felvett többlet koleszterinre, ami gyorsan kialakuló és súlyos hypercholesterinaemiához, majd atherosclerosishoz vezet. A máj által felvett koleszterin mennyiségétől függően a máj LDL receptorainak száma emberben és a nyúlban is lecsökkenhet. A nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein (VLDL) receptorok, amelyek nagymértékben részt vesznek a habos sejtek kialakulásában, nyúlban és emberben is nagymértékben expresszálódnak a macrophagokban. A nyulak anatómiai jellegzetességei, így a rágszálókhöz mérten nagyobb méretű artériák, alkalmasabbá teszik őket, klinikai módszerekkel történő vizsgálatokra, például mágneses rezonanciás képalkotásra (MRI) és echocardiographiás mérésekre, morfológiai (plakkok összetétele és szerkezete), illetve a funkcionális (szisztolés és diasztolés zavarok) változások kimutatására.

Annak ellenére, hogy a nyúl modell kiválóan alkalmas metabolikus kutatásokra, mint minden kísérletes állatmodellnek megvannak a maga limitációi. Egyik ilyen korlátozó tényező, hogy a laboratóriumi körülmények között standard tápon tartott nyulaknál nem alakul ki spontán atherosclerosis, a tápok alacsony koleszterin tartalma miatt. A komolyabb patológias elváltozásokat, mint a szívfunkciók romlása, atherosclerotikus plakkok létrejötte, infarktus és magasabb mortalitás, csak a hosszú ideig és megnövelt koleszterin tartalmú diétán tartott nyulaknál fordul elő. Ha a nyulakat magas koleszterin tartalmú táppal etetjük, akkor aorta károsodás is kialakulhat, először az aorta íven, majd a mellkasi aorta szakaszon; az emberre jellemző a hasi aorta érintettség, csak súlyos esetekben fordul elő. Bizonyos esetekben a koszorúereket érintő érlemezésedés is megfigyelhető nyulaknál.

A nyúl modell további jellegzetessége, hogy az humán atherosclerosisban elforduló károsodások, mint a plakk ruptura, fekélyesedés vagy aorta aneurysma nem, vagy csak ritkán mutatható ki. A nyulaknál kialakuló plakkok főleg habos sejtekből állnak, amelyekben zsírlerekódások vannak és magas a macrophag tartalma. Az előrehaladott állapotban levő károsodások hosszabb ideig tartó koleszterin etetés után alakulhatnak ki, a máj alacsony lipáz aktivitásának következtében kialakuló májkárosodás miatt.

A kutatásunk során használt nyúl modell jelentős morfológiai, funkcionális és szerológiai elváltozásokat mutatott. A bal pitvar megvastagodott, a bal kamra tömege és relatív vastagsága megnövekedett. A szövettani elemzés során az aortában habos atherosclerotikus plakkok kialakulását, a myocardialis szövetben interstitialis fibrosist állapítottunk meg. Diasztolés diszfunkció jelei is mutatkoztak az állatokban. A szérum lipid paraméterek, az atherogen index és az ApoB/ApoA aránya szignifikánsan magasabb volt az atherogen csoportban.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az atherogen diéta számos haematológiai paramétert befolyásolt kutatásunk 16 hetes időtartama alatt. Mind a vörösvérsejt szám, mind a haemoglobin szint csökkent a kezelt kísérleti csoportban. Hasonló változásokat írtak le nyulaknál magas koleszterin- és LDL szint esetén. Szakirodalmi adatok szerint, már 6 hetes atherogen kezelés hatására is jelentkezhet alacsony vörösvérsejt szám, valamint jelentős változások tapasztalhatók az MCV, MCH és MCHC értékekben.

Kísérletünk során, a HC csoportban megjelenő szignifikánsan megemelkedett MCV, változatlan MCH és a szignifikánsan csökkent MCHC értékek hypochrom macrocyter regeneratív anaemia kialakulására utalt. Az anaemia létrejötte okozhat hypoxiás állapotot a szervezetben a

csökkent haemoglobin szint miatt, ami kihat több hemodinamikai paraméterre is. Az akut anaemia okozta klinikai és haemodinamikai paraméterekben történt változások visszafordíthatók, ellenben a krónikus anaemiás állapot progresszív szívmegegyobbodáshoz és bal kamrai hypertrophiához vezethet. Hasonló patofiziológiás elváltozásokat a mi kísérletünkben is észleltünk. A megnövekedett MCV utalhat az atheroscleroticus állapot súlyosságára és a vitaminhiányhoz kötött atherosclerosis jelenlétére is.

A hypercholesterinaemiás állapot stimulálja a thrombocytá szám növekedését megacaryopoesisen és myelopoiesisen keresztül, valamint növeli a thrombocytá aktivációt. Továbbá a megnövekedett koleszterinszint fokozza a thrombocytá hyperaggregabilitás mértékét is. Az aktivált thrombocyták képesek aggregátumokat létrehozni a neutrophil granulocytákkal és monocytákkal is. Az így létrejövő interakció a vérlemezkék és a leukocyták között fontos szerepet játszik a gyulladáshoz vezetők termelésében, a leukotriének és reaktív oxigén gyökök (ROS) létrejöttében. A reaktív oxigén gyökök elősegítik gyulladáshoz vezetők termelését, mint a C-reaktív protein (CRP), ami ezt követően aktiválhatja a pro-thrombotikus faktorokat és a thrombocytákat. Az általunk mért megnövekedett fehérvérsejt és thrombocytá szám, valamint CRP szint az atherosclerosis gyulladáshoz vezetők jellegét mutatja.

A magas koleszterinszint közvetlen hatással van a véráramlásra; úgy, mint az atheroscleroticus plakkok létrejötté és növekedése az artériákban, a koszorúerek lumenjének csökkenése, az endothelium gyulladáshoz vezetők állapota, és csökkent mértékű endothelium-függő vasorelaxatio. Ezek együttesen rontják a szívizom keringését és a szöveti perfúziót. A hypercholesterinaemia indirekt módon is képes befolyásolni a rheológiai faktorokat: a magas koleszterinszint növeli a teljes vér viszkozitást a fehérvérsejt- és thrombocytá szám megemelkedésével.

A vörsvérsejt aggregatio esetében jelentős különbségeket mutattunk ki a kísérleti csoportok között, mind a fénytranszmissziós, mind a syllectometriás mérési módszer segítségével. A Myrenne aggregometerrel (fénytranszmissziós mérési eszköz) kimutattuk, hogy a HC csoport aggregációs indexei szignifikánsan emelkedtek a kontrollhoz képest minden mérési módban (M, M1). A LoRRca (syllectometriás mérési módszer) a HC csoport megnövekedett aggregációs index értékei mellett, csökkent aggregációs amplitúdót tapasztaltunk, míg az aggregatio idődinamikájában nem volt számottevő változás. A humán klinikai tanulmányok során végzett mérések hasonló aggregációs index és amplitúdó értékeket mutattak ki, azonos mérési

módszerekkel, túlsúlyos, diabeteses és hypercholesterinaemiás betegeknél. Továbbá megállapították, a teljes koleszterinszint és a vörösvérsejt aggregációs indexek (AI) között pozitív, míg az aggregatio-félideje ( $t_{1/2}$ ) negatív korreláció áll fenn.

Az alacsony sebesség-gradiensnél megnövekedett vérviszkózitás fő oka a vörösvérsejt aggregatio. A plakkok által beszűkített lumen okozta véráramlás változás növelheti a sejtek adhézióját és az áramlási ellenállást. Az alacsony szöveti haematocrit szint, alacsony lokális viszkozitást okozhat az erek marginális zónájában, ami csökkenti a súrlódási ellenállást az endotheliummal. Az axiális migráció (a deformálható vörösvérsejtek az érfal közelében lévő nyíróerők miatt a középáramba vándorolnak) elősegíti a fehérvérsejteknel és thrombocytáknál leírt marginalizáció jelenségét. Munn és Dupin megállapította, hogy a vörösvérsejtek aggregációja során létrejövő roleaux formálódás jelensége hatékonyabb formája a fehérvérsejtek érfalhoz való sodródásának, mintha ezt a jelenséget lazán összerendeződött sejtek okoznák. A fehérvérsejtek marginalizációja függ az áramlási tulajdonságoktól, az erythrocyták és aggregátumaik axiális migrációjától, a lokális haematocrit értéktől, és a vörösvérsejt deformabilitástól.

Számos fiziológias és patofiziológias tényező hat az erythrocyták deformálhatóságára. A vörösvérsejtek membránstabilitását az LDL-koleszterin szint direkt módon is befolyásolja. Az erythrocyták membránjában felhalmozódó túlzott mennyiségű koleszterin növeli a sejtek rigiditását és csökkenti a deformálhatóságukat, ez a rigiditás összefügg a relatív koleszterin/foszfolipid arány növekedésével is. A koleszterin/foszfolipid arány változása in vitro befolyásolhatja a vörösvérsejtek foszfatidil-szerin mennyiségét a sejtek felszínén hypercholesterinaemiás és acanthocytosis anaemiában szenvedő betegek vérében. A magas zsír tartalmú étrenden tartott egerek esetében a membrán koleszterinszint és a foszfatidil-szerin externalizáció növekedett, ami elősegítette a vörösvérsejt-macrophag gyulladásos interakciókat, és növelte a macrophagok fagocitózisának mértékét is, in vitro körülmények között. A vörösvérsejt deformabilitás romlását humán klinikai vizsgálatokban is kimutatták. A foszfatidil-szerin fontos trigger a macrophagoknak, és ez által az előregedő vörösvérsejtek felismerésében is szerepet játszik, továbbá az erythrocyták membránstabilitásának is fontos tényezője.

A rigidebb membránnal rendelkező vörösvérsejtek jobban ki vannak téve az érrendszerben létrejövő mechanikai stressznek, így könnyebben károsodnak (elsősorban a kapillárisokban, lépben). A rigidebb erythrocyták kevésbé deformálódnak a nyíróerők hatására, így a magasabb viszkozitás okozta többlet erőhatás is hozzájárulhat a vörösvérsejt

membránstabilitás értékek csökkenéséhez. Kutatási eredményeink azt mutatták, hogy csökkent deformabilitás, rontott a membránstabilitáson is a hypercholesterinaemiás csoportban. A vizsgált paraméterek jól kifejezték a deformabilitásbeli különbségeket ( $EI$ ,  $EI_{\max}$ ,  $SS_{1/2}$ , és ezek aránya) és a mechanikai stabilitás (mechanikai stressz előtt és után) csökkenését. A vörösvérsejt deformabilitás csökkenését a hypercholesterinaemiás csoportban jól mutatja az  $EI$ - $SS$  görbék parametrizációja utána kapott  $EI_{\max}$  csökkenés,  $SS_{1/2}$  növekedés és az  $EI_{\max}/SS_{1/2}$  arány csökkenése is. A romló membránstabilitás az  $EI$ - $SS$  görbék közötti különbségekben is megmutatkozott. A hypercholesterinaemiás csoport esetében már a mechanikai stressz előtt is alacsonyabb értékeket regisztráltunk, ami a stressz hatására még kifejezettebbé vált. Ezt a tendenciát mutatja az itt számított  $SS_{1/2}/EI_{\max}$  arány is.

## FŐBB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK ÖSSZEGRÉSE

1. A vörösvérsejt membránstabilitásában bekövetkező változások vizsgálatainak összehasonlíthatósága szempontjából az alábbi paramétereket találtuk a legmegfelelőbbnek: elongációs index-idő görbék meredeksége a mechanikai stressz periódus alatt, az elongációs index előtte/utána arány a nyíró feszültség (SS) vonatkozásában, a 3 Pa-nál mért elongációs index utána/előtte aránya, a maximális elongációs index ( $EI_{max}$ ), és ennek feléhez tartozó nyírófeszültség érték ( $SS_{1/2}$ ) és ezek aránya ( $EI_{max}/SS_{1/2}$ ) mind egészséges, mind patológiás vérminták esetén.
2. Kimutattuk, hogy már a rövid ideig tartó hőkezelés is szignifikánsan csökkenti a vörösvérsejtek deformabilitását. Leírtuk, hogy a különböző fajok vörösvérsejtjei eltérően reagálnak a különböző mértékű hőhatásokra, így a humán vérminták voltak a legérzékenyebbek, míg a kutyákból származó minták a legellenállóbbak a vizsgált hőhatásokra. Kimutattuk, hogy a hőmérséklet emelkedésének módja és a minták összetétele is befolyásolja a vörösvérsejt deformabilitás romlását.
3. A koleszterin dús diéta haemorheologiai hatásainak vizsgálata során kimutattuk, hogy az atherogen diéta szignifikáns változásokat okoz: emelkedett a fehérvérsejt szám, a vörösvérsejtek átlagos térfogata és thrombocytá szám; csökkent a vörösvérsejt szám, haemoglobin és a vörösvérsejtek átlagos haemoglobin koncentrációja. A szakirodalomban először, kétféle aggregációs mérési módszerrel is bebizonyítottuk, hogy a hypercholesterinaemia jelentősen rontja az aggregatio mértékét. Megállapítottuk, hogy az atherogen táp szignifikánsan csökkenti a vörösvérsejtek deformálhatóságát. Leírtuk, hogy a vörösvérsejt membránstabilitás már az alkalmazott mechanikai stressz előtt is jelentősen alacsonyabb deformabilitás görbét mutatott a HC csoportban a kontroll csoporthoz képest és ez a tendencia a mechanikai stressz után is megmaradt.

## 6. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények hitelesített listája



**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/364/2022.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tánczos Bence

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Tánczos, B.**, Somogyi, V., Bombicz, M., Juhász, B., Németh, N., Deák, Á.: Changes of Hematological and Hemorheological Parameters in Rabbits with Hypercholesterolemia. *Metabolites*. 11 (4), 1-12, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo11040249>  
IF: 5.581
2. Mátrai, Á. A., Varga, G., **Tánczos, B.**, Baráth, B., Varga, Á., Horváth, L., Bereczky, Z., Deák, Á., Németh, N.: In vitro effects of temperature on red blood cell deformability and membrane stability in human and various vertebrate species. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 78 (3), 291-300, 2021.  
DOI: <https://doi.org/10.3233/CH-211118>  
IF: 2.411

### További közlemények

3. Baráth, B., Somogyi, V., **Tánczos, B.**, Varga, Á., Bereczky, Z., Németh, N., Deák, Á.: Examination of the relation between red blood cell aggregation and hematocrit in human and various experimental animals. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 78 (2), 187-198, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-211109>  
IF: 2.411
4. Szabó, B., **Tánczos, B.**, Varga, Á., Baráth, B., Ghanem, S., Rezsabek, Z., Al-Smadi, M. W., Németh, N.: Micro-rheological changes of red blood cells in the presence of an arterial venous fistula or a loop-shaped venous graft in the rat. *Front. Physiol.* 11, 1-12, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2020.616528>  
IF: 4.566





5. Ghanem, S., Lesznyák, T., Fazekas, L., **Tánczos, B.**, Baráth, B., Nasser, M., Horváth, L., Bidiga, L., Szabó, B., Deák, Á., Pető, K., Németh, N.: Microrheology, microcirculation and structural compensatory mechanisms of a chronic kidney disease rat model: a preliminary study.  
*Clin. Hemorheol. Microcirc.* 75 (1), 47-56, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-190763>  
IF: 2.375
6. Varga, G., Ghanem, S., Szabó, B., Nagy, K., Pál, N., **Tánczos, B.**, Somogyi, V., Baráth, B., Deák, Á., Matolay, O., Bidiga, L., Pető, K., Németh, N.: Which remote ischemic preconditioning protocol is favorable in renal ischemia-reperfusion injury in the rat?  
*Clin. Hemorheol. Microcirc.* 76 (3), 439-451, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-200916>  
IF: 2.375
7. Ghanem, S., Somogyi, V., **Tánczos, B.**, Szabó, B., Deák, Á., Németh, N.: Modulation of micro-rheological and hematological parameters in the presence of artificial carotid-jugular fistula in rats.  
*Clin. Hemorheol. Microcirc.* 71 (3), 325-335, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-180411>  
IF: 1.741
8. Nemes, B. Á., Pető, K., Németh, N., Mester, A., Magyar, Z., Ghanem, S., Somogyi, V., **Tánczos, B.**, Deák, Á., Kállay, M., Bidiga, L., Frecska, E.: N,N-dimethyltryptamine Prevents Renal Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Model.  
*Transplant. Proc.* 51 (4), 1268-1275, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2019.04.005>  
IF: 0.784
9. Varga, G., Ghanem, S., Szabó, B., Nagy, K., Pál, N., **Tánczos, B.**, Somogyi, V., Baráth, B., Deák, Á., Pető, K., Németh, N.: Renal ischemia-reperfusion-induced metabolic and micro-rheological alterations and their modulation by remote organ ischemic preconditioning protocols in the rat.  
*Clin. Hemorheol. Microcirc.* 71 (2), 225-236, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-189414>  
IF: 1.741
10. Mester, A., Magyar, Z., Molnár, Á., Somogyi, V., **Tánczos, 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: 1.872





11. Magyar, Z., Mester, A., Nadubinszky, G., Varga, G., Ghanem, S., Somogyi, V., **Tánczos, 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.* 70 (2), 181-190, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-170351>  
IF: 1.642
12. Ghanem, S., **Tánczos, B.**, Deák, Á., Bidiga, L., Németh, N.: Carotid-Jugular Fistula Model to Study Systemic Effects and Fistula-Related Microcirculatory Changes.  
*J. Vasc. Res.* 55 (5), 268-277, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000491930>  
IF: 1.855
13. 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.* 54 (5-6), 127-140, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/BIR-17148>  
IF: 0.933
14. Pető, K., Németh, N., Mester, A., Magyar, Z., Ghanem, S., Somogyi, V., **Tánczos, 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.* 70 (1), 107-117, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-170361>  
IF: 1.642
15. Mester, A., Magyar, Z., Somogyi, V., **Tánczos, 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: 1.642
16. Magyar, Z., Varga, G., Mester, A., Ghanem, S., Somogyi, V., **Tánczos, B.**, Deák, Á., Bidiga, L., Pető, K., Németh, N.: Is the early or delayed remote ischemic preconditioning the more effective from a microcirculatory and histological point of view in a rat model of partial liver ischemia-reperfusion?  
*Acta Cir. Bras.* 33 (7), 597-608, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-865020180070000005>  
IF: 0.931





17. Szemán-Nagy, G., **Tánczos, B.**, Fidrus, E., Tálás, L., Bánfalvi, G.: Chemically Induced Cell Cycle Arrest in Perfusion Cell Culture.  
In: Cell cycle synchronization : methods and protocols. Ed.: by Gaspar Bánfalvi, Humana Press, New York, 161-176, 2017.
18. 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.
19. Németh, N., Pető, K., Deák, Á., Somogyi, V., Varga, G., **Tánczos, B.**, Balog, K., Csiszókó, 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
20. Turáni, M., Bánfalvi, G., Péter, Á., Kukoricza, K., Király, G., Tálás, L., **Tánczos, B.**, Dezső, B., Szemán-Nagy, G., Kemény-Beke, Á.: Antibiotics delay in vitro human stem cell regrowth.  
*Toxicol. Vitro.* 29 (2), 370-379, 2015.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.10.013>  
IF: 3.338
21. Szemán-Nagy, G., Benkő, I., Király, G., Vörös, O., **Tánczos, B.**, Sztrik, A., Takács, T., Pócsi, I., Prokisch, J., Bánfalvi, G.: Cellular and nephrotoxicity of selenium species.  
*J. Trace Elem. Med. Biol.* 30, 160-170, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.12.011>  
IF: 2.55
22. Bányai, E., Balogh, E., Fagyas, M., Arosio, P., Hendrik, Z., Király, G., Szemán-Nagy, G., **Tánczos, B.**, Pócsi, I., Balla, G., Balla, J., Bánfalvi, G., Jeney, V.: Novel functional changes during podocyte differentiation: increase of oxidative resistance and H-ferritin expression.  
*Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 1-10, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/976394>  
IF: 3.516





23. Benkő, I., Szemán-Nagy, G., **Tánczos, B.**, Ungvári, É., Sztrik, A., Eszenyi, P., Prokisch, J., Bánfalvi, G.: Subacute toxicity of nano-selenium compared to other selenium species in mice. *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (12), 2812-2820, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.1995>  
IF: 2.618

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 48,203**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
7,992**

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, 2022.07.12.



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani Témavezetőmnek, Dr. Deák Ádám adjunktus Úrnak, PhD témavezetésem előtt és alatt nyújtott segítségével és barátságáért. Megmutatta többek között a laborállatokkal való helyes bánásmódokat, segített és támogatott a közös TDK témavezetésnél, cikk írásnál és a disszertációval kapcsolatos teendők lebonyolításánál.

Hálás köszönetem Prof. Dr. Németh Norbert Tanszékvezető Úrnak, aki még laboranalitikusként meglátta bennem a PhD-hoz szükséges potenciált, és támogatott ezen célom elérésében. Bármikor fordulhattam hozzá szakmai segítségért legyen az haemorheologia, tudományos előadás vagy kísérlettervezés.

Továbbá köszönet illeti Dr. Somogyi Viktória tanársegédet, Dr. Mester Anitát, Baráth Barbara, Varga Ádám és Mátrai Ádám PhD hallgatókat, akikkel számos és számtalan órát eltöltöttünk a laboratóriumi mérések alatt, és csapatként jó hangulatban tudtuk egymás munkáját és a közös munkát előre lendíteni.

Köszönöm Dr. Szabó Balázsnak és Dr. Fazekas Lászlónak a mikrosebészeti kutatások alatt közösen végzett munkát és barátságukat az eltöltött idők alatt.

Továbbá köszönet illeti a Sebészeti Műtéttani Tanszék régi és jelenlegi Munkatársait a közös jó hangulatú évekért.

Szeretném megköszönni Szüleimnek és régi Barátaimnak az erőfeletti támogatást és szeretet, amit nyújtottak tanulmányaim hosszú és sokszor viszontagságos éveim alatt, meghallgattak és felsegítettek amikor elestem a mindennapok göröngyös útjain.

Zárszóként szeretném Doktori Értekezésemet Édesapám emlékének ajánlani, aki sajnos már nem élhette ezt meg (Tánczos Tamás 1955-2020).