

Μελέτη των μικροσωματιδίων στην εκτίμηση του θρομβωτικού μικροπεριβάλλοντος ασθενών με πρόσφατη διάγνωση Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2*

Β. Νικολαΐδου¹
Ε. Γκαλιαγκούση¹
Ε. Γαβριηλάκη¹
Ε. Γιαννάκη²
Π. Ανυφαντή¹
Ι. Ζωγράφου³
Χ. Σαμπάνης³
Σ. Δούμα¹

Περίληψη

Σκοπός: Μελετήσαμε το θρομβωτικό μικροπεριβάλλον από τα πρώιμα στάδια Σακχαρώδους Διαβήτη Τύπου 2 (ΣΔ2) μέσω της μέτρησης αιμοπεταλιακών (ΑιμΜΣ) και ερυθροκυτταρικών (ΕρΜΣ) μικροσωματιδίων. Επιπλέον, συσχετίσαμε τα επίπεδα ΜΣ με παραμέτρους της νόσου, όπως η γλυκόζη νηστείας και η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA_{1c}).

Υλικό-Μέθοδοι: Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 50 ασθενείς με πρόσφατη διάγνωση ΣΔ2 (<6 μήνες) και 25 εθελοντές αντίστοιχης ηλικίας, φύλου και αρτηριακής πίεσης. Οι ΣΔ2 δεν ελάμβαναν αντιδιαβητική αγωγή πέραν μετφορμίνης. Τα επίπεδα ΜΣ μετρήθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Επιπλέον, καταγράφηκαν το γλυκαιμικό, λιπιδαιμικό προφίλ, η νεφρική και ηπατική λειτουργία των συμμετεχόντων.

Αποτελέσματα: Οι ασθενείς με ΣΔ2 παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα ΑιμΜΣ ($p=0,001$) και ΕρΜΣ ($p=0,007$) έναντι των εθελοντών. Τα ΑιμΜΣ συσχετίστηκαν με τη γλυκόζη νηστείας ($p=0,026$) και τη HbA_{1c} ($p=0,002$), ενώ τα ΕρΜΣ μόνο με τη γλυκόζη νηστείας ($p=0,018$). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, τα ΕρΜΣ συσχετίστηκαν ανεξάρτητα με τη διάγνωση ΣΔ2.

Συμπεράσματα: Η αθηροθρόμβωση ανιχνεύεται από τα πρώιμα στάδια ΣΔ2 όπως αναδεικνύεται από τα αυξημένα επίπεδα ΜΣ. Η ανεύρεση συσχέτισης των ΜΣ με το γλυκαιμικό προφίλ συνδέεται πιθανά όχι μόνο με έναν νέο μηχανισμό εξελισσόμενης θρομβωτικής τάσης σχετιζόμενης με την υπεργλυκαιμία αλλά και με πρώιμους δείκτες θρόμβωσης, αναδεικνύοντας την ανάγκη πρώιμης διαχείρισης υπεργλυκαιμίας.

Εισαγωγή

Τα μικροσωματίδια (ΜΣ) αποτελούν σύμπλοκες φυσαλιδώδεις δομές με διάμετρο 0,1-1 μm οι οποίες εκχύνονται από ενεργοποιημένα ή αποπτωτικά κύτταρα^{1,2}. Ανάλογα με το κύτταρο από το οποίο προέρχονται διακρίνονται σε ενδοθηλιακά (ΕνΜΣ), ερυθροκυτταρικά (ΕρΜΣ) και αιμοπεταλιακά (ΑιμΜΣ) μικροσωματίδια. Τα ΕνΜΣ αποτελούν ισχυρό δείκτη ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, τα

¹ Γ' Παθολογική Κλινική
ΓΝ Παπαγεωργίου, ΑΠΘ,
Θεσσαλονίκη

² Τμήμα Αιματολογίας, Θεαγένειο
Αντικαρκινικό Νοσοκομείο,
Θεσσαλονίκη

³ Β' Προπαιδευτική Παθολογική
Κλινική, ΓΝ Ιπποκράτειο, ΑΠΘ,
Θεσσαλονίκη

* Η εργασία βραβεύτηκε στο 31ο Πανελλήνιο Ετήσιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης και Εκπαίδευσης για τον Σακχαρώδη Διαβήτη, 14-18/11/2018, Θεσσαλονίκη.

ΑιΜΜΣ αντιπροσωπεύουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, ενώ τα ΕρΜΣ προάγουν τον σχηματισμό και τη σταθεροποίηση του θρόμβου³.

Τα ΜΣ σε υγιείς συνθήκες παράγονται σε μικρές ποσότητες συνεισφέροντας στη ρύθμιση φυσιολογικών διαδικασιών όπως η πήξη, η φλεγμονή και η ενδοθηλιακή λειτουργία. Αντίθετα, η παρουσία καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου οδηγεί στην απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων ΜΣ τα οποία διαφέρουν σε σύνθεση και λειτουργία και ασκούν βλαβερές επιδράσεις που προάγουν την πήξη, τη φλεγμονή, την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και εντέλει την εκδήλωση καρδιαγγειακών νοσημάτων⁴. Ως εκ τούτου, αυξημένα επίπεδα ΜΣ έχουν βρεθεί στην αρτηριακή υπέρταση, τον σακχαρώδη διαβήτη, τη δυσλιπιδαιμία και τη στεφανιαία νόσο. Επιπλέον, τα ΜΣ έχουν προταθεί ως πιθανός βιοδείκτης διαταραγμένης ομοιόστασης των αγγείων⁵.

Οι υπάρχουσες μελέτες αφορούν κυρίως ασθενείς με μακροχρόνιο Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2) και έχουν συσχετίσει τα ΜΣ με τη βαρύτητα των μικρο- και μακρο-αγγειακών επιπλοκών. Ωστόσο, η επίδραση του γλυκαιμικού προφίλ καθώς και ο ρόλος των ΜΣ σε ασθενείς με νεοδιαγνωσμένο ΣΔ2 δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μέτρηση των ΜΣ σε ασθενείς με νεοδιαγνωσμένο ΣΔ2 και η συσχέτισή τους με κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους της νόσου.

Υλικό – Μέθοδοι

Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 50 ασθενείς με ΣΔ2 ηλικίας 18-75 ετών και 25 υγιείς εθελοντές αντίστοιχης ηλικίας, φύλου και αρτηριακής πίεσης. Απαραίτητες προϋποθέσεις συμμετοχής στη μελέτη ήταν η πολύ πρόσφατη διάγνωση της νόσου (<6 μήνες) και η μη λήψη αντιδιαβητικής αγωγής με μοναδική εξαίρεση τη λήψη μετφορμίνης. Η διάγνωση του ΣΔ2 βασίστηκε σε 2 παθολογικές τιμές γλυκόζης σε 2 διαφορετικές ημέρες (γλυκόζη νηστείας ≥ 126 mg/dl και/ή γλυκόζη >200 mg/dl δύο ώρες μετά από δοκιμασία ανοχής με 75 gr άνυδρης γλυκόζης). Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν διαβητικοί ασθενείς οι οποίοι είχαν φυσιολογική γλυκόζη νηστείας ή μη παθολογική δοκιμασία ανοχής έως και έναν χρόνο πριν την επίσημη διάγνωση της νόσου σύμφωνα με εργαστηριακό έλεγχο. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν ασθενείς με στεφανιαία νόσο, αγ-

γειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, φλεγμονώδη νοσήματα οξεία ή χρόνια, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια [glomerular filtration rate (GFR) ≤ 45 ml/min/m²], κακοήθεια, εγκυμοσύνη, λήψη αντιαιμοπεταλιακών ή αντιπηκτικών σκευασμάτων. Όλες οι μετρήσεις διενεργήθηκαν το πρωί μεταξύ 9-11 π.μ. μετά από νηστεία 10 ωρών και εφόσον οι ασθενείς απείχαν από κάπνισμα και καφεΐνη για 3 ώρες τουλάχιστον. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις αρχές της διακήρυξης του Ελσίνκι και εγκρίθηκε από την Επιστημονική και Ηθική Επιτροπή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Όλοι οι συμμετέχοντες υπέγραψαν έγγραφη συγκατάθεση πριν τη συμμετοχή τους στη μελέτη.

Σε όλους τους συμμετέχοντες διενεργήθηκαν εργαστηριακές εξετάσεις προκειμένου να εκτιμηθεί η γλυκόζη νηστείας, η ηπατική, η νεφρική λειτουργία, το λιπιδαιμικό προφίλ και η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA_{1c}). Η αρτηριακή πίεση ιατρείου εκτιμήθηκε σε καθιστή θέση με τη χρήση έγκυρης συσκευής μέτρησης αρτηριακής πίεσης (Microlife Exact BP, Microlife AG, Widnau, Switzerland) σύμφωνα με τις αντίστοιχες κατευθυντήριες οδηγίες⁶. Ως αρτηριακή πίεση ιατρείου καταγράφηκε ο μέσος όρος μεταξύ δεύτερης και τρίτης μέτρησης τριών συνεχόμενων μετρήσεων με μεσοδιάστημα 2 λεπτών στο άκρο με την υψηλότερη αρτηριακή πίεση. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της λευκωματίνης ούρων διενεργήθηκε με τη μέθοδο της νεφελομετρίας σε συλλογή ούρων 24ώρου. Επίπεδα λευκωματίνης μεταξύ 30-300 mg/24h ορίστηκαν ως μικρολευκωματινουρία⁷. Οι ασθενείς δεν άλλαξαν διατροφικές συνήθειες προκειμένου να γίνει η καταγραφή.

Ποσοτικός προσδιορισμός μικροσωματιδίων

Η δειγματοληψία, φυγοκέντρηση και αποθήκευση των δειγμάτων έγινε με βάση συγκεκριμένο πρωτόκολλο⁸. Δείγμα αίματος συλλέχθηκε σε σωληνάκια εμπλουτισμένα με κιτρικό νάτριο 3,2% και ακολούθησε φυγοκέντρηση εντός 30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου σε συνθήκες 2.500 g για 15 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκέντρηση του υπερκείμενου εκ νέου στις ίδιες συνθήκες. Το υπερκείμενο πλάσμα ελεύθερο αιμοπεταλίων αποθηκεύτηκε στους -80°C. Ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός των ΜΣ με κυτταρομετρία ροής (CyFlow Cube8 ROBBY, Sysmex Partec GmbH, Goerlitz, Germany). Προκα-

ταρκτικά πειράματα ανέδειξαν υψηλό ποσοστό αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου σε δείγματα που είχαν αποφυχθεί σε χρονικό διάστημα μικρότερο των 2 εβδομάδων (συντελεστής μεταβλητότητας <10%). Η σήμανση των ΜΣ έγινε με τα αντισώματα anti-C235 PC7 για τα ΕρΜΣ και anti-CD42a APC για τα ΑιμΜΣ, καθώς και αννεξίνη FITC (Immunotech SAS, Marseille, France). Μικροσφαιρίδια μεγέθους 0,16-0,55 χιλιοστών (Megamix-Plus SSC beads, Biotex, Marseille, France) χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό παραθύρου ανάλογης αντίστοιχου του μεγέθους των ΜΣ.

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού πακέτου SPSS 22 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν με ποσοστά για τις ποιοτικές μεταβλητές ενώ για τις συνεχείς ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (mean \pm standard deviation, $M \pm SD$) ή με τη διάμεση τιμή και το πρώτο και τρίτο τεταρτημόριο (ενδοτεταρτημοριακό εύρος) [median, Q1, Q3 (interquartile

range)] ανάλογα με την κανονικότητα. Οι διαφορές μεταξύ μέσων όρων υπολογίστηκαν με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney, η σύγκριση μεταξύ των ποιοτικών μεταβλητών διενεργήθηκε με τη δοκιμασία Pearson chi square. Η συσχέτιση μεταξύ ποσοτικών μεταβλητών εκτιμήθηκε με τον συντελεστή κατά Pearson και τον συντελεστή Spearman σε περίπτωση μη κανονικής κατανομής. Μοντέλο πολλαπλής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε όπου κρίθηκε απαραίτητο. Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$ θεωρήθηκε σημαντικό σε συνδυασμό με 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95% confidence intervals, 95% CI).

Αποτελέσματα

Συνολικά μελετήθηκαν 75 άτομα, 50 νεοδιαγνωσμένοι ασθενείς με ΣΔ2 και 25 εθελοντές. Τα βασικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Η πλειοψηφία των ασθενών με ΣΔ2 (65,3%) είχαν διαγνωσθεί μόλις 1 μήνα νωρίτερα, ενώ οι υπόλοιποι 3 μήνες (1-5,5) κατά διάμεση τιμή. Από τους ασθενείς μόνο το 40% ελάμβανε μετφορμίνη για 2,5 εβδομάδες (1-11) κατά διάμεση

Πίνακας 1. Βασικά χαρακτηριστικά πληθυσμού μελέτης.

Μεταβλητή	Διαβητικοί (n=50)	Μη διαβητικοί (n=25)	P
Ηλικία (έτη)	56,2 \pm 11,0	53,4 \pm 10,6	0,291
Άνδρες (%)	50	52	0,870
Αρτηριακή Υπέρταση (%)	70	60	0,294
Δυσλιπιδαιμία (%)	52	44	0,514
ΔΜΣ (kg/m ²)	30,3 \pm 3,5	26,9 \pm 4,3	<0,001
ΣΑΠ ιατρείου (mmHg)	140,9 \pm 21,3	136,3 \pm 20,1	0,378
ΔΑΠ ιατρείου (mmHg)	84,7 \pm 11,7	86,8 \pm 13,3	0,527
Καρδιακή Συχνότητα (χτύπου/min)	76,4 \pm 10,9	73,3 \pm 6,5	0,288
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	130 \pm 45,5	92,7 \pm 7,5	<0,001
HbA _{1c} (%)	6,9 (6,4 – 8,2)	5,3 (5,0 – 5,6)	<0,001
eGFR (ml/min/1.73m ²)	111,8 \pm 36,7	83,7 \pm 33,9	0,001
Λευκοματίνη ούρων (mg/24h)	9,28 (5,25 -25)	6,1 (5,2-16,8)	0,218
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	198,4 \pm 39,4	208,4 \pm 37,8	0,304
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	131 (104 – 177,5)	96,5 (76 – 130)	0,002
HDL-C (mg/dl)	41,7 \pm 10,2	51,4 \pm 10,1	<0,001
LDL-C (mg/dl)	126,3 \pm 34,0	135,6 \pm 33,2	0,274
ΕρΜΣ/μl	26 (9-100)	9 (4-25)	0,007
ΑιμΜΣ/μl	195 (115-409)	110 (73-150)	0,001
Μετφορμίνη (%)	40	0	<0,001
Κάπνισμα (%)	42	32	0,218

ΔΜΣ: Δείκτης Μάζας Σώματος, ΣΑΠ: Συστολική Αρτηριακή Πίεση, ΔΑΠ: Διαστολική Αρτηριακή Πίεση, eGFR: estimated glomerular filtration rate (Ρυθμός Σπειραματικής Διήθησης), HbA_{1c}: Γλυκοζυλιωμένη Αιμοσφαιρίνη, HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol (Υψηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεϊνική Χοληστερόλη), LDL-C: Low-density lipoprotein cholesterol (Χαμηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεϊνική Χοληστερόλη), ΕρΜΣ: Ερυθροκυτταρικά Μικροσωματίδια, ΑιμΜΣ: Αιμοπεταλιακά Μικροσωματίδια

τιμή. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι ασθενείς με ΣΔ2 εμφάνισαν υψηλότερες τιμές γλυκόζης νηστείας και HbA_{1c}. Επιπλέον, οι ΣΔ2 εμφάνισαν υψηλότερο BMI, τριγλυκερίδια, χαμηλότερη HDL όπως συνήθως χαρακτηρίζει το μεταβολικό τους προφίλ. Τέλος, οι ΣΔ2 παρουσίασαν υψηλότερη τιμή GFR ως επακόλουθο της υπερδιήθησης που παρατηρείται στα αρχικά στάδια της νόσου.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως: Mean ± SD/ Median (Q1-Q3 interquartile range).

Επίπεδα κυκλοφορούντων μικροσωματιδίων

Ασθενείς με ΣΔ2 εμφάνισαν υψηλότερες τιμές κυκλοφορούντων ΑιμΜΣ και ΕρΜΣ σε σύγκριση με τους μη διαβητικούς όπως απεικονίζεται στον πίνακα 1. Στο επόμενο στάδιο της ανάλυσης διερευνήσαμε πιθανές συσχετίσεις των αυξημένων ΕρΜΣ και ΑιμΜΣ και του γλυκαιμικού προφίλ των ασθενών (Πίνακας 2). Τα επίπεδα των ΑιμΜΣ παρουσίασαν θετική συσχέτιση με τη γλυκόζη νηστείας και την HbA_{1c}, ενώ τα ΕρΜΣ συσχετίστηκαν θετικά με τη γλυκόζη νηστείας αλλά όχι με τη HbA_{1c}. Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ ΜΣ και άλλων παραμέτρων όπως αρτηριακή πίεση ιατρείου, λιπίδια, BMI και μικρολευκοματίνη. Στη συνέχεια εξετάστηκε εάν η αύξηση των ΕρΜΣ και ΑιμΜΣ σε ασθενείς με ΣΔ2 ήταν ανεξάρτητη από άλλους παράγοντες. Διενεργήθηκε πολλαπλή λογαριθμική παλινδρόμηση προκειμένου να οριστούν ανεξάρτητοι προδιαθεσικοί παράγοντες για την εμφάνιση ΣΔ2 στον πληθυσμό μας. Όπως φαίνεται στον πίνακα 3, τα ΕρΜΣ και η HDL προέβλεψαν την εμφάνιση ΣΔ2 ανεξάρτητα από τα τριγλυκερίδια και τα ΑιμΜΣ.

Πίνακας 2. Συσχετίσεις μεταξύ κυκλοφορούντων στο πλάσμα ΜΣ & δεικτών γλυκαιμίας σε όλο τον πληθυσμό.

Μεταβλητή	Συντελεστής Συσχέτισης	P
ΑιμΜΣ		
Γλυκόζη νηστείας	0,261	0,026
HbA _{1c}	0,350	0,002
ΕρΜΣ		
Γλυκόζη νηστείας	0,276	0,018
HbA _{1c}	0,152	0,193

ΑιμΜΣ: Αιμοπεταλιακά Μικροσωματίδια, HbA_{1c}: Γλυκοζυλιωμένη Αιμοσφαιρίνη, ΕρΜΣ: Ερυθροκυτταρικά Μικροσωματίδια

Πίνακας 3. Μοντέλο πολλαπλής λογαριθμικής παλινδρόμησης των ασθενών με ΣΔ2.

	Exp(B)	p-value	lower 95% CI	upper 95% CI
ΕρΜΣ	3,714	0,022	1,204	11,454
HDL-c	0,919	0,023	0,854	0,988
ΑιμΜΣ	3,534	0,238	0,434	28,784
Τριγλυκερίδια	1,009	0,198	0,955	1,023

CI: confidence intervals (όρια εμπιστοσύνης), ΕρΜΣ: Ερυθροκυτταρικά Μικροσωματίδια, HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol (Υψηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεϊνική Χοληστερόλη), ΑιμΜΣ: Αιμοπεταλιακά Μικροσωματίδια

Συζήτηση

Οι ασθενείς με ΣΔ2 παρουσιάζουν αυξημένη θνητότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα κυρίως λόγω της εμφάνισης μικρο- και μακροαγγειακών επιπλοκών σε συνδυασμό με τη συνύπαρξη καρδιαγγειακών παραγόντων κινδύνου όπως αρτηριακή υπέρταση, δυσλιπιδαιμία και στεφανιαία νόσος. Η επιταχυνόμενη διαδικασία αθηροσκλήρυνσης και η θρομβωτική τάση αποτελούν τη μοριακή βάση της διαταραγμένης ομοιόστασης της λειτουργίας των αγγείων στην οποία συμβάλλουν η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, η φλεγμονή και η υπερπηκτικότητα⁹⁻¹².

Η παρούσα μελέτη καταγράφει για πρώτη φορά την παρουσία νέων βιοδεικτών αθηροσκλήρυνσης και θρόμβωσης σε πληθυσμό διαβητικών ασθενών με πολύ πρώιμη διάγνωση της νόσου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα ΕρΜΣ διαδραματίζουν ρόλο στην αθηροθρομβωτική διαδικασία¹³⁻¹⁵. Ωστόσο, υπάρχουν μόνο λίγες κλινικές μελέτες σε καρδιαγγειακά νοσήματα που μελετούν τον ρόλο των ΕρΜΣ. Η ομάδα του Helal ανέδειξε υψηλά επίπεδα κυκλοφορούντων ΕρΜΣ σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο οι οποίοι παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ2¹⁶. Η μόνη μελέτη η οποία μέτρησε τα ΕρΜΣ στον ΣΔ2 αφορά σε χρόνιους διαβητικούς υπό αγωγή¹⁷. Το γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη τα ΕρΜΣ συσχετίζονται ανεξάρτητα με τον ΣΔ2 σε πολύ πρώιμα στάδια της νόσου προτείνουν ότι τα ΜΣ μπορεί να αποτελούν ένα κληρονομικό χαρακτηριστικό το οποίο βρίσκεται αυξημένο πρακτικά στην έναρξη της νόσου ή ακόμη και από το στάδιο του προδιαβήτη. Εάν τα ΕρΜΣ αποτελούν έναν κλινικό βιοδείκτη ο οποίος αντικατοπτρίζει ένα μικροπεριβάλλον θρόμβωσης και φλεγμονής ή έναν ισχυρό μεσολαβητή της αθηροσκλήρυνσης ο οποίος διαδραματίζει ρόλο στη

μακρόχρονη πορεία της νόσου και των επιπλοκών της μένει να ερευνηθεί περαιτέρω.

Εστιάζοντας στον ρόλο των αιμοπεταλίων, ο ΣΔ2 χαρακτηρίζεται από αλλαγές στον μεταβολισμό των αιμοπεταλίων καθώς και στα σηματοδοτικά μονοπάτια που αυτά συμμετέχουν, συμβάλλοντας έτσι στην αθηρογόνο τάση της νόσου^{18,19}. Επιπλέον τα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν ενεργά με τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λευκά αιμοσφαίρια, ρυθμίζοντας τη δράση τους, προωθώντας το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή^{20,21}. Ένα σημαντικό ποσοστό μελετών έχει δείξει ότι τα ΑιμΜΣ αυξάνονται σημαντικά τόσο σε ασθενείς με ΣΔ2 είτε εμφανίζουν επιπλοκές είτε όχι²² και μπορεί να συσχετίζονται με τη βαρύτητα των μικροαγγειακών επιπλοκών²³. Ωστόσο καμία μελέτη έως τώρα δεν έχει καταμετρήσει τα ΑιμΜΣ σε τόσο πρώιμα στάδια ΣΔ2, καθώς η πλειονότητα των μελετών δεν διευκρινίζει τη διάρκεια της νόσου. Το γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη έχουν βρεθεί αυξημένα τα ΑιμΜΣ όχι μόνο επιβεβαιώνει τη συνεχή θρομβωτική διαδικασία που εμφανίζεται στον ΣΔ2 αλλά και ότι η έναρξη της χαρακτηρίζει ακόμη και τα πολύ πρώιμα στάδια της νόσου.

Στη συνέχεια μελετήσαμε εάν τα αυξημένα ΕρΜΣ και ΑιμΜΣ συσχετίζονται με παράγοντες που χαρακτηρίζουν την εμφάνιση ΣΔ2. Η ανάλυση των δεδομένων ανέδειξε ότι τα ΕρΜΣ συσχετίζονται θετικά με τη γλυκόζη νηστείας ενώ τα ΑιμΜΣ με τη γλυκόζη νηστείας και τη HbA_{1c}. Σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο οι Helal και οι συνεργάτες βρήκαν θετική συσχέτιση των ΑιμΜΣ και γλυκόζης νηστείας¹⁶. Σε ασθενείς με ΣΔ2 οι Feng και συνεργάτες έδειξαν ότι τα ΑιμΜΣ συσχετίζονται θετικά με τη μεταγευματική γλυκόζη αλλά όχι με τη HbA_{1c}²⁴, ενώ σε άλλη μελέτη οι Sabatier και συνεργάτες δεν βρήκαν συσχέτιση μεταξύ ΜΣ και γλυκόζης νηστείας ή HbA_{1c}²⁵. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι και στις δύο μελέτες οι ασθενείς έπασχαν επί χρόνια από ΣΔ2. Όσον αφορά στα ΕρΜΣ δεν υπάρχει καμία μελέτη που να τα συσχετίζει με το γλυκαιμικό προφίλ των διαβητικών. Το εύρημά μας ότι τα ΕρΜΣ και ΑιμΜΣ συσχετίζονται θετικά με το γλυκαιμικό προφίλ των ασθενών (γλυκόζη νηστείας ή/και HbA_{1c}) σε ασθενείς με πολύ πρόσφατη διάγνωση της νόσου ενδεχομένως μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η υπεργλυκαιμία αποτελεί έναν από τους παράγοντες που πυροδοτούν τη θρομβωτική τάση που παρουσιάζει η νόσος. Απο-

τελεί συνεπώς μοναδικό εύρημα της παρούσας μελέτης το γεγονός ότι και τα δύο είδη ΜΣ που

Πίνακας 3. Μοντέλο πολλαπλής λογαριθμιστικής παλινδρόμησης των ασθενών με ΣΔ2.

	Exp(B)	p-value	lower 95% CI	upper 95% CI
ΕρΜΣ	3.714	0.022	1.204	11.454
HDL-c	0.919	0.023	0.854	0.988
ΑιμΜΣ	3.534	0.238	0.434	28.784
Τριγλυκερίδια	1.009	0.198	0.955	1.023

CI: confidence intervals (όρια εμπιστοσύνης), ΕρΜΣ: Ερυθροκυτταρικά Μικροσωματίδια, HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol (Υψηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεϊνική Χοληστερόλη), ΑιμΜΣ: Αιμοπεταλιακά Μικροσωματίδια

εμπλέκονται στη διαδικασία της αθηροθρόμβωσης σε καρδιαγγειακά νοσήματα ανευρίσκονται αυξημένα και συσχετίζονται με το γλυκαιμικό προφίλ ασθενών με πολύ πρώιμη διάγνωση ΣΔ2. Ως εκ τούτου, τα ΜΣ θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν

Πίνακας 2. Συσχετίσεις μεταξύ κυκλοφορούντων στο πλάσμα ΜΣ & δεικτών γλυκαιμίας σε όλο τον πληθυσμό.

Μεταβλητή	Συντελεστής Συσχέτισης	P
ΑιμΜΣ		
Γλυκόζη νηστείας	0.261	0.026
HbA _{1c}	0.350	0.002
ΕρΜΣ		
Γλυκόζη νηστείας	0.276	0.018
HbA _{1c}	0.152	0.193

ΑιμΜΣ: Αιμοπεταλιακά Μικροσωματίδια, HbA_{1c}: Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη, ΕρΜΣ: Ερυθροκυτταρικά Μικροσωματίδια

έναν νέο μηχανισμό μέσω του οποίου η υπεργλυκαιμία ενισχύει τη θρομβωτική τάση στον ΣΔ2¹⁸ αλλά και νέους δείκτες του θρομβωτικού μικροπεριβάλλοντος της νόσου.

Συμπερασματικά, σε ασθενείς με πρόσφατη διάγνωση ΣΔ2 χωρίς μακροχρόνιες καρδιαγγειακές επιπλοκές τα επίπεδα των κυκλοφορούντων ΕρΜΣ και ΑιμΜΣ βρέθηκαν αυξημένα. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει πως η αθηροθρομβωτική διαδικασία έχει ξεκινήσει από τα πολύ πρώιμα στάδια του ΣΔ2 ακόμη και πριν την εκδήλωση των επιδράσεων της υπεργλυκαιμίας καθώς και των κλινικών επιπλοκών της νόσου. Το γεγονός ότι τα ΕρΜΣ προβλέπουν ανεξάρτητα τον ΣΔ2 ενδεχομένως να σημαίνει ότι τα ΕρΜΣ αποτελούν ένα συγγενές μοριακό μονοπάτι που οδηγεί στην εμφάνιση ΣΔ2.

Τέλος, η συσχέτιση μεταξύ των νέων βιοδεικτών (ΕρΜΣ και ΑιμΜΣ) με το γλυκαιμικό προφίλ των ασθενών αναδεικνύει την ανάγκη για πρωιμότερη διάγνωση της νόσου και θεραπεία της υπεργλυκαιμίας.

Περιορισμοί-μειονεκτήματα

Στα μειονεκτήματα της μελέτης συγκαταλέγεται το μικρό μέγεθος του δείγματος, αν και οι μελέτες με τόσο πρόωμη διάγνωση ΣΔ2 είναι ελάχιστες και παρουσιάζουν μεθοδολογικά προβλήματα κυρίως όσον αφορά στον ορισμό του δείγματος. Επιπλέον, από την παρούσα μελέτη δεν μπορούν να εξαχθούν αιτιολογικές συσχετίσεις καθώς πρόκειται για μελέτη χρονικής στιγμής.

Abstract

Nikolaidou B, Gkaliagkousi E, Gavriilaki E, Yannaki E, Anyfanti P, Zografou I, Sampanis Ch, Douma S. A study of microvesicles in the assessment of the thrombotic microenvironment in newly diagnosed Diabetes Mellitus Type 2. *Hellenic Diabetol Chron* 2018; 4: 242-248.

Aims: We investigated the thrombotic microenvironment at the very early stages of type 2 diabetes mellitus (T2DM) by measuring platelet-derived MVs (PMVs) and erythrocyte-derived MVs (ErMV) in newly diabetics. We also correlated MVs levels with factors related to disease emergence and severity including fasting glucose, glycated hemoglobin (HbA_{1c}).

Methods: We recruited 50 newly diagnosed (<6 months) patients with T2DM and 25 matched non-T2DM volunteers. Diabetics did not receive any anti-diabetic treatment except metformin. MVs measurement was based on a standardized protocol including flow cytometry. MVs detection was done based on appropriate fluorochrome coupled antibodies and their corresponding isotypes. Glycated hemoglobin (HbA_{1c}), plasma glucose, lipids (total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides), kidney and liver function were determined.

Results: Patients with T2DM displayed significantly higher levels of PMVs (p=0.001) and ErMV (p=0.007) compared to non-T2DM individuals. PMVs were positively correlated with fasting blood glucose (p=0.026) and HbA_{1c} (p=0.002). ErMV were positively correlated with fasting blood glucose (p=0.018) but not with HbA_{1c} (p=0.193). Multiple logistic regression model revealed that ErMV predicted the presence of T2DM, independently of PMVs.

Conclusions: In newly diabetics, ongoing atherothrombosis is evident from the very early stages of the disease as evidenced by increased MVs levels. In addition, the correlation between MVs and glycaemic profile suggests that MVs could represent not only a novel mechanism by which hyperglycemia amplifies thrombotic tendency in T2DM but also early markers of thrombosis, and highlights the need for earlier management of hyperglycemia.

Βιβλιογραφία

1. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 2006; 48: 180-6.
2. Hoefler IE, Steffens S, Ala-Korpela M, Back M, Badimon L, Bochaton-Pierrat ML, et al. Novel methodologies for biomarker discovery in atherosclerosis. *European heart journal* 2015; 36: 2635-42.
3. Thomas MR, Lip GY. Novel Risk Markers and Risk Assessments for Cardiovascular Disease. *Circulation research* 2017; 120: 133-49.
4. Tushuizen ME, Diamant M, Sturk A, Nieuwland R. Cell-derived microparticles in the pathogenesis of cardiovascular disease: friend or foe? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2011; 31: 4-9.
5. Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clinical science* 2013; 124: 423-41.
6. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal* 2013; 34: 2159-219.
7. de Jong PE, Curhan GC. Screening, monitoring, and treatment of albuminuria: Public health perspectives. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 2006; 17: 2120-6.
8. Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraud L, Hauchard A, et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* 2009; 7: 190-7.
9. Pasterkamp G. Methods of accelerated atherosclerosis in diabetic patients. *Heart* 2013; 99: 743-9.
10. Sena CM, Pereira AM, Seica R. Endothelial dysfunction – a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochimica et biophysica acta* 2013; 1832: 2216-31.
11. Authors/Task Force M, Ryden L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *European*

- heart journal 2013; 4: 3035-87.
12. *Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F.* Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *European heart journal* 2013; 34: 2436-43.
 13. *Li KY, Zheng L, Wang Q, Hu YW.* Characteristics of erythrocyte-derived microvesicles and its relation with atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2016; 255: 140-4.
 14. *Westerman M, Porter JB.* Red blood cell-derived microparticles: An overview. *Blood cells, molecules & diseases* 2016; 59: 134-9.
 15. *Said AS, Rogers SC, Doctor A.* Physiologic Impact of Circulating RBC Microparticles upon Blood-Vascular Interactions. *Frontiers in physiology* 2017; 8: 1120.
 16. *Helal O, Defoort C, Robert S, Marin C, Lesavre N, Lopez-Miranda J, et al.* Increased levels of microparticles originating from endothelial cells, platelets and erythrocytes in subjects with metabolic syndrome: relationship with oxidative stress. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD* 2011; 21: 665-71.
 17. *Chiva-Blanch G, Suades R, Padro T, Vilahur G, Pena E, Ybarra J, et al.* Microparticle Shedding by Erythrocytes, Monocytes and Vascular Smooth Muscular Cells Is Reduced by Aspirin in Diabetic Patients. *Revista espanola de cardiologia* 2016; 69: 672-80.
 18. *Feroni P, Basili S, Falco A, Davi G.* Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* 2004; 2: 1282-91.
 19. *Aoki I, Shimoyama K, Aoki N, Homori M, Yanagisawa A, Nakahara K, et al.* Platelet-dependent thrombin generation in patients with diabetes mellitus: effects of glycemic control on coagulability in diabetes. *Journal of the American College of Cardiology* 1996; 27): 560-6.
 20. *Shantsila E, Kamphuisen PW, Lip GY.* Circulating microparticles in cardiovascular disease: implications for atherogenesis and atherothrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis* 2010; 8: 2358-68.
 21. *Morel O, Morel N, Freyssinet JM, Toti F.* Platelet microparticles and vascular cells interactions: a checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses. *Platelets* 2008; 19: 9-23.
 22. *Tsimerman G, Roguin A, Bachar A, Melamed E, Brenner B, Aharon A.* Involvement of microparticles in diabetic vascular complications. *Thrombosis and haemostasis* 2011; 106: 310-21.
 23. *Ogata N, Imaizumi M, Nomura S, Shozu A, Arichi M, Matsuoka M, et al.* Increased levels of platelet-derived microparticles in patients with diabetic retinopathy. *Diabetes research and clinical practice* 2005; 68: 193-201.
 24. *Feng B, Chen Y, Luo Y, Chen M, Li X, Ni Y.* Circulating level of microparticles and their correlation with arterial elasticity and endothelium-dependent dilation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 2010; 208: 264-9.
 25. *Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, et al.* Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2002; 51: 2840-5.

Λέξεις-κλειδιά:

Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2
Μικροσωματίδια
Γλυκοζυλιωμένη Αιμοσφαιρίνη

Key-words:

Type 2 Diabetes mellitus
Microvesicles
Glycated Hemoglobin