

Η σχέση της ανταλλαγής Na^+/H^+ με την 24ωρη αρτηριακή πίεση, την ευαισθησία στην ινσουλίνη και το ενδοκυττάριο ασβέστιο σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2*

Μ.Ι. Ποικιλίδου¹

Χ.Δ. Μπεφάνη²

Π.Α. Σαραφίδης¹

Γ.Γ. Κολιάκος²

Ι.Μ. Τζιόλας¹

Κ.Α. Καζάκος¹

Π.Ε. Ζεμπεκάκης¹

Λ.Σ. Χατζησταυρή¹

Α.Δ. Χίτογλου-Μακέδου³

Ι.Γ. Γιώβος¹

Α.Ν. Λαζαρίδης¹

Περίληψη

Σκοπός: Η ανταλλαγή Na^+/H^+ αποτελεί για ορισμένους ερευνητές έναν ενδιάμεσο φαινότυπο για την έκφραση τόσο της υπέρτασης όσο και της αντίστασης στην ινσουλίνη. Η αυξημένη ενεργότητά της σε υπερτασικούς πληθυσμούς έχει μελετηθεί στο παρελθόν ενώ λίγα είναι τα στοιχεία που υπάρχουν σε σχέση με τη δραστικότητα του ιοντοανταλλάκτη, την υπέρταση και την ευαισθησία στην ινσουλίνη (ΕΙ) σε πληθυσμούς διαβητικών ασθενών. Έχει προταθεί ότι στην ενεργοποίηση της ανταλλαγής στα κύτταρα τόσο των υπερτασικών όσο και των διαβητικών ασθενών σημαντικό ρόλο παίζει το ενδοκυττάριο ασβέστιο. Σκοπός της μελέτης ήταν να διερευνηθεί η συσχέτιση της ανταλλαγής Na^+/H^+ με την 24ωρη αρτηριακή πίεση (ΑΠ) το ενδοαίμοπεταλιακό ασβέστιο και την ΕΙ σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. **Υλικό και Μέθοδοι.** Αξιολογήθηκαν 52 ασθενείς (23 άνδρες και 29 γυναίκες) με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 υπό αγωγή με γλιβενκλαμίδα και αρτηριακή υπέρταση. Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε 24ωρη καταγραφή της ΑΠ, προσδιορισμό της ΕΙ με τη μέθοδο του ευγλυκαιμικού υπερινσουλιναίμικου clamp, υπολογισμό της ενεργότητας της ανταλλαγής Na^+/H^+ στα ερυθροκύτταρα και μέτρηση της ενδοαίμοπεταλιακής συγκέντρωσης Ca^{2+} με τη βοήθεια φθορίζουσας ουσίας (fura-2). **Αποτελέσματα.** Σημαντικές ήταν οι συσχετίσεις μεταξύ της ενεργότητας της ανταλλαγής και όλων των δεικτών της 24ωρης καταγραφής. Οι συντελεστές συσχέτισης ήταν $r=0,312$, $p<0,05$, $r=0,371$, $p<0,001$, $r=0,347$, $p<0,05$ για τη μέση 24ωρη συστολική αρτηριακή πίεση (ΣΑΠ), τη μέση 24ωρη διαστολική αρτηριακή πίεση (ΔΑΠ) και την 24ωρη μέση αρτηριακή πίεση (ΜΑΠ). Αντίθετα κανένας δείκτης ΕΙ του clamp δεν συσχετίστηκε με τη δραστηριότητα της ανταλλαγής, ενώ τα επίπεδα του ενδοαίμοπεταλιακού Ca^{2+} έδειξαν θετική, σημαντική συσχέτιση με την ενεργότητα της Na^+/H^+ ($r=0,304$, $p<0,05$). Τέλος, η 24ωρη ΣΑΠ, και η 24ωρη ΜΑΠ συσχετίστηκαν θετικά σημαντικά με τη συγκέντρωση του ενδοαίμοπεταλιακού Ca^{2+} ($r=0,287$, $p<0,05$ και $r=0,276$, $p<0,05$ αντίστοιχα), ενώ η προσθήκη και της ενεργότητας της Na^+/H^+ στην ανάλυση άμβλυνε τις παραπάνω σχέσεις ($r=0,232$, $p>0,05$ και $r=0,206$, $p>0,05$ για την 24ωρη ΣΑΠ και την 24ωρη ΜΑΠ αντίστοιχα). **Συμπεράσματα.** Η 24ωρη αρτηρια-

¹ Α' Παθολογική Κλινική ΑΠΘ,

² Τμήμα Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής ΑΠΘ

³ Μικροβιολογικό Εργαστήριο Β' Παιδιατρικής Κλινικής ΑΠΘ, Νοσοκομείο ΑΧΕΠΑ, Θεσσαλονίκη

* Ανακοινώθηκε στο 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αρτηριακής Υπέρτασης της Ελληνικής Αντιυπερτασικής Εταιρείας που έγινε στη Θεσσαλονίκη, 1-3 Φεβρουαρίου 2007.

κή πίεση εξαρτάται από την ενεργότητα της ανταλλαγής $\text{Na}^+\text{-H}^+$ σε διαβητικούς ασθενείς, ενώ η αύξηση της συγκέντρωσης ενδοκυττάρου Ca^{2+} είναι πιθανός μηχανισμός για τη σχέση αυτή.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανταλλαγή $\text{Na}^+\text{-H}^+$ βρίσκεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα¹. Πρόκειται για μία ομάδα πρωτεϊνικών ανταλλακτών ($\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchangers, NHE), οι οποίοι εμφανίζουν διαφορετική κατανομή στα διάφορα είδη κυττάρων. Ο πιο σημαντικός είναι ο ανταλλάκτης NHE-1, που είναι ευαίσθητος στην αμιλορίδη^{2,3}. Ο φυσιολογικός ρόλος της $\text{Na}^+\text{-H}^+$ είναι η διατήρηση του ενδοκυττάρου pH, του κυτταρικού όγκου και ο έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Αυξημένη ανταλλαγή έχει παρατηρηθεί σε λεία μυϊκά κύτταρα υπερτασικών επίμυων⁴, σε λευκά αιμοσφαίρια⁵, αιμοπετάλια⁶ και ερυθρά αιμοσφαίρια⁷ υπερτασικών ανθρώπων.

Η σχέση μεταξύ της αρτηριακής πίεσης (ΑΠ) και της ανταλλαγής $\text{Na}^+\text{-H}^+$ καθώς και της ανταλλαγής $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ που για πολλούς ερευνητές αντικατοπτρίζει την ενεργότητα της $\text{Na}^+\text{-H}^+$, έχει μελετηθεί εκτεταμένα στο παρελθόν⁸⁻¹⁶. Οι περισσότερες αναφορές υποστηρίζουν ότι η ενεργότητα τόσο της ανταλλαγής $\text{Na}^+\text{-H}^+$ όσο και της ανταλλαγής $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ ήταν σημαντικά αυξημένες σε υπερτασικά άτομα σε σχέση με νορμοτασικά^{10,12-16}. Παρόλα αυτά και με βάση τα ευρήματα των παραπάνω μελετών κάποιοι ερευνητές καταλήγουν ότι η αυξημένη δραστηριότητα της ανταλλαγής δεν αποτελεί κανόνα αλλά υπάρχουν υπερτασικοί ασθενείς με φυσιολογική ενεργότητα της ανταλλαγής^{9,17}. Λίγα και αντικρουόμενα είναι τα δεδομένα μέχρι τώρα σχετικά με τη δραστηριότητα της αντλίας και το ύψος της ΑΠ σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ) τύπου 2. Συγκεκριμένα οι Johnson και συν βρήκαν ότι υπερτασικοί ασθενείς της μαύρης φυλής με ΣΔ τύπου 2 είχαν υψηλότερη ενεργότητα της αντλίας $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ σε σχέση με νορμοτασικούς ασθενείς της ίδιας φυλής με ΣΔ τύπου 2¹⁸. Αντίθετα οι Gall και συν δεν βρήκαν καμία διαφορά στην ενεργότητα της ανταλλαγής Na-Li μεταξύ ατόμων με ΣΔ τύπου 2 πρωτεϊνουρία και υψηλή ΑΠ και νορμοτασικών με ΣΔ τύπου 2 χωρίς πρωτεϊνουρία¹⁹. Τα αποκλίνοντα αυτά συμπεράσματα οφείλονται τόσο στις διαφορετικές μεθοδολογίες προσδιορισμού της

ανταλλαγής όσο και στη μεγάλη μεταβλητότητα που παρουσιάζει η ΑΠ που μετρείται στο ιατρείο. Η υψηλή επαναληψιμότητα της 24ωρης καταγραφής και η υπεροχή της στην πρόβλεψη της καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνητότητας την καθιστούν ανώτερη της ΑΠ που μετρείται στο ιατρείο^{20,21}. Είναι ενδιαφέρον επομένως να διερευνηθεί η σχέση της 24ωρης καταγραφής και της ανταλλαγής $\text{Na}^+\text{-H}^+$.

Ιδιαίτερη σημασία έχει επίσης η ενεργότητα της ανταλλαγής και η ινσουλινική αντίσταση. Μελέτες έδειξαν ότι η πρόκληση υπερινσουλιναϊμίας προκαλεί αύξηση της ενεργότητας της $\text{Na}^+\text{-H}^+$ σε υπερτασικούς επίμυες²². Παρόμοια αποτελέσματα έχουν φανεί και in vitro όπου η εξωγενής προσθήκη ινσουλίνης σε κύτταρα φυσιολογικών ατόμων προκάλεσε αύξηση της $\text{Na}^+\text{-H}^+$, ενώ δεν επηρέασε την $\text{Na}^+\text{-H}^+$ παχύσαρκων ασθενών²³.

Σε αναζήτηση μηχανισμών για τη σχέση υπέρτασης και ανταλλαγής $\text{Na}^+\text{-H}^+$ ο Rosskopf και συν. πρότειναν μία πιθανή σύνδεση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} με την ενεργότητα της ανταλλαγής $\text{Na}^+\text{-H}^+$, σύμφωνα με την οποία η αύξηση του pH που προκαλείται από την αυξημένη ανταλλαγή $\text{Na}^+\text{-H}^+$, έχει ως αποτέλεσμα την κινητοποίηση των ενδοκυττάρων αποθεμάτων Ca^{2+} μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C^1 . Η αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} προκαλεί με τη σειρά της αύξηση της ανταλλαγής $\text{Na}^+\text{-H}^+$ και τη δημιουργία ενός φαύλου κύκλου.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η συσχέτιση της ανταλλαγής $\text{Na}^+\text{-H}^+$ με την 24ώρη ΑΠ το ενδοαιμοπεταλιακό ασβέστιο και την ευαισθησία στην ινσουλίνη (ΕΙ) σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2.

ΑΤΟΜΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

Πληθυσμός της μελέτης

Στην έναρξη της μελέτης αξιολογήθηκαν 57 ασθενείς, 25 εκ των οποίων ήταν άνδρες και 32 γυναίκες. Όλοι είχαν ΣΔ τύπου 2 και βρισκονταν ήδη σε αγωγή με γλιβενκλαμίδη και σχετικά καλή μεταβολική ρύθμιση. Όσοι από τους ασθενείς ήταν διαγνωσμένοι υπερτασικοί δεν λάμβαναν αντιυπερτασική αγωγή που να αναστέλλει την ενεργότητα της ανταλλαγής $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (π.χ. αμιλορίδη). Οι υπόλοιποι είχαν πρόσφατη διάγνωση ήπιας ιδιοπαθούς ΑΥ και δεν ελάμβαναν θεραπεία. Όλες οι εξετάσεις διεξήχθησαν σε συμφωνία με τη

Διακήρυξη του Ελσίνκι και οι ασθενείς συμμετείχαν εθελοντικά στη μελέτη παρέχοντας τη συγκατάθεσή τους μετά από αντίστοιχη ενημέρωση. Από τους ασθενείς αυτούς 5 δεν μπόρεσαν να υποβληθούν σε εξέταση με τη μέθοδο του clamp λόγω δυσκολίας στην τοποθέτηση των ενδοφλεβίων γραμμών. Τελικά οι ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη ήταν 52 (23 άνδρες και 29 γυναίκες) με πλήρες σύνολο δεδομένων.

Πρωτόκολλο μελέτης

Στην αρχική επίσκεψη οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε κλινική εξέταση και εργαστηριακό έλεγχο για να αποκλειστούν ασθενείς με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, στεφανιαία νόσο, νεφρική ανεπάρκεια, ηπατική νόσο ή ιστορικό κακοήθειας.

Οι συμμετέχοντες προσέρχονταν στο Εργαστήριο Κλινικών Δοκιμασιών της κλινικής μας όπου στις 07: 00 π.μ. (1^η ημέρα) μετά από 12ωρη νηστεία και χωρίς λήψη πρωινών φαρμάκων λαμβάνονταν δείγματα αίματος για τον προσδιορισμό των επιπέδων γλυκόζης, γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA_{1c}), λιπιδίων, δεικτών ηπατικής λειτουργίας και λοιπών συνήθων εργαστηριακών παραμέτρων. Επίσης λαμβανόταν δείγμα αίματος με ειδική μέθοδο για τον προσδιορισμό του ενδοαιμοπεταλιακού Ca²⁺ καθώς και για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της ανταλλαγής Na⁺-H⁺. Οι ασθενείς υποβάλλονταν στη συνέχεια σε μέτρηση του βάρους και του ύψους, από τα οποία υπολογιζόταν ο δείκτης μάζας σώματος (body mass index, BMI) και της αναλογίας της περιμέτρου της μέσης προς την περίμετρο των ισχίων (waist to hip ratio, WHR). Αυτήν την ημέρα λάμβανε χώρα η περιπατητική καταγραφή της ΑΠ, όπως περιγράφεται παρακάτω. Το επόμενο πρωί (2^η ημέρα), οι ασθενείς επέστρεφαν στο εργαστήριο για τον προσδιορισμό της ΕΙ με τη μέθοδο του ευγλυκαιμικού υπερινσουλιαιμικού clamp.

Εργαστηριακές μέθοδοι

Μετρήσεις ινσουλινοευαισθησίας

Η ΕΙ υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την τεχνική του ευγλυκαιμικού υπερινσουλιαιμικού clamp, όπως έχει περιγραφεί αλλού²⁴⁻²⁶. Συνοπτικά, μετά από 12ωρη νηστεία και χωρίς πρωινή λήψη φαρμάκων τοποθετήθηκαν δύο ενδοφλέβιες γραμμές, μία σε μια φλέβα της άκρας χειρός ή του

καρπού με παλίνδρομη φορά για τις συχνές αιμοληψίες και άλλη μία σε μια φλέβα του αντιβραχίου για την έγχυση ινσουλίνης και γλυκόζης. Για να ελαχιστοποιηθεί η αρτηριοφλεβική διαφορά στη συγκέντρωση γλυκόζης πλάσματος και να ληφθούν φλεβικές τιμές γλυκόζης όσο το δυνατόν πλησιέστερες στις αντίστοιχες αρτηριακές, η άκρα χείρα παρέμεινε θερμοαινώμενη στους 65°C με χρήση ειδικής συσκευής καθ' όλη τη μέτρηση^{25,27}. Μετά από μια αρχική έγχυση διάρκειας 10 min, η έγχυση ινσουλίνης διατηρήθηκε σταθερή στα 100 mU*m⁻²*min⁻¹ για άλλα 110 min. Η συγκέντρωση γλυκόζης αίματος μετρούνταν κάθε 5 min με σκοπό να διατηρηθεί στο ευγλυκαιμικό επίπεδο (90 mg/dl) μέσω μεταβαλλόμενης έγχυσης υδατικού διαλύματος δεξτρώζης 20%. Η μέση τιμή του ρυθμού έγχυσης γλυκόζης κατά τη διάρκεια των τελικών 40 min της μελέτης (δείκτης M) αντιπροσώπευσε την ΕΙ και ομαλοποιήθηκε περαιτέρω διαιρώντας με το σωματικό βάρος (body weight, bw) και την άλιπο μάζα (fat-free mass, ffm) και προσέκυψαν οι δείκτες M_{bw} και M_{ffm}. Ο ρυθμός μεταβολικής κάθαρσης (Metabolic Clearance Rate, MCR) υπολογίστηκε διαιρώντας τους αντίστοιχους δείκτες M με τη μέση συγκέντρωση γλυκόζης πλάσματος σταθερής κατάστασης^{24,25}.

Μέτρηση ενδοαιμοπεταλιακού ασβεστίου

Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε πρωινή αιμοληψία με τη μέθοδο των δύο συριγγών, για την απομόνωση των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα το αίμα λήφθηκε με καθετηριασμό μίας φλέβας του αντιβραχίου χωρίς περιδέση, με φλεβοκαθετήρα διαμέτρου 20 gauge. Στη συνέχεια λήφθηκαν 10 ml αίματος για τη διεξαγωγή διαφόρων βιοχημικών εξετάσεων που αναφέρθηκαν και χωρίς διακοπή της ροής του αίματος με δεύτερη σύριγγα λήφθηκαν 9 ml αίματος που αμέσως μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες προπυλενίου οι οποίοι περιείχαν 1 ml διαλύματος citrate dextrose (2,5 g κιτρικό νάτριο, 1,5 g κιτρικό οξύ, 2,0 g δεξτρώζης και 100 ml αποσταγμένο νερό)(αναλογία όγκων 9: 1)²⁸. Με τον τρόπο αυτόν απομακρυνόταν το ιστικό πλασμινογόνο που θα μπορούσε να προκαλέσει πήξη του αίματος. Για τον προσδιορισμό της ενδοαιμοπεταλιακής συγκέντρωσης του Ca²⁺ και του μαγνησίου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που περιγράφηκε από τους Yoshimura και συν²⁹⁻³².

Ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο με πάγο ενώ η επεξεργασία του δείγματος γινόταν μέσα σε 15-30 min από τη λήψη του αίματος. Μετά από φυγοκέντρηση στα 500g για 10 min στους 20°C λαμβανόταν η πλούσια σε αιμοπετάλια υπερκείμενη στιβάδα (πλάσμα με αιμοπετάλια). Στη συνέχεια γινόταν η απομόνωση των αιμοπεταλίων με τη χρήση στήλης διαχωρισμού Sepharose 2B-CL (Sigma, Germany) και η διάλυσή τους σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 145mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgSO₄, 10 mM HEPES και 5 mM γλυκόζης σε θερμοκρασία δωματίου. Τα αιμοπετάλια που εξήλθαν από τη στήλη επωάστηκαν με 1 μM fura 2-AM (Molecular Probes, Eugene, OR) και 0,02% Pluronic F-127 (Molecular Probes) στους 37°C για 30 min σε συγκέντρωση 10⁸ κύτταρα/ml. Στη συνέχεια τα αιμοπετάλια πλύθηκαν ξανά με gel filtration για να απομακρυνθεί το εξωκυττάριο fura 2-AM και η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων ρυθμίστηκε στα 10⁷ κύτταρα/ml και το διάλυμα επωάστηκε στους 37 °C για 7 min για να ολοκληρωθεί η υδρόλυση του fura-2AM. Για τη μεγαλύτερη ακρίβεια παρασκευάστηκαν τρία ξεχωριστά διαλύματα αιμοπεταλίων από κάθε δείγμα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος της συγκέντρωσης Ca²⁺.

Η μέτρηση του φθορισμού έγινε με φασματοφθορισμόμετρο (RF-5000, Shimadzu, Kyoto, Japan), (dual excitation wavelength) σε μήκη κύματος διέγερσης 340 και 380 nm και μήκος κύματος εκπομπής 510 nm. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρίου Ca²⁺ υπολογίστηκε ο λόγος του σήματος 340/380 (R), χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος που περιγράφηκε από τον Grynkiewicz³³:

$$[Ca]_i = Kd (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times S_{f380} / S_{f340}$$

όπου η σταθερά διάστασης Kd είναι 224 nM για το fura 2,

R είναι ο λόγος του φθορισμού σε μήκη κύματος 340 και 380 nm στο κυτταρικό διάλυμα, R_{max} και R_{min} είναι οι λόγοι του φθορισμού στα 340 και 380 nm που προέκυψαν σε συγκεντρώσεις κορεσμού και μηδενικού Ca²⁺ αντίστοιχα και S_{f380} και S_{f340} είναι οι εντάσεις του φθορισμού στα 380 nm για το fura 2 σε συγκεντρώσεις μηδενικού και περίσσειας ενδοκυτταρίου Ca²⁺ αντίστοιχα. Για τον προσδιορισμό του R_{max} έγινε προσθήκη 1mM CaCl₂ και Digitonin 50μM ενώ για τον προσδιορισμό του R_{min} έγινε προσθήκη

EGTA σε Tris. Διορθώσεις έγιναν για την επώαση της εκροής fura 2 στον εξωκυττάριο χώρο με την προσθήκη EGTA και για τον αυτοφθορισμό αφαιρώντας το φθορισμό των μη φθορισμένων αιμοπεταλίων και των αντιδραστηρίων. Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του fura 2 εκτιμήθηκε από μία in vitro καμπύλη βαθμονόμησης, η οποία έγινε μετρώντας γνωστές συγκεντρώσεις της fura-2.

Υπολογισμός εισροής Na⁺ στα ερυθρά αιμοσφαίρια

Τα ερυθροκύτταρα πλύθηκαν 4 φορές με 10 mM potassium phosphate buffer pH 7,4 (140 mM choline chloride και 1 mM MgCl₂) και στη συνέχεια 2 ml ερυθροκυττάρων επαναδιαλύθηκαν σε 20 ml ζεστού 37°C 10 mM Tris/Mes buffer pH 6,0 (145 mM KCl, 0,15 mM MgCl₂, 10 mM glucose, 35 mM sucrose, 0,1 mM ouabain, 0,125 mM DIDS και 0,4 mM methazolamide) και επωάστηκαν για 5 min στους 37°C.

Το παραπάνω δείγμα φυγοκεντρήθηκε και τα ερυθροκύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 20ml φρέσκο από το ίδιο 10 mM Tris/Mes buffer pH 6,0. Μετά από 30 min επώαση τα κύτταρα πλύθηκαν 4 φορές με unbuffered solution (145 mM KCl, 0,15 mM MgCl₂, 10 mM glucose, 35 mM sucrose, 0,1 mM ouabain, 0,125 mM DIDS, 0,4 mM methazolamide και 0,01 mM bumetanide). Στη συνέχεια τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν είτε σε 10 mM Tris/Mes buffer pH 6,0 ή 10 mM Tris/Mops buffer pH 8,0, τα όποια ρυθμιστικά διαλύματα ήταν προθερμασμένα στους 37°C και περιείχαν 145 mM NaCl, 0,15 mM MgCl₂, 10 mM glucose, 35 mM sucrose, 0,1 mM ouabain, 0,125 mM di-isothiocyanostilbenedisulfonic acid (DIDS), 0,4 mM methazolamide και 0,01 mM bumetanide. Κατόπιν, 0,2 ml di-putyphthalate επιστοιβάστηκαν πάνω από 0,085 ml είτε από Tris/Mes buffer pH 6,0 (with Na⁺, free of K⁺) είτε από Tris/Mops buffer pH 8,0 (with Na⁺, free of K⁺) με 30% σουκρόζη και από πάνω επιστοιβάστηκαν 0,3 ml από τα κύτταρα. Μετά από 1min φυγοκέντρησης το ίζημα επαδιαλύθηκε ισχυρά σε H₂O.

Η εισροή Na⁺ προσδιορίστηκε σε φλογόφωτόμετρο, εκφράστηκε σε mmol Na⁺ ανά 10⁶ κύτταρα ανά ώρα και έγινε αφαίρεση της τιμής των δειγμάτων που ήταν διαλυμένα σε pH 6 (ελάχιστη τιμή, ανενεργός ιοντοανταλλάκτης)

από την τιμή των δειγμάτων που ήταν διαλυμένα σε pH 8,0 (μέγιστη τιμή, πλήρως ενεργός ιοντοανταλλάκτης).

Περιπατητική καταγραφή της ΑΠ

Η 24ωρη καταγραφή της ΑΠ πραγματοποιήθηκε με συσκευή Spacelabs 90217 (Spacelabs Medical, Redmond, WA) την 1^η ημέρα της προσέλευσης του ασθενούς^{34,35}. Συνοπτικά, η συσκευή μέτρησης και μια περιχειρίδα κατάλληλου μεγέθους τοποθετήθηκαν και άρχισαν οι μετρήσεις της ΑΠ. Κάθε καταγραφή της περιπατητικής ΑΠ διάρκεισε 25 ώρες κατά τη διάρκεια των οποίων οι ασθενείς εκτελούσαν τις συνήθεις τους δραστηριότητες. Τα στοιχεία της πρώτης ώρας δεν περιλήφθηκαν στην ανάλυση και αυτή η περίοδος χρησιμοποιήθηκε για να μπορέσουν οι ασθενείς να αισθανθούν άνετα με τον εξοπλισμό και να μην επηρεαστεί η αντικειμενικότητα των μετρήσεων. Οι ασθενείς κατά τη διάρκεια της 24ωρης καταγραφής έλαβαν την γλιβενκλαμίδα ως συνήθως και την αντιυπερτασική τους αγωγή (εάν υπήρχε). Η συσκευή κατέγραφε την ΑΠ τρεις φορές ανά ώρα από τις 08:00 έως τις 24:00 (διάστημα ημέρας) και ανά μία ώρα από τις 24:00 έως τις 08:00 της επόμενης ημέρας (διάστημα νύχτας)^{36,37}. Οι καταγραφές θεωρούνταν έγκυρες μόνο εάν $\geq 80\%$ των προγραμματισμένων μετρήσεων είχαν πραγματοποιηθεί³⁸. Από την ανάλυση της καταγραφής στον ηλεκτρονικό υπολογιστή προέκυψαν μέσες τιμές για τη συστολική, τη διαστολική και τη μέση αρτηριακή πίεση (ΣΑΠ, ΔΑΠ και ΜΑΠ αντίστοιχα), καθώς επίσης για την πίεση παλμού (ΠΠ), τον καρδιακό ρυθμό.

Πίνακας 1. Βασικά δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης (mean \pm SD)

N	σύνολο 52	άνδρες 23	γυναίκες 29
Ηλικία (χρόνια)	58,8 \pm 7,7	58,0 \pm 5,6	59,2 \pm 9,3
Διάρκεια ΣΔ (έτη)	4,5 \pm 4,4	4,2 \pm 4,9	4,8 \pm 4,0
Διάρκεια υπέρτασης (έτη)	7,1 \pm 7,7	5,4 \pm 4,0	8,5 \pm 9,4
Βάρος (kg)	89,5 \pm 17,7	92,5 \pm 15,0	87,1 \pm 19,6
ΔΜΣ (kg/m ²)	32,9 \pm 6,6	31,6 \pm 5,0	34,0 \pm 7,6
WHR	0,98 \pm 0,6	1,01 \pm 0,05	0,95 \pm 0,06

ΔΜΣ: Δείκτης Μάζας Σώματος, WHR (Waist to Hip Ratio): ο λόγος της περιμέτρου μέσης προς την περιμέτρο των ισχίων

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Τα βασικά δημογραφικά στοιχεία και τα υπόλοιπα δεδομένα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (mean \pm SD). Ο προσδιορισμός του βαθμού συσχέτισης μεταξύ δύο μεταβλητών έγινε με χρήση του συντελεστή συσχέτισης (r) του Pearson. Χρησιμοποιήθηκε γραμμική πολυπαράγοντική ανάλυση για να καθοριστεί η συμμετοχή της συγκέντρωσης του ενδοαιμοπεταλιακού ασβεστίου και της ενεργότητας της Na⁺-H⁺ στην 24ωρη ΑΠ μετά από διόρθωση για την ηλικία και τον ΔΜΣ. Επίπεδο σημαντικότητας P<0,05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό. Η ανάλυση εκτελέστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 13.0 (SPSS PC Inc, Chicago, Illinois, ΗΠΑ).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα βασικά δημογραφικά χαρακτηριστικά για το σύνολο των ασθενών και ανά φύλο παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Οι τιμές των δεικτών της 24ωρης καταγραφής της ΑΠ και της ΕΙ (mean \pm SD) παραθέτονται στους πίνακες 2 και 3 αντίστοιχα. Σημαντικές συσχετίσεις παρατηρήθηκαν μεταξύ της ενεργότητας της ανταλλαγής Na⁺-H⁺ και των επιπέδων της ΑΠ. Συγκεκριμένα, η μέση 24ωρη ΣΑΠ εμφάνισε σημαντική συσχέτιση με τα

Πίνακας 2. Οι τιμές των δεικτών της 24ωρης καταγραφής της ΑΠ (mean \pm SD)

	σύνολο	άνδρες	γυναίκες
24ωρη μέση ΣΑΠ (mmHg)	127,0 \pm 12,1	127,6 \pm 12,9	126,4 \pm 12,9
24ωρη μέση ΔΑΠ (mmHg)	75,3 \pm 7,9	77,0 \pm 8,4	74,1 \pm 7,3
24ωρη μέση ΜΑΠ (mmHg)	92,9 \pm 8,0	93,4 \pm 8,9	92,5 \pm 7,3
Ημερήσια μέση ΣΑΠ (mmHg)	129,3 \pm 13,1	129,8 \pm 13,3	126,4 \pm 12,9
Ημερήσια μέση ΔΑΠ (mmHg)	76,8 \pm 8,0	78,4 \pm 8,7	75,6 \pm 7,4
Νυκτερινή μέση ΣΑΠ (mmHg)	121,0 \pm 12,2	120,7 \pm 11,3	
120,28 \pm 13,1			
Νυκτερινή μέση ΔΑΠ (mmHg)	71,2 \pm 8,3	72,6 \pm 8,0	70,2 \pm 8,6

ΣΑΠ: Συστολική Αρτηριακή Πίεση, ΔΑΠ: Διαστολική Αρτηριακή Πίεση, ΜΑΠ: Μέση Αρτηριακή Πίεση.

Πίνακας 3. Οι τιμές των δεικτών της ινσουλινικής ευαισθησίας που προκύπτουν από το ευγλυκαιμικό υπερινσουλιναϊκό clamp, οι τιμές του ενδοαίμοπεταλιακού Ca^{2+} και της ενεργότητας της ανταλλαγής Na^+-H^+ (mean \pm SD)

	σύνολο	άνδρες	γυναίκες
M (mmol*min ⁻¹)	2,48 \pm 0,83	2,78 \pm 0,88	2,26 \pm 0,72
Mbw (μ mol*min ⁻¹ *kg ⁻¹)	29,3 \pm 10,9	31,5 \pm 5,0	27,7 \pm 11,5
Mffm (μ mol*min ⁻¹ *kg ⁻¹)	48,6 \pm 12,3	53,2 \pm 15,7	43,7 \pm 13,6
MCR (L*min ⁻¹)	0,48 \pm 0,16	0,53 \pm 0,16	0,44 \pm 0,14
MCRbw (mL*min ⁻¹ *kg ⁻¹)	5,6 \pm 2,1	6,0 \pm 1,9	5,4 \pm 2,2
MCRffm (mL*min ⁻¹ *kg ⁻¹)	9,4 \pm 2,8	10,2 \pm 3,1	8,5 \pm 2,6
HbA1c	6,4 \pm 1,5	6,3 \pm 1,2	6,5 \pm 1,5
Συγκέντρωση ελεύθερου ενδοαίμοπεταλιακού Ca (nM)	134,9 \pm 79,2	162,5 \pm 95,0	110,2 \pm 63,5
Ενεργότητα ανταλλαγής Na-H (mmol/L ερυθρών αιμοσφαιρίων/h)	74,0 \pm 40,0	81,8 \pm 40,1	67,8 \pm 39,5

M, Mbw και Mffm, συνολικός σωματικός μεταβολισμός γλυκόζης σε απόλυτες τιμές και ομαλοποιημένος με το σωματικό βάρος και την άλιπο μάζα αντίστοιχα. MCR, MCRbw, MCRffm, μεταβολικοί ρυθμοί κάθαρσης, που προκύπτουν με διαίρεση των αντίστοιχων M-δεικτών με τη μέση συγκέντρωση γλυκόζης σταθερής κατάστασης. HbA1c: η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη.

επίπεδα της δραστηριότητας της ανταλλαγής Na^+-H^+ ($r = 0,312, p < 0,05$), καθώς σημαντική ήταν και η συσχέτιση με τη μέση 24ωρη ΔΑΠ ($r = 0,371, p < 0,001$). Όπως ήταν αναμενόμενο και η 24ωρη ΜΑΠ συσχετίστηκε σημαντικά με την ενεργότητα της ανταλλαγής ($r = 0,347, p < 0,05$). Αναλυτικότερα, η μέση ημερήσια ΣΑΠ παρουσίασε επίσης σημαντική συσχέτιση ($r = 0,342, p < 0,05$), ενώ η μέση ημερήσια ΔΑΠ ήταν ο δείκτης που συσχετίστηκε ισχυρότερα με την ενεργότητα της ανταλλαγής ($r = 0,389, p < 0,001$). Τόσο η μέση νυκτερινή ΣΑΠ, όσο και η μέση νυκτερινή ΔΑΠ συσχετίστηκαν ασθενέστερα, μη στατιστικά σημαντικά με τη δραστηριότητα της ανταλλαγής ($r = 0,152, p > 0,05$ και $r = 0,255, p > 0,05$ για τη μέση νυκτερινή ΣΑΠ και τη μέση νυκτερινή ΔΑΠ αντίστοιχα). Τέλος ο καρδιακός ρυθμός δεν συσχετίστηκε με την ενεργότητα της αντλίας (Πίν. 4, Σχ. 1).

Αντίθετα με την ΑΠ, η ΕΙ δεν εμφάνισε σημαντική συσχέτιση με τη δραστηριότητα της αντλίας Na^+-H^+ . Συγκεκριμένα κανένας από τους δείκτες της ΕΙ M, Mbw, Mffm, που προέκυψαν από το ευγλυκαιμικό clamp δεν συσχετίστηκε με την ενεργότητα της ανταλλαγής Na^+-H^+ (αναλυτικά οι συντελεστές συσχέτισης ήταν $r = 0,084, p >$

Πίνακας 4. Ο συντελεστής συσχέτισης r και το επίπεδο σημαντικότητας P μεταξύ της ενεργότητας της ανταλλαγής Na^+-H^+ και των δεικτών που προκύπτουν από την 24ωρη καταγραφή της ΑΠ καθώς και με τον καρδιακό ρυθμό.

Δείκτες αρτηριακής πίεσης	συσχέτιση (r) με την ανταλλαγή Na^+-H^+	p
24ωρη μέση ΣΑΠ	0,312	<0,05
24ωρη μέση ΔΑΠ	0,371	<0,001
24ωρη μέση ΜΑΠ	0,347	<0,05
Ημερήσια μέση ΣΑΠ	0,342	<0,05
Ημερήσια μέση ΔΑΠ	0,389	<0,001
Νυκτερινή μέση ΣΑΠ	0,152	>0,05
Νυκτερινή μέση ΔΑΠ	0,255	>0,05
24ωρος καρδιακός ρυθμός	-0,125	>0,05

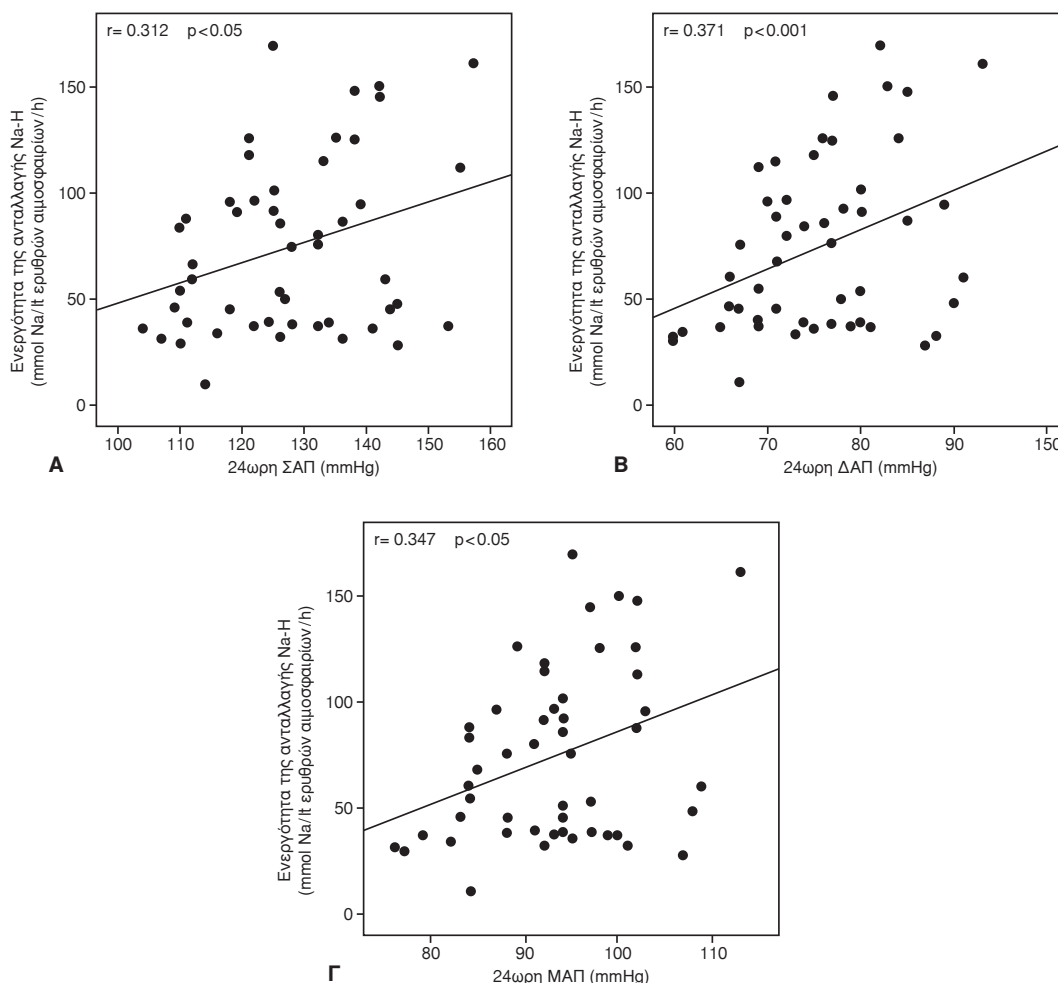
Πίνακας 5. Ο συντελεστής συσχέτισης r και το επίπεδο σημαντικότητας P μεταξύ της ενεργότητας της ανταλλαγής Na^+-H^+ και των δεικτών M, Mbw, Mffm, MCR, MCRbw, MCRffm που προκύπτουν από το clamp.

Δείκτες αρτηριακής πίεσης	συσχέτιση (r) με την ανταλλαγή Na^+-H^+	p
M (mmol*min ⁻¹)	0,084	>0,05
Mbw (μ mol*min ⁻¹ *kg ⁻¹)	0,071	>0,05
Mffm (μ mol*min ⁻¹ *kg ⁻¹)	0,094	>0,05
MCR (L*min ⁻¹)	0,080	>0,05
MCRbw (mL*min ⁻¹ *kg ⁻¹)	0,069	>0,05
MCRffm (mL*min ⁻¹ *kg ⁻¹)	0,077	>0,05

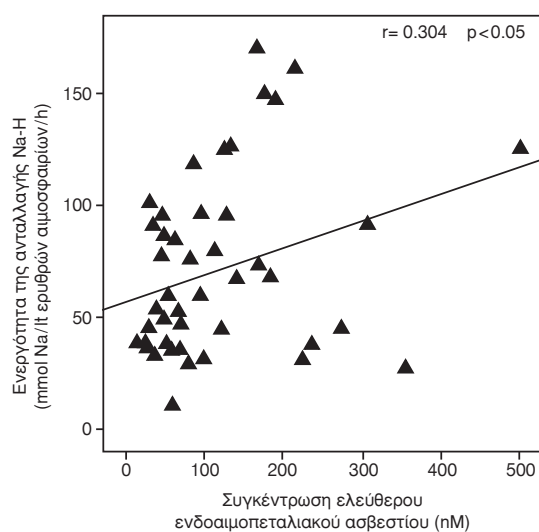
0,05, $r = 0,071, p > 0,05$, $r = 0,094, p > 0,05$ αντίστοιχα για κάθε δείκτη). Ακόμη, μη σημαντικές ήταν και οι συσχετίσεις της ενεργότητας της αντλίας και του μεταβολικού ρυθμού κάθαρσης MCR ($r = 0,080, p > 0,05$), του MCRbw ($r = 0,069, p > 0,05$) και του MCRffm ($r = 0,077, p > 0,05$) (Πίν. 5).

Σημαντική βρέθηκε η συσχέτιση της ενεργότητας της ανταλλαγής Na^+-H^+ ($r = 0,304, p < 0,05$) και της συγκέντρωσης του ενδοαίμοπεταλιακού Ca^{2+} (Σχ. 2).

Στην πολυπαραγοντική ανάλυση η 24ωρη ΣΑΠ συσχετίστηκε ισχυρά με τη συγκέντρωση του ενδοαίμοπεταλιακού Ca^{2+} ακόμη και μετά από διόρθωση για την ηλικία και το ΔΜΣ ($r = 0,287, p < 0,05$). Η προσθήκη στο παραπάνω μοντέλο και της ενεργότητας της Na^+-H^+ έδειξε ότι η παραπάνω σχέση της 24ωρης ΣΑΠ και του Ca^{2+} αποδυναμώνεται ($r = 0,232, p > 0,05$), ενώ η συσχέτιση της



Σχ. 1. Τίτλος: Συσχέτιση μεταξύ της ενεργότητας της ανταλλαγής $\text{Na}^+\text{-H}^+$ και Α. της 24ωρης ΣΑΠ, Β. 24ωρης ΔΑΠ, Γ. 24ωρης ΜΑΠ. Λεζάντα: ΣΑΠ: Συστολική Αρτηριακή Πίεση, ΔΑΠ: Διαστολική Αρτηριακή Πίεση ΜΑΠ: Μέση Αρτηριακή Πίεση.



Σχ. 2. Τίτλος: Συσχέτιση μεταξύ της ενεργότητας της ανταλλαγής $\text{Na}^+\text{-H}^+$ και του ενδοαίμοπεταλιακού Ca^{2+} .

ενεργότητας της $\text{Na}^+\text{-H}^+$ με τη ΣΑΠ παρέμεινε σημαντική ($r = 0,324, p < 0,05$). Ασθενής ήταν η συσχέτιση της 24ωρης ΔΑΠ με τη συγκέντρωση του ενδοαίμοπεταλιακού Ca^{2+} ($r = 0,186, p > 0,05$), ενώ η εφαρμογή του παραπάνω πολυπαραγοντικού μοντέλου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του παραπάνω συντελεστή συσχέτισης ($r = 0,132, p > 0,05$) και σημαντική εξάρτηση της 24ωρης ΔΑΠ από την ενεργότητα $\text{Na}^+\text{-H}^+$ ($r = 0,305, p < 0,05$). Τέλος η 24ωρη ΜΑΠ, συσχετίστηκε με τα επίπεδα του ενδοαίμοπεταλιακού Ca^{2+} ($r = 0,276, p < 0,05$) μετά από διόρθωση για την ηλικία και τον ΔΜΣ, ενώ η σημαντική συμμετοχή στο μοντέλο της δραστηριότητας της $\text{Na}^+\text{-H}^+$ ($r = 0,312, p < 0,05$) μετέβαλε τη συσχέτιση της 24ωρης ΜΑΠ και του Ca^{2+} ($r = 0,206, p > 0,05$) (Πίν. 6).

Πίνακας 6. Πολυπαραγοντικά μοντέλα με εξαρτημένη μεταβλητή την 24ωρη ΣΑΠ, 24ωρη ΔΑΠ και 24ωρη ΜΑΠ και ανεξάρτητες μεταβλητές μεταβλητές την συγγέντρωση του ενδοαμοιπεταλιακού ασβεστίου, την ηλιμία, τον ΔΜΣ πριν (Α) και μετά (Β) από την προσθήκη στην ανάλυση και της ενεργότητας της Na^+-H^+ .

	24ωρη ΣΑΠ		24ωρη ΣΑΠ		24ωρη ΔΑΠ		24ωρη ΔΑΠ		24ωρη ΜΑΠ		24ωρη ΜΑΠ	
	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p	β	p
$[\text{Ca}^{2+}]$	0,287	<0,05	0,232	>0,05	0,186	>0,05	0,132	>0,05	0,276	<0,05	0,206	<0,05
Na-H ανταλλαγή	-		0,324	<0,05	-		0,305	<0,05	-		0,312	<0,05
Ηλιμία	0,115	>0,05	0,257	>0,05	-0,372	<0,05	-0,262	>0,05	-0,113	>0,05	0,004	>0,05
ΔΜΣ	0,029	>0,05	0,170	>0,05	-0,127	>0,05	-0,058	>0,05	-0,064	>0,05	0,045	>0,05
R ²	0,102		0,186		0,172		0,240		0,099		0,148	

$[\text{Ca}^{2+}]$ = συγγέντρωση του ενδοαμοιπεταλιακού ασβεστίου.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αυτή η μελέτη είχε ως βασικό σκοπό να αξιολογήσει τη σχέση μεταξύ της δραστηριότητας της ανταλλαγής Na^+-H^+ , των επιπέδων της ΑΠ και της ΕΙ σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2. Ένας δεύτερος στόχος ήταν να αναζητήσει την πιθανή συμμετοχή των επιπέδων ενδοκυττάρου Ca^{2+} στη ρύθμιση της ανταλλαγής Na^+-H^+ .

Το κύριο εύρημά της ήταν η σημαντική θετική συσχέτιση της ενεργότητας της ανταλλαγής Na^+-H^+ με τους περισσότερους δείκτες που προέκυψαν από την 24ωρη καταγραφή της ΑΠ. Η δραστηριότητα της ανταλλαγής συσχετίστηκε επίσης θετικά με τα επίπεδα του ενδοκυττάρου Ca^{2+} αλλά όχι και με την ΕΙ.

Παρότι κατεβλήθη προσπάθεια να χρησιμοποιηθούν οι πλέον αξιόπιστες μέθοδοι για τη μέτρηση των παραπάνω παραμέτρων, (π.χ. η τεχνική του ευγλυκαιμικού υπερινσουλιναϊμικού clamp, η περιπατητική καταγραφή της ΑΠ,) η μελέτη αυτή είχε και ορισμένες ιδιαιτερότητες που πρέπει να αναφερθούν.

Στον πληθυσμό της μελέτης συμπεριλήφθηκαν και άτομα τα οποία λάμβαναν αντιυπερτασική αγωγή για τη ρύθμιση της αρτηριακής τους πίεσης η οποία δεν διακόπηκε κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Ο λόγος ήταν ότι είναι μη ηθικό να προκληθεί σε άτομα με ΣΔ απορρύθμιση της ΑΠ. Επιπλέον, υπάρχουν αποτελέσματα των Giordanno και συν που χορηγώντας σε τρεις ομάδες υπερτασικών ασθενών με ΣΔ τύπου 2 είτε έναν αναστολέα του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης, είτε έναν ανταγωνιστή των διαύλων Ca^{2+} , είτε ένα κεντρικώς δρών, παρατήρησαν μείωση τόσο της δραστηριότητας της Na^+-H^+ όσο και της Na^+-Li^+ που συνοδεύταν από αντίστοιχες μειώσεις της ΑΠ³⁹.

Περίπου 50 χρόνια πριν έγινε η πρώτη παρατήρηση ότι το ενδοκυττάριο Na ήταν αυξημένο στα κύτταρα των υπερτασικών ασθενών⁴⁰. Αργότερα τα δεδομένα αυτά αποδόθηκαν σε προβληματική ανταλλαγή ιόντων μέσω των κυτταρικών μεμβρανών όπως η μειωμένη εκροή ιόντων Na μέσω της ανταλλαγής Na^+-H^+ .

Η θέση της ανταλλαγής Na^+-H^+ στην παθοφυσιολογία της υπέρτασης έχει συζητηθεί αρκετά^{1,4,10,14,41-44}. Πρώτη ασχολήθηκε η Canessa η οποία παρατήρησε ότι υπάρχει μία δικόρυφη κατανομή σε ότι αφορά τη δραστηριότητα της Na^+-Li^+ , αναφέροντας ότι μόνο 45% των υπερτασικών

είχαν αυξημένη ενεργότητα της ανταλλαγής⁸. Ο Rosskopf συνόψισε σε μία ανασκόπηση μελέτες σε σχέση με τη δραστηριότητα της ανταλλαγής και την υπέρταση, οι περισσότερες από τις οποίες βρήκαν αυξημένα επίπεδα της ανταλλαγής στους υπερτασικούς ασθενείς σε σχέση με νορμοτασικούς¹. Υπάρχουν όμως μελέτες που κατέληξαν σε αντίθετα συμπεράσματα όπως αυτή των Sagnella και συν. όπου η ενεργότητα της ανταλλαγής σε αιμοπετάλια υπερτασικών δεν διέφερε από αυτήν των νορμοτασικών ασθενών¹³. Πολύ λιγότερα είναι τα δεδομένα που αφορούν την ενεργότητα της ανταλλαγής και την υπέρταση στους διαβητικούς ασθενείς, τα περισσότερα από τα οποία αφορούν την ανταλλαγή Na^+-Li^+ , η οποία βρίσκεται σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με υπέρταση και ΣΔ σε σχέση με αυτούς που εμφάνισαν υπέρταση χωρίς ΣΔ^{18,19}. Οι Pinkney και συν μελέτησαν την ενεργότητα της ανταλλαγής Na^+-Li^+ με 24ωρη καταγραφή πίεσης σε 66 ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 και δεν βρήκαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δεικτών της 24ωρης μέτρησης πίεσης και της δραστηριότητας της ανταλλαγής⁴⁵. Έως τώρα δεν έχει μελετηθεί η συσχέτιση της δραστηριότητας της ανταλλαγής Na^+-H^+ και των επιπέδων της 24ωρης πίεσης. Η παρούσα εργασία καλύπτει αυτήν τη γνώση βρίσκοντας σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ της δραστηριότητας της ανταλλαγής και του ύψους της 24ωρης πίεσης.

Πολλές μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι η ενεργότητα της Na^+-H^+ ανταλλαγής αυξάνεται σημαντικά με την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ινσουλίνης^{23,46,47}. Παρόμοια και στις περισσότερες *in vivo* μελέτες τα επίπεδα της ινσουλίνης του πλάσματος και η δραστηριότητα της ανταλλαγής συσχετίστηκαν θετικά. Οι Masai και συν βρήκαν ότι η αύξηση της ενεργότητας της ανταλλαγής Na^+-Li^+ , συμβάδιζε με την αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης σε επίμυες που ανέπτυξαν υπερινσουλιναϊμία μετά από χορήγηση φρουκτόζης²². Οι Romero και συν. ανέφεραν ότι τα επίπεδα ινσουλίνης του πλάσματος είχαν ισχυρή θετική συσχέτιση με τα επίπεδα της δραστηριότητας της ανταλλαγής σε ασθενείς με υπέρταση¹¹. Οι Canessa και συν. ανέφεραν σημαντικά αυξημένη ενεργότητα τόσο της Na^+-H^+ όσο και της Na^+-Li^+ σε υπερτασικούς ασθενείς με αντίσταση στην ινσουλίνη σε σχέση με υπερτασικούς ασθενείς ινσουλινοευσθητικούς⁷. Σε παρόμοιο συμπέρασμα κατέληξαν οι Herlitz και συν που βρήκαν σημαντική συσχέ-

τιση μεταξύ των επιπέδων της ινσουλινοευσθησίας και της ενεργότητας της Na^+-Li^+ με ήπια ιδιοπαθή υπέρταση⁴⁸. Αντίθετα σε άλλη μελέτη οι Giordanno και συν παρατήρησαν ότι ενώ υπήρχε θετική συσχέτιση μεταξύ της ανταλλαγής Na^+-Li^+ και της αντίστασης στην ινσουλίνη δεν συνέβη το ίδιο και με τη δραστηριότητα της ανταλλαγής Na^+-H^+ ³⁹.

Στην παρούσα μελέτη η ενεργότητα της ανταλλαγής Na^+-H^+ δεν συσχετίστηκε με κανέναν από τους δείκτες ΕΙ του ευγλυκαιμικού clamp, γεγονός που αποδυναμώνει τη θέση της αύξησης της ενεργότητας της παραπάνω ανταλλαγής ως ενδιάμεσο φαινόμενο στην ανάπτυξη της ινσουλινικής αντίστασης.

Τέλος, στους ασθενείς μας φάνηκε μία σημαντική θετική συσχέτιση της ενεργότητας της ανταλλαγής Na^+-H^+ και των επιπέδων του ενδοαίμοπεταλιακού Ca^{2+} . Επίσης η παρουσία στα πολυπαραγοντικά μοντέλα της δραστηριότητας της ανταλλαγής αποδυνάμωσε τις σημαντικές σχέσεις των δεικτών της 24ωρης ΑΠ και ενδοαίμοπεταλιακής συγκέντρωσης Ca^{2+} . Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν υπέρ ενός μηχανισμού αλληλεπίδρασης με τον οποίον η ανταλλαγή Na^+-H^+ και το ενδοκυττάριο Ca^{2+} επηρεάζουν την ΑΠ. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με πρόσφατες υποθέσεις ερευνητών που υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση της Na^+-H^+ ανταλλαγής στους υπερτασικούς είναι επακόλουθο της αυξημένης συγκέντρωσης ενδοκυττάρου Ca^{2+} ^{15,41,49-51}. Είναι αποδεκτή πλέον γνώση ότι τα κύτταρα των υπερτασικών ασθενών έχουν υψηλές συγκεντρώσεις Ca^{2+} ^{52,53}. Η ενεργοποίηση της δραστηριότητας της ανταλλαγής Na^+-H^+ από τα αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάρου Ca^{2+} είναι αποτέλεσμα πολλών μηχανισμών που δεν έχουν επιβεβαιωθεί ακόμη. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η ενεργοποίηση του συμπλέγματος Ca^{2+} -καλμοδουλίνης¹⁵, η ενεργοποίηση των G πρωτεϊνών κ.α. Ο ακριβής μηχανισμός της ενεργοποίησης της ανταλλαγής από το αυξημένο ενδοκυττάριο Ca^{2+} μένει να διερευνηθεί σε περαιτέρω μελέτες.

SUMMARY

Pikilidou MI, Befani CH.C, Sarafidis PA, Koliakos GG, Tziolas IM, Kazakos KA, Zebekakis PE, Hadjistavri LS, Hitoglou-Makedou AD, Yovos IG, Lasaridis AN. The relation of sodium-hydrogen exchanger activity with 24h blood pressure, insulin

resistance and intracellular calcium in patients with type 2 diabetes. *Arterial Hypertension* 2007; 16: 128-139.

Aim: The Na⁺-H⁺ consists, according to some, an intermediate phenotype for the expression of hypertension and insulin resistance. Its enhanced activity in hypertensive populations has previously been studied, while few evidence exists regarding the activity of the exchange, blood pressure and insulin sensitivity in diabetic patients. It has been proposed that calcium plays a pivotal role in the activation of the exchange in cells of both hypertensive and diabetic patients. The aim of the present study was to investigate the relation of Na⁺-H⁺ exchange with 24h blood pressure, intraplatelet calcium and insulin resistance in patient with type 2 diabetes. **Subjects and methods:** Fifty two patients were evaluated with type 2 diabetes, under treatment with glibenclamide, and hypertension. Patients underwent a 24h blood pressure measurement and measurement of their insulin resistance by the use of hyperinsulinemic euglycemic clamp. Also the Na⁺-H⁺ activity in erythrocytes and intraplatelet Ca²⁺ concentration by the use of a fluorescent indicator (fura-2) was defined. **Results:** Significant correlations were observed between the Na⁺-H⁺ activity and all the indices of 24h blood pressure measurement. The correlation coefficients were as follows r=0.312, p<0.05, r=0.371, p<0.001, r=0.347, p<0.05 for 24h mean systolic arterial pressure (SBP), 24h mean diastolic pressure (DBP) and 24h mean arterial (MAP) pressure respectively. On the contrary, none of the indices of insulin resistance that derived from the clamp technique correlated with Na⁺-H⁺ activity while intraplatelet Ca²⁺ levels demonstrated a significant positive correlation with Na⁺-H⁺ activity (r=0.304, p<0.05). Finally 24h SBP and 24h MAP significantly correlated with intraplatelet Ca²⁺ concentration (r=0.287 p<0.05 and r=0.276, p<0.05 respectively) whereas presence of Na⁺-H⁺ activity in the analysis attenuated the aforementioned correlation (r=0.232 p>0.05 and r=0.206, p>0.05 for 24h SBP and 24h MAP respectively). **Conclusions:** 24h blood pressure depends on Na⁺-H⁺ activity in diabetic patients while a raise in intracellular Ca²⁺ is a potential mechanism for this relationship.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Roszkopf D, Dusing R, Siffert W. Membrane sodium-proton exchange and primary hypertension. *Hypertension* 1993; 21: 607-617.
- Soleimani M, Singh G. Physiologic and molecular aspects of the Na⁺/H⁺ exchangers in health and disease processes. *J Investig Med* 1995; 43: 419-430.
- Wakabayashi S, Sardet C, Fafournoux P, et al. Structure function of the growth factor-activatable Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1). *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1992; 119: 157-186.
- Davies JE, Ng LL, Ameen M, Syme PD, Aronson JK. Evidence for altered Na⁺/H⁺ antiport activity in cultured skeletal muscle cells and vascular smooth muscle cells from the spontaneously hypertensive rat. *Clin Sci* 1991; 80: 509-516.
- Ng LL, Fennell DA, Dudley C. Kinetics of the human leucocyte Na⁺/H⁺ antiport in essential hypertension. *J Hypertens* 1990; 8: 533-537.
- Tokudome G, Tomonari H, Gardner JP, et al. Variations in the apparent pH set point for activation of platelet Na-H antiport. *Hypertension* 1990; 16: 180-189.
- Canessa M, Falkner B, Hulman S. Red blood cell sodium-proton exchange in hypertensive blacks with insulin-resistant glucose disposal. *Hypertension* 1993; 22: 204-213.
- Canessa M, Adragna N, Solomon HS. Increased sodium-lithium countertransport in red cells of patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1980; 302: 772-776.
- Canessa M. Kinetic properties of Na⁺/H⁺ exchange and Li⁺/Na⁺, Na⁺/Na⁺, and Na⁺/Li⁺ exchanges of human red cells. *Methods in Enzymol* 1989; 173: 176-191.
- Delva P, Pastori C, Degan M, et al. Erythrocyte Na⁺/H⁺ exchanger kinetics and Na⁺-Li⁺ countertransport activity in essential hypertensive patients. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 64-70.
- Romero JR, Rivera A, Monari A, Ceolotto G, Semplicini A, Conlin PR. Increased red cell sodium-lithium countertransport and lymphocyte cytosolic calcium are separate phenotypes in patients with essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2002; 16: 353-358.
- Roszkopf D, Fromter E, Siffert W. Hypertensive sodium-proton exchanger phenotype persists in immortalized lymphoblasts from essential hypertensive patients. A cell culture model for human hypertension. *J Clin Invest* 1993; 92: 2553-2559.
- Sagnella GA, Miller MA, Khong TK, MacGregor GA. Platelet sodium/hydrogen exchanger activity in normotensives and hypertensives. *Clin Chim Acta* 1999; 283: 105-118.
- Seniplicini A, Sartori M, Ceolotto G, Calo LA. The Li⁺/Na⁺ exchange in hypertension. *Front Biosci* 2003; 8: d912-d929.
- Siffert W, Dusing R. Sodium-proton exchange and primary hypertension: An update. *Hypertension* 1995; 26: 649-655.
- Turner ST, Sing CF. Erythrocyte sodium transport and the probability of having hypertension. *J Hypertens* 1996; 14: 829-837.
- Canessa M, Morgan K, Goldszer R, Moore TJ, Spalvins A. Kinetic abnormalities of the red blood cell sodium-proton exchange in hypertensive patients. *Hypertension* 1991; 17: 340-348.

18. Johnson BAB, Sowers JR, Zemel PC, Luft FC, Zemel MB. Increased sodium – lithium countertransport in black non – insulin – dependent diabetic hypertensives. *Am J Hypertens* 1990; 3: 563-565.
19. Gall MA, Rossing P, Jensen JS, Funder J, Parving HH. Red cell Na⁺/Li⁺ countertransport in non-insulin-dependent diabetics with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1991; 39: 135-140.
20. Dolan E, Stanton A, Thijs L, et al. Superiority of ambulatory over clinic blood pressure measurement in predicting mortality: The Dublin outcome study. *Hypertension* 2005; 46: 156-161.
21. Stenohjem AE, Os I. Reproducibility of blood pressure variability, white-coat effect and dipping pattern in untreated, uncomplicated and newly diagnosed essential hypertension. *Blood Pressure* 2004; 13: 214-224.
22. Masai M, Fujioka Y, Fujiwara M, et al. Activation of Na⁺/H⁺ exchanger is associated with hyperinsulinemia in borderline hypertensive rats. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 193-200.
23. Kaloyianni M, Bourikas D, Koliakos G. The effect of insulin on Na⁺/H⁺ antiport activity of obese and normal subjects erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2001; 11: 253-258.
24. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979; 237: 214-223.
25. Ferrannini E, Mari A. How to measure insulin sensitivity. *J Hypertens* 1998; 16: 895-906.
26. Sarafidis PA, Lasaridis AN, Nilsson PM, et al. Ambulatory blood pressure reduction after rosiglitazone treatment in patients with type 2 diabetes and hypertension correlates with insulin sensitivity increase. *J Hypertens* 2004; 22: 1769-1777.
27. McGuire EAH, Helderma JH, Tobin JD, Andres R, Bergman RN. Effects of arterial versus venous sampling on analysis of glucose kinetics in man. *J Appl Physiol* 1976; 41: 565-573.
28. Oshima T, Young EW, Bukoski RD, McCarron DA. Abnormal calcium handling by platelets of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1990; 15: 606-611.
29. Yoshimura M, Oshima T, Matsuura H, et al. Assessment of platelet cytosolic concentration of free magnesium in healthy subjects. *J Lab Clin Med* 1995; 125: 743-747.
30. Yoshimura M, Oshima T, Matsuura H, et al. Effect of the transmembrane gradient of magnesium and sodium on the regulation of cytosolic free magnesium concentration in human platelets. *Clin Sci* 1995; 89: 293-298.
31. Yoshimura M, Oshima T, Hiraga H, et al. Increased cytosolic free Mg²⁺ and Ca²⁺ in platelets of patients with vasospastic angina. *Am J Physiol* 1998; 274.
32. Hiraga H, Oshima T, Yoshimura M, Matsuura H, Kajiyama G. Abnormal platelet Ca²⁺ handling accompanied by increased cytosolic free Mg²⁺ in essential hypertension. *Am J Physiol* 1998; 275.
33. Grynkiwicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260: 3440-3450.
34. Amoore JN, Dewar D, Gough K, Padfield PL. Do Space-Labs ambulatory non-invasive blood pressure recorders measure blood pressure consistently over several years use? *Blood Press Monit* 2005; 10: 51-56.
35. Baumgart P, Kamp J. Accuracy of the SpaceLabs Medical 90217 ambulatory blood pressure monitor. *Blood Press Monit* 1998; 3: 303-307.
36. O'Brien E, Waeber B, Parati G, Staessen J, Myers MG. Blood pressure measuring devices: recommendations of the European Society of Hypertension. *Bmj* 2001; 322: 531-536.
37. Parati G, Mendis S, Abegunde D, et al. Recommendations for blood pressure measuring devices for office/clinic use in low resource settings. *Blood Press Monit* 2005; 10: 3-10.
38. O'Brien E, Asmar R, Beilin L, et al. European Society of Hypertension recommendations for conventional, ambulatory and home blood pressure measurement. *J Hypertens* 2003; 21: 821-848.
39. Giordano M, Castellino P, Solini A, Canessa ML, DeFronzo RA. Na⁺/Li⁺ and Na⁺/H⁺ countertransport activity in hypertensive non- insulin-dependent diabetic patients: Role of insulin resistance and antihypertensive treatment. *Metabolism* 1997; 46: 1316-1323.
40. Tobian L, Binion JT. Tissue cations and water in essential hypertension. *Circulation* 1952; 754-758.
41. Aviv A. Can the Na⁺/H⁺ exchange serve as an intermediate phenotype for essential hypertension? *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 566-567.
42. Reeves JP, Aviv A. Na⁽⁺⁾-H⁺ exchange and essential hypertension. A new approach. *Hypertension* 1995; 25: 978-980.
43. Strazzullo P, Cappuccio FP, Trevisan M, et al. The relationship of erythrocyte sodium-lithium countertransport to blood pressure and metabolic abnormalities in a sample of untreated middle-aged male workers. *J Hypertens* 1993; 11: 815-822.
44. Strazzullo P, Siani A, Cappuccio FP, et al. Red blood cell sodium-lithium countertransport and risk of future hypertension: The olivetti prospective heart study. *Hypertension* 1998; 31: 1284-1289.
45. Pinkney JH, Foyle WJ, Denver AE, Mohamed-Ali V, McKinlay S, Yudkin JS. The relationship of urinary albumin excretion rate to ambulatory blood pressure and erythrocyte sodium-lithium countertransport in NIDDM. *Diabetologia* 1995; 38: 356-362.
46. Moore RD. Stimulation of Na: H exchange by insulin. *Biophys J* 1981; 33: 203-210.
47. Pontremoli R, Zerbini G, Rivera A, Canessa M. Insulin activation of red blood cell Na⁺/H⁺ exchange decreases the affinity of sodium sites. *Kidney Int* 1994; 46: 365-375.
48. Herlitz H, Bokemark L, Alenahg EL, Wikstrand J, Fagerberg B. Sodium/lithium countertransport, insulin resistance, insulin peptides and microalbuminuria in cli-

- nically healthy 58-year-old men. *Clin Sci* 2001; 100: 443-449.
49. *Aviv A.* The roles of cell Ca^{2+} , protein kinase C and the $\text{Na}^{(+)}\text{-H}^{+}$ antiport in the development of hypertension and insulin resistance. *J Am Soc Nephrol* 1992; 3: 1049-1063.
50. *Aviv A.* Recent advances in cellular Ca^{2+} homeostasis: implications to altered regulations of cellular Ca^{2+} and $\text{Na}^{(+)}\text{-H}^{+}$ exchange in essential hypertension. *Curr Opin Cardiol* 1996; 11: 477-482.
51. *Aviv A.* The links between cellular Ca^{2+} and $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ exchange in the pathophysiology of essential hypertension. *Am J Hypertens* 1996; 9: 703-707.
52. *Erne P, Burgisser E, Bolli P, Ji BH, Buhler FR.* Free calcium concentration in platelets closely relates to blood pressure in normal and essentially hypertensive subjects. *Hypertension* 1984; 6: 166-169.
53. *Lechi C, Sinigaglia D, Corsato M, Covi G, Arosio E, Lechi A.* Intracellular free Ca^{2+} in platelets of essential hypertensive patients. Lack of correlation with clinical and laboratory data. *J Hum Hypertens* 1988; 2: 49-52.