

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**LABORATÓRIUMI ÁLLATOK
MICRO-RHEOLOGIAI TULAJDONSÁGAINAK
ÖSSZEHASONLÍTÓ STANDARDIZÁCIÓS VIZSGÁLATAI
KÍSÉRLETES SEBÉSZETI KUTATÁSOKHOZ**

Dr. Kiss Ferenc

Témavezető:
Dr. Németh Norbert, Ph.D.



**DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola**

2012

A doktori tézis betétlapja

**LABORATÓRIUMI ÁLLATOK MICRO-RHEOLOGIAI TULAJDONSÁGAINAK
ÖSSZEHASONLÍTÓ STANDARDIZÁCIÓS VIZSGÁLATAI
KÍSÉRLETES SEBÉSZETI KUTATÁSOKHOZ**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Kiss Ferenc általános orvos

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

Témavezető: Dr. Németh Norbert, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok: Dr. Soltész Pál, az MTA doktora
Dr. Vokó Zoltán, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja:

Szemklinika könyvtár, 2012. január 13. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Bogár Lajos, az MTA doktora
Dr. Bereczky Zsuzsanna, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Bogár Lajos, az MTA doktora
Dr. Bereczky Zsuzsanna, Ph.D.
Dr. Soltész Pál, az MTA doktora
Dr. Vokó Zoltán, Ph.D.

.

Az értekezés védésének időpontja:

I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme, 2012. január 13. 14 óra

1. BEVEZETÉS

Alfred L. Copley 1951-ben definiálta a haemorheologia fogalmát a vér alakos és plazmatikus komponenseinek, valamint a vérrel kontaktusban lévő érfal makro- és mikroszkópikus áramlástanának tudományaként.

A haematocrit, a plazma viszkozitás és a fibrinogén koncentráció mellett a vér viszkozitását befolyásoló tényezők közül kiemelt fontosságú micro-rheologiai paraméter a vörösvérsejt deformabilitás és a vörösvérsejt aggregatio.

A vörösvérsejtek deformabilitása jellemezhető a nyíróerő hatására létrejövő passzív alakváltozás mértékével. A megfelelő deformabilitásnak az úgynevezett egyenkénti áramlás zónában (érátmérő $< 8 \mu\text{m}$) van a legnagyobb jelentősége, hiszen a szervezetben számos helyen (szívizom, agy) a $3\text{-}5 \mu\text{m}$ vagy annál kisebb átmérőjű microcapillarisokon csak a megfelelően elnyújtható vörösvérsejtek tudnak áthaladni. A deformabilitás paraméter meghatározásának jelentősége ebben rejlik, hiszen a bármilyen okból károsodott, rigidebbé váló vörösvérsejtek a szöveti microcirculatio területén okoznak további zavarokat.

A vörösvérsejteknek a deformabilitását számos celluláris faktor határozza meg, melyek igen érzékenyek a sejtek homeostasisának változásaira. A deformabilitás fő meghatározói a cytoskeletális struktúra, a sejt morphológiája, felszín-térfogat aránya, a belső viszkozitás (haemoglobintartalom), valamint a sejtmembrán saját viszkozitása.

A bizonnyal erythrocyták másik fontos micro-rheologiai tulajdonsága a stasis során vagy alacsony sebesség-gradiensnél létrejövő reverzibilis összekapcsolódás, az aggregatio. A vörösvérsejtek aggregációját, annak mértékét plazmatikus és celluláris faktorok együttesen határozzák meg. A plazmatikus faktorok közül fontos a fibrinogén koncentráció, illetve *in vitro* körülmények között más, nagy és elágazó térszerkezetű makromolekulák jelenléte. A celluláris faktorok közé tartozik a vörösvérsejtek alakja, deformálhatósága és az igen nehezen meghatározható glycocalyx összetétel.

A fokozott vörösvérsejt aggregatio következményeként a tömeges áramlási szakaszban nő a particulum-méret, következményes viszkozitás emelkedéssel az alacsonyabb sebesség-gradiens tartományokban. A mikrokeringésben nagyobb disaggregáló energiára van szükség az aggregatumok feltöréséhez, csökkenhet a szöveti haematocrit.

Mára, a modern rheologiai mérőmódszerek elterjedésével igazi multidiszciplináris területté vált a haemorheologia az alap- és alkalmazott kutatásoktól a klinikai vizsgálatokig. A vizsgált problémák nagy része természetszerűen klinikai kérdéskörök, amelyekre a választ gyakran a kísérletes orvostudományban használt állatmodellek képesek adni. A vér és plazma viszkozitás, haematocrit, vörösvérsejt deformabilitás, vörösvérsejt aggregatio, fibrinogén kóros, gyakran jelző értékű változásokat mutatnak cardiovascularis és cerebrovascularis kórképekben, peripheriás érbetegségekben, gerontologiai vonatkozásokban, anyagcsere betegségekben, gyulladásos-, ischaemia-reperfusiós és septicus folyamatokban, továbbá a lépfunkció csökkenésekor vagy elvesztésekor.

A kutatások során az eredmények validitásának, értékelhetőségének és extrapolálhatóságának az alappillérét képezi, hogy a kialakított kutatási modell tervezése és kivitelezése korszerű laborállat-tudományi elvek szerint és standardizált körülmények között történjen, beleértve a megfelelő laboratóriumi/kísérleti állatfaj megválasztását, az esetszám és a nemi arányok meghatározását, a vérvétel helyének, mennyiségének, valamint a mintakezelési és mintaelőkészítési körülményeket is. Ezen elvek és standardok nélkül a különböző laboratóriumi állatfajokból, más-más kutató csoportoktól származó kutatási eredmények biztonsággal nem hasonlíthatók össze, és nem extrapolálhatóak megfelelően a humán klinikai gyakorlatból felmerülő kérdéskörökre.

A faji haemorheologiai különbségekről egyre több ismeret áll a rendelkezésre, azonban a laboratóriumi állatok nemi különbségei kevésbé

ismertek. Humán vonatkozásban jól kimutathatóak a nemi haemorheologiai különbségek, amelyek szignifikánsak lehetnek. E kérdéskör vizsgálata a kísérletes modellekben kialakított csoportok nemi eloszlását tekintve lehet fontos.

Az egyes mérőműszerek eltérő érzékenységgel mutathatnak ki változásokat a laboratóriumi állatfajok vérmintáiban. Feltételezhető, hogy a vörösvérsejt deformabilitás ektacytometriás méréseinél az alkalmazható oldatok viszkozitásának növelésével a vörösvérsejt deformabilitás faji- és nemi különbségei is érzékenyebben kimutathatóak mind normál, mind az összehasonlító vizsgálatokhoz alkalmazott hőkárosított, rigid vörösvérsejtek vonatkozásában.

Feltételeztük, hogy az eltérő mintakezelési és méréstechnikai körülményekből adódó különbségek megközelíthetők, vagy akár el is fedhetik a kísérleti csoportok között indukált pathophysiologiai folyamatokban kimutatható jelentős, gyakran szignifikáns haemorheologiai változások mértékét.

Kutatásaink néhány, az állatkísérletes haemorheologiai méréstechnikai standardok kialakításában fontos kérdéskör elemzésére irányultak a mintakezelési és műszer-érzékenységi összehasonlító vizsgálatokkal, azzal a céllal, hogy a kísérletes sebészeti kutatásokban alkalmazott állatmodellek tervezéséhez, és a haemorheologiai mérések jól összehasonlítható eredményeket adó kivitelezéséhez adatokat szolgáltatassunk.

2. CÉLKITŰZÉSEK

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

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Nemi különbségek haematologiai és haemorheologiai elemzése laboratóriumi állatokon

3.1.1. Kísérleti állatok és vérvételi protokoll

Vizsgálataink során felnőtt, közép súlyú, hím és nőstény CD outbred patkányok és inbred beagle kutyák haemorheologiai paramétereit hasonlítottuk össze a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Sebészeti Műtéttani Tanszékének kutatási programjaiba vont állatok közül az egészséges kontroll csoportok adatainak felhasználásával. Az adatokat nyújtó kísérletek Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság (DE MÁB) által nyilvántartott engedélyszámai: 6/2000., 7/2006., 34/2007., 37/2007. DE MÁB.

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

Haematologiai, vörösvérsejt aggregációs és ektacytometrián alapuló vörösvérsejt deformabilitási mérésekhez anticoagulánsként K₃-EDTA-t használtunk (beagle kutya: 7,5%, 0,04 ml, BD Vacutainer[®] csövek; CD patkány: 1,5 mg/ml koncentrációban fecskendőben). Vér viszkozitás és filtrometrián alapuló vörösvérsejt deformabilitási mérésekhez Na-heparin anticoagulánst használtunk (beagle kutya: 143 IU, BD Vacutainer[®]; CD patkány: 10-15 U/ml fecskendőben). A fibrinogén koncentrációt Na-citráttal anticoagulált vérminták plazmájából határoztuk meg (beagle kutya és CD patkány: 0,129 M, BD Vacutainer[®] csövek).

3.1.2. Haematologiai paraméterek meghatározása

A mennyiségi és minőségi haematologiai paramétereket Sysmex F-800 microcell counter-rel (TOA Medical Electronics Co., Ltd., Japán) határoztuk meg. A vizsgálatokhoz 70 µl anticoagulált vér szükséges.

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

3.1.3. Haemorheologiai paraméterek vizsgálata

3.1.3.1. A teljes vér és plazma viszkozitás meghatározása

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

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

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

3.1.3.2. A fibrinogén koncentráció mérése

Sysmex CA-500 coagulometer (TOA Medical Electronics Co., Ltd., Japán) segítségével határoztuk meg a fibrinogén koncentrációt (Fbg [g/l]) Clauss módszere alapján. Az összehasonlító vizsgálatokhoz 32 hím és 27 nőstény beagle kutya, illetve 20 hím és 12 nőstény CD patkány adatait használtuk.

3.1.3.3. A vörösvérsejt deformabilitás meghatározása

3.1.3.3.1. Filtrometria

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

A vizsgálatokhoz vörösvérsejtek normál foszfátpufferben (PBS; osmolaritás: 295 ± 5 mOsm/kg; pH: 7,4) elkészített 5%-os szuszpenziói

szükségesek. A vörösvérsejt-PBS szuszpenzió konstans filtrációs nyomással (4 cmH₂O) 5 µm átlagos pórusméretű polycarbonát Nucleopore® filteren halad keresztül. A fotodetektorokkal történő helyzet-idő érzékelés alapján meghatározható filtrációs sebességből a kapcsolt szoftver kiszámolja a kezdeti relatív filtrációs ráta (initial relative filtration rate, IRFR) és a szuszpenzió haematocritjának ismeretében, a relatív sejt-tranzitidő (relative cell transit time, RCTT) paramétereket: $RCTT = [(IRFR^{-1} - 1)/Hct] + 1$

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

3.1.3.3.2. Ektacytometria

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

A mintaelőkészítés során a 6 µl mintát 600 µl, magas -általában 20 mPa.s feletti- viszkozitású, isotoniás polyvinyl-pyrrolidon (PVP, 360 kDa) oldatba mértük. A magas viszkozitású közegre azért van szükség, hogy a mérések során az alkalmazott nyírófeszültség sejtekre történő átadása megtörténjen, lehetővé téve azok elongációját. A készülék a laser-diffractogram elemzésével határozza meg a vörösvérsejtek elongációs index (EI) értékét adott nyírófeszültség (SS) érték mellett. Az EI a sejt deformálhatóságával párhuzamosan nő.

Az EI-SS görbék összehasonlításához a 3 Pa-nál mért EI értékeket és a Lineweaver-Burk analízissel kalkulált maximális elongációs index (EI_{max}) és ennek feléhez tartozó nyírófeszültség (SS_½ [Pa]) értéket használtuk:

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

Az SS_½ érték növekszik a vörösvérsejt deformabilitás csökkenésével.

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

3.1.3.4. A vörösvérsejt aggregatio meghatározása

A vörösvérsejt aggregatio meghatározását fénytranszmissziós elven működő Myrenne MA-1 erythrocyta aggregometerrel (Myrenne GmbH, Németország) végeztük. A mérésekhez 20 μ l anticoagulált vérminta szükséges.

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

A mérések során a tárgylemez és a kúp közé helyezett vérmintát 600 s⁻¹ sebesség-gradienssel néhány másodpercig disaggregálja a készülék, majd a sebesség-gradiens hirtelen nullára (M mód) vagy igen alacsony értékre, 3 s⁻¹-ra (M1 mód) csökken. Eközben a vérminta fényáteresztő képességének megváltozása alapján a készülék aggregációs indexet számít az aggregációs folyamat 5., illetve 10. másodpercében. Fokozott aggregatio esetén mind az M, mind az M1 paraméterek emelkednek.

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

3.1.4. Statisztikai analízis

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

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

3.2.1. Kísérleti állatok és mintavétel

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

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

Patkányoktól általános anaesthesiában (Na-pentobarbital, 35 mg/kg, i.p.) cardialis punctio révén, beagle kutyáktól a vena cephalica punctiójával zárt rendszerben 6-8 ml vérmintát vettünk állatonként K_3 -EDTA-t tartalmazó vérvételi csövekbe (7,5% 0,04 ml, BD Vacutainer®). Beagle kutyáktól további 6 ml vért vettünk Na-heparint tartalmazó vérvételi csövekbe (143 IU, BD Vacutainer®) a viszkozitási vizsgálatokhoz.

3.2.2. Tárolási és mintaelőkészítési protokoll

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

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

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

3.2.3. Laboratóriumi mérések

A haematologiai paramétereket a 3.1.2. fejezetben leírtaknak megfelelően Sysmex F-800-as haematologiai automatával határoztuk meg mindegyik vérminta valamennyi almintájából. Az eredmények közül az átlagos vörösvérsejt térfogat (mean cell volume, MCV [fl]) változásának értékeit ismertetjük.

A teljes vér és plazma viszkozitás meghatározása a 3.1.3.1. fejezetben, vörösvérsejt deformabilitás filtrometriás mérése a 3.1.3.3.1. fejezetben leírtak szerint történt. Ezeket a méréseket csak a beagle kutyák hűtve tárolt mintáin végeztük a vizsgálatokhoz szükséges vérmennyiség miatt.

Ektacytometriás elven (Rheoscan-D200 slit-flow ektacytometer) a K₃-EDTA-val anticoagulált szobahőmérsékleten vagy hűtve tárolt vérmintákból kerültek meghatározásra a 3.1.3.3.2. fejezetben leírtak szerint.

A vörösvérsejtek aggregációjának vizsgálata Myrenne MA-1 aggregometerrel a 3.1.3.4. fejezetben ismertetett módon történt.

3.2.4. Statisztikai analízis

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

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

3.3.1. Nemi különbségek további ektacytometriás vizsgálatai

3.3.1.1. Kísérleti állatok és mintavétel

Kísérleteinket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság (DE MÁB) által 37/2007. számon nyilvántartásba vett hatósági engedéllyel

végeztük 10 hím ($455,6 \pm 38,1$ g) és 10 nőstény ($284,8 \pm 14,3$ g) egészséges, 8 hónapos Sprague-Dawley (SD) patkány, továbbá 10 hím ($12,9 \pm 1,6$ kg) és 10 nőstény ($12,3 \pm 2,3$ kg), egészséges, 3-4 éves beagle kutya bevonásával.

A vérvételek a reggeli órákban (8 és 10 óra között) történtek. Patkányok esetén a lateralis farok vena 26 G-s tűvel történő punctiójával 0,5 ml vérmintát vettünk Na-EDTA-t (1,5 mg/ml) tartalmazó fecskendőbe. Kutyák esetén a vérvétel zárt vérvételi rendszerben történt a vena cephalica punctiója révén (K_3 -EDTA, 7,5% 0,04 ml; BD Vacutainer®).

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

3.3.1.2. Mintaelőkészítés és vörösvérsejt deformabilitás mérés

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

A további mintaelőkészítés és a vörösvérsejt deformabilitás meghatározása a 3.1.3.3.2. fejezetben leírtak szerint történt.

3.3.2. *Ektacytometriás mérések érzékenységének vizsgálata laboratóriumi állatok hőkezelt vörösvérsejtjeivel*

3.3.2.1. Kísérleti állatok és mintavétel

Vizsgálatainkba 8 nőstény, egészséges Sprague-Dawley patkányt ($334 \pm 55,8$ g) és 8 nőstény, egészséges beagle kutyát ($11,05 \pm 1,41$ kg) vontuk be.

Patkányok esetén a vérvétel általános anaesthesiában történt (Na-thiopenthal 60 mg/kg, i.p., Thiopenthal®, Biochemie GmbH, Ausztria): median laparotomiát végeztünk, majd 26 G-s tű és a hozzá csatlakoztatott

anticoagulánst (Na-EDTA, 1,5 mg/ml) tartalmazó fecskendő segítségével 1,5 ml vérmintát vettünk a vena cava caudalis punctiója révén. A vérvételt követően az állatokat exsanguináltuk.

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

3.3.2.2. Mintaelőkészítés és hőkezelés

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

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

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

3.3.2.3. Haematologiai és morphologiai vizsgálatok

A natív és a vörösvérsejt-PBS szuszpenziók haematologiai paramétereinek közül a haematocrit (Htc [%]) és a vörösvérsejt átlagos térfogat (MCV [fl]) értékeket elemeztük. A vörösvérsejt-PBS szuszpenziókban a hőkezelés hatására bekövetkező vörösvérsejt morphologiai változások megfigyelésére a mintákat zsírtalanított tárgylemezre cseppentettük, majd fedőlappal borítottuk. A vizsgálathoz Nikon Eclipse E200 mikroszkópot használtunk.

3.3.2.4. A vörösvérsejt deformabilitás meghatározása

A natív minták, a normál és hőkezelt vörösvérsejt-PBS szuszpenziók vörösvérsejt deformabilitás meghatározása a 3.1.3.3.2. fejezetben leírtak szerint

történt, párhuzamosan 15, 20 és 30 mPa.s viszkozitású PVP-PBS szuszpenziós oldatok alkalmazásával.

3.3.2.5. Statisztikai analízis

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. *Nemi különbségek haematologiai és haemorheologiai elemzése laboratóriumi állatokon*

4.1.1. *Haematologiai paraméterek*

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

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

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

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

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

4.1.2. *Haemorheologiai paraméterek*

4.1.2.1. Teljes vér és plazma viszkozitás

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

A plazma viszkozitás (PV [mPa.s]) a nőstény patkányokban volt szignifikánsan magasabb a hímekhez képest, a szignifikánsan magasabb

fibrinogén koncentráció (Fbg [g/dl]) mellett. Beagle kutyák hím és nőstény egyedeiben mind a plazma viszkozitás, mind a fibrinogén koncentráció hasonló volt.

4.1.2.2. Vörösvérsejt deformabilitás

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

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

Az EI-SS görbék összehasonlítására alkalmas paramétereknél patkányokban a 3 Pa nyírófeszültségnél mért EI értékek szignifikánsan magasabbak voltak a nőstények esetén, míg az EI_{max} értéke nem mutatott szignifikáns nemi eltérést. Az $SS_{1/2}$ [Pa] értékek alacsonyabbak voltak a nőstényekben, bár a különbség nem érte el a szignifikáns mértéket.

Beagle kutyák esetén a hímek rendelkeztek jobb vörösvérsejt deformabilitási mutatókkal, bár a különbség nem érte el a szignifikáns szintet.

4.1.2.3. Vörösvérsejt aggregatio

CD patkányoknál a nőstények mutattak magasabb aggregációs index értékeket, kifejezett nemi különbséget adva (M 5 sec: 77,8%; M1 5 sec: 25%; M 10 sec: 87%; M1 10 sec: 36,3%). Beagle kutyák esetén a hímeknél tapasztaltunk nagyobb aggregációs index értékeket. A nemi különbségek

mértéke bár jelentős volt, nem érte el a patkányoknál tapasztalt arányokat (M 5 sec: 39,5%; M1 5 sec: 41,7%; M 10 sec: 4%; M1 10 sec: 16,5%).

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

Állatkísérletes vonatkozásban a fajok közötti haemorheológiai különbségekről az újabb mérőmódszerek kifejlesztésével és elterjedésével egyre több ismeret áll rendelkezésre, a nemi különbségekről azonban kevés adat ismert, és rendszerezett összehasonlító tanulmányt nem találtunk.

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

4.2. A tárolási idő és hőmérséklet hatása laboratóriumi állatok vérmintáinak haematológiai és haemorheológiai paramétereire

4.2.1. Haematológiai paraméterek

A haematológiai paraméterek közül a vörösvérsejt átlagos térfogat (MCV [fl]) értékek szobahőmérsékleten való tárolás esetén egyik faj vérmintájában sem mutatott jelentős változást az első 6 órán belül. 24 óra elteltével mindkét faj esetén nőtt az MCV, patkányoknál 25%-kal. A beagle kutyák MCV értéke

24 óra elteltével is folyamatosan nőtt a vizsgálati időtartam alatt (24 óra: 9%, 48 óra: 19%, 72 óra: 28%).

Hűtéssel történt tárolásnál az MCV növekedése mindkét állatfajnál kiküszöbölhető volt a vizsgált 72 óra alatt, bár kutyák esetén 72 óra elteltével 5%-os emelkedést tapasztaltunk.

4.2.2. Haemorheologiai paraméterek

4.2.2.1. Teljes vér és plazma viszkozitás

A teljes vér viszkozitásban a hűtéssel történő tárolás esetén már 24 óra elteltével emelkedést tapasztaltunk. A plazma viszkozításban ellentétes irányú tendenciát figyelhattunk meg, amely 48 óra elteltével mutatott szignifikáns csökkenést.

4.2.2.2. Vörösvérsejt deformabilitás

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

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

E két paraméter változásai a hűtés ellenére romló vörösvérsejt deformabilitásra utaltak a tárolási idő előrehaladtával.

Az ektacytometriával meghatározott vörösvérsejt deformabilitási paraméterekben a szobahőmérsékleten tárolt patkány vérminták esetén az első 6 órában változást nem tapasztaltunk, de ezt követően jelentős és folyamatos EI csökkenés mutatkozott. 24 óra elteltével a változások még csak a vizsgált legmagasabb nyírófeszültség értékeknél (10, 20 Pa) meghatározott EI értékekben mutatkoztak, de 48 és 72 óra elteltével mindegyik nyírófeszültség

tartományban szignifikáns deformabilitás romlást tapasztaltunk. Hűtéssel való tárolásnál ez a romlás kivédhető volt.

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

4.2.2.3. Vörösvérsejt aggregatio

A szobahőmérsékleten tárolt patkány vérminták 10 secundos üzemmódban mért vörösvérsejt aggregációs index értékeiben bifázisos jellegű változást tapasztaltunk mind az M, mind az M1 paraméterek vonatkozásában. Már 2 óra elteltével az aggregációs index értékek szignifikáns, 40-60%-os csökkenését észleltük, amely csökkenés tovább folytatódott 4, illetve 6 óra elteltével. Azonban 24 óra tárolás után az aggregációs index értékek növekedni kezdtek, megközelítve, majd elérve, és az M1 index paraméter esetében 72 óra múltán meghaladva a kiindulási értékeket. A 4-8 °C-on történő hűtve tárolással az M és M1 értékek szignifikánsan alacsonyabbak maradtak a kiindulási értékekhez képest.

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

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

Az észlelt micro-rheologiai változások egy részének magyarázatául szolgálhatnak a vörösvérsejt deformabilitást meghatározó faktorokban, mint a sejtmembrán felületének a sejt térfogatához viszonyított arányában, valamint a sejt alakjában, méretében, felszín-térfogat arányában bekövetkező változások. A szobahőmérsékleten tárolt vérminták MCV érték növekedése szerepet játszhatott a vörösvérsejtek deformálhatóságának csökkenésében is.

A vörösvérsejtek aggregációs index változásainak vonatkozásában, feltételezhető, hogy a háttérben részben a plazma proteinek degradációja, a megváltozott sejtfelszíni töltésmintázata és a glycocalyx változásai állhatnak, azonban a morfológiai változásoknak is kulcsfontosságú szerepe lehet. A patkány vörösvérsejtek rendkívül érzékenyek a mikrokörnyezeti változásokra. Az echinocytá formák jelenléte a deformabilitás értékek romlásával jár, továbbá ezek a sejthalakok aggregációra nem, vagy csak nehezen képesek. A patkány vörösvérsejtek környezeti hatásokra való érzékenysége jelentős mértékű echinocytá-átalakuláshoz vezet, így érthető az aggregációs index csökkenése. A tárolás előrehaladtával, amikor a sejtek a hypoxia és az energia depletio miatt már nem képesek fenntartani volumenjüket, duzzadni kezdenek, s így az echinocytá alakok száma is csökken.

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

4.3.1. Nemi különbségek további ektacytometriás vizsgálatai

Mind a Sprague-Dawley (SD) patkányok, mind beagle kutyák elongációs index értékei a 15 mPa.s viszkozitású PVP oldat alkalmazásakor bizonyultak a

legalacsonyabbaknak, míg a legmagasabb értékeket a 30 mPa.s viszkozitású közeg használatával mérhettük. A 15 és 20 mPa.s-os oldatokban meghatározott elongációs index értékek közötti különbség nagyságrendileg hasonló volt a 20 és 30 mPa.s-os oldatok használatával kapott eredmények közötti különbségével.

A legnagyobb variabilitást mindkét állatfajnál a 30 mPa.s viszkozitású közegben történt méréseknél tapasztaltunk.

Mindkét faj és mindkét nem esetén a 15 és 20 mPa.s viszkozitású közeg alkalmazása esetén a 3 Pa-nál meghatározott EI értékek szignifikánsan alacsonyabbak ($p < 0,001$) voltak a 30 mPa.s viszkozitású közeg használatakor mértékhez képest. Szignifikáns nemi különbségeket patkányokban találtunk a 20 és a 30 mPa.s viszkozitású közegek alkalmazásakor ($p = 0,027$; $p = 0,01$).

A 15 és 20 mPa.s-os közegek esetén szignifikánsan alacsonyabb EI_{max} értékeket kaptunk a 30 mPa.s-os oldatnál mért eredményekhez képest. Kutyák vérmintáiban a legmagasabb EI_{max} értékeket a 20 mPa.s-os közegnél észleltük, ami hím állatoknál szignifikánsan magasabb volt a 30 mPa.s-os oldatnál mért adatokhoz képest ($p = 0,007$). A 15 és a 20 mPa.s-os oldatok esetén az $SS_{1/2}$ értéke szignifikánsan magasabb volt a 30 mPa.s-os oldatnál mértékkel összevetve (SD patkány hímeknél: $p = 0,001$ és $p = 0,04$, nőstényeknél: $p < 0,001$ és $p = 0,037$; beagle kutya hímeknél: $p < 0,001$ és $p < 0,001$, nőstényeknél: $p < 0,001$ és $p = 0,004$).

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

4.3.2. Ektacytometriás mérések érzékenységének vizsgálata laboratóriumi állatok hőkezelt vörösvérsejtjeivel

4.3.2.1. Haematológiai és morfológiai változások

Mindkét állatfajnál a szuszpenziók vörösvérsejtjei legnagyobb részben megtartott morfológiával rendelkeztek, csak néhány echinocytoid alak volt mikroszkóppal megfigyelhető. A hőkezelés hatására az echinocytá és

fragmentálódott sejtalakok számának növekedését észleltük a normális discoid alakok csökkenésével párhuzamosan.

4.3.2.2. A vörösvérsejt deformabilitás változásai

Mindkét faj vérmintáiban az elongatiós index értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a vörösvérsejt-PBS szuszpenziók esetén a natív, normál vérminták mérési eredményeihez képest.

A hőkezelést követően az EI értékek szignifikánsan alacsonyabbnak ($p < 0,001$) mutatkoztak mindegyik PVP oldat használata során. A legalacsonyabb értékeket ebben a vizsgálati sorozatban is a 15 mPa.s, a legmagasabbakat a 30 mPa.s viszkozitású oldat alkalmazásánál kaptuk.

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

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

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

Beagle kutyák vérmintáinál is megfigyelhettük, hogy az EI értékek szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkoztak a vörösvérsejt-PBS szuszpenziók esetén a natív vérminták értékeihez képest ($p < 0,001$).

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

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

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

A vörösvérsejt deformabilitás korszerű meghatározására alkalmas haemorheológiai laboratóriumi műszer, a Rheoscan-D200 slit-flow ektacytometer, melynek érzékenysége eltérő lehet a faji- és nemi különbségek kapcsán.

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

Mindkét állatfaj vörösvérsejt deformabilitási értékei szignifikáns különbséget mutattak a natív vérminták és a vörösvérsejt-PBS szuszpenziók összehasonlításakor is. Ennek hátterében feltehetőleg a vörösvérsejt-PBS szuszpenziók jelentősen alacsonyabb haematocrit értéke állhat. A natív vérminták legalább négyszer-ötször magasabb átlagos haematocrit értékkel

rendelkeztek (patkány: 44,56%, kutya: 54,58%), mint a vörösvérsejt-PBS szuszpenziók, amiket 10%-os haematocrit értékre készítettünk elő.

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

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

4.4. Az eredmények hasznosíthatósága a kísérletes sebészeti kutatásokban

A humán laboratóriumi alkalmazásra kidolgozott haemorheológiai mérés technikai útmutatókhoz hasonló, állatkísérletekre és haemorheológiai témájú kísérletes sebészeti kutatásokra vonatkozó ajánlás nem ismert.

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

A CD patkányok és beagle kutyák vérmintáiban talált szignifikáns mértékű haemorheológiai faji- és nemi különbségek megismerése segítheti a kísérleti csoportok megtervezését. Ajánlott a homogén, egynemű csoportok kialakítása, vagy az adott pathophysiologiai változás eleve nemi bontásban

történő vizsgálata, hiszen a különböző egyedszámú, kevert nemű csoportok eredményei elfedhetik, torzíthatják a kísérleti csoportok közötti valós különbségeket.

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

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

Az eredmények szerint elmondható, hogy vizsgált laboratóriumi állatfajok vérmintáira vonatkozóan a nem megfelelő mintakezelési, mintaelőkészítési és mérés technikai körülményekből fakadó változások, valamint a faji- és nemi különbségek megközelíthetők, vagy akár el is fedhetik a kísérletes sebészeti modellekben vizsgált pathophysiologiai változások mértékét. Ezért az összehasonlító adatok támpontot nyújthatnak a kísérletek tervezéséhez, a haemorheologiai mérések kivitelezéséhez és az eredmények értékeléséhez.

5. FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA

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

5. Először mutattuk ki, hogy Sprague-Dawley patkányok és beagle kutyák vörösvérsejtei eltérő mértékben érzékenyek a hőkezelésre (48 °C, 9 perc). A különbségeket a 30 mPa.s viszkozitású PVP oldat használatával mutattuk ki a legérzékenyebben.

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

Az értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények

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

Az értekezés témájával összefüggő in extenso közlemények

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

Egyéb in extenso közlemények

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

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

Összesített IF: 24,829

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

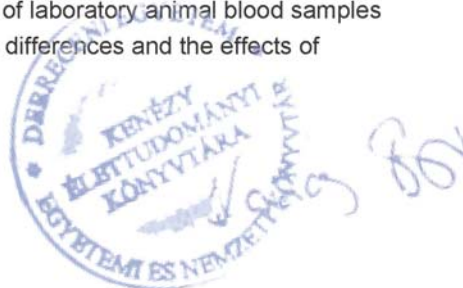
Jelölt: Kiss Ferenc

Neptun kód: FWXQXQ

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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



További Közlemények

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

IF:2.838

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

Összesített impakt faktor: 24,829

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

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

Debrecen, 2011.08.01



Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

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

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