



# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ

ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
Διευθύντρια: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευαγγελή Τσιρώνη

### ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ (ALR2)  
ΣΤΗΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΑ ΚΑΙ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ  
ΣΤΟ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ II**

Υπό

**ΣΟΦΙΑΣ Β. ΤΑΧΜΙΤΖΗ**  
ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥ ΟΦΘΑΛΜΙΑΤΡΟΥ  
ΕΠΙΜΕΛΗΤΡΙΑΣ Β' ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΑΣ  
Γ. Ν. ΛΑΡΙΣΑΣ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση του  
Διδακτορικού Διπλώματος

**Λάρισα 2015**



# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ

ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
Διευθύντρια: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευαγγελή Τσιρώνη

### ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ (ALR2)  
ΣΤΗΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΑ ΚΑΙ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ  
ΣΤΟ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ II

Υπό

**ΣΟΦΙΑΣ Β. ΤΑΧΜΙΤΖΗ**  
ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥ ΟΦΘΑΛΜΙΑΤΡΟΥ  
ΕΠΙΜΕΛΗΤΡΙΑΣ Β' ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΑΣ  
Γ. Ν. ΛΑΡΙΣΑΣ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση του  
Διδακτορικού Διπλώματος

**Λάρισα 2015**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

### **Ευαγγελή Τσιρώνη**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας – Νευρο-οφθαλμολογίας  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας  
Επιβλέπουσα - Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

### **Ιωάννης Στεφανίδης**

Καθηγητής Παθολογίας - Νεφρολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας  
Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

### **Ηλίας Ζιντζαράς**

Καθηγητής Βιομαθηματικών - Βιομετρίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας  
Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ****Ευαγγελή Τσιρώνη**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας – Νευρο-οφθαλμολογίας  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας  
Επιβλέπουσα - Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

**Ιωάννης Στεφανίδης**

Καθηγητής Παθολογίας - Νεφρολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας  
Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

**Ηλίας Ζιντζαράς**

Καθηγητής Βιομαθηματικών - Βιομετρίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας  
Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

**Γεώργιος Μ. Χατζηγεωργίου**

Καθηγητής Νευρολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Ευθύμιος Δαρδιώτης**

Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Σοφία Ανδρούδη**

Επίκουρος Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Θεόδωρος Ελευθεριάδης**

Επίκουρος Καθηγητής Νεφρολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας



**«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα»**

**(Νόμος 5343/32, άρθρο 202§2)**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μελέτη αυτή αποτέλεσε μία προσπάθεια για την περαιτέρω κατανόηση της παθογένειας των επιπλοκών του ΣΔ και τη διεξοδική μελέτη του προβλήματος που πιθανόν να οδηγήσει στην πρόληψή του. Ολοκληρώθηκε υπό την επίβλεψη της Αναπλ. Καθηγήτριας κας **Ευαγγελής Τσιρώνη**, και απέφερε αποτελέσματα που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή. Με την ευκαιρία αυτή, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες, κατά πρώτο λόγο, στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα θέμα που παρουσίαζε για μένα μεγάλο ενδιαφέρον. Η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε. Τσιρώνη, Διευθύντρια της Οφθαλμολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, είναι για μένα Πανεπιστημιακή Δασκάλα. Την ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη της, για την έμπρακτη συμπαράστασή της, την ηθική της υποστήριξη και την καθοδήγησή της κατά την εκπόνηση της εργασίας και ελπίζω το αποτέλεσμα να την ικανοποιήσει.

Ένα απλό ευχαριστώ θα ήταν λίγο για τον Καθηγητή Παθολογίας - Νεφρολογίας κ. **Ιωάννη Στεφανίδη**, Διευθυντή της Νεφρολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μέλους της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής και υπεύθυνο για το σκέλος του ερευνητικού προγράμματος που αναφέρεται στη διαβητική νεφροπάθεια. Του είμαι ευγνώμων για την εμπιστοσύνη, τη φιλική διάθεση, το ευχάριστο κλίμα και την επιστημονική δουλειά υψηλής ποιότητας. Επίσης, τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την ενθάρρυνσή του κατά τις δυσκολίες της κοινής προσπάθειας.

Επιθυμώ επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Βιομαθηματικών - Βιομετρίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. **Ηλία Ζιντζαρά** και μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων καθώς και για την συμβολή του στην διαμόρφωση του ειδικού μέρους της παρούσας διατριβής.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω και να εκφράσω τον σεβασμό μου στον Ομότιμο Καθηγητή Οφθαλμολογίας κ. **Δημήτριο Χατζούλη**. Κοντά του είχα την ευκαιρία, ως ειδικευόμενη ιατρός, να μάθω τις βασικές και

ουσιώδεις αρχές της παθολογίας του αμφιβληστροειδούς. Εξαίρετος άνθρωπος, επιστήμονας και χειρουργός, αποτέλεσε για μένα παράδειγμα πειθαρχημένης δουλειάς για τη μετέπειτα ζωή μου. Η βοήθεια που μου προσέφερε ήταν σημαντική. Τον ευχαριστώ για τη στήριξη, τις γνώσεις και τις ερευνητικές δυνατότητες που απλόχερα μου προσέφερε, αλλά και για τον τρόπο επιστημονικής σκέψης που μου υπέδειξε.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης στον Επίκουρο Καθηγητή Νευρολογίας κ. **Ευθύμιο Δαρδιώτη** για τη βοήθειά του στην εκπόνηση του εργαστηριακού μέρους της διατριβής μου αλλά και για τη γενικότερη υποστήριξη της προσπάθειάς μου. Είθε να επιτύχουμε και μελλοντική συνεργασία.

Ευχαριστίες απευθύνω, επίσης, στην διευθύντρια ΕΣΥ Οφθαλμολογίας του Π.Γ.Ν.Λάρισας κα **Μαρία Κοτούλα** και υπεύθυνη του ιατρείου παθολογίας του χοριοαμφιβληστροειδούς, για τη βοήθειά της στη συλλογή του υλικού, τις συμβουλές της και τη φιλική της διάθεση.

Οφείλω πολλά στους ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες που εθελούσια συμμετείχαν στη συγκεκριμένη μελέτη. Η συμβολή τους στην επιστημονική έρευνα της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας και νεφροπάθειας ήταν ανεκτίμητη.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και τον αδερφό μου, που ανέμειναν με προσμονή την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Με ενεθάρρυναν στην προσπάθειά μου και με υποστήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής. Ξεχωριστά θα αναφερθώ στην μητέρα μου, στην οποία και αφιερώνω με πολλή αγάπη αυτό το έργο. Ιδιαίτερως θα ευχαριστήσω το σύζυγό μου, ο οποίος υπήρξε όχι μόνο συμπαραστάτης αλλά και ένας πολύτιμος συνεργάτης, που με τις συμβουλές του αλλά και την συμμετοχή του βοήθησε στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Σοφία Β. Ταχμιτζή

Λάρισα 2015

**στη μητέρα μου Διαλεκτή**

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Γεννήθηκα στη Θεσσαλονίκη το Νοέμβριο του 1970. Εκεί ολοκλήρωσα τις βασικές σπουδές μου και στη συνέχεια εισήχθη στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου του Βελιγραδίου στη Γιουγκοσλαβία μετά από εξετάσεις, όπου και αποφοίτησα το 1997.

Το 1998 υπηρέτησα την τρίμηνη άσκηση στο Π.Γ.Π.Ν. Ιπποκράτειο Θεσσαλονίκης και την υπηρεσία υπαίθρου στο Περιφερειακό Ιατρείο Περιστεράς και Λιβαδίου του νομού Θεσσαλονίκης.

Πριν την έναρξη της ειδίκευσής μου στην Οφθαλμολογία, από τον Δεκέμβριο του 2001 έως τον Οκτώβριο του 2004 εργάστηκα ως ιδιώτης γενικός ιατρός στη Θεσσαλονίκη. Σε αυτό το χρονικό διάστημα συμμετείχα σε διεθνή ερευνητικά προγράμματα της Οφθαλμολογικής Πανεπιστημιακής κλινικής του Νοσοκομείου Αχέππα, ενώ ταυτόχρονα παρακολουθούσα ως άμισθος επιστημονικός συνεργάτης τις δραστηριότητες της Οφθαλμολογικής Πανεπιστημιακής κλινικής του Νοσοκομείου Παπαγεωργίου, οργανώνοντας και συμμετέχοντας σε συνέδρια, σεμινάρια και επιστημονικές ημερίδες. Παράλληλα είχα εθελοντική δράση σε προγράμματα πρόληψης, διαγνωστικής εξέτασης και θεραπείας του συλλόγου «των ιατρών εντός συνόρων του νομού Θεσσαλονίκης».

Από τον Οκτώβριο του 2004 έως τον Ιούλιο 2008 υπηρέτησα ως ειδικευόμενη ιατρός στην Πανεπιστημιακή Οφθαλμολογική κλινική του Π.Γ.Ν. Λάρισας.

Τον Οκτώβριο του 2008 απέκτησα τον τίτλο ειδικότητας στην Οφθαλμολογία, ενώ στην Πανεπιστημιακή Οφθαλμολογική κλινική του Π.Γ.Ν. Λάρισας παρέμεινα ως επικουρική ιατρός για άλλα δύο χρόνια, όπου και ασχολήθηκα με την εξειδίκευση στην παιδοοφθαλμολογία καθώς και με όλες τις δραστηριότητες της κλινικής και των εξωτερικών της ιατρείων, ενώ παράλληλα συμμετείχα στην εκπαίδευση των ειδικευόμενων ιατρών καθώς και στα μετεκπαιδευτικά προγράμματα της παθολογικής και χειρουργικής νοσηλευτικής ειδικότητας του εν λόγω Νοσοκομείου.

Από τον Ιούλιο του 2011 έως και σήμερα είμαι Επιμελήτρια Β' στην Οφθαλμολογική κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

Είμαι έγγαμη και έχω μία κόρη 6 ετών.

➤ **ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΑΠΗΧΗΣΗΣ (IF) και ΚΡΙΤΕΣ**

1. **Sophia V. Tachmitzi**, Evangelia E Tsironi, Maria G Kotoula, Efthimios Dardiotis, Theodoros Eleftheriadis, Dimitrios Z Chatzoulis, Paraskevi Xanthopoulou, Maria Tziastoudi, Aristotle G Koutsiaris, Anatoli Fotiadou, Georgios M Hadjigeorgiou, Ioannis Stefanidis, Elias Zintzaras. Association between Polymorphisms and Haplotypes in AKR1B1 and diabetes type 2 leading to complications. *Int J Med Health Sci*. 2015 Oct; 4(4):430-436.
  
2. Xiromerisiou G., Dardiotis E., Tsironi E., Hadjigeorgiou G., Ralli S., Kara E., Petalas A., **Tachmitzi S.**, Hardy J., Houlden H. THAP1 mutations in a Greek primary blepharospasm series. *Parkinsonism Relat Disord*. 2013 Mar; 19(3):404-405 [IF = 4.1, **2 αναφορές**].
  
3. Koutsiaris A. G., **Tachmitzi S V.**, Batis N. Wall shear stress quantification in the human conjunctival pre-capillary arterioles in vivo. *Microvasc Res*. 2013 Jan; 85:34-39 [IF = 2.4, **7 αναφορές**].
  
4. E. E. Tsironi, F Zacharaki, Ioanna N Grivea, **Sophia V. Tachmitzi**, Aspasia N Michoula, Marianna Vlychou, Efthimia Petinaki and George A Syrogiannopoulos European ST80 community-associated methicillinresistant Staphylococcus aureus orbital cellulitis in a neonate. *BMC Ophthalmology*. 2012 May; 12:7 [IF = 1.1, **1 αναφορά**].
  
5. Dastiridou A., Androudi S., **Tachmitzi S.**, Kotoula M., Brazitikos P., Tsironi E. Transcranial diode laser cyclophotocoagulation for refractory glaucoma secondary to juvenile idiopathic arthritis: a short term follow up. *Eur J Ophthalmology*. 2011; 7826 [IF = 1.1, **2 αναφορές**].
  
6. Drakou A. A., Koutsiaris A. G., **Tachmitzi S. V.**, Roussas N., Tsironi E., Giannoukas A.D. The importance of ophthalmic artery hemodynamics in patients with atheromatous carotid artery disease. *Int Angiol*. 2011; 30(6), 547-554. [IF = 1.0, **5 αναφορές**].
  
7. Koutsiaris A. G., **Tachmitzi S. V.**, Papavasileiou P., Batis N., Kotoula M. G., Giannoukas A. D., Tsironi E. Blood velocity pulse quantification in the human conjunctival pre-capillary arterioles. *Microvasc Res*. 2010 Sep; 80(2):202-208 [IF = 2.4, **17 αναφορές**].

8. Koutsiaris A.G., **Tachmitzi S. V.**, Kotoula M.G., Tsironi E. Old and new velocity profile equations of the blood flow in vivo: A preliminary evaluation. *Series on Biomechanics*. 2010; 25(1-2), 111-116.

9. Kotoula MG, Chatzoulis DZ, **Tahmitzi S**, Tsironi EE. Detection of macular photocoagulation scars with confocal infrared reflection imaging. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2009 Jul-Aug; 40 (4):385-8. [IF = 1.432, **2 αναφορές**].

10. Aristotle G. Koutsiaris, **Sophia V. Tachmitzi**, Nick Batis, Maria G. Kotoula, Constantinos H. Karabatsas, Evagelia Tsironi, Dimitrios Z. Chatzoulis. Volume flow and wall shear stress quantification in the human conjunctival capillaries and post-capillary venules in vivo. *Biorheology*. 2007; 44 (5-6):375-86. [IF = 1.6, **53 αναφορές**].

11. Koutsiaris, A. G., **Tachmitzi, S. V.**, Kotoula, M. G., Karabatsas, C. H., Tsironi, E., Batis, N., & Chatzoulis, D. Z. A slit lamp based imaging system for measuring blood velocity in the conjunctival microcirculation of the human eye. *J Vasc Res*. 2006 Jan; Vol. 43, pp. 40. [IF = 2.4, **1 αναφορά**].

➤ **IMPACT FACTORS ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ: 18.532**

➤ **ΑΝΑΦΟΡΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ: 90.**

➤ **19 ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

➤ **ΕΠΑΙΝΟΣ ΣΕ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΗ ΣΕ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ**

➤ **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΕΣ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ**

Συμμετείχα στο πρόγραμμα Thessaloniki eye study, που διεξήχθη στην ερευνητική μονάδα της Πανεπιστημιακής οφθαλμολογικής κλινικής του Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ σε συνεργασία με τα Πανεπιστήμια της Καλιφόρνια (UCLA) και της Ινδιανάπολης, κατά τη χρονική περίοδο 2001-2004.

Συμμετείχα στο πρόγραμμα Eureye study. Το συγκεκριμένο πρόγραμμα επιδημιολογίας της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας ήταν ενταγμένο στο 5<sup>ο</sup> πρόγραμμα πλαίσιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης στο οποίο συνεργάστηκαν δώδεκα Ευρωπαϊκά Πανεπιστήμια, κατά τη χρονική περίοδο 2001-2004.

Συμμετείχα στο ερευνητικό πρόγραμμα «ΑΡΧΙΜΗΔΗΣ» του ΤΕΙ Λάρισας, που έγινε σε συνεργασία με την Οφθαλμολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, κατά τη χρονική περίοδο 2004-2006.





**ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ (ALR2)  
ΣΤΗΝ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΑ ΚΑΙ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ  
ΣΤΟ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ II**

**ΣΟΦΙΑ Β. ΤΑΧΜΙΤΖΗ  
ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥ ΟΦΘΑΛΜΙΑΤΡΟΥ  
ΕΠΙΜΕΛΗΤΡΙΑΣ Β' ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΑΣ  
Γ. Ν. ΛΑΡΙΣΑΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Ευαγγελή Τσιρώνη**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οφθαλμολογίας – Νευρο-οφθαλμολογίας  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας  
Επιβλέπουσα - Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

**Ιωάννης Στεφανίδης**

Καθηγητής Παθολογίας - Νεφρολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας  
Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

**Ηλίας Ζιντζαράς**

Καθηγητής Βιομαθηματικών - Βιομετρίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας  
Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ) και η διαβητική νεφροπάθεια(ΔΝ) αποτελούν σοβαρές επιπλοκές του σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ) τύπου I και II. Για τις μικροαγγειοπάθειες αυτές ποικίλοι προδιαθεσικοί παράγοντες έχουν ήδη αναγνωρισθεί, αλλά η παθογένεια δεν είναι ακόμη εξολοκλήρου τεκμηριωμένη. Η απουσία, όμως, απόλυτα αποτελεσματικού θεραπευτικού χειρισμού στις περιπτώσεις ΔΑ και ΔΝ, σε όλους ανεξαιρέτως τους ασθενείς, επιβάλουν την περαιτέρω διερεύνηση της παθογένειας των επιπλοκών του ΣΔ και τη διεξοδική μελέτη του προβλήματος που πιθανόν να οδηγήσει στην πρόληψή του. Είναι γνωστό ότι τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης προκαλούν την ενεργοποίηση της μεταβολικής οδού των πολυολών, όπου η αναγωγή της αλδόζης (ALR2) είναι το πρώτο και καθοριστικό ένζυμο ρυθμού και φαίνεται να εμπλέκεται στην παθογένεια των διαβητικών μικροαγγειακών επιπλοκών. Σε αυτή τη μελέτη, ελέγχθηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ 5 κοινών πολυμορφισμών-SNPs (rs2259458 G/T, rs2734653 G/A, rs2670230 C/A, rs1790998 C/A, rs17188118 A/C) του γονιδίου *AKR1B1* με την εμφάνιση της ΔΑ και ΔΝ, σε σακχαροδιαβητικούς ασθενείς τύπου II. Η κοόρτη αποτελείτο από 169 διαβητικούς με μικροαγγειακές επιπλοκές (ασθενείς με επιπλοκές), 107 διαβητικούς χωρίς μικροαγγειακές επιπλοκές (ομάδα ελέγχου ασθενών) και 315 υγιείς (ομάδα ελέγχου υγιών). Η εξέλιξη της ασθένειας εξετάστηκε χρησιμοποιώντας ως μέτρο τον γενικευμένο λόγο πιθανοτήτων  $OR_G$  (generalized odds ratio), μία προσέγγιση ανεξάρτητη του γενετικού μοντέλου. Ο κίνδυνος ανάπτυξης διαβητικών επιπλοκών εξετάστηκε χρησιμοποιώντας τον  $OR_G$  του προσθετικού και συν-κυρίαρχου μοντέλου. Η τάση κληρονομικότητας αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τον δείκτη βαθμού κυριαρχίας  $h$  (degree of dominance index). Το γονίδιο *AKR1B1* δεν εμπλέκεται στην εξέλιξη της ασθένειας. Διερευνώντας την συσχέτιση μεταξύ των παραλλαγών του *AKR1B1* και τον κίνδυνο ανάπτυξης διαβητικών επιπλοκών, στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα υπήρξαν για το προσθετικό μοντέλο της παραλλαγής rs2259458 G/T [OR = 1.87 (1.01 – 3.50)] και το συν-κυρίαρχο μοντέλο του πολυμορφισμού rs2670230 C/A [OR = 1.45 (1.01 – 2.04)]. Η τάση κληρονομικότητας ( $h$  index) για τις παραλλαγές rs2259458 G/T και rs2670230 C/A ήταν «μη – κυριαρχία» και «κυριαρχία του αλληλόμορφου A» αντίστοιχα. Οι συχνότητες των τριών απλοτύπων (T-G-A-C-A, G-G-C-C-A and G-A-C-C-A) ήταν σημαντικά διαφορετικές ( $P \leq 0.05$ ) ανάμεσα στις ομάδες ελέγχου ασθενών και υγιών. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *AKR1B1* ίσως επιδρούν στην εξέλιξη του ΣΔ και γιαυτό να οδηγούν τελικά στις επιπλοκές του.

**Λέξεις κλειδιά:** Πολυμορφισμοί του γονιδίου της αναγωγή της αλδόζης, διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, διαβητική νεφροπάθεια.

## ABSTRACT

Diabetic retinopathy (DR) and diabetic nephropathy (DN) are serious chronic microvascular complication of both type 1 and type 2 diabetes mellitus. Various predisposing factors have already been identified but the pathogenesis is not yet fully elucidated. It was convincingly proved that the single most important factor in the development of these complications is hyperglycemia. However, is strong evidence for the involvement of genetic factors in its pathophysiology. The absence, however, of an absolutely effective therapy for all DR and DN patients necessitates a further investigation of the diabetic complication pathogenesis and a more thorough study of the problem as well, leading probably to the diabetic disease prevention. Not all diabetic patients develop DR or DN indicating specific genetically defined predisposing factors. Variants of the *AKR1B1* gene are implicated in the development of both microvascular complications of diabetes. Thus, a candidate-gene association study was conducted to investigate the association between five *AKR1B1* gene variants (rs2259458 G/T, rs2734653 G/A, rs2670230 C/A, rs1790998 C/A, rs17188118 A/C) to the progression of diabetes type 2 and the risk of diabetes leading to complications. The cohort consisted of 169 diabetic cases with microvascular complications, 107 diseased controls (diabetics without complications) and 315 healthy controls. The disease progression was tested using the generalized odds ratio ( $OR_G$ ) metric, a genetic model-free approach. The risk of diabetes leading to complications was tested using the ORs of the additive and co-dominant models. The mode of inheritance was assessed using the degree of dominance index ( $h$ -index). This study concluded that *AKR1B1* gene is not implicated in disease progression. In investigating the association between the *AKR1B1* variants and the risk of diabetes leading to complications, significant results was derived for the additive model of the variant rs2259458 G/T [OR= 1.87 (1.01-3.50)] and the co-dominant model of the variant rs2670230 C/A [OR=1.45 (1.01-2.04)]. The mode of inheritance ( $h$ -index) for the variants rs2259458 G/T and rs2670230 C/A were “non-dominance” and “dominance of allele A”, respectively. The frequencies of three haplotypes (T-G-A-C-A, G-G-C-C-A and G-A-C-C-A) were significantly different ( $P \leq 0.05$ ) between cases and healthy controls. Genetic variation in *AKR1B1* gene may alter susceptibility to diabetes leading to complications; though, it is not implicated in disease progression.

**Keywords:** Aldose reductase gene variants; diabetic retinopathy; diabetic nephropathy.

## Πίνακας Περιεχομένων

<b>Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή</b> .....	<b>σελ. 16</b>
Σακχαρώδης διαβήτης .....	σελ. 17
Ιστορική ανασκόπηση του σακχαρώδη διαβήτη .....	σελ. 17
Η επιδημιολογία του σακχαρώδη διαβήτη .....	σελ. 18
Μορφές σακχαρώδη διαβήτη, παθογένεια και θεραπεία.....	σελ. 19
Επιπλοκές που σχετίζονται με το σακχαρώδη διαβήτη .....	σελ. 21
<b>Κεφάλαιο 2 Γενικό μέρος</b> .....	<b>σελ. 23</b>
Σακχαρώδης διαβήτης και οφθαλμός .....	σελ. 24
<b>2.1. Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια</b> .....	<b>σελ. 24</b>
2.1.1 Ιστορική ανασκόπηση της ΔΑ.....	σελ. 25
2.1.2. Η παθοφυσιολογία της ΔΑ - παθογένεια .....	σελ. 29
2.1.3. Κλινική εικόνα ΔΑ .....	σελ. 44
2.1.4. Στάδια της Δ Α .....	σελ. 54
2.1.5. Διαγνωστικές εξετάσεις ΔΑ .....	σελ. 55
2.1.6. Θεραπεία ΔΑ.....	σελ. 57
<b>2.2 Διαβητική νεφροπάθεια</b> .....	<b>σελ. 62</b>
2.2.1. ΣΔ και νεφρός – επιδημιολογία της ΔΝ .....	σελ. 62
2.2.2. Ιστορική ανασκόπηση της ΔΝ .....	σελ. 62
2.2.3. Η παθοφυσιολογία της ΔΝ .....	σελ. 63
2.2.4. Μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές στη ΔΝ .....	σελ. 72
2.2.5. Κλινική εικόνα της ΔΝ.....	σελ. 80
2.2.6. Στάδια ΔΝ .....	σελ. 81

2.2.7.	Πρόληψη και θεραπεία της ΔΝ .....	σελ. 85
<b>2.3</b>	<b>Μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί στην ΔΑ και ΔΝ .....</b>	<b>σελ. 89</b>
2.3.1.	Η αναγκαιότητα διερεύνησης της παθογένειας της ΔΑ και ΔΝ .....	σελ. 89
2.3.2.	Μεταλλάξεις που επηρεάζουν την εμφάνιση της ΔΑ και ΔΝ .....	σελ. 90
2.3.3.	Μικροσυστοιχίες νουκλεϊκών οξέων (DNA microarrays) και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	σελ. 93
2.3.4.	Συσχέτιση γονιδίων με τον κίνδυνο εμφάνισης ΔΑ και ΔΝ .....	σελ. 94
<b>2.4</b>	<b>Μελέτες συσχέτισης υποψήφιων γονιδίων στην ΔΑ και ΔΝ .....</b>	<b>σελ.96</b>
<b>Κεφάλαιο 3</b>	<b>Ειδικό μέρος .....</b>	<b>σελ. 98</b>
<b>3.1</b>	<b>Σκοπός της μελέτης.....</b>	<b>σελ. 99</b>
<b>3.2</b>	<b>Σχεδιασμός της μελέτης .....</b>	<b>σελ. 100</b>
3.2.1.	Υλικό και μέθοδος .....	σελ. 100
3.2.2.	Απομόνωση DNA από το ολικό αίμα και ηλεκτροφόρηση .....	σελ. 107
3.2.3.	Γονότυπος.....	σελ. 109
3.2.4.	Στατιστική ανάλυση δεδομένων .....	σελ. 110
<b>3.3.</b>	<b>Αποτελέσματα .....</b>	<b>σελ. 112</b>
3.3.1.	Εξέλιξη του ΣΔ.....	σελ. 113
3.3.2.	Σακχαροδιαβητικοί ασθενείς με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης επιπλοκών .....	σελ 115
<b>3.4</b>	<b>Συζήτηση .....</b>	<b>σελ. 121</b>
<b>3.5</b>	<b>Συμπεράσματα.....</b>	<b>σελ. 125</b>
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>σελ. 127</b>	
<b>Παράρτημα: Πρωτόκολλο εξέτασης ασθενούς.....</b>	<b>σελ. 143</b>	

## **Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή**

## Σακχαρώδης διαβήτης

Ο όρος σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) περιγράφει μία διαταραχή πολλαπλής αιτιολογίας, η οποία χαρακτηρίζεται από χρόνια υπεργλυκαιμία, λόγω διαταραχών του μεταβολισμού της γλυκόζης και οφείλεται στην ανεπαρκή έκκριση ή την ανεπαρκή δράση της ινσουλίνης ή και τα δύο.

### Ιστορική ανασκόπηση του σακχαρώδη διαβήτη

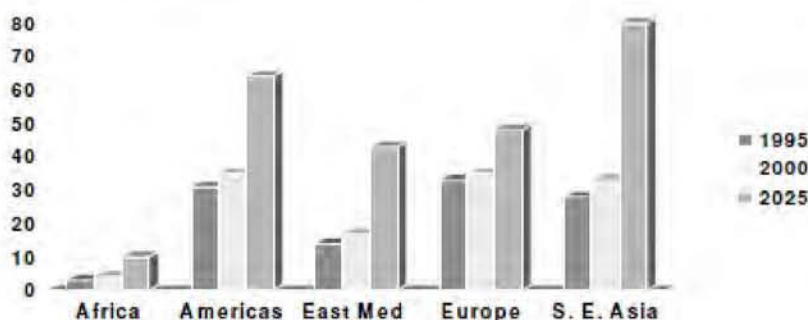
Ο ΣΔ είναι γνωστός από την αρχαιότητα. Συγκεκριμένα ο Έλληνας γιατρός Αρεταίος ονόμασε την ασθένεια διαβήτη. Περιγραφές της ασθένειας βρέθηκαν στην Αίγυπτο, σε ένα χειρόγραφο γνωστό ως «Πάπυρος Ebers» που χρονολογείται από το 1550π.χ.<sup>1</sup> Στα τέλη του 17<sup>ου</sup> αιώνα ο Johan Conrad Brunner απέδειξε ότι η πάθηση συνδέεται με τη λειτουργία του παγκρέατος. Το 1869, μάλιστα, ο Γερμανός Paul Langerhans περιέγραψε τις νησίδες του παγκρέατος, που μετέπειτα βρέθηκε ότι εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλυκόζης.<sup>2</sup> Η ολοκληρωμένη όμως αποσαφήνιση του ρόλου του παγκρέατος στο ΣΔ έγινε το 1889 και αποδίδεται σε δύο Ευρωπαίους ερευνητές τον Joseph Von Mering και στον Oscar Minkowski. Το 1910, ο Sir Edward Albert Sharpey-Schafer, ένας Άγγλος φυσιολόγος από το Εδιμβούργο, πρότεινε να ονομαστεί ινσουλίνη η χημική ουσία που εκκρίνει το πάγκρεας. Ο ενδοκρινικός ρόλος του παγκρέατος, όμως, στο μεταβολισμό και ο ρόλος της ινσουλίνης σε αυτόν δεν είχαν, πλήρως, διασαφηνιστεί μέχρι το 1921, όταν οι

Καναδοί Frederick Grant Banting και Charles Herbert Best ολοκλήρωσαν την εργασία των Joseph Von Mering και Oscar Minkowski.<sup>2</sup>

## Η επιδημιολογία του σακχαρώδη διαβήτη

Ο ΣΔ είναι ευρύτατα διαδεδομένος σε ολόκληρη την υφήλιο, η δε συχνότητά του φαίνεται ότι συνεχώς αυξάνεται τις τελευταίες δεκαετίες. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας – WHO, το 2006 οι ασθενείς με ΣΔ παγκοσμίως ξεπερνούσαν τα 170 εκατομμύρια, αριθμός που αναμένεται να διπλασιαστεί μέχρι το 2030 (Σχήμα 1.1.).<sup>3</sup> Εκτιμάται ότι στην Ελλάδα το 5.9% του γενικού πληθυσμού πάσχει από ΣΔ. Υπάρχουν δηλαδή περίπου 700.000 - 900.000 διαβητικοί στην Ελλάδα, από τους οποίους οι 15.000 θα παρουσιάσουν ΔΑ, ενώ υπολογίζεται ότι 400-500 από αυτούς θα τυφλώνονται κάθε χρόνο.<sup>4</sup> Παράλληλα το 20-30% των ασθενών με διαβήτη τύπου II εμφανίζουν μικρολευκωματινουρία και λιγότεροι από το 50% αυτών των ασθενών καταλήγουν σε έκδηλη νεφροπάθεια.<sup>3</sup>

### W.H.O.: Diabetics (millions)



Σχήμα 1.1. Αύξηση του ΣΔ τις τελευταίες δεκαετίες.<sup>3</sup>



Η επικράτηση του ΣΔ είναι υψηλότερη στις αναπτυγμένες χώρες από ότι στις αναπτυσσόμενες. Η αύξηση της επικράτησης του ΣΔ είναι πιθανό να οφείλεται στην αύξηση της μέσης ηλικίας του πληθυσμού, την κακή διατροφή, την αύξηση του ποσοστού των παχύσαρκων ασθενών και στην καθιστική ζωή.<sup>3</sup>

### Μορφές σακχαρώδη διαβήτη, παθογένεια και θεραπεία

Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας, υπάρχουν 4 τύποι ΣΔ:

Διαβήτης τύπου I	Αυτοάνοσος Ιδιοπαθής
Διαβήτης τύπου II	
Άλλες μορφές	Γενετικές ανωμαλίες των β κυττάρων Γενετικές διαταραχές της δράσης της ινσουλίνης Παθήσεις του εξωκρινούς παγκρέατος
Διαβήτης της κύησης	

Πίνακας 1.1. Ταξινόμηση των διαφόρων μορφών του ΣΔ<sup>4</sup>

Οι δύο βασικοί τύποι του ΣΔ, δηλαδή ο τύπος I και ο τύπος II, έχουν διαφορετική αιτιολογία, αλλά εμφανίζουν και μία σχετική επικάλυψη. Ο ΣΔ τύπου I (ινσουλινοεξαρτώμενος, νεανικός) αντιπροσωπεύει το 10-12% των



διαβητικών και συνδυάζεται με συγκεκριμένο γενετικό υπόστρωμα που καθορίζει και την κληρονομική προδιάθεση σε αυτό τον τύπο του Σ.Δ.<sup>2</sup> Η κληρονομική προδιάθεση είναι μεν απαραίτητη αλλά δεν επαρκεί από μόνη της για να προκαλέσει τον Σ.Δ. τύπου I. Πρέπει να συνυπάρξει και άλλος, άγνωστος παράγοντας, ο οποίος θα πυροδοτήσει τις αυτοάνοσες αντιδράσεις που θεωρούνται σήμερα υπεύθυνες για την πρόκληση του Σ.Δ. τύπου I. Για την αντιμετώπισή του είναι απαραίτητη η χορήγηση ινσουλίνης. Ο Σ.Δ. τύπου II (ΣΔ των ενηλίκων) χαρακτηρίζεται ως μη ινσουλινοεξαρτώμενος ή ως ινσουλινοθεραπευόμενος διότι για την αντιμετώπισή του δεν είναι απαραίτητη η χορήγηση ινσουλίνης, χρησιμοποιείται όμως ως θεραπεία στις περιπτώσεις εκείνες που τα δισκία δεν επαρκούν για τον έλεγχο της υπεργλυκαιμίας. Αντιπροσωπεύει το 88-95% των διαβητικών. Είναι μία πολυπαραγοντική νόσος που αποδίδεται αφενός στη γενετική προδιάθεση και αφετέρου στην επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η διατροφή, η παχυσαρκία και η έλλειψη μυϊκής άσκησης, που προαναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα και που προάγουν την εμφάνιση του Σ.Δ.<sup>3,19</sup>

Αν και η παθογένεια του ΣΔ έχει εκτενώς διερευνηθεί, ωστόσο η αιτιολογία των επιπλοκών του, όπως είναι η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (ΔΑ) και διαβητική νεφροπάθεια (ΔΝ), δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Λείπουν σημαντικά κομμάτια για τη σύνθεση του πάζλ της παθογένειας αυτών των σοβαρών επιπλοκών. Τα τελευταία χρόνια, ο ρόλος που φαίνεται να παίζουν οι γενετικοί παράγοντες, στην παθογένεια, εμφανίζεται όλο και συχνότερα στη βιβλιογραφία. Η επίδραση των γενετικών παραμέτρων δείχνει να είναι αδιαμφισβήτητη.<sup>14</sup>

## Επιπλοκές που σχετίζονται με το σακχαρώδη διαβήτη

Η νόσος χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση επιπλοκών που διακρίνονται σε οξείες και χρόνιες. Η διαβητική κετοξέωση αποτελεί την πλέον σοβαρή επιπλοκή του ΣΔ, που συχνά μπορεί να απειλήσει τη ζωή του ασθενούς. Αυτή η οξεία μεταβολική διαταραχή αποτελεί τη μία μόνο όψη του διαβητικού συνδρόμου. Η άλλη όψη αφορά στην βραδεία ανάπτυξη επιπλοκών οι οποίες μακροπρόθεσμα είναι το ίδιο επικίνδυνες με τη διαβητική κετοξέωση. Η παρατεταμένη υπεργλυκαιμία προκαλεί βλάβες εκλεκτικά σε συγκεκριμένες ομάδες κύτταρων όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του αμφιβληστροειδούς, τα μεσαγγειακά κύτταρα των νεφρικών σπειραμάτων, τους νευρώνες και τα κύτταρα του Schwann των περιφερικών νεύρων. Υποστηρίζεται ότι αιτία αυτής της διαταραχής είναι η απουσία, στα κύτταρα αυτά, μηχανισμών ικανών να μειώνουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα γλυκόζης σε κατάσταση υπεργλυκαιμίας. Με τον μηχανισμό αυτό προσβάλλονται τα μικρά και τα μεγάλα αγγεία (μικρο και μακροαγγειοπάθεια αντίστοιχα) και το νευρικό σύστημα (περιφερική και αυτόνομη νευροπάθεια). Στη διαβητική μικροαγγειοπάθεια συγκαταλέγονται η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, νεφροπάθεια και νευροπάθεια ενώ συνέπεια της διαβητικής μακροαγγειοπάθειας είναι η ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου και η απόφραξη των μεγάλων περιφερικών αγγείων.<sup>18,19</sup>

Σήμερα, παρά τις σύγχρονες μεθόδους πρόληψης και αντιμετώπισης στην οφθαλμολογία και τη νεφρολογία, ο αριθμός των ατόμων με σοβαρές μορφές ΔΑ και ΔΝ δεν τείνει να περιοριστεί. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην αύξηση του αριθμού των διαβητικών ο οποίος τριπλασιάστηκε τα τελευταία 30

χρόνια, αλλά και στην αδυναμία της έγκαιρης διάγνωσης, ειδικά σε ό,τι αφορά το ΣΔ τύπου II.<sup>20</sup> Η ανεπαρκής ενημέρωση των ασθενών για το σωστό τρόπο παρακολούθησης της ασθένειάς τους παίζει, επίσης, σημαντικό ρόλο.<sup>19</sup> Θα πρέπει βέβαια στο σημείο αυτό, να σημειωθεί ότι νεότερες μελέτες εμφανίζουν πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα, σε σχέση με την εμφάνιση της ΔΑ και ΔΝ. Η μείωση, δηλαδή, του ποσοστού εμφάνισης των επιπλοκών του ΣΔ, φαίνεται να οφείλεται καθαρά στη αυστηρή ρύθμιση του σακχάρου και της αρτηριακής πίεσης, σε πολύ συνειδητοποιημένους ασθενείς. Αυτό το γεγονός επιβεβαιώνει το σημαντικό ρόλο της ενημέρωσης των ασθενών σε ό,τι αφορά τη νόσο από την οποία πάσχουν.<sup>20</sup>

Η απουσία, όμως, απόλυτα αποτελεσματικού θεραπευτικού χειρισμού στις περιπτώσεις ΔΑ και ΔΝ, σε όλους ανεξαιρέτως τους ασθενείς, επιβάλλουν την περαιτέρω κατανόηση της παθογένειας των επιπλοκών του ΣΔ και τη διεξοδική μελέτη του προβλήματος που πιθανόν να οδηγήσει στην πρόληψή του. Τον στόχο αυτό υπηρετεί η παρούσα μελέτη.

## Κεφάλαιο 2. Γενικό μέρος

## Σακχαρώδης διαβήτης και οφθαλμός

Ο ΣΔ είναι, ίσως, η μόνη μεταβολική νόσος που επηρεάζει τη μορφολογία και τη λειτουργία του οφθαλμού από τις εξωτερικές του δομές ως τον αμφιβληστροειδή. Ο παθολογικός μεταβολισμός της γλυκόζης συνδέεται με την παθογένεια των ιστολογικών βλαβών που χαρακτηρίζουν τη νόσο, κυριότερες από τις οποίες είναι η πάχυνση των βασικών μεμβρανών και η μικροαγγειοπάθεια. Η ΔΑ είναι μία από τις σημαντικότερες επιπλοκές του ΣΔ σε ό,τι αφορά τις επιπτώσεις του στον οφθαλμό. Μεταξύ των οφθαλμικών επιπλοκών του διαβήτη, ιδιαίτερη σημασία έχουν επίσης η πάρεση των οφθαλμοκινητικών νεύρων, η ισχαιμική οπτική νευροπάθεια, ο καταρράκτης, οι διαθλαστικές μεταβολές και το νεοαγγειακό γλαύκωμα. Σπάνια, βέβαια, οι οφθαλμολογικές παθήσεις αποτελούν πρώιμο εύρημα του ΣΔ.<sup>18</sup>

### 2.1. Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια

Η ΔΑ (Diabetic Retinopathy, DR) είναι μία χρόνια μικροαγγειοπάθεια, όπως έχει ήδη αναφερθεί και αντιπροσωπεύει μία από τις βασικές αιτίες επίκτητης τύφλωσης των ενηλίκων στις βιομηχανικές χώρες, και την πρώτη αιτία τύφλωσης ατόμων άνω των 65 ετών στο Δυτικό κόσμο.<sup>16</sup>

### 2.1.1. Ιστορική ανασκόπηση της ΔΑ

Οι πρώτες αναφορές για παροδική απώλεια της όρασης σε διαβητικούς, έγιναν το 1846 από το Γάλλο οφθαλμίατρο Appolinare Bouchardat, ο οποίος επισημαίνει επίσης ότι υπάρχουν περίοδοι βελτίωσης της όρασης όταν η ρύθμιση του διαβήτη είναι καλύτερη.<sup>21</sup> Παρόμοιες παρατηρήσεις κάνει, το 1853 και ο Francois Tavnignot.<sup>22</sup> Το 1850 ο Hermann von Helmholtz εφευρίσκει το άμεσο οφθαλμοσκόπιο με αποτέλεσμα οι οφθαλμίατροι να έχουν τη δυνατότητα της in vivo παρατήρησης του αμφιβληστροειδούς.<sup>23</sup>

Οι διαβητικές αλλοιώσεις της ωχράς αναφέρονται για πρώτη φορά από τον Eduard Jaeger το 1856.<sup>24</sup> Το 1869 ο Αμερικανός Henry Noyes δημοσίευσε την αναφορά «η αμφιβληστροειδίτιδα στην γλυκοζουρία» (“Retinitis in glycosuria”),<sup>26</sup> οι οποίες επιβεβαιώθηκαν το 1872 από τον Άγγλο Edward Nettleship στην διατριβή του με τίτλο «Περί οιδήματος ή κυστικής νόσου του αμφιβληστροειδούς» (“On oedema or cystic disease of the retina”).<sup>27</sup> Η παθοφυσιολογία των διαβητικών αλλοιώσεων από όλους τους ερευνητές εκείνης της εποχής παρουσιαζόταν ως φλεγμονώδης διότι επικρατούσε η άποψη ότι οι αλλοιώσεις οφείλονται κυρίως στην συνυπάρχουσα αρτηριακή υπέρταση και στην φλεγμονώδη απάντηση του αμφιβληστροειδούς στα αυξημένα επίπεδα της αλβουμίνης και κρεατινίνης στο αίμα και μόνο έμμεσα σε υπεργλυκοζαιμία. Ακολούθησαν δημοσιεύσεις των Nettleship και Mackenzie με περαιτέρω διευκρινίσεις για τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις του αμφιβληστροειδούς στα διαβητικά μάτια.<sup>28</sup> Το 1875, ο Appolinare Bouchardat στο βιβλίο του «Περί γλυκοζουρίας στο ΣΔ» (“De la glycosurie ou diabète

sucré”),<sup>12</sup> δείνει μία πιο σαφή εικόνα για τη ΔΑ, ενώ την ίδια χρονιά δημοσιεύεται και το άρθρο του Γερμανού οφθαλμιάτρου Theodor Leber με τον τίτλο «γλυκοζουρική αμφιβληστροειδίτιδα» που περιέχει κλινικές παρατηρήσεις από σειρά περιστατικών.<sup>29</sup>

Η πρώτη, όμως, ολοκληρωμένη περιγραφή της παραγωγικής αμφιβληστροειδοπάθειας προέρχεται από τον Wilhelm Manz το 1876.<sup>30</sup> Η απόδοση των διαβητικών αλλοιώσεων του βυθού στην ύπαρξη της διαβητικής μικροαγγειοπάθειας οφείλεται στον Arthur James Ballantyne, το 1943.<sup>31</sup> Το 1948, ο Michaelson πρότεινε την κλασική πλέον θεωρία του αγγειογενετικού παράγοντα X (X-factor).<sup>32</sup> Η θεωρία του Michaelson επαληθεύτηκε σχετικά πρόσφατα με την απομόνωση και μελέτη των αγγειογενετικών παραγόντων και ειδικά του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF). Στην διατύπωση της θεωρίας του παράγοντα X συνέβαλε σημαντικά ο μαθητής του Michaelson, ο Norman Ashton.<sup>33</sup> Ο Ashton, στη συνέχεια, απέδειξε τον ρόλο των τριχοειδικών και αρτηριδιακών εμφράκτων στην παθογένεια της ΔΑ.<sup>34</sup> Η μελέτη του αγγειακού δικτύου του αμφιβληστροειδούς in vivo έγινε εφικτή με την εισαγωγή της φλουοροαγγειογραφίας στην διαγνωστική των παθήσεων του αμφιβληστροειδούς.

Η ανακάλυψη της ινσουλίνης το 1921 από τους Frederick Banting και Charles Best έφερε επανάσταση στην θεραπεία του ΣΔ και παράτεινε σημαντικά το μέσο όρο διαβίωσης των διαβητικών.<sup>35</sup> Η μακρόχρονη επιβίωση των διαβητικών ασθενών οδήγησε σε αύξηση της συχνότητας εμφάνισης των όψιμων επιπλοκών της νόσου, μεταξύ των οποίων και της ΔΑ. Η μελέτη (Diabetes Control and Complications Trial - DCCT) απέδειξε ότι η αυστηρή

μεταβολική ρύθμιση του ΣΔ αποτελεί τον πλέον σημαντικό παράγοντα τόσο στην πρόληψη της εμφάνισης της ΔΑ, όσο και την επιβράδυνση της εξέλιξής της.<sup>80-88</sup>

Ο Γερμανός οφθαλμίατρος Gerd Meyer-Schwickerath εισήγαγε τη θεωρία της θεραπείας των παθήσεων του αμφιβληστροειδούς με φωτοπηξία με ηλιακή ακτινοβολία.<sup>37</sup> Η θεωρία αυτή βρήκε κλινική εφαρμογή από τον Paul Wetzig ο οποίος έκανε χρήση του Xenon arc. Με αυτό το Laser έκανε φωτοπηξία άμεσα στους νεοαγγειακούς θυσάνους σε εσθενείς με παραγωγική ΔΑ.<sup>38</sup> Η παναμφιβληστροειδική φωτοπηξία προτάθηκε από τους William Beetham και Lloyd Aiello οι οποίοι απέδειξαν την αποτελεσματικότητά της με την χρήση του Ruby laser.<sup>39</sup> Ταυτόχρονα, χάρη στις εργασίες του Francis L' Esperance και Arnall Patz, αναπτύχθηκε η τεχνική του Argon laser.<sup>40,41</sup> Η παναμφιβληστροειδική φωτοπηξία με Argon laser αποτελεί μέχρι σήμερα θεραπεία επιλογής στην παραγωγική ΔΑ.

Το 1953 ο Paulsen ανακοίνωσε μια περίπτωση υποστροφής της ΔΑ μετά από αιμορραγικό έμφρακτο υπόφυσης σε λεχώνα.<sup>42</sup> Αυτή η ανακοίνωση εισήγαγε την χειρουργική εκτομή και την ακτινοβολία της υπόφυσης ως θεραπεία της ΔΑ. Πολύ σύντομα η μέθοδος αυτή εγκαταλείφθηκε λόγω πολλών σοβαρών επιπλοκών και έδωσε θέση στην όλο και πιο δημοφιλή φωτοπηξία με laser. Η χειρουργική στην αντιμετώπιση της ΔΑ επανήλθε το 1971 με την πρόταση της οπίσθιας (pars plana) υαλοειδεκτομής από τον Robert Machemer.<sup>43</sup> Στα χρόνια που ακολούθησαν η υαλοειδεκτομή εδραιώθηκε στην αντιμετώπιση των δύσκολων περιπτώσεων της παραγωγικής ΔΑ και ειδικά της ενδοϋαλοειδικής αιμορραγίας και ελκτικής αποκόλλησης του αμφιβληστροειδούς.<sup>75-79</sup>



Το 1968, στο Airlie House της Virginia των Ηνωμένων Πολιτειών έλαβε χώρα το Airlie House Symposium on Treatment of Diabetic Retinopathy. Στο συμπόσιο αυτό προτάθηκε η σταδιοποίηση της ΔΑ η οποία βασίστηκε σε τυποποιημένες φωτογραφίες προς διευκόλυνση της ταξινόμησης, γνωστές ως Airlie House standard photographs.<sup>44</sup> Η Airlie House ταξινόμηση της ΔΑ τροποποιήθηκε έπειτα από την Diabetic Retinopathy Study και την Early Treatment Diabetic Retinopathy Study.

Απότοκος του συμποσίου ήταν η Diabetic Retinopathy Study (DRS), η πρώτη πολυκεντρική, τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη στην οφθαλμολογία, που δημοσιεύεται το 1981.<sup>45</sup> Η μελέτη αυτή εξασφάλισε την επιστημονική απόδειξη της αποτελεσματικότητας της παναμφιβληστροειδικής φωτοπηξίας (PRP) στην θεραπεία της ΔΑ και έδωσε βάση για τον προγραμματισμό της μελέτης της πρώιμης θεραπείας της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study, ETDRS), που ξεκίνησε το 1985.<sup>46-74</sup> Η τελευταία, αποσαφήνισε την φυσική πορεία της ΔΑ και επέβαλε την φωτοπηξία με Argon-laser ως θεραπεία επιλογής για την αντιμετώπιση της παραγωγικής ΔΑ και του διαβητικού οιδήματος της ωχράς.<sup>73</sup> Οι μελέτες DCCT<sup>80-88</sup> και UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study)<sup>89-93</sup> διευκρίνισαν τον ευεργετικό ρόλο του αυστηρού γλυκαιμικού ελέγχου στην μείωση του κινδύνου εμφάνισης και εξέλιξης της ΔΑ και άλλων μικροαγγειακών επιπλοκών του ΣΔ.

## 2.1.2. Η παθοφυσιολογία της ΔΑ - παθογένεια

Ποικίλοι προδιαθεσικοί παράγοντες της ΔΑ έχουν ήδη αναγνωρισθεί. Αν και η παθογένεια δεν είναι ακόμη, εξολοκλήρου, τεκμηριωμένη, όπως ήδη αναφέρθηκε και πολλά σημεία στο μηχανισμό ανάπτυξης των όψιμων επιπλοκών του διαβήτη παραμένουν αδιευκρίνιστα, κοινός τόπος όλων είναι οι κάτωθεν αναφερόμενοι προδιαθεσικοί παράγοντες της ΔΑ.<sup>93</sup>

### 2.1.2.1. Προδιαθεσικοί παράγοντες

Η εμφάνιση και η εξέλιξη της ΔΑ εξαρτάται από συστηματικούς και οφθαλμικούς παράγοντες, που περιγράφονται στη συνέχεια.

- **Συστηματικοί παράγοντες**

Η θεραπεία με ινσουλίνη επηρεάζει την έναρξη και την εξέλιξη της ΔΑ. Με τη χορήγηση της ινσουλίνης, παρατηρείται συχνά επιδείνωση της ΔΑ κατά τους πρώτους μήνες της θεραπείας, παρά τη βελτίωση της ρύθμισης του σακχάρου στο αίμα και στους δύο τύπους του ΣΔ.<sup>89-92,93</sup>

Τα επίπεδα της γλυκόζης και των λιπιδίων του αίματος επίσης, συνδέονται άμεσα με την εξέλιξη της ΔΑ.<sup>93</sup> Η μελέτη Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)<sup>80-88</sup> έδειξε ότι οι ασθενείς με στενή παρακολούθηση και ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης έχουν πολύ καλύτερη εξέλιξη από αυτούς που ακολουθούν ένα μη αυστηρό πρόγραμμα. Εκτός από τις τιμές της γλυκόζης ένας άλλος χρήσιμος δείκτης είναι η τιμή της

γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c). Τιμές HbA1c < 6% θεωρούνται ενδεικτικές καλού γλυκαιμικού ελέγχου.<sup>80-88</sup>

Σε ό,τι αφορά τους παχύσαρκους, οι συνεχείς ανάγκες σε ινσουλίνη πιθανόν να οδηγούν σε ανάπτυξη περιφερικής αντίστασης στην ινσουλίνη, με αποτέλεσμα την επιδείνωση του ΣΔ και κατ' επέκταση της ΔΑ.<sup>3,93</sup> Παράλληλα η συστολική υπέρταση σχετίζεται με την πρώιμη εμφάνιση της ΔΑ, ενώ αντίθετα ο αυστηρός έλεγχος της υπέρτασης μειώνει κατά 37% τη μικροαγγειοπάθεια.<sup>3,93</sup>

Η παρουσία χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (ΧΝΑ) επηρεάζει δυσμενώς τη φυσική πορεία της ΔΑ, καθώς μαρτυρά προχωρημένη μικροαγγειοπάθεια.<sup>9,14</sup>

Η ρύθμιση της γλυκόζης στη διάρκεια της κύησης αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την εμφάνιση και την εξέλιξη της ΔΑ, ενώ αντίθετα η τα υψηλά επίπεδα σακχάρου στη διάρκεια της εγκυμοσύνης επιβαρύνουν τη φυσική πορεία της ΔΑ, στο μέλλον.<sup>116,117</sup>

Η αναιμία πιθανώς επιβαρύνει την υπάρχουσα υποξία λόγω των διαταραχών στη μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ενώ το κάπνισμα επιδεινώνει τις αθηροσκληρωτικές βλάβες κι δημιουργεί ένα υπόστρωμα στην εξέλιξη της μικροαγγειοπάθειας.<sup>4,93</sup> Τέλος τα αντιπηκτικά φάρμακα πιθανώς να επιβαρύνουν τις διαταραχές του συστήματος πήξη-ινωδόλυσης, που εμφανίζονται στο μηχανισμό των επιπλοκών του ΣΔ.<sup>4,93</sup>

- **Οφθαλμικοί παράγοντες**

Η αποκόλληση του υαλοειδούς πιθανόν να δημιουργεί ένα καλό υπόστρωμα για την ανάπτυξη παραγωγικής ΔΑ και την επιμονή του διαβητικού οιδήματος της ωχράς,<sup>6,14,93</sup> ενώ και η επέμβαση καταρράκτη προκαλεί επιδείνωση της ΔΑ.<sup>14,93</sup> Η μυωπία αντίθετα θεωρείται ότι ασκεί κάποια ανασταλτική επίδραση στην εμφάνιση και την εξέλιξη της ΔΑ.<sup>14,93</sup>

Σύμφωνα με τη μελέτη ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study), άτομα με πολύ σοβαρή μη παραγωγική ΔΑ ή ήπια προς σοβαρή παραγωγική ΔΑ έχουν 60 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν υψηλού κινδύνου παραγωγική ΔΑ σε 1 έτος.<sup>52,93</sup>

### **2.1.2.2. Παράγοντες κινδύνου**

Πολλοί παράγοντες κινδύνου ενέχονται στην εμφάνιση και την εξέλιξη της ΔΑ. Ένας από αυτούς είναι η διάρκεια του ΣΔ. Όσο μεγαλύτερο είναι το προσδόκιμο επιβίωσης σε έναν σακχαροδιαβητικό ασθενή τόσο αυξάνεται η πιθανότητα εμφάνισης ΔΑ.<sup>72</sup> Ένας άλλος παράγοντας είναι η κακή ρύθμιση του σακχάρου που έχει δυσμενή επίπτωση στην εξέλιξη της ΔΑ.<sup>72,80-88</sup> Στους παράγοντες κινδύνου ανοίκουν επίσης το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ.

Ανεξάρτητα όμως με τους παράγοντες κινδύνου και σύμφωνα με την κλασική άποψη για την παθολογία της ΔΑ, κάθε αλλοίωση του βυθού των διαβητικών είναι αποτέλεσμα παθολογικών μεταβολών στα αμφιβληστροειδικά αγγεία. Αυτός είναι και ο λόγος που η ΔΑ θεωρείται κυρίως

αγγειακή διαταραχή. Όμως, η ύπαρξη διαταραχών της αμφιβληστροειδικής λειτουργίας, ακόμα και σε απουσία αγγειακών βλαβών, αποδεικνύει την συμμετοχή και νευροαισθητηριακής διαταραχής, η οποία αποδίδεται σε συστηματικές μεταβολικές διαταραχές της νευροαξονικής λειτουργίας του αμφιβληστροειδούς ή και άλλων τμημάτων του οπτικού συστήματος.<sup>94</sup>

Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι έχουν αναφερθεί υποομάδες υπερήλικων ασθενών με ΣΔ τύπου II που δεν ανέπτυξαν ΔΑ, ανεξάρτητα από τον πτωχό έλεγχο της γλυκόζης, ενώ άλλες υποομάδες, με αρκετά καλό έλεγχο του σακχάρου, εμφάνισαν ΔΑ. Η ανάλυση υποομάδων ασθενών έδειξε σημαντική οικογενή μεταβίβαση της ΔΑ, ειδικά σε ασθενείς με εκτεταμένη παραγωγική ΔΑ. Οι ενδείξεις αυτές αποτελούν πειστικά στοιχεία ότι οι γενετικοί παράγοντες συμβάλλουν στην εμφάνιση της ΔΑ.<sup>17</sup> Αρκετές μελέτες προτείνουν διάφορα γονίδια που συμβάλλουν ως συνιστώσες, στην εμφάνιση της νόσου. Πάνω σε αυτή την παρατήρηση στηρίζονται, η μεγαλύτερης κλίμακας, μελέτες συσχέτισης (*association studies*) ή μελέτες εύρεσης ύποπτων γονιδίων (*candidate gene studies*).<sup>17</sup>

Σύμφωνα λοιπόν με αυτές τις μελέτες τα ύποπτα γονίδια που εμπλέκονται στην μεταβολική οδό των πολυολών και κατ' επέκταση αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση και την εξέλιξη της ΔΑ είναι τα εξής:

- angiotensin-I converting enzyme (*ACE*),
- angiotensin II type 1 receptor (*AGTR1*),
- angiotensinogen (*AGT*),
- vascular endothelial growth factor (*VEGF*),
- aldose reductase (*AKR1B1*),

receptor for advanced glycation endproducts (*RAGE*),  
glucose transporter 1 (*GLUT1*),  
apolipoprotein E (*APOE*),  
methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*),  
plasminogen activator inhibitor-1 (*PAI-1*),  
 $\alpha$ 2 $\beta$ 1 Integrin (*ITGA2*),  
peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPAR- $\gamma$* ),  
and nitric oxide synthases (*NOS3*).

Η επιβεβαίωση της συσχέτιση αυτών των γονιδίων με τη ΔΑ ή η τυχαία σύνδεσή τους έχει διερευνηθεί από πολλές μελέτες.<sup>95-115</sup> Αντικείμενο της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη συσχετισμού των πολυμορφισμών του γονιδίου της αναγωγάση της αλδόσης - aldose reductase (*AKR1B1*) με τον κίνδυνο εμφάνισης της ΔΑ και ΔΝ σε σακχαροδιαβητικούς ασθενείς. Στην προσπάθεια διερεύνησης των μηχανισμών επιρροής του συγκεκριμένου γονιδίου στην παθογένεια της ΔΑ, πρέπει πρώτα να διευκρινιστεί η μεταβολική οδός της γλυκόζης στον αμφιβληστροειδή.

### 2.1.2.3. Γλυκόζη και αμφιβληστροειδής

Όπως συμβαίνει στους περισσότερους ιστούς του σώματος, η γλυκόζη είναι το απαραίτητο «καύσιμο» για τη λειτουργία του αμφιβληστροειδούς. Όμως, η αδέσμευτη γλυκόζη φαίνεται να είναι τοξική για τα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς. Γι'αυτό το λόγο, τα γλοιακά κύτταρα (αστροκύτταρα, κύτταρα του Müller), βρισκόμενα σε στενή ανατομική σχέση με τα τριχοειδή

του αμφιβληστροειδούς, προσλαμβάνουν τη γλυκόζη, τη μεταβολίζουν σε πυροσταφυλικό οξύ και στη συνέχεια, σε γαλακτικό οξύ και την προσφέρουν ως γαλακτικό οξύ στους νευρώνες, στο εξωκυττάριο υγρό και στα άλλα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς. Η ενεργοποίηση του μεταβολισμού της γλυκόζης στον αμφιβληστροειδή και η μετατροπή της σε γαλακτικό οξύ γίνεται με τη βοήθεια του γλουταμινικού οξέος και του αμμωνίου ( $\text{NH}_4^+$ ). Έτσι, το 90% της ολικής γλυκόζης που μεταβολίζεται μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ.<sup>5</sup> Πιθανολογείται ότι ο λόγος που συμβαίνει αυτή η μετατροπή της γλυκόζης σε γαλακτικό, ώστε να χρησιμοποιηθεί από τους φωτοϋποδοχείς, είναι για να μην υπάρχει ανταγωνιστική κατανάλωση του «καυσίμου» από τα περιβάλλοντα κύτταρα.<sup>5,9</sup>

#### **2.1.2.4. Μεταφορά γλυκόζης στον αμφιβληστροειδή**

Η γλυκόζη φτάνει στον αμφιβληστροειδή με δύο αιματικές οδούς:

- Η πρώτη οδός είναι μέσω των τριχοειδών που αποτελούν τον έσω αιματο- αμφιβληστροειδικό φραγμό. Η γλυκόζη του αίματος διέρχεται, με ενεργητική μεταφορά, τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών και στη συνέχεια, περνά στα κύτταρα της γλοίας με διευκολυνόμενη διάχυση.
- Η δεύτερη οδός άφιξης της γλυκόζης στον αμφιβληστροειδή είναι μέσω της χοριοτριχοειδικής κυκλοφορίας, της μεμβράνης του Bruch και των κυττάρων του μελάγχρου επιθηλίου, δηλαδή

διαπερνώντας τον έξω αμφιβληστροειδικό φραγμό. Τα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, όπως και του εγκεφάλου, είναι μη ινσουλινοεξαρτώμενα σε ό,τι αφορά τη μεταφορά της γλυκόζης σε αυτά. Σε καταστάσεις μειωμένης παροχής γλυκόζης, τα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς προσπαθούν να προσλάβουν το μέγιστο δυνατό αυτής. Αντίθετα, σε καταστάσεις περίσσειας ποσότητας γλυκόζης, όπως συμβαίνει κατά την υπεργλυκαιμία, η υπερβολική συγκέντρωσή της στα κύτταρα είναι τοξική.<sup>4,9,15</sup>

#### **2.1.2.5. Αποθήκευση γλυκόζης στον αμφιβληστροειδή**

Ο αμφιβληστροειδής στερείται ικανής αποθηκευτικής δύναμης σε ό,τι αφορά τη γλυκόζη, με εξαίρεση τα κύτταρα του Müller, όπως έχει προαναφερθεί. Σε αυτά, ένα μέρος της γλυκόζης που προσλαμβάνεται μετατρέπεται σε γλυκογόνο. Εκτός από τα κύτταρα του Müller, φαίνεται ότι και το υαλοειδές μπορεί να λειτουργήσει ως αποθήκη γλυκόζης με τη μορφή του γλυκογόνου. Έτσι, σε καταστάσεις υποξίας, το υαλοειδές μπορεί για λίγο να τροφοδοτήσει τον αμφιβληστροειδή με γλυκόζη.<sup>2,9</sup>

#### **2.1.2.6. Μεταβολισμός της γλυκόζης στον αμφιβληστροειδή**

Η γλυκόζη μεταβολίζεται στον αμφιβληστροειδή προς απόδοση ενέργειας μέσω τριών οδών:



- Γλυκόλυση
- Τρικαρβοξυλίωση (κύκλος του κιτρικού οξέος ή κύκλος του Krebs)
- Οδός των φωσφορικών πεντοζών

Η αερόβια γλυκόλυση παρέχει ενέργεια με τη μορφή του ATP, καθώς και τις προϋποθέσεις για την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος προς ακετυλο-συνένζυμο Α. Σε περιπτώσεις, όμως, υπεργλυκαιμίας γίνεται εκτροπή της γλυκόλυσης προς την παραγωγή μεθυλ-γλυοξάλης ή προς την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Ο κύκλος του κιτρικού οξέος αποτελεί τη συνέχεια της γλυκόλυσης και πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια, ενώ η οδός των φωσφορικών πεντοζών είναι εναλλακτικό μονοπάτι της γλυκόλυσης και επιτελείται – όπως και η γλυκόλυση – στο κυτταρόπλασμα.<sup>4,9</sup>

#### **2.1.2.7. Βιοχημικές μεταβολές στον αμφιβληστροειδή**

Η χρόνια υπεργλυκαιμία προκαλεί αμφιβληστροειδοπάθεια και ειδικού τύπου μικροαγγειοπάθεια σε διάφορους άλλους ιστούς με τους ακόλουθους ανεξάρτητους βιοχημικούς μηχανισμούς:

1. Ενεργοποίηση της οδού των πολυολών (ή της αναγωγάσης της αλδόζης), που είναι και το θέμα της συγκεκριμένης μελέτης.<sup>9,96,97</sup>
2. Ενεργοποίηση ορισμένων ισομορφών της πρωτεϊνικής κινάσης C.<sup>102,103</sup>
3. Αύξηση παραγωγής τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (advanced glycation end products ή AGE).<sup>9,100</sup>

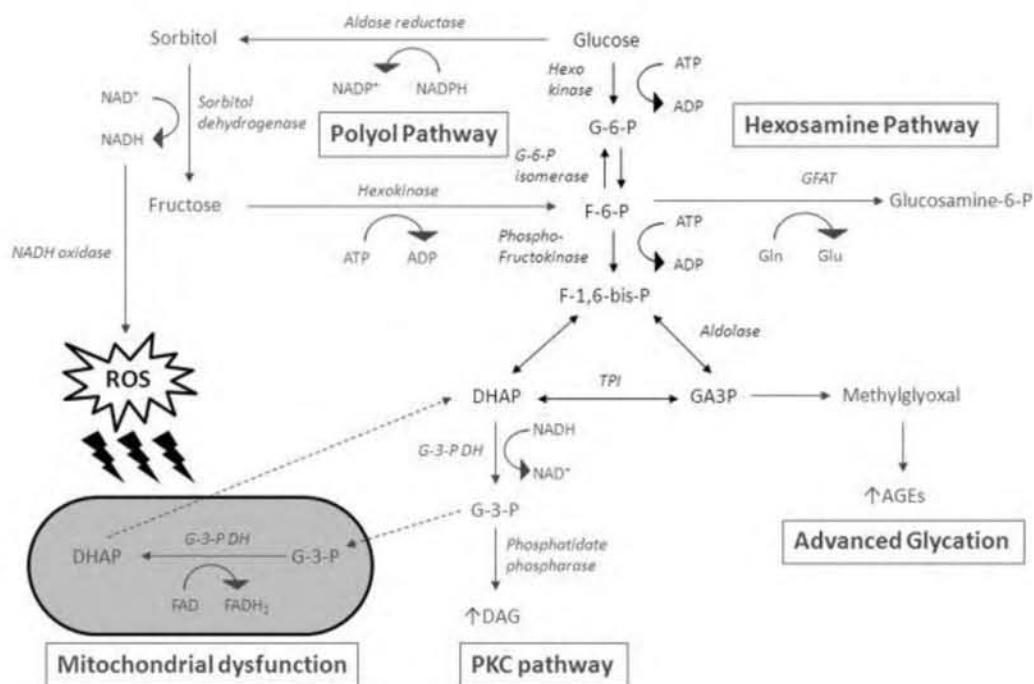
#### 4. Υπερδραστηριοποίηση της οδού των εξοζαμινών.<sup>9,109</sup>

Μία επιπλέον βιοχημική οδός φαίνεται ότι αποτελεί η αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species ή ROS) στα μιτοχόνδρια.<sup>9,111</sup>

Η ενεργοποίηση των ανωτέρω μεταβολικών οδών φαίνεται να μεσολαβεί για την εμφάνιση των διαβητικών διαταραχών μέσω της τροποποίησης του κυτταρικού μεταβολισμού, των αλλαγών στην έκφραση αρκετών γονιδίων και της διέγερσης της παραγωγής αυξητικών παραγόντων και ειδικότερα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor–VEGF).<sup>9,112-115</sup>

#### **2.1.2.8. Η ενεργοποίηση της οδού των πολυολών (η υπεργλυκαιμία αυξάνει τη δραστηριότητα της αναγωγάσης της αλδόζης)**

Τα περισσότερα σάκχαρα, μόλις εισέλθουν στα κύτταρα, φωσφορυλίονται τάχιστα με αποτέλεσμα να παγιδεύονται μέσα στα κύτταρα, γιατί οι οργανικές φωσφορικές ενώσεις δεν περνούν ελεύθερα μέσω των μεμβρανών. Ένας εναλλακτικός μηχανισμός για το μεταβολισμό των μονοσακχαριτών είναι η μετατροπή τους σε πολυόλες με την αναγωγή της αλδεϋδοομάδας. Έτσι η αναγωγάση της αλδόζης (ALR), που είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο, ανάγει τη γλυκόζη και σχηματίζει τη σορβιτόλη (γλυκικόλη) (Σχήμα 2.2.).<sup>9,96,106-108</sup>



Σχήμα 2.2. Ο μεταβολισμός της σορβιτόλης. (Ανατύπωση από Tang. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. Front Pharmacol. 2012; 3: 87).

Η ALR βρίσκεται σε πολλούς ιστούς του οργανισμού, όπως είναι ο κρυσταλοειδής φακός του οφθαλμού, τα περικύτταρα καθώς και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του αμφιβληστροειδούς, τα κύτταρα του Schwann των περιφερικών νεύρων, τα νεφρά, τον πλακούντα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα κύτταρα των ωθηκών και των σπερματοδόχων κύστεων. Πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι η ALR βρίσκεται σε αυξημένη συγκέντρωση στο μελαχρωστικό επιθήλιο (55% ατόμων με μη παραγωγική ΔΑ και 88% ατόμων με παραγωγική ΔΑ), στα περικύτταρα και στο ενδοθήλιο των τριχοειδών του αμφιβληστροειδούς. Στο ήπαρ, στις ωθήκες, στο σπέρμα και στα κύτταρα των σπερματοδόχων κύστεων υπάρχει και ένα δεύτερο ένζυμο, η δευδρογονάση της σορβιτόλης που οξειδώνει τη σορβιτόλη και σχηματίζει τη φρουκτόζη.<sup>9,96-99</sup>

Επειδή δεν είναι απαραίτητη η ύπαρξη ινσουλίνης, για την είσοδο της γλυκόζης στα κύτταρα που προαναφέρθηκαν, μεγάλα ποσά γλυκόζης εισέρχονται στα κύτταρα αυτά σε περιόδους υπεργλυκαιμίας, όπως συμβαίνει στο Σ.Δ. Η υψηλή ενδοκυτταρική συγκέντρωση γλυκόζης ενεργοποιεί την εναλλακτική μεταβολική οδό των πολυολών μέσω της ενζυματικής δράσης της ALR. Λόγω της χαμηλής συγγένειας (affinity) της γλυκόζης προς την ALR, αυτή η οδός συμμετέχει πολύ λίγο στο μεταβολισμό της γλυκόζης σε κατάσταση ευγλυκαιμίας. Όταν όμως η γλυκόζη περνά μέσα στο κύτταρο σε μεγάλες ποσότητες, όπως συμβαίνει, σε καταστάσεις υπεργλυκαιμίας, η δραστηριότητα της οδού της ALR γίνεται πιο έντονη. Με αυτό τον τρόπο η ALR μειώνει τις τοξικές αλδεΐδες, μετατρέποντάς τις σε ανενεργές αλκοόλες.<sup>9,97</sup>

Η σορβιτόλη αυτή, σε αντίθεση με τη γλυκόζη, δεν διαπερνά αποτελεσματικά τις κυτταρικές μεμβράνες και επομένως παραμένει παγιδευμένη μέσα στα κύτταρα. Η συσσώρευση πολυολών σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας οδηγεί στην πάχυνση της βασικής μεμβράνης των αγγείων του αμφιβληστροειδούς, στην απώλεια των περικυττάρων και στο σχηματισμό μικροανευρισμάτων, γιατί η ALR καταναλώνει μεγάλες ποσότητες του συνενζύμου NADPH. απαραίτητου για την αναγέννηση της βασικής κυτταρικής αντίοξειδωτικής ουσίας της γλουταθειόνης.<sup>106</sup> Το φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (NADPH) είναι το συνένζυμο αυτής της αντίδρασης, αλλά ταυτόχρονα και της αντίδρασης αναγωγής της γλουταθειόνης. (Σχήμα 2.2.).<sup>9,109</sup> Η έλλειψη του NADPH, λόγω κατανάλωσης και κατ' επέκταση της γλουταθειόνης έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS - reactive oxygen species) στα κύτταρα και

έτσι να γίνονται πιο ευάλωτα στο οξειδωτικό στρες.<sup>107</sup> Επομένως, η ALR2 είναι ένζυμο κλειδί στην παθογένεια ενός αριθμού μικροαγγειακών επιπλοκών σε ό,τι αφορά το Σ.Δ.<sup>106,107</sup>

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να διευκρινιστεί ότι υπάρχουν συγγενή ένζυμα με την αναγωγή της αλδόζης. Στην ίδια οικογένεια ανήκει και ένα άλλο ένζυμο η αναγωγή των αλδεϋδών (ALR1). Τα ένζυμα ALR2 και ALR1 εμφανίζουν σημαντική δομική ομοιότητα τόσο στη πρωτοταγή (~65% ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων τους) όσο και στην τεταρτοταγή δομή τους. Η ALR2, όμως, είναι το ένζυμο κλειδί στην παθογένεια ενός αριθμού μικροαγγειακών επιπλοκών σε ό,τι αφορά το Σ.Δ., όπως προαναφέρθηκε. Το γονίδιο που κωδικοποιεί το συγκεκριμένο ένζυμο είναι το AKR1B1.<sup>9,107,109</sup> Η διερεύνηση του συσχετισμού του γονιδίου AKR1B1 της ALR2 και των πολυμορφισμών της με τη Δ.Α. και τη Δ.Ν. είναι το επίκεντρο της συγκεκριμένης μελέτης.

#### **2.1.2.9. Η επίδραση των τελικών προϊόντων υψηλής γλυκοζυλίωσης (AGEPs)**

Ο σχηματισμός των AGEPs προκαλεί ένα είδος «δυσκαμψίας» της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (matrix) η οποία κλινικά εκφράζεται με την μείωση της ελαστικότητας των ιστών πχ. των αγγειακών τοιχωμάτων. Τα AGEPs επηρεάζουν, επίσης, τη λειτουργία των μακροφάγων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και των λείων μυϊκών κυττάρων του τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων.<sup>9,100</sup>

Έτσι, πιστεύεται ότι η αυξημένη ποσότητα γλυκόζης στον ενδοκυττάριο χώρο αποτελεί το έναυσμα για το σχηματισμό AGE τόσο στον ενδοκυττάριο

όσο και στον εξωκυττάριο χώρο. Τα AGE και τα ενδοκυττάρια πρόδρομα μόρια τους επιδρούν στους διαβητικούς ιστούς-στόχους με τριών ειδών αλληλεπιδράσεις:

- μεταβολή της λειτουργίας των πρωτεϊνών,
- αλληλεπίδραση με τους κυτταρικούς υποδοχείς διαφόρων τύπων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, και
- παρεμβολή ανάμεσα στα μόρια μακροζωίας της διάμεσης ουσίας των κυττάρων και τους υποδοχείς της ουσίας αυτής.<sup>100</sup>

#### **2.1.2.10. Ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC)**

Η υπεργλυκαιμία οδηγεί σε αύξηση της δραστηριότητας της PKC, που συνοδεύεται από σειρά διαταραχών όπως η αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμελιώδους ουσίας (matrix proteins) (π.χ. του κολλαγόνου και της φιμπρονεκτίνης) και η αυξημένη έκφραση των αγγειοδραστικών διαμεσολαβητών (vasoactive mediators) όπως η ενδοθηλίνη.<sup>102</sup> Η PKC-β2 φαίνεται να ευθύνεται, κυρίως, για τις σχετιζόμενες με την υπεργλυκαιμία επιπλοκές ενώ η PKC-β αποτελεί παράγοντα απαραίτητο για την κυτταρική μεταβίβαση του σήματος (signaling) του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), που οδηγεί σε αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων, και στην ανάπτυξη της αμφιβληστροειδικής νεοαγγείωσης. Οι υπόλοιπες ισομορφές της PKC (α, β1, β2 και ε) έχουν σημαντικά μικρότερη συμμετοχή.<sup>9,103</sup>

### **2.1.2.11. Αυξημένη δραστηριότητα της οδού της εξοζαμίνης**

Σε συνθήκες με υψηλά ενδοκυτταρικά επίπεδα γλυκόζης, ενεργοποιείται ακόμα μία εναλλακτική οδός, η οδός της εξοζαμίνης, μέσω της οποίας ένα μέρος της 6-φωσφορικής φρουκτόζης μεταβολίζεται σε ουριδίνιο-διφωσφορική (UDP) N-ακετυλογλυκοζαμίνη. Η γλυκοζαμίνη προκαλεί διαταραχές στην φωσφορυλίωση των παραγόντων της γονιδιακής μεταγραφής. Αυτό με την σειρά του οδηγεί σε μεταβολές στην έκφραση αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF – transforming growth factor) και του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου1 (PAI-1 plasminogen activator inhibitor), των οποίων τα αυξημένα επίπεδα προκαλούν αγγειακή απόφραξη και ισχαιμία.<sup>9,101</sup>

### **2.1.2.12. Οξειδωτικό στρες ως κοινός μηχανισμός της παθοφυσιολογίας της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας**

Σύμφωνα με τον Michael Brownlee και οι τέσσερις προαναφερθέντες μηχανισμοί έχουν ως κοινό σημείο εκκίνησης, το οξειδωτικό στρες.<sup>111</sup> Ο Brownlee υποστηρίζει ότι η παραγωγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS - reactive oxygen species) αποτελεί την πρωτογενή διαταραχή στα μιτοχόνδρια των υπερφορτωμένων με γλυκόζη κυττάρων.<sup>9</sup> Την υπόθεση του Brownlee ενισχύει η παρατήρηση ότι η ρύθμιση της υπερπαραγωγής του

υπεροξειδίου καταστέλλει τους τρεις από τους τέσσερις μηχανισμούς της διαβητικής διαταραχής και συγκεκριμένα την οδό των πολυολών, τον σχηματισμό των τελικών προϊόντων υψηλής γλυκοζυλίωσης (AGEPs) και την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC).<sup>111</sup>

### 2.1.2.13. Αυξητικοί παράγοντες

Η υπεργλυκαιμία του ΣΔ αυξάνει την παραγωγή σημαντικού αριθμού αυξητικών παραγόντων. Σε αυτούς συγκαταλέγονται ο Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) η αυξητική ορμόνη, ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας-1 (insulin-like growth factor-I, IGF-I), ο β-αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (transforming growth factor-β, TGF-β) και ο αυξητικός παράγοντας ο προερχόμενος από το μελάγχρουν επιθήλιο (pigment epithelium-derived growth factor, PEDF).<sup>112</sup>

Σε φυσιολογικές συνθήκες, η συνδυασμένη δράση των διαφόρων τύπων αυξητικών παραγόντων, οδηγεί σε ομαλή ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου.<sup>113</sup> Σε ό,τι αφορά παθολογικές καταστάσεις, όμως, έχει βρεθεί ότι οι αγγειογενετικοί παράγοντες παίζουν ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη της ΔΑ. Επόμενο βήμα είναι η σύνθεση μορίων ικανών να τροποποιούν την έκφραση των αυξητικών παραγόντων παρέχοντάς μας τη δυνατότητα θεραπευτικής παρέμβασης για την αντιμετώπιση της ΔΑ. Ήδη δοκιμάζονται αρκετές αντιαγγειογενετικές ουσίες για την θεραπεία της ΔΑ.<sup>9,114,115</sup>



### 2.1.3. Κλινική εικόνα ΔΑ

Ο αμφιβληστροειδής απαρτίζεται από το μελάγχρουν επιθήλιο (ΜΕ) και τον ιδίως αμφιβληστροειδή (ή νευροαμφιβληστροειδή). Ο ιδίως αμφιβληστροειδής περιέχει τρεις βασικές κυτταρικές ομάδες:

- τα νευρικά κύτταρα,
- τα κύτταρα γλοίας και
- τα αιμοφόρα αγγεία.

Τα αγγεία του αμφιβληστροειδούς είναι ανάλογα των εγκεφαλικών αγγείων λόγω της ικανότητας τους να διατηρούν τον έσω αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό και της ιδιότητας της αυτορύθμισης (auto-regulation). Ανατομικά, ο έσω αιματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός εξασφαλίζεται από μονή στιβάδα μη θυριδωτών ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία συνδέονται σταθερά μεταξύ τους. Τα κύτταρα του ενδοθηλίου στηρίζονται προς τα έξω στην βασική μεμβράνη και αυτή με τη σειρά της καλύπτεται από ένα διακεκομμένο στρώμα περικυττάρων. Σε φυσιολογικές συνθήκες η αναλογία των ενδοθηλιακών κυττάρων προς τα περικύτταρα είναι 1:1. Τα αμφιβληστροειδικά αγγεία στερούνται έσω ελαστικού πετάλου και μυϊκής στιβάδας. Λεία μυϊκά κύτταρα είναι ενίοτε παρόντα στα μεγάλα αγγεία κοντά στην οπτική θηλή αλλά γενικώς απουσιάζουν από τον αμφιβληστροειδή.<sup>14</sup>

Από ιστολογική άποψη μόνο η κεντρική αρτηρία του αμφιβληστροειδούς είναι αληθινή αρτηρία και, ως τέτοια, προσβάλλεται από αθηρωμάτωση. Οι κλάδοι της, επειδή ακριβώς είναι αρτηριόλια, δεν

παρουσιάζουν αθηρωματικές βλάβες, είναι όμως επιρρεπείς σε υπερτασικές βλάβες και αρτηριοσκλήρυνση. Ιδιαίτερο ανατομικό χαρακτηριστικό των αμφιβληστροειδικών αγγείων αποτελούν τα σημεία διασταύρωσης των φλεβιδίων με τα αρτηριόλια, όπου η βασική μεμβράνη των διασταυρούμενων αγγείων είναι κοινή.

Η ΔΑ ανήκει στις όψιμες επιπλοκές του ΣΔ. Συγκεκριμένα, στο 50% των διαβητικών τύπου I, η ΔΑ πρωτοεμφανίζεται 7 χρόνια μετά τη διάγνωση του ΣΔ, όπως ήδη έχει αναφερθεί. Ο ανάλογος συσχετισμός για τους διαβητικούς τύπου II δεν είναι εφικτός, λόγω της δυσκολίας στον ακριβή προσδιορισμό της έναρξης της νόσου.

Οι ασθενείς χωρίς βυθοσκοπικά ευρήματα ΔΑ δεν αναφέρουν, συνήθως, διαταραχές στην όραση, αλλά όταν υποβάλλονται σε ειδικές δοκιμασίες, τότε αυτές, συχνά, αποδεικνύονται παθολογικές. Ενδεικτικά σημειώνεται ότι, η δοκιμασία της φωτεινής αντίθεσης (contrast sensitivity) και η αντίληψη χρωμάτων σε μπλε και κίτρινο ανιχνεύονται διαταραγμένες πριν την κλινική εμφάνιση της ΔΑ. Επίσης, παρατηρούνται μείωση του ύψους του επάρματος β του κλασσικού ηλεκτροαμφιβληστροειδογράμματος, και πρώιμες διαταραχές του πολυεστιακού ηλεκτροαμφιβληστροειδογραφήματος πριν την εμφάνιση των αγγειακών αλλοιώσεων του βυθού. Τα προαναφερθέντα τεστ εκφράζουν στο σύνολό τους βλάβη των έσω στιβάδων του αμφιβληστροειδούς. Στην «προκλινική» φάση της ΔΑ, εκτός από την νευροαξονική βλάβη, στα αγγεία του αμφιβληστροειδούς παρατηρείται αυξημένη αιματική ροή η οποία συνδυάζεται με αυξημένη διαπερατότητα του έσω αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού.

Από παθοφυσιολογική άποψη, η αμφιβληστροειδική αγγειακή απόφραξη και η παθολογική διαπερατότητα των αμφιβληστροειδικών αγγείων, θεωρούνται υπεύθυνες για την πρόκληση των αλλοιώσεων της ΔΑ.<sup>14</sup>

### 2.1.3.1. Αγγειακή απόφραξη

Τα τριχοειδικά αγγεία του αμφιβληστροειδούς έχουν δύο χαρακτηριστικούς τύπους πυρήνων:

τους πυρήνες των ενδοθηλιακών κυττάρων και

τους πυρήνες των ενδοτοιχωματικών περικυττάρων.

Στον φυσιολογικό αμφιβληστροειδούς η αναλογία των πυρήνων αυτών είναι 1:1.

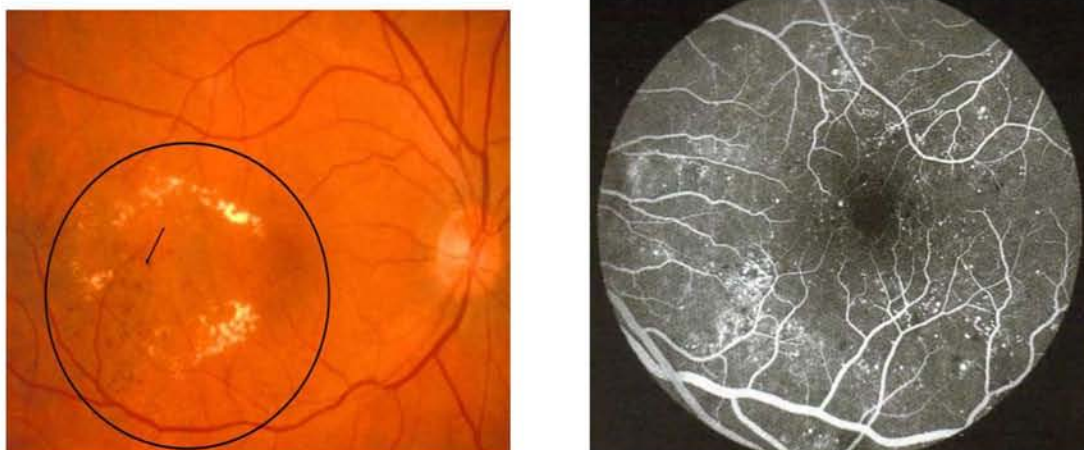
Σε οφθαλμούς με ΔΑ παρατηρείται εκλεκτική μείωση της αναλογίας των περικυττάρων προς τα ενδοθηλιακά κύτταρα με αποτέλεσμα η σχέση να είναι μικρότερη της μονάδος. Παράλληλα, σε μερικά τριχοειδούς είναι δυνατόν να παρατηρείται παντελής έλλειψη των πυρήνων και των δύο τύπων κυττάρων, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται τα «ακύτταρα τριχοειδούς» (ghost capillaries), ενώ σε παρακείμενα διασταλμένα τριχοειδούς, να είναι εμφανής η παραγωγικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων.<sup>94</sup>

Τα **τριχοειδικά έμφρακτα** αποτελούν τις πλέον πρώιμες αγγειακές βλάβες της ΔΑ. Παρουσιάζονται ως μικρές μη διηθούμενες ισχαιμικές περιοχές, στα όρια των οποίων παρατηρούνται μικροανευρίσματα.

Τα **μικροανευρίσματα** σχηματίζονται στα αποφραγμένα άκρα των μετά-τριχοειδικών φλεβιδίων και είναι επίσης χαρακτηριστικά ευρήματα της πρώιμης ΔΑ. Πρόκειται για σακοειδείς διευρύνσεις των αγγείων, που πιθανότατα οφείλονται στην υπερτροφία των ενδοθηλιακών κυττάρων λόγω

αγγειογενετικών παραγόντων, στην απώλεια περικυττάρων, στην πάχυνση της βασικής τους μεμβράνης και στην αύξηση της ενδοαυλικής πίεσης. Βιομικροσκοπικά βρίσκονται κυρίως στον οπίσθιο πόλο κροταφικά της ωχράς και έχουν την μορφή των σκουρόχρωμων στιγμάτων, σαν διάσπαρτες ερυθρές κηλίδες, διαμέτρου 16-60 μm στις μεσαίες στιβάδες του αμφιβληστροειδούς. Αν το τοίχωμα τους λεππυνθεί αρκετά, μπορεί να υποστεί ρήξη και να προκαλέσει ενδοαμφιβληστροειδική αιμορραγία. Στη ΦΑ, αρχικά απεικονίζονται σαν στίγματα φωτεινού υπερφθορισμού (Εικόνα 2.1.) και όψιμα εμφανίζουν διαρροή χρωστικής. Η ΦΑ βοηθά στη διάκρισή τους από στικτές αιμορραγίες, οι οποίες μπλοκάρουν τη χρωστική, ενώ αν τα μικροανευρύσματα έχουν θρόμβους, πάλι η διάκριση είναι αδύνατη. Αν ο αυλός τους αποφραχθεί, εξαφανίζονται μετά την αποκατάσταση της ροής. Ωστόσο, η ΦΑ δεν ενδείκνυται για τη διάγνωση τους. Δεν έχουν μεγάλη κλινική σημασία, αν και όταν αυξάνονται, δηλώνουν πρόοδο της ΔΑ.<sup>94</sup>

Η τριχοειδική απόφραξη η οποία προσβάλλει τον οπίσθιο πόλο προκαλεί συχνά διεύρυνση της αναγγείου ζώνης και διαταραχές της όρασης. Συχνά η τριχοειδική απόφραξη στην ΔΑ συνοδεύεται από διάταση του παρακείμενου τριχοειδικού δικτύου με αποτέλεσμα την καλύτερη απεικόνισή του στην αγγειογραφία.<sup>94</sup>



Εικόνα 2.1. Φωτογραφία βυθού (αριστερά), όπου φαίνονται οι στικτές αιμορραγίες, και τα εξιδρώματα στην περιοχή της ωχράς και φλουοραγγειογραφία (δεξιά), όπου φαίνονται τα μικροανευρίσματα σαν στικτές περιοχές υπερφθορισμού. (Από το αρχείο της Πανεπιστημιακής Οφθαλμολογικής Κλινικής Λάρισας)

Οι **βαμβακόμορφες αλλοιώσεις** (cotton wool spots), οι εν τω βάθει, σκουρόχρωμες και κηλιδόμορφες αιμορραγίες, η ανώμαλη εμφάνιση των φλεβών και οι ενδοαμφιβληστροειδικές μικροαγγειακές ανωμαλίες (IRMA), συνιστούν τα βυθοσκοπικά ευρήματα που οφείλονται στα αρτηριακά έμφρακτα.

Οι βαμβακόμορφες αλλοιώσεις αποτελούν την κλινική εκδήλωση του νευραξονικού οιδήματος στην περιοχή του αποφραγμένου προτριχοειδικού αρτηριδίου. Το ότι είναι απόφραξη αποδεικνύεται από την απουσία αιμάτωσης (υποφθορισμός) στην ΦΑ. Οι βαμβακόμορφες αλλοιώσεις (μαλακά εξιδρώματα) εμφανίζονται στα πρώιμα στάδια της ΔΑ (Εικόνα 2.2.). Τα μαλακά εξιδρώματα συνήθως εξαφανίζονται εντός 6-12 μηνών και έχουν την μορφή λευκής αδιαφάνειας, με ασαφή όρια, που εντοπίζονται στην στιβάδα των νευρικών ινών. Με την απορρόφηση της βαμβακόμορφης αλλοίωσης, τα γαγγλιακά κύτταρα και οι νευρικές ίνες της προσβεβλημένης περιοχής καθίστανται ατροφικά και η περιοχή αυτή μπορεί να παραμείνει ορατή λόγω

απώλειας του φυσιολογικού φωτεινού αντανakλαστικού (depression sign). Με την πάροδο του χρόνου οι περιοχές αυτές υφίστανται ένα είδος ανασύστασης και ίσως αυτός είναι ο λόγος που οι βαμβακόμορφες αλλοιώσεις, παρά την θεαματική τους βυθοσκοπική εμφάνιση, δεν αποτελούν ισχυρό ισχαιμικό δείκτη και δεν συνυπολογίζονται στην καταχώρηση της ΔΑ στην σοβαρή ή πολύ σοβαρή μη- παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια.<sup>94</sup>

Αντίθετα, οι βύθιες σκουρόχρωμες αιμορραγίες και οι φλεβικές ανωμαλίες (όπως ή κομβολογιοειδής εμφάνιση των φλεβών και οι ανώμαλες αγγειακές αγκύλες), παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα και αποτελούν ισχυρό ισχαιμικό δείκτη. Οι αλλοιώσεις αυτές αποδίδονται σε αιμορραγικά αμφιβληστροειδικά έμφρακτα που οφείλονται σε μερική απόφραξη αρτηριδίων ή σε ατελή αναδιήθηση αποφραγμένων αρτηριδίων. Οι επιφανειακές φλογοειδείς αιμορραγίες, οι οποίες πιθανόν να οφείλονται σε μικρές κλαδικές φλεβικές αποφράξεις, δεν αποτελούν ένδειξη σοβαρής ισχαιμίας.

Οι **ενδοαμφιβληστροειδικές μικροαγγειακές ανωμαλίες (IRMA – Intraretinal Microvascular Abnormalities)** εμφανίζονται ως ακανόνιστες τμηματικές διατάσεις του αμφιβληστροειδικού τριχοειδικού δικτύου. Η παθογένεια των IRMA δεν είναι γνωστή και ο όρος αυτός είναι καθαρά περιγραφικός. Τα αγγεία αυτά προέρχονται συνήθως από το φλεβικό σκέλος της αμφιβληστροειδικής κυκλοφορίας, έχουν μεγαλύτερη διάμετρο από τα φυσιολογικά τριχοειδή και, σε αντίθεση με τα αμφιβληστρο-ειδικά νεοαγγεία, αναπτύσσονται ενδοαμφιβληστροειδικά χωρίς να εμφανίζουν διαρροή στην αγγειογραφία με φλουορεσεΐνη. Οι IRMA θεωρούνται ιδιαίτερα ισχυροί δείκτες αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας.<sup>94</sup>



Σε ακραίες περιπτώσεις βαριάς αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας παρατηρούνται αποφραγμένα μεγαλύτερα αρτηριόλια χωρίς αιματική ροή τα οποία έχουν υποστεί ίνωση (ghost-vessels).<sup>14</sup>

### 2.1.3.2. Παθολογική διαπερατότητα των αγγείων

Ο VEGF διαταράσσει τον έσω αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό και αυξάνει την διαπερατότητα των αμφιβληστροειδικών αγγείων πιθανόν με μεσολάβηση των κυττάρων που συμμετέχουν στο φαινόμενο της φλεγμονής (inflammatory cells). Κλινικά, η αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων οδηγεί στην συσσώρευση του ορού του αίματος στις στιβάδες του αμφιβληστροειδούς, την πάχυνση αυτού και την εμφάνιση του **διαβητικού οίδηματος της ωχράς** (diabetic macular edema - DME). Όταν το οίδημα προσβάλλει όλη την περιοχή του οπισθίου πόλου χαρακτηρίζεται ως **διάχυτο**, ενώ ένα περιορισμένο οίδημα της ωχράς ονομάζεται **εστιακό**.

Σύμφωνα με την ETDRS<sup>52-74</sup> το οίδημα της ωχράς κρίνεται κλινικά σημαντικό όταν:

- α. η πάχυνση του αμφιβληστροειδούς εντοπίζεται στο κεντρικό βοθρίο ή και σε απόσταση μέχρι 500 μ από αυτό
- β. τα σκληρά εξιδρώματα εντοπίζονται στο κεντρικό βοθρίο ή και σε απόσταση μέχρι 500μ από αυτό μόνο όταν εφάπτονται μιας περιοχής με πάχυνση του αμφιβληστροειδούς (Εικόνα 2.2.)
- γ. περιοχή ή περιοχές με πάχυνση αμφιβληστροειδούς έχουν διαστάσεις τουλάχιστον μιας θηλαίας διαμέτρου και βρίσκονται από το κεντρικό βοθρίο σε απόσταση όχι μεγαλύτερη από μια θηλαία διάμετρο.



Εικόνα 2.2. Φωτογραφίες βυθού, όπου φαίνονται αιμορραγίες, μαλακά εξιδρώματα (αριστερά) και σκληρά εξιδρώματα (δεξιά). (Από το αρχείο της Πανεπιστημιακής Οφθαλμολογικής Κλινικής Λάρισας)

Ένα οίδημα της ωχράς συνοδεύεται σχεδόν πάντα από σκληρά εξιδρώματα. Τα σκληρά εξιδρώματα οφείλονται σε εναπόθεση λιποπρωτεϊνών του ορού του αίματος σε διάφορα επίπεδα του αμφιβληστροειδούς και έχουν το χαρακτηριστικό να απορροφούνται πολύ αργά, ακόμα και μετά την υποχώρηση του οιδήματος. Τα εξιδρώματα παρατηρούνται συχνά στα όρια του οιδηματώδους και μη-οιδηματώδους αμφιβληστροειδούς με τη μορφή χαρακτηριστικών κυκλοτερών σχηματισμών. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα σκληρά εξιδρώματα που δεν συνοδεύονται από πάχυνση του αμφιβληστροειδούς δεν αποτελούν γνώρισμα διαβητικού οιδήματος της ωχράς.<sup>94</sup>

Ένα εγκατεστημένο, για πολλούς μήνες, οίδημα ωχράς συνοδεύεται σχεδόν πάντα από κυστικό οίδημα της ωχράς (cystoid macular edema – CME) με σχηματισμό μεγάλων κυστικών χώρων γύρω από το κεντρικό βοθρίο. Αυτή η μορφή του CME επηρεάζει πολύ σημαντικά την οπτική οξύτητα και δεν ανταποκρίνεται σε συμβατική θεραπεία με φωτοπηξία δίκην



σκάρας (grid-pattern). Η παραμονή του CME οδηγεί συχνά σε σχηματισμό μερικού πάχους οπής ωχράς και περαιτέρω μείωση της όρασης.<sup>73</sup>

### **2.1.3.3. Ισχαιμία αμφιβληστροειδούς – παραγωγική ΔΑ**

Ο VEGF είναι ένας από τους πολλούς αυξητικούς παράγοντες του αμφιβληστροειδή. Παράγεται από τα γαγγλιακά κύτταρα, τα κύτταρα του Muller, και τα κύτταρα του μελάγχρου επιθηλίου.<sup>14</sup>

Η παρατεταμένη ισχαιμία αποτελεί ερέθισμα για την παραγωγή αγγειογενετικών παραγόντων και κυρίως του VEGF, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη του νεοαγγειακού ιστού. Η νεοαγγείωση εμφανίζεται συνήθως στα όρια των ισχαιμικών και μη ισχαιμικών περιοχών, τόσο στην κεντρική περιοχή του αμφιβληστροειδούς, όσο και στη μέση περιφέρεια. Η εμφάνισή νεοαγγείωσης στην οπτική θηλή και πέριξ αυτής αποτελεί ισχυρό δείκτη ισχαιμίας και συνεπώς της βαρύτητας της παραγωγικής αμφιβληστροειδοπάθειας.<sup>14</sup>

Τα νεοαγγεία σχηματίζονται χάρη στον άτακτο πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και είναι ελαττωματικά. Δεν αναπτύσσονται εντός του αμφιβληστροειδούς αλλά στην επιφάνεια της έσω αφοριστικής μεμβράνης και πολλές φορές εισχωρούν εντός της υαλοειδικής κοιλότητας. Στο τοίχωμα των νεοαγγείων τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν συνδέονται στενά μεταξύ τους με αποτέλεσμα να δημιουργούνται τοιχωματικές οπές και να απουσιάζει ο έσω αιματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός. Η διαρροή του ορού του αίματος και μαζί του ινογόνου, οδηγεί σε σχηματισμό ινοαγγειακών μεμβρανών. Οι

μεμβράνες αυτές αποτελούν στηρικτικό στοιχείο των νεοαγγείων και συμμετέχουν στο σχηματισμό του συμπλέγματος του ινοαγγειακού ιστού. Τα τοιχώματα των νεοαγγείων είναι ιδιαίτερα εύθραυστα και συχνά αποτελούν πηγή ενδοϋαλοειδικών αιμορραγιών (Εικόνα 2.3.).

Η συρρίκνωση του ινοαγγειακού ιστού ασκεί έλξη στον υποκείμενο αμφιβληστροειδή με επακόλουθο την ελκτική αποκόλλησή του. Οι έλξεις αυτές μπορεί να είναι ιδιαίτερα ισχυρές και να προκαλέσουν ρωγμή (διάσπαση της συνέχειας) του αμφιβληστροειδούς. Αυτή, η διπλής μορφής βλάβη του αμφιβληστροειδούς ονομάζεται μικτή αποκόλληση, δηλαδή ελκτική και ρηγματογενής ταυτόχρονα.<sup>14</sup>

Ο παραγόμενος από τον αμφιβληστροειδή VEGF είναι δυνατόν να μεταφέρεται σε απομακρυσμένους οφθαλμικούς ιστούς, όπου ασκεί τη δράση του. Σε συνθήκες βαριάς ισχαιμίας του αμφιβληστροειδούς είναι δυνατόν να προκληθεί ανάπτυξη νεοαγγείωσης στο πρόσθιο ημιμόριο του οφθαλμού και συγκεκριμένα στην ίριδα (NVI – new vessels on iris). Τα νεοαγγεία εμφανίζονται αρχικά στο κορικό χείλος της ίριδας (NVI – 1), επεκτείνονται στη συνέχεια στην πρόσθια επιφάνεια της ίριδας (NVI – 2) και τελικά φτάνουν στην γωνία του προσθίου θαλάμου (NVA – new vessels in angle). Ο ινοαγγειακός ιστός επικαλύπτει την επιφάνεια της γωνίας και η ακολουθούσα συρρίκνωσή του κλείνει την γωνία σαν φερμουάρ. Η καταστροφή της γωνίας του προσθίου θαλάμου έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία παροχέτευσης του υδατοειδούς υγρού και σημαντική αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης. Η κατάσταση αυτή αποκαλείται νεοαγγειακό γλαύκωμα (NVG – neovascular glaucoma).<sup>14,15</sup>

Με την πάροδο του χρόνου, και πιθανό με την ολοκλήρωση της αποκόλλησης του υαλοειδούς, η παραγωγική ΔΑ φτάνει στο τελικό της στάδιο, δηλαδή στην ινώδη ή αδρανή μορφή (burned-out proliferative diabetic retinopathy). Τα επεισόδια με ενδοϋαλοειδικές αιμορραγίες γίνονται όλο και λιγότερο συχνά μέχρι που να σταματήσουν τελείως. Σε αυτό το στάδιο της νόσου τα νεοαγγεία είναι λίγα και αδρανή και οι ινοαγγειακές μεμβράνες λεπτές. Τα αγγεία του αμφιβληστροειδούς εμφανίζονται στενεμένα και πολλές φορές παρουσιάζουν περιχειρίδες ή και πλήρη απόφραξη (ghost- vessels). Πολύ συνηθισμένη στο στάδιο αυτό της παραγωγικής ΔΑ είναι η κάποιου βαθμού ελκτική αποκόλληση αμφιβληστροειδούς με ή χωρίς την προσβολή της ωχράς. Η οπτική οξύτητα είναι, συνήθως, πολύ περιορισμένη, ακόμα και όταν απουσιάζει η αποκόλληση της ωχράς, οφειλόμενη πιθανώς στην πάντα παρούσα βαρύτερη ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς.<sup>14,15</sup>

#### **2.1.4. Στάδια της ΔΑ**

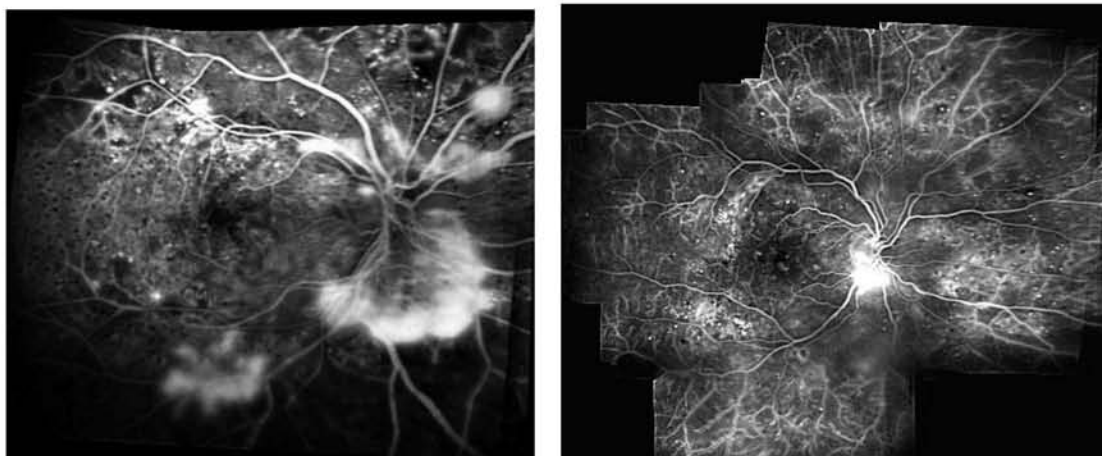
Υπάρχουν διάφορες μελέτες αξιολόγησης της ΔΑ. Για τη σταδιοποίηση της ΔΑ και τον προσδιορισμό της σοβαρότητας του διαβητικού οιδήματος της ωχράς στην παρούσα κλινική μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κλίμακα της ETDRS και για αυτό, θα αναπτηχθεί στη συνέχεια, στο ειδικό μέρος της μελέτης.<sup>52-74</sup>

## **2.1.5. Διαγνωστικές εξετάσεις ΔΑ**

### **2.1.5.1. Φλουοροαγγειογραφία αμφιβληστροειδούς**

Η αγγειογραφία με φλουοροσεΐνη αποτελεί τη βασική διαγνωστική εξέταση στην μελέτη των αγγειακών παθήσεων του βυθού και συνεπώς και της ΔΑ. Βασίζεται στην ιδιότητα του φλουοροσεϊνικού νατρίου (Sodium fluorescein) να απαντά με φθορισμό στην διέγερση με μονοχρωματικό κυανό φως με μήκος κύματος από 465 μέχρι 490 nm. Το φως το οποίο εκπέμπει η φλουοροσεΐνη, κάτω από αυτές τις συνθήκες, είναι στο φάσμα του πράσινου-κίτρινου με μήκος κύματος 520-530 nm.

Η φλουοροσεΐνη, όπως και ο ορός του αίματος, δεν διαπερνά τους αιματο-αμφιβληστροειδικούς φραγμούς, τόσο τον έξω (μελάγχρουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς) όσο και τον έσω (ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του αμφιβληστροειδούς). Κάθε παθολογία του αμφιβληστροειδούς που συνοδεύεται από διάσπαση αυτών των φραγμών παρουσιάζει την φλουοροαγγειογραφική εικόνα υπερφθορισμού. Στην διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια ο υπερφθορισμός παρατηρείται στο διαβητικό οίδημα της ωχράς, λόγω της διαταραχής του έσω αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού, αλλά και στην παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, αφού τα νεοαγγεία στερούνται του έσω αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού εξ' αρχής (Εικόνα 2.3.).



Εικόνα 2.3. Στη φλουροαγγειογραφία (αριστερά) εμφανίζονται περιοχές νεοαγγείωσης με εντονότατη διαρροή κάτωθεν της ωχράς και πέριξ του οπτικού δίσκου. Στη φλουροαγγειογραφία (δεξιά) φαίνεται η νεοαγγείωση του οπτικού δίσκου. (Από το αρχείο της Πανεπιστημιακής Οφθαλμολογικής Κλινικής Λάρισας)

Εκτός από τον υπερφθορισμό, παθολογικές καταστάσεις του βυθού δύνανται να απεικονισθούν με εικόνα ελάττωσης του φθορισμού, δηλαδή ως υποφθορισμός. Η μείωση της έντασης του φθορισμού μπορεί να οφείλεται σε απόκρυψη του φυσιολογικού φθορισμού από παθολογικά στοιχεία όπως αιμορραγίες (υποαμφιβληστροειδικές, ενδοαμφιβληστροειδικές και προαμφιβληστροειδικές) και σκληρά εξιδρώματα, αλλά και σε μείωση του φυσιολογικού φθορισμού.<sup>118</sup>

#### 2.1.5.2. Τομογραφία Οπτικού Συντονισμού

##### (Optical Coherent Tomography - OCT)

Η τομογραφία οπτικού συντονισμού (οπτική τομογραφία) θεωρείται πλέον απαραίτητη για τη μελέτη και τη διάγνωση του διαβητικού οιδήματος της ωχράς, επιτρέποντας τη μέτρηση του πάχους του αμφιβληστροειδούς και

την καταγραφή των μεταβολών της δομής στην περιοχή της ωχράς. Η τομογραφία αναπτύχθηκε στο MIT το 1991.<sup>118</sup>

## **2.1.6. Θεραπεία ΔΑ**

### **2.1.6.1. Θεραπεία του διαβητικού οιδήματος της ωχράς με laser**

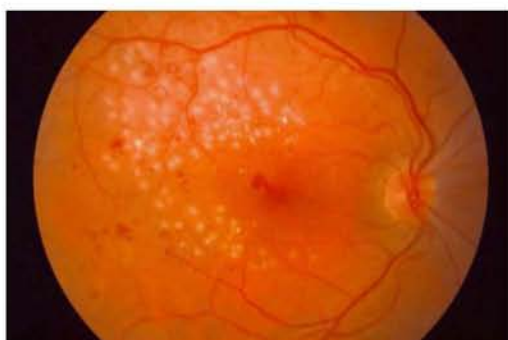
Κατά την φωτοπηξία χρησιμοποιείται μια ισχυρή πηγή φωτός, το laser (light amplification by stimulated emission of radiation – ενίσχυση φωτός με διεγερόμενη εκπομπή ακτινοβολίας). Το φως το οποίο εκπέμπεται από την συσκευή laser έχει τα εξής χαρακτηριστικά: είναι μη αποκλίνον (παράλληλο), μονοχρωματικό και συμφασικό (σύμφωνο σε φάση). Στην οφθαλμολογία το πιο διαδεδομένο είναι το Argon laser. Εκπέμπει στο πράσινο τμήμα του φάσματος (514 nm) και το φως που εκπέμπει απορροφάται πολύ καλά από την μελανίνη του μελάγχρου επιθηλίου και την αιμοσφαιρίνη, και λιγότερο από την ξανθοφύλλη της ωχράς. Επιπρόσθετα, το πράσινο φως διαπερνά σχετικά εύκολα τα θολωμένα διαθλαστικά μέσα.

Για την θεραπεία της διαβητικής ωχροπάθειας με κλινικό χαρακτηριστικό το σημαντικό οίδημα της ωχράς χρησιμοποιούνται, ως επί το πλείστον, δύο τεχνικές:

- η εστιακή φωτοπηξία για περιπτώσεις εστιακού οιδήματος και
- η φωτοπηξία δίκην σχάρας (grid-pattern photocoagulation) για περιπτώσεις διάχυτου οιδήματος της ωχράς (Εικόνα 2.6.).



Για την θεραπεία της ΔΑ με κλινικό χαρακτηριστικό την παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, χρησιμοποιείται η παναμφιβληστροειδική φωτοπηξία (PRP), η οποία αποτελεί, προς το παρόν, μαζί με την ενδοουλοειδική έγχυση αντι-VEGF παραγόντων, την ευρέως αποδεκτή θεραπεία της παραγωγικής διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας.<sup>58,121</sup>



Εικόνα 2.4. Φωτογραφία βυθού όπου φαίνονται τα Laser spots (Από το αρχείο της Πανεπιστημιακής Οφθαλμολογικής Κλινικής Λάρισας)

#### 2.1.6.2. Χειρουργική θεραπεία της παραγωγικής ΔΑ

Η χειρουργική επέμβαση στην ΔΑ περιορίζεται στην οπίσθια υαλοειδεκτομή. Οι κλασσικές ενδείξεις για την επέμβαση είναι οι εξής:

- Αδιαφανή διαθλαστικά μέσα
- Παρατεταμένη ενδοϋαλοειδική αιμορραγία,
- Προαμφιβληστροειδική αιμορραγία στην περιοχή της ωχράς
- Νεοαγγείωση της ίριδας και αδιαφάνεια των διαθλαστικών μέσων η οποία παρεμποδίζει την κατάλληλη διεξαγωγή της PRP
- Πυκνός καταρράκτης
- Υαλοειδοαμφιβληστροειδική έλξη
- Ελκτική αποκόλληση της ωχράς

- Μικτή αποκόλληση αμφιβληστροειδούς
- Συνεχιζόμενη εξέλιξη του ινωαγγειακού ιστού παρά την εκτεταμένη επέμβαση με PRP.<sup>74-79</sup>

### 2.1.6.3. Φαρμακευτική Αντιμετώπιση της ΔΑ

#### ➤ Έλεγχος της υπεργλυκαιμίας

Η ύπαρξη στενής συσχέτισης ανάμεσα στην υπεργλυκαιμία και την αμφιβληστροειδοπάθεια τεκμηριώθηκε με τις μελέτες DCCT<sup>80-88</sup> και UKPDS.<sup>89-93</sup> Είναι αποδεδειγμένο ότι η πιο αποτελεσματική φαρμακευτική αντιμετώπιση της εμφάνισης και της περαιτέρω εξέλιξης της υπάρχουσας ΔΑ επιτυγχάνεται με την καλή ρύθμιση της γλυκαιμίας των διαβητικών ασθενών. Η εισαγωγή της μέτρησης της γλυκοζυλιωμένης (συζευγμένης με γλυκόζη) αιμοσφαιρίνης (HbA1c) αποτέλεσε μια σημαντική πρόοδο στην εργαστηριακή παρακολούθηση των διαβητικών ασθενών.<sup>119,122</sup> Η HbA1c αποτελεί τόσο τον δείκτη της μέσης συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα για τις τελευταίες 4 – 8 εβδομάδες, όσο και τον δείκτη ελέγχου της πορείας της αντιδιαβητικής θεραπείας. Η φυσιολογική τιμή της HbA1c είναι 4-6% της συνολικής HbA. Για τους διαβητικούς ασθενείς, επίπεδα της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης άνω του 8% θεωρούνται μη αποδεκτά, ενώ επιθυμητά είναι τα επίπεδα της HbA1c χαμηλότερα του 7%.<sup>119</sup>



### ➤ Έλεγχος της αρτηριακής υπέρτασης

Όπως προκύπτει από τις επιδημιολογικές μελέτες, η αρτηριακή υπέρταση αυξάνει το ρίσκο της εμφάνισης και επιδείνωσης της ΔΑ και ειδικά του διαβητικού οιδήματος της ωχράς. Στους ασθενείς με ΣΔ II, η αυξημένη αρτηριακή πίεση συνδυάζεται με την εμφάνιση του διαβητικού οιδήματος της ωχράς, ενώ η αυστηρή ρύθμιση της ΑΠ μειώνει τον κίνδυνο εξέλιξης της ΔΑ κατά 34% και περιορίζει κατά 47% τον κίνδυνο μείωσης της οπτικής οξύτητας κατά 3 γραμμές. Επίσης, σημειώθηκε μείωση των θανάτων των σχετιζόμενων με το ΣΔ.<sup>119</sup>

### ➤ Έλεγχος της υπερλιπιδαιμίας

Η δυσλιπιδαιμία αποτελεί αναγνωρισμένο παράγοντα κινδύνου για την μακροαγγειοπάθεια και τη διαβητική νεφροπάθεια, ενώ η επίδρασή της στην εμφάνιση και εξέλιξη της ΔΑ βρίσκεται ακόμα υπό διερεύνηση. Επιδημιολογικές παρατηρήσεις δείχνουν ότι τα αυξημένα επίπεδα των λιπιδίων του αίματος σχετίζονται θετικά με αυξημένη οφθαλμική νοσηρότητα που αφορά στο διαβητικό οίδημα της ωχράς (όπως αυτό εκφράζεται σε εμφάνιση σκληρών εξιδρωμάτων) και την βαρύτητα της ΔΑ. Η δυσλιπιδαιμία στους διαβητικούς φαίνεται να έχει άμεση σχέση με την οπτική οξύτητα, η οποία επηρεάζεται σημαντικά από το διαβητικό οίδημα της ωχράς. Αυξημένος κίνδυνος ανεπανόρθωτης απώλειας της κεντρικής όρασης υπάρχει στις

περιπτώσεις με μεγάλες κεντρικές εξιδρωματικές πλάκες οι οποίες καταλήγουν συνήθως σε υποαμφιβληστροειδική ίνωση.<sup>119</sup>

➤ **Ενδοαλοειδική φαρμακολογική αντιμετώπιση της ΔΑ**

Η anti-VEGF θεραπεία έχει οριακά ευεργετική επίδραση στην πρόληψη και τον περιορισμό του διαβητικού οιδήματος της ωχράς. Ενώ η αντί-αγγειογενετική δράση των κορτικοειδών βασίζεται στην αναστολή της γονιδιακής έκφρασης του VEGF. Επίσης, τα γλυκοκορτικοειδή περιορίζουν την παραγωγή του VEGF από τους παράγοντες έναρξης της φλεγμονώδους διεργασίας, περιορίζοντας τον χρόνο και την ένταση της δράσης τους. Φαίνεται ότι, η ενδοαλοειδική χορήγηση τριαμσινολόνης δεν εξασφαλίζει μακροχρόνιο αποτέλεσμα και παράλληλα παρατηρείται, αρκετά συχνά, αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης.<sup>120</sup>

## **2.2. Διαβητική νεφροπάθεια**

### **2.2.1. ΣΔ και νεφρός – επιδημιολογία της ΔΝ**

Η διαβητική νεφροπάθεια (ΔΝ) είναι μια από τις συχνότερες και σοβαρότερες μικροαγγειακές επιπλοκές του ΣΔ και αποτελεί τη συχνότερη αιτία νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου στο δυτικό κόσμο. Όμως, παρόλο που στο παρελθόν το ποσοστό των διαβητικών ασθενών που εξελίσσονταν σε νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου υπολογιζόταν σε 30 - 40%, η καλύτερη ρύθμιση του σακχάρου και της αρτηριακής πίεσης τα τελευταία χρόνια επέτρεψε να μειωθεί το ποσοστό αυτό στο 8%, μετά από 30 χρόνια από τη διάγνωση της νόσου. Η συχνότητα εμφάνισης της ΔΝ σηματοδοτείται πλέον με κριτήριο την λευκωματουρία και την μείωση της σπειραματικής διήθησης (GFR), γεγονός που κάνει σημαντική την συγκεκριμένη επιπλοκή. Το ένα τρίτο περίπου των ασθενών με ΣΔ τύπου I ή II θα αναπτύξουν κλινικά εμφανή νεφρική προσβολή (πρωτεϊνουρία ή έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας). Αξίζει να σημειωθεί ότι η νεφροπάθεια εμφανίζεται, συνήθως, τα πρώτα 10-15 χρόνια από την έναρξη του ΣΔ, ενώ διαβητικοί ασθενείς που δεν εμφάνισαν ευρήματα νεφρικής νόσου, 20 - 25 χρόνια από την έναρξή του ΣΔ, έχουν μικρές πιθανότητες να αναπτύξουν νεφροπάθεια στη συνέχεια.<sup>123</sup>

### **2.2.2. Ιστορική ανασκόπηση της ΔΝ**

Η πρώτη σύνδεση του ΣΔ με τους νεφρούς και την λειτουργία τους, έγινε το 1936. Τότε οι Kimmelstiel και Wilson περιέγραψαν, για πρώτη φορά,

την οξειδιακή βλάβη, που βρέθηκε στους νεφρούς διαβητικών ατόμων. Εντόπισαν όχι μόνο τη βλάβη, αλλά περιέγραψαν και το κλινικό σύνδρομο της νεφρικής ανεπάρκειας. Επεσήμαναν, ότι η κλινική πορεία της χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση λευκωματουρίας και την ανάπτυξη υπέρτασης.<sup>126</sup>

### 2.2.3. Η παθοφυσιολογία της ΔΝ

Η ΔΝ χαρακτηρίζεται από αιμοδυναμικές διαταραχές που στη συνέχεια προκαλούν μορφολογικές αλλοιώσεις που αφορούν όλες τις ανατομικές δομές του νεφρού. Φαίνεται ότι η αιτία, όλων αυτών των διαταραχών, είναι η υπεργλυκαιμία (η κοινή συνιστώσα τόσο στο ΣΔ I όσο και στο ΣΔ II) και οι μεταβολές που προκαλεί στη λειτουργία των κυττάρων αλλά και την εξωκυττάρια ουσία. Είναι προφανές ότι η ρύθμιση του σακχάρου είναι απαραίτητη για την πρόληψη της ΔΝ, όπως και για τις άλλες μικροαγγειακές επιπλοκές του ΣΔ. Μάλιστα στις αρχές της δεκαετίας του '90 η υπεργλυκαιμία προτεινόταν ως ο μόνος σημαντικός παράγοντας ανάπτυξης αυτού του τύπου νεφροπάθειας.<sup>8</sup> Βέβαια η υπεργλυκαιμία, ως κυρίαρχο αίτιο, αναστέλλοντας τη γλυκόλυση και εκτρέποντας τον μεταβολισμό της γλυκόζης προς άλλες μεταβολικές οδούς, οδηγεί όντως σε αυξημένη σύνθεση κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων και προκαλεί αλλαγές στη δομή και στη λειτουργία του νεφρού. Ωστόσο, ο βαθμός της υπεργλυκαιμίας δεν μπορεί να αιτιολογήσει από μόνος του τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΔΝ που παρουσιάζουν ορισμένα άτομα με ΣΔ.<sup>9</sup>

Επίσης, ο έλεγχος των παραδοσιακών παραγόντων κινδύνου (Αρτηριακή υπέρταση, υπερλιπιδαιμία, κάπνισμα, παχυσαρκία) δε φαίνεται να ασκεί σημαντική προληπτική επίδραση στην εμφάνιση της ΔΝ. Οι μη αποτελεσματικές και αρκετά δαπανηρές θεραπευτικές παρεμβάσεις που εφαρμόζονται στην αντιμετώπιση της ΔΝ, οδήγησαν τελικά στην εντατικοποίηση της έρευνας που στοχεύει στην έγκαιρη διάγνωση και στην καλύτερη θεραπεία αυτής της επιπλοκής, με στόχο την πρόληψη.<sup>4</sup> Το γεγονός ότι δεν αναπτύσσουν ΔΝ όλοι οι διαβητικοί ασθενείς, επιβεβαιώνει την ύπαρξη ειδικών παραγόντων γενετικής προδιάθεσης. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί οικογενής συγκέντρωση ΔΝ τόσο σε ασθενείς με ΣΔ τύπου Ι όσο και σε τύπου ΙΙ, σε διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες. Έτσι, τις τελευταίες δεκαετίες, η ερευνητική προσπάθεια έχει στραφεί στη διερεύνηση της γενετικής προδιάθεσης της νόσου.<sup>9,10</sup>

Πιο συγκεκριμένα το 1989 αναφέρθηκε για πρώτη φορά η συμβολή της γενετικής προδιάθεσης στην παθογένεια της νόσου. Τα τελευταία χρόνια η άποψη αυτή άρχισε να γίνεται ευρύτερα αποδεκτή, τόσο από νεφρολόγους, όσο και από διαβητολόγους. Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, οι επιπτώσεις της ΔΝ αυξάνονται κατά τη διάρκεια των πρώτων 15-20 χρόνων από την έναρξη του ΣΔ και στη συνέχεια σταθεροποιούνται, καταδεικνύοντας ότι μόνο ένα ποσοστό διαβητικών ασθενών θα εμφανίσει τελικά νεφροπάθεια. Πράγματι, μόνο το 20%-40% των ασθενών με ΣΔ θα αναπτύξει τελικά ΔΝ και μάλιστα ανεξάρτητα της θεραπείας. Πιο συγκεκριμένα είναι γνωστό από την κλινική πράξη ότι ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών εμφανίζει ΔΝ παρά την ικανοποιητική ρύθμιση του μεταβολικού παράγοντα της υπεργλυκαιμίας ενώ από την άλλη ένα ποσοστό ασθενών παρά την κακή ρύθμιση δεν εμφανίζει

ποτέ νεφρική βλάβη. Επίσης, όπως ήδη αναφέρθηκε, από μελέτες οικογενειών (family-based studies) φάνηκε ότι οι διαβητικοί ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό ή ΔΝ ή υπέρτασης ή καρδιαγγειακής νόσου έχουν περισσότερες πιθανότητες να εμφανίσουν νεφρικές επιπλοκές, σε σχέση με τους διαβητικούς ασθενείς με αρνητικό οικογενειακό ιστορικό. Μάλιστα, η επίπτωση της νόσου επηρεάζεται ακόμη και από την εθνολογική προέλευση των ασθενών. Φαίνεται λοιπόν ότι τα γονίδια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου. Πρόσφατες μελέτες έχουν ταυτοποιήσει συγκεκριμένες χρωμοσωμικές περιοχές και θέσεις που πιθανόν να περιέχουν γονίδια υπεύθυνα για την εμφάνιση της νόσου και έχουν αξιολογήσει την επίδραση των γονιδίων αυτών στο φαινότυπο.<sup>141,142</sup>

### **Αναγωγή Αλδόζης (AKR1B1)**

Η αναγωγή της αλδόζης (aldose reductase) είναι ένα ενδοπλασματικό ένζυμο, που με την παρουσία του NADPH και μέσω της οδού της πολυόλης μετατρέπει τη γλυκόζη σε σορβιτόλη, όπως έχει ήδη αναφερθεί και στο σκέλος της ΔΑ. Το γονίδιο AKR1B που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7q35 έχει αναφερθεί ως υποψήφιος γονιδιακός τόπος για τη ΔΝ.<sup>143</sup>

Έχουν ταυτοποιηθεί 7 αλληλία στη θέση της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας νουκλεοτιδίων (AC) ή στο γονίδιο της AKR1B. Το πιο γνωστό αλληλίο περιέχει <sub>24</sub>(AC) επαναλήψεις και ονομάστηκε Z. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τη σχέση ανάμεσα στο Z-2 αλληλίο (23 επαναλήψεις) και τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΔΝ τόσο σε ασθενείς με ΣΔ τύπου I, όσο και

τύπου II.<sup>142</sup> Ωστόσο, άλλες παρόμοιες μελέτες δεν επιβεβαίωσαν τα ως άνω αποτελέσματα. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός, ότι οι διαβητικοί ασθενείς που είναι ομοζυγώτες για το XbaI(-) αλληλίο του GLUT1 και φέρουν μαζί το Z2 αλληλίο, παρουσιάζουν 9 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης ΔN, γεγονός που δείχνει έναν υψηλού κινδύνου γενετικό συνδυασμό. Ένας δεύτερος AKR1B1 πολυμορφισμός έχει παρατηρηθεί στη θέση -106 του εκκινητή. Ο C106G πολυμορφισμός έχει συσχετισθεί με τη ΔN. Όλα τα παραπάνω αποδεικνύουν ότι οι AKR1B1 πολυμορφισμοί παίζουν κάποιο ρόλο στην εμφάνιση της ΔN και αυτό είναι το δεύτερο σκέλος του αντικειμένου αυτής της μελέτης.<sup>143</sup>

### **Τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs)**

Η ένωση των μορίων της γλυκόζης με ελεύθερες αμινο-ομάδες πρωτεϊνών, αλλά και με λιπίδια χωρίς τη μεσολάβηση ενζύμου και η δημιουργία τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs) είναι γνωστό ότι διαδραματίζουν ουσιώδη ρόλο στην παθογένεια της ΔN. Τα AGEs ως μεσολαβητές προκαλούν μια σειρά από παθολογικές αντιδράσεις σε κύτταρα και ιστούς, διεγείροντας την παραγωγή αυξητικών παραγόντων και στοιχείων της εξωκυττάριας ουσίας. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα AGEs αλληλεπιδρούν και με το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης. Οι δράσεις αυτές προάγονται από τη σύνδεση των AGEs με συγκεκριμένους υποδοχείς (RAGEs). Αρκετοί πολυμορφισμοί<sup>43</sup> (-429T/C, -374T/A, G82S, 1704G/T, 2184G/T, 2245G/A) έχουν καταγραφεί για τον εκκινητή του γονιδίου του υποδοχέα των AGEs που φαίνεται να επηρεάζουν τη μεταγραφική δραστηριότητά του.<sup>138</sup>

## Γονίδια – δείκτες γενετικής προδιάθεσης για τη ΔΝ

Ο μεταφορέας γλυκόζης 1 (glucose transporter) είναι ο σημαντικότερος εκπρόσωπος της οικογένειας των μεταφορέων γλυκόζης και εκφράζεται στα σπειραματικά, μεσαγγειακά, ενδοθηλιακά κύτταρα. Το γονίδιο SLC2A1 είναι πιθανόν να συμμετέχει στην αύξηση των ενδοκυττάρων συγκεντρώσεων της γλυκόζης μέσω της ενεργοποίησης παθογενετικών μεταβολικών οδών. Αρκετές μελέτες προσπαθούν να διερευνήσουν αν οι πολυμορφισμοί του SLC2A1 αποτελούν δείκτες γενετικής προδιάθεσης, τα αποτελέσματα όμως είναι αντικρουόμενα.<sup>128</sup>

Η διπεπτιδάση 1 της καρνοσίνης (καρνοσινάση), μέλος της οικογένειας των μεγαλλοπρωτεϊνών M20, αποδομεί το διπεπτίδιο της καρνοσίνης που ελαττώνει την σύνθεση των στοιχείων της θεμέλιας ουσίας, τη φιμπονεκτίνη, το κολλαγόνο IV και τον TGFβ2 στα νεφρικά κύτταρα, ενώ παράλληλα μειώνει τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Το γονίδιο της καρνοσινάσης (CNDP1), υποψήφιο γονίδιο, εδράζεται στο χρωμόσωμα 18q, ενώ ο αριθμός των επαναλήψεων της τριπλέτας που κωδικοποιεί την λευκίνη (CTG) στο εξώνιο 2 του γονιδίου φαίνεται να σχετίζεται με τη ΔΝ. Από πολλές μελέτες φαίνεται ότι έχει βρεθεί ένα νέο μεταβολικό μονοπάτι και έχει εξαιρετικό ενδιαφέρον να αποδειχτεί αν οι μεταβολές στη δράση της καρνοσίνης με αποτέλεσμα την αναστολή της καρνοσινάσης θα εμποδίσει την ανάπτυξη νεφροπάθειας σε ασθενείς με γενετική προδιάθεση.<sup>127</sup>

Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ελαττωμένη έκφραση της νεφρίνης και αυξημένη αποβολή της στα ούρα σε νεφρολογικές παθήσεις συμπεριλαμβανομένης και της ΔΝ. Παρ όλα αυτά δεν έχουν δημοσιευθεί μέχρι



σήμερα πολλές έρευνες που να συσχετίζουν πολυμορφισμούς του NPHS1 γονιδίου με την προδιάθεση για νεφροπάθεια σε διαβητικούς ασθενείς.<sup>129</sup>

Έχει αποδειχθεί σε πειραματόζωα ότι η υπεργλυκαιμία και η έλλειψη ινσουλίνης συνδέεται με διαταραχές στη ρύθμιση των γονιδίων των MMPs και TIMP-1 (tissue inhibitor of MMP). Αυτή η διαταραχή φαίνεται να συμβάλλει στη σπειραματική βλάβη.<sup>134,136</sup>

Η πρωτεογλυκάνη της θειικής ηπαράνης (heparan sulfate proteoglycan) αποτελεί μέλος της οικογένειας των γλυκοζαμινογλυκανών. Βρίσκεται τόσο στην κυτταρική μεμβράνη όσο και στην εξωκυττάρια ουσία καθώς και στη βασική μεμβράνη των νεφρικών σπειραμάτων. Φαίνεται ότι απωθεί τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες, όπως την αλβουμίνη, εμποδίζοντας τη διήθηση τους. Αλλαγές στην έκφρασή της έχουν αναφερθεί σε διάφορες νεφρολογικές παθήσεις, όπως είναι και η ΔΝ, αφού η ελαττωμένη έκφρασή της σχετίζεται με αύξηση της λευκωματουρίας. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η χορήγηση ηπαρίνης χαμηλού M.W. ελατώνει τη λευκωματουρία σε διαβητικούς ασθενείς, ενώ η αγγειοτενσίνη II αναστέλλει την παραγωγή της HSPG.<sup>127</sup>

Το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ACE) παίζει πολύ σημαντικό ρόλο, αφενός στην παραγωγή της ισχυρής αγγειοσυσπαστικής αγγειοτενσίνης II και αφετέρου στη δράση της βραδυκινίνης. Η πολλαπλή δράση και ευρεία κατανομή αυτών των πεπτιδίων δείχνει ότι το MEA θα μπορούσε να εμπλέκεται σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις (αρτηριακή πίεση, νεφρική αιμοδυναμική, φλεγμονή), ενώ η ανακάλυψη ότι τα επίπεδα του ενζύμου βρίσκονται κάτω από γενετικό έλεγχο άνοιξε το δρόμο για μια σειρά ερευνητικών μελετών, μέσα από τις οποίες φαίνεται οι

πολυμορφισμοί του ACE γονιδίου να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην εξέλιξη της ΔΝ και λιγότερο στην εμφάνισή της.<sup>127</sup>

Εκτός από το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης και το αγγειοτενσινογόνο έχει συσχετισθεί με τη γενετική προδιάθεση της ΔΝ. Δύο μελέτες έχουν ενοχοποιήσει τον M235T πολυμορφισμό του γονιδίου του αγγειοτενσινογόνου ως παράγοντα κινδύνου εμφάνισης ΔΝ σε Κινέζους διαβητικούς ασθενείς.<sup>133</sup>

Σήμερα αποδεικνύεται όλο και περισσότερο η σχέση της χρόνιας φλεγμονής με την ανάπτυξη τόσο των μικρο όσο και των μακροαγγειακών επιπλοκών του ΣΔ. Για τον λόγο αυτό αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη διερεύνηση των πολυμορφισμών των γονιδίων της ιντερλευκίνης-1 και-6. Η ιντερλευκίνη 1 έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μεσογειακά κύτταρα και αυξάνει την παραγωγή κολλαγόνου IV. Το αλληλίο του ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1 (IL-1RN\*2: penta-allele 86-bp repeat) στο ιντρόνιο 2 έχει συνδεθεί με διάφορες φλεγμονώδεις καταστάσεις. Κατά συνέπεια το γονίδιο της IL-6 τοποθετείται ανάμεσα στα υποψήφια γονίδια, αφού η χρόνια φλεγμονή εμπλέκεται στην παθογένεια της ΔΝ.<sup>127,144</sup>

Οι κυτταροκίνες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ΔΝ. Ενώ ο αυξητικός παράγοντας TGF β1 επάγει την υπερτροφία και ίνωση των σπειραμάτων, κατταροκίνες όπως TNF-a, MCP-1 και RANTES (regulated upon activation and normal T cell expressed and secreted) προσελκύουν τα μακροφάγα στο νεύρο. Μελέτες έδειξαν ότι ο-28 γονότυπος του εκκινητή του γονιδίου και ο 59029A γονότυπος του εκκινητή του υποδοχέα του CCR5 όχι μόνο σχετίζονται αλλά έχουν και συνεργική δράση στην εμφάνιση της νεφροπάθειας.<sup>128,144</sup>

Ο αυξητικός παράγοντας TGFβ1(transforming growth factor-β1), έχει αποδειχτεί ότι αποτελεί κύριο μεσολαβητή στην παθογένεια της ΔΝ, παίζοντας καθοριστικό ρόλο στις διαταραχές της δομής της εξωκυττάριας ουσίας, όπως στην πάχυνση της βασικής μεμβράνης και στην υπερπλασία των μεσαγγειακών κυττάρων. Ενώ οι μελέτες συσχέτισης πολυμορφισμών του γονιδίου του σε ασθενείς με ΣΔ τύπου I είναι αρκετές, η βιβλιογραφία για μελέτες σε ασθενείς με ΣΔ τύπου II είναι ιδιαίτερα φτωχή. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι ο γονιδιακός πολυμορφισμός TGFβ T869C(Leu10pro) επηρεάζει τα επίπεδα του TGFβ1, και σίγουρα υπάρχει κάποια σχέση ανάμεσα στους πολυμορφισμούς των γονιδίων αυτών με τη ΔΝ, αφού ο ρόλος του TGFβ1, αλλά και των υποδοχέων του είναι καθοριστικός τόσο για την έναρξη, όσο και για την εξέλιξη της νόσου.<sup>137</sup>

Βρίσκεται στο χρωμόσωμα q και έχει συσχετισθεί με το ΣΔ τύπου I και II. Είναι μια πολυμορφική πρωτεΐνη που αποτελείται από 3 ισομορφές, E2, E3, και E4, κωδικοποιημένες από τα αλληλία ε2, ε3 και ε4. Παρουσιάζουν διαφορετική συγγένεια με τους υποδοχείς της ApoE, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο το μεταβολισμό των λιπιδίων. Πληθώρα μελετών έχουν προσπαθήσει να διερευνήσουν τη συσχέτιση των APO ισομορφών με τη ΔΝ, αλλά χωρίς σαφή αποτελέσματα.<sup>127,144</sup>

Το γονίδιο της συνθετάσης του NO (NOS3) αποτελεί επίσης ένα υποψήφιο γονίδιο για ΔΝ, αφού και το οξειδωτικό στρές έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει στην παθογένεια της νόσου. Εδράζεται στο χρωμόσωμα 7q και ρυθμίζει τη λειτουργία του ενδοθηλίου προκαλώντας αγγειοδιαστολή. Το NO συντίθεται από L-αργινίνη με τη βοήθεια της NOS και η μακροπρόθεσμη αναστολή του (σε μελέτες πειραματόζων) βρέθηκε ότι οδηγεί σε αύξηση της

αρτηριακής πίεσης στο σπείραμα και προοδευτικά σε λευκωματουρία και σπειραματοσκλήρυνση. Ο T-786C πολυμορφισμός είναι γνωστό ότι ελαττώνει τη δραστικότητα του εκκινητή του NOS3 γονιδίου και σχετίζεται με την εμφάνιση τόσο στεφανιαίας νόσου, όσο και ΔΝ.<sup>127,144</sup>

Το γονίδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 6q25 και έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη ΔΝ σε ασθενείς με ΣΔ τύπου II, αφού η συμμετοχή του στο οξειδωτικό στρές προκαλεί βλάβη στα νεφρικά κύτταρα. Ο πολυμορφισμός (βαλίνη αντί αλανίνης) στο γονίδιο του SOD2 (RS4880) φαίνεται να επιδρά στην αποτελεσματικότητα με την οποία η MnSOD μεταφέρεται μέσα στα μιτοχόνδρια. Έτσι, συσχετισμοί του Val-val γονοτύπου με τη ΔΝ σε καπνιστές ασθενείς με ΣΔ τύπου I, έδειξαν αύξηση κατά 32% του κινδύνου εμφάνισης ΔΝ.<sup>127,144</sup>

Ο PPAR $\gamma$ 2 (Peroxisome proliferator-activated reseptor gamma2) αποτελεί έναν υποδοχέα που εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στο λιπώδη ιστό και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων-στόχων που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση λιπωδών κυττάρων και την ομοίωση της γλυκόζης. Το γονίδιο του PPAR $\gamma$ 2 θεωρείται ότι συνδέεται όχι μόνο με τον ΣΔ τύπου II και την παχυσαρκία, αλλά πρόσφατα και με τη ΔΝ.<sup>127,1144</sup>

Ο TSC-22 είναι ένας παράγοντας μεταγραφής που η έκφρασή του επάγεται από τον TGF παράγοντα. Και φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ΔΝ.<sup>127,144</sup>

Δεδομένου ότι ο συµµεταφορέας Na/Cl παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του νεφρικού σωληναρίου, αρκετοί ερευνητές άρχισαν να επικεντρώνουν την έρευνα τους στους πολυμορφισμούς του γονιδίου SLC12A3 (Solute carrier family[sodium/chloride] member3). Κάποιες μελέτες

επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση του πολυμορφισμό SLC12A3+78G/A στο εξώνιο 23(Arg913Glu) με πιθανή προστατευτική δράση στην ανάπτυξη ή/και εξέλιξη της ΔΝ και κάποιες όχι.<sup>127,144</sup>

#### **2.2.4. Μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές στη ΔΝ**

Οι παθογενετικοί μηχανισμοί, οι οποίοι ευθύνονται για την ΔΝ, διακρίνονται σ' εκείνους που προκαλούν μορφολογικές ή δομικές αλλαγές και σ' αυτούς που προκαλούν λειτουργικές διαταραχές.

##### **2.2.4.1. Μορφολογικές αλλαγές**

Οι αλλοιώσεις που παρατηρούνται στο σπείραμα είναι οι εξής:

##### **α. Πάχυνση της βασικής μεμβράνης.**

Είναι η πρώτη και χαρακτηριστική βλάβη που παρατηρείται, μάλιστα έχει βρεθεί και στα τριχοειδή του σπειράματος ατόμων που δεν έχουν εκδηλώσει ακόμη ΣΔ. Αφορά στην πάχυνση της βασικής μεμβράνης των τριχοειδών του σπειράματος, με αποτέλεσμα την αλλαγή της δομής και της διαπερατότητας της βασικής μεμβράνης. Η αιτιολογία αυτής της διαταραχής φαίνεται να έχει μεταβολικό υπόβαθρο. Εκτός όμως από την μεταβολική διαταραχή, πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι ο σχηματισμός ανοσοσυμπλεγμάτων *in situ*, ίσως είναι αποτέλεσμα γλυκοζηλύωσης

συστατικών του κολλαγόνου της βασικής μεμβράνης. Αυτή η άποψη βασίζεται στην παρατήρηση ότι σε *in vitro* πειράματα, η εναπόθεση των μη ενζυματικώς γλυκοζηλυμένων πρωτεϊνών, προκαλεί πάχυνση της βασικής μεμβράνης και διεύρυνση του μεσαγγείου.

Οι φυσιολογικοί μηχανισμοί έχουν σαν αποστολή την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που έχουν εξαγγειωθεί στο μεσαγγείο χώρο. Ίσως λοιπόν, οι φυσιολογικοί μηχανισμοί, να αδρανοποιούνται, με αυτή την εναπόθεση. Εκτός από αυτό, η γλυκοζηλύωση αναδιατάσσει τη δομή του μορίου, γιατί αυξάνει την οξειδωση των σουλφυδρικών ομάδων και μεγαλώνει έτσι την δυνατότητα εναπόθεσης, με αποτέλεσμα να αλλάζουν το ηλεκτρικό φορτίο της μεμβράνης, σαν μόρια αρνητικώς φορτισμένα και έτσι μεταβάλλεται η εκλεκτική διαπερατότητα της μεμβράνης. Βέβαια και άλλοι παράγοντες ευθύνονται, τουλάχιστον εν μέρει, για την αλλαγή της δομής και της διαπερατότητας της βασικής μεμβράνης. Αυτοί οι παράγοντες είναι πολυσακχαρίτες και πολυμερή αυτών που αποτελούν δομικό υλικό της βασικής μεμβράνης.<sup>124</sup>

Η διεργασία έχει βραδεία εξέλιξη και σχετίζεται άμεσα με τη διάρκεια τη σοβαρότητα του ΣΔ και ποιότητα της ρύθμισης του σακχάρου. Αξίζει να σημειωθεί πως όταν οι βλάβες ανιχνευτούν στα πρώιμα στάδια της εμφάνισής τους μπορούν να υποστραφούν, με την αποκατάσταση της μεταβολικής διαταραχής.

## **β. Σκλήρυνση του μεσαγγείου.**

Υπάρχουν δύο μορφές, η διάχυτη και η οζιδιακή, οι οποίες συχνά συνυπάρχουν. Αποτελούν επέκταση των αλλοιώσεων της βασικής μεμβράνης, καταλαμβάνουν τον μεσαγγείο χώρο και προκαλούν την διεύρυνσή του.

Η διάχυτη πάχυνση της βασικής μεμβράνης και διάχυτη σκλήρυνση του μεσαγγείου χαρακτηρίζεται από διάχυτη πάχυνση της βασικής μεμβράνης των τριχοειδών του σπειράματος και αύξηση του μεσαγγείου με πολλαπλασιασμό μεσαγγειακών κυττάρων (μεσαγγειακή διεύρυνση). Οι αλλαγές στο σπείραμα αρχίζουν πάντα στο αγγειακό μίσχο. Τα σπειράματα που έχουν επηρεαστεί, αναπτύσσουν τελικά αποφρακτική διαβητική σκλήρυνση. Αυτές οι αλλαγές παρατηρήθηκαν στο 40% τουλάχιστον, των διαβητικών ασθενών μετά από περισσότερα από 10 έως 20 έτη από την έναρξη του ΣΔ.

Η οζιδιακή σκλήρυνση του σπειράματος (νόσος Kimmelstiel - Wilson ή τριχοειδική σκλήρυνση του σπειράματος) είναι όπως και η διάχυτη μορφή, αλλά με περισσότερο εμφανής τις εστιακές συσσωρεύσεις μεσαγγειακού παρεγχύματος, που παράγουν μεσαγγειακά οζίδια τα οποία βρίσκονται στην περιφέρεια του επηρεασμένου σπειράματος. Τα οζίδια περιέχουν λιπίδια και ινώδη ιστό. Τα οζίδια επεκτείνονται τείνοντας να εξαλείψουν το σπείραμα. Τα μικροανευρύσματα των τριχοειδών μπορεί να προκύψουν από τη στρέβλωση των τμημάτων που γειτνιάζουν με τα μεσαγγειακά οζίδια. Στο νεφρικό παρέγχυμα αναπτύσσεται πάντα ισχαιμία που οδηγεί σε ατροφία, διάμεση ίνωση και τελικά μειωμένη νεφρική λειτουργία καθώς και μέγεθος. Αυτά τα

οζίδια είναι παθογνωμονικά για τον ΣΔ και παρατηρούνται σε 15-30% των περιπτώσεων της ΔΝ.<sup>123,124</sup>

#### **γ. Ίνωση του ελύτρου του Bowman.**

Αφορά στο τοίχωμα του ελύτρου του Bowman και εμφανίζεται στο διάστημα μεταξύ της βασικής μεμβράνης και των επιθηλιακών κυττάρων.

#### **δ. Βλάβη στο νεφρικό σωληνάριο.**

Παρατηρείται στο τελικό στάδιο της νεφρικής ανεπάρκειας. Το σωληνάριο γίνεται ατροφικό και λειτουργικά ανενεργές.

#### **2.2.4.2. Λειτουργικές διαταραχές**

Η εμφάνιση λειτουργικών διαταραχών είναι συνέπεια των μορφολογικών και δομικών αλλαγών, οι οποίες παρατηρούνται στην βασική μεμβράνη και στο μεσάγγειο. Διακρίνονται σε πρώιμες και σε όψιμες, ανάλογα με το χρόνο εμφάνισής τους.



## **A. Πρώιμες λειτουργικές διαταραχές**

### **α. Υπερδιήθηση**

Η υπερδιήθηση σχετίζεται άμεσα με την ποιότητα της ρύθμισης του σακχάρου. Αποκατάσταση της μεταβολικής διαταραχής, επαναφέρει τις τιμές της σπειραματικής διήθησης στα φυσιολογικά επίπεδα, για την ηλικία. Το σύστημα ρενίνης – αγγειοτενσίνης επίσης εμπλέκεται στη λειτουργία της σπειραματικής διήθησης. Η μείωση των επιπέδων της ρενίνης, προκαλεί αύξηση του όγκου του κυκλοφορούντος αίματος, με αποτέλεσμα την αύξηση της σπειραματικής διήθησης. Εκτός όμως από την μεταβολή των επιπέδων της ρενίνης, παρατηρείται και μία ανωμαλία στο επίπεδο της σύνδεσης της αγγειοτενσίνης II με το σπείραμα. Η σύνδεση γίνεται μέσω υποδοχέων. Ο αριθμός τους μειώνεται στο σπείραμα. Η μείωση αυτή είναι ένδειξη της μη λειτουργίας του συστήματος up - regulation για τους υποδοχείς, όταν μειωθούν τα επίπεδα της ρενίνης. Αυτή η διαταραχή προκαλεί αύξηση της σπειραματικής διήθησης.

Επίσης και η παραγωγή των κατεχολαμινών και των προσταγλανδινών, διαταράσσεται στον ΣΔ. Η αύξηση των επιπέδων της νεφρικής προσταγλανδίνης, μεταβάλλει τις αιμοδυναμικές συνθήκες του σπειράματος με αποτέλεσμα οι εσωνεφρικές αιμοδυναμικές αλλαγές να προκαλούν την αύξηση της σπειραματικής διήθησης.

Η σπειραματικής διήθηση εξαρτάται από την αιματική ροή του σπειράματος, η οποία είναι αυξημένη στα πρώιμα στάδια του ΣΔ και συντελεί στην εμφάνιση της υπερδιήθησης. Επίσης, εξαρτάται από την περιεκτικότητα του πλάσματος σε λευκώματα, ώστε να παραμένει αμετάβλητη και σταθερή η ωσμωτική πίεση στο σπείραμα. Η σπειραματικής διήθηση επηρεάζεται και από την υδροστατική πίεση στο εσωτερικό των τριχοειδών του σπειράματος. Αυξομειώσεις προκαλούν ανάλογες μεταβολές στη σπειραματική διήθηση. Τέλος εξαρτάται από την λειτουργικώς ικανή τριχοειδική επιφάνεια. Μεταβολές αυτής (μείωση) προκαλούν ελάττωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης. Είναι λοιπόν λογικό οι αλλαγές που συμβαίνουν στο σπείραμα των σακχαροδιαβητικών να επηρεάζουν άμεσα την διήθηση.<sup>126</sup>

## **β. Μικρολευκωματουρία**

Η ανίχνευση του λευκώματος στα ούρα, κατά τη φάση της μικρολευκωματουρίας είναι δυνατή μόνο αν χρησιμοποιηθούν ραδιοανοσολογικές μέθοδοι. Φυσιολογικές τιμές μικρολευκωματουρίας είναι από 5-10μg/ml. Όταν οι τιμές ξεπεράσουν τα 10-12μg/ml θεωρούνται παθολογικές. Ο ρυθμός αποβολής του λευκώματος επηρεάζεται από το μέγεθος του μορίου, το ηλεκτρικό φορτίο και τις αιμοδυναμικές δυνάμεις, οι οποίες δρουν κατά μήκος του αγγειακού τοιχώματος του τριχοειδούς.<sup>126,127</sup>

## **γ. Σωληναριακή Λειτουργία**

Στον ΣΔ παρατηρούνται αλλαγές στη λειτουργικότητα του εγγύς σωληναρίου. Αφορούν στην διαταραχή της επαναρροφήσεως του Na και των φωσφωρικών. Επηρεάζεται και η επαναρρόφηση της γλυκόζης. Οι μηχανισμοί, οι οποίοι ευθύνονται για αυτές τις διαταραχές δεν είναι πλήρως γνωστοί.<sup>126</sup>

## **Β. Όψιμες λειτουργικές Διαταραχές**

### **α. Ρυθμός σπειραματικής διήθησης**

Από τη στιγμή που η μικρολευκωματουρία μεταπίπτει στην έκδηλη λευκωματουρία, αρχίζει η προοδευτική και σταδιακή ελάττωση του ρυθμού της σπειραματικής διήθησης, που μέχρι εκείνη τη στιγμή ήταν φυσιολογικός ή αυξημένος. Όσο μειώνεται η σπειραματική διήθηση, τόσο αυξάνει η clearance της IgG σφαιρίνης.

### **β. Λευκωματουρία**

Σαν λευκωματουρία χαρακτηρίζεται η κατάσταση κατά την οποία το ποσό του ανιχνευόμενου στα ούρα λευκώματος είναι μεγαλύτερο από 250 μg/24ωρο. Παρατηρείται σε προχωρημένη ΔN. Αυτή η αυξημένη διαπερατότητα, είναι αποτέλεσμα της αύξησης της διαμέτρου των πόρων που

υπάρχουν στο τοίχωμα των τριχοειδών του σπειράματος, που επιτρέπουν την δίοδο μεγάλου μεγέθους μορίων, διαμέτρου μεγαλύτερης των 100<sup>Å</sup>. Η αύξηση της διαμέτρου των πόρων, καταργεί, κατά κάποιον τρόπο, την εκλεκτική διαπερατότητα, με αποτέλεσμα να γίνεται δυνατή η δίοδος μεγάλων μορίων από το τοίχωμα των τριχοειδών του σπειράματος. Τέλος ένα σημαντικό ρόλο παίζει και η αύξηση της ενδοτριχοειδικής υδροστατικής πίεσης, η οποία αυξάνει στους αρρυθμιστους διαβητικούς.

### **γ. Υπέρταση**

Στην πλειοψηφία των διαβητικών με προχωρημένη ΔΝ, αναπτύσσεται υπέρταση. Στον αρρυθμιστο ΣΔ, τα αυξημένα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα, δρουν ωσμωτικώς. Αυτό σημαίνει ανακατανομή των υγρών του σώματος από τον ενδοκυττάριο χώρο, στον εξωκυττάριο και εν συνεχεία από τον περιαγγειακό χώρο στην κυκλοφορία. Άρα αυξάνει ο όγκος του κυκλοφορούντος αίματος, με αποτέλεσμα την αύξηση της αρτηριακής πίεσης.

Επίσης τα αυξημένα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα, αυξάνουν την απορρόφηση του Na από το εγγύς σωληνάριο. Η κατακράτηση του Na οδηγεί επίσης σε υπέρταση.<sup>124</sup>

### 2.2.5. Κλινική εικόνα της ΔΝ

Η φυσική πορεία και εξέλιξη της ΔΝ διατρέχει ένα σιωπηλό υποκλινικό στάδιο, το οποίο μεταπίπτει στην κλινικά έκδηλη νόσο. Η έναρξη του υποκλινικού σταδίου, τοποθετείται στα τρία χρόνια από την εμφάνιση του ΣΔ τύπου Ι και η μετάπτωσης του στην έκδηλη νόσο χρειάζεται 10-20 χρόνια.

Η προκλινική φάση, χαρακτηρίζεται από αύξηση των τιμών της σπειραματικής διήθησης. Η αύξηση αυτή, μπορεί να ξεπερνάει κατά 20-50% τις φυσιολογικές, για την ηλικία, τιμές. Αυτή η υπερδιήθηση συσχετίζεται απολύτως με το βαθμό και την ποιότητα ρύθμισης του ΣΔ. Συνοδεύεται από αύξηση του μεγέθους των νεφρών, η οποία αποδεικνύεται είτε με πτελογραφία είτε με υπερηχογράφημα. Σ' αυτή τη φάση δεν υπάρχει έκδηλη λευκωματουρία. Αν όμως χρησιμοποιηθούν ραδιοανασολογικές μέθοδοι, αποκαλύπτεται μία διαλείπουσα στην αρχή και σταθερή στη συνέχεια μικρολευκωματουρία. Ακόμα πρωϊμότερα μπορεί να γίνει η διαπίστωση της μικρολευκωματουρίας, όταν οι διαβητικοί τύπου Ι υποβληθούν σε μέτριας έντασης σωματική άσκηση. Η άριστη ρύθμιση, προλαβαίνει ή υποστρέφει αυτές τις διεργασίες.

Η μετάπτωση στην κλινική φάση, σηματοδοτείται από τη στιγμή που η λευκωματουρία ανιχνεύεται με Albustix. Η εμφάνισή της, όπως έχει λεχθεί τοποθετείται 10-20 χρόνια, από την έναρξη του ΣΔ. Αν δεν εμφανιστεί ΔΝ μέχρι τα 30 χρόνια, τότε η πιθανότητα να εμφανιστεί είναι σχεδόν μηδενική. Αυτή η πληροφορία αφορά στο 50-60% των διαβητικών με τύπου Ι Σ.Δ. Από τη στιγμή όμως της μετάπτωσης στην κλινική φάση, η πορεία είναι ταχεία και η ρύθμιση του Σ.Δ. αποτυγχάνει ν' αναστρέψει την εξέλιξη. Ο χρόνος που

απαιτείται μέχρι το τελικό στάδιο, είναι από μερικούς μήνες έως πέντε χρόνια. Προοδευτικά αναπτύσσεται υπέρταση, η οποία συμβάλλει στην ταχύτερη εξέλιξη. Υπάρχουν διαταραχές στα επίπεδα των λιπιδίων και η συχνότητα συνύπαρξης και ΔΑ φθάνει στο 90%. Τελικά, εγκαθίσταται και ΔΝ.<sup>124</sup>

### 2.2.6. Στάδια ΔΝ

Η πορεία της ΔΝ έχει μελετηθεί καλύτερα στους ασθενείς με ΣΔ τύπου I καθώς στους ασθενείς αυτούς η έναρξη του διαβήτη είναι σαφώς προσδιορισμένη λόγω της βαρύτητας των συμπτωμάτων, ενώ είναι σπάνια η νεφρική προσβολή από άλλα αίτια λόγω της νεαρής ηλικίας των ασθενών. Αντίθετα στους ασθενείς με ΣΔ τύπου II η έναρξη του διαβήτη μπορεί να προϋπάρχει της κλινικής εκδήλωσης για πολλά χρόνια ενώ και η εμφάνιση νεφροπάθειας στο 20-25% των ασθενών, λόγω της ηλικίας τους, δεν οφείλεται στο ΣΔ αλλά σε συνυπάρχουσες παθολογικές καταστάσεις (ιδιοπαθής υπέρταση, πρωτοπαθής σπειραματονεφρίτιδα κ.α.). Ωστόσο μελέτες έχουν δείξει ότι η εξέλιξη της ΔΝ στους ασθενείς με ΣΔ τύπου II ακολουθεί τα ίδια στάδια με τη νεφροπάθεια στους ασθενείς με ΣΔ τύπου I. Τα στάδια αυτά θα περιγραφούν στη συνέχεια.<sup>126</sup>

## 1<sup>ο</sup> στάδιο

Στα αρχικά στάδια του ΣΔ δεν διαπιστώνονται κλινικοεργαστηριακά και ιστολογικά ευρήματα νεφρικής βλάβης. Με την έναρξη, όμως, του ΣΔ διαπιστώνονται αιμοδυναμικές διαταραχές στη νεφρική κυκλοφορία, που ανήκουν στο πρώτο στάδιο της ΔΝ. Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από υπερτροφία των νεφρών, αύξηση της νεφρικής ροής αίματος και αύξηση της σπειραματικής διήθησης κατά 15-20% στους ασθενείς με ΣΔ τύπου II. Οι παράμετροι αυτές μπορεί να διορθωθούν, πλήρως ή μερικώς, με την έναρξη της ινσουλινοθεραπείας και την ικανοποιητική ρύθμιση του σακχάρου αίματος. Στο στάδιο αυτό η αρτηριακή πίεση είναι φυσιολογική ενώ δεν παρατηρείται λευκωματουρία. Μπορεί, όμως, να εμφανιστεί διαλείπουσα μικροαλβουμιουρία λόγω υπερδιήθησης σε καταστάσεις έντονου stress, απορρύθμισης του σακχάρου ή σε εμπύρετες λοιμώξεις.<sup>126</sup>

## 2<sup>ο</sup> στάδιο

Οι πρώτες δομικές αλλοιώσεις εμφανίζονται 10-15 χρόνια μετά την έναρξη του ΣΔ και αφορούν τη μεμβράνη διήθησης του σπειράματος. Η εμφάνιση της μικροαλβουμιουρίας αποτελεί το πρώτο εύρημα έναρξης της ΔΝ και έχει μεγάλη προγνωστική σημασία, διότι αποτελεί την πρώτη ένδειξη για τη μελλοντική ανάπτυξης χρόνιας νεφρικής βλάβης. Με τον όρο μικροαλβουμιουρία εννοούμε την απέκκριση με τα ούρα 30-300 mg αλβουμίνης το 24ωρο. Η σπειραματική διήθηση είναι φυσιολογική ή ελαφρώς αυξημένη (όχι όμως στα επίπεδα του πρώτου σταδίου), ενώ η αρτηριακή



πίεση αρχίζει να αυξάνει (παραμένοντας ωστόσο στα ανώτερα φυσιολογικά επίπεδα).

Από ιστολογικές μελέτες έχει προκύψει ότι στο στάδιο αυτό η υπερτροφία των νεφρών παραμένει ενώ εμφανίζεται πάχυνση της βασικής μεμβράνης τόσο του σπειράματος όσο και των σωληναρίων και αύξηση της εξωκυττάριας ουσίας του μεσαγγείου.<sup>126</sup>

### **3<sup>ο</sup> στάδιο**

Το επόμενο στάδιο της νόσου εμφανίζονται οι πρώτες κλινικές εκδηλώσεις, όπως είναι η ανάπτυξη της υπέρτασης. Η ρύθμιση της υπέρτασης σε αυτό το στάδιο αποτελεί τη σημαντικότερη θεραπευτική παρέμβαση για την καθυστέρηση της εξέλιξης της νόσου. Η μικροαλβουμιουρία του δεύτερου σταδίου εξελίσσεται σε μακροαλβουμιουρία (αποβολή περισσότερων από 300 mg αλβουμίνης στα ούρα 24ώρου) ή εμφανή πρωτεϊνουρία (αποβολή περισσότερο από 500 mg ολικών πρωτεϊνών στα ούρα 24ώρου). Το τρίτο στάδιο εμφανίζεται 2-3 χρόνια μετά την εμφάνιση της μικρο-αλβουμιουρίας.

Η ιστολογική εξέταση των νεφρών αναδεικνύει τη χαρακτηριστική οζώδη ή διάχυτη σπειραματοσκλήρυνση, ενώ μπορεί να συνυπάρχει, ανάλογα με την έκταση της νεφρικής βλάβης, κάποιου βαθμού αρτηριοσκλήρυνση και ίνωση του διάμεσου χώρου του σωληναρίου. Επίσης, παρατηρείται μείωση της σπειραματικής διήθησης σε σύγκριση με τα

προηγούμενα στάδια της νόσου που χαρακτηρίζονται, όπως προαναφέρθηκε, από σπειραματική υπερδιήθηση.

Στο στάδιο αυτό η μικροαλβουμινουρία εξελίσσεται σε πρωτεϊνουρία και εμφανίζονται ισχαιμικές αλλοιώσεις και ίνωση στο διάμεσο νεφρικό χώρο, με αποτέλεσμα την έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας η οποία επιδεινώνει την υπέρταση αλλά και την πρωτεϊνουρία. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένας φαύλος κύκλος που ανατροφοδοτεί τη νεφρική βλάβη.<sup>126</sup>

#### **4<sup>ο</sup> στάδιο**

Αυτό το στάδιο της ΔΝ χαρακτηρίζεται από τη σταδιακή έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας και την εμφάνιση νεφρικής ανεπάρκειας. Επίσης χαρακτηρίζεται από την επιδείνωση της πρωτεϊνουρίας, η οποία μπορεί να φτάσει σε επίπεδο νεφρωσικού συνδρόμου και από σοβαρή και δύσκολα ρυθμιζόμενη υπέρταση. Μάλιστα η επιθετική αντιυπερτασική αγωγή και η χορήγηση αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου για τον περιορισμό της πρωτεϊνουρίας αποτελούν τις βασικές θεραπευτικές προτεραιότητες για την καθυστέρηση της εξέλιξης της νεφρικής βλάβης. Αυτό το στάδιο εμφανίζεται, συνήθως, 15 με 20 χρόνια μετά την έναρξη του ΣΔ.<sup>126</sup>

#### **5<sup>ο</sup> στάδιο**

Ανεξάρτητα από την αγωγή, η νόσος θα εξελιχθεί, σε τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια. Σε αυτό το στάδιο απαιτείται η έναρξη κάποιας μεθόδου υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας, ενώ παράλληλα εμφανίζονται ή

επιδεινώνονται και οι εξωνεφρικές εκδηλώσεις του ΣΔ (αμφιβληστροειδοπάθεια, καρδιαγγειακή νόσος, νευροπάθεια) με αποτέλεσμα να αυξάνεται σημαντικά η θνητότητα και η νοσηρότητα των ασθενών αυτών. Αυτός είναι και ο λόγος που η επιβίωση των ασθενών με ΣΔ σε μέθοδο υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας είναι σημαντικά χειρότερη από αυτή των ασθενών με τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια άλλης αιτιολογίας.<sup>126</sup>

### **2.2.7. Πρόληψη και θεραπεία της ΔΝ**

Η ΔΝ είναι μια κατάσταση για την οποία δεν υπάρχει ειδική θεραπεία. Όπως αναφέρθηκε η νεφροπάθεια εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε διαβητικούς ασθενείς με υπέρταση, σπειραματική υπερδιήθηση και κακή ρύθμιση του σακχάρου. Βέβαια θα πρέπει να σημειωθεί ότι από τη στιγμή που θα καταστεί κλινικά έκδηλη η ΔΝ, η εξέλιξη της νόσου δεν ανακόπτεται. Η τροποποίηση των ανωτέρω παραγόντων, ειδικά στα στάδια που η κατάσταση είναι ακόμη αναστρέψιμη αποτελεί το βασικό στόχο της πρόληψης. Σε ό,τι αφορά την καθυστέρηση της εξέλιξης της νόσου οι χειρισμοί που γίνονται αποβλέπουν στη ρύθμιση της μεταβολικής διαταραχής, στην αντιμετώπιση της υπέρτασης και τον καθορισμό του κατάλληλου διαιτολογίου.

### **2.2.7.1. Ρύθμιση της μεταβολικής διαταραχής**

Η ρύθμιση του σακχάρου αίματος αποτελεί βασικό παράγοντα που επηρεάζει την εμφάνιση των επιπλοκών του ΣΔ. Ειδικά για τη ΔΝ η καλή ρύθμιση του σακχάρου, όταν γίνεται από αρχικά στάδια της νόσου, μειώνει σημαντικά την σπειραματική υπερδιήθηση και τη σπειραματική υπερτροφία, μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης μικροαλβουμινουρίας ενώ σταθεροποιεί ή και μειώνει την απέκκριση λευκώματος μετά την εμφάνιση της μικροαλβουμινουρίας. Σε μερικές περιπτώσεις δε, υπάρχει η δυνατότητα αναστροφής των χρόνιων βλαβών του νεφρικού ιστού στη ΔΝ αλλά η διαδικασία είναι πολύ αργή και σταδιακή. Προτείνεται, λοιπόν, σε κάθε στάδιο της διαβητικής νόσου, η αυστηρή ρύθμιση του σακχάρου με στόχο η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA1c) να είναι μικρότερη από 7%.<sup>126</sup>

### **2.2.7.2. Δίαιτα χαμηλού λευκώματος**

Ο περιορισμός στο λεύκωμα της τροφής, φαίνεται ότι μειώνει την σπειραματική υπερδιήθηση και καθυστερεί την εξέλιξη της νεφρικής νόσου.<sup>126</sup>

### **2.2.7.3. Ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης**

Η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης αποτελεί τη σημαντικότερη θεραπευτική παρέμβαση για την πρόληψη ή την καθυστέρηση στην εξέλιξη της ΔΝ. Ο στόχος είναι ο αποτελεσματικός έλεγχος της υπέρτασης και

μάλιστα σε χαμηλότερα επίπεδα αρτηριακής πίεσης από ότι στο γενικό πληθυσμό.<sup>126</sup>

Φάρμακα εκλογής για την αντιμετώπιση της υπέρτασης στη ΔΝ είναι οι αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης, οι ανταγωνιστές των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης II.<sup>132</sup> Σε διαβητικούς ασθενείς με νεφρική νόσο απαιτείται η χρησιμοποίηση κατά μέσο όρο τεσσάρων διαφορετικών και αλληλοσυμπληρούμενων αντιϋπερτασικών φαρμάκων για να επιτευχθεί ο θεραπευτικός στόχος. Ο συνδυασμός α-MEA με ανταγωνιστή των διαύλων ασβεστίου παρέχει την καλύτερη αντιπρωτεϊνουρική δράση.<sup>126</sup>

#### **2.2.7.4. Συμπληρωματικά θεραπευτικά μέτρα**

Ευεργετική δράση έχει και η αντιμετώπιση της υπερλιπιδαιμίας καθώς εμπλέκεται στη νεφρική βλάβη ενώ συγχρόνως αυξάνει τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Απαραίτητη είναι η ρύθμιση του ισοζυγίου ασβεστίου- φωσφόρου και της οξεοβασικής ισορροπίας.

Συγχρόνως πρέπει να ελέγχονται τα όργανα στόχοι του ΣΔ (καρδιά, περιφερικά αγγεία, νεύρα, οφθαλμοί) ώστε να επιτευχθεί η έγκαιρη διάγνωση και αντιμετώπιση συνοδών της νεφροπάθειας παθολογικών καταστάσεων.<sup>126</sup>

### 2.2.7.5. Υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας στο ΣΔ

Η επιβίωση των ασθενών με ΣΔ τόσο στην αιμοκάθαρση όσο και στην περιτοναϊκή κάθαρση είναι χειρότερη από του γενικού πληθυσμού των νεφροπαθών και αυτό οφείλεται στα συνοδά προβλήματα και κυρίως στην αυξημένη καρδιαγγειακή θνησιμότητα. Η θεραπεία εκλογής είναι η μεταμόσχευση νεφρού. Και στην περίπτωση αυτή η επιβίωση είναι μικρότερη από αυτή του γενικού πληθυσμού των μεταμοσχευμένων με τα καρδιαγγειακά προβλήματα και τις λοιμώξεις να εμφανίζονται σε αυξημένη συχνότητα. Για τους νέους ασθενείς (<45 ετών) η θεραπεία εκλογής είναι η ταυτόχρονη μεταμόσχευση νεφρού-παγκρέατος καθώς διορθώνει τη μεταβολική διαταραχή και τις συνέπειές της στη νεφρική λειτουργία και το καρδιαγγειακό. Σε μεγαλύτερους σε ηλικία ασθενείς οι συχνές μετεγχειρητικές επιπλοκές περιορίζουν την ένδειξη της ταυτόχρονης μεταμόσχευσης.<sup>126</sup>

## 2.3. Μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί στην ΔΑ και ΔΝ

### 2.3.1. Η αναγκαιότητα διερεύνησης της παθογένειας της ΔΑ και ΔΝ

Σήμερα, παρά τις σύγχρονες μεθόδους πρόληψης και αντιμετώπισης στην οφθαλμολογία και τη νεφρολογία, ο αριθμός των ατόμων με σοβαρές μορφές ΔΑ και ΔΝ δεν τείνει να περιοριστεί. Η προσπάθεια διερεύνησης της παθογένειας των επιπλοκών του ΣΔ, αναλύοντας το γενετικό υπόβαθρο της νόσου καθώς και η προσπάθεια ταυτοποίησης ενός συγκεκριμένου γονιδίου, με καθοριστική επίδραση στην εμφάνιση της ΔΑ και ΔΝ, έχει αποτύχει.

Ωστόσο, όπως έχει προαναφερθεί, υπάρχουν υποομάδες υπερήλικων ασθενών με ΣΔ τύπου II που δεν ανέπτυξαν ΔΑ, ανεξάρτητα από τον πτωχό έλεγχο της γλυκόζης, ενώ άλλες υποομάδες, με αρκετά καλό έλεγχο του σακχάρου, εμφάνισαν ΔΑ. Η ανάλυση υποομάδων ασθενών έδειξε σημαντική οικογενή μεταβίβαση της ΔΑ, ειδικά σε ασθενείς με εκτεταμένη παραγωγική ΔΑ.

Ο βαθμός της υπεργλυκαιμίας δεν μπορεί, επίσης, να αιτιολογήσει από μόνος του τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΔΝ που παρουσιάζουν ορισμένα άτομα με ΣΔ,<sup>9</sup> και ο έλεγχος των παραδοσιακών παραγόντων κινδύνου δε φαίνεται να ασκεί σημαντική προληπτική επίδραση στην εμφάνιση της ΔΝ.<sup>4</sup> Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι δεν αναπτύσσουν ΔΝ όλοι οι διαβητικοί ασθενείς, επιβεβαιώνει την ύπαρξη ειδικών παραγόντων γενετικής προδιάθεσης, ενώ παράλληλα, έχει παρατηρηθεί οικογενής συγκέντρωση ΔΝ τόσο σε ασθενείς με ΣΔ τύπου I όσο και σε τύπου II, σε διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες.<sup>9,10</sup>



Οι ενδείξεις αυτές αποτελούν πειστικά στοιχεία ότι οι γενετικοί παράγοντες συμβάλλουν στην εμφάνιση των επιπλοκών του ΣΔ και γι αυτό οι προσπάθειες συσχέτισης αυτών των δύο παραμέτρων συνεχίζονται.<sup>149</sup>

Επιπρόσθετα η απουσία απόλυτα αποτελεσματικού θεραπευτικού χειρισμού στις περιπτώσεις ΔΑ και ΔΝ, σε όλους ανεξαιρέτως τους ασθενείς, επιβάλλουν την περαιτέρω κατανόηση της παθογένειας των επιπλοκών του ΣΔ και τη διεξοδική μελέτη του προβλήματος που πιθανόν να οδηγήσει στην πρόληψή του. Τον στόχο αυτό υπηρετεί η παρούσα μελέτη.

### **2.3.2. Μεταλλάξεις που επηρεάζουν την εμφάνιση της ΔΑ και ΔΝ**

Μέσα από την εξέλιξη του ανθρώπου το γενετικό υλικό έχει υποστεί αλλαγές με πολλούς διαφορετικούς τρόπους. Μεταλλάξεις ονομάζονται οι αλλαγές στην αλληλουχία του DNA και μπορεί να δημιουργούν ένα διαφορετικό φαινότυπο, ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο η αλλαγή επιδρά στο γονιδιακό προϊόν, δηλαδή στην πρωτεΐνη. Σύμφωνα με τη μονάδα του γενετικού υλικού που αλλάζει, οι μεταλλάξεις διακρίνονται σε γονιδιακές ή μεταλλάξεις σημείου, εάν η αλλαγή βρίσκεται σε ένα μόνο γονιδίο, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα νέο αλληλόμορφο, σε χρωμοσωματικές μεταλλάξεις, εάν η αλλαγή βρίσκεται στη δομή των χρωμοσωμάτων και γενωματικές μεταλλάξεις, εάν η αλλαγή επηρεάζει τον αριθμό των χρωμοσωμάτων.

Οι μεταλλάξεις συμβάλλουν στη δημιουργία γενετικής ποικιλομορφίας στον πληθυσμό και ευθύνονται για πολλές κληρονομικές ασθένειες.

Μεταλλάξεις μπορούν να συμβούν σε οποιοδήποτε γεννητικό ή σωματικό κύτταρο ενός οργανισμού. Μόνο οι μεταλλάξεις των γεννητικών κυττάρων, όμως, μπορούν να μεταβιβαστούν από τη μια γενιά στην επόμενη.<sup>143</sup>

Οι παραλλαγές στην ακολουθία του DNA ονομάζονται απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms) και που μπορούν να συμβούν όταν ένα νουκλεοτίδιο αντικατασταθεί από ένα άλλο σε μια συγκεκριμένη θέση. Μια μετάλλαξη για να θεωρηθεί πολυμορφισμός θα πρέπει να εμφανίζεται με συχνότητα που υπερβαίνει το 1% σε έναν πληθυσμό.

Τα SNPs παρατηρούνται πιο συχνά σε μη κωδικές περιοχές, όπως στον εκκινητή και στα ιντρόνια. Τα SNPs στην περιοχή του εκκινητή μπορεί να επηρεάσουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου. SNPs υπάρχουν και σε κωδικές περιοχές και καλούνται cSNPs. Τα cSNPs παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς μπορούν να αλλάξουν τη βιολογική λειτουργία μιας πρωτεΐνης. Κατά μέσο όρο, ένα SNP πιστεύεται ότι παρουσιάζεται σε κάθε 300 βάσεις στον άνθρωπο. Υπάρχουν, δηλαδή, αρκετά εκατομμύρια θέσεις νουκλεοτιδίων στο ανθρώπινο γονιδίωμα στις οποίες παρατηρείται πολυμορφισμός. Μέχρι σήμερα περίπου 10 εκατομμύρια SNPs είναι καταγεγραμμένα για τον άνθρωπο στις βάσεις δεδομένων.

Έχουν βρεθεί πολυμορφισμοί γονιδίων που σχετίζονται με το διαβήτη τύπου I και II, καθώς και με άλλες ασθένειες. Τα SNPs δεν αποτελούν τους αιτιολογικούς παράγοντες ασθενειών, αλλά μπορούν να βοηθήσουν στον καθορισμό της πιθανότητας να αναπτύξει κάποιος μια συγκεκριμένη ασθένεια, γιατί βρίσκονται κοντά σε γονίδια που έχει βρεθεί ότι συνδέονται με συγκεκριμένες ασθένειες.

Η διερεύνηση των SNPs μπορεί να οδηγήσει είτε στην αναγνώριση γονιδίων που μπορεί να σχετίζονται με μια συγκεκριμένη ασθένεια, είτε στην αναγνώριση γονιδίων-στόχων για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων, είτε στην αναγνώριση γονιδίων που μπορεί να προβλέπουν το αποτέλεσμα από μια θεραπεία.<sup>147</sup>

Οι γενετικές ασθένειες που οφείλονται σε αλλαγή ή σε περισσότερες αλλαγές σε ένα μόνο γονίδιο ονομάζονται μονογονιδιακές και κληρονομούνται σύμφωνα με τους νόμους του Mendel. Οι πολυγονιδιακές ασθένειες προκαλούνται από αλλαγές σε αρκετά γονίδια και εξαρτώνται και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Για το λόγο αυτό, αναφέρονται, συχνά, ως σύνθετες ασθένειες.<sup>144</sup> Συγκεκριμένα οι μεταλλάξεις, όπως προαναφέρθηκε, μπορεί να επηρεάσουν τη δομή και τη λειτουργία μιας πρωτεΐνης ή ενός tRNA. Σε μερικές περιπτώσεις, αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί να βρίσκονται σε ρυθμιστική περιοχή ενός γονιδίου και να αλλάζουν, πλήρως, την έκφραση του γονιδίου. Η μονογονιδιακή μορφή χαρακτηρίζεται από υψηλή διεισδυτικότητα, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι η παρουσία μιας μετάλλαξης, πρακτικά, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη της ασθένειας. Χαρακτηρίζεται επίσης από την παρουσία πρόσθετων παγκρεατικών χαρακτηριστικών. Το γενετικό υπόβαθρο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση, ενώ οι περιβαλλοντικοί παράγοντες τροποποιούν ελάχιστα την κλινική εικόνα. Οι γνωστές περιπτώσεις μονογονιδιακής μορφής του ΣΔ χαρακτηρίζονται, είτε από σοβαρά προβλήματα στην έκκριση ινσουλίνης, είτε από σημαντική μείωση στην αντοχή στην ινσουλίνη και δεν έχει βρεθεί να επηρεάζουν την πιθανότητα εμφάνισης των επιπλοκών του.

Η πολυγονιδιακή μορφή είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Μελέτες έδειξαν ότι εμπλέκονται πολλά γονίδια, ωστόσο, ο τελικός αριθμός και η σχετική τους συνεισφορά δεν έχουν καθοριστεί. Τα διάφορα γονίδια μπορεί να συμμετέχουν στο ίδιο ή σε διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια. Μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί σε αυτά τα γονίδια μπορεί να εμφανίζονται σε μεγάλη συχνότητα σε έναν πληθυσμό και ελάχιστα σε έναν άλλο. Αλληλόμορφα αυτών των πολυμορφισμών ανιχνεύονται τόσο σε υγιή όσο και σε διαβητικά άτομα με διαφορετικές συχνότητες. Αλληλόμορφα των πολυμορφισμών προκαλούν μόνο προδιάθεση αλλά δεν αποτελούν τους αιτιολογικούς παράγοντες που ευθύνονται για την ανάπτυξη του ΣΔ και συνδέονται με μικρό κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας και των επιπλοκών της, όπως είναι η ΔΑ και η ΔΝ.<sup>143</sup>

### **2.3.3. Μικροσυστοιχίες νουκλεϊκών οξέων (DNA microarrays) και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).**

Στην προσπάθεια περαιτέρω διερεύνησης της γενετικής προδιάθεσης έχει βοηθήσει σημαντικά η ανάπτυξη τεχνικών όπως οι μικροσυστοιχίες των νουκλεϊκών οξέων (DNA microarrays) και η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

Οι μικροσυστοιχίες νουκλεϊκών οξέων (DNA microarrays) υψηλής πυκνότητας αποτελούνται από μικροσκοπικές τακτικά διατεταγμένες σειρές νουκλεϊκών οξέων από ξεχωριστά τμήματα γονιδίων, τοποθετημένες σε προκαθορισμένες θέσεις. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας αυτής κατέστησε

εφικτή την ταυτόχρονη μέτρηση της έκφρασης χιλιάδων γονιδίων. Εφαρμόζοντας σε αυτές τις μικροσυστοιχίες τη μεθοδολογία του ειδικού υβριδισμού σε κλινικά δείγματα, είναι δυνατή η λήψη συγκεκριμένων πληροφοριών για την παθογένεια μιας νόσου και η ομαδοποίησή τους σε λειτουργικές κατηγορίες ανάλογα με την έκφραση του γονιδιώματος.<sup>144</sup>

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης PCR, πολλαπλασιάζοντας συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων, έδωσε για πρώτη φορά τη δυνατότητα διάθεσης αρκετού DNA για επεξεργασία, ξεκινώντας από πολύ μικρές ποσότητες αρχικού υλικού.<sup>144</sup>

#### **2.3.4. Συσχέτιση γονιδίων με τον κίνδυνο εμφάνισης ΔΑ και ΔΝ**

Η επιλογή των γονιδίων που πιθανόν να ενέχονται στην παθογένεια της ΔΑ και της ΔΝ γίνεται με βάση τα τυπογραφικά ή και λειτουργικά χαρακτηριστικά τους και κυρίως με βάση την επίδραση των προϊόντων που κωδικοποιούν, ενδοκυττάρους, μεταβολικούς, αιμοδυναμικούς και ανοσολογικούς παράγοντες που ενέχονται στην παθογένεια των επιπλοκών του ΣΔ, όπως.

Οι μελέτες που αναφέρονται σε γονίδια που πιθανόν να ενέχονται στην παθογένεια της ΔΑ και της ΔΝ, αν και έχουν γίνει σε διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες, με μικρό αριθμό ατόμων και με διαφορετικούς ορισμούς για τις επιπλοκές του ΣΔ, έχουν αναδείξει 4 γονιδιακούς τόπους (18q22-23, 7q35-36, 7q15, 10q26), ενισχύοντας την υπόθεση για ύπαρξη γενετικής προδιάθεσης και ελαττώνοντας την πιθανότητα ψευδώς αρνητικών-

θετικών αποτελεσμάτων. Αρκετές μελέτες προτείνουν διάφορα γονίδια που συμβάλλουν ως συνιστώσες, στην εμφάνιση της νόσου. Τα γονίδια που φαίνεται να εμπλέκονται με την εμφάνιση της ΔΑ αναφέρονται στις σελίδες 37 και 38, ενώ τα γονίδια που φαίνεται να εμπλέκονται με την εμφάνιση της ΔΝ αναφέρονται στις σελίδες 71-78.<sup>141,142,144</sup>

Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης που προκαλούν την ενεργοποίηση της μεταβολικής οδού των πολυολών, όπου η (ALR2) είναι το πρώτο και καθοριστικό ένζυμο ρυθμού. Συγκεκριμένα το μέλος B1 (αναγωγή της αλδόζης AR) της οικογένειας 1 αλδο-κέτο αναγωγασών, είναι ένα ένζυμο το οποίο στους ανθρώπους κωδικοποιείται από το γονίδιο *AKR1B1*, το οποίο βρίσκεται στον γενετικό τόπο 7q35. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί ένα μέλος της υπέρ-οικογένειας (superfamily) των αλδο/κέτο αναγωγασών, το οποίο καταλύει την αναγωγή ενός αριθμού αλδεϋδών συμπεριλαμβανομένης και της γλυκόζης σε σορβιτόλη και επομένως μπορεί να εμπλέκεται στην ανάπτυξη διαβητικών μικροαγγειακών επιπλοκών (όπως η ΔΝ και ΔΑ).<sup>142,150</sup> Σε αυτή τη μελέτη, εξετάζονται οι συσχετίσεις του πολυμορφισμού της (ALR2) με την εμφάνιση της ΔΑ και ΔΝ, σε σακχαροδιαβητικούς, στην περιοχή της Θεσσαλίας, με την ελπίδα τα αποτελέσματα και άλλων ανεξάρτητων μελετών που πραγματοποιούνται το ίδιο αντικείμενο έρευνας, να συγκεντρωθούν και να αναλυθούν ως αποτελέσματα μιας μεγάλης μελέτης.

## 2.4. Μελέτες συσχέτισης γονιδίων στην ΔΑ και ΔΝ

Με την βοήθεια των DNA microarrays και της PCR, δύο στρατηγικές έχουν ακολουθηθεί προκειμένου να αναδειχθούν, αλλά και να ταυτοποιηθούν οι γονιδιακοί τόποι που σχετίζονται με τη γενετική προδιάθεση της ΔΑ και της ΔΝ:

- η ανάλυση γενετικής σύνδεσης γονιδίων (Linkage analysis) που βασίζεται σε μελέτες οικογενειών που παρουσιάζουν τη νόσο (family-based studies)
- και η ανάλυση συσχέτισης (association analysis) που βασίζεται σε μελέτες στις οποίες οι ομάδες ασθενών συγκρίνονται με ομάδες ελέγχου (case-control studies ή candidate gene studies).<sup>144</sup>

Η ταυτοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με πολυπαραγοντικές νόσους μπορεί να ξεκινήσει εστιάζοντας αρχικά στις οικογένειες που εμφανίζουν τη νόσο, όπου αναμένεται και η μεγαλύτερη γονιδιακή συμμετοχή. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται οι μελέτες γενετικής σύνδεσης (linkage studies), οι οποίες είναι κατάλληλες για την ταυτοποίηση σπάνιων γονιδιακών πολυμορφισμών που έχουν μεγάλη επιρροή στον γονότυπο. Πρόκειται για μελέτες που πραγματοποιούνται σε οικογένειες με υψηλό ποσοστό εμφάνισης ΔΑ και ΔΝ και αξιολογούν την κληρονομική μεταβίβαση πολυμορφικών γονιδιακών δεικτών που κατανέμονται σε όλο το γονιδίωμα, ανάλογα με την παρουσία ή απουσία της νόσου σε συγγενείς. Ωστόσο, η διενέργεια αυτών των μελετών παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες και περιορισμούς. Μέχρι σήμερα έχουν δημοσιευθεί μόνο λίγες μελέτες, με έλεγχο όλου του γονιδιώματος (genome-wide scan), σε οικογένειες με υψηλά ποσοστά εμφάνισης των



μικροαγγειακών επιπλοκών του ΣΔ. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών δεν συμφωνούν πάντα, αποδεικνύοντας για άλλη μια φορά αυτό που προκύπτει και από μελέτες παρατήρησης, ότι δηλαδή ο διαφορετικός επιπολασμός της νόσου στις διαφορές πληθυσμιακές ομάδες οφείλεται στο διαφορετικό γενετικό υλικό που αυτές φέρουν. Επίσης, η κάθε μελέτη προτείνει την ύπαρξη και άλλων γονιδίων που συμβάλλουν ως συνιστώσες, με μικρότερη όμως επίδραση στην εμφάνιση της νόσου.<sup>144,147</sup>

Πάνω σε αυτή την παρατήρηση στηρίζονται οι μεγαλύτερης κλίμακας μελέτες συσχέτισης ή μελέτες εύρεσης ύποπτων γονιδίων (association studies ή candidate gene studies). Στις μελέτες αυτές γίνεται προσπάθεια να διερευνηθεί η σχέση που μπορεί να υπάρχει ανάμεσα σε πολυμορφισμούς (SNPs) ενός ύποπτου γονιδίου ή μιας περιοχής (επιλεγμένο από τη βιβλιογραφία ή το HapMap database) με την εμφάνιση της νόσου, συγκρίνοντας ομάδες διαβητικών ασθενών με αμφιβληστροειδοπάθεια ή νεφροπάθεια (cases), με ομάδες ελέγχου διαβητικών ασθενών χωρίς τις επιπλοκές αυτές (controls).<sup>148</sup>

Η παρούσα έρευνα αποτελεί μια μελέτη εύρεσης συσχετισμού των υποψηφίων γονιδίων με τη νόσο και πραγματοποιείται με την προοπτική τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής να συγκριθούν και με άλλες ανεξάρτητες μελέτες συσχέτισης υποψηφίων γονιδίων ή ολόκληρων γονιδιωμάτων GWAS και να αναλυθούν με τη μορφή της μετα-ανάλυσης, με την ελπίδα η διεξοδική διερεύνηση του προβλήματος να οδηγήσει στην πρόληψή του.

## **Κεφάλαιο 3. Ειδικό μέρος**

### 3.1. Σκοπός της μελέτης

Μέχρι σήμερα, η προσπάθεια ταυτοποίησης ενός συγκεκριμένου γονιδίου, με καθοριστική επίδραση στην εμφάνιση των επιπλοκών του ΣΔ, δεν έχει επιτευχθεί. Έχουν ταυτοποιηθεί βέβαια, όπως προαναφέρθηκε, ποικίλοι πολυμορφισμοί σε διάφορα γονίδια, με μικρή όμως συμβολή στην επιδείνωση της νόσου. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα τόσο των μελετών γενετικής σύνδεσης, όσο και των μελετών συσχέτισης είναι πολλές φορές αντικρουόμενα.<sup>144,145</sup> Οπωσδήποτε λοιπόν ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί εκτενέστερα ο ρόλος της αναγωγάσης της αλδόζης (ALR2) στην εμφάνιση των επιπλοκών του ΣΔ.

Η παρούσα έρευνα αποτελεί μια μελέτη εύρεσης συσχετισμού των υποψήφιων γονιδίων με τη νόσο. Πρώτος σκοπός της ήταν η διερεύνηση, σε μοριακό επίπεδο, της συχνότητας των εξής 5 πολυμορφισμών-SNPs:

- rs2259458 G/T,
- rs2734653 G/A,
- rs2670230 C/A,
- rs1790998 C/A,
- rs17188118 A/C

του γονιδίου της αναγωγάσης της αλδόζης (AKR1B1) σε ασθενείς με ΣΔ τύπου II χωρίς ΔΑ και ΔΝ, (ομάδα ελέγχου ασθενών), σε σακχαροδιαβητικούς τύπου II με ΔΝ, σακχαροδιαβητικούς τύπου II με ΔΑ, σε σακχαροδιαβητικούς τύπου II με ΔΝ και ΔΑ και η σύγκρισή τους με τα επίπεδα συχνότητας αυτών των πολυμορφισμών στους υγιείς μάρτυρες (ομάδα ελέγχου υγείων). Από αυτά τα αποτελέσματα επιχειρείται να εξεταστεί εάν η παρουσία αυτών των

πολυμορφισμών συσχετίζεται με την επιδείνωση στην εξέλιξη της νόσου του ΣΔ τύπου II.

Δεύτερος σκοπός της μελέτης ήταν να εξεταστεί η πιθανή συσχέτιση των προαναφερθέντων πολυμορφισμών του γονιδίου *AKR1B1* με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης των επιπλοκών του ΣΔ (ΔΑ και ΔΝ). Βέβαια σε αυτή την υπόθεση έγινε σύγκριση και του συν-κυρίαρχου μοντέλου (δηλαδή της ομάδας των σακχαροδιαβητικών ασθενών χωρίς επιπλοκές) και του προσθετικού μοντέλου των ασθενών με επιπλοκές (δηλαδή της ομάδας των σακχαροδιαβητικών ασθενών με ΔΑ και ΔΝ).

## **3.2. Σχεδιασμός της μελέτης**

### **3.2.1. Υλικό και μέθοδος**

#### **Επιλογή ασθενών**

Η μελέτη διεξήχθη στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, κατά το χρονικό διάστημα 12/04/2006 - 12/04/2007. Η επιλογή των διαβητικών ασθενών και των υγιών μαρτύρων, που συμμετείχαν στη μελέτη, έγινε από τους εξεταζόμενους στο ειδικό ιατρείο βυθού, στα εξωτερικά ιατρεία της Οφθαλμολογικής Κλινικής του Π.Γ.Ν. Λάρισας και από τους νοσηλευόμενους στην ίδια Κλινική. Οι μάρτυρες επιλέχθηκαν, ώστε να αντιστοιχούν με τους πάσχοντες ως προς την ηλικία και το φύλο, ενώ οι ασθενείς επιλέχθηκαν με τα εξής κριτήρια ένταξης:

- Άνδρες ή γυναίκες άνω των 50 ετών.
- Άτομο πρόθυμο να υπογράψει οικειοθελώς τα έντυπα συγκατάθεσης και προστασίας δεδομένων πριν την ένταξή του στην κλινική μελέτη.
- Ασθενείς με διαγνωσμένο ΣΔ τύπου II
- Ασθενείς που είναι ικανοί να καταλάβουν τις απαιτήσεις της κλινικής μελέτης και να ακολουθήσουν το πρόγραμμα επισκέψεων παρακολούθησης.

Κριτήρια αποκλεισμού, τόσο για τους ασθενείς όσο και για τους μάρτυρες, αποτελούσαν τα εξής:

- Προηγούμενες οφθαλμολογικές επεμβάσεις (όπως εγχείρηση καταρράκτη, υαλοειδεκτομή, διαθλαστικές επεμβάσεις).
- Οφθαλμικά τραύματα, τα οποία προκάλεσαν μόνιμες αλλοιώσεις στον κερατοειδή ή αντιμετωπίστηκαν με συρραφή και ράμματα.
- Χρόνιες ή οξείες παθήσεις του κερατοειδούς.
- Συστηματικές παθήσεις οι οποίες ενδέχεται να προκαλέσουν νεφροπάθεια, πέραν της διαβητικής νεφροπάθειας.
- Συστηματικές παθήσεις, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν είτε λόγω μηχανισμού είτε λόγω αγωγής βλάβες στον αμφιβληστροειδή, όπως ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος και η λήψη υδροξυχλωροκίνης (Plaquenil). Ωστόσο, δεν αποκλειστήκαν άτομα με Στεφανιαία Νόσο, αρτηριακή υπέρταση ή δυσλιπιδαιμία, νοσήματα που συχνά συνοδεύουν το ΣΔ.
- Αναφορικά με την ομάδα ελέγχου, αποκλείονται άτομα με αλλοιώσεις στον αμφιβληστροειδή. Εξαίρεση αποτελούν πρώιμες αλλοιώσεις

ξηρής ωχροπάθειας ή περιφερικοί σπίλοι, που δεν επηρεάζουν την οπτική οξύτητα.

Αφού εξηγήθηκε ο σκοπός και η σημασία της παρούσας ερευνητικής εργασίας, εξασφαλίστηκε η συναίνεση των ασθενών και των μαρτύρων για τη συμμετοχή τους στη μελέτη. Η εργασία διενεργήθηκε σύμφωνα με τις αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι και η μελέτη εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Έγινε ακριβής καταγραφή των δημογραφικών δεδομένων, του οικογενειακού και ατομικού ιστορικού των συμμετεχόντων στη μελέτη, και μετρήθηκαν οι σωματομετρικοί δείκτες ( $BMI = \text{Βάρος σώματος} / \text{Ύψος}^2$  και  $WHR = \text{Περίμετρος μέσης} / \text{Περίμετρος Ισχύων}$ ) και η συστηματική αρτηριακή πίεση.

Το σύνολο των ατόμων που πληρούσε τα κριτήρια συμμετοχής και τα κριτήρια αποκλεισμού στην έρευνα ήταν 591 ασθενείς και μάρτυρες, οι οποίοι διαχωρίστηκαν σε 5 ομάδες, ως εξής:

- Ασθενείς με ΣΔ τύπου II, χωρίς ΔΑ και ΔΝ, (ομάδα ελέγχου ασθενών).
- Σακχαροδιαβητικούς τύπου II με ΔΝ.
- Σακχαροδιαβητικούς τύπου II με ΔΑ.
- Σακχαροδιαβητικούς τύπου II με ΔΝ και ΔΑ.
- Υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου υγείων).

## Οφθαλμολογικός έλεγχος

Για τη διάγνωση ή τον αποκλεισμό ύπαρξης ΔΑ, καθώς και για τη σταδιοποίησή της, τόσο οι διαβητικοί ασθενείς όσο και οι υγιείς μάρτυρες υποβλήθηκαν στον εξής οφθαλμολογικό έλεγχο:

- Μέτρηση οπτικής οξύτητας κάθε οφθαλμού κατά Snellen (μακρινή όραση).
- Εκτίμηση κεντρικής όρασης με τους ειδικούς διαγραμματισμένους πίνακες του Amsler.
- Εξέταση των οφθαλμών στη σχισμοειδή λυχνία. Εδώ αναζητήθηκαν πιθανές αιτίες μείωσης της οπτικής οξύτητας εκτός της ΔΑ (π.χ. καταρράκτης, θολώσεις κερατοειδούς), καθώς και πιθανή νεοαγγείωση της ίριδας ως αποτέλεσμα παραγωγικής ΔΑ.
- Τονομέτρηση (μέτρηση ενδοφθάλμιας πίεσης) κάθε οφθαλμού με τονόμετρο επιπέδωσης Goldmann.
- Βυθοσκόπηση κάθε οφθαλμού έπειτα από μυδρίαση.
- Φλουοραγγειογραφία έγινε στις περιπτώσεις που υπήρχαν ενδείξεις (προσδιορισμός της βαρύτητας της ΔΑ). Κατά την εξέταση αυτή, έγινε λήψη φωτογραφιών του βυθού κάθε οφθαλμού πριν και μετά από ενδοφλέβια έγχυση σκιαγραφικής ουσίας (φλουοροσεΐνης) με σκοπό την απεικόνιση διαταραχών του αγγειακού συστήματος του βυθού, την ανίχνευση χαρακτηριστικών βλαβών ΔΑ και τον προσδιορισμό της βαρύτητας της ΔΑ.

Για τη σταδιοποίηση της ΔΑ εφαρμόστηκε το σύστημα ταξινόμησης που έχει προταθεί από την «Early Treatment Diabetic Retinopathy Study»



(ETDRS) και βασίζεται στις τυποποιημένες φωτογραφίες της ETDRS (Airlie House standard photographs).<sup>44,58</sup> Το σύστημα αυτό εφαρμόζεται διεθνώς (ETDRS Research Group 1991d, DCCT Research Group 1995)<sup>46,74</sup> και συνοψίζεται στους Πίνακες 3.2. και 3.2.

Σύμφωνα με την ETDRS, η ΔΑ χαρακτηρίζεται βάση της απουσίας ή παρουσίας νεοαγγείωσης του αμφιβληστροειδούς ως :

- Μη – παραγωγική ΔΑ
- Παραγωγική ΔΑ αντίστοιχα

Ανάλογα με την βαρύτητά της, η μη – παραγωγική ΔΑ περιγράφεται ως:

#### **Μη – παραγωγική ΔΑ**

- **Ήπια**: μόνο μικροανευρύσματα
  - **Μέτρια**: ευρήματα περισσότερα της ήπιας και λιγότερα της σοβαρής
  - **Σοβαρή**: ένα από τα 3 κριτήρια (Κανόνας 4-2-1 τεταρτημόρια)
1. 1ο κριτήριο: περισσότερες από 20 ενδοαμφιβληστροειδικές αιμορραγίες και στα τέσσερα τεταρτημόρια
  2. 2ο κριτήριο: σαφείς φλεβικές ανωμαλίες σε τουλάχιστο 2 τεταρτημόρια
  3. 3ο κριτήριο: IRMA (ενδοαμφιβληστροειδικές μικροαγγειακές ανωμαλίες) σε τουλάχιστο ένα τεταρτημόριο

Πίνακας 3.1.

Ενώ η παραγωγική ΔΑ χαρακτηρίζεται ως:

---

### **Παραγωγική ΔΑ**

- **Πρώιμη**: παρουσία νεοαγγείωσης αμφιβληστροειδούς σε βαθμό μικρότερο του σταδίου υψηλού κινδύνου
  - **Υψηλού κινδύνου**: τουλάχιστο ένα από τα εξής τρία κριτήρια:
    1. Παρουσία νεοαγγείωσης πάνω στην οπτική θηλή και παρουσία ενδοϋαλοειδικής ή και προαμφιβληστροειδικής αιμορραγίας
    2. Παρουσία νεοαγγείωσης πάνω στην οπτική θηλή σε έκταση τουλάχιστον του 1/3 της επιφάνειάς της
    3. Παρουσία νεοαγγείωσης συνολικής έκτασης τουλάχιστον 1/2 της επιφάνειας της οπτικής θηλής και παρουσία ενδοϋαλοειδικής ή και προαμφιβληστροειδικής αιμορραγίας
- 

Πίνακας 3.2.

## **Αιματολογικός και βιοχημικός έλεγχος**

Στο χώρο της Οφθαλμολογικής Κλινικής (κλινική, ιατρείο παθήσεων του αμφιβληστροειδούς και γενικό ιατρείο) του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, έγινε λήψη περιφερικού αίματος από κάθε ασθενή και κάθε μάρτυρα, μετά από νηστεία κατά τη διάρκεια της νύχτας. Τα δείγματα του αίματος τοποθετήθηκαν μέσα σε φιαλίδια EDTA, καθώς και σε ανάλογα

φιαλίδια για τον περαιτέρω εργαστηριακό έλεγχο. Δείγματα κάθε εξεταζόμενου υποβλήθηκαν σε αιματολογικό έλεγχο:

- μέτρηση αιμοσφαιρίνης,
- αιματοκρίτη,
- αριθμού ερυθροκυττάρων και
- γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης ολικού αίματος-HbA1c %, ΦΤ < 6,5%)

και σε βιοχημικό έλεγχο προκειμένου να υπολογισθούν οι ακόλουθες παράμετροι:

- τιμές γλυκόζης νηστείας αίματος (Glucose, GLU, mg/dl, ΦΤ= 70-115 mg/dl)
- επίπεδα ολικής χοληστερόλης αίματος (Total Cholesterol, TC, mg/dl, ΦΤ < 200 mg/dl)
- επίπεδα αίματος λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (Low Density Lipoprotein, LDL, mg/dl, ΦΤ < 130 mg/dl)
- επίπεδα αίματος λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (High Density Lipoprotein, HDL, mg/dl, ΦΤ > 35 mg/dl)
- τιμές τριγλυκεριδίων αίματος (Triglycerides, TRG, mg/dl, ΦΤ = 40-160 mg/dl)
- τιμές ουρίας (ΦΤ = 10-50 mg/dl)
- τιμές κρεατινίνης (ΦΤ = 0,81-1,44 mg/dl - ηλικία άνω των 50 ετών)

Από τον οφθαλμολογικό και βιοχημικό έλεγχο προέκυψε ότι η κοόρτη αποτελείται από 169 διαβητικούς με μικροαγγειακές επιπλοκές (ασθενείς με επιπλοκές), 107 διαβητικούς χωρίς μικροαγγειακές επιπλοκές (ομάδα ελέγχου ασθενών) και 315 υγιείς (ομάδα ελέγχου υγιών).

Στη συνέχεια, τα δείγματα κάθε εξεταζόμενου μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο κυτταρογενετικής και μοριακής γενετικής του Π.Γ.Ν. Λάρισας για περαιτέρω εργαστηριακή ανάλυση.

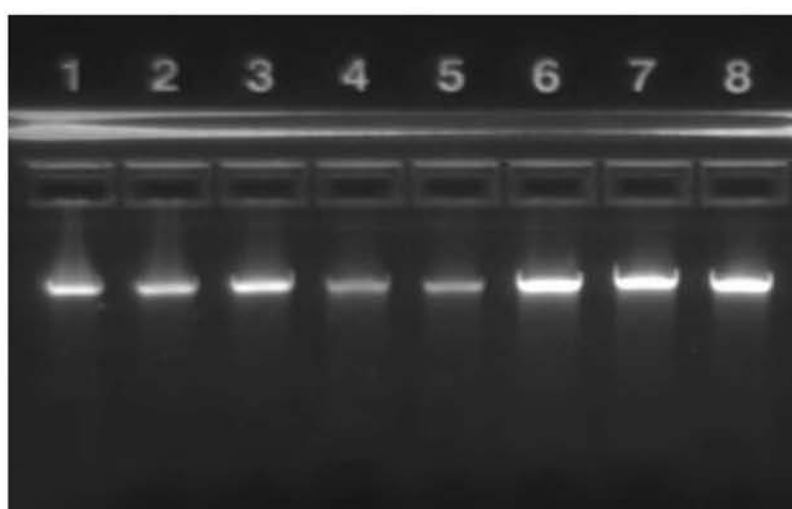
### **3.2.2. Απομόνωση DNA από το ολικό αίμα, ενίσχυση του γενετικού υλικού και ηλεκτροφόρησή του**

Για την εξαγωγή του DNA και των έλεγχο των γενετικών πολυμορφισμών, έγινε λήψη 5-10 ml ολικού αίματος από κάθε διαβητικό ασθενή και κάθε υγιή μάρτυρα, το οποίο συντηρήθηκε σε θερμοκρασία  $-20^{\circ}\text{C}$ . Για την απομόνωση του DNA από τα εμπύρνηνα λευκοκύτταρα χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο απομόνωσης από το περιφερικό αίμα και έγινε περαιτέρω καθαρισμός του από πρωτεΐνες και άλατα. Το καθαρό DNA που απομονώθηκε, φυλάχθηκε σε θερμοκρασία  $-20^{\circ}\text{C}$ , έως την περαιτέρω ανάλυσή του.

Η ταυτοποίηση του γονιδιώματος (genotyping) βασίστηκε στη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται ο πολλαπλασιασμός ενός συγκεκριμένου τμήματος του DNA που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο περιοχές με γνωστή αλληλουχία, με τη χρήση κατάλληλων ζευγών εκκινητών (primers) και ελεύθερων δεσοξυνουκλεοτιδίων. Το DNA υφίσταται αλληπάλληλους κύκλους αποδιάταξης – σύζευξης των εκκινητών – επέκτασης των εκκινητών, στο τέλος των οποίων πραγματοποιείται στάδιο σταθεροποίησης των προϊόντων της PCR. Με αυτό τον τρόπο γίνεται ενίσχυση της επιλεγμένης αλληλουχίας

DNA συνθέτοντας εκατομμύρια αντιγράφων της συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ούτως ώστε να ενισχυθούν οι αλληλουχίες DNA που υπάρχουν μόνο σε ίχνη και να γίνουν κυρίαρχη αλληλουχία. Με την PCR, λοιπόν, η αλληλουχία DNA, που υπήρχε σε κάθε μεμονωμένο κύτταρο, ενισχύθηκε για να μελετηθεί.

Για την εκτίμηση της καθαρότητας και της ποσοτικής επάρκειας των προϊόντων της PCR (PCR products) έγινε ηλεκτροφόρηση αυτών σε γέλη αγαρόζης, σε αρκετά τυχαία δείγματα. Κατά την ηλεκτροφόρηση γίνεται διαχωρισμός των τμημάτων DNA που έχουν προκύψει από την PCR αναλόγως του μεγέθους των. Τα τμήματα αυτά σημαίνονται με φθορίζουσα ουσία (βρωμιούχο αιθίδιο), ώστε να γίνονται ορατά κατά τη φωτογράφιση. Εν συνεχεία ακολουθεί sequencing ή πέψη με ένζυμα περιορισμού. Στην ηλεκτροφόρηση που έγινε επιβεβαιώθηκε η επαρκής ποσότητα του απομονωμένου γενετικού υλικού. Ενδεικτικά παρουσιάζονται 8 δείγματα DNA στα οποία έγινε ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 3.1.).



Εικόνα 3.1. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της PCR σε πηκτή αγαρόζης 2%.

### 3.2.3. Γονότυπος

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε, στην προηγούμενη ενότητα, προσδιορίστηκε, για κάθε ασθενή, ο γονότυπος των πολυμορφισμών του γονιδίου της *AKR1B1* με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και στη συνέχεια η αλληλουχία DNA, που υπήρχε σε κάθε μεμονωμένο κύτταρο, ενισχύθηκε για να μελετηθεί.

Με βάση τα δεδομένα Harmap για πληθυσμό CEU (Έκδοση 27, Φάση II+III, Φεβρουάριος 2009, πάνω στην συναρμολόγηση NCBI B36, dbSNP b126) επιλέχθηκαν tag SNPs του γονιδίου *AKR1B1* (από μία περιοχή εύρους 16.78Kbp εκτεινόμενη από τη θέση 133777657 έως τη θέση 133794428 του χρωμοσώματος νούμερο 7), χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο tagger,<sup>154</sup> με τεχνική ζευγών, με τιμή αποκοπής του  $r^2 \geq 0.8$  και με συχνότητα ελάσσονος αλληλόμορφου (minor allele)  $> 0.05$ .

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 5 tag SNPs σε τέσσερις διακριτές γονιδιακές περιοχές:

- στην εσωνική περιοχή ανάμεσα στα εξώνια 1 – 2 (εσώνιο 1-2) (rs17188118 και rs1790998),
- στο εσώνιο 3 - 4 (rs2670230),
- στο εσώνιο 5 – 6 (rs2734653) και
- στο εσώνιο 8 – 9 (rs2259458).

Η εύρεση του γονότυπου των tag SNPs έγινε με TaqMan allele specific discrimination assays με το σύστημα γενωμικής αλληλουχίας ABI PRISM 7900 και η ανάλυση με το λογισμικό SDS (Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, USA). Τουλάχιστον 10% των δειγμάτων

επιλέχθηκαν τυχαία για επανάληψη της διαδικασίας, ως ένας εσωτερικός έλεγχος. Η εύρεση του γονότυπου έγινε από εργαστηριακό προσωπικό που δεν είχε γνώση της κλινικής κατάστασης.

#### 3.2.4. Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Η σχέση μεταξύ της κατανομής του γονότυπου και της εξέλιξης της ασθένειας ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας το στατιστικό τεστ  $\chi^2$ , καθώς και τον γενικευμένο γραμμικό λόγο πιθανοτήτων (generalized linear odds ratio -  $OR_G$ ). Για ένα άτομο που φέρει στο γονότυπό του πολλές μεταλλάξεις, ο  $OR_G$  εκφράζει τον λόγο της πιθανότητας για επιδείνωση της ασθένειας προς την πιθανότητα για βελτίωση της ασθένειας.

Διερευνώντας την πιθανότητα εμφάνισης  $\Delta A$  και  $\Delta N$  σε σακχαροδιαβητικούς ασθενείς, έγινε σύγκριση των τριών μεγάλων υποομάδων της μελέτης. Το συν-κυρίαρχο μοντέλο (δηλαδή η ομάδα των σακχαροδιαβητικών ασθενών χωρίς επιπλοκές) και το προσθετικό μοντέλο των ασθενών με επιπλοκές (δηλαδή η ομάδα των σακχαροδιαβητικών ασθενών με  $\Delta A$  και  $\Delta N$ ) συγκρίθηκαν με την ομάδα ελέγχου (υγιής, χωρίς  $\Sigma\Delta$ ) χρησιμοποιώντας ένα λογιστικό μοντέλο. Αυτά τα δύο μοντέλα επιλέχθηκαν διότι είναι ορθογώνια. Η αξία των γενετικών μοντέλων ελέγχθηκε επίσης με το τεστ του Fisher. Η σύγκριση των συσχετίσεων εκφράστηκε με τους λόγους πιθανοτήτων ( $ORs$ ) χωρίς ρύθμιση και με ρύθμιση, ως προς την ηλικία και το φύλλο, με το αντίστοιχο 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

Η σχέση μεταξύ των ασθενών με επιπλοκές και της ομάδας ελέγχου εξετάστηκε επίσης χρησιμοποιώντας τον λόγο  $OR_G$  που είναι μία τεχνική ανεξάρτητη προσέγγιση και δίνει μία εκτίμηση του συνολικού κινδύνου χρησιμοποιώντας την συνολική γονοτυπική κατανομή. Στην ομάδα ελέγχου των υγιών, τυχόν απόκλιση της γονοτυπικής κατανομής από την ισορροπία Hardy – Weingerg (HWE) καθώς και τυχόν ύπαρξη ανισορροπίας σύνδεσης LD (Linkage Disequilibrium) στους πολυμορφισμούς, εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας ακριβή τεστ σύμφωνα με τον Weir. Η τάση κληρονομικότητας (mode of inheritance) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον βαθμό του δείκτη κυριαρχίας ( $h - index$ ). Κάθε αποτέλεσμα θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό όταν  $p < 0.05$ .

Οι ρυθμισμένοι και μη ρυθμισμένοι ORs υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό SPSS v11.5 (SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows Version 18.0. Chicago: SPSS Inc). Η ισορροπία HWE και η ανισορροπία LD ελέγχθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Generic Data Analysis (GDA) software. Οι συχνότητες των απλοτύπων υπολογίστηκαν και συγκρίθηκαν με το SHEsis. Ο λόγος  $OR_G$  υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το ORGGASMA.



### 3.3. Αποτελέσματα

Το σύνολο των ατόμων που πληρούσε τα κριτήρια συμμετοχής στην έρευνα ήταν 591 ασθενείς και μάρτυρες. Η ομάδα των ασθενών (276 ασθενείς) αποτελείτο από τέσσερις υποομάδες. Η πρώτη αφορούσε 107 ασθενείς με ΣΔ τύπου II, χωρίς ΔΑ και ΔΝ (ομάδα ελέγχου ασθενών), η δεύτερη αφορούσε 100 σακχαροδιαβητικούς ασθενείς τύπου II με ΔΑ και ΔΝ, η τρίτη αφορούσε 39 σακχαροδιαβητικούς ασθενείς τύπου II με ΔΑ και η τέταρτη αφορούσε 30 σακχαροδιαβητικούς ασθενείς τύπου II με ΔΝ (πίνακας 3.3.). Η ομάδα ελέγχου περιελάμβανε 315 μάρτυρες.

<b>ΣΥΝΟΛΟ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΩΝ (N=591)</b>	
<b>ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΔΑ</b>	<b>39</b>
<b>ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΔΝ</b>	<b>30</b>
<b>ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΔΑ ΚΑΙ ΔΝ</b>	<b>100</b>
<b>ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΧΩΡΙΣ ΜΙΚΡΟΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ</b> (ομάδα ελέγχου ασθενών)	<b>107</b>
<b>ΥΓΙΕΙΣ</b> (ομάδα ελέγχου υγιών)	<b>315</b>

Πίνακας 3.3. Συμμετέχοντες στη μελέτη

### 3.3.1. Εξέλιξη του ΣΔ

Οι γονοτυπικές κατανομές των πέντε απλότυπων, για κάθε ομάδα (ομάδα ασθενών με ΔΑ και ΔΝ, ομάδα ελέγχου ασθενών και ομάδα ελέγχου υγιών) και οι αντίστοιχοι λόγοι  $OR_G$  φαίνονται στον πίνακα 4.1.

Οι υγιής ομάδα ελέγχου συμμορφώθηκε με την ισορροπία HWE για όλους τους απλότυπους ( $P \geq 0.05$ ).

Σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην εξέλιξη της νόσου και στη γονοτυπική κατανομή δεν εμφανίστηκε για κανένα από τους 5 απλότυπους ( $P \geq 0.05$ ).

Μία οριακή συσχέτιση ( $P = 0.08$ ) εμφανίστηκε για τον απλότυπο rs2670230 C/A, ενώ ο λόγος  $OR_G$  έδωσε μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα για όλους τους απλότυπους, δείχνοντας ότι ο κίνδυνος εξέλιξης της ασθένειας δεν σχετίζεται με το φορτίο μετάλλαξης των απλότυπων (Πίνακας 3.4.).

**Πίνακας 3.4.** Αποτελέσματα από τον έλεγχο συσχέτισης ανάμεσα στους απλότυπους του γονιδίου *AKR1B1* και της εξέλιξης του ΣΔ.

Απλότυπος	Γονότυπος	Ομάδα ασθενών με επιπλοκές N (%)	Ομάδα ελέγχου ασθενών N (%)	Ομάδα ελέγχου υγιών N (%)	P-value	OR <sub>G</sub> (95% CI)
rs2259458 G/T	GG	56 (33.9)	43 (40.6)	115 (37.6)	0.65	1.11 (0.80-1.53)
	GT	80 (48.5)	50 (47.2)	138 (45.1)		
	TT	29 (17.6)	13 (12.3)	53 (17.3)		
rs2734653 G/A	GG	92 (57.1)	63 (59.4)	177 (57.8)	0.93	1.00 (0.70-1.44)
	GA	60 (37.3)	38 (35.8)	108 (35.3)		
	AA	9 (5.6)	5 (4.7)	21 (6.9)		
rs2670230 C/A	CC	50 (30.5)	25 (23.8)	108 (35.2)	0.08	1.02 (0.75-1.40)
	CA	87 (53.0)	60 (57.1)	134 (43.6)		
	AA	27 (16.5)	20 (19.0)	65 (21.2)		
rs1790998 C/A	CC	75 (45.5)	30 (29.1)	123 (39.4)	0.13	0.82 (0.59-1.13)
	CA	64 (38.8)	52 (50.5)	133 (42.6)		
	AA	26 (15.8)	21 (20.4)	56 (17.9)		
rs17188118 A/C	AA	148 (90.2)	93 (92.1)	267 (88.4)	0.65	0.83 (0.45-1.55)
	AC	14 (8.5)	8 (7.9)	33 (10.9)		
	CC	2 (1.2)	0 (0.0)	2 (0.7)		

Στον πίνακα 3.4. παρουσιάζεται η γονοτυπική κατανομή των απλότυπων του γονιδίου *AKR1B1* ανάμεσα στην ομάδα ασθενών με επιπλοκές και στις ομάδες ελέγχου ασθενών και υγιών. Φαίνονται οι τιμές του P και ο γενικευμένος λόγος πιθανοτήτων (OR<sub>G</sub>) για τη συσχέτιση ανάμεσα στην γονοτυπική κατανομή κάθε απλότυπου και την εξέλιξη της ασθένειας [υγιείς, διαβητικοί ελέγχου (χωρίς μικροαγγειακές επιπλοκές), διαβητικοί με επιπλοκές].

### 3.3.2. Σακχαροδιαβητικοί ασθενείς με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης επιπλοκών

#### 3.3.2.1. Ανάλυση ενός γενετικού τόπου (Single-locus analysis):

Στον πίνακα 3.5. φαίνονται τα αποτελέσματα της συσχέτισης ανάμεσα στους απλότυπους του γονιδίου *AKR1B1* και τους σακχαροδιαβητικοί ασθενείς με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης επιπλοκών.

Η λόγος πιθανοτήτων ( $OR_G$ ) έδωσε μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα για όλους τους απλότυπους, υποδεικνύοντας ότι οι ασθενείς χωρίς επιπλοκές, με υψηλότερο φορτίο μετάλλαξης, έχουν την ίδια πιθανότητα να αναπτύξουν διαβητικές επιπλοκές, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Ωστόσο, μία οριακά σημαντική συσχέτιση παρουσιάστηκε για

- το προσθετικό μοντέλο της παραλλαγής rs2259458 G/T [ $OR_{adjusted} = 1.87$  (1.01 – 3.50)] και
- το συν-κυρίαρχο μοντέλο του απλότυπου rs2670230 C/A [ $OR = 1.45$  (1.01 – 2.04)].

**Πίνακας 3.5.** Αποτελέσματα από τον έλεγχο συσχέτισης ανάμεσα στους απλότυπους του γονιδίου *AKR1B1* και τους σακχαροδιαβητικοί ασθενείς με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης επιπλοκών.

SNP	Genetic model	OR (95% CIs)	p-value	OR <sub>adjusted</sub> (95% CIs)	P-value
<b>rs2259458 G/T</b>	Additive	1.12 (0.65-1.96)	0.68	1.87 (1.01-3.50)	0.05
	Co-dominant	1.15 (0.78-1.67)	0.48	1.14 (0.75-1.72)	0.55
<b>rs2734653 G/A</b>	Additive	0.83 (0.36-1.87)	0.65	0.94 (0.38-2.32)	0.89
	Co-dominant	1.09 (0.73-1.61)	0.67	0.98 (0.64-1.52)	0.95
<b>rs2670230 C/A</b>	Additive	0.90 (0.51-1.57)	0.70	0.77 (0.42-1.43)	0.41
	Co-dominant	1.45 (1.01-2.04)	0.05	1.39 (0.91-2.13)	0.12
<b>rs1790998 C/A</b>	Additive	0.87 (0.66-1.15)	0.33	0.80 (0.59-1.08)	0.14
	Co-dominant	0.85 (0.58-1.25)	0.42	0.74 (0.49-1.12)	0.16
<b>rs17188118 A/C</b>	Additive	1.34 (0.50-3.60)	0.56	1.04 (0.37-2.91)	0.94
	Co-dominant	0.76 (0.40-1.47)	0.41	0.63 (0.31-1.30)	0.21

Στον πίνακα 3.5. φαίνονται ο λόγος πιθανοτήτων (OR) και το αντίστοιχο 95% επίπεδο εμπιστοσύνης, για τον έλεγχο της συσχέτισης ανάμεσα στους απλότυπους του γονιδίου *AKR1B1* και του των σακχαροδιαβητικών ασθενών με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης επιπλοκών, για το προσθετικό και το συν-κυρίαρχο μοντέλο. Φαίνονται επίσης και οι λόγοι πιθανοτήτων προσαρμοσμένοι με την ηλικία και το φύλο των ασθενών.

- Ο πολυμορφισμός rs2259458 G/T κληρονομείται ως “non-dominance” ( $h = 0.21$ ), δείχνοντας ότι το ετεροζυγωτικό GT έχει έναν κίνδυνο ασθένειας που βρίσκεται στην μέση ανάμεσα στην ομοζυγωτική περίπτωση GG χωρίς κίνδυνο και στην ομοζυγωτική περίπτωση TT που παρουσιάζει μεγάλο κίνδυνο (Πίνακας 3.6.).
- Ο πολυμορφισμός rs2670230 C/A κληρονομείται ως “dominance” σε ό,τι αφορά το αλληλόμορφο A ( $h = 3.53$ ), δείχνοντας ότι η ομοζυγωτική περίπτωση AA έχει μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης ΣΔ σε σύγκριση με την ομοζυγωτική περίπτωση CC και ότι η ετεροζυγωτική περίπτωση CA έχει τιμή πιθανότητας εμφάνισης διαβήτη με επιπλοκές πιο κοντά στην ομοζυγωτική περίπτωση AA παρά στη μέση μεταξύ των δύο ομοζυγωτικών περιπτώσεων (Πίνακας 3.6.).

**Πίνακας 3.6.** Ο δείκτης  $h$  και η αντίστοιχη τάση κληρονομικότητας για τους δύο πολυμορφισμούς που παρουσιάζουν οριακά σημαντική συσχέτιση.

SNP	Δείκτης- $h$	Τάση Κληρονομικότητας
rs2259458 G/T	0.21 <sup>‡</sup>	“non-dominance”
rs2670230 C/A	3.53 <sup>¶</sup>	“dominance” για το αλληλόμορφο A

<sup>‡</sup> αποτέλεσμα βασισμένο σε ρυθμισμένες τιμές

<sup>¶</sup> αποτέλεσμα βασισμένο σε μη-ρυθμισμένες τιμές

### 3.3.2.2. Ανάλυση Ανισορροπίας Σύνδεσης (Linkage disequilibrium analysis):

Στον πίνακα 3.7. φαίνονται οι τιμές του  $r$  και τα αντίστοιχα  $D$  primes, για τον έλεγχο της ανισορροπίας LD ανάμεσα σε ζεύγη πολυμορφισμών για την ομάδα των ασθενών με επιπλοκές και για την ομάδα των υγιών (παρενθέσεις). Όλοι οι πολυμορφισμοί ήταν σε ανισορροπία σύνδεσης LD ( $P < 0.05$ ), εκτός από τον πολυμορφισμό rs2670230 C/A ο οποίος δεν ήταν σε ανισορροπία και για τις δύο ομάδες και τον πολυμορφισμό rs2734653 G/A για την ομάδα των ασθενών με επιπλοκές.

Πίνακας 3.7. Τιμή-P/D για τον έλεγχο της ανισορροπίας σύνδεσης σε ζεύγη παραλλαγών για την ομάδα των ασθενών με επιπλοκές και για την ομάδα των υγιών (παρενθέσεις).

	<b>rs2734653</b>	<b>rs2670230</b>	<b>rs1790998</b>	<b>rs17188118</b>
<b>rs2259458</b>	<0.01/1 (<0.01/1)	<0.01/0.75 (<0.01/0.80)	<0.01/0.72 (<0.01/0.72)	0.02/1.00 (0.01/1.00)
<b>rs2734653</b>		<0.01/0.94 (<0.01/1.00)	<0.01/0.70 (<0.01/0.60)	0.07/0.66 (0.02/0.79)
<b>rs2670230</b>			0.45/0.09 (0.05/0.04)	0.04/0.76 (<0.01/0.82)
<b>rs1790998</b>				<0.01/1.00 (<0.01/1.00)

### 3.3.2.3. Ανάλυση των Απλοτύπων:

Η κατανομή της υπολογισμένης συχνότητας των απλοτύπων των δύο περιπτώσεων (ομάδα ασθενών με επιπλοκές και ομάδα υγιών) παρουσιάζεται στον πίνακα 3.8. Η συνολική διαφορά μεταξύ ασθενών με επιπλοκές και υγιών ήταν οριακά σημαντική (Συνολικό  $P = 0.06$ ).

Διερευνώντας τους απλότυπους: rs2259458, rs2734653, rs2670230, rs1790998, rs17188188,

- οι συνδυασμοί:

T-G-A-C-A,

G-G-C-C-A και

G-A-C-C-A έδωσαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ( $P \leq 0.05$ )

- και ο συνδυασμός G-G-C-A-C έδωσε οριακά στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ( $P = 0.06$ ).

Ο συνδυασμός G-G-C-C-A μπορεί να δίνει προστασία για τον διαβήτη που οδηγεί σε επιπλοκές, ενώ το αλληλόμορφο T του πολυμορφισμού rs2259458 G/T και το αλληλόμορφο A του πολυμορφισμού rs2670230 C/A, μπορεί να συσχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης επιπλοκών σε σακχαροδιαβητικούς ασθενείς. Το ίδιο ισχύει και για το αλληλόμορφο A του πολυμορφισμού rs2734653 G/A και για το αλληλόμορφο A του πολυμορφισμού rs1790998 C/A.



Πίνακας 3.8. Εκτίμηση της συχνότητας εμφάνισης των 5 πολυμορφισμών του γονιδίου *AKR1B1* (SNP1, SNP2, SNP3, SNP4, SNP5) στην ομάδα ασθενών (ασθενείς με επιπλοκές) και στην ομάδα ελέγχου των υγιών.

Πολυμορφισμοί SNP1-SNP2-SNP3-SNP4-SNP5	Εκτίμηση συχνοτήτων			
	Ασθενείς	Ομάδα ελέγχου υγιών	P-value	P-value (Σύνολο)
G-A-A-A-A	0.02	0.05	0.07	0.06
G-A-A-A-C	0.01	0.00	0.45	
G-A-A-C-A	0.21	0.19	0.63	
G-A-C-C-A	0.01	0.00	0.05	
G-G-A-A-A	0.12	0.10	0.34	
G-G-A-A-C	0.00	0.00	0.86	
G-G-A-C-A	0.02	0.05	0.07	
G-G-C-A-A	0.12	0.14	0.41	
G-G-C-A-C	0.05	0.06	0.58	
G-G-C-C-A	0.03	0.01	0.05	
T-G-A-A-A	0.02	0.03	0.74	
T-G-A-C-A	0.02	0.01	0.04	
T-G-C-A-A	0.01	0.02	0.64	
T-G-C-A-C	0.00	0.00	0.21	
T-G-C-C-A	0.36	0.35	0.81	

Στον πίνακα 3.8. φαίνεται η συχνότητα εμφάνισης των 5 πολυμορφισμών του γονιδίου *AKR1B1* (SNP1: rs2259458 G/T, SNP2: rs2734653 G/A, SNP3: rs2670230 C/A, SNP4: rs1790998 C/A, SNP5: rs17188118 A/C) στην ομάδα ασθενών (ασθενείς με επιπλοκές) και στην ομάδα ελέγχου των υγιών. Φαίνονται, επίσης, οι τιμές του P για τις συγκρίσεις κάθε απλότυπου μεταξύ των δύο ομάδων (ασθενών και υγιών). Τέλος φαίνεται η συνολική τιμή του P για τη σύγκριση της συνολικής διαφοράς στους απλότυπους.

### 3.4. Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη διερεύνησε εάν κάποιοι από τους πολυμορφισμούς του γονιδίου AKR1B1 σχετίζονται με την επιδείνωση της νόσου του ΣΔ και τον κίνδυνο εμφάνισης των επιπλοκών του. Η ομάδα ελέγχου που επιλέχθηκε, για την εξέταση της συσχέτισης μεταξύ των πολυμορφισμών του AKR1B1 και την εμφάνιση των επιπλοκών σε σακχαροδιαβητικούς ασθενείς, ήταν υγιή άτομα και όχι διαβητικοί χωρίς επιπλοκές.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κανένας πολυμορφισμός του συγκεκριμένου γονιδίου δεν εμπλέκεται στην επιδείνωση της ασθένειας.

Δύο πολυμορφισμοί, όμως οι:

- rs2259458 G/T και
- rs2670230 C/A

μπορεί να σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνιση της ΔΑ και της ΔΝ.

Οι τιμές του δείκτη κυριαρχίας η έδειξαν ότι:

- ο πολυμορφισμός rs2259458 G/T κληρονομείται με τον προσθετικό χαρακτήρα και
- ο πολυμορφισμός rs2670230 C/A κληρονομείται με τον επικρατούντα χαρακτήρα για το αλληλόμορφο A.

Οι γονοτυπικές κατανομές των πολυμορφισμών που εξετάστηκαν συμμορφώνονται με την ισορροπία HWE στην ομάδα ελέγχου και επομένως δεν υπήρξε στρωματοποίηση του πληθυσμού και γονοτυπικά λάθη.

Η ανάλυση των απλοτύπων rs2259458, rs2734653, rs2670230, rs1790998, rs17188188, έδειξε ότι οι κατανομές των συνδυασμών G-A-C-C-A, G-G-C-A-C και G-G-C-C-A ήταν διαφορετικές ανάμεσα στους ασθενείς και τους υγιείς.

Αν και κάποιες σημαντικές συσχετίσεις ανιχνεύτηκαν σε αυτή τη μελέτη, το μέγεθος του στατιστικού δείγματος ήταν σχετικά μικρό, γεγονός που είναι ένα συνηθισμένο φαινόμενο στις μελέτες συσχέτισης υποψηφίων γονιδίων. Έτσι, η ισχύς ανίχνευσης μιας στατιστικά σημαντικής συσχέτισης δεν ήταν αρκετή. Οι μελέτες συσχέτισης υποψηφίων γονιδίων, όπως η παρούσα, αν και είναι κατάλληλες για την ταυτοποίηση γονιδίων δεικτών γενετικής προδιάθεσης σε πολυπαραγοντικές νόσους, καθώς και για τον έλεγχο ειδικών πολυμορφισμών σε γνωστούς γονιδιακούς τόπους, ωστόσο απαιτούν μεγάλο αριθμό συμμετεχόντων στη μελέτη. Γενικά, για να επιτευχθεί ισχύς μεγαλύτερη του 80% στην ταυτοποίηση ενός «μέτριου» γενετικού αποτελέσματος (λόγος πιθανοτήτων 1.2) ενός πολυμορφισμού παρόντος στο 10% του πληθυσμού, θα ήταν απαραίτητο ένα μέγεθος δείγματος μεγαλύτερο των 10.000 ατόμων.

Θα πρέπει, βέβαια, να αναφερθεί ότι αρκετές μελέτες, διερεύνησης του συσχετισμού του κινδύνου των επιπλοκών του ΣΔ με την παρουσία των πολυμορφισμών της αναγωγάσης της αλδόζης, έχουν δείξει τη σχέση ανάμεσα στο Z-2 αλληλίο και τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΔΑ και ΔΝ τόσο σε ασθενείς με ΣΔ τύπου I, όσο και ΣΔ τύπου II.<sup>35,36</sup> Ωστόσο, άλλες παρόμοιες μελέτες δεν επιβεβαίωσαν τα ως άνω αποτελέσματα.<sup>37</sup> Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός, ότι οι διαβητικοί ασθενείς που είναι ομοζυγώτες για το Xbal(-) αλληλίο του GLUT1 και φέρουν παράλληλα και το Z-2 αλληλίο, παρουσιάζουν 9 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης των επιπλοκών του ΣΔ, γεγονός που δείχνει έναν υψηλού κινδύνου γενετικό συνδυασμό.<sup>38</sup> Ένας δεύτερος πολυμορφισμός του γονιδίου AKR1B1 έχει παρατηρηθεί στη θέση -106 του εκκινήτη. Ο C106G πολυμορφισμός έχει ταυτοποιηθεί, τόσο σε Καυκάσιους, όσο και σε Ασιάτες διαβητικούς ασθενείς και έχει συσχετισθεί με τη ΔΑ και ΔΝ. Ανάλογες μελέτες έχουν αναφερθεί και σε

έρευνες στον Κινέζικο πληθυσμό.<sup>36</sup> Δύο μελέτες διατύπωσαν την άποψη ότι αυτός ο πολυμορφισμός μπορεί να εμπλέκεται στην πρώιμη ανάπτυξη μικρολευκωματινουρίας σε Φινλανδούς ασθενείς με ΣΔ τύπου 2, ενώ αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση ΔΝ σε διαβητικούς ασθενείς με κακό γλυκαιμικό έλεγχο.<sup>40</sup> Μία έρευνα έδειξε ότι ο γονότυπος ΤΤ παρουσιάζει αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΔΝ σε Ιάπωνες διαβητικούς ασθενείς.<sup>41</sup> Όλα τα παραπάνω αποδεικνύουν ότι οι πολυμορφισμοί του γονιδίου της AKR1B1 παίζουν κάποιο ρόλο στην εμφάνιση της ΔΑ και της ΔΝ.

Μέχρι σήμερα, η προσπάθεια ταυτοποίησης ενός συγκεκριμένου γονιδίου, με καθοριστική επίδραση στην εμφάνιση των επιπλοκών του ΣΔ, δεν έχει επιτευχθεί. Όλοι οι πολυμορφισμοί που έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορα γονίδια, παρουσιάζουν μικρή συμβολή στην επιδείνωση της νόσου. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα τόσο των μελετών γενετικής σύνδεσης, όσο και των μελετών συσχέτισης είναι πολλές φορές αντικρουόμενα. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως στη διαφορετική εθνολογική προέλευση των πληθυσμών, στην ετερογένεια του γενετικού υλικού και στο περιορισμένο μέγεθος του υπό εξέταση δείγματος. Φαίνεται λοιπόν πως οι υπάρχουσες τεχνικές δεν επαρκούν για την διερεύνηση της κωδικοποιημένης εκείνης πληροφορίας του γονιδιώματος, που οδηγεί μία μερίδα διαβητικών ασθενών να παρουσιάσουν επιπλοκές.

Από όλα τα παραπάνω είναι φανερό ότι ένα μόνο ερευνητικό κέντρο δεν είναι ικανό να συγκεντρώσει αρκετό αριθμό ασθενών ώστε να αποδειχθεί πιθανή συσχέτιση. Μελέτες συνεργασίας θα μπορούσαν να δώσουν αποτελέσματα μεγαλύτερης ισχύος ανίχνευσης σημαντικών συσχετίσεων μέσω της συγκέντρωσης δεδομένων. Επιπλέον, μελλοντικές μετα-αναλύσεις πολλών

διαφορετικών μελετών θα μπορούσαν να αντισταθμίσουν το μειονέκτημα της μικρής ισχύος και να δώσουν πιο ισχυρές αποδείξεις για την εμπλοκή του γονιδίου AKR1B1 στις διαβητικές επιπλοκές. Με αυτή την προοπτική λοιπόν, τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής μπορούν να συγκριθούν με άλλες ανεξάρτητες μελέτες συσχέτισης υποψηφίων γονιδίων ή ολόκληρων γονιδιωμάτων GWAS και να αναλυθούν με τη μορφή της μετα-ανάλυσης.

#### 4.5. Συμπεράσματα

Η ΔΝ και η ΔΑ, ως επιπλοκές του Σ.Δ, αποτελούν αντικείμενο διερεύνησης προκειμένου να διεξαχθούν συμπεράσματα με σκοπό την καλύτερη αντιμετώπισή τους καθώς και την πρόληψή τους. Η ανάπτυξή τους έχει πολυπαραγοντική αιτιολογία και η γενετική προδιάθεση που αδιαμφισβήτητα παίζει ρόλο σχετίζεται και με ενζυμικές καθώς και με περιβαλλοντικές επιδράσεις, γεγονός που κάνει πολύπλοκη κάθε προσπάθεια διεξοδικής ανάλυσης της παθογένειας.

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της διερεύνησης της γενετικής επίπτωσης στην εμφάνιση και την επιδείνωση αυτών των δύο επιπλοκών του ΣΔ και το δείγμα αναφέρεται σε συγκεκριμένο πληθυσμό. Τα αποτελέματά της έδειξαν ότι οι γενετικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου AKR1B1 θα μπορούσαν να σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης ΔΑ και ΔΝ σε σακχαροδιαβητικούς ασθενείς, αν και το γονίδιο δεν φαίνεται να εμπλέκεται στην εξέλιξη της ασθένειας. Βέβαια γενετικές μελέτες υποψηφίων γονιδίων, όπως η παρούσα, έχουν μειωμένη πιθανότητα να καταλήξουν σε οριστικά συμπεράσματα. Ωστόσο μεγαλύτερες μελέτες συσχέτισης υποψηφίων γονιδίων μπορούν να βοηθήσουν στην εξαγωγή πιο βάσιμων συμπερασμάτων σχετικά με την χρήση του γονιδίου AKR1B1 ως δείκτη επικινδυνότητας για την εμφάνιση των επιπλοκών του ΣΔ. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί εάν τα ευρήματα και παρόμοιων μελετών συσχέτισης υποψηφίων γονιδίων γίνουν υποστηρικτικά σε υπάρχοντα στοιχεία σε μελλοντικές μελέτες.

Εν κατακλείδι, μελέτες συνεργασίας καθώς και η ανάλυση γενετικής σύγκλισης διαφορετικών πηγών δεδομένων, είναι απαραίτητες ώστε να παραχθούν πιο βάσιμοι ισχυρισμοί γύρω από τη συσχέτιση του γονιδίου AKR1B1 με τις επιπλοκές του ΣΔ. Επίσης η περαιτέρω εξέλιξη των τεχνικών της μοριακής βιολογίας και της γενετικής ίσως βοηθήσει τελικά στην ταυτοποίηση των

υπεύθυνων γονιδίων, προσφέροντας έτσι ένα ισχυρό εργαλείο για την αναγνώριση εκείνων των διαβητικών ασθενών που πρόκειται να εμφανίσουν ΔΑ και ΔΝ. Η γνώση αυτή θα δώσει τη δυνατότητα πρώιμης παρέμβασης στα άτομα αυτά και θα συμβάλει στη μείωση της εμφάνισης των επιπλοκών του ΣΔ.

## Βιβλιογραφία



1. Loriaux, D Lynn. Diabetes and The Ebers Papyrus: 1552 B.C. *Endocrinologist* 2006;16(2): 55-56
2. Χατζημηνάς ΙΣ (1987). Επίτομη Φυσιολογία. Εκδόσεις Γ. Παρισιάνος, Αθήνα.
3. World Health Organization. 1985 WHO multinational study of vascular disease in diabetes. *Diabetologia*. 28:615–640.
4. Κολιόπουλος Ι (1999α). Διαβητική Αμφιβληστροειδοπάθεια 2000. Εκδόσεις Γ. Παρισιάνος, Αθήνα.
5. Μαργαρίτης ΛΧ, Κατσώρχης ΘΑ, Παπασιδέρη ΙΣ (1999). Ειδικά Κεφάλαια Κυτταρικής Βιολογίας. Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα.
6. Klein R, Klein BE, Moss SE, et al. (1994). The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XIV. Ten-year incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 112: 1217-1228.
7. Klein R, Klein BE, Moss SE, et al. (1995). The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XV. The long-term incidence of macular edema. *Ophthalmology* 102: 7-16.
8. Brownlee M (1995). Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 46: 223-234.
9. Brownlee M (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813-820.
10. Brownlee M (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54: 1615-1625.
11. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H (1988). Advanced glycosylation end products
12. Bouchardat A. (1975) *De la glycosurie ou diabète sucré*. Paris: Librairie Germer Bailliere.
13. Sophie Caillat-Zucman, Henri-Jean Garchon, Jos6 Timsit, Roger Assan, Christian Boitard, Idriss Djilali-Saiah, Pierre Bougneres, I and Jean-Francois Bach. Age-dependent HLA Genetic Heterogeneity of Type 1 Insulin-dependent Diabetes Mellitus. *The American Society for Clinical Investigation, Inc.* 1992;90: 2242-2250
14. Fong DS, Aiello LP, Ferris FL III, Klein F: Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care* 2004; 27:2540-2353

15. Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG (2000). Biochemistry. Addison Wesley Longman Inc., San Francisco, CA, USA.
16. Ryan SJ (2006). Retina. Volume II: Medical Retina. 4th edition. Elsevier Inc., Philadelphia, PA, USA.
17. Cho H, Sobrin L. Genetics of diabetic retinopathy. Curr Diab Rep. 2014 Aug;14(8):515.
18. Kahn CR, Weir GC, eds. Joslin's Diabetes Mellitus, 13th edn. Philadelphia : Lea and Febiger, 1994
19. Harris M, IFlega KM, Cowie CC et al. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance in US adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. Diabetes Care 1998, 21: 518-524
20. Harris MI: Undiagnosed NIDDM: clinical and public health issues. Diabetes Care 16:642–652, 1993
21. Bouchardat A. Nouveau memoire la glycosurie. Ann de Therap suppl. 1846; 162-311.
22. Tavignot B. De l'amblyopie symptomatique du diabete. Gaz des Hop 1853 ; 412-413.
23. Helmholtz H. Beschreibung eines Augenspiegels zur Untersuchung der Netzhaut im lebenden Auge. Berlin: Jeanrenaud, 1851.
24. Jaeger E. Beitr zur pathol des Auges. Wien: 1956; vol p. 33.
25. Von Graefe A. Ueber die mit Diabetes Mellitus vorkommenden Sehstorungen. Dies Arch. 1858;IV 920;230-234.
26. Noyes HD. Retinitis in glycosuria. Trans Am Ophthalmol Soc. 1869; 4:71-75.
27. Nettleship G. On oedema or cystic disease of the retina. Roy Ophthal Lond Hosp Rep. 1872; VII (3): 343 – 351
28. Mackenzie S, Nettleship G. A case of glucosuric retinitis. Roy Ophthal Lond Hosp Rep. 1877; 9:134.
29. Leber T. Ueber die Erkrankungen des Auges bei Diabetes mellitus. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 1875; 21 (3): 206 – 253.
30. Manz W. Retinitis Proliferans. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 1876; 22: 229.

31. Ballantyne AJ, Loewenstein A. Exudates in diabetic retinopathy. *Trans Ophthalmol Soc. UK* 1043; 63: 95
32. Michaelson IC: The mode of development of vascular system of the retina, with some observations on its significance for certain retinal diseases. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1948;68;137-180
33. Ashton N: Retinal neovascularisation in health and disease. *Am J Ophthalmol* 1957;44:7-24
34. Ashton N, Cunha-Vaz JG. Effect of histamine on the permeability of the ocular vessels. *Arch Ophthalmol.* 1965; 73: 211-223
35. Banting FG, Best CH. The internal secretion of the pancreas. *J Lab Clin Med.* 1922; 7: 251 – 266.
36. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report. *Can Med Assoc J.* 1922; 145: 1281-1286
37. Meyer – Schwickerath G. Koagulation der Netzhaut mit Sonnenlicht. *Berl Dtsch Ophthalmol Ges.* 1950; 55: 256 – 259.
38. Wetzig PC, Worlton JT. Treatment of diabetic retinopathy by light – coagulation: a preliminary study. *Br J Ophthalmol.* 1963; 47: 539 – 541
39. Beetham WP, Aiello LM, Balodimos MC, Koncz L. Ruby laser photocoagulation of early diabetic neovascular retinopathy: preliminary report of a longterm controlled study. *Arch Ophthalmol.* 1970; 261-272.
40. L' Esperance FA. An ophthalmic argon laser photocoagulation system: design, construction, and laboratory investigation. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1968; 66: 827-904
41. Patz A, Maumenee AE, Ryan SJ. Argon laser photocoagulation: advantages and limitations. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1971; 75: 569-579
42. Paulsen JE. Recovery from retinopathy in case of diabetes with Simmonds' disease. *Diabetes.* 1953; 2:7.
43. Machemer R, Buettner H, Norton WE, Parel JM. Vitrectomy: a pars plana approach. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1971; 75: 813-820

44. Goldberg MF, Jampol LM. Knowledge of diabetic retinopathy before and 18 years after the Airlie House Symposium on Treatment of Diabetic Retinopathy. *Ophthalmology*. 1987; 94(7): 741-6
45. The Diabetic Retinopathy Study Research Group. Report number 6: design, methods and baseline results. Report number 7: a modification of the Arlie House classification of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981; 21: 1-226
46. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Grading diabetic retinopathy from stereoscopic fundus photographs – an extension of the modified Arlie House classification of diabetic retinopathy ETDRS report number 10. *Ophthalmology* 1991; Suppl 98:786-806.
47. The Diabetic Retinopathy Study Research Group, Preliminary report on effects of photocoagulation therapy. *Am J Ophthalmol* 1976; 81: 383–396.
48. The Diabetic Retinopathy Study Research Group, Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy: the second report of Diabetic Retinopathy Study findings. *Ophthalmology* 1978; 85: 82–106.
49. The Diabetic Retinopathy Study Research Group, Four risk factors for severe visual loss in diabetic retinopathy. The third report from the Diabetic Retinopathy Study. *Arch Ophthalmol* 1979; 97: 654–655.
50. The Diabetic Retinopathy Study Research Group, Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy: relationship of adverse treatment effects to retinopathy severity. Diabetic Retinopathy Study report no. 5. *Dev Ophthalmol* 1981; 2: 248–261.
51. The Diabetic Retinopathy Study Research Group, Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy. Clinical application of Diabetic Retinopathy Study (DRS) findings, DRS report number 8. *Ophthalmology* 1981; 88: 583–600.
52. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Photocoagulation for diabetic macular edema. ETDRS report number 1. *Arch Ophthalmol* 1985; 103:1796–1806.

53. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Results after lens extraction in patients with diabetic retinopathy. ETDRS report number 25. Arch Ophthalmol 1999;117:1600–1606
54. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Treatment techniques and clinical guidelines for photocoagulation of diabetic macular edema. ETDRS report number 2. Ophthalmology 1987; 94:761-774
55. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Techniques for scatter and local photocoagulation treatment of diabetic retinopathy. ETDRS report number 3. Int Ophthalmol Clin 1987; 27: 254-264
56. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Photocoagulation for diabetic macular edema. ETDRS report number 4. Int Ophthalmol Clin 1987; 27: 265-272
57. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Case Reports to accompany Photocoagulation for diabetic macular edema. ETDRS reports number 3 and 4. Int Ophthalmol Clin 1987; 27: 273-333
58. Kinyoun J, Barton F, Fisher M, Hubbard L, Aiello L and Ferris F, III. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Detection of diabetic macular edema. Ophthalmoscopy versus photography – ETDRS report number 5. Ophthalmology 1989; 96: 746-750
59. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study design and baseline patients characteristics. ETDRS report number 7. Ophthalmology 1991; Suppl 98: 741-756
60. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Effects of aspirin treatment on diabetic retinopathy. ETDRS report number 8. Ophthalmology 1991; Suppl 98: 757-765
61. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. Ophthalmology 1991; Suppl 98: 766-785

62. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group, Classification of diabetic retinopathy from fluorescein angiograms. ETDRS report number 11. *Ophthalmology* 1991; Suppl 98: 807–822
63. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group, Fundus photographic risk factors for progression of diabetic retinopathy. ETDRS report number 12. *Ophthalmology* 1991; Suppl 98: 823–833.
64. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group, Fluorescein angiographic risk factors for progression of diabetic retinopathy. ETDRS report number 13. *Ophthalmology* 1991; Suppl 98: 834–840
65. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group, Aspirin effects on mortality and morbidity in patients with diabetes mellitus. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report 14. *JAMA* 1992; 268: 1292–1300
66. Fong D.S., Barton F.B. and Bresnick G.H. Impaired color vision associated with diabetic retinopathy: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report no. 15. *Am J Ophthalmol* 1999; 128: 612–617.
67. Chew E.Y., Williams G.A., Burton T.C., Barton F.B., Remaley N.A. and Ferris F.L., III, Aspirin effects on the development of cataracts in patients with diabetes mellitus. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report 16. *Arch Ophthalmol* 1992; 110: 339–342.
68. Flynn H.W., Jr, Chew E.Y., Simons B.D., Barton F.B., Remaley N.A., Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group and F.L. Ferris, III, Pars plana vitrectomy in the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study. ETDRS report number 17. *Ophthalmology* 1992; 99: 1351–1357.
69. Davis M.D., Fisher M.R., Gangnon R.E. et al., Risk factors for high-risk proliferative diabetic retinopathy and severe visual loss: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report 18. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 3: 233–252.
70. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group, Focal photocoagulation treatment of diabetic macular edema. Relationship of treatment effect to fluorescein angiographic and other retinal



- characteristics at baseline: ETDRS report no. 19. Arch Ophthalmol 1995; 113: 1144–1155
71. Chew E.Y., Klein M.L., Murphy R.P., Remaley N.A. and Ferris F.L., III, Effects of aspirin on vitreous/preretinal hemorrhage in patients with diabetes mellitus. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report no. 20. Arch Ophthalmol 1995; 113: 52–55.
72. Chew E.Y., Klein M.L., Ferris, F.L. III et al. Association of elevated serum lipid levels with retinal hard exudate in diabetic retinopathy. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) report 22. Arch Ophthalmol 1996; 114: 1079–1084.
73. Fong D.S., Segal P.P., Myers F., Ferris F.L., Hubbard L.D. and Davis M.D. Subretinal fibrosis in diabetic macular edema. ETDRS report 23. Arch Ophthalmol 1997; 115: 873–877.
74. Fong DS, Ferris FL, Davis MD, Chew EY: Causes of severe visual loss in the early treatment diabetic retinopathy study: ETDRS report number 24: The Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Am J Ophthalmol 1999; 127:137–141
75. Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group, Two-year course of visual acuity in severe proliferative diabetic retinopathy with conventional management. Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study (DRVS) report 1. Ophthalmology 1985; 92: 492–502.
76. Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group, Early vitrectomy for severe vitreous hemorrhage in diabetic retinopathy. Two-year results of a randomized trial. Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study report 2. Ophthalmology 1985; 103: 1644–1652.
77. Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group, Early vitrectomy for severe proliferative diabetic retinopathy in eyes with useful vision. Clinical application of results of a randomized trial. Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study report 4. Ophthalmology 1988; 95: 1321–1334.
78. Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group, Early vitrectomy for severe proliferative diabetic retinopathy in eyes with useful vision. Results of a randomized trial. Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study report 3. Ophthalmology 1988; 95: 1307–1320.

79. Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group, Early vitrectomy for severe vitreous hemorrhage in diabetic retinopathy. Four-year results of a randomized trial: Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study report 5. *Arch Ophthalmol* 1990; 108: 958–964.
80. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of longterm complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329:977–986
81. Diabetes Control and Complications Trial Research Group, The effect of intensive diabetes treatment on the progression of diabetic retinopathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol* 1995; 113: 36–51.
82. Diabetes Control and Complications Trial Research Group, The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes* 1995; 44: 968–983.
83. Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Progression of retinopathy with intensive versus conventional treatment in the Diabetes Control and Complications Trial. *Ophthalmology* 1995; 102: 647–661.
84. Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Lifetime benefits and costs of intensive therapy as practiced in the Diabetes Control and Complications Trial. *JAMA* 1996; 276: 1409–1415.
85. Diabetes Control and Complications Trial Research Group, The absence of a glycemic threshold for the development of long-term complications: the perspective of the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes* 1996; 45: 1289–1298.
86. Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC), Design, implementation, and preliminary results of a long-term follow-up of the Diabetes Control and Complications Trial Cohort. *Diabetes Care* 1999; 22: 99– 111.
87. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group, Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four



- years after a trial of intensive therapy. *N Engl J Med* 2000; 342: 381–389.
88. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group, Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. *Am J Ophthalmol* 2000; 129: 704–705
89. UK Prospective Diabetes Study Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *BMJ* 1998; 317(7160):703–13
90. UK Prospective Diabetes Study Group, Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352: 837–853.
91. UK Prospective Diabetes Study Group, Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 39. *BMJ* 1998; 317: 713–720.
92. Kohner E.M., Stratton I.M., Aldington S.J., Holman R.R. and Matthews D.R., Relationship between the severity of retinopathy and progression to photocoagulation in patients with type 2 diabetes mellitus in the UKPDS (UKPDS 52). *Diabet Med* 2001; 18: 178–184.
93. Kohner E.M., Aldington S.J., Stratton I.M. et al., United Kingdom Prospective Diabetes Study, 30: diabetic retinopathy at diagnosis of non-insulin-dependent diabetes mellitus and associated risk factors. *Arch Ophthalmol* 1998;116: 297– 303.
94. Chihara E, Matsuoka T, Oguar Y, Matsumara M : Retinal nerve layer defect as an early manifestation of diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 1993; 100:1147-1151
95. Kaiser N, Sasson S, Feener EP, Boukobza-Vardi N, Higashi S, Moller DE, Davidheiser S, Przybylski RJ, King GL: Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes* 1993; 42: 80–89

96. Gabbay KH, Merola LO, Field RA: Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science* 1966; 151: 209–210
97. Lee AY, Chung SS: Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* 1999;13: 23–30
98. Engerman RL, Kern TS, Larson ME: Nerve conduction and aldose reductase inhibition during 5 years of diabetes or galactosaemia in dogs. *Diabetologia* 1994; 37: 141–144
99. Charonis AS, Reger LA, Dege JE, Kouzi-Koliakos K, Furcht LT, Wohlhueter RM, Tsilibary EC: Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation. *Diabetes* 1990; 39: 807–814
100. Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowicz D, Yang Z, Liu FT, Cerami A: Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. *Mol Med* 1995; 1: 634–64
101. Kirstein M, Aston C, Hintz R, Vlassara H: Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J Clin Invest* 1992; 90: 439–446
102. Koya D, King GL: Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998; 47: 859–866
103. Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL: Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest* 1997; 100: 115–126
104. Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, King GL: Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation* 2000; 101: 676–681
105. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications. *Diabetes* 2005; 54:1615-1625

106. Tomlinson DR, Willars GB, Carrington AL: Aldose reductase inhibitors and diabetic complications. *Pharmacol Ther* 1992; 54:151–194
107. Arauz-Pacheco C, Ramirez LC, Pruneda L, Sanborn GE, Rosenstock J, Raskin P: The effect of the aldose reductase inhibitor, ponalrestat, on the progression of diabetic retinopathy. *J Diabetes Complications* 1992; 6:131–137
108. A randomized trial of sorbinil, an aldose reductase inhibitor, in diabetic retinopathy: the Sorbinil Retinopathy Trial Research Group. *Arch Ophthalmol* 1990; 108:1234-1244
109. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A: Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med* 1984; 101:527–537
110. Brownlee M: Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 1994; 43:836-841
111. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404: 787–790
112. Adamis A., Shima D The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. *Retina* 2005; 25:111-118
113. Shima D, Adamis AP, Ferrara N, et al. Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterisation of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the sole mitogen. *Mol Med* 1995; 2: 182193
114. Ishida S, Usui T, Yamashiro K, et al. VEGF-164 mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularisation. *J Exp Med* 2003; 198: 483-489
115. Ishida S, Usui T, Yamashiro K, et al. VEGF-164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:2155-2162

116. Chew EY, Mills JL, Metzger BE, Remaley NA, Jovanovic-Peterson L, Knopp RH, Conley M, Rand L, Simpson JL, Holmes LB, Aarons JH, the National Institute of Child Health and Human Development Diabetes in Early Pregnancy Study Group: Metabolic control and progression of retinopathy: the Diabetes in Early Pregnancy Study. *Diabetes Care* 1995; 18:631–637
117. Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C, Hazariwala KM, Cooper-DeHoff R, Caballero S, Estes KS: The efficacy of octreotide in the therapy of severe nonproliferative and early proliferative diabetic retinopathy: a randomized controlled study. *Diabetes Care* 2000; 23:504–509
118. Huang D, Swanson EA, Lin CP et al. Optical coherence tomography. *Science* 1991;254:1178-1181
119. Flynn HW, Smiddy WE. Diabetes and Ocular Disease. Past, Present and Future Therapies. *Ophthalmology Monographs* 14, American Academy of Ophthalmology 2000 pp.115-154
120. Haritoglou C, Kook D, Neubauer A, Wolf A, Priglinger S, Strauss R, Gandorfer A, Ulbig M, Kampik A. Intravitreal bevacizumab (Avastin) therapy for persistent diffuse diabetic macular edema. *Retina*. 2006; 26(9):999-1005
121. Vander JF, Duker JS, Benson WE, Brown GC, McNamara JArch, Rosenstein RB: Long-term stability and visual outcome after favorable initial response of proliferative diabetic retinopathy to panretinal photocoagulation. *Ophthalmology* 1991; 98: 1575-1579
122. Kotoula MG, Koukoulis GN, Zintzaras E, Karabatsas CH, Chatzoulis DZ. Metabolic control of diabetes is associated with an improved response of diabetic retinopathy to panretinal photocoagulation. *Diabetes Care*. 2005 Oct;28(10):2454
123. Gilbert, RE, Tsalamandris, C, Allen, TJ, et al. Early nephropathy predicts vision-threatening retinal disease in patients with type I diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:85.
124. Mason RM, Wahab NA. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1358–1373.

125. Krishnamurti U, Rondeau E, Sraer JD, Michael AF, Tsilibary EC. Alterations in human glomerular epithelial cells interacting with nonenzymatically glycosylated matrix. *J Biol Chem* 1997; 272: 27966–27970
126. P.H.Kimmelstiel, C.Wilson: Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. *American Journal of Pathology*, Philadelphia, 1936, 12: 82-97.
127. Benigni A, Gagliardini E, Tomasoni S, et al. Selective impairment of gene expression and assembly of nephrin in human diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2004; 65: 2193–2200.
128. Kestilä M, Lenkkeri U, Mannikko M, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1: 575-582.
129. Beltcheva O, Martin P, Lenkkeri U, Tryggvason K. Mutation spectrum in the nephrin gene (NPHS1) in congenital nephrotic syndrome. *Hum Mutat* 2001; 17: 368-373.
130. Doublie S, Salvidio G, Lupia E, et al. Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy: evidence for a distinct role for glycosylated albumin and angiotensin II. *Diabetes* 2003; 52: 1023-1030.
131. Ruggenenti P, Fassi A, Ilieva AP, et al. Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2004; 351: 1941–1951.
132. Sasso FC, Carbonara O, Persico M, et al. Irbesartan reduces the albumin excretion rate in microalbuminuric type 2 diabetic patients independently of hypertension: a randomized double-blind placebo-controlled crossover study. *Diabetes Care* 2002; 25: 1909-1913.
133. Nagai Y, Yao L, Kobori H, et al. Temporary angiotensin II blockade at the prediabetic stage attenuates the development of renal injury in type 2 diabetic rats. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 703-711.
134. Martin J, Steadman R, Knowlden J, Williams J, Davies M. Differential regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human glomerular epithelial cells in vitro. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1629–1637.

135. 46. Kitsiou PV, Tzinia AK, Stetler-Stevenson WG, et al. Glucose-induced changes in integrins and matrix related functions in cultured human glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F671-F679.
136. McLennan SV, Fisher E, Martell SY, et al. Effects of glucose on matrix metalloproteinase and plasmin activities in mesangial cells: possible role in diabetic nephropathy. *Kidney Int (Suppl)* 2000; 77: S81–S87. 48. Schena F, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 30–33.
137. Riser BL, Ladson-Wofford S, Sharba A, et al. TGF-beta receptor expression and binding in rat mesangial cells: modulation by glucose and cyclic mechanical strain. *Kidney Int* 1999; 56: 428–439.
138. Fukami K, Yamagishi S, Ueda S, Okuda S. Role of AGEs in diabetic nephropathy. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 946-952.
139. Lorenzi M, Karam JH, McIlroy MB, Forsham PH. Increased growth hormone response to dopamine infusion in insulin-dependent diabetic subjects. *J Clin Invest* 1980; 65: 146-153.
140. Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes* 2008; 57; 1446-1454.
141. Zintzaras E, Chatzoulis DZ, Karabatsas CH, Stefanidis I. The relationship between C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and retinopathy in type 2 diabetes: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2005; 50:267-275.
142. Zintzaras, E., Stefanidis, I. Association between the GLUT1 gene polymorphism and the risk of diabetic nephropathy: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2005; 50:84-91.
143. Graham A, Heath P, Morten JE, Markham AF. The human aldose reductase gene maps to chromosome region 7q35. *Hum Genet* 1991; 86, 509-514.
144. A. Ntemka, F. Iliades, T. Didagelos, D. Grekas. The role of genes on diabetic nephropathy development in patients with type-2 diabetes mellitus. *Hellen Nephrol* 2010; 22 (1): 31-44.

145. Zintaras E. The power of generalized odds ratio in assessing association in genetic studies with known mode of inheritance. *Journal of Applied Statistics* 2012; 39:2569-2581.
146. Weir BS. *Genetic Data Analysis*. Sunderland, Sinauer, MA. 1990.
147. Zintzaras E. Impact of Hardy-Weinberg equilibrium deviation on allele-based risk effect of genetic association studies and meta-analysis. *Eur J Epidemiol* 2010b; 25:553-560.
148. Zintzaras E, Ioannidis JP. Meta-analysis for ranked discovery datasets: theoretical framework and empirical demonstration for microarrays. *Comput Biol Chem* 2008; 32:38-46.
149. Zintzaras E, Ioannidis JP. HEGESMA: genome search meta-analysis and heterogeneity testing. *Bioinformatics* 2005b; 21:3672-3673.
150. Hosseini SM, Boright AP, Sun L, Canty AJ, Bull SB, Klein BE, Klein R; DCCT/EDIC Research Group, Paterson AD. The association of previously reported polymorphisms for microvascular complications in a meta-analysis of diabetic retinopathy. *Hum Genet.* 2015 Feb;134(2):247-57



## **Παράρτημα**

### **Πρωτόκολλο εξέτασης ασθενούς**



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ		ΚΩΔΙΚΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ
ΕΠΩΝΥΜΟ	ΦΥΛΟ	ΗΜΕΡ. ΕΞΕΤΑΣΗΣ
ΟΝΟΜΑ	ΦΥΛΗ	ΚΩΔΙΚΟΣ
		ΑΜ. ΕΞ. ΙΑΤΡΕΙΟΥ
ΠΑΤΡΩΝΥΜΟ	ΤΟΠΟΣ ΔΙΑΜΟΝΗΣ	ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ
ΗΛΙΚΙΑ	ΤΗΛΕΦΩΝΟ	ΑΣΦΑΛ. ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ		

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΝΤΑΞΗΣ:	ΝΑΙ	ΟΧΙ
Άνδρες ή γυναίκες άνω των 50 ετών.		
Άτομο πρόθυμο να υπογράψει οικειοθελώς τα έντυπα συγκατάθεσης και προστασίας δεδομένων πριν την ένταξή του στην κλινική μελέτη.		
Ασθενείς με διαγνωσμένο ΣΔ τύπου II		
Ασθενείς που είναι ικανοί να καταλάβουν τις απαιτήσεις της κλινικής μελέτης και να ακολουθήσουν το πρόγραμμα επισκέψεων παρακολούθησης.		

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ:	ΝΑΙ	ΟΧΙ
Προηγούμενες οφθαλμολογικές επεμβάσεις (όπως εγχείρηση καταρράκτη, υαλοειδεκτομή, διαθλαστικές επεμβάσεις).		
Οφθαλμικά τραύματα, τα οποία προκάλεσαν μόνιμες αλλοιώσεις στον κερατοειδή ή αντιμετωπίστηκαν με συρραφή και ράμματα.		
Χρόνιες ή οξείες παθήσεις του κερατοειδούς.		
Συστηματικές παθήσεις οι οποίες ενδέχεται να προκαλέσουν νευροπάθεια, πέραν της διαβητικής νευροπάθειας		
Συστηματικές παθήσεις, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν είτε λόγω μηχανισμού είτε λόγω αγωγής βλάβες στον αμφιβληστροειδή, όπως ο Συστηματικός Ερυθρηματώδης Λύκος και η λήψη υδροξυχλωροκίνης (Plaquenil).		
(Αναφορικά με την ομάδα ελέγχου) αποκλείονται άτομα με αλλοιώσεις στον αμφιβληστροειδή. Εξαίρεση αποτελούν: <ul style="list-style-type: none"> <li>• πρώιμες αλλοιώσεις ξηρής ωχροπάθειας ή</li> <li>• περιφερικοί σπίλοι, που δεν επηρεάζουν την οπτική οξύτητα.</li> </ul>		

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ		
ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ	ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ
.....	ΑΜΦΙ/ΠΑΘΕΙΑ	ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ
.....	.....	.....

ΑΤΟΜΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ	ΝΑΙ	ΕΤΗ	ΟΧΙ	
ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ		< 5 ΕΤΗ 5-10 ΕΤΗ 10-15 ΕΤΗ > 15 ΕΤΗ		
ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ				
ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ				
ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ			ΕΟΜ	ΑΕΕ
ΚΑΠΝΙΣΜΑ			ΠΑΚΕΤΟ/ΗΜΕΡΑ	
ΑΛΚΟΟΛ			ΠΟΤΗΡΙΑ	

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ
.....
.....
.....

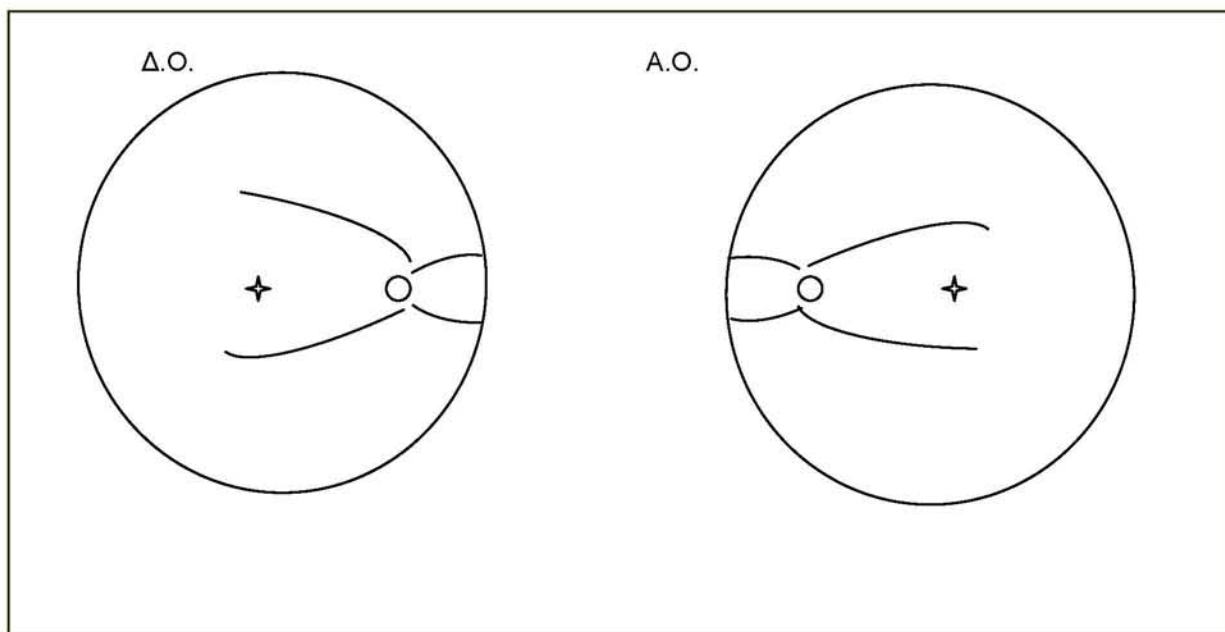


ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ			
ΑΙΜΑ:		ΟΥΡΑ (Τυχαίο δείγμα):	
GLU		ΛΕΥΚΩΜΑ	
ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΜΕΝΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ (GHb) (HbA1c)		ΛΕΥΚΩΜΑΤΙΝΗ	
ΚΡΕΑΤΙΝΙΝΗ		ΚΡΕΑΤΙΝΙΝΗ	
ΟΥΡΙΑ			
LDL			
HDL			
ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ			

ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ:	Δ.Ο.	Α.Ο.
ΟΠΤΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ ΧΩΡΙΣ ΔΙΟΡΘΩΣΗ		
ΟΠΤΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ ΜΕ ΔΙΟΡΘΩΣΗ		
ΟΠΤΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ ΡΗ		
ΕΝΔΟΦΘΑΛΜΙΑ ΠΙΕΣΗ		

ΠΡΟΣΘΙΑ ΜΟΡΙΑ		
ΕΡΥΘΡΩΣΗ ΙΡΙΔΟΣ		
ΝΕΟΑΓΓΕΙΩΣΗ ΓΩΝΙΑΣ		
ΓΛΑΥΚΩΜΑ-C/D (ΟΠΤΙΚΗ ΘΗΛΗ)		
ΨΕΥΔΟΑΠΟΦΟΛΙΔΩΣΗ		
ΚΑΤΑΡΡΑΚΤΗΣ		

1. ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΑΜΦ/ΠΑΘΕΙΑ	Δ.Ο.	Α.Ο.
ΗΠΙΑ ΜΗ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ Δ.Α.		
ΜΕΤΡΙΑ ΜΗ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ Δ.Α.		
ΣΟΒΑΡΗ ΜΗ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ Δ.Α.		
ΗΠΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ Δ.Α.		
ΣΟΒΑΡΗ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ Δ.Α.		
ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ ΟΙΔΗΜΑ ΩΧΡΑΣ		
ΦΛΟΥΟΡΟΑΓΓΕΙΟΓΡΑΦΙΑ		
ΝΕΟΑΓΓΕΙΑΚΟ ΓΛΑΥΚΩΜΑ		
ΕΝΔΟΥΑΛΟΕΙΔΙΚΗ ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ		
ΦΩΤΟΠΗΞΙΑ GRID		
ΦΩΤΟΠΗΞΙΑ PRP		



**ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ**

.....

.....

.....

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ ΑΜΦΙΒΛΙΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΑΣ	Δ.Ο.	Α.Ο.
ΑΠΟΥΣΙΑ Δ.Α.		
ΗΠΙΑ Δ.Α. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ		
ΜΕΤΡΙΑ Δ.Α. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ		
ΣΟΒΑΡΗ Δ.Α. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ		
ΠΡΩΙΜΗΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ Δ.Α.		
ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ Δ.Α.		
ΩΧΡΟΠΑΘΕΙΑ		

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑΣ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
ΜΙΚΡΟΛΕΥΚΩΜΑΤΟΥΡΙΑ		
ΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ		

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ	
ΧΩΡΙΣ ΑΜΦ/ΠΑΘΕΙΑ ΧΩΡΙΣ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ	
ΜΟΝΟ ΜΕ ΑΜΦ/ΠΑΘΕΙΑ	
ΜΟΝΟ ΜΕ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ	
ΜΕ ΑΜΦ/ΠΑΘΕΙΑ ΚΑΙ ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ	

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ..... .....
--------------------------------