

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A thrombocyta-leukocyta vegyes aggregátum képződés, a thrombocyta EDRF/NO termelés és a haemorheologiai tényezők változása diabetes mellitusban, szerepük az angiopathia kialakulásában

Dr. Káplár Miklós

**DEBRECENI EGYETEM ORVOS- és EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
I. sz. BELGYÓGYÁSZATI KLINIKA
ANYAGCSEREBETEGSÉGEK TANSZÉKE
DEBRECEN
2002.**

BEVEZETÉS

A cukorbetegség a világ népességének egyre nagyobb hányadát érinti, incidenciája évről évre emelkedik. A diabeteses betegek megfelelő kezelése, gondozása mellett komoly feladatot jelent a betegséggel összefüggésben kialakuló szövődmények ellátása, melyek gyakorisága a diabeteses betegek számának emelkedését követi. A már kialakult érszövődmény okozta panaszokat sok esetben csak mérsékelni lehet, gyógyítani nem, a hangsúlyt a szövődmények megelőzésére kell helyezni.

A cukorbetegség érszövődményeinek megelőzésére irányuló törekvések az utóbbi években felerősödtek. A DCCT és a UKPDS tanulmányok eredményei egyértelműen igazolták a normoglykaemia angiopathia megelőzésben betöltött alapvető szerepét, emellett a UKPDS a normotensio fontosságát is hangsúlyozza. Irodalmi adatok szerint a szénhidrátháztartás és a vérnyomás normalizálása kb 30-70 százalékkal képes mérsékelni a kísér-szövődmények előfordulási gyakoriságát. Az ennél is eredményesebb prevenció megvalósításának feltétele az érszövődmények kialakulásának az eddigieknél pontosabb megismerése. A legújabb kutatási eredmények szerint egyes nem glykaemia függő, örökletes tényezők, mint a vasanyagcsere - haemochromatosis heterozigóta állapot, haptoglobin polimorfizmus is jelentősek az érszövődmények kialakulásában, sőt, alkalmasak lehetnek az angiopathia-hajlam előrejelzésére.

Az elmúlt években számos kutatócsoport foglalkozott a diabeteses angiopathia kialakulását meghatározó tényezőkkel. Igazolták az oxidatív stressz, a fokozott thrombocytá aktiváció, a haemorheológiai eltérések, az endothelium diszfunkció, a glikációs folyamatok stb. szerepét. Egyes szerzők kiemelten fontosnak tartják az oxidatív folyamatokat, valamint az akut (étkezést követő), aránylag rövid ideig tartó hyperglykaemiát.

Magas thrombocytá számmal járó myeloproliferatív kórképekben szenvedő betegek gyakorta említenek mikrocirkulációs zavarokra visszavezethető panaszokat, mint ujjzsibbadás, szédülés, fejfájás stb. Ebben a betegcsoportban gyakrabban fordulnak elő thromboemboliás események mint egészségesekben, a betegség sajátos természetéből adódóan pedig vérzéses szövődmények is felléphetnek (pl. agyvérzés).

Ph.D. értekezésemben elsősorban a diabeteses angiopathia, kisebb részben a magas thrombocytá számmal járó myeloproliferatív kórképeket kísérő érszövődmények, ill. értünetek kialakulásában részt vevő tényezőkkel kívántam foglalkozni. Vizsgáltam a leukocytá-thrombocytá vegyes aggregátumok számának alakulását diabeteses betegekben külön elemezve a két fő diabetesformára (1-es és 2-es típusú), valamint az egyes érszövődmények szerint csoportosított betegekre vonatkozó adatokat. Cukorbetegekben a postprandialis vércukorszint emelkedés aggregátum képződésre gyakorolt hatását is megfigyeltem. A vegyes aggregátumok számát magas thrombocytá számmal járó myeloproliferatív kórképek esetén is tanulmányoztam, összefüggést kerestem a betegek értünetei és az aggregátum képződés mértéke között. A vizelettel ürített NO₂/NO₃ mennyiségéből következtettünk az endothelium EDRF/NO-termelésére, míg egy külön tanulmányban NO-mérő készülékkel in vitro vizsgáltuk diabeteses betegek thrombocytáinak NO-termelés változását. A haemorheológiai paraméterek közül a plazmaviszkozitást, a vörösvérsejtek deformabilitását, valamint a fibrinogén- és von Willebrand faktor (vWF) szinteket határoztuk meg. Mértük továbbá az oxidatív folyamatokat a plazmában és a vörösvérsejtekben. A hyperhomocysteinaemia és a Helicobacter Pylori diabeteses angiopathia kialakulását befolyásoló szerepét is tanulmányoztam. Összefüggéseket kerestem az egyes patogenetikai tényezők, a szénhidrát háztartás egyensúlya és az érszövődmények kialakulása között.

Vizsgálataim azokhoz a törekvésekhez kívánnak kiegészítő adatokat szolgáltatni, amelyek a diabeteses angiopathia pathogenesisének megértését, ezen keresztül hatékonyabb megelőzését és kezelését szolgálják.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során a következő kérdésekre kerestem választ:

- 1-es és 2-es típusú diabetesesekben, valamint magas thrombocytákkal járó myeloproliferatív kórképekben szenvedő betegekben emelkedett-e a leukocytá-thrombocytá vegyes aggregátumok száma?
- Diabeteses betegekben kimutatható-e összefüggés a vegyes aggregátum képződés és a szénhidrát-háztartás egyensúlya (HgbA1c) között?
- Diabeteses angiopathia eseteiben milyen az aggregátumok előfordulási gyakorisága, valószínűsíthető-e az aggregátumok érszűkítő hatás kialakulásában betöltött szerepe? A postprandialis vércukorszint emelkedés hatást gyakorol-e a vegyes aggregátum képződésre?
- Magas thrombocytákkal járó myeloproliferatív kórképekben gyakran fellépő tünetek (fejfájás, szédülés, ujjzsibbadás stb.) kialakulásában valószínűsíthető-e a vegyes aggregátumok szerepe?
- Miként változik diabeteses betegek thrombocytáinak NO termelése különböző fiziológiai stimulusok hatására?
- A mikrocirkulációt meghatározó haemorheológiai tényezők hogyan változnak diabeteses betegekben (plazmaviszkozitás, vörösvérsejt deformabilitás)?
- Miként változnak az oxidatív folyamatok, a lipidperoxidáció cukorbeteg plazmájában és vörösvérsejtjeiben?
- Kimutatható-e összefüggés az egyes, diabeteses érszűkítő hatás kialakulása szempontjából jelentős patogenetikai tényezők között?
- Hatást gyakorol-e az emelkedett homocysteinszint a diabeteses érszűkítő hatás kialakulására?
- Valószínűsíthető-e a *Helicobacter pylori* szerepe a diabeteses angiopathia létrejöttében?

MÓDSZEREK

Összesen kilencven, 1-es és 2-es típusú diabetes mellitusban szenvedő beteg esetében mértük a vegyes aggregátumok számát, közülük 54 esetben (27 1-es típusú, átlag életkor: 36 ± 14 év, 27 2-es típusú átlag életkor: 56 ± 10 év) a vörösvérsejt deformabilitását és intracelluláris lipidperoxidációját, a plazma lipidperoxidációt, a szérum és vizelet NO₂/NO₃ ürítést, a fibrinogénszintet és a plazmaviszkozitást is meghatároztuk. A *Helicobacter* pozitivitás meghatározást, a homocysteinszint és thrombocytá NO mérését más-más betegcsoportokon végeztük. *Helicobacter pylori* jelenlétét teszteltük 100 beteg esetében (51 férfi, 49 nő, 10 1-es típusú, 90 2-es típusú diabeteses beteg, átlagéletkor: $58,5 \pm 12,9$ év). Kontrollnak a Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézet adatait tekintettük. 79 esetben (15 1-es, 64 2-es típusú beteg) határoztuk meg az össz homocysteinszintet. A thrombocytá NO mérésben az egészséges kontroll csoportot 13 normoglykaemiás önkéntes (klinikai munkatárs, 3 nő, 10 férfi, átlagos életkor $38,5 \pm 6,2$ év) alkotta. Az 1-es típusú cukorbeteg csoportba tíz személy tartozott (7

férfi, 3 nő, átlagos életkor $22,3 \pm 4,1$ év), míg a 2-es típusú diabeteses csoport 12 betegből (9 nő, 3 férfi, életkor $62,3 \pm 11,4$ év) állt.

A vizsgálatban részt vevő betegek metabolikusan stabil állapotban voltak, súlyos hyper- vagy hypoglykaemia esetén nem kerülhettek be a vizsgálati csoportokba. Egyik csoport tagja sem kapott nitrit tartalmú gyógyszert, ill. a vizsgálatot megelőző tíz nap során a thrombocyták működését befolyásoló vagy más antithrombotikus szert.

A vegyes aggregátumok számának méréséhez heparinnal alvadásgátolt vérmintákat használtunk. Egységesen a vérvétel után 60 perccel dolgoztuk fel a mintákat. (Előzetes méréseink szerint az első 60 percben nem változik számottevően a vegyes aggregátumok száma, majd ezután szignifikánsan emelkedik.) Először FITC-cel jelölt CD42a (Becton Dickinson, San Jose, CA) és PE-Cy5-tel jelzett CD45 (DAKO Glostrup, Dánia) ellen termeltetett monoklonális antitesteket adtunk a vérmintához, majd 15 perces sötétben végzett inkubálás után lizáltuk a vörösvérsejteket (FACS lizáló oldat). A fehérvérsejteket kétszer mostuk foszfát-pufferben (PBS) majd 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk. A CD42a thrombocyták specifikus marker (a glikoprotein IX egyik komponense), a CD45 pedig a magvas vérsejtek felületén található pan-leukocyták marker. Flow-cytometerrel (FACSscan, Becton Dickinson, San Jose, CA) mértük a kettős pozitív jelet adó, tehát felületükön thrombocytákat hordozó fehérvérsejtek számát. Kettős jelöléssel kizárható, hogy a flow-cytometerrel történő mérés során a nagyobb thrombocyták aggregátumokat mint fehérvérsejteket értékeljük. A perifériás vér leukocyták populációit a CD45 marker és oldalszórás dot plot képek alapján azonosítottuk. Egy alkalommal 10.000 CD45 pozitív fehérvérsejtet vizsgáltunk, a vegyes aggregátumot alkotó (tehát CD45 és CD42a pozitív) fehérvérsejtek arányát százalékban fejeztük ki.

A vegyes aggregátumok számának alakulását az *akut vércukorszint-változás* függvényében is megfigyeltem. Olyan 2-es típusú diabetesben szenvedő betegeket választottunk ki a vizsgálatra akik csak diétával (4 beteg) vagy diéta mellett szedett acarboseval (6 beteg) tartották egyensúlyban szénhidrát háztartásukat. Három beteg az acarbose mellett kis dózisban sulfonilurea készítményt is szedett. (A sulfonilurea készítményt is szedő betegek a vizsgálat alatt csak acarbose-t vettek be.) Összesen tehát 13 beteget vontunk be a vizsgálatba, mely két egymást követő napon történt. Vérvételeket éhomi állapotban és 50 g szénhidrát tartalmú reggeli elfogyasztása után a 60. és a 120. percben végeztünk. Az első nap a betegek nem vettek be gyógyszert, a második nap közvetlenül a reggeli elfogyasztása előtt 100 mg acarbose-t vettek be.

A thrombocyták NO-termelését ex vivo NO-mérő készülékkel határoztuk meg. Vénás alvadásgátolt vérmintából származó vérlemezkéket (ACD /citrát/ oldat, Beckton-Dickinson) három ízben mostuk HEPES-pufferben (pH 7,4), majd a harmadik mosás után 0,9%-os NaCl-ben resuspendáltuk. A mosott thrombocyták suspensió NO termelésének mérése: a méréseket NO-szenzitív mikroelektrodájú, az in vitro celluláris NO termelés céljára kifejlesztett speciális készülékkel (ISONOP 200, ISO-NO WPI, Sarasota, Florida) végeztük. Az NO mennyiség standardizálására a gyár által mellékelt SNAP donort használtuk, hat koncentrációt felvéve. Az eredményeket egységesen 100000 thrombocytára vonatkoztatva adtuk meg. L-Arg tartalmú pufferben vizsgáltuk a vérlemezkék nyugalmi NO képzését, s ezt alapvonalnak tekintve alkalmaztuk az aktivátorokat: kollagént (2,5 mg/ml), thrombint (3,1 mE/ml), adrenalin (0,25 ug/ml) és ristomycint (31,5 ug/ml). A zárójelben levő számok a mérőfolyadékban levő aktivátor végkoncentrációkat jelzik. Minden esetben elvégeztük az inkubációt és a mérést az L-Arg kompetitív metabolikus inhibitorai jelenlétében is (így nem képes NO képződni), e célra a más közleményekben is alkalmazott L-NAME-t (nitro-L-arginine-metilészter), és L-NNA-t (L-nitro-L-arginine) használtunk.

Az NO termelődés pikoAmper (pA) nagyságrendű elektromos válaszként jelent meg az általunk alkalmazott thrombocyta/aktivátor rendszerben. A gyorsan emelkedő, majd tetőző áramerősség változást a reakcióidő függvényében görbéként ábráztuk, s azt az enzimkinetikából jól ismert paraméterekkel jellemeztük: így Vmax: az időegységre jutó pA változás, Km a maximális válasz feléig eltelt idő. Az NO termelés mennyiségi változásaira a Vmax a jellemző (ezt illesztettük a SNAP standard pontokhoz), míg a képződés gyorsaságát a Km érték jelzi (értelemszerűen a nagyobb szám lassabb produkcióra utal).

Az endothelium NO-termelésére a szérumban és vizeletben mért NO₃/NO₂ szintből következtettünk. Az NO rendkívül rövid féléletidejű molekula (3-5 másodperc), hamar NO₂-vé, ill. NO₃-má alakul, melyek szintje jól mérhető. Az elfogyasztott élelmiszerek fehérje tartalma nagymértékben befolyásolhatja az ürített NO₂/NO₃ mennyiségét, ezért a vizsgálatban részt vevő betegek a vizsgálatot megelőző nap 60 g fehérjetartalmú diétát tartottak.

A plazmaviszkozitást Haake mikroviszkozimeterrel mértük, eredményeinket mPas-ban fejeztük ki (Carat Diagnosztika, Budapest).

A vörösvérsejtek deformabilitását St. George típusú filtrométer segítségével határoztuk meg. 5µm pórusátmérőjű szűrőket alkalmaztunk. A sejtek deformabilitását a relatív sejtt tranzit idő (RCCT) jellemzi, alakváltozásuktól függően mennyi idő alatt jutnak át a szűrőn.

A fibrinogénszint mérését rutin haemostasis vizsgálat keretében végeztük (derivált fibrinogén módszer).

A vörösvérsejtek intracellularis lipidperoxidációját a sejtek malondialdehid szintjének mérésével határoztuk meg. Tiobarbitursavas módszert alkalmaztunk, 532 és 600 nm-en végzett fotometrálással határoztuk meg a malondialdehid szintet, melyet gramm haemoglobinra számított nmol malondialdehidben adtunk meg (nmol MDA/g Hgb).

A plazma lipidperoxidációra a teljes antioxidáns státusz (TAS) méréséből következtettünk, a lipidperoxidáció ugyanis a teljes antioxidáns státusz inverz képe. Méréseinkhez Randox kitet használtunk.

Az endothelium károsodás mértékére a szérum vWF szintje utalt, melyet ELISA módszerrel mértünk.

A homocystein meghatározást HPLC módszerrel végeztük.

A Helocobacter pylori pozitívításra urea-kilégzési teszt segítségével következtettünk (UBT).

Statisztikai kiértékelés: Az eredményeket átlag ± szórás alakban adtuk meg. A csoportok átlagainak összehasonlítására egyszempontos varianciaanalízist alkalmaztunk, Tukey-Kramer próbával kiegészítve a páronkénti összehasonlításokhoz. A változók közötti függő viszonyt a Pearson-féle korrelációs együtthatóval (r) jellemeztük.

EREDMÉNYEK

A thrombocyta-monocyta vegyes aggregatumok számában észleltünk jelentős, szignifikáns különbséget a diabeteses és a kontroll csoport között, a két diabeteses csoport között nem (1-es típ. diab. mell.: 43,0±17,8, 2-es típ. diab. mell.: 34,9±12,5, kontroll: 24,6±8,2; 1-es típ. diab. mell. vs kontroll: p<0,001, 2-es típ. diab. mell. vs kontroll: p<0,05, 1-es típ. diab. mell. vs 2-es típ. diab. mell.: p>0,05).

Magas thrombocytá számmal járó krónikus myeloproliferatív kórképek esetén még határozottabb thrombocytá-monocytá aggregátum szám emelkedést tapasztaltunk mint diabeteses betegekben (krónikus myeloproliferatív kórképek: $59,5 \pm 19,6$, kontroll: $21,4 \pm 8,4$).

A thrombocytá-monocytá aggregátumok diabeteses érszövödmények szerinti előfordulását illetően proliferatív retinopathia és mikroalbuminuriával járó nephropathia eseteiben észleltük a leghatározottabb emelkedést (proliferatív retinopathia: $47,5 \pm 18,6$, nephropathia (mikroalbuminúria): $41,5 \pm 15,4$).

A vegyes aggregátumok számának alakulása és az aktuális vércukorszint változás(emelkedés) között tendenciaszerű összefüggés igazolódott. A várakozásnak megfelelően az acarbose bevétele után alacsonyabb vércukorértékeket mértünk. Az átlagérték különbségek a 60. percben $1,1$ mmol/l-nek, a 120. percben pedig $0,5$ mmol/l-nek adódtak. A vegyes aggregátumok aránya között a 60. percben nem észleltünk különbséget, a 120. percben azonban igen. A thrombocytá-monocytá vegyes aggregátumok aránya a 120. percben $52,6\%$ volt a gyógyszert nem szedő, míg $44,8\%$ az acarbose-t szedő csoportban.

A thrombocytá NO válasz általában az aktivátor alkalmazását követően 20 - 40 másodpercen belül jelentkezett. Egészséges egyének thrombocytáinak kollagén stimulációt követő NO termelése jelentősen fokozódik (Isd. 1. Táblázat), L-Arg kompetitív antagonistáival (L-NAME, L-NNA) az NO válasz gátolható. Egészséges egyének thrombocytái különböző fiziológiás stimulusokra eltérő NO választ adnak. Legerőteljesebb NO termelés thrombinnal váltható ki, ezt követi az epinephrin, melyet a kollagén és a ristomycin követ, leggyengébb stimulusnak pedig az ADP bizonyult.

Az 1. Táblázatban a mosott vérelemzésekben a különféle ingerekre képződő, 100000 thrombocytára számolt átlagos NO koncentrációt (nMol/l/100000 thrombocytá), valamint kinetikus paraméterként az átlagos Km értéket (ez abszolút értékében a reakció sebességével fordítottan arányos), valamint szórásaikat tüntettük fel.

Vizsgált csoport	Kollagén		ADP		Adrenalin		Thrombin		Ristomycin	
	Nano mol/l	Km	Nano mol/l	Km	Nano mol/l	Km	Nano mol/l	Km	Nano mol/l	Km
Kontroll	901,3 ± 381,1	1,75 ± 1,48	377,3 ± 159,1	2,51 ± 1,98	950,2 ± 314,2	1,61 ± 1,51	1049 ± 402,2	1,66 ± 1,42	682,2 ± 292,4	1,44 ± 0,96
1-es típusú diabetes	529,1 ± 216,2	1,77 ± 1,36	188,6 ± 99,4	2,25 ± 1,23	821,9 ± 297,3	2,18 ± 0,91	555,4 ± 212,3	1,18 ± 0,50	823,0 ± 271,4	1,70 ± 1,16
2-es típusú diabetes	606,6 ± 346,5	1,31 ± 1,55	221,6 ± 178,2	1,44 ± 0,19	807,5 ± 394,5	3,87 ± 1,62	605,5 ± 286,1	1,87 ± 0,94	868,7 ± 375,0	2,37 ± 0,96

1. Táblázat. A thrombocytá NO képzés mennyisége (nmol/l/100000 thrombocytá) és sebessége (Km) a vizsgált egészségesekben és cukorbetegekben

Az eredmények jelentős szórása ellenére 1-es típusú diabetesben a thrombocytá NO produkció statisztikailag is jelentős (szignifikáns) mértékben csökkentnek bizonyult a kontrolcsoportéhoz képest kollagén, ADP, thrombin ingerléskor. Adrenalin esetében a képződött NO mennyisége nem csökkent, de a képzés üteme szignifikánsan késedelmes, lassult. 2-es típusú cukorbetegségben a thrombocytá NO képzés mennyiségi zavara enyhébb, szignifikáns mértékű csökkenés a thrombin esetében észlelhető. Az adrenalin és a ristomycin esetében a képzés

sebessége azonban e betegcsoportban is statisztikailag jelentős mértékben lelassul. Sajátos módon ADP után az NO válasz gyorsabb a 2-es típusú cukorbetegekben, mint az egészségesekben.

A szérum nitrit/nitrát szintjének és ennek következtében a vizelet nitrit/nitrát tartalmának csökkenése szignifikáns a diabeteses betegek és egészséges kontrollok között (1-es típ. diab. mell.: szérum nitrit/nitrát: $14,10 \pm 7,10$ vs. kontroll: $25,30 \pm 10,70$, $p < 0,01$, vizelet nitrit/nitrát: 1-es típ.diab. mell.: $816,50 \pm 281,60$ vs. kontroll: 1254 ± 339 , $p < 0,01$; 2-es típ. diab. mell.: szérum nitrit/nitrát: $15,10 \pm 6,30$ vs. kontroll: $25,30 \pm 10,70$ $p < 0,05$, vizelet nitrit/nitrát 2-es típ. diab. mell.: $761,90 \pm 273,50$ vs. kontroll: 1254 ± 339 , $p < 0,01$, a nitrit/nitrát tartalom mértékegysége: $\mu\text{mol/l}$).

A vörösvérsejtek deformabilitásában észlelt csökkenés szignifikáns különbséget jelez a cukorbeteg és a kontroll csoport között, határozottabb eltérést 1-es típusú diabetes esetén láttunk (1-es típ. diab. mell.: $7,36 \pm 0,81$ vs. $6,03 \pm 0,30$, $p < 0,001$; 2-es típ. diab. mell.: $7,00 \pm 0,79$ vs. $6,03 \pm 0,30$, $p < 0,01$).

A TAS csökkenése, azaz a lipidperoxidáció plazmában mért fokozódása is szignifikáns, hasonlóan a vörösvérsejtek lipidperoxidációjának fokozódásához. (TAS (mmol/l): 1-es típ. diab. mell.: $0,74 \pm 0,20$ vs. kontroll: $1,22 \pm 0,28$, $p < 0,001$; 2-es típ. diab. mell.: $0,83 \pm 0,27$ vs. kontroll: $1,22 \pm 0,28$, $p < 0,05$; vörösvérsejtekben mérhető lipidperoxidáció (nmol MDA/g Hgb): 1-es típ. diab. mell.: $3,38 \pm 1,91$ vs. kontroll: $1,87 \pm 1,22$, $p < 0,05$; 2-es típ. diab. mell.: $3,98 \pm 1,66$ vs. kontroll: $1,87 \pm 1,22$, $p < 0,01$)

A plazmaviszkózitsban nem volt jelentős különbség a diabeteses és kontroll csoport között, a fibrinogénszintben 2-es típusú diabetes esetén a szignifikancia határán mozgó különbséget találtunk. (Plazmaviszkózits: 1-es típ. diab. mell.: $1,28$ vs. kontroll: $1,27$; 2-es típ. diab. mell.: $1,32 \pm 0,10$ vs. kontroll: $1,27$, $p > 0,05$. Fibrinogénszint: 1-es típ. diab. mell.: $3,14 \pm 1,18$ vs. kontroll: $2,46 \pm 0,90$, $p > 0,05$; 2-es típ. diab. mell.: $3,57 \pm 1,86$ vs. kontroll: $2,46 \pm 0,90$ $p = 0,06$). A plazmaviszkózitást egyes szövödményekre lebontva a nephropathiás és proliferatív retinopathiás betegcsoport és kontroll csoport, valamint a proliferatív retinopathiás és hátér retinopathiás esetek között szignifikáns különbséget észleltünk (nephropathia vs. kontroll $p < 0,05$; PRP vs. kontroll $p < 0,001$).

A vWF szintje 2-es típusú diabetesesekben volt szignifikáns mértékben emelkedett.

A homocystein szintet 2-es típusú diabeteses betegekben szignifikánsan magasabbnak találtuk mint 1-es típusúakban ($p < 0,0001$). Az irodalomból ismert életkortól való függést eredményeink is tükrözték (a kor előrehaladtával szintje emelkedik). A nephropathiát jelző albuminürítés jól korrelált a homocystein szinttel, mikroalbuminuria mellett szignifikánsan magasabb értékeket mértünk, a diabeteses retinopathiával azonban nem találtunk összefüggést.

A Helicobacter pylori pozitív diabeteses betegek között gyakrabban fordult elő súlyos érszövödmény mint a Helicobacter negatív csoportban. A cukorbetegek között általunk észlelt mintegy 65%-os Helicobacter előfordulási gyakoriság meghaladja a hasonló korú nem diabeteses kontroll csoportban észlelt értéket. A Klinikai Biokémiai és molekuláris Pathológiai Intézet adatai szerint Debrecen környékén a Helicobacter pylori előfordulási gyakorisága 50-55% körüli.

FONTOSABB MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. Diabetesben, annak mindkét formájában és magas thrombocytá számmal járó myeloproliferatív kórképekben a thrombocytá-monocytá vegyes aggregátumok száma szignifikánsan nagyobb az egészséges kontroll csoport értékeihez viszonyítva.
2. Cukorbetegekben nem mutatható ki összefüggés a szénhidrátháztartás egyensúlya (HgbA1c) és a vegyes aggregátumok száma között.
3. A thrombocytá–monocytá vegyes aggregátumok érszövődmények mellett fordulnak elő legnagyobb számban, elsősorban súlyos kísérbetegség eseteiben (proliferatív retinopathia és mikroalbuminuriával járó nephropathia). Eredményeink arra utalnak, hogy a keringésben nagyobb arányban előforduló thrombocytá-monocytá vegyes aggregátumok hozzájárulnak a diabeteses angiopathia kialakulásához. További, részletes vizsgálatok szükségesek a szabadon keringő, valamint az érfalhoz kitapadt aggregátumok angiopathia pathogenesisében betöltött szerepének pontosabb meghatározására.
Fontosnak tartom annak megállapítását, hogy az étkezést követő, nem szignifikáns vércukorszint emelkedés is hatással van a vegyes aggregátum képződésre. Postprandialis állapotban a 60. perc után fokozódik a thrombocytá-monocytá aggregátumok képződése, melynek vélhetően szerepe van a diabeteses angiopathia kialakulásában és a szigorú postprandialis vércukorkontroll szükségességére hívja fel a figyelmet.
4. Magas thrombocytá számmal járó myeloproliferatív kórképekben jelentős számú thrombocytá-monocytá vegyes aggregátum képződés tapasztalható, közel kétszer nagyobb mértékű mint diabetes mellitusban. Az érszövődmények kialakulását magasabb vegyes aggregátum szám mellett gyakoribbnak észleltük, mely a vegyes aggregátumok érszövődmények kialakulását befolyásoló szerepe mellett szól.
5. Vizsgálataink megerősítik a tényt, hogy a nyugvó thrombocytá nem termel NO-t in vitro feltételek között. A thrombocytákban, in vitro rendszerben NO termelés indukálható L-Arg jelenlétében és az aggregométerben is használt, aggregometriás koncentrációjú, élettanilag és kórélettanilag releváns stimulánsok hatására. Ez a válasz a legkisebb ADP után és a leginkább jelentős mennyiségű thrombin hatására. A válasz általában fél percnél már jelentős, 1 percnél megközelíti a maximális koncentrációt, nagyságrendjét tekintve néhány száz nmol/l-t ér el, 100000 thrombocytára vonatkoztatva. Adataink arra utalnak, hogy a thrombocytá NO válasz az in vitro rendszerben a cukorbetegség mindkét típusában csökkent. A jelenség okára vonatkozóan csak feltételezésekre lehet alkalom, valószínűleg az L-Arg felhasználás diabetesben megjelenő zavarának lehet fontos pathogenetikai szerepe.
A ristomycin válasz értelmezése annyiban más, hogy ez az antibiotikum nem élettani vérlemezke inger, hanem a vérlemezke adhézió, kitapadás szempontjából kiemelt fontosságú thrombocytá - von Willebrand faktor kölcsönhatás vizsgálatára (így a Willebrand betegség diagnosztikájára) is alkalmas anyag. Jól ismert, s indokolja a ristomycinnel végzett vizsgálatokat, hogy diabeteses angiopathiában a plazma von Willebrand faktor szintje jelentősen emelkedett.

A thrombinra, kollagénnel adott válasz cukorbetegekben csökkent mennyiségű. Adrenalin után nem annyira a válasz nagysága csökken, hanem az NO képződés időben válik késedelmessé. Ennek jelentősége lehet a thrombocytáthrombus képződése vonatkozásában is. Az ADP-re adott válaszok összehasonlítása eleve nehéz az NO válasz igen csekély mennyisége miatt.

Az 1-es típusú cukorbetegségben a thrombocytá in vitro NO válasz csökkenése markánsabb, kifejezettebb mértékű a hasonló előjelű, de kisebb mértékű csökkenéshez képest, amelyet a 2-es típusú diabetesesekből származó thrombocyták esetében észleltünk.

A leírt vérelemzések NO válasz csökkenés szerepét játszhat a cukorbetegségben ismert, többszörösen dokumentált thrombocytá túlműködés kialakulásában, amelynek a jelenség eddig fel nem ismert, azonosított kiváltó vagy súlyosbító tényezője lehet. Az adatsor új építőkö, elem lehet a diabeteses angiopathia és a vascularis haematologia kapcsolatának elemzésében is. A kis esetszám nem ad alkalmat arra, hogy a diabetes tartama, az érszövődmények kiterjedtsége, súlyossága és a talált eltérések között összefüggések legyenek megállapíthatók.

Természetesen az eredmények értékelése komoly kritikát és óvatosságot igényel, az alábbi okok miatt:

- A vizsgálatok in vitro jellegűek, ezért valamennyi klinikailag releváns következtetés, hypothesisen alapul.
- A thrombocytá preparátum az ismételt mosás ellenére sem tekinthető teljesen tisztának. A további mosás vagy tisztítás azonban a thrombocytá szám és funkció vesztesét eredményezte volna, a tisztaság már nem javult a mosások további ismétlése után.
- A vizsgálat munkai ingyenes, bonyolult volta sem változtat azon, hogy az esetszám kicsi. Jelentős a különbség az életkor és nem tekintetében a csoportok között, melyek nem tekinthetők teljesen homogén módon összevethetőnek.
- A légköri és táplálkozási, ivóvízzel, esetleg gyógyszerrel történő nitritbevitel esetleges különbségei az in vitro NO mérés eredményeit jelentősen torzíthatják, bár ezek a tényezők általában megtevesztően magas NO értékeket eredményezhetnek. A csökkent válasz nem lehet efféle artefactum eredménye. A nyugvó thrombocytá esetében nincs NO produkció, s ez is a külső zavaró tényezők, artefactumok lehetősége ellen szólhat.

6. A plazmaviszkózitás nem, míg a fibrinogénszint a szignifikancia határán mozogva különbözik a diabeteses és egészséges csoport között. A plazmaviszkózitásban talált különbség a nephropathiás és proliferatív retinopathiás betegcsoport és kontroll csoport, valamint a proliferatív retinopathiás és háttér retinopathiás esetek között szignifikáns (nephropathia vs. kontroll $p < 0,05$; PRP vs. kontroll $p < 0,001$; PRP vs. HRP $p < 0,007$). Adataink szerint a háttér retinopathiában szenvedő betegek száma a kor előrehaladtával emelkedik, a proliferatív retinopathiás betegek fiatalabbak és a plazmaviszkózitás nem korrelál az életkorral, tehát a proliferatív retinopathia kialakulásának hátterében nem az életkorral járó változások állnak.

A vörösvérsejtek deformabilitása mindkét diabeteses csoportban szignifikáns mértékben csökkent.

7. A vörösvérsejtekben és a szérumban mérhető lipidperoxidáció fokozódás mindkét diabeteses csoportban szignifikáns. Előbbi az 1-es típusú, utóbbi a 2-es típusú betegcsoportban kifejezettebb. A vörösvérsejt membrán fluiditása, deformabilitása és a lipidperoxidáció közötti logikus, korábban már leírt összefüggést saját vizsgálataink nem erősítik meg. Ennek egyik oka lehet, hogy a vörösvérsejtek lipidperoxidációja

nagymértékben függ az aktuális vércukorszinttől, aránylag rövid ideig tartó hyperglykaemia is jelentősen fokozza azt.

8. Eredményeink alapján az egyes, diabeteses angiopathia kialakulása szempontjából fontos pathogenetikai tényezők között az alábbi összefüggések állapíthatók meg:

1-es és 2-es típusú diabetesben szenvedő betegekben pozitív korreláció észlelhető a thrombocyta-monocyta és a thrombocyta-granulocyta vegyes aggregátumok között ($r=0,50$, ill $r=0,54$), vagyis ezen aggregátumok aránya együtt változik, nevezetesen emelkedik. Az emelkedés mértéke a thrombocyta-monocyta aggregátumok esetén szignifikáns.

Negatív korreláció állapítható meg a szénhidrát háztartás egyensúlya és a TAS között 1-es típusú diabetesesekben ($r=-0,630$, $p=0,012$), azaz pozitív korreláció a lipidperoxidációval. Ez az összefüggés nem igazolható a 2-es típusú betegcsoportban ($r= -0,058$), ugyanakkor utóbbi esetben a TAS a betegség tartammal mutat negatív összefüggést ($r= -0,641$, $p=0,025$). A plazmaviszkózitás 1-es típusú betegek körében a diabetes tartammal, míg 2-es típusú esetekben a szénhidrátháztartás egyensúlyával és a fibrinogénszinttel mutat pozitív korrelációt ($r = 0,448$, ill. $r = 0,399$ és $0,499$). 2-es típusú betegek között a fibrinogénszint és a vWF-szint között is pozitív összefüggés igazolható ($r=0,626$, $p<0,01$).

9. 2-es típusú diabeteses betegekben szignifikánsan magasabb homocysteinszintet mértünk mint 1-es típusúakban ($p < 0,0001$). A hyperhomocysteinaemia és a mikroalbuminuriával jellemezhető nephropathia között észleltünk korrelációt, az irodalomból ismert életkorral való összefüggést is sikerült igazolnunk. Más tanulmányok ismeretében feltételezhető, hogy a cukorbetegség – angiopathia - cardiovascularis betegségek kapcsolatának a homocystein meghatározó eleme lehet.

10. A Helicobacter pylori diabeteses angiopathia létrejöttében játszott esetleges szerepe kis betegszámon végzett vizsgálatunk eredménye alapján felvethető. Az a tény, hogy diabetesesek körében gyakoribb a HP pozitivitás (65%) mint nem diabeteses kontrollok között (50-55%) és az érszövődmények is gyakrabban fordulnak elő a HP pozitív csoportban, ennek lehetőségére és nagyobb betegszámon végzendő vizsgálat szükségességére hívja fel a figyelmet.

ÖSSZEFOGLALÁS

A diabeteses angiopathia kialakulása összetett folyamat. A már meglévő érszövődmények kezelése szükségszerű, de nem megoldott, teljes gyógyulásra többnyire nincs lehetőség. Megfelelő kezeléssel és a szénhidrátháztartás rendezésével a további progresszió lassítható, megállítható, illetve több-kevesebb javulás is elérhető. Jelen ismereteink szerint a legjobb „megoldást” a megelőzés jelenti. Jelentős, pozitív szemléletváltást tükröz az a tény, hogy a prevenció az elmúlt években a cukorbeteg-gondozás meghatározó elemévé vált.

Az érszövődmények megelőzésének és kezelésének fontos feltétele a pathomechanismus minél pontosabb ismerete és az érbetegségek korai stádiumban való felismerése. Nagy előrelépést jelenthet ezen a téren az angiopathia-hajlam előrejelzésének lehetősége, az ide vonatkozó legfrissebb kutatási eredmények biztatóak. Az angiopathia-rizikó ismeretének jelentőségét hangsúlyozza, hogy a cukorbetegséghez kapcsolódó érbetegségek

megjelenése csak részben glykaemia függő folyamatok eredménye. A betegek kb 5%-ában akkor is csak enyhe angiopathia alakul ki, ha nem kezelik megfelelően cukorbetegségüket, míg 10-15%-ban gondos kezelés mellett is súlyos szövődmények lépnek fel. Feltételezhető tehát egy bizonyos öröklött, nem glykaemia függő angiopathia-hajlam, melynek ismerete előrevetíti az érbetegség kialakulásának kockázatát.

Az utóbbi évtizedekben az angiopathia pathogenesisét számos vizsgáló különböző szempontok szerint elemezte és több részletét, részfolyamatát tárták fel. A technikai lehetőségek bővülésével mélyrehatóbb vizsgálatokra nyílt lehetőség és egyre inkább gyűlnek az érszövődmények kialakulását magyarázó, illetve azzal összefüggésbe hozható adatok, a részletekbe menőbb megfigyelések pedig újabb és újabb szempontokat vetnek fel.

Utóbbiak közé sorolhatók a fehérvérsejtek és thrombocyták kapcsolódásakor kialakuló ún. vegyes aggregátumok, a thrombocyták NO-termelésének csökkenése stb. A legfrissebb elgondolások, vizsgálati eredmények szerint a vasanyagcsere - haemochromatosis heterozigota állapot és a haptoglobin polimorfizmus az örökletes angiopathia-hajlam előrejelzésében lehetnek fontosak.

Célul tűztem ki a diabéteses angiopathia kialakulásának több szempontból való vizsgálatát és összefüggéseket kerestem az egyes pathogenetikai tényezők között. Munkám súlyponti részét a leukocytathrombocytá vegyes aggregátumok és a thrombocytá NO termelés vizsgálata képezik. A vegyes aggregátumok számának alakulását magas thrombocytá számmal járó myeloproliferatív kórképekben is tanulmányoztam. Elemeztem továbbá a lipidperoxidáció, a homocysteinszint és a haemorheológiai tényezők cukorbetegben létrejövő változását, a diabéteses érszövődmények kialakulásában játszott szerepüket. A *Helicobacter pylori* diabéteses érszövődmények kialakulását elősegítő feltételezett hatását is vizsgáltam egy kisebb betegcsoportban.

Irodalmi adatok szerint a leukocytá-thrombocytá vegyes aggregátumok számát egyes kóros állapotokban (pl. myocardialis infarctus acut szakában, extracorporalis keringés mellett végzett szívműtétek kapcsán, stb.) emelkedettnek találták. Vizsgálataink szerint a monocytá-thrombocytá vegyes aggregátumok szignifikánsan nagyobb arányban fordulnak elő diabéteses betegekben az egészséges kontroll csoporttal szemben. Súlyos kísérbetegségek esetén az aggregátumok számának emelkedése kifejezettebb. Ez a tény megerősíti az aggregátumok érszövődmények pathogenesisében betöltött szerepére vonatkozó feltételezésünket. Figyelemfelkeltő, új megállapításnak tartom a thrombocytá-monocytá vegyes aggregátumok számának postprandialis vércukorszint emelkedéssel párhuzamosan megfigyelhető növekedését.

Magas thrombocytá számmal járó chronikus myeloproliferatív kórképekben a thrombocytá-monocytá aggregátumok számának emelkedése jelentős, meghaladja a diabéteses betegekben mért értékeket. Értünetek mellett (ujjsibbadás, szédülés, stroke) az emelkedés mértéke még határozottabb.

A vérlemezkék NO-termelése mindkét diabétes formában csökkent. Az önmagában nem jelentős mennyiségű NO-nak mint „utolsó szalmaszálnak” szerepe lehet egy esetleges érelzáródás megelőzésében. Hasonló eredményt kaptunk a vizelettel ürített, endothelium NO termelését tükröző NO₂/NO₃ mennyiségében is. A haemorheológiai tényezők közül a vörösvérsejtek deformabilitását jelző relatív sejtranzit időt, a plazma fibrinogénszintet és viszkozitást határoztuk meg. A relatív sejtranzit idő diabétesben megfigyelhető változására vonatkozó irodalmi adatok kissé ellentmondásosak, többnyire emelkedésről számolnak be. Saját vizsgálatunkban a vörösvérsejtek sejtranzit idejének fokozódását észleltük. A plazmaviszkózitásban nem, a fibrinogénszintben csak a 2-es típusú diabétesesek és kontroll csoport között találtunk a szignifikancia határán mozgó különbséget. A plazmaviszkózitást szövődményekre lebontva vizsgálva a különbség a nephropathiás és proliferatív retinopathiás betegcsoport és kontroll csoport, valamint a proliferatív retinopathiás és háttér retinopathiás esetek

között szignifikáns. A vörösvérsejtek és a plazma lipidperoxidációját egyaránt fokozottnak találtuk a diabeteses csoportban, a különbség szignifikáns. A lipidperoxidáció 1-es típusú diabetesesekben a szénhidrátháztartás egyensúlyával, míg 2-es típusú betegekben a betegség tartammal mutat pozitív korrelációt. A plazmaviszkozitás 1-es típusú betegekben a diabetes tartammal, 2-es típusúak között a szénhidrátháztartás egyensúlyával és a fibrinogénszinttel korrelál.

Vizsgálataink az említett tényezők diabeteses angiopathia kialakulásában betöltött szerepét támasztják alá.

Eredményeink szerint a hyperhomocysteinaemia is fontos, additív tényező a diabeteses nephropathia kifejlődésében.

A Helicobacter pozitívítás vizsgálata inkább figyelemfelkeltő jellegű, eredményeink messzemenő következtetésekre nem adnak lehetőséget. A krónikus fertőzések és a diabeteses angiopathia kapcsolatát egyre több adat erősíti. További, nagyobb betegszámot felölelő vizsgálat szükséges a pontosabb összefüggések feltárására. Kis számú betegen végzett vizsgálatunk alapján a HP érszövődmények kialakulását elősegítő szerepe felvethető.

A TÉZISEKHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Udvardy M., Káplár M., Rejtő L., Tornai I., Palatka K., László P., Huszka M.: Increased in vivo platelet activation and reduced intravascular endothelium-derived relaxing factor and nitrate/nitrite production in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Platelets*. 9, 257-260, 1998. Impakt faktor: 0.763
2. M. Kaplar, J. Kappelmayer, A. Kiss, K. Szabo and M. Udvardy: Increased leukocyte-platelet adhesion in chronic myeloproliferative disorders with high platelet counts. *Platelets*, 11, 97-98, 2000. Impakt faktor: 0,763
3. M. Kaplar, J. Kappelmayer, A. Veszpremi, K. Szabo, M. Udvardy: The possible association of in vivo formation of leukocyte-platelet heterophilic aggregates and the development of diabetic angiopathy. *Platelets* 12: 419-422, 2001. Impakt faktor: 0,763
4. Udvardy M, Káplár M, Rejtő L, Szász R, Huszka M: Csökkent in vitro thrombocytá EDRF-NO képzés cukorbetegekben a vérlemezke aktiváció során *Diab. Hung.* 2:63-69,2001.