

Doktori (Phd) Értekezés Tézisei

**A vörösvérsejt aggregatio haematocrit függőségének vizsgálata,
valamint változásai policisztás ovárium szindróma során**

Bedőcs-Baráth Barbara

Témavezető: Dr. Deák Ádám



DEBRECENI EGYETEM

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2023.

**A vörösvérsejt aggregatio haematocrit függőségének vizsgálata,
valamint változásai policisztás ovárium szindróma során**

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

Írta: **Bedőcs-Baráth Barbara** okleveles klinikai laboratóriumi kutató

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája
(Experimentális és operatív orvostudományok programja) keretében

Témavezető: **Dr. Deák Ádám**

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

Prof. Dr. Póka Róbert, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szekanecz Zoltán, az MTA doktora

tagok: Dr. Katona Éva, PhD

Dr. Nádasy György, CSc

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Belgyógyászati Intézet
„A” épület előadóterme

2024. január 15., 13:00

1. BEVEZETÉS

A haemorheologia, ahogy Alfred Levin Copley, a tudományág atyjaként is emlegetett amerikai haematologus 1951-ben megfogalmazta: „*A vér sejtés és plazmatikus komponensei makro- és mikroszkópikus dimenziójú áramlástanának, valamint a vérrel kontaktusban lévő érfal rheológiájának összefoglaló megjelölése.*”. Az utóbbi évtizedekben egyre szélesebb körben kezdtek el a haemorheologiai kutatásokat, így egyre több és több pathológiás folyamat véráramlásra, és kifejezetten a vörösvérsejtekre gyakorolt hatásáról kaphatunk információt, köszönhetően az alkalmazható mérési módszerek széles skálájának, mint a különböző fény-transzmisszió, fény-reflektancián alapuló mérőmódszereknek, az ektacytometriás, mikroszkópos és filtrációs technikáknak.

A haemorheologiai paramétereket, mint a teljes vér- és plazmaviszkozitást, a vörösvérsejt deformabilitást és aggregációt számos tényező befolyásolja. Ezek a befolyásoló tényezők már jól ismertek, azonban az egyes paraméterek egymásra hatását még nem ismerjük teljesen. Korábbi kutatások már kimutatták, hogy a haematocrit és a teljes vérviszkozitás kapcsolata nem lineáris, ahogy az aggregatio-haematocrit kapcsolat sem. Leírták továbbá, hogy a haematocrit-viszkozitás kapcsolat, a centrifugálás okozta mechanikus trauma, valamint az aggregatio, a deformabilitás és a sejtmembrán stabilitás is faji eltéréseket is mutat.

Számos pathológiás folyamat során tapasztalunk változásokat a haemorheologiai paraméterekben. Főként a szív- és érrendszert érintő betegségekben, mint a magas vérnyomás, a myocardialis infarctus, de metabolikus elváltozások esetén is, mint a II-es típusú diabetes mellitus, vagy az inzulin rezisztencia. A policisztás ovárium szindróma (PCOS) nagyon gyakori megbetegedés a reprodukív korú nők körében. Bár a kardiovaszkuláris és metabolikus elváltozások PCOS-ben gyakoriak, továbbá a haemorheologiai paraméterek nemi eltéréseket is

mutatnak, ennek ellenére a policisztás ovárium szindrómában jelentkező haemorheológiai változásokat leíró tudományos publikációk száma kevés.

Vizsgálataink egyik része az aggregatio-haematocrit kapcsolat fajok (humán, patkány, kutya, sertés) közötti különbségeinek feltárására irányult, míg másik részében a policisztás ovárium szindróma haemorheológiai hatásait kívántuk vizsgálni, patkánymodellben.

2. CÉLKITŰZÉS

1. Célul tűztük ki az egyes fajok (humán, patkány, kutya és sertés) fiziológias haematocrit mellett mért aggregációjának összehasonlítását.
2. A kérdéskört tovább vizsgálva célunk volt különböző mérőmódszerek segítségével meghatározható aggregációs paraméterek (statikus és kinetikus) összehasonlítása különböző haematocrit értékre beállított vérmintákat alkalmazva, és azok fajok közötti különbségeinek feltárása.
3. Kérdésként merült fel, hogy mely paraméterek lehetnek hasznosak az aggregációhoz „optimális” haematocrit tartomány meghatározásához, és hogy ezen értékek fajok között mutatnak-e diverzitást.
4. Célunk volt egy haemorheológiai vizsgálatokhoz alkalmazható PCOS patkány modell beállítása.
5. A beállított modellen egy átfogó haematológiai és haemorheológiai vizsgálat elvégzése, kifejezetten a PCOS vörösvérsejt aggregációra kifejtett hatásának vizsgálata.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Vörösvérsejt aggregatio meghatározása különböző haematocrit értékekre beállított vörösvérsejt-autológ plazma szuszpenziókban, négy faj vonatkozásában

3.1.1. Kísérleti állatok és humán mintavétel

Az állatkísérletet a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (DEMÁB) regisztrálta az állatkísérletekről szóló EU-irányelv (63/2010 EU-irányelv) és a magyar állatvédelmi törvény (1998. évi XXVIII. törvény „Az állatok védelméről és kíméletéről”) figyelembevételével (engedély regisztrációs számok: 13/2014/DEMÁB; 7/2014/DEMÁB; 24/2016/DEMÁB). A humán vérmintákat önkéntesektől kaptuk, méréseinket a Debreceni Egyetem Regionális Kutatásetikai Bizottság engedélyével végeztük (engedély szám: DE-RKEB 3189-2010).

A vérmintáinkat 6 Wistar hím patkányból (testtömeg: 353 ± 80 g; kor: 6 hónap; érzéstelenítés: 60 mg/kg thiopenthal [Tiobarbital Braun 1g; B. Braun, Melsungen, Németország], intraperitonealisan; mintavételi hely: vena cava caudalis); 6 hím Beagle kutyából (testtömeg: $18,05 \pm 2,05$ kg; kor: 3 év; érzéstelenítés: 10 mg/kg ketamin [CP-Ketamin hidroklorid 10%, Produlab Pharma BV, Hollandia] + 1 mg/kg xilazin [CP-Xylazin-hidroklorid, 2%; Produlab Pharma BV, Hollandia] + 0,25 mg/kg diazepam (Seduxen, 0,5%, Richter Gedeon Nyrt., intramuscularisan; mintavételi hely: vena cephalica); és 7 Hungahib-39 nőtény sertésből (testtömeg: $15,26 \pm 1,02$ kg; kor: 3 hónap; érzéstelenítés: 15 mg/kg ketamin + 1 mg/kg xilazin, intramuscularisan; mintavételi hely: vena saphena) vettük, K3-EDTA-t tartalmazó vérvételi csövekbe (1,8 mg/mL; BD Vacutainer® Becton, Dickinson and Company, USA).

Humán vérmintáinkat 7 egészséges, férfi önkéntes szolgáltatatta (átlagéletkor: 29 ± 6 év). A vérvétel a vena mediana cubiti punctiojával történt, zárt vérvételi rendszerben, 21G átmérőjű tű használatával, K3-EDTA tartalmú vérvételi csövekbe. A laboratóriumi méréseket a vérvételtől számított 4 órán belül végeztük el.

3.1.2. Minta előkészítés

A vérmintákat centrifugáltuk (3000 rpm, 10 perc), a plazmát félretettük, és a „buffy coat” -ot eltávolítottuk. Ezt követően a vörösvérsejt-szuszpenziót PBS oldattal 1:1 arányban hígítottuk. Ismét centrifugáltuk (3000 rpm, 10 perc), majd eltávolítottuk a felülúszót, és ezt a mosási lépést még egyszer megismételtük.

Meghatároztuk a vörösvérsejt szuszpenzió haematocrit értékét (Sysmex F-800 és Sysmex K-4500, TOA Medical Electronics Corp. Ltd., Japán), és ennek ismeretében elkészítettük a 20, 40, 60%-os vörösvérsejt-autológ plazma szuszpenzióinkat.

3.1.3. Vörösvérsejt aggregatio meghatározása

3.1.3.1. Vörösvérsejt aggregatio meghatározása fény-transzmissziós elven

A fény-transzmisszió alapuló mérőmódszerek közül a Myrenne MA-1 aggregometert alkalmaztuk (Myrenne GmbH, Németország). A méréshez 20 μL antikoagulált vérre van szükség, amelyet egy 2° -os szögben csiszolt, rotor segítségével forgatható üveglencsére viszünk fel. A készülék fedelét lecsukva egy üveg lemez elteríti a mintát az üveglencsén, majd a lencse forgó mozgásával 500 s^{-1} sebesség-grádiens generál, amivel az esetlegesen jelenlevő aggregátumok disaggregálódnak. Ezt követően a készülék négy aggregációs index paraméter meghatározására képes, ezek az M 5sec, M1 5sec, M 10sec és M1 10sec paraméterek. Az M 5 sec és M 10sec esetében a disaggregációt követően a lencse forgása teljesen megáll (stasis), és ebben az állapotban méri az áteresztett fény intenzitását az aggregációs folyamat 5., illetve 10. másodpercében. Az M1 5sec és M1 10sec paraméterek esetén a lencse mozgása nem áll meg teljesen, csak lelassul (3 s^{-1}). A transzmittált fény intenzitását a lencse alatt található infravörös detektor méri. A fényforrás a készülék fedelében, az üveglemez mögött található. A készülék nem temperált, a méréseket szobahőmérsékleten ($22\text{--}25\text{ }^\circ\text{C}$) végeztük. Minden paraméter esetében 4 mérés történt, ezek átlagával dolgoztunk tovább.

3.1.3.2. Vörösvérsejt aggregatio meghatározása fény-reflektancián alapuló módszerrel

Fény-reflektancián alapuló méréseinket a LoRRca MaxSis Osmoscan ektacytometerrel végeztük (Mechatronics BV, Hollandia). A Myrenne MA-1 aggregometerrel ellentétben, 700-1000 μL antikoagulált teljes vérre van szükség a méréshez. A készülék Couette-rendszerben mér, ami egy statikus hengerből (bob) és egy forgatható hengerköpenyből (cup) áll. A vérmintát a két henger között található 0,3 mm-es résbe juttatjuk be. A mérés első fázisa ebben az esetben is a disaggregatio, amit a hengerköpeny forgatásával generált sebesség-grádiens (600 s^{-1}) segítségével érünk el, majd a készülék 120 mp-en keresztül rögzíti a visszavert fény intenzitásában bekövetkező változásokat. A fényforrás (670 nm) és a detektor is a bobba beépítve található. A LoRRca készülék nem csak az aggregatio korai, gyors fázisáról (rouleaux képződés, 5-15mp), hanem a teljes aggregációs folyamatról szolgáltat adatokat. A mérés során kapott adatokból több paramétert is kiszámol a készülék, ezek az aggregációs index (AI, [%]), az amplitúdó (Amp, [au]), és a fél-amplitúdó idő ($t_{1/2}$, [s]).

3.1.4. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéseket a SigmaStat program segítségével végeztük (Systat Software Inc., San Jose, California, USA). Az adatok eloszlásától függően Student t-próbát, Mann-Whitney és ANOVA tesztekkel használtunk. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értékeket tekintettük.

Az adatok $\text{átlag} \pm \text{S.D.}$, valamint box and whiskers formában ábráztuk. Utóbbi tartalmazza a mediánt, 25% és 75% percentiliseket, valamint a hibasávok jelzik a maximum és minimum értékeket.

3.2.Policisztás ovárium szindróma hatása a micro-rheológiai paraméterekre

3.2.1. Kísérleti állatok, kezelési és mintavételi protokoll

A szükséges engedélyek birtokában (engedély regisztrációs száma: 17/2019/DEMÁB) a kutatásba 18 Wistar, 3 hónapos, nőstény patkányt vontunk be. Az állatokat véletlenszerűen két csoportba osztottuk ($n=9/\text{csoport}$), így kontroll csoportra (testtömeg: $291,6 \pm 20,6\text{g}$) és a PCOS csoportra (testtömeg: $264,5 \pm 25,1\text{g}$). A kontroll csoport semmilyen kezelésben nem részesült. A PCOS csoport, az alap vérvételt követően, 4 mg/állat ösztradiol-valerátot (Estradiol valerate, Y0000046, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) kapott 0,5 mL szezám olajban oldva (Sesame oil, S3547, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), subcutan injekció formájában. Vérvételek történtek a kezelés előtt, majd azt követően havonta, a laterális farokvéna punctiojával, 26G-s kanül (Becton, Dickinson and Company, USA) használatával, K3-EDTA tartalmú csövekbe, altatásban, ketamin-xilazine-atropin keverékével (100 mg/kg, CP-Ketamin hidroklorid 10%, Produlab Pharma BV, Hollandia; 10 mg/kg, CP-Xylazin-hidroklorid, 2%; Produlab Pharma BV, Hollandia 0.05 mg/ttkg, atropinum sulfuricum 0.1%, Egis Pharmaceuticals PLC, Budapest, Magyarország).

3.2.2. Oestrus ciklus meghatározás

Az állatok oestrus ciklusának ellenőrzését hüvelykenetek mikroszkópos vizsgálatával végeztük. A kísérlet megkezdése előtt, majd havonta, 5 egymást követő napon vettünk az állatoktól mintát lavage technikával, szűrős pipettahegyet és 250-500 μL desztillált vizet használva. A keneteket egy éjszakán át, szobahőmérsékleten szárítottuk, majd módosított Giemsa protokoll szerint festettük. A keneteket metanolban (Methanol Technical, 20903, VWR International, USA) fél percig fixáltuk, majd Giemsa festékkel (PanReac AppliChem Giemsa's Azur-Eosin-Methylene Blue solution, 251338, ITW Reagents) 1 percig festettük, desztillált vízzel mostuk, és egy éjszakán át szobahőmérsékleten szárítottuk. A kiértékelés fénymikroszkóppal (Nikon Eclipse E200, Nikon Europe BV, Hollandia) történt.

3.2.3. Laboratóriumi mérések

3.2.3.1. Testtömeg és vércukorszint meghatározás

Hetente mértük az állatok testtömegét, és vércukorszintjét (AccuCheck Active vércukormérő, Roche Diabetes Care GmbH, Németország). A kísérlet 120. napján orális glükóz tolerancia tesztet (OGTT) végeztünk, az alábbiak szerint: 12 órás éheztetés után 2 g/ttkg glükózt 1,5 ml desztillált vízben oldottunk, és gavage technikával megettettük az állatokkal. A vércukorszintet (mmol/L) 6 különböző időpontban (a glükóz beadása előtt és 15, 30, 60, 90, 120 perccel azután) mértük.

3.2.3.2. Haematologiai paraméterek meghatározása

A kvantitatív és kvalitatív haematologiai paramétereket a Sysmex K-4500 haematologiai automatával határoztuk meg. A készülék apertura-impedancia elven határozza meg a fehérvérsejtszámot (Fvs, [$\times 10^9/L$]), vörösvérsejtszámot (Vvs, [$\times 10^{12}/L$]) és a thrombocyta számot (Thr, [$\times 10^9/L$]), míg spektrofotometriás elven méri a hemoglobin tartalmat (Hgb, [g/dL]). Ezen mért adatokból kalkulálja ki 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]) értékeket. A mérésekhez 80 μ L antikoagulált vérre van szükség.

3.2.3.3. Haemorheologiai paraméterek meghatározása

A vörösvérsejt aggregatio méréseket a 3.1.3.1. fejezetben leírt Myrenne MA-1 aggregometerrel végeztük.

A vörösvérsejt deformabilitást a LoRRca MaxSis Osmoscan ektacytometer segítségével mértük. A méréshez 10 μ L teljes vért szuszpendálunk 2 mL PVP oldatban (Polyvinylpyrrolidone: 360 kDa Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, pH=7,0-7,2; ozmolalitás: 294-295 mOsm/kg; viszkozitás=25.2-28.0 mPas). A 3.1.3.2. fejezetben ismertetett Couette

rendszerbe juttatjuk be a szuszpenziót, majd a cup forgásával 0,3-30 Pa nyírófeszültséget fejtünk ki a mintára. A mérés során a készülék a mintát átvilágítja a 670nm-es lézertérnyel, a keletkező diffrakciós mintázatokat CCD kamera rögzíti. A diffrakciós képek szélességéből (W) és hosszából (L) számolja a szoftver az elongációs indexet (EI), ami a deformabilitást leíró dimenzió nélküli érték, az $(L-W) / (L+W)$ képlet segítségével. A deformabilitás mérés során a kapott EI értékeket az alkalmazott nyírófeszültség (SS, shear stress, [Pa]) függvényében ábrázoljuk. A kapott görbe parametrizálásával több más paraméter is meghatározható, ilyen a maximális elongációs index (EI_{max}), az ennek feléhez tartozó nyírófeszültség ($SS_{1/2}$, [Pa]), és ezen két paraméter hányadosa ($EI_{max}/SS_{1/2}$). A parametrizáláshoz a Linewaver-Burke egyenletet használjuk, ami $1/EI = SS_{1/2} / EI_{max} \times 1/SS + 1/ EI_{max}$.

3.2.3.4. Hormonszint mérések

A PCOS kialakulásának igazolására ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) módszerrel hormonméréseket végeztünk (LH, FSH, tesztoszteron, IBL International GmbH, Németország). Az LH és FSH szint meghatározása szilárd fázisú szendvics ELISA-t használtunk, ahol a 96 lyukú mikrolemez felületén anti-LH, illetve anti-FSH antitestek találhatók. A mintákat torma-peroxidáz enzimmel konjugált antitestekkel inkubáltuk 30 percig, majd lemostuk a nem kötődött konjugátumokat, és hozzáadtuk a szubsztátot a reakcióhoz. A tesztoszteron mérések kompetitív ELISA módszerrel történtek. Az ismeretlen tesztoszteron koncentrációjú minták és meghatározott mennyiségű, enzimmel jelölt antigénnel „versengtek” a lyukak felületén található antitestek kötőhelyeiért. Egy óra inkubáció után a lemezt mostuk, leállítva ezzel a reakciót, majd hozzáadtuk a szubsztátot. Mindkét módszer végén, a színintenzitást ELISA microplate olvasó készülék (Tecan Infinite M200, Tecan Trading AG, Svájc) segítségével mértük, majd a standard görbénket használva kiszámítottuk az egyes minták hormon koncentrációját.

3.2.4. Szövettani vizsgálatok

A kísérlet végén, a petefészkeken szövettani vizsgálatot végeztünk. Az állatokat háromszoros dózis altató (300 mg/ttkg, ketamin-hidroklorid 10%; 30 mg/ttkg, xilazin-hidroklorid) beadását követően termináltuk. A petefészkeket 10%-os neutrális formaldehidben fixáltuk (Leica Biosystems Inc., Leica Lane Buffalo Grove, IL, USA), majd paraffinba ágyztuk. 6 µm-es szeleteket készítettünk, és hematoxilin-eozin festéssel festettük (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). A tüszők, a sárgatestek és a cisztás tüszők számát minden patkány petefészkében 10x nagyítás mellett határoztuk meg.

3.2.5. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéseket a SigmaStat program segítségével végeztük (Systat Software Inc., San Jose, California, USA). Az adatok eloszlásától függően csoportokon belül páros t-tesztet és Wilcoxon tesztet, csoportok közötti összehasonlításhoz Student-féle t-próbát és Mann-Whitney tesztet használtunk. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értékeket tekintettük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Vörösvérsejt aggregatio meghatározása különböző haematocrit értékekre beállított vörösvérsejt-autológ plazma szuszpenziókban, négy faj vonatkozásában

4.1.1. Haematologiai paraméterek

A minták haematologiai eredményeit vizsgálva megállapítható, hogy az elkészült szuszpenziók haematocrit értékeinek beállítása sikeres volt. A vörösvérsejtek mérete és denzitása nem változott szignifikánsan, kivéve a sertés minták esetében 40% haematocrit értéknél, ahol az MCH, és 60% haematocrit értéknél, ahol az MCHC változott.

4.1.2. Vörösvérsejt aggregatio

4.1.2.1. Vörösvérsejt aggregatio meghatározása fény-transzmissziós módszerrel

A Myrenne MA-1 aggregometerrel meghatározott négy indexparaméter közül, a stasisban, 5 másodpercnél mért, M 5s paraméterre fókuszáltunk, mivel ezen paraméternél láttuk a legszámottevőbb változásokat. Az M 5s paraméter szignifikáns fajok közötti különbségeket mutatott a natív haematocrit esetében (humán vs. patkány: $p < 0,0001$; humán vs. sertés: $p < 0,0001$; kutya vs. patkány: $p = 0,005$; kutya vs. sertés: $p = 0,0164$). A különbségek a vörösvérsejt-autológ plazma szuszpenziókban is szignifikánsak mutatkoztak 20% haematocriton (humán vs. sertés: $p = 0,0187$), 40% haematocrit mellett (humán vs. sertés: $p = 0,0006$; ember vs. patkány: $p < 0,0001$; sertés vs. patkány: $p = 0,0251$; kutya vs. patkány: $p < 0,0001$) és a 60% haematocritra állított szuszpenziókban (humán vs. patkány: $p < 0,0001$; humán vs. kutya: $p = 0,0002$; patkány vs. sertés: $p = 0,02$).

Az aggregációs index értékeket a haematocrit függvényében ábrázoltuk, az egyes pontokra illesztett, legmagasabb regressziós koefficiens adó görbék deriválásával megkaptuk az egyes indexparaméterek csúcspontjához tartozó haematocrit értékeket. Humán vérmintánál ez 43,95%, kutyánál 42,48%, sertésnél 47,63%-nak bizonyult. Patkány vérminták esetében csak az M1 10s adatokkal számíthattunk maximum pontot, ami 44,44% haematocrit értéknél volt.

4.1.2.2. Vörösvérsejt aggregatio meghatározása fény reflektancián alapuló módszerrel

Az reflektometriás módszerrel mért aggregációs index (AI [%]) szignifikáns különbségeket mutatott az egyes fajok között, natív haematocriton (humán vs. kutya: $p = 0,0351$; sertés vs. patkány: $p = 0,0207$; sertés vs. kutya $p < 0,0001$), valamint a vörösvérsejt-autológ plazma szuszpenziókban 20% haematocrit mellett (humán vs. kutya: $p = 0,0006$; patkány vs. kutya: $p < 0,0001$; kutya vs. sertés: $p = 0,0274$), 40% haematocrit értéknél (humán vs. sertés: $p = 0,0039$); humán vs patkány: $p < 0,0001$; sertés vs. patkány: $p = 0,0081$; sertés vs. kutya; $p = 0,0371$; kutya vs. patkány: $p < 0,0001$), és a 60%-os szuszpenziók esetén (humán vs. sertés: $p = 0,0002$; humán vs. patkány: $p < 0,0001$; kutya vs. patkány: $p = 0,0032$). Csak patkány adatok esetén tudtuk kiszámítani az aggregatio maximumához tartozó haematocrit értéket: 43,3% ($y = -0,0835x^2 + 7,2315x - 70,481$). A többi fajnál a görbék ennél a paraméternél nem adtak maximum pontot.

A natív haematocrittal rendelkező vérminták amplitúdója (amp [au]) fajok között szignifikánsan különbözött (humán vs. patkány: $p < 0,0001$; humán vs. kutya: $p < 0,0001$; humán vs. sertés: $p = 0,0096$; kutya vs. patkány $p < 0,0001$; vs. sertés $p < 0,0001$; patkány vs. sertés $p = 0,0423$). A patkány, kutya és sertés vörösvérsejt – autológ plazma szuszpenziók értékei 20%-os haematocrit mellett jelentősen eltértek a humán mintáktól ($p < 0,0001$, $p = 0,0024$ és $p < 0,0001$). A 40%-os szuszpenziók esetén erős szignifikáns különbségeket láttunk minden lehetséges kombinációban ($p < 0,0001$). A 60%-os szuszpenziók szignifikánsan különböztek az humán és kutya ($p < 0,0001$), humán és patkány ($p = 0,0101$), patkány és kutya ($p < 0,0001$), valamint patkány és sertés ($p = 0,0001$) között.

A teljes intenzitás változás esetében minden fajnál kiszámításra került a korábban említett csúcsponthoz tartozó haematocrit érték: 40,86% embernél ($y = -0,0287x^2 + 2,2881x - 23,641$), 39,37% patkánynál ($y = -0,0027x^2 + -0,212$). 0,0183), 44,29% kutyánál ($y = -0,0233x^2 + 2,064x - 25,884$) és 52,8% sertésnél ($y = -0,0056x^2 + 0,5921x - 4,9259$).

A natív haematocritú minták fél-amplitúdó idő ($t_{1/2}$ [s]) értékeiben szintén szignifikáns különbségeket mutattunk ki a vizsgált fajok között (humán vs. kutya: $p = 0,0025$; kutya vs. patkány: $p = 0,004$; kutya vs. sertés: $p < 0,0001$). 20%-os haematocrit mellett szignifikáns különbséget találtunk patkány és humán ($p = 0,035$), a patkány és a kutya ($p = 0,0002$) és a patkány vs. sertés ($p = 0,0001$); 40%-os mintáinkban a humán vs. sertés ($p < 0,0001$), humán vs patkány ($p < 0,0001$), patkány vs kutya ($p = 0,0015$) és kutya vs sertés ($p = 0,0268$); 60%-os haematocritnél a humán vs. sertés ($p = 0,0001$), humán vs. kutya ($p < 0,0001$), humán vs. patkány ($p < 0,0001$), a patkány vs. kutya ($p = 0,001$) és a kutya vs. sertés ($p = 0,0275$) összehasonlítások esetén. Humán, kutya és sertés mintákban a $t_{1/2}$ a haematocrit értékkel emelkedett, az aggregációs folyamat lassult. Kutya és sertés minták adataira az illesztett görbék maximum pontjait a korábban ismertetett módon azonosítottuk: 54,21% kutyáknál ($y = -0,0051x^2 + 0,5529x - 6,5992$) és 58,5% sertéseknél ($y = -0,0004x^2 + 0,0004x + 0,143$). A patkány mintákban minimum pontot tudtunk számolni, ami 46,15% ($y = 0,0234x^2 - 2,1889x + 51,847$).

4.2. Policisztás ovárium szindróma hatása a micro-rheologiai paraméterekre

4.2.1. Oestrus ciklus meghatározás

A hüvelykeneteket megvizsgálva azt találtuk, hogy a PCOS csoport oestrus ciklusa a kísérlet 90. napjától leállt pro-oestrus (77,78%) és met-oestrus (22,22%) fázisban, és nem normalizálódott, míg a kontrollok oestrus ciklusa normális maradt a kísérlet ideje alatt.

4.2.2. Laboratóriumi mérések

4.2.2.1. Testtömeg és vércukorszint meghatározás

A kontroll állatok testtömege a relatív értékeket vizsgálva szignifikánsan emelkedett az alap adatokhoz képest ($p=0,017$) a 4. hónapra. A PCOS csoportban az abszolút (120. nap vs. alap $p=0,003$) és a relatív (120. nap vs. alap $p=0,03$) értékekben is emelkedést találtunk.

Az állatok viselkedésében nem figyeltünk meg semmilyen változást. A bundájuk rendezett volt, a szemük tiszta, és nem volt látható porfirines elszíneződés. Nem láttunk különbséget a táplálék- és vízfogyasztásban a két csoport között.

A vércukorszint a PCOS csoportban folyamatosan emelkedett, a 4. hónapra szignifikánsan magasabb volt, mint a kiindulási érték ($p=0,021$).

Az OGTT alatt a kontrollcsoport és a PCOS csoport vércukorszintje is szignifikáns emelkedést mutatott 15 perccel a glükóz beadását követően az alap adatokhoz képest. A PCOS csoportban a 30. percig emelkedett a vércukorszint, majd meredek csökkenést figyeltünk meg. A kontroll csoport értékei csökkentek a 15 percnél mért csúcs után. Mindkét csoport esetében minden időpontban szignifikánsan magasabb eredményeket kaptunk, mint az alapméréseknél, azonban statisztikailag nem volt szignifikáns különbség a két csoport között.

4.2.2.2. Haematologiai paraméterek meghatározása

A PCOS csoportban a vörösvérsejt számban (120. nap vs. alap $p=0,015$, 120. nap vs. kontroll $p<0,001$), a haematocrit (120. nap vs. alap $p=0,004$, 120. nap vs. kontroll $p=0,004$) és a haemoglobin értékekben (60. nap vs. alap $p<0,001$, 60. nap vs. kontroll $p<0,001$, 120. nap vs. kontroll $p<0,001$) szignifikáns csökkenést találtunk az alapértékekhez és a kontroll csoporthoz viszonyítva. Továbbá a PCOS csoportban szignifikánsan csökkent a fehérvérsejtszám (120. nap vs. alap $p=0,03$, 90. nap vs. kontroll $p=0,041$), és szignifikánsan nőtt a thrombocytaszám (120. nap vs. alap $p<0,001$) és az MCV (90. nap vs. kontroll $p=0,006$, 30. nap vs. alap $p=0,015$, vs. kontroll $p=0,017$). Az MCH értékekben (90. nap vs. alap $p<0,001$, vs. kontroll $p=0,006$, 120. nap vs. alap $p=0,002$; 30. nap vs. kontroll $p=0,02$), szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető a PCOS csoportban a kezdeti csökkenés után. Folyamatos növekedés volt tapasztalható az MCHC-értékekben (60. nap vs. alap $p<0,001$, 90. nap vs. alap $p=0,003$, 120. nap vs. alap $p=0,001$).

4.2.2.3. Haemorheologiai paraméterek meghatározása

A 3 Pa-nál mért elongációs index (EI 3Pa) értékek emelkedtek a 60. (vs. alap $p=0,047$) és a 90. napra (vs. alap $p<0,001$) a PCOS csoportban. Az EI_{max} esetében szignifikáns emelkedést figyeltünk meg a PCOS csoportban (120. nap vs. alap $p=0,035$). Az SS^{1/2} értékek szignifikánsan csökkentek a 90. napon (vs. alap $p<0,001$, vs. kontroll $p<0,001$) és a 120. napon (vs. alap $p<0,001$). A 90. napon (vs. alap $p<0,001$) és 120. napon (vs. alap $p<0,001$) az EI_{max}/SS ^{1/2} arány szignifikánsan megemelkedett.

Az M 5s (120. nap vs. alap $p<0,001$, 120. nap vs. kontroll $p=0,004$) és M1 5s index paraméterekben (120. nap vs. alap $p<0,001$, 120. nap vs. kontroll $p=0,015$) a PCOS csoportban jelentős, folyamatos növekedés volt megfigyelhető. Az M 10s (120. nap vs. alap $p=0,005$) és M1 10s (120. nap vs. alap $p<0,001$) paraméterekben szintén növekedés volt tapasztalható, az első két hónapban, de ezt követően ezen paraméterek értékei csökkentek, és a két csoport között ekkor már nem volt statisztikailag szignifikáns különbség.

4.2.2.4. Hormonszint mérések

Az FSH szintekben egyik csoportban sem találtunk szignifikáns különbséget, sem saját alapértékeikhez, sem egymás értékeihez viszonyítva. Az LH értékek szignifikánsan megemelkedtek a PCOS csoportban a 120. napra az alapértékekhez képest ($p=0,036$). A tesztoszteronszint mindkét csoportban emelkedett.

4.2.2.5. Szövettani vizsgálatok

A PCOS csoport esetében az ovarium és az uterus makroszkópos eltéréseket mutatott: nagy petefészkek, a felszíni rétegen keresztül is jól látható cisztás tüszőkkel, a méh megnagyobbodott és ödémás volt.

A petefészkek szövettani vizsgálata policisztás elváltozásokat mutatott a PCOS csoportban, míg a kontroll csoport normális petefészkek szerkezettel rendelkezett. A PCOS csoportban sok cisztás tüsző volt, csökkent a sárgatestek száma, és szignifikánsan csökkent az ép folliculusok száma. A kontroll csoport petefészkeiben több elsődleges, másodlagos és antrális folliculus volt látható.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Vörösvérsejt aggregatio meghatározása különböző haematocrit értékekre beállított vörösvérsejt-autológ plazma szuszpenziókban, négy faj vonatkozásában

A vörösvérsejt aggregatio pontos folyamata és mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, azonban jól ismertek a plazmatikus és sejtszintű befolyásoló tényezők. A fő befolyásoló tényezők közé sorolhatjuk a plazmafehérjéket, mint a fibrinogén, az immunglobulinok vagy a transferrin. A fibrinogént tekintjük a legfontosabb plazmafehérjének a vörösvérsejt aggregatio létrejötte során, ez egy pozitív akut fázis protein, így szintje megemelkedik gyulladásokban vagy szív- és érrendszeri betegségek során, ami magyarázza az aggregatio emelkedését inflammatorikus folyamatokban. Az aggregatio mértékét az egymás ellen ható aggregációs (aggregatiót támogató) és disaggregációs (aggregatio ellen ható) erők együttesen határozzák meg. Utóbbiak közé sorolható a nyíróerő, a vörösvérsejtek felszíni töltése és a membrán tulajdonságai, mint a glycocalyx összetétele és a rigiditás mértéke. A sejtek alakja, mérete, és nem utolsósorban a száma (haematocrit) is jelentős szerepet játszik a folyamat során.

A haemorheológiai paraméterek közül az aggregatio mutatja a legnagyobb faji diverzitást. Ennek hátterében számos tényező áll. Ide tartoznak a különböző fajok vörösvérsejtjeinek alaki és méretbeli eltérései, a fibrinogén kötődésének jellegzetességei, az adott állatfajra jellemző haemodinamikai és érgeometriai tulajdonságok, a táplálkozásuk, életmódjuk, valamint a vörösvérsejtek glycolcalyx összetételében található különbségek. Különbségeket találunk az egyes fajok normál fibrinogén szintjében is (humán: 150-300 mg/dl, CD patkány: 128-153 mg/dl; beagle kutya: 177-229 mg/dL; sertés: 213 –273 mg/dl). Ezek a különbségek az aggregatio diverzitását is okozhatják, mivel a fibrinogén szint befolyásolja az aggregatio mértékét. Windberger és mtsai (2003) „referencia tartományokat” állítottak fel a Myrenne stasisban mért aggregációs index értékeihez, különböző fajok 40% haematocrit értékre

beállított vérmintáit vizsgálva. Ez patkányoknál 0,3–1,2; kutyáknál 2,7–4; sertéseknél 2,2–4,6. A 40%-os szuszpenzióinknál kapott aggregációs index értékek átlaga minden esetben ezekbe az intervallumokba esett.

A táplálkozás is kiemelt szerepet játszik a haemoreologiai paraméterek értékeiben. A magas koleszterinszint nem csak közvetlen hatással van a szív- és érrendszerre, hanem közvetett hatásként a teljes vér viszkozitást is növelheti. A viszkozitás exponenciális kapcsolatban áll a haematocrit értékkel. A haematocrit/viszkozitás arány fajonként eltérő, ez az arány a haematocrittal emelkedik, de egy „optimális” haematocrit érték után (ami a maximális oxigénszállítási kapacitás haematocrit értéke) csökkenés következik be. A megnövekedett teljes vér viszkozitása következtében a haematocrit/viszkozitás arány csökken, ezáltal csökken a vér oxigénszállító képessége. A natív haematocritú patkány mintákban magasabb, mint a kutyamintákban. Ez az „optimális” érték az alkalmazott nyírófeszültségtől függ. A leggyakrabban alkalmazott nyírófeszültségnél (90 s^{-1}) a haematocrit/viszkozitás arány maximuma patkányban 36,5% Hct, kutyában 39,7%.

Korábbi tanulmányok megállapították, hogy a haematocrit jelentősen befolyásolja az aggregációt, de ez a kapcsolat nem lineáris. A Myrenne MA-1 aggregométerrel kapott M 5 s index paraméterben a vizsgált 20%-os haematocrittal rendelkező mintákban csökkenést tapasztaltunk a teljes vérhez képest minden faj esetében. A humán, kutya és sertés adatokban egyfajta „csúcspont” volt megfigyelhető, amelyet az aggregációs index csökkenése követett. Deng és mtsai (1994) humán mintákat vizsgálva ezt a csúcsot 40–42% haematocrit körül találták, tanulmányunkban ez a számított csúcserték az M5s indexparaméter esetén emberben, kutyában és sertésben közel 40% haematocrit volt. Ez a csúcspont patkány mintáinkban csak az M1 10 s paraméternél volt megfigyelhető. Ez arra utal, hogy a patkány aggregatio a folyamat első 5–10 másodperce között megy végbe.

A fent említetteket a LoRRca készülékkel mért aggregációs index értékek is megerősítik, mivel ez a paraméter az aggregációs folyamat első 10 másodpercében lezajló fényintenzitás változását reprezentálja, és ennél a paraméternél csak a patkányvér mutatta a „csúcspontot” (43,3%). A 20%-os haematocritú szuszpenziókban a kutyaminták értékei szignifikánsan magasabbak voltak, 40-60%-ban a patkány és az emberi minták eredményei szignifikánsan különböztek a többi fajtól.

A fény-reflektancián alapuló mérések során a humán, kutya és sertés minták nem mutatták a fent említett „csúcspontot”. Ezek esetében a 20%-os szuszpenziók aggregációs indexei magasabbak voltak, mint a 40%-os mintáké. Emellett a $t_{1/2}$ folyamatosan emelkedett, az aggregációs folyamat a haematocrit emelkedésével lelassult. A legnagyobb növekedést a humán mintákban találtuk, ebből arra lehet következtetni, hogy a vizsgált fajok közül az emberi vörösvérsejtek aggregációs képessége a legérzékenyebb a haematocrit változására.

Az általunk leírt „optimális” haematocrit értékek nem egyeznek meg a Hct/viszkozitás arány optimális értékével. Nem csak jelentésben van különbség, hiszen a Hct/viszkozitás arány optimuma a görbe azon pontja, ahol a lehető legmagasabb haematocrit érték a lehető legalacsonyabb viszkozitás értékkel párosul adott sebesség grádiens mellett, míg a tanulmányunkban leírt csúcs az aggregatio csúcsát jelzi; de vannak értékbeli különbségek is. A korábban említett maximális aggregációhoz tartozó Hct-értékek patkányokban és kutyában minden paraméter esetén magasabbak, mint a korábbi vizsgálatokban leírt Hct/viszkozitás arány optimális értékei. A fokozott aggregatio elősegíti a plazma-skimming kialakulását a kapillárisokban, ami azt jelenti, hogy a vörösvérsejtek száma csökken az érlumenben. Ennek eredményeként csökken a szövetek vérellátása, ezáltal csökken az oxigénszállításuk. Ez lehet az oka annak, hogy a maximális oxigénszállítási kapacitás Hct értéke alacsonyabb, mint az aggregációs maximum Hct értéke. Ez arra utal, hogy a szövetek megfelelő vérellátása csak

akkor biztosítható, ha a vörösvérsejt-aggregatio nem éri el a maximális szintet. A túlzott aggregatio ronthatja az oxigénellátást.

Korábbi vizsgálatokban kimutatták, hogy a patkányok $t_{1/2}$ értéke ötször alacsonyabb, mint a sertések és tízszer alacsonyabb, mint a kutyák esetében. Vizsgálatunkban a kutyák natív haematocritú mintáinak $t_{1/2}$ értékei is szignifikánsan magasabbak voltak, mint a humán, patkány és sertés vérminták esetében (kutya > patkány > sertés > ember). A normál, natív haematocrit esetén a kutya vörösvérsejtjeinek aggregációja a leglassabb, az emberi vérsejteké pedig a leggyorsabb. A kutyák natív haematocriton mért értékeinek átlaga szignifikánsan magasabb, mint a többi fajé, valamint a kutyák AI értékei a legalacsonyabbak. Ez a jelenség a haematocrit és az aggregatio nem-lineáris kapcsolatával magyarázható.

Az aggregációs folyamat felgyorsulása patkány mintáinkban a középső Hct tartományban volt megfigyelhető. A fél-amplitúdó idő értékei csökkentek, amint azt Deng és mtsai (1994) is leírták. Ugyanakkor a $t_{1/2}$ minimumához tartozó AI volt a legmagasabb, így a patkány vörösvérsejtek aggregációjának jelentős része a folyamat első 10 másodpercében zajlik le. A különböző mérőmódszerek sajátosságai (fény-transzmisszió, illetve fény-reflektancián alapuló módszerek, statikus-kinetikai paraméterek) magyarázhatják ezeket a különbségeket.

Az amplitúdó tekintetében Deng és mtsai a 40%-os mintákban találták a legmagasabb értékeket. Vizsgálatunk egyértelműen azt mutatja, hogy a legnagyobb fényintenzitás változás a 40-50%-os Hct tartományban van, azonban ez fajonként eltérő. A legalacsonyabb értékeket patkányokban mértük, majd ezt a sertés-, ember- és kutyaminták követték. Ebből következik, hogy a patkányvér aggregálódik legkevésbé, amint azt korábbi összehasonlító vizsgálatok is mutatták. A teljes vér esetén a legalacsonyabb Amp értékeket patkányban találták, amit vizsgálatunk is megerősített.

Vizsgálatunk limitáló tényezői az alacsony esetszám és a módszertani adottságok (pl. minta-előkészítés, mérési módszerek, műszerspecifikációk). Ezek az adatok azonban kiegészítő információk értékkel bírhatnak, és ez által jobban feltárhatjuk a fajok közötti haemorheológiai különbségeket és a vörösvérsejtek aggregációs tulajdonságait változó haematocrit értékek mellett.

5.2. Policisztás ovárium szindróma hatása a micro-rheológiai paraméterekre

A policisztás ovárium szindróma (PCOS) etiológiája még nem teljeskörűen tisztázott, azonban közismert, hogy a PCOS a fogamzóképes nők egyik leggyakoribb endokrinológiai betegsége. A PCOS számos hatással van a vérkeringésre, megemeli plazma viszkozitást, ami egy macro-rheológiai paraméter, ezáltal hatással lesz a micro-rheológiai paraméterekre. Emellett a PCOS-t megnövekedett tesztoszteron, luteinizáló hormon (LH), éhgyomri inzulinszint, magasabb triglicerid- és fibrinogén koncentráció jellemzi. A fibrinogén szint pozitív korrelációt mutat a plazmaviszkozitással. A megnövekedett plazma viszkozitás növeli a teljes vér viszkozitását, és ez ronthatja a véráramlást. Simmonds és mtsai fokozott vörösvérsejt-aggregációt, teljes vér- és plazma viszkozitást, csökkent haematocritot és változatlan vörösvérsejt-deformabilitást írtak le PCOS-ben szenvedő nőknél, összehasonlítva a korban egyeztetett egészséges kontrollokkal.

A fő terápiás célok a menstruációs ciklus regularitásának helyreállítása, az infertilitás kezelése és a szénhidrátháztartás stabilizálása. A meddőségi kezelések közé tartoznak a progeszteronterápia és a klomiphén-citrát. Az inzulin-rezisztencia és a II-es típusú diabetes esetén a leggyakrabban metformin terápiát alkalmaznak. Az elmúlt években a különböző inozitol származékok, amelyek kulcsszerepet töltenek be az inzulin jelátviteli folyamatokban, mint másodlagos hírvivők, általános gyógyszerre váltak az inzulin-rezisztencia kezelésében. Ezenkívül a különböző inozitol izoformák hatással vannak az ovulációra, ezáltal segíthetnek a meddőség kezelésében.

Ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre az ösztradiol-valerát (EV) glükóz metabolizmusra gyakorolt hatásáról patkányokban. A kutatások emelkedett éhgyomri vércukorszintről számoltak be, vagy nem találtak különbséget a kezelt és a kontroll csoport között. Dănăsea és mtsai megemelkedett éhgyomri glükóz szintet írtak le, de orális glükóz tolerancia teszt során nem mutattak ki különbséget. Kísérletünkben folyamatosan emelkedő éhgyomri vércukorszintet tapasztaltunk a PCOS-csoportban, az OGTT mérések során azonban nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között.

A PCOS indukálására egyetlen dózisban 4mg/állat ösztradiol-valerátot kaptak az állatok 0,5 mL szezám olajban, subcutan injekció formájában. Az ösztradiol-valerát egy elnyújtott hatású ösztrogén forma, amely a gonadotropin felszabadító hormon (GnRH) regulációjának zavarát okozza a hypothalamus-hypophysis tengelyen, ami a luteinizáló hormon (LH) és folliculus stimuláló hormon (FSH) felszabadulás és/vagy tárolás elégtelenségét eredményezi. Az EV-indukált modellben a tesztoszteronszintre gyakorolt hatás dózis függő, míg 2 mg EV használatával a tesztoszteronszint emelkedik, addig 4 mg EV adásával a szabad tesztoszteron szintje többnyire csökken patkányokban, bár ez utóbbi dózissal is számoltak be emelkedett tesztoszteronszintről. Vizsgálatunkban a tesztoszteron szint mindkét csoportban emelkedett volt, de nem volt szignifikáns különbség sem a csoporton belül az egyes időpontok között, sem a kontroll és PCOS csoportok közt. Ellentmondásos adatokat találtunk az EV-kezelés LH-szintekre gyakorolt hatására vonatkozóan is. Számos tanulmányban leírták, hogy az LH-szint emelkedett az EV-indukált patkány modellben, míg mások csökkenő LH-szinteket találtak. Az ösztrogén-indukált modellekben általában az FSH-szint csökkenését mutatták ki, vagy nem találtak változást. Vizsgálatunk során az LH szintek emelkedtek a PCOS csoportban, míg az FSH szintekben egyik csoportban sem találtunk különbséget.

Az EV kezelés hatására a patkányok oestrus ciklusa zavart szenved és leáll, az állatoknál amenorrhea lép fel. Az emberi menstruációs ciklusnak két fázisa van: a folliculáris és a luteális

fázis. A folliculáris fázis a menstruáció első napján kezdődik és az ovulációig tart (1-14 nap); a luteális fázis, az ovuláció után kezdődik és 14 nappal azután ér véget (15-28 nap). Ezzel szemben patkányok ivari ciklusának négy fázisa van, ezek a pro-oestrus, az oestrus, a met-oestrus és a di-oestrus. A különböző fázisokban más és más sejttípusok kerülnek túlsúlyba a hüvelykenetekben, ez alapján lehet megállapítani, hogy egy adott pillanatban mely fázisban van a vizsgált állat. Lara és mtsai, valamint Ramadoss és mtsai megállapították, hogy a patkányok oestrus ciklusa EV kezelés hatására di-oestrus fázisban leállt. Vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a PCOS csoport oestrus ciklusa pro-oestrus (77,78%) és a met-oestrus (22,22%) fázisban állt le. A kontroll állatok ciklusa normál maradt a kísérlet végéig. Mivel a Lee-Boot hatás (hímek jelenléte nélkül a nőstény rágeszálók ciklusa leáll vagy lelassul) kizárható, így az aciklicitás a hormonkezelésnek tulajdonítható.

A nők fertilitása az életkor előrehaladtával csökken, ami a petefészkek működésében bekövetkezett változások, a petesejtek mennyiségének és minőségének csökkenése, valamint a hormonális változásoknak tulajdonítható. Ezt az úgynevezett petefészkek-öregedést patkányoknál is megfigyelték, Anzalone és mtsai arról számoltak be, hogy középkorú patkányokban kevesebb folliculus található, mint fiatal állatokban. Az általunk alkalmazott modellnél a petefészkekben megnőtt a cisztás folliculusok és a primer tüszők száma, és nem találtunk új sárgatestek, helyettük regresszív régi sárgatesteket helyezkedtek el a petefészkekben. Vizsgálatunkban a PCOS csoportban sok cisztás folliculust találtunk, csökkent a sárgatestek és az egészséges tüszők száma. Kang és mtsai (2015) modelljükben folyamatos fényt alkalmaztak a PCOS előidézésére, ők megnagyobbodott petefészkeket találtak, és szabad szemmel látható, nagy cisztákat figyeltek meg a petefészkek felszínén. Mirabolghasemi és mtsai (2017) megvizsgálták a méhszövetben létrejövő változásokat, és azt találták, hogy a lumen hámszövetének és a méhfal vastagsága a PCOS-csoportban megnövekedett. Makroszkóposan

a méh megnagyobbodott és ödémás lett, a petefészkek megnőttek, és a felszíni rétegen keresztül cisztás tüszők jelentek meg.

Kísérletünkben a vörösvérsejtszám, a haemoglobin és a haematocrit szint csökkenését, valamint az aggregációs indexek emelkedését találtuk a PCOS csoportban, ami már a kutatás első hónapjában is látható volt. A PCOS csoportban szignifikáns EI emelkedést figyeltünk meg 3 Pa-nál mért EI és az Elmax értékek esetében, ez a változás a beadott nagy mennyiségű ösztrogén hatására következhetett be. Egy *in vitro* kísérletben Farber és mtsai (2018) kimutatták, hogy az exogén ösztrogén növeli a vörösvérsejtek deformabilitását, míg a vörösvérsejt aggregációban nem találtak különbséget, azonban Brun és mtsai (2021) leírták, hogy az ösztradiol csökkenti a deformabilitást és fokozza az eryptosist. A fehérvérsejtszámban a PCOS csoportban szignifikáns csökkenést tapasztaltunk, míg a kontrollok értékei szintén csökkentek, de nem azonos mértékben. Ezekben a változásokban az állatok öregedése is szerepet játszhat. A nőstény patkányok fehérvérsejtszáma és elongációs indexe az öregedés előrehaladtával csökken, míg a vörösvérsejt aggregációs index paraméterei enyhe növekedést mutatnak.

Vizsgálatunk során PCOS-specifikus változásokat észleltünk a metabolikus paraméterekben (testtömeg-növekedés és emelkedett éhgyomri vércukorszint), a nemi ciklusban (aciklicitás) és szövettani jellemzőkben (érett tüszők hiánya, ciszták megjelenése). A hormonkezelés jelentős változásokat okozott a vizsgált periódusban a haematológiai (vörösvérsejtszám, haematocrit, haemoglobin szintek) és haemorheológiai paraméterekben. Először írtuk le a vörösvérsejt aggregatio és deformabilitás emelkedését az ösztradiol-valerát kezeléssel kiváltott PCOS során patkányokban. Eredményeink felhívják a figyelmet a micro-rheológiai vizsgálatok fontosságára a további PCOS-re irányuló kutatások során.

6. FŐBB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. Megállapítottuk, hogy a vörösvérsejt aggregatio és a haematocrit kapcsolata fajonként eltérő. Eredményeink alapján elmondható, hogy a vizsgált fajok közül a humán vörösvérsejtek aggregációs képessége a legérzékenyebb a haematocrit változására.
2. Az alacsonyabb vagy magasabb haematocrit esetén tapasztalható kisebb mértékű aggregatio nem minden vizsgált paraméterben mutatkozik meg. A legszembetűnőbb eltéréseket a fény-transzmissziós módszerrel stasisban (M5s módban) és fény-reflektancia elven meghatározott amplitúdó paraméterekkel lehetett kimutatni.
3. Elsőként állapítottuk meg az aggregatio maximumához tartozó haematocrit értékek fajok közötti (humán, patkány, kutya, sertés) eltéréseit, mind statikus, mind dinamikus aggregációs paraméterek esetében.
4. A policisztás ovárium szindróma (PCOS) állatmodelljében történő vizsgálatok során, a humán betegekben leírt jellegzetes tüneteket és elváltozásokat figyeltünk meg, mint testtömeg növekedést, emelkedett éhgyomri vércukorszintet, megszakadt oestrus ciklust, valamint az érett tüszők hiányát és nagyméretű ciszták megjelenését.
5. A vizsgált időszakban jelentős változásokat láttunk a haematologiai (vörösvérsejtszám, haematocrit és haemoglobin értékek csökkenése) és haemorheológiai paraméterekben. Először írtuk le, hogy a vörösvérsejtek aggregációja és deformabilitása fokozódott az ösztradiol-valerát által indukált PCOS során patkányokban.

7. 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/199/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bedőcs-Baráth Barbara
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Baráth, B.**, Varga, Á., Mátrai, Á. A., Pocsai, K., Németh, N., Deák, Á.: Estradiol Valerate Affects Hematological and Hemorheological Parameters in Rats.
Metabolites. 12 (7), 602, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo12070602>
IF: 5.581 (2021)
2. **Baráth, B.**, Somogyi, V., Tánccs, 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

További közlemények

3. Varga, Á., Mátrai, Á. A., **Baráth, B.**, Deák, Á., Horváth, L., Németh, N.: Interspecies Diversity of Osmotic Gradient Deformability of Red Blood Cells in Human and Seven Vertebrate Animal Species.
Cells. 11 (8), 1-15, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells11081351>
IF: 7.666 (2021)
4. Gál, K., Veres, K., Halmi, S., Bozoki-Beke, K., Fekete, K., Homoki, J., Gálné Remenyik, J., **Baráth, B.**, Varga, Á., Németh, N., Soltész, P.: The effect of rheopheresis treatment on the cytokine profile in diabetic foot syndrome with hyperviscosity in the aspect of clinical changes - a preliminary study.
Clin. Hemorheol. Microcirc. 80 (2), 117-125, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-211188>
IF: 2.411 (2021)





5. Szántó, S., Módy, T., Némethné Gyurcsik, Z., Babják, L. B., Somogyi, V., **Baráth, B.**, Varga, Á., Mátrai, Á. A., Németh, N.: Alterations of Selected Hemorheological and Metabolic Parameters Induced by Physical Activity in Untrained Men and Sportsmen. *Metabolites*. 11, 1-12, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo11120870>
IF: 5.581
6. Körei, C., Szabó, B., Varga, Á., **Baráth, B.**, Deák, Á., Ványolos, E., Hargitai, Z., Kovács, I., Németh, N., Pető, K.: Hematological, Micro-Rheological, and Metabolic Changes Modulated by Local Ischemic Pre- and Post-Conditioning in Rat Limb Ischemia-Reperfusion. *Metabolites*. 11 (11), 776, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo11110776>
IF: 5.581
7. 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
8. 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 arterio-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
9. 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
10. 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





11. 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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 42,699

**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, 2023.06.01.



8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Azért, hogy ez a disszertáció elkészülhetett, sokaknak tartozom köszönettel.

Elsősorban szeretném megköszönni Témavezetőmnek, **Dr. Deák Ádám** adjunktus Úrnak, aki már alap- és mesterképzésem alatt itt folytatott TDK munkám során is segített, támogatott és biztosította a jó hangulatot. A későbbiekben, PhD tanulmányaim megkezdése előtt és közben is bármikor fordulhattam hozzá, mindig nyitott volt az új ötletekre, így olyan kutatás lehetett alapja a disszertációmnak, amit tényleg teljes szívvel-lélekkel tudtam véghez vinni.

Köszönetem szeretném kifejezni **Prof. Dr. Németh Norbert** tanszékvezető Úrnak, aki évekkel ezelőtt megszerettette velem a haemorheológiát, TDK hallgatóként elindított és végig támogatott azon az úton, ami ehhez az értekezéshez vezetett.

Szeretném megköszönni **Prof. Dr. Mikó Irénnek** és **Prof. Dr. Furka Istvánnak** (1935-2021), hogy tanulhattam tőlük.

Nagyon köszönöm a temérdek segítséget, és őszinte barátságát **Dr. Somogyi Viktóriának**, aki bevezetett a laboratóriumi mérések rejtelseibe.

Szeretném megköszönni támogatását, segítségét, barátságát, a sok laborban töltött órát **Dr. Tánczos Bencének**, **Varga Ádámnak** és **Mátrai Ádámnak**, nélkülük nem sikerült volna eljutnom idáig.

Hatalmas köszönet illeti a Sebészeti Műtéttani Tanszék minden korábbi és jelenlegi munkatársát, aki közvetlenül, vagy közvetve segítségemre volt a PhD tanulmányaim alatt.

Köszönöm **Haramura Gizellának**, a Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék vezető laboratóriumi analitikusának, az ELISA mérésekhez nyújtott szakmai segítségét.

A szövettani vizsgálatok kivitelezésében nyújtott segítségéért hálával tartozom **Dr. Deák-Pocsai Krisztinának**.

Kiemelt köszönet illeti családtagjaimat, testvéreimet, de legfőképpen ***Szüleimet***, akik mindig teljes válszélességgel mellettem álltak, támogattak eddigi tanulmányaim során.

Köszönöm a kitartását, hogy mindig meghallgatott és ha kellett meg is nyugtatott, legjobb barátnőmnek, ***Csemer Andreának***.

Hatalmas köszönetet érdemel ***Férjem***, aki az elmúlt években a legnagyobb támaszom volt, aki egyetlen szóval képes megnyugtatni és meggyőzni, hogy nem adhatom fel.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni mindazoknak, akik kételkedtek bennem, és nem hitték, hogy sikerülni fog, ők voltak a legnagyobb motiválóim.