

Η επίδραση της ομοκυστεΐνης (ΟΚ) στην λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων σε διαβητικούς τύπου 1 με διαβητική νεφροπάθεια (ΔΝΦ)

Ε. Ρεπαντά
Γ. Σκαραγκάς
Σ. Γκουτκίδου
Ν. Παπάζογλου
Ε. Γεωργακοπούλου

Περίληψη

Σκοπός: Η δράση της ΟΚ στην λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων παραμένει αντιφατική. Για να εκτιμήσουμε την πιθανότητα διαταραχής της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων, μετρήσαμε τα επίπεδα της ΟΚ πλάσματος νηστείας και τα επίπεδα β-θρομβογλοβουλίνης (β-TG) και του αιμοπεταλιακού παράγοντα 4 (PF4) σε διαβητικούς τύπου 1 με ΔΝΦ. **Ασθενείς – Μέθοδοι:** Οι ασθενείς μας ήταν 35 αυστηρά επιλεγμένοι διαβητικοί τύπου 1 οι οποίοι χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες σε σχέση με την απέκκριση λευκωματίνης από τα ούρα. Η 1η ομάδα (AER <30 mg/24ωρο) αποτελούνταν από 12 άτομα, 5 άνδρες και 7 γυναίκες μέσης ηλικίας 44 ± 13.8 ετών, η 2η ομάδα (AER: 30-300 mg/24ωρο) από 15 άτομα, 7 άνδρες και 8 γυναίκες ηλικίας 49 ± 12.5 ετών και η 3η ομάδα (AER >300 mg/24ωρο) από 8 άτομα, 4 άνδρες και 4 γυναίκες ηλικίας $51 \pm 10,6$ ετών. Την ομάδα ελέγχου απετέλεσαν 35 υγιή άτομα αντίστοιχης ηλικίας και φύλου (ομάδα 4η). Σε όλα τα άτομα μετρήθηκαν τα επίπεδα (ΟΚ) πλάσματος νηστείας (Ανοσοενζυμική μέθοδος FPIA, Fluorescence Polarisation Immuno Assay, Abbott), τα επίπεδα της β-TG (Asserachrom β-TG), τα επίπεδα του PF4 (Asserachrom PF4) και τα επίπεδα απέκκρισης λευκωματίνης από τα ούρα (αυτόματος μέθοδος ανοσοκαθίζησης, SPQTM Test System, DiaSorin). **Αποτελέσματα:** Τα επίπεδα της ΟΚ ήταν αντίστοιχα (μmol/l) για την 1η ομάδα: $7,6 \pm 3,95$, για την 2η ομάδα: $12 \pm 4,58$, για την 3η ομάδα: $19 \pm 5,77$ και για την 4η ομάδα: $6,9 \pm 2,96$. Τα επίπεδα της β-TG (IU/ml) ήταν για την 1η ομάδα: $22,2 \pm 5,54$, για την 2η ομάδα: $26,8 \pm 12,16$, για την 3η ομάδα: $96,8 \pm 10,7$ και για την 4η ομάδα: $22,8 \pm 4,8$. Τα επίπεδα του PF4 (IU/ml) ήταν για την 1η ομάδα: $2,3 \pm 0,11$, για την 2η ομάδα $2,65 \pm 0,14$ για την 3η ομάδα: $5,3 \pm 0,92$ και για την 4η ομάδα: $2,2 \pm 0,1$. Υπάρχει μία στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα της β-TG στους διαβητικούς με μακρολευκωματουρία ($p < 0.001$) και μικρολευκωματινουρία και μία σαφής στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα του PF4 στους διαβητικούς με μακρολευκωματουρία ($p < 0,001$) και μικρότερη στους διαβητικούς με μικρολευκωματινουρία ($p < 0,01$). **Συμπέρασμα:** Φαίνεται ότι τα υψηλά επίπεδα ΟΚ που παρατηρούνται σε διαβητικούς τύπου 1 με ΔΝΦ επηρεάζουν την λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων όπως αυτό εκφράζεται από τα αυξημένα επίπεδα της β-TG και του PF4, δύο ειδικών ενζύμων της υπερδραστηριότητας των αιμοπεταλίων, ακόμη και στο επίπεδο της μικρολευκωματινουρίας.

Βιοχημικό Εργαστήριο
Α' Γ.Ν. «ΑΓΙΟΣ ΠΑΥΛΟΣ»
Θεσσαλονίκης
Β' Παθολογική Κλινική
Π.Γ.Ν. «ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ»
Θεσσαλονίκης

Εισαγωγή

Η πληθώρα των παραγόντων κινδύνου που συνδέονται με την αθηρωμάτωση σε διαβητικούς τύπου 1^{1,2} με μικρολευκωματινουρία δεν μπορούν να ερμηνεύσουν από μόνοι τους την μεγάλη θνητότητα από καρδιακή νόσο³. Ο αρχικός προβληματισμός αν η μικρολευκωματινουρία αποτελεί από μόνη της ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου, αντικαταστάθηκε από βεβαιότητα και σήμερα από μόνη της η λευκωματινουρία θεωρείται ότι και για τους μη διαβητικούς αλλά και για τους διαβητικούς και των δύο τύπων διαβήτη ότι αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου⁴⁻⁷ για θάνατο από καρδιαγγειακή νόσο.

Η β-TG θεωρείται ένας πολύ καλός δείκτης της in vivo αντίδρασης απελευθέρωσης μετά από διέγερση των αιμοπεταλίων⁸. Είναι μία ειδική πρωτεΐνη των α-κοκκίων των αιμοπεταλίων με μικρή συγγένεια προς την ηπαρίνη, αναστέλλει την παραγωγή της προστακυκλίνης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και έχει ισχυρή χημειοτακτική δράση για τους ινοβλάστες^{9,10}.

Ο PF4 είναι και αυτός παράγων των α-κοκκίων των αιμοπεταλίων και η δράση του είναι να εξουδετερώνει την αντιπηκτική δράση της ηπαρίνης με την οποία συνδέεται με μεγάλη συγγένεια. Στα αιμοπετάλια υπάρχουν θέσεις μεγάλης συγγένειας για τον PF4 με αποτέλεσμα η σύνδεσή του με αυτές να αυξάνει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Ο PF4 δρα χημειοτακτικά για τα ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα και ινοβλάστες κύτταρα δηλαδή που συμμετέχουν στον μηχανισμό αθηρωματικής εξεργασίας^{11,12}.

Σκοπός της εργασίας μας ήταν να μελετήσουμε την σχέση ανάμεσα στην OK και στην λει-τουρ-γικότητα των αιμοπεταλίων όπως αυτή εκφράζεται με την παρουσία των ειδικών ενζύμων των α-κοκκίων τους σε διαβητικούς ασθενείς τύπου 1 με ΔΝΦ.

Ασθενείς – Μέθοδοι

Το υλικό της εργασίας απετέλεσαν 35 αυστηρά επιλεγμένοι διαβητικοί τύπου 1 οι οποίοι χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες ανάλογα με το επίπεδο λευκωματινουρίας. Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ατόμων της μελέτης φαίνονται στον πίνακα 1. Η 1η ομάδα (AER<30 mg/24ωρο) περιελάμβανε 12 άτομα, 5 άνδρες και 7 γυναίκες μέσης ηλικίας 44±13,8 ετών, η 2η ομάδα (AER: 30-300 mg/ 24ωρο) περιελάμβανε 15 άτομα 7 άνδρες και 8 γυναίκες μέσης ηλικίας 49±12,5 ετών, η 3η ομάδα (AER >300 mg/24ωρο) περιελάμβανε 8 άτομα 4 άνδρες και 4 γυναίκες μέσης ηλικίας 51±10,6 ετών. Την ομάδα ελέγχου απετέλεσαν 35 άτομα υγιή αντίστοιχης ηλικίας και φύλου (ομάδα 4η). Σε όλα τα άτομα μετρήθηκαν τα επίπεδα της OK πλάσματος νηστείας (Ανοσοενζυμική μέθοδος FPIA, Fluorescence Polarisation Immuno Assay, Abbott), τα επίπεδα της β-TG (Asserachrom β-TG) τα επίπεδα του PF4 (Asserachrom PF4) και τα επίπεδα λευκωματινουρίας (αυτόματος μέθοδος ανοσοκαθίζησης, SPQTM Test System, DiaSorin). Κανένα από τα άτομα της μελέτης δεν ελάμβανε σκευάσματα βιταμινών (B₆, B₁₂, φυλλικό οξύ) ή φάρμακα που παρεμβαίνουν στον μεταβολισμό των βιταμινών αυτών (μεθοτρεξάτη, θεοφυλλίνη, αγχολυτικά). Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το t-Student test.

Αποτελέσματα

Οι τιμές των διαφόρων παραμέτρων των ατόμων που μετρήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2. Τα επίπεδα της OK (μmol/l) ήταν για την 1η ομάδα: 7,6±3,95, για την 2η ομάδα: 12±4,58, για την 3η ομάδα 19±5,77 και για την 4η ομάδα: 6,9±2,96. Υπάρχει μία στατιστικώς σημαντική διαφορά (p<0.001) ανάμεσα στην πρώτη ομάδα και στις υπόλοιπες ομάδες των διαβητικών. Το ίδιο ισχύει και μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ομάδων των διαβητικών (2η και 3η). Τα επίπεδα της β-TG

Πίνακας 1. Κλινικά χαρακτηριστικά των ατόμων

Ομάδα	1η	2η	3η	4η
Αριθμός	12	15	8	35
Φύλο(A/Γ)	5/7	7/8	4/4	15/20
Ηλικία	44±13,8	49±12,5	51±10,6	45±12,8
BMI	23,8±2,9	23,6±2,7	23,6±2,5	24,5±2,1
HbA1c(%)	7,4±1,2	7,5±1,2	7,6±1,1	-
Διάρκεια νόσου	19±9,8	19,5±10,5	20,5±10,6	-

Πίνακας 2. Εργαστηριακά ευρήματα

Ομάδα,	1η	2η	3η	4η
AER (mg/24h)	<30	30-300	>300	—
OK (μmol/l)	7,6±3,95	12±4,58	19±5,57	6,9±2,96
β-TG (IU/ml)	22,2±5,54	26,8±12,16	96,8±10,7	22,8±4,8
PF4 (IU/ml)	2,3±0,11	2,65±0,14	5,3±0,92	2,2±0,1

(IU/ml) ήταν για την 1η ομάδα: 22,2±5,54, για την 2η ομάδα: 26,8±12,16, για την 3η ομάδα: 96,8±10,7 και για την 4η ομάδα: 22,8±4,8. Υπάρχει μία στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p<0,001$) στα επίπεδα της β-TG στους διαβητικούς με μικρολευκωματινουρία και μακρολευκωματινουρία σε σχέση με την 1η ομάδα (χωρίς ΔΝΦ) και την 4η ομάδα (ομάδα ελέγχου). Τα επίπεδα του PF4 (IU/ml) ήταν για την 1η ομάδα: 2,3±0,11, για την 2η ομάδα: 2,65±0,14, για την 3η ομάδα: 5,3±0,92 και για την 4η ομάδα 2,2±0,1. Υπάρχει μία στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p<0,001$) στα επίπεδα του PF4 στους διαβητικούς με μακρολευκωματινουρία και μικρότερη ($p<0,01$) στην ομάδα των διαβητικών με μικρολευκωματινουρία σε σχέση με την 1η ομάδα (χωρίς ΔΝΦ) και την 4η ομάδα (ομάδα ελέγχου).

Συζήτηση

Ο ρόλος της συμμετοχής των αιμοπεταλίων στην παθογένεια της μακροαγγειοπάθειας *in vivo* δεν έχει μελετηθεί επαρκώς ιδίως στους διαβητικούς τύπου 1 με ύπαρξη ή όχι ΔΝΦ^{1-3,13,14}. Ακόμη λιγότερο δεν έχει γίνει αποδεκτή λόγω έλλειψης σχετικών μελετών η σχέση της παρουσίας υπερOK στην λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων. Τα αποτελέσματα της εργασίας μας έδειξαν ότι για την β-TG είχαμε αυξημένα επίπεδα τόσο στην ομάδα των διαβητικών με μικρολευκωματινουρία όσο και στην ομάδα των διαβητικών με μακρολευκωματινουρία με παράλληλη αύξηση της OK και στις δύο ομάδες. Για τον PF4 υπήρχε μεγάλη αύξηση στην ομάδα των διαβητικών με μακρολευκωματινουρία και μικρότερη στην ομάδα των διαβητικών με μικρολευκωματινουρία.

Υπάρχουν λίγες προηγούμενες μελέτες σε διαβητικούς με μακρολευκωματινουρία οι οποίες έδειξαν αυξημένη συσσώρευση και υπερδραστικότητα των αιμοπεταλίων. Δεν υπάρχουν όμως μελέτες για το θέμα αυτό που να λαμβάνουν υπ' όψιν και το θέμα της παρουσίας αυξημένων επιπέδων OK.

Βρίσκοντας κανείς αυξημένα επίπεδα ενζύμων που εκφράζουν υπερδραστικότητα των αιμο-

πεταλίων αυτόματα γεννιάται το ερώτημα αν η αύξηση αυτή είναι πρωτογενής ή δευτερογενής απότοκος αγγειακής βλάβης. Για τον λόγο αυτό έγινε προσπάθεια επιλογής ασθενών χωρίς μακροαγγειοπάθεια για να τεκμηριωθεί όσο είναι δυνατόν η πρωτογενής αύξηση της β-TG και του PF4. Έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα των ενζύμων αυτών σε διαβητικούς χωρίς διαβητική αγγειοπάθεια^{15,16}. Στην μελέτη μας φαίνεται να σχετίζεται η υπερδραστικότητα των αιμοπεταλίων τόσο από την παρουσία της ΔΝΦ όσο και από την ύπαρξη ή όχι της υπερOK. Δεν γνωρίζουμε πλήρως τι σημαίνει η υπερδραστικότητα των αιμοπεταλίων στην παθογένεια της διαβητικής μακροαγγειοπάθειας και σε ποιο βαθμό. Όμως η συγκεκριμένη αυτή διαταραχή των αιμοπεταλίων σαφώς υποδηλώνει συμμετοχή στον παθογενετικό μηχανισμό της μακροαγγειοπάθειας των διαβητικών¹⁷ ιδιαίτερα δε στους διαβητικούς με ΔΝΦ.

Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής δείχνουν μία έντονη υπερδραστικότητα των αιμοπεταλίων στους διαβητικούς τύπου 1 με ΔΝΦ οι οποίοι εμφανίζουν και αυξημένα επίπεδα OK ενός παράγοντα που έχει ενοχοποιηθεί έτσι ή αλλιώς στην παθογένεια της μακροαγγειοπάθειας και με άλλους μηχανισμούς. Δεν παύει όμως η ανάγκη για προοπτικές μελέτες με μεγάλο αριθμό ασθενών και σε βάθος χρόνου οι οποίες θα συχετίζουν την παρουσία αγγειακής βλάβης και με άλλους παράγοντες κινδύνου.

Summary

Repanta E, Skaragkas G, Goutkidou S, Papazoglou N, Georgakopoulou E. The influence of homocysteine in the platelet function in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. Hellen Diabetol Chron 2003; 1: 59 - 62.

To evaluate the possibility of platelet dysfunction by the presence of homocysteine in patients with type 1 diabetes mellitus with diabetic nephropathy, we measured homocysteine, β-thromboglobulin and platelet factor 4 plasma levels in 35 patients with type 1 diabetes mellitus (1st group included 12 patients

who had AER <30 mg/24h, 2nd group 15 patients who had AER: 30-300 mg/24h, 3rd group 8 patients who had AER >300 mg/24h). 35 healthy subjects were matched to patients with type 1 diabetes mellitus for age and sex. Homocysteine ($\mu\text{mol/l}$), β -thromboglobulin (IU/ml) and platelet factor 4 (IU/ml) plasma levels were for the 1st group 7.6 ± 3.95 , 22.2 ± 5.54 , 2.3 ± 0.11 , for the 2nd group 12 ± 4.58 , 26.8 ± 12.16 , 2.65 ± 0.14 , for the 3rd group 19 ± 5.77 , 96.8 ± 10.7 , 5.3 ± 0.92 and for the control group 6.9 ± 2.96 , 22.8 ± 4.8 and 2.2 ± 0.1 respectively. There is a statistically significant difference in β -thromboglobulin plasma levels between diabetics with macro- and microalbuminuria ($p < 0.001$) and the control group and in platelet factor 4 plasma levels between diabetics with macro- (0.001) and microalbuminuria ($p < 0.01$) and the control group too. The elevated homocysteine plasma levels that have been found in type 1 diabetics influence the platelet function which results to the elevated β -thromboglobulin and platelet factor 4 plasma levels.

Βιβλιογραφία

1. Deckert T, Kofoedd-Enevoldsen A, Boerch-Johnsen K, et al. Microalbuminuria. Implications for micro- and macrovascular disease. *Diabetes Care* 1992; 9: 1181-91.
2. Jensen T, Stender S, Deckert T. Abnormalities in plasma concentrations of lipoproteins and fibrinogen in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with increased urinary albumin excretion. *Diabetologia* 1988; 31: 142-5.
3. Massent J, Elliott TG, Jarrett RJ, et al. The prognostic significance of microalbuminuria in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 23-year follow up study. *Kidney Int* 1992; 41: 936-9.
4. Borch-Johnsen K, Kreiner S. Proteinuria: value as a predictor of cardiovascular mortality in insulin-dependent diabetes mellitus. *BMJ* 1987; 294: 1651-4.
5. Jensen T, Borch-Johnsen K, Kofoed-Enevoldsen A, et al. Coronary heart disease in young type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with and without diabetic nephropathy: incidence and risk factors. *Diabetologia* 1987; 30: 144-8.
6. Mattock M, Morrish N, Viberti GC, et al. Prospective study of microalbuminuria as predictor of mortality in NIDDM. *Diabetes* 1992; 41: 735-41.
7. Miettinen H, Haffner SM, Lehto S, et al. Proteinuria predicts stroke and other atherosclerotic vascular disease events in nondiabetic and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Stroke* 1996; 27: 2033-9.
8. Kaplan KL, Owen J. Plasma levels of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vivo. *Blood* 1981; 57: 199-202.
9. Μακρής Π. β -θρομβογλοβουλίνη. Στο: Αιμόσταση-Φυσιολογία 1994: 114.
10. Paulus JM, Aster RH. Clinical evaluation of thrombokinetics. In Williams WJ, Beutler E, Ersslev AJ, Lichtman MA. Hematology. International edition 1991: 1260-6.
11. Μακρής Π. Αιμοπεταλιακός παράγων 4. Στο: Αιμόσταση-Φυσιολογία. 1994: 113.
12. Files JC, Malpass TW, Yee KE, et al. Studies of human platelet a-granule release in vivo. *Blood* 1981; 10: 186-94.
13. Packham MA, Mustard JF. The role of platelets in the development and complications of atherosclerosis. *Sem Hematol* 1986; 23: 8-26.
14. Jensen T, Bjerre-Knudsen T, Feldt-Rasmussen B, et al. Features of endothelial dysfunction in early diabetic nephropathy. *Lancet* 1989; 1: 461-3.
15. Ιωαννίδου-Παπαγιαννάκη ΚΒ, Χαράλαμπίδου-Βρανίτσα Σ, Κλωνιζάκης Ι, Κονκουρής Α. Λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων στους διαβητικούς με ή χωρίς αγγειακές αλλοιώσεις. *Γάληνός* 1988; 30: 467-72.
16. Ek I, Thunell S, Blomback M. Enhanced in vivo platelet activation in diabetes mellitus. *Scand J Haematol* 1982; 29: 185-191.
17. Gruden G, Cavallo-Perin P, Romagnoli R, et al. Plasma beta-thromboglobulin and factor 4 not increased in insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Acta Diabetol* 1994; 31: 130-2.

Λέξεις κλειδιά:

Ζακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1
Αιμοπετάλια
Ομοκυστεΐνη

Key words:

Diabetes type 1
Platelets
Homocysteine