

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Micro-rheologiai mérés technikai összehasonlító  
vizsgálatok különös tekintettel a vörösvérsejt  
membránstabilitására**

**Somogyi Viktória**

**Témavezető: Dr. Németh Norbert**



**DEBRECENI EGYETEM  
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA  
Debrecen, 2018**

# Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK .....	3
1. BEVEZETÉS .....	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	6
2.1. Haemorheológiai paraméterek.....	6
2.1.1. Vörösvérsejt deformabilitás .....	7
2.1.1.1. Vörösvérsejt membránstabilitás .....	7
2.1.1.2. Ozmotikus gradiens ektacytometria.....	8
2.1.1.3. A vörösvérsejt deformabilitás meghatározása .....	10
2.1.2. Vörösvérsejt aggregatio .....	10
2.1.2.1. Vörösvérsejt aggregatio meghatározása.....	12
2.2. Nemi és korfüggő haemorheológiai különbségek vizsgálata.....	12
3. CÉLKITŰZÉS .....	14
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	15
4.1. Membránstabilitás és osmoscan vizsgálatok különböző nyírófeszültség és időtartam kombinációk alkalmazása mellett.....	15
4.1.1. Kísérleti állatok és humán mintavétel .....	15
4.1.2. Haematológiai paraméterek meghatározása .....	15
4.1.3. Haemorheológiai paraméterek meghatározása.....	16
4.1.3.1. A vörösvérsejt deformabilitás és membránstabilitás meghatározása .....	16
4.1.3.2. Az ozmotikus gradiens ektacytometria meghatározása.....	18
4.1.4. Statisztikai analízis.....	19
4.2. Micro-rheológiai paraméterek nemi és korfüggő vizsgálatai .....	20
4.2.1. Kísérleti állatok és mintavételi protokoll .....	20
4.2.2. Haematológiai paraméterek vizsgálata.....	22
4.2.3. Haemorheológiai paraméterek vizsgálata .....	22
4.2.3.1. A vörösvérsejt aggregatio meghatározása fénytranszmissziós elven .....	22
4.2.4. Statisztikai analízis.....	23
5. EREDMÉNYEK .....	24
5.1. Osmoscan és membránstabilitás vizsgálatok különböző nyírófeszültség és időtartam kombinációk mellett .....	24
5.1.1. Haematológia és deformabilitási paraméterek leírása .....	24
5.1.2. Vörösvérsejt membránstabilitás .....	25
5.1.3. A vörösvérsejt membránstabilitási adatok ozmolalitás függő változásai .....	34
5.2. A haematológiai és haemorheológiai paraméterek nemi és korfüggő vizsgálatai .....	38
5.2.1. Testtömeg változások és az oestrus ciklus .....	38
5.2.2. Haematológiai paraméterek.....	39
5.2.3. Haemorheológiai paraméterek .....	42

5.2.3.1. A vörösvérsejt aggregatio .....	42
5.2.3.2. Vörösvérsejt deformabilitás, sejt membrán stabilitás (normál és ozmotikus grádiens ektacytometria).....	43
6. MEGBESZÉLÉS .....	47
6.1. Membránstabilitás és osmoscan vizsgálatok különböző nyírófeszültség és időtartam kombinációk mellett .....	47
6.2. Nemi és korfüggő haemorheologiai paraméterek .....	50
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	54
9. SUMMARY .....	55
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	56
10.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke.....	56
10.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények hitelesített listája.....	62
11. TÁRGYSZAVAK.....	65
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	66
13. FÜGGELÉK .....	67

## **RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK**

Vvs	vörösvérsejt
Fvs	fehérvérsejt
Hgb	haemoglobin
Thr	thrombocyta szám
Hct	haematocrit
MCV	átlagos vörösvérsejt térfogat (mean corpuscular volume)
MCH	átlagos vörösvérsejt haemoglobin tartalom (mean corpuscular hemoglobin)
MCHC	átlagos vörösvérsejt haemoglobin koncentráció (mean corpuscular hemoglobin concentration)
PVP	polyvinyl-pyrrolidon
EI	elongációs index
SS	nyírófeszültség (shear stress)

*„A vér minden emberinek a lényege.  
A vér a lélek, maga az élet.  
És ahogy szent az élet, a vér is az.  
A vér jelképezi az élet ajándékát,  
amelyért minden élő lélek hálával tartozik.”*  
(Ian McEwan, 2014)

## 1. BEVEZETÉS

A rheologia az anyagok áramlási tulajdonságaival foglalkozó tudomány.<sup>1</sup> A haemorheologia úttörője Alfred L. Copley volt, aki bevezette a biorheologia (1948) és haemorheologia (1951) fogalmát. Copley az alábbiak szerint definiálta a haemorheologia fogalmát: *„A vér sejtes és plazmatikus komponensei makro- és mikroszkópikus dimenziójú áramlástanának, valamint a vérrel kontaktusban lévő érfal rheológiájának összefoglaló megjelölése”*.<sup>1</sup> A rheologia célja a vér áramlástanának, azon belül is leginkább a microcirculatio területén lezajló folyamatoknak a megismerése és ezek különböző patológiás változásainak feltárása.

Napjainkban a haemorheologiai vizsgálatok és kutatások széles körben elterjedtek köszönhetően a korszerű mérőmódszerek megjelenésének. Ezen tudományterületen számos különböző elven alapuló mérőmódszer elérhető (ektacytometriás és filtrációs módszerek, aggregatio mérésére alkalmas technikák). A keringési rendszer ezen területének megismerése révén számos folyamat komplexebb feltárása válik lehetővé. A Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Sebészeti Műtéttani Tanszék Kutató Laboratóriumában a haemorheologiai és ezen belül a micro-rheologiai paraméterek széles körű vizsgálatára számos mérőműszer áll rendelkezésre. Tanszékünkön a korábbi években több méréstechnikai standardizációs tanulmány készült, illetve végeztek vizsgálatokat a haemorheologiai nemi különbségek feltárására laboratóriumi állatokon.<sup>2,3,4,5,6,7,8,9,10,11</sup>

Az állatkísérleti mérési eredmények humán eredményekkel történő összevetéséhez elengedhetetlen a megfelelő kísérleti modell kiválasztása, a fajspecifikus különbségek feltárása, illetve a metodika kiválasztása. Nagyon fontos a kísérletek pontos megtervezése, kivitelezése, hogy a mérések standardizált körülmények között és a megfelelő laborállattudományi elvek szerint történjenek.<sup>12</sup> A különböző mérőmódszerek kivitelezéséhez eltérő mintaelőkészítés, mintamennyiség szükséges és a vizsgálni kívánt paramétereket is több tényező befolyásolhatja.<sup>9,13</sup> A fent említettek miatt nagy körültekintést igényel a megfelelő

állatfaj kiválasztása, és állatkíméleti szempontból fontos definiálni, hogy mekkora a szükséges és mekkora az elérhető mintamennyiség és ennek ismeretében meghatározni, hogy a vérvétel terminális vagy nem-terminális módon megy majd végbe. Ha az állat utánkövetésére nincs szükség, és csak egyszeri vérvételről van szó, alkalmazható a terminális vérvétel. Követéses vizsgálatok esetében azonban nem-terminális vérvétel alkalmazandó, amely során nagyobb mintamennyiség levételére nincs lehetőség. A mérés technikai standardizációs munka összehasonlító vizsgálatainak elvégzéséhez az újabb módszerek elengedhetetlenek, hogy a kutatási eredmények jól értelmezhetőek és extrapolálhatóak legyenek.

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

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Haemorheológiai paraméterek

A vér haemorheológiai tulajdonságai kulcsfontosságúak, hiszen, patológiás folyamatokban jelző értékű információval szolgálhatnak.<sup>14,15,16,17,18,19</sup> A haemorheológiai kutatások egyik kiemelkedő alakja Jean Louis Marie Poiseuille volt, aki létrehozta a rheologia egyik fontos törvényét. Elsőként használta a newtoni törvényt cilindrikus átmetszetű, egyenes, rigid falú csőben, lamináris áramlású folyadékokra, ami később jó megközelítéssel alkalmazható lett a nem-newtoni folyadékként viselkedő vér leírására.<sup>19,20</sup> A Poiseuille-törvény:

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

ahol, Q: folyadék áramlási sebessége

$\Delta P$ : cső két vége közötti nyomás-gradiens

r: cső sugara

l : csőszakasz hossza

$\eta$ : vér viszkozitása

Newtoni folyadékról beszélhetünk, amikor a nyírófeszültség és a sebesség-gradiens kapcsolata lineáris. Ide sorolható például: víz, vérplazma, szérum. Ezen folyadékok esetében a viszkozitás független a sebesség-gradienstől. A nem-newtoni folyadékok esetében a kapcsolat nem lineáris a folyadékok egy részénél az áramlás csak egy bizonyos nyírófeszültségnél indul meg, ezt küszöbfeszültségnek nevezzük. Nem-newtoni folyadékok viszkozitása nyírófeszültség és sebesség-gradiens függő, ilyen például a teljes vér (Casson-típusú görbe).

A teljes vér viszkozitást számos tényező határozza meg, mint a vörösvérsejtek száma és alakja, a fehérvérsejtek és thrombocyták száma, a vörösvérsejt deformabilitás és aggregatio. Egyéb paraméterek is befolyásoló hatással lehetnek, mint a hőmérséklet, sebesség-gradiens és morfológiai jellemzők.<sup>19,21</sup>

### **2.1.1. Vörösvérsejt deformabilitás**

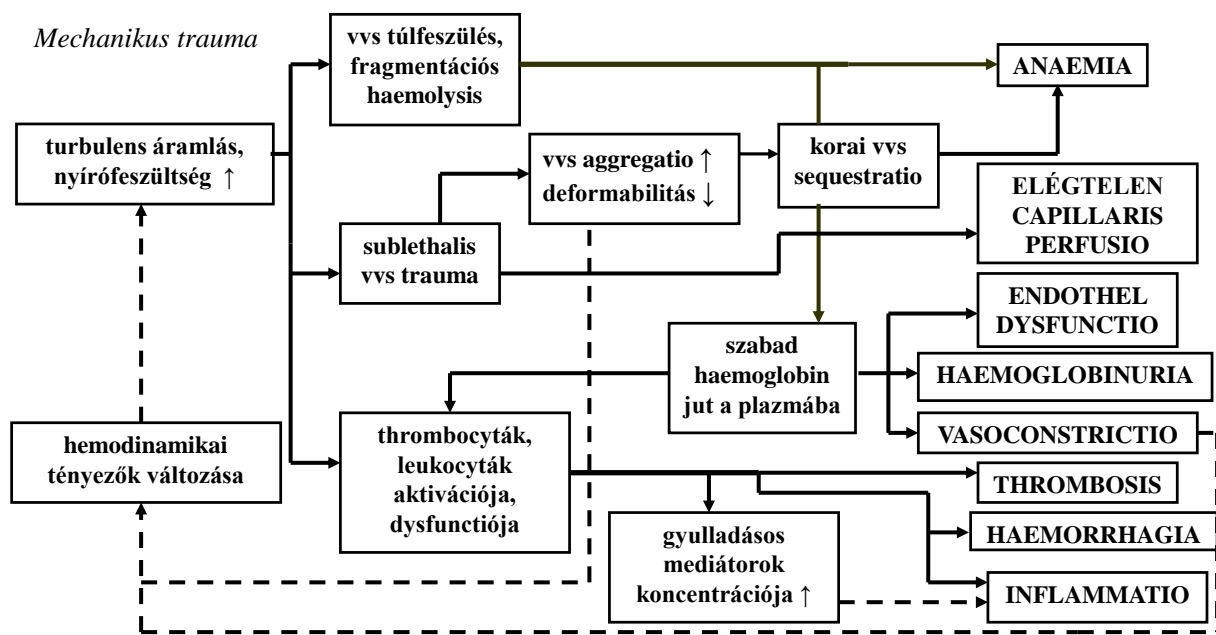
Deformabilitáson a nyíróerő hatására bekövetkező passzív alakváltozás mértékét értjük.<sup>19,22</sup> A deformálhatóságra hatással van a biconkáv morfológia, sejt felszín, felszín-térfogat arány, intracelluláris viszkozitás (hemoglobin koncentráció) és a sejtmembrán saját viszkozitása.<sup>22,23,24,25</sup> Az erythrocyták alakját és deformálhatóságát az ozmotikus környezet is befolyásolja. Hypertoniás környezetben víz áramlik ki a sejtekből, ennek következtében a sejtek zsugorodnak. Hypotoniás környezetben a sejtek megduzzadnak, víz áramlik be a sejtekbe, majd egy idő után haemolysis következik be. Az élő szervezetben az isotoniás környezet tekinthető fiziológiásnak (~300 mOsm/kg).<sup>22</sup>

A deformabilitás fontos jelentőséggel bír a keringés különböző szakaszaiban. A tömeges áramlás szakaszában, ahol az érátmérő > 300 µm a romló deformabilitás a viszkozitás emelkedését okozza. A tranziens -zóna szakaszán megjelenik a vörösvérsejtek axiális migrációja: az ér tengelye mentén magasabb áramlási sebesség és magasabb haematocrit figyelhető meg. Az érfal mentén sejt szegény zóna (Poiseuille-zóna) jön létre. Az erythrocyták aggregációja elősegíti az axiális migrációt, amihez megfelelő deformabilitásra van szükség. Az egyenkénti áramlási szakaszban (érátmérő < 8 µm) a kapillárisokon való áthaladáshoz a sejteknek deformálódniuk kell. Abban az esetben, ha a sejtek deformálhatósága romlik, az a szöveti perfúzió romlásához vezet.<sup>21,26</sup> Számos patofiziológiai folyamat (septicus, tumoros folyamatok, ischaemia-reperfusio) vörösvérsejt deformabilitás csökkenéssel és aggregatio fokozódással jár, ezek kollektív hatása: vér viszkozitás emelkedés, az áramlás romlása, perfúziós zavarok megjelenése.<sup>27,28,29</sup>

#### **2.1.1.1. Vörösvérsejt membránstabilitás**

Az erythrocyták az érrendszerben állandó mechanikai terhelésnek, mechanikai stressznek vannak kitéve. A különböző fiziológiai és patofiziológiai folyamatok hatására, beleértve az extrafiziológiai hatásokat (például extracorporalis keringés, intravasculáris készülékek és implantátumok), amelyek befolyásolják a vörösvérsejtek deformálhatóságát meghatározó paramétereket (citoszkeleton és morfológiai tulajdonságok, belső viszkozitás, sejtmembrán viszkozitás), a sejtek fokozott nyírófeszültséggel szembeni tűrőképessége változhat és károsodhat a sejtmembrán.<sup>30,31,32,33,34</sup> Ebben a vonatkozásban a vörösvérsejt mechanikai (membrán) stabilitási teszt hasznos információkkal szolgálhat.<sup>35</sup> Mohandas és mtsai kimutatták, hogy a sejtek nem szenvednek nagymértékű károsodást fiziológiai nyírófeszültséggel szemben.<sup>36</sup> Kameneva és mtsai leírták, hogy az expozíciós idő mértéke és

az alkalmazott nyírófeszültség között összefüggés van, mely subletalis traumát, végül a sejtek lysisét idézi elő.<sup>31</sup> A vörösvérsejtek mechanikus sérülését *in vivo* előidézheti a hemodinamikai faktorok megváltozása, amely semi-turbulens, vagy néha turbulens áramláshoz és ebből adódóan a sejtekre ható nyírófeszültség növekedéséhez vezet. A subletalis károsodás deformabilitás romlást és aggregatio fokozódást okoz, mely sok esetben a szöveti perfúzió romlását eredményezheti. Az előbb említett változások negatív módon hatnak a keringésre, amit a hemodinamikai állapot további romlása kísér (1. ábra).



1. ábra

A vörösvérsejtek károsodásához és traumájához vezető folyamatok Kameneva és Antaki alapján<sup>31</sup> (folytonos vonalak egyirányú kapcsolatot, a szaggatott vonalak a kétirányú kapcsolatot jelzik)

Mechanikai stabilitási vizsgálat esetén különböző nyírófeszültség-időtartam kombinációk alkalmazhatóak. A hatás a sejtek mechanikai tulajdonságaitól függ. Az irodalomban egyre nagyobb mennyiségű adat áll rendelkezésre a vér összetételének faji diverzitásáról, beleértve a haematologiai és haemorheologiai paramétereket is.<sup>37,38,39</sup> Viszont mechanikai stabilitással kapcsolatban nincsenek adatok.

#### 2.1.1.2. Ozmotikus gradiens ektacytometria

Az ozmotikus gradiens ektacytometria (osmoscan) alapjai Clark és munkatársai nevéhez fűződnek.<sup>40</sup> Rendkívül érzékeny módszer, mely kiválóan használható a vörösvérsejt deformabilitás változás mértékének mérésére az ozmolalitás függvényében.

Az ozmotikus gradiens ektacytometriás mérések számos betegség esetén nyújtanak hasznos információt, mint például haemolyticus anaemia<sup>41</sup>, örökletes spherocytosis<sup>40</sup> és

örökletes stomacytosis<sup>40</sup> során. Ilyenkor a mérések során kapott osmoscan görbék alakjában változásokat figyelhetünk meg.

Németh és munkatársai humán, sertés, patkány és kutya vérmintákon végeztek kutatásokat. Kísérletükben különböző nyírófeszültség (1, 2, 3, 5, 10, 20, 30 Pa) mellett végezték az osmoscan méréseket. Az eredmények feldolgozása és kiértékelése során azt találták, hogy a vizsgált fajokból származó minták jelentős mértékű különbségeket mutattak (2. ábra). 10 Pa-nál végzett mérések esetén a görbék maximum pontja egyre inkább baloldalra és lefelé tolódott. 5 Pa alatt ez a változás még inkább megfigyelhetővé vált (szabálytalan, instabil, nem értékelhető görbeszakaszok). Ez leginkább a kutyák és sertések mintáiban, valamint humán mintákban mutatkozott. Emellett új paramétereket is bevezettek:<sup>42</sup>

$\Delta EI$  = EI max és EI min értékek között lévő különbség

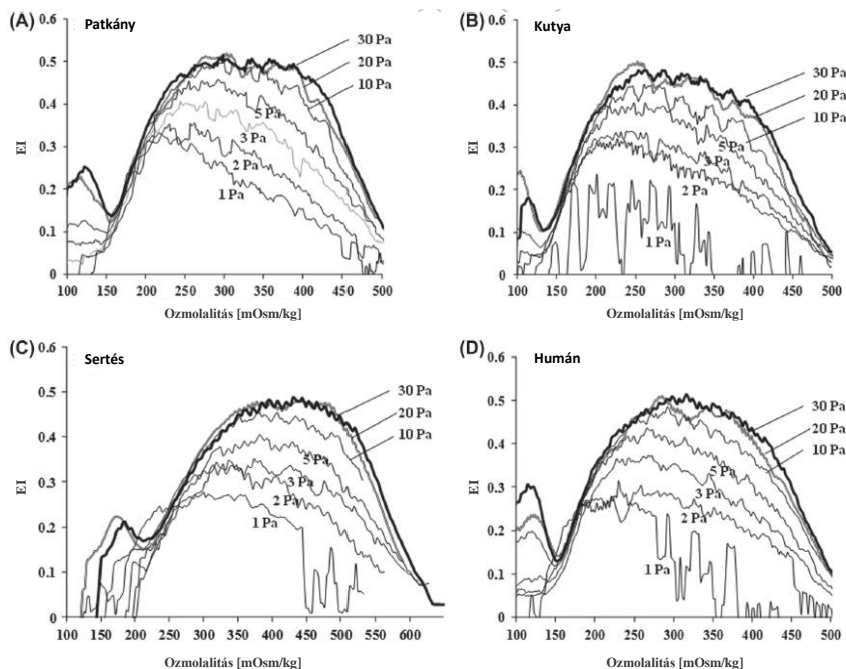
$\Delta O$  = EI max és EI min értékekhez tartozó ozmolalítás értékek különbsége

$\Delta EI / \Delta O$

rEI = EI max és EI min egymáshoz viszonyított aránya

rO = O (EI max) és O min értékekhez tartozó ozmolalítás értékek egymáshoz viszonyított aránya

rEI / rO



**2. ábra**

Különböző nyírófeszültségen végzett osmoscan mérések reprezentatív görbéi patkány (A), kutya (B), sertés (C) és humán (D) mintákon<sup>42</sup>

### *2.1.1.3. A vörösvérsejt deformabilitás meghatározása*

A vörösvérsejt deformabilitás mérésére sokféle mérőmódszer létezik. Ismertek filtrációs, mikropipettás aspirációs technikák, mikrocsatornás és ektacytometriás módszerek egyaránt. Napjainkban a legszélesebb körben a lézer-diffrakciós elven működő ektacytométerek terjedtek el. Ezek közül a legnagyobb kereslet a rotációs (LoRRca MaxSis Osmoscan) és a slit-flow (Rheoscan D-200) ektacytométer készülékek iránt van. Ezen készülékek nagy előnye, hogy a vizsgálatokhoz kis mennyiségű (mindössze 6-10  $\mu$ l) vérmintára van szükség.<sup>25,7,43,44</sup>

### *2.1.2. Vörösvérsejt aggregatio*

Vörösvérsejt aggregatio alatt a sejtek reverzibilis összekapcsolódását értjük. Ez az átmeneti összekapcsolódás stasis során vagy kellően alacsony sebesség-grádiens mellett következik be.<sup>6,45</sup> Az aggregációra, illetve annak mértékére számos tényező hatással van. Ilyen a szuszpendáló közeg összetétele, a haematocrit, a vörösvérsejt tulajdonságai, mint például felszíni sajátságok (felszíni töltés, glycocalyx összetétel), mechanikai tulajdonságok (deformabilitás), valamint a nyíróerő.<sup>45,46</sup> A szuszpendáló közeg összetételének vonatkozásában a nagy molekulatömegű fehérjék bírnak kiemelkedő jelentőséggel, mint például fibrinogén, coaguloplasmin, haptoglobulin, hiszen jelenlétük elősegíti a vörösvérsejtek aggregációját.<sup>45,47</sup> Fontos megemlíteni, hogy a vörösvérsejt aggregációhoz nélkülözhetetlen a bikonkáv sejthalak (6-8  $\mu$ m átmérő) is, mivel vannak olyan sejthalakok, amik nem vagy csak kis mértékben képesek aggregálódni, ezek közé tartoznak például a spherocytá, echinocytá vagy a sphero-echinocytá sejthalakok.<sup>48</sup> Echinocytá alak esetében a membránon tüskeszerű kiemelkedések jelennek meg, amit ozmotikus vagy oxidatív stressz hatására vesznek fel a sejtek. Spherocytá alakról például szerzett haemolyticus anaemia esetén beszélhetünk.<sup>49</sup>

Az aggregációt befolyásoló tényezők között vannak az úgynevezett disaggregációs erők vagy más néven aggregációt gátló erők. Ide sorolhatók: az elektrosztatikus repulsió (sejtfelszíni töltés-eloszlás), a membrán rigiditás és a nyíróerők. A disaggregációs tényezők közé tartozik egyrészt a sejtek felszíni sajátságaiból fakadó elektrosztatikus taszítás, ugyanis a vörösvérsejtek felszíni töltése nettó negatív kiváltképp a szíalsav reziduumok miatt. Másrészt ahhoz, hogy az erythrocyták aggregálódni tudjanak, a megfelelő deformabilitás nélkülözhetetlen. Jól kell deformálódni a sejteknek ahhoz, hogy biztosítani tudják az összekapcsolódási felületet. A membrán saját rigiditása ez ellen hat, mivel a merevebb membránnal rendelkező sejtek kevésbé képesek aggregálódni.<sup>45,50</sup> Ezen kívül a nyíróerő is

fontos szerepet játszik. Az aggregatio kialakulásához normál körülmények között kellően alacsony,  $<20 \text{ s}^{-1}$  sebesség-gradiens szükséges<sup>45,50,51</sup>, az ennél magasabb sebesség-gradiens felett ( $20-40 \text{ s}^{-1}$ ) az aggregátumok szétesnek. Az aggregációs folyamat két szakaszra osztható, egy kezdeti 5-15 s fázisra, ekkor a vörösvérsejtek pénztekeres-szerűen, lineárisan egymás mellé rendeződnek. Ezt hívjuk „rouleaux”-formának. Majd ezt követően az előzőekben létrejött aggregátumok 1-2 perc alatt három dimenziós alakzatba rendeződnek.<sup>47,52</sup>

Az aggregatio kialakulásának a folyamata még nem teljesen tisztázott. Jelenleg két hipotézis ismert: a „bridging” és a „depletion”.<sup>50,53</sup> Az előbbi azt feltételezi, hogy a vörösvérsejt aggregatio kialakulásában nagy szerep jut a plazmában található makromolekuláknak azáltal, hogy nem kovalens kötéseket alakítanak ki az egymás közelébe kerülő sejtek között, mintha hidak alakulnának ki a két erythrocyta között. Amint a disaggregációs erők túlsúlyba kerülnek, ez a kölcsönhatás felbomlik. A „depletion” modell szerint az aggregatio folyamata során az egymáshoz közel kerülő sejtek között makromolekula szegény (depléciós) zóna alakul ki, mivel a köztük levő térből kiszorítják a nagyobb plazma komponenseket, így ozmotikus grádienszt kialakítva elősegítik a sejtek összekapcsolódását.<sup>45,54</sup>

A 2.1.1 fejezetben említésre került, hogy a keringést véráramlástani aspektusból három szakaszra oszthatjuk: 1. tömeges áramlás szakaszára, 2. átmeneti vagy tranziens zónára, 3. egyenkénti áramlás szakaszára.<sup>19,26</sup> A különböző áramlási szakaszok jellemzőit az I. táblázat mutatja be.

**I. táblázat:** A különböző vérkeringési szakaszok tulajdonságai<sup>19,26,49</sup>

Áramlási szakasz	Érátmérő	Jellemzők
<b>Tömeges áramlási zóna</b>	$> 300 \mu\text{m}$	A sejtek egymás áramlását nem befolyásolják. A sejtek deformálódnak, ezáltal redukálják a belső súrlódást. Magas nyírófeszültség értékek.
<b>Tranziens zóna</b>	$8-300 \mu\text{m}$	A sejtek az érpálya közepén haladnak ( $<100 \mu\text{m}$ ), amit az aggregatio elősegít. Sejtszegény, úgynevezett Poiseuille-zóna az érfal mentén.
<b>Egyenkénti áramlás szakasza</b>	$< 8 \mu\text{m}$	A vérsejtek megnyúlnak, aggregatio nem jellemző.

### 2.1.2.1. Vörösvérsejt aggregatio meghatározása

Az aggregatio meghatározására megkülönböztetünk indirekt és direkt módszereket. Az indirekt módszerek közé tartozik az erythrocyta szedimentációs ráta (ESR), ultrahangon alapuló módszerek, fény-transzmissziós és lézerdiffractometriás módszerek, míg a különféle mikroszkópos technikák a direkt módszerek körébe tartoznak. Napjainkban a technika gyors fejlődésének köszönhetően a direkt módszerek egyre jobban előtérbe kerültek. Az aggregatio mérésére használt legelterjedtebb módszerek: a fénytranszmittancián alapuló Myrenne MA-1 aggregometer (Myrenne GmbH, Németország) és a laser-backscattering elven működő LoRRca (Laser-assisted Optical Cell Analyzer) ektacytométer (Mechatronics BV, Hollandia). A kétféle mérőmódszer az aggregációs folyamat különböző vetületeit vizsgálja. Myrenne készülékkel az aggregatio 5. és 10. másodpercéről kapunk információt, ezzel szemben a LoRRca készülékkel való syllectometriás mérés során az aggregatio teljes folyamatát vizsgáljuk. Technikai szempontból összehasonlítva elmondható, hogy a Myrenne készülékkel végzett mérések egyszerűek, egy méréshez mindössze kb. 20-30 µl vérminta szükséges és a mérések hőkontroll nélkül zajlanak. A LoRRca készülék esetében viszont nagy mintamennyiségre van szükség (kb. 0,7-1 ml), és a mérések hőkontrollált körülmények között (37° C) zajlanak.<sup>25,55</sup>

## 2.2. Nemi és korfüggő haemorheologiai különbségek vizsgálata

Az öregedés egy bonyolult és többfaktoros folyamat, ami a szív- és érrendszerre ható komplex folyamatokat foglal magában.<sup>5,56,57,58</sup> Számos tanulmány arról számolt be, hogy ez a fiziológias folyamat összefüggésbe hozható bizonyos haemorheologiai paraméterek változásával, beleértve a teljes vér és plazma viszkozitást, thrombocyta aggregatiót, vörösvérsejt aggregatiót és deformabilitást.<sup>2,4,51,59,60,61,62,63,64</sup> Ezen felül az öregedés alatti élettani változások fokozott morbiditási és mortalitási kockázat jelentenek szív- és érrendszeri betegségekben és tumorokban, kiemelik a gerontológiai kutatások fontosságát. *In vivo* öregedés vagy tárolás során az erythrocyták vizet, 2,3-bifoszfoglicerinsavat, ATP-t, fehérjéket, haemoglobint és vezikulákat veszítenek. Az eredmény térfogat csökkenés, felszíni töltés változás és növekvő sűrűség.<sup>65,66,67</sup>

A sejtek felszínének csökkenése és vízvesztése a sejt-öregedés egyik karakterisztikus jele.<sup>68</sup> A keringésben résztvevő vörösvérsejtekkel ez fiziológiásan és folyamatosan történik a 120 napos élettartamuk során. Több haemorheologiai tanulmány felveti, hogy a test

öregedésével a folyamat dinamikája és a sejteket érintő változások tulajdonságai különbözhetnek.<sup>2,4,51,63,64</sup>

Laboratóriumi állatokon, modern micro-rheologiai műszerekkel végzett kísérletes eredmények jelenleg nem állnak rendelkezésre.<sup>25,43,69</sup> Idős állatokon végzett mérések hasznos információval szolgálhatnak sok korról összefüggésbe hozott megbetegedéssel.<sup>70,71,72,73</sup> Azonban az állatkísérletek nagy részét dominánsan fiatal 3-4 hónapos, ritkábban kissé idősebb (átlagosan 6 hónapos) rágcsálókön végzik. Patkányokban ez az életkor 18 humán életévnek feleltethető meg.<sup>74</sup>

### 3. CÉLKITÚZÉS

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

## **4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **4.1. Membránstabilitás és osmoscan vizsgálatok különböző nyírófeszültség és időtartam kombinációk alkalmazása mellett**

#### **4.1.1. Kísérleti állatok és humán mintavétel**

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

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

A humán mintavétel 7 önkéntes nőtől (kor: 31-48 éves) a vena mediana cubiti punctiójával történt. A vérvételek zárt rendszerben 3 ml-s  $K_3$ -EDTA-t tartalmazó (1,8 mg/ml Vacutainer® csövek alkalmazásával 21 G-s vérvételi tűvel. A laboratóriumi méréseket 2 órán belül elvégeztük.<sup>13,25</sup>

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

A fent említett fajokból 5 egységnyi vérmintát vizsgáltunk tovább. Ezekon a mintákon a mechanikai stabilitás tesztet 100 Pa-on 300 másodpercig végeztük el, 200, 250, 300 és 500 mOsmol/kg-os PVP oldatban.

#### **4.1.2. Haematologiai paraméterek meghatározása**

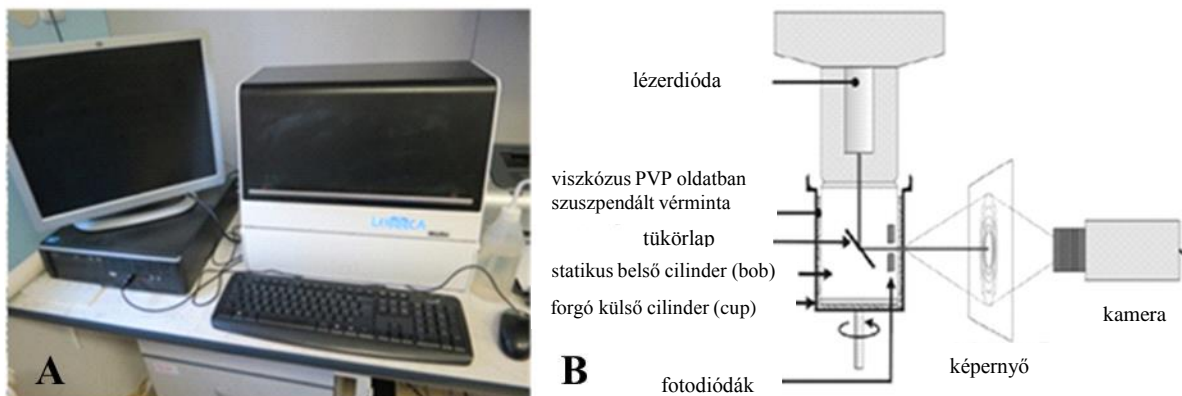
A kvalitatív és kvantitatív haematologiai paramétereket Sysmex F-800 haematologiai automata (TOA Medical Electronics Corp., Ltd., Japán) segítségével detektáltuk. A készülék apertura-impedancia elven határozza meg a vörösvérsejt (Vvs), fehérvérsejt (Fvs) és thrombocyt (Thr) számot. A haemoglobin koncentráció (Hgb [g/dl]) meghatározása

fotometriásan történik. A többi paramétert a fenti adatokból kalkulálja a készülék. A mérésekhez 70 µl antikoagulált vérmintára van szükség. Az eredmények közül a vörösvérsejt szám ( $V_{vs}$  [ $10^6/\mu\text{L}$ ]), a haemoglobin koncentráció (Hgb [g/dl]), a haematocrit (Hct [%]), az átlagos vörösvérsejt térfogat (MCV [fl]), az átlagos vörösvérsejt haemoglobin tartalom (MCH [pg]) és az átlagos vörösvérsejt haemoglobin koncentráció (MCHC [g/dl]) értékek kerültek bemutatásra.

### 4.1.3. Haemorheológiai paraméterek meghatározása

#### 4.1.3.1. A vörösvérsejt deformabilitás és membránstabilitás meghatározása

A vörösvérsejtek deformabilitását és membránstabilitását lézer diffrakciós elven működő LoRRca MaxSis Omoscan rotációs ektacytometer (Mechatronics BV, Hollandia) segítségével határoztuk meg (3. ábra).



**3. ábra**  
LoRRca MaxSis Omoscan ektacytometer (A) és működési elve (B)  
(Sebészeti Műtéttani Tanszék fotóanyaga)

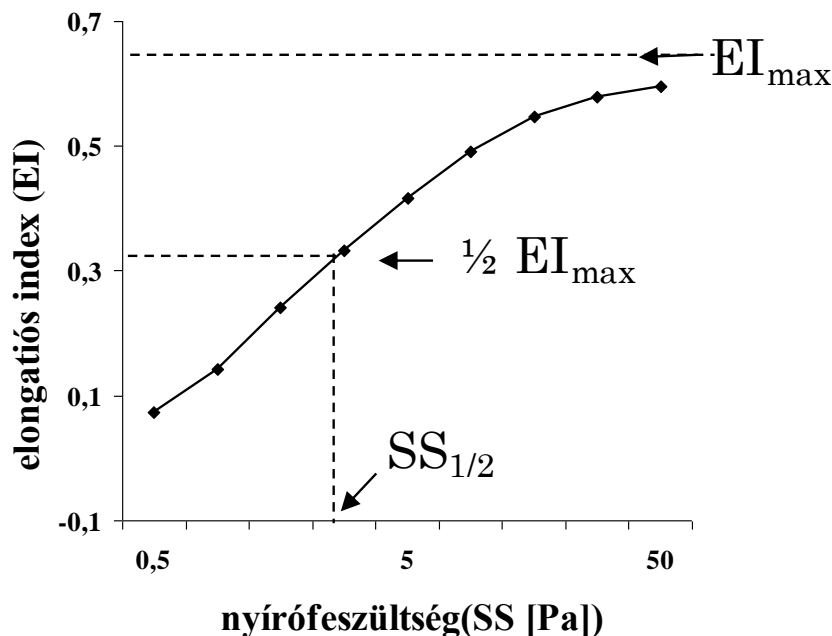
Mind a deformabilitás, mind a membránstabilitás vizsgálatához 10 µl vérmintát 2 ml PVP (polyvinyl-pyrrolidon: 360 kDa, Sigma-Aldrich Co. USA; PVP-PBS oldat viszkozitása = 30,83 mPas, ozmolalitása = 298 mOsmol/kg, pH =7,2) oldatba szuszpendáltunk.

A készülék Couette-rendszer felépítésű, egy statikus hengerből (bob) és egy külső hengerköpenyből (cup) áll. A kettő közötti résbe (kb. 0,3 mm) helyezük a mintát Pasteur pipetta segítségével. A cup forgó mozgást végez a henger körül meghatározott szögsebességgel, eközben a mintát lézernyaláb világítja meg. A diffrakciós kép változása attól függ, milyen a vörösvérsejtek elnyúlásának a mértéke. Ezt a diffrakciós mintázatot egy CCD kamera rögzíti, amit a számítógépen található szoftver eleméz. A szoftver analizálja a

diffraktogramm átmérőit és a  $(L-W) / (L+W)$  képlet alapján megkapjuk az elongációs indexet (EI). A képletben az L a diffrakciós minta hosszát, míg a W a diffrakciós minta szélességét jelenti. A deformabilitást az EI-SS függvényében ábrázolva kapott görbe jellemzi. E görbe parametrizálásával további paramétereket tudunk kalkulálni:  $EI_{max}$  (maximális EI értéke) és az  $SS_{1/2} / EI_{max}$  ( $EI_{max}$  feléhez tartozó nyírófeszültség érték). A parametrizálás a Linewaver-Burke analízis segítségével történik:

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

$EI_{max}$  csökkenése és az  $SS_{1/2}$  értékek emelkedése deformabilitás romlásra utal (4. ábra).<sup>25,43,75</sup>

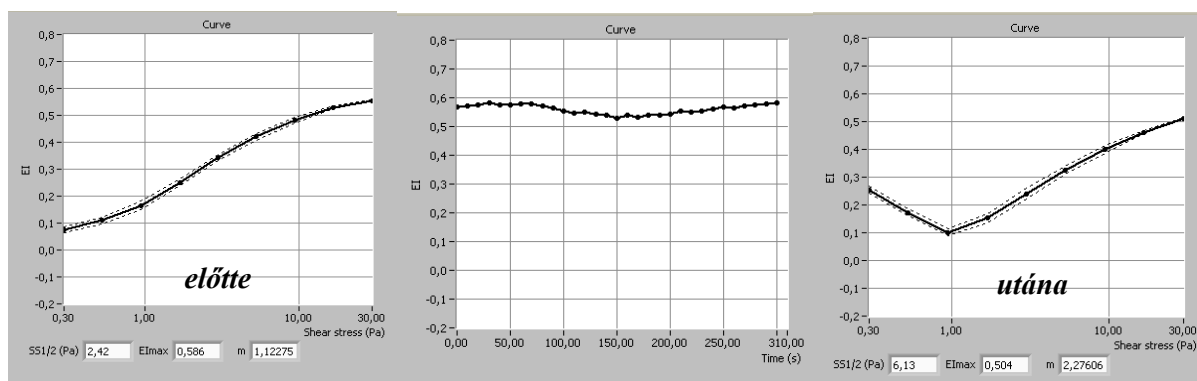


**4. ábra**

A mérések során kapott görbék parametrizálásaként nyert  $EI_{max}$  és  $SS_{1/2}$  [Pa] értelmezése<sup>25,43,75</sup>

A membránstabilitás mérése során meghatározott mechanikai stressz (adott, állandó nyírófeszültség és adott időtartam) előtt és után hagyományos ektacytometriás vörösvérsejt deformabilitási teszt elvégzése történik, majd a rögzített elongációs index-nyírófeszültség görbék összehasonlító analízise következik (5. ábra). Az expozíciós idő és a nyírófeszültség nagysága változtatható. Az ábra középső részén látható az adott időtartamig meghatározott nyírófeszültséggel alkalmazott mechanikus stressz során mért elongációs index értékek, míg az ábra két oldalán a stressz alkalmazása előtt és után meghatározott elongációs index-nyírófeszültség görbék.

A membránstabilitási tesztet összesen 9 kombinációban végeztük: 30, 60 és 100 Pa nyírófeszültség mellett 100, 200 és 300 secundum időtartamig.

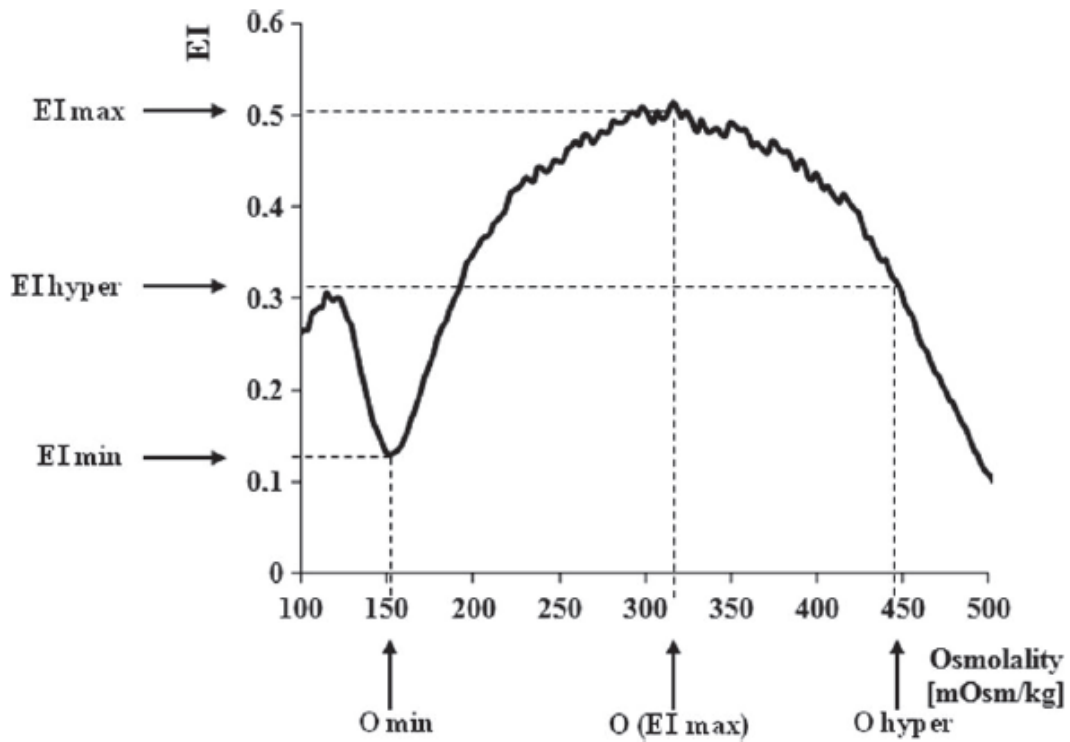


**5. ábra**

Membránstabilitási teszt mérése során kapott kép  
(Sebészeti Műtéttani Tanszék fotóanyaga)

#### 4.1.3.2. Az ozmotikus grádiens ektacytometria meghatározása

Az ozmotikus grádiens ektacytometria (osmoscan) mérés során az ozmolaritás értéke folyamatosan nő 0 és 500 mOsmol/kg között.<sup>25</sup> Az osmoscan mérésekhez különböző ozmolalítású PVP-PBS oldatokat használtunk: 200, 250, 300, és 500 mOsmol/kg (pH ~7,2 viszkozitás = 29-31 mPas). A vizsgálathoz 250  $\mu$ l antikoagulált vérmintát 5 ml PVP oldatba szuszpendáltunk. A készülék által az alábbi paraméterek kerülnek meghatározásra: EI min (legalacsonyabb elongációs érték hypoozmotikus közegben), EI max (nem azonos a Lineweaver-Burke analízissel kapott EI<sub>max</sub> értékkel; maximális elongációs index érték adott nyírófeszültségnél), OEI min és OEI max (ozmolalítás a minimális és maximális elongációs index értéknél), EI hyper (magasabb ozmolalítású tartományban EI max felét jelentő elongációs index érték), AUC (görbe alatti terület). A következő tulajdonságokat a készülék által megadott paraméterek alapján számítottuk ki:  $\Delta$ EI (a maximális és a minimális EI érték közötti különbség),  $\Delta$ O (maximális és minimális EI mellett mért ozmolalítás értékek különbsége), EI<sub>max</sub> / EI<sub>min</sub> (a maximális és minimális EI aránya) és EI<sub>max</sub> / O<sub>min</sub> (maximális és minimális EI mellett mért ozmolalítás értékek aránya) (6. ábra).<sup>42</sup>



**6. ábra**

Az osmoscan mérés során kapott görbe és a készülék által meghatározott paraméterek<sup>42</sup>

#### 4.1.4. Statisztikai analízis

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

## 4.2. Micro-rheologiai paraméterek nemi és korfüggő vizsgálatai

### 4.2.1. Kísérleti állatok és mintavételi protokoll

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

Összehasonlító vizsgálatainkba konvencionális állatházban tartott, azonos életkorú Crl:WI (Toxi-Coop Ltd., Magyarország) hím (n=10) és nőstény (n=10) patkányokat vontunk be. A vizsgálatokat 3 hónapos korú állatokon kezdtük. Nőstény patkányokból vérvételek előtt minden esetben hüvelykenet mintavétel is történt. A kísérlet során rövid anesztézia mellett (Thiopental [60mg/kg] i.p.) vérvétel az állatok 3 hónapos korában (alap, március), majd 4, 5, 9, 12, 15 és 18 hónapos korokban a laterális farok vena punctiója révén (alkalmanként ~ 0,5 ml) történt (7. ábra). Az állatok a kísérletek végére 18 hónaposak voltak. Antikoagulánsként K<sub>3</sub>-EDTA-t (1,5 mg/ml) használtunk.



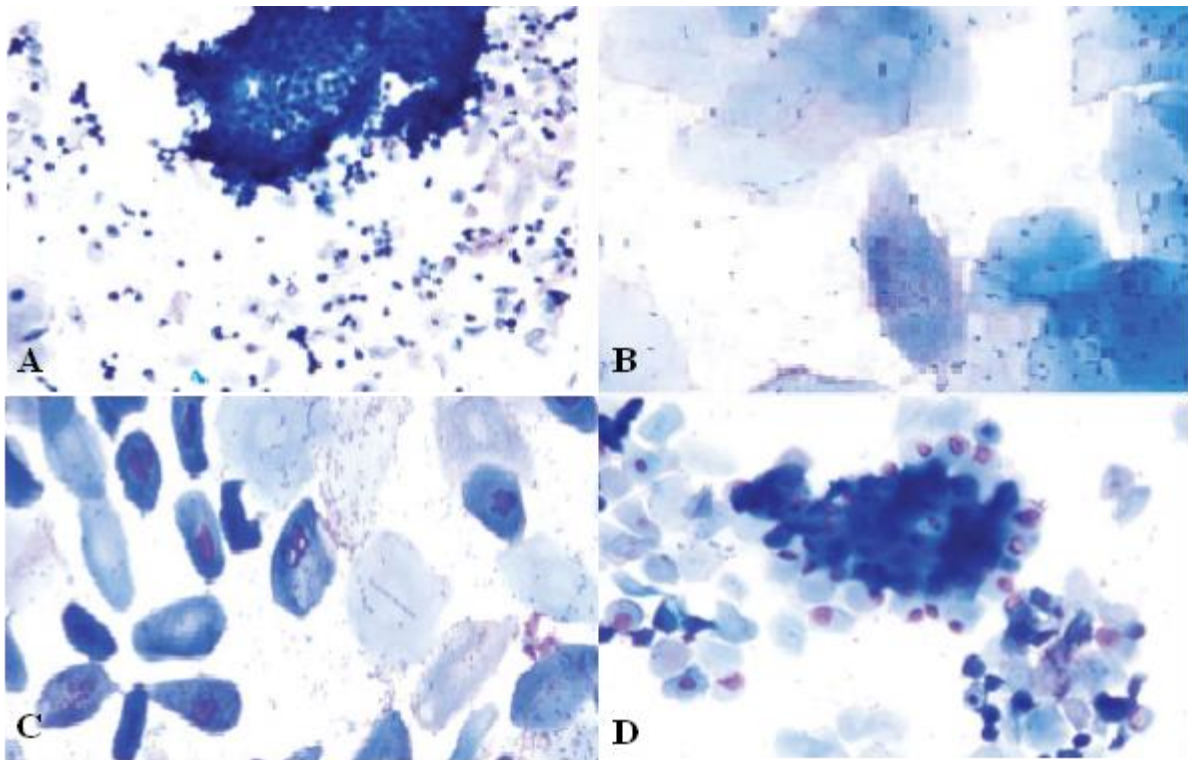
**7. ábra**

Patkány farokvéna vérvétel  
(Sebészeti Műtéttani Tanszék fotóanyaga)

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

Nőstényeknél hüvelykenetből vizsgáltuk az oestrus -ciklus szakaszait is. A mintavételek minden reggel 7 és 9 óra között történtek. A tárgylemezre felvitt keneteket egy éjszakán át levegőn szárítottuk. A kenetek festésére kismértékben módosított Giemsa protokollt alkalmaztunk. A festés előtt a mintákat abszolút metanol segítségével 30 másodpercig fixáltuk. A Giemsa-oldatot (J.T Bakers' szövettan/citológia Giemsa 3856.1000) 1 percig hagytuk a mintákon, majd ezt követően desztillált vízzel mosást végeztünk, egészen addig, amíg az összes festékmaradékot el nem távolítottuk. Ezután a festett mintákat egy éjszakán át levegőn szárítottuk, majd fénymikroszkóp alatt megvizsgáltuk.

A következő citológiai osztályozást használtuk: prooestrus - sejtmaggal rendelkező hámsejtek, oestrus - elszarusodott pikkelyes hámsejtek, metoestrus - csoportos elszarusodott pikkelyes hámsejtek és polimorfonukleáris (PMN) leukocyták és dioestrus - kerek leukocyták (8. ábra).<sup>76</sup>



**8. ábra**

Hüvely kenet minták Sprague-Dawley patkányokból prooestrus (A), oestrus (B), késői-oestrus (C) és dioestrus (D) ciklusban módosított Wright-Giemsa festéssel Cora és mtsai szerint<sup>76</sup>

#### 4.2.2. Haematologiai paraméterek vizsgálata

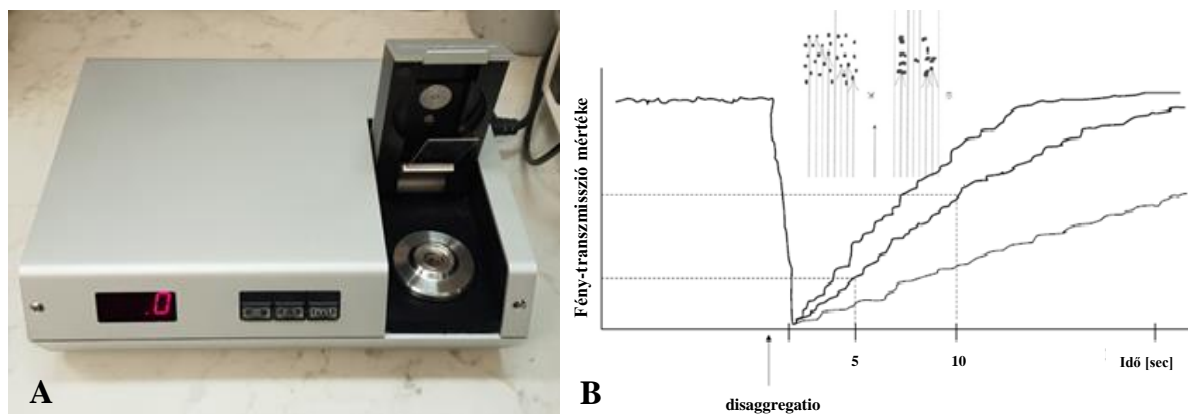
A haematologiai paramétereket a 4.1.2. fejezetben bemutatott Sysmex F-800 automatával határoztuk meg. Az alábbi paraméterek kerültek meghatározásra: vörösvérsejtszám (Vvs [ $10^6/\mu\text{L}$ ]), fehérvérsejtszám (Fvs [ $\times 10^3/\mu\text{L}$ ]), monocyta-granulocyta arány (Mo+Gr [%]), haemoglobin koncentráció (Hgb [g/dl]), haematocrit (Hct [%]), thrombocyta szám (Thr [ $\times 10^3/\mu\text{L}$ ]), átlagos vörösvérsejt térfogat (MCV [fl]), átlagos vörösvérsejt haemoglobin tartalom (MCH [pg]) és az átlagos vörösvérsejt haemoglobin koncentráció (MCHC [g/dl]).

A vörösvérsejt deformabilitás, membránstabilitás és osmoscan mérések LoRRca MaxSis Omoscan rotációs ektacytometerrel a 4.1.3.1. és 4.1.3.2. fejezetben leírtak alapján történtek. A vizsgálatokhoz használt PVP-PBS oldat viszkozitása = 23,7-35,9 mPas, ozmolalitása = 296-319 mOsmol/kg, míg a pH = 7,0-7,2 volt. A méréseket a deformabilitási vizsgálatnál leírt feltételekkel (4.1.3.1. fejezet) végeztük. Az ozmotikus grádiens ektacytometria (osmoscan) teszt alatt az elongációs index értékeket állandó nyirófeszültség (30 Pa) alkalmazása mellett határoztuk meg (4.1.3.2.).

#### 4.2.3. Haemorheologiai paraméterek vizsgálata

##### 4.2.3.1. A vörösvérsejt aggregatio meghatározása fénytranszmissziós elven

A vörösvérsejt aggregatio mértékének vizsgálatát fénytranszmissziós elven működő Myrenne MA-1 aggregometerrel (Myrenne GmbH, Németország) végeztük (9. ábra).<sup>77</sup>



**9. ábra**  
Myrenne MA-1 aggregometer (A) és működési elve (B)<sup>50</sup>  
(Sebészeti Műtéttani Tanszék fotóanyaga)

A mérésekhez szükséges 20  $\mu\text{l}$  antikoagulált vérmintát buborékmentesen egy rotor által forgatott 2°-os szögben csiszolt üveg lencsére visszük fel, amely alatt egy infravörös detektor található. A fedelet lecsukva a vérmintát egy üveg tárgylemez szétteríti a lencsén, ami fölött egy infravörös dióda van. A készülék által meghatározott aggregációs index paraméterek: M 5 s, M1 5 s, M 10 s, M1 10s. A készülék működési elvét a 9. B ábra szemlélteti: először a mintában lévő vörösvérsejtek diszaggregálódnak ( $600\text{ s}^{-1}$  sebesség-grádienssel), majd a sebesség-grádiens hirtelen nullára (stasis, M mód) vagy a nyírófeszültség alacsony értékre csökken ( $3\text{ s}^{-1}$ , M1 mód) és ezt követően a készülék az áthaladó fény intenzitását méri az aggregációs folyamat 5. és 10. másodpercében. A sematikus ábrán látható, hogy a középső görbe normál, a felső görbe emelkedett, míg az alsó görbe csökkent mértékű aggregációt mutat. Emelkedett aggregatio esetén az index paraméterek is növekednek. A berendezés nem temperált, a mérések hőkontroll nélkül zajlanak.<sup>25,43,69,77</sup>

#### **4.2.4. Statisztikai analízis**

Az adatokat átlag  $\pm$  szórás (S.D.) formájában ábrázoltuk. Az adatok normalitásának függvényében a csoportok közötti összehasonlításhoz t-tesztet vagy Mann-Whitney Rank-Sum tesztet alkalmaztunk, míg a csoportokon belüli értékek összevetéséhez egyirányú ANOVA tesztet (Bonferroni vagy Dunn post hoc teszt) használtunk. A szignifikancia szintet  $p < 0,05$  értéknél határoztuk meg. A statisztikai elemzést SigmaStat (Systat Software Inc., San Jose, California, USA) szoftverrel végeztük.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Osmoscan és membránstabilitás vizsgálatok különböző nyírófeszültség és időtartam kombinációk mellett

#### 5.1.1. Haematologia és deformabilitási paraméterek leírása

A vörösvérsejttel összefüggő kvalitatív és kvantitatív haematologiai paramétereket az II. táblázat mutatja be.

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

**II. táblázat:** Válogatott kvalitatív és kvantitatív haematologiai paraméterek és a vörösvérsejt deformabilitást leíró paraméterek patkány (n=6), kutya (n=8), sertés (n=11) és humán (n=7) vérmintákban.

	patkány	kutya	sertés	humán
<b>Vvs [T/l]</b>	7,29 ± 0,87 *	6,5 ± 0,45 *	5,92 ± 0,60 *	4,64 ± 0,37
<b>Hgb [g/dl]</b>	13,03 ± 0,98 *	13,44 ± 0,98 *	9,45 ± 0,75 *	11,59 ± 0,65
<b>Hct [%]</b>	46,68 ± 4,11 *	50,28 ± 3,98 *	38,44 ± 4,03 *	42,76 ± 4,14
<b>MCV [fl]</b>	59,75 ± 5,14 *	77,48 ± 5,00 *	65,31 ± 7,32 *	92,26 ± 8,19
<b>MCH [pg]</b>	18,01 ± 1,46 *	20,71 ± 1,06 *	16,05 ± 1,04 *	25,04 ± 1,35
<b>MCHC [g/dl]</b>	30,39 ± 4,36 *	26,83 ± 2,07	24,72 ± 1,84 *	27,26 ± 2,15
<b>EI at 3 Pa</b>	0,312 ± 0,02 *	0,267 ± 0,013 *	0,306 ± 0,018 *	0,248 ± 0,011
<b>EI<sub>max</sub></b>	0,579 ± 0,017 *	0,551 ± 0,025 *	0,505 ± 0,025 *	0,528 ± 0,029
<b>SS<sub>1/2</sub> [Pa]</b>	2,28 ± 0,38 *	4,33 ± 0,8	1,99 ± 0,33 *	4,2 ± 0,74
<b>EI<sub>max</sub> / SS<sub>1/2</sub> [Pa<sup>-1</sup>]</b>	0,24 ± 0,04 *	0,13 ± 0,03	0,26 ± 0,05 *	0,13 ± 0,03

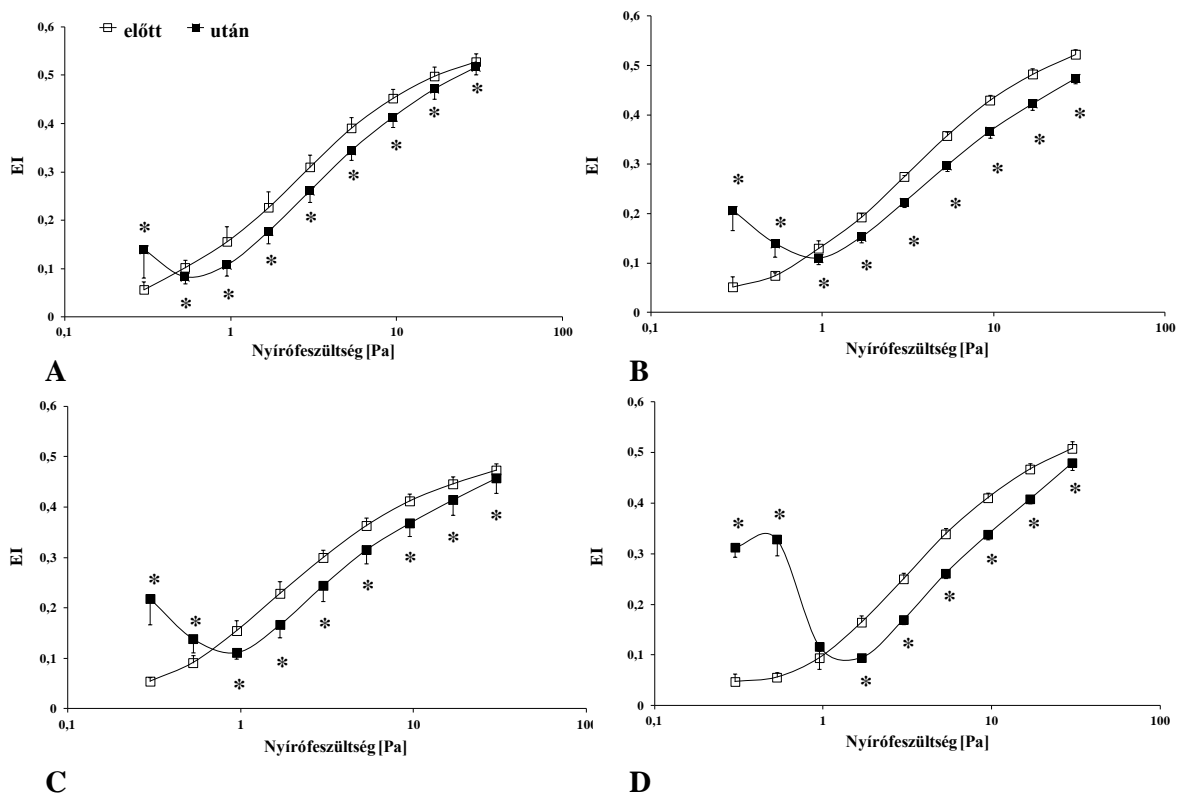
átlag ± S.D., \*  $p<0,05$  vs. humán

A vörösvérsejt deformabilitást leíró EI-SS görbék alapján látható, hogy a fajok közötti különbségek, mind a görbék alakjában, mind az EI értékekben láthatóak. Általában a legmagasabb EI értékeket patkány, míg a legalacsonyabbakat humán vérmintákban mértük. A

kutya minták EI-SS görbék alakja hasonlított leginkább a humán mintákéra, de magasabb értékekkel. A patkány és sertés minták elongációs index értéke párhuzamosan futott alacsonyabb nyírófeszültség szint mellett, majd 3 Pa felett a sertés görbék meredeksége egyenletesebbé vált. A kalkulált paraméterek (V. táblázat) jól tükrözik az EI-SS görbék fajok közötti különbségeit. Minden értéket, kivéve a kutya minták  $SS_{1/2}$  és  $EI_{max} / SS_{1/2}$  eredményeit, szignifikánsan különböztek a humán értékektől ( $p < 0,001$ ).

### 5.1.2. Vörösvérsejt membránstabilitás

A legkifejezettebb faji különbségeket 100 Pa 300 s mechanikus stressz alkalmazása során figyeltük meg (10. ábra). A 10. ábrán látható a vérminták elongációs index értékei (EI) a nyírófeszültség függvényében (SS) a mintán alkalmazott mechanikus stressz előtt és után. Kisebb nyírófeszültség és rövidebb időtartam alkalmazása alatt a különbségek csökkentek a vizsgált fajokban, de nem azonos módon.



10. ábra

Patkányok (A), beagle kutyák (B), Hungahib sertések (C) és humán (D) minták elongációs index értékei a nyírófeszültség függvényében 100 Pa 300 s mechanikus stressz alkalmazása előtt és után átlag  $\pm$  S.D.,

\*  $p < 0,05$  vs. mechanikus stressz előtti értékek

SD patkány:  $n=6$ , beagle kutya:  $n=8$ , Hungahib sertés:  $n=11$ , humán:  $n=7$

A 30 Pa mechanikai stressz során a patkány vörösvérsejtek nem mutattak szignifikáns EI romlást, mivel a mechanikai teszt utáni és előtti EI értékek aránya - mint reprezentatív paramétere az EI károsodás nagyságának - közel 1 volt és az értéke nem változott, ahogy az expozíciós idő emelkedett (11. A ábra, III. táblázat).

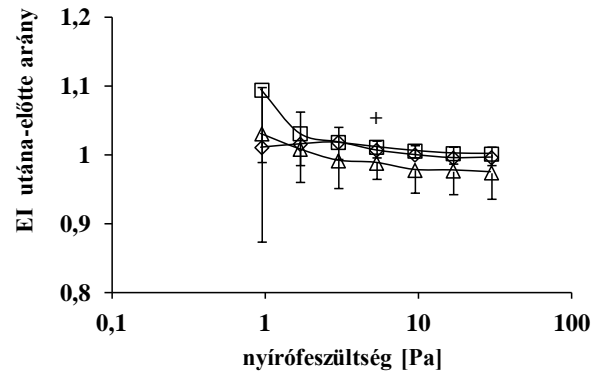
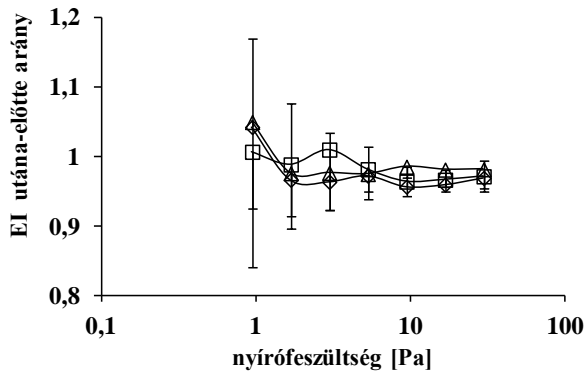
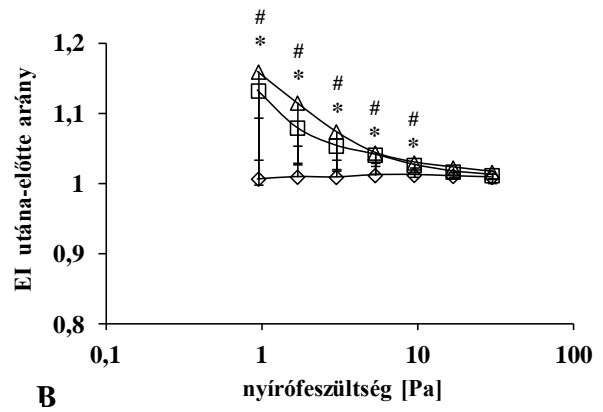
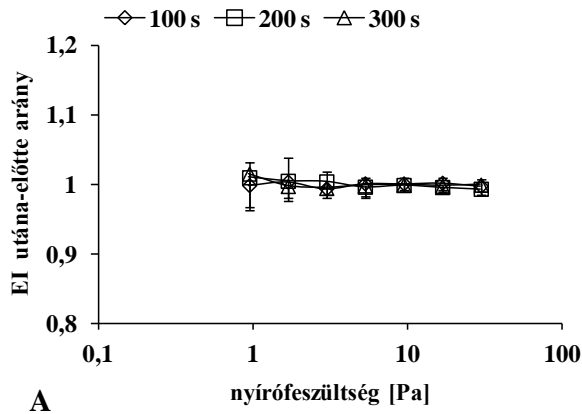
A kutyák esetén jobb deformabilitást tapasztaltunk - magasabb EI értékekkel - 30 Pa mechanikai stressz alkalmazása után. 100 s időintervallumnál szignifikánsabban magasabb elongációs index értékeket mértünk általában 10-30 Pa nyírófeszültség közötti tartományban, míg 200 és 300 s időintervallum esetében minden nyírófeszültségnél. Amint a 11. ábra is mutatja, a javulás nagysága jelentős mértékben függött az expozíciós időtől (10 Pa alatt) (11. B ábra, IV. táblázat).

Sertéseknél a 30 Pa nyírófeszültség mellett 100 másodpercig végzett mechanikai stressz (legalacsonyabb kombináció) már szignifikáns mértékben csökkentette az EI értékeket a 10-30 Pa közötti tartományban, de a nagysága - EI utána/előtte - független volt az expozíciós időtől (11. C ábra, V. táblázat).

A humán vörösvérsejtek enyhe, de nem nyilvánvaló deformabilitás javulást mutattak, amely 100 és 200 s időtartamnál is megfigyelhető (11. D ábra, VI. táblázat).

60 Pa-nál alkalmazott mechanikai stressz jelentős romlást eredményezett az EI értékekben minden nyírófeszültségnél, kivéve kutyáknál, ahol a mintákban ez a nyírófeszültség jelentős változásokat okozott az EI értékekben (10. ábra, III-VI. táblázat). Az elongációs index romlásának a nagysága alapvetően független volt az expozíció időtartamától. Enyhe különbség mutatkozott humán mintákban, valamint patkányokban alacsonyabb nyírófeszültségek esetében.

Amint azt a 10. ábra (A-D) is mutatja a legmagasabb mechanikai stressz 100 Pa 300 s volt. Az EI-SS görbék alakja 0,95 Pa alatt rendkívül szabálytalan, ez főleg a humán és legkevésbé a patkány minták esetén figyelhető meg (13. ábra, III-VI. táblázat). A legnagyobb mértékű deformabilitás csökkenést a humán vörösvérsejtek mutatták 300 s-ig alkalmazott 100 Pa-os nyírófeszültség hatására, a 0,95-10 Pa közötti tartományban az elongációs index 17,6-42,4%-kal és a 10-30 Pa közötti tartományban 5,5-12,6%-kal csökkent (kivéve a 0,95 Pa nyírófeszültséget,  $p < 0,001$  minden vizsgált nyírófeszültség érték pontnál: 1,69; 3; 5,33; 9,49; 16,87 és 30 Pa). Ugyanezek az értékek patkánynál 8,6-21,5% és 2-5,2% ( $p < 0,001$  minden vizsgált nyírófeszültség értéknél), kutyánál 14,5-20,8% és 9,2-12,3% ( $p < 0,001$  minden nyírófeszültségnél, kivéve 0,95 Pa:  $p = 0,007$ ), míg sertésnél 10,6-26,8% és 3,3-7% ( $p < 0,001$  a legtöbb nyírófeszültségnél, kivéve 16,87 és 30 Pa-nál  $p = 0,002$  és  $p = 0,024$ ).



**11. ábra**

30 Pa mechanikus stressz (100, 200 és 300 s) alkalmazása után kapott elongációs index stressz előtti értékekhez viszonyított aránya a nyírófeszültség függvényében patkány (A), kutya (B), sertés (C) és humán (D) vérmintákban.

átlag  $\pm$  S. D.

\*  $p < 0,05$ : 100 s vs. 300 s; #  $p < 0,05$ : 100 s vs. 200 s; +  $p < 0,05$ : 200 s vs. 300 s

**III. táblázat:** Membránstabilitás mérés során az alkalmazott mechanikus stressz (30, 60 vagy 100 Pa mellett 100, 200 illetve 300 secundum) utáni és előtti patkány vörösvérsejt deformabilitási értékek.

		<b>30 Pa</b>			<b>60 Pa</b>			<b>100 Pa</b>		
		<i>100 s</i>	<i>200 s</i>	<i>300 s</i>	<i>100 s</i>	<i>200 s</i>	<i>300 s</i>	<i>100 s</i>	<i>200 s</i>	<i>300 s</i>
<b>EI</b>	előtte (B)	0,309 ± 0,02	0,311 ± 0,017	0,314 ± 0,019	0,310 ± 0,018	0,314 ± 0,021	0,317 ± 0,02	0,314 ± 0,019	0,31 ± 0,029	0,31 ± 0,025
	utána (A)	0,307 ± 0,018	0,312 ± 0,014	0,312 ± 0,02	0,300 ± 0,02 *	0,300 ± 0,016 *	0,298 ± 0,017 *	0,282 ± 0,013 *	0,269 ± 0,022 *	0,261 ± 0,023 *
	<i>A/B arány</i>	<i>0,994 ± 0,023</i>	<i>1,004 ± 0,019</i>	<i>0,994 ± 0,014</i>	<i>0,967 ± 0,014 #</i>	<i>0,956 ± 0,022 #</i>	<i>0,94 ± 0,028 #</i>	<i>0,897 ± 0,024 #</i>	<i>0,871 ± 0,028 #</i>	<i>0,842 ± 0,033 #</i>
<b>EI<sub>max</sub></b>	előtte	0,573 ± 0,027	0,59 ± 0,016	0,583 ± 0,017	0,585 ± 0,018	0,578 ± 0,012	0,578 ± 0,013	0,575 ± 0,015	0,581 ± 0,017	0,572 ± 0,016
	utána	0,573 ± 0,015	0,579 ± 0,018 *	0,582 ± 0,022	0,574 ± 0,025	0,586 ± 0,009	0,576 ± 0,017	0,553 ± 0,011 *	0,541 ± 0,013 *	0,53 ± 0,016 *
	<i>A/B arány</i>	<i>1,001 ± 0,033</i>	<i>0,981 ± 0,011 #</i>	<i>0,998 ± 0,014</i>	<i>0,98 ± 0,022</i>	<i>1,013 ± 0,03 #</i>	<i>0,998 ± 0,021 #</i>	<i>0,962 ± 0,018</i>	<i>0,932 ± 0,044 #</i>	<i>0,928 ± 0,027</i>
<b>SS<sub>1/2</sub> [Pa]</b>	előtte	2,48 ± 0,39	2,53 ± 0,32	2,53 ± 0,34	2,55 ± 0,29	2,51 ± 0,37	2,38 ± 0,34	2,38 ± 0,45	2,47 ± 0,56	2,49 ± 0,56
	utána	2,53 ± 0,26	2,66 ± 0,25	2,67 ± 0,27	2,84 ± 0,44 *	2,89 ± 0,32 *	3,09 ± 0,28 *	3,59 ± 0,28 *	4,12 ± 0,48 *	4,44 ± 0,4 *
	<i>A/B arány</i>	<i>1,032 ± 0,081</i>	<i>1,058 ± 0,066 #</i>	<i>1,056 ± 0,059</i>	<i>1,113 ± 0,104 #</i>	<i>1,16 ± 0,125 #</i>	<i>1,313 ± 0,193</i>	<i>1,537 ± 0,203 #</i>	<i>1,722 ± 0,304 #</i>	<i>1,834 ± 0,308 #</i>

n=6, átlag ± S.D., \* p<0,05 vs. előtte, # p<0,05 vs. humán (adatok a VI. táblázatban)

**IV. táblázat:** Membránstabilitás mérés során az alkalmazott mechanikus stressz (30, 60 vagy 100 Pa mellett 100, 200 illetve 300 secundum) utáni és előtti kutya vörösvérsejt deformabilitási értékek.

		30 Pa			60 Pa			100 Pa		
		100 s	200 s	300 s	100 s	200 s	300 s	100 s	200 s	300 s
<b>EI</b> <b>at 3 Pa</b>	előtte (B)	0,258 ± 0,013	0,265 ± 0,004	0,265 ± 0,008	0,26 ± 0,02	0,262 ± 0,022	0,272 ± 0,003	0,274 ± 0,009	0,275 ± 0,005	0,275 ± 0,003
	utána (A)	0,26 ± 0,012	0,28 ± 0,009 *	0,285 ± 0,017 *	0,256 ± 0,022	0,258 ± 0,028	0,272 ± 0,01	0,231 ± 0,013 *	0,224 ± 0,011 *	0,223 ± 0,01 *
	<i>A/B arány</i>	<i>1,009 ± 0,026</i>	<i>1,053 ± 0,035 #</i>	<i>1,074 ± 0,053 #</i>	<i>0,982 ± 0,029 #</i>	<i>0,983 ± 0,041 #</i>	<i>1 ± 0,033 #</i>	<i>0,844 ± 0,035 #</i>	<i>0,816 ± 0,033 #</i>	<i>0,812 ± 0,036 #</i>
<b>EI<sub>max</sub></b>	előtte	0,564 ± 0,028	0,573 ± 0,018	0,565 ± 0,023	0,556 ± 0,027	0,537 ± 0,023	0,537 ± 0,019	0,543 ± 0,018	0,535 ± 0,021	0,546 ± 0,025
	utána	0,562 ± 0,027	0,579 ± 0,009	0,576 ± 0,022	0,549 ± 0,021	0,535 ± 0,026	0,549 ± 0,022	0,499 ± 0,017 *	0,49 ± 0,17 *	0,477 ± 0,007 *
	<i>A/B arány</i>	<i>0,995 ± 0,024</i>	<i>1,013 ± 0,047</i>	<i>1,02 ± 0,027</i>	<i>0,989 ± 0,056</i>	<i>0,998 ± 0,048 #</i>	<i>1,024 ± 0,05 #</i>	<i>0,919 ± 0,037</i>	<i>0,917 ± 0,049</i>	<i>0,876 ± 0,048</i>
<b>SS<sub>1/2</sub></b> <b>[Pa]</b>	előtte	4,08 ± 0,58	3,82 ± 0,71	4,1 ± 0,83	4,42 ± 0,98	4,74 ± 0,79	4,63 ± 0,75	4,42 ± 0,65	4,55 ± 0,81	4,21 ± 0,92
	utána	4 ± 0,49	3,41 ± 0,33	3,8 ± 0,54	4,54 ± 0,8	4,95 ± 1,12	4,38 ± 0,68	5,96 ± 0,55 *	6,71 ± 0,58 *	6,26 ± 0,6 *
	<i>A/B arány</i>	<i>0,985 ± 0,091</i>	<i>0,91 ± 0,136</i>	<i>0,939 ± 0,095</i>	<i>1,053 ± 0,21 #</i>	<i>1,067 ± 0,263 #</i>	<i>0,968 ± 0,223 #</i>	<i>1,379 ± 0,271 #</i>	<i>1,522 ± 0,337 #</i>	<i>1,567 ± 0,44 #</i>

n=8, átlag ± S.D., \* p<0,05 vs. előtte, # p<0,05 vs. humán (adatok a VI. táblázatban)

**V. táblázat:** Membránstabilitás mérés során az alkalmazott mechanikus stressz (30, 60 vagy 100 Pa mellett 100, 200 illetve 300 secundum) utáni és előtti sertés vörösvérsejt deformabilitási értékek.

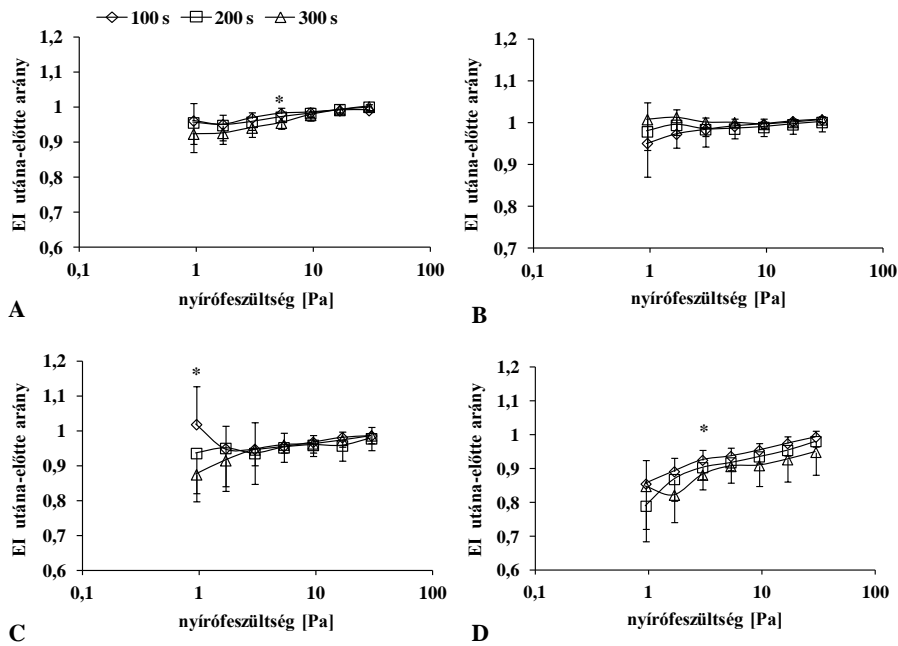
		30 Pa			60 Pa			100 Pa		
		100 s	200 s	300 s	100 s	200 s	300 s	100 s	200 s	300 s
<b>EI</b> <b>at 3 Pa</b>	előtte (B)	0,313 ± 0,018	0,301 ± 0,018	0,304 ± 0,024	0,317 ± 0,016	0,303 ± 0,017	0,304 ± 0,021	0,306 ± 0,016	0,308 ± 0,018	0,3 ± 0,016
	utána (A)	0,301 ± 0,02	0,303 ± 0,017	0,297 ± 0,025	0,3 ± 0,023 *	0,283 ± 0,025 *	0,287 ± 0,02 *	0,274 ± 0,022 *	0,255 ± 0,017 *	0,244 ± 0,031 *
	<i>A/B arány</i>	<i>0,963 ± 0,072</i>	<i>1,009 ± 0,087</i>	<i>0,976 ± 0,054</i>	<i>0,947 ± 0,076</i>	<i>0,935 ± 0,087</i>	<i>0,946 ± 0,044 #</i>	<i>0,899 ± 0,072 #</i>	<i>0,83 ± 0,057 #</i>	<i>0,815 ± 0,092 #</i>
<b>EI<sub>max</sub></b>	előtte	0,498 ± 0,018	0,518 ± 0,027	0,507 ± 0,023	0,496 ± 0,03	0,503 ± 0,014	0,501 ± 0,018	0,509 ± 0,027	0,506 ± 0,029	0,508 ± 0,032
	utána	0,485 ± 0,031	0,492 ± 0,03	0,496 ± 0,021	0,489 ± 0,03	0,478 ± 0,017 *	0,468 ± 0,025 *	0,474 ± 0,016 *	0,47 ± 0,02 *	0,449 ± 0,032 *
	<i>A/B arány</i>	<i>0,975 ± 0,053</i>	<i>0,951 ± 0,075 #</i>	<i>0,981 ± 0,073</i>	<i>0,987 ± 0,064</i>	<i>0,952 ± 0,044</i>	<i>0,935 ± 0,045</i>	<i>0,932 ± 0,034</i>	<i>0,931 ± 0,04</i>	<i>0,885 ± 0,068</i>
<b>SS<sub>1/2</sub></b> <b>[Pa]</b>	előtte	1,97 ± 0,31	1,94 ± 0,42	1,9 ± 0,36	1,92 ± 0,3	2,15 ± 0,3	2,05 ± 0,35	2,11 ± 0,21	2 ± 0,39	1,85 ± 0,31
	utána	2,12 ± 0,31	2,02 ± 0,32	2,12 ± 0,37	2,6 ± 0,41 *	3,15 ± 0,54 *	3,23 ± 0,31 *	4,22 ± 0,49 *	5,18 ± 0,49 *	5,14 ± 0,89 *
	<i>A/B arány</i>	<i>1,096 ± 0,243</i>	<i>1,071 ± 0,189</i>	<i>1,151 ± 0,031 #</i>	<i>1,367 ± 0,215</i>	<i>1,483 ± 0,309</i>	<i>1,624 ± 0,35</i>	<i>2,018 ± 0,306</i>	<i>2,681 ± 0,626</i>	<i>2,812 ± 0,443</i>

n=11, átlag ± S.D., \* p<0,05 vs. előtte, # p<0,05 vs. humán (adatok a VI. táblázatban)

**VI. táblázat:** Membránstabilitás mérés során az alkalmazott mechanikus stressz (30, 60 vagy 100 Pa mellett 100, 200 illetve 300 secundum) utáni és előtti humán vörösvérsejt deformabilitási aránya.

		<b>30 Pa</b>			<b>60 Pa</b>			<b>100 Pa</b>		
		<i>100 s</i>	<i>200 s</i>	<i>300 s</i>	<i>100 s</i>	<i>200 s</i>	<i>300 s</i>	<i>100 s</i>	<i>200 s</i>	<i>300 s</i>
<b>EI</b> <b>at 3 Pa</b>	előtte (B)	0,249 ± 0,012	0,248 ± 0,013	0,25 ± 0,015	0,252 ± 0,011	0,248 ± 0,009	0,247 ± 0,01	0,245 ± 0,014	0,246 ± 0,012	0,25 ± 0,012
	utána (A)	0,253 ± 0,011	0,253 ± 0,016	0,248 ± 0,021	0,233 ± 0,013 *	0,224 ± 0,016 *	0,218 ± 0,017 *	0,193 ± 0,009 *	0,174 ± 0,01 *	0,17 ± 0,009 *
	<i>A/B arány</i>	<i>1,018 ± 0,022</i>	<i>1,018 ± 0,024</i>	<i>0,991 ± 0,04</i>	<i>0,924 ± 0,029</i>	<i>0,902 ± 0,037</i>	<i>0,88 ± 0,042</i>	<i>0,786 ± 0,035</i>	<i>0,709 ± 0,033</i>	<i>0,679 ± 0,022</i>
<b>EI<sub>max</sub></b>	előtte	0,54 ± 0,032	0,528 ± 0,024	0,524 ± 0,011	0,534 ± 0,027	0,533 ± 0,028	0,525 ± 0,031	0,523 ± 0,026	0,519 ± 0,052	0,522 ± 0,026
	utána	0,546 ± 0,026	0,547 ± 0,032	0,53 ± 0,041	0,511 ± 0,016 *	0,495 ± 0,02 *	0,471 ± 0,04 *	0,467 ± 0,036 *	0,469 ± 0,031 *	0,478 ± 0,012 *
	<i>A/B arány</i>	<i>1,011 ± 0,022</i>	<i>1,037 ± 0,024</i>	<i>1,013 ± 0,04</i>	<i>0,959 ± 0,029</i>	<i>0,929 ± 0,037</i>	<i>0,899 ± 0,042</i>	<i>0,908 ± 0,035</i>	<i>0,908 ± 0,033</i>	<i>0,917 ± 0,022</i>
<b>SS<sub>1/2</sub></b> <b>[Pa]</b>	előtte	4,09 ± 0,73	4,23 ± 0,65	4,38 ± 0,86	4,19 ± 0,62	4,1 ± 0,57	4,27 ± 1	4,2 ± 0,78	4,12 ± 0,93	4,23 ± 0,82
	utána	3,71 ± 0,68	3,82 ± 0,84	3,65 ± 0,56	5,53 ± 0,64 *	6,01 ± 1,02 *	5,9 ± 0,98 *	7,82 ± 0,62 *	9,44 ± 0,71 *	10,13 ± 0,78 *
	<i>A/B arány</i>	<i>0,915 ± 0,113</i>	<i>0,906 ± 0,146</i>	<i>0,865 ± 0,214</i>	<i>1,333 ± 0,126</i>	<i>1,47 ± 0,195</i>	<i>1,419 ± 0,251</i>	<i>1,953 ± 0,351</i>	<i>2,379 ± 0,493</i>	<i>2,456 ± 0,392</i>

n=7, átlag ± S.D., \* p<0,05 vs. előtte

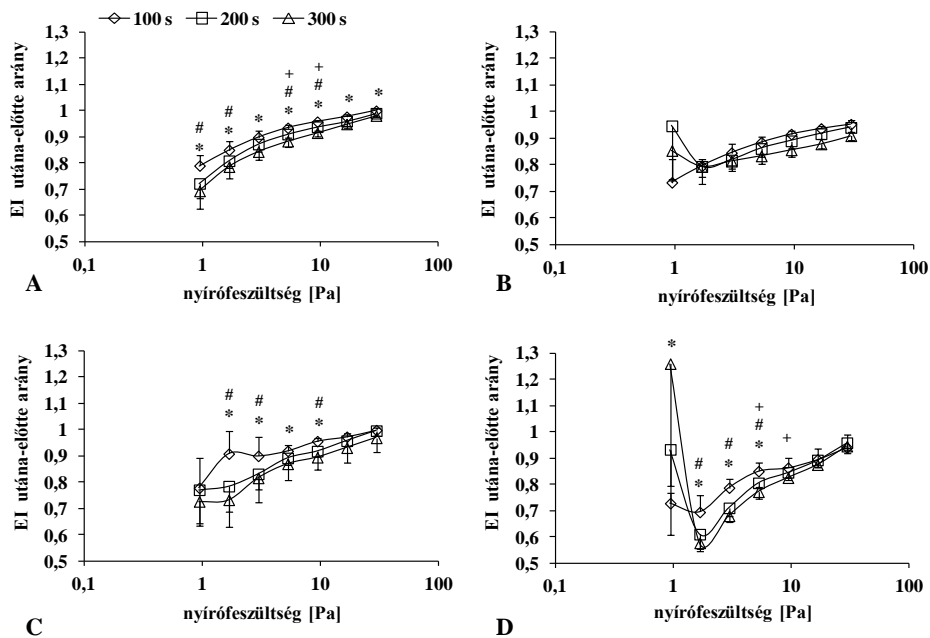


**12. ábra**

60 Pa mechanikus stressz (100, 200 és 300 s) alkalmazása után kapott elongációs index stressz előtti értékekhez viszonyított aránya a nyírófeszültség függvényében patkány (A), kutya (B), sertés (C) és humán (D) vérmintákban.

átlag  $\pm$  S. D.

\*  $p < 0,05$ : 100 s vs. 300 s; #  $p < 0,05$ : 100 s vs. 200 s; +  $p < 0,05$ : 200 s vs. 300 s



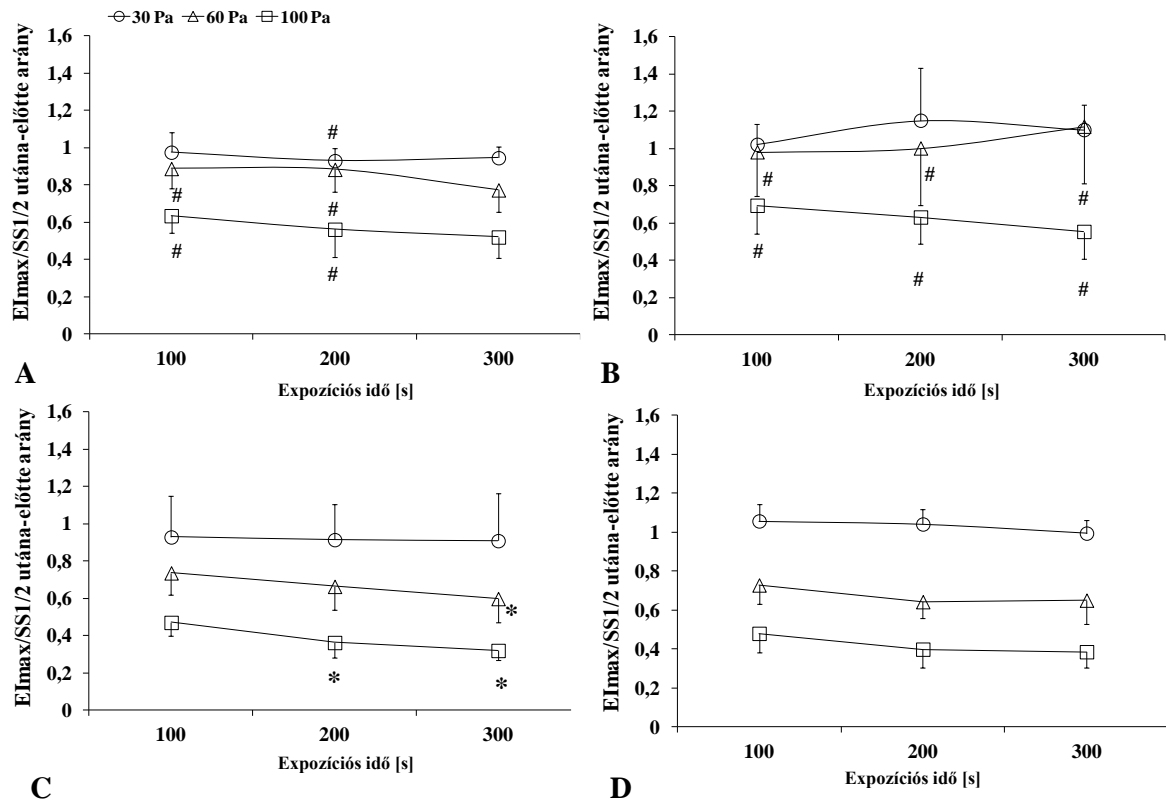
**13. ábra**

100 Pa mechanikus stressz (100, 200 és 300 s) alkalmazása után kapott elongációs index stressz előtti értékekhez viszonyított aránya a nyírófeszültség függvényében patkány (A), kutya (B), sertés (C) és humán (D) vérmintákban.

átlag  $\pm$  S. D.

\*  $p < 0,05$ : 100 s vs. 300 s; #  $p < 0,05$ : 100 s vs. 200 s; +  $p < 0,05$ : 200 s vs. 300 s

Mind a négy faj esetében az  $EI_{\max} / SS_{1/2}$  értékek csökkentek az expozíciós idő növelésével 100 Pa nyírófeszültség mellett (14. ábra). 30 Pa-on való mérés esetében az értékek nem változtak az expozíciós idővel. A kutya vérmintákban enyhe javulást tapasztaltunk. 60 Pa nyírófeszültség alkalmazása mellett az értékek patkányokban mérsékelten csökkentek, kutyákban emelkedtek és csökkentek humán és sertés vérben.



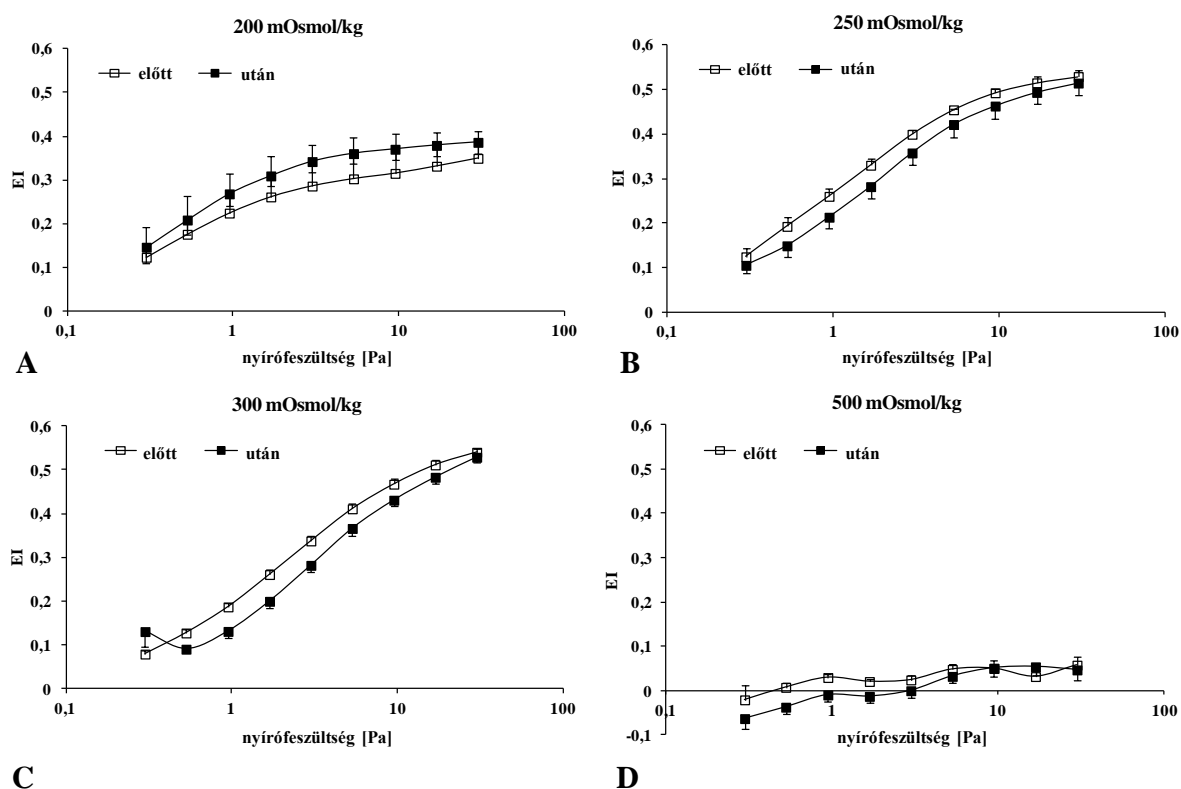
14. ábra

Maximális elongációs értékek ( $EI_{\max}$ ) és ennek a feléhez tartozó nyírófeszültség relatív értékei a mintákon alkalmazott 30,60 és 100 Pa nagyságú mechanikus stressz előtt és után kapott értékek összevetésével SD patkányok (A), beagle kutyák (B), Hungahib sertések (C) és humán (D) vérmintákban a mechanikus stressz idejének függvényében átlag  $\pm$  S.D.

\*  $p < 0,05$  vs. 100 s; #  $p < 0,05$  vs. humán, azonos nagyságú mechanikus stressznél  
SD patkány:  $n=6$ , beagle kutya:  $n=8$ , Hungahib sertés:  $n=11$ , humán:  $n=7$

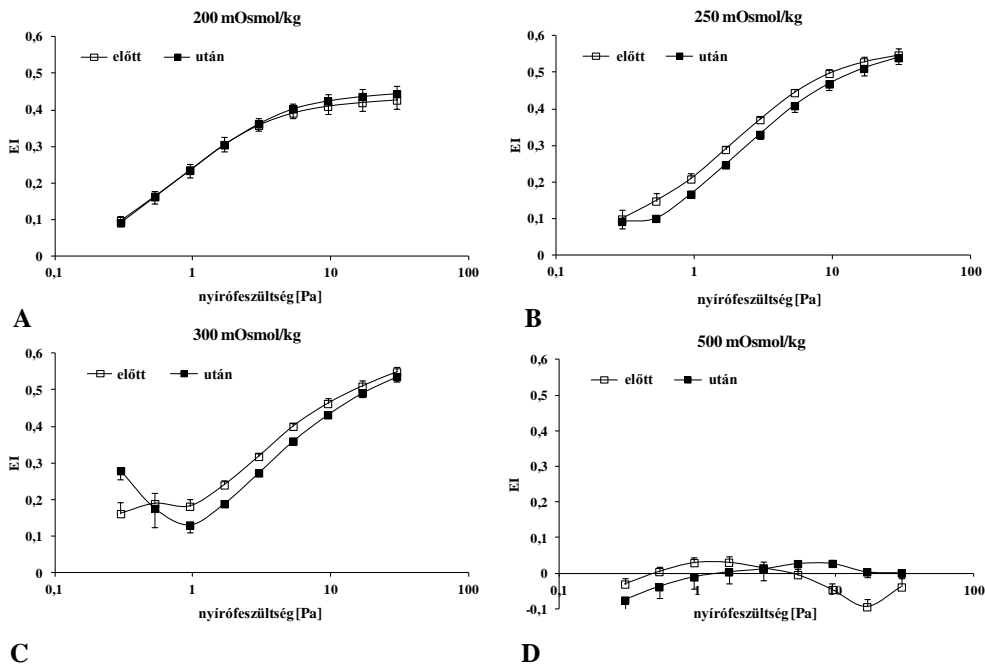
### 5.1.3. A vörösvérsejt membránstabilitási adatok ozmolalitás függő változásai

Az ozmolalitás mind hypo-, mind hyperozmolaris irányban változik, ami nagymértékben befolyásolta a mechanikai stabilitási teszt eredményeit (100 Pa 300 s) (15-18. ábra). Érdekes módon, hypoozmoláris PVP-PBS oldat (200 mOsm/kg) alkalmazásával végzett méréseknél mind a 4 faj esetében javult a deformabilitás, leginkább patkány és sertés mintákban (15. és 17. A ábra). 500 mOsm/kg-nál nem láthatók nyilvánvaló változások, a zsugorodott sejtek által okozott szabálytalan görbék miatt (15-18. ábra, D).



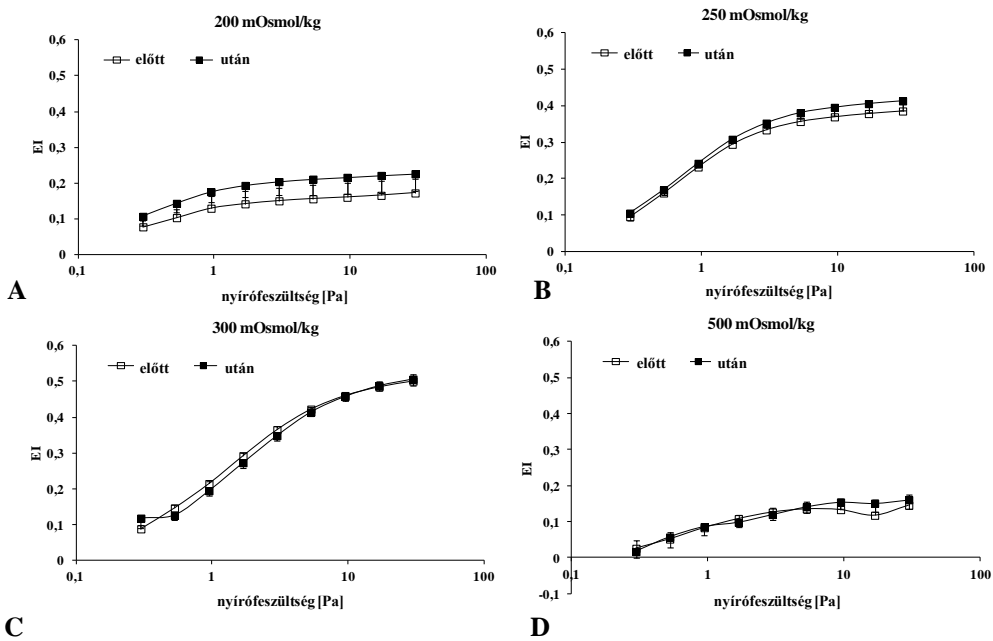
15. ábra

Patkány elongációs index értékei a nyirófeszültség [Pa] függvényében a mintán alkalmazott 100 Pa, 300 s mechanikus stressz előtt és után 200 mOsm/kg (A), 250 mOsm/kg (B), 300 mOsm/kg (C) és 500 mOsm/kg (D) ozmolalítású szuszpenziós közeg alkalmazásakor  
átlag  $\pm$  S.D.; n=6



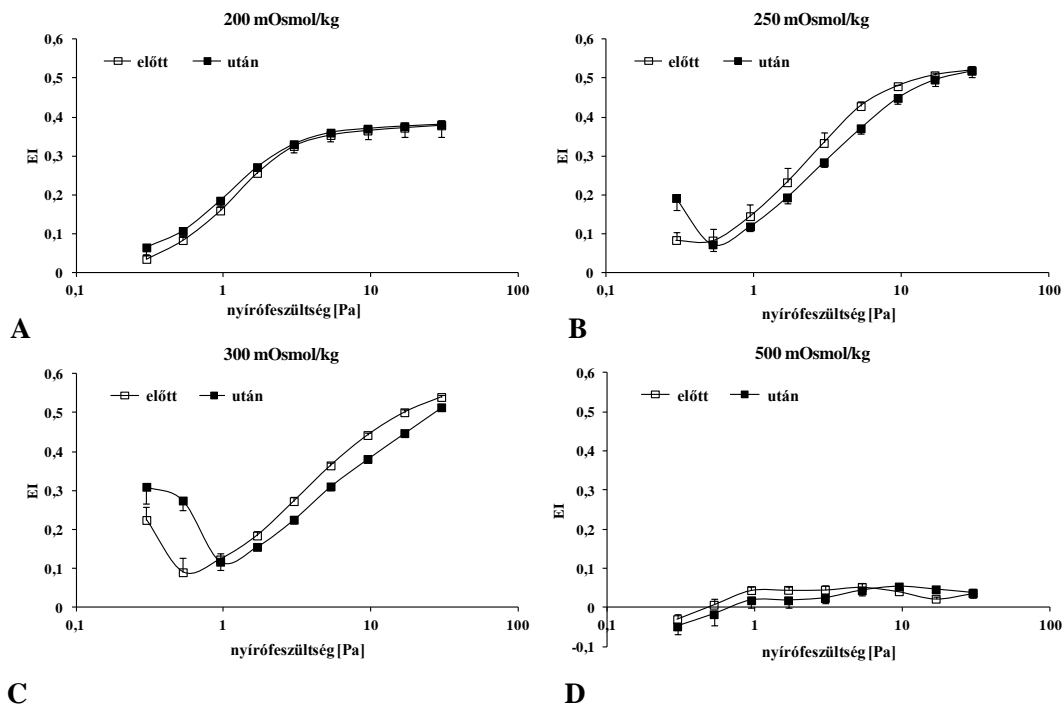
**16. ábra**

Beagle kutya elongációs index értékei a nyírőfeszültség [Pa] függvényében a mintán alkalmazott 100 Pa, 300 s mechanikus stressz előtt és után 200 mOsm/kg (A), 250 mOsm/kg (B), 300 mOsmol/kg (C) és 500 mOsm/kg (D) ozmolalitású szuszpenziós közeg alkalmazásakor  
 átlag  $\pm$  S.D.; n=8



**17. ábra**

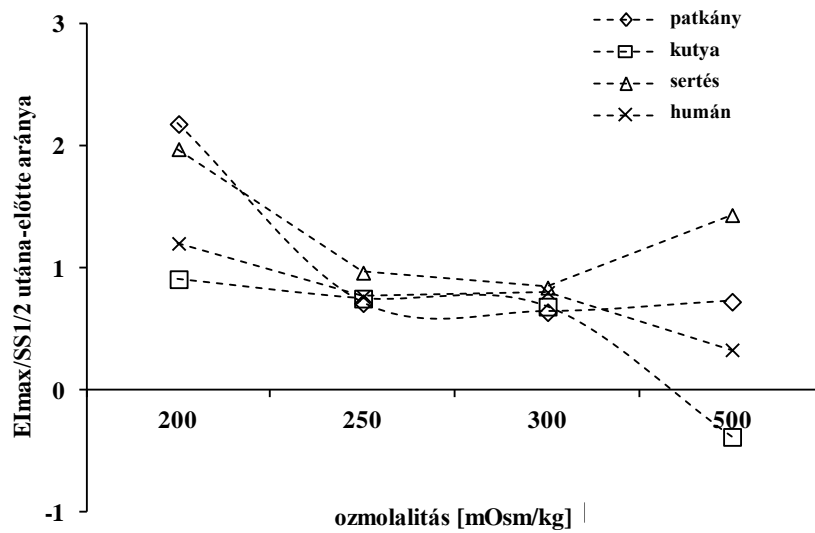
Hungahib sertés elongációs index értékei a nyírőfeszültség [Pa] függvényében a mintán alkalmazott 100 Pa, 300 s mechanikus stressz előtt és után 200 mOsm/kg (A), 250 mOsm/kg (B), 300 mOsmol/kg (C) és 500 mOsm/kg (D) ozmolalitású szuszpenziós közeg alkalmazásakor  
 átlag  $\pm$  S.D.; n=11



**18. ábra**

Humán minták elongációs index értékei a nyírófeszültség [Pa] függvényében a mintán alkalmazott 100 Pa, 300 s mechanikus stressz előtt és után 200 mOsm/kg (A), 250 mOsm/kg (B), 300 mOsm/kg (C) és 500 mOsm/kg (D) ozmolalítású szuszpenziós közeg alkalmazásakor  
 átlag  $\pm$  S.D.; n=7

A vizsgált fajok ozmotikus gradiens ektacytometriás (osmoscan) paramétereinek összehasonlításában jelentős különbségek figyelhetőek meg (19. ábra). A legmagasabb értékeket alacsony ozmolalításnál figyeltük meg, bár a 250 és 300 mOsmol/kg adatok is hasonló eredményt mutattak, a hyperozmoláris állapot az értékek csökkenését váltotta ki, sertésnél viszont enyhe emelkedés látható. Patkány mintákban a különbség a 250 és 500 mOsmol/kg értékek között volt a legkisebb, és alig változott, míg a kutya vérminták a 200-300 mOsmol/kg tartományban viszonylag stabilak maradtak, és magasabb ozmolalítás esetén az értékek csökkentek. A humán értékek változtak a legkisebb tartományban, de nyilvánvaló irányba: az ozmolalítás növekedésével az értékek csökkentek (19. ábra).



**19. ábra**

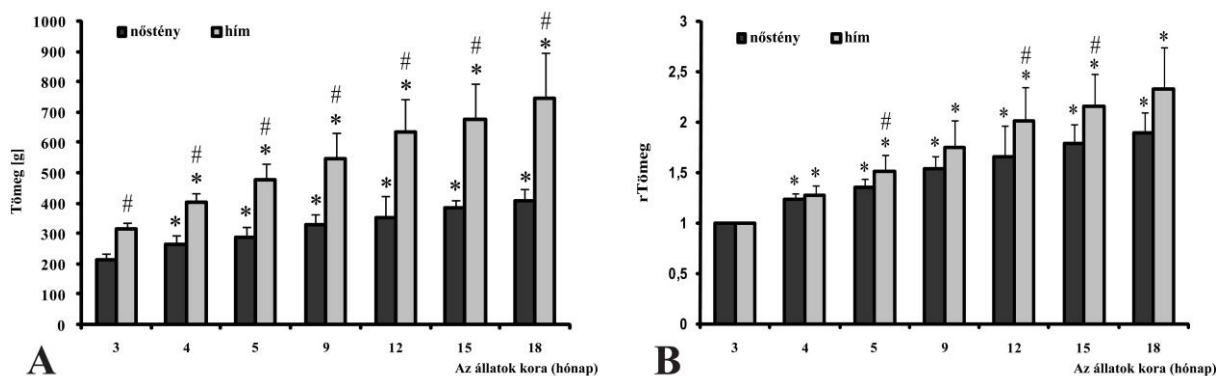
Maximális elongációs értékek ( $EI_{max}$ ) és ennek a feléhez tartozó nyírófeszültség relatív értékei a mintákon alkalmazott 100 Pa 300 s mechanikus stressz előtt és után kapott értékek összevetésével patkányok (A), beagle kutyák (B), Hungahib sertések (C) és humán (D) vérmintákban az osmolalitás függvényében

## 5.2. A haematologiai és haemorheologiai paraméterek nemi és korfüggő vizsgálatai

### 5.2.1. Testtömeg változások és az oestrus ciklus

Az állatok testtömege a vártnak megfelelően jelentősen gyarapodott a követéses időszak során. Jól látható, hogy az állatok 5 hónapos korától kezdve szignifikáns különbség jelentkezett a nőstény és hím állatok testsúlya között. A nőstények testsúlya átlagosan 89,9%-kal, a hímeké 133,4 %-kal nőtt a követéses időszak végére, az állatok 15 hónapos korára (20. ábra).

Az VII. táblázatban a nőstények oestrus ciklusának változását tüntettük fel %-os arányban.



20. ábra

Azonos korú hím és nőstény Crl:WI patkányok abszolút [g] (A) és relatív (B) testtömeg változásai a követéses periódus alatt az állatok 3, 4, 5, 9, 12, 15 és 18 hónapos korában.

átlag  $\pm$  S.D.

\*  $p < 0.05$  vs. 3. hónap, #  $p < 0.05$  vs. nőstény

**VII. táblázat:** Az oestrus ciklus fázisainak eloszlása azonos korú CrI:WI nőtény patkányokban a mintavételi dőpontjában, %-os arányban feltüntetve, a hüvely kenet domináns mikroszkópos képe alapján (Cora és mtsai, 2015). A mintavételek az állatok 3, 4, 5, 9, 12, 15 és 18 hónapos korában végeztük.

Kor (hónap)	3	4	5	9	12	15*	18*
Pro-oestrus	40%				100%	12,5%	100%
Oestrus	60%		20%			75%	
Metooestrus			80%	100%		12,5%	
Dioestrus		100%					

\*az értékelt kenetek száma = 8

### 5.2.2 Haematologiai paraméterek

A fehérvérsejtszám (Fvs [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]), a monocyta-granulocyta arány (Mo+Gr [%]), a vörösvérsejtszám (Vvs [ $10^6/\mu\text{l}$ ]) és a thrombocyta (Thr [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]) értékeket a 21. ábra mutatja be. A többi haematologiai paramétert a VIII. táblázat foglalja össze.

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

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

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

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

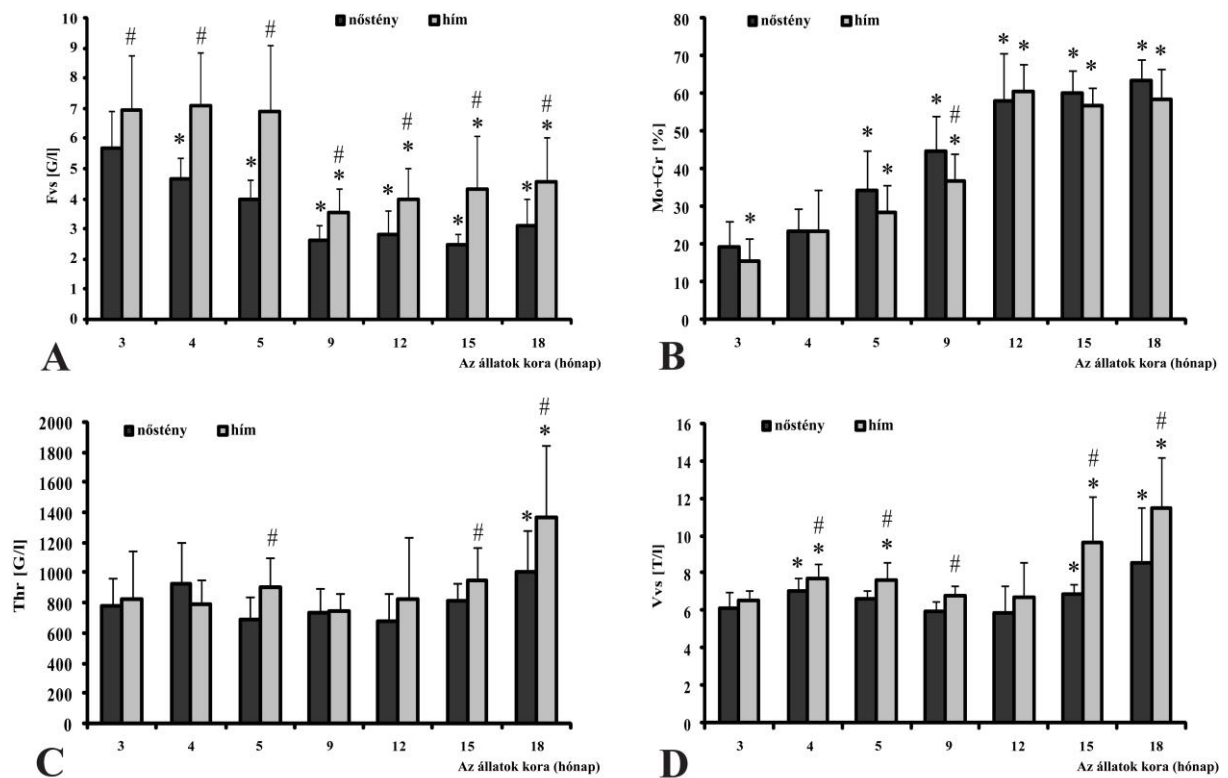
A haemoglobin koncentráció (Hgb [g/dl]) szignifikánsan nagyobb volt a hímeben az állatok 3 ( $p=0,047$ ), 4 ( $p=0,002$ ), 5 ( $p=0,016$ ), 9 ( $p<0,001$ ) és 15 ( $p<0,001$ ) hónapos korára. A VIII. táblázat azt mutatja, hogy az értékek a 15. hónapban (március) voltak a legmagasabbak. Az eredmények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

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

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

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

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



**21. ábra**

Hematologiai értékek azonos korú hím és nőstény Crl:WI patkányok 3, 4, 5, 9, 12, 15 és 18 hónapos korában: fehérvérsejt szám (A), monocyta-granulocyta arány (B), trombocyta szám (C), vörösvérsejt szám (D).

átlag  $\pm$  S.D., \*  $p < 0,05$  vs. 3. hónap, #  $p < 0,05$  vs. nőstény

**VIII. táblázat:** Haematologiai paraméterek hím és nőstény patkányokban. A mintavétel azonos korú Crl:WI hím és nőstény patkányokból történt a követési periódus alatt az állatok 3, 4, 5, 9, 12, 15 és 18 hónapos korában.

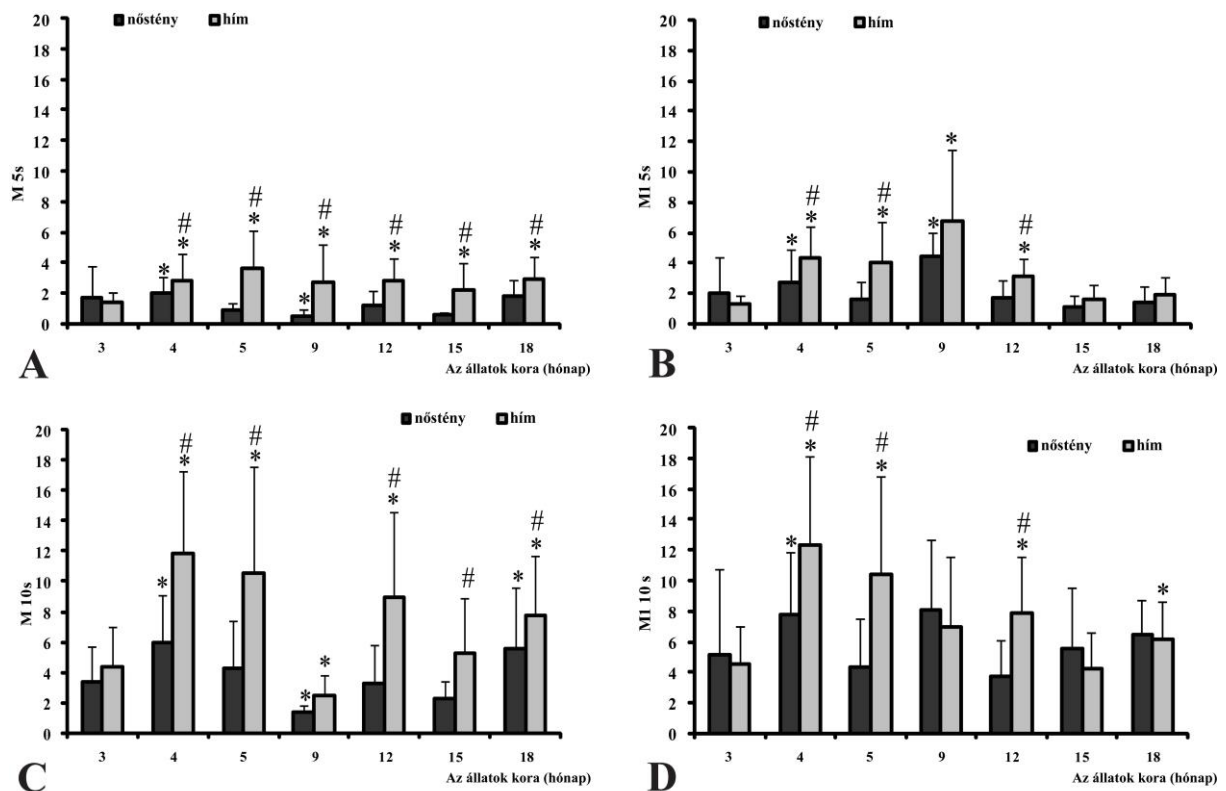
		Követési időszak (az állatok kora)						
		3. hónapos	4. hónapos	5. hónapos	9. hónapos	12. hónapos	15. hónapos	18. hónapos
Hgb [g/dl]	hím	12,84 ± 0,74 <sup>#</sup>	13,05 ± 0,72 <sup>#</sup>	12,6 ± 0,8 <sup>#</sup>	12,02 ± 0,38 <sup>*#</sup>	12,19 ± 1,49	14,9 ± 3,72 <sup>*#</sup>	14,09 ± 1,98
	nőstény	12,41 ± 0,58	12,09 ± 1,03	11,97 ± 0,78 <sup>*</sup>	10,82 ± 0,32 <sup>*</sup>	11,84 ± 1,7	11,42 ± 0,42 <sup>*</sup>	13,21 ± 4,13 <sup>*</sup>
Hct [%]	hím	45,47 ± 4,13	46,69 ± 6,04	47,85 ± 6,93 <sup>#</sup>	39,87 ± 5,85 <sup>*#</sup>	39,64 ± 10,82	56,01 ± 14,62 <sup>*#</sup>	65,64 ± 14,77 <sup>*</sup>
	nőstény	41,57 ± 6,93	46,21 ± 5,98 <sup>*</sup>	40,95 ± 3,58	36,6 ± 4,45 <sup>*</sup>	36,29 ± 8,41 <sup>*</sup>	43,92 ± 1,6	52,89 ± 16,87 <sup>*</sup>
MCV [fl]	hím	69,64 ± 5,9	60,28 ± 3,13 <sup>*#</sup>	62,82 ± 3,88 <sup>*</sup>	59,65 ± 3,65 <sup>*#</sup>	59,22 ± 2,23 <sup>*</sup>	57,93 ± 2,63 <sup>*</sup>	57,5 ± 1,46 <sup>*#</sup>
	nőstény	68,31 ± 3,83	65,79 ± 3,16 <sup>*</sup>	61,69 ± 3,44 <sup>*</sup>	61,17 ± 2,05 <sup>*</sup>	62,11 ± 4,82 <sup>*</sup>	63,88 ± 4,48 <sup>*</sup>	64,98 ± 11,24 <sup>*</sup>
MCH [pg]	hím	19,68 ± 1,41	16,98 ± 1,15 <sup>*</sup>	16,71 ± 1,53 <sup>*#</sup>	17,88 ± 1,4 <sup>*</sup>	19,53 ± 5,52 <sup>*#</sup>	15,68 ± 2,38 <sup>*</sup>	12,88 ± 2,35 <sup>*#</sup>
	nőstény	20,78 ± 2,76	17,3 ± 0,74 <sup>*</sup>	18,07 ± 1,15 <sup>*</sup>	18,26 ± 1,71 <sup>*</sup>	20,77 ± 3,51	16,63 ± 1,31 <sup>*</sup>	16,24 ± 2,9 <sup>*</sup>
MCHC [g/dl]	hím	28,44 ± 2,95	28,25 ± 2,69 <sup>#</sup>	26,73 ± 3,08 <sup>*#</sup>	30,09 ± 2,9	32,87 ± 9,19	27,04 ± 3,98	22,31 ± 3,61 <sup>*#</sup>
	nőstény	30,46 ± 4,05	26,37 ± 1,89 <sup>*</sup>	29,32 ± 1,49	29,94 ± 3,5	33,47 ± 5,09	26,06 ± 1,67 <sup>*</sup>	25,19 ± 3,93 <sup>*</sup>

átlag ± S.D., \*p<0,05 vs. 3. hónap, # p<0,05 vs. nőstény

### 5.2.3. Haemorheologiai paraméterek

#### 5.2.3.1. A vörösvérsejt aggregatio

Az erythrocyta aggregációs értékeket a 22. ábra mutatja be. A vörösvérsejt aggregációs index értékek a hímekben, kezdetben alacsonyabbak voltak, mint nőstényekben. Eleinte magasabb M1 5 s és M1 10 s aggregációs index értékeket találtunk nőstényekben és magasabb M 5 s és M 10 s értékeket hímekben. Az állatok 4. és 5. hónapos korára (tavaszi hónapok) azonban jelentősen nőttek (áprilisban hím vs. nőstény M 5 s:  $p=0,011$ ; M1 5 s:  $p=0,001$ ; M 10 s:  $p<0,001$ ; M1 10 s:  $p<0,001$ ; májusban M 5 s:  $p<0,001$ ; M1 5 s:  $p<0,001$ ; M 10 s:  $p<0,001$ ; M1 10 s:  $p<0,001$ ). A téli időszakban nőstényekben újra aggregációs index emelkedés, hímekben csökkenés volt megfigyelhető. A megfigyelési időszak végén az M 10s és M1 10s értékek magasabbak voltak a fiatalabb korú patkányokhoz viszonyítva mindkét nemben. Összességében a négy paraméternél jellegzetes egyirányú változást nem látunk. Növekedés, csökkenés egyaránt megfigyelhető a követéses időszak alatt.



22. ábra

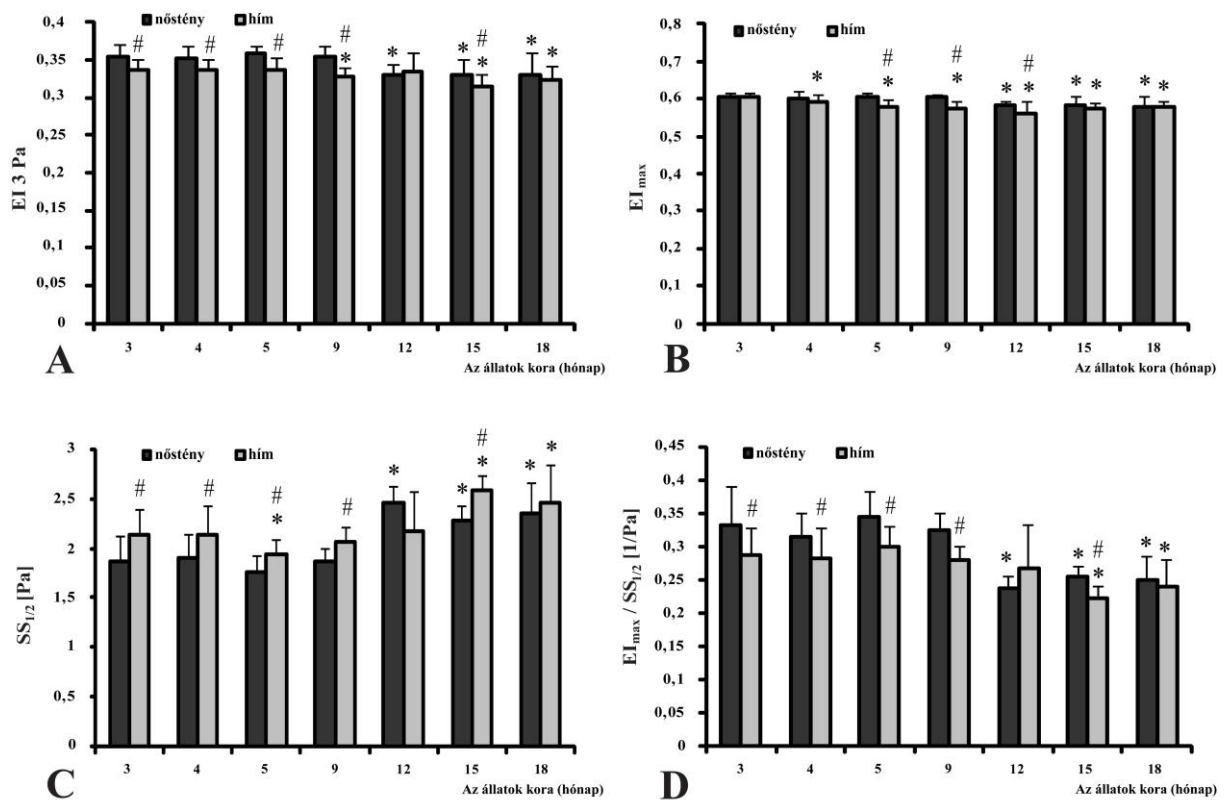
M5 s (A), M1 5 s (B), M10 s (C) és M1 10 s (D) aggregációs index értékek változásai azonos korú hím és nőstény Crl:WI patkányokban az állatok 3, 4, 5, 9, 12, 15 és 18 hónapos korában.

átlag  $\pm$  S.D.,

\*  $p<0,05$  vs. 3. hónap, #  $p<0,05$  vs. nőstény

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

A 23. ábrán a LoRRca készülékkel meghatározott deformabilitás paraméterek változásait ábrázoltuk. Nőstényekben a 3 Pa nyírófeszültségnél mért értékek szignifikánsan magasabbak voltak, mint a hímekben. Az állatok 9 hónapos korában az eredmények csökkenő tendenciát mutattak (23.A ábra). A 13.B ábra elemzése alapján a hímek rendelkeztek alacsonyabb  $EI_{max}$  értékekkel, szignifikáns nemi különbségeket is jelezve az 5., 9. és 12 hónapban ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ;  $p = 0,029$ ). Az  $SS_{1/2}$  értékek [Pa] esetében emelkedést tapasztaltunk a követéses időszak végére (23.C ábra).  $EI_{max}/SS_{1/2}$  a 3. és 9. hónap közötti időszakban a hímekben szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk (3. hónap:  $p = 0,004$ ; 4. hónap:  $p = 0,001$ ; 5. hónap:  $p < 0,001$ ; 9. hónap:  $p < 0,001$ ). A 12 és 18. hónap között jelentősen lecsökkentek az értékek mindkét csoportban (23.D ábra).



23. ábra

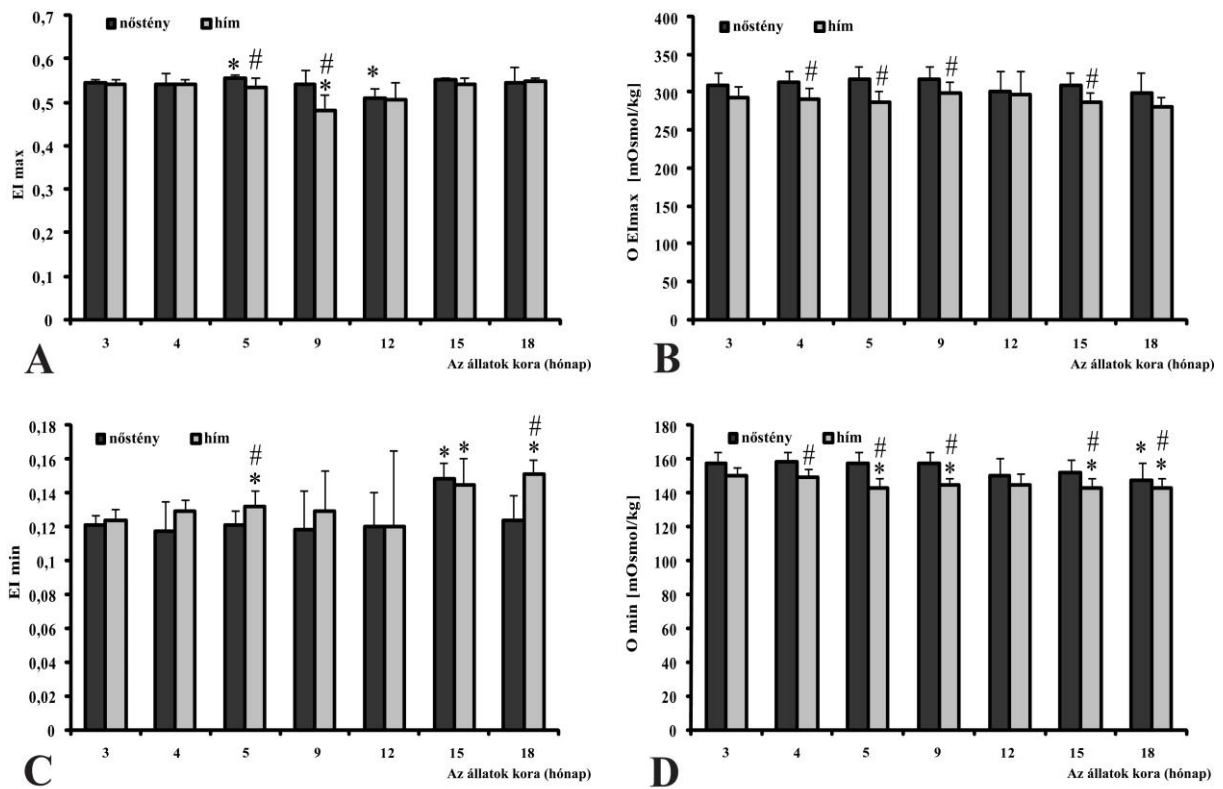
$EI_{3 Pa}$  (A), maximális elongációs index (B),  $EI_{max}$  (C),  $EI_{max}$  és  $SS_{1/2}$  aránya (D) azonos korú hím és nőstény Crl:WI patkányokból az állatok 3, 4, 5, 9, 12, 15 és 18 hónapos korában.

átlag  $\pm$  S.D.,

\*  $p < 0,05$  vs. 3. hónap, #  $p < 0,05$  vs. nőstény

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

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



## 24. ábra

30 Pa nyírófeszültség alkalmazásával végzett osmoscan mérések azonos korú hím és nőstény Crl:WI patkányokban (kor: 3, 4, 5, 9, 12, 15 és 18 hónapok): maximális EI (A), maximális elongációs indexhez tartozó ozmolaritás (B), minimális elongációs index (C) és minimális elongációs indexhez tartozó ozmolaritás (D)

átlag ± S.D.,

\*  $p < 0,05$  vs. 3. hónap, #  $p < 0,05$  vs. nőstény

**IX. táblázat:** Az osmoscan mérések paraméterei 30 Pa nyírófeszültség mellett. A mintákat azonos korú Crl:WI hím és nőstény patkányokból vettük a követési periódus alatt az állatok 3, 4, 5, 9, 12, 15 és 18 hónapos korában.

		Követési periódus (az állatok kora)						
		3. hónapos	4. hónapos	5. hónapos	9. hónapos	12. hónapos	15. hónapos	18. hónapos
<b>EI hyper</b>	hím	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,01 <sup>#</sup>	0,24 ± 0,02 <sup>*#</sup>	0,25 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,01
	nőstény	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,01 <sup>*</sup>	0,27 ± 0,02	0,26 ± 0,01 <sup>*</sup>	0,28 ± 0,00	0,27 ± 0,02
<b>O hyper</b> <b>[mOsm/kg]</b>	hím	453,4 ± 14,63 <sup>#</sup>	446,1 ± 8,67 <sup>#</sup>	447,7 ± 9,84 <sup>#</sup>	471,33 ± 10,32 <sup>*#</sup>	439,5 ± 11,74 <sup>*</sup>	422,38 ± 6,37 <sup>*#</sup>	425,86 ± 9,19 <sup>*</sup>
	nőstény	466,2 ± 10,23	461,7 ± 8,83	458,7 ± 7,24	460,78 ± 7,9	431 ± 9 <sup>*</sup>	436,38 ± 7,82 <sup>*</sup>	425,63 ± 8,65 <sup>*</sup>
<b>AUC</b>	hím	149,09 ± 6,29	146,19 ± 5,1	148,13 ± 8,12	128,19 ± 13,89 <sup>*#</sup>	134,29 ± 17,32 <sup>*</sup>	143,14 ± 5,83	148,8 ± 3,3
	nőstény	148,19 ± 4,89	144,61 ± 10,25	153,85 ± 4,18 <sup>*</sup>	145,36 ± 12,2	131,46 ± 10,46 <sup>*</sup>	146,53 ± 4,26	145,26 ± 10,74
<b>ΔEI</b>	hím	0,42 ± 0,02	0,41 ± 0,01	0,4 ± 0,03 <sup>#</sup>	0,35 ± 0,04 <sup>*#</sup>	0,38 ± 0,02 <sup>*</sup>	0,4 ± 0,03	0,4 ± 0,01 <sup>*#</sup>
	nőstény	0,42 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,42 ± 0,04	0,39 ± 0,02 <sup>*</sup>	0,4 ± 0,02 <sup>*</sup>	0,42 ± 0,05
<b>ΔO</b>	hím	143,1 ± 11,32	142,1 ± 12,48 <sup>#</sup>	145,4 ± 11,44 <sup>#</sup>	155,11 ± 15,85	152,25 ± 27,85	144,38 ± 8,31 <sup>#</sup>	138,29 ± 8,08
	nőstény	152,1 ± 12,73	154,9 ± 13,48	158,7 ± 13,04	159,33 ± 13,23	151,78 ± 17,93	156,63 ± 12,35	152,63 ± 15,86
<b>ΔEI/ ΔO</b>	hím	0,003 ± 0,0003	0,003 ± 0,0002	0,003 ± 0,0002	0,002 ± 0,0003 <sup>*#</sup>	0,003 ± 0,0004 <sup>*</sup>	0,003 ± 0,0002	0,003 ± 0,0002
	nőstény	0,003 ± 0,0002	0,003 ± 0,0003	0,003 ± 0,0002	0,003 ± 0,0002	0,003 ± 0,0002	0,003 ± 0,0003	0,003 ± 0,0003

átlag ± S.D., \*p<0,05 vs. 3. hónap, # p<0,05 vs. nőstény

## 6. MEGBESZÉLÉS

### 6.1. Membránstabilitás és osmoscan vizsgálatok különböző nyírófeszültség és időtartam kombinációk mellett

Az irodalomban nagyon kevés adat áll rendelkezésre a vörösvérsejt mechanikai stresszről. A vörösvérsejtek mechanikai stabilitása elengedhetetlen a keringésben való túléléshez. Fiziológiai körülmények között az erythrocytákra ható nyíróerő általában 5 Pa alatt van és nem haladja meg a 10 Pa értéket.<sup>31,78,79</sup> Azonban, patofiziológiai folyamatok vagy nem fiziológias keringési állapotok okozhatják a nyírófeszültség növekedését, ami az erythrocyták membránkárosodásához vezethet.<sup>35,80</sup> A mechanikai károsodás mértéke – amely subletalis és később haemolyticus traumát okoz a vörösvérsejteknek - attól függ, hogy mekkora a nyírófeszültség nagysága és expozíciós ideje<sup>31,80,81</sup>, valamint a sejtek mechanikai stabilitása.<sup>80,82,83</sup> Az örökletes membrán rendellenességek és a vörösvérsejtek emzimopátiái vagy bármely olyan patofiziológiai folyamat, amely a vörösvérsejtek károsodását okozza, károsítja a membránt.<sup>40,84,85,86,87</sup> A mechanikai sérülés végpontja a sejtek lízise, ami a membrán felszakadásával jár. A mechanikai trauma, amely még nem okoz haemolysist, de a sejtek micro-rheologia paramétereinek a romlását eredményezi, mint például deformabilitás, aggregatio, azt sublethalis traumának nevezzük.<sup>31</sup> Brinsfield és munkatársai említették ezt először 1962-ben, amikor azt tapasztalták, hogy kísérleti állatokban csökkent a vörösvérsejt szám 10-48 órán át tartó extracorporalis keringés után.<sup>88</sup> Ez vörösvérsejt deformabilitás romlást és fokozott aggregatiót okoz, amely negatív hatással van a microcirculációra és a szöveti perfúzióra. Számos kaszkádszerű mechanizmuson keresztül és leukocytá és thrombocytá funkciók hatására a supra-fiziológiai nyírófeszültség megváltoztatja a haemodinamikai paramétereiket, ami tovább növeli a nyírófeszültséget és a folyamat circulus vitiosus-szá válik.<sup>31,81</sup> A patofiziológiai folyamatok vizsgálatára, amelyek megváltoztathatják a nyíróerőket a keringésben és az intravaszkuláris eszközök kifejlesztésének tesztelésére (például stentek, graftok, vaszkuláris protézisek, mesterséges szelepek és szívek, extracorporalis keringés eszközei, speciális intravaszkuláris keringést segítő eszközök) *in vivo* vizsgálatok szükségesek.<sup>30,31,32,33,35</sup>

Széles körben megvizsgálták, hogy más fiziológiai paraméterekhez hasonlóan a haemorheológiai jellegek is mutatják a fajok közötti különbségeket.<sup>37,39</sup> A vörösvérsejt deformabilitást számos celluláris faktor határozza meg<sup>21,22,85,89</sup>, és a mechanikai stabilitás fenntartásának egyik legfontosabb eleme a spektrin alapú membrán skeleton.<sup>34,85,89</sup> A

vörösvérsejtek mechanikai stabilitásában mutatkozó kölcsönhatások közötti különbségek részben a spektrin-hálózat kvantitatív és kvalitatív különbségeivel és a fehérjefoszforiláció szintjével magyarázhatók, főként a 4.1R-es fehérje esetében, amely modulálja a spektrin és aktin affinitását és a vörösvérsejtek membránstabilitását.<sup>82,89,90,91</sup> Azonban figyelembe kell venni, hogy a mechanikai stabilitás mérés nem végezhető *in vivo*, és bár minden mérés a protokoll szerint 2 órán belül befejeződött, a különböző fajok vörösvérsejtjei eltérő módon érzékenyek az *in vitro* körülményekre.<sup>13,25,37,38</sup> A vörösvérsejtek metabolikus állapotában bekövetkező változások a membrán merevedését is okozhatják a csontrendszeri foszforiláció csökkenése miatt.<sup>82</sup>

A kutya erythrocyta-deformabilitásának javulására vonatkozó megállapításaink szerint, a közelmúltban Meram és munkatársai beszámoltak arról, hogy nagyon rövid (néhány másodperces) 5-20 Pa-os nyírófeszültség akár 8%-kal is javíthatja vörösvérsejtek deformálódását, ezen adatok vonatkoztathatóak emberi vörösvérsejtekre is.<sup>92</sup> Simmonds és mtsai szintén megfigyelték az emberi vörösvérsejtek jobb deformálhatóságát fiziológiai nyírófeszültség mellett, és azt találták, hogy a humán erythrocyták sub-haemolyticus küszöbértéke 30-40 Pa 300 másodperces expozíció mellett.<sup>83</sup> Azonban Arwatz és Smits, egy általuk készített Taylor-Couette készülék alkalmazásával 50 másodpercig tartó 50 Pa nyírófeszültség terhelés mellett 1-2% haemolysist, 50 Pa-nál 300 másodperc esetében 5%-os haemolysist, és 200 Pa-on 300 másodperc használatával 10-12%-os haemolysist találtak.<sup>93</sup> Kísérletünk adatai alapján az expozíciós idő és mechanikai stressz erősségének növelésével az elongációs idő-nyírófeszültség görbék egyre szabálytalanabb mintázatot vettek fel a 0,95 Pa nyírófeszültség alatti tartományban. Ezen változás oka valószínűleg a növekvő mértékű erythrocyta fragmentáció és haemolysis.<sup>30,31</sup>

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

A patkány és a sertés erythrocyták kisebb MCV értékkel rendelkeznek (5. ábra), kifejezettebb változást mutattak a 200 mOsmol/kg-on végzett mechanikai stabilitás teszten humán és kutya erythrocytákhoz képest. Korábban szignifikáns különbséget figyeltünk meg az elongációs index-oszmolalítás (osmoscan) görbék között, jobbra tolódtak a patkány, kutya és humán görbékhez képest.<sup>39</sup> Az osmoscan mérés során az elongációs index értékeket az alkalmazott oszmolalítás függvényében ábrázoljuk. Az osmoscan görbe maximumpontja azt az oszmolalítást reprezentálja, amely értéknél a vörösvérsejtek a lehető legnagyobb mértékben tudnak elongálódni az adott nyírófeszültség hatására. A fajok közti micro-rheológiai diverzitás miatt (sejtek mérete, száma, alakja, deformabilitása, aggregációja) a vörösvérsejtjeik máshogy reagálnak a különböző külső hatásokra, beleértve az őket körülvevő környezet oszmolalítását is. Feltételezhető, hogy ennek a diverzitásnak köszönhető a görbék jobbra tolódása is, amennyiben egyes fajok vörösvérsejtjei kevésbé érzékenyek a magasabb oszmolalítású környezettel szemben, így az elongatio maximuma is a magasabb oszmolalítású tartományba esik, mint egér és sertés vérminták esetén.<sup>39</sup> A haemorheológiai faktorok fajok közötti különbözősége sokrétűbbnek tűnik, ahogy újabb és újabb technikákkal vizsgáljuk.

## 6.2. Nemi és korfüggő haemorheologiai paraméterek

Az irodalmi adatok és saját eredményeink szerint a vörösvérsejt deformabilitási és aggregációs értékek a különböző fajok között eltérést mutatnak.<sup>37,94</sup> Azonban a nemi és életkorral kapcsolatos különbségekről kevés adat áll rendelkezésünkre. Korábban patkányokon és kutyákon tanulmányoztuk a vörösvérsejt deformabilitást és aggregációt. Patkányok esetében a nőstény állatokban mértünk magasabb vörösvérsejt deformabilitás index értékeket, míg kutyáknál a hím állatok rendelkeztek magasabb elongációs index értékekkel. A vörösvérsejt aggregatio tekintetében humán eredmények esetén más tendenciát figyelhetünk meg.<sup>9</sup> Számos tanulmány szerint férfiakban az erythrocyták nagyfokú aggregációs képességgel és kisebb fokú deformálhatósággal jellemezhetőek.<sup>4,60,62</sup>

A vörösvérsejt deformabilitást meghatározza az intracelluláris viszkozitás, a sejtmembrán saját viszkozitása, a felület-térfogat arány és a morfológia. A vörösvérsejt aggregatio mértékét számos celluláris (a sejt alakja, deformabilitása, a glycocalyx összetétele) és plazmatikus faktor (fibrinogén és más makromolekulák) határozza meg a nyíróerő mellett.<sup>22,77,95,96,97,98</sup> Ezen felül hormonális és anyagcsere tényezők is befolyásolhatják ezeket a paramétereket.<sup>99</sup>

Számos tanulmány kimutatta, hogy a haemorheologiai tényezőket jelentősen befolyásolja az öregedés.<sup>70,73,100</sup> Az irodalmi adatok többsége emelkedett plazma és teljes vér viszkozitásról<sup>72</sup>, fokozott vörösvérsejt aggregációról és károsodott deformabilitásról számol be idős korban.<sup>2,63</sup> Azonban a korfüggő haemorheologiai eredményekről ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre. Néhány szerző nem talált összefüggést<sup>59,61,101</sup>, vagy arra a következtetésre jutottak, hogy nem a kor, hanem bizonyos rizikó faktorok felelősek a változásokért, beleértve az elhízást<sup>102</sup>, a magas vérnyomást<sup>103</sup>, a dohányzást<sup>104</sup> vagy bizonyos gyógyszereket.<sup>105</sup> Az eltérés nemcsak az egészségi állapottól függ, hanem a különböző mérőmódszerektől, a nemtől és a kortól is. Kameneva és munkatársai statisztikailag szignifikáns különbségeket mutattak ki a férfi és női haemorheologiai paraméterek között. Férfiakban magasabb haematocrit és vérviszkozitás, nagyobb vörösvérsejt aggregabilitást, valamint alacsony deformabilitást értékeket mértek.<sup>2,60</sup> Kísérleti és klinikai adatok alapján Simmonds és munkatársai egy cikkben összegezték az öregedés és ehhez kapcsolódó mechanizmusok által megváltozó vér rheológiáját, beleértve a felerősödő oxidatív stresszt és pro-inflammatorikus körülményeket idős egyéneknél.<sup>50</sup> A nemi és korfüggő haemorheologiai szempontok még nem voltak teljesen ismertek patkányokban.

A X. táblázatban foglaltuk össze főbb megfigyeléseinket a nemmel és életkorral kapcsolatos különbségek tekintetében, valamint a haematologiai és micro-rheologiai változások lehetséges tendenciáit. Az eredmények értékelése során számos befolyásoló és limitációs tényezőt figyelembe kell venni a fajspecifikus tulajdonságokat, az oestrus ciklust és a szezonális hatásokat.

**X. táblázat:** Haematologiai és haemorheologiai paraméterek változásainak összefoglalása

Paraméterek	A követéses időszak megfigyelései	
	<i>Nemi különbség</i>	<i>Tendencia</i>
Haematologiai változók	Magasabb Fvs, Vvs, Hct, Hgb értékek hímekben.	Fvs 5 hónap alatt csökkent, majd enyhén emelkedett. Mo+Gr% fokozatosan emelkedett az állatok 12 hónapos koráig. Thrombocytá szám emelkedett 18 hónapos korig a Vvs szám növekedésével. Hct, Hgb, MCV kiss mértékben csökkent.
Vörösvérsejt aggregatio	Kezdeti M1 5 s és M1 10 s aggregációs index értékek nőstényekben magasabbak, M 5 s és M 10 s hímekben voltak magasabbak. Hímekben nagyobbak voltak a változások.	Szabálytalan. Növekedések, csökkenések figyelhetők meg a követési időszak alatt. M 10 s, M1 10 s értékek magasabbak voltak mindkét nemben fiatalabb korokban.
Vörösvérsejt deformabilitás	Alacsonyabb EI és magasabb SS <sub>1/2</sub> értékek hímekben.	Csökkenő EI és növekvő SS <sub>1/2</sub> értékek mindkét nemben, főleg 12 hónapos kor fölött.
Ozmotikus gradiens deformabilitás	EI max, EI hyper, EI min és a hozzájuk tartozó ozmolaritás értékek hímekben alacsonyabbak.	EI min érték emelkedett mindkét nemben életkor előrehaladtával, kifejezetten hímekben.

A patkányok oestrus ciklusának meghatározására egy egyszerű, régóta használatos módszert alkalmaztunk, a hüvely keneteket fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk.<sup>76</sup> Az állatokat konvencionális állatházban tartottuk, így a Lee-Boot hatás kizárható (amikor is a nőstény közösen vannak tartva hím patkányok nélkül, és ennek következtében az oestrus ciklusuk lelassul vagy leáll), de a Whitten hatás nem (hím patkány feromonjai indukálják az oestrus ciklus összehangolódását felnőtt nőstényekben). A menstruációs ciklus főemlősökben megváltoztathatja a haematologiai paramétereket, a vörösvérsejt és a fehérvérsejt számot.<sup>106</sup> Ezen felül az oestrus ciklus különböző fázisai (dioestrus vs. többi fázis) megváltoztathatják

beagle kutyákban a haematologiai értékeket (haemoglobint, vörösvérsejt, eozinofilok).<sup>107</sup> Cetin és munkatársai vizsgálták a vér paramétereit nem, vemhesség és szezonális hatások tekintetében Angora nyúlakban, szignifikáns különbségeket találtak a nem, a fiziológiai állapot és az évszakok hatása között.<sup>108</sup> A nőstény patkányok oestrus ciklusa körülbelül 3-5 napig tart (polyoestrusos állatok). Az öregedés meghosszabbíthatja vagy lerövidítheti a patkányok ivari ciklusát. Emiatt nem lehet közvetlenül összekapcsolni ezeket a haemorheologiai eredményeket az oestrus ciklussal. Ez a vizsgálatunk egyik lehetséges limitációja. A szezonális hatás nem zárható ki, azonban ezt a feltevést nem tudtuk alátámasztani. A kísérletek elején, márciusban az állatok 3 hónaposak voltak.

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

*„A legtöbb kutató a humán és patkány korát azok élettartamának korrelációjával számolják ki, ami nem elfogadható, mivel egy specifikus kutatáshoz, a patkányok egy meghatározott fejlődési szakaszát vizsgálják. Ezért figyelembe kell venni a patkányok életének megfelelő fázisait is az életkor pontos korrelációjához”.<sup>74</sup>* A laboratóriumi patkányok átlagosan 2-3,5 évig élnek. A teljes élettartamukat tekintve kb. 26,7 emberi nap felel meg a patkányok egy napjának, tehát kb 13,8 patkány nap felel meg egy emberi évnek. Azonban a „pubertás”, felnőtt kor, reprodukív kor, az öregedés, az öregkor korrelációja különbözhet.<sup>74,110,111</sup>

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

## 7. FŐBB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

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

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A vér rheológiai faktoraik számos kórképben, anyagcsere és érrendszeri betegségben, septicus folyamatokban, gyulladás során kóros, gyakran jelző értékű információt szolgáltatnak.

Célul tűztük ki összehasonlító vizsgálatok elvégzését különböző mérőmódszerek használatával laboratóriumi állatfajokon és humán vérminták esetében. Emellett mivel a korszerű módszerekkel meghatározható nemi- és korfüggő haemorheológiai különbségei tekintetében kevés irodalmi adat található, ennek tanulmányozására követéses vizsgálatokat is terveztünk Crl:WI patkányokon.

Irodalmi adatok alapján elmondható, hogy a különböző állatfajok haemorheológiai tényezői változatos különbségeket mutatnak.

Eddigi eredményeink azt mutatják, hogy nagymértékű a fajok közötti különbség a vörösvérsejtek membránjának mechanikai stresszel szembeni tűrőképessége tekintetében. A legjelentősebb eltérések 100 Pa, 300 s esetén mutatkoztak. Általában a patkány vörösvérsejtek mutatták a legnagyobb ellenálló képességet. Humán vörösvérsejteknel a 60 Pa, 200 s beállítás volt az a minimális kombináció, amely jelentős deformabilitás romlást eredményezett. A 100 Pa nyírófeszültség mellett 300 s időtartamig végzett mérés a humán erythrocyták esetében mutatta a vizsgált fajok között a legnagyobb deformabilitás romlást.

Kimutattuk, hogy a mechanikus stressz a közeg ozmolalításától függően befolyásolja a deformabilitást. Hypoozmoláris közeg javítja a deformabilitást mind a négy faj estén, legfőképpen sertésekben és patkányokban. Míg a hyperozmoláris közeg az értékek csökkenését váltotta ki.

A vizsgált micro-rheológiai paraméterek a követéses időszak során az életkor előrehaladásától, a nemtől, nőstényeknel az oestrus ciklustól, valamint feltételezett szezonális hatásoktól függően is változást mutattak. A vörösvérsejt aggregatio mérése során jelentős nemi és korfüggő különbségeket találtunk, azonban e változások szabálytalan tendenciát mutattak a követéses periódus alatt. Összeségében a nemi különbségeket illetően a hímekekben találtunk nagyobb változásokat. A deformabilitás esetében fokozatos romlás figyelhető meg az állatok 12 hónapos kora felett. A membránstabilitási adatok a követési periódus végére mutattak igazán különbségeket, az alkalmazott mechanikus stressz hatására (100 Pa, 300 s) nagyobb mértékű deformabilitás romlás volt ekkor mérhető. Ezek az adatok hasznosak lehetnek a kor és nemi különbségek mechanizmusának tanulmányozásához a haemorheológiai paraméterekben, patkányokban.

Tapasztalataink révén e módszerek hasznos kiegészítői lehetnek a vörösvérsejtek micro-rheológiai paramétereinek vizsgálataiban. Adataink további kísérletek tervezéséhez és az eredmények kiértékeléséhez nyújthatnak hasznos információt.

## 9. SUMMARY

The haemorheological factors can provide useful diagnostic information in numerous metabolic and vascular diseases, inflammation and septic processes.

The aim of our research was to conduct comparative analysis on human and laboratory animal blood samples. Since in the literature there are only a few articles on the relation between the gender, age and the haemorheological factors, we aimed to conduct a long-term study using modern haemorheological equipment and Crl:WI rats.

According to literature data, the haemorheological factors of different animal species show varied differences.

Based on our results, it can be seen that the difference between species is significant in terms of the ability of the red blood cells membranes to withstand mechanical stress. The most significant differences were at 100 Pa 300 s mechanical stress. Generally, rat red blood cells showed the highest resistance. For human red blood cells, the 60 Pa 200 s setting was the minimum combination that resulted in significant deformability deterioration. The measurements with 100 Pa 300 sec mechanical stress showed the greatest deformability deterioration in human erythrocytes among the examined species.

Our results show that the deformability is greatly dependent on the osmolarity values of the medium. The hyposmolar medium is beneficial for the deformability values in all four examined species. Contrary to this, the hyperosmolar medium decreases these aforementioned values.

The examined microrheological parameters during the follow-up period showed seasonal changes and dependency from age, gender and estrus (cycle in the females). The red blood cell aggregation values showed major differences in case of the gender and age during the examination period. Overall, we found greater changes in the gender differences in males. Deformability deteriorates gradually over the age of 12 months. While the membrane stability data showed differences at the end of the follow-up period, greater deformability deterioration could be measured by the mechanical stress (100 Pa 300 s). These data could be useful for studying further the mechanism underlying age and gender differences in hemorheological parameters in rats.

Based on our experiences these methods can be useful supplementary tools in examination of red blood cells microrheological parameters. Our results may provide useful (valuable) information for planning further researches and evaluating the results.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

### 10.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Copley AL. The history of clinical hemorheology. *Clin Hemorheol* 1985. 5:765-811.
2. Kameneva MV, Garrett KO, Watach MJ, Borovetz HS. Red blood cell aging and risk of cardiovascular diseases. *Clin Hemorheol Microcirc* 1998. 18:67-74.
3. Mojžiš J, Nicák A, Mojžišová G, Mirossay L. Age-dependent differences in cation-osmotic haemolysis in rats. *Comparative Haematology International*, 1999; 9:152-155
4. Bogár L, Juricskay I, Késmárky G, Fehér G, Kenyeres P, Tóth K. Gender differences in hemorheological parameters of coronary artery disease patients. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006. 35:99-103.
5. Antonov P, Antonova M, Nikolova N, Antonova N, Vlaskovska M, Kasakov L. Age dependent changes of arterial wall viscoelasticity. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008. 39: 63-8.
6. Baskurt OK, Uyuklu M, Ulker P, Cengiz M, Nemeth N, Alexy T és mtsai. Comparison of three instruments for measuring red blood cell aggregation. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009a. 43. 283-298.
7. Baskurt, OK, Hardeman MR, Uyuklu M, Ulker P, Cengiz M, Nemeth N, Shin S, Alexy T és Meiselman HJ. Comparison of three commercially available ektacytometers with different shearing geometries. *Biorheology* 2009b. 46. 251-264.
8. Connes P, Németh N, Meiselman HJ, Baskurt OK. Effect of tourniquet application during blood sampling on RBC deformability and aggregation: Is better to keep it on? *Clin Hemorheol Microcirc* 2009. 42: (4) pp. 297-302.
9. Németh N, Kiss F, Furka I, Mikó I. Gender differences of blood rheological parameters in laboratory animals. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010. 45:263-72.
10. Klárik Z, Kiss F, Mikó I, Németh N. Aorto-porto-caval micro-rheological differences of red blood cells in laboratory rats: further deformability and ektacytometrial osmoscan data. *Clin Hemorheol Microcirc* 2013. 53: (3) pp. 217-229.
11. Kiss F, Tóth E, Pető K, Mikó I, Németh N. The investigation of interspecies diversity of erythrocyte aggregation properties by two different photometric methods in four animal species. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl.)* 2015. Mar 18.
12. van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC (eds). *Principles of Laboratory Animal Science*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands 2001.
13. Nemeth N, Baskurt OK, Meiselman HJ, Kiss F, Uyuklu M, Hever T, Sajtos E, Kenyeres P, Toth K, Furka I, and Miko I. Storage of laboratory animal blood samples causes hemorheological alterations: Inter-species differences and the effects of duration and temperature, *Korea-Austr Rheol J* 2009. 21 127-133.
14. Fowkes FG, Pell JP, Donnan PT, Housley E, Lowe GDO, Riemersma RA, Prescott RJ. Sex differences in susceptibility to etiologic factors for peripheral arteriosclerosis. Importance of plasma fibrinogen and blood viscosity. *Arterioscler Thromb* 1994. 14. 862-868.
15. Brown DW, Giles DW, Croft JB. Hematocrit and the risk of coronary heart disease mortality. *Am Heart J* 2001. 142. 657-663.
16. Velcheva I, Antonova N, Dimitrova V, Dimitrov N, Ivanov I. Plasma lipids and blood viscosity in patients with cerebrovascular disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006. 35. 155-157.
17. Koltai K, Fehér G, Kenyeres P, Lénárt I, Alexy T, Horváth B, Márton Z, Késmárky G, Tóth K. Relation of platelet aggregation and fibrinogen levels to advancing age in aspirin- and thienopyridine-treated patients. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008. 40. 295-302.

18. Bogár L. Diagnosztika. In: Bernát SI, Pongrácz E. (eds) A klinikai haemorheologiai alapjai. Kornétás Kiadó, Budapest 1999. 33-50.
19. Tóth K, Juricskay I. Rheologiai alapfoglamak. In: Bernát SI, Pongrácz E. (szerk.) A klinikai haemorheologiai alapjai. Budapest: Kornétás Kiadó, 1999. pp. 13-24.
20. Rampling MW. History of hemorheology. In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ. (eds) Handbook of Hemorheology and Hemodynamics. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands 2007. 3-17.
21. Cokelet GR, Meiselman HJ. Macro- and micro-rheological properties of blood. In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ. (szerk.) 2007. Handbook of Hemorheology and Hemodynamics IOS Press. Amsterdam, pp. 45-71.
22. Meiselman, HJ. Morphological determinants of red cell deformability. Scand J Clin Lab Invest Suppl 1981. 156, 27-34.
23. Bessis M. Normal and abnormal red cell shape. In: Bessis M, Weed RI, Leblond PF. (szerk), Red Cell Shape. New York: Springer-Verlag, 1973. pp. 1-24.
24. Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Vanhaeverbeek M, Vincent JL. Red blood cell rheology in sepsis. Intensive Care Med 2003. 29, 1052-1061.
25. Hardeman, MR, Goedhart PT, & Shin S. Methods in Hemorheology. In Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ (szerk.) 2007. Handbook of Hemorheology an Hemodynamics pp 242-266.
26. Baskurt OK & Meiselman HJ. Blood rheology and hemodynamics. Semin Thromb Hemost 2003. 29: 435-450.
27. Holmberg A, Sandhagen B, Bergqvist D. Hemorheologic variables in critical limb ischemia before and after infrainguinal reconstruction. J Vasc Surg 2000. 31:691–695.
28. Lipowsky HH. Blood rheology aspects of the microcirculation. In: Handbook of Hemorheology and Hemodynamics. Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ, IOS Press, Amsterdam, 2007. pp. 307–321.
29. Baskurt OK. In vivo correlates of altered blood rheology. Biorheology 2008. 45:629–638.
30. Baskurt OK. Mechanisms of blood rheology alterations. in: Handbook of Hemorheology and Hemodynamics, Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW and Meiselman HJ, eds., IOS Press, Amsterdam, The Netherlands, 2007. pp. 170-190.
31. Kamaneva MV, Antaki JF. Mechanical trauma to blood. In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, Meiselman HJ. (szerk.) Handbook of Hemorheology and Hemodynamics Amsterdam: IOS Press, 2007. pp. 206-238.
32. Jung F, Braune S and Lendlein A. Haemocompatibility testing of biomaterials using human platelets. Clin Hemorheol Microcirc 2013. 53 97-115. doi: 10.3233/CH-2012-1579.
33. Menu P, Stoltz JF and Kerdjoudj H. Progress in vascular graft substitute. Clin Hemorheol Microcirc 2013. 53 117-129.
34. Boguslawska DM, Machnicka B, Hryniewicz-Jankowska A, and Czogalla A. Spectrin and phospholipids - the current picture of their fascinating interplay. Cell Mol Biol Lett 2014. 19 158-179.
35. Baskurt OK. Red blood cell mechanical stability, Engineering 2013. 5. 8-10.
36. Mohandas N, Clark MR, Health BP, Rossi M, Wolfe LC, Lux SE, Shohet SB. A technique to detect reduced mechanical stability of red cell membranes: relevance to elliptocytic disorders. Blood 1982. 59, 768-774.
37. Windberger U, Baskurt OK. Comparative Hemorheology. Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW and Meiselman HJ, editors. Handbook of Hemorheology and Hemodynamics. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands 2007. pp. 267-85.
38. Hiebl B, Hopperdietzel C, Hünigen H, Dietze K, Klein S, Schreier B and Jung F. Influence of iodine-containing radiographic contrast media on the phenotype of

- erythrocytes from different laboratory animal species. *Clin Hemorheol Microcirc* 2013. 55 473-479.
39. Nemeth N, Kiss F, Klarik Z and Miko I. Comparative osmotic gradient ektacytometry data on inter-species differences of experimental animals. *Clin Hemorheol Microcirc* 2014. 57 1-8.
  40. Clark MR, Mohandas N, Shohet SB. Osmotic gradient ektacytometry: comprehensive characterization of red red cell volume and surface maintenance. *Blood* 1983. 61:899-910.
  41. Cooper RA. Loss of membrane components in the pathogenesis of antibody induced spherocytosis. *J Clin Invest* 1972. 51:16-21.
  42. Németh N, Kiss F, Miszti-Blasius K. Interpretation of osmotic gradient ektacytometry (osmoscan) data: A comparative study for methodological standards. *Scand J Clin Lab Invest* 2015. 75(3) pp. 213-22.
  43. Baskurt OK, Boynard M, Cokelet GC, Connes P, Cooke BM, Forconi S, Liao F, Hardeman MR, Jung F, Meiselman HJ, Nash G, Nemeth N, Neu B, Sandhagen B, Shin S, Thurston G, Wautier JL. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009c. 42. 75-97.
  44. Németh N. Haemorheologiai vizsgálatok a kísérletes sebészeti és mikrosebészeti kutatások szolgálatában. MTA doktori értekezés, Debrecen, 2016.
  45. Baskurt OK, Neu B, Meiselman HJ. *Red Blood Cell Aggregation*. Boca Raton: CRC Press. 2012.
  46. Uyuklu M, Canpolat M, Meiselman HJ & Baskurt OK. Wavelength selection in measuring red blood cell aggregation based on light transmittance. *Journal of Biomedical Optics* 2011. 16(11):117006.
  47. Armstrong JK, Wenby RB, Meiselman HJ & Fisher TC. The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation. *Biophys J* 2004. 87:4259-4270.
  48. Reinhart WH, Singh A. Erythrocyte aggregation: the roles of cell deformability and geometry. *Eur J Clin Invest* 1990. 20:458-462.
  49. Mohandas N & Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 2008. 112:3939-3948.
  50. Németh, N. Vér- és nyirokáramlás reológiája - Haemorheologiai alapismeretek. Kiadott előadásanyagok 2013.
  51. Simmonds MJ, Meiselman HJ & Baskurt OK. Blood rheology and aging. *Journal of Geriatric Cardiology* 2013. 10: 291-301.
  52. Hardeman MR, Dobbe JG & Ince C. The Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer. *Clin Hemorheol Microcirc* 2001. 25:1-11.
  53. Neu B & Meiselman HJ. Depletion-mediated red blood cell aggregation in polymer solutions. *Biophys J* 2002. 83: 2482-2490.
  54. Liu Y & Liu WK. Rheology of red blood cell aggregation by computer simulation. *JCP* 2006. 220, 139-154.
  55. Uyuklu M, Meiselman HJ, Baskurt OK. Effect of hemoglobin oxygenation level on red blood cell deformability and aggregation parameters. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009. 41. 179-188.
  56. North BJ, Sinclair DA. The intersection between aging and cardiovascular disease. *Circ Res* 2012. 110(8):1097-108.
  57. Nanayakkara S, Marwick TH, Kaye DM. The ageing heart: the systemic and coronary circulation. *Heart* 2017. pii: heartjnl-2017-312114.
  58. Xu X, Wang B, Ren C, Hu J, Greenberg DA, Chen T, Xie L, Jin K. Age-related impairment of vascular structure and functions. *Aging Dis* 2017. 8(5):590-610.

59. Jung F, Roggenkamp HG, Ringelstein EB, Leipnitz G, Schneider R, Kiesewetter H. Effect of sex, age, bodyweight, and smoking on plasma viscosity. *Klin Wochenschr* 1986. 64(20):1076-81.
60. Kameneva MV, Watach MJ, Borovetz HS. Gender difference in rheologic properties of blood and risk of cardiovascular diseases. *Clin Hemorheol Microcirc* 1999. 21(3-4):357-63.
61. Coppola L, Caserta F, De Lucia D, Guastafierro S, Grassia A, Coppola A, et al. Blood viscosity and aging. *Arch Gerontol Geriatr* 2000. 31(1):35-42.
62. Baev VM. Effect of sex on rheological properties of blood in adults. *Klin Lab Diagn* 2001. 12:33-5.
63. Fehér G, Koltai K, Késmárky G, Szapary L, Juricskay I, Tóth K. Hemorheological parameters and aging. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006. 35(1-2):89-98.
64. Kovács A, Szikszai Z, Várady E, Imre S. Study on hemorheological parameters of oldest-old residents in the East-Hungarian city, Debrecen. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006. 35(1-2):83-8.
65. Nash GB, Meiselman HJ. Red cell and ghost viscoelasticity. Effects of hemoglobin concentration and in vivo aging. *Biophys J* 1983. 43(1):63-73.
66. Piomelli S, Seaman C. Mechanism of red blood cell aging: relationship of cell density and cell age. *Am J Hematol* 1993. 42(1):46-52.
67. Huang YX, Wu ZJ, Mehrishi J, Huang BT, Chen XY, Zheng XJ, Liu WJ, Luo M. Human red blood cell aging: correlative changes in surface charge and cell properties. *J Cell Mol Med* 2011. 15(12):2634-42.
68. Waugh RE, Narla M, Jackson CW, Mueller TJ, Suzuki T, Dale GL. Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age. *Blood* 1992. 79(5):1351-8.
69. Baskurt OK, Neu B, Meiselman HJ. Measurement of red blood cell aggregation. In Baskurt OK, Neu B, Meiselman HJ, editors. *Red Blood Cell Aggregation* Boca Raton, USA: CRC Press, 2011. p. 63-132.
70. Ajmani RS, Rifkind JM. Hemorheological changes during human aging. *Gerontology* 1998. 44(2):111-20.
71. Michalska-Malecka K, Slowinska L, Dorecka M, Romaniuk W. Correlations in some pathogenetic factors and values of hemorheological parameters in age-related macular degeneration. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008. 38:209-16.
72. Carallo C, Irace C, De Franceschi MS, Coppoletta F, Tiriolo R, Scicchitano C, et al. The effect of aging on blood and plasma viscosity. An 11.6 years follow-up study. *Clin Hemorheol Microcirc* 2011. 47(1):67-74.
73. Vayá A, Alis R, Romagnoli M, Pérez R, Bautista D, Alonso R, Laiz B. Rheological blood behavior is not only influenced by cardiovascular risk factors but also by aging itself. Research into 927 healthy Spanish Mediterranean subjects. *Clin Hemorheol Microcirc* 2013. 54(3):287-96.
74. Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's. *Int J Prev Med* 2013. 4(6):624-30.
75. Baskurt OK, Hardeman MR, Uyklu M, Ulker P, Cengiz M, Nemeth N, et al. Parameterization of red blood cell elongation index--shear stress curves obtained by ektacytometry. *Scand J Clin Lab Invest* 2009d. 69(7):777-88.
76. Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicol Pathol* 2015. 43(6):776-93.
77. Schmid-Schönbein H, Malotta H, Striesow F. Erythrocyte aggregation: causes, consequences and methods for assessment. *Tijdschr NVKC* 1990. 15:88-97.

78. Lipowsky HH. Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation* 2005. 12 5-15.
79. Greve JM, Les AS, Tang BT, Draney Blomme MT, Wilson NM, Dalman RL, Pelc NJ, and Taylor CA. Allometric scaling of wall shear stress from mice to humans: quantification using cine phase-contrast MRI and computational fluid dynamics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006. 291 H1700-1708.
80. Chasis JA and Mohandas N. Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. *J Cell Biol* 1986. 103. 343-350.
81. Leverett LB, Hellums JD, Alfrey CP, and Lynch EC. Red blood cell damage by shear stress. *Biophys J* 1972. 12 257-273.
82. Picas L, Rico F, Deforet M, and Scheuring S. Structural and mechanical heterogeneity of the erythrocyte membrane reveals hallmarks of membrane stability. *ACS Nano* 2013. 7 1054-1063.
83. Simmonds MJ, Atac N, Baskurt OK, Meiselman HJ, and Yalcin O. Erythrocyte deformability responses to intermittent and continuous subhemolytic shear stress. *Biorheology* 2014. 51 171-185.
84. Mohandas N and. Shohet SB. The role of membrane-associated enzymes in regulation of erythrocyte shape and deformability. *Clin Haematol* 1981. 10 223-237.
85. Mohandas N and Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids, *Semin Hematol* 1993. 30 171-192.
86. Da Costa L. Galimand J, Fenneteau O, and Mohandas N. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Rev* 2013. 27 167-178.
87. Gilca M, Lixandru D, Gaman L, Virgolici B, Atanasiu V, and Stoian I. Erythrocyte membrane stability to hydrogen peroxide is decreased in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2014. 28 358-363.
88. Brinsfield DE, Hopf MA, Geering RB, and Galletti PM. Hematological changes in long-term perfusion. *J Appl Physiol* 1962. 17, 531-534.
89. Cooke BM and Lim CT. Mechanical and adhesive properties of healthy and diseased red blood cells. in: *Handbook of hemorheology and hemodynamics*, Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW and Meiselman HJ, eds., IOS Press, Amsterdam, The Netherlands, 2007. pp. 91-114
90. Manno S, Takakuwa Y, and Mohandas N. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation. *J Biol Chem* 2005. 280 7581-7587.
91. Tang F, Lei X, Xiong Y, Wang R, Mao J, and Wang X. Alteration Young's moduli by protein 4.1 phosphorylation play a potential role in the deformability development of vertebrate erythrocytes. *J Biomech* 2014. 47 3400-3407.
92. Meram E, Yilmaz BD, Bas C, Atac N, Yalcin O, Meiselman HJ, and Baskurt OK. Shear stress-induced improvement of red blood cell deformability. *Biorheology* 2013. 50 165-176.
93. Arwatz G and Smits AJ. A viscoelastic model of shear-induced hemolysis in laminar flow. *Biorheology* 2013. 50 45-55.
94. Plasenzotti R, Stoiber B, Posch M, Windberger U. Red blood cell deformability and aggregation behaviour in different animal species. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004. 31:105-11.
95. Dormandy JA. Red blood cell deformability. *Eur Neurol* 1983. 22 (Suppl. 156): 181-4.
96. Stuart J. Erythrocyte rheology. *J Clin Pathol* 1988. 38: 965-77.
97. Stoltz JF, Singh M, Riha P. editors, in: *Hemorheology in Practice*, IOS Press, Amsterdam, The Netherlands 1999. pp. 9-52.

98. Neu B, Meiselman HJ. Red blood cell aggregation. Handbook of Hemorheology and Hemodynamics. Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW and Meiselman HJ, editors. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands 2007. pp. 114-36.
99. Brun JF. Hormones, metabolism and body composition as major determinants of blood rheology: potential pathophysiological meaning. Clin Hemorheol Microcirc 2002. 26(2):63-79.
100. Coppola L, Guastafierro S, Sagristani M, Coppola A, Nasuti A, Ruggiero L, et al. Decreased hemoglobin levels are associated with higher plasma level of fibrinogen, irrespective of age. Am J Med Sci 2007. 333:154-60.
101. Konstantinova E, Tolstaya T, Prishchep S, Milutin A, Mironova E, Ivanova L. Plasma lipid levels, blood rheology, platelet aggregation, microcirculation state and oxygen transfer to tissues in young and middle-aged healthy people. Clin Hemorheol Microcirc 2004. 30(3-4):443-8.
102. Jarnell WJ, Swwetnam PM, Rumley A, Lowe GD. Lifestyle and hemostatic risk factors for ischemic heart disease: the Caerphilly Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000. 20:271-9.
103. Tóth K, Késmárky G, Vékási J, Nemes J, Czopf L, Kapronczay P, et al. Hemorheological and hemodynamic parameters in patients with essential hypertension and their modification by alpha-1 inhibitor drug treatment. Clin Hemorheol Microcirc 1999. 21(3-4):209-16.
104. Ernst E, Koenig W, Matrai A, Filipiak B, Stieber J. Blood rheology in healthy cigarette smokers: results from the MONICA-project. Arterioscler 1988. 8:385-8.
105. Gibbs CR, Blann AD, Watson RD, Lip GYH. Abnormalities of hemorheological, endothelial, and platelet function in patients with chronic heart failure in sinus rhythm. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and beta-blocker therapy. Circulation 2001. 103:1746-51.
106. Harewood WJ, Gillin A, Hennessy A, Armitstead J, Horvath JS, Tiller DJ. The effects of the menstrual cycle, pregnancy and early lactation on haematology and plasma biochemistry in the baboon (*Papio hamadryas*). J Med Primatol 2000. 29(6):415-20.
107. Willson CJ, Chandra SA, Kimbrough CL, Jordan HL. Effect of estrus cycle phase on clinical pathology values in beagle dogs. Vet Clin Pathol 2012. 41(1):71-6.
108. Cetin N, Bekyürek T, Cetin E. Effect of Sex, Pregnancy and season on some haematological and biochemical blood values in angora rabbits. Scand J Lab Anim Sci 2009. 36(2):155-62.
109. Animal Care and Use Policies and Guidelines. Veterinary Recommendations for Multiple Blood Draws – Volumes and Frequency [homepage on the Internet]. Johns Hopkins University Available from: <http://web.jhu.edu/animalcare/policies/multiple-blood-draws.html>.
110. Quinn R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? Nutrition 2005. 21(6):775-7.
111. Sengupta P. A scientific review of age determination for a laboratory rat: how old is it in comparison with human age? Biomed Int 2012. 2:81-9.

## 10.2. 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/95/2018.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

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

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





**További közlemények**

3. Mester, A., Magyar, Z., Molnár, Á., **Somogyi, V.**, 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: 2.187 (2016)
4. Magyar, Z., Mester, A., Nadubinszky, G., Varga, G., Souleiman, G., **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.* "Accepted by Publisher", 2018.  
IF: 1.679 (2016)
5. Pető, K., Németh, N., Mester, A., Magyar, Z., Souleiman, G., **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.* [Epub ahead of print], 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-170361>  
IF: 1.679 (2016)
6. Mester, A., Magyar, Z., **Somogyi, V.**, 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: 1.679 (2016)
7. Mikó, I., Németh, N., **Somogyi, V.**, Kiss, F., Tóth, E., Pető, K., Furka, A., Ványolos, E., Tóth, L., Varga, J., Szigeti, K., Benkő, I., Oláh, A., Furka, I.: Comparative erythrocyte deformability investigations by filtrometry, slit-flow and rotational ektacytometry in a long-term follow-up animal study on splenectomy and different spleen preserving operative techniques: partial or subtotal spleen resection and spleen autotransplantation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 66 (1), 83-96, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-160231>  
IF: 1.679 (2016)
8. Magyar, Z., Molnár, Á., Nachmias, B. D., Mann, D., **Somogyi, V.**, Mester, A., Pető, K., Németh, N.: Impact of groin flap ischemia-reperfusion on red blood cell micro-rheological parameters in a follow-up study on rats. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* [Epub ahead of print], 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/CH-170277>  
IF: 1.679 (2016)





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

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 22,433**

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

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

Debrecen, 2018.04.25.



## 11. TÁRGYSZAVAK

haemorheologia

hemorheology

kronobiológia

chronobiology

faji- és nemi különbségek

interspecies and gender differences

vörösvérsejt deformabilitás

red blood cell deformability

vörösvérsejt aggregatio

red blood cell aggregation

membrán stabilitás

membrane stability

osmoscan gradiens ektacytometria

osmotic gradient ektacytometry

## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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

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

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

## **13. FÜGGELÉK**

**Az értekezés alapját képező *in extenso* közlemények másolatai**