

**EFFECTS OF IMPAIRED GLUCOSE METABOLISM, AGING AND
METEOROLOGICAL FACTORS ON HEMORHEOLOGICAL
PARAMETERS AND PLATELET AGGREGATION**

Ph.D. thesis

Author: Katalin Koltai, MD

Tutor: Kálmán Tóth, MD, DSc

1st Department of Medicine, School of Medicine

University of Pécs

Hungary

2009

Abbreviations

ADP - adenosine-5'-diphosphate

ASA - acetylsalicylic acid

BMI - body mass index

CRP - C-reactive protein

Coll - collagen

CVD - cardiovascular disease

Epi - epinephrine

IGT - impaired glucose tolerance

MI - myocardial infarction

NGT - normal glucose tolerance

NSAID - non-steroid anti-inflammatory drug

OGTT - oral glucose tolerance test

PPP - platelet poor plasma

PRP - platelet rich plasma

RBC - red blood cell

S.E.M. - standard error of the means

sP - selectin - soluble P-selectin

vWF - von Willebrand factor

1. Introduction

Hemorheology is the science of blood flow that deals with the deformation and flow properties of blood and its elements under mechanical forces. Blood is a non-Newtonian fluid, a suspension of cells, chylomicrons, carbohydrates, proteins, electrolytes in an aqueous medium.

Numerous studies have investigated the effects of aging on different hemorheological parameters. Age-associated changes have been described among others in the rheological properties of erythrocytes, plasma proteins, fibrinogen level, fibrin degradation products and blood viscosity. It is suspected that the increased incidence of cardio-and cerebrovascular diseases in the elderly may partially be due to age-related hemorheological alterations, i.e. hyperviscosity due to elevated fibrinogen level and altered erythrocyte properties may negatively influence hemodynamics and impair tissue oxygenisation. A significant rise was found in plasma viscosity and fibrinogen associated with aging in several studies. Platelet aggregation showed an increase with age in hypertensive and normotensive individuals.

Diabetes mellitus is a clinical term denoting a group of metabolic impairments which affect glucose utilization and lead to hyperglycemia. As vascular disease represents the main etiology for death, and accounts for a great percent of morbidity in diabetic patients, poorly controlled diabetes is considered to be a vascular disease. Glycemic control seems to be a major factor for determining the hemorheological consequences of diabetes. Positive associations have been found between parameters of glycemic control (HbA1C, fructoseamine), fibrinogen levels and red blood cell aggregation; fibrinogen levels are also closely correlated to insulin resistance. Both type-1 and type-2 diabetes are associated with diabetic thrombocytopathy, a condition related to increased platelet adhesiveness and aggregability. The binding of fibrinogen to the GP IIb-IIIa receptor is increased in diabetic patients, and they also have a higher ratio of platelets expressing activation-dependent adhesion molecules such as activated GPIIb-IIIa, lysosomal Gp53, thrombospondin and P-selectin; plasma fibrinogen levels are also increased in both types of diabetes. Platelets may interact with glycosylated low density lipoproteins, von Willebrand factor or immune complexes, and platelet turnover may be shortened in diabetes, thereby contributing to the observation that antiplatelet agents such as aspirin and clopidogrel have a diminished effect in these patients. Soluble P-selectin is a widely accepted marker for platelet activation: elevated plasma levels have been proved to be significantly associated with diabetes mellitus.

Chronobiology is the scientific discipline concerned with the definition, mechanisms, and significance of the so-called time structure of life forms. While homeostasis presumes a relatively constant internal state, chronobiology presumes human bioprocesses and functions exhibit predictable variability in time, biological rhythms, at every level of organization. Variations in the annual per capita death rates in different countries are well documented. Less well known are seasonal variations in death rates with the highest levels occurring during the colder winter months as it has been described in many countries. A seasonal variation in the incidence of MI, cardiac death, and stroke is consistently described. CVD-related deaths account for the majority of excess winter deaths (up to 70% in some countries). Seasonal deaths from MI may partially be due to endogenous physiological rhythms in cardiovascular risk factors. Large annual blood pressure amplitude has been observed with a peak in winter and a trough in the summer. Circannual rhythms have been described in parameters as fibrinogen, hematocrit, platelet count, hormones, serum lipids, and glucose. Total cholesterol, HDL-C and LDL-C showed seasonal alterations in many studies with a peak in winter and a trough in the summer months. While improvements in lifestyle, diet, housing and medical care may have contributed to decreased mortality rates, seasonal fluctuations remain a significant problem.

2. Aims

2.1. Rheological factors and increased platelet aggregation are convincingly implicated in the development of micro- and macrovascular diseases associated with diabetes mellitus. The presented examination has been designed to describe the effects of a standard oral glucose load on hemorheological parameters, platelet activation and aggregation in patients with normal and pathologic glucose tolerance.

2.2. I aimed to investigate the association between the effectiveness of the most widely used antiplatelet therapies (100 and 300-325 mg acetylsalicylic acid (ASA), 75 mg clopidogrel, 500 mg ticlopidine and the combination of 100 mg aspirin and 75 mg clopidogrel), fibrinogen levels and aging.

2.3. In the third part of my work I aimed to investigate whether hemorheological parameters and platelet aggregability show seasonal differences in a population with established vascular disease. A possible association with certain meteorological factors as ambient temperature, daily amount of sunshine hours, relative humidity and simultaneous changes in air pressure was also investigated.

3. Materials and methods

RBC aggregation:

RBC aggregation was measured in Myrenne aggregometer (MA-1 Aggregometer, Myrenne GmbH, Germany) applying the light transmission method of Schmid-Schonbein et al. The aggregometer has two modes of operation: M and M1. For both modes blood sample (30 μ l) is first sheared at 600 s^{-1} to disperse all pre-existing aggregates, then shear rate decreases rapidly to zero (M0 mode) or low shear (M1 mode). The extent of aggregation is characterized by the aggregation index (AI_M , AI_{M1}), calculated from the surface area below the light intensity curve in a 10 s measurement period.

Hematocrit:

Venous blood collected into lithium-heparin coated Vacutainer tubes was centrifugated in hematocrit capillaries at 12000 rpm for five minutes in a microhematocrit centrifuge (Hemofuge, Heraeus Instr., Germany).

RBC filtration:

RBC filterability, a variable referring to cell deformability was measured in a Carat FT-1 Filtrometer (Carat Diagnostics Ltd., Hungary) using the St George's technique. In this apparatus RBC suspension flows through a Nucleopore filter with 5 μ m pores. Filtration rate is calculated from the data measured at four pairs of light sources and detectors. The device is interfaced to a computer, which automatically analyses sequential flow rates and thus distinguishes the cell transit time (relative cell transit time) and the pore clogging rate. In our experiments, filtrating pressure was set to 4 cm of water.

Platelet aggregation:

Platelet aggregation was measured by Carat TX-4 optical platelet aggregometer (Carat Diagnostics Ltd., Hungary) using ADP, collagen and epinephrine inducers.

sP-selectin:

Determination of the level of sP-selectin was performed by using a sandwich ELISA procedure from platelet poor plasma.

4. Summary

1. Oral glucose tolerance test was performed in 30 patients suspected to have diabetes mellitus. After an overnight fast, fasting glucose levels were measured, then patients were loaded with 75 g glucose. Blood samples were taken 1, 2, and 3 hours after the oral glucose load. Based on the 2-hour result of the tests, patients were divided into a normal glucose tolerance (NGT) group (glucose levels below 7.8 mmol/l at the 2-hour sampling) and an impaired glucose tolerance/diabetes mellitus (IGT/DM) group, where 2-hour glucose values were above the normal limits.

BMI was significantly higher in the IGT/DM group. Red blood cell aggregation showed a significant elevation in the course of time in all groups, however, in IGT/DM patients the elevation was more expressed and could already be observed in the 2nd hour of the examination. Both the M0 and M1 indices correlated significantly with BMI in the IGT/DM group, but no significant association could be found between these parameters in patients with normal glucose tolerance. M0 and M1 indices did not correlate significantly with coinstantaneous blood glucose levels. The M1 index was significantly higher in the IGT/DM group than in the NGT group at the 2- and 3-hour samplings. Plasma viscosity in the IGT/DM group showed significant decrease in all samplings compared to baseline values, while no statistically significant changes could be observed in the NGT group. Whole blood viscosity was significantly higher in the IGT/DM group at the one-hour measurements, but not at the other tested time-points. However, it did not change significantly in the course of time in either groups. Hematocrit decreased statistically significantly in the IGT/DM group in the 2nd hour, while in the NGT group only in the 3rd hour and to a lesser extent. Red blood cell filtration did not show significant changes at any time points in this study, and no significant difference was found between the two groups either. Platelet aggregation showed statistically significant decrease at the 1-hour measurements compared to baseline values both in the non-diabetic and in the diabetic/IGT group in the case of higher ADP concentrations, but no significant changes could be observed with other inducers.

2. Between 2001 and 2005, platelet aggregation was checked in 5026 patients with clinical evidence of vascular diseases receiving antiplatelet therapy in our laboratory. Platelet aggregation tests were performed to analyze whether the chosen antiplatelet medication was effective. Age, sex, and antiplatelet agent taken were recorded in all patients. Patients were under antiplatelet therapy for at least 4 weeks at the time of testing. 3389 patients received aspirin therapy (100, 300 or 325 mg per day). 970 patients took 75 mg clopidogrel. 362

patients took 500 mg ticlopidine. We also investigated 305 patients who received a combination of 100 mg ASA and 75 mg clopidogrel. Patient compliance to antiplatelet treatment was assessed by interview. Fibrinogen level was measured in 3243 patients by the method of Claus.

In patients treated with 100 and 300-325 mg ASA platelet aggregation increased significantly across age decades, in the case of the former dosage with all but the collagen inducer, while in the latter with all used inducers. Patients aged ≥ 80 years exhibited significantly higher aggregation indices than individuals aged less than 40 years. At the same time we found no association between platelet aggregation and aging either in patients treated with 75 mg clopidogrel or with 500 mg ticlopidine. However, in the case of combination therapy with 100 mg aspirin and 75 mg clopidogrel the association between platelet aggregation and age was similar to that seen in patients treated only with ASA. Fibrinogen levels increased significantly across age decades in ASA treated patients, and significant difference was found between the oldest age group and patients aged less than 40 years. In patients treated with thienopyridines no association was found between fibrinogen levels and aging. Neither was any difference found between different age groups in patients taking ASA–clopidogrel combination therapy. Fibrinogen levels were significantly lower in the case of clopidogrel and ticlopidine treatment than in patients treated with ASA, and ticlopidine treated patients had significantly lower fibrinogen levels than patients treated with clopidogrel. Individuals treated with a combination of ASA and clopidogrel exhibited fibrinogen levels which did not differ significantly from results detected in either ASA or clopidogrel monotherapy, but that were significantly higher than in the case of ticlopidine treatment.

3. Between 2001 and 2005, platelet aggregation was checked in our laboratory in 2693 patients (1417 males, 1276 females, mean age: 62.9 ± 11.2 years) with clinical evidence of vascular disease receiving a daily dose of 100 mg aspirin. Platelet aggregation tests were performed to analyze whether the chosen antiplatelet medication was effective. Patients were under antiplatelet therapy for at least 4 weeks at the time of testing. In a subgroup of 1873 patients fibrinogen level was measured by the method of Claus. In 1260 patients plasma and whole blood viscosity and hematocrit were also tested. In a third subgroup of 724 patients we assessed erythrocyte aggregation. Patients are residents of an area within 40 km-s from the local station of the Hungarian Meteorological Service. External temperature at 8 a.m., daily maximal and minimal temperatures, air pressure at 8 a.m. and 10 a.m., relative humidity and

daily amount of precipitation were assessed in the local station of the Hungarian Meteorological Service. Daily temperature variation (difference between daily minimal and maximal temperatures) was assessed. Difference between air pressure at 8 and 10 a.m. (Δp) was calculated as an indicator of meteorological front activity at the time-point of sampling.

Similarly to other investigators we found significantly higher fibrinogen levels in the winter than in the summer with a peak in December and a trough in July.

Both the M0 and M1 indices proved to be significantly higher in the winter than in the summer months with a peak in December (M0) and January (M1) and a trough in July and June, respectively. Differences between winter-and summer results of whole blood viscosity measurements were not significant. Plasma viscosity showed significantly higher values in the hottest months than in the winter. Epinephrine-induced platelet aggregation was highest in April and May, while its minimum was in August and September. Significant negative correlation was found between external temperature measured at 8 a.m. as well as daily minimal and maximal temperatures and M0 and M1 indices. Plasma viscosity showed a positive correlation with daily minimal temperatures. A weak, but statistically significant correlation was found between platelet aggregation induced with ADP 10 and all examined temperature parameters, however, no significant association was found with either the smaller dose of ADP inducer or with the other applied inducers. Fibrinogen and hematocrit exhibited a weak negative association with ambient temperature. Neither of the examined hemorheological and platelet aggregation parameters were associated with daily temperature variability or with changes in air pressure between 8 and 10 a.m. Air pressure measured at 8, 9, and 10 a.m. showed a significant positive correlation with M0 and M1 indices. Plasma- and whole blood viscosity were negatively correlated to air pressure. Daily precipitation and humidity at 8 and 10 a.m. were not associated with any examined hemorheological or platelet aggregation parameters.

5. Conclusions

Glucose consumption influences hematocrit, plasma viscosity and red blood cell aggregation, however, a direct association between actual glucose levels and these parameters could not be shown in this study. Red blood cell aggregation is associated with BMI, possibly through low-grade inflammation known to be present in obesity. Erythrocyte aggregation after glucose consumption might be influenced by changing insulin levels in the course of

time. Changes in plasma viscosity and hematocrit levels might be caused by an influx from the interstitial space into the circulation due to elevated osmolality.

Age associated increase in fibrinogen level may play a crucial role in increased platelet aggregation in elderly patients found in the second part of my work. Independence of fibrinogen levels of age in both clopidogrel and ticlopidine treated patients might be contributed to the beneficial effect of these drugs on fibrinogen levels also seen in this study. Platelet aggregability may be negatively influenced by several factors in the elderly. Elder patients tend to have more co-morbidities and take more drugs that raise the potential of drug interactions. NSAIDs have been shown to interact with aspirin's antiplatelet effect. A higher prevalence of chronic diseases as diabetes, hypertension, dyslipidemia and chronic heart failure may further increase the propensity for increased platelet activation and aspirin resistance. An other possible cause of increased in vitro platelet aggregation in older people may be due to long-lasting aspirin treatment, as this has been shown to be associated with a progressive reduction in platelet sensitivity to this drug. The present study has a number of limitations. This was a non-randomized, observational study. Several factors that may further explain the differences observed in platelet aggregation and fibrinogen levels in the different age and drug groups (plasma lipid levels, concomitant medication, case history) were not investigated. The type and dosage of antiplatelet agent(s) taken were documented based on medical records and interview. However, compliance was not checked with direct methods. Further tests exist to investigate platelet aggregability (urinary thromboxane measurements, arachidonic acid induced aggregation, etc.) that were not used in this study and might lead to different results. Data of patients less than 40 and more than 80 years could not be evaluated in the case of certain regimens because of low number of cases. Prospective, randomized further examinations are needed to confirm our results in a multivariate analysis.

The third part of my work shows that certain hemorheological parameters and platelet aggregability exhibited seasonal differences in aspirin treated vascular patients. The observed differences might contribute to the seasonal fluctuation in the mortality of cardiovascular diseases known from the literature. These results might also be of importance in the case of longitudinal investigations when consecutive samplings take place in different periods of the year. In these cases seasonal alterations may interfere with study results. The results support the theory that beside seasonal variations in diet and physical activity, annual fluctuation in ambient temperature may contribute to seasonal variation in certain hemorheological

parameters. Meteorological front activity do not seem to have an immediate effect on the examined parameters.

ACKNOWLEDGEMENTS

These studies were carried out at the Hemorheological Laboratory of the 1st Department of Medicine, Medical School of the University of Pécs in 2002-2005.

First of all I would like to express my thanks to my teacher and project leader, Prof. Dr. Kálmán Tóth for his support and encouraging words at critical points of my work that were decisive for me to carry on my studies.

I thank Dr. Gábor Késmárky, leader of the Hemorheological Laboratory for being a thorough advisor and lector.

I also thank for the previous and present PhD students of the Hemorheological Laboratory, Dr. Zsolt Márton, Dr. Beáta Horváth, Dr. Tamás Alexy, Dr. Gergely Fehér and Dr. Péter Kenyeres for their contribution in executing my investigations.

I am grateful to Dr. László Czopf, Dr. István Juricskay, Dr. Róbert Halmosi and Prof. Dr. István Wittman for inspiring my investigations with great ideas.

I would like to express my gratitude to Dr. Judit Vékási and Dr. Zsuzsanna Keszthelyi for their help in recruiting patients to my studies.

I want to express my thanks to the technicians of the Hemorheological Laboratory, Mrs. Kornélia Fazekas Tapasztó and Mrs. László Nagy for their reliable work.

I thank Antal Tibold for being my best companion in work as well.

At last, I dedicate my work to my parents who with their caring love encouraged me to do what I am interested in.

**A KÓROS GLÜKÓZ ANYAGCSERE, AZ ÖREGEDÉS ÉS
METEOROLÓGIAI FAKTOROK HATÁSAI A HEMOREOLÓGIAI
PARAMÉTEREKRE ÉS A TROMBOCITA AGGREGÁCIÓRA**

Ph.D. tézisek

Dr. Koltai Katalin

Programvezető: Prof. Dr. Tóth Kálmán

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

I. sz. Belgyógyászati Klinika

Pécs

2009

Rövidítések jegyzéke

ADP - adenzin-5'-difoszfát

ASA - acetil-szalicilsav

BMI - testtömeg index

CRP - C-reaktív protein

IGT - kóros glükóz tolerancia

NGT - normális glükóz tolerancia

NSAID - nem-szteroid gyulladáscsökkentő

OGTT - orális glükóz tolerancia teszt

PPP - trombocita szegény plazma

PRP - trombocita dús plazma

RBC - vörösvérsejt

S.E.M.- az átlag szórása

sP-selectin - szolubilis P-szelektin

vWF - von Willebrand faktor

1. Bevezetés

A hemoreológia a vér és alkotóelemei áramlási tulajdonságaival, deformációjával foglalkozó tudományág. A vér nem-newtoni folyadék; sejtek, kilomikronok, szénhidrátok, fehérjék és elektrolitok alkotta szuszpenzió.

Számos vizsgálat foglalkozott már az öregedés hemoreológiai paraméterekre kifejtett hatásaival. Korfüggő változásokat írtak le többek között a vörösvérsejtek és plazmafehérjék reológiai tulajdonságaiban, a plazma fibrinogén és a fibrin degradációs termékek szintjében és a vérviszkozitásban. Feltételezhető, hogy a kardio- és cerebrovaszkuláris betegségek időskori magasabb incidenciája részben az öregedéssel kapcsolatos hemoreológiai változásokkal hozható összefüggésbe, pl. az emelkedett fibrinogénszint okozta hiperviszkozitás és a korral megváltozott vörösvérsejt jellemzők előnytelenül befolyásolhatják a hemodinamikát és ronthatják a szöveti oxigenizációt. Számos vizsgálat írt le az öregedéshez kapcsolódóan jelentős plazma viszkozitás és fibrinogén szint emelkedést. Hyper- és normotenzív vizsgálati alanyokban a trombocita aggregáció is emelkedett az életkor előrehaladtával.

A diabétesz mellitusz jelentőségét jól tükrözi a tény, hogy prevalenciája 2025-re várhatóan világszerte megkétszereződik és eléri, vagy akár meghaladja a 300 milliót. Mivel a diabéteszes betegek esetén az érbetegségek szerepelnek a halálozás fő etiológiai tényezőjeként, és a morbiditás jelentős százalékaért felelősek, így a nem megfelelően beállított cukorbetegséget érbetegségnek tekinthetjük. A diabétesz hemoreológiai következményeinek fontos meghatározója a megfelelő vércukor-beállítás. Összefüggést találtak a vércukor-kontrollt jellemző paraméterek (HbA1C, fruktózamin), a fibrinogén szint és a vörösvérsejt aggregáció között. A fibrinogén szint szorosán összefügg az inzulin rezisztenciával is. Mind az 1-es, mind a 2-es típusú diabétesz mellitusz kapcsolatba hozható a fokozott trombocita adhézios készséggel és aggregabilitással járó diabéteszes trombocitopátiával. A fibrinogén fokozottan kötődik a GPIIb-IIIa receptorokhoz diabéteszesekben, és esetükben magasabb az aktiváció-függő adhézios molekulákat, mint az aktivált GP IIb-IIIa-t, lizoszomális Gp53-t, trombospondint és P-szelektint expresszáló trombociták aránya. A plazma fibrinogén szint szintén emelkedett mindkét típusú diabétesz esetén. A trombociták életideje csökken diabéteszben, ami hozzájárulhat ahhoz a megfigyeléshez, hogy cukorbetegben csökken a trombocita aggregáció gátlók, mint az aszpirin vagy a clopidogrel hatásossága. A szolubilis P-szelektin a trombocita aktiváció

elfogadott markere; emelkedett plazma szintjei összefüggésbe hozhatók a diabétesz mellitusszal.

A kronobiológia az élőlények időstruktúrájának meghatározásával, mechanizmusával és jelentőségével foglalkozó tudományág. Míg a homeosztázis viszonylag állandó belső állapotot feltételez, a kronobiológia kiindulópontja a biológiai folyamatokban az élő szervezet minden szintjén megmutatkozó megjósolható időbeli variabilitás, a biológiai ritmus. Közismert, hogy a különböző országokban az éves halálozási arány jelentősen eltérő lehet. Kevésbé ismertek a halálozási arány számos országban leírt szezonális eltérései a hideg téli hónapokra eső legmagasabb értékekkel. A MI, szívhalál és stroke incidenciájában következetesen szezonális eltéréseket találtak. A téli magasabb halálozás legnagyobb részéért (egyes országokban akár 70%-ért) a kardiovaszkuláris betegségek felelősek. A MI miatti szezonális halálozás hátterében részben a kardiovaszkuláris rizikófaktorokban jelentkező belső élettani ritmusok állhatnak. A vérnyomás értékekben nagy éves amplitudót figyeltek meg téli csúccsal és alacsonyabb nyári értékekkel. Éves ritmust írtak le a fibrinogén, hematokrit, trombocitaszám, számos hormon, szérum lipidek és a plazma glükóz szintjében is. Az összkoleszterin, a HDL és az LDL koleszterin számos vizsgálatban mutatott szezonális eltéréseket téli csúccsal és nyári mélyponttal. Míg az életmód, a táplálkozás, a lakáskörülmények és az egészségügyi ellátás javulása hozzájárultak a mortalitási arány csökkenéséhez, a szezonális ingadozás ma is problémát jelent.

2. Célkitűzések

2.1. Reológiai faktorok és a fokozott trombocita aggregáció bizonyítottan szerepet játszanak a diabétesz mellitusz következményeként fellépő kis- és nagyér-betegség kialakulásában. A vizsgálat során a standard orális glükóz terhelés hemoreológiai paraméterekre, trombocita aktivációra és aggregációra kifejtett hatását kívántuk tanulmányozni normális és kóros glükóz toleranciájú egyéneknél.

2.2. Munkám második részében a leggyakrabban használt trombocita aggregáció gátló terápia (100 és 300-325 mg ASA, 75 mg clopidogrel, 500 mg ticlopidin ill. 100 mg ASA és 75 mg clopidogrel kombinációja) *in vitro* hatásossága, a fibrinogén szint és az életkor közötti összefüggést vizsgáltam.

2.3. Vizsgálataim harmadik szakaszában arra kerestem a választ, hogy a hemoreológiai paraméterek és a trombocita aggregáció mutatnak-e szezonális ingadozást acetilszalicilsavval kezelt érbetegekben. Vizsgáltuk a hemoreológiai faktorok esetleges összefüggését bizonyos

meteorológiai paraméterekkel, mint a környezeti hőmérséklet, napi napfényes órák száma, relatív páratartalom vagy az egyidejű légnomás-változás.

3. Hemoreológiai mérések

Vörösvérsejt aggregáció:

A VVT agregáció meghatározása lítium-heparinnal bevont Vacutainer csövekbe vett vénás vérből, Myrenne MA-1 aggregométerben (Myrenne GmbH, Németország) történt Schmid-Schönbein fény-transzmissziós módszerét alkalmazva. Az aggregométernek két beállítási módozata van. Mindkét esetben 30 μ l vérmintát először 600 s^{-1} -al centrifugálunk, hogy a meglévő VVT aggregátumokat diszperzáljuk. Ezt követően a forgási sebességet hirtelen vagy 0-ra (M0 módozat), vagy alacsony forgási sebességre (M1 módozat) csökkentjük. Az ekkor mért aggregációt ún. aggregációs index-szel jellemezzük (AIM0, AIM1), melyet a fényintenzitás-görbe alatti területből számolunk 10 mp mérési periódus alatt.

Hematokrit:

Lítium-heparinnal bevont Vacutainer csövekbe vénás vért vettünk, majd hematokrit kapillárisokban 12000 rpm-en öt percre centrifugáltuk Hemofuge mikrohematokrit centrifugában (Heraeus Instr., Németország).

Vörösvérsejt filtráció:

A vörösvérsejt filterabilitást, amely a sejt deformabilitására utaló paraméter, Carat FT-1 filtrométerben mértük (Carat Kft, Budapest) a St George's technikát alkalmazva. A készülékben a vörösvérsejt szuszpenzió egy 5 μ m pórusátmérőjű Nucleopore membránon halad át. A filtrációs arányt 4 pár fényforrás és hozzájuk tartozó detektorok adataiból számoljuk. A készülékhez egy számítógép kapcsolódik, amely automatikusan elemzi a szakaszok áramlási adatait, és így meghatározza a sejt áthaladási időt és a relatív sejtáthaladási időt, ill. a pórus elzáródási rátát. A vizsgálatok során a filtrációs nyomás 4 vízcentiméterre volt állítva.

Trombocita aggregáció:

Trombocita aggregometriás méréseinket Carat TX-4 típusú trombocita aggregométerrel végeztük. A mérőműszer az induktorokkal kiváltott aggregáció mértékét a PPP-PRP optikai sűrűségkülönbséghez viszonyítva számolja és az idő függvényében ábrázolja. A trombocita aggregáció mértékét adenzin-difoszfát, kollagén és adrenalin induktorokkal mértük.

sP-szelektin:

Az sP-szelektin szint meghatározás szendvics ELISA módszerrel történt trombocita szegény plazmából.

4. Összefoglalás

1. Módosított orális glükóz tolerancia tesztet végeztünk 30 olyan betegen, akiknél felmerült a diabétesz mellitusz lehetősége. A betegeket 12 óra koplalást követően 75 g glükózzal terheltük meg. A glükóz elfogyasztása után 1, 2 és 3 órával vérmintát vettünk. A 2 órás eredmények alapján a betegeket normál glükóz toleranciájú (NGT) ill. kóros glükóz toleranciájú (IGT/DM) csoportokra osztottuk.

Az IGT/DM csoportban jelentősen magasabb volt a BMI, mint a NGT csoportban. A vörösvérsejt aggregáció az idő múlásával szignifikánsan emelkedett mindkét csoportban, de az IGT/DM csoportban ez az emelkedés kifejezettebb volt és már a vizsgálat 2. órájában jelentkezett. Mind az M0, mind az M1 index szignifikánsan korrelált a BMI-vel az IGT/DM csoportban, de nem találtunk összefüggést ezen paraméterek között a normális glükóz toleranciájú betegekben. Az M0 és M1 index nem mutatott összefüggést az egyidejű vércukor-szinttel. A 2. és 3. órában vett mintákban az M1 index szignifikánsan magasabb volt az IGT/DM csoportban, mint a NGT csoportban. Az IGT/DM csoportban a plazma viszkozitás az összes mintavétel során szignifikánsan csökkent a kiindulási értékhez képest, míg a normális glükóz toleranciájú csoportban nem találtunk szignifikáns csökkenést. A teljes vér viszkozitás jelentősen magasabb volt a kóros glükóz toleranciájú egyéneknél az 1. órában történt mintavételkor, mint a NGT csoportban, de a többi vizsgált időpontban nem volt jelentős eltérés a két csoport között. A különböző vizsgált időpontokban a teljes vér viszkozitás egyik csoportban sem mutatott jelentős eltéréseket. A vörösvérsejt filtráció nem változott jelentősen a vizsgált időpontokban, és a két csoport között sem találtunk különbséget ebben a paraméterben. Az ADP indukálta trombocita aggregáció statisztikailag szignifikánsan csökkent az 1. órában a kiindulási értékhez képest mindkét csoportban, de csak a magasabb vizsgált ADP koncentráció esetén. A többi vizsgált induktor esetén nem tapasztaltunk jelentős változásokat.

2. 2001 és 2005 között 5026 klinikailag igazolt, trombocita aggregáció gátló terápiában részesülő érbetegben mértünk trombocita aggregációt. A aggregometria célja a választott trombocita aggregáció gátló terápia hatékonyságának ellenőrzése volt. A betegek életkorát, nemét és a szedett trombocita aggregáció gátló szer dózisát minden esetben rögzítettük. A betegek a vizsgálat időpontjában legalább 4 hete részesültek az adott trombocita aggregáció gátló terápiában. 3389 beteg szedett napi 100, 300 vagy 325 mg ASA-t, 970 beteg 75 mg clopidogrelt, míg 362-en 500 mg ticlopidint. 305 beteg kapott kombinált 100 mg ASA - 75 mg clopidogrel terápiát. 3243 betegben meghatároztuk a plazma fibrinogén szintet is. A 100 és 300-325 mg ASA-val kezelt betegekben a trombocita aggregáció jelentősen emelkedett az életkorral. A 80 évnél idősebb betegek esetén a trombocita aggregáció szignifikánsan magasabb volt, mint a 40 évesnél fiatalabbak csoportjában. Ugyanakkor nem találtunk összefüggést a trombocita aggregáció és az öregedés között sem a 75 mg clopidogrellel, sem az 500 mg ticlopidinnel kezelt betegekben. A kombinált terápiában részesülő betegeknél a trombocita aggregáció és az életkor összefüggése a csak ASA-val kezelt betegek esetén tapasztaltakra hasonlított. A fibrinogén szint szignifikánsan emelkedett az életkorral, és a legöregebb életkori csoport és a 40 évnél fiatalabbak csoportja között jelentős különbséget találtunk ebben a paraméterben. A thienopyridinnel kezelt betegekben és a kombinált terápiában részesülők esetén nem találtunk a fibrinogén szint és az életkor között összefüggést. A fibrinogén szint jelentősen alacsonyabb volt clopidogrel vagy ticlopidin terápia esetén, mint az ASA szedőkben. A kombinált aggregáció gátló terápiában részesülők esetén a fibrinogén szint nem különbözött jelentősen sem a csak ASA-t, sem a csak clopidogrelt szedő betegeknél tapasztalt értékektől.

3. 2001 és 2005 között 2693 100 mg ASA-t szedő klinikailag igazolt érbeteg számára trombocita aggregometriás vizsgálatot végeztünk. Egy 1873 fős alcsoportban Clauss módszere szerint meghatároztuk a plazma fibrinogén szintet is. 1260 fő esetén a trombocita aggregometria mellett plazma és teljes vér viszkozitást, ill. hematokritot mértünk. 724 beteg esetén vörösvérsejt aggregometria is történt. A betegek az Országos Meteorológiai Szolgálat pogányi állomásától számított 40 km-es körzeten belül laktak. A 8 órakor mért külső hőmérsékletet, a 8, 9 és 10 órakor mért légnyomás értékeket, a relatív páratartalom és napi csapadékmennyiség értékeket, a napi minimális és maximális hőmérsékletet az OMSZ szívésségéből a vizsgált időszak minden egyes napjára megkaptuk. Meghatároztuk a napi hőingadozást ill. a 8 és 10 órakor mért légnyomás értékek különbségét (Δp), mely a mintavétel időpontjában zajló időjárási front aktivitást jellemzi.

Más vizsgálókhoz hasonlóan szignifikánsan magasabb fibrinogén szinteket találtunk télen, mint nyáron, decemberi legmagasabb és júliusi legalacsonyabb értékkel.

Mind az M0 mind az M1 index értékek szignifikánsan magasabbak voltak télen, mint nyáron. Ebben az esetben is december-januárban találtuk a legmagasabb, míg június-júliusban a legalacsonyabb értékeket. A teljes vér viszkozitás értékek nem különböztek jelentősen az év különböző szakaszaiban. A plazma viszkozitás jelentősen magasabb volt a legforróbb hónapokban, mint télen. Az adrenalin indukálta trombocita aggregáció csúcsa áprilisban és májusban, míg mélypontja augusztusban és szeptemberben volt. Szignifikáns negatív korrelációt találtunk mind a 8 órakor mért külső környezeti hőmérséklet, mind a napi legalacsonyabb és legmagasabb hőmérséklet és az M0 és M1 index között. A plazma viszkozitás pozitívan korrelált a napi hőmérsékleti minimummal. Gyenge, de statisztikailag szignifikáns összefüggés mutatkozott a 10 μ M ADP-vel indukált trombocita aggregáció és külső hőmérsékleti paraméterek között, ugyanakkor a többi induktor esetén nem találtunk hasonló összefüggést. A 8, 9 és 10 órakor mért légnyomás értékek az M0 és M1 indexszel gyenge pozitív, míg a plazma és a teljes vér viszkozitással gyenge negatív korrelációt mutattak. A vizsgált hemoreológiai paraméterek nem mutattak kapcsolatot a napi hőingadozással, a Δp értékkel, relatív páratartalommal és a napi csapadékmennyiséggel.

5. Következtetések

A glükóz fogyasztás befolyásolja a hematokritot, plazma viszkozitást és vörösvérsejt aggregációt, ugyanakkor nem találtunk közvetlen összefüggést a vizsgált időpontokban a mért vércukor-értékek és ezen paraméterek között. A vörösvérsejt aggregabilitás és a BMI között talált szoros összefüggést az elhízásban leírt alacsony fokú gyulladásnak tulajdonítjuk. Elképzelhető, hogy a cukor fogyasztás után bekövetkező vörösvérsejt-aggregációs eltéréseket az inzulin-szint változásai befolyásolják az idő függvényében. A plazma viszkozításban és a hematokritban megfigyelt változásokat a fokozódó osmolalitás révén az intersticiumból a keringésbe történő folyadék beáramlás okozhatja.

A fibrinogén szint életkorhoz kapcsolódó emelkedése állhat részben a vizsgálat során az idős betegcsoportokban talált emelkedett trombocita aggregáció hátterében. Thienopyridin terápia esetén a plazma fibrinogén életkortól való függetlenségét ezen gyógyszerek fibrinogén szintre kifejtett jótékony hatásával magyarázhatjuk, amit jelen vizsgálatunkban is igazoltunk. A trombocita aggregabilitást az idősekben számos faktor negatívan befolyásolja. Az idős

betek általában több társbetegségben szenvednek, ezért több gyógyszert szednek, ami fokozza a gyógyszerkölcsonhatások lehetőségét. Többek közt a nagyon gyakran szedett nem-szteroid gyulladáscsökkentőkről igazolódott, hogy befolyásolják az ASA aggregációgátló hatását. A krónikus betegségek, mint diabétesz, magas vérnyomás, dyslipidaemia vagy a krónikus szívelégtelenség időskori magasabb prevalenciája tovább emeli a fokozott trombocita aktiváció és az ASA rezisztencia lehetőségét. Az időseknél tapasztalt fokozott in vitro trombocita aggregáció másik lehetséges oka a hosszantartó ASA kezelés lehet, erről ugyanis számos szerző leírta, hogy a trombociták ASA-val szembeni érzékenységének progresszív csökkenéséhez vezet. Számos olyan faktort, amely a megfigyelt jelenségek további magyarázatául szolgálhatna (plazma lipid szintek, egyidejű gyógyszeres terápia, anamnézis) nem tudunk figyelembe venni. A compliance-t nem ellenőriztük közvetlen módon, a gyógyszerek típusát és dózisékat az orvosi dokumentáció és személyes kikérdezés alapján detektáltuk. A felvetett kérdéseket egy prospektív, randomizált vizsgálat tisztázhatja.

Munkám harmadik része igazolta, hogy egyes hemoreológiai paraméterek és a trombocita aggregáció szezonális különbségeket mutat ASA kezelt érbetegekben. A megfigyelt különbségek hozzájárulhatnak a kardiovaszkuláris mortalitás szakirodalomból ismert szezonális fluktuációjához. A megfigyelt jelenségek olyan hosszútávú utánkövetéses vizsgálatok esetén is jelentőséget kaphatnak, amikor a mintavételek időpontja az év különböző időszakaira esik, ebben az esetben ugyanis befolyásolhatják a vizsgálati eredményeket. Az eredmények azt az elméletet támasztják alá, hogy az étrend és a fizikai aktivitás szezonális változásai mellett a környezeti hőmérséklet éves fluktuációja is befolyásolhat egyes hemoreológiai paramétereket. A meteorológiai front aktivitás eredményeink alapján nem gyakorol azonnali hatást a vizsgált paraméterekre.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ph. D. tanulmányaimat a PTE ÁOK I. sz. Belgyógyászati Klinika Hemoreológiai Kutatólaboratóriumában végeztem 2002 és 2005 között.

Mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Tóth Kálmán Professor Úrnak szeretném hálámat kifejezni, aki a kritikus pontokon átsegítve mindvégig támogatott munkámban.

Köszönettel tartozom Dr. Késmárky Gábornak, aki a Hemoreológiai Kutatólaboratórium vezetőjeként figyelemmel követte a kísérleteimet és precízen lektorálta a munkáimat.

Köszönöm a Hemoreológiai Kutatólaboratóriumban korábban, vagy jelenleg is aktívan dolgozó PhD hallgatóknak, Dr. Fehér Gergelynek, Dr. Horváth Beátának, Dr. Kenyeres Péternek, Dr. Márton Zsoltnak és Dr. Alexy Tamásnak a közös munkát.

Hálás vagyok Dr. Czopf Lászlónak, Dr. Juricskay Istvánnak, Dr. Halmosi Róbertnek, Prof. Dr. Wittmann Istvánnak, Dr. Keszthelyi Zsuzsának és Dr. Vékási Juditnak az inspiráló ötletekért.

Köszönettel tartozom Tapasztóné Fazekas Kornéliának és Nagy Lászlónénak a precíz asszisztenciáért.

Köszönöm Dr. Tibold Antalnak, hogy a munkámban is a társam.

Végezetül szüleimnek ajánlom a munkámat, akik mindig arra bátorítottak, hogy olyasmivel foglalkozzak, amit szeretni tudok.

Publications of the author

1. Szapary L, Horvath B, Marton ZS, Alexy T, Kesmarky G, Szots M, Koltai K, Czopf J, Toth K. Short term effect of low dose atorvastatin on hemorheological parameters, platelet aggregation and endothelial function in cerebrovascular patients with dyslipidemia. *CNS Drugs* 2004; 18:165-72. (IF: 4.180)
2. Horváth B, Hegedüs D, Szapary L, Márton ZS, Alexy T, Koltai K, Gyevnár ZS, Juricskay I, Tóth K, Késmárky G. A von Willebrand faktornak, mint az endothelium diszfunkció markerének vizsgálata érbetegekben. *Orv Hetil* 2003; 50:2471-6.
3. Alexy T, Stef Gy, Márton Zs, Horváth B, Koltai K, Pálfi A, Fehér G, Bócsa Z, Pusch G, Szapary L, Késmárky G, Veress G, Tóth K. A rutinszerűen alkalmazott trombocita aggregáció gátló kezelés hatékonyságának felmérése érbetegekben. *Kardiológus* 2003; 2:5-24.
4. Szapary L, Horváth B, Márton Zs, Alexy T, Késmárky G, Szóts M, Pusch G, Gaál V, Pálfi A, Koltai K, Juricskay I, Tóth K. A krónikus ischaemiás agyérbetegségek haemorrheologiai jellemzői. *Agyérbetegségek* 2003; 9:2-7.
5. Marton ZS, Halmosi R, Alexy T, Horvath B, Toth A, Feher G, Koltai K, Kesmarky G, Habon T, Sumegi B, Hideg K, Toth K. Hemorheological methods in drug research. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004; 30:243-52. (IF: 0.630)
6. Alexy T, Toth A, Marton ZS, Horvath B, Koltai K, Feher G, Kesmarky G, Kalai T, Hideg K, Sumegi B, Toth K. Inhibition of ADP-evoked platelet aggregation by selected poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43:423-31. (IF: 1.576)
7. Keszthelyi Zs, Past T, Koltai K, Szabó L, Mózsik Gy. A króm(III)ion fokozza a glukóz hasznosulását 2-es típusú diabetes mellitusban. *Orv Hetil* 2003; 144:2073-6.
8. Szapary L, Szóts M, Horváth B, Márton Zs, Alexy T, Késmárky G, Juricskay I, Nagy F, Gaál V, Pálfi A, Koltai K, Tóth K. A kardiovaszkuláris rizikófaktorok hatása az agyérbetegek haemorrheologiai viszonyaira. *Orv Hetil* 2003; 144:1085-90.
9. Keszthelyi Zs, Past T, Koltai K, Szabó L, Mózsik Gy. Króm-és szelénionok szerepe a glukóz-felhasználás sebességének szabályozásában. *Metabolizmus* 2004; 2:97-103.

10. Keszthelyi Z, Past T, Lukats B, Koltai K, Karadi Z. The central effect of chromium on glucose metabolism. *Pharmacopsychiatry* 2004; 37:242. (IF: 2.089)
11. Deres P, Koltai K, Keszthelyi Zs, Tóth K. Speciális szempontok a metabolikusan érintett iszkémiás szívbetegek kezelésében. *Háziorv Továbbk Szle* 2003; 8:503-7.
12. Szapáry L, Csalódi R, Pusch G, Horváth B, Alexy T, Márton Zs, Késmárky G, Szóts M, Koltai K, Tóth K. A thrombocytá aggregáció-gátló kezelés hatékonyságának aggregometriás vizsgálata ischaemiás agyérbetegeknél. *Agyérbetegségek* 2003; 9:12-7.
13. Horvath B, Hegedus D, Szapary L, Marton Zs, Alexy T, Koltai K, Czopf L, Wittmann I, Juricskay I, Toth K, Kesmarky G. Measurement of von Willebrand factor as the marker of endothelial dysfunction in vascular diseases. *Exp Clin Cardiol* 2004; 9:1-4.
14. Tóth K, Koltai K. Metabolikus szindróma és szívbetege. *Háziorv Továbbk Szle* 2004; 9:402-6.
15. Feher G, Koltai K, Kesmarky G, Szapary L, Juricskay I, Toth K. Hemorheological parameters and aging. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006; 35:89-98. (IF: 1.242)
16. Kesmarky G, Feher G, Koltai K, Horvath B, Toth K. Viscosity, hemostasis and inflammation in atherosclerotic heart diseases. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006; 35:67-73. (IF: 1.242)
17. Feher G, Koltai K, Papp E, Alkonyi B, Solyom A, Kenyeres P, Kesmarky G, Czopf L, Toth K. Aspirin resistance: possible roles of cardiovascular risk factors, previous disease history, concomitant medications and haemorrheological variables. *Drugs Aging* 2006; 23:559-67. (IF: 2.200)
18. Koltai K, Feher G, Kesmarky G, Keszthelyi Z, Czopf L, Toth K. The effect of blood glucose levels on hemorheological parameters, platelet activation and aggregation in oral glucose tolerance tests. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006; 35:517-25. (IF: 1.242)
19. Feher G, Koltai K, Alkonyi B, Papp E, Keszthelyi Z, Kesmarky G, Toth K. Clopidogrel resistance: Role of body mass and concomitant medications. *Int J Cardiol* 2007; 120:188-92. (IF: 2.878)
20. Feher G, Koltai K, Toth K. Are hemorheological parameters independent of aging? *Clin Hemorheol Microcirc* 2007; 36:181-2. (IF: 0.977)

21. Fehér G, Bagoly E, Kövér F, Koltai K, Hantó K, Pozsgai E, Komoly S, Dóczy T, Tóth K, Szapáry L. The effect of carotid stenting on rheological parameters, free radical production and platelet aggregation. *Orv Hetil* 2007; 148:2365-70.
22. Feher G, Koltai K, Kesmarky G, Toth K. Hemorheological background of acetylsalicylic acid resistance. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008; 38:143-52. (IF: 0.977)
23. Vekasi J, Koltai K, Gaal V, Toth A, Juricskay I, Kesmarky G. The effect of aspirin on hemorheological parameters of patients with diabetic retinopathy. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008; 39:385-9. (IF: 0.977)
24. Csejtej A, Tibold A, Varga Z, Koltai K, Ember A, Orsos Z, Feher G, Horvath OP, Ember I, Kiss I. GSTM, GSTT and p53 polymorphisms as modifiers of clinical outcome in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2008; 28:1917-22. (IF: 1.414)
25. Koltai K, Feher G, Kenyeres P, Lenart I, Alexy T, Horvath B, Marton Zs, Kesmarky G, Toth K. Relation of platelet aggregation and fibrinogen levels to advancing age in aspirin- and thienopyridine-treated patients. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008;40:295-302. (IF: 0.977)
26. Koltai K, Fulop A, Feher G, Kenyeres P, Halmosi R, Tibold A, Czopf L, Kesmarky G, Toth K. Investigation of seasonal differences in hemorheological parameters and platelet aggregability and their association with meteorological factors. (under publication)