

**Το σύστημα αντιμεταφοράς Na^+/Li^+
στα ερυθρά αιμοσφαίρια
ινσουλινοεξαρτώμενων διαβητικών γυναικών
και η σχέση του με την προεκλαμψία**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Της

ΣΑΡΙΚΑ ΕΛΕΝΗΣ - ΛΗΔΑΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΥ

NATIONAL AND KAPODESTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF SCIENCES – DEPARTEMENT OF BIOLOGY
SECTION OF GENETICS AND BIOTECHNOLOGY

**Erythrocyte Na⁺-Li⁺ counter-transport
activity in insulin dependent diabetic
women with preexisting preeclampsia**

PhD THESIS

of

SARIKA HELEN-LEDA

BIOLOGIST

ATHENS 2013

Στη μνήμη των γονιών μου

Στην Ντίτα, στη Νίκη

Στον Γιώργο

Σύμφωνα με το άρθρο 202 του Νόμου 5343/1932, «Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα».

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Θεοχάρης Παταργιάς (επιβλέπων)

Ομότιμος Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

2. Μιλτιάδης Τύπας

Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

3. Εμμανουήλ Φραγκούλης

Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α. – Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Θεοχάρης Παταργιάς (επιβλέπων)

Ομότιμος Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α., Τμήμα Βιολογίας.

2. Μιλτιάδης Τύπας

Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α., Τμήμα Βιολογίας.

3. Εμμανουήλ Φραγκούλης

Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α. – Πρόεδρος Τμήματος Βιολογίας

4. Βασιλική Αλεπόρου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α., Τμήμα Βιολογίας.

5. Σοφία Κουγιανού-Κουτσούκου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α., Τμήμα Βιολογίας.

6. Ισιδώρα Παπασιδέρη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α., Τμήμα Βιολογίας.

7. Ειρήνη Γράψα

Επίκουρη Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α., Ιατρικής Σχολής, Τμήμα Παθολογίας.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ – ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ
(που προέκυψαν από την μελέτη)

A. Δημοσίευση σε διεθνές περιοδικό

Helen-Leda Sarica, Helen Anastasiou, Maria-Rea Charitopoulou, Maria Karamaliki, Eirini Grapsa. Erythrocyte Na⁺-Li⁺ counter-transport activity and digoxin-like substances in insulin dependent diabetic women with preexisting preeclampsia. **2011** *Diab Res Clin Pract*; 94:249-254.

B. Ανακοινώσεις σε συνέδρια

1. **Λ. Σαρίκα**, Π.Σ. Κοντέσης, Α. Θωμά, Ρ. Χαριτοπούλου, Μ. Καραμαλίκη, Ν. Ζερεφός, Α. Σουβατζόγλου, **Ε. Φραγκούλης**. Το Σύστημα Αντιμεταφοράς Na⁺/Li⁺ στα Ερυθρά Αιμοσφαίρια Ινσουλινοεξαρτώμενων Διαβητικών Γυναικών κατά την Κύηση και η σχέση του με την Προεκλαμψία. 49^η Συνεδρία της Ελληνικής Βιοχημικής Βιοφυσικής Εταιρείας. Αμφιθ. Ιατρικής Σχολής Ηρακλείου Κρήτης, 22-23 Μαΐου **1998**.
2. Π.Σ. Κοντέσης, **Λ. Σαρίκα**, Α. Θωμά. Σύστημα αντιμεταφοράς Na⁺-Li⁺ και ενδογενείς ουσίες παρόμοιες με διγοξίνη σε διαβητικές και μη-διαβητικές γυναίκες με αρτηριακή υπέρταση κατά την κύηση και στους γονείς τους. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας 5^{ος} **1996**.
3. P.S. Kontessis, **L. Sarika**, A. Thoma, H. Anastassiou, L. Giannakou, R. Charitopoulou, N. Zerefos, A. Souvatzoglou. Sodium-Lithium Countertransport Activity (Na⁺/Li⁺ CT) and Digoxin Like substances (DLIS) in Insulin Dependent (IDDM) and Non-Diabetic Women with Pregnancy Induced Hypertension (P.I.H.) and their Parents. *XXXIInd Congress of the European Renal Association, European Dialysis and Transplant Association, June 11-14, 1995. Abstract.*
4. P.S. Kontessis, **L. Sarika**, A. Thoma, H. Anastassiou, L. Giannakou, R. Charitopoulou, N. Zerefos, A. Souvatzoglou. Sodium-Lithium Countertransport Activity (Na⁺/Li⁺ CT) and Digoxin Like substances (DLIS) in Insulin Dependent (IDDM) and Non Diabetic Women with Pregnancy Induced Hypertension (P.I.H.) and their Parents. *XIII International Congress of Nephrology (Madrid, Spain, July 2-6), 1995.*
5. Π.Σ. Κοντέσης, **Λ. Σαρίκα**, Π. Ραπίνι, Α. Θωμά. Σύστημα μεταφοράς Na⁺/Li⁺ και ενδοκυττάριο Na⁺ σε διαβητικές γυναίκες με αρτηριακή πίεση κατά την κύηση. 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αρτηριακής Υπέρτασης **1993** και 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας **1994**.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα πειράματα αυτής της διατριβής διεξήχθησαν κατά το μεγαλύτερο μέρος τους, στο εργαστήριο του Α' Ενδοκρινολογικού Τμήματος του ΓΝΑ «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ», με τη χρήση όλου του σύγχρονου εξοπλισμού του. Οι προσδιορισμοί των ιόντων της μελέτης έγιναν στο Βιοχημικό Τμήμα του ΓΝΑ «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ», όπου βρισκόταν ο απαραίτητος εξοπλισμός, υπό τη διεύθυνση της τ. Διευθύντριας Κας Ιωάννας Καρλή, την οποία και ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη δυνατότητα αυτή που μου παρείχε.

Θα ήθελα να μπορούσα να ευχαριστήσω δια ζώσης τον Παναγιώτη Κοντέση, ο οποίος είχε την ιδέα και μου εμπιστεύτηκε το θέμα της διατριβής αυτής, παρέχοντας μου αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια. Δυστυχώς έφυγε νωρίς και δεν είναι πια μαζί μας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους Καθηγητές μου της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής Κυρίου Θεοχάρη Παταργιά, Εμμανουήλ Φραγκούλη και Μιλτιάδη Τύπα, για την πολύτιμη υποστήριξη τους σ' αυτήν μου την προσπάθεια.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ, οφείλω, στην Επίκουρη Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής Κα Γράβα για τη συμμετοχή της στην επιστημονική επεξεργασία και δημοσίευση των αποτελεσμάτων καθώς και την ευρύτερη συνολική της βοήθεια.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες, στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμ. Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α Κα Κουγιανού-Κουτσούκου Σοφία, για την εμπύχωση και τις πολύτιμες συμβουλές της.

Ευχαριστώ πολύ τις Αναπληρώτριες Καθηγήτριες του Τμ. Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α Κυρίες Βασιλική Αλεπόρου και Ισιδώρα Παπασιδέρη για τη συμμετοχή τους στην επταμελή εξεταστική επιτροπή της διατριβής μου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τις συναδέλφους στο Α' Ενδοκρινολογικό Τμήμα, τη βιολόγο Μαρία-Ρέα Χαριτοπούλου, τη τεχνολόγο Μαρία Καραμαλίκη καθώς και τη γιατρό ενδοκρινολόγο Διαμαντίνη Θωμά, για την πολύτιμη συμβολή τους στο τεχνικό μέρος της μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη τον φίλο Παύλο Μαύρο, Καθηγητή του Τμ. Χημείας του Α.Π.Θ., για την έμπρακτη βοήθειά του και την πιστή απόδοση των εικόνων του Γενικού Μέρους.

Και βεβαίως, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον τ. Διευθυντή μου, Καθηγητή Κο Σουβατζόγλου που μου έδωσε την δυνατότητα να υλοποιήσω αυτό το εγχείρημα.

Τέλος ευχαριστώ τον σύντροφο μου για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξη του στην προσπάθεια αυτή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- ΠΡΟΛΟΓΟΣ
- ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ
- ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

14

1.	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΛΑΤΟΣ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ ΚΑΙ Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΥΠΕΡΤΑΣΗ	15
2.	ΥΔΑΤΙΚΗ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ.....	19
	2.1. Ο ρόλος και η φυσιολογία του Na^+	20
3.	ΥΠΕΡΤΑΣΗ	21
	3.1. Νάτριο και Υπέρταση	24
4.	ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ Ή «ΚΑΝΑΛΙΑ» ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΙΟΝΤΩΝ ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ	25
	4.1. Αντλία Na^+ (Na^+/K^+ ΑΤΡάση)	26
	4.1.1. Χημική δομή της Na^+/K^+ ΑΤΡάση	27
	4.1.2. Φυσιολογικές δράσεις της Na^+/K^+ ΑΤΡάσης	28
	4.1.3. Αναστολείς της Na^+/K^+ ΑΤΡάσης (DLIS ή ενδογενής ουαμπαΐνη)	30
	4.2. Σύστημα συμμεταφοράς Na^+/K^+	32
	4.3. Αντλία Ca^{++} (Ca^{++} ΑΤΡάση) και το Σύστημα μεταφοράς $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$	33
	4.4. Το σύστημα ανταλλαγής $\text{Na}^+ - \text{H}^+$	35
	4.4.1. Δομή και λειτουργία των ισομορφών του NHE	37
	4.5. Το σύστημα αντιμεταφοράς Na^+/Li^+ (ΣΑ Na^+/Li^+)	38
	4.6. Ομοιότητες και διαφορές μεταξύ του ΣΑ Na^+/Li^+ και του συστήματος ανταλλαγής $\text{Na}^+ - \text{H}^+$	41
	4.6.1. Το σύστημα αντιμεταφοράς Na^+/Li^+ (ΣΑ Na^+/Li^+) και υπέρταση	42
	4.6.2. Το σύστημα αντιμεταφοράς Na^+/Li^+ (ΣΑ Na^+/Li^+) και διαβήτης	43
5.	ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ	45
	5.1. Παθοφυσιολογία της προεκκλαμψίας	45
	5.2. Προεκκλαμψία και σακχαρώδης διαβήτης	46
	5.3. Προεκκλαμψία και ΣΑ Na^+/Li^+	47

5.4.	Προεκλαμψία και DLIS	47
6.	ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΙΔΙΟΠΑΘΟΥΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ	48
6.1.	Γονίδια της υπέρτασης	49
6.2.	Οι σύγχρονες στρατηγικές που ακολουθούνται στην γενετική ανάλυση	53

ΙΙ. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **58**

A.	ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	59
-----------	-----------------------------	----

B.	ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	60
-----------	---------------------------------	----

Γ.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	63
-----------	--------------------------------	----

1.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΑΝΤΙΜΕΤΑΦΟΡΑΣ Na^+/Li^+ ΣΕ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΑ	63
----	--	----

1.1.	Απομόνωση ερυθρών	64
------	-------------------------	----

1.2.	Έκπλυση ερυθρών	64
------	-----------------------	----

1.3.	Φόρτιση ερυθρών με Li	65
------	-----------------------------	----

1.4.	Έκπλυση ερυθρών μετά την φόρτιση	65
------	--	----

1.5.	Κινητική του ΣΑ Na^+/Li^+	66
------	---	----

1.6.	Προσδιορισμός ενδοκυττάρων συγκεντρώσεων Na^+ , K^+	66
------	---	----

1.7.	Προσδιορισμός συγκεντρώσεων Li^+	67
------	---	----

1.8.	Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ΣΑ Na^+/Li^+	68
------	---	----

2.	ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ DLIS	69
----	----------------------------------	----

2.1.	Προετοιμασία δειγμάτων. Εκχύλιση πλάσματος	69
------	--	----

2.2.	Ραδιοανοσολογική μέθοδος προσδιορισμού (RIA) DLIS με ^{125}I -Digoxin και μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον της διγοξίνης	70
------	--	----

2.3.	Βιοχημικοί προσδιορισμοί	71
------	--------------------------------	----

3.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	72
----	--------------------------	----

Δ.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
-----------	---------------------------	----

1.	ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ	73
----	--	----

2.	ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ	74
----	--	----

3.	ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΟΥ ΣΑ Na^+/Li^+ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΙΟΝΤΩΝ	75
----	--	----

3.1.	Η δραστηριότητα του Σ.Α Na^+/Li^+	75
------	---	----

3.2.	Η συγκέντρωση του ενδοκυττάρου Na^+	76
------	--	----

4.	ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ DLIS	76
----	------------------------------	----

5.	ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ Σ.Α. Na^+/Li^+ ΚΑΙ DLIS	78
----	---	----

6.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ	78
-	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	81
-	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	86
	1. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	86
	2. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	87
-	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	88
-	SUMMARY	90
-	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	91
-	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ – Δημοσίευση εργασίας	102

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η υπέρταση αποτελεί ένα από τα συχνότερα νοσήματα του πολιτισμού μας. Διαχωρίζεται στην πρωτοπαθή ή ιδιοπαθή και στη δευτεροπαθή υπέρταση στην οποία και υπάρχει υποκείμενο νόσημα.

Η ιδιοπαθής υπέρταση είναι μια πολυπαραγοντική διαταραχή με γενετικό αλλά και περιβαλλοντικό υπόστρωμα, η παθογένεια της οποίας δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως.

Η πρόσληψη αυξημένων ποσοτήτων άλατος δια της τροφής έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη της ιδιοπαθούς υπέρτασης. Έχει παρατηρηθεί ότι πληθυσμοί με μειωμένη πρόσληψη άλατος έχουν μειωμένη μέση αρτηριακή πίεση και μειωμένα ποσοστά ατόμων με υπέρταση (Frisoli *et al* 2012). Παράλληλες μελέτες έδειξαν ότι δεν αναπτύσσουν υπέρταση όλοι όσοι καταναλώνουν περίσσεια άλατος. Από τα αποτελέσματα αυτά διαφαίνεται η ύπαρξη ευαισθησίας στο νάτριο σε ορισμένα άτομα, ονομαζόμενη «νατριοευαισθησία» και η οποία καθορίζεται γενετικά (Weinberger 1996).

Το νάτριο αποτελεί τον κύριο ηλεκτρολύτη του εξωκυττάριου χώρου, καθορίζει τον όγκο και την ωσμωτικότητα του. Για τον λόγο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στο υδατικό ισοζύγιο του οργανισμού. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μεταφορά ιόντων δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Μεταβολές του όγκου του εξωκυττάριου χώρου μπορούν να επηρεάσουν την αρτηριακή πίεση. Η περιεκτικότητα ενός κυττάρου σε νάτριο προσδιορίζεται από τον ρυθμό εισόδου του σ' αυτό και από την ικανότητα της αντλίας νατρίου να το αποβάλλει. Η μεταφορά των ιόντων και του νερού διαμέσου των βιολογικών μεμβρανών διευκολύνεται από μια ομάδα πρωτεϊνών γνωστών και σαν «κανάλια» μεταφοράς που βρίσκονται στην μεμβράνη των κυττάρων. Αυτά είναι συνήθως μακρομοριακές διαυλικές πρωτεΐνες στη στιβάδα λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης. Υπάρχουν πολλά «κανάλια» για τη μεταφορά νατρίου. Τέτοια είναι η αντλία Na^+/K^+ με την Na^+/K^+ ATPάση, το σύστημα συμμεταφοράς Na^+-K^+ , το σύστημα ανταλλαγής Na^+-H^+ , το σύστημα αντιμεταφοράς Na^+/Li^+ (ΣΑ Na^+/Li^+), η ανταλλαγή $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, η αντλία ασβεστίου με την Ca^{++} ATPάση καθώς και η παθητική διαπερατότητα ή διάχυση ιόντων.

Αντλία Νατρίου/Καλίου με την Na^+/K^+ ATPάση. Η εξωκυττάρια συγκέντρωση νατρίου είναι πολύ υψηλότερη (140 mmol) από την ενδοκυττάρια που

είναι μόλις 10 mmol. Η αντλία Na^+/K^+ είναι ο κύριος μηχανισμός που διατηρεί τη μεγάλη αυτή διαφορά των συγκεντρώσεων του Na^+ μεταξύ των δύο διαμερισμάτων του κυττάρου και η οποία είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση και τη λειτουργία του. Λειτουργεί δε, με τη δράση ενός ενζύμου της Na^+/K^+ ATPάσης και με την κατανάλωση ενέργειας που προέρχεται από την υδρόλυση μιας αδενοσινωτριφωσφατάσης (ATP). Με το «κανάλι» αυτό μεταφέρονται 3 ιόντα Na^+ από τον ενδοκυττάριο προς τον εξωκυττάριο χώρο με ταυτόχρονη μετακίνηση 2 ιόντων K^+ προς το εσωτερικό του κυττάρου. Στην υπέρταση παρατηρείται μειωμένη δραστηριότητα της αντλίας αυτής. Επιπλέον, η δραστηριότητα της Na^+/K^+ ATPάσης βρέθηκε σημαντικά μειωμένη σε διαβητικούς ασθενείς με υπέρταση, ενώ υπάρχουν αναφορές οι οποίες δείχνουν ότι η μείωση της δραστηριότητάς της είναι πιθανόν να σχετίζεται με οικογενή προδιάθεση για υπέρταση.

Το ΣΑ Na^+/Li^+ είναι ένα σύστημα ανταλλαγής ιόντων Na^+ με ιόντα Li^+ σε αντίθετη μεταξύ τους κατεύθυνση, εφ' όσον υπάρχει νάτριο στον εξωκυττάριο χώρο. Η δραστηριότητα του συστήματος αντιμεταφοράς Na^+/Li^+ στα ερυθροκύτταρα (ΣΑ Na^+/Li^+) είναι ανθεκτική στην ουαμπαΐνη, η οποία αναστέλλει την αντλία Na^+ , και στην αμιλορίδη η οποία αναστέλλει την ανταλλαγή Na^+/H^+ . Η δραστηριότητά του βρίσκεται αυξημένη σε ασθενείς με ιδιοπαθή υπέρταση και ιδιαίτερα σε ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό υπέρτασης (Canessa *et al* 1980, Lau *et al* 1992, Kosmidou *et al* 2008). Το ΣΑ Na^+/Li^+ βρέθηκε αυξημένο επίσης σε ισουλινοεξαρτώμενους ασθενείς με μικροαλβουμινουρία ή πρωτεϊνουρία ενώ αναφέρθηκε αυξημένο και σε γονείς διαβητικών ασθενών με νεφροπάθεια (Jones *et al* 1990). Μια ισχυρή γενετική επίδραση φαίνεται ότι επεμβαίνει και μεταβάλλει τη μεταφορά κατιόντων Na^+ σε άτομα με υπέρταση καθώς και στα παιδιά τους (Mazzanti *et al* 1991). Η δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ αυξάνεται στη φυσιολογική κύηση και επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα μετά τον τοκετό (Rutherford *et al* 1992). Εντούτοις, άλλοι ερευνητές δεν βρήκαν συσχέτιση της δραστηριότητας του ΣΑ Na^+/Li^+ με την προεκλαμψία (Lologlu *et al* 1993). Η δραστηριότητα της Na^+/K^+ ATPάσης βρέθηκε σημαντικά μειωμένη σε διαβητικούς ασθενείς με υπέρταση (Poston *et al* 1981) και η μείωση αυτή είναι πιθανόν να σχετίζεται με οικογενή προδιάθεση για αρτηριακή υπέρταση (Canessa *et al* 1984).

Ενδογενείς αναστολείς της Na^+/K^+ ATPάσης ή DLIS (Digoxin Like Immunoreactive Substances). Έχει αναφερθεί πως ενδογενείς ουσίες με ιδιότητες διγοξίνης (digoxin-like immunoreactive substances, DLIS) συνδεδεμένες με την

Na^+/K^+ ATPάση αναστέλλουν τη δράση της. Οι ουσίες αυτές που ανήκουν στην κατηγορία των καρδιοτονωτικών γλυκοζιτών, αυξάνονται κατά την κύηση και ακόμη περισσότερο στην προεκλαμψία, συμμετέχοντας μάλλον, στον μηχανισμό της υπέρτασης. Πειραματικά δεδομένα σε επίμυες δείχνουν ότι τα αντισώματα έναντι της μαρινομπουφαγενίνης (MBG), ενός καρδιοτονωτικού στεροειδούς, μειώνουν την αρτηριακή πίεση σε υπέρτασικούς αρουραίους κατά την κύηση και αποκαθιστούν την αντλία Na^+/K^+ . Οδηγούν δε στη σκέψη ότι τα αντισώματα κατά της MBG μπορεί να αποτελέσουν χρήσιμο εργαλείο τόσο για τη μελέτη της MBG καθώς και για τη θεραπεία της προεκλαμψίας (Bagrov *et al* 2007).

Προεκλαμψία. Είναι από τις κύριες διαταραχές της κύησης ενώ η παθογένεια της παραμένει αδιευκρίνιστη. Η προεκλαμψία χαρακτηρίζεται από αύξηση της αρτηριακής πίεσης, οιδήματα, αύξηση του ενδαγγειακού όγκου και λευκωματουρία. Θεωρήθηκε πιθανό ότι η παρατηρούμενη μεγάλη κατακράτηση Na^+ που βρέθηκε στις προεκλαμπτικές γυναίκες σχετίζεται με διαταραχή στο σύστημα μεταφοράς του Na^+ δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και στο ορμονικό σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS) (Irani *et al* 2008).

Στη μελέτη αυτή εξετάστηκε, σε περίοδο μετά την κύηση, η δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ και τα επίπεδα των DLIS σε γυναίκες με προϋπάρχουσα προεκλαμψία κατά την κύηση. Βασιζόμενοι στα ευρήματα αυτά θελήσαμε να επεκτείνουμε τη μελέτη σε γονείς γυναικών με ιστορικό προεκλαμψίας για να εξετάσουμε το ενδεχόμενο οικογενούς συμμετοχής με κληρονομούμενα στοιχεία στην παθογένεια της προεκλαμψίας.

Στο Γενικό Μέρος γίνεται ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που αφορά στην υπέρταση και στον ρόλο του νατρίου, στη δραστηριότητα της αντλίας Na^+/K^+ , του αντιμεταφορέα Na^+/H^+ και του ΣΑ Na^+/Li^+ , καθώς και στις νοσολογικές οντότητες στις οποίες παρατηρείται παθολογική έκφραση των συστημάτων αυτών όπως ο σακχαρώδης διαβήτης.

Στο Ειδικό Μέρος περιγράφονται ο σχεδιασμός της μελέτης, τα υλικά, οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν, οι ομάδες των μελετώμενων ατόμων καθώς και τα αποτελέσματα της μελέτης. Ελέγχθηκαν γυναίκες με ιστορικό προεκλαμψίας κατά την κύηση, ινσουλινοεξαρτώμενες διαβητικές και ευγλυκαιμικές καθώς επίσης και οι γονείς αυτών, όσον αφορά στο ΣΑ Na^+/Li^+ και στα επίπεδα των DLIS.

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΛΑΤΟΣ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ **ΚΑΙ Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΥΠΕΡΤΑΣΗ**

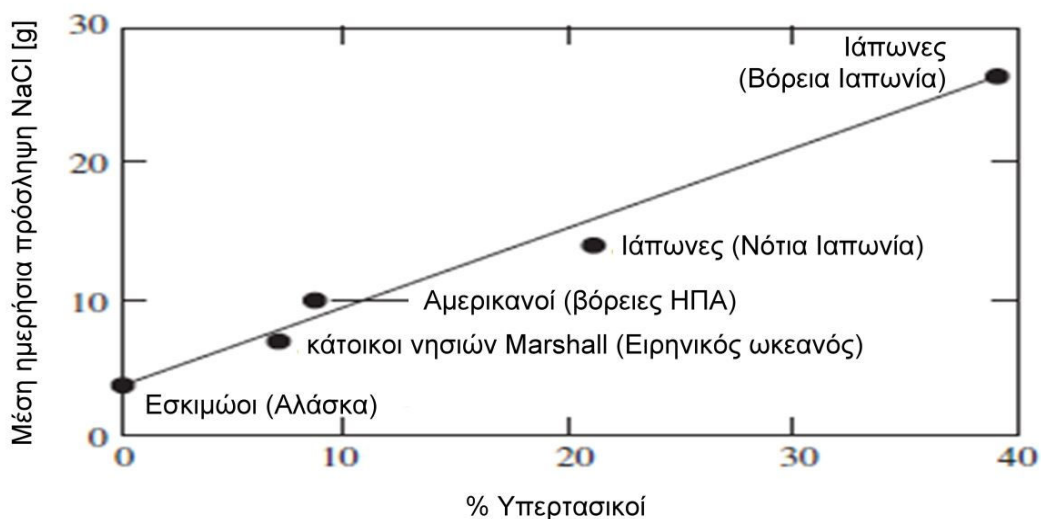
Η ιδέα ότι η δια της τροφής πρόσληψη άλατος είναι πιθανό να συνδέεται με τον μηχανισμό της υπέρτασης είναι πολύ παλιά. Βασίστηκε στην παρατήρηση ότι πληθυσμοί με μειωμένη πρόσληψη άλατος έχουν μειωμένη μέση αρτηριακή πίεση και σπανίως εμφανίζουν υπέρταση (Dahl *et al* 1958). Η υπέρταση καθώς και η αύξηση της αρτηριακής πίεσης με την αύξηση της ηλικίας, φαινόμενα συνήθη στις δυτικές κοινωνίες, απουσιάζουν από πληθυσμούς που καταναλώνουν νάτριο λιγότερο από 50 mmol (2,9g) την ημέρα (Frisoli *et al* 2012).

Ήδη από το 1988, ευρήματα διεθνών επιδημιολογικών μελετών ενίσχυσαν τον πιθανό ρόλο του νατρίου στην εμφάνιση της νόσου, παρατηρώντας ότι πλήρης αποκλεισμός του νατρίου από τη διατροφή θεραπεύει ακόμη και περιπτώσεις σοβαρής υπέρτασης (Intersalt study 1998).

Διαφορετικοί πληθυσμοί καταναλώνουν διαφορετικές ποσότητες άλατος με μεγάλη διακύμανση (από 4 g ημερησίως από τους Εσκιμώους της Αλάσκας έως 26 g από την κοινότητα Ακίτα της Βορείου Ιαπωνίας). Τα ποσοστά υπερτασικών σ' αυτούς τους πληθυσμούς ακολουθούν τις προσλαμβανόμενες ποσότητες άλατος, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 (Dahl *et al* 2005) Εικόνα 1.

Πίνακας 1 Μέση ημερήσια πρόσληψη άλατος (βασισμένη στην απέκκριση νατρίου μέσω των ούρων σε 24h) σε διάφορους πληθυσμούς (Dahl *et al* 2005)

	Έτος	Φύλο	Πρόσληψη άλατος	
			Μέσος όρος (g/ημ)	Εύρος (g/ημ)
Εσκιμώοι της Αλάσκας	1958, 1960	αμφότερα	4	1-10
Marshall Islander (Ειρηνικός Ωκεανός)	1958	αμφότερα	7	1.5-13
Η.Π.Α. (Brookhaven)	1954-1956	άρρενες	10	4-24
Ιαπωνία Hiroshima (N. Ιαπωνία)	1958	άρρενες	14	4-29
Akita (B. Ιαπωνία)	1954	αμφότερα	26	5-55



Εικόνα 1 Συσχέτιση της μέσης ημερήσιας πρόσληψης άλατος με τη συχνότητα υπέρτασης σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και μεταξύ διαφορετικών φυλών (Dahl *et al* 2005).

Θα πρέπει να διευκρινίσουμε ότι οι έννοιες «**άλας**» και «**νάτριο**» χρησιμοποιούνται πολλές φορές σαν συνώνυμα. Στην πραγματικότητα το άλας (NaCl) περιέχει μόνον 40% νάτριο και το 60% είναι τα ιόντα χλωρίου. Εάν αντικαταστήσουμε το χλωριούχο νάτριο με κιτρικό νάτριο, παύει η υπερτασική του δράση. Γι αυτό μιλώντας για υπέρταση είναι δόκιμο να χρησιμοποιούμε τον όρο «**πρόσληψη άλατος**» (Frisoli *et al* 2012).

Η ημερήσια πρόσληψη νατρίου σήμερα στους περισσότερους πληθυσμούς στον κόσμο είναι 100 mmol (5.8 g Na ή 14.5 g άλατος), εντούτοις η πλειοψηφία των ανθρώπων έχουν φυσιολογική πίεση .

Η υπερβολική ποσότητα προσλαμβανόμενου νατρίου 50-100 mmol ημερησίως (7.25-14.5g άλατος) είναι αναγκαία αλλά όχι προϋπόθεση για την ανάπτυξη υπέρτασης. Φαίνεται ότι σε ορισμένα άτομα υπάρχει **ευαισθησία στο νάτριο**, η οποία καθορίζεται γενετικά και χαρακτηρίζεται ως «**νατριοευαισθησία**». Εκτός δηλαδή από τον περιβαλλοντικό παράγοντα όπως είναι η διαιτητική πρόσληψη άλατος, υπάρχουν κληρονομικοί παράγοντες που καθορίζουν την ανάπτυξη ή όχι υπέρτασης σε κάθε άνθρωπο, ανεξάρτητα από την ποσότητα του προσλαμβανόμενου άλατος.

Στους νέους, μέτρια μείωση του προσλαμβανόμενου άλατος έχει ως συνέπεια τη σχετικά γρήγορη μείωση της αρτηριακής πίεσης και αυτό είναι σημαντικό διότι μπορεί να έχει μακρόχρονα ευνοϊκά αποτελέσματα στην πορεία της ζωής τους.

Η περίσσεια άλατος απεκκρίνεται μέσω των νεφρών από τα ούρα, σε ποσότητες ίσες με τις προσλαμβανόμενες, ώστε να διατηρείται το μεταβολικό ισοζύγιο. Ο Dahl και οι συνεργάτες του σε μελέτες, με μακροχρόνιο αυστηρό περιορισμό στην πρόσληψη άλατος, διαπίστωσαν ότι ο ανθρώπινος οργανισμός έχει επιδείξει μεγάλη προσαρμοστικότητα και σε συνθήκες έλλειψης έχει τη δυνατότητα

να κατακρατά το απαραίτητο άλας για τις ανάγκες του (Dahl *et al* 2005). Σε κανονικές συνθήκες 1 με 2 g άλατος την ημέρα είναι αρκετά για τις μεταβολικές μας ανάγκες ακόμη και στη φάση ανάπτυξης του οργανισμού, χωρίς αυτή η ποσότητα να θεωρείται ότι είναι απαραίτητη ή προτεινόμενη (Dahl *et al* 2005, και Dahl *et al* 1958).

Το αλάτι αρχικά χρησιμοποιήθηκε ευρέως στη διατήρηση των τροφίμων, ήταν «**το ψυγείο**» της **αρχαιότητας**, σε εποχή κατά την οποία τα αλίπαστα (οι τάριχοι, δηλαδή τα συντηρημένα σε αλάτι τρόφιμα) τύγγαναν μεγάλης εκτίμησης. Αργότερα χρησιμοποιήθηκε σαν βελτιωτικό γεύσης στις σύγχρονες, δυτικές κυρίως, κοινωνίες. Σήμερα, η κατανάλωση σε αλάτι είναι υψηλή λόγω της προσθήκης του στο φαγητό, αλλά κυρίως λόγω των αλατισμένων προπαρασκευασμένων τροφίμων από τις βιομηχανίες τροφίμων και μια συνήθης διατροφή περιλαμβάνει 10 g άλατος ημερησίως.

Η πρόσληψη υψηλών ποσοτήτων άλατος είναι πιθανό να επιδρά απ' ευθείας, πέρα από την επίδραση της μέσω της αύξησης της αρτηριακής πίεσης, στην αύξηση του κινδύνου για εγκεφαλικό επεισόδιο, στην υπερτροφία της αριστερής κοιλίας και στη νεφρική νόσο με πρωτεϊνουρία. Σχετίζεται επίσης με εμφάνιση λίθων στα νεφρά με την οστεοπόρωση, με τη βαρύτητα του άσθματος και πιθανόν είναι σοβαρή αιτία του καρκίνου του στομάχου σύμφωνα με δεδομένα του Frisoli και συν. (2005).

Η μείωση του προσλαμβανόμενου άλατος μπορεί να καθυστερήσει ή και να προλάβει την ανάπτυξη υπέρτασης σε φυσιολογικά άτομα, να συμβάλει στη μείωση των επιπέδων της αρτηριακής πίεσης σε υπερτασικά άτομα υπό θεραπεία, ακόμη και να περιορίσει ή να αποτρέψει τη χρήση αντιυπερτασικών φαρμάκων σε υπερτασικούς ασθενείς. Αυξάνονται οι ενδείξεις, ότι η μείωση της ποσότητας του προσλαμβανόμενου άλατος έχει επίδραση στη μείωση του κινδύνου για

καρδιαγγειακά νοσήματα τουλάχιστον εν μέρει, μέσω της μείωσης της αρτηριακής πίεσης (Frisoli *et al* 2005).

Μία στρατηγική μείωσης κατά 10% με 20% του προσλαμβανόμενου άλατος τον χρόνο δεν θα γινόταν αντιληπτή από τους γευστικούς υποδοχείς των καταναλωτών και θα είχε αποτέλεσμα τη μείωση της προσλαμβανόμενης ποσότητας άλατος από τον πληθυσμό στα 5-6 g την ημέρα σε διάρκεια πέντε ετών με μακροχρόνια ευεργετικά αποτελέσματα. Ο στόχος αυτός όμως είναι δύσκολος διότι θα χρειαζόταν ευρύτερη συνεργασία της πολιτείας με τις βιομηχανίες τροφίμων.

2. ΥΔΑΤΙΚΗ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ

Η ζωή μας εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από το νερό. Ο άνθρωπος αδυνατεί να ζήσει χωρίς νερό παραπάνω από μερικές μέρες ενώ χωρίς τροφή μπορεί να αντέξει τουλάχιστον ένα μήνα. Το νερό αποτελεί κατά προσέγγιση το 60% του σωματικού βάρους (ΣΒ) ενός ενήλικα και κατανέμεται κατά 40% σε ενδοκυττάριο ύδωρ (ΕΔΥ) και ένα 20% σε εξωκυττάριο ύδωρ (ΕΞΥ) με 4% αυτού ως πλάσμα και 16% ως μεσοκυττάριο ή διάμεσο υγρό. Η περιεκτικότητα του ανθρώπινου οργανισμού σε νερό βεβαίως εξαρτάται τόσο από την ηλικία όσο και από το φύλο. Περιορίζεται με την πρόοδο της ηλικίας λόγω αύξησης του λίπους και μείωσης της μυϊκής μάζας και είναι μεγαλύτερη στους άντρες απ' ότι στις γυναίκες.

Κύριος ρόλος του νατρίου και των συνοδών του ανιόντων (Cl^- και HCO_3^-) είναι να συγκρατούν το H_2O έξω από τα κύτταρα και να διατηρείται έτσι σταθερός ο όγκος του εξωκυττάριου χώρου, να διατηρείται δηλαδή το υδατικό ισοζύγιο στον οργανισμό. Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι συγκεντρώσεις των κατιόντων και ανιόντων που βρίσκονται στην ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια περιοχή είναι ίσες

(αρχή ηλεκτρικής ουδετερότητας). Ο εξωκυττάριος όγκος υγρών αποτελεί το μέσον με το οποίο μεταφέρονται οι θρεπτικές ουσίες και τα προϊόντα του μεταβολισμού, ενώ ο ενδοκυττάριος παρέχει την αρχιτεκτονική δομή των κυττάρων και βοηθάει στη λειτουργία τους. Ωστόσο, το ενδοκυττάριο ύδωρ δεν είναι κατανεμημένο ομοιόμορφα σ' όλα τα κύτταρα του οργανισμού. Η μεγαλύτερη συγκέντρωσή του βρίσκεται στα κύτταρα με έντονη μεταβολική δράση όπως είναι τα μυϊκά, τα ηπατικά και τα νεφρικά και η μικρότερη στα σχετικά αδρανή όπως τα οστεοκύτταρα (Μαυροματίδης 2006).

2.1 Ο ρόλος και η φυσιολογία του Na^+

Το νάτριο αποτελεί τον κύριο ηλεκτρολύτη του εξωκυτταρίου χώρου. Το 95% της συνολικής του ποσότητας βρίσκεται σ' αυτόν. Το νάτριο καθορίζει τον όγκο του κυτταρίου και η συγκέντρωσή του προσδιορίζει την ωσμωτικότητα του εξωκυτταρίου χώρου. Ο ανθρώπινος οργανισμός, κατά την εξελικτική του πορεία, έχει αναπτύξει μηχανισμούς κατακράτησης νατρίου σε περιπτώσεις μειωμένης πρόσληψής του από το περιβάλλον ώστε να εξασφαλίζει την απαραίτητη ποσότητα για την ομαλή του λειτουργία. Όταν ο εξωκυττάριος χώρος διαστέλλεται, υπάρχει υπερβολική ποσότητα νατρίου στον οργανισμό, ενώ όταν αυτός μειώνεται υπάρχει έλλειμμα νατρίου. Η αυξομείωση του εξωκυτταρίου χώρου μπορεί να επηρεάσει την αρτηριακή πίεση. Αυτό παρατηρείται καθαρά σε ανθρώπους σε αιμοκάθαρση. Μικρότερες μεταβολές του εξωκυτταρίου υγρού σε φυσιολογικά άτομα αντισταθμίζονται ικανοποιητικά με ορμονικούς και νευρολογικούς μηχανισμούς. Επίσης, δεν έχει παρατηρηθεί αύξηση του εξωκυτταρίου υγρού σε ασθενείς με ιδιοπαθή υπέρταση. Η πιθανή συμμετοχή του νατρίου στο μηχανισμό της ιδιοπαθούς υπέρτασης σχετίζεται μάλλον με την κύρια

διαταραχή της νόσου που είναι η αυξημένη περιφερειακή αντίσταση των αγγείων (Hilton *et al* 1991).

Η ισορροπία του νατρίου στον οργανισμό διασφαλίζεται κυρίως από τα νεφρά. Η νεφρική απάντηση στη μείωση του εξωκυττάριου όγκου υγρών είναι η αποβολή ούρων με μειωμένη ποσότητα NaCl. Οι κύριοι μηχανισμοί που εμποδίζουν την αποβολή του Na^+ σε αυτή την περίπτωση είναι η μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης, η αύξηση της επαναρρόφησής του στα εγγύς νεφρικά σωληνάρια και η διέγερση της επαναρρόφησής του με τη δράση της αλδοστερόνης.

Όταν υπάρχει φόρτιση του οργανισμού με νάτριο, οι ανωτέρω μηχανισμοί ενεργοποιούνται κατά την αντίθετη κατεύθυνση για την αποφόρτισή του. Αυξάνεται δηλαδή ο ρυθμός της σπειραματικής διήθησης, μειώνεται σχετικά η επαναρρόφιση του νατρίου στα εγγύς νεφρικά σωληνάρια, καταστέλλεται η έκκριση της αλδοστερόνης και απελευθερώνεται το νατριουρητικό πεπτίδιο. Η αλδοστερόνη επηρεάζει σημαντικά την επαναρρόφιση του νατρίου στα άπω νεφρικά σωληνάρια και είναι υπεύθυνη για επαναρρόφιση του 5% της ποσότητας που διηθείται (Penney *et al* 2008). Το σύστημα Ρενίνης-Αγγειοτενσίνης-Αλδοστερόνης (RAAS) είναι ο ισχυρότερος μηχανισμός που ενεργοποιείται σε συνθήκες μειωμένης πρόσληψης άλατος με στόχο την κατακράτηση νατρίου για τις ανάγκες του οργανισμού (Takahashi *et al* 2011).

3. ΥΠΕΡΤΑΣΗ

Η υπέρταση αποτελεί ένα περίπλοκο πολυπαραγοντικό νόσημα. Είναι από τα συχνότερα νοσήματα της σύγχρονης δυτικής κοινωνίας με σοβαρές επιπτώσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα.

Η συστηματική υπέρταση προσδιορίζεται, με απλούς όρους, ως η αύξηση της συστολικής αρτηριακής πίεσης (ΣΑΠ) σε επίπεδα ≥ 140 mm Hg ή/και της διαστολικής αρτηριακής πίεσης (ΔΑΠ) ≥ 90 mm Hg. Διακρίνεται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: την πρωτοπαθή ή ιδιοπαθή και τη δευτεροπαθή υπέρταση. Η δευτεροπαθής υπέρταση έχει υπόβαθρο την ύπαρξη άλλου νοσήματος. Η ιδιοπαθής υπέρταση περιγράφεται πρώτη φορά από τον Meakins το 1927, ο οποίος της δίνει και το όνομα “ιδιοπαθής”, για να περιγράψει μία μορφή υπέρτασης η οποία αναπτύσσεται χωρίς προφανές υποκείμενο νόσημα. Ο ίδιος σημειώνει ότι αναφέρονται πολλές περιπτώσεις καρδιακών νοσημάτων και εγκεφαλικών επεισοδίων ως αιτία θανάτου σε γονείς ατόμων με ιδιοπαθή υπέρταση. Παρατήρησε επίσης ότι γονείς νεαρών ασθενών με αυτή τη διαταραχή, πεθαίνουν νωρίτερα.

Για την εμφάνιση της υπέρτασης συνδυάζονται τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί αιτιολογικοί παράγοντες, με αποτέλεσμα την αυξημένη περιφερική αγγειακή αντίσταση.

Εκτιμάται ότι στις ΗΠΑ ένα 25% περίπου των ενηλίκων λαμβάνει αντιυπερτασική αγωγή. Ακόμη και με αυτή την αγωγή, το 24% του πληθυσμού παραμένει υπερτασικό. Επίσης σύμφωνα με επιδημιολογικές έρευνες, περισσότερο από το 50% των ανθρώπων άνω των 65 ετών είναι υπερτασικοί (Hauck 2012), ενώ το ποσοστό αυτό ανέρχεται στο 70% στην ηλικία των 80 ετών. Τα άτομα της μαύρης φυλής εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα υπέρτασης κατά 40%, συγκρινόμενη με αυτή των λευκών. Η αυξημένη αυτή συχνότητα αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες για τα αυξημένα επίπεδα καρδιαγγειακών επεισοδίων καθώς και τα αυξημένα επίπεδα θνησιμότητας που παρατηρούνται στους πληθυσμούς αυτούς (Havas *et al* 2004).

Η αυξημένη πρόσληψη διαιτητικού άλατος πιστεύεται ότι είναι ο κύριος περιβαλλοντικός παράγων που οδηγεί στην ανάπτυξη της ιδιοπαθούς υπέρτασης. Σε

πολλά άτομα η αρτηριακή πίεση ακολουθεί τις διακυμάνσεις της ποσότητας άλατος στη διατροφή, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο. Εντούτοις, στην πολυεθνική πληθυσμιακή μελέτη Intersalt, η απέκκριση νατρίου δια των ούρων δεν είχε στενή συσχέτιση με τη συχνότητα ανάπτυξης της ιδιοπαθούς υπέρτασης. Μια μειοψηφία ατόμων μόνον είναι «νατριοευαίσθητα». Ο λόγος για τον οποίο κάποιοι πληθυσμοί είναι νατριοευαίσθητοι και κάποιοι ανθεκτικοί στο νάτριο δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος. Ορισμένοι ερευνητές βασιζόμενοι σε πειραματικά δεδομένα, διατύπωσαν την ιδέα ότι η αιτία της αύξησης της αρτηριακής πίεσης κατά τη λήψη υψηλών ποσοτήτων διαιτητικού άλατος, ενδέχεται να είναι κληρονομική (Dahl *et al* 1967, Sanchez *et al* 1997). Δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμη ειδικά γονίδια που να προκαλούν νατριοευαισθησία στον άνθρωπο. Άτομα σε αυτήν την υποομάδα της ιδιοπαθούς υπέρτασης, τα οποία αντιπροσωπεύουν το 40-45% αυτών, έχουν τα εξής χαρακτηριστικά που τα διακρίνουν από τα φυσιολογικά άτομα: α) μειωμένη νεφρική αγγειακή απάντηση στην αγγειοτενσίνη II, σε συνθήκες υψηλής πρόσληψης άλατος, β) επινεφριδιακή απάντηση στην αγγειοτενσίνη II που δεν επηρεάζεται από αλλαγές στις ποσότητες προσλαμβανόμενου άλατος και γ) απουσία αύξησης της ροής του αίματος στα νεφρά μετά από χρόνια λήψη υψηλών ποσοτήτων άλατος (Huot *et al* 1991).

Η νατριοευαισθησία προσδιορίζεται ως μία διαφορά ≥ 10 mmHg στη συστολική πίεση μεταξύ συνθηκών υψηλής και χαμηλής πρόσληψης άλατος. Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι το 51% των υπερτασικών και το 26% των νορμοτασικών ατόμων πληρούν τα κριτήρια της νατριοευαισθησίας (Weinberger *et al* 1996). Το ερώτημα που προκύπτει είναι το με ποιό τρόπο στα νατριοευαίσθητα άτομα το άλας οδηγεί στην αύξηση της περιφερικής αγγειακής αντίστασης και ακολούθως στην υπέρταση.

3.1 Νάτριο και Υπέρταση

Η ιδέα ότι η υπέρταση πιθανόν συνδέεται με μεταβολές στη μικρή ενδοκυττάρια δεξαμενή του νατρίου αναφέρθηκε το 1952, όταν οι Tobian και ο Binion βρήκαν αυξημένη περιεκτικότητα νατρίου σε τμήματα νεφρικών αρτηριών υπερτασικών ατόμων σε σύγκριση με άτομα με φυσιολογική αρτηριακή πίεση, όταν ανάλογα παρασκευάσματα εξετάστηκαν μετά θάνατον (Tobian *et al* 1952). Αυτή η πρώτη παρατήρηση αναδεικνύει το κεντρικό πρόβλημα που συνδέεται με τη μελέτη της κυτταρικής μεταφοράς του νατρίου στην υπέρταση. Ο ιστός που εμπλέκεται, με τον μηχανισμό της υπέρτασης είναι ο λείος αγγειακός μυς. Αυτός όμως, έχει περίπλοκη δομή και είναι δύσκολο να μελετηθεί, ιδιαίτερα *in vivo* και να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα. Γι αυτό, η μελέτη της μεταφοράς νατρίου στο κύτταρο στράφηκε σε άλλους ιστούς, όπως τα ερυθροκύτταρα, τα λευκοκύτταρα και άλλα είδη κυττάρων. Τα ερυθροκύτταρα φαίνεται ότι αποτελούν κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη μεταφοράς νατρίου καθόσον είναι εύκολα διαθέσιμα, είναι ανθεκτικά *in vitro* και τα φυσιολογικά τους χαρακτηριστικά είναι καλώς κατανοητά. Μειονεκτήματα των ερυθροκυττάρων, ως μοντέλο μελέτης, αποτελούν ο χαμηλός ρυθμός ενεργού μεταφοράς νατρίου μέσω της αντλίας νατρίου και η χαμηλή διαπερατότητά τους στο νάτριο (Hilton *et al* 1986).

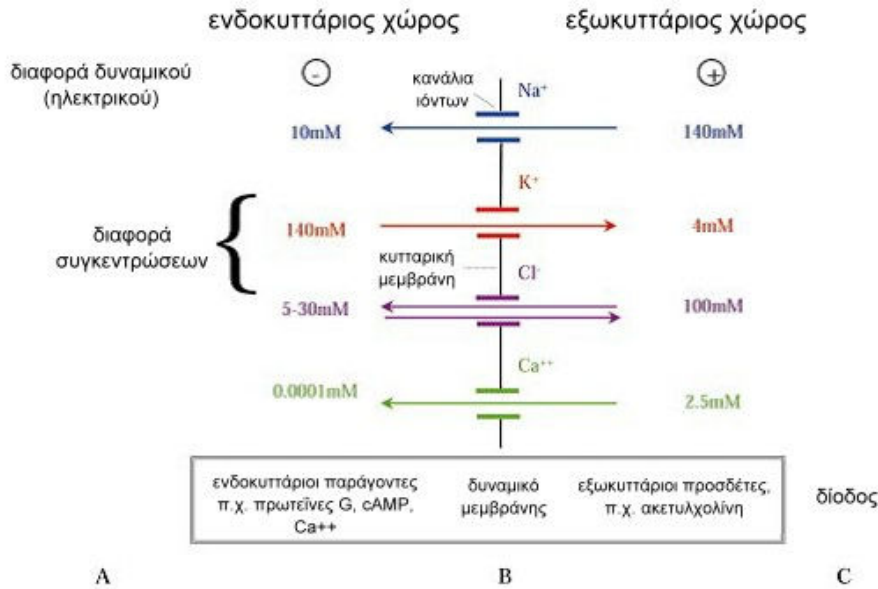
Το περιεχόμενο ενός κυττάρου σε νάτριο προσδιορίζεται από τον ρυθμό εισόδου του νατρίου στο εσωτερικό του κυττάρου και την ικανότητα της αντλίας νατρίου να το αποβάλλει, καταναλώνοντας ενέργεια για να μετακινήσει το νάτριο από χαμηλές συγκεντρώσεις προς υψηλές. Οι πρώτες μελέτες της μεταφοράς νατρίου στα ερυθροκύτταρα στην υπέρταση έγιναν από τον Losse το 1960 και περιέγραψαν μία αύξηση του ενδοκυττάρου νατρίου στους ασθενείς με ιδιοπαθή υπέρταση.

4. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΙΟΝΤΩΝ ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Πολλά συστήματα ή «κανάλια» μεταφοράς στην κυτταρική μεμβράνη λειτουργούν παράλληλα για τη μεταφορά ιόντων και ύδατος προς και από το εσωτερικό του κυττάρου.

Τα «κανάλια» αυτά είναι μακρομοριακές διαυλικές πρωτεΐνες που βρίσκονται στην στιβάδα λιπιδίων της μεμβράνης. Η δομή και η έκφραση των πρωτεϊνών αυτών είναι υπό γενετικό έλεγχο. Τα γονίδια αυτών των πρωτεϊνών έχουν πολλά αλληλόμορφα, με αποτέλεσμα να αντιμετωπίζουμε περίπλοκα γενετικά προβλήματα μελετώντας τις μεταβολές της μεταφοράς των ιόντων Na^+ κατά την υπέρταση (Canessa *et al* 1984).

Το κυρίαρχο ενδοκυττάριο κατιόν είναι το κάλιο K^+ , η συγκέντρωση του οποίου προσδιορίζει κυρίως τον όγκο του κυττάρου. Η συγκέντρωση του ενδοκυττάρου K^+ σε πολλά κύτταρα, βρίσκεται κοντά στην ηλεκτροχημική του ισορροπία καθώς το δυναμικό της μεμβράνης του κυττάρου αντιπροσωπεύει μια ισχυρή ηλεκτρική δύναμη που ενθαρρύνει τη συσσώρευση κατιόντων. Αυτό δεν ισχύει για τα ιόντα Na^+ για τα οποία απαιτείται μία συνεχής κατανάλωση ενέργειας ώστε να διατηρείται ενδοκυτταρίως η συγκέντρωσή του σε χαμηλά επίπεδα (Hilton *et al* 1991) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Παράγοντες που προσδιορίζουν τη μεταφορά ιόντων διαμέσου των καναλιών ιόντων στην κυτταρική μεμβράνη (Baker *et al* 2000).

Στα επόμενα κεφάλαια περιγράφονται τα κυριότερα συστήματα μεταφοράς ιόντων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης.

4.1. Αντλία Na⁺ (Na⁺/K⁺ ATPάση)

Η αντλία νατρίου ή Na⁺/K⁺ ATPάση είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη ενεργού μεταφοράς ιόντων K⁺ προς το εσωτερικό του κυττάρου με ταυτόχρονη μεταφορά ιόντων Na⁺ προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε κατεύθυνση αντίθετη προς την κλίση συγκεντρώσεών τους, με αναλογία (στοιχειομετρία) 2:3. Διατηρεί έτσι χαμηλή τη συγκέντρωση του Na⁺ και υψηλή τη συγκέντρωση του K⁺ στο εσωτερικό του κυττάρου (Hauck *et al* 2012). Η ύπαρξη της αντλίας αυτής περιγράφηκε πρώτη φορά το 1957 από τον Skou σαν μία αδενοσινοτριφωσφατάση που ενεργοποιείται από τα ιόντα Na⁺ και K⁺. Είναι ένα ενεργό σύστημα αντίθετης μεταφοράς αυτών των

ιόντων, καλά διατηρημένο σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Πρόκειται για ένα ένζυμο το οποίο χρησιμοποιεί την ενέργεια που παρέχεται από την υδρόλυση μίας ATP.

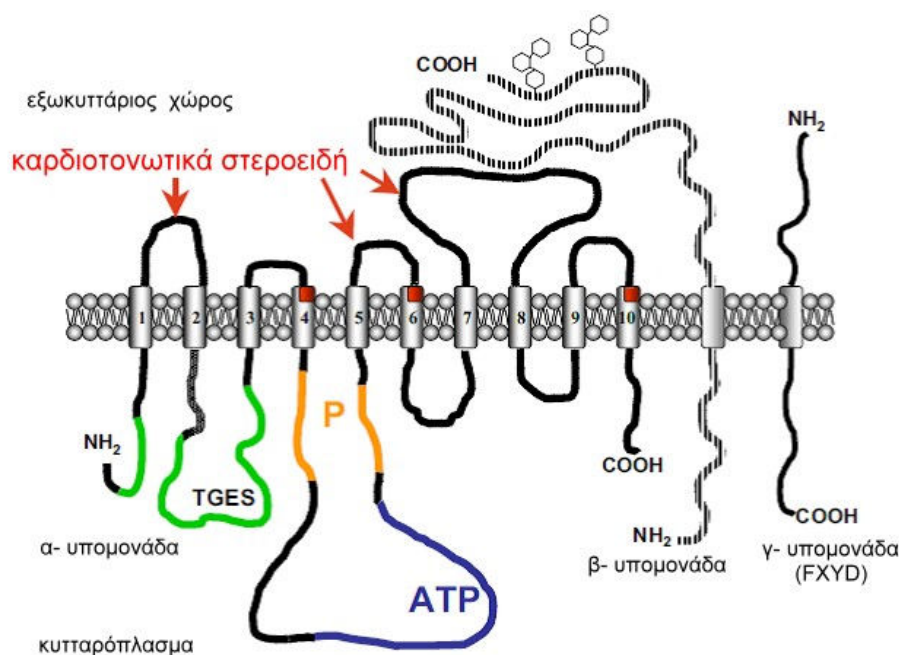
Η αντλία νατρίου φαίνεται να επηρεάζεται και να ρυθμίζεται από πολλές ορμόνες όπως η αλδοστερόνη, η θυρεοειδική ορμόνη, η ινσουλίνη καθώς και από νατριουρετικούς παράγοντες (Canessa *et al* 1984).

Αυτό που είναι σημαντικό στο παραπάνω σύστημα είναι ότι αυτή η ανισότητα συγκεντρώσεων Na^+ που διατηρείται καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του κυττάρου, αποτελεί μια αποτελεσματική δύναμη, οδηγό για άλλα συστήματα μεταφοράς, τα οποία χρειάζονται ενέργεια και εκμεταλλεύονται την ενέργεια που απελευθερώνεται όταν τα ιόντα Na^+ επανεισέρχονται στο κύτταρο (Hilton *et al* 1991). Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι η σύζευξη αυτής της κίνησης ιόντων Na^+ με τη μεταφορά άλλων ιόντων όπως H^+ και Ca^{++} . Να σημειωθεί ότι ακόμη και η μεταφορά γλυκόζης μπορεί να διευκολυνθεί από αυτή την πηγή ελεύθερης «δωρεάν» ενέργειας.

4.1.1. Χημική δομή της Na^+/K^+ ATPάση

Η κρυσταλλική δομή της Na^+/K^+ ATPάσης ταυτοποιήθηκε το 2007 από τον Morth και τους συνεργάτες του. Είναι ένα ολιγομερές αποτελούμενο τουλάχιστον από δύο πολυπεπίδια, τις υπομονάδες α και β , οι οποίες πρέπει να είναι αμφότερες παρούσες για να είναι λειτουργικό το ένζυμο. Η μεγαλύτερη α -υποομάδα έχει μέγεθος περίπου 110 kDa και αποτελεί τη μονάδα-καταλύτη περιλαμβάνοντας τη θέση σύνδεσης της ATP, τη θέση σύνδεσης κατιόντων Na^+ , K^+ , Mg^{++} , μία θέση φωσφορύλιωσης και μια θέση σύνδεσης των καρδιακών γλυκοζιτών. Έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερα ισομερή τα οποία έχουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στους διάφορους ιστούς και διαφορετικό ρόλο σε κάθε ιστό. Στους λείους αγγειακούς μύες

κυριαρχούν τα ισομερή α_1 και α_2 , ενώ το α_1 ισομερές είναι το κύριο ισοένζυμο που εκφράζεται στα νεφρά. Η μικρότερη β -υπομονάδα είναι μία γλυκοζυλιωμένη γλυκοπρωτεΐνη με μοριακή μάζα 31,5 kDa, η λειτουργία της οποίας δεν είναι απολύτως κατανοητή, φαίνεται όμως να χρησιμεύει ως υποβοήθεια στην υπομονάδα α σταθεροποιώντας τη δομή της και προσανατολίζοντας την προς τη μεμβράνη (Hauck *et al* 2012) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3 Χημική δομή της Na^+/K^+ ATPάσης (Bagrov *et al* 2009).

4.1.2. Φυσιολογικές δράσεις της Na^+/K^+ ATPάσης

Οι φυσιολογικές δράσεις της Na^+/K^+ ATPάσης προέρχονται από τον ρόλο της σαν αντλία ιόντων. Ο κύριος ρόλος της είναι η δημιουργία και διατήρηση μιας ηλεκτροχημικής κλίσης συγκεντρώσεων ιόντων δια μέσω της μεμβράνης. Αυτή είναι κρίσιμη για φυσιολογικές διεργασίες όπως η επικοινωνία των νευρώνων, η οσμωτική

ρύθμιση του κυτταρικού όγκου και η ομοιόσταση των ιόντων (Prassas *et al* 2008), είναι ακόμη σημαντική για τη δημιουργία και διατήρηση των ηλεκτρικών δυναμικών της μεμβράνης. Στα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων η έκφραση και λειτουργία του λόγου α_1/β_1 των ισομερών της Na^+/K^+ ATPάσης είναι το κλειδί του προσδιορισμού της επαναρρόφησης ιόντων νατρίου από το πειραματικό διήθημα. Διάφορα επίπεδα ενδογενών αναστολέων της αντλίας νατρίου φαίνεται να ρυθμίζουν αυτή την επαναρρόφηση, αναστέλλοντας την ενζυμική της λειτουργία, αλλά και τροποποιώντας την έκφρασή της, ρυθμίζοντας έτσι την ομοιόσταση του νατρίου στον νεφρό. Η αντλία νατρίου συμμετέχει επίσης στη διατήρηση των ενδοκυττάρων συγκεντρώσεων νατρίου που είναι απαραίτητες για τη λειτουργία των λείων μυϊκών κυττάρων και των καρδιακών μυϊκών κυττάρων. Η δραστηριότητα της Na^+/K^+ ATPάσης αναστέλλεται από την ενδογενή ουαμπαΐνη (Canessa *et al* 1980) και άλλους γλυκοζίτες ή καρδιοτονωτικά στεροειδή όπως η διγοξίνη.

Η αλληλεπίδραση των καρδιακών γλυκοζιτών με την αντλία νατρίου έχει μια ινότροπο δράση στην καρδιά καλά χαρακτηρισμένη. Οι καρδιακοί γλυκοζίτες αναστέλλοντας την Na^+/K^+ ATPάση προκαλούν αύξηση των επιπέδων των ιόντων του ενδοκυττάρου Na^+ . Αποτέλεσμα αυτής είναι η μείωση της ανταλλαγής $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ και ως εκ τούτου η αύξηση των ιόντων Ca^{++} στο εσωτερικό του κυττάρου η οποία και ασκεί ινότροπο δράση στην καρδιά.

Η Na^+/K^+ ATPάση εκτός από τον ρόλο της σαν αντλία ιόντων παίζει ρόλο και στη μετάδοση σημάτων σε διάφορα ενδοκυττάρια διαμερίσματα ρυθμίζοντας κυτταρικές διαδικασίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη, κινητικότητα και η απόπτωση (Prassas *et al* 2008).

Μειωμένη δραστηριότητα της αντλίας Na^+/K^+ έχει συνδεθεί με την ιδιοπαθή υπέρταση. Η ενδογενής ουαμπαΐνη (EO) στο πλάσμα είναι αυξημένη στο 45%

ασθενών με ιδιοπαθή υπέρταση και συσχετίζεται με την αρτηριακή υπέρταση (Hamlyn *et al* 2013).

4.1.3. Αναστολείς της Na^+/K^+ ATPάσης (DLIS ή ενδογενής διγοξίνη)

Οι αναστολείς της Na^+/K^+ ATPάσης αποτελούν μια ομάδα χημικών ενώσεων που προσδένονται στην εξωκυττάριο περιοχή του ενζύμου. Η χημική τους δομή έχει ένα κοινό στεροειδή πυρήνα ο οποίος θεωρείται ότι φέρει τη φαρμακευτική τους δράση, με ένα λακτονικό δακτύλιο στη θέση 17 και ένα σάκχαρο στη θέση 3. Σ' αυτή την κατηγορία ανήκουν η ουαμπαΐνη, η μαρινομπουφαγενίνη, η διγοξίνη, η διγιτοξίνη και άλλες χημικές ενώσεις. Κάθε τύπος αυτών των καρδιακών γλυκοζιτών διαφέρει ως προς τη χημική συγγένεια με τα διάφορα ισομερή της Na^+/K^+ ATPάσης και ως εκ τούτου η δράση τους ποικίλει ανάλογα με την έκφραση των α -ισομερών με τα οποία έχουν τη μεγαλύτερη χημική συγγένεια (Εικόνα 4).

Οι ουσίες αυτές, ομοιάζουσες με διγοξίνη (DLIS ή digoxin-like immunoreactive substances) ή διγιτάλη, ανακαλύφθηκαν αρχικά στα φυτά και τα ζώα. Χρησιμοποιούνται για ιατρικούς λόγους για πάνω από 200 χρόνια στη θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας και της αρτηριακής αρρυθμίας ασκώντας ινότροπο δράση.

Η ενδογενής ουαμπαΐνη χαρακτηρίστηκε πρώτη φορά το 1991 από τον Hamlyn (Hamlyn *et al* 1991). Συντίθεται και εκκρίνεται από τον φλοιό των επινεφριδίων, την υπόφυση και τον υποθάλαμο. Επίσης, αργότερα η μαρινοφομπουφαγενίνη (marinobufagenin) βρέθηκε ότι παράγεται ενδογενώς από τα επινεφρίδια (Hauck *et al* 2012).

Οι πρόσφατες ανακαλύψεις όπως η ταυτοποίηση της ενδογενούς καρδενολίδης (cardenolide) (ενδογενής ουαμπαΐνη) και μπουφαδιενολίδης

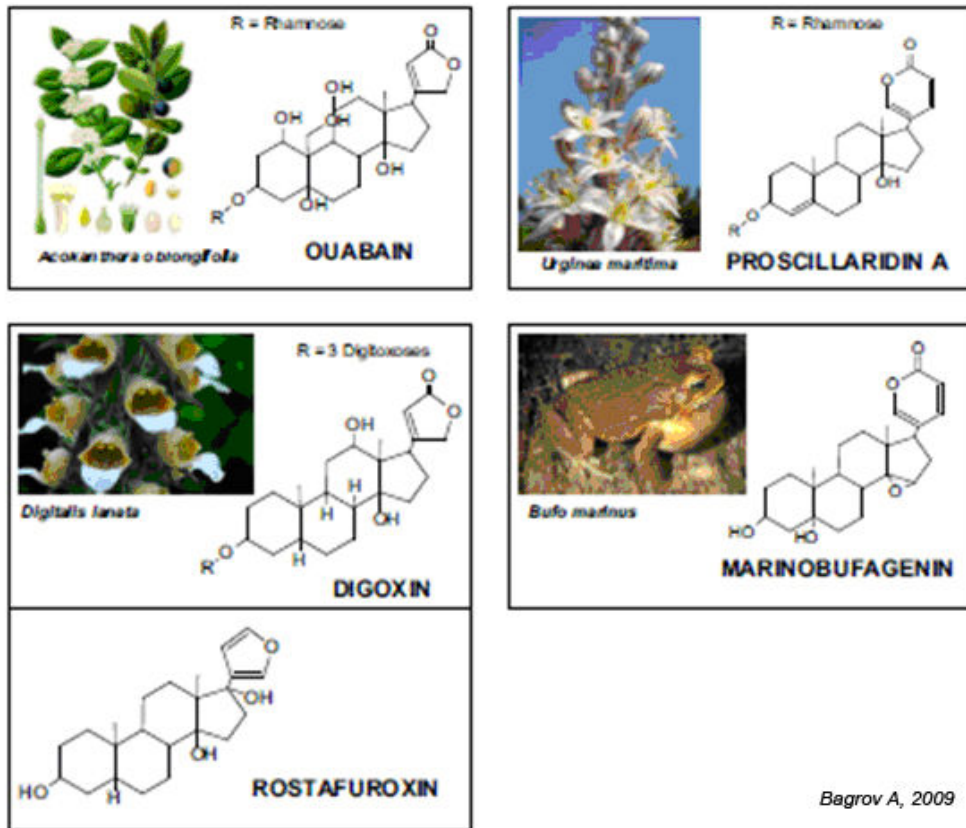
(bifadienolide) μαζί με την περιγραφή εναλλακτικού μηχανισμού δράσης τους μέσω της Na^+/K^+ ATPάσης αύξησαν σημαντικά το ενδιαφέρον σ' αυτό το πεδίο (Fedorova *et al* 2010).

Αρχικά θεωρήθηκαν σημαντικές ουσίες για τη ρύθμιση της μεταφοράς του νατρίου στα νεφρά και της αρτηριακής πίεσης. Πιο σύγχρονες μελέτες, εμπλέκουν τις ορμόνες αυτές, στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, διαφοροποίησης, απόπτωσης και ίνωσης, στον μηχανισμό της ανοσίας, στον μεταβολισμό των υδατανθράκων και στον έλεγχο διαφόρων λειτουργιών του κεντρικού νευρικού συστήματος ακόμη και της συμπεριφοράς (Bagrov *et al* 2009).

Φυσιολογικές αλληλεπιδράσεις των καρδιοτονωτικών στεροειδών με ρυθμιστικά συστήματα του οργανισμού παίζουν πιθανόν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ιδιοπαθούς υπέρτασης, της προεκλαμψίας, της νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου, της διατακτικής καρδιακής ανεπάρκειας και του σακχαρώδους διαβήτη.

Αντισώματα κατά της διγοξίνης φαίνεται ότι έχουν αντιυπερτασική δράση στους επίμυες (Kojima *et al* 1982).

Σημαντικά πρόσφατα ευρήματα παρουσιάζουν πρόσθετες ιδιότητες στη δράση της Na^+/K^+ ATPάσης εμπλέκοντας τους καρδιακούς γλυκοζίτες στη ρύθμιση πολλών σημαντικών κυτταρικών διαδικασιών αναδεικνύοντας νέους θεραπευτικούς ρόλους σε διάφορες ασθένειες. Η αυξημένη ευαισθησία του καρκινικού κυττάρου σ' αυτές τις ουσίες υποστηρίζει τη δράση τους σε αντικαρκινικές θεραπείες. Πρέπει να σημειωθεί ότι φάρμακα βασισμένα στους καρδιακούς γλυκοζίτες βρίσκονται σε στάδιο κλινικών δοκιμών.



Bagrov A, 2009

Εικόνα 4 Χημική δομή των καρδιοτονωτικών γλυκοζιδίων

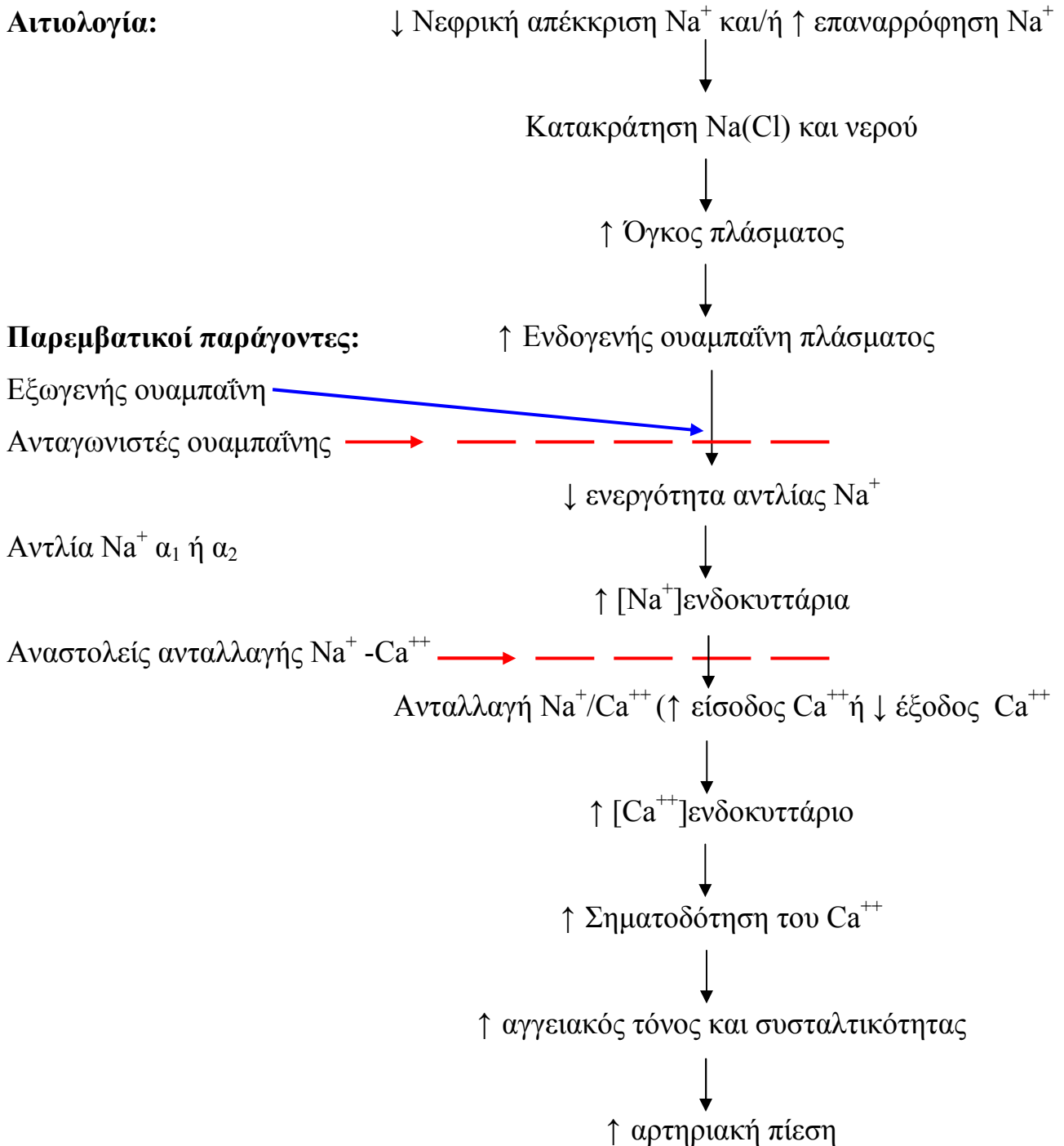
4.2. Σύστημα συμμεταφοράς Na^+ / K^+

Το 1974, οι Wiley και Cooper, περιέγραψαν ότι ένα μέρος της μεταφοράς των ιόντων Na^+ συνδεόταν με τη μεταφορά των ιόντων K^+ προς την ίδια κατεύθυνση και αναστέλλετο από τη φουροσεμίδα (Wiley et Cooper 1974). Η παράλληλη κίνηση των δύο κατιόντων χαρακτηρίζεται ως συμμεταφορά, απαιτεί άμεση κατανάλωση ενέργειας και χρησιμοποιεί την κλίση συγκέντρωσης του ενός κατιόντος για να μεταφέρει το άλλο. Η πιο προφανής λειτουργία του συστήματος είναι η διατήρηση του κυτταρικού όγκου με την παρουσία μεταβολών της εξωκυττάριας ωσμωτικότητας και η επαναρρόφηση του Na^+ και Cl^- στο ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle.

4.3. Αντλία Ca^{++} (Ca^{++} ΑΤΡάση) και το Σύστημα μεταφοράς $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$

Το ενδοκυττάριο Ca^{++} δεν είναι ομοιογενώς κατανεμημένο. Αποτελεί κυρίως συστατικό των μιτοχονδρίων και του ενδοπλασματικού δικτύου. Το ελεύθερο κυτταροπλασματικό Ca^{++} είναι εξαιρετικά χαμηλό περίπου 100 nmol συγκρινόμενο με το εξωκυττάριο που είναι 1mmol. Αυτή η διαβάθμιση συγκεντρώσεων επιτυγχάνεται με δύο μηχανισμούς. Ο πρώτος μηχανισμός χρησιμοποιεί την Ca^{++} ΑΤΡάση με τρόπο ανάλογο της K^+/Na^+ ΑΤΡάσης, καταναλώνοντας ΑΤΡ, το οποίο παρέχει ενέργεια, στη μεταφορά του Ca^{++} από χαμηλότερες προς υψηλότερες συγκεντρώσεις. Ο δεύτερος μηχανισμός είναι ένα σύστημα ανταλλαγής $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$. Αυτός εξασφαλίζει την απαιτούμενη ενέργεια για την έξοδο του Ca^{++} από το κύτταρο από τη σύζευξη του με την είσοδο των ιόντων Na^+ . Η δραστηριότητα του οδηγεί στην αύξηση του ενδοκυτταρίου νατρίου, το οποίο αποβάλλει ακολούθως η αντλία νατρίου (Hilton 1991). Πρέπει να σημειωθεί ότι η διατήρηση της φυσιολογικής διαφοράς συγκεντρώσεων ιόντων Na^+ είναι σημαντική για τη δραστηριότητα του συστήματος ανταλλαγής $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$. Μερική διαταραχή αυτής της διαφοράς θα διατάρασσε τη ικανότητα του συστήματος να αποβάλλει Ca^{++} . Η αυξημένη συγκέντρωση Ca^{++} στο εσωτερικό των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων αυξάνει την συσταλτικότητα τους και με αυτό τον τρόπο οδηγεί στην αύξηση της αρτηριακής πίεσης (Εικόνα 5).

ΒΗΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ ΝΑΤΡΙΟΕΥΑΙΣΘΗΤΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ



Εικόνα 5.

4.4. Το σύστημα ανταλλαγής $\text{Na}^+ - \text{H}^+$

Ο ενδιάμεσος μεταβολισμός έχει αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτονίων (H^+) που προέρχονται από το κύτταρο και πρέπει να περάσουν στο εξωτερικό περιβάλλον. Αυτή η ενδοκυττάρια οξינוποίηση δημιουργεί μία τάση για μετακίνηση των πρωτονίων προς τον εξωκυττάριο χώρο. Εντούτοις, όταν η μεταβολική δραστηριότητα του κυττάρου αυξηθεί, ένας άλλος συμπληρωματικός μηχανισμός ενεργοποιείται καθώς το ενδοκυττάριο pH μειώνεται. Ο μηχανισμός αυτός είναι **το σύστημα ανταλλαγής $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ (NHE)**. Αυτό δεν είναι σύστημα ενεργού μεταφοράς αφού δεν καταναλώνει ενέργεια. Διευκολύνει την έξοδο πρωτονίων για την αντிரόπηση του ενδοκυττάρου του pH με τίμημα την είσοδο Na^+ στο κύτταρο. Την ενδοκυττάρια αύξηση της συγκέντρωσης του Na^+ διορθώνει κατόπιν η αντλία νατρίου, ενεργοποιούμενη από την αύξηση του ενδοκυττάρου Na^+ (Hilton *et al* 1991). Οι αντιμεταφορείς NHEs αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, μεταφορέων, που βρίσκεται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς (Kemp *et al* 2008).

Το σύστημα ανταλλαγής $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ ανταλλάσσοντας ενδοκυττάρια πρωτόνια με εξωκυττάριο νάτριο παίζει κεντρικό ρόλο στη διατήρηση του ενδοκυττάρου pH και στον έλεγχο του κυτταρικού όγκου, επιδρώντας έτσι στην κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την απόπτωση (Trevisan *et al* 1997, Kemp *et al* 2008). Σε αλκαλικό περιβάλλον, η δραστηριότητα του συστήματος μειώνεται σημαντικά.

Η ανταλλαγή ιόντων Na^+ με H^+ γίνεται στοιχειομετρικά, σε αναλογία ένα προς ένα. Πρόκειται για ένα σύστημα μεταφοράς, ηλεκτρικά ουδέτερο, το οποίο δεν επηρεάζεται από την αλλαγή της διαφοράς δυναμικού διαμέσου της μεμβράνης. Το σύστημα ανταλλαγής $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ λειτουργεί κυρίως για τα ιόντα Na^+ με τα ιόντα H^+ , έχει

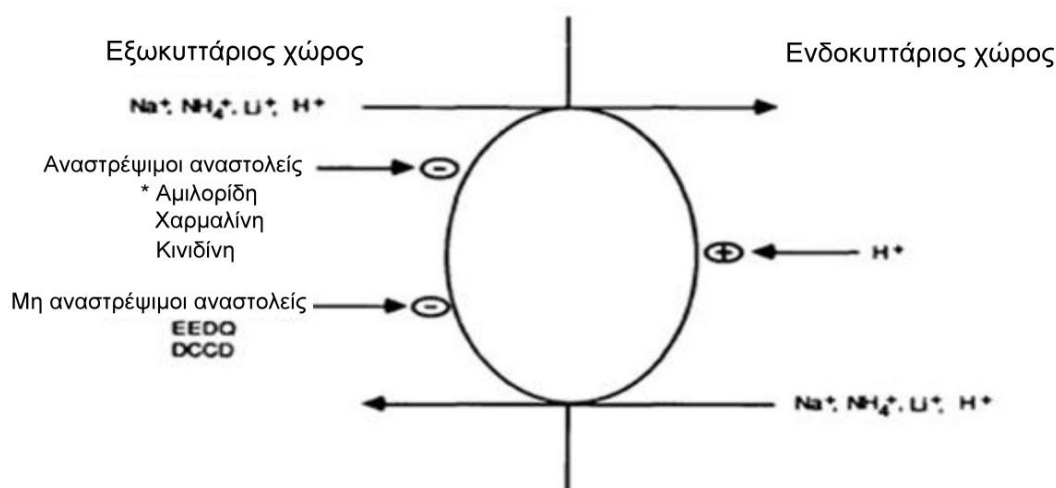
όμως χημική συγγένεια και με άλλα μονοσθενή κατιόντα όπως το NH_4^+ και το Li^+ . Έχει περιγραφεί επίσης ότι μπορεί να λειτουργήσει και με πολλούς άλλους τρόπους ως σύστημα ανταλλαγής $\text{Li}^+ - \text{H}^+$, $\text{Na}^+ - \text{Li}^+$, $\text{Na}^+ - \text{NH}_4^+$ και $\text{Na}^+ - \text{Na}^+$. Στην πραγματικότητα τα ιόντα αυτά ανταγωνίζονται μεταξύ τους στην πρόσδεση τους στην ίδια εξωτερική θέση. Η ακολουθία εκλεκτικότητας στη σύνδεση αυτών των κατιόντων είναι η ακόλουθη: $\text{H}^+ \gg \text{Li}^+ > \text{NH}_4^+ \approx \text{Na}^+$ (14). Πιθανός τρόπος λειτουργίας απεικονίζεται στην εικόνα 6.

Μεταβολές στη λειτουργία του αντιμεταφορέα $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ μπορεί να είναι σημαντικές για την αρτηριακή πίεση σε δύο κυρίως ιστούς, τον λείο αγγειακό μυ και το εγγύς νεφρικό σωληνάριο. Αυξημένη δραστηριότητα του έχει αναφερθεί στα λευκοκύτταρα και στα ερυθροκύτταρα, τόσο στην ιδιοπαθή υπέρταση, όσο και σε ινσουλινοεξαρτώμενους ασθενείς με στοιχεία νεφροπάθειας. Σε όλες τις περιπτώσεις αυτή η αυξημένη δραστηριότητα οφείλετο σε αυξημένη ταχύτητα του αντιμεταφορέα. Φαίνεται ότι μία κληρονομική προδιάθεση για ιδιοπαθή υπέρταση εμπλέκεται στην αύξηση του κινδύνου για διαβητική νεφροπάθεια (Trevisan *et al* 1997).

Στο εγγύς νεφρικό σωληνάριο, ο αντιμεταφορέας $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ εμπλέκεται στην επαναρόφηση των ιόντων Na^+ , Cl^- και HCO_3^- . Αρκετοί παράγοντες επηρεάζουν τον αντιμεταφορέα $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ στο εγγύς νεφρικό σωληνάριο. Η παραθορμόνη αναστέλλει τον μεταφορέα ενώ τα γλυκοκορτικοειδή, η θυρεοειδική ορμόνη, η αγγειοτενσίνη II καθώς και οι συνθήκες μεταβολικής οξείδωσης, τον διεγείρουν. Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες όπως π.χ. η αγγειοτενσίνη II, η αργινίνη, βασοπρεσίνη και οι κατεχολαμίνες είναι γνωστό ότι επιδρούν στο μεταφορέα $\text{Na}^+ - \text{H}^+$, τόσο στον λείο αγγειακό μυ, όσο και στο εγγύς νεφρικό σωληνάριο. Με αυτόν τον τρόπο παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης μέσω της επίδρασης στη ρύθμιση του όγκου και μέσω της περιφερικής αντίστασης. Οι βιοχημικοί μηχανισμοί

για τη δράση αυτή δεν είναι πλήρως διαλευκασμένοι, είναι όμως πιθανό να χρησιμοποιούν ένα δεύτερο αγγελιοφόρο όπως το cAMP, τις κινάσες πρωτεϊνών και πιθανόν την Ca^{++} -καδμουλίνη (Huot *et al* 1991).

Η πρωτεΐνη αντιμεταφορέας Na^+-H^+ αναστέλλεται από τη δράση της αμιλορίδης. Η αναστολή που προκαλεί η αμιλορίδη είναι γρήγορη και αναστρέψιμη όπως και η δράση των χημικών αναλόγων της που είναι διουρητικές ουσίες. Ο μεταφορέας αναστέλλεται και από άλλες ουσίες με μη αναστρέψιμη δράση (Εικόνα 6).



Εικόνα 6 Σχηματικό μοντέλο της ανταλλαγής Na^+-H^+ στην πλασματική μεμβράνη και των αναστολέων της (Huot *et al* 1991).

4.4.1. Δομή και λειτουργία των ισομορφών του NHE

Το σύστημα ανταλλαγής Na^+-H^+ (NHE) ταυτοποιήθηκε πρώτη φορά από τους Aickin και Thomas το 1977 ως ένα σύστημα ρύθμισης του ενδοκυττάριου pH. Το γονίδιο αναγνωρίστηκε και η μοριακή του δομή ταυτοποιήθηκε το 1989 (Sardet *et al* 1989). Ακολούθησαν πολλές μελέτες και μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 9 ισομορφές γονιδίων, στην οικογένεια του ανθρώπινου αντιμεταφορέα (NHE). Η ισομορφή NHE1 είναι πανταχού παρούσα στον οργανισμό και είναι γνωστή σαν το

ένζυμο «νοικοκύρης», “housekeeping enzyme”. Παίζει δε ρόλο σε δύο από τις σοβαρότερες ασθένειες που αντιμετωπίζει η κοινωνία μας σήμερα, την καρδιακή νόσο και τον καρκίνο, μέσω της ρύθμισης του ενδοκυττάρου pH. Οι άλλες 8 ισομορφές απαντώνται σε διαφορετικούς ιστούς, με διαφορετική θέση στο κύτταρο και διαφορετική έκφραση.

Η ιστορία των NHE είναι ενδιαφέρουσα αφού εκφράζονται εκτός από τα θηλαστικά, στα βακτήρια, στους μύκητες, στα φυτά και τα απλούστερα ζώα, χωρίς όμως να είναι ίδιος ο ρόλος και ο τρόπος λειτουργίας τους. Στα θηλαστικά ενεργοποιούνται από το χαμηλό pH, στους απλούστερους οργανισμούς αντίθετα ενεργοποιούνται από το υψηλό pH. Επίσης, η στοιχειομετρία ανταλλαγής ιόντων δεν είναι ομοιόμορφη. Στα βακτήρια είναι $1\text{Na}^+/2\text{H}^+$, στη ζύμη, τα θηλαστικά και τα φυτά είναι $1\text{Na}^+/1\text{H}^+$, ενώ στα ασπόνδυλα είναι $2\text{Na}^+/1\text{H}^+$. Διαφέρουν ακόμη και στη χημική συγγένεια τους με άλλα μονοσθενή ιόντα καθώς και στην αλληλουχία των αμινοξέων τους. Στην ανθρώπινη οικογένεια των hNHE η ταυτότητα των αμινοξέων κυμαίνεται μεταξύ 25% και 65% (Kemp *et al* 2008).

Στον άνθρωπο η ισομορφή NHE-1 εκφράζεται σε όλα τα είδη κυττάρων. Οι ισομορφές NHE-2, NHE-3 και NHE-4 τοποθετούνται ευρέως στο γαστρεντερικό σύστημα, ενώ η NHE-3 εκφράζεται πολύ στον νεφρό.

4.5. Το σύστημα αντιμεταφοράς Na^+/Li^+ ($\Sigma\text{A Na}^+/\text{Li}^+$)

Η παρουσία στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων ενός μεταφορέα ο οποίος μεσολαβεί στην ανταλλαγή ενδοκυττάρου λιθίου με εξωκυττάριο νάτριο προτάθηκε για πρώτη φορά το 1973. Η ιδέα βασίστηκε στην παρατήρηση ότι σε ασθενείς υπό θεραπεία με λίθιο, αυτό βρισκόταν σε χαμηλότερη συγκέντρωση στο εσωτερικό των ερυθροκυττάρων από ότι στο πλάσμα (Elizur *et al* 1972, Frazer *et al* 1973).

Πρόκειται για ένα σύστημα αμοιβαίας ανταλλαγής μονοσθενών ιόντων Na^+ προς Li^+ αντίθετα προς την κλίση των συγκεντρώσεων τους. Αντίθετα με την αντλία νατρίου, μεταφέρει Na^+ προς το εσωτερικό του κυττάρου με σύγχρονη αντίθετη κίνηση των ιόντων Li^+ προς το εξωτερικό του κυττάρου. Επειδή μπορεί να προκαλέσει τη μεταφορά λιθίου αντίθετα προς την ηλεκτροχημική του κλίση, οδηγούμενο από μία αντιθέτως κατευθυνόμενη ηλεκτροχημική διαφορά του νατρίου ονομάστηκε **σύστημα αντιμεταφοράς νατρίου-λιθίου** ($\Sigma\text{A Na}^+/\text{Li}^+$). Μετά τον εντοπισμό του συστήματος, ερευνητικές μελέτες επιβεβαίωσαν την ύπαρξη του, τόσο στα ερυθροκύτταρα του ανθρώπου αλλά και στα λεμφοκύτταρα, στους ινοβλάστες σε άλλους ιστούς καθώς και σε μία σειρά είδη του ζωικού βασιλείου (Haas *et al* 1975, Duhm *et al* 1979). Μελετάται κυρίως στα ερυθροκύτταρα.

Είναι ένα σύστημα, αμοιβαίας ανταλλαγής μονοσθενών ιόντων ένα προς ένα, ανθεκτικό στην ουαμπαΐνη, η οποία αναστέλλει την Na^+/K^+ ATPάση και στην αμιλορίδη, που αναστέλλει τον αντιμεταφορέα Na^+/H^+ , αναστέλλεται δε από τη φλωρετίνη. Το $\Sigma\text{A Na}^+/\text{Li}^+$ είναι ευαίσθητο στις μεταβολές του pH, έχει μέγιστη ενεργότητα σε $\text{pH} \geq 8$ και μειώνεται γρήγορα σε pH χαμηλότερο του φυσιολογικού. Είναι ευαίσθητο στη θερμοκρασία (μείωση ενεργότητας σε $T < 37^\circ \text{C}$). Το σύστημα αυτό ευνοεί την ανταλλαγή Na^+ με Na^+ , Li^+ με Li^+ ή Li^+ με Na^+ . Έχει 20 φορές μεγαλύτερη χημική συγγένεια με το λίθιο από ότι με το νάτριο και δεν δέχεται να μεταφέρει άλλα μονοσθενή ή δισθενή ιόντα (Elizur *et al* 1972). Ο μηχανισμός αυτός λειτουργεί και προς τις δύο κατευθύνσεις, μελετάται όμως συνήθως σε ερυθροκύτταρα φορτίζοντας τα με Li^+ και παρατηρώντας την εκροή του στο εξωκυττάριο περιβάλλον παρουσία νατρίου. Σε υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων Li^+ ή Na^+ , ή και των δύο, ο ρυθμός του μεταφορέα κορέννυται. Η μέγιστη ταχύτητα του

συστήματος αυτού (V_{max}) διαφέρει από άτομο σε άτομο λόγω, εν μέρει, γενετικών παραγόντων, φύλου, φυλής και μετά από άσκηση (Haas *et al* 1975).

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση του ΣΑ Na^+/Li^+ των ερυθροκυττάρων με την αρτηριακή πίεση (Turner ST 1985, Hunt 1986, Laurenzi 1989, Strazzulo 1989). Αντίστοιχα, πολλές κλινικές μελέτες κατέδειξαν υψηλότερες μέσες τιμές του ΣΑ Na^+/Li^+ σε ασθενείς με ιδιοπαθή υπέρταση συγκρινόμενες με νορμοτασικά άτομα. Αν και γενετικοί παράγοντες παίζουν μείζονα ρόλο στον προσδιορισμό του ΣΑ Na^+/Li^+ , η δραστηριότητα του βρέθηκε αυξημένη επίσης σε μια σειρά φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων όπως η εγκυμοσύνη, η λήψη αντισυλληπτικών, η διαβητική νεφροπάθεια, η υπερλιπιδαιμία και η παχυσαρκία. Αυτό υποδηλώνει ότι πολλοί περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν αυτό το συγκεκριμένο σύστημα μεταφοράς νατρίου (Strazzullo *et al* 1993), καθώς επίσης ότι είναι πιθανόν ορμονικοί παράγοντες να ρυθμίζουν τη δραστηριότητα του (Canessa *et al* 1994).

Το ΣΑ Na^+/Li^+ των ερυθροκυττάρων είναι ο καλύτερα χαρακτηρισμένος ενδιάμεσος φαινότυπος στην ιδιοπαθή υπέρταση, δεν έχει όμως ταυτοποιηθεί ακόμα ο γονότυπος του. Για πολλά χρόνια θεωρείτο ότι το ΣΑ Na^+/Li^+ βρίσκεται μόνο στα ερυθροκύτταρα. Αυτό δημιουργούσε σημαντικά ερωτήματα διότι τα ερυθροκύτταρα δεν εμπλέκονται άμεσα με την ιδιοπαθή υπέρταση και τη διαβητική νεφροπάθεια, ασθένειες με τις οποίες συσχετίζεται. Στην πορεία βρέθηκε να υπάρχει στα λεμφοκύτταρα και στους δερματικούς ινοβλάστες (Zerbini *et al* 2004). Είναι δε ενδιαφέρον, ότι το ΣΑ Na^+/Li^+ είναι αυξημένο στους ινοβλάστες ασθενών με ιδιοπαθή υπέρταση συγκρινόμενο με αυτό των φυσιολογικών μαρτύρων (Zerbini *et al* 2001).

Ο ρόλος του δεν είναι σαφής αφού το Li^+ δεν βρίσκεται φυσιολογικά στον οργανισμό. Σε απουσία λιθίου, μια ανταλλαγή Na^+/Na^+ μπορεί να επωφεληθεί του συστήματος αυτού χωρίς να είναι και ο κύριος ρόλος του. Το κύριο ενδιαφέρον είναι ότι παρουσιάζει αναλογίες με το σύστημα ανταλλαγής Na^+-H^+ που περιγράφηκε προηγουμένως. Παρόλο που τα χαρακτηριστικά τους δεν είναι πανομοιότυπα υπάρχουν πολλές ενδιαφέρουσες ομοιότητες ανάμεσα στα δύο συστήματα. Το ΣΑ Na^+/Li^+ στα ερυθροκύτταρα περιγράφηκε πρώτη φορά από την ομάδα του Tosteson το 1975. Την εποχή εκείνη πολλοί μελετούσαν τη μεταφορά του νατρίου δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης σε σχέση με την υπέρταση.

Ευρείες μελέτες του συστήματος ΣΑ Na^+/Li^+ σε μεγάλη ομάδα ατόμων αντιπροσωπευτική του πληθυσμού έδειξαν ότι στον πληθυσμό η κατανομή του συστήματος είναι συνεχής και διωνυμική και το εύρημα αυτό φαίνεται να έχει γενετική αιτιολογία (Boerwinkle *et al* 1986).

Το ΣΑ Na^+/Li^+ στα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι από τα πιο μελετημένα συστήματα στη διεθνή βιβλιογραφία, τα οποία είναι εύκολα προσβάσιμα και τα αποτελέσματα από τη μελέτη του ΣΑ Na^+/Li^+ σε αυτά είναι επαναλήψιμα .

4.6. Ομοιότητες και διαφορές μεταξύ του ΣΑ Na^+/Li^+ και του συστήματος ανταλλαγής Na^+-H^+ .

Υπάρχουν ενδείξεις ότι το Σ.Α. Na^+/Li^+ αντιπροσωπεύει την *in vitro* λειτουργία του συστήματος ανταλλαγής Na^+/H^+ στα ερυθροκύτταρα. Τα δύο συστήματα έχουν αρκετές ομοιότητες αλλά και διαφορές.

Ομοιότητες στα δύο συστήματα είναι η ένα προς ένα ανταλλαγή ιόντων δια μέσου της μεμβράνης, η οποία είναι ηλεκτρικά ουδέτερη, ακόμη η δράση τους είναι ανεξάρτητη από την ATP, είναι αμφότερα ανθεκτικά στην ουαμπαΐνη και έχουν

χημική συγγένεια με Na^+ , Li^+ και H^+ , με μεγαλύτερη συγγένεια προς το Li^+ απ' ό τι με το Na^+ . Στερούνται αμφότερα χημικής συγγένειας με τη χολίνη, το Cs^+ , το Rb^+ ή το K^+ . Η δραστηριότητα τους βρίσκεται αυξημένη στην ιδιοπαθή υπέρταση, ενώ σε φυσιολογικά άτομα είναι χαμηλή και αμφότερα υπόκεινται σε ορμονικές επιδράσεις.

Η βασική διαφορά τους είναι ότι η αμιλορίδη αναστέλλει την πρώτη ισομορφή του συστήματος ανταλλαγής $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ (NHE1), τη μόνη παρούσα στα ερυθροκύτταρα, ενώ το ΣΑ Na^+/Li^+ είναι ανθεκτικό σ' αυτήν. Μελέτες έχουν δείξει ότι μόνον ένα 30-50% του συστήματος ανταλλαγής $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ στα ερυθροκύτταρα είναι ευαίσθητο στην αμιλορίδη, ενώ ένα σημαντικό μέρος του είναι ανθεκτικό σε αυτήν (Huot *et al* 1991).

Ερευνητές έχουν περιγράψει ένα εναλλακτικό μάτισμα (splicing) του NHE1 αντιμεταφορέα Na^+/H^+ με το οποίο αφαιρείται η θέση πρόσδεση της αμιλορίδης. Έτσι ο μεταφορέας ανακτά την αντοχή του στην αμιλορίδη και την ευαισθησία του στη φλωρετίνη, χαρακτηριστικά που έχει το ΣΑ Na^+/Li^+ . Έτσι το γονίδιο του ισομερούς NHE1, το οποίο εκφράζεται στα ερυθροκύτταρα, είναι υποψήφιο για τη συμμετοχή του στην παθογένεση της υπέρτασης (Zerbini *et al* 2003). Ερευνητική μελέτη έδειξε ότι το γονίδιο της ισομορφής NHA₂ στον άνθρωπο είναι ανθεκτικό στην αμιλορίδη και αναστέλλεται από την φλωρετίνη, χαρακτηριστικά που έχουν περιγραφεί για τον αντιμεταφορέα του ΣΑ Na^+/Li^+ . Τα ευρήματα αυτά αυξάνουν την πιθανότητα τα γονίδια του NHA να συμμετέχουν στην έκφραση του αντιμεταφορέα του ΣΑ Na^+/Li^+ και στην ομοιόσταση του νατρίου στον άνθρωπο (Xinag *et al* 2007)

4.6.1. Το σύστημα αντιμεταφοράς Na^+/Li^+ (ΣΑ Na^+/Li^+) και υπέρταση

Το 1980 περιγράφηκε για πρώτη φορά, από την Canessa, η σύνδεση της αυξημένης δραστηριότητας του ΣΑ Na^+/Li^+ στα ερυθροκύτταρα με την ιδιοπαθή

υπέρταση (Canessa *et al* 1980). Σε μία ομάδα 36 ασθενών με ιδιοπαθή υπέρταση η δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ βρέθηκε αυξημένη, κατά το διπλάσιο, σε σχέση με ομάδα 26 φυσιολογικών ατόμων. Έκτοτε, ακολούθησαν πολλές μελέτες πάνω στο σύστημα αυτό. Η αυξημένη δραστηριότητά του συνδέεται με την ιδιοπαθή υπέρταση, τη διαβητική νεφροπάθεια και την υπερλιπιδαιμία. Σε μία μεγάλη μελέτη εξαιτούς παρακολούθησης με 1729 άνδρες και γυναίκες με φυσιολογική αρτηριακή πίεση (συστολική αρτηριακή πίεση <140 mmHg και διαστολική πίεση < 90 mmHg), στο Gubbio, μελετήθηκε η μέγιστη ταχύτητα (V_{\max}) του ΣΑ Na^+/Li^+ με τη μέθοδο της Canessa (Vacaro *et al* 2005). Συγκρίνοντας τα άτομα που παρέμειναν με φυσιολογική αρτηριακή πίεση στο τέλος της περιόδου, με αυτά που ανέπτυξαν στο διάστημα αυτό υπέρταση, η V_{\max} της δεύτερης ομάδας βρέθηκε στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη από αυτήν της πρώτης. Έτσι παρατηρήθηκε ότι το ΣΑ Na^+/Li^+ δεν είναι αυξημένο μόνο στα υπέρτασικά άτομα, αλλά και σε νορμοτασικά άτομα που ανέπτυξαν στη πορεία υπέρταση. Θεωρήθηκε λοιπόν ότι μπορεί να αποτελεί δείκτη γενετικής προδιάθεσης για την ανάπτυξη υπέρτασης (Laurenzi *et al* 1997). Ο ίδιος μεταφορέας συμμετέχει στη θεραπευτική δράση των αλάτων λιθίου που χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία ψυχικών διαταραχών. Παρόλα, αυτά η μοριακή ταυτότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ παραμένει άγνωστη.

4.6.2. Το σύστημα αντιμεταφοράς Na^+/Li^+ (ΣΑ Na^+/Li^+) και διαβήτης

Η δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ στα ερυθροκύτταρα έχει βρεθεί αυξημένη σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη και συνδέεται με την ανάπτυξη διαβητικής νεφροπάθειας (Vervoort *et al* 2002, Jones *et al* 1990). Εκτός από τη συσχέτιση του ΣΑ Na^+/Li^+ με την ιδιοπαθή υπέρταση, ερευνητές έχουν εντοπίσει ότι αυξημένη ανταλλαγή Na^+-H^+ παίζει σημαντικό ρόλο στην προδιάθεση για ιδιοπαθή υπέρταση,

σε μη ινσουλινοεξαρτώμενους διαβητικούς ασθενείς. Αρκετές μελέτες έδειξαν δυσανάλογα αυξημένες περιπτώσεις ιδιοπαθούς υπέρτασης σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 (ΣΔ1). Σύμφωνα με τα ευρήματα των μελετών αυτών μεταξύ των διαβητικών υπερτασικών υπάρχει μια μεγάλη υποομάδα με υπερινσουλιναμία και αντίσταση στην ινσουλίνη (Ferranini *et al* 1989, Modan *et al* 1985, Huot *et al* 1991).

Η συσχέτιση της υπέρτασης με την αντίσταση στην ινσουλίνη είναι καλά τεκμηριωμένη (De Fronzo *et al* 1991). Πολλές παρατηρήσεις οδήγησαν στην υπόθεση ότι η υπερινσουλιναμία και η αντίσταση στην ινσουλίνη μπορεί να παίζουν ένα παθοφυσιολογικό ρόλο στη διαδικασία της υπέρτασης. Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι υψηλά επίπεδα του ΣΑ Na^+/Li^+ εμφανίζονται συχνότερα σε υπερτασικά άτομα, τα οποία έχουν μεταβολικές διαταραχές και στη πλειοψηφία τους έχουν διαταραγμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη. Επίσης φαίνεται ότι ο διαβήτης, προκαλεί ο ίδιος αύξηση της δραστηριότητας του ΣΑ Na^+/Li^+ (Gall *et al* 1991).

Ασθενείς με ΣΔ1 και νεφροπάθεια έδειξαν αυξημένη τη V_{\max} του ΣΑ Na^+/Li^+ συγκρινόμενοι με ασθενείς χωρίς νεφροπάθεια (Jones *et al* 1990). Η αυξημένη δραστηριότητα των συστημάτων αντιμεταφοράς Na^+/Li^+ και Na^+-H^+ που παρατηρήθηκαν σε ΣΔ1 ασθενείς, δείχνουν ότι υπάρχει συσχέτιση με την επίδραση της ινσουλίνης (Canessa *et al* 1994). Επίσης, αυξημένη δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ φαίνεται να συνδέεται με την έλλειψη ευαισθησίας στην ινσουλίνη του ΣΔ1 ακόμη και απουσία νεφροπάθειας, υπερλιπιδαιμίας ή υπέρτασης (Catalano *et al* 1993).

Το 2005 η Vaccaro με την ομάδα της μακρόχρονης μελέτης του Gubbio σε 2167 ασθενείς, άνδρες και γυναίκες, κατέδειξαν ότι η δραστηριότητα ΣΑ Na^+/Li^+ είναι αυξημένη πολύ πριν, ακόμη και χρόνια, πριν εκδηλωθεί ο σακχαρώδης διαβήτης

και συνεπώς μπορεί να είναι ένας πρώιμος δείκτης για την ανάπτυξη του (Vaccaro *et al* 2005).

5. ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ

Η προεκκλαμψία αποτελεί τη σοβαρότερη διαταραχή της κύησης (3-5%), και αποτελεί την κύρια αιτία εμβρυϊκής και μητρικής νοσηρότητας καθώς και θνησιμότητας (10%-15% των προεκκλαμπτικών γυναικών). Αποτελεί την τρίτη κατά σειρά αιτία μητρικών θανάτων στις ΗΠΑ. Οδηγεί σε αυξημένη συχνότητα θνητότητας του εμβρύου προκαλώντας διαταραχές όπως αποκόλληση πλακούντα, υπολειπόμενη ανάπτυξη του εμβρύου και πρόωρο τοκετό (Turner *et al* 2010).

Τα συμπτώματα την προεκκλαμψίας εμφανίζονται μετά την 20^η εβδομάδα της κύησης και μπορεί να παραμείνουν μέχρι και 6-12 εβδομάδες μετά τον τοκετό. Διαγνωστικά κριτήρια της προεκκλαμψίας είναι η υπέρταση (αρτηριακή πίεση (ΣΑΠ) \geq 140 mmHg ή διαστολική αρτηριακή πίεση (ΔΑΠ) \geq 90 mmHg), οιδήματα και πρωτεϊνουρία \geq 300 mg/ 24 ωρο (Turner *et al* 2010).

5.1. Παθοφυσιολογία της προεκκλαμψίας

Πρόκειται για μία πολυσυστηματική νόσο της οποίας οι υπεύθυνοι παθογενετικοί μηχανισμοί δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί (Bagrov *et al* 2009). Εμπλέκονται δε σε αυτήν, εν δυνάμει, όλα τα συστήματα του οργανισμού (καρδιαγγειακό, αναπνευστικό, αιματολογικό, ενδοκρινικό, νεφρικό, ηπατικό, μητροπλακουντιακό). Μια ανώμαλη εισβολή τροφοβλαστικού ιστού στο τοίχωμα της μήτρας της μητέρας, στην 12^η με 13^η εβδομάδα της κύησης, είναι πιθανό να έχει αποτέλεσμα την εμφάνιση προεκκλαμψίας. Σημαντικό ρόλο στην προεκκλαμψία φαίνεται να παίζει το ανοσοποιητικό σύστημα. Η υποξία του πλακούντα προκαλεί απελευθέρωση κυτοκινών και φλεγμονωδών παραγόντων που έχουν ως αποτέλεσμα

τη βλάβη του μητρικού ενδοθηλίου που οδηγεί σε διαταραχή της μητροπλακουντιακής κυκλοφορίας (Turner *et al* 2010). Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης φαίνεται επίσης να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη προεκλαμψίας. Ενώ στη φυσιολογική κύηση έχουμε ρύθμισή του σε υψηλότερα επίπεδα, στην προεκλαμψία αυτή η εύθραυστη ισορροπία διαταράσσεται (Iraní *et al* 2008). Γενετικοί παράγοντες φαίνεται να εμπλέκονται επίσης στην παθογένεση της προεκλαμψίας. Η κληρονομικότητα μεταβιβάζεται τόσο μέσω των θυγατέρων όσο και των υιών, με τη συχνότητα να είναι σημαντικά υψηλότερη στις κόρες (23%), από ότι στις νύφες που είναι 10%. Δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στα ποσοστά στις εγγονές που εμφανίζουν προεκλαμψία συγκρίνοντας τις προερχόμενες από υιούς ή από θυγατέρες (Arngrimson *et al* 1990). Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης υπέρτασης και καρδιαγγειακής νόσου σε γυναίκες με ιστορικό προεκλαμψίας. Με αυτά τα δεδομένα, κατά τους ερευνητές, η προεκλαμψία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν προγνωστικός δείκτης για την εμφάνιση των ανωτέρω νοσημάτων (Garovic & August 2013).

5.2. Προεκλαμψία και σακχαρώδης διαβήτης

Στις διαβητικές γυναίκες η συχνότητα εμφάνισης της προεκλαμψίας κατά την κύηση είναι σχεδόν διπλάσια, απ' ότι στις φυσιολογικές μη διαβητικές γυναίκες, με ποσοστό 9,9%. Ακόμη και αν δεν υπολογίσουμε τις διαβητικές κυήσεις με επιπλοκές, όπως η νεφροπάθεια ή η χρόνια υπέρταση, το ποσοστό παραμένει υψηλό στο 8,9% (Garner *et al* 1990). Η πιθανότητα εμφάνισης προεκλαμψίας αυξάνει με την αύξηση της σοβαρότητας του διαβήτη όπως αυτός ταξινομείται κατά White (1949).

Στις διαβητικές γυναίκες, η εμφάνιση πρωτεϊνουρίας νωρίς στην κύηση, σε επίπεδα >190 mg/ημέρα, αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης προεκλαμψίας (Combs *et al* 1993).

5.3. Προεκλαμψία και ΣΑ Na^+/Li^+

Η δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ αυξάνεται κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής κύησης και επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα μετά τον τοκετό (Worley *et al* 1982, Rutherford *et al* 1992), αυξάνει δε ακόμη περισσότερο στην προεκλαμψία. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης δεν βρέθηκε διαφορά στα επίπεδα του ΣΑ Na^+/Li^+ μεταξύ υπερτασικών και μη γυναικών (Catalano *et al* 1993). Στη φυσιολογική κύηση, η συγκέντρωση των ιόντων Na^+ στα ερυθροκύτταρα αυξάνεται όπως και οι θέσεις πρόσδεσης της ουαμπαΐνης, ενώ η δραστηριότητα της συμμεταφοράς ιόντων Na^+-K^+ μειώνεται. Η συσσώρευση ενδοκυττάριου νατρίου στις γυναίκες με προεκλαμψία είναι πιθανό να οφείλεται στην αναστολή της αντλίας νατρίου ή στην ενεργοποίηση της συμμεταφοράς ιόντων Na^+-K^+ , ή του ΣΑ Na^+/Li^+ , που δρουν σαν αντισταθμιστικοί μηχανισμοί (Miyamoto *et al* 1992).

5.4. Προεκλαμψία και DLIS

Η κύηση συνδέεται με αύξηση του όγκου πλάσματος, μέσω της κατακράτησης νατρίου και υγρών από τα νεφρά. Είναι λοιπόν αναμενόμενο να μελετηθεί ο ρόλος των καρδιοτονωτικών γλυκοζιτών στην κύηση καθώς και του πιθανού τους ρόλου στην υπέρταση της κύησης και την προεκλαμψία. Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν αναφέρει αυξημένα επίπεδα ενδογενών DLIS και υψηλότερη ανασταλτική δράση της Na^+/K^+ ATPάσης στο πλάσμα προεκλαμπτικών γυναικών (Bagrov *et al* 2009). Ερευνητές έχουν υποστηρίξει ότι οι καρδιοτονωτικοί γλυκοζίτες όπως είναι τα DLIS

φαίνεται να συμβάλουν στην παθογένεση της προεκλαμψίας και ότι αύξηση των επιπέδων της μαρινομπουφαγενίνης (MBG), παρά της ουαμπαΐνης, ευθύνεται για την αναστολή της Na^+/K^+ ΑΤΡάσης (Hilton *et al* 1996).

6. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΙΔΙΟΠΑΘΟΥΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ

Η πρωτοπαθής ή ιδιοπαθής υπέρταση αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό νόσημα, η εμφάνιση και η σοβαρότητα του οποίου καθορίζεται από περιβαλλοντικούς αλλά και γενετικούς παράγοντες, οι οποίοι δεν είναι δυνατόν να διαχωριστούν μεταξύ τους. Η ιδιοπαθής υπέρταση είναι μια ετερογενής διαταραχή κατά την οποία ενοχοποιούνται διαφορετικοί παράγοντες που οδηγούν στην αυξημένη αρτηριακή πίεση (Armani *et al* 2011). Ένα ποσοστό 20%-50% των περιπτώσεων πρωτοπαθούς υπέρτασης αποδίδεται σε γενετική προέλευση (Gong *et al* 2006). Όποιες και αν είναι οι γενετικές μεταβλητές που σχετίζονται με την υπέρταση, μόνον όταν αλληλεπιδρούν με περιβαλλοντικούς παράγοντες οδηγούν στη νόσο. Στα ανεπτυγμένα κράτη, σε μεγάλο βαθμό η υπέρταση συνοδεύεται και από άλλες ασθένειες όπως παχυσαρκία, σακχαρώδη διαβήτη καθώς και διαταραχή μεταβολισμού της ινσουλίνης και της γλυκόζης, δυσλιπιδαιμία. Η συνύπαρξη αυτή υποδηλώνει ότι οι ασθένειες αυτές αποτελούν φαινοτυπικές πλευρές ενός συνδρόμου που προέρχεται από την έκφραση μιας ομάδας γονιδίων τα οποία, αρχικά στην εξέλιξη του ανθρώπου, χρησίμευαν στη διατήρηση και αποθήκευση θερμίδων και θρεπτικών στοιχείων ζωτικής ανάγκης για την επιβίωση, περιλαμβανομένου και του νατρίου. Οι ιδιότητες αυτές ήταν απαραίτητες στην παλαιολιθική εποχή, όταν η εύρεση τροφής ήταν απρόβλεπτη και καθόλου

εξασφαλισμένη. Στη σημερινή εποχή όμως της αφθονίας, δημιουργούν τα ανωτέρω προβλήματα (Weder *et al* 2007).

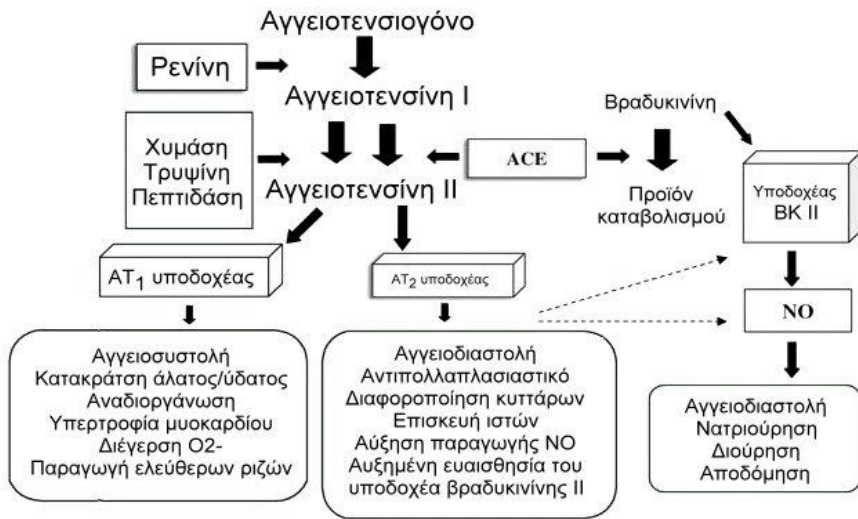
Το γενετικό υπόβαθρο της ιδιοπαθούς υπέρτασης δεν είναι αποσαφηνισμένο και δεν φαίνεται να σχετίζεται με ένα μόνο γονίδιο. Έχει ταυτοποιηθεί ένας αριθμός γονιδίων που συνδέονται με την ιδιοπαθή υπέρταση (Weder *et al* 2007) και κάποια από αυτά συνδέονται με την ευαισθησία της αρτηριακής πίεσης στο νάτριο.

6.1. Γονίδια της υπέρτασης

α. Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (RAAS) είναι ένας από τους ρυθμιστές-κλειδιά της αρτηριακής πίεσης στην ιδιοπαθή υπέρταση (Poch *et al* 2001) και έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας του καρδιαγγειακού συστήματος (Elton *et al* 2007, Armani *et al* 2011) και εμπλέκεται στο ισοζύγιο του νατρίου (Εικόνα 7α, 7β).

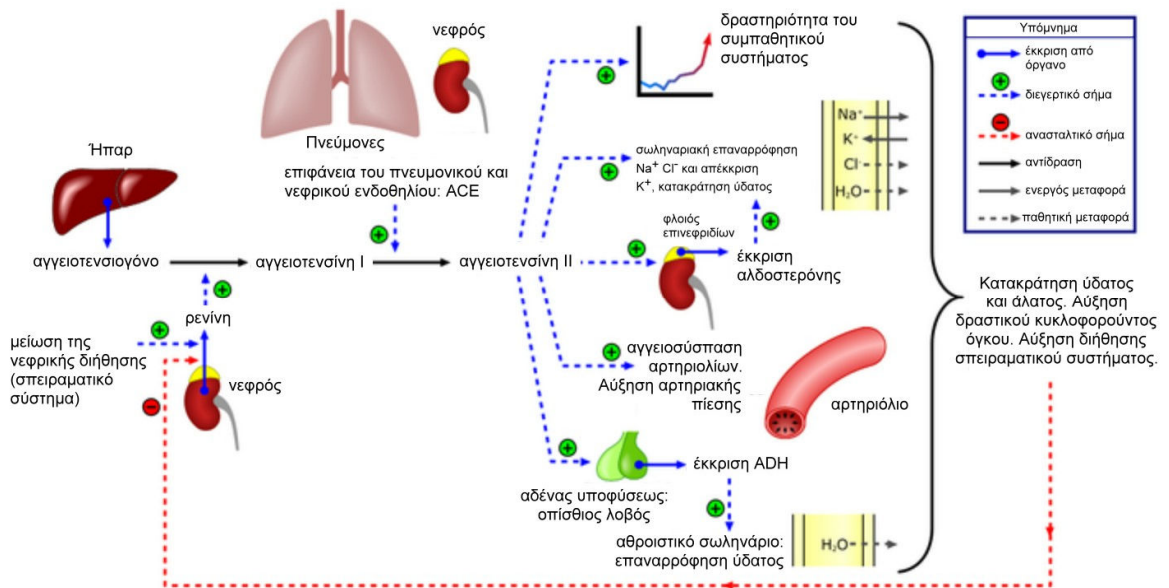
Πολυμορφισμοί στα γονίδια του RAAS περιλαμβανομένων των γονιδίων της ρενίνης (REN), του αγγειοτενσινογόνου (AGT), του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE), του υποδοχέα τύπου 1 της αγγειοτενσίνης II (AT1R) και της συνθετάσης της αλδοστερόνης (CYP11B2) είναι οι περισσότερο μελετημένοι πολυμορφισμοί (variants) συνδεόμενοι με διαφορετικές πλευρές της υπέρτασης (Tanira *et al* 2005) (Εικόνα 7α, 7β).

Σύστημα Ρενίνης - Αγγειοτενσίνης



Auer 2007. J. Kardiol. 14(1-2), 35-37

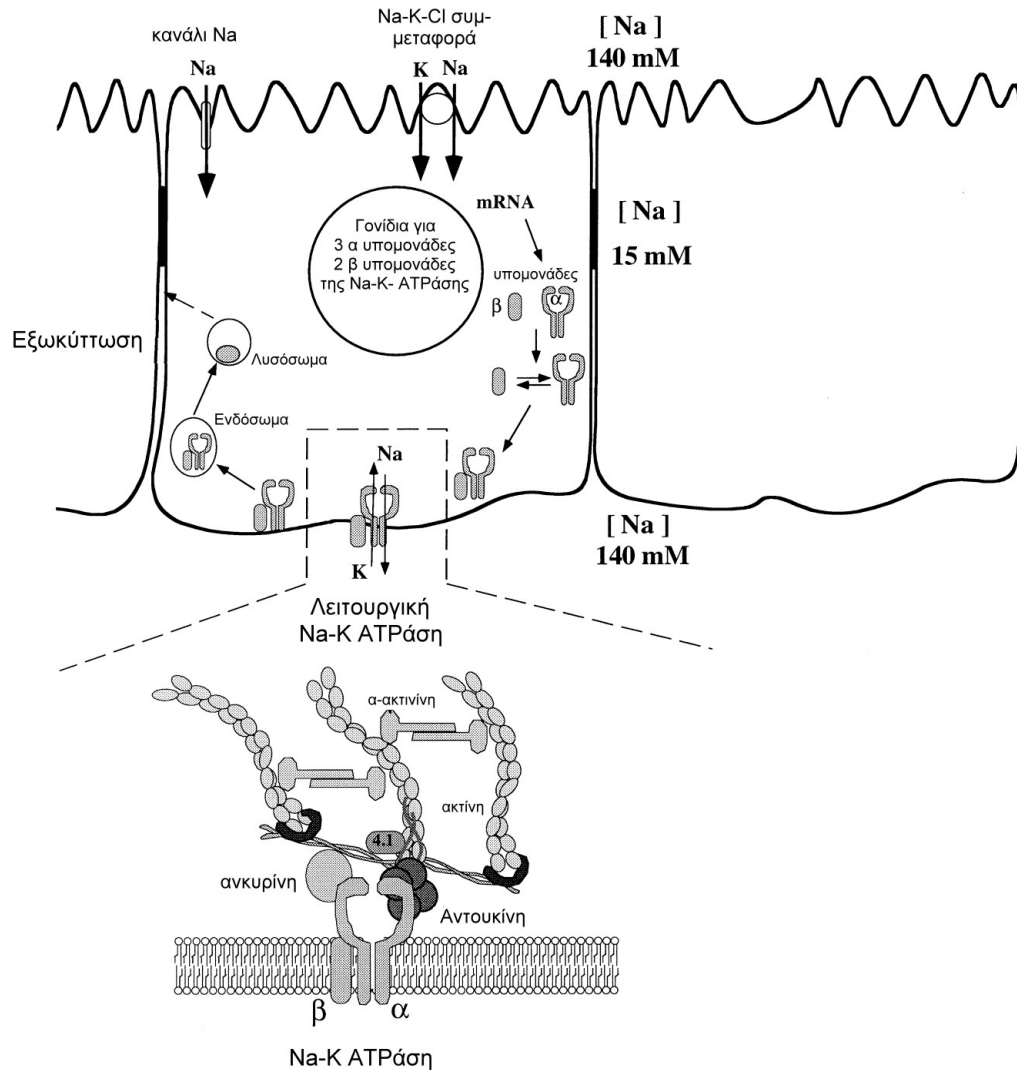
Εικόνα 7α Το σύστημα ρενίνης αγγειοτενσίνης



Εικόνα 7β. Το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης. Το σύστημα μπορεί να ενεργοποιηθεί με μία μείωση του όγκου αίματος ή με πτώση της αρτηριακής πίεσης όπως επί αιμορραγίας. Εναλλακτικά, ή μείωση της συγκέντρωσης του διηθούμενου NaCl και/ή ο μειωμένος ρυθμός διήθησης διεγείρει την πυκνή κηλίδα (macula densa) του νεφρού δίνοντας σήμα στο σπειραματικό σύστημα να απελευθερώσει ρενίνη (A. Rad 2006).

β. Η **αντουκίνη (adducin)** είναι μια κυτταροσκελετική πρωτεΐνη που φαίνεται να ρυθμίζει τη δραστηριότητα της Na^+/K^+ ΑΤΡάσης στα κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων, συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη νατριοευαίσθητης ιδιοπαθούς υπέρτασης (Cusi *et al* 1997, Casari *et al* 1995) (Εικόνα 7). Ο πολυμορφισμός $\text{Gly}^{460} \rightarrow \text{Tyr}$ της α -adducin είναι πιθανόν να επιδρά στην ομοίωση του νατρίου στον νεφρό και στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, μεταβάλλοντας τη μεταφορά ιόντων δια μέσου της μεμβράνης, όπως αυτή αντανάκλαται στα ερυθροκύτταρα (Glorioso *et al* 2002). Η ορμόνη αυτή, επηρεάζει ακόμη την μεταφορά ιόντων όπως αυτή μετράται με το ΣΑ Na^+/Li^+ στα ερυθροκύτταρα. Η ορμόνη αυτή, επηρεάζει την κινητική του ΣΑ Na^+/Li^+ στα ερυθροκύτταρα. Η επίδραση αυτού του γονότυπου διαφέρει στους ασθενείς με ιδιοπαθή υπέρταση, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα και δεν εξηγεί τη διαταραχή της κινητικής στους υπερτασικούς ασθενείς. Η χρήση ενός τέτοιου ενδιάμεσου φαινοτύπου μπορεί να είναι χρήσιμη για να διαφωτίσει σειρά γενετικών νοσημάτων όπως και την ιδιοπαθή υπέρταση (Mead *et al* 2005).

Γονίδια που κωδικοποιούν το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης, την α -αντουκίνη (ADD) και τη συνθετάση της αλδοστερόνης, επηρεάζουν την αρτηριακή πίεση μέσω της ομοίωσης του νατρίου (Staessen *et al* 2001).



Εικόνα 8 Σχηματικό μοντέλο της αλληλεπίδρασης της αντουκίνης με τον κυτταρικό σκελετό και τη μεμβρανική πρωτεΐνη στο κύτταρο του νεφρικού σωληναρίου. Η αντουκίνη συνδέεται με στοιχεία της ακτίνης και μιας υπομονάδας της Na-K ATPάσης. Πολυμορφισμοί της αντουκίνης είναι πιθανόν να επηρεάζουν τη μεταφορά νατρίου επιδρώντας στην αντλία Na-K. (Manunta *et al* 1998)

γ. Σηματοδοτικά μονοπάτια που συνδέονται με G πρωτεΐνες (G-protein signaling pathways).

Τα μονοπάτια αυτά επηρεάζονται από ορμόνες και νευροδιαβιβαστές και δρουν για να ρυθμίσουν την αρτηριακή πίεση. Για παράδειγμα, η β-3 υπομονάδα της G πρωτεΐνης (GNB3), ευνοεί την κατακράτηση του νατρίου και την αγγειοσυστολή. Το αλληλόμορφο 825T της GNB3 έχει παρατηρηθεί ότι έχει ισχυρή σύνδεση με τον

κίνδυνο ανάπτυξης υπέρτασης και με την νατριοευαίσθητη υπέρταση (Tanira *et al* 2005).

δ. Νοραδρενεργικά συστήματα.

Πολλές μελέτες αναφέρουν επίσης πως μια σειρά **μεταλλαγών του β₂-αδρενεργικού υποδοχέα** συνδέονται με μορφές της υπέρτασης συμπεριλαμβανομένης και της νατριοευαίσθησίας (Tanira *et al* 2005).

ε. Σύστημα ενδοθηλίνης.

Πρόκειται για μια οικογένεια αγγειοσυσταλτικών πεπτιδίων με τρία μέλη. Την ενδοθηλίνη-1 (ET-1), την ενδοθηλίνη-2 (ET-2), την ενδοθηλίνη-3 (ET-3) και τους υποδοχείς τους. Στην ιδιοπαθή υπέρταση αναφέρεται πως κυκλοφορούν υψηλά επίπεδα ενδοθηλίνης στο πλάσμα. Γενετικές μεταλλαγές των γονιδίων της ενδοθηλίνης εμπλέκονται στην αιτιολογία της υπέρτασης.

ζ. Κανάλια ιόντων.

Άλλα υποψήφια γονίδια, που θα μπορούσαν να επηρεάζουν τη νεφρική ομοιόσταση του νατρίου, είναι πιθανόν να επιδρούν στα επιθηλιακά κανάλια μεταφοράς νατρίου των περιφερειακών νεφρικών σωληναρίων (Weder *et al* 2007).

Πληθώρα μελετών και σειρά σύγχρονων μοριακών μεθόδων εστιάζουν στη γενετική διερεύνηση της παθογένεσης της υπέρτασης.

6.2.Σύγχρονες στρατηγικές που ακολουθούνται στη γενετική ανάλυση

1. Μέθοδος προσέγγισης με υποψήφια γονίδια (candidate genes)
2. Μέθοδος σάρωσης ολόκληρου του γονιδιώματος (genome-wide scan (GWS)) και γενετικής σύνδεσης (linkage analysis)
3. Χρήση ενδιάμεσου φαινότυπου
4. Συγκριτική γονιδιωματική

5. Συνδυασμός των ανωτέρω.

1. Με την μέθοδο της **προσέγγισης υποψήφιων γονιδίων (candidate genes)** έχουν περιγραφεί οι θέσεις (loci) τουλάχιστον 51 γονιδίων, που επηρεάζουν διαφορετικά συστήματα, ως προς τη φυσιολογία και τη βιοχημεία της ιδιοπαθούς υπέρτασης (Tanira *et al* 2005). Η μέθοδος παρουσιάζει προβλήματα στην αναπαραγωγή των αποτελεσμάτων, στην επαναληψιμότητα και δεν αναμένεται να περιλάβει όλα τα γονίδια και τους πολυμορφισμούς που ευθύνονται για το νόσημα αυτό.

Μελετήθηκαν γονίδια που κωδικοποιούν τα ευαίσθητα στην αμιλορίδη κανάλια νατρίου (SCNN1A, SCNN1B και SCNN1G). Το αλληλόμορφο G2139 του SCNN1A βρέθηκε ότι αυξάνει τον κίνδυνο για υπέρταση. Επίσης τα SCNN1A και SCNN1B φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεση της συστολικής αρτηριακής πίεσης (Wong *et al* 1999).

2. Με την μέθοδο της **σάρωσης όλου του γονιδιώματος [genome-wide scan (GWS)]** βρέθηκε σύνδεση (linkage) της συστολικής αρτηριακής πίεσης (ΣΑΠ) με τέσσερεις περιοχές του γονιδιώματος [2q22.1-2p21, 5q33.3-5q34, 6q23.1-6q24.1, 15q25.1-15q26.1] (Krushkal *et al* 1999), με μια θέση στο χρωμόσωμα 11q (Sharma *et al* 2000) και μια θέση στο χρωμόσωμα 17 συνδεδεμένο με την υπέρταση (Levy *et al* 2000). Ωστόσο, μελέτες με την μέθοδο αυτή (GWS), δεν κατάφεραν να βρουν σύνδεση με την ιδιοπαθή υπέρταση.

3. Με τη **χρήση ενδιάμεσων φαινοτύπων** περιγράφηκε ένα παράδειγμα ενδιάμεσου φαινοτύπου, σύμφωνα με τον οποίο η αγγειοτενσίνη II αδυνατεί να ρυθμίσει την έκκριση της αλδοστερόνης και την αιμάτωση των νεφρών, σε ένα υποσύνολο ασθενών με ιδιοπαθή υπέρταση (Williams *et al* 1992). Αργότερα ο φαινότυπος αυτός συνδέθηκε με μια αλλαγή στο γονότυπο του γονιδίου (M235T) του αγγειοτενσινογόνου (Hopkins *et al* 1996).

4. Μελέτη **γενετικής σύνδεσης** σε όλο το γονιδίωμα, σε δυο ανεξάρτητες οικογένειες της μελέτης Rochester Family Heart Study (RFHS), εντόπισε περιοχή στο χρωμόσωμα 10 που περιέχει πολυμορφισμούς (variants) οι οποίοι επηρεάζουν το ΣΑ Na^+/Li^+ (SLC) με $\text{LOD} \geq 2$ (log odds). Οι πολυμορφισμοί αυτοί είναι πιθανόν να επηρεάζουν την ευαισθησία στην υπέρταση (Morrison *et al* 2005). Ευρήματα με γενετική σύνδεση, σε συνδυασμό με κινητική μελέτη, έδειξαν ότι μεταλλαγές στο αλληλόμορφο SLC20A1 συνδέονται με τα επίπεδα ενεργότητας του ΣΑ Na^+/Li^+ και υποστηρίζουν ότι το SLC20A1 εμπλέκεται στον προσδιορισμό της (Zheng *et al* 2011).

5. Επίσης ο Xiang και συνεργάτες ανέφεραν την πιθανότητα τα γονίδια των ισομορφών του αντιμεταφορέα Na^+/H^+ να συμβάλουν στη δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ και στην ομοιόσταση του νατρίου στον άνθρωπο (Xiang *et al* 2007). Ένας αντιμεταφορέας που ανακαλύφθηκε με τη μέθοδο γενετικής σύνδεσης -ο ανθρώπινος NHA2- φαίνεται να εμπλέκεται στην ιδιοπαθή υπέρταση. Ο Kondapalli και συνεργάτες έδειξαν ότι ο NHA2 μεσολαβεί στην αντιμεταφορά Na^+/Li^+ , έναν καλά χαρακτηρισμένο δείκτη της ιδιοπαθούς υπέρτασης, ευαίσθητο στη φλωρετίνη (Kondapalli *et al* 2012).

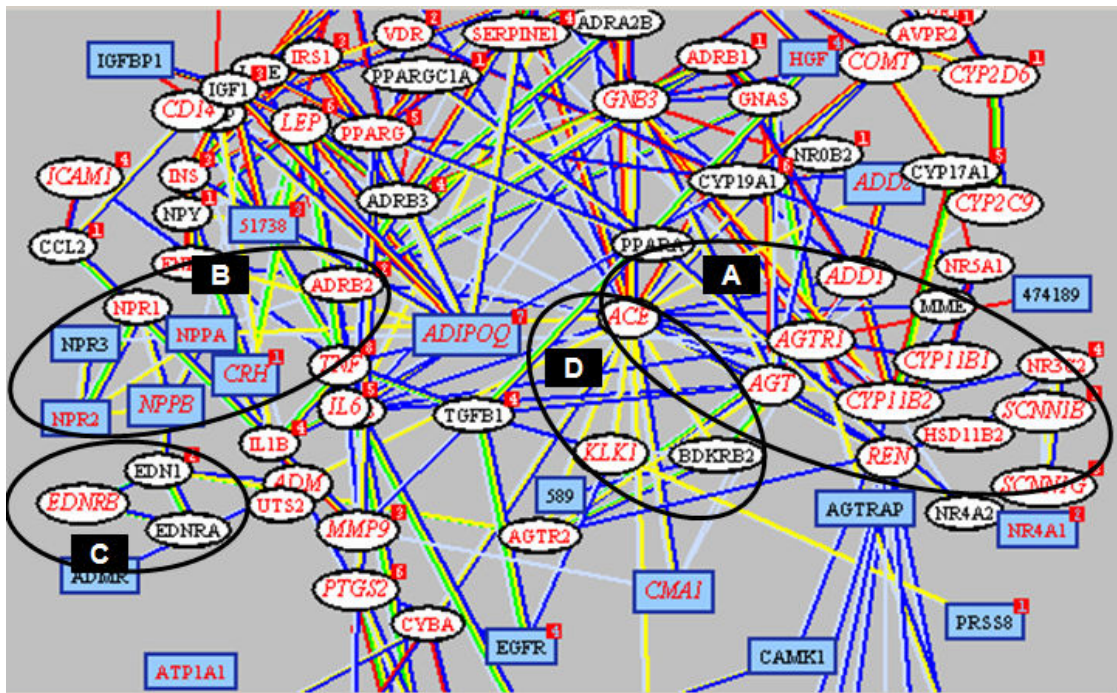
6. **Η συγκριτική γονιδιωματική** χρησιμοποιεί και συγκρίνει δεδομένα από μελέτες στο ζωικό βασίλειο για να εντοπίσει γονιδιακούς τόπους στον άνθρωπο. Το ανθρώπινο γονίδιο *SLC34A2* [στο χρωμόσωμα 4p15.1-p1.3] είναι ένα υποψήφιο γονίδιο θέσης για το ΣΑ Na^+/Li^+ (SLC). Μελέτη πολυμορφισμών του γονιδίου *SLC34A2* τόσο στον άνθρωπο όσο και στον μπαμπούνο έδειξαν ότι συνδέεται τη δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ και την αρτηριακή πίεση (Zheng *et al* 2009). Ακόμη μελέτη στηριζόμενη στη σύγκριση γονιδίων μεταξύ ανθρώπου και επίμων, βοήθησε στον εντοπισμό 26 θέσεων στο ανθρώπινο γονιδίωμα οι οποίες είναι πολύ πιθανό να περιέχουν γονίδια που εμπλέκονται στην υπέρταση (Stoll *et al* 2000).

7. **Συνδυασμός των ανωτέρω μεθόδων αποτελεί** μια συνθετική προσέγγιση μια μέθοδο τιτλοποίησης των γονιδίων (gene titration) με την οποία μελετάται, η επίδραση της διαφοροποίησης των επιπέδων έκφρασης ενός συγκεκριμένου γονιδίου στον φαινότυπο (Taniguchi *et al* 2005).

Η πρόοδος στην τεχνολογία της γονοτυπικής αποτύπωσης (genotyping) επέτρεψε τη χρήση τεράστιου αριθμού δεικτών (markers) για μελέτες γενετικής σύνδεσης με την χρήση ολόκληρου του γονιδιώματος. Έτσι, οι Sober και συνεργάτες υπολόγισαν 160 γονίδια υποψήφια για σύνδεση με την ιδιοπαθή υπέρταση, βασιζόμενοι σε αποτελέσματα γονοτυπικής αποτύπωσης (Genotyping), με μικροσυστοιχίες GeneChip Human Mapping 500k Array Set –Affymetrix. Καμία όμως σύνδεση δεν εμφάνισε επαρκή επίπεδα σημαντικότητας μετά τη διόρθωση για τον έλεγχο πολλαπλών υποθέσεων κατά Bonferroni (Sober *et al* 2009) .

Η υπέρταση είναι μια παθολογική οντότητα που περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις πολλών γονιδίων καθώς και περιβαλλοντικών παραγόντων. Μελέτες γονιδιώματος μεγάλης κλίμακας που πραγματοποιήθηκαν σε πληθυσμούς διαφορετικών εθνοτήτων, καθώς και μελέτες του μοντέλου αλληλεπίδρασης γονιδίων με διεθνείς συνεργασίες (consortiums), βοήθησαν και θα βοηθήσουν περισσότερο στο μέλλον στην ταυτοποίηση αλληλόμορφων που επηρεάζουν την αρτηριακή πίεση στον γενικό πληθυσμό και θα συμβάλλουν στην ανάπτυξη προσεγγίσεων για την καλύτερη πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία της νόσου.

Ο Yue και συν. απεικόνισαν σχηματικά τα γονίδια ή ομάδες γονιδίων που εμπλέκονται στην υπέρταση (Yue *et al* 2006) (Εικόνα 9)



Εικόνα 9 Γονίδια εμπλεκόμενα στην υπέρταση. Τα τέσσερα μεγαλύτερα οβάλ σχήματα περιβάλλουν ομάδες γονιδίων που ρυθμίζουν την αρτηριακή πίεση στην πρωτοπαθή υπέρταση το **A**: γονίδια του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης, **B**: γονίδια ρύθμισης νατριουρետικού πεπτιδίου, **C**: γονίδια ενδοθηλίνης, **D**: γονίδια βραδυκίνης και καλικρεΐνης. Τα μικρότερα οβάλ σχήματα περιβάλλουν γονίδια σχετιζόμενα με μονογονιδιακά νοσήματα και τα τετράγωνα τα υπόλοιπα νοσήματα. (Yue *et al* 2006)

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της μελέτης ήταν :

- 1) Η διερεύνηση πιθανής παθογενετικής σχέσης της ΠΕ με τη δραστηριότητα του ΣΑ $\text{Na}^+\text{-Li}^+$ στα ερυθροκύτταρα τόσο ινσουλινοεξαρτώμενων διαβητικών (ΣΔ1) όσο και ευγλυκαιμικών γυναικών, που εμφάνισαν προεκλαμψία κατά την κύηση.
- 2) Η διερεύνηση πιθανής παθογενετικής σχέσης της ΠΕ με τα επίπεδα των ενδογενών αναστολέων της Na^+/K^+ ΑΤΡάσης DLIS (digoxin-like immunoreactive substances) στο πλάσμα.
- 3) Η διερεύνηση ύπαρξης πιθανής γενετικής προδιάθεσης για την ανάπτυξη ΠΕ.

B. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η μελέτη σχεδιάστηκε με τρόπο ώστε να μπορούν να εξεταστούν οι διαφορές στη δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ στα ερυθρά αιμοσφαίρια, μεταξύ ινσουλινοεξαρτώμενων διαβητικών (ΣΔ1) και ευγλυκαιμικών γυναικών με ιστορικό προεκλαμψίας κατά την κύηση καθώς και στους γονείς τους. Για να αποφύγουμε την επίδραση της φυσιολογίας της κύησης στους παράγοντες που μελετήθηκαν ο έλεγχος έγινε τουλάχιστον 4 μήνες μετά τον τοκετό. Οι γυναίκες που συμμετείχαν στην έρευνα είχαν αρνητικό ιστορικό υπέρτασης.

Μελετήθηκαν συνολικά 72 άτομα, 59 γυναίκες και 26 γονείς 13 προεκλαμπτικών γυναικών.

1. Ομάδες ασθενών

- η 1η ομάδα περιλαμβάνει 12 ΣΔ1 γυναίκες, με ιστορικό υπέρτασης κατά την κύηση.
- η 2η ομάδα περιλαμβάνει 12 ΣΔ1 γυναίκες, χωρίς ιστορικό ΠΕ.
- η 3η ομάδα περιλαμβάνει 23 ευγλυκαιμικές γυναίκες, που εκδήλωσαν ΠΕ κατά την κύηση.
- η 4η ομάδα 12 φυσιολογικές γυναίκες με φυσιολογική κύηση, ως ομάδα μαρτύρων.

Για τη διερεύνηση πιθανού γενετικού παράγοντα σχετιζόμενου με την ΠΕ, μελετήθηκαν αμφότεροι οι γονείς 13 γυναικών, με ΠΕ κατά την κύηση, εφόσον ήταν και οι δύο ζώντες, διαμορφώνοντας δύο ομάδες:

- η 5^η ομάδα περιλαμβάνει 16 γονείς 8 γυναικών διαβητικών, με ΠΕ και
- η 6^η ομάδα περιλαμβάνει 10 γονείς 5 γυναικών ευγλυκαιμικών, με ΠΕ.

2. Κριτήρια επιλογής γυναικών

Οι γυναίκες άνηκαν στη λευκή φυλή και είχαν όλες ιστορικό με τουλάχιστον μια κύηση με υγιές παιδί, επίσης δεν είχαν αυξημένη αρτηριακή πίεση πριν την εγκυμοσύνη.

Η μελέτη έλαβε χώρα αφού παρήλθαν τουλάχιστον τέσσερις μήνες από τον τοκετό (κατά μέσο όρο 5 μήνες με εύρος 4-6 μήνες), οπότε οι παράγοντες που επηρεάζονται από την κύηση επανέρχονται στα φυσιολογικά επίπεδα. Άτομα με προϋπάρχουσα υπέρταση, καρδιακή ή νεφρική νόσο, αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

3. Προετοιμασία για αιμοληψία

Όλοι οι συμμετέχοντες προσήλθαν το πρωί της αιμοληψίας νήστεις.

Οι διαβητικές γυναίκες (ομάδες 1 και 2), το προηγούμενο διάστημα, βρισκόταν υπό τη συνήθη αντιδιαβητική τους διατροφή, η οποία ήταν παρόμοια και στις δύο ομάδες και καμία δεν ελάμβανε άλλο φάρμακο παρά μόνον ινσουλίνη. Την ημέρα της μελέτης δεν είχαν κάνει την πρωινή ένεση ινσουλίνης.

Οι γυναίκες των δύο μη διαβητικών ομάδων (3ης και 4ης) δεν ελάμβαναν καμία φαρμακευτική αγωγή.

Από τις συμμετέχουσες στη μελέτη, καμία δεν παρουσίαζε υπερλιπιδαιμία ή νόσο του θυρεοειδούς. Όλα τα άτομα είχαν στην καθημερινή τους ζωή παρόμοια επίπεδα φυσικής δραστηριότητας και τους ζητήθηκε να αποφύγουν βαριά άσκηση την προηγούμενη της αιμοληψίας. Το βάρος και το ύψος των ασθενών μετρήθηκε με ελαφρά ένδυση και χωρίς υποδήματα. Η πίεση μετρήθηκε με κλασσικό σφυγμομανόμετρο στον δεξί βραχίονα, από τον ίδιο εξεταστή, μετά από 10 λεπτή παραμονή σε ύπτια θέση. Η πίεση του αίματος εκφράζεται ως μέση αρτηριακή πίεση (ΜΑΠ). Αυτή υπολογίζεται ως το άθροισμα της διαστολικής πίεσης (ΔΑΠ) με το εν τρίτο της συστολικής (ΣΑΠ), (ΔΑΠ+1/3ΣΑΠ).

Σε όλα τα άτομα μετρήθηκαν ο Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) και οι βιοχημικοί δείκτες: τα επίπεδα της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c), κρεατινίνη ορού, ουρικό οξύ, κάλιο πλάσματος, νάτριο πλάσματος, αλβουμίνη ούρων 24ώρου.

Έξι από τις ΣΔ1 γυναίκες με ΠΕ και 15 από τις ευγλυκαιμικές με ΠΕ ήταν πρωτοτόκες.

4. Κριτήρια διάγνωσης προεκλαμψίας

Η διάγνωση της προεκλαμψίας έγινε στη βάση καταμέτρησης της αρτηριακής πίεσης, με κριτήρια (Miyamoto 1992):

- αρτηριακή πίεση μεγαλύτερη από 140/90 mmHg ή
- συστολική πίεση αυξημένη κατά 30 mmHg ή εναλλακτικά
- διαστολική πίεση μεγαλύτερη κατά 15 mmHg από τη βασική τιμή
σε τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες μετρήσεις μετά την 20^η εβδομάδα της κύησης
- πρωτεϊνουρία > 0,3gr/24h

Γ) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

ΑΝΤΙΜΕΤΑΦΟΡΑΣ Na^+/Li^+ ΣΕ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΑ

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ΣΑ Na^+/Li^+ ακολουθήθηκε τροποποιημένη η μέθοδος αναφοράς που περιέγραψε το 1980 η Canessa (Canessa *et al* 1980).

Η μέθοδος βασίζεται στη φόρτιση των ερυθροκυττάρων με Li, σε συνθήκες κορεσμού, δηλαδή συγκέντρωση ιόντων Li^+ στα 13 mM και Na^+ στα 5mM . Μελετάται η κινητική εξόδου του λιθίου από τα ερυθροκύτταρα σε περιβάλλον τόσο ελεύθερο νατρίου (NaF) όσο και σε περιβάλλον πλούσιο σε νάτριο (NaR) (NaCl 150 mM), με την παρουσία 0,1mM ουαμπαΐνης για την αναστολή της δράσης της K^+/Na^+ ATPάσης, ώστε να μην παρεμβαίνει η αντλία νατρίου στα αποτελέσματα. Προσδιορίζεται η έξοδος από τα ερυθροκύτταρα των ιόντων λιθίου στα 15 και 30 λεπτά της ώρας, σε συνθήκες μέγιστης ταχύτητας του συστήματος (V_{max}), δηλαδή σε pH:7.4 και θερμοκρασία 37⁰C. Τα αποτελέσματα ανάγονται στα 60 min με τη μέθοδο της γραμμικής εκτίμησης (linear estimation).

Αναλυτικά

Την ημέρα της αιμοληψίας οι ασθενείς προσέρχονται στις 8:00 το πρωί, νήστες και οι διαβητικές γυναίκες χωρίς τη πρωινή ένεση ινσουλίνης. Με φλεβοκέντηση χωρίς περίσφιξη, με πεταλούδα, λαμβάνονται 40 ml περιφερικού αίματος σε ηπαρινισμένη σύριγγα.

1.1. Απομόνωση ερυθρών

Η διαδικασία τελείται αυθημερόν και πρέπει να αρχίσει το αργότερο εντός διώρου (2h) από την αιμοληψία. Το αίμα διαμοιράζεται σε δύο σωληνάρια τύπου Falcon, 20 ml στο καθένα και φυγοκεντρείται για 10 min σε 1600 rpm. Το πλάσμα φυλάσσεται στους -20°C για τον προσδιορισμό των άλλων παραμέτρων, ενώ το υπόλοιπο υπερκείμενο μαζί με τα λευκά αιμοσφαίρια απομακρύνεται.

1.2. Έκπλυση ερυθρών

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια, αφού απομακρυνθούν με προσοχή τα λευκοκύτταρα, «πλένονται» πέντε (5) φορές με ισοοσμωτικό ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιέχει MgCl_2 1mM, $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{ClNO}$ (χλωριούχο χολίνη) 149 mM, Tris 10mM, γλυκόζη 10 mM και MOPS 10mM με $\text{pH}:7.4$, στους 4°C και ωσμωτική πίεση 280-300 mosmol/Kg βάρους (**διάλυμα A**). Κάθε έκπλυση ακολουθείται από μία φυγοκέντρωση στα 2000 rpm για 5 λεπτά της ώρας. Δίδεται προσοχή στην απομάκρυνση της ινικής και στη μη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Η επιτυχής έκπλυση των ερυθρών ελέγχεται με τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του νατρίου στο υπερκείμενο της τελευταίας έκπλυσης, το Na effluent (Na-efl). Η συγκέντρωση Na^+ στο Na-efl ελέγχεται και πρέπει να είναι πολύ χαμηλή.

Σε ένα μέρος των «πλυμένων» ερυθρών προστίθεται ποσότητα διαλύματος A, ίση με το 1/3 του όγκου τους και φυλάσσεται το δείγμα που ονομάζεται **VVS1**. Στο υπόλοιπο εναιώρημα ερυθρών ξεκινάει η διαδικασία φόρτισης τους με Li.

1.3. Φόρτιση ερυθρών με Li

Σε 2 σωληνάρια τύπου Falcon, τοποθετούνται 8 ml στο καθένα από τα «πλυμένα» ερυθροκύτταρα (packed red cells) και προστίθενται 40 ml διαλύματος LiCl (LiCl 13mM, Tris 10mM, MOPS 10mM, Glucose 10mM) PH: 7.4 με ωσμωτική πίεση 330 mosmol/Kg βάρους, σε αναλογία 1:6, για τον εμπλουτισμό τους με λίθιο, ώστε να κορεσθούν όλες οι ενδοκυττάρια θέσεις δέσμευσης λιθίου του μεταφορέα Na^+/Li^+ .

Ακολουθεί επώαση 3 ωρών, σε κινούμενο υδατόλουτρο, στους 37⁰ C.

1.4. Έκπλυση ερυθρών μετά την φόρτιση με Li

Μετά τη φόρτιση με λίθιο τα ερυθροκύτταρα «πλένονται» 4 φορές στο αρχικό διάλυμα (**διάλυμα Α**), ώστε να απομακρυνθεί το εξωκυττάριο Li.

Κάθε έκπλυση ακολουθείται από φυγοκέντρηση στα 2000 rpm για 5 min. Ακολούθως ενώνουμε το εναίωρημα των ερυθροκυττάρων των δύο σωληναρίων σε ένα, προσθέτουμε διάλυμα Α και φυγοκεντρούμε για 10 min στα 1600 rpm.

Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση απομακρύνουμε τη μεγαλύτερη ποσότητα του υπερκειμένου, αφήνοντας 10 ml διαλύματος Α στα εναπομείναντα ερυθρά. Ανακινούμε το εναπομείναν εναίωρημα, το φυλάσσουμε σε πάγο και το ονομάζουμε **VVS2**.

Το υπόλοιπο υπερκείμενο Li effluent (Li-efl) φυλάσσεται για τον έλεγχο της καλής απομάκρυνσης του Li. Προσδιορίζουμε σε αυτό τη συγκέντρωση του Li και αυτή δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 30 μM .

1.5. Κινητική του ΣΑ Na⁺/Li⁺

Το εναιώρημα VVS2 αποτελεί τη βάση της κινητικής μας.

4 ml από το VVS2 μεταφέρεται σε σωληνάριο με διάλυμα πλούσιο σε νάτριο (Na-R), με σύνθεση (NaCl 150 mM, γλυκόζη 10 mM, Tris, MOPS 10 mM και ουαμπαΐνη 0.1 mM), με pH:7,4 και οσμωτική πίεση 280-300 mosmol/Kg. Το διάλυμα Na-R φυλάσσεται μέχρι τη χρήση του στους 4⁰C.

Άλλα 4 ml από το VVS2 μεταφέρονται σε διάλυμα ελεύθερο νατρίου (Na-F) στο οποίο αντί NaCl περιέχεται χλωριούχος χολίνη (Choline Chloride) (148 mM).

Τα σωληνάρια με τα δείγματα VVS2 σε διαλύματα Na-R και Na-F τοποθετούνται σε κινούμενο υδατόλουτρο στους 37⁰C. Λαμβάνονται δείγματα στα 15 min και 30 min. Στη διάρκεια της κινητικής, το ΣΑ Na⁺/Li⁺ λειτουργεί σε συνθήκες μέγιστης ταχύτητας (V_{max}).

Η κινητική σταματά με τη μεταφορά των δειγμάτων στους 4⁰C, σε πάγο. Η δραστηριότητα του ΣΑ Na⁺/Li⁺, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, σταματά σε χαμηλή θερμοκρασία. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται και το υπερκείμενο φυλάσσεται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ιόντων Li.

1.6. Προσδιορισμός ενδοκυττάρων συγκεντρώσεων Νατρίου και

Καλίου (Na_i και K_i)

Οι ενδοκυττάρειες συγκεντρώσεις των ιόντων Na_i και K_i προσδιορίζονται στα εναιωρήματα VVS1 και VVS2.

1) Στο εναιώρημα VVS1 που κρατήθηκε πριν την κινητική, μετράται ο αιματοκρίτης και προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις των ενδοκυττάρων ιόντων Na_i και K_i αφού τα ερυθροκύτταρα λυθούν με απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα που προκύπτει ονομάζουμε VVS1-lysate (VVS1-lys). Στο δείγμα VVS1-lys

προσδιορίζουμε και την ενδοκυττάριο ποσότητα νερού υπολογίζοντας τη διαφορά βάρους πριν και μετά την ξήρανση του στους 80⁰ C για 24h.

2) Στο εναιώρημα VVS2 προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση ενδοκυττάρου Li, μετά από λύση των ερυθροκυττάρων με νερό (VVS2-lys), καθώς και τις ενδοκυττάρειες συγκεντρώσεις Na_i και K_i μετά το τέλος της κινητικής για να υπολογίσουμε τη μεταφορά των ιόντων υπολογίζοντας τη διαφορά των συγκεντρώσεων τους .

3) Για τον προσδιορισμό των ενδοκυττάρων συγκεντρώσεων Na_i και K_i στα ερυθροκύτταρα, αιμολύουμε το δείγμα VVS1 με δις απεσταγμένο νερό, σε αναλογία 1:50. Ακολουθούν αραιώσεις κατάλληλες για κάθε ιόν:

Για το Na⁺, τα προς μέτρηση δείγματα αραιώθηκαν 1:5 και για το K⁺ 1:20.

Για τη μέτρηση των ιόντων δημιουργούμε καμπύλες αναφοράς με διαδοχικές συγκεντρώσεις ως εξής:

Για το νάτριο, καμπύλη 6 σημείων, με εύρος 1-25 μM NaCl και

Για το κάλιο καμπύλη 6 σημείων, με εύρος 25-100 μM KCl.

Οι μετρήσεις τόσο των πρότυπων διαλυμάτων (καμπύλες αναφοράς) όσο και των δειγμάτων έγιναν σε φλογοφασματοφωτόμετρο εκπομπής, με φούρνο γραφίτη, της εταιρείας Perkin Elmer και σε μήκη κύματος 589 nm για το Na⁺ και 766,5 nm για το K⁺.

1.7. Προσδιορισμός των συγκεντρώσεων Li⁺.

Προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση Li στα 15min και στα 30 min και στα δύο διαλύματα, τόσο στο NaR όσο και στο ελεύθερο νατρίου (NaF). Η συγκέντρωση λιθίου στο NaF, αντιπροσωπεύει την παθητική έξοδο λιθίου και αφαιρείται από τη συγκέντρωση Li στο NaR διάλυμα για να υπολογιστεί η ταχύτητα εκροής του Li, που

συμμετέχει τον τελικό υπολογισμό της δραστηριότητας του ΣΑ Na^+/Li^+ , αφού έχει υπολογιστεί με βάση τον αιματοκρίτη του διαλύματος ο πραγματικός όγκος των ερυθροκυττάρων.

Όλα τα δείγματά φυλάχθηκαν στους -20°C και οι προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

Η συγκέντρωση Li τόσο στο διάλυμα NaF όσο και Na-R μετρήθηκε σε φλογοφασματοφωτόμετρο ατομικής εκπομπής-απορρόφησης με φούρνο γραφίτη Perkin Elmer.

Για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων Li^+ χρησιμοποιούμε τρεις καμπύλες διαδοχικών συγκεντρώσεων σε διαφορετικά διαλύματα και ανάλογα με το εύρος των συγκεντρώσεων που αναμένουμε. Μία καμπύλη σε διάλυμα Na-F με εύρος 0,5-40 μM LiCl, μία σε διάλυμα Na-R με εύρος 2,5-60 μM LiCl και μία καμπύλη με εύρος 40-130 μM σε απεσταγμένο νερό για το ενδοκυττάριο Li^+ . Η μέτρηση του λιθίου γίνεται σε μήκος κύματος 670,8 nm.

1.8. Προσδιορισμός της δραστηριότητας του ΣΑ Na^+/Li^+ .

Ο υπολογισμός της δραστηριότητας του ΣΑ Na^+/Li^+ ανάγεται στην ώρα. Προσδιορίζεται δε ως η ποσότητα Li που εκρέει σε μία ώρα ανά λίτρο ερυθρών λόγω της αντλίας Na^+/Li^+ . Η αναγωγή γίνεται με τη μέθοδο γραμμικής εκτίμησης (linear estimation) και αποτυπώνεται σε **mMLi/L ερυθρών/h**. Υπολογίζεται ως η διαφορά της συγκέντρωσης Li στο διάλυμα Na-F [C_F] από τη συγκέντρωση Li στο διάλυμα Na-R [C_R], στα 60min.

$$C_R - C_F = C_{60} \text{ διαιρούμενο δια } 1000 \rightarrow C_{60}/1000 = \text{mmolLi/L ερυθρών/h.}$$

2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ DLIS

2.1. Προετοιμασία δειγμάτων. Εκχύλιση πλάσματος.

Εκχυλίζουμε το πλάσμα των δειγμάτων για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και τη συμπύκνωση των DLIS.

Από 10 ml αίματος μετά από φυγοκέντρηση απομακρύνεται το πλάσμα. Τρία ml πλάσματος τοποθετούνται σε γυάλινο σωληνάριο με εσφυρισμένο πώμα και προστίθενται 9 ml καθαρό ακετονιτρίλιο (ACCN), το οποίο είναι οργανικός διαλύτης, σε αναλογία όγκων 1:3. Τα σωληνάρια ανακινούνται καλά σε περιστροφικό αναδευτήρα (vortex) και επωάζονται για 24 ώρες στους 4⁰ C για να ολοκληρωθεί η εκχύλιση.

Τα δείγματα φυγοκεντρώνται κατόπιν για 15min σε 700xg. Το υπερκείμενο μεταφέρεται προσεκτικά με γυάλινα μικροσιφώνια (τύπου Pasteur) σε καθαρό γυάλινο σωληνάριο όπου και εξατμίζονται μέχρι ξηρού, στους 37⁰ C, υπό συνεχή ροή αζώτου.

Για μεγαλύτερη ανάκτηση των DLIS ακολουθεί δεύτερη εκχύλιση των δειγμάτων διερχόμενα μέσω στερεού προσροφητικού φυσιγγίου Sep-Pak τύπου C 18 (Waters). Τα φυσιγγία έχουν προηγουμένως πλυθεί με 5ml ακετονιτρίλιο και κατόπιν με 5ml απεσταγμένου νερού.

Το ξηρό εκχύλισμα αναδιαλύεται σε 5ml απεσταγμένου νερού και αναρροφάται με πλαστική σύριγγα όγκου 20 ml. Αυτή προσαρμόζεται στο φυσιγγίο και με ελεγχόμενη πίεση του εμβόλου, το δείγμα περνάει με ταχύτητα 1 σταγόνα/δευτερόλεπτο.

Ακολουθεί έκπλυση του φυσιγγίου Sep-Pak με 5ml απεσταγμένου νερού και τέλος έκλουση των DLIS με 5ml ακετονιτρίλιου. Το έκλουσμα συλλέγεται σε

γυάλινα σωληνάρια και εξατμίζεται μέχρι ξηρού, στους 37⁰ C, υπό συνεχή ροή αζώτου.

Το στερεό υπόλειμμα διαλύεται σε 400μl ορού ελεύθερου διγοξίνης (DFS). Ο ορός αυτός προέρχεται από ελεγμένο ορό αίματος φυσιολογικών ενηλίκων, οι οποίοι προσήλθαν στο Α΄ Ενδοκρινολογικό Τμήμα του Νοσοκομείου ΑΛΕΞΑΝΑΝΔΡΑ. Στη συνέχεια προσδιορίζονται τα επίπεδα των DLIS με ραδιοανοσολογική μέθοδο διαμορφωμένη στο εργαστήριο μας (Loukari *et al* 1990).

2.2. Ραδιοανοσολογική μέθοδος προσδιορισμού (RIA) DLIS

με ¹²⁵ I-Digoxin και μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον της διγοξίνης.

Μέθοδος βασίζεται στην ανταγωνιστική δέσμευση της μελετώμενης ουσίας DLIS και της ραδιενεργού διγοξίνης επί ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος (Loukari *et al* 1990).

Χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα (standards) 6 επιπέδων με εύρος 0-5ng/ml. Για τη μέτρηση της μη ειδικής δέσμευσης (NSB) χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα χωρίς διγοξίνη (επίπεδο μηδέν).

Σε σωληνάριο τύπου RIA τοποθετούνται ίσες ποσότητες (100 μl) από τα δείγματα μας (εκχύλισμα πλάσματος προηγούμενης διαδικασίας) ή από τα πρότυπα διαλύματα, με 100 μl ¹²⁵ I-Digoxin από kit της RAINEN και 100 μl μονοκλωνικού αντισώματος.

Ακολουθεί επώαση για 24 ώρες στους 4⁰ C. Την επόμενη μέρα προστίθενται 100 μl δευτέρου αντισώματος εναντίον πρωτεϊνών σε όλα τα δείγματα και τα πρότυπα διαλύματα. Ακολουθεί επώαση 20-30 min στους 4⁰ C. Στη συνέχεια προστίθεται 1ml PEG (polyethylene glycole) για την κατακρήμνιση της δεσμευμένης ουσίας. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 20 min στους 4⁰ C σε 900xg.

Η ραδιενέργεια μετράται στο ίζημα, μετά από απόχυση του υπερκείμενου, σε αναλυτή γ ακτινοβολίας.

Οι συγκεντρώσεις υπολογίζονται με βάση την καμπύλη αναφοράς που σχηματίζεται από τα πρότυπα διαλύματα.

Η μέθοδος έχει ελεγχθεί για πιθανή διασταυρούμενη αντίδραση με στεροειδείς ορμόνες. Ανιχνεύτηκε μια μικρή διασταυρούμενη αντίδραση με την προγεστερόνη και την 17-OH-προγεστερόνη ενώ οι ορμόνες αλδοστερόνη, κορτιζόλη, θειική δεϋδροεπιανδροστενδιόνη (DHEA-S), οιστραδιόλη και τεστοστερόνη δεν ανιχνεύονται.

2.3. Βιοχημικοί προσδιορισμοί

Η γλυκόζη πλάσματος προσδιορίστηκε με ενζυματική μέθοδο εξωκινάσης της Boeringer Mannheim.

Οι συγκεντρώσεις πλάσματος νατρίου και καλίου προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο εκλεκτικών ηλεκτροδίων σε συσκευή Ciba-Corning.

Η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA1c) μετρήθηκε με την μέθοδο αναφοράς HPLC Menarini Diagnostics.

Οι συγκεντρώσεις της μικρολευκωματίνης ούρων προσδιορίστηκαν με ραδιοανοσολογική μέθοδο με RIA kit της Pharmacia.

3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι τιμές μας εκφράστηκαν ως $mean \pm SEM$ (μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής), εκτός αν αναφέρονται αλλιώς. Το Student t-test χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση δεδομένων με κανονική κατανομή, ενώ για σύγκριση δεδομένων μη προερχόμενων από κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε το Wilcoxon's test. Στατιστικώς σημαντικές θεωρήθηκαν διαφορές με $p < 0,05$.

Οι διαφορές μεταξύ των τεσσάρων ομάδων επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω με ανάλυση μεταβλητότητας (ANOVA) για να αυξηθεί η στατιστική ισχύς του ελέγχου των δειγμάτων μας και για να αποφύγουμε τις πολλαπλές συγκρίσεις με το t-test.

Η ύπαρξη πιθανών σχέσεων διερευνήθηκε με υπολογισμό του κατάλληλου συντελεστή συσχέτισης με επίπεδο σημαντικότητα $p < 0,05$.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων ομάδων ως προς την ηλικία και τον ΔΜΣ.

Η Μέση Αρτηριακή Πίεση ήταν εντός φυσιολογικών ορίων και στις 4 ομάδες. Ήταν όμως υψηλότερη στην ομάδα 3 (ΣΔ1 με ΠΕ) συγκριτικά με την ομάδα 4 (ΣΔ1 χωρίς ΠΕ), [92,5 (80-110) προς 87,3 (73-100)] με $p < 0,5$. Επίσης μεταξύ των μη-διαβητικών γυναικών, η ΜΑΠ είναι υψηλότερη σε αυτές με προϋπάρχουσα προεκλαμψία σε σχέση με τις φυσιολογικές [101,2 (88-133) προς (86,1 (72-95) mmHg] με $p < 0.01$ (Πίνακας 2).

Πίνακας 2 Κλινικά χαρακτηριστικά

	Ομάδα 1	Ομάδα 2	Ομάδα 3	Ομάδα 4
	ΣΔ1 με ΠΕ	ΣΔ1 χωρίς ΠΕ	Ευγλοκαϊμικές με ΠΕ	Φυσιολογικές
Αριθμός	12	12	23	12
Ηλικία (χρόνια)	29 (24-36)	28 (27-38)	31 (28-40)	32 (28-37)
BMI (kg/m ²)	24 (20-32)	25 (19-33)	26 (22-32)	25 (20-30)
Διάρκεια διαβήτη (έτη)	11(9-11)	10 (8-16)		
ΜΑΠ (mmHg)	92.5 (80-110)	87.3 (73-100) *	101 (88-133)	85 (72-95)**

Π.Ε.: Αρτηριακή υπέρταση, BMI: δείκτης μάζας σώματος,

ΜΑΠ: Μέση αρτηριακή πίεση

Η ΜΑΠ είναι σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα 1 συγκριτικά με την ομάδα 2: * $p < 0.05$

Η ΜΑΠ είναι σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα 3 συγκριτικά με την ομάδα 4: ** $p < 0.01$

2. ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Διαβητικές γυναίκες με ΠΕ ή χωρίς ΠΕ είχαν παρόμοιο γλυκαιμικό έλεγχο όπως φαίνεται από τα επίπεδα γλυκόζης (170 προς 180 mg/dl) και γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης [6,8 (4,8-9,1) προς 6,9 (4,9-8,6)].

Επίσης οι τιμές της κρεατινίνης, του ουρικού οξέος πλάσματος, του καλίου και του νατρίου δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά στις ομάδες με προεκλαμψία.

Οι τιμές εκφράζονται με την μέση τιμή και εντός παρενθέσεως το εύρος τιμών.

Τα επίπεδα μικρολευκωματίνης ούρων είχαν σημαντική διαφορά μεταξύ των διαβητικών ομάδων. Ήταν υψηλότερα στην ομάδα 1 [67 (15,3-120,5) συγκριτικά με την ομάδα 2 (16,7 (0,69-36,3), $p<0.01$] (Πίνακας 2) οι τιμές εκφράζονται με τον γεωμετρικό μέσο και το εύρος των τιμών εντός παρενθέσεως. Τα επίπεδα της μικρολευκωματίνης ούρων μεταξύ των μη-διαβητικών ομάδων 3 και 4, δεν διέφεραν σημαντικά [35 (1,36-68) προς 19,1 (1,2-29,5) mg/24h] (Πίνακας 3).

Πίνακας 3 Βιοχημικά χαρακτηριστικά

	Ομάδα 1	Ομάδα 2
	ΣΔΙ ΜΕ ΠΕ	ΣΔΙ ΧΩΡΙΣ ΠΕ
HbA1c (%)	6.8 (4.8-9.1)	6.9 (4.9-8.)
Κρεατινίνη ορού (mg/dl)	0.77 (0.5-1.2)	0.75 (0.4-1.1)
Ουρικό οξύ (mg/dl)	4.0 (2.8-5.0)	3.8 (2.9-5.1)
K πλάσματος mmol/L	4.1 (3.6-5.2)	3.9 (3.7-4.8)
Na πλάσματος mmol/L	138 (136-143)	139 (136-143)
Ρυθμός απέκκρισης αλβουμίνης (mg/24h)**	67 (15.3-120.5)*	16.7 (0.69-36.3)*

* $P<0.01$

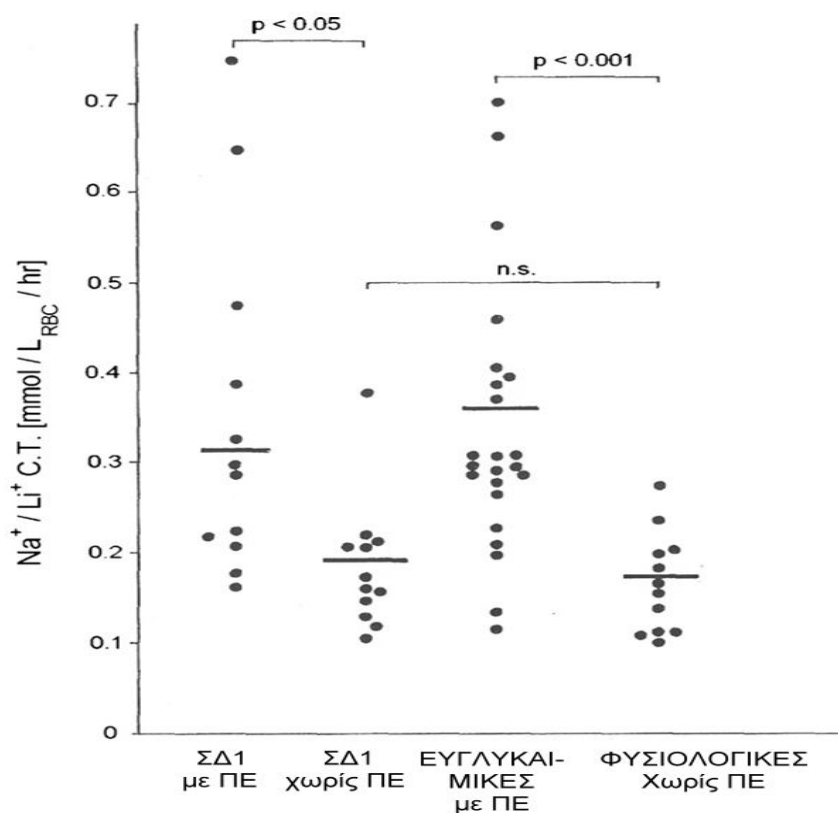
** ρυθμός απέκκρισης αλβουμίνης: γεωμετρικός μέσος (εύρος τιμών)

3. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΟΥ ΣΑ Na^+/Li^+ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΙΟΝΤΩΝ

3.1. Η δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ ήταν υψηλότερη στην ομάδα 1 (ΣΔ1 με ΠΕ) σε σύγκριση με την ομάδα 2 (ΣΔ1 χωρίς ΠΕ) ($0,31 \pm 0,05$ προς $0,19 \pm 0,02$ mmol/Λερυθρών/h, $p < 0.14$) και στην ομάδα 3 (ευγλυκαιμικές με ΠΕ) συγκριτικά με την ομάδα 4 (φυσιολογικές) (0.36 ± 0.04 προς $0,17 \pm 0,01$ mmol/Λερυθρών/h, $p < 0.013$) (Πίνακας 4) (Εικόνα 10).

Πίνακας 4 Δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ σε mmol/Λερυθρών/h εκφρασμένη σε $\text{mean} \pm 2\text{SE}$

ΣΔ1 με ΠΕ	ΣΔ1 χωρίς ΠΕ	Ευγλυκαιμικές με ΠΕ	Φυσιολογικές
$0,31 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,04$	$0,17 \pm 0,01$
$p < 0,05$		$p < 0,001$	



Εικόνα 10 Η δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ στις 4 ομάδες γυναικών

3.2. Η συγκέντρωση του ενδοκυττάριου Na_i ήταν υψηλότερη στην

ομάδα 1 συγκριτικά με την ομάδα 2 (6.72 ± 0.52 προς 5.61 ± 0.40 mmol/L, ενώ η συγκέντρωση του ενδοκυττάριου K_i δεν διέφερε σημαντικά. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των ενδοκυττάριων συγκεντρώσεων Na_i και K_i μεταξύ των μη-διαβητικών ομάδων (Πίνακας 5).

Πίνακας 5 Ενδοκυττάριες συγκεντρώσεις ιόντων Na_i και K_i

	Ομάδα 1	Ομάδα 2	Ομάδα 3	Ομάδα 3
	ΣΔ1 με ΠΕ	ΣΔ1 χωρίς ΠΕ	Ευγλυκαιμικές με ΠΕ	Φυσιολογικές
Na_i mmol/Lκυττ	6,72±0,52*	5,61±0,40*	6,49±046	5,9±0,6
K_i mmol/Lκυττ	127±9,7	146,7±7,1	130±8,2	128±9,8

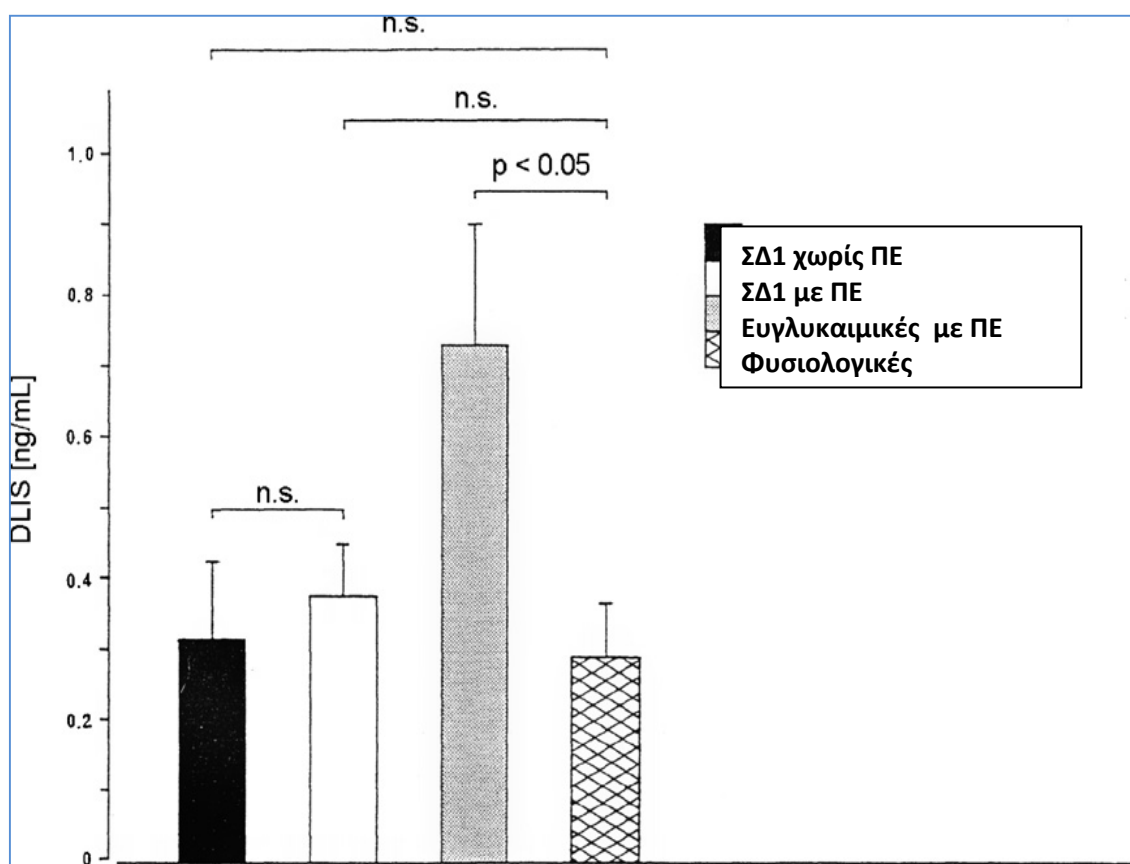
*P< 0.04

4. ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ DLIS

Τα επίπεδα των DLIS βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα 3 (μη διαβητικές με ΠΕ) συγκριτικά με την ομάδα 4 (μη διαβητικές χωρίς προεκλαμψία) (0.73 ± 0.19 ng/ml vs 0.30 ± 0.07 ng/ml, $p < 0.03$). Αντιθέτως μη σημαντικές ήταν οι διαφορές μεταξύ των ομάδων 1 (ΣΔ1 με ΠΕ) και 2 (ΣΔ1 χωρίς ΠΕ) (0.32 ± 0.10 vs 0.26 ± 0.09 ng/ml). Εικόνα 10, Πίνακας 6.

Πίνακας 6 Συγκεντρώσεις DLIS

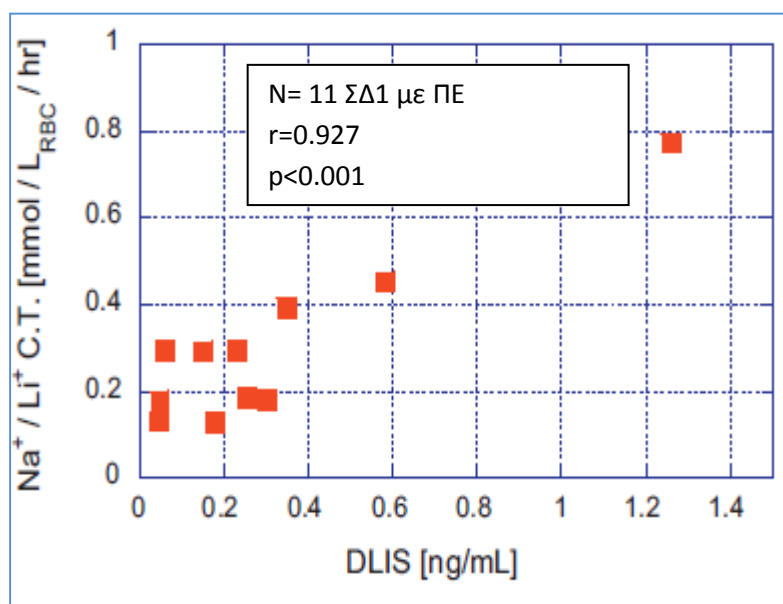
	Ομάδα 1	Ομάδα 2	Ομάδα 3	Ομάδα 4
	ΣΔ1 με Π.Ε.	ΣΔ1 χωρίς Π.Ε.	Ευγλυκαιμικές με Π.Ε.	Φυσιολογικές
Αριθμός	23	12	23	12
DLIS ng/ml	0.32 (± 0.10)	0.26 (± 0.09)	0.73 (± 0.19)*	0.30 (± 0.07) *
	*p<0.03			



Εικόνα 11 Τα επίπεδα των DLIS στις 4 ομάδες γυναικών

5. ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ Σ.Α. Na⁺/Li⁺ ΚΑΙ DLIS

Με ανάλυση συσχέτισης (correlation analysis) βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ενεργότητας του Σ.Α. Na⁺/Li⁺ και των DLIS στις ΣΔ1 γυναίκες με προεκλαμψία (r=0.927, p<0.001) (Εικόνα 11) και στα μη διαβητικά άτομα με ΠΕ (r=0.485, p<0.05)



Εικόνα 12 Συσχέτιση Του ΣΑ Na⁺/Li⁺ και των DLIS στις ΣΔ1 με ΠΕ

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ

Η δραστηριότητα του Σ.Α. Na⁺/Li⁺ βρέθηκε αυξημένη στις γυναίκες με προεκλαμψία διαβητικές και μη, γι αυτό προχωρήσαμε στη διερεύνηση πιθανής γενετικής συσχέτισης της δραστηριότητας του Σ.Α. Na⁺/Li⁺ και των επιπέδων ενδογενούς ομοιάζουσας με διγοξίνη ουσίας (DLIS) με τη προεκλαμψία.

Για τον σκοπό αυτό μελετήσαμε τους γονείς των γυναικών που εμφάνισαν προεκλαμψία κατά την κύηση διαβητικών και μη-διαβητικών.

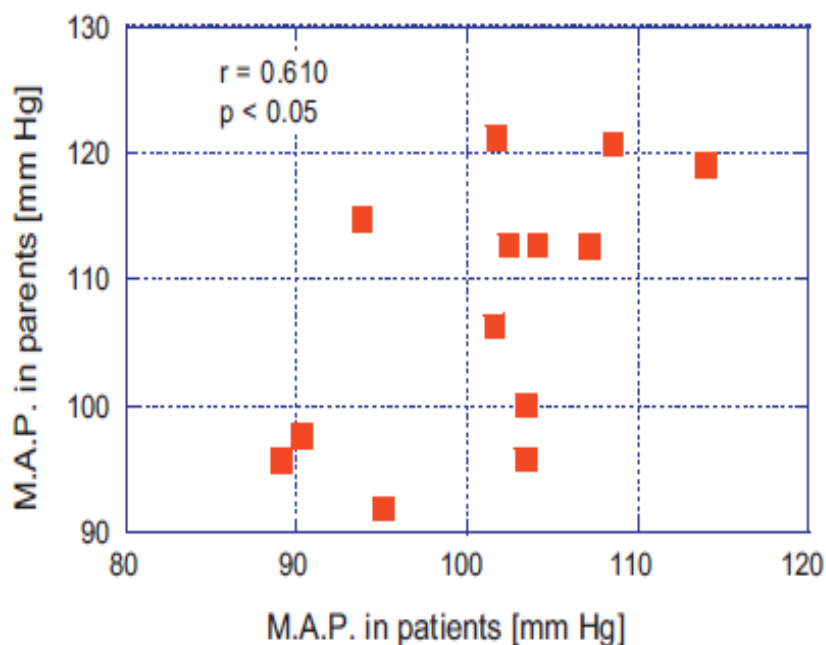
Επιλέξαμε από όσους γονείς είχαν τη θέληση να συμμετάσχουν στη μελέτη μόνο τις περιπτώσεις στις οποίες και οι δύο γονείς ήταν εν ζωή.

Είχαμε δύο ομάδες γονέων από 13 γυναίκες με ΠΕ, διαβητικές και μη: η 5^η ομάδα περιλαμβάνει 8 γονείς διαβητικών γυναικών που εμφάνισαν ΠΕ κατά την κύηση και η 6^η ομάδα περιλαμβάνει 5 γονείς μη-διαβητικών γυναικών που εμφάνισαν ΠΕ κατά την κύηση.

Μετρήθηκαν σε αυτούς η μέση αρτηριακή πίεση και προσδιορίστηκε η δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ καθώς και τα επίπεδα των ενδογενών παρόμοιων με διγοξίνη ουσιών (DLIS) στο πλάσμα. Υπολογίσαμε τη μέση τιμή των παραμέτρων από τους δύο γονείς.

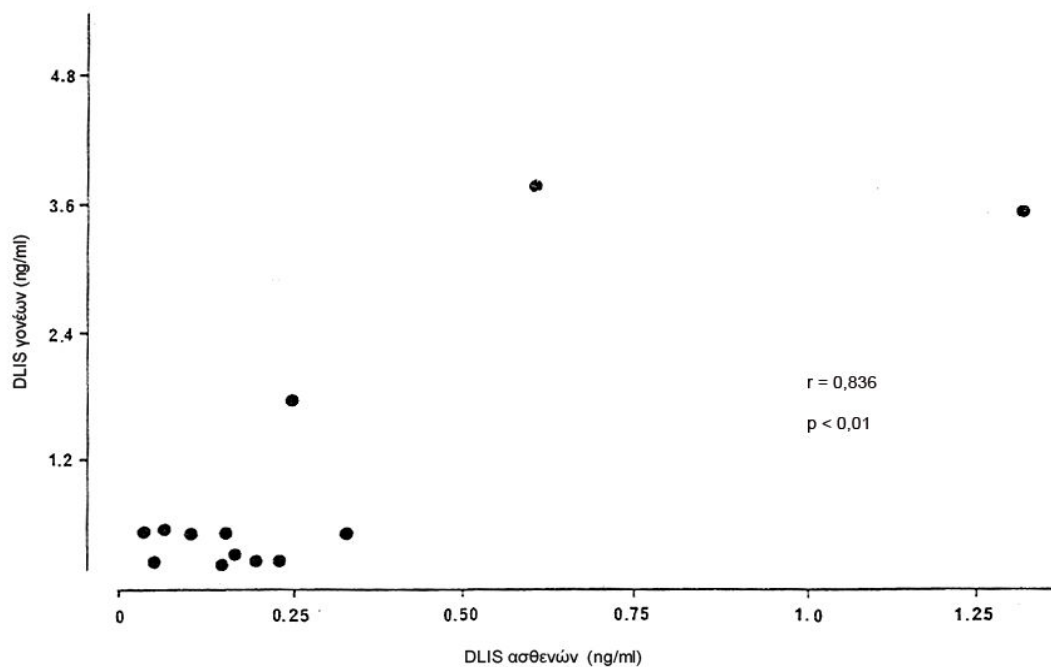
α) Η μέση αρτηριακή πίεση των δύο γονέων της κάθε ασθενούς υπολογίστηκε και βρέθηκε να έχει θετική συσχέτιση με αυτήν των θυγατέρων ($r=0.610$, $p<0.005$)

(Εικόνα 13)



Εικόνα 13 Συσχέτιση της ΜΑΠ γονέων και θυγατέρων

β) Θετική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ των επιπέδων DLIS των γονέων με αυτά των θυγατέρων τους με ΠΕ ($r=0.836$, $p<0.01$), (Εικόνα 14).



Εικόνα 14 Συσχέτιση των DLIS μεταξύ γονέων και θυγατέρων

γ) Δεν βρέθηκε συσχέτιση Σ.Α. Na^+/Li^+ μεταξύ γονέων και των θυγατέρων τους με ΠΕ.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ιδιοπαθής υπέρταση αποτελεί μια από τις συχνότερες και σοβαρότερες ασθένειες του σύγχρονου κόσμου. Πρόκειται για μια πολύπλοκη πολυπαραγοντική νόσος με γενετικό και περιβαλλοντικό υπόβαθρο, η παθογένεση της οποίας-παρά τις πολύχρονες και πολυάριθμες μελέτες-δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως.

Επίσης η προεκλαμψία είναι μια πολυοργανική διαταραχή της κύησης, αγνώστου αιτιολογίας, με κύριο σύμπτωμα της την αυξημένη αρτηριακή πίεση. Πρόσφατες μελέτες συνδυάζουν την προεκλαμψία με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου (Garovic & August 2013).

Ο στόχος της μελέτης μας ήταν να διερευνήσουμε την παθογένεια της προεκλαμψίας καθώς και την πιθανή γενετική της επιβάρυνση. Στη μελέτη μας εξετάστηκαν γυναίκες ινσουλινοεξαρτώμενες διαβητικές (ΣΔ1) και ευγλυκαιμικές, οι οποίες είχαν αναπτύξει υπέρταση για πρώτη φορά μετά την 20^η εβδομάδα της κύησης, συνοδευόμενη από πρωτεϊνουρία και οίδημα σύμφωνα με τα κριτήρια ταξινόμησης της προεκλαμψίας (Miyamoto *et al* 1992, Sibai 2003). Οι ασθενείς ήταν φυσιολογικές προ κυήσεως. Έχει παρατηρηθεί από ερευνητικές μελέτες ότι στην προεκλαμψία αυξάνεται η V_{max} του ΣΑ Na^+/Li^+ , που είναι δείκτης για την ανάπτυξη υπέρτασης, και επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα μετά τον τοκετό (Rutherford *et al* 1992). Ο Adair και συνεργάτες αναφέρουν ότι η βαριά προεκλαμψία συνδέεται με σημαντική μείωση της ενεργότητας της αντλίας Na^+ στα ερυθροκύτταρα, σε σχέση με τις νορμοτασικές γυναίκες (Adair 2009).

Για να αποφευχθεί η επίδραση της κύησης στα αποτελέσματα της μελέτης, αυτή διεξήχθη τουλάχιστον 4 μήνες μετά τον τοκετό, σε περίοδο που οι παράγοντες που επηρεάζονται από την κύηση έχουν επανέλθει στα φυσιολογικά επίπεδα.

Βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη την αρτηριακή πίεση στις γυναίκες που είχαν αναπτύξει προεκλαμψία, τόσο τις διαβητικές (ομάδα 1) όσο και τις ευγλυκαιμικές (ομάδα 3), σε αντίθεση με τις γυναίκες χωρίς προεκλαμψία διαβητικές (ομάδα 2) και τις φυσιολογικές γυναίκες (ομάδα 4).

Αντίστοιχα βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη η δραστηριότητα του Σ.Α Na^+/Li^+ στις ομάδες γυναικών με προεκλαμψία (1 και 3) σε αντίθεση με τις δύο ομάδες χωρίς προεκλαμψία (2 και 4). Συγκεκριμένα βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη η δραστηριότητα επίσης του Σ.Α Na^+/Li^+ στην ομάδα 1 συγκριτικά με την ομάδα 2, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,005$ και υψηλότερη στην ομάδα 3 συγκρινόμενη με την ομάδα 4 με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,001$.

Σε πρόσφατη μελέτη (Kosmidou *et al* 2008) βρέθηκε άμεση συσχέτιση των επιπέδων δραστηριότητας του ΣΑ Na^+/Li^+ με την παχυσαρκία, τη συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση και την υπερλιπιδαιμία. Αυξημένη δραστηριότητα επίσης του ΣΑ Na^+/Li^+ αναφέρθηκε ωρύτερα από άλλους ερευνητές σε διαβητικούς ασθενείς με μικροαλβουμινουρία και διαβητική νεφροπάθεια (Krolewski *et al* 1988), σε ασθενείς με ιδιοπαθή υπέρταση (Lau *et al* 1992) καθώς και σε ασθενείς με IgA νεφροπάθεια με υπέρταση (Kontessis *et al* 1994). Η αυξημένη δραστηριότητα του Σ.Α Na^+/Li^+ στα ερυθρά αιμοσφαίρια έχει συσχετισθεί επίσης θετικά, με την αντίσταση στην ινσουλίνη σε ασθενείς με ιδιοπαθή υπέρταση (Canessa *et al* 1993) και σε ασθενείς με ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη (Chiarelli 1999, Catalano *et al* 1993).

Η υψηλότερη απέκκριση αλβουμίνης στην ομάδα με ΣΔ1 και ΠΕ μπορεί να εξηγεί την αυξημένη δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ των ερυθροκυττάρων σε αυτές τις ασθενείς, δεν την εξηγεί όμως το γεγονός ότι στην ομάδα των ευγλυκαιμικών γυναικών με ΠΕ η απέκκριση της αλβουμίνης δεν διέφερε από τις φυσιολογικές. Φαίνεται πιθανό, η αυξημένη δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ των ερυθροκυττάρων στις ασθενείς με ΠΕ να συνδέεται με μια γενετική προδιάθεση για προεκλαμψία.

Η υψηλότερη αρτηριακή πίεση που βρήκαμε στις δύο ομάδες με ΠΕ μπορεί να εξηγεί την αυξημένη δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ των ερυθροκυττάρων σε αυτές τις ασθενείς. Η επαναφορά των επιπέδων της δραστηριότητας του ΣΑ Na^+/Li^+ στα βασικά επίπεδα μετά τον τοκετό, που αναφέρουν ερευνητές (Rutherford *et al* 1992), είναι πιθανόν να εξηγεί τις φυσιολογικές τιμές που βρήκαμε στις ομάδες γυναικών χωρίς ΠΕ (2 και 4).

Τα ευρήματα μελετών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για τα επίπεδα των ενδογενών αναστολέων της Na^+/K^+ ΑΤΡάσης (DLIS) κατά την κύηση, ποικίλουν.

Αυξημένα επίπεδα των DLIS κατά την κύηση αναφέρονται από την Poston και συν. (Poston L *et al* 1989). Επίσης η ενδογενής ουαμπαΐνη που είναι ένας αναστολέας της Na^+/K^+ ΑΤΡάσης περιγράφεται να οδηγεί στην ανάπτυξη υπέρτασης, ενώ τα επίπεδα κυκλοφορίας της στον οργανισμό φαίνεται να αυξάνονται με την αύξηση της πρόσληψη άλατος (Manunta *et al* 2006, Hauck *et al* 2012).

Ο Ijiri και συν. αναφέρουν αυξημένα επίπεδα των DLIS στη φυσιολογική κύηση και μεγαλύτερη αύξηση στην προεκλαμψία (Ijiri *et al* 2003). Ο Bagron με τους συνεργάτες του, σε ερευνητικές μελέτες βρήκαν ότι η μαρινομπουφαγενίνη, η οποία είναι ένας ενδογενής αναστολέας της Na^+/K^+ ΑΤΡάσης, είναι ένας κοινός παράγοντας στην παθογένεση του σακχαρώδους διαβήτη και της προεκλαμψίας (Bagron *et al* 2007). Στη μελέτη μας βρήκαμε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα των DLIS στις

ευγλυκαιμικές γυναίκες με ΠΕ συγκριτικά με τις φυσιολογικές. Δεν υπήρχε όμως διαφορά μεταξύ των ΣΔ1 με και χωρίς ΠΕ. Αυτό μπορεί να εξηγείται από το γεγονός ότι οι διαβητικές γυναίκες ακολουθούν αντιδιαβητική διατροφή με περιορισμό στη λήψη άλατος.

Η σημαντική συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας του ΣΑ Na^+/Li^+ και των DLIS που βρήκαμε στις διαβητικές (ΣΔ1) και ευγλυκαιμικές γυναίκες με ΠΕ και όχι στις γυναίκες χωρίς ΠΕ, υποστηρίζουν την υπόθεση της πιθανής συσχέτισης της δραστηριότητας του ΣΑ Na^+/Li^+ και των επιπέδων DLIS με την προεκλαμψία. Τα ευρήματά μας φαίνεται να συμφωνούν με δημοσίευση σύμφωνα με την οποία οι καρδιοτονωτικοί γλυκοζίτες (ενδογενής ουαμπαΐνη) παίζουν σημαντικό ρόλο στην νατριοευαίσθητη υπέρταση (Fedorova *et al* 2010).

Η γενετική προδιάθεση για υπέρταση, όπως αυτή εκφράζεται με αυξημένη δραστηριότητα ΣΑ Na^+/Li^+ , αναφέρεται να είναι πιο συχνή σε διαβητικούς με μικροαλβουμινουρία καθώς και στους γονείς και τους προγόνους τους (Chiarelli *et al* 1994).

Μειωμένη ενεργότητα της Na^+/K^+ ΑΤΡάσης παρατηρήθηκε σε γονείς υπερτασικούς και στα παιδιά τους, υποδηλώνοντας μια γενετική επίδραση που συμβάλει σε οικογενείς μεταβολές της μεταφοράς κατιόντων (Manzzanti *et al* 1991). Ο Manzzanti και συνεργάτες (1991) αναφέρουν επίσης αυξημένη συγκέντρωση ενδοκυττάριου Na^+ σε απογόνους υπερτασικών γονέων, ενώ εμείς βρήκαμε αυξημένη συγκέντρωση ενδοκυττάριου Na^+ στις ΣΔ1 γυναίκες με προεκλαμψία κατά την κύηση. Αυτό το εύρημα συμβαδίζει με την αυξημένη δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ που βρέθηκε στη μελέτη μας.

Στη μελέτη μας παρατηρήθηκε ακόμη μία θετική συσχέτιση της μέσης αρτηριακής πίεσης των γονέων με αυτή των τέκνων τους. Είναι ενδιαφέρον το

γεγονός ότι βρέθηκε επίσης σημαντική συσχέτιση των επιπέδων DLIS μεταξύ γονέων και των θυγατέρων τους με ΠΕ. Αντιθέτως, δεν βρέθηκε παρόμοια συσχέτιση της δραστηριότητας του ΣΑ Na^+/Li^+ μεταξύ γονέων και των θυγατέρων τους με ΠΕ. Τα ευρήματα αυτά παρέχουν ένδειξη ότι οικογενείς παράγοντες συνδεδεμένοι με την αρτηριακή υπέρταση μπορεί να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της προεκλαμψίας.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι ο έλεγχος της δραστηριότητας του ΣΑ Na^+/Li^+ , προσδιοριζόμενος προ κύησης θα μπορούσε να χρησιμεύει σαν δείκτης αυξημένου κινδύνου για την ανάπτυξη προεκλαμψίας. Βεβαίως θα έπρεπε προηγουμένως να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα με μεγαλύτερης κλίμακας δεδομένα και να τεκμηριωθούν τα φυσιολογικά επίπεδα του συστήματος με ευρύτερες μελέτες.

Περιορισμοί της μελέτης: Ο μικρός αριθμός των ατόμων που μελετήσαμε, αν και σε μεγάλο βαθμό αντικειμενικός, λόγω της ανάγκης μακρόχρονης παρακολούθησης των γυναικών και των αυστηρών κριτηρίων επιλογής τους, είναι ένα περιοριστικό στοιχείο. Παρόλα αυτά, τα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα μας, μας δίνουν την πεποίθηση ότι περισσότερες και ευρύτερες μελέτες θα επιβεβαίωναν τα αποτελέσματα μας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

1. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ βρέθηκε αυξημένη σε νορμοτασικές γυναίκες με ιστορικό προεκλαμψίας στη περίοδο 4 μηνών μετά τον τοκετό. Η αυξημένη δραστηριότητα μετά τον τοκετό οδηγεί στη σκέψη ότι μπορεί να παίζει ένα ρόλο στη παθογένεια της προεκλαμψίας τόσο σε διαβητικές όσο και μη γυναίκες .

Η αυξημένη συγκέντρωση ενδοκυττάριου Na^+ που παρατηρήσαμε στις ΣΔ1 γυναίκες με προεκλαμψία, συμβαδίζει με την αυξημένη δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ σ' αυτές τις ασθενείς.

Η σημαντική συσχέτιση μεταξύ δραστηριότητας του ΣΑ Na^+/Li^+ και DLIS στις ΣΔ1 γυναίκες με ΠΕ που βρήκαμε, ενισχύει την υπόθεση μιας πιθανής σχέσης του ΣΑ Na^+/Li^+ αλλά και των DLIS με την προεκλαμψία.

Τα ευρήματα μας ενισχύουν την άποψη όπως αναφέρεται και από άλλες μελέτες, ότι τα ενδογενή καρδιοτονωτικά στεροειδή (DLIS ή ενδογενής ουαμπαΐνη) παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της νατριοευαίσθητης υπέρτασης.

Η μέση αρτηριακή πίεση των γονέων συσχετίζεται με αυτήν των παιδιών τους. Επίσης έχουμε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ γονέων και θυγατέρων ως προς τα επίπεδα των DLIS και όχι του ΣΑ Na^+/Li^+ . Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οικογενείς παράγοντες μπορεί παίζουν ένα ρόλο στη παθογένεση της προεκλαμψίας.

2. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Τα ευρήματα μας, όπως αναφέρθηκε, υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οικογενείς παράγοντες συνδεδεμένοι με την υπέρταση μπορεί να παίζουν ρόλο στη παθογένεια της προεκλαμψίας. Ο τομέας αυτός της κληρονομικής συσχέτισης είναι σημαντικός και αξίζει περαιτέρω διερεύνησης. Θα ήταν ενδιαφέρον η έρευνα μας να στραφεί τόσο στη διερεύνηση μεγαλύτερου αριθμού ατόμων με προεκλαμψία με παράλληλη μελέτη γονιδίων των πρωτεϊνών που είναι πιθανόν να εμπλέκονται στη μεταφορά ιόντων και σχετίζονται με την υπέρταση και τη προεκλαμψία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τίτλος: Η δραστηριότητα του συστήματος αντιμεταφοράς νατρίου-λιθίου στα ερυθρά αιμοσφαίρια ινσουλινοεξαρτώμενων διαβητικών γυναικών στην κύηση και η σχέση του με την προεκλαμψία.

Στόχος της μελέτης: Η διερεύνηση πιθανής παθογενετικής συσχέτισης μεταξύ της δραστηριότητας του συστήματος αντιμεταφοράς νατρίου-λιθίου ($\text{SA Na}^+/\text{Li}^+$) στα ερυθρά αιμοσφαίρια και των επιπέδων ομοιαζόντων με διγοξίνη ουσιών (DLIS) στο πλάσμα, ινσουλινοεξαρτώμενων διαβητικών (ΣΔ1) και ευγλυκαιμικών γυναικών με προϋπάρχουσα προεκλαμψία (ΠΕ) κατά την κύηση. Επίσης στόχος ήταν η διερεύνηση πιθανής γενετικής επιβάρυνσης στις γυναίκες με ΠΕ.

Υλικό και μέθοδοι: Μελετήσαμε τη δραστηριότητα του $\text{SA Na}^+/\text{Li}^+$ και τα επίπεδα πλάσματος των DLIS σε 12 ΣΔ1 γυναίκες με προϋπάρχουσα ΠΕ (ομάδα 1) 12 ΣΔ1 χωρίς ΠΕ (ομάδα 2), 23 ευγλυκαιμικές γυναίκες με προϋπάρχουσα ΠΕ (ομάδα 3) και 12 φυσιολογικές γυναίκες (ομάδα 4). Η μελέτη έγινε τουλάχιστον 4 μήνες μετά τον τοκετό.

Μελετήσαμε επίσης, τους ίδιους παράγοντες σε 26 γονείς από 13 γυναίκες με ΠΕ κατά την κύηση.

Αποτελέσματα: Η δραστηριότητα του $\text{SA Na}^+/\text{Li}^+$ βρέθηκε υψηλότερη στην ομάδα 1 συγκρινόμενη με την ομάδα 2 (mean \pm SEM ; 0.32 ± 0.05 vs 0.19 ± 0.02 mmol/LRBC/hr $p < 0.05$) και στην ομάδα 3 συγκρινόμενη με την ομάδα 4 (0.36 ± 0.004 vs 0.17 ± 0.01 mmol/LRBC/hr, $p < 0.01$). Τα επίπεδα των DLIS βρέθηκαν υψηλότερα στην ομάδα 3 συγκρινόμενη με την ομάδα 4 (0.73 ± 0.19 vs 0.295 ± 0.07 ng/ml; $p < 0.05$) ενώ δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 διαβητικών ομάδων (1 και 2). Στις ομάδες 1 και 3 βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ

της δραστηριότητας του ΣΑ Na^+/Li^+ και των επιπέδων DLIS. ($r = 0.927$; $p < 0.001$ and $r = 0.485$; $p < 0.05$ αντίστοιχα).

Συμπεράσματα: Αυξημένη δραστηριότητα του ΣΑ Na^+/Li^+ και αυξημένα επίπεδα DLIS μετά τον τοκετό στις γυναίκες με ιστορικό προεκλαμψίας, είναι πιθανόν να αποτελούν επιβαρυντικό παράγοντα στην ανάπτυξη αυτής της διαταραχής της κύησης τόσο σε διαβητικές όσο και σε ευγλυκαιμικές γυναίκες.

SUMMARY

Title: The sodium-Lithium countertransport activity in red blood cells of insulin-dependent diabetic women in pregnancy and its relation to preeclampsia.

Aim of the study: To determine whether there is pathogenetic link between red cells sodium–lithium counter-transport activity and digoxin-like immunoreactive substances (DLIS) in plasma of insulin-dependent diabetic (IDDM) and non-diabetic women with preexisting preeclampsia (PE). Our study also aimed to investigate, if there is a possible genetic contribution in development of PE in women with preexisting PE.

Subjects and methods: We studied Na^+/Li^+ CT activity in red cells and plasma levels of DLIS in 12 IDDM women with preexisting PE (Group 1), 12 IDDM without preexisting PE (Group 2) 23 non-diabetic women with preexisting PE (Group 3) and 12 non-diabetic women with normal pregnancy (Group 4) at least 4 months after delivery. We also examined the above factors in 23 parents of 13 women with preexisting PE.

Results: Na^+/Li^+ CT activity was higher in Group 1 compared to Group 2 (mean \pm SEM 0.316 ± 0.05 vs 0.190 ± 0.02 mmol/LRBC/hr $p < 0.05$) and in Group 3 compared to Group 4 (0.365 ± 0.004 vs 0.168 ± 0.01 mmol/LRBC/hr, $p < 0.01$). Plasma levels of DLIS were higher in Group 3 compared to Group 4 (0.727 ± 0.189 vs 0.295 ± 0.066 ng/ml; $p < 0.05$); there was no statistically significant difference between the two diabetic groups. In Groups 1 and 3, Na^+/Li^+ CT activity was correlated to the plasma levels of DLIS ($r = 0.927$; $p < 0.001$ and $r = 0.485$; $p < 0.05$ respectively).

Conclusion: Increased Na^+/Li^+ CT activity and increased plasma levels of DLIS may contribute to PE in IDDM and non-diabetic women.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aickin CC**, Thomas RC. An investigation of the ionic mechanism of intracellular pH regulation in mouse soleus muscle fibres. **1977** *J Physiol*; 273:295-316.
- Adair CD**, Hauptert Jr GT, Koh HP, Wang Y, Veille JC, Buckalew V. Erythrocyte sodium/potassium ATPase activity in severe preeclampsia. **2009** *J Perinatol*; 29:280–283.
- Arngrimson R**, Bjornsson S, Geirsson RT, Bjornsson H, Walker J, Snaedal G. Genetic and familial predisposition to eclampsia and pre-elampsia in a defined population. **1990** *Br J Obst Gynecol*; 97:762-769.
- Baker EH**. Ion channels and the control of blood pressure. **2000** *Br J Clin Pharmacol*; 49:185-198.
- Bagrov AY**, Shapiro JI, Fedorova OV. Endogenous Cardiotonic Steroids: Physiology, Pharmacology and Novel Therapeutic Targets. **2009** *Pharmacol Rev*; 61:9-38.
- Bagrov YY**, Manusova NB, Frolova EV, Egorova IA, Kashkin VA, Tapilskaya NI, Fedorova O, Bagrov A. Endogenous sodium pump inhibitors, diabetes mellitus and preeclampsia Preliminary observations and a hypothesis. **2007** *Pathophysiology*; 14(3-4):147–51.
- Boerwinkle E**, Turner ST, Weinshilboum R, Johnson M, Richelson E, Sing CF. Analysis of Distribution of Erythrocyte Sodium Lithium Countertransport in a Sample Representative of the General Population. **1986** *Genetic Epidemiology*; 3:365-378.
- Canessa M**, Adragna W, Solomon HS, Connolly TM, Tosteson DC. Increased sodium-lithium countertransport in red cells of patients with essential hypertension. **1980** *N Engl J Med*; 302:772-776.
- Canessa M**, Falkner B, Hulman S. Red blood cell sodium–proton exchange in hypertensive blacks with insulin resistant glucose disposal. **1993** *Hypertension*; 22:204–13.

- Canessa M.** Erythrocyte sodium-lithium countertransport: another link between essential hypertension and diabetes. **1994** *Cur Opin in Nephrol and Hypert*; 3:511-517.
- Canessa M.** The polymorphism of red cell Na and K transport in essential hypertension: findings, controversies and perspectives. **1984** *Erythrocyte Membrane 3: Recent Clinical and Experimental Advances*, pages 293-315. Alan R. Liss, Inc., 150 Fifth Avenue, New York, NY 1011.
- Casari G**, Barlassina C, Cusi D. Association of the alpha-adducin locus with essential hypertension. **1995** *Hypertension*; 25:320-326.
- Catalano C**, Winocour PH, Thomas TH, Walker M, Sum CF, Wilkinson R, Alberti KGMM. Erythrocyte sodium-lithium countertransport activity and total body insulin-mediated glucose disposal in normoalbuminuric normotensive Type 1 (insulin dependent) diabetic patients. **1993** *Diabetologia*; 36:52-52.
- Chiarelli F**, Catino M, Tumini S, De Martino M, Mezzetti A, Verrotti A, Vanelli M. Increased Na^+/Li^+ countertransport activity may help to identify type 1 diabetic adolescents and young adults at risk for developing persistent microalbuminuria. **1999** *Diabetes Care*; 22:1158-64
- Combs CA**, Rosenn B, Kitzmiller JL, Khoury JC, Wheeler BC, Miodovnik M: Early-Pregnancy proteinuria in Diabetes Related to Preeclampsia. **1993** *Ostet Gynecol*; 82:802-807.
- Cusi D**, Barlassina C, Azzani T, Casari Gc, Citterio L, Devoto M, Glorioso N, Lanzani C, Manunta P, Righetti M, Rivera R, Stella P, Troffa C, Zagato L, Bianchi G. Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. **1997** *Lancet*; 349:1353-135.
- Dahl L.K.** Possible role of salt intake in the development of essential hypertension. **2005** *Intern J of Epidem*; 34:967-972.
- Dahl, LK**, Silver L and Christie R W. Medical Progress: Salt intake and salt need. **1958** *N. England J. Med.* **258**:1186.

- De Fronzo R**, Ferrannini E. Insulin Resistance: A Multifaceted Syndrome Responsible for NIDDM, Obesity, Hypertension, Dislipidemia and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. **1991** *Diabetes Care*; 14:173-194.
- Duhm J**, Gobel Bo. Sodium-Lithium Exchange and Sodium-Potassium Cotransport in Human Erythrocytes. **1982** *Hypertension*; 4:468-476.
- Elizur A**, Shopsin B, Gershon S, Ehlenberger A. Intra-extracellular lithium ratios and clinical course in affective states. **1972** *Clin Pharmacol Ther*; 13:947-952.
- Elton TS and Martin MM**. Angiotensin II type 1 receptor gene regulation: transcriptional and posttranscriptional mechanisms. **2007** *Hypertension*; 49:953-961.
- Fedorova O**, Shapiro J, Bagrov A. Endogenous cardiotonic steroids and salt-sensitive hypertension. **2010** *Biochim Biophys Acta*;103:1230-1236.
- Ferrannini E** and DeFronzo RA: The association of hypertension, diabetes, and obesity: a review. **1989** *Nephrol*; 1:3-15.
- Frazer A**, Mendels J, Sekunda SK, Cochrane CM, Bianchi CP. The prediction of brain lithium concentration from plasma or erythrocyte measures. **1973** *J Psychiatr Res*; 10:1-7.
- Frisoli T.M.**, Schmieder R.E., Grodziski T., Messerli F.H. Salt and Hypertension: Is Salt Dietary Reduction Worth the Effort?. **2005**, *The American Journal of Medicine*; 125(5):433-439.
- Gall MA**, Rossing P, Jensen JS, Funder J, Parving HH. Red cell Na^+/Li^+ countertransport in non-insulin-dependent diabetics with diabetic nephropathy. **1991** *Kidney Int*; 39:135-140.
- Garner PR**, D'Alton ME, Dudley DK, Huard P, Hardie M. Preeclampsia in diabetic pregnancies. **1990** *Am J Obstet Gynecol*; 163:505-508.
- Garovic V.D.** & August P. Preeclampsia and the Future Risk of Hypertension: The Pregnant Evidence. **2013** *Curr Hypertens Rep*; 15:114–121.

- Glorioso N**, Filigheddu F, Cusi D, Troffa C, Conti M, Natalizio M, Argiolas G, Barlassina C, Bianchi J. α -Adducin 460Trp Allele Is associated With Erythrocyte Na Transport Rate in North Sardinian Primary Hypertensives. **2002** *Hypertension*; 39:357-362.
- Gong M and Hubner N**. Molecular genetics of human hypertension. **2006** *Clinical Science*; 110:315–326
- Gonzalez AR**, Phelps SJ, Cochran EB, Sibai BM. Digoxin-like immunoreactive substance in pregnancy. **1987** *Am J Obstet Gynecol*;157:660–4.
- Haas M**, Schooler J, Tosteston DC. Coupling of lithium to sodium transport in human red cells. **1975** *Nature*; 258:425-427.
- Hamlyn JM**, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Harris DW, Mandel F, Mathews WR, Ludns JH. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **1991** *Proc Nati Acad Sci USA*; 88:6259-6563.
- Hamlyn JM** and Blaustein MP. Salt sensitivity, endogenous ouabain and hypertension. **2013** *Curr Opin Nephrol Hypertens* ;2:51-58.
- Hauck C** and Frishman W. Systematic Hypertension: The Role of Salt, Vascula Na^+/K^+ ATPase and the Endogenous Glycosides, Ouabain and Marinobufagenin. **2012** *Cardiology in Review*; 20:130-138.
- Havas S**, Roccella E. J., Lenfant C. Reducing the Public Health Burden From Elevated Blood Pressure Levels in the United States by Lowering Intake of Dietary Sodium. **2004** *Am J Public Health*; 94:19-22.
- Hilton PJ**. Cellular sodium transport in essential hypertension. **1986** *New Engl J of Med*; 314:222-229.
- Hilton P.J**. Na^+ Transport in hypertension. **1991** *Diabetes Care* 14:233-239.
- Hilton P.J**, White RW, Lord GA, Garner GV, Gordon DB, Hilton MJ, Forni LG, McKinnon W, Ismail FM, Keenan M et al. **1996** An inhibitor of the sodium pump obtained from human placenta. *Lancet*; 348:303-305.
- Hopkins PN**, Lifton RP, Hollenberg NK, Jeunemaitre X, Hallouin MC, Skuppin J, Williams CS, Dluhy RG, Lalouel JM, Williams RR, Williams GH. Blunted renal vascular

- response to angiotensinII is associated with a common variant of the angiotensinogen gene and obesity. **1996** *J Hypertens*;14:199-207.
- Hunt SG**, Williams RR, Smith JB, Ash KO. Association of three erythrocyte cation systems with plasma lipids in Utah subjects. **1986** *Hypertension*; 8:30-36.
- Huot SJ** and Aronson PS. Na⁺-H⁺ Exchanger and Its Role in Essential Hypertension and Diabetes Mellitus. **1991** *Diabetes Care*; 14:521-535.
- Ijiri Y**, Hayashi T, Kamegai H, Ohi K, Suzuki K, Kitaura Y, Takenaka H. Digital-like immunoreactive substances in maternal and umbilical cord plasma: a comparative sensitivity study of fluorescence polarization immunoassay and microparticle enzyme immunoassay. **2003** *Ther Drug Monit*; 25:234–9.
- Intersalt** Cooperative Research Group, Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure: Results from 24 hour urinary sodium and potassium excretion. **1988** *Br. Med. J.* **297**:319-328.
- Irani R.A.** and Xia Y. The Functional Role of the Renin–Angiotensin System in Pregnancy and Preeclampsia. **2008** *Placenta*; 29:763-771.
- Jones ST**, Trevisan R, Tariq T, Semplicini A, Mattock M, Walker JD, Viberti G. Sodium–lithium counter-transport in microalbuminuric insulin-dependent diabetic patients. **1990** *Hypertension*; 15:570–5.
- Kemp G**, Young H and Fliegel L. Structure and function of the human Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1. **2008** *Channels*; 2:329-336.
- Kojima I**, Yoshihara S, Ogata E. Involvement of endogenous digitalis-like substance in genesis of deoxycorticosterone-salt hypertension. **1982**, 24; 30(21):1775-81.
- Kondapalli KC**, Kallay LM, Muszelik M, Rao R. Inconventional chemiosmotic coupling of NHA2, a mammalian Na⁺/H⁺ antiporter, to a plasma membrane H⁺ gradient. **2012** *J Biol Chem* 19; 27:36239-36250.
- Kontessis PS**, Friedman R, Tariq T, Moro F, Williams DG, Hartley D, Viberti JC. Sodium–lithium counter-transport activity as a determinant of deterioration of glomerular function in IgA nephropathy. **1994** *Exp Nephrol*; 2:176–81.

- Kosmidou M**, Hatzitolios A, Adamidou A, Giannopoulou S, Raikos N, Parharidis G, Millionis HJ. Effects of Atrovastatin on red-blood cell Na^+/Li^+ countertransport in hyperlipidemic patient with and without hypertension. **2008** *Am J Hypertens*; 21:303–9.
- Krolewski AS**, Canessa M, Warran JH, Laffel LMB, Christieb AR, Knowler WC, Rand LI. Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin-dependent diabetes mellitus. **1988** *NEJM*; 21:140–5.
- Krushkal J**, Ferrell R, Mockrin SC, Turner ST, Sing CF, Boerwinkle E. Genome-wide linkage analysis of systolic blood pressure using highly discordant siblings. **1999** *Circulation*; 99:1407-1410.
- Lau Y-T**, Cheng H-S, Hsieh C-C. Sodium transport in hypertension. **1992** *Chin J Physiol*; 35(3):241–56.
- Laurenzi M** and Trevisan M. Sodium-lithium countertransport and blood pressure the Gubbio population study. **1989** *Hypertension*; 13: 408-415.
- Laurenzi M**, Cirillo M, Panarelli W, Trevisan M, Stamler R, Dyer AR, Stamler J. Baseline sodium-lithium countertransport and 6-year incidence of hypertension: the Gubbio population study. **1997** *Circulation*; 95:581-587.
- Logoglu G**, Erdogan S, Ozgunem FT, Dogan A, Ozgunem T, Kadayifci O. Endogenous digoxin-like immunoreactive substance in normal and pre-eclamptic pregnancies. **1993** *Int J Gynaecol Obstet*; 43(2):137–43.
- Losse H**, Wehmeyer H, Wessels F. Wasser und electrolytegehalt von Erythrocyten bei arterieller Hypertonie. **1960** *Klin Wochenschr*; **38:393-395**.
- Loukari E**, Yiannakou L, Souvatzoglou A, Diamantis EP. Radioimmunoassay of digoxin in serum using monoclonal antibodies and assessment of interference by digoxin like immunoreactive substances. **1990** *Ther Drug Monit*; 12:195– 200.
- Manunta P**, Hamilton BP, Hamlyn JM. Salt intake and Depletion increase circulating levels of endogenous ouabain in normal men. **2006** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 290:R553-R559.

- Μαυροματίδης Κ.Σ.**, 2006, *Διαταραχές Ύδατος, Ηλεκτρολυτών και Οξοβασικής Ισορροπίας*. UNIVERSITY STUDIO PRESS, Θεσσαλονίκη, 2^η έκδοση.
- Mazzanti L**, Rabini RA, Testa I, Coppa GV, Catassi C, Cecconi M, Giorgi PL. Sodium metabolism in offspring of hypertensive parents. **1991** *Biochem Med Metab Biol*; 45(2):181–7.
- Mead PA**, Harvey JN, Rutherford PA, Leitch H, Thomas TH. Sodium-Lithium countertransport and the Gly⁴⁶⁰→Trp α -adducin polymorphism in essential hypertension. **2005** *Clinical Science*; 108:231-236.
- Meakins JC**. Circulatory failure in chronic intoxications and vascular disturbances: hyperthyroidism, chronic anemia, chronic nephritis, diabetes, hypertension. **1927** *Can Med Assoc J.*; 17(6): 647–651.
- Miyamoto S**, Makino N, Shimokawa H, Akazawa K, Wake N, Nakano H. The characteristics of erythrocyte Na⁺ transport systems in normal pregnancy and pregnancy induced hypertension. **1992** *J of Hypertension*; 10:367-372.
- Modan M**, Halkin H, Almog S, Lusky A, Eskol A, ShefiM, Shitrit A, Fuchs L. Hyperinsulinemia: a link between hypertension, obesity and glucose intolerance. **1985** *Clin Invest*; 75:809-17.
- Morrison AC**, Boerwinkle E, Turner ST, Ferrell RE. Genome-wide linkage study of erythrocyte sodium-lithium countertransport. **2005** *Am J Hypertens*; 18:653-656.
- Penney M**. Sodium, water and potassium. **2008** *Clinical Biochemistry Chapter 4*.
- Poch E**, Gonzalez D, Giner V, Bragulat E, Coca A, De La Sierra A. Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension. Evaluation of rennin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms. **2001** *Hypertension*; 38:1204-1209.
- Poston L**, Morris JF, Wolfe CD, Hilton PJ. Serum digoxin-like substances in pregnancy-induced hypertension. **1989** *Clin Sci*; 77:189–94.
- Prassas I** and Diamandis EP. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides **2008** *Nature Reviews*; 7:926-935.

- Rutherford PA**, Thomas TH, Macphail S, Wilkinson R Sodium-lithium countertransport kinetics in normal and hypertensive human pregnancy. **1992** *Eur J Clin Invest*; 22:50-54.
- Sanchez A.R**, Gimenez M.I, Migliorini M, Giannone C, Ramirez A.J, Weder A.B. Erythrocyte Sodium-Lithium Countertransport in Non-Modulating Offspring and Essential Hypertensive Individuals. Response to Enalapril. **1997** *Hypertension*; 30:99-105.
- Sardet C**, Franchi A, Pouyssegur J. Molecular Cloning, Primary Structure and Expression of the Human Growth Factor-Activable Na⁺/H⁺ Antiporter. **1989** *Cell*; 56:271-280.
- Sharma P** Fatibene J, Ferraro F, Jia H, Monteith S, Brown C, Clayton D, O'Shaughnessy K, Brown MJ. A genome-wide scan search for susceptibility loci to human hypertension. **2000** *Hypertension*; 35:1291-1296.
- Sibai BM**. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. **2003** *Obstet Gynecol.*; 102:181–92.
- Skou JC**. The influence of some cations on an adenosinetriphosphate from peripheral nerves. **1957** *Biochem. Biophys. Acta*; 23:394-401.
- Sober S**, Org E, Kepp K, Juhanson P, Eyheramendy S, Gieger C, Lichtner P, Klopp N, Veldre G, Viigimaa M, Döring A; Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg Study, Putku M, Kelgo P; HYPertension in ESTonia Study, Shaw-Hawkins S, Howard P, Onipinla A, Dobson RJ, Newhouse SJ, Brown M, Dominiczak A, Connell J, Samani N, Farrall M; MRC British Genetics of Hypertension Study, Caulfield MJ, Munroe PB, Illig T, Wichmann HE, Meitinger T, Laan M. Targeting 160 Candidate Genes for blood Pressure Genome-Wide Genotyping Array. **2009** *Plos ONE*; 4:e6034.
- Staessen J**, Wang JG, Brand E, Barlassina C, Birkenhager W, Herrmann SM, Fagar R, Tizzoni L, Bianchi G. Effects of three candidate genes on prevalence and incidence of hypertension in a Caucasian population. **2001** *J Hypertension*; 19:1349-1358.

- Stoll M**, Kwitek-Black AE, Cowley AW Jr, Harris EL, Harrap SB, Krieger JE, Printz MP, Provoost AP, Sassard J, Jacob HJ. New target regions for human hypertension via comparative genomics. **2000** *Genome Res*; 10:473-482.
- Strazullo P**, Cappuccio F, Trevisan M, Siani A, Barba G, Ragone E, Pagano E, Mancini M. The relation of erythrocyte sodium-lithium countertransport to blood pressure and metabolic abnormalities in a sample of untreated middle-aged workers. **1993** *J of Hypertention*; 11:815-822.
- Strazzullo P**, Cappuccio FP, Trevisan M, Lacoviello L, Lacoze R, Jossa F, Giorgione N, Farinaro E, Mancini M. Erythrocyte sodium-lithium countertransport and renal lithium clearance in a random sample of untreated middle-aged men. **1989** *Clin Sci*; 77:337-342.
- Takahashi H**, Yoshika M, Komiyama Y and Nishimura M. The central mechanism underlying hypertension: a review of the roles of sodium ions, epithelial sodium channels, the renin–angiotensin–aldosterone system, oxidative stress and endogenous digitalis in the brain. **2011** *Hypertension Research*; 34:1147-1160.
- Tanira M** and Al Balushi KA. Genetic variations related to hypertension: a review. **2005** *J of Hum Hypert*; 19:7-19.
- Tobian I.Jr** and Binion JT. Tissue cations and water in arterial hypertension. **1952** *Circulation*; 5:754-758.
- Trevisan R**, Nosadini R, Fioretto P, Semplicini A, Donadon V, Doria A, Nicolosi G, Zanuttini D, Cipollina MR, Lusiani L, et al. Clustering of risk factors in hypertensive insulin-dependent diabetics with high sodium-lithium countertransport **1992** *Kidney Int.*; 41(4):855-61.
- Trevisan R.** and Viberti G. Sodium-hydrogen antiporter: its possible role in the genesis of diabetic nephropathy. **1997** *Nephro Dial Transplant*; 12:643-645.
- Turner ST**, Johnson M, Taswell HP, Sing CF. Sodium-lithium countertransport and blood pressure in healthy blood donors. **1985** *Hypertension*; 7:995-962.

- Turner J.** Diagnosis and management of pre-eclampsia: an update. **2010:2** *Intern J of Women's Health*; 327-337.
- Vaccaro O,** Cuomo V, Trevisan M, Cirillo M, Panarelli W, Laurenzi M, Manzini M, Riccardi G. Enhanced Na-Li countertransport: a marker of inherited susceptibility to type 2 diabetes. **2005** *Intern J of Epidem*; 34:1123-1128.
- Van Norren K,** Thien T, Berden JHM, Elving LD, De Pont JJHJM. Relevance of erythrocyte Na^+/Li^+ countertransport measurement in essential hypertension, Hyperlipidaemia and diabetic nephropathy: a critical review. **1998** *Eur J Clin Invest*; 28:339-352.
- Vervoort G,** Elving LD, Wetzels JF, Lutterman JA, Smits P, De Pont JJ, Berden JH. Sodium-lithium countertransport is increased in normoalbuminuric type 1 diabetes but is not related to other risk factors for microangiopathy. **2002** *Eur J Clin Invest*; 32:93-99.
- Weder A.** Genetics and Hypertension. **2007** *J Clin Hypertens*; 9:217-223.
- Weinberger MH.** Salt sensitivity of blood pressure in humans. **1996** *Hypertension*; 27:481-490.
- Wiley J** and Cooper R. A Furosemide-Sensitive Cotransport of Sodium plus Potassium in the Human Red Cel. **1974** *J Clin Invest* ;53:745-755.
- Williams GH** Dluhy RG, Lifton RP, Moore TJ, Gleason R, Williams R, Hunt SC, Hopkins PN, Hollenberg NK. Non Modulation as an intermediate phenotype in essential hypertension. **1992** *Hypertension*; 20: 788-796.
- Wong ZY,** Stebbing M, Ellis JA, Lamantia A, Harrap SB. Genetic linkage of beta and gamma subunit of epithelial sodium channel to systolic blood pressure. **1999** *Lancet*; 353:1222-1225.
- Worley RJ,** Hentschel WM, Cormier C, Nutting S, Pead G, Zelenkov K, Smith JB, Ash KO, Williams RR. Increased sodium-lithium countertransport in erythrocytes of pregnant women. **1982** *N Engl J Med*; 307:412-416.

Xiang M, Feng M, Muend R, Rao R. A human Na⁺/H⁺ antiporter sharing revolutionary origins with bacterial NhaA may be a candidate gene for essential hypertension. **2007** *Proc Natl Acad Sci USA*; 104:18677-18681.

Yue P, Melamud E, Moulton J. SNPs3D: Candidate gene and SNP selection for association studies. **2006** *BMC Bioinformatics*; 7:166.

Zheng X, Kammerer CM, Cox LA, Morrison A, Turner ST, Ferrell RE. Association of *SLC34a2* variation and sodium-lithium countertransport activity in humans and baboons. **2009** *Am J Hypertens*; 22:288–293.

Zerbini G, Gabellini D, Ruggeri D, and Maestroni A. Increased Sodium-Lithium Countertransport Activity: A Cellular Dysfunction Common to Essential Hypertension and Diabetic Nephropathy. **2004** *J Am Soc Nephrol*; 15: S81–S84

Zerbini G, Maestroni A, Breviaro D, Mangili R, Casari G. Alternative Splicing of NHE-1 Mediates Na-Li Countertransport and Associates With Activity Rate. **2003** *Diabetes*; 52:1511-1518.

Zerbini G, Podesta F, Meregalli G, Deferrari G, Pontremoli R. Fibroblast Na⁺-Li⁺ countertransport rate is elevated in essential hypertension. **2001** *J Hypertens*; 19(7):1263-9.

Zhang J, Lee MY, Cavalli M, Chen L, Berra-Romani R, Balke CW, Bianchi G, Ferrari P, Hamlyn JM, Iwamoto T, Lingrel JB, Matteson DR, GilWier W, Blaustein MP. Sodium pump $\alpha 2$ subunits control myogenic tone and blood pressure in mice. **2005** *J Physiol*; 569:243–256.

Zheng X, Morrison AC, Turner ST, Ferrell RE. Association between SLC20A1 and sodium-lithium countertransport. **2011** *Am J Hypertens*; 24:1069-1072.

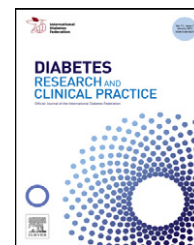
White Priscilla. Pregnancy complicating pregnancy. **1949** *The Amer J of Medicine*; 7: 609-616.

Π Α Ρ Α Ρ Τ Η Μ Α

δημοσίευση εργασίας



Contents lists available at ScienceDirect

Diabetes Research
and Clinical Practicejournal homepage: www.elsevier.com/locate/diabresInternational
Diabetes
Federation

Erythrocyte Na⁺–Li⁺ counter-transport activity and digoxin-like substances in insulin dependent diabetic women with preexisting preeclampsia

Helen-Leda Sarica^a, Helen Anastasiou^a, Maria-Rea Charitopoulou^a,
Maria Karamaliki^a, Eirini Grapsa^{b,*}

^aFirst Endocrinology Department, Alexandra Hospital, Athens, Greece

^bNephrology Department, Aretaieio University Hospital, Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2011

Received in revised form

14 July 2011

Accepted 21 July 2011

Published on line 15 August 2011

Keywords:

Preeclampsia

Sodium–lithium counter-transport

Digoxin like immuno reactive

substance

Diabetes

ABSTRACT

Aim of the study: To determine whether there is pathogenetic link between red cells sodium–lithium counter-transport activity and digoxin-like immunoreactive substances (DLIS) in plasma of insulin-dependent diabetic (IDDM) and non-diabetic women with preexisting preeclampsia (PE).

Subjects and methods: We studied Na⁺/Li⁺ CT activity in red cells and plasma levels of DLIS in 11 IDDM women with preexisting PE (Group 1), 13 IDDM without preexisting PE (Group 2) 23 non-diabetic women with preexisting PE (Group 3) and 12 non-diabetic women with normal pregnancy (Group 4) at least 4 months after delivery.

Results: Na⁺/Li⁺ CT activity was higher in Group 1 compared to Group 2 (mean ± SEM 0.316 ± 0.05 vs 0.190 ± 0.02 mmol/LRBC/hr *p* < 0.05) and in Group 3 compared to Group 4 (0.365 ± 0.004 vs 0.168 ± 0.01 mmol/LRBC/hr, *p* < 0.01). Plasma levels of DLIS were higher in Group 3 compared to Group 4 (0.727 ± 0.189 vs 0.295 ± 0.066 ng/ml; *p* < 0.05); there was no statistically significant difference between the two diabetic groups. In Groups 1 and 3, Na⁺/Li⁺ CT activity was correlated to the plasma levels of DLIS (*r* = 0.927; *p* < 0.001 and *r* = 0.485; *p* < 0.05 respectively).

Conclusion: Increased Na⁺/Li⁺ CT activity and increased plasma levels of DLIS may contribute to PE in IDDM and non-diabetic women.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The pathogenesis of preeclampsia (PE) remains obscure. The incidence of PE is higher in diabetic women compared to non-diabetic controls [1,2]. It has been suggested that excessive Na⁺ retention found in PE women is possibly related to the Na⁺ transport across the membrane and the renin–angiotensin–aldosterone system [3,4]. Erythrocyte sodium–lithium counter-transport activity (Na⁺/Li⁺ CT) is increased in patients with essential hypertension and particularly in patients with a

family history of hypertension [5,6]. In insulin-dependent diabetic (IDDM) patients a link between essential hypertension and diabetic nephropathy has been found [7]. The Na⁺/Li⁺ CT activity has been found increased in IDDM patients with microalbuminuria or proteinuria, whereas elevated activity of Na⁺/Li⁺ CT has been reported in the parents of diabetic patients with nephropathy [8,9]. A strong genetic influence contributing to familiar alteration in Na⁺ cation transport has been found in persons with hypertension and their offspring [10].

In adolescents with type I diabetes, the Na⁺/Li⁺ CT activity is largely genetically determined and a positive correlation has

* Corresponding author. Tel.: +30 2107286253; fax: +30 2107286253.

E-mail address: grapes@otenet.gr (E. Grapsa).

0168-8227/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.diabres.2011.07.026

been reported between activities of this mechanism in parents and their offspring [11]. Erythrocyte Na^+/Li^+ CT activity is increased in normal pregnancy and returns to basal levels in the postpartum period [12]. On the other hand it has been reported that endogenous digoxin-like immunoreactive substances (DLIS) that inhibit the sodium/potassium-dependent adenosine triphosphatase (Na^+/K^+ ATPase) are increased in normal pregnancy and increase further in PE but this seems to depend on the sensitivity of the method used [13]. Experimental study in rats by Fedorova et al., shows that marinobufagenin (MBG) antibodies, a cardiotonic steroid, decrease the blood pressure in pregnant hypertensive rats and restore the vascular Na/K pump leading to the idea that Anti-MBG may be a useful tool in the study of MBG and the treatment of preeclampsia [14]. Also interesting findings have been reported by Wang et al., about the beneficial effect in vitro of Digibind which binds to endogenous digoxin like factors and attenuates the inflammatory response to endothelial cells [15].

However there are other investigators who found no correlation between, Erythrocyte Na^+/Li^+ CT activity and PE [16]. Moreover Na^+/K^+ -ATPase activity has been found significantly reduced in diabetic patients with hypertension [17] while there are reports suggesting that the reduction of erythrocyte Na^+/K^+ -ATPase activity may be related to a familial predisposition to arterial hypertension [10].

We have therefore attempted to examine in non pregnant state erythrocyte Na^+/Li^+ CT activity and DLIS in women with preexisting PE. To explore further the familial and hereditary components in the susceptibility to PE we investigated Na^+/Li^+ CT activity in red cells and DLIS plasma levels in the parents of the women with PE history.

2. Subjects and methods

Eleven [11] caucasian IDDM women with Preeclampsia (PE) in their history (Group 1) were matched for age, body mass index (BMI) and duration of diabetes with 13 IDDM, women who did not present hypertension during their pregnancies (Group 2). Twenty three [23] non diabetic women with preexisting PE (Group 3) were matched for age and BMI with a group of 12 non diabetic with normal pregnancy in the past (Group 4) (Table 1). The time of investigation of the patients was at least four months after the delivery (median: 5 months, range: 4–6). Patients with preexisting hypertension, cardiac, or renal

disease were excluded. All IDDM women were on their diabetic maintaining diet, which was similar in both diabetic groups. None of the IDDM, women were taking- any drugs other than insulin. The two groups of non diabetic women were taking no drugs either. All subjects had similar levels of physical activity and they were asked to avoid heavy physical exercise on the day before the study. We also studied both parents of 13 patients with PE (8 IDDM and 5 non-diabetic). None of the parents were known to have hyperlipidaemia, thyroid disease or diabetes. Of the 26 parents 6 were taking antihypertensive drugs including b-blockers, calcium antagonists and angiotensin converting enzyme inhibitors. None of them were taking amiloride and none of the mothers were on estrogen, or progesterone. The diagnosis of PE, was made on the basis of blood pressure more than 140/90 mmHg or a rise in systolic blood pressure of 30 mmHg and/or in diastolic pressure of 15 mmHg over the baseline values, on at least two occasions, after the 20th week of gestation [18]. All women with PE had proteinuria greater than 0.3 g/24 h when hypertension was diagnosed after 20th week of the gestation. Six of the IDDM women with PE and 15 of the non diabetic women with PE were primigravid. Data were collected from their files. The diabetic patients had not taken their morning insulin injections on the day of the investigation. The patients' weight and height were obtained while they were wearing light clothing without shoes. Blood pressure was measured by a standard sphygmomanometer in the right arm by one observer with the subject supine after 10 min rest. Blood pressure is expressed as the mean arterial pressure (MAP), calculated as diastolic pressure plus one third of the pulse pressure.

A blood sample was taken from all subjects for measurement of plasma glucose (enzymatic colorimetric method with hexokinase (Boehringer Mannheim GmbH Diagnostics), urea, creatinine, total protein, albumin (Enzymatic method end point, device FALCOR, Holliston, MA, USA) sodium, potassium (on selective electrodes, device CIBA – Corning, Block Scientific Inc., New York, USA). Glycosylated hemoglobin (HbA1c) (A. Menarini Diagnostic, Firenze, Italy) was measured by HPLC in the diabetic patients only. Urinary albumin concentration was measured by radioimmunoassay (albumin RIA kit Pharmacia AB, Uppsala, Sweden) in timed 24 h collections. Sodium–lithium counter-transport activity in red blood cells was determined by the method of Canessa [19]. Intracellular levels of sodium and potassium were determined by atomic

Table 1 – Clinical features of insulin dependent diabetic women with and without PE and non diabetic women with and without PE and parents of women with PE.

	IDDM with PE	IDDM without PE	Non Diabetics with PE	Non diabetics without PE	Parents of women with PE
No	12	12	23	12	26 (13F,13M)
Age	29 (24–36)	28 (27–38)	31 (28–40)	32 (28–37)	62 (48–73)
B.M.I. (kg/m ²)	24 (20–32)	25 (19–32)	26 (22–32)	25 (20–30)	27.5 (16–46)
Duration of IDDM (yrs)	11 (9–11)	10 (8–16)			
M.A.P. (mmHg)	92.5 (80–110)	87.3 (73–100)*	101 (88–133)	85 ((72–95)*	107.5 (92.5120)

MAP is statistically higher in IDDM with PE than in IDDM without PE $p < 0.05$, and higher in non diabetics with P.E. compared to non diabetics without P.E. (normal controls) $p \leq 0.01$.

* $p < 0.05$.

emission photometer (PERKIN ELMER) before and after the cells were loaded with lithium. DLIS activity was assayed by a modified, commercially available digoxin radioimmunoassay (RIA, RAINEN New England Nuclear, North Billerica MA, USA) as previously described [20]. Our method uses anti-digoxin monoclonal antibodies which react also with ouabain. The method has a small cross-reactivity with progesterone and 17-OH-progesterone, out of a various steroids checked (aldosterone, cortisol DHEA-S, estradiol and testosterone) which were non detectable.

The study was approved by the hospital's ethical committee and all subjects signed an informed consent form.

2.1. Statistical analysis

Values are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Student's *t* test was used to compare normally distributed data and Wilcoxon's rank sum test to compare non-normally distributed data; *p* values less than 0.05 were considered significant. Differences among the four study groups were further confirmed by analysis of variance (ANOVA). We used ANOVA to increase the statistical power of our sample and to avoid multiple comparison with the two *T*-test.

3. Results

3.1. Clinical characteristics and main biochemical features

The main clinical characteristics of diabetic and non diabetic women with and without PE are summarized in Table 1. Patient's age, BMI and duration of diabetes were similar between IDDM with and without PE. MAP was significantly higher in the IDDM, group with preexisting PE compared to the IDDM group without PE. Among non diabetic patients, age and BMI were similar but the MAP was significantly higher in those with PE (101.2, range 88–133 vs 86.1, range 72–95 mmHg, $p < 0.01$). The IDDM, patients with and without PE had similar glycemic control as assessed by the fasting blood glucose concentrations (170 vs 180 mg/dl) and glycosylated hemoglobin concentration (6.8 ± 0.78 vs $6.8 \pm 0.44\%$). There were no significant differences in serum creatinine levels (0.77 vs 0.75 mg/dl) and uric acid levels (4.0 vs 3.8 mg/dl) plasma sodium (138 vs 139 mmol/l) and plasma potassium levels (4.1 vs 3.9 mmol/l). No significant differences were found between the two non diabetic groups in terms of plasma glucose, serum creatinine, serum uric acid, plasma sodium and plasma potassium levels. Urinary albumin excretion rate was higher in the IDDM group with PE compared to the IDDM group without PE, (geometric mean 67 (range 15.3–120.5 vs 16.7 (0.69–36.3) mg/24 h $p < 0.01$) whereas there was no statistical difference between the two non diabetic groups 35 range (1.36–68) vs 19.1 (1.2–29.5) mg/24 h).

3.2. Na^+/Li^+ CT activity and DLIS levels

Erythrocyte Na^+/Li^+ CT activity was significantly higher in the IDDM patients with PE compared to IDDM without PE (0.31 ± 0.05 vs 0.19 ± 0.02 mmol/L RBC/h; $p < 0.014$) and in

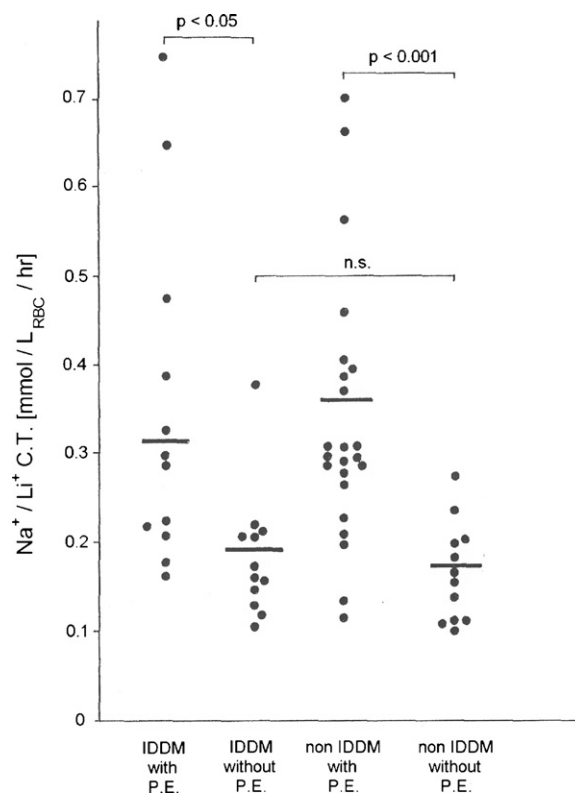


Fig. 1 – Erythrocyte Na^+/Li^+ countertransport activity in IDDM patients with PE vs IDDM without P.E. ($p < 0.05$) and in non diabetic patients with PE vs normal controls ($p < 0.01$).

the non diabetic women with PE than in those with normal pregnancy (0.365 ± 0.04 vs 0.168 ± 0.01 mmol/LRBC/hr; $p < 0.013$ (Fig. 1). Plasma levels of DLIS were significantly greater in the non diabetic subject with PE than in those with normal pregnancy (0.727 ± 0.189 vs 0.295 ± 0.066 ng/ml; $p < 0.03$) while no significant differences were found between IDDM, patients with and without PE (0.316 ± 0.104 vs 0.260 ± 0.086 ng/ml (Fig. 2). Correlation analysis was performed within each subpopulation to assess the potential relationship between erythrocyte Na^+/Li^+ CT activity and DLIS. The correlation between Na^+/Li^+ CT activity and DLIS was significant in IDDM patients with PE ($r = 0.927$; $p < 0.001$) (Fig. 3) and in non diabetic subjects with PE ($r = 0.485$; $p < 0.05$). Intra-erythrocyte sodium content was higher in IDDM patients with PE, than in IDDM women without PE (6.72 ± 0.52 vs 5.6 ± 0.40 mmol/L_{RBC}; $p < 0.04$) whereas non significant difference was found between the non diabetic groups. Intra-erythrocyte potassium was not different across the groups.

3.3. Family study

Because of the increased erythrocyte Na^+/Li^+ CT activity found in diabetic and non diabetic women with PE we performed a further analysis in which we tried to explore the hereditary and familial components of 13 subjects with PE whose biological parents were both alive. The means of erythrocyte Na^+/Li^+ CT activity, plasma levels of DLIS and mean blood

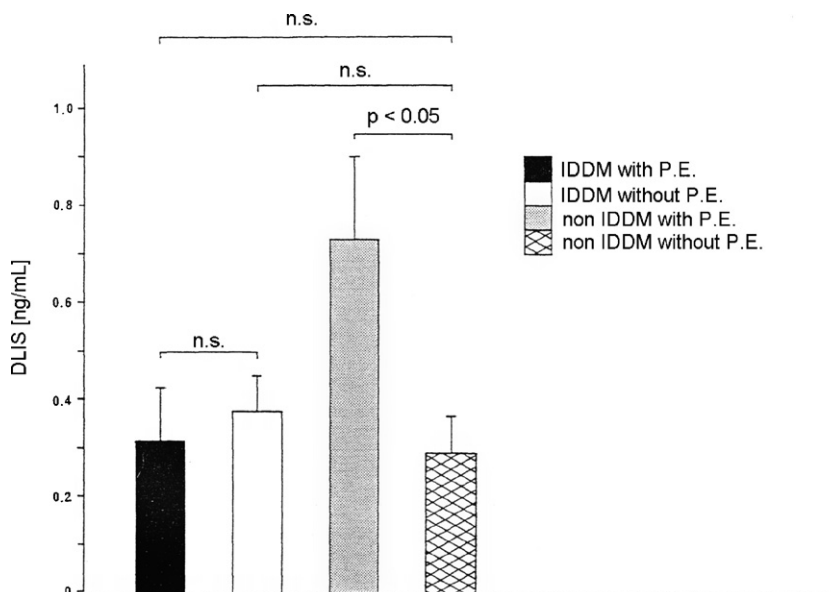


Fig. 2 – Digoxin like immunoreactive substances (DLIS) in insulin dependent patients with P.E. compared to IDDM without P.E. p:NS. And DLIS in non diabetics with P.E. vs normal controls ($p < 0.05$).

pressure for the two parents of each patient were calculated. Mean blood pressure of the parents was related to that of their offspring ($r = 0.610$; $p < 0.005$) (Fig. 4). There was a positive correlation between DLIS in parents and their daughters with PE ($r = 0.836$; $p < 0.01$) but there was no correlation between Na^+/Li^+ CT activity in parents and their offspring with PE.

4. Discussion

Preeclampsia is a pregnancy-specific multisystem disorder of unknown etiology. In our study we investigated IDDM, and non diabetic patients, with preexisting preeclampsia according to the criteria of classification (proteinuria, edema), new onset hypertension after 20 weeks of gestation in previously normotensive women) [18]. Adair et al., report that severe preeclampsia is associated with significantly lower erythrocyte sodium pump activity than normotensive pregnancy [21].

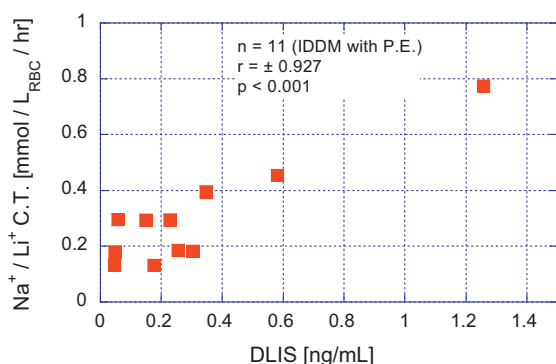


Fig. 3 – Correlation between RBC Na^+/Li^+ CT activity and DLIS in IDDM patients with P.E.

In order to avoid the influence of pregnancy we decided to study the patients at least four months after delivery. We found a significantly higher blood pressure ($p < 0.01$) in IDDM (Group 1) and non diabetic women (Group 3) with preeclampsia contrary to IDDM (Group 2) and non diabetic women (Group 4) without preeclampsia. Also erythrocyte Na^+/Li^+ CT activity was significantly higher in both Groups (1 and 3) with preeclampsia contrary to the two groups without P.E. (2 and 4). Specifically, significantly higher erythrocyte Na^+/Li^+ CT activity found in Group 1 compared to Group 2 ($p < 0.05$) and in Group 3 compared to Group 4 ($p < 0.001$). Our results seem to be in accordance with previous works. On Kosmidou et al. study, Na/Li CT activity correlated directly with obesity, systolic and diastolic BP and hyperlipidemia [6]. Higher erythrocyte Na^+/Li^+ CT activity has been reported by previous workers also in diabetic patients with microalbuminuria and diabetic nephropathy [7], patients with essential hypertension [5], and those with IgA nephropathy with hypertension [22]. Also increased RBC Na^+/Li^+ CT activity is associated with insulin resistance in patients with essential hypertension [23] and in patients with IDDM [11,24]. The higher albumin excretion in the IDDM group with PE may explain the higher erythrocyte Na^+/Li^+ CT activity in these patients but not in the non diabetic group with PE in which urinary albumin excretion was not different. The higher blood pressure that we found in both groups with PE may explain the higher erythrocyte Na^+/Li^+ CT activity, that still exists in these patients. Rutherford et al. [12] reported that erythrocyte Na^+/Li^+ CT activity, is increased also during normal pregnancy and returns to basal levels in the post partum period. This may explain the normal values that we found in Groups (2 and 4) without preeclampsia. Findings about the DLIS levels in pregnancy in the literature vary [13,16,25,26].

Increased values in normal pregnancy and further increase in PE have been reported by Ijiri et al. [13] while Logoglu et al, reported differences in DLIS in normal and women with PE

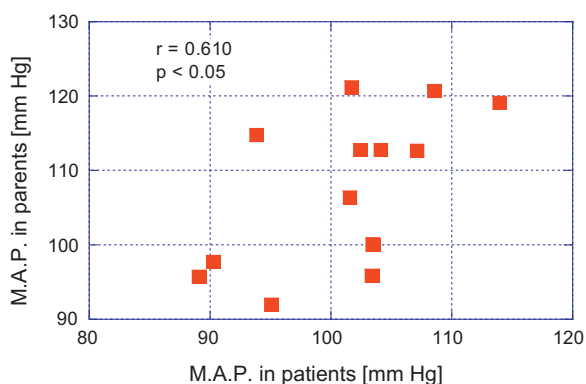


Fig. 4 – Correlation of M.A.P. between parents of patients with P.E. and their offsprings.

[16]. Bagrov et al. in their experimental study found that marinobufagenin which is an endogenous inhibitor of Na^+ / K^+ ATPase is a common factor in the pathogenesis of DM and PE [27]. We found significantly higher plasma levels of DLIS in non diabetic women with PE but no differences in non-diabetic women with or without PE. The significant correlation between Na^+ / Li^+ CT activity, and DLIS in IDDM and in non diabetic women with PE, that we found, but not in women without PE, supports the hypothesis of the potential relationship of Na^+ / Li^+ CT activity, and DLIS with the preeclampsia. Our findings seem to comply with a recent publication according which, cardiotonic steroids (endogenous ouabain) play an important role in the pathogenesis of NaCl -sensitive hypertension [28].

We observed that the parent mean blood pressure was related to that of their offspring. It is interesting that we found a significant correlation of DLIS levels in parents and their daughters with PE but non with the Na^+ / Li^+ CT activity. These findings provide evidence that familial factors related to arterial hypertension may have a role in the pathogenesis of preeclampsia.

Limitations of our study: The small number of the studied patients is a limitation of our study, but despite that we were able to find statistically significant differences. More studies are needed to confirm our results.

5. Conclusions

The increased Na^+ / Li^+ CT activity in post partum period in women with history of preeclampsia may play a role in the pathogenesis of this complication of pregnancy. In addition the correlation of DLIS level with MAP in patients and their parents suggest that familial factors may contribute in the pathogenesis of PE.

Acknowledgments

Thanks are due to Professor Athanasios Souvatzoglou for his unlimited support and also to Dr. Kontessis who passed away and was the inspirer of this study.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Penney GC, Mair G, Pearson DW. Scottish diabetes in pregnancy group outcomes of pregnancies in women with type 1 diabetes in Scotland: a national population-based study. *BJOG* 2003;110(10):966.
- [2] Garner PR, D'Alton ME, Dudley DK, Huard P, Hardie M. Preeclampsia in diabetic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163(2):505–8.
- [3] Lee VM, Halligan AW, Ng LL. Neutrophil intracellular Ph and Na^+ / H^+ exchanger activity in pre-eclampsia. *Metabolism* 2003;52(1):87–93.
- [4] Irani RA, Xia Y. The functional role of the rennin-angiotensin system in pregnancy and preeclampsia. *Placenta* 2008;29(9):763–71.
- [5] Lau Y-T, Cheng H-S, Hsieh C-C. Sodium transport in hypertension. *Chin J Physiol* 1992;35(3):241–56.
- [6] Kosmidou M, Hatzitolios A, Adamidou A, Giannopoulou S, Raikos N, Parharidis G, et al. Effects of Atrovastatin on red-blood cell Na^+ / Li^+ countertransport in hyperlipidemic patient with and without hypertension. *Am J Hypertens* 2008;21(3):303–9.
- [7] Krolewski AS, Canessa M, Warran JH, Laffel LMB, Christieb AR, Knowler WC, et al. Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *NEJM* 1988;21:140–5.
- [8] Trevisan R, Nosadini R, Floretto P, Semplicini A, Mozzato MG, Giorato C, et al. Arterial hypertension cation countertransport and renal function in insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes* 1989;38:31A (Abstract).
- [9] Jones ST, Trevisan R, Tariq T, Semplicini A, Mattock M, Walker JD, et al. Sodium-lithium counter-transport in microalbuminuric insulin-dependent diabetic patients. *Hypertension* 1990;15:570–5.
- [10] Mazzanti L, Rabini RA, Testa I, Coppa GV, Catassi C, Ceconi M, et al. Sodium metabolism in offspring of hypertensive parents. *Biochem Med Metab Biol* 1991;45(2):181–7.
- [11] Chiarelli F, Catino M, Tumini S, De Martino M, Mezzetti A, Verrotti A, et al. Increased Na^+ / Li^+ countertransport activity may help to identify type 1 diabetic adolescents and young adults at risk for developing persistent microalbuminuria. *Diabetes Care* 1999;22:1158–64.
- [12] Rutherford PA, Thomas TH, Macphall S, Wilkinson R. Sodium-lithium countertransport kinetics in normal and hypertensive human pregnancy. *Eur J Clin Invest* 1992;22:50–4.
- [13] Ijiri Y, Hayashi T, Kamegai H, Ohi K, Suzuki K, Kitauro Y, et al. Digital-like immunoreactive substances in maternal and umbilical cord plasma: a comparative sensitivity study of fluorescence polarization immunoassay and microparticle enzyme immunoassay. *Ther Drug Monit* 2003;25(2):234–9.
- [14] Fedorova OV, Simbirtsev AS, Kolodkin NI, Kotov AY, Agalakova NI, Kashkin VA, et al. Monoclonal antibody to an endogenous bufadienolide, marinobufagenin, reverses preeclampsia-induced Na^+ / K^+ -ATPase inhibition and lowers blood pressure in NaCl -sensitive hypertension. *J Hypertens* 2008;26(12):2414–25.

- [15] Wang Y, Lewis DF, Adair CD, Gu Y, Mason L, Kipikasa JH. Digibind attenuates cytokine TNF α -induced endothelial inflammatory response: potential benefit role of digibind in preeclampsia. *J Perinatol* 2009;29(3):195–200.
- [16] Logoglu G, Erdogan S, Ozgunem FT, Dogan A, Ozgunem T, Kadayifci O. Endogenous digoxin-like immunoreactive substance in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Int J Gynaecol Obstet* 1993;43(2):137–43.
- [17] Poston L, Sewell RB, Wilkison SP, Richardson PJ, Williams R, Clarkson EM, et al. Evidence for a circulating sodium transport inhibitor in essential hypertension. *Br Med J* 1981;283:847–9.
- [18] Sibai BM. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2003;102(1):181–92. Review.
- [19] Canessa M, Adragna N, Solomon HS, Connolly TM, Tosteson DC. Increased sodium–lithium countertransport in red cells of patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1980;302:772–6.
- [20] Loukari E, Yiannakou L, Souvatzoglou A, Diamantis EP. Radioimmunoassay of digoxin in serum using monoclonal antibodies and assessment of interference by digoxin like immunoreactive substances. *Ther Drug Monit* 1990;12:195–200.
- [21] Adair CD, Hauptert Jr GT, Koh HP, Wang Y, Veille JC, Buckalew V. Erythrocyte sodium/potassium ATPase activity in severe preeclampsia. *J Perinatol* 2009;29(4):280–3.
- [22] Kontessis PS, Friedman R, Tariq T, Moro F, Williams DG, Hartley D, et al. Sodium–lithium counter-transport activity as a determinant of deterioration of glomerular function in IgA nephropathy. *Exp Nephrol* 1994;2:176–81.
- [23] Canessa M, Falkner B, Hulman S. Red blood cell sodium–proton exchange in hypertensive blacks with insulin-resistant glucose disposal. *Hypertension* 1993;22:204–13.
- [24] Catalano C, Winocour PH, Thomas TH, Walker M, Sum CF, Wilkinson R, et al. Erythrocyte sodium–lithium activity and body insulin-mediated glucose disposal in normoalbuminuric normotensive type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1993;36:52–6.
- [25] Gonzalez AR, Phelps SJ, Cochran EB, Sibai BM. Digoxin-like immunoreactive substance in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1987;157:660–4.
- [26] Poston L, Morris JF, Wolfe CD, Hilton PJ. Serum digoxin-like substances in pregnancy-induced hypertension. *Clin Sci* 1989;77:189–94.
- [27] Bagrov YY, Manusova NB, Frolova EV, Egorova IA, Kashkin VA, Tapilskaya NI, et al. Endogenous sodium pump inhibitors, diabetes mellitus and preeclampsia Preliminary observations and a hypothesis. *Pathophysiology* 2007;14(3–4):147–51.
- [28] Fedorova OV, Shapiro JI, Bagrov AY. Endogenous cardiostimulatory steroids and salt-sensitive hypertension. *Biochim Biophys Acta* 2010;1802(12):1230–6. (Review).