

Δείκτες φλεγμονής και ενεργοποίησης των ποδοκυττάρων σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και διαβητική νεφροπάθεια

Ι.Θ. Λαμπροπούλου¹
Μ. Στάγκου¹
Π. Σαραφίδης¹
Π. Γιαμαλής¹
Ι. Τσουχνιάς¹
Τ. Διδάγγελος²
Α. Παπαγιάννη¹

Περίληψη

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας μελέτης χρονικής στιγμής ήταν η διερεύνηση του ρόλου της οδού του TNF-α και της ενεργοποίησης των ποδοκυττάρων στην παθογένεια και εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας και των πιθανών συσχετίσεών τους με την λευκωματουρία και την έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Εκτιμήθηκαν οι πιθανές συσχετίσεις βιοδεικτών φλεγμονής και ενεργοποίησης των ποδοκυττάρων με άλλες μικρο- και μακροαγγειακές επιπλοκές του ΣΔτ2.

Υλικό – Μέθοδοι: Στη μελέτη εντάχθηκαν 82 ασθενείς με ΣΔτ2. Η βαρύτητα της ΔΝ εκτιμήθηκε με βάση τις τιμές του λόγου λευκωμάτινη/κρεατινίνη ούρων (ACR, μg/mg). Η διαβητική νευροπάθεια αξιολογήθηκε με το ερωτηματολόγιο MNSI (Michigan Neuropathy Screening Instrument) και η ύπαρξη διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας με βυθοσκόπηση. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του TNF-α στα ούρα και των μορίων TNF-α, TNF-R1 και TNF-R2, CD28, B7-1 και CTLA-4 στον ορό έγινε με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA) στο Ερευνητικό Εργαστήριο της Μονάδας Μελέτης Νεφρικών Νοσημάτων της Νεφρολογικής Κλινικής του ΑΠΘ, στο «Ίπποκράτειο» Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης. Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού IBM SPSS 23. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες, ανάλογα με τη βαρύτητα της λευκωματουρίας. Ομάδα I (ACR <30 μg/mg), Ομάδα II (ACR 30-300 μg/mg), Ομάδα III (ACR >300 μg/mg).

Αποτελέσματα: Οι τρεις ομάδες διέφεραν σημαντικά στα επίπεδα των μορίων TNF-α στα ούρα ($p < 0,001$), TNF-R1 ($p < 0,001$), TNF-R2 ($p < 0,001$), CTLA-4 ($p < 0,001$) και CD28 ($p = 0,034$) στον ορό. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση ανεξάρτητοι παράγοντες που συσχετίστηκαν με το ACR ήταν ο TNF-R1 ($p = 0,003$) και ο TNF-R2 ($p = 0,0012$) στον ορό και ο TNF-α στα ούρα ($p = 0,015$).

Συμπεράσματα: Συμπερασματικά, η μελέτη μας έδειξε για πρώτη φορά τη σημασία της ενεργοποίησης της σηματοδοτικής οδού του TNF-α και των ποδοκυττάρων από τα αρχικά στάδια της διαβητικής νεφροπάθειας. Οι παραπάνω μηχανισμοί φαίνεται ότι δρουν συνεργικά στην ανάπτυξη έκδηλης λευκωματουρίας και στην έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας.

¹ Α΄ Νεφρολογική Κλινική ΑΠΘ, ΓΝΘ «Ίπποκράτειο»

² Διαβητολογικό Κέντρο, Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική ΑΠΘ, ΠΓΝΘ ΑΧΕΠΑ

Εισαγωγή

Η διαβητική νεφροπάθεια (ΔΝ) αποτελεί μείζονα μικροαγγειακή επιπλοκή του σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ) και κύρια αιτία αυξημένης νοσηρότητας και θνητότητας στους διαβητικούς ασθενείς.^{1,2} Η παθογένειά της είναι πολυπαραγοντική και περιλαμβάνει μεταβολικούς και αιμοδυναμικούς μηχανισμούς που ρυθμίζονται από γονιδιακούς παράγοντες και την επίδραση του περιβάλλοντος.^{3,4} Πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν τον σημαντικό ρόλο της χρόνιας υποκλινικής φλεγμονής και της ενεργοποίησης των ποδοκυττάρων στην παθογένεια και την εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας μέσω της επίδρασης των παραπάνω μηχανισμών.⁵

Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α), που αποτελεί πλειοτρόπο κυτταροκίνη, και οι υποδοχείς του 1 και 2 (TNF-R1 και TNF-R2) είναι σημαντικοί μεσολαβητές της χρόνιας φλεγμονής.⁶ Επάγουν σηματοδοτικά μονοπάτια (MAPK, NF-kB) και μεταγραφικούς παράγοντες, διεγείρουν την απελευθέρωση άλλων κυτταροκινών, πρωτεϊνών οξειάς φάσης, αυξητικών παραγόντων και μορίων προσκόλλησης στον νεφρό, οδηγώντας με τον τρόπο αυτό στην ανάπτυξη σπειραματοσκλήρυνσης και διαμεσοσωληναριακής ίνωσης.^{5,7-10} Στη διαβητική νεφροπάθεια τα επίπεδα του TNF-α και των υποδοχέων του είναι αυξημένα στον ορό και ο ρόλος τους στη νεφρική λειτουργία είναι αναγνωρισμένος. Δεν έχει αποσαφηνιστεί ο ρόλος των μορίων αυτών στα πρώιμα στάδια της διαβητικής νεφροπάθειας, όταν υπάρχει μικρού βαθμού λευκωματουρία.

Τα ποδοκύτταρα είναι τελικά διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα της σπειραματικής βασικής μεμβράνης. Πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν τον ρόλο τους ως ανοσοϊκανά κύτταρα (immune like cells), καθώς φαίνεται ότι σε φλεγμονώδεις καταστάσεις εκφράζουν τα ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα (human leukocyte antigen, HLA) τάξης I και II¹¹ και το συνδιεγερτικό μόριο B7-1. Η ενεργοποίηση των ποδοκυττάρων προϋποθέτει ένα πρωταρχικό σήμα που προέρχεται από την παρουσίαση των μορίων τάξης II του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC) και ένα μη ειδικό σήμα που επάγεται από την αλληλεπίδραση ανάμεσα στο B7-1, με το CD28 ή με το CTLA-4. Τα μόρια αυτά εκφράζονται στα T λεμφοκύτταρα και στην πρώτη περίπτωση προκύπτει ενεργοποίηση των ποδοκυττάρων, ενώ

στη δεύτερη καταστολή τους.^{12,13} Σε ορισμένες μελέτες έχει αναφερθεί αυξημένη έκφραση B7-1 σε ασθενείς με διαβητική νεφροπάθεια, με αντικρουόμενα ορισμένες φορές αποτελέσματα.¹³⁻¹⁶

Σκοπός της μελέτης μας ήταν η διερεύνηση του ρόλου της σηματοδοτικής οδού του TNF-α και της ενεργοποίησης των ποδοκυττάρων στα πρώιμα και προχωρημένα στάδια της διαβητικής νεφροπάθειας και οι πιθανές συσχετίσεις με τη λευκωματουρία και την έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς με ΣΔτ2.

Υλικό – Μέθοδοι

Στη μελέτη εντάχθηκαν 82 ασθενείς με ΣΔτ2 που παρακολουθούνταν στα Εξωτερικά Ιατρεία της Νεφρολογικής Κλινικής του ΑΠΘ του «Ιπποκράτειου» Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης και στα Διαβητολογικά Ιατρεία της Α΄ Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης ΑΧΕΠΑ.

Έγινε καταγραφή των δημογραφικών, ανθρωπομετρικών, κλινικών, και εργαστηριακών παραμέτρων καθώς και της χορηγούμενης φαρμακευτικής αγωγής. Αξιολογήθηκε η παρουσία μικροαγγειακών επιπλοκών, συμπεριλαμβανομένης της διαβητικής νεφροπάθειας, διαβητικής νευροπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας. Η βαρύτητα της ΔΝ εκτιμήθηκε με τον λόγο λευκωματίνης προς κρεατινίνη ούρων (ACR), η ύπαρξη διαβητικής νευροπάθειας με βάση το πρωτόκολλο Michigan Neuropathy Screening Instrument (MNSI), ενώ της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας με βυθοσκόπηση, κατά την είσοδο στη μελέτη.

Η εκπόνηση της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιστημονική Επιτροπή των νοσοκομείων και οι ασθενείς κατέθεσαν έγγραφη συγκατάθεση πριν την ένταξή τους.

Ορισμοί: Η καρδιαγγειακή νόσος ορίστηκε από την ύπαρξη ιστορικού στεφανιαίας νόσου (εμφράγματος μυοκαρδίου ή επαναγγείωσης των στεφανιαίων αγγείων), αγγειακής εγκεφαλικής νόσου, περιφερικής αρτηριακής νόσου και νόσου της αορτής. Ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ) υπολογίστηκε ως ο λόγος του βάρους σώματος σε χιλιόγραμμα (kg) προς το τετράγωνο του ύψους σε μέτρα (m). Ο εκτιμώμενος ρυθμός σπειραματικής διήθησης (eGFR) υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση CKD-EPI και εκφράστηκε σε mL/min/1,73 m². Επίπεδα

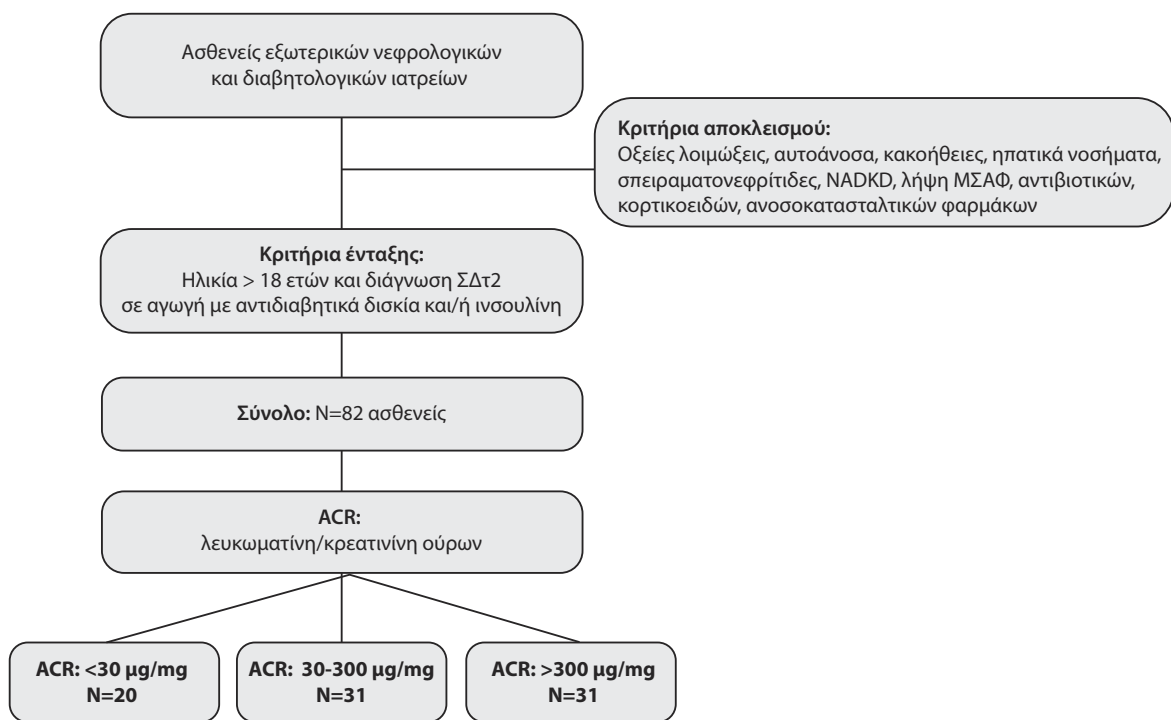
eGFR < 60 mL/min/1,73 m² θεωρήθηκαν ενδεικτικά χρόνιας νεφρικής νόσου. Με τη βοήθεια υδροαγυρικού μανομέτρου και μετά από πεντάλεπτη ανάπαυση των ασθενών μετρήθηκε η συστολική και η διαστολική αρτηριακή πίεση τρεις διαδοχικές φορές, με τους ασθενείς σε ύπτια θέση. Η μέση αρτηριακή πίεση (ΜΑΠ) υπολογίστηκε με την εξίσωση: $ΜΑΠ = ΔΑΠ + (ΣΑΠ - ΔΑΠ) / 3$. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του 2018 της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Υπέρτασης ως αρτηριακή υπέρταση ορίστηκε η ΣΑΠ ≥ 140 mmHg ή/και η ΔΑΠ ≥ 90 mmHg ή/και η συστηματική λήψη αντιυπερτασικής αγωγής. Κάπνισμα θεωρήθηκε η ενεργός χρήση καπνού ή η χρήση του μέχρι και διάστημα έξι μηνών πριν από την ένταξη στη μελέτη.

Ο λόγος ACR < 30 μg/mg ορίστηκε ως νορμολευκωματουρία, ACR = 30-300 μg/mg ως μετρίου βαθμού λευκωματουρία (μικρολευκωματουρία) και ACR > 300 μg/mg ως σοβαρού βαθμού λευκωματουρία (μακρολευκωματουρία). Οι ασθενείς διαρέθηκαν σε τρεις ομάδες, Ομάδα 1: ασθενείς με ΣΔτ2 χωρίς λευκωματουρία, οι οποίοι ορίστηκαν ως νορμολευκωματουρικοί, Ομάδα 2: ασθενείς με ΣΔτ2 με μετρίου βαθμού λευκωματουρία και Ομάδα 3: ασθενείς με ΣΔτ2 και σοβαρή λευκωματουρία.

Κριτήρια ένταξης-αποκλεισμού: Κριτήρια

ένταξης ήταν: ηλικία άνω των 18 ετών και διάγνωση ΣΔτ2 σε αγωγή με αντιδιαβητικά δισκία και/ή ινσουλίνη. Κριτήρια αποκλεισμού: ασθενείς με οξεία ή πρόσφατη λοίμωξη, χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα, ηπατική νόσο, αυτοάνοσα και κακοήθη νοσήματα, προκειμένου να αποφευχθεί η επίδραση των παραπάνω παθολογικών καταστάσεων στην παραγωγή κυτταροκινών. Επίσης, ασθενείς με μικρο- ή μακροσκοπική αιματοουρία, ενεργό ίζημα ούρων ή με νεφρωσικό σύνδρομο, το οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί σε μη διαβητική νεφρική νόσο, και ασθενείς στους οποίους, μετά από βιοψία νεφρού, διαπιστώθηκε συνυπάρχον σπειραματικό νόσημα. Αποκλείστηκαν ασθενείς με Νορμολευκωματουρική Διαβητική Νεφρική Νόσο (Non Albuminuric Diabetic Kidney Disease, NADKD) καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι η τελευταία διαφέρει από τη ΔΝ όσον αφορά τους παθογενετικούς μηχανισμούς και την έκβαση. Τέλος, ασθενείς που βρίσκονταν σε αγωγή με αντιβιοτικά ή ανοσοκατασταλτικά, κορτικοστεροειδή και μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα κατά την ένταξη και για χρονικό διάστημα τουλάχιστον δύο μηνών πριν την ένταξη στη μελέτη.

Παρακάτω δίνεται σχηματικά το διάγραμμα στρατολόγησης των ασθενών στη μελέτη (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Διάγραμμα στρατολόγησης ασθενών στη μελέτη.

Μέθοδοι: Οι αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις έγιναν με τις συνήθεις τεχνικές και με τη χρήση αυτόματου αναλυτή (Olympus AU 560, Hamburg, Germany) στο εργαστήριο του ΓΝΘ «Ιπποκράτειο». Τα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) προσδιορίζονταν με υψηλής ευαισθησίας νεφελομετρία και οι φυσιολογικές τιμές ήταν $<0,8$ mg/dL.

Από τους ασθενείς λαμβανόταν δείγμα από την πρώτη πρωινή ούρηση, το οποίο και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα δοχεία. Ποσότητα ούρων 10 ml υποβαλλόταν σε φυγοκέντρηση στις 1.500 στροφές/min για 10 min, ακολουθούσε λήψη του υπερκείμενου, διαχωρισμός και αποθήκευση στους -80°C μέχρι τον προσδιορισμό του TNF- α . Τα ίδια δείγματα χρησιμοποιούνταν για καλλιέργεια και για τη μέτρηση λευκωματίνης και κρεατινίνης και τον υπολογισμό του πηλίκου ACR ($\mu\text{g}/\text{mg}$). Η κάθε μέτρηση επαναλαμβάνόταν με τον ίδιο τρόπο συνολικά τρεις φορές, σε χρονικό διάστημα τριών μηνών και χρησιμοποιούνταν ο μέσος όρος των τιμών. Δείγμα ορού υποβαλλόταν σε φυγοκέντρηση αμέσως μετά την πήξη του (1.500 στροφές/min για χρονικό διάστημα 10 min), ακολουθούσε λήψη του υπερκείμενου, διαχωρισμός και αποθήκευση στους -80°C μέχρι την εφαρμογή των μεθόδων μέτρησης.

Για την εκτίμηση της συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης αξιολογήθηκαν τα επίπεδα του TNF- α και των διαλυτών υποδοχέων του (TNF-R1, TNF-R2) στον ορό, ενώ, ως δείκτης της ενδονεφρικής ενεργοποίησης της φλεγμονώδους αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα του TNF- α στα ούρα. Για την αξιολόγηση της ανοσιακής απάντησης προσδιορίστηκαν στον ορό τα διαλυτά μόρια CD28, B7-1 και CTLA-4. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του TNF- α στα ούρα και των μορίων TNF- α , TNF-R1 και TNF-R2 στον ορό έγινε με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA) με τη χρησιμοποίηση εμπορικά διαθέσιμων αντιδραστηρίων [Quantikine high-sensitivity human TNF- α , human TNF-R1/TNFRSF1A and human TNFR2/TNFRSF1B, (Research & Diagnostic Systems Europe, Ltd, Abingdon, UK)]. Ο TNF- α εκφραζόταν ως pg/mg κρεατινίνης ούρων προκειμένου να γίνει διόρθωση για διαφορές στη συμπύκνωση των ούρων. Τα μόρια CD28, B7-1 και CTLA-4 στον ορό επίσης προσδιορίστηκαν με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA) με

τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντιδραστηρίων [Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay for quantitative detection of Human CD28 (Biotin) and CTLA-4 (Novus Biologicals, Abingdon, UK) και Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay for quantitative detection of B7-1 (Abcam PLC, Cambridge, UK)]. Όλες οι μετρήσεις των δεικτών ενεργοποίησης της φλεγμονώδους και ανοσιακής απάντησης πραγματοποιήθηκαν στο Ερευνητικό Εργαστήριο Νεφρικών Νοσημάτων της Νεφρολογικής Κλινικής του ΑΠΘ στο ΓΝΘ «Ιπποκράτειο».

Στατιστική ανάλυση: Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού IBM SPSS 23, και η τιμή $p < 0,05$ θεωρήθηκε ως όριο στατιστικής σημαντικότητας.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (mean \pm standard deviation), ως διάμεση τιμή και εύρος τιμών (median, range), ή σε αριθμό ασθενών επί τοις εκατό. Οι διαφορές των μεταβλητών ανάμεσα στις τρεις ομάδες εκτιμήθηκαν με τις δοκιμασίες ANOVA ή Kruskal-Wallis. Για τη σύγκριση δεδομένων δύο ποιοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Pearson χ^2 . Για τον υπολογισμό των διαφορών μεταξύ των μέσων όρων σε δύο ανεξάρτητα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Student's-test για τις μεταβλητές με κανονική κατανομή και το Mann-Whitney U test για τις μεταβλητές με μη κανονική κατανομή. Οι συσχετίσεις έγιναν με τον συντελεστή Pearson και Spearman. Με την πολυπαραγοντική ανάλυση και τη μέθοδο enter εξετάστηκε η επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στην τιμή της λευκωματινουρίας.

Τέλος, η διωνυμική λογιστική παλινδρόμηση χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθούν οι φλεγμονώδεις και ανοσολογικοί βιοδείκτες ως προγνωστικοί παράγοντες για την ανάπτυξη λευκωματουρίας, χρόνιας νεφρικής νόσου, μικρο- και μακροαγγειακών επιπλοκών. Υπολογίστηκε ο λόγος πιθανοτήτων (OR) με 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

Αποτελέσματα

Τα δημογραφικά, ανθρωπομετρικά, κλινικά χαρακτηριστικά των 82 ασθενών της μελέτης και η φαρμακευτική αγωγή που ελάμβαναν απεικονίζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Δημογραφικά, ανθρωπομετρικά και κλινικά χαρακτηριστικά και φαρμακευτική αγωγή των 82 ασθενών της μελέτης με ΣΔ τύπου 2.

Ηλικία (έτη)	69,5 (56-78)
Φύλο (άρρεν/θήλυ) (%)	39/43 (47,6%/52,4%)
Διάρκεια σακχαρώδη διαβήτη (έτη)	16,09 ± 8,3
Δείκτης μάζας σώματος (kg/m ²)	26,6 (22,1-52)
ΜΑΠ (mmHg)	103,33 (81,6-120)
ΣΑΠ (mmHg)	142,5 (110-170)
ΔΑΠ (mmHg)	80 (60-110)
Αρτηριακή υπέρταση	73 (89%)
Κάπνισμα	15 (18,3%)
Αμφιβληστροειδοπάθεια	46 (56,1%)
Καρδιαγγειακή νόσος	39 (47,6%)
Διαβητική νευροπάθεια	46 (56,1%)
Φαρμακευτική αγωγή	
Στατίνες	68 (82,6%)
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	24 (29,3%)
Κλοπιδογρέλη	30 (36,6%)
αΜΕΑ/ΑΤ	60 (73%)
Αντιδιαβητικά δισκία	41 (50%)
Ινσουλίνη	13 (15,9%)
Συνδυασμός (δισκία και ινσουλίνη)	28 (34,1%)

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση, διάμεση τιμή και εύρος τιμών ή αριθμός ασθενών (%) κατά περίπτωση. ΜΑΠ: Μέση Αρτηριακή Πίεση, ΣΑΠ: Συστολική Αρτηριακή Πίεση, ΔΑΠ: Διαστολική Αρτηριακή Πίεση, αΜΕΑ: αναστολέας Μετατρεπτικού Ενζύμου Αγγειοτενσίνης, ΑΤ: Αποκλειστές των υποδοχέων Αγγειοτενσίνης.

Συσχετίσεις ACR με κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους

Ο βαθμός της λευκωματουρίας (ACR) εμφάνιζε ισχυρή αρνητική συσχέτιση με τον eGFR ($r=-0,613$, $p<0,001$) και θετική συσχέτιση με τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης ($r=0,42$, $p<0,001$), της LDL ($r=0,32$, $p=0,004$) και HDL χοληστερόλης ($r=0,24$, $p=0,035$) και της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης ($r=0,27$, $p=0,022$). Ο ACR ήταν σημαντικά μεγαλύτερος στους ασθενείς με υπέρταση σε σύγκριση με τους νορμοτασικούς [176,3 (4,3-7.201) μg/mg έναντι 15 (1,8-96,8) μg/mg, $p<0,001$] και με διαβητική νευροπάθεια σε σύγκριση με αυτούς χωρίς

[128 (4,1-7.201) μg/mg έναντι 125,5 (1,8-2.913) μg/mg, $p=0,02$].

Διαφορές σε κλινικά χαρακτηριστικά, εργαστηριακά ευρήματα και φαρμακευτική αγωγή μεταξύ των ασθενών με νορμολευκωματουρία, μετρίου βαθμού και σοβαρή λευκωματουρία

Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες, ανάλογα με τη βαρύτητα της λευκωματουρίας. Ομάδα Ι (νορμολευκωματουρία): $n=20$ (24,4%), Ομάδα ΙΙ (μετρίου βαθμού λευκωματουρία): $n=31$ (37,8%) και Ομάδα ΙΙΙ (σοβαρού βαθμού λευκωματουρία): $n=31$ (37,8%), αντίστοιχα.

Οι τρεις ομάδες διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ως προς τη διάρκεια του ΣΔ, την ύπαρξη αρτηριακής υπέρτασης ή αμφιβληστροειδοπάθειας, την επάρκεια ελέγχου του ΣΔ με βάση τα επίπεδα της HbA1c και τα επίπεδα της ΣΑΠ και του eGFR.

Σηματοδοτική οδός του TNF-α και δείκτες ενεργοποίησης των ποδοκυττάρων – Συσχέτιση με τη λευκωματουρία

Τα επίπεδα του TNF-α στα ούρα ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με μέτριο και σοβαρού βαθμού λευκωματουρία συγκριτικά με εκείνους με νορμολευκωματουρία ($p=0,004$ και $p<0,001$ αντίστοιχα). Οι TNF-R1 και TNF-R2 ήταν αυξημένοι στους ασθενείς με σοβαρού βαθμού συγκριτικά με αυτούς με νορμο- ή μέτριο βαθμού λευκωματουρία ($p=0,002$ και $p<0,001$ αντίστοιχα για τον TNF-R1, $p<0,001$ και $p<0,001$ αντίστοιχα για τον TNF-R2) (Σχήμα 1). Ο ACR συσχετιζόταν θετικά με τη CRP ($r=0,29$, $p=0,03$), τον TNF-α στα ούρα ($r=0,65$, $p<0,001$), τον TNF-R1 ($r=0,69$, $p<0,001$) και TNF-R2 ($r=0,61$, $p<0,001$) στον ορό.

Τα επίπεδα του CD28 στον ορό ήταν υψηλότερα στους ασθενείς με σοβαρού βαθμού λευκωματουρία συγκριτικά με εκείνους με μέτρια ($p=0,03$), ενώ ο CTLA-4 αυξανόταν ανάλογα με τη βαρύτητά της και διέφεραν μεταξύ των τριών ομάδων ($p=0,01$ νορμο- έναντι μέτριας λευκωματουρίας, $p<0,001$ μέτριας έναντι σοβαρής και $p<0,001$ νορμο- έναντι σοβαρής). (Πίνακας 1, Σχήμα 2).

Πίνακας 2. Δημογραφικά, ανθρωπομετρικά, κλινικά χαρακτηριστικά και φαρμακευτική αγωγή στις 3 ομάδες των 82 ασθενών με ΣΔτ2 της μελέτης.

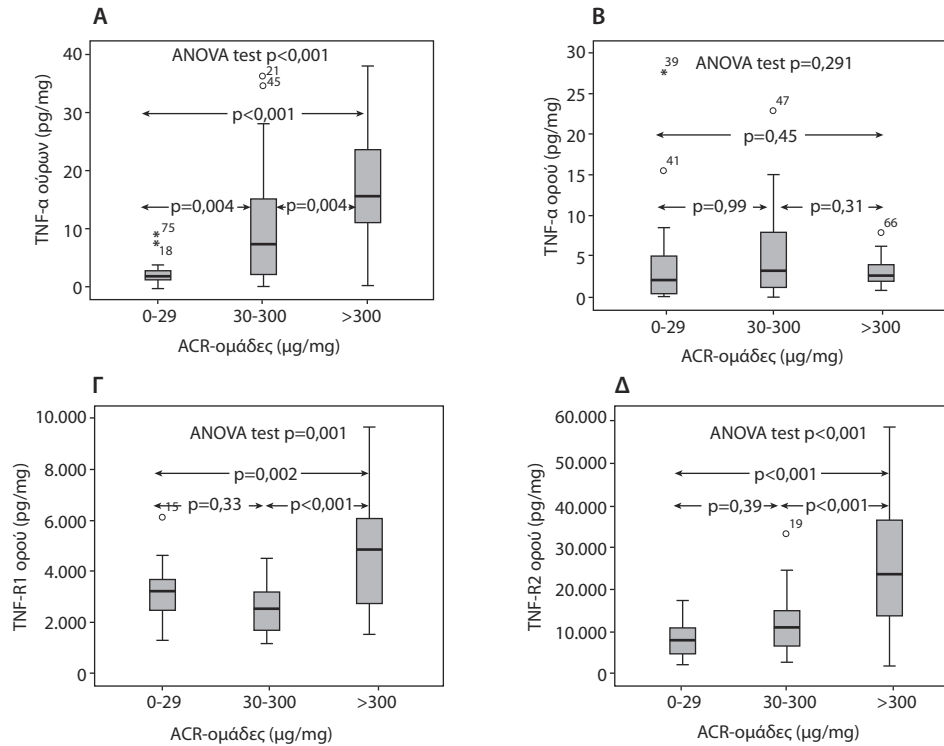
Παράμετρος	Όλοι οι ασθενείς (n=82)	Ομάδα I ACR<30 (n=20)	Ομάδα II ACR=30-300 (n=31)	Ομάδα III ACR>300 (n=31)	ANOVA P
Ηλικία (έτη)	69,5 (56-78)	67,60 (57-77)	69,68 (56-78)	69,84 (56-78)	0,340
Φύλο (άρρεν/θήλυ)	39/43	9/11	14/17	16/15	0,853
Διάρκεια ΣΔ (έτη)	16,09 ± 8,3	12,2 ± 8,33	18,94 ± 9,62*	15,74 ± 5,71	0,016
ΔΜΣ (kg/m ²)	26,6 (22,1-52)	27,07 (22,8-40,4)	27,78 (22,1-37,6)	30,24 (23,1-52)	0,089
ΜΑΠ (mmHg)	103,33 (81,6-120)	101,7 (86,7-115)	101,6 (81,7-120)	104,0 (81,6-116)	0,467
ΣΑΠ (mmHg)	142,5 (110-170)	137,5 ± 12,01^	139,83 ± 14,12	147,16 ± 13,28	0,028
ΔΑΠ (mmHg)	80 (60-110)	83,81 (70-100)	82,66 (67,5-110)	79,58 (60-100)	0,239
Αρτ/κή υπέρταση (%)	73 (89)	13/20 (65)^	29/31 (93,5)	31/31 (100)**	<0,001
Διαβ. αμφ/θεια (%)	48 (58,5)	6/14 (30)^	20/11 (64,5)	22/9 (71)	0,022
Καρδ/κή νόσος (%)	39 (47,6)	8/12 (40)	18/13 (58,1)	13/18 (41,9)	0,338
Διαβ. νευρ/θεια (%)	46 (56,1)	8/12 (40)	20/11 (64,5)	18/13 (58,1)	0,224
Στατίνες (%)	68 (82,6)	17/3 (85)	27/4 (87,1)	24/7 (77,4)	0,585
Ακετυλ/κό οξύ (%)	24 (29,3)	7/13 (35)	13/18 (41,9)	10/21 (32,3)	0,780
Κλοπιδογρέλη (%)	30 (36,6)	7/13 (35)	13/18 (41,9)	10/21 (32,3)	0,729
αΜΕΑ/ΑΤ (%)	60 (73)	11/9 (55)	26/5 (83,9)	23/8 (74,2)	0,076
HbA1c (%)	6,99 ± 0,86	6,59 ± 0,89§	7 ± 0,45	7,38 ± 1,11	0,013

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση, ως διάμεση τιμή και εύρος τιμών ή ως ποσοστό ασθενών (%) κατά περίπτωση. *p=0,01 νορμο- vs μέτρια, **p<0,001 νορμο- vs σοβαρή, ***p<0,001 σοβαρή vs μέτρια, ^p=0,04 νορμο- vs σοβαρή, ^^p=0,002 νορμο- vs μέτρια, ^^p=0,02 νορμο- vs σοβαρή, §p=0,009 νορμο- vs σοβαρή.

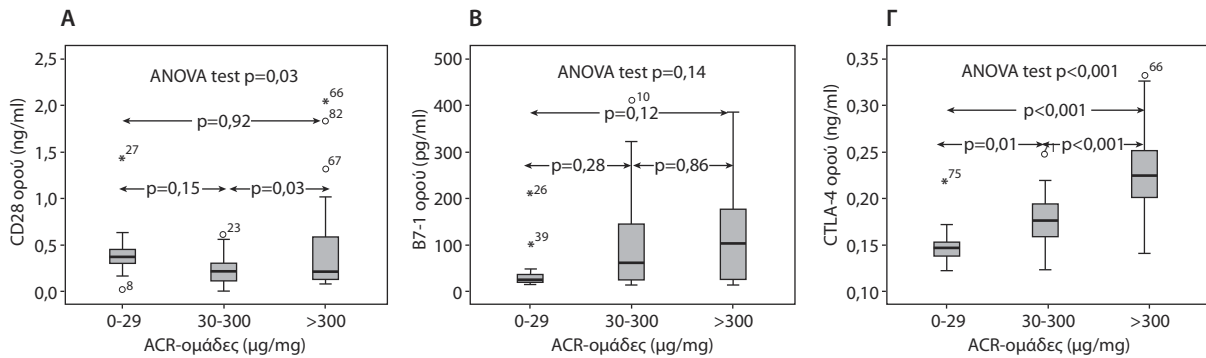
Πίνακας 3. Νεφρική λειτουργία, λευκωματουρία, δείκτες φλεγμονής και ενεργοποίησης των ποδοκυττάρων στις 3 ομάδες των 82 ασθενών της μελέτης.

Παράμετρος	Όλοι οι ασθενείς (n=82)	Ομάδα I ACR<30 (n=20)	Ομάδα II ACR=30-300 (n=31)	Ομάδα III ACR>300 (n=31)	ANOVA P
Ηλικία (έτη)	69,5 (56-78)	67,60 (57-77)	69,68 (56-78)	69,84 (56-78)	0,340
CRP (mg/dl)	0,54 (0,01-9,5)	0,36 (0,01-1,2)	1,53 (0,12-9,5)	2,45 (0,14-3,9)*	0,021
eGFR (ml/min/1,73 m ²)	57,65 ± 24,1	86,57 ± 21,35****	66,07 ± 22,55^^	48,77 ± 25,44**	<0,001
ACR (μg/mg)	125,9 (1,8-720,0)	13 (1,8-24,9)**	101,9 (31,7-242)^	2.452,9 (346-7201)	<0,001
TNF-α ορ. (pg/ml)	2,65 (0,12-28,06)	4,59 (0,13-28,06)	4,72 (0,16-23,06)	3,00 (0,86-7,95)	0,291
TNF-α ούρ. (pg/mg κρ)	9,51 (0,228-37,89)	2,78 (0,22-9,18)**	11,2 (0,61-36,1)***	18,66 (0,623-37,89)^	<0,001
TNF-R1 ορ. (pg/ml)	3.072,6 (1.190-9.747,69)	3.148,6 (1.336,1-6.297,6)^	2.525,9 (1.190-4.536,1)	4.670,1 (1.532,3-9.747,6)^	<0,001
TNF-R2 ορ. (pg/ml)	11.699,5 (1.975,3-58.364)	8.000,1 (2.181-17.264,5)**	12.149,6 (2.620-33.742)	25.608,6 (1.975,3-58.364)^	<0,001
CD28 ορ. (ng/ml)	0,26 (0,004-2,04)	0,4 (0,025-1,44)	0,22 (0,004-0,6)§	0,44 (0,08-2,04)	0,034
B7-1 ορ. (pg/ml)	63,4 (17-405,6)	50,8 (18,2-213,8)	105,26 (17-405,6)	119,5 (17,2-384,1)	0,145
CTLA-4 ορ. (ng/ml)	0,181 (0,122-0,328)	0,14 (0,12-0,21)§§	0,17 (0,12-0,24)	0,22 (0,14-0,32)***	<0,001

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση ή ως διάμεση τιμή και εύρος τιμών κατά περίπτωση. *p=0,01 νορμο- vs σοβαρή, **p<0,001 νορμο- vs σοβαρή, ***p=0,004 νορμο- vs μέτρια, ^p=0,004 μέτρια vs σοβαρή, ^^p=0,002 νορμο- vs σοβαρή, ^^p<0,001 μέτρια vs σοβαρή, §p=0,03 μέτρια vs σοβαρή, §§p=0,01 νορμο- vs μέτρια ****p=0,007 νορμο- vs μέτρια.



Σχήμα 1. Τιμές μορίων της οδού TNF-α στις τρεις ομάδες ασθενών, TNF-α ούρων (Α), TNF-α ορού (Β), TNF-R1 (Γ) και TNF-R2 (Δ).



Σχήμα 2. Τιμές μορίων ενεργοποίησης των ποδοκντάρων CD28 (Α), B7-1 (Β) και CTLA-4 (Γ) στις τρεις ομάδες ασθενών.

Σηματοδοτική οδός του TNF-α και δείκτες ενεργοποίησης των ποδοκντάρων – Συσχέτιση με τον βαθμό έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας

Ο eGFR είχε αρνητική συσχέτιση με τον TNF-α στα ούρα ($r=-0,49, p<0,001$), τον TNF-R1 στον ορό ($r=-0,49, p<0,001$) και τον TNF-R2 ($r=-0,478, p<0,001$) στον ορό. Τα επίπεδα του CTLA-4 στον ορό συσχετιζόνταν αρνητικά με τον eGFR ($r=-0,498, p<0,001$).

Πολυπαραγοντική ανάλυση

Η πολυπαραγοντική ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (multiple regression) έδειξε ότι η συσχέτιση της παρουσίας λευκωματουρίας (ACR) με τα επίπεδα του TNF-R1 ($\text{beta}=0,403, p=0,003$) και TNF-R2 ($\text{beta}=0,03, p=0,012$) στον ορό και τα επίπεδα του TNF-α στα ούρα ($\text{beta}=0,285, p=0,015$) παρέμεινε στατιστικά σημαντική. Οι μεταβλητές που μελετήθηκαν αρχικά μονοπαραγοντικά ήταν η ηλικία,

Πίνακας 4. Συσχέτιση δημογραφικών, ανθρωπομετρικών, κλινικών χαρακτηριστικών, φαρμακευτικής αγωγής, δεικτών φλεγμονής και ενεργοποίησης των ποδοκυττάρων με την παρουσία λευκοματουρίας > 30 µg/mg.

Παράμετρος	Μονοπαραγοντική ανάλυση	Πολυπαραγοντική ανάλυση	
	<i>p</i>	beta	<i>p</i>
Ηλικία	0,143		
Διάρκεια σακχαρώδη διαβήτη	0,020		
ΜΑΠ	0,588		
ΣΑΠ	0,102		
ΔΑΠ	0,271		
Αρτηριακή υπέρταση	0,001		
Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια	0,009		
Καρδιαγγειακή νόσος	0,438		
Διαβητική νευροπάθεια	0,100		
Στατίνες	0,777		
Ακετυλοσαλικυλικό οξύ	0,518		
Κλοπιδογρέλη	0,866		
αΜΕΑ/ΑΤ	0,040		
HbA1c	0,018		
eGFR	<0,001		
Ολική χοληστερόλη	0,676		
LDL χοληστερόλη	0,806		
HDL χοληστερόλη	0,137		
Τριγλυκερίδια	0,031		
Ινωδογόνο	0,289		
CRP	0,082		
TNF-α ορού	0,544		
TNF-α ούρων	0,001	0,285	0,015
TNF-R1	0,001	0,403	0,003
TNF-R2	0,004	0,03	0,012
CD28	0,424		
B7-1	0,076		
CTLA-4	<0,001		

ΜΑΠ: Μέση Αρτηριακή Πίεση, ΣΑΠ: Συστολική Αρτηριακή Πίεση, ΔΑΠ: Διαστολική Αρτηριακή Πίεση, αΜΕΑ/ΑΤ: αναστολέας Μετατρεπτικού Ενζύμου Αγγειοτενσίνης/Αποκλειστής των υποδοχέων Αγγειοτενσίνης, HbA1c: γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη A1c, eGFR: εκτιμώμενος ρυθμός σπειροματικής διήθησης, LDL: χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες, HDL: υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες, CRP: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, TNF-α: παράγοντας νέκρωσης όγκων-α, TNF-R1: υποδοχέας 1 του παράγοντα νέκρωσης όγκων, TNF-R2: υποδοχέας 2 του παράγοντα νέκρωσης όγκων, CD28: παράγοντας διαφοροποίησης 28, CTLA-4: πρωτεΐνη 4 σχετιζόμενη με τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα.

η διάρκεια του σακχαρώδη διαβήτη, η μέση αρτηριακή πίεση, η συστολική αρτηριακή πίεση, η διαστολική αρτηριακή πίεση, η ύπαρξη αρτηριακής υπέρτασης, διαβητικής νευροπάθειας, διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, καρδιαγγειακής νόσου, η λήψη στατινών, κλοπιδογρέλης, ακετυλοσαλικυλικού οξέος, αΜΕΑ/ΑΤ, τα επίπεδα της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης, ο eGFR, τα επίπεδα της LDL, HDL, ολικής χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων, το ινωδογόνο και η CRP στον ορό, οι TNF-α, TNF-R1, TNF-R2, CD28, B7-1 και CTLA-4 στον ορό και ο TNF-α στα ούρα. Από τις μεταβλητές αυτές, στο πολυπαραγοντικό μοντέλο εισήχθησαν με τη μέθοδο enter όσες είχαν τιμή $p < 0,1$ στη μονοπαραγοντική στατιστική ανάλυση (η διάρκεια του σακχαρώδη διαβήτη, η ύπαρξη αρτηριακής υπέρτασης, διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, η λήψη αΜΕΑ/ΑΤ, τα επίπεδα της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης, ο eGFR, τα τριγλυκερίδια, η CRP στον ορό, ο TNF-R1, TNF-R2, B7-1 και CTLA-4 στον ορό και ο TNF-α στα ούρα) και η συγγραμμικότητα μεταξύ τους ήταν $< 0,7$. Το R^2 για το πολυπαραγοντικό μοντέλο ήταν 0,69.

Συστηματικές μικρο- και μακροαγγειακές επιπλοκές του ΣΔ

Σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια οι ασθενείς με τη νόσο είχαν υψηλότερα επίπεδα CRP ($p=0,02$) όπως και TNF-α στα ούρα ($p=0,01$), και TNF-R2 στον ορό ($p=0,02$). Ακόμη, οι ασθενείς με διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια είχαν αυξημένα επίπεδα CTLA-4 στον ορό ($p=0,04$).

Σε σύγκριση με τους ασθενείς με διαβητική νευροπάθεια οι ασθενείς χωρίς τη νόσο είχαν αυξημένα επίπεδα CD28 ($p=0,04$) και ελαττωμένα επίπεδα TNF-α στον ορό ($p=0,02$). Η παρουσία καρδιαγγειακής νόσου, ως εκδήλωση μακροαγγειακών επιπλοκών του ΣΔ δεν συσχετιζόταν με τα επίπεδα της CRP ($p=0,56$) ή με τους παράγοντες της οδού του TNF-α, ή τους δείκτες ενεργοποίησης των ποδοκυττάρων.

Συσχετίσεις δεικτών φλεγμονής και ενεργοποίησης των ποδοκυττάρων

Παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση της συγκέντρωσης του CTLA-4 με τη CRP ($r=0,373$, $p=0,008$), τα επίπεδα του TNF-α στα ούρα ($r=0,379$, $p < 0,001$), τις τιμές TNF-R1 ($r=0,253$, $p=0,022$) και TNF-R2 στον ορό ($r=0,295$, $p=0,007$) καθώς και με τα επίπεδα του CD28 ($r=0,33$, $p=0,002$).

Συζήτηση

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου της φλεγμονής και της ενεργοποίησης των ποδοκυττάρων στην παθογένεια και εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας σε ασθενείς με ΣΔτ2.

Οι ασθενείς με μέτρια λευκωματουρία νοσούσαν από ΣΔ για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα συγκριτικά με τους ασθενείς με νορμολευκωματουρία, δεδομένο αναμενόμενο, καθώς η διάρκεια νόσησης από ΣΔ για περισσότερο από δέκα χρόνια αποτελεί καλά αποδεδειγμένο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη διαβητικής νεφροπάθειας.^{1,2} Η παρουσία σοβαρής λευκωματουρίας συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης και την ύπαρξη διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, αρτηριακής υπέρτασης και επιδεινωμένης νεφρικής λειτουργίας. Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια είναι γνωστό ότι στους ασθενείς με ΣΔτ2 συνήθως είτε προηγείται, είτε εκδηλώνεται ταυτόχρονα με την εμφάνιση σοβαρής λευκωματουρίας. Επιπλέον, η συσχέτιση της σοβαρής λευκωματουρίας με τον ανεπαρκή γλυκαιμικό έλεγχο και την αρτηριακή υπέρταση συμφωνεί με την τεκμηριωμένη γνώση ότι οι παράγοντες αυτοί είναι βασικές αιτίες πρόκλησης ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και οδηγούν στην ανάπτυξη σπειροματωσκήρυνσης.^{1,2}

Πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν τον σημαντικό ρόλο της φλεγμονής και της ενεργοποίησης των ποδοκυττάρων στην παθογένεια και την εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας. Η φλεγμονή ενεργοποιείται από τον συνδυασμό μεταβολικών, αιμοδυναμικών και βιοχημικών παραγόντων και επάγει τη νεφρική βλάβη μέσω πλήθους μηχανισμών, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η μετανάστευση μονοκυττάρων, ουδετερόφιλων και λεμφοκυττάρων, η συσσώρευση αιμοπεταλίων, η

ενεργοποίηση του συμπληρώματος και η ενεργοποίηση οδών κυτταρικής σηματοδότησης όπως η οδός της πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από το μιτογόνο p38 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK), η σηματοδοτική οδός JAK-STAT (JAK-STAT signalling pathway, JAK-STAT) και ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF-α).^{17,18}

Σύμφωνα με πρόσφατες αναφορές μόρια με φλεγμονώδη δράση, όπως η λιποπολυσακχαρίδη S (LPS) και η ιντερλευκίνη 1α (IL-1α), διεγείρουν την απελευθέρωση ποικίλων κυτταροκινών και χυμοκινών και αυξάνουν την παραγωγή του TNF-α καθώς και την έκφραση των υποδοχέων του, TNF-R1 και TNF-R2, τόσο από τα ενεργοποιημένα εγγενή νεφρικά κύτταρα όσο και από τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα-μακροφάγα. Ακόμη, διεγείρουν την απελευθέρωση άλλων κυτταροκινών, πρωτεϊνών οξείας φάσης και αυξητικών παραγόντων από παρακείμενα κύτταρα. Ο παράγοντας TNF-α προάγει την έκφραση μορίων προσκόλλησης, την προσκόλληση και μετανάστευση των φλεγμονωδών κυττάρων στον διάμεσο ιστό, μέσω του ενεργοποιημένου ενδοθηλίου, επάγοντας έτσι τη λευκωματουρία.^{7,9,19}

Στην παρούσα μελέτη, η βαρύτητα της λευκωματουρίας (ACR) συσχετιζόταν σημαντικά με τη CRP, τα επίπεδα του TNF-α στα ούρα και TNF-R2 στον ορό, λιγότερο με τον TNF-R1, αλλά όχι με τα επίπεδα του TNF-α στον ορό. Η απέκκριση TNF-α στα ούρα ήταν η μόνη παράμετρος που ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με μετρίου βαθμού λευκωματουρία, ενώ τα επίπεδα των CRP, TNF-R1 και TNF-R2 στον ορό παρουσίαζαν σημαντική αύξηση μόνο σε ασθενείς με σοβαρού βαθμού λευκωματουρία. Τα παραπάνω ευρήματα αποδεικνύουν την ενεργοποίηση της οδού του TNF-α σε πρώιμα στάδια της διαβητικής νεφροπάθειας, πριν από την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας, καθώς και τη συμμετοχή της παραπάνω οδού στην εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενη μελέτη μας στην οποία η απέκκριση του TNF-α στα ούρα ήταν η μοναδική παράμετρος που παρουσίαζε στατιστικά σημαντική αύξηση κατά τα αρχικά (πρώιμα) στάδια της διαβητικής νεφροπάθειας. Επιπρόσθετα τα επίπεδα του μορίου αλλά όχι του TNF-α στον ορό ή της CRP συσχετιζόνταν με τη

βαρύτητα της λευκωματουρίας.²⁰

Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, τα μόρια TNF-R1 και TNF-R2 στον ορό ήταν ανεξάρτητοι παράγοντες πρόκλησης λευκωματουρίας, πιθανά λόγω μεσαγγειακής υπερπλασίας συνεπεία του TNF-R1. Σε πρόσφατη μελέτη τα αυξημένα επίπεδα των TNF-R1 και TNF-R2 φάνηκε ότι επιταχύνουν την έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας χωρίς παρουσία σοβαρού βαθμού λευκωματουρίας, υποδηλώνοντας έτσι την ύπαρξη και άλλων παθογενετικών μηχανισμών.^{10,21-23} Πολλές μελέτες σε ασθενείς με ΣΔτ2 έχουν αναδείξει την προογνοστική αξία της ενεργοποίησης της οδού του TNF-α στην εξέλιξη σε χρόνια νεφρική νόσο (XNN) τελικού σταδίου.^{10,21,24-29} Τα δεδομένα είναι λιγότερα στα αρχικά στάδια της ΔΝ, όπου υπάρχει μετρίου βαθμού λευκωματουρία και η νεφρική λειτουργία είναι φυσιολογική. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, σε αυτό το στάδιο μόνο εύρημα είναι η αύξηση του TNF-α στα ούρα. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η απέκκριση του παράγοντα αυτού στα ούρα οφείλεται στην τοπική ενδονεφρική παραγωγή και ότι η σηματοδοτική οδός του TNF-α ενεργοποιείται ενδονεφρικά πριν από τη συστηματική κυκλοφορία, πιθανόν ως αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης αιμοδυναμικών και μεταβολικών παραγόντων. Η συστηματική φλεγμονώδης απάντηση φαίνεται ότι ενεργοποιείται αργότερα, καθώς η CRP και οι υποδοχείς TNF-R1, TNF-R2 αυξάνουν όταν πλέον υπάρχει σοβαρού βαθμού λευκωματουρία και έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας.

Ένα ακόμα νέο σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν η θετική συσχέτιση μεταξύ του TNF-α στα ούρα με το CTLA-4, το οποίο αποτελεί δείκτη της ενεργοποίησης των ποδοκυττάρων. Η πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ της οδού του TNF-α και κυρίως του TNF-R1 και των δεικτών ενεργοποίησης των ποδοκυττάρων στην εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας άρχισε να προσελκύει το ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, ωστόσο τα δεδομένα μέχρι σήμερα είναι μόνο πειραματικά και όχι κλινικά.³⁰⁻³³ Η T-κυτταρική ανοσία στη διαβητική νεφροπάθεια επάγεται συστηματικά αλλά και τοπικά-ενδονεφρικά ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του συστήματος MHC τάξης II στα ποδοκύτταρα, με τη μεσολάβηση του μορίου B7-1, το οποίο και επάγει τη βλάβη των ποδοκυττάρων.³²⁻³⁴ Η αλ-

ληλεπίδραση του B7-1, που εκφράζεται στα ποδοκύτταρα, με το CD28 ή με το CTLA-4, που εκφράζονται στα T-λεμφοκύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων στην πρώτη περίπτωση και την καταστολή τους στη δεύτερη.

Στη διαβητική νεφροπάθεια μελέτες έδειξαν συσχέτιση των επιπέδων CD28 στον ορό με τη βαρύτητα της λευκωματουρίας, καθώς και με την εξέλιξη σε XNN τελικού σταδίου.²⁷ Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τα επίπεδα του CD28 στον ορό ήταν αυξημένα, κυρίως όμως σε ασθενείς με σοβαρού βαθμού λευκωματουρία και έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Αντίθετα, τα επίπεδα του CTLA-4 στον ορό ήταν αυξημένα σε ασθενείς τόσο με σοβαρή όσο και με μέτρια λευκωματουρία, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων των ασθενών στα επίπεδα του μορίου B7-1. Τα επίπεδα του CTLA-4 είχαν στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση με τον eGFR. Το CTLA-4 υπάρχει σε δύο μορφές, τη διαμεμβρανική μορφή του CTLA-4 (transmembrane isoform, TmCTLA-4) που βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια και την εκκρινόμενη-διαλυτή μορφή (secreted soluble form, sCTLA-4). Το TmCTLA-4 εκφράζεται από τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα και είναι απαραίτητο για την καταστολή της ανοσιακής απάντησης ενώ, αντίθετα, το sCTLA-4, παρ' όλο που είναι μόριο διαφορετικό στη δομή του, έχει τη δυνατότητα να συνδέει το μόριο B7-1 και να επάγει την ανοσιακή απόκριση.³³⁻³⁴ Η σύνδεση του B7-1 με το sCTLA-4 αφενός αναστέλλει την πρώιμη ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων καθώς ανταγωνίζεται την αλληλεπίδραση του μορίου B7-1 με το συνδιεγερτικό μόριο CD28, αφετέρου μειώνει το ανασταλτικό σήμα στα T-λεμφοκύτταρα, καθώς ανταγωνίζεται τη σύνδεση του B7-1 με το TmCTLA-4, και επομένως ευνοεί τη συνέχιση της δραστηριότητας των ήδη ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων. Ας σημειωθεί ότι τα επίπεδα του sCTLA-4 βρέθηκαν αυξημένα σε νοσήματα που χαρακτηρίζονται από διαταραχές της ανοσιακής απόκρισης, όπως στον συστηματικό ερυθματώδη λύκο, στην αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα και σε διάφορους τύπους νεοπλασιών.³⁴

Η μελέτη μας είναι η πρώτη σε ασθενείς με ΣΔτ2 στην οποία διερευνήθηκαν τα επίπεδα στον ορό μορίων ενεργοποίησης των ποδοκυττάρων και

η πιθανή συσχέτισή τους με την παρουσία διαβητικής νεφροπάθειας, τον βαθμό της λευκωματουρίας και την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας. Τα σημαντικότερα ευρήματα ήταν ότι τα επίπεδα του sCTLA-4 στον ορό ήταν αυξημένα ακόμη και σε μετρίου βαθμού λευκωματουρία (ACR>30), αποτελούσαν ανεξάρτητο παράγοντα παρουσίας λευκωματουρίας και συσχετιζονταν με τη βαρύτητά της. Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε αρνητική συσχέτιση των επιπέδων του sCTLA-4 με τον eGFR, εύρημα το οποίο υποδηλώνει την επίδραση της κυτταρικής ανοσίας στην εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής νόσου. Δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής δεδομένα στη βιβλιογραφία που να αφορούν στην επίδραση του sCTLA-4 στην εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας. Παρ' όλα αυτά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας φαίνεται ότι το μόριο sCTLA-4 ενεργοποιείται στα πρώιμα στάδια της νόσου και συμμετέχει στην έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας που χαρακτηρίζει την προχωρημένη διαβητική νεφροπάθεια, δρώντας με τρόπο παρόμοιο με αυτό που συναντούμε σε συστηματικά νοσήματα, όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος και η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, στα οποία τα επίπεδα του sCTLA-4 βρέθηκαν επίσης αυξημένα.³³⁻³⁴

Μεθοδολογικός περιορισμός της μελέτης μας είναι το σχετικά μικρό μέγεθος του δείγματος και ο σχεδιασμός ως συγχρονική μελέτη ο οποίος δεν επιτρέπει την ανάδειξη αιτιολογικών συσχετίσεων. Απαιτούνται προοπτικές μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών προκειμένου να εξασφαλιστεί η μεγαλύτερη εγκυρότητα των αποτελεσμάτων.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν τον σημαντικό ρόλο της σηματοδοτικής οδού του TNF- α και των δεικτών ενεργοποίησης των ποδοκυττάρων στα αρχικά στάδια της διαβητικής νεφροπάθειας. Οι παραπάνω μηχανισμοί συμμετέχουν στην ανάπτυξη μικρού και μετρίου βαθμού λευκωματουρίας και δρουν πιθανόν συνεργικά στην ανάπτυξη σοβαρού βαθμού λευκωματουρίας και στην έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Ο TNF- α και οι υποδοχείς TNF-R1 και TNF-R2 στον ορό, ως δείκτες φλεγμονής, και τα μόρια sCTLA-4 και CD28, ως δείκτες ενεργοποίησης των ποδοκυττάρων, φαίνεται ότι διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεια και στην εξέλιξη της διαβητικής νεφροπάθειας.

Abstract

Lampropoulou IT, Stangou M, Sarafidis P, Giamalis P, Tsouchnikas I, Didangelos T, Papagianni A. Inflammatory and podocyte activation markers in patients with diabetes mellitus type 2 and diabetic nephropathy. Hellenic Diabetol Chron 2021; 3: 155-167.

Introduction: The present cross-sectional study aimed to investigate the role of TNF- α signaling pathway and podocyte activation in the development of diabetic nephropathy, and their possible association with albuminuria and renal function impairment. Additionally, possible associations with other micro- and macrovascular complications of DMT2 were investigated.

Material – Methods: Eighty-two patients with DMT2 entered the study. Microvascular complications assessed included diabetic nephropathy, diabetic neuropathy and retinopathy. The presence and severity of diabetic nephropathy was estimated based on albumin/creatinine ratio (ACR, $\mu\text{g}/\text{mg}$). Diabetic neuropathy was estimated by Michigan Neuropathy Screening Instrument (MNSI) protocol and presence of diabetic retinopathy by fundoscopy. Measurements of serum of TNF- α , TNF-R1, TNF-R2, CD28, B7-1 and CTLA-4 and urine TNF- α were performed at the Research Laboratory of the Department of Nephrology of Aristotle University, at Hippokratio General Hospital of Thessaloniki, by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Statistical analysis was performed using IBM SPSS 23 and a p value of 0.05 was considered to be statistically significant.

Results: Diabetic patients [39 male, age 69.5 (56-78) years] were divided into three groups, based on albumin/creatinine ratio (ACR) levels, Group I (ACR <30 $\mu\text{g}/\text{mg}$, $n=20$), Group II (ACR 30-300 $\mu\text{g}/\text{mg}$, $n=31$), Group III (ACR >300 $\mu\text{g}/\text{mg}$, $n=31$). Statistically significant differences were observed in the concentrations of urinary TNF- α ($p<0.001$), serum TNF-R1 ($p<0.001$), serum TNF-R2 ($p<0.001$), CTLA-4 ($p<0.001$) and CD28 ($p=0.034$), Groups I, II, III, respectively. In multivariate analysis, independent parameters correlated with ACR were serum TNF-R1 ($p=0.003$), TNF-R2 ($p=0.0012$) and urinary TNF- α ($p=0.015$) levels.

Conclusions: Our study is the first that supports that TNFRs and urinary TNF- α , as inflammatory markers, and sCTLA-4 and CD28 molecules, as markers of podocyte activation, play central role in the pathogenesis and progression of DN.

Βιβλιογραφία

1. Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, et al. American Diabetes Association, Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: (Suppl 1): 79-83.
2. National Kidney Foundation. KDOQI Clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for diabetes and chronic kidney disease: 2012 update. *Am J Kid Dis* 2012; 60: 850-86.
3. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414: 813-20.
4. Yamagishi S, Matsui T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxid Med Cell Longev* 2010; 3: 101-8.
5. Zhang H, Zhang R, Chen J, Shi M, Li W, Zhang X. High mobility group box1 inhibitor glycyrrhizic acid attenuates kidney injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kid Blood Press Res* 2017; 42: 894-904.
6. Shi JH, Sun SC. Tumor necrosis factor receptor-associated factor regulation of nuclear factor κB and mitogen-activated protein kinase pathways. *Front Immunol* 2018; 9: 1849.
7. Navarro-González JF, Mora-Fernández C, Muros de Fuentes M, García-Pérez J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2011; 7: 327-40.
8. Murakoshi M, Gohda T, Suzuki Y. Circulating tumor necrosis factor receptors: A potential biomarker for the progression of diabetic kidney disease. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 1957.
9. Navarro JF, Mora C, Gómez M, Muros M, López-Aguilar C, García J. Influence of renal involvement on peripheral blood mononuclear cell expression behaviour of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in type 2 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 919-26.
10. Fernández-Real JM, Vendrell J, García I, Ricart W, Vallès M. Structural damage in diabetic nephropathy is associated with TNF- α system activity. *Acta Diabetol* 2012; 49: 301-5.
11. Goldwith A, Burkard M, Olke M. Podocytes are non-hematopoietic professional antigen-presenting cells. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24: 906-16.
12. Moon JY, Jeong KH, Lee TW, Ihm CG, Lim SJ, Lee SH. Aberrant recruitment and activation of T cells in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 2012; 35(2): 164-74.
13. Fiorina P, Vergani A, Bassi R, et al. Role of podocyte B7-1 in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25: 1415-29.
14. Gagliardini E, Novelli R, Coma D, et al. B7-1 Is not induced in podocytes of human and experimental diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2015; 27: 999-1005.
15. Herrera M, Söderberg M, Sabirsh A, et al. Inhibition of T-cell activation by the CTLA4-Fc Abatacept is sufficient to ameliorate proteinuric kidney disease. *Am J Physiol Ren Physiol* 2017; 312: 748-59.
16. Norlin J, Nielsen Fink L, Helding Kvist P, Douglas Galsgaard E, Coppieters K. Abatacept treatment does not preserve

- renal function in the streptozocin-induced model of diabetic nephropathy. *PLoS One*. 2016; 11: e0152315.
17. *Ma KL, Zhang Y, Liu J, et al.* Establishment of an inflamed animal model of diabetic nephropathy. *Int J Biol Sci* 2014; 10: 149-59.
 18. *Sassy-Prigent C, Heudes D, Mandel C, et al.* Early glomerular macrophage recruitment in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 2000; 49: 466-75.
 19. *Navarro-González JF, Jarque A, Muros M, Mora C, García J.* Tumor necrosis factor-alpha as a therapeutic target for diabetic nephropathy. *Cytok Growth Fact Rev* 2009; 20: 165-73.
 20. *Lampropoulou IT, Stangou M, Papagianni A, Didangelos T, Iliadis F, Efstratiadis G.* TNF- α and microalbuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Res* 2014: 1-7.
 21. *Pavkov ME, Weil EJ, Fufaa GD, et al.* Tumor necrosis factor receptors 1 and 2 are associated with early glomerular lesions in type 2 diabetes. *Kidney Int* 2016; 89: 226-34.
 22. *Gohda T, Nishizaki Y, Murakoshi M, et al.* Clinical predictive biomarkers for normoalbuminuric diabetic kidney disease. *Diabetes Res Clin Pract* 2018; 141: 62-6.
 23. *Miyazawa I, Araki S, Obata T, et al.* Association between serum soluble TNF α receptors and renal dysfunction in type 2 diabetic patients without proteinuria. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 92: 174-80.
 24. *Lin J, Hu FB, Mantzoros C, Curhan GC.* Lipid and inflammatory biomarkers and kidney function decline in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2010; 53: 263-7.
 25. *Gohda T, Tomino Y.* Novel biomarkers for the progression of diabetic nephropathy: Soluble TNF receptors. *Curr Diab Rep* 2013; 13: 560-6.
 26. *Niewczas MA, Gohda T, Skupien J, et al.* Circulating TNF receptors 1 and 2 predict ESRD in type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23: 507-15.
 27. *Gómez-Banoy N, Cuevas V, Higuera A, Aranzález LH, Mockus I.* Soluble tumor necrosis factor receptor 1 is associated with diminished estimated glomerular filtration rate in Colombian patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Complicat* 2016; 30: 852-7.
 28. *Pena M, Heinzel A, Heinze G, et al.* A panel of novel biomarkers representing different disease pathways improves prediction of renal function decline in type 2 diabetes. *PLoS One* 2015; 14: e0120995.
 29. *Lee JE, Gohda T, Walker WH, et al.* Risk of ESRD and all cause mortality in type 2 diabetes according to circulating levels of FGF-23 and TNFR1. *PLoS One* 2013; 8: e58007.
 30. *Ye LL, Wei XS, Zhang M, Niu YR, Zhou Q.* The significance of tumor necrosis factor receptor type II in CD8⁺ regulatory T cells and CD8⁺ effector T cells. *Front Immunol* 2018; 9: 583.
 31. *So T, Nagashima H, Ishii N.* TNF receptor-associated factor (TRAF) signaling network in CD4(+) T-lymphocytes. *Tohoku J Exp Med* 2015; 236: 139-54.
 32. *Dahal LN, Basu N, Youssef H, et al.* Immunoregulatory soluble CTLA-4 modifies effector T-cell responses in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2016; 18: 180.
 33. *Esposito L, Hunter KM, Clark J, et al.* Investigation of soluble and transmembrane CTLA-4 isoforms in serum and microvesicles. *J Immunol* 2014; 193: 889-900.
 34. *Simone R, Pesce G, Antola P, et al.* The soluble form of CTLA-4 from serum of patients with autoimmune diseases regulates T-cell responses. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 215763.

Λέξεις-κλειδιά:

Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔτ2)
 Διαβητική νεφροπάθεια
 Υποκλινική φλεγμονή
 Φλεγμονώδεις κυτταροκίνες
 TNF- α , TNF-R1, TNF-R2, CD28, CTLA-4, B7-1

Key words:

Diabetes mellitus type 2
 Diabetic nephropathy
 Subclinical inflammation
 Inflammatory cytokines
 TNF- α , TNF-R1, TNF-R2, CD28, CTLA-4, B7-1