



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**Α΄ ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗ ΝΟΣΟΛΟΓΙΑ**  
**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΕΤΡΟΣ Π. ΣΦΗΚΑΚΗΣ**

Ενδοθηλιακά Προγονικά Κύτταρα και Περιφερική Νευροπάθεια σε  
ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

της

**Ναταλίας Ι. Δημητρακοπούλου**

**Ιατρού, Παθολόγου**

Αθήνα 2021



Τίτλος : Ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα και Περιφερική Νευροπάθεια σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2

Ημερομηνία εγκρίσεως και ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 03/03/2016

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

κ. Νικόλαος Τεντολούρης, Καθηγητής (επιβλέπων)

κ. Πέτρος Σφηκάκης, Καθηγητής

κ. Αλέξανδρος Κόκκινος, Καθηγητής

Ημερομηνία καταθέσεως 1<sup>ης</sup> έκθεσης προόδου: 18/01/2017

Ημερομηνία καταθέσεως 2<sup>ης</sup> έκθεσης προόδου: 17/01/2018

Ημερομηνία καταθέσεως 3<sup>ης</sup> έκθεσης προόδου: 30/11/2021

Ημερομηνία καταθέσεως διδακτορικής διατριβής: 30/11/2021

Ημερομηνία επιτυχούς υποστήριξης διδακτορικής διατριβής: 08/02/2022

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

κ. Νικόλαος Τεντολούρης, Καθηγητής (επιβλέπων)

κ. Πέτρος Σφηκάκης, Καθηγητής

κ. Αθανάσιος Πρωτογέρου, Καθηγητής

κ. Κωνσταντίνος Μακρυλάκης, Καθηγητής


κ. Ευάγγελος Λυμπερόπουλος, Καθηγητής

κ. Αλέξανδρος Κόκκινος, Καθηγητής

κ. Παναγιώτης Κοκότης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Βαθμός : Άριστα

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,  
 ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ  
 ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ  
 ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ  
 ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΉΓΗΣΑΣΘ  
 ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ  
 Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ  
 ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ  
 ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ  
 ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ  
 ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ  
 ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ  
 ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ  
 ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ  
 ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ  
 ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ  
 ΔΙΔΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ  
 ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ  
 ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΪΕΙΝ, ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ  
 ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ  
 ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ  
 ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ, ΑΓΝΩΣ Δ  
 Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ  
 ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ, ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ  
 ΙΛΜΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ  
 ΗΪΙΟΣ ΤΗΣΔΕ, ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ,  
 ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ  
 ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, Τ  
 ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΔΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ  
 ΝΔΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ  
 ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ, Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,  
 Η ΙΔΩ, Η ΔΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ Β  
 ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ  
 ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ  
 ΙΔΥΤΑ, ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ  
 Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ  
 ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΪΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π  
 ΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ  
 ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.



## Βιογραφικό Σημείωμα

### ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ

E-mail: [ndimitra@med.uoa.gr](mailto:ndimitra@med.uoa.gr) , [info@pathologiko.gr](mailto:info@pathologiko.gr)

Website (Ιατρείου): <http://www.pathologiko.gr/>

### ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ – ΑΡΙΣΤΕΙΑ- ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- **Φεβρουάριος 2016 – σήμερα:** Έναρξη εκπόνησης διδακτορικής διατριβής στην Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών στο γνωστικό πεδίο του Σακχαρώδους Διαβήτη με θέμα διδακτορικής διατριβής «Ενδοθηλιακά Προγονικά Κύτταρα και Περιφερική Νευροπάθεια σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2». Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ: κ. Νικόλαος Τεντολούρης, Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ.
- **Δεκέμβριος 2021:** Τίτλος Εξειδίκευσης στον Σακχαρώδη Διαβήτη (Αρ.Πρωτ.Γ5α/Γ.Π.72931/14-12-2021)
- **Μάρτιος 2015 – Μάρτιος 2016:** Μετεκπαίδευση στο Σακχαρώδη Διαβήτη, Παθήσεις διαβητικού ποδιού, Παχυσαρκία – Συμμετοχή σε κλινικές μελέτες ως συνεργαζόμενος ερευνητής στο γνωστικό πεδίο του Σακχαρώδους Διαβήτη στο Διαβητολογικό Κέντρο του Λαϊκού Νοσοκομείου και στο Διαβητολογικό Εργαστήριο
- **Δεκεμβριος 2014:** Τίτλος ειδικότητας Παθολογίας (Αρ.Πρωτ: 2813/15-01-2015)
- **Φεβρουαριος 2009 – Οκτωβριος 2014:** Ειδικότητα στην Παθολογία στην Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών ΓΝΑ Λαϊκού Νοσοκομείου.
- **Σεπτέμβριος 1998 – Ιούλιος 2004:** Εισαγωγή 3<sup>η</sup> σε σειρά και 7<sup>η</sup> πανελλαδικώς στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Παν/μίου Αθηνών - Πτυχιούχος περιόδου Ιουλίου 2004 με βαθμό πτυχίου «Λίαν Καλώς».
- Κάτοχος βραβείου ΕΘΝΟΣΠΟΥΔΕΣ της Εθνικής Τράπεζας της Ελλάδος για τις Εισαγωγικές Εξετάσεις 1998 της 2ης Δέσμης στα Α.Ε.Ι. (γενική σειρά εισαγωγής στη Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ 3<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> πανελλαδικώς.)
- Υποτροφία αριστείας για το ακαδημαϊκό έτος 1998- 1999, από το Πνευματικό Κέντρο «Αντιγονη Ζουρούδη», εις μνήμην Αντιγόνης Ζουρούδη.

## ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- **Νοέμβριος 2015 – σήμερα:** Ιδιωτικό παθολογικό ιατρείο (Ν. Σμύρνη)
- **Δεκέμβριος 2021:** Κτήση τίτλου Εξειδίκευσης στο Σακχαρώδη Διαβήτη (Αρ.Πρωτ.Γ5α/Γ.Π.72931/14-12-2021)
- **Μάρτιος 2015 – Μάρτιος 2016:** Μετεκπαίδευση στο Σακχαρώδη Διαβήτη, Παθήσεις διαβητικού ποδιού, Παχυσαρκία – Συμμετοχή σε κλινικές μελέτες ως συνεργαζόμενος ερευνητής στο γνωστικό πεδίο του Σακχαρώδους Διαβήτη στο Διαβητολογικό Κέντρο του Λαϊκού Νοσοκομείου και στο Διαβητολογικό Εργαστήριο.
- **Δεκεμβριος 2014:** Κτήση τίτλου ειδικότητας Παθολογίας (Αρ.Πρωτ: 2813/15-01-2015)
- **Φεβρουαριος 2009 – Οκτωβριος 2014:** Άσκηση ως ειδικευόμενη ιατρός στην Παθολογία στην Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών ΓΝΑ Λαϊκού Νοσοκομείου, η οποία συνίσταται σε παρακολούθηση ασθενών στους θαλάμους της Παθολογικής Κλινικής, πραγματοποίηση εφημεριών στην Παθολογική Κλινική και στο Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών, καθώς και παρακολούθηση στο εξωτερικό Παθολογικό ιατρείο της Κλινικής και στα εξειδικευμένα ιατρεία σακχαρώδους διαβήτη και υπέρτασης.
- **Ιούνιος 2006 - 2009:** Απασχόληση στις κλινικές: «Αθήναιον» Euromedica S.A. (Κόνωνος 121, Βύρωνας) ως εφημερεύουσα ιατρός και Γενική Κλινική Πειραιώς «Ιπποκράτης» (Ηρώων Πολυτεχνείου 65, Πειραιάς) ως ιατρός της κλινικής με το καθεστώς της πλήρους απασχόλησης.
- **Φεβρουάριος 2005 – Φεβρουάριος 2006 :** Υπηρεσία υπαίθρου - 12μηνη θητεία στο Π.Ι. Αβραμίου του Κ.Υ.Μεσσήνης ως αγροτική ιατρός και στο Κ.Υ. Μεσσήνης ως εφημερεύουσα ιατρός.
- **Νοέμβριος 2004 - Φεβρουάριος 2005 :** Υπηρεσία στο Γενικό Νοσοκομείο Καλαμάτας για την υποχρεωτική τρίμηνη εκπαίδευση σε τακτικά Παθολογικά, Χειρουργικά και Καρδιολογικά εξωτερικά Ιατρεία και αντίστοιχα Ιατρεία Επειγόντων Περιστατικών.

## ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΙΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

- HARMONY OUTCOMES TRIAL 2014N193553\_01/GR
- MK-8835-004-00/B1521021
- E-Predice, “Early Prevention of Diabetes Complications in People with Hyperglycaemia in Europe” project (ePREDICE)

Τελευταία εκπαίδευση GCP Μάιος 2015

## ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Εσωτερικής Παθολογίας, της Ελληνικής Διαβητολογικής Εταιρείας, της Εταιρείας Μελέτης Παθήσεων Διαβητικού Ποδιού, της Ελληνικής Εταιρείας Αθηροσκλήρωσης, και του Ιατρικού Συλλόγου Αθηνών.

Πιστοποίηση μετεκπαίδευσης στη λιπιδιολογία (Excellence in Lipidology certification), Hellenic Atherosclerosis Society, Ιούλιος 2017.

## ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

**Αγγλικά:** Certificate of Proficiency in English Cambridge (grade B) – Επάρκεια διδασκαλίας Αγγλικής γλώσσας.

**Ιατρική αγγλική ορολογία:** Ολοκλήρωση 2ετούς κύκλου σπουδών του τμήματος Ιατρικής Ορολογίας στην Αγγλική γλώσσα στο Διδασκαλείο ξένων γλωσσών του Πανεπιστημίου Αθηνών με βαθμό πρώτου και δεύτερου έτους «10».

**Μουσικές σπουδές 1984 – 2000:** Πτυχίο Πιάνου με βαθμό «Άριστα Παμψηφεί» και Ανώτατη Τιμητική Διάκριση, Ιούνιος 2000 – Σχολή πιάνου Καθηγήτριας κας. Μαίρης Χάλαρη, Ωδείο Αττικής. Παρακολούθηση και συμμετοχή ως ενεργό μέλος σε σεμινάρια με τους Γ. Χατζηνίκο, Ν. Σεμιτέκολο κ.ά.

## ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ (ενδεικτικά)

- 10<sup>th</sup> Anniversary Congress of the European Federation of Internal Medicine (EFIM), October 5-8, 2011, Athens, Greece
- 17<sup>th</sup> Congress of the Hellenic Society of Internal Medicine (HSIM), October 5-8, 2011, Athens, Greece
- 9<sup>th</sup> Annual European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) Conference, March 7-9, 2012, Copenhagen, Denmark
- 38<sup>ο</sup> Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 16-19 Μαΐου 2012, Αθήνα
- Official pre-ESH/ISH Congress Satellite Symposium “Update on Resistant Hypertension and Related Comorbidities”, June 11-12, 2014, Athens, Greece
- Joint Meeting ESH/ISH Hypertension Athens 2014, June 13-16, 2014, Athens, Greece
- ESCCA (European society for Clinical Cell Analysis), Edinburgh, UK, 11-14 September 2016
- 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ανοσολογίας 8-10 Δεκεμβρίου 2016, Θεσσαλονίκη



**ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ – ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ**

- N. Δημητρακοπούλου, N. Καφάση, I. Ελευθεριάδου, A. Δημητρακοπούλου, E. Jude, N. Τεντολούρης, «Συνέκφραση δεικτών επιφανείας στα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα των διαβητικών», 1<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Διαδικτυακό Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας 11-13 Δεκεμβρίου 2020
  
- Ioanna Eleftheriadou, Natalia Dimitrakopoulou, Nikolitsa Kafasi, Anastasios Tentolouris, Aglaia Dimitrakopoulou, Ioanna A. Anastasiou, Iordanis Mourouzis, Edward Jude, Nikolaos Tentolouris, «Endothelial progenitor cells and peripheral neuropathy in subjects with type 2 diabetes mellitus», Journal of Diabetes and its Complications Volume 34, Issue 4, April 2020, 107517  
<https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2019.107517>
  
- N. Δημητρακοπούλου, N. Καφάση, I. Ελευθεριάδου, A. Δημητρακοπούλου, E. Jude, N. Τεντολούρης, «Ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (erc) σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 με και χωρίς περιφερική νευροπάθεια» (ΠΝ) Περιοδικό ΑΝΟΣΙΑ, Τριμηνιαία Έκδοση της Ελληνικής Εταιρείας Ανοσολογίας τόμος 15, τεύχος 2, 2019
  
- N. Δημητρακοπούλου, N. Καφάση, I. Ελευθεριάδου, A. Δημητρακοπούλου, E. Jude, N. Τεντολούρης, «Ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα σε ασθενείς διαβήτη τύπου 2 με και χωρίς περιφερική νευροπάθεια» (ΠΝ) 11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ανοσολογίας, 5-7 Δεκεμβρίου 2019, Μουσείο Μπενάκη Πειραιώς 138 Αθήνα
  
- Ναταλία Δημητρακοπούλου, Ιωάννα Ελευθεριάδου, Νικολίτσα Καφάση, Αγλαΐα Δημητρακοπούλου, E. Jude, N. Τεντολούρης, «Προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα και διαβητική περιφερική νευροπάθεια σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2», 21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Εσωτερικής Παθολογίας, 31/10 – 3/11 2018, Ξενοδοχείο Divani Caravel, Αθήνα
  
- Kafasi Nikolitsa, Dimitrakopoulou Natalia, Eleftheriadou Ioanna, Dimitrakopoulou Aglaia, Jude Edward, Tentolouris Nikolaos, «Endothelial Progenitor Cells in Diabetics type 2 with Peripheral Neuropathy display a CD31<sup>dim</sup> phenotype» 125, ESCCA (European society for Clinical Cell Analysis), Valencia, Spain, 13-15 September 2018
  
- Δημητρακοπούλου N., Καφάση N., Ελευθεριάδου I., Δημητρακοπούλου A. Jude E., Τεντολούρης N., «Ενδοθηλιακά Προγονικά Κύτταρα και Περιφερική Διαβητική Νευροπάθεια σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2», 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρομετρίας, 11 - 13 Μαΐου 2018, Αμφιθέατρο Σαράτση, Βόλος

- Δημητρακοπούλου Ν., Καφάση Ν., Ελευθεριάδου Ι., Δημητρακοπούλου Α. Jude Ε., Τεντολούρης Ν., «Ενδοθηλιακά Προγονικά Κύτταρα σε Διαβητικούς με Περιφερική Νευροπάθεια»
  - **Βραβείο της επιτροπής βράβευσης του 10<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Ιατρικής Βιοπαθολογίας 28/04/2018**

10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 26-28 Απριλίου 2018, Μέγαρο Διεθνές Συνεδριακό Κέντρο Αθηνών, Αθήνα
- Ελευθεριάδου Ιωάννα, Δημητρακοπούλου Ναταλία, Καφάση Νικολίτσα, Δημητρακοπούλου Αγλαΐα, Jude Edward, Τεντολούρης Νικόλαος, “Διαβητική περιφερική νευροπάθεια και ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα- προκαταρκτικά αποτελέσματα” , 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εταιρίας Μελέτης Παθήσεων Διαβητικού Ποδιού (ΕΜΕΔΙΠ) με Διεθνή Συμμετοχή, 1-4 Φεβρουαρίου 2018, Ξενοδοχείο Crowne Plaza, Αθήνα
- Nikolitsa Kafasi, Natalia Dimitrakopoulou, Ioanna Eleftheriadou, Aglaia Dimitrakopoulou, Edward Jude, Nikolaos Tentolouris., “Endothelial Progenitor Cells and Diabetic Peripheral Neuropathy”, ESCCA (European society for Clinical Cell Analysis), Thessaloniki, Greece, 24 - 27 September 2017
- I. Eleftheriadou, N. Dimitrakopoulou, N. Kafasi, A. Dimitrakopoulou, E. Jude, N. Tentolouris, “Endothelial progenitor cells are increased in patients with type 2 diabetes and peripheral neuropathy”, European Association for the Study of Diabetes (EASD) 2017 Annual Meeting, September 11 - 15, 2017 Lisbon, Portugal
- I. Eleftheriadou, N. Dimitrakopoulou, N. Kafasi, A. Dimitrakopoulou, E. Jude, N. Tentolouris, “The association of Endothelial Progenitor Cells with peripheral neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus ”, Diabetic Foot Study Group of the EASD (DFSG), 14th Scientific Meeting 8 - 10 September 2017, Porto · Portugal
- Ναταλία Δημητρακοπούλου, Νικολίτσα Καφάση, Ιωάννα Ελευθεριάδου, Αγλαΐα Δημητρακοπούλου, Ε. Jude, Ν. Τεντολούρης, «Ο ρόλος των ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων στη διαβητική περιφερική νευροπάθεια», 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Διαβητολογικό Συνέδριο, 15-18 Μαρτίου 2017, Αθήνα.
- Ν. Δημητρακοπούλου, Ν. Καφάση, Ι. Ελευθεριάδου, Α. Δημητρακοπούλου, Ε. Jude, Ν. Τεντολούρης, «Ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα και περιφερική νευροπάθεια σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2» Περιοδικό ΑΝΟΣΙΑ, τόμος 12, τεύχος 2, 2016.

- N. Δημητρακοπούλου, N. Καφάση, I. Ελευθεριάδου, A. Δημητρακοπούλου, E. Jude, N. Τεντολούρης, «Ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα και περιφερική νευροπάθεια σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου» 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ανοσολογίας 8-10 Δεκεμβρίου 2016, Θεσσαλονίκη.
- Nikolitsa Kafasi, Natalia Dimitrakopoulou, Ioanna Eleftheriadou, Aglaia Dimitrakopoulou, Nikolaos Tentolouris, «Endothelial Progenitor Cells in patients with diabetic peripheral neuropathy - preliminary results», ESCCA (European society for Clinical Cell Analysis), Edinburgh, UK, 11-14 September 2016
- Ελευθεριάδου I., Γρηγοροπούλου Π., Δημητρακοπούλου Ν., Σιάμη Ε., Μουρούζης Ι., Κόκκινος Α., Περρέα Δ., Κατσιλάμπρος Ν., Τεντολούρης Ν., «Οστεοποντινη, περιφερική αγγειοπάθεια και αρτηριακή σκληρία σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2», 5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Εταιρίας Μελέτης Παθήσεων Διαβητικού Ποδιού, Αθήνα, 5-7 Φεβρουαρίου 2016.
- Ελευθεριάδου I., Γρηγοροπούλου Π., Δημητρακοπούλου Ν., Αθανασοπούλου Ε., Μουρούζης Ι., Κόκκινος Α., Περρέα Δ., Κατσιλάμπρος Ν., Τεντολούρης Ν. «Συσχέτιση φετουίνης-α με την περιφερική αγγειοπάθεια και την ασβέστωση των αρτηριών των κάτω άκρων σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2», 5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Εταιρίας Μελέτης Παθήσεων Διαβητικού Ποδιού, Αθήνα, 5-7 Φεβρουαρίου 2016.
- Angelopoulos, T., Basagiannis, C., Dimitrakopoulou, N., Ampazis, O., and Nikou, G, “A 67-year Old Woman with a Carcinoid Tumor of the Coccyx with Liver Metastases”, in Proc. 9<sup>th</sup> Annual ENETS Conference for the Diagnosis and Treatment of Neuroendocrine Tumor Disease, Copenhagen, Denmark, 7-9 March 2012.
- Αγγελόπουλος Θ., Μπασαγιάννης Χ., Δημητρακοπούλου Ν., Γεραγώτου Θ., Κολίντου Α., Κίτσου ε., Νίκου Γ., «Συγκριτική μελέτη των απεικονιστικών μεθόδων για τη διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση μη λειτουργικών νευροενδοκρινικών όγκων του παγκρεάτος», 30<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, 11-14 Νοεμβρίου 2010, Αθήνα.
- Μπασαγιάννης Χ., Παπαδημητρίου Χ., Αγγελόπουλος Θ., Γεραγώτου Θ., Δημητρακοπούλου Ν., Παναγούλιας Γ., Νίκου Γ., «Τα ανάλογα σωματοστατίνης στην αντιμετώπιση μιας σειράς 109 ασθενών με καρκινοειδή του στομάχου», 30<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, 11-14 Νοεμβρίου 2010, Αθήνα.

*Χαίρε, ότι τον πολύφωτον ανατέλλεις φωτισμόν,  
Χαίρε, Νύμφη Ανύμφευτε.*

*Οίκος Φ, Δ' Στάση Ακολουθίας των Χαιρετισμών της Θεοτόκου*

*Στους γονείς μου  
στο σύζυγό μου και στις κόρες μας,  
με αγάπη και ευγνωμοσύνη*

*Στους δασκάλους μου,  
με σεβασμό και ευγνωμοσύνη*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

*Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Διαβητολογικό Εργαστήριο της Α Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής και Ειδικής Νοσολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι εθελοντές εξεταζόμενοι ασθενείς συμμετέχοντες στη μελέτη προέρχονταν από το Διαβητολογικό Κέντρο του Γ.Ν.Α. «Λαϊκό» και οι εργαστηριακές μετρήσεις έλαβαν χώρα στο Διαβητολογικό Εργαστήριο και στο Τμήμα Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας του Γ.Ν.Α. «Λαϊκό».*

*Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου σε όλους όσους συνέβαλαν στο σχεδιασμό και την πραγματοποίησή της, ιδιαίτερα στα τρία μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Νικόλαο Τεντολούρη, τον Καθηγητή και Διευθυντή της Κλινικής κ. Πέτρο Σφηκάκη και τον Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Κόκκινο για τη συμμετοχή, την υποστήριξη και την καθοδήγησή τους κατά τη διάρκεια της πορείας και της διεκπεραίωσης του έργου.*

*Καταρχάς, ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω με ευγνωμοσύνη τον Καθηγητή Παθολογίας της Α Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής και Ειδικής Νοσολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Νικόλαο Τεντολούρη, δάσκαλό μου και επιβλέποντα του έργου, για την τόσο τιμητική για εμένα ανάθεση της διδακτορικής αυτής διατριβής, την ανάληψη της επίβλεψής της, και για την υποστήριξη, την ενίσχυση και την αμέριστη συμπαράστασή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησής της. Η εμπιστοσύνη, η συνεχής βοήθεια και διδαχή, μαζί με το αίσθημα απόλυτης σιγουριάς, γαλήνης και αισιοδοξίας που καλλιέργησε, με συνόδευαν σε όλα τα στάδια της μελέτης αυτής. Οφείλω ευγνωμοσύνη στο πρόσωπό του και αισθάνομαι ευνοημένη όσο λίγοι, όχι μόνο γιατί με επέβλεψε, με καθοδήγησε ενεργά με επιμονή και απέραντη υπομονή, και με ενθάρρυνε εμπυχώνοντάς με αδιαλείπτως μέχρι την περάτωση του έργου, αλλά και για τον πλούτο των γνώσεων και τη μοναδική εμπειρία της βιωματικής μάθησης που πλάι του διδάχθηκα και διαφυλάττω ως πολύτιμο εφόδιο σε κάθε βήμα στην επαγγελματική και επιστημονική μου πορεία. Με περιέβαλλε και με περιβάλλει αδιάκοπα με πατρική στοργή, με ενέπνευσε και εμπνέει, δίδαξε και διδάσκει με την ψυχική του γενναιοδωρία, την αρχοντική του καλοσύνη - και πάνω απ' όλα με το παράδειγμά του - την απλότητα και την ανθρωπιά με την οποία ο ιατρός προσεγγίζει τον πάσχοντα, και τη γνήσια αγάπη του δασκάλου για το μαθητή. Αποτελεί για εμένα πρότυπο δασκάλου, επιστήμονα, ιατρού και ανθρώπου.*

*Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή και Διευθυντή της Α Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής και Ειδικής Νοσολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Πέτρο Σφηκάκη για την ευκαιρία που μου έδωσε προς εκπόνηση της έρευνας αυτής και ευόδωση της προσπάθειάς μέχρι την τελική μορφή του έργου, την παρουσία, και την εμπιστοσύνη με την οποία με τίμησε καθ' όλο το διάστημα της μελέτης.*

*Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Παθολογίας της Α Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής και Ειδικής Νοσολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Αλέξανδρο Κόκκινο για την πολύτιμη και σημαντική συνεισφορά του στην ολοκλήρωση της προσπάθειάς μου, για την κλινική και ερευνητική του παρουσία η ακτινοβολία της οποίας επέδρασε στη διαμόρφωση και στην εκπλήρωση της διδακτορικής αυτής διατριβής, και για την εμπιστοσύνη, τη διαρκή υποστήριξη και την καθοδήγησή του σε ολόκληρη την επιστημονική διαδρομή μου έως τώρα.*

Θα ήθελα να ευχαριστήσω συγχρόνως τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Κων/νο Μακρυλάκη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Παν/τη Κοκότη, τον Καθηγητή κ. Ευάγγελο Λυμπερόπουλο και τον Καθηγητή κ. Αθανάσιο Πρωτογέρου, για την ευγένεια και την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Τις θερμότερες ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου θα ήθελα να εκφράσω στην Ιατρό, ειδική Παθολόγο, Ακαδημαϊκή Υπότροφο και Επιστημονική Συνεργάτιδα της Κλινικής Δρ. Ιωάννα Ελευθεριάδου, η συμβολή της οποίας υπήρξε καθοριστική για την έναρξη, την εκπόνηση και την ολοκλήρωση της μελέτης, καθώς με αμείωτο ενθουσιασμό και αφοσίωση μου μετέδωσε την πολύτιμη εμπειρία της, και αφιέρωσε απεριόριστο χρόνο σε όλα τα στάδια της μελέτης κατά την εξέλιξη της διατριβής. Οι επιστημονικές κατευθύνσεις, οι σημαντικές υποδείξεις και οι γόνιμες παρατηρήσεις της κατά την παρακολούθηση της εργασίας προώθησαν την εκπόνησή της, η δε πολύπλευρη βοήθειά της κατά τη λήψη και επεξεργασία των δειγμάτων, τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή οδήγησαν στην τελική μορφή της παρούσας διατριβής, και της είμαι ειλικρινώς ευγνώμων. Υπήρξε ανεκτίμητη αρωγός, συμβουλευόντάς με και ενθαρρύνοντάς με με πολλή αγάπη, και ήταν πάντα δίπλα μου σαν άξια επιστήμονας και το σπουδαιότερο για εμένα, σαν υπέροχος άνθρωπος.

Ιδιαίτερως εκφράζω θερμά από καρδιάς πολλά ευχαριστώ στον Ιατρό, ειδ. Παθολόγο της Α Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής Δρ. Αναστάσιο Τεντολούρη, για την ανεκτίμητη βοήθειά του χωρίς την οποία μεγάλο μέρος της διατριβής αυτής δεν θα ήταν δυνατό να εκπονηθεί, για την καθοδήγηση και τη συμβουλευτική που μου παρείχε, και τη συμβολή του στην επιστημονική συζήτηση επί του αντικειμένου της παρούσας εργασίας και στην ανάλυσή της. Η αμεσότητα και η πληρότητα της επικοινωνίας μας σε όλα τα στάδια της μελέτης αυτής, η αδελφική του συμπαράσταση, κατανόηση και αγάπη, μου προσέφεραν αυθεντική δημιουργική χαρά, και μου χάρισαν το αναντικατάστατο βίωμα της ασφάλειας, το οποίο θεμελιώνει, τροφοδοτεί και προάγει την πρόοδο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στη Διευθύντρια του Τμήματος Ανοσολογίας - Ιστοσυμβατότητας του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Λαϊκό» Ιατρό Βιοπαθολόγο κα. Νικολίτσα Καφάση, για την επιστημονική της καθοδήγηση και υποστήριξη, για την ευγενική και απρόσκοπτη παραχώρηση του χώρου και της υλικοτεχνικής υποδομής του Τμήματος Ανοσολογίας, απαραίτητης για τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης, και για τις ατελείωτες ώρες που δαπάνησε, προσφέροντας σημαντική και πάντα πρόθυμη βοήθεια και ενθάρρυνση σε ερευνητικό και προσωπικό επίπεδο. Η στήριξη εκ μέρους της και η μετάγγιση της γνώσης της στα θέματα που άπτονταν του ερευνητικού της πεδίου, μου εμφύσησαν το ενδιαφέρον σε σχέση με τον ερευνητικό τομέα της Κυτταρικής Ανοσολογίας, και της χρωστώ μεγάλο επιστημονικό και ηθικό όφελος.

Θερμώς ευχαριστώ όλους τους συνεργάτες και τους συναδέλφους με τους οποίους είχα την τιμή και την τύχη να συνεργαστώ και να συμπορευτώ στο Διαβητολογικό Εργαστήριο της ΑΠΠΚ, το οποίο αποτελεί αστείρευτη πηγή δημιουργικής έμπνευσης και ένα ερευνητικό περιβάλλον από όπου άντλησα και αντλώ γνώσεις και εμπειρία, για τη βοήθεια και τη συμβολή τους ως επιστήμονες και ως άνθρωποι.

*Ομοίως, οφείλω πολλά και σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου του τμήματος Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, που με υποδέχθηκαν με θέρμη, προσέφεραν πρόθυμη βοήθεια στην προσπάθειά μου και συνέδραμαν στην πρόοδο και τελείωση του έργου.*

*Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους ασθενείς και στα πρόσωπα που συμμετείχαν στη μελέτη εθελοντικά ως υγιείς εξεταζόμενοι, ιδιαίτερως στα μέλη του προσωπικού της Κλινικής, του Διαβητολογικού Εργαστηρίου και του Εργαστηρίου Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας, τα οποία με τίμησαν με την ανιδιοτελή προσφορά του χρόνου τους και με την παρουσία τους, και η αξία της συνεισφοράς τους είναι ανυπολόγιστη.*

*Ξεχωριστά και με απέραντη ευγνωμοσύνη ευχαριστώ την οικογένειά μου, το σύζυγό μου και τις κόρες μας, τους γονείς μας, τα αδέρφια και τους φίλους μας, οι οποίοι με την αγάπη τους, την δοτική παρουσία και την ουσιαστική τους βοήθεια, με υπομονή, κατανόηση και πίστη, μου συμπαραστάθηκαν και με στηρίζουν σε όλη τη διάρκεια της πορείας μου.*

*Αθήνα, Νοέμβριος 2021*

*Ναταλία Ι. Δημητρακοπούλου*



## Περιεχόμενα

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ.....	20
<b>1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>25</b>
1.1. Εισαγωγή .....	26
1.2. Σακχαρώδης Διαβήτης και Επιπλοκές – Διαβητική Νευροπάθεια .....	27
1.2.1. Δυσλειτουργία Ενδοθηλίου στον Σακχαρώδη Διαβήτη .....	27
1.2.2. Επιπλοκές του Σακχαρώδη Διαβήτη – Παθογένεση επιπλοκών.....	29
1.2.3. Μηχανισμοί βλάβης μικροαγγειακών επιπλοκών .....	29
1.2.3.1. Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια .....	29
1.2.3.2. Διαβητική νεφροπάθεια .....	31
1.2.4. Διαβητική νευροπάθεια .....	32
1.2.4.1. Ορισμός -Ταξινόμηση .....	32
1.2.4.2. Παθογένεση.....	34
1.2.4.3. Κλινική εικόνα.....	34
1.2.4.4. Διάγνωση – Κλινική εξέταση.....	35
1.3. EPCs – Ορισμός και δράση στο ενδοθήλιο .....	38
1.3.1. Ορισμός .....	38
1.3.2. Βιολογία των EPCs .....	39
1.3.3. Ρόλος και δράση των EPCs στο ενδοθήλιο .....	41
1.3.4. Ταξινόμηση EPCs .....	45
1.3.5. Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός EPCs .....	46
1.3.6. Υποτύποι EPCs .....	48
1.3.7. Υποπληθυσμοί EPCs .....	51
1.4. Μεταβολές των EPCs στο Σακχαρώδη Διαβήτη.....	54
1.4.1. Γενικά.....	54
1.4.2. Διαταραχή αριθμού .....	54
1.4.3. Διαταραχή λειτουργίας.....	56
1.4.3.1. Διαταραχή κινητοποίησης .....	56
1.4.3.2. Διαταραχή μετανάστευσης.....	57
1.4.3.3. Διαταραχή ενσωμάτωσης.....	57
1.4.4. Το οξειδωτικό στρες και η υπεργλυκαιμία ως τα κύρια αίτια διαταραχής του αριθμού και της λειτουργίας των EPCs. ....	58
1.4.5. Τα EPCs στις διαβητικές επιπλοκές .....	61

1.4.5.1. Γενικά.....	61
1.4.5.2. EPCs και μακροαγγειακή νόσος.....	62
1.4.5.3. EPCs και μικροαγγειακές επιπλοκές.....	62
1.5. Παράγοντες που επηρεάζουν τα EPCs.....	66
1.5.1. Ηλικία.....	66
1.5.2. Τρόπος ζωής - Lifestyle.....	66
1.5.3. Φάρμακα.....	67
1.5.3.1. Στατίνες.....	67
1.5.3.2. Φάρμακα που δρουν στο σύστημα ρενίνης – αγγειοτενσίνης – αλδοστερόνης.....	68
1.5.3.3. Οιστρογόνα.....	68
1.5.3.4. Αντιδιαβητική αγωγή.....	68
1.6. Ο Ποσοτικός προσδιορισμός των EPCs με κυτταρομετρία ροής – Μεθοδολογία.....	72
1.6.1. Κυτταρικός διαχωρισμός.....	72
1.6.2. Αρχή μεθόδου κυτταρομετρίας ροής.....	72
1.6.3. Μονοκλωνικά αντισώματα και ανοσοφθορισμός.....	73
1.6.4. Κυτταρομετρία ροής και EPCs.....	74
1.7. Θεραπευτικές προσεγγίσεις με EPCs.....	76
1.7.1. Καρδιαγγειακό σύστημα.....	76
1.7.2. Πνεύμονες- Ήπαρ- Οστά.....	76
1.7.3. Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια.....	77
1.7.4. Διαβητική Νευροπάθεια.....	77
1.7.5. Έλκος διαβητικού ποδιού.....	78
<b>2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>79</b>
2.1. Σκοπός.....	80
2.2. Άτομα και πληθυσμός της μελέτης.....	81
2.2.1. Πληθυσμός της μελέτης.....	81
2.2.2. Άτομα της μελέτης.....	81
2.3. Εκτίμηση της ΔΠΝ.....	85
2.4. Εργαστηριακός έλεγχος.....	91
2.5. Απομόνωση των EPCs – Κυτταρομετρία ροής.....	92
2.5.1. Διαχωρισμός κυττάρων και χρώση με μονοκλωνικά αντισώματα σημασμένα με φθοριοχρώματα.....	92
2.5.2. Μέθοδος για χρώση EPCs.....	93
2.5.3. Συλλογή και ανάλυση δεδομένων.....	95

2.5.4. Πρωτόκολλο ISHAGE – Τυποποιημένο και τροποποιημένο πρωτόκολλο ISHAGE .....	100
2.5.4.1. Τυποποιημένο πρωτόκολλο ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering).....	100
2.5.4.2. Τροποποιημένο πρωτόκολλο ISHAGE.....	101
2.6. Στατιστική ανάλυση .....	107
2.7. Αποτελέσματα .....	108
2.7.1. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά .....	108
2.7.2. CPCs και φαινότυποι των EPCs .....	111
2.7.3. Επίπεδα VEGF, SDF-1 και κυτοκινών .....	113
2.7.4. Συσχετίσεις με τους δείκτες νευροπάθειας .....	117
2.8. Συζήτηση.....	118
2.9. Συμπεράσματα .....	123
2.10. Περίληψη.....	124
2.11. Abstract .....	126
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>127</b>

## ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

Ακρωνύμιο	Επεξήγηση
ABI	ankle brachial index, κνημοβραχιόνιος δείκτης
AcLDL	acetylated low density lipoprotein, ακετυλιωμένη LDL
ACR	albumin/creatinine ratio, λόγος αλβουμίνης προς κρεατινίνη
ADA	American Diabetes Association, Αμερικανική Διαβητολογική Εταιρεία
AGEs	advanced glycation end-products, τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης
Akt	πρωτεϊνική κινάση Β (γνωστή και ως PKB)
AMPK	ενεργοποιημένη με AMP πρωτεϊνική κινάση
BDNF	brain-derived neurotrophic factor, νευροτροφικός παράγων που προέρχεται από τον εγκέφαλο
BFGF	basic fibroblast growth factor, βασικός αυξητικός παράγων ινοβλαστών
BMI	body mass index, δείκτης μάζας σώματος
BMP-2	bone morphogenetic protein- 2, μορφογενετική πρωτεΐνη οστών 2
CACs	circulating angiogenic cells, κυκλοφορούντα αγγειογόνα κύτταρα
CD	cluster of differentiation, σύμπλοκο διαφοροποίησης
CECs	circulating endothelial cells, κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα
CEPs	circulating endothelial progenitors, κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά πρόδρομα
c-kit	υποδοχέας της μεμβράνης c - kit
CNTF	ciliary neurotrophic factor, ακτινωτός νευροτροφικός παράγοντας
CPCs	circulating progenitor cells, κυκλοφορούντα προγονικά κύτταρα
CRP	c- reactive protein, c-αντιδρώσα πρωτεΐνη
CSF	colony stimulating factor, παράγοντας διέγερσης αποικιών
CSF-1	colony stimulating factor, παράγοντας διέγερσης αποικιών
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4, υποδοχέας χημειοκίνης τύπου 4
DNF	glial cell line-derived neurotrophic factor, νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από τη γλοιακή κυτταρική σειρά
DPP-4	dipeptidyl-peptidase – 4, διπεπτιδυλο- πεπτιδάση

ECFCs	endothelial colony-forming cells, κύτταρα σχηματισμού ενδοθηλιακών αποικιών
ECs	endothelial cells, ενδοθηλιακά κύτταρα
eGFR	estimated glomerular filtration rate
eNOS	ενδοθηλιακή συνθετάση του NO
eNOS3	ισομορφή 3 της ενδοθηλιακής συνθάσης του NO
EOCs	endothelial outgrowth cells, ενδοθηλιακά κύτταρα ανάπτυξης
EPCs	endothelial progenitor cells, ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα
FCM	Flow CytoMetry, πολυχρωματική κυτταρομετρία ροής
FGF2	fibroblast growth factor -2, αυξητικός παράγων ινοβλαστών - 2
FITC	fluorescein isothiocyanate, ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη
FSC	forward scattering, σκέδαση παράλληλα με τη δέσμη laser (κυτταρομετρία ροής)
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor, παράγων διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor, νευροτροφικός παράγων που προέρχεται από τη γλοιακή κυτταρική σειρά
GLP-1	glucagon-like peptide 1, παρόμοιο με τη γλυκαγόνη πεπτίδιο 1
HECs	hemogenic endothelial cells, αιματογενή ενδοθηλιακά κύτταρα
HGF	hepatic growth factor, ηπατικός αυξητικός παράγοντας
HIF-1	hypoxia-inducible factor-1, παράγων-1 που προκαλείται από υποξία
HPCs	hematopoietic progenitor cells, αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα
HSCs	hematopoietic stem cells, αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-1, μόριο ενδοκυττάριας προσκόλλησης-1
IGF	insulin-like growth factor, αυξητικός παράγοντας που μοιάζει με ινσουλίνη ή ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας
IL-1α	ιντερλευκίνη 1α
iNOS	επαγωγίμη συνθετάση νιτρικού οξειδίου
KDR	kinase insert domain receptor, υποδοχέας με παρεμβαλλόμενη περιοχή κινάσης
LPS	λιποπολυσακχαρίτης
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1, χημειοελκυστική πρωτεΐνη μονοκυττάρων
MMP-2	matrix metalloproteinase-2, μεταλλοπρωτεΐνάση στρώματος μυελού των οστών 2

MMP-9	matrix metalloproteinase-9, μεταλλοπρωτεϊνάση στρώματος μυελού των οστών 9
NDS	neuropathy disability score, δείκτης ευρημάτων νευροπάθειας
NGF	nerve growth factor, αυξητικός παράγων νεύρων ή παράγων ανάπτυξης νεύρων
NO	nitric oxide, μονοξειδίο του αζώτου ή νιτρικό οξύ
NSS	neuropathy symptom score, δείκτης συμπτωμάτων νευροπάθειας
OECs	outgrowth endothelial cells
oxLDL	oxidized low-density lipoprotein, οξειδωμένη LDL
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1, αναστολέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου 1
PARP	poly ADP-ribose polymerase 1, πολυμεράση πολυ – ADP - ριβόζης
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells, μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος
PBS	phosphate buffered saline, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος
PDGF	platelet-derived growth factor, προερχόμενος από αιμοπετάλια υποδοχέας αυξητικού παράγοντα
PECAM-1	platelet-endothelial cells adhesion molecule-1, μόριο προσκόλλησης αιμοπεταλίων- ενδοθηλιακών κυττάρων
PI-3	phosphoinositide 3, φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη - 3
PTPase	protein-tyrosine phosphatase, πρωτεϊνική φωσφατάση τυροσίνης
ROS	reactive oxygen species , δραστικές μορφές οξυγόνου
RE	Resin Immunohistological Sections
SCF	stem cell factor
SDF-1	stromal cell -derived factor 1, προερχόμενος από κύτταρα του στρώματος παράγοντας -1
SGLT2	Sodium-glucose cotransporter-2, συµµεταφορέας νατρίου-γλυκόζης υπότυπου 2
SHH	“sonic hedgehog” («σκαντζόχοιρος») πρωτεΐνη ορού
SMPCs	skeletal muscle progenitor cells, προγονικά κύτταρα των λείων μυών
SSC	side scattering, σκέδαση κάθετα στη δέσμη laser (κυτταρομετρία ροής)
Tie-2	Tie-2 angiopoietin receptor, υποδοχέας αγγειοποιητίνης
TMRICT	Tetramethylrhodamine Isothiocyanate, ισοθειοκυανική τετραμεθυλροδαμίνη
TNF-α	tumor necrosis factor, παράγοντας νέκρωσης όγκων - α

UEA-1 lectin	λεκτίνη Ulex europaeus agglutinin I
VCAM	vascular adhesion molecule, μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων
VE- Cad	VE- cadherin, VE- καντερίνη
VEGF	vascular endothelial growth factor, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
VPT	vibration perception threshold, ουδός αντίληψης δονήσεων
vWF	von Willebrand factor, παράγων von Willebrand
Δ.Α.	διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια
Δ.Ν.	διαβητική νευροπάθεια
ΔΝΦ	διαβητική νεφροπάθεια
Σ.Δ.	σακχαρώδης διαβήτης
ΧΝΝ	χρόνια νεφρική νόσος
ΔΠΝ	διαβητική περιφερική νευροπάθεια





# 1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

## 1.1. Εισαγωγή

Ο σακχαρώδης διαβήτης (Σ.Δ.) είναι μία παθολογική κατάσταση προκαλούμενη από πλήρη ή σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών και χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Στο Σ.Δ. τύπου 2, η υπεργλυκαιμία είναι το αποτέλεσμα της αδυναμίας των κυττάρων του σώματος να ανταποκριθούν στην ινσουλίνη, μια κατάσταση που ονομάζεται αντίσταση στην ινσουλίνη. [1][2]

Ο υψηλός κίνδυνος μακρο- και μικρο-αγγειακής νόσου στο Σ.Δ. αποδίδεται στις αρνητικές επιδράσεις της γλυκοτοξικότητας και της λιποτοξικότητας στο τοίχωμα των αγγείων γενικά και στα ενδοθηλιακά κύτταρα ειδικότερα. [3][4] Η υπεργλυκαιμία, η αντίσταση στην ινσουλίνη, η υπερλιπιδαιμία αντιπροσωπεύουν τα σημαντικότερα παθοφυσιολογικά ευρήματα που εμφανίζονται στο Σ.Δ. και οδηγούν σε ενδοθηλιακή αγγειακή δυσλειτουργία μέσω πολλών υποκείμενων διαδικασιών. [5]

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία εμφανίζεται νωρίς στην πορεία της νόσου και αποτελεί το πρώτο στάδιο στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης. [6][7] Οι μεταβολικές διαταραχές που προκαλούνται από το Σ.Δ. μεταβάλλουν τη λειτουργία πολλαπλών τύπων κυττάρων, όπως των κυττάρων του *ενδοθηλίου*, των *λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων* και των *αιμοπεταλίων* και ευθύνονται για την αγγειακή βλάβη, η οποία προδιαθέτει τον πληθυσμό των ασθενών με διαβήτη σε αθηροσκλήρωση. [8]

Οι παθολογικές αλλαγές στη μικροκυκλοφορία στο Σ.Δ. μπορούν να προξενήσουν με τη σειρά τους μεταβολές στην αιμάτωση των οργάνων, επηρεάζοντας ιδιαίτερα συγκεκριμένα όργανα και ιστούς, όπως τον αμφιβληστροειδή, τους νεφρούς και το περιφερικό νευρικό σύστημα, με αποτέλεσμα την εγκατάσταση των μικροαγγειακών επιπλοκών: της διαβητικής νεφροπάθειας, της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας (Δ.Α.) και της διαβητικής νευροπάθειας (Δ.Ν.).

Η κύρια δομική μικροαγγειοπαθητική μεταβολή στο Σ.Δ. είναι η πάχυνση της βασικής μεμβράνης των τριχοειδών, συμπεριλαμβανομένων των αρτηριδίων του νεφρικού σπειράματος, του αμφιβληστροειδούς, του δέρματος και των μυών, με αποτέλεσμα την κλασική διαβητική μικροαγγειοπάθεια. Αυτή η πάχυνση μεταβάλλει τη λειτουργία των αγγείων, προκαλώντας μειωμένη επούλωση τραυμάτων και υποξία των ιστών. Η διαβητική μικροαγγειοπάθεια συμβάλλει σαφώς στην εμφάνιση των συστηματικών διαβητικών επιπλοκών. [9][10]

## 1.2. Σακχαρώδης Διαβήτης και Επιπλοκές – Διαβητική Νευροπάθεια

### 1.2.1. Δυσλειτουργία Ενδοθηλίου στον Σακχαρώδη Διαβήτη

Η εσωτερική επιφάνεια όλων των αιμοφόρων αγγείων επενδύεται από ένα ενιαίο στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων, το οποίο παρέχει μια μεταβολική αλληλεπίδραση μεταξύ αίματος και ενδοθηλίου. [11] Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (endothelial cells, ECs) εκκρίνουν υπό φυσιολογικές συνθήκες μεσολαβητές που επηρεάζουν την αιμοδυναμική των αγγείων. Παράλληλα, συνθέτουν σημαντικές βιοδραστικές ουσίες, όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO), άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου, προσταγλανδίνες, ενδοθηλίνη και αγγειοτενσίνη II, που ρυθμίζουν τη λειτουργία των αιμοφόρων αγγείων. Το NO έχει αγγειοδιασταλτική δράση και παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της αγγειοχάλασης από το ενδοθήλιο. [6] Το NO εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά η παραγωγή του ρυθμίζεται από μια σειρά εξωγενών χημικών και φυσικών ερεθισμάτων. [11] Επιπροσθέτως, αναστέλλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, περιορίζει τη φλεγμονή μειώνοντας την προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο, και μειώνει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων. [6][12] Οι ιδιότητες αυτές από κοινού αναστέλλουν την αθηρογένεση και προστατεύουν τα αιμοφόρα αγγεία.

Η ενεργοποίηση του ενδοθηλίου παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανοσολογική απόκριση στη φλεγμονή. Αρκετοί ερευνητές έχουν αναφέρει ότι ο παράγων νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) και ο λιποπολυσακχαρίτης LPS ενεργοποιούν άμεσα τους υποδοχείς στην επιφάνεια του ενδοθηλίου. [13][14] Ως απόκριση σε αυτές τις παθολογικές διεργασίες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα υφίστανται δομικές και λειτουργικές αλλαγές. [15]

Σε σημεία τραυματισμού, η ιστική ισχαιμία ενεργοποιεί την έκφραση του παράγοντα-1 που προκαλείται από υποξία (Hypoxia-inducible factor-1, HIF-1), ο οποίος με τη σειρά του διεγείρει την έκφραση του προερχόμενου από κύτταρα του στρώματος παράγοντα-1 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1) [16].

Η υπερ-έκφραση του SDF-1 διαπιστώθηκε επίσης κατά τη διάρκεια της επούλωσης κατάγματος σε ποντίκια [17] [18]

Στο τραυματισμένο ενδοθήλιο παρουσιάζονται αγγειοσυστολή, διαταραχές πήξης, συσσώρευση λευκοκυττάρων, θρόμβωση και αγγειακή φλεγμονή που προδιαθέτουν σε αθηροσκλήρωση. [19]

Είναι γνωστό ότι ο Σ.Δ. διαταράσσει τη δραστηριότητα της ενδοθηλιακής συνθετάσης νιτρικού οξειδίου (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) καθώς επίσης ενισχύει την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), με αποτέλεσμα τη μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του NO και τις επακόλουθες προαθηρογενετικές αλλοιώσεις. [19]

Στο διαβήτη η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του NO στο ενδοθήλιο οφείλεται:

- στην υπεργλυκαιμία,
- στην αντίσταση στην ινσουλίνη,
- στη μετανάστευση T- λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων στον έσω χιτώνα. [4]

- *Η υπεργλυκαιμία αναστέλλει την παραγωγή NO εμποδίζοντας την ενεργοποίηση της eNOS και αυξάνοντας την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, ιδιαίτερα ανιόντων υπεροξειδίων (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων. [20]*
- *Η αντίσταση στην ινσουλίνη οδηγεί σε υπέρμετρη απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων από τον λιπώδη ιστό, τα οποία ενεργοποιούν το ένζυμο πρωτεΐνη κινάση C, αναστέλλουν τη κινάση φωσφατιδυλινοσιτόλης-3 (PI-3) και αυξάνουν την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου-μηχανισμοί οι οποίοι επηρεάζουν άμεσα την παραγωγή NO ή μειώνουν τη βιοδιαθεσιμότητά του μόλις παράγεται. Η παραγωγή υπεροξυνιτρώδους μειώνει τη σύνθεση της αγγειοδιασταλτικής και αντιαιμοπεταλιακής προστακυκλίνης. [8] Η ινσουλίνη είναι ένας φυσιολογικός ρυθμιστής της ενεργοποίησης της eNOS και της παραγωγής NO μέσω διαδοχικής φωσφορυλίωσης. Πιο συγκεκριμένα, η ινσουλίνη διεγείρει την οδό κινάσης φωσφατιδυλινοσιτόλης - 3 / Akt, η οποία ενισχύει την ενεργοποίηση της eNOS και την επακόλουθη παραγωγή NO. Η αντίσταση στην ινσουλίνη στο διαβήτη εξασθενεί αυτήν την παθοφυσιολογική διαδικασία και καταστέλλει τη φυσιολογική έκκριση NO. [21] Ο Σ.Δ. επίσης αυξάνει την παραγωγή αγγειοσυσταλτικών παραγόντων, με σημαντικότερο την ενδοθελίνη-1, η οποία ενεργοποιεί τους υποδοχείς ενδοθελίνης-A στα κύτταρα των λείων μυών των αγγείων ώστε να προκαλείται αγγειοσυστολή και παράλληλα τα ενδοθηλιακά κύτταρα αυξάνουν την παραγωγή του ιστικού παράγοντα και άλλων αγγειοδραστικών ουσιών, όπως αγγειοσυσπαστικών, προστανοειδών και αγγειοτασίνης II. [22]*
- *Η μετανάστευση των T-λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων στον έσω χιτώνα συμμετέχει ολοκληρωτικά στην αθηρογένεση. Τα T-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν κυτοκίνες που ρυθμίζουν το σχηματισμό βλαβών. [23] Τα μονοκύτταρα, φτάνοντας στον υποενδοθηλιακό χώρο, προσλαμβάνουν την οξειδωμένη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (oxidized low-density lipoprotein, oxLDL) και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Η τοπική συσσώρευση αφρωδών κυττάρων οδηγεί στο σχηματισμό λιπωδών ραβδώσεων, το χαρακτηριστικό γνώρισμα των πρώιμων αθηρωματικών βλαβών. Η παρουσία Σ.Δ. ευοδώνει αυτές τις παθολογικές διαδικασίες.*

Επιπλέον, οι ασθενείς με Σ.Δ. παρουσιάζουν παθολογικά υψηλούς βιοδείκτες ενδοθηλιακής λειτουργίας, όπως το μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων (vascular adhesion molecule-1, VCAM-1) και παράγοντα von Willebrand (von Willebrand factor, vWF), καθώς και δείκτες συστηματικής φλεγμονής συμπεριλαμβανομένης της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (c-reactive protein, CRP) και του TNF -α. [24]

## 1.2.2. Επιπλοκές του Σακχαρώδη Διαβήτη – Παθογένεση επιπλοκών

Οι χρόνιες επιπλοκές του Σ.Δ. διακρίνονται σε **μακροαγγειακές** (αθηροθρόμβωση στεφανιαίων και εγκεφαλικών αρτηριών, καρωτίδων, αορτής και περιφερικών αρτηριών) και **μικροαγγειακές** (διαβητική νεφροπάθεια, διαβητική νευροπάθεια και διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια). [25]

Στις **μακροαγγειακές επιπλοκές** του Σ.Δ. κύριο παθοφυσιολογικό μηχανισμό αποτελεί η διαδικασία και εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης, η οποία οδηγεί σε στένωση των αρτηριακών τοιχωμάτων. Θεωρείται ότι η αθηροσκλήρωση προκύπτει από χρόνια φλεγμονή και τραυματισμό του αρτηριακού τοιχώματος στο περιφερικό ή στεφανιαίο αγγειακό σύστημα. Στις αρτηρίες που υφίστανται βλάβη διαταράσσεται η αγγειοκινητική λειτουργία, και συγκεκριμένα η αγγειοδιαστολή, καθώς και η λειτουργία των λείων μυών των αγγείων με τρόπους ώστε να προάγεται ο σχηματισμός αθηρωματικών βλαβών και η αστάθεια της πλάκας. [26][27]

Παράλληλα με το σχηματισμό αθηρώματος, συνυπάρχουν αυξημένη πρόσφυση αιμοπεταλίων και υπερπηκτικότητα. Η μειωμένη παραγωγή NO και ο αυξημένος σχηματισμός ελεύθερων ριζών στα αιμοπετάλια, μπορεί να οδηγήσουν σε συσσώρευση αιμοπεταλίων. [25][8][28] Οι διαταραχές αυτές προκύπτουν από τη μειωμένη παραγωγή NO και προστακυκλίνης, τα οποία έχουν αντιθρομβωτική δράση, από την αυξημένη παραγωγή ινωδογόνου και την αυξημένη παραγωγή ενεργοποιητών των αιμοπεταλίων, όπως η θρομβίνη και ο παράγοντας von Willebrand. [29] Συγχρόνως οι ασθενείς με Σ.Δ. τύπου 2 έχουν μειωμένη ινωδολυτική ικανότητα λόγω των αυξημένων επιπέδων αναστολέα ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου 1 (Plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) στις αθηρωματικές βλάβες και σε αρτηρίες χωρίς αθηρωματικές βλάβες.

Ετσι στο Σ.Δ. λόγω αυξημένης πηκτικότητας του αίματος, η ρήξη ή η διάβρωση της αθηρωματικής πλάκας καθίσταται πιθανότερο να οδηγήσει σε θρομβωτική απόφραξη των αρτηριών. [30][31]

Στις **μικροαγγειακές επιπλοκες**, η διάρκεια του Σ.Δ. και ο βαθμός υπεργλυκαιμίας έχουν αναγνωρισθεί ως προγνωστικοί δείκτες της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας και της νεφροπάθειας. [32] Η αναγωγή της αλδόζης μπορεί να συμμετέχει στην δημιουργία των μικροαγγειακών επιπλοκών του Σ.Δ. Η αναγωγή της αλδόζης αποτελεί το αρχικό ένζυμο της ενδοκυτταρικής οδού των πολυολών, στην οποία λαμβάνει χώρα η μετατροπή της γλυκόζης σε αλκοόλη γλυκόζης. Η πάχυνση της μεμβράνης των τριχοειδών αγγείων και το οσμωτικό στρες από τη συσσώρευση σορβιτόλης έχουν θεωρηθεί υποκείμενοι μηχανισμοί στην ανάπτυξη διαβητικών μικροαγγειακών επιπλοκών. [25] Στη μικροαγγειοπάθεια υπάρχει βλάβη των τροφικών αγγείων των αγγείων (vasa vasorum), η οποία οδηγεί σε επακόλουθη βλάβη των μικρού και μεσαίου μεγέθους αρτηριών των ασθενών με Σ.Δ.

## 1.2.3. Μηχανισμοί βλάβης μικροαγγειακών επιπλοκών

### 1.2.3.1. Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια

Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (Δ.Α.) αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες διαταραχής της όρασης σε όλο τον κόσμο. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι περίπου 1 στους 3 ασθενείς με Σ.Δ. έχει Δ.Α. και 1 στους 10 έχει παραγωγική διαβητική

αμφιβληστροειδοπάθεια (Π.Δ.Α.) και οίδημα ωχράς κηλίδας. [33][34][35][36] Η νεοαγγείωση του αμφιβληστροειδούς που αναπτύσσεται στην Π.Δ.Α. πιστεύεται ότι συμβαίνει ως απόκριση στην υποξία, η οποία προκαλεί αλλαγές στα υπάρχοντα αγγεία και αντισταθμιστική, αν και παθολογική, νέα τριχοειδική ανάπτυξη. [37][38]

Η Δ.Α. εξελίσσεται με την πάροδο του χρόνου [39] στους ασθενείς με Σ.Δ., από πιο ήπια στάδια μη παραγωγικής αμφιβληστροειδοπάθειας στα πιο προχωρημένα στάδια, την παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια και τη διαβητική ωχροπάθεια. [40] Η μικροαγγειακή αυτή επιπλοκή εμφανίζεται συχνότερα σε άτομα με πτωχό γλυκαιμικό έλεγχο και μεγαλύτερη διάρκεια Σ.Δ. και κύριοι παράγοντες κινδύνου αποτελούν η υπέρταση, η νεφρική νόσος και η δυσλιπιδαιμία. [39][41] Η μελέτη Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) [42] και η μελέτη United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) [43] κατέδειξαν τη σημασία της διατήρησης ενός αυστηρού γλυκαιμικού ελέγχου για την καθυστέρηση της έναρξης και την επιβράδυνση της εξέλιξης της Δ.Α. σε άτομα με Σ.Δ. τύπου 1 και τύπου 2 αντίστοιχα. [44][42][45]

Η παθογένεση των βλαβών που οδηγούν στη Δ.Α. συνδέεται με την υπεργλυκαιμία, ενώ συγχρόνως σε αυτή συμμετέχουν και γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες, η παραγωγή ελεύθερων ριζών και τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης, φλεγμονώδεις παράγοντες και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor) VEGF. Τα προχωρημένα στάδια Δ.Α. (παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια και διαβητική ωχροπάθεια) μπορεί να οδηγήσουν σε οπτική δυσλειτουργία και τύφλωση αν δεν υπάρξει θεραπευτική παρέμβαση. [40]

Οι δύο βασικές παθοφυσιολογικές αλλαγές που χαρακτηρίζουν τη Δ.Α. είναι η πτωχή αιμάτωση των αγγείων του αμφιβληστροειδούς και η διαρροή. [46] Η υπεργλυκαιμία ενεργοποιεί βιοχημικούς μηχανισμούς που οδηγούν σε υποξία στα αγγεία και νεύρα της περιοχής και καθώς ο αμφιβληστροειδής χιτώνας είναι πολύ ευαίσθητος σε αλλαγές στην παροχή οξυγόνου, η υποξία αυτή προκαλεί οξειδωτικό στρες, και δομικές και λειτουργικές αλλαγές στα κύτταρα των τριχοειδών αγγείων και νεύρων. Τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης διεγείρουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών και συγχρόνως τα κύτταρα υφίστανται επιβλαβείς επιδράσεις από φλεγμονώδεις παράγοντες και από ορισμένες *κυτοκίνες*, σημαντικότερη των οποίων είναι ο παράγοντας VEGF, ο οποίος ευνοεί τη δημιουργία νέων αγγείων. [47]

Η χαμηλού βαθμού φλεγμονή η οποία χαρακτηρίζεται από υπερέκφραση πολλών μορίων προσκόλλησης ενδοθηλιακών κυττάρων (μόριο ενδοκυττάριας προσκόλλησης-1 [intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1], VCAM-1 και E-σελεκτίνη), προκαλεί λευκόσταση και δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων. [48][49][50][51] Οι μηχανισμοί αυτοί οδηγούν σε συνεχιζόμενη φλεγμονή και τραυματισμό του αγγειακού τοιχώματος [52][53] με συνοδό υπερέκφραση αγγειοσυσπαστικών παραγόντων (ενδοθηλίνη-1) και του NO, οι οποίοι αντικατοπτρίζουν τον παθολογικό αγγειακό τόνο. [54][55][56]

Η καταστροφή στα τοιχώματα των αγγείων έχει ως αποτέλεσμα να χάνεται η στεγανότητά τους, και έτσι παρουσιάζονται διαρροές στον αμφιβληστροειδή. Συγκεκριμένα, δημιουργούνται: **μικροανευρύσματα**, δηλαδή διογκώσεις των αγγείων από τις οποίες μπορεί να διαρρέει υγρό στον αμφιβληστροειδή, **οιδήματα** από διαρροή πλάσματος, **μικροαιμορραγίες** από διαρροή αίματος και **εξιδρώματα** από διαρροή λιπιδίων. Επίσης προκαλούνται **αποφράξεις μικρών αγγείων** και δημιουργία νέων, μη φυσιολογικών αγγείων (**νεοαγγειογένεση**). [47]

### 1.2.3.2. Διαβητική νεφροπάθεια

Σημαντικό ποσοστό των ασθενών με Σ.Δ. τύπου 1 και τύπου 2 (20-30%) εμφανίζει διαβητική νεφροπάθεια (ΔΝΦ). Η ΔΝΦ ξεκινά με μικρή αύξηση της απέκκρισης λευκωματίνης (αλβουμίνης) στα ούρα, η οποία είναι πιθανό να εξελιχθεί κατά την πορεία της νόσου σε σημαντική, και να καταλήξει σε τελικό στάδιο νεφρικής ανεπάρκειας. Η απέκκριση της λευκωματίνης εκτιμάται με τον υπολογισμό του λόγου λευκωματίνης/κρεατινίνης σε τυχαίο δείγμα ούρων (albumin/creatinine ratio, ACR) ή/και με τον προσδιορισμό του ρυθμού απέκκρισης λευκωματίνης στη συλλογή ούρων 24ώρου. [57]

Η χρόνια νεφρική νόσος (ΧΝΝ) ορίζεται ως διαταραχή της νεφρικής λειτουργίας ή της νεφρικής αρχιτεκτονικής παρούσα για τουλάχιστον 3 μήνες και ταξινομείται ανάλογα με το ρυθμό σπειραματικής διήθησης (glomerular filtration rate, GFR) και το βαθμό λευκωματινουρίας. (Πίνακας 1) [57] [58]

Οι παθολογικές αλλοιώσεις στο νεφρό περιλαμβάνουν αυξημένο πάχος σπειραματικής βασικής μεμβράνης, σχηματισμό μικροανευρύσματος, σχηματισμό μεσαγγειακών όζων (σώματα Kimmelsteil-Wilson) και άλλες αλλαγές.

Ο υποκείμενος μηχανισμός παθογένεσης των βλαβών περιλαμβάνει τις ίδιες παθοφυσιολογικές μεταβολές με εκείνες της Δ.Α. [25]

				Κατηγορίες λευκωματινουρίας (αλβουμινουρίας) Περιγραφή και εύρος			
				A1	A2	A3	
				Φυσιολογική- ήπια αυξημένη	Μέτρια αυξημένη	Σοβαρά αυξημένη	
				< 30 mg/gr < 3 mg/mmol	30-300 mg/gr 3-30 mg/mmol	> 300 mg/gr > 30mg/mmol	
Κατηγορίες GFR (ML/min/1,73m <sup>2</sup> )	G1	Φυσιολογική ή υψηλή	≥ 90				
	Περιγραφή και εύρος	G2	Ήπια μειωμένη	60-89			
		G3a	Ήπια εως μέτρια μειωμένη	45-59			
		G3b	Μέτρια έως σοβαρά μειωμένη	30-44			
		G4	Σοβαρά μειωμένη	15-29			
		G5	Νεφρική ανεπάρκεια	< 15			

Πίνακας 1. Πρόγνωση εξέλιξης της ΧΝΝ ανάλογα με το GFR και τη λευκωματινουρία ούρων (Kidney Disease Improving Global Outcomes, KDIGO 2021)

**Λευκό:** Χαμηλός κίνδυνος (όταν δεν υπάρχουν άλλοι δείκτες νεφρικής νόσου, χωρίς ΧΝΝ).  
**Ανοιχτό γκρι:** Μέτρια αυξημένος κίνδυνος. **Σκούρο γκρι:** Υψηλού κινδύνου. **Μαύρο:** Πολύ υψηλού κινδύνου.

## 1.2.4. Διαβητική νευροπάθεια

### 1.2.4.1. Ορισμός -Ταξινόμηση

Η διαβητική νευροπάθεια Δ.Ν. ορίζεται ως η παρουσία συμπτωμάτων ή/και σημείων δυσλειτουργίας των περιφερικών νεύρων σε άτομα με Σ.Δ. μετά τον αποκλεισμό άλλων αιτιών νευροπάθειας. [59]

Στη Δ.Ν. ανήκουν πολλές μορφές νευροπάθειας όμως οι πιο μελετημένες μορφές νευροπάθειας στο Σ.Δ. είναι η διαβητική περιφερική συμμετρική πολυνευροπάθεια (ΔΠΣΝ) μαζί με την καρδιαγγειακή αυτόνομη νευροπάθεια. (ΚΑΝ) Η ΔΠΣΝ είναι η πιο συχνή νευροπάθεια στο Σ.Δ., μπορεί να εμφανισθεί στο 10% των ασθενών με νέο-διαγνωσθέντα διαβήτη, ενώ σε μεγάλη διάρκεια διαβήτη μπορεί να εμφανιστεί σε ποσοστό έως και 50%. [59][60] Η ταξινόμηση των διαβητικών νευροπαθειών σύμφωνα με την Αμερικανική Διαβητολογική Εταιρεία (American Diabetes Association, ADA) απεικονίζεται παρακάτω (Πίνακας 2). [61]

Η Δ.Ν. είναι μια σύνθετη διαταραχή με παθογενετική συμμετοχή τόσο των αγγείων όσο και των νεύρων, συχνά παρουσιάζονται έλκη ποδών και μπορεί να οδηγήσει σε ακρωτηριασμούς άκρων; πάνω από το 80% των ακρωτηριασμών συμβαίνουν μετά από εξέλκωση ή τραυματισμό στα κάτω άκρα, που μπορεί να προκύψουν από Δ.Ν. Η Δ.Ν. χαρακτηρίζεται από μειωμένη αγγείωση των περιφερικών νεύρων και ανεπάρκεια αγγειογενετικών και νευροτροφικών παραγόντων. [62][63][64]

*Σε μοριακό επίπεδο*, ο πρωταρχικός παράγοντας κινδύνου είναι η υπεργλυκαιμία, η οποία σχετίζεται με πέντε βιοχημικές οδούς: την οδό των πολυολών, το μονοπάτι των τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης (advanced glycation end-products, AGEs) [65][66], το μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης C, το μονοπάτι της πολυμεράσης πολύ-ADP-ριβόζης (Poly-ADP-ribose polymerase 1, PARP) και το μονοπάτι της εξοζαμίνης. Οι πέντε οδοί συμβάλλουν στην παραγωγή οξειδωτικού στρες, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου, οι οποίες επιφέρουν την αύξηση υπεροξειδωσης λιπιδίων, DNA και πρωτεϊνών, την κυτταρική απόπτωση, καθώς και τη μειωμένη ροή αίματος των νεύρων. [67][68][69]

*Σε κυτταρικό επίπεδο*, η υπεργλυκαιμία επηρεάζει τους αισθητικούς, κινητικούς και αυτόνομους νευρώνες ενεργοποιώντας τις πέντε βιοχημικές οδούς. Η απώλεια της νευροτροφικής δράσης και η υποξία αποτελούν τις δύο βασικές συνέπειες των κυτταρικών μηχανισμών που περιγράφηκαν παραπάνω. Πολλοί αντιπροσωπευτικοί αυξητικοί παράγοντες έχουν διπλή δράση, συγχρόνως νευροτροφική και αγγειογενετική [70], όπως ο VEGF, ο αυξητικός παράγοντας που μοιάζει με ινσουλίνη (insulin growth factor, IGF), ο αυξητικός παράγοντας νεύρων (nerve growth factor, NGF), ο νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από τον εγκέφαλο (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), και ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών-2 (fibroblast growth factor, FGF2). [71][72][73]

### Πίνακας 2. Ταξινόμηση διαβητικών νευροπαθειών

#### Διαβητικές νευροπάθειες

#### A. Διάχυτη νευροπάθεια



## A1] Διαβητική περιφερική συμμετρική πολυνευροπάθεια

- α) κυρίως νευροπάθεια μικρών ινών
- β) κυρίως νευροπάθεια μεγάλων ινών
- γ) μικτή νευροπάθεια μικρών και μεγάλων ινών

## A2] Νευροπάθεια αυτόνομου νευρικού συστήματος

- α) Καρδιαγγειακή
  - i) Μειωμένη μεταβλητότητα καρδιακής συχνότητας
  - ii) Ταχυκαρδία ηρεμίας
  - iii) Ορθοστατική Υπόταση
  - iv) Αιφνίδιος θάνατος (κακοήθης αρρυθμία)
- β) Γαστρεντερική
  - i) Διαβητική γαστροπάρεση
  - ii) Διαβητική εντεροπάθεια
  - iii) Υποκινητικότητα του παχέος εντέρου
- γ) Ουροποιογεννητική
  - i) Διαβητική κυστεοπάθεια (νευρογενής κύστη)
  - ii) Στυτική δυσλειτουργία
  - iii) Γυναικεία σεξουαλική δυσλειτουργία
- δ) Δυσλειτουργία ιδρωτοποιών αδένων
  - i) άπω υποιδρωσία / ανιδρωσία
  - ii) γευστική εφίδρωση
- ε) Απώλεια αντίληψης υπογλυκαιμιών
- στ) Παθολογική λειτουργία της κόρης του οφθαλμού

**B. Μονονευροπάθεια (πολλαπλή μονονευροπάθεια) - (άτυπες μορφές)**

B1] Μεμονωμένου κρανιακού ή περιφερικού νεύρου (π.χ., ΙΙΙης εγκεφαλικής συζυγίας, ωλένιου, μηριαίου, περνιαίου νεύρων)

B2] Πολλαπλή Μονονευροπάθεια

**Γ. Ριζοπάθεια ή πολυριζοπάθεια (άτυπες μορφές)**

Γ1] Νευροπάθεια νευρικού πλέγματος (επίσης γνωστές ως οσφυοιερά πολυνευροπάθεια εγγύς κινητική αμιατροφία)

Γ2] Θωρακική ριζοπάθεια

**Μη διαβητικές νευροπάθειες συχνές στον διαβήτη**

Παράλυση εκ πίεσεως

Χρόνια φλεγμονώδης απομυελινωτική πολυνευροπάθεια

Οξεία επώδυνη νευροπάθεια λεπτών ινών (ιατρογενής)

#### 1.2.4.2. Παθογένεση

Η παθογένεση της Δ.Ν. θεωρείται πολυπαραγοντική. Μια επικρατούσα άποψη είναι ότι το οξειδωτικό στρες και το στρες λόγω φλεγμονής, μπορούν να βλάψουν τα νευρικά κύτταρα στο πλαίσιο μεταβολικής δυσλειτουργίας. Ο ακριβής μηχανισμός της βλάβης των περιφερικών νεύρων από την υπεργλυκαιμία δεν είναι διευκρινισμένος, αλλά πιθανώς σχετίζεται με τους μηχανισμούς που προαναφέρθηκαν, όπως η συσσώρευση πολυολών, ο τραυματισμός από προϊόντα τελικής γλυκοζυλίωσης και το οξειδωτικό στρες. [74][75][76][77] Τα παθολογικά ευρήματα περιλαμβάνουν αξονική ατροφία, απομυελίνωση και απώλεια νευρικών ινών. [78][79]

Η υπεργλυκαιμία αποτελεί τον κύριο παράγοντα που συμβάλλει στην ανάπτυξη της διαβητικής περιφερικής νευροπάθειας (ΔΠΝ), καθώς επιδρά στα νευρικά κύτταρα και προκαλεί βλάβες στα μικρά αγγεία των περιφερικών νεύρων (στα αγγεία του ενδονευρίου, του περινευρίου και του επινευρίου). [80] Κύριος συντελεστής της νευρικής βλάβης θεωρείται το οξειδωτικό στρες και οι δραστικές ρίζες οξυγόνου, που φαίνεται ότι διαταράσσουν την αγγειοδιαστολή στα αγγεία του επινευρίου, οδηγώντας έτσι σε αγγειοσύσπαση και λειτουργική ισχαιμία του νευρικού ιστού. Τα τριχοειδή του ενδονευρίου φαίνεται να έχουν μεταβλητή βατότητα. Επίσης, έχουν αναφερθεί ανάμικτα αποτελέσματα σε σχέση με τον αριθμό και την πυκνότητα των αγγείων σε ασθενείς με ΣΔ. Στα πρώιμα στάδια της νόσου η πυκνότητα των τριχοειδών του ενδονευρίου είναι αυξημένη σε σύγκριση με αυτή υγιών ατόμων, ενώ αυτό δεν παρατηρείται σε ασθενείς με εγκατεστημένη ΔΠΝ. Θα μπορούσε να υποθεθεί ότι στα αρχικά στάδια του ΣΔ ο αριθμός των νευρικών τριχοειδών αυξάνεται ως απάντηση στην ισχαιμία του νευρικού ιστού, ενώ υπό την μακροχρόνια επίδραση υπεργλυκαιμίας ο αριθμός και κυρίως η λειτουργική πυκνότητα των τριχοειδών μειώνεται. [80][81][82] Δομικές αλλαγές στα μικρά αγγεία έχουν επίσης καταδειχθεί στην ΔΠΝ, πιο συγκεκριμένα πολλαπλασιασμός και πάχυνση της βασικής μεμβράνης των τριχοειδών του ενδονευρίου. Συγχρόνως στην παθογένειά της ΔΠΝ συντελεί αναμφίβολα η ανεπαρκής παροχή αίματος, ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρο ακόμη αν η βλάβη των νευρικών ινών είναι αποτέλεσμα αλλοιώσεων των αγγείων. [81][82] Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι τα αρτηριόλια του επινευρίου, καθώς και του περινευρίου διαθέτουν απολήξεις νεύρων του αυτονόμου συμπαθητικού συστήματος και φαίνεται ότι η δυσλειτουργία του αυτονόμου συστήματος συμβάλλει περαιτέρω στην εκδήλωση της ΔΠΝ. [81][82]

#### 1.2.4.3. Κλινική εικόνα

Η εμφάνιση και εξέλιξη της ΔΠΝ είναι προοδευτική και σε ποσοστό 50% των ασθενών είναι πιθανό να μην παρουσιάζονται συμπτώματα. Τα συνηθέστερα συμπτώματα των ασθενών με ΔΠΝ είναι αίσθημα καύσου ή ψύχους των άκρων (διαταραχή αίσθησης θερμοκρασίας), οξύ άλγος σαν «ηλεκτρική εκκένωση», το οποίο παρουσιάζει επιδείνωση κατά τις νυχτερινές ώρες, καθώς και αιμωδίες ή κράμπες. [83]

Η ΔΠΝ εκδηλώνεται με συμμετρική απώλεια της αισθητικότητας, όπως της αντίληψης της αίσθησης του θερμού και ψυχρού, του άλγους, των δονήσεων και της αφής. Η πλειοψηφία των ασθενών αναφέρει αίσθημα καύσου (καυσαλγίες), παραισθησίες, αίσθημα νυγμών,

αλλοδυνία (αντίληψη ενός φυσιολογικού ερεθίσματος ως επώδυνο), κράμπες και έντονο διαξιφιστικό άλγος κάτω άκρων, ενώ συνήθως δεν αντιλαμβάνονται την απώλεια της αισθητικότητας των κάτω άκρων. Τα συμπτώματα εντοπίζονται κυρίως στα δάκτυλα και στους άκρους πόδες, συχνά επεκτείνονται προς τις κνήμες, και επιδεινώνονται τις νυχτερινές ώρες, ενώ μπορεί να είναι τόσο έντονα ώστε να αφυπνίζουν τον ασθενή. Ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών αναφέρει ύφεση των συμπτωμάτων με τη βάδιση, χαρακτηριστικό το οποίο διακρίνει το νευροπαθητικό άλγος από εκείνο της ισχαιμίας των κάτω άκρων, το οποίο επιδεινώνεται με το περπάτημα και υφίεται σε ύπτια θέση. [59]

#### 1.2.4.4. Διάγνωση – Κλινική εξέταση

Η διάγνωση της ΔΠΝ είναι κυρίως κλινική. Ένας συνδυασμός τυπικής συμπτωματολογίας και συμμετρικής αισθητικής απώλειας ή η παρουσία τυπικής σημειολογίας με απουσία συμπτωμάτων σε ασθενή με Σ.Δ. υποδηλώνει ΔΠΝ. Δεδομένου ότι έως και οι μισοί ασθενείς μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί, η διάγνωση μπορεί να τεθεί μόνο μετά από προσεκτική λεπτομερή κλινική εξέταση ή, σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν ο ασθενής παρουσιάσει ανώδυνο έλκος στο πόδι. [61] Στους ασυμπτωματικούς ασθενείς η πρώτη διαπίστωση της ΔΠΝ γίνεται συχνά με την εμφάνιση έλκους στα κάτω άκρα ή σε τυχαία νευρολογική εξέταση των κάτω άκρων. [83] Στόχος της νευρολογικής εξέτασης των άκρων ποδών των ασθενών με Σ.Δ. αποτελεί η ανεύρεση νευρολογικών ελλειμμάτων, τα οποία καθιστούν τους ασθενείς υψηλού κινδύνου για εμφάνιση εξέλκωσης.

Όλοι οι ασθενείς με Σ.Δ. συστήνεται από την ADA να ελέγχονται ετησίως για την παρουσία ΔΠΝ εξετάζοντας την αίσθηση θερμού - ψυχρού με ράβδους θερμού – ψυχρού, τη δοκιμασία νυγμού διά βελόνης- καρφίδας, την αντίληψη των δονήσεων (χρησιμοποιώντας ένα διαπασών 128-Hz), την αίσθηση πίεσης με χρήση μικροινίδιου 10 g και τα αχίλλεια τενόντια αντανακλαστικά. [59]

Τα κάτω άκρα πρέπει να εξετάζονται για έλκη, κάλους, παραμορφώσεις, καθώς λόγω συνυπάρχουσας ξηρότητας του δέρματος – επί συνύπαρξης νευροπάθειας του αυτονόμου νευρικού συστήματος – μπορεί να αποκαλυφθούν υπερκερατώσεις σε περιοχές υψηλής πίεσης στα πέλματα, ή και ατροφία μεσόστεων μυών με επακόλουθη παραμόρφωση της αρχιτεκτονικής του άκρου ποδός. [59][83][85]

Ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα εργαλεία για τη διάγνωση της ΔΠΝ είναι ο δείκτης συμπτωμάτων και ευρημάτων της νευροπάθειας (neuropathy symptom score, NSS, και neuropathy disability score, NDS, αντίστοιχα).

**Ο δείκτης συμπτωμάτων της νευροπάθειας** είναι ένα ερωτηματολόγιο που περιέχει ερωτήσεις σχετικά με τα πιο συχνά συμπτώματα της ΔΠΝ που αναφέρθηκαν ανωτέρω. [84] (Πίνακας 3)

**Ο δείκτης ευρημάτων νευροπάθειας** είναι η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της κλινικής νευρολογικής εξέτασης των ποδών, όπως προκύπτει από την εξέταση του αισθήματος άλγους με βελόνη- καρφίδα, της παλλαισθησίας (αίσθησης δονήσεων) με το διαπασών, της αίσθησης θερμού- ψυχρού με ράβδους θερμού -ψυχρού, και των αχίλλειων αντανακλαστικών. [83][84] (Πίνακας 4)

Πίνακας 3. Δείκτης συμπτωμάτων νευροπάθειας (NSS: Neuropathy symptom score)

Περιγραφή	Κόπωση, κράμπες, πόνος στα σουβλιά	1
	Καύσος, αιμωδία, βελόνες	2
Εντόπιση	Μηρός	0
	Γάμπες	1
	Πόδια	2
Χρόνος επιδείνωσης	Ημέρα	0
	Διαλείπων	1
	Νύχτα	2
Ξυπνάει από τον ύπνο	Όχι	0
	Ναι	1
Ανακούφιση με	Ανάπαυση	0
	Όρθια θέση	1
	Περπάτημα	2

NSS = .... / 9

Πίνακας 4. Δείκτης ευρημάτων νευροπάθειας (NDS: neuropathy disability score)

		ΔΕΞΙΑ	ΑΡΙΣΤΕΡΑ
Μεγάλο δάκτυλο	Αίσθηση του πόνου	φυσιολογικό = 0 παθολογικό = 1	φυσιολογικό = 0 παθολογικό = 1
	Αίσθηση δονήσεων	φυσιολογικό = 0 παθολογικό = 1	φυσιολογικό = 0 παθολογικό = 1
Ράχη άκρου ποδός	Αίσθηση θερμού-ψυχρού	φυσιολογικό = 0 παθολογικό = 1	φυσιολογικό = 0 παθολογικό = 1
Αχίλλεια αντανακλαστικά		φυσιολογικό = 0 με επίταση = 1 παθολογικό = 2	φυσιολογικό = 0 με επίταση = 1 παθολογικό = 2

NDS = .../ 10

Είναι σημαντικό να αποκλειστεί η νευροπάθεια άλλων αιτίων εκτός του Σ.Δ. με τη λήψη ιστορικού και τη διενέργεια εργαστηριακού ελέγχου (π.χ. Β12, θυρεοειδικός έλεγχος, κ.ά.) [83]

## 1.3. EPCs – Ορισμός και δράση στο ενδοθήλιο

### 1.3.1. Ορισμός

Τα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (endothelial progenitor cells, EPCs) απομονώθηκαν για πρώτη φορά από περιφερικό αίμα ενηλίκων το 1997 από τους Asahara και συν. [86] και ανεδείχθη ότι είναι κύτταρα τα οποία προέρχονται από το μυελό των οστών, έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro* με την παρουσία του βασικού αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (basic fibroblast growth factor, bFGF), του IGF-1 και VEGF, και συμμετέχουν στη νεοαγγειογένεση. [87]

Τα EPCs ορίστηκαν από τους Asahara και συν. ως κυκλοφορούντα κύτταρα που εκφράζουν στην επιφάνειά τους το αντιγόνο των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων CD34 ή το αντιγόνο του υποδοχέα με παρεμβαλλόμενη περιοχή κινάσης (kinase insert domain receptor, KDR) των ενδοθηλιακών κυττάρων, ο οποίος αντιστοιχεί λειτουργικά στον υποδοχέα του VEGF (VEGFR2). [86] [4]

Τα EPCs εκφράζουν στην επιφάνειά τους ταυτοχρόνως δείκτες και της αιμοποιητικής (CD34 και CD133) και της ενδοθηλιακής (KDR, CD31, και vWf) σειράς, προέρχονται από τον μυελό των οστών και μπορούν να κινητοποιηθούν στην περιφερική κυκλοφορία ως απάντηση σε πολλά ερεθίσματα. [88]

Το CD34 είναι ένα μόριο πρόσφυσης που εκφράζεται σε αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, σε αγγειακά προγονικά κύτταρα και σε ορισμένα ενδοθηλιακά κύτταρα των μικρών αγγείων. [89] Οι Asahara και συν. έδειξαν ότι αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα ενηλίκων που εκφράζουν στην επιφάνειά τους το δείκτη CD34 μπορούν να διαφοροποιηθούν *ex vivo* σε κύτταρα με ενδοθηλιακό φαινότυπο. [86]

Ο KDR ή CD309 θεωρείται γενικά ως αντιπροσωπευτικός της ενδοθηλιακής διαφοροποίησης των προγονικών κυττάρων, καθώς εκφράζεται σε πιο πρώιμο στάδιο από τον δείκτη CD31 και τον vWF. [90]

Κατά την αρχική ανακάλυψη, τα EPCs ή κυκλοφορούντα EPCs (circulating EPCs, CEPCs) ορίστηκαν ως κύτταρα θετικά για δείκτες αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων, όπως ο CD34, και για ενδοθηλιακούς δείκτες, όπως ο VEGFR2 (εκφράζουν δηλαδή στην επιφάνειά τους δείκτες αυτούς). Επειδή όμως ο CD34 δεν εκφράζεται αποκλειστικά και μόνο σε αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα αλλά και σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα (αν και σε μικρότερο βαθμό), μετέπειτα μελέτες χρησιμοποίησαν τον δείκτη CD133, ο οποίος αποτελεί δείκτη πιο ανώριμων αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, και έδειξαν ότι τα κύτταρα που εκφράζουν στην επιφάνειά τους το CD133 μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro*.

Ο CD133, είναι ένα αντιγόνο επιφανείας το οποίο εκφράζεται σε αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, σε πιο ανώριμα προγονικά κύτταρα, ενώ απουσιάζει από τα ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μονοκύτταρα και για το λόγο αυτό θεωρείται κατάλληλος δείκτης για τον προσδιορισμό των EPCs. [91][90] Προς το παρόν, δεν είναι σαφές εάν ο CD133 αντιπροσωπεύει μόνο έναν επιφανειακό δείκτη ή έχει λειτουργικό ρόλο και εμπλέκεται στη ρύθμιση της νεοαγγείωσης. [92]

Έτσι, τα κύτταρα CD133<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup> πιθανώς αντιπροσωπεύουν ανώριμα προγονικά κύτταρα, ενώ τα CD34<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup> μπορεί να αντιπροσωπεύουν κύτταρα του τοιχώματος του αγγείου που έχουν αποβληθεί. [92]

Αν και ο ακριβής φαινότυπος των EPCs δεν έχει καθοριστεί ακόμη οριστικά, υπάρχει γενική συμφωνία για τη χρήση τουλάχιστον ενός επιπλέον δείκτη που αντικατοπτρίζει τον ενδοθηλιακό χαρακτήρα: ο πιο χρησιμοποιούμενος είναι ο VEGFR-2 ή KDR, ενώ άλλοι δείκτες είναι οι Platelet-Endothelial Cells Adhesion Molecule-1 (PECAM-1 ή CD31), Vascular Endothelial-cadherin, vWF, c-kit, Tie-2 και VEGFR-1. [92][93]

Επιπλέον, μεταγενέστερες εργασίες έδειξαν ότι κύτταρα που απομονώθηκαν in vitro από καλλιέργεια κυκλοφορούντων CD34<sup>+</sup> μονοπύρηνων κύτταρων εκφράζουν τον δείκτη λευκοκυττάρων CD45, ο οποίος εκφράζεται σε όλα τα λευκοκύτταρα. [94][95]

### 1.3.2. Βιολογία των EPCs

Δύο χαρακτηριστικά των EPCs μελετώνται κυρίως, ο αριθμός των EPCs και η λειτουργία τους. [96]

Ο προσδιορισμός του αριθμού των κυκλοφορούντων EPCs μπορεί να γίνει με χρήση κυτταρομετρίας ροής και οι δείκτες κυτταρικής επιφάνειας (αντιγόνα) που χρησιμοποιούνται συχνότερα για την ταυτοποίησή τους είναι οι CD34, CD133 και KDR. [95]

Η λειτουργία των EPCs μελετάται σε σχέση με τον πολλαπλασιασμό, την πρόσφυση τους στο ενδοθήλιο και τη μετανάστευσή τους. [92]

Πολλαπλασιασμός: Η ικανότητα των EPCs για επέκταση και σχηματισμό αποικιών σε καλλιέργειες κυττάρων: τα EPCs πολλαπλασιάζονται ως απόκριση στους αυξητικούς παράγοντες που απελευθερώνονται τοπικά μετά από αγγειακή βλάβη ή ισχαιμία των ιστών.

Προσκόλληση: Η ικανότητα των EPCs να προσκολλώνται σε ένα στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων σε καλλιέργειες κυττάρων. Η ιδιότητα αυτή είναι απαραίτητη για την επανενδοθηλιοποίηση των αγγείων και τη νεοαγγείωση. Τα EPCs προσκολλώνται στα τοιχώματα των αγγείων και μεταναστεύουν στο διάμεσο ιστό όπου οργανώνονται σε αγγειακές δομές.

Μετανάστευση: Η ικανότητα των EPCs να εισέρχονται στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και η οποία εκτιμάται in vitro με την χρήση του τεχνικού πρωτοκόλλου Boyden chamber assay. [96] Η ιδιότητα αυτή είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη νέων αγγείων.

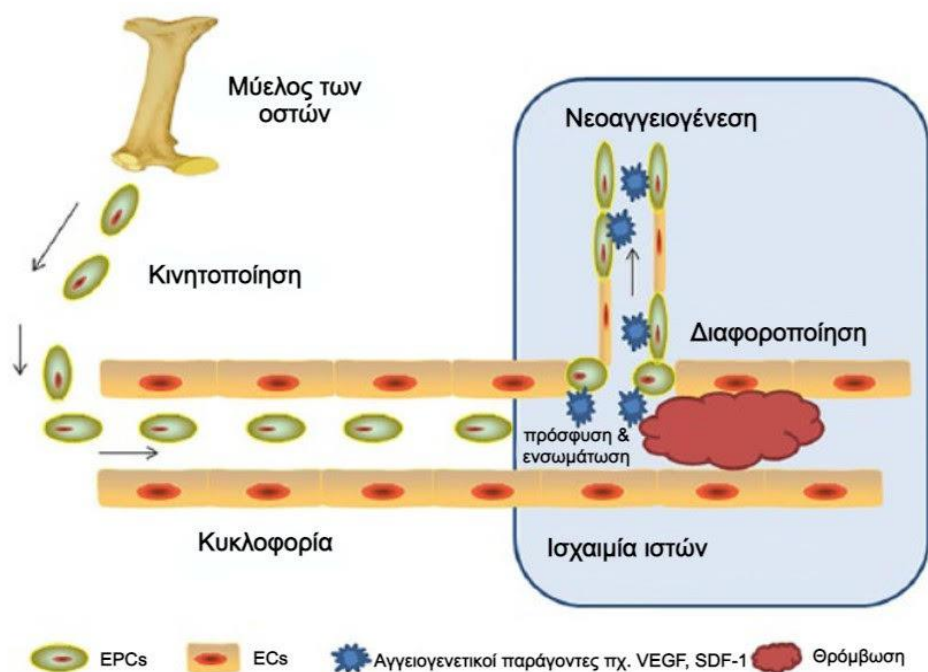
#### Η συμβολή των EPCs στην αγγειογένεση και τη νεοαγγείωση

Πολλές μελέτες σε ισχαιμικές αγγειακές διαταραχές έχουν δείξει ότι η αγγειακή συντήρηση, επιδιόρθωση και νεοαγγείωση διαμεσολαβούνται από τη στρατολόγηση των EPCs. [97][98][99] Μόλις τα EPCs κινητοποιηθούν προς την θέση της αγγειακής βλάβης, ουσιαστικά αποτελούν μια κυκλοφορούσα δεξαμενή κυττάρων που είναι σε θέση να «επιδιορθώσει» το σημείο του τραυματισμού ή να χρησιμεύσει για την αποκατάσταση του κατεστραμμένου ενδοθηλίου. Είναι χαρακτηριστικό ότι όταν EPCs εγχέονται σε ζωικά μοντέλα με ισχαιμία, ενσωματώνονται γρήγορα σε σημεία νεοαγγείωσης. [100]

Τα EPCs έχουν ουσιαστική συμβολή στην αγγειακή βλάβη άμεση και έμμεση:

- Άμεσα, τα EPCs συμβάλλουν στη νεοαγγείωση μέσω αγγειογένεσης, δηλαδή του de novo σχηματισμού αιμοφόρων αγγείων, ο οποίος συνίσταται στη μετανάστευση, στον πολλαπλασιασμό και στην ενσωμάτωση των EPCs που προέρχονται από το μυελό των οστών στα αναγεννητικά αγγεία. [101]
- Έμμεσα, τα EPCs συμβάλλουν στη νεοαγγείωση μέσω μετανάστευσης προς ισχαιμικούς ιστούς, χωρίς όμως να συμμετέχουν στο σχηματισμό νέων αγγείων. Τα EPCs κατοικούν στο διάμεσο ιστό και παράγουν διάφορες κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες που ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ήδη υπαρχόντων ενδοθηλιακών κυττάρων. [102][103] Αυτή η δραστηριότητα των EPCs που αντιπροσωπεύει την έμμεση συμβολή τους στην αγγειογένεση μελετήθηκε σε αναφορές στις οποίες επιβεβαιώθηκε η διαμεσολάβηση διαφόρων κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων, όπως VEGF, ηπατικός αυξητικός παράγοντας (hepatic growth factor, HGF), SDF-1 $\alpha$ , IGF-1 και η eNOS/επαγωγή συνθετάση νιτρικού οξειδίου (iNOS). [104][105][106]

Στην Εικόνα 1 φαίνονται οι λειτουργίες των EPCs που περιγράφηκαν και η συμβολή τους στη αγγειογένεση μέσω της διαμεσολάβησης των VEGF και SDF-1.



Εικόνα 1. Λειτουργίες των EPCs και συμβολή τους στη αγγειογένεση μέσω της διαμεσολάβησης των VEGF και SDF-1.

Diabetes & Vascular Disease Research 2017, Vol. 14(5) 381–394

**EPCs:** endothelial progenitor cells, ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα, **ECs:** endothelial cells, ενδοθηλιακά κύτταρα, **VEGF:** vascular endothelial growth factor, αγγειακός ενδοθηλιακός



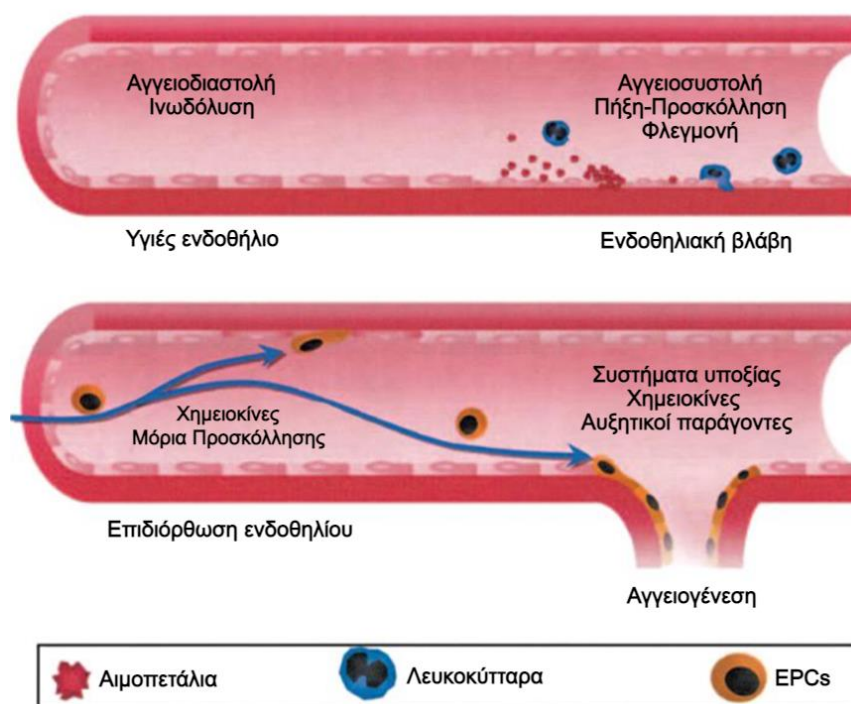
αυξητικός παράγοντας, **SDF-1**: stromal cell -derived factor 1, προερχόμενος από κύτταρα του στρώματος παράγων -1

### 1.3.3. Ρόλος και δράση των EPCs στο ενδοθήλιο

Η πλειοψηφία των κυκλοφορούντων EPCs βρίσκονται στο μυελό των οστών σε στενή σχέση με τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (hematopoietic stem cells, HSCs) και το στρώμα του μυελού των οστών, το οποίο παρέχει το βέλτιστο μικροπεριβάλλον. Τα EPCs έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται, να μεταναστεύουν και να διαφοροποιούνται σε κύτταρα ενδοθηλιακής προέλευσης, χωρίς όμως να έχουν αποκτήσει ακόμη τα πλήρη χαρακτηριστικά των ώριμων ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι Urbich και Dimmeler [107] ορίζουν τα EPCs ως μη ενδοθηλιακά κύτταρα που παρουσιάζουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σε ενδοθηλιακά κύτταρα. [108]

Ο ρόλος των κυκλοφορούντων EPCs στην ομοίωση του αγγειακού ιστού έχει αποδειχθεί σημαντικός. [109] Η αποστολή τους εντός του αγγειακού συστήματος είναι διπλή: συνίσταται στην επούλωση της βλάβης του ενδοθηλίου και στο σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων σε ισχαιμικούς ιστούς. [4]

Τα EPCs αποτελούν μια κυκλοφορούσα δεξαμενή κυττάρων τα οποία είναι ικανά να σχηματίσουν ένα κυτταρικό «έπιθεμα» σε σημεία τραυματισμού του ενδοθηλίου, συμβάλλοντας έτσι άμεσα στην ομοίωση και την επιδιόρθωση του ενδοθηλιακού τοιχώματος (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Η συμβολή των EPCs στην επιδιόρθωση του ενδοθηλιακού τοιχώματος

Fadini GP, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Significance of Endothelial Progenitor Cells in Subjects With Diabetes. *Diabetes Care* 2007, 30: 1305-1313

Η έκταση και ο τύπος της αποκατάστασης ή της αναγέννησης του αγγειακού ενδοθηλίου φαίνεται να εξαρτάται από την έκταση και το είδος του τραυματισμού και την ηλικία του κάθε ατόμου. [110]

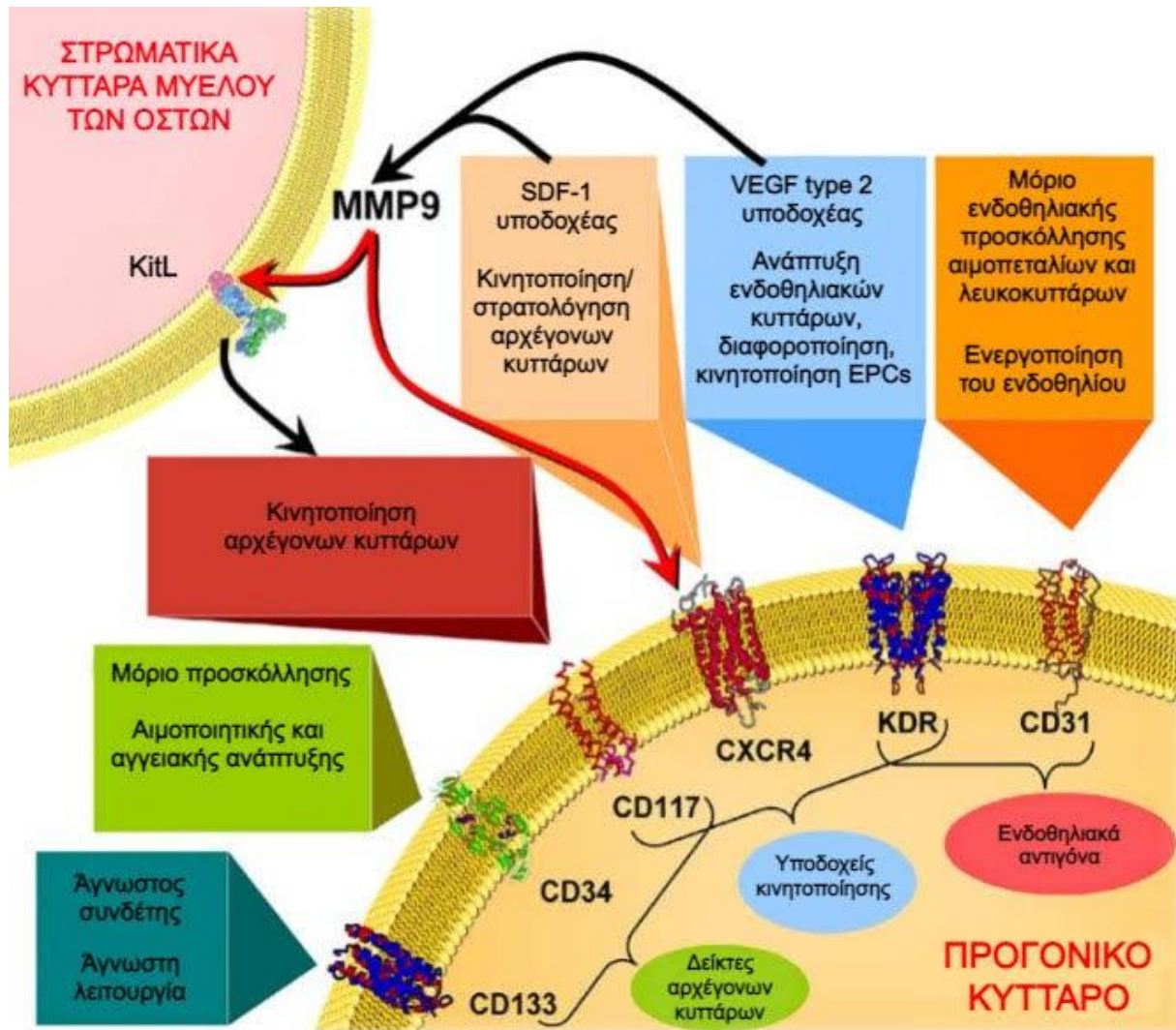
Τα EPCs κινητοποιούνται από το μυελό των οστών στην περιφερική κυκλοφορία κατά τη διάρκεια φυσιολογικών λειτουργιών, όπως η έμμηνος ρύση ή η ανάπτυξη ιστών, [112][113] καθώς και από ισχαιμικούς ή κατεστραμμένους ιστούς λόγω της απελευθέρωσης αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών. Οι Rehman και συν. ήταν από τους πρώτους που έδειξαν ότι τα EPCs εκκρίνουν αγγειογενετικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του VEGF. [111]

Οι Zhang και συν. διαπίστωσαν ότι τόσο τα πρώιμα EPCs όσο και τα κύτταρα σχηματισμού ενδοθηλιακών αποικιών (Endothelial colony-forming cells ECFCs) εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. [94]

Η κινητοποίηση αυτή των EPCs από το μυελό των οστών είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, που ρυθμίζεται από ποικίλους παράγοντες και μια αλυσίδα βιοχημικών σημάτων, με τα οποία στρατολογούνται τα EPCs από το μυελό των οστών στο σημείο της αγγειακής βλάβης, όπου και διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα [115] και προάγουν τη νεοαγγείωση. [116][117] Ο αριθμός των EPCs έχει βρεθεί ότι συσχετίζεται με τη συγκέντρωση του SDF-1. [118]

Η ισχαιμία των ιστών, μέσω της απελευθέρωσης αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών, είναι εκείνη που κινητοποιεί τα EPCs. Στο τοπικό μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, η νησίδα όπου βρίσκονται τα βλαστικά κύτταρα αποτελείται από ινοβλάστες, οστεοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα, και καθοδηγεί την κινητοποίηση ή όχι των βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών. [119][120][121] Η ρύθμιση της κινητοποίησης γίνεται από κυτοκίνες, οι οποίες συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ βλαστοκυττάρων και κύτταρων του μυελού, που οδηγούν στην αποδέσμευση των βλαστοκυττάρων από το μυελό των οστών και στην απελευθέρωσή τους στην κυκλοφορία του αίματος. [122] Οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται προκαλούν διάσπαση των δεσμών ανάμεσα στα κύτταρα του στρώματος και στα βλαστοκύτταρα και απελευθέρωσή των τελευταίων στην κυκλοφορία. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες διασπούν τον SDF-1.

Οι μηχανισμοί αυτοί απεικονίζονται στην Εικόνα 3.



Εικόνα 3. Δείκτες που εκφράζονται στην επιφάνεια των EPCs - Ο ρόλος και η σημασία των επιφανειακών αντιγόνων στο προγονικό κύτταρο

Fadini GP. An underlying principle for the study of circulating progenitor cells in diabetes and its complications. Diabetologia 2008; 51:1091–1094

**SDF1:** stromal cell-derived factor-1, προερχόμενος από κύτταρα του στρώματος παράγοντας-1

**VEGF:** vascular endothelial growth factor, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

**MMP9:** matrix metalloproteinase-9, μεταλλοπρωτεϊνάση στρώματος μυελού των οστών 9

**c-kit:** tyrosine kinase receptor CD117, υποδοχέας τυροσινικής κινάσης CD117

**KitL:** membrane-bound c-kit ligand, συνδέτης μεμβράνης του c-kit υποδοχέα

**CXCR4:** C-X-C chemokine receptor type 4, υποδοχέας χημειοκίνης τύπου 4

**KDR:** kinase insert domain receptor, υποδοχέας με παρεμβαλλόμενη περιοχή κινάσης

Τυπικά αντιγόνα που χαρακτηρίζουν τα προγονικά κύτταρα μπορούν να διακριθούν σε:

**δείκτες αρχέγονων κυττάρων** (CD34, CD133 και CD117),

**υποδοχείς κινητοποίησης** (CD117, CXCR4 και KDR) και

**ενδοθηλιακούς δείκτες** (KDR και CD31).

Το CD34 θεωρείται ταυτοχρόνως και ενδοθηλιακό αντιγόνο.

Οι υποδοχείς CXCR4 και KDR (του SDF-1 και του VEGF, αντίστοιχα) ενεργοποιούν τη διάσπαση του υποδοχέα της μεμβράνης c-kit (KitL) με τη μεσολάβηση της MMP9. μεταλλοπρωτεϊνάσης στρώματος μυελού των οστών 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP9).

Η MMP9 διασπά τον CXCR4 που εκφράζεται στην επιφάνεια των προγονικών κυττάρων (κόκκινα βέλη). Ως αποτέλεσμα, τα προγονικά κύτταρα απελευθερώνονται και παραμένουν στην κυκλοφορία του αίματος. Σε πειραματικό μοντέλο διαβήτη, βλάβη των SDF-1 – CXCR4 και VEGF – KDR, σε συνδυασμό με μειωμένη απόκριση μυελού των οστών, συμβάλλουν στη μείωση των κυκλοφορούντων επίπεδων προγονικών κυττάρων.

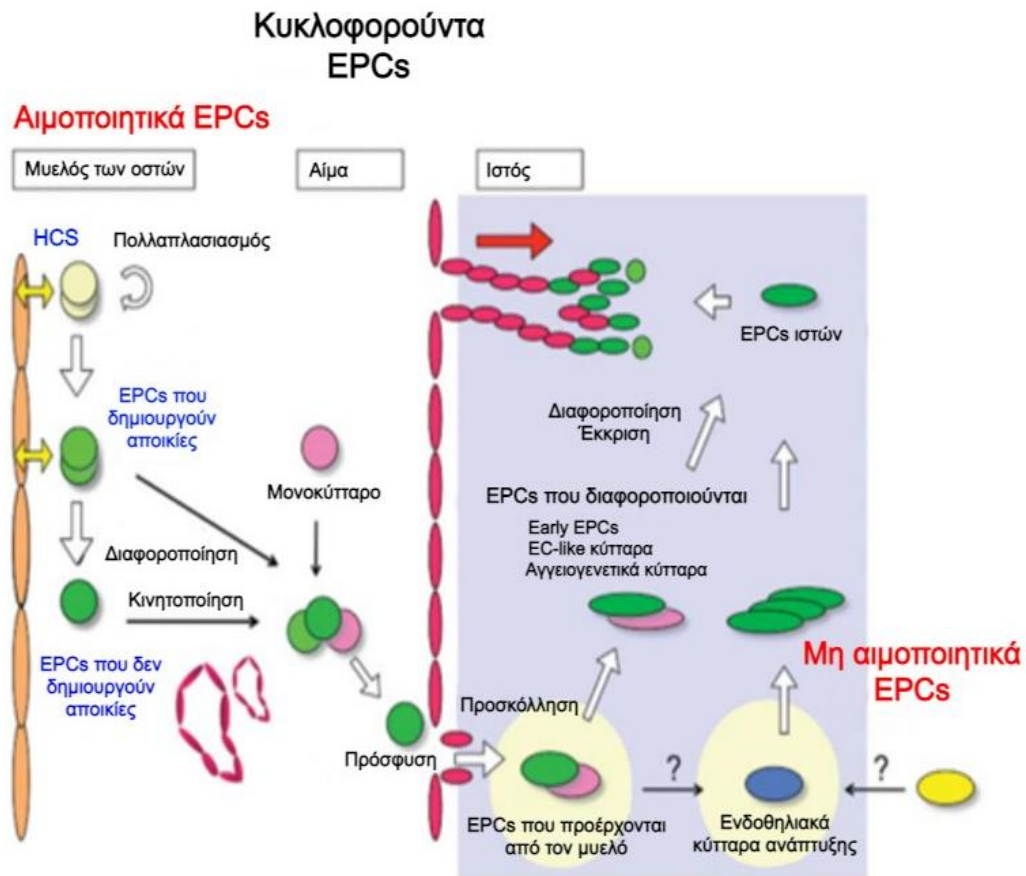
Το eNOS είναι απαραίτητο προκειμένου να διατηρείται επαρκής η κινητοποίηση των προγονικών κυττάρων ως απόκριση σε δεδομένα ερεθίσματα, όπως ο VEGF, οι στατίνες, η άσκηση, τα οιστρογόνα κ.ά. [122]

Τα EPCs μόλις βρεθούν στην περιφερειακή κυκλοφορία, κατευθύνονται στα σημεία της ισχαιμίας και ενσωματώνονται εκεί ώστε να διεγείρουν την αντισταθμιστική νεοαγγειογένεση. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η κινητοποίηση αυτή ρυθμίζεται από αυξητικούς παράγοντες, όπως οι SDF-1, G-CSF, FGF και VEGF με τη συμμετοχή μεταλλοπρωτεϊνών του στρώματος, όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάση στρώματος μυελού των οστών 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) και η μεταλλοπρωτεϊνάση στρώματος μυελού των οστών 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9), καθεψίνη-G και ελαστάση. [123][124]

Στη συνέχεια τα EPCs προσκολλώνται στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο και λειτουργούν είτε ως κάλυμμα για να επιδιορθώσουν βλάβες του ενδοθηλίου, αντικαθιστώντας το δυσλειτουργικό ενδοθήλιο, είτε μεταναστεύουν στο γειτονικό ιστό. Εκεί, ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα, δηλαδή σε αυξητικούς παράγοντες, τα EPCs πολλαπλασιάζονται και οργανώνονται σε σωληνοειδείς δομές οι οποίες ενσωματώνονται στα υπάρχοντα αγγεία και ωριμάζουν για να γίνουν νέα αγγεία. [125][93]

### 1.3.4. Ταξινόμηση EPCs

Τα κυκλοφορούντα EPCs μπορούν να υποδιαιρεθούν σε δύο κύριες κατηγορίες, EPCs αιμοποιητικής σειράς και EPCs μη αιμοποιητικής σειράς (Εικόνα 4).



Κυκλοφορούντα EPCs: αιμοποιητικά και μη αιμοποιητικά EPCs

ECs: ενδοθηλιακά κύτταρα, EOCs: ενδοθηλιακά κύτταρα ανάπτυξης,  
EPCs: ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα, HSCs: αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα

Εικόνα 4. Αιμοποιητικά και μη-αιμοποιητικά EPCs

Asahara T, Kawamoto A, Masuda H. Concise Review: Circulating Endothelial Progenitor Cells for Vascular Medicine. StemCells 2011; 29:1650–1655

Τα αιμοποιητικά EPCs προέρχονται από το μυελό των οστών και αποτελούν έναν προ-αγγειογενετικό υποπληθυσμό αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (Hematopoietic stem cells HSCs). [126][109] Τα αιμοποιητικά EPCs σε απόκριση σε πολλά ερεθίσματα εισέρχονται στην κυκλοφορία ως κυτταρικά συστατικά του αίματος και μπορούν να αντιπροσωπεύουν ποικίλους κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως EPCs που σχηματίζουν αποικίες (colony-forming EPCs) και EPCs που δε δημιουργούν αποικίες (non colony-forming EPCs). Τα EPCs που σχηματίζουν αποικίες προέρχονται από ένα μόνο κύτταρο και διακρίνονται σε μικρά και

μεγάλα EPCs. Τα μικρά EPCs είναι ανώριμα κύτταρα και προσδιορίζονται ως πρωτόγονα EPCs, ενώ τα μεγάλα EPCs τείνουν να διαφοροποιούνται και να ευοδώνουν την αγγειογένεση. [127]

Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από μονοκύτταρα περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών, σχηματίζουν φαινοτύπους EPCs που δημιουργούν αποικίες, και χαρακτηρίζονται ως καλλιεργημένα [128], πρώιμα (early) EPCs [129], τα οποία δημιουργούν νέα αιμοφόρα αγγεία ή προάγουν τη δημιουργία αιμοφόρων αγγείων. Εξάλλου, τα προερχόμενα από το μυελό των οστών μονοκύτταρα είναι ικανά και τα ίδια να ενσωματωθούν στο αγγειακό τοίχωμα. [130][131] (εικόνα 4)

Οι Pelosi και συν. έδειξαν ότι ανθρώπινα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, όταν καλλιεργηθούν σε ειδικό περιβάλλον διαφοροποιούνται σε έναν υποστηρικτικό κυτταρικό πληθυσμό EPCs (CD34<sup>+</sup>/cadherin<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup>), με ικανότητα προσκόλλησης στο ενδοθήλιο, ο οποίος προωθεί και εντείνει τη νεοαγγείωση. [132]

**Τα μη αιμοποιητικά EPCs** είναι κύτταρα που δεν προέρχονται από αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα και μπορούν να απομονωθούν από δείγματα αίματος ή ιστού με διαδοχικές καλλιέργειες. Η προέλευση των μη αιματοποιητικών EPCs δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη, αλλά θεωρείται ότι προέρχονται από βλαστοκύτταρα ιστικής προέλευσης ή από αιμοφόρα αγγεία οργάνων. [133]

### 1.3.5. Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός EPCs

Τα EPCs χαρακτηρίζονται και ταυτοποιούνται με δείκτες που εκφράζονται από αιμοποιητικά κύτταρα [128], ενώ συν-εκφράζουν δείκτες επιφανείας τόσο των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (CD34 και CD133) όσο και των ενδοθηλιακών κυττάρων (VEGF-R2 ή KDR, και CD31). [134][127]

**Το CD34** συγκέντρωσε το ενδιαφέρον εξαρχής, επειδή αναγνωρίζεται ευρέως ως ο κύριος δείκτης που χρησιμοποιείται κατά την απομόνωση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων για μεταμόσχευση στην κλινική πράξη. [135][136] Το CD34 περιγράφηκε για πρώτη φορά σε αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα ως γλυκοπρωτεΐνη κυτταρικής επιφάνειας και λειτουργεί ως παράγοντας διακυτταρικής πρόσφυσης. Μπορεί επίσης να μεσολαβεί στην προσκόλληση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του μυελού των οστών ή απευθείας στα στρωματικά κύτταρα. [137]

Το CD34 εκφράζεται σε κύτταρα ιστών που προέρχονται από το μεσοδέρμα, όπως στο αίμα, σε ενδοθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες, σε επιθηλιακές σειρές και μερικούς πληθυσμούς βλαστικών καρκινικών κυττάρων.

**Ο KDR ή CD309**, επίσης γνωστός ως VEGF-R2, και Flk-1 (ποντίκι), είναι διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I, μέλος της οικογένειας των υποδοχέων: παράγοντα διέγερσης αποικιών (colony stimulating factor, CSF-1) και του προερχόμενου από αιμοπεταλία υποδοχέα αυξητικού παράγοντα (platelet-derived growth factor, PDGF) των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης τύπου III. Ο ανθρώπινος VEGF-R2 εκφράζεται κυρίως σε ενδοθηλιακά κύτταρα, εμβρυϊκούς ιστούς και μεγακαρυοκύτταρα. Παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αγγειογένεσης και της αγγειακής διαπερατότητας. Η ενεργοποίηση του VEGF-R2 οδηγεί σε αυτοφωσφορύλιωση των υποδοχέων για τον ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα των αγγείων, διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Εκφράζεται σε σειρές κυττάρων που προέρχονται από το μεσόδερμα, δηλαδή του αίματος, του ενδοθηλίου και του καρδιακού ιστού. [138]

**Ένας δείκτης αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, ο CD133,** είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, της οποίας η ακριβής λειτουργία είναι άγνωστη και εκφράζεται επίσης σε υποπληθυσμούς των EPCs, αλλά όχι σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η έκφρασή του μειώνεται κατά τη διαφοροποίηση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων και των EPCs. [139] Οι Gehling et al. [140] έδειξαν ότι τα κύτταρα που εκφράζουν το δείκτη CD133 διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα όταν καλλιεργούνται παρουσία VEGF και αυξητικού παράγοντα βλαστικών κυττάρων, και η φαινοτυπική ανάλυση των κυττάρων αυτών ανέδειξε συνέκφραση VEGFR-2, Tie-2, και vWF.

Κατά τη μελέτη ενός μικρού υποπληθυσμού CD34<sup>+</sup> κυττάρων από διαφορετικές αιμοποιητικές σειρές που εξέφραζαν τους δείκτες CD133 και VEGFR-2, όταν αυτός επώαστηκε με VEGF, FGF-2 και κολλαγόνο, παρατηρήθηκε ως αποτέλεσμα ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίησή των κυττάρων σε AC133<sup>-</sup>/VEGFR2<sup>+</sup> ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα. Το γεγονός ότι κατά την ωρίμανση και την *in vitro* διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων καταργείται η έκφραση του CD133, υποδηλώνει ότι τα EPCs μπορούν να σημανθούν με CD133. [108]

Όλα αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο CD133 είναι ένας από τους πλέον αρμόδιους δείκτες για τον προσδιορισμό των EPCs και ότι τα κυκλοφορούντα κύτταρα CD34<sup>+</sup>, VEGFR-2<sup>+</sup>, και AC133<sup>+</sup> συνιστούν έναν φαινοτυπικά και λειτουργικά διακριτό πληθυσμό κυκλοφορούντων κυττάρων, ο οποίος συμμετέχει στην αγγειογένεση.

**Ο δείκτης CD45** είναι ένα διαμεμβρανικό μόριο που βρίσκεται στην επιφάνεια όλων των αιματοποιητικών κυττάρων, και έχει ταυτοποιηθεί ως η πρώτη διαμεμβρανική πρωτεϊνική φωσφατάση τυροσίνης (protein-tyrosine phosphatase, PTPase), η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην θετική ρύθμιση της σηματοδότησης αντιγόνου-υποδοχέα μέσω της αποφωσφορυλίωσης των κινάσων τυροσίνης Src. Στα κύτταρα T και B έχει εκτιμηθεί ότι ο CD45 αποτελεί έως και το 10% της κυτταρικής τους επιφάνειας. [141]

Ο δείκτης CD45 αποτελεί κοινό αντιγόνο λευκοκυττάρων, εκφράζεται δηλαδή σε όλα τα λευκοκύτταρα, και έχει βρεθεί ότι τα EPCs αποκτούν αυτόν τον δείκτη μόνο κατά τη διαφοροποίησή τους σε αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα και όχι κατά την εξέλιξή τους προς την ενδοθηλιακή σειρά. Επομένως, η έκφραση του δείκτη CD45 σηματοδοτεί τη διαφοροποίηση προς την αιμοποιητική σειρά από την εμβρυϊκή έως την ενήλικη ζωή, ενώ δεν εκφράζεται σε κύτταρα ενδοθηλιακής σειράς. [127]

**Ο μεμβρανικός δείκτης CD31** είναι ένα μόριο το οποίο μεσολαβεί τόσο για την πρόσφυση των λευκοκυττάρων όσο και για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στη μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη δια-ενδοθηλιακή μετανάστευση. Το CD31 εκφράζεται στα αιμοπετάλια, στα περισσότερα λευκοκύτταρα, στα ιστιοκύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου. [142][143]

Οι πληθυσμοί των EPCs απομονώνονται συνήθως από μονοπύρνα κύτταρα περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) και καλλιεργούνται παρουσία VEGF. Ωστόσο, υπάρχει διαφωνία σχετικά με την πραγματική φύση και προέλευση των κυκλοφορούντων EPCs. Αν και είναι γνωστό ότι τα CD34<sup>+</sup> ή CD133<sup>+</sup> προγονικά κύτταρα τα οποία έχουν απομονωθεί με ανοσομαγνητική τεχνική και έχουν καλλιεργηθεί παρουσία VEGF

μπορούν να αναπαραγάγουν ενδοθηλιακά κύτταρα με ιδιότητες επαναγγείωσης *in vivo*, [144][145][146][86][147][97] αυτά τα κύτταρα αντιπροσωπεύουν ένα πολύ μικρό υποσύνολο PBMCs, που κυμαίνεται από 0,02% έως 0,1%. [130][92]

Δεδομένου ότι τα CD34 και CD133 εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στα HSCs, αλλά ο αριθμός και η λειτουργικότητά τους μειώνεται κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων σε αιμοποιητικά, ο Reichen et al [147] εξήγησαν ότι οποιαδήποτε κύτταρα που εκφράζουν αυτούς τους δείκτες μπορεί να αντιπροσωπεύουν έναν πληθυσμό ανώριμων προγονικών κυττάρων. Επιπλέον, εξέφρασαν την υπόθεση ότι το KDR (γνωστό ότι εκφράζεται σε εμβρυϊκούς αγγειοβλάστες) μπορεί να εκφράζεται σε υποπληθυσμούς κυττάρων CD133<sup>+</sup> και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση μεταξύ ώριμων ενδοθηλιακών κυττάρων και κυκλοφορούντων EPCs. [138][148]

Συγχρόνως, οι ερευνητές συμφωνούν ότι στον φαινότυπο των αναλυθέντων πληθυσμών θα πρέπει να περιέχονται δείκτες CD31/CD45 μη αιμοποιητικών κυττάρων με υψηλή ικανότητα πολλαπλασιασμού, τα οποία κατόπιν διέγερσής τους αναπτύσσονται σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα. [110]

Για τον υπολογισμό των EPCs έχουν υποστηριχθεί διάφορες προσεγγίσεις, οι κύριες μέθοδοι όμως για τον ποσοτικό προσδιορισμό EPCs είναι δύο: η ανάλυση δεικτών κυτταρικής επιφάνειας με κυτταρομετρία ροής που βασίζεται σε ομάδα επιφανειακών αντιγόνων, και η κυτταρική καλλιέργεια *in vitro*. [149][110] Η κυτταρομετρία ροής θεωρείται η μέθοδος εκλογής για την απαρίθμηση των EPCs, καθώς έχει ευαισθησία, ακρίβεια και με την εφαρμογή της, τα EPCs μπορούν να οριστούν από την έκφραση στην επιφάνεια τους τουλάχιστον ενός δείκτη ανωριμότητας (π.χ. CD34 ή CD133) συν του ενδοθηλιακού δείκτη VEGFR2 (KDR). Στις περισσότερες μελέτες οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για να περιγράψουν τα EPCs ήταν οι CD34, KDR, CD133. [150]

Στην εικόνα 3, κεφαλαίο 1.3.3 απεικονίζονται οι δείκτες που εκφράζονται στην επιφάνεια των EPCs και ο ρόλος τους στην κινητοποίηση των EPCs από το μυελό των οστών.

### 1.3.6. Υποτύποι EPCs

Οι Lin και συν. ανέφεραν την ύπαρξη ενός τύπου κυκλοφορούντων EPCs που προέρχονταν από το μυελό των οστών από τα οποία καλλιεργήθηκαν μετά από 2-4 εβδομάδες κύτταρα με μεγάλο ρυθμό πολλαπλασιασμού και σχημάτισαν μια στιβάδα κυττάρων με ενδοθηλιακό φαινότυπο. [152] Οι Hur και συν. διαπίστωσαν την παρουσία 2 τύπων EPCs σε καλλιέργεια PBMCs σε ενδοθηλιακό μέσο ανάπτυξης και τα ονόμασε "πρώιμα" και "όψιμα EPCs" ("**early**" and "**late EPCs**" αντίστοιχα). Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα πρώιμα EPCs είναι ένας ετερογενής κυτταρικός πληθυσμός που περιελάμβανε μερικούς κλώνους από τους οποίους παράγονταν τα όψιμα EPCs. [151]

Οι τύποι αυτών των EPCs μπορεί να ανευρεθούν σε μεταγενέστερες μελέτες και με διαφορετική ονοματολογία, και συγκεκριμένα τα πρώιμα EPCs αποκαλούνται και κυκλοφορούντα αγγειογόνα κύτταρα (circulating angiogenic cells, CACs) και τα όψιμα EPCs αποκαλούνται κύτταρα σχηματισμού ενδοθηλιακών αποικιών (endothelial colony-forming cells, ECFCs). [149]

Αυτοί οι δύο τύποι κυττάρων έχουν πολλές διαφορές ως προς τη μορφολογία τους, το ρυθμό ανάπτυξης και τους κυτταρικούς δείκτες που εκφράζουν στην επιφάνειά τους. Οι Hur και



συν. έδειξαν ότι τα πρώιμα EPCs έχουν σχήμα ατρακτοειδές, ενώ τα όψιμα EPCs έχουν σχήμα σφαιρικό [151]. Οι Shantsila και συν. πρότειναν ότι τα πρώιμα EPCs εκφράζουν τους CD14/CD45/KDR<sup>low</sup> και CD31/vWF, ενώ τα όψιμα EPCs εκφράζουν τους CD34/KDR και CD31/vWF. [153] Οι δύο αυτοί διαφορετικοί υποπληθυσμοί EPCs μπορεί να εμφανίζουν διαφορετικές αγγειογενετικές ιδιότητες, καθώς τα πρώιμα EPCs έχουν σχετικά χαμηλή πολλαπλασιαστική ικανότητα και χαμηλή ικανότητα έκφρασης ενδοθηλιακών πρωτεϊνών. [123]

Μεταγενέστερη μελέτη των Hirschi και συν. ανέδειξε 3 υποτύπους EPCs, οι οποίοι διακρίνονται με βάση τον φαινότυπο που παρατηρείται στην καλλιέργεια *in vitro*. [138]

**(1)** Κυκλοφορούντα αγγειογόνα κύτταρα (CACs), (που παλαιότερα ονομάζονταν πρώιμα EPCs) είναι κύτταρα που απομονώνονται μετά από 4-7 ημέρες καλλιέργειας PBMCs παρουσία ινονεκτίνης σε ενδοθηλιακό κυτταρικό μέσο. [149] Τα κύτταρα αυτά δεν διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα, συμμετέχουν όμως στην αγγειακή επιδιόρθωση *in vivo*. [151] Στην επιφάνεια τους εκφράζουν δείκτες των M2 μακροφάγων, ο ρόλος τους στη νεοαγγειογένεση όμως έχει επιβεβαιωθεί και έχει συνδεθεί με την έκκριση αγγειογενετικών κυτοκινών. [130][131][154]

**(2)** Από διαθέσιμη στο εμπόριο μονάδα σχηματισμού αποικιών (colony-forming unit, CFU)-Hill, καλλιεργούνται αποικίες ετερογενών κυττάρων, τα οποία εκφράζουν συγχρόνως δείκτες αιμοποιητικούς και μυελοειδείς, καθώς και τους VEGFR2 and CD31. Μεταγενέστερες μελέτες έχουν δείξει ότι τα T λεμφοκύτταρα CD3<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup> (που αναφέρονται ως αγγειογόνα T κύτταρα) αποτελούν τον πυρήνα αυτών των αποικιών και ότι οι αποικίες αυτές απαρτίζονται από ένα συνδυασμό T κυττάρων και μονοκυττάρων. [140]

**(3)** Τα κύτταρα σχηματισμού ενδοθηλιακών αποικιών (ECFCs), (που παλαιότερα ονομάζονταν όψιμα EPCs) προέρχονται από PBMCs, που καλλιεργούνται σε ενδοθηλιακό μέσο για 6-21 ημέρες. Οι αποικίες από αυτά τα κύτταρα εμφανίζουν σχήμα σφαιρικό και τα κύτταρα συμμετέχουν στο σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων *in vivo*. Τα ECFCs εκφράζουν σε αφθονία τους CD34 και KDR στην κυτταρική τους μεμβράνη, αλλά δεν έχουν έντονη έκφραση του πανλευκοκυτταρικού δείκτη CD45. [133] Αυτά τα «αληθή» EPCs αποτελούν μέρος του πληθυσμού κυττάρων CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>/CD45<sup>dim</sup> που ανιχνεύονται με κυτταρομετρία ροής. [149] Χρησιμοποιώντας ανοσοφθορισμό, τα όψιμα EPCs διαπιστώνεται πως είναι θετικά για αρκετούς ενδοθηλιακούς δείκτες συμπεριλαμβανομένων των VE-cadherin, vWF, CD31, και είναι σε θέση να ενσωματώνουν ακετυλιωμένη-LDL και να συνδέονται με τη λεκτίνη UEA-1 (Ulex europaeus agglutinin I lectin, UEA-1). Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής αποκαλύπτει ότι τα όψιμα EPCs εκφράζουν τα αντιγόνα επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων CD31, CD146, CD34 και VEGFR-2. [155][108][154]

Στον πίνακα παρακάτω (Πίνακας 5) ταξινομούνται τα χαρακτηριστικά των υποτύπων EPCs.

Πίνακας 5. Τα κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των πρώιμων και όψιμων EPCs

Φαινοτυπικοί δείκτες	
CACs (πρώιμα EPCs)	ECFCs (όψιμα EPCs)
CD45 <sup>+</sup>	CD45 <sup>-</sup>
CD14 <sup>+</sup>	CD14 <sup>-</sup>
CD115 <sup>+</sup>	CD115 <sup>-</sup>
CD31 <sup>+</sup>	CD31 <sup>+</sup>
CD146 <sup>low</sup>	CD146 <sup>high</sup>
VE- Cad <sup>+/-</sup>	VE-Cad <sup>+/+</sup>
CD105 <sup>+</sup>	CD105 <sup>+</sup>
vWF <sup>+/-</sup>	vWF <sup>+</sup>
CD34 <sup>+/-</sup>	CD34 <sup>+/-</sup>
CD133 <sup>+</sup>	CD133 <sup>-</sup>
CD117 <sup>+</sup>	CD117 <sup>+/-</sup>
VEGF-R1 <sup>+</sup>	VEGF-R1 <sup>+</sup>
VEGF-R2 <sup>+</sup>	VEGF-R2 <sup>++</sup>
TIE-2 <sup>+</sup>	TIE-2 <sup>+</sup>
CXCR4 <sup>+</sup>	CXCR4 <sup>+/-</sup>
AcLDL uptake <sup>+</sup>	AcLDL uptake <sup>+</sup>
ALDH high <sup>+</sup>	ALDH high <sup>+</sup>

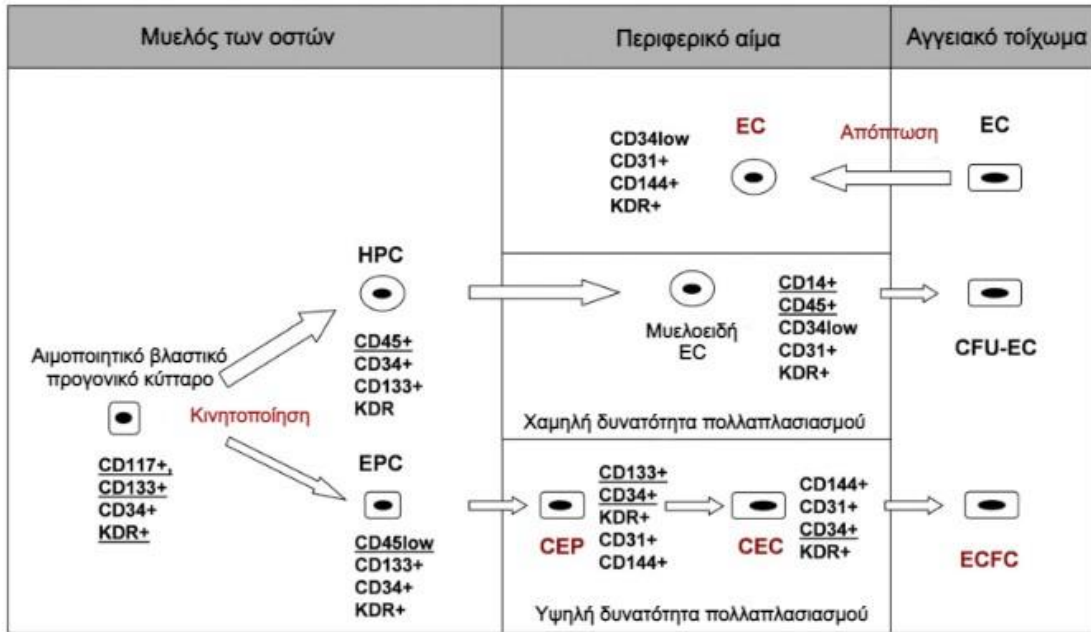
CACs (circulating angiogenic cells): κυκλοφορούντα αγγειογόνα κύτταρα

ECFCs (colony forming cells): κύτταρα σχηματισμού ενδοθηλιακών αποικιών

EPCs (endothelial progenitor cells): προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα

### 1.3.7. Υποπληθυσμοί EPCs

Στην Εικόνα 5 φαίνονται η προέλευση και τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά υποπληθυσμών κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών κυττάρων EPCs στο περιφερικό αίμα.



Εικόνα 5. Προέλευση και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά διακριτών υποπληθυσμών κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών κυττάρων στο περιφερικό αίμα

Michael S et al. Quantification of circulating endothelial and progenitor cells: comparison of quantitative PCR and four-channel flow cytometry, BMC Res Notes 2008, 1:71

**HPCs** (Hematopoietic progenitor cells, αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα) ή αλλιώς

**CPCs**: circulating progenitor cells, κυκλοφορούντα προγονικά κύτταρα

**EPCs**: endothelial progenitor cells, ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα

**CEPs**: circulating endothelial progenitors, κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά πρόδρομα

**CECs**: Circulating endothelial cells, κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα

**ECs**: endothelial cells, ενδοθηλιακά κύτταρα

**ECFCs**: Endothelial colony-forming cells, κύτταρα σχηματισμού ενδοθηλιακών αποικιών

Πολυδύναμα βλαστοκύτταρα βρίσκονται στις νησίδες βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών και παράγουν "αιμαγγειοβλάστες" που έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα (HPCs ή αλλιώς CPCs) και EPCs. Τα EPCs διαφοροποιούνται σε κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά πρόδρομα (CEPs) και κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα (circulating endothelial cells, CECs). Τα HPCs διαφοροποιούνται σε μυελοειδή κύτταρα όπως τα μονοκύτταρα, που μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μυελοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα που αποπίπτουν από το τοίχωμα του αγγείου μπορούν να εισέλθουν στην κυκλοφορία.

Η βιβλιογραφία στον τομέα των EPCs υποστηρίζει τον συνδυασμό δεικτών CD34/VEGFR-2 για τον χαρακτηρισμό των CEPCs στους ανθρώπους. Ωστόσο, τα κυκλοφορούντα κύτταρα CD34<sup>+</sup>/VEGFR-2<sup>+</sup> μπορεί επίσης να αντιπροσωπεύουν αιματοποιητικά προγονικά κύτταρα και ώριμα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα. [128][127]

Επειδή τόσο τα κύτταρα ενδοθηλιακής σειράς όσο και τα αιματοποιητικά κύτταρα υπάρχουν σε σημεία νεοαγγείωσης και συν-εκφράζουν πλήθος παρόμοιων επιφανειακών δεικτών, μπορεί να είναι δύσκολο να τα διακρίνουμε το ένα από το άλλο στα σημεία αγγειακής επιδιόρθωσης και να εκτιμήσουμε την ατομική τους συμβολή στην επούλωση ή στην αναγεννητική διαδικασία. [128]

Όταν πραγματοποιήθηκε έγχυση EPCs CD34<sup>+</sup>, VEGFR-2<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, ή VEGFR-2<sup>-</sup> σε ποντίκια, αρουραίους και κουνέλια σε προσπάθεια για νεοαγγείωση λόγω ισχαιμίας του οπίσθιου άκρου, διαπιστώθηκε ότι τα CD34<sup>+</sup> και VEGFR-2<sup>+</sup> κύτταρα είναι εκείνα που ενσωματώνονται στα αγγεία, και σπάνια τα CD34<sup>-</sup> ή VEGFR-2<sup>-</sup> EPCs.

Σε άλλη μελέτη ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής φάνηκε ότι ο υποπληθυσμός KDR<sup>+</sup> κυττάρων περιορίζεται σε τμήμα του πληθυσμού CD45<sup>+</sup> κυττάρων και CD34<sup>+</sup>. Η βιολογική σημασία αυτού του πληθυσμού CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> είναι ασαφής. Λόγω της φαινοτυπικής αλληλεπικάλυψης μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων και κυττάρων αίματος, είναι πιθανό τα ενδοθηλιακά κύτταρα να εκφράζουν παροδικά το CD45, ενώ είναι γνωστό ότι τα κύτταρα του αίματος μπορούν να εκφράσουν το KDR σε μεταβλητό βαθμό. Κατά συνέπεια, τα επίπεδα των EPCs που καθορίζονται από την κυτταρομετρία ροής είναι πολύ χαμηλότερα από την απαρίθμηση κυττάρων CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> και δεν αντιπροσωπεύονται από αυτά. [156]

**Τα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά πρόδρομα κύτταρα (Circulating endothelial precursor cells, CEPCs),** μπορούν να συμβάλλουν στην αγγειογένεση με μετανάστευση σε εστίες ισχαιμίας ιστού και σε τοποθεσίες αγγειογένεσης όγκου (Asahara και συν., 1997, 1999 [86][100], Reichen και συν., 2000 [147]). Τα CEPCs είναι μια ετερογενής ομάδα κυττάρων που χαρακτηρίζεται από τη δέσμευσή τους σε λεκτίνες, την πρόσληψη ακετυλιωμένων λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (Dil-Ac-LDL) και την έκφραση ενδοθηλιακών και προγονικών δεικτών κυτταρικής επιφάνειας. [157] Στην επιφάνειά τους εκφράζουν CD34, CD133 και τον VEGFR ή KDR. Κατά την ωρίμανση τους, αποκτούν την έκφραση ενδοθηλιακών δεικτών, όπως CD31 (PECAM), CD144 (VE-Cadherin) και vWF. Η ακριβής προέλευσή και ταυτοποίησή τους δεν είναι ξεκάθαρη.

**Τα CPCs ή HPCs κυκλοφορούντα προγονικά κύτταρα ή αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα** και τα **κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα CECs** αντιπροσωπεύουν δύο κυτταρικούς πληθυσμούς οι οποίοι θεωρείται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη νεοαγγείωση των ιστών. Τα CECs και CPCs μελετώνται ως βιοδείκτες, ωστόσο η απομόνωσή τους και η μελέτη τους παρουσιάζει δυσκολίες, καθώς οι μέθοδοι προσδιορισμού τους και τα πρωτόκολλα για την καταμέτρησή τους είναι πολλά και διαφορετικά μεταξύ εργαστηρίων. Οι δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί περισσότερο για τον φαινοτυπικό καθορισμό και την ταυτοποίηση των CPCs είναι οι CD34, CD133 και CD45<sup>-</sup> σε μελέτες έχει χρησιμοποιηθεί και ο CD31. [158]

**Τα CECs** έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν σημαντικά στην αγγειογένεση σε καταστάσεις ισχαιμίας, φλεγμονής και στην επούλωση των τραυμάτων. Τα CECs αποτελούν έναν ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό αποτελούμενο από ενδοθηλιακά κύτταρα που αποπύπτουν από το τοίχωμα του αγγείου, κυκλοφορούντα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα που

προέρχονται από το μυελό των οστών CEPs (circulating endothelial precursor cells) και ενδοθηλιακά πρόδρομα που προέρχονται από μονοκύτταρα (εικόνα 5). [159] Τα CECs θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγειακού έσω χιτώνα που έχουν αποβληθεί λόγω βλάβης οφειλόμενης σε μεταβολική αιμοδυναμική ή άλλη διαταραχή [160] και παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον ως βιοδείκτες για την πρόβλεψη της εμφάνισης και της βαρύτητας της αγγειακής νόσου. [161]

Τα πρώτα κύτταρα που μετακινούνται έξω από το αγγειακό τοίχωμα ενσωματωμένα σε τρισδιάστατες δομές είναι οι ινοβλάστες και τα μακροφάγα (που εκφράζουν CD45, CD68, και CD163) και στη συνέχεια ακολουθούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται στην κορυφή έχουν μεγαλύτερη τάση μετανάστευσης, ενώ τα κύτταρα στη βάση του αγγειακού τοιχώματος έχουν μεγαλύτερη τάση πολλαπλασιασμού. [125] Είναι συνηθισμένος ο χαρακτηρισμός των CECs ως ενδοθηλιακά κύτταρα του τοιχώματος των αγγείων με χαμηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό που απομακρύνονται από το τοίχωμα του αγγείου κατά τη διάρκεια φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων. [162]

### **EPCs στο αγγειακό τοίχωμα**

Με βάση παλαιά και νέα στοιχεία υποστηρίζεται η ύπαρξη EPCs μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων του τοιχώματος των αγγείων. Αυτά τα κύτταρα εμφανίζουν τυπικούς δείκτες ενδοθηλιακών κυττάρων, εκφράζουν αντιγόνα προγονικών κυττάρων, όπως CD34 και CD309 και έχουν αγγειογενετική δραστηριότητα. [163] Επιπλέον, ορισμένα κύτταρα CD31<sup>+</sup> που απομονώνονται από τον πνεύμονα ποντικών είναι σε θέση να σχηματίσουν in vitro μεγάλες αποικίες ενδοθηλιακών κυττάρων: αυτά τα κύτταρα ενσωματώνονται in vivo στα αιμοφόρα και τα λεμφικά αγγεία, υποδεικνύοντας έτσι τη διπλή τους ικανότητα ως EPCs να σχηματίσουν λεμφικά και αιμοφόρα αγγεία.

## 1.4. Μεταβολές των EPCs στο Σακχαρώδη Διαβήτη

### 1.4.1. Γενικά

Η διαπίστωση ότι τα EPCs και τα ενδοθηλιακά κύτταρα καθίστανται δυσλειτουργικά κατά τη διάρκεια μιας νόσου προέρχεται από την παρατήρηση ότι κατά τη νόσηση διαταράσσεται η ικανότητά τους για αναγέννηση, μετανάστευση και σχηματισμό τριχοειδών. [164]

Η γήρανση είναι η πιο κοινή αιτία δυσλειτουργίας των EPCs. [165] Έχει διαπιστωθεί ότι η υπεργλυκαιμία μειώνει την επιβίωση των κυκλοφορούντων EPCs και επηρεάζει δυσμενώς τη λειτουργικότητά τους. [166] Η διαταραχή της λειτουργίας των EPCs έχει επίσης τεκμηριωθεί στο Σ.Δ. τύπου I και II, στη στεφανιαία νόσο, την αθηροσκλήρωση, την αγγειίτιδα με προσβολή των νεφρών και στη νεφρική νόσο τελικού σταδίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η δυσλειτουργία αυτή είναι αποτέλεσμα της πρόωρης γήρανσης των EPCs που οφείλεται στο stress και συμβάλλει σημαντικά στην επιτάχυνση της εξέλιξης διαφόρων ασθενειών. [164][165][166]

Μελέτες έδειξαν ότι τα EPCs που προέρχονται από το μυελό διαβητικών ποντικών είναι λειτουργικά διαταραγμένα, ενώ η λήψη κυττάρων του μυελού από συγγενικούς μη διαβητικούς ποντικούς βελτίωσε σημαντικά την αγγειοπάθεια, την ευαισθησία στην ινσουλίνη και εν μέρει τη νεφρική λειτουργία στους διαβητικούς ποντικούς - λήπτες. [167]

Τα EPCs φαίνεται πως εμπλέκονται στη διαβητική αγγειοπάθεια. Κλινικές και πειραματικές μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι ο Σ.Δ. διαταράσσει τον αριθμό και τη λειτουργικότητα των EPCs, με συνέπεια η απόκρισή τους να είναι πτωχή κατά την εμφάνιση αγγειακής βλάβης.

Τα EPCs των ασθενών με Σ.Δ. παρουσιάζουν μειωμένη απόκριση σε ερεθίσματα που τα ενεργοποιούν, όπως η ισχαιμική βλάβη, με αποτέλεσμα μειωμένη ικανότητά για μετανάστευση και διαφοροποίηση προς ενδοθηλιακά κύτταρα. Υπό συνθήκες υποξίας παρατηρείται επίσης σημαντικά μειωμένη πρόσφυση και πολλαπλασιασμός των EPCs. Ομοίως, έχει δειχθεί ότι τα EPCs που απομονώθηκαν από ασθενείς με Σ.Δ. είχαν μειωμένη ανταπόκριση στον SDF-1, οποίος αποτελεί χαρακτηριστικό ερέθισμα για τη μετανάστευση EPCs, υποδηλώνοντας ότι τα EPCs έχουν μειωμένη ικανότητα απόκρισης στα ερεθίσματα, γεγονός το οποίο οδηγεί σε μειωμένη αγγειογένεση και επιβράδυνση της αγγειακής αναγέννησης. [123]

Η ομοκυστεΐνη και η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (c-reactive protein, CRP), μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη λειτουργία των EPCs. Τα επίπεδα της CRP είναι ανάλογα με τον αριθμό των κυκλοφορούντων EPCs σε ασθενείς με ασταθή στηθάγχη και η CRP μεταβάλλει την άμυνα έναντι του οξειδωτικού στρες, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των EPCs και προάγει την απόπτωση τους. [123]

### 1.4.2. Διαταραχή αριθμού

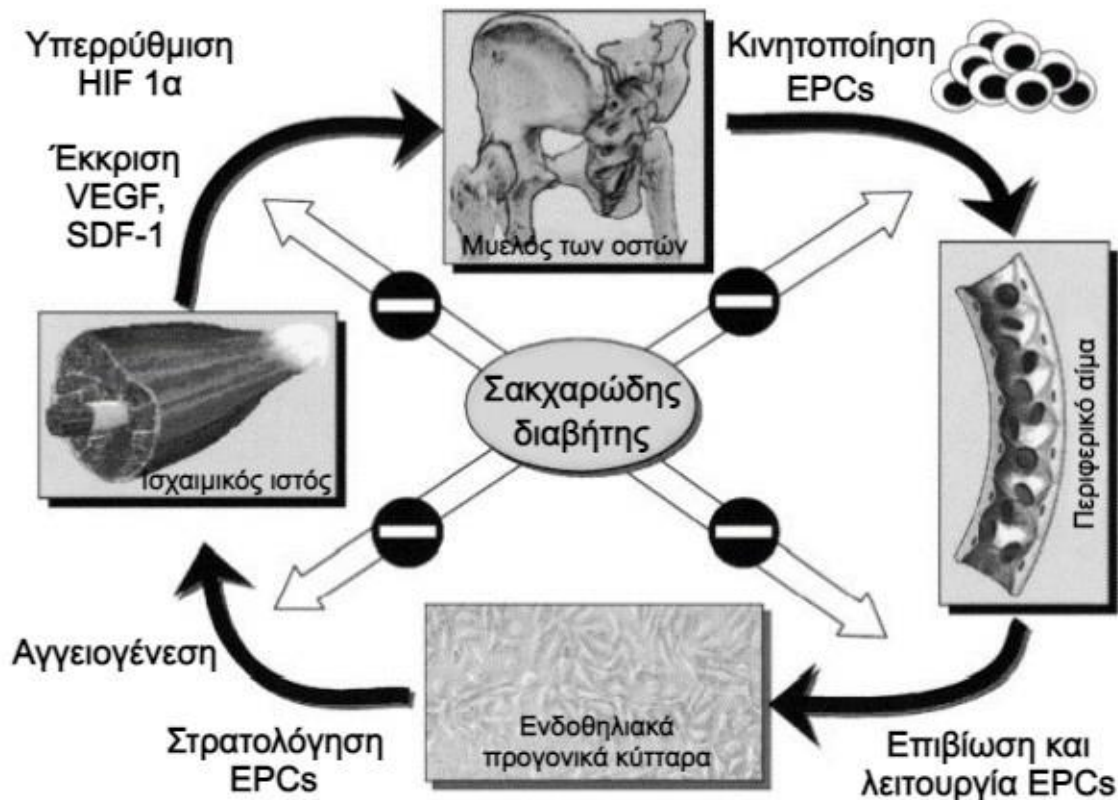
Σε ασθενείς με Σ.Δ. τύπου 1 και τύπου 2 έχει αποδειχθεί ότι ο αριθμός των κυκλοφορούντων EPCs μειώνεται και η λειτουργία τους διαταράσσεται [166], καθώς μειώνεται ο πολλαπλασιασμός, η πρόσφυση τους στο ενδοθήλιο και κατ'επέκταση και η αγγειογένεση.

Το γεγονός αυτό υποδηλώνει μια στενή σύνδεση ανάμεσα στην υπεργλυκαιμία και στη μείωση του αριθμού των EPCs και τη διαταραχή της λειτουργίας τους. [168]

Ο Σ.Δ. αντιπροσωπεύει την κλινική κατάσταση που συνδέεται στενά με μείωση των προγονικών κυττάρων. [169] Οι κυτταρομετρικές μέθοδοι και οι μέθοδοι καλλιέργειας έχουν αποδείξει ότι οι ασθενείς με Σ.Δ. τύπου 1 και τύπου 2 έχουν λιγότερα κυκλοφορούντα EPCs από τα αντίστοιχα υγιή άτομα. Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που εικάζεται ότι ευθύνονται για τη μείωση των EPCs στο Σ.Δ. περιλαμβάνουν: (i) μειωμένη επιβίωση στο περιφερικό αίμα (ii) διαταραχή κινητοποίησης από το μυελό των οστών και μειωμένος πολλαπλασιασμός (iii) διαταραγμένη διαφοροποίηση και (iv) αδυναμία εγκατάστασής τους σε εξωαγγειακούς χώρους. [96] Οι μηχανισμοί αυτοί μέσω των οποίων στο Σ.Δ. μειώνεται ο αριθμός των EPCs φαίνονται στην Εικόνα 6.

Οι ασθενείς με Σ.Δ. τύπου 2 βρέθηκε πως έχουν 40% μέση μείωση του αριθμού των EPCs του περιφερικού αίματος. Σε μελέτη ασθενών με Σ.Δ. τύπου 2, όπου χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής για τον προσδιορισμό του αριθμού των κυκλοφορούντων CD34<sup>+</sup> κυττάρων του περιφερικού αίματος (που ορίστηκαν ως CPCs) και των κυττάρων CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> (που ορίστηκαν ως EPCs), βρέθηκαν μειωμένα και τα CPCs και τα EPCs. [134]

Η έλλειψη κυκλοφορούντων αγγειο-αναγεννητικών βλαστικών/προγονικών κυττάρων έχει αποδοθεί σε μια ποικιλία παθολογικών αλλοιώσεων. Οι αλλοιώσεις στο μυελό των οστών των ασθενών με Σ.Δ. επηρεάζουν δυσμενώς την ικανότητα να απελευθερώνουν HSCs και EPCs μετά από ισχαιμία ή μετά διέγερση με αυξητικό παράγοντα λευκών αιμοσφαιρίων-παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF). [170][171] Έρευνες σχετικά με τις αιτίες του μειωμένου αριθμού CD34<sup>+</sup> κυττάρων και EPCs στον Σ.Δ. οδήγησαν πρόσφατα στη διαπίστωση ότι ο Σ.Δ. επηρεάζει έντονα τη δομή και τη λειτουργία του μυελού των οστών. [172] Οι ασθενείς με Σ.Δ. δεν ανταποκρίνονται στις επιδράσεις του G-CSF, με αποτέλεσμα τη μείωση κυττάρων CD34<sup>+</sup> και EPCs, γεγονός το οποίο είναι πιθανό να οφείλεται στην αναδιαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών που ο Σ.Δ. προκαλεί. [173]



Εικόνα 6. Οι μηχανισμοί που οδηγούν στη μείωση του αριθμού των EPCs στο Σ.Δ.

EPCs: endothelial progenitor cells, ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα, HIF 1α: Hypoxia-inducible factor 1α, VEGF: vascular endothelial growth factor, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, SDF-1: stromal cell -derived factor 1, προερχόμενος από κύτταρα του στρώματος παράγοντας -1

Fadini GP, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Significance of Endothelial Progenitor Cells in Subjects With Diabetes. *Diabetes Care* 2007, 30: 1305-1313

### 1.4.3. Διαταραχή λειτουργίας

Τα EPCs των ασθενών με Σ.Δ. εμφανίζουν λειτουργική βλάβη, μειωμένο πολλαπλασιασμό, διαταραχή κινητοποίησης, πρόσφυσης, μετανάστευσης και ενσωμάτωσης στο αγγειακό ενδοθήλιο σε σωληνοειδείς δομές. [97][168]

#### 1.4.3.1. Διαταραχή κινητοποίησης

Η ιστική ισχαιμία θεωρείται το ισχυρότερο ερέθισμα για την κινητοποίηση των EPCs, μέσω της ενεργοποίησης συστημάτων ανίχνευσης υποξίας. Σε κανονικές συνθήκες, η κινητοποίηση ρυθμίζεται από αυξητικούς παράγοντες, όπως οι SDF-1, G-CSF, FGF) και ο VEGF με τη



συμμετοχή μεταλλοπρωτεϊνών στρώματος, όπως MMP-2 και MMP-9, καθεψίνη-G και ελασάση. Στους ασθενείς με Σ.Δ. η κινητοποίηση από το μυελό των οστών μετά από τραυματισμό ή ισχαιμία είναι ελαττωματική, καθώς τα σήματα στρατολόγησης λόγω αγγειακής βλάβης είναι ασθενέστερα, με αποτέλεσμα τη μειωμένη κινητοποίηση των EPCs στην κυκλοφορία. [123]

Μεταξύ των διαφορετικών μηχανισμών, η δυσλειτουργία της eNOS και οι μεταβαλλόμενες κλίσεις συγκέντρωσης κυτοκινών, όπως για παράδειγμα, η διαφορά συγκέντρωσης του παράγοντα SDF-1α μεταξύ του μυελού και των ισχαιμικών ιστών στο σακχαρώδη διαβήτη, μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη βλάβη της κινητοποίησης EPCs. [168]

Ο SDF-1α είναι μια κυτοκίνη που συμβάλλει στην κινητοποίηση των EPCs διεγείροντας τον υποδοχέα χημειοκίνης τύπου 4 (C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4) στην κυτταρική τους μεμβράνη. Η μειωμένη παραγωγή του SDF-1α στον ισχαιμικό ιστό οδηγεί σε κλίση συγκέντρωσης αυτού του χημειοστακτικού παράγοντα προς κινητοποίηση των EPCs από το μυελό στην κυκλοφορία. [174][175][170]

Καθώς η μειωμένη κινητοποίηση των EPCs συνδέθηκε με μειωμένη αυξορρύθμιση παραγόντων όπως ο VEGF και ο SDF-1, η μείωση αυτή οδηγεί τελικά σε ανεπαρκή αντισταθμιστική αγγειογένεση. [174][168]

#### 1.4.3.2. Διαταραχή μετανάστευσης

Η μετανάστευση των EPCs σε σημεία τραυματισμού/ ισχαιμίας μεσολαβείται επίσης από την κλίση συγκέντρωσης του SDF-1α και άλλων χημειοστακτικών παραγόντων, όπως του VEGF και της ερυθροποιητίνης. Κατά συνέπεια, στο Σ.Δ. λόγω μειωμένου NO, αυξημένων αντιδραστικών μορφών οξυγόνου και προϊόντων τελικής γλυκοζυλίωσης, η μετανάστευση διαταράσσεται. [176][177][178]

Η οξειδωμένη LDL (oxLDL) αποτελεί έναν από τους παράγοντες που σχετίζονται με την επιβίωση και την λειτουργία των EPCs και το αυξημένο οξειδωτικό στρες οδηγεί σε υπερβολική παραγωγή oxLDL. [123] Η oxLDL μειώνει τη φωσφορυλίωση του Akt και την έκφραση του eNOS στα EPCs των υγιών ατόμων, όταν όμως εκτεθούν τα EPCs σε υπεργλυκαιμία, η oxLDL μειώνει την έκφραση των CXCR-4 και eNOS, καθώς και την φωσφορυλίωση των eNOS και Akt. Η αλλαγή αυτών των οδών της κυτταρικής σηματοδότησης οδηγεί σε διαταραχή της μετανάστευσης των EPCs. Η μείωση του NO που οφείλεται στην oxLDL και η διαταραχή της βιοχημικής οδού Akt προκαλούν απόπτωση των EPCs συγχρόνως με τη διαταραχή της μετανάστευσης, τη διακοπή της προσκόλλησης και του σχηματισμού σωληνοειδών σχηματισμών.

Οι Chen et al. μελέτησαν in vitro τη λειτουργία των EPCs (acLDL<sup>+</sup>/λεκτίνη<sup>+</sup>) σε ασθενείς με Σ.Δ. τύπου 2 και παρατήρησαν ότι η μεταναστευτική λειτουργία των EPCs ήταν εξασθενημένη, γεγονός που οδήγησε σε μειωμένη νεοαγγειογένεση. [179]

#### 1.4.3.3. Διαταραχή ενσωμάτωσης

Η τοπική απελευθέρωση και συνεπώς η κλίση συγκέντρωσης των κυτοκινών, ειδικά του SDF-1α, παίζουν καθοριστικό ρόλο και στην ενσωμάτωση των EPCs. Η μείωση είτε του SDF-1α είτε του υποδοχέα του CXCR4, εμποδίζει τη μετακίνηση των EPCs σε τραυματισμένα σημεία.

Σε ασθενείς με Σ.Δ., η υπεργλυκαιμία μειώνει την έκκριση των VEGF και SDF-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα μειωμένα επίπεδα αυτών των κυτοκινών μπορεί στη συνέχεια να επηρεάσουν τη ρύθμιση της μετανάστευσης και της επιβίωσης των EPCs. Η εξωγενής χορήγηση SDF-1α ανέτρεψε τη διαταραχή της ενσωμάτωσης των EPCs σε ασθενείς με Σ.Δ. και βελτίωσε τη νεοαγγείωση και την επούλωση πληγών σε μοντέλα ζώων. [175][180][16]

#### 1.4.4. Το οξειδωτικό στρες και η υπεργλυκαιμία ως τα κύρια αίτια διαταραχής του αριθμού και της λειτουργίας των EPCs.

Το οξειδωτικό στρες παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεση των διαβητικών επιπλοκών [181] καθώς και στη διαδικασία της αθηρογένεσης [182]. Η απόπτωση που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες μπορεί να είναι ένας μηχανισμός μείωσης του αριθμού των EPCs στον διαβήτη. Τα κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος εκτίθενται άμεσα στο συστηματικό οξειδωτικό στρες και η μακροχρόνια υπεργλυκαιμία μπορεί να μειώσει τους μηχανισμούς απομάκρυνσης των ROS και να προωθήσει την απόπτωση EPCs, όπως αποδεικνύεται *in vitro*. [166] Τα οιστρογόνα, οι στατίνες και η σωματική άσκηση αυξάνουν τα καλλιεργημένα EPCs αναστέλλοντας την απόπτωση, ενώ τα υψηλά επίπεδα CRP και η υποξία μειώνουν τον αριθμό των EPCs ενισχύοντας την απόπτωση. [183][184]

Η παραγωγή ROS στα EPCs ασθενών με Σ.Δ. είναι επίσης σημαντικά υψηλότερη από εκείνη των EPCs υγιών ατόμων. [123] Στα κυκλοφορούντα PBMCs ασθενών με Σ.Δ. τύπου 2 έχει βρεθεί αυξημένη γονιδιακή έκφραση της οξειδάσης NAD(P)H, [185] η οποία αποτελεί κύρια αγγειακή πηγή ROS. Δεδομένου ότι τα EPCs αποτελούν υποσύνολο των PBMCs συμπεραίνεται ότι το οξειδωτικό στρες μπορεί να μειώνει τα EPCs σε καταστάσεις όπως ο Σ.Δ. [93]

Σε μελέτες έχει δειχθεί ότι ο ενεργοποιητής τρανσκετολάσης βενφοτιαμίνη, η οποία αποκλείει τα βιοχημικά μονοπάτια υποκυτταρικής βλάβης που κινητοποιούνται στο οξειδωτικό στρες, αποκατέστησε ισχαιμικές βλάβες στα οπίσθια άκρα διαβητικών ποντικών με τη μεσολάβηση EPCs και απέτρεψε τη δυσλειτουργία των EPCs λόγω υπεργλυκαιμίας μέσω της τροποποίησης της βιοχημικής οδού Akt. [186]

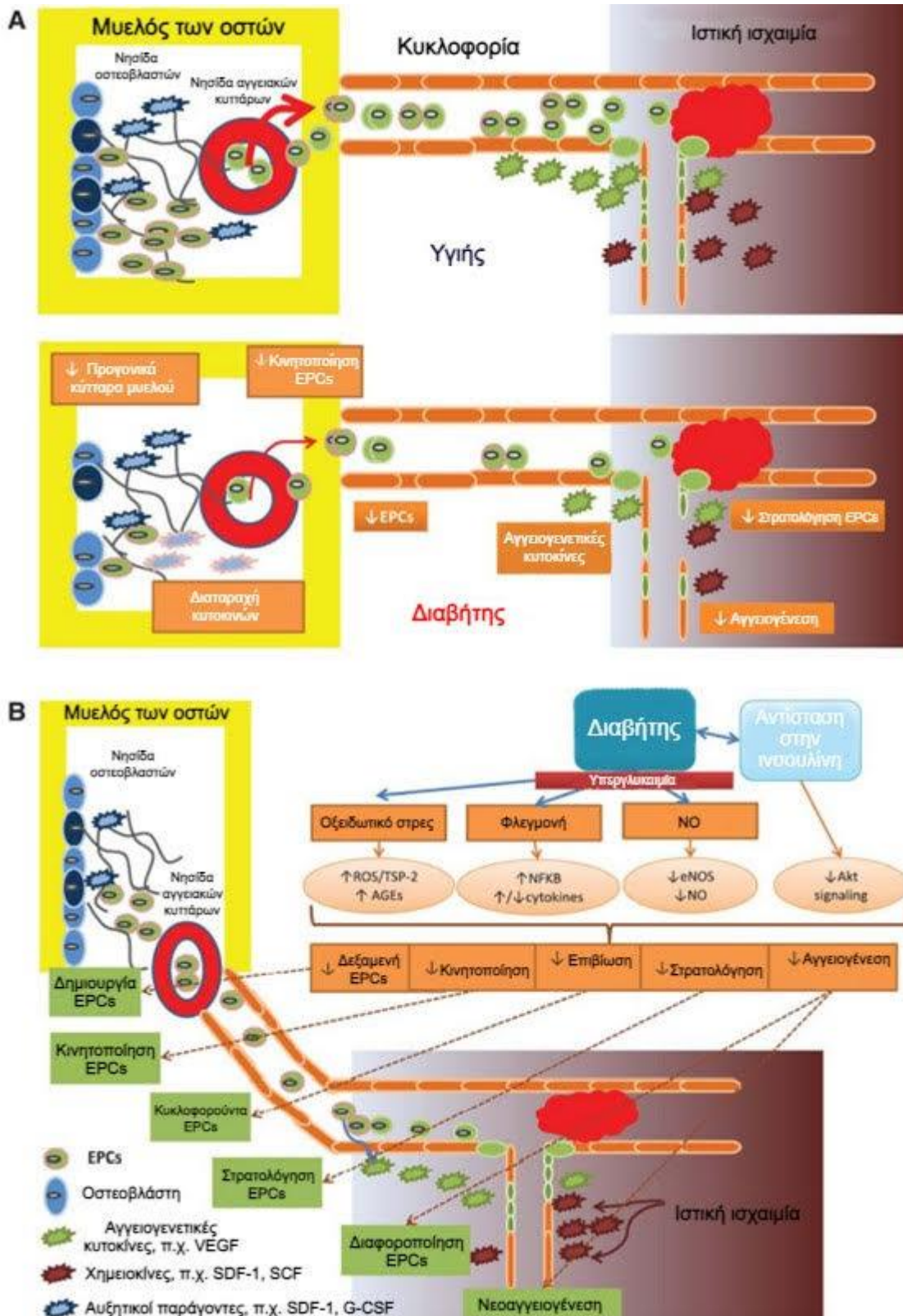
Η υπεργλυκαιμία *in vivo*, είναι εκείνη που προκαλεί το οξειδωτικό στρες αυξάνοντας την παραγωγή ROS και μεταβάλλει τη λειτουργία των λευκοκυττάρων και του ενδοθηλίου. [187]

Στην ενδοθηλιακή αυτή βλάβη του Σ.Δ. μειώνονται τα επίπεδα των κυκλοφορούντων HSCs και των EPCs [156] τα οποία παρουσιάζουν διαταραχή στον πολλαπλασιασμό, προσκόλληση και ενσωμάτωση στις αγγειακές δομές, δηλαδή τροποποίηση της βιολογίας τους λόγω υπεργλυκαιμίας. [188][189][190][96]

Έχει αναφερθεί προηγουμένως ότι η υπεργλυκαιμία ενεργοποιεί πρωτεϊνικές κινάσες και την πρωτεϊνική κινάση-C στα PBMCs *in vivo* και ότι η υψηλή γλυκόζη επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη λειτουργία των καλλιεργημένων EPCs, με ταυτόχρονη μείωση της παραγωγής NO και της δραστηριότητας της MMP-9. [166][191]

Επιπλέον, η μειωμένη έκκριση NO και VEGF, προκαλούν μειωμένη δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης, ενώ μετά από έκθεση σε υπεργλυκαιμικό περιβάλλον ή σε προϊόντα τελικής γλυκοζυλίωσης τα όψιμα EPCs εμφανίζουν διαταραχή της μετανάστευσης και της ενσωμάτωσης σε σωληνοειδείς δομές. [168]

Στην Εικόνα 7 απεικονίζεται ο ρόλος των EPCs στην επιδιόρθωση του ενδοθηλίου σε υγιείς και σε ασθενείς με Σ.Δ., καθώς και οι μηχανισμοί διαταραχής του αριθμού και της λειτουργίας των EPCs στον Σ.Δ.



Εικόνα 7. Α. Λειτουργικός ρόλος EPCs στην επιδιόρθωση του ενδοθηλίου στους υγιείς και στο Σ.Δ. Β. Διαταραχή αριθμού και λειτουργίας EPCs στο Σ.Δ.- Μηχανισμοί

You KH, Tse H-F. Specific Role of Impaired Glucose Metabolism and Diabetes Mellitus in Endothelial Progenitor Cell Characteristics and Function Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014;34:1136-1143

A. Σε ασθενείς με Σ.Δ. ο αριθμός των προγονικών κυττάρων του μυελού μειώνεται και η επιβίωση των κυκλοφορούντων EPCs μειώνεται, με αποτέλεσμα την ελάττωση του αριθμού των κυκλοφορούντων EPCs. Επιπλέον, διαταράσσονται οι λειτουργίες μετανάστευσης και κινητοποίησης στον ισχαιμικό ιστό και η διαταραχή αυτή συμβάλλει στην αδυναμία αγγειακής επιδιόρθωσης και αγγειογένεσης.

B. Πιθανοί μηχανισμοί διαταραχής του αριθμού και της λειτουργίας των EPCs στο Σ.Δ. που προκαλούνται από την υπεργλυκαιμία και την αντίσταση στην ινσουλίνη. Πολλαπλοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί, όπως αλλαγές σε δείκτες φλεγμονής, το οξειδωτικό στρες ( $\uparrow$ ROS και  $\uparrow$ AGEs), μείωση eNOS και NO, και αλλαγές στη βιοχημική οδό Akt) επιδρούν στα EPCs σε διάφορα στάδια: διαφοροποίηση, κινητοποίηση, μετανάστευση, ενσωμάτωση και νεοαγγειογένεση.

**G-CSF:** granulocyte colony-stimulating factor, **SCF:** stem cell factor, **SDF-1:** stromal-derived factor 1, **VEGF:** vascular endothelial growth factor, **ROS:** reactive oxygen species, δραστικές μορφές οξυγόνου, **AGEs:** Advanced glycation end-products, τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης **eNOS:** ενδοθηλιακή συνθετάση νιτρικού οξειδίου, **NO:** μονοξείδιο του αζώτου

#### 1.4.5. Τα EPCs στις διαβητικές επιπλοκές

##### 1.4.5.1. Γενικά

Τα EPCs υφίστανται μεταβολές σε όλες τις διαβητικές επιπλοκές και η διαταραχή τους αυτή ενοχοποιείται ως ένας από τους κύριους κοινούς παθογόνους μηχανισμούς των επιπλοκών. Ο χαμηλός αριθμός προγονικών κυττάρων αποτελεί προγνωστικό δείκτη για εμφάνιση καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια ή μεταβολικό σύνδρομο [4], και στο Σ.Δ. τύπου 2.

Η μείωση της δεξαμενής των κυκλοφορούντων CD34<sup>+</sup> κυττάρων συμβαίνει σε πρώιμο στάδιο της φυσικής ιστορίας του Σ.Δ. τύπου 2 και παρουσιάζεται και σε άτομα με διαταραγμένη ανοχή γλυκόζης. [192] Η εξάντληση των προγονικών κυττάρων επιμένει με την πάροδο του χρόνου και είναι μεγαλύτερη σε ασθενείς με προχωρημένες επιπλοκές. Πράγματι, τα επίπεδα των CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κυττάρων συσχετίζονται αρνητικά με το βαθμό των περιφερικών αγγειακών επιπλοκών στον ΣΔ τύπου 2. [173]

Στους ασθενείς στους οποίους οι τιμές των CD133<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κυττάρων ήταν χαμηλότερες της μέσης τιμής, η πιθανότητα επιδείνωσης της μικροαγγειοπάθειας ήταν μεγαλύτερη σε σύγκριση με τους ασθενείς με υψηλά επίπεδα κυττάρων. [193]

Οι Fadini και συν. [150] έδειξαν ότι ο αριθμός των EPCs που περιγράφονται ως CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> είναι σημαντικά μειωμένος σε ασθενείς με ΣΔ και περιφερική αγγειακή νόσο σε σύγκριση με ασθενείς με ΣΔ χωρίς επιπλοκές.

Επιπλέον, οι Nowak και συν. [194] μέτρησαν προγονικά κύτταρα σε ασθενείς με διαβήτη με και χωρίς επιπλοκές όπου εδείχθη ότι σε ασθενείς με Σ.Δ. τύπου 2 ο αριθμός των κυκλοφορούντων προγονικών κυττάρων (CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>) ήταν μειωμένος σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, αλλά σε ασθενείς με διαβητικό πόδι ο αριθμός τους θα μπορούσε να αυξηθεί, ειδικά σε περίπτωση ενεργού μόλυνσης. [110]

Οι ασθενείς με ΣΔ με περιφερικές αγγειακές επιπλοκές έχουν μείωση όλων των κυκλοφορούντων προγονικών κυττάρων. Η πτώση των προγονικών κυττάρων συσχετίστηκε μάλιστα γραμμικά με τη σοβαρότητα των διαβητικών επιπλοκών. [169]

#### 1.4.5.2. EPCs και μακροαγγειακή νόσος

Τα EPCs, τα CACs και τα προγονικά κύτταρα των λείων μυών (skeletal muscle progenitor cells, SMPCs) συμμετέχουν στην παθογένεση της μακροαγγειακής νόσου. Η αναλογία μεταξύ EPCs και SMPCs διαταράσσεται στον ΣΔ τύπου 2, όπου υπερέχουν τα SMPCs. Αυτό μπορεί να μεταφραστεί ως μειωμένη ικανότητα αγγειακής επιδιόρθωσης, προάγοντας έτσι την εμφάνιση των μακροαγγειακών επιπλοκών. [195]

Η μείωση των κυκλοφορούντων EPCs είναι χαρακτηριστικό εύρημα στις καρδιαγγειακές παθήσεις. Μια προοδευτική μείωση των EPCs συμβαίνει παράλληλα με την αύξηση της βαρύτητας των περιφερικών αγγειακών επιπλοκών σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2. [150][134] Τα επίπεδα των κυττάρων CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> συσχετίζονται αρνητικά με τον κνημοβραχιόνιο δείκτη (ankle brachial index, ABI) [134], και με τον μέγιστο βαθμό στένωσης των καρωτίδων. [150]

Η διαταραχή της λειτουργίας του μυοκαρδίου σε ασθενείς με Σ.Δ. τύπου 2 βρέθηκε ότι σχετίζεται με την εξάντληση των EPCs και το αυξημένο οξειδωτικό στρες, [196] αλλά και λειτουργικές αλλοιώσεις παρουσιάζονται σε EPCs που απομονώνονται από ασθενείς με στεφανιαία νόσο ή ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια. [197][198]

#### 1.4.5.3. EPCs και μικροαγγειακές επιπλοκές

##### Νεφροπάθεια

Η χρόνια νεφρική νόσος (XNN) αντιπροσωπεύει μια παθολογική κατάσταση στην οποία ο αριθμός EPCs είναι μειωμένος σε σύγκριση με αυτόν των υγιών. Αυτή η μείωση σχετίζεται σημαντικά με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο τόσο σε ασθενείς προ αιμοκάθαρσης όσο και σε αιμοκαθαιρούμενους. [199]

Οι αριθμοί των EPCs έχει αναφερθεί ότι είναι χαμηλότεροι σε ασθενείς με XNN. Μειωμένοι αριθμοί EPCs στη XNN μπορεί να προκληθούν από μειωμένη κινητοποίηση των EPCs από το μυελό των οστών, εξάντληση EPCs λόγω αυξημένης ζήτησης, ή δέσμευση των EPCs στους νεφρούς. Μελέτες in vitro έδειξαν ότι ο ουραιμικός ορός επιφέρει δυσλειτουργία των EPCs και διαταραχή της διαφοροποίησης των μονοπυρηνικών κυττάρων σε EPCs, πιθανώς λόγω αύξησης του θειικού ινδοξυλίου (IS), το οποίο βρέθηκε ότι έχει τοξική επίδραση στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και στα νεφρικά σωληνάκια. Στη μελέτη των Lin et al. [200], το IS ανέστειλε το σχηματισμό αποικίας και τις λειτουργίες των EPCs με δοσοεξαρτώμενο τρόπο σε ασθενείς με XNN. [201]

Έχει αποδειχθεί ότι η XNN σχετίζεται με μείωση του αριθμού και δυσλειτουργία των κυκλοφορούντων και καλλιεργημένων EPCs. Σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 και χαμηλά κυκλοφορούντα CD34<sup>+</sup> κύτταρα βρέθηκε πως τα ποσοστά απέκκρισης λευκωματίνης στα ούρα ήταν υψηλότερα, ενώ συγχρόνως εμφάνιζαν τάση επιδείνωσης της νεφρικής λειτουργίας με την πάροδο του χρόνου, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι η διαταραχή της βιολογίας των προγονικών κυττάρων μπορεί να αλλάξει την ομοιόσταση του ενδοθηλίου του σπειράματος και να προαγάγει την εξέλιξη της αρχικής νεφροπάθειας. [202]

Τα CD34<sup>+</sup> κύτταρα και τα EPCs έχουν βρεθεί σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με ΣΔ με εμφάνιση/εξέλιξη μικρολευκωματινουρίας και άλλης μικροαγγειοπάθειας. [193] Οι ασθενείς με χαμηλό αριθμό CD34<sup>+</sup> κυττάρων είχαν υψηλότερη πιθανότητα εμφάνισης ΧΝΝ και οποιασδήποτε μικροαγγειοπάθειας σε σύγκριση με εκείνους με υψηλό αριθμό CD34<sup>+</sup> κυττάρων, ενώ η συσχέτιση μειωμένου αριθμού CD34<sup>+</sup> κυττάρων με το ρυθμό εξέλιξης της αμφιβληστροειδοπάθειας και νευροπάθειας δεν επιβεβαιώθηκε στη στατιστική ανάλυση. [193]

Ωστόσο, κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των EPCs σε ασθενείς με ΧΝΝ, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη διάφορες παράμετροι οι οποίες ενδεχομένως επηρεάζουν το αποτέλεσμα, όπως η αιμοκάθαρση που μπορεί να επηρεάσει τον αριθμό και τη λειτουργία των EPCs καθώς αφαιρούνται οι ουραιμικές τοξίνες, οι οποίες είναι επιβλαβείς στη βιολογία των EPCs. Επομένως υπάρχει θετική συσχέτιση της αιμοκάθαρσης με τη λειτουργία των EPCs. [149]

### Αμφιβληστροειδοπάθεια

Η σύνδεση ανάμεσα στη Δ.Α. και την παθοφυσιολογία των EPCs ανήκει στο ονομαζόμενο «διαβητικό παράδοξο», σύμφωνα με το οποίο οι ασθενείς με ΣΔ, οι οποίοι έχουν πτωχή αγγειακή αποκατάσταση και επανενδοθηλιοποίηση των αγγείων τους σε ισχαιμικές καταστάσεις, παρουσιάζουν αυξημένη νεοαγγείωση του αμφιβληστροειδούς η οποία οδηγεί σε Δ.Α. [203] Έχει αποδειχθεί ότι στη νεοαγγείωση του αμφιβληστροειδούς συμμετέχουν κύτταρα που προέρχονται από μυελό των οστών με λειτουργική δραστηριότητα βλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων. Επιπλέον, ο VEGF, που είναι γνωστό ότι έχει ισχυρή διεγερτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των EPCs και στην αγγειογένεση, είναι σημαντικά αυξημένος στο οφθαλμικό υγρό των ασθενών με ΣΔ, ενώ μειώνεται στους ισχαιμικούς μη αμφιβληστροειδικούς ιστούς. [93][204]

Έχει παρατηρηθεί, επίσης, ένα διφασικό μοτίβο εξέλιξης στην αλλαγή των EPCs: στη μη παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια παρατηρείται μειωμένος αριθμός EPCs, αλλά αυξημένος αριθμός EPCs σε ασθενείς με διαβητική παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια. [205][206] Η προαγγειογενετική δραστηριότητα του αυξανόμενου αριθμού των δυσλειτουργικών EPCs μπορεί να συμβάλλει στην παθολογική νεοαγγείωση του αμφιβληστροειδούς σε προχωρημένη Δ.Α. [168]

Διάφορες μελέτες σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 διερεύνησαν τον πιθανό ρόλο των προγονικών κυττάρων που προέρχονται από μυελό των οστών στη ΔΠΑ σε σύγκριση με τη μη-παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια.

- Οι Lee και συν. [207] μέτρησαν τα CD117<sup>+</sup> και CD34<sup>+</sup> κύτταρα του περιφερικού αίματος με κυτταρομετρία ροής. Ήταν οι πρώτοι που έδειξαν ότι τα κύτταρα CD34<sup>+</sup> μπορεί να είναι αυξημένα σε ασθενείς με παραγωγική και μη-παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια σε σύγκριση με ασθενείς με ΣΔ χωρίς αμφιβληστροειδοπάθεια.
- Παρατηρήσεις έχουν γίνει από τους Fadini και συν., [208] που διερεύνησαν EPCs σε ασθενείς με Σ.Δ. τύπου 2 με και χωρίς Δ.Α. και με και χωρίς περιφερική αρτηριακή αποφρακτική νόσο. Ομοίως, τα EPCs αυξήθηκαν σε Δ.Α. αλλά μειώθηκαν στην

αρτηριακή αποφρακτική νόσο, υποστηρίζοντας έτσι τη συμμετοχή προγονικών κυττάρων και στις δύο ασθένειες, σε ασθενείς με Σ.Δ. 2. [205]

- Ο Liu και συν. εξέτασαν ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 και Δ.Α. (σοβαρή μη παραγωγική και παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια), διαβητικούς τύπου 2 με περιφερική αρτηριακή νόσο και υγιείς εθελοντές αντίστοιχης ηλικίας και φύλου και διαπίστωσαν αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων EPCs σε ασθενείς με Δ.Α. σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. [44]

### Περιφερική Νευροπάθεια

Τα στοιχεία που υπάρχουν σχετικά με τις μεταβολές των προγονικών κυττάρων στο πλαίσιο της διαβητικής νευροπάθειας είναι πολύ λίγα.

Τα EPCs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοίωση των τροφικών αγγείων των νεύρων (vasa nervorum), καθώς ελαττωματικοί μηχανισμοί στην επιδιόρθωση του ενδοθηλίου και στη νεοαγγειογένεση συμβάλλουν στην ισχαιμία του νευρικού ιστού [209][69][210][99]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα EPCs κινητοποιούνται από το μυελό των οστών στο σημείο της βλάβης, όπου παράγουν διάφορους αγγειογενετικούς και νευροτροφικούς παράγοντες ή διαφοροποιούνται σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα και συντονίζουν την επανενδοθηλιοποίηση και τη νεοαγγειογένεση. [211]

Η Δ.Ν. χαρακτηρίζεται από διαταραχή της μικροκυκλοφορίας στα περιφερικά νεύρα καθώς η υπεργλυκαιμία προκαλεί βλάβη των τροφικών αγγείων των νεύρων (vasa nervorum), ενώ παράλληλα η ανεπάρκεια νευροτροφικών παραγόντων θεωρείται παθοφυσιολογικός μηχανισμός που οδηγεί σε ανάπτυξη Δ.Ν.

Έτσι, η χορήγηση αγγειογενετικών παραγόντων, όπως ο VEGF, θα μπορούσε να αποκαταστήσει εν μέρει τη νευρική λειτουργία αυξάνοντας την αγγειογένεση. Η χορήγηση νευροτροφικών παραγόντων, όπως ο παράγοντας ανάπτυξης των νεύρων (nerve growth factor, NGF), ο IGF1 και IGF2, ο ακτινωτός νευροτροφικός παράγοντας (Ciliary Neurotrophic Factor, CNTF), ή ο νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από τη γλοιακή κυτταρική σειρά (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) αποδείχθηκε ότι βελτιώνουν την ΠΝ σε ζωικά μοντέλα. [69]

Σε αυτή τη βάση, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν πληθυσμό κυττάρων εμπλουτισμένο με EPCs για να ανακουφίσουν τα σημεία πειραματικής Δ.Ν. [4][78][212]

Για παράδειγμα, οι Naruse et al. [213] χρησιμοποίησαν EPCs προερχόμενα από ανθρώπινο ομφάλιο αίμα για να διεγείρουν την ανασύσταση της αγγειακής λειτουργίας των νεύρων σε διαβητικούς αρουραίους. Παράλληλα με την αποκατάσταση της πυκνότητας των τριχοειδών των νεύρων, διαπίστωσαν ότι τα EPCs ήταν σε θέση να βελτιώσουν την ταχύτητα αγωγιμότητας στα ισχιακά νεύρα. Οι ταχύτητες αγωγιμότητας των κινητικών και αισθητηριακών νεύρων, η ροή του αίματος και η τριχοειδική πυκνότητα επανήλθαν στα φυσιολογικά επίπεδα μετά από ένεση EPCs προερχόμενων από μυελό των οστών, στα οπίσθια άκρα διαβητικών ποντικών. [168]

Είναι ενδιαφέρον ότι ο μεγαλύτερος αριθμός των EPCs που ενίνονται κατευθύνονται προς τα vasa nervorum και ενσωματώνονται, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Schwann και των εντοπίων ενδοθηλιακών κυττάρων, και μειώνοντας την απόπτωση των



ενδοθηλιακών κύτταρων, καθώς αυξάνονται πολλαπλοί αγγειογόνοι, αντιαποπτωτικοί και νευροτροφικοί παράγοντες. [168][212]

## 1.5. Παράγοντες που επηρεάζουν τα EPCs.

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν τα επίπεδα των EPCs, όπως η ηλικία, το φύλο, ο τρόπος ζωής, η φυσική δραστηριότητα, το κάπνισμα, οι επιδράσεις ορμονών, καθώς και διάφορα φάρμακα. [214][215][216][217]

### 1.5.1. Ηλικία

Με την αύξηση της ηλικίας η μεταναστευτική ικανότητα των EPCs υπό την καθοδήγηση των VEGF και SDF-1a μειώνεται σημαντικά. Παράλληλα, η χημειοτακτική τους απόκριση σε ερεθίσματα, η οποία συσχετίζεται σημαντικά με δομικές αλλοιώσεις της θεικής ηπαράνης της επιφάνειας τους που οφείλονται στην γήρανση, είναι μειωμένη, με αποτέλεσμα να μειώνεται και η μεταναστευτική τους ικανότητα. [155]

### 1.5.2. Τρόπος ζωής - Lifestyle

Αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες, μόνες ή σε συνδυασμό με τακτική φυσική δραστηριότητα, είναι δυνατό να επηρεάσουν τον αριθμό των κυκλοφορούντων EPCs. Η μείωση των επιπέδων της LDL χοληστερόλης σε ασθενείς που ακολούθησαν δίαιτα ή συνδυασμό δίαιτας και άσκησης οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των EPCs. Οι oxLDL επηρεάζουν τη διαφοροποίηση των EPCs εντείνοντας τη γήρανση τους, και καθώς η υπερχοληστερολαιμία σχετίζεται με αυξημένη υπεροξειδωση των λιπιδίων, εικάζεται ότι η μείωση του οξειδωτικού στρες μετά από τη μη φαρμακολογική διόρθωσή της θα μπορούσε να παίζει ρόλο στην παρατηρούμενη αύξηση του αριθμού των EPCs. [218]

Έχει αποδειχθεί ότι η σωματική άσκηση επηρεάζει τον αριθμό των EPCs, αφενός μειώνοντας το αγγειακό οξειδωτικό στρες μέσω της υπερρύθμισης των αντιοξειδωτικών ενζύμων και της eNOS και αφετέρου ενισχύοντας την τοπική αγγειογένεση. [219] Παράγοντες τρόπου ζωής, όπως η άσκηση, η σωματική δραστηριότητα, η παχυσαρκία και η διαιτητική πρόσληψη ωμέγα-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και αντιοξειδωτικών, επηρεάζουν σημαντικά τον αριθμό και τη λειτουργία των EPCs. [220]

Μετά από μια περίοδο μέγιστης άσκησης, ο αριθμός των κυκλοφορούντων CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κυττάρων αυξάνεται τόσο σε υγιή άτομα όσο και σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο. [221][222][223][220][224] Η επίδραση αυτή έχει παρατηρηθεί σε υγιή άτομα μέχρι και 24 ώρες μετά την άσκηση και οι αριθμοί των CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κυττάρων επανέρχονται στην αρχική τους τιμή μετά από 48 ώρες. Επομένως, θα πρέπει να ζητείται από τους ασθενείς να μην ασκούν έντονη σωματική δραστηριότητα τουλάχιστον 24 ώρες πριν από την αιμοληψία για τον προσδιορισμό των EPCs. [149]

Οι Muller-Ehmsen και συν. επιβεβαίωσαν ότι ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ) και η περίμετρος της μέσης σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με πολλούς φαινοτύπους προγονικών κυττάρων, όπως τα CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>, και CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κύτταρα. Μετά από 6-μηνο πρόγραμμα δίαιτας και άσκησης παρατηρήθηκε αύξηση των κυττάρων CD34<sup>+</sup> και CD34<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>, η οποία συσχετίστηκε με μείωση του ΔΜΣ και του πάχους του μέσου-έσω χιτώνα. [225]

Συγκεκριμένες δίαιτες και διάφορα συστατικά της διατροφής θα μπορούσαν να επηρεάσουν τον αριθμό των EPCs. Τα φλαβονοειδή του κακάο, για παράδειγμα, μειώνουν σημαντικά τον κίνδυνο καρδιομεταβολικών διαταραχών. Στους πιθανούς μηχανισμούς της μείωσης αυτού του κινδύνου μετά από χρόνια κατανάλωση περιλαμβάνεται η απελευθέρωση EPCs. Το κόκκινο κρασί και το πράσινο τσάι είναι γνωστά για τις ευεργετικές τους επιδράσεις στην ενδοθηλιακή λειτουργία, η οποία σχετίζεται με την ταχεία αύξηση των επιπέδων των EPCs. [226][227][228][229]

Ερευνητές έχουν καταδείξει επιβλαβή επίδραση τόσο του ενεργού όσο και του παθητικού καπνίσματος στους αριθμούς των CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κυττάρων. Συνεπώς, συνιστάται στους ασθενείς να διακόπτουν το κάπνισμα 6 ώρες πριν από την αιμοληψία για τον προσδιορισμό των EPCs. [149]

### 1.5.3. Φάρμακα

#### 1.5.3.1. Στατίνες

Οι στατίνες είναι από τα πρώτα φάρμακα που έδειξαν ευεργετική επίδραση στα EPCs. Φαίνεται ότι αυξάνουν τον αριθμό και ενισχύουν τη λειτουργία των κυκλοφορούντων EPCs αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα του NO και μειώνοντας το οξειδωτικό στρες και την απόπτωση τους. [230][168] Επιπλέον, οι στατίνες ευοδώνουν την κινητοποίηση των EPCs από το μυελό των οστών. [231][232] Στα ποντίκια, η ικανότητα των στατινών να κινητοποιούν EPCs από το μυελό εξαρτάται από την παραγωγή NO. Παράλληλα, αυξάνουν την ενσωμάτωση των EPCs σε εστίες νεοαγγείωσης του κερατοειδούς, ενώ διεγείρουν τη νεοαγγείωση και βελτιώνουν τη λειτουργία της αριστερής κοιλίας σε ποντικούς μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου. [231][233]

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση των στατινών στον αριθμό των EPCs, οι Schmidt-Lucke και συν. χορηγήσαν 40 mg ατορβαστατίνης για 4 εβδομάδες σε 10 ασθενείς με στεφανιαία νόσο που δεν είχαν λάβει στο παρελθόν αγωγή με στατίνη. Η θεραπεία αύξησε σημαντικά τον αριθμό των CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, ενώ τα κύτταρα CD45<sup>bright</sup>/CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> παρέμειναν αμετάβλητα. [230]

Οι Dimmeler et al. έδειξαν ότι οι στατίνες ενισχύουν σημαντικά την διαφοροποίηση των πρώιμων EPCs από τα μονοπύρρηνα κύτταρα και τα CD34<sup>+</sup> κύτταρα [232]. Θεραπεία 4 εβδομάδων με σιμβαστατίνη αύξησε τα κυκλοφορούντα EPCs σε ποντίκια και ο εμπλουτισμός του μέσου καλλιέργειας με στατίνη αύξησε τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία τους, ενώ μείωσε τη γήρανση τους μέσω της ρύθμισης πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου δια της ενδοκυττάριας οδού σηματοδότησης φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης 3-κινάσης (Phosphoinositide 3-kinase, PI3-K). [93]

In vitro, η επίδραση των στατινών είναι δόσοεξαρτώμενη. Σε υψηλές συγκεντρώσεις οι στατίνες εκδηλώνουν αντι-πολλαπλασιαστική δράση στα EPCs, όπως και σε άλλους τύπους κυττάρων, καθώς και αναστολή της αγγειογένεσης.

### 1.5.3.2. Φάρμακα που δρουν στο σύστημα ρενίνης – αγγειοτενσίνης – αλδοστερόνης

Η υπερ-δραστηριότητα του άξονα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης φαίνεται ότι έχει αρνητική επίδραση στη βιολογία των EPCs, [234] καθώς η υπερπλασία των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων, η πρόκληση φλεγμονωδών σημάτων και το οξειδωτικό στρες λαμβάνουν χώρα υπό την επίδραση της αγγειοτασίνης-II και της αλδοστερόνης.

Ο αποκλεισμός του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης με αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης ή αναστολείς υποδοχέων της αγγειοτενσίνης έχει επίσης αποδειχθεί ότι αυξάνει τον αριθμό των EPCs σε ασθενείς με Σ.Δ., πιθανώς μέσω αντιφλεγμονώδων και αντιοξειδωτικών δράσεων λόγω της καταστολής της αγγειοτενσίνης II. [235][236][237] Οι αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης επιτυγχάνουν την ενίσχυση διαδικασιών που σχετίζονται με τα EPCs, όπως η νεοαγγειογένεση.

Επιπλέον, ένας συνδυασμός στατίνης και αναστολέα υποδοχέων αγγειοτασίνης φαίνεται να έχει συνεργικό αποτέλεσμα στην αύξηση του αριθμού και της λειτουργίας των EPCs στο Σ.Δ. [168]

Ο αποκλεισμός των υποδοχέων αγγειοτασίνης με ολμεσαρτάνη 40mg για 12 εβδομάδες αύξησε τα κυκλοφορούντα CD34<sup>+</sup> κύτταρα και τα πρώιμα EPCs σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2.

Σε άλλη μελέτη, τα CD14<sup>+</sup>/CD309<sup>+</sup> κύτταρα αυξήθηκαν σημαντικά σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με υψηλές δόσεις βαλσαρτάνης. [238]

### 1.5.3.3. Οιστρογόνα

Ένας μεγάλος αριθμός δεδομένων δείχνει ότι ορισμένοι μεταβολίτες της οιστραδιόλης, προκαλούν πολλαπλές επιδράσεις στην καρδιαγγειακή και νεφρική λειτουργία, οι οποίες είναι σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητες από τους υποδοχείς οιστρογόνων [93]

Οι Strehlow και συν. έδειξαν σε ποντίκια που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή, ότι η έλλειψη οιστρογόνων μείωσε σημαντικά τα κυκλοφορούντα EPCs του περιφερικού αίματος και του μυελού, ενώ η μείωση αυτή απετράπη πλήρως με θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης με οιστρογόνα.[93][122] Απέφεραν επίσης ότι γυναίκες με αυξημένες συγκεντρώσεις οιστρογόνων στο πλάσμα εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων EPCs.

### 1.5.3.4. Αντιδιαβητική αγωγή

#### Μετφορμίνη

Ο αριθμός των κυκλοφορούντων EPCs αυξήθηκε σημαντικά σε διαβητικούς ποντικούς που έλαβαν μετφορμίνη. Οι ικανότητες σχηματισμού σωληνωδών σχηματισμών και μετανάστευσης ήταν μειωμένες στα EPCs του μυελού σε διαβητικούς ποντικούς, ενώ βελτιώθηκαν με μετφορμίνη. Παράλληλα, επιταχύνθηκε η επούλωση τραυμάτων και αυξήθηκε η αγγειογένεση. Επιπλέον, η έκφραση τόσο της φωσφορυλιωμένης AMPK (ενεργοποιημένης με AMP πρωτεϊνικής κινάσης), της φωσφορυλιωμένης-eNOS και η παραγωγή NO αυξήθηκαν σημαντικά μετά τη χορήγηση μετφορμίνης. [239]

Η μετφορμίνη βελτίωσε τον γλυκαιμικό έλεγχο και αύξησε τον αριθμό των EPCs σε ασθενείς με Σ.Δ. τύπου 2. Ωστόσο, η προσθήκη σουλφονουλουρίας (γλικλαζίδης) στη μετφορμίνη είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη αύξηση των κυκλοφορούντων EPCs σε ασθενείς με Σ.Δ. τύπου 2

σε σύγκριση με τη μετφορμίνη ως μονοθεραπεία, παρά το γεγονός ότι ο γλυκαιμικός έλεγχος ήταν παρόμοιος στις δύο περιπτώσεις. [168][240]

Σε άλλη μελέτη, η θεραπεία με μετφορμίνη επιτάχυνε την επούλωση των τραυμάτων, βελτίωσε την αγγειογένεση και επέφερε αύξηση του αριθμού των κυκλοφορούντων EPCs σε ποντίκια db/db. In vitro, θεραπεία με μετφορμίνη ανέτρεψε τη διαταραχή της λειτουργίας των EPCs που προέρχονται από το μυελό, με αύξηση του σχηματισμού σωληνοειδών σχηματισμών, και σημαντικά αυξημένη παραγωγή NO. [220]

### GLP-1 αγωνιστές και DPP-4 αναστολείς

Πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι οι GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) αγωνιστές, οι αγωνιστές παρόμοιοι με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου-1 και ο αναστολέας διπεπτιδυλο-πεπτιδάσης-4, DPP-4i (Dipeptidyl-Peptidase – 4 inhibitor,) σιταγλιπτίνη βελτιώνουν τη λειτουργία των EPCs στο Σ.Δ. Η σιταγλιπτίνη αυξάνει τα κυκλοφορούντα EPCs σε ασθενείς με Σ.Δ. τύπου 2 μέσω υπερρύθμισης του SDF-1α. Είναι ενδιαφέρον ότι σε ασθενείς με Σ.Δ. τύπου 2, ο αναστολέας DPP-4 αύξησε τα επίπεδα του SDF-1α στο πλάσμα μειώνοντας τη διάσπασή του από τη δραστηριότητα του ενζύμου DPP4 - το οποίο απενεργοποιεί τον SDF-1 και έτσι ενίσχυσε την κινητοποίηση των EPCs από το μυελό. [241]

Οι ασθενείς που λάμβαναν σιταγλιπτίνη μετά από 4 εβδομάδες έδειξαν σημαντική αύξηση των EPCs και του SDF-1α καθώς και μείωση της χημειοελκυστικής πρωτεΐνης μονοκυττάρων-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) σε σύγκριση με τα άτομα της ομάδας ελέγχου. [242][243]

Η λιναγλιπτίνη, σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο, βελτίωσε τη λειτουργία και τον αριθμό των ενδοθηλιακών προγονικών CD34<sup>+</sup> κύτταρων σε άτομα με Σ.Δ. τύπου 2 με χρόνια νεφρική νόσο που λάμβαναν μετφορμίνη και/ή ινσουλίνη σε μια τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική μελέτη.

### Πιογλιταζόνη

Η πιογλιταζόνη αύξησε τη βιωσιμότητα των πρώιμων και όψιμων EPCs, βελτιώνοντας την ικανότητα αμφοτέρων να σχηματίζουν σωληνοειδείς δομές. Επίσης, η πιογλιταζόνη μείωσε την έκφραση μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1 σε πρώιμα και όψιμα EPCs, καθώς και την έκφραση του γονιδίου και της πρωτεΐνης του TNFα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. [244]

Άλλη μελέτη έδειξε ότι η θεραπεία με πιογλιταζόνη αύξησε τα κυκλοφορούντα CD34<sup>+</sup> κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι αυτή η επίδραση μπορεί να συμβάλλει τουλάχιστον εν μέρει στην αντι-αθηροσκληρωτική δράση της πιογλιταζόνης. [245]

Η πιογλιταζόνη αύξησε σημαντικά τον αριθμό και βελτίωσε τη λειτουργία των EPCs σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 μέσω άμεσης επίδρασης και/ή αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων και τροποποίησης των λιπιδίων. Ο αριθμός και η λειτουργική δραστηριότητα των EPCs προσδιορίστηκαν πριν και μετά τη θεραπεία με πιογλιταζόνη (8 εβδομάδες) ως πρόσθετη θεραπεία στη μετφορμίνη. [246]

### SGLT-2 αναστολείς

Η χαμηλή δόση καναγλιφλοζίνης βρέθηκε πως έχει ευεργετική επίδραση στη λειτουργία των CD34<sup>+</sup> κυττάρων στον Σ.Δ. τύπου 2. Σημαντική έκφραση του υποδοχέα CXCR4 με συνακόλουθη αύξηση της μεταναστευτικής λειτουργίας των CD34<sup>+</sup> κυττάρων παρατηρήθηκε στην ομάδα που έλαβε καναγλιφλοζίνη σε σύγκριση με την ομάδα του εικονικού φαρμάκου. Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων CD34<sup>+</sup> έδειξε αύξηση της έκφρασης αντιοξειδωτικών, όπως υπεροξειδίου δισμουτάση 2 (Superoxide dismutase 2, SOD2), καταλάση και γλουταθειόνη υπεροξειδάση) και ενδοθηλιακών δεικτών [PECAM1, VEGF-A και ισομορφή 3 της eNOS (NOS3)]. [247]

Τα CSCs παρέμειναν σταθερά με την πάροδο του χρόνου, ενώ τα EPCs αυξήθηκαν σημαντικά σε ασθενείς που έλαβαν δαπαγλιφλοζίνη σε μια τυχαίοποιημένη δοκιμή δαπαγλιφλοζίνης έναντι εικονικού φαρμάκου. [248]

### Ερυθροποιητίνη

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα EPCs μειώνονται κατά πολύ στη ΧΝΝ μια κατάσταση που είναι πολύ συχνή σε ασθενείς με Σ.Δ.

Είναι ενδιαφέρον ότι βρέθηκε άμεση συσχέτιση μεταξύ του αιματοκρίτη και του επιπέδου των κυκλοφορούντων EPCs, υποδηλώνοντας ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα EPCs ενδεχομένως συν-ρυθμίζονται από την ερυθροποιητίνη. Θεραπεία με δαρβεποετίνη ενίσχυσε τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των EPCs σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια. [249]

Η ερυθροποιητίνη αύξησε σημαντικά την κινητοποίηση των κυκλοφορούντων EPCs σε πειραματικά μοντέλα και αύξησε την κινητοποίηση των κυκλοφορούντων CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> κυττάρων περιφερικού αίματος σε ανθρώπους. [250] Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η ερυθροποιητίνη συμβάλλει καθοριστικά στην κινητοποίηση των EPCs και προκαλεί βελτίωση της κινητοποίησης εφάμιλλη του VEGF. [122]

### Ινσουλίνη

Η υπεργλυκαιμία έχει φανεί πως είναι επιζήμια για τη βιολογία των EPCs τόσο in vitro [251] όσο και in vivo. [252] Η ανθρώπινη ινσουλίνη έχει αναγνωρισθεί ως ένας παράγοντας που ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των κυκλοφορούντων EPCs από PBMCs μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα IGF-1. [253][254] Η in vitro χορήγηση ινσουλίνης μπόρεσε να αυξήσει τον αριθμό των καλλιεργημένων EPCs.

In vivo, αποδείχθηκε ότι η ινσουλίνη βελτιώνει την επανενδοθηλιοποίηση μετά από τραυματισμό των αρτηριών, μέσω της αναστολής της μετανάστευσης των κυττάρων και ενισχύοντας τη λειτουργία των EPCs. [255]

Οι Humpert και συν. έδειξαν ότι η θεραπεία με ινσουλίνη σε διαβητικούς ασθενείς με Σ.Δ. και πτωχή γλυκαιμική ρύθμιση ακολουθήθηκε από αύξηση του επιπέδου των CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> κυττάρων. Μια αλλαγή στην έκφραση SDF-1 στον γονότυπο SDF1-3A/G θα μπορούσε έτσι να ενισχύσει την κινητοποίηση των προγονικών κυττάρων μετά από θεραπεία με ινσουλίνη. [261].

### Άλλα- Κυτοκίνες- αυξητικοί παράγοντες

Η χρήση του αυξητικού παράγοντα του πλακούντα έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει τη διαφοροποίηση των EPCs και βελτιώνει τη νεοαγγείωση μετά από ισχαιμία σε διαβητικά ποντίκια. Η επίδραση του VEGF στα EPCs, του BFGF, και του αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από τα αιμοπετάλια, προκαλεί βελτίωση στην επούλωση τραυμάτων (όπως εκτιμήθηκε με τη δοκιμασία αγγειογένεσης, τη δοκιμασία Matrigel και τις πυκνότητες των αγγείων) σε διαβητικούς ποντικούς. [168]

Η άμεση χορήγηση κυτοκινών, SDF-1α και VEGF, ή ένα μείγμα αυτών των κυτοκινών που προέρχονται από καλλιεργημένα EPCs υγιών πολυδύναμων κυτταρικών σειρών, όπως ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα, μπορεί να ανατρέψει τη δυσλειτουργία των EPCs σε ασθενείς με Σ.Δ. [256][257]

Το sildenafil, ένας ισχυρός αγγειοδιασταλτικός παράγοντας και διεγέρτης αγγειογένεσης, έχει φανεί πως προάγει την αύξηση των κυκλοφορούντων EPCs [258] και έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ισχαιμικών νόσων. [259] [260][18]

## 1.6. Ο Ποσοτικός προσδιορισμός των EPCs με κυτταρομετρία ροής – Μεθοδολογία

### 1.6.1. Κυτταρικός διαχωρισμός

Ο διαχωρισμός των κυττάρων είναι ένα εργαλείο, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλούς τομείς της βιολογικής και βιοϊατρικής έρευνας και στην κλινική θεραπεία. Για την έρευνα, η ικανότητα ταξινόμησης κυττάρων σε ξεχωριστούς πληθυσμούς επιτρέπει τη μελέτη μεμονωμένων τύπων κυττάρων, που απομονώνονται από έναν ετερογενή αρχικό πληθυσμό χωρίς (ή με πολύ μειωμένη) πρόσμειξη άλλων τύπων κυττάρων. [262]

Μια πληθώρα τεχνικών διαχωρισμού κυττάρων που διατίθενται επί του παρόντος βασίζονται σε τρία βασικά στοιχεία: πυκνότητα, προσκόλληση και σύνδεση αντισώματος. Οι τεχνικές που βασίζονται στην πυκνότητα στηρίζονται στην χρήση φυγοκέντρωσης. Η ικανότητα ταξινόμησης μεγάλου αριθμού κυττάρων με βάση την πυκνότητά τους, σε ένα διαβαθμισμένο μέσο διαχωρισμού (συνήθως με βάση το σάκχαρο), καθιστά αυτές τις τεχνικές εφαρμόσιμες για κυτταρικούς διαχωρισμούς που περιλαμβάνουν τη χρήση αίματος. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη κλινική μέθοδος διαχωρισμού κυττάρων είναι η αιμαφαίρεση για την απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων, η οποία χρησιμοποιείται για τη θεραπεία διαφόρων καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένης της λευχαιμίας.

Ωστόσο, παρά την ευρεία χρήση μεθόδων που βασίζονται στην πυκνότητα, αυτές εξακολουθούν να υστερούν σε ακρίβεια, καθώς οι διαφορετικές πυκνότητες των διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών σε ορισμένες περιπτώσεις δεν είναι αρκετά μεγάλες ώστε να μπορούν να διαχωριστούν μεμονωμένοι τύποι κυττάρων. Αυτά τα μειονεκτήματα μπορούν να ξεπεραστούν με την εκτέλεση επαναλαμβανόμενων φυγοκεντρήσεων και χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις μέσου φυγοκέντρωσης και διαφορετικές γωνιακές ταχύτητες. Καταυτόν τον τρόπο, είναι δυνατό να απομονωθούν διαφορετικοί τύποι κυττάρων από ένα σύνθετο ετερογενή πληθυσμό.

Τα κυκλοφορούντα EPCs μπορούν να μετρηθούν από PBMCs περιφερικού αίματος που απομονώνονται με φυγοκέντρωση σε κλίση πυκνότητας. Το αίμα που προορίζεται για κυτταρομετρική ανάλυση συλλέγεται σε σωλήνες που περιέχουν αντιπηκτικό (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ [EDTA], ηπαρίνη ή κιτρική οξική δεξτρόζη [ACD]). Η θερμοκρασία κατά την επεξεργασία των δειγμάτων είναι ένας παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη, καθώς η επεξεργασία σε θερμοκρασία δωματίου αυξάνει την ένταση φθορισμού στους φαινοτύπους λευκοκυττάρων σε σύγκριση με την εργασία στους 4 ° C. [149]

### 1.6.2. Αρχή μεθόδου κυτταρομετρίας ροής

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια ποσοτική διαδικασία μέτρησης των χημικών και φυσικών χαρακτηριστικών των κυττάρων με μια τεχνική μελέτης κυτταρικών πληθυσμών, μέσω ανάλυσης της σκέδασης του φωτός από τα κύτταρα και της εκπομπής φθορισμού από αυτά.

Σκοπός της κυτταρομετρίας ροής είναι η καταμέτρηση και η ανάλυση σωματιδίων και κυττάρων σε μορφή εναιωρήματος, καθώς ρέουν μπροστά από σταθερές πηγές λέιζερ. Τα



σωματίδια αυτά μπορεί να είναι χρωμοσώματα, μόρια ή πρωτεΐνες. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μέτρηση της σκέδασης του φωτός που προσπίπτει στο σωματίδιο, με στόχο την μέτρηση του μεγέθους και της κοκκίωσης του, και στη συνέχεια με τη μέτρηση κάποιου σήματος φθορισμού, εάν έχει προηγηθεί επώαση με φθορίζουσες ουσίες.

Η βασική αρχή λειτουργίας των κυτταρομετρητών περιλαμβάνει μία σταθερή ροή εναιωρήματος κυττάρων σε γραμμική διάταξη, τα οποία περνώντας από μια φωτεινή δέσμη (laser) υφίστανται ανάλυση των χαρακτηριστικών τους, με τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ κυττάρου, φθορισμού και σκεδασμένου φωτός. Η σκέδαση ανιχνεύεται παράλληλα και κάθετα στη δέσμη laser και ο φθορισμός ανιχνεύεται κάθετα σε αυτήν.

Ο φθορισμός προέρχεται από ενώσεις με τις οποίες σημαίνονται οι προς ανάλυση κυτταρικοί πληθυσμοί. Τα μόρια συγκεκριμένων ουσιών, που ονομάζονται φθοριοχρώματα, απορροφούν την ενέργεια ακτινοβολίας που προσκρούει πάνω τους, διεγείρονται, και στη διεγερμένη αυτή κατάσταση τα ηλεκτρόνια τους βρίσκονται σε ενεργειακή κατάσταση ανώτερη της αρχικής τους. Με την επιστροφή στη θεμελιώδη τους ενεργειακή κατάσταση, εκπέμπουν την ενέργεια που απορρόφησαν ως φωτόνια, προκαλώντας το φαινόμενο του φθορισμού.

Τα προς ανάλυση κύτταρα σημαίνονται με κατάλληλα αντισώματα τα οποία προσδέονται σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων. Τα αντισώματα έχουν προηγουμένως σημανθεί με φθορίζουσες ενώσεις.

Οποιοδήποτε εναιώρημα κυττάρων ή μικροσωματιδίων μεταξύ 0,2-150 nm, κατόπιν κατάλληλης προετοιμασίας είναι δυνατόν να εκτιμηθεί από τον κυτταρομετρητή. Συνήθως διατηρείται ένας σταθερός ρυθμός ροής 2,000–20,000 cells/sec. Το πιο κοινά χρησιμοποιούμενο διάλυμα εναιωρήματος είναι το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (Phosphate Buffered Saline, PBS).

Οριοθέτηση ή περίφραξη (gating) ονομάζεται η δυνατότητα επιλογής κυττάρων ή μορίων. Σε ένα στικτόγραμμα, ο χειριστής μπορεί να επιλέξει έναν υποπληθυσμό κυττάρων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά ως προς δυο παραμέτρους [π.χ. forward scattering (FSC): σκέδαση παράλληλα με τη δέσμη laser και side scattering (SSC): σκέδαση κάθετα στη δέσμη laser] και ακολούθως να απεικονιστούν μόνο τα κύτταρα αυτού του πληθυσμού σε ένα στικτόγραμμα ως προς δύο άλλες παραμέτρους.

Ο ορισμός των κυττάρων όπου γίνεται η οριοθέτηση μπορεί να πραγματοποιηθεί πριν (live gating) ή μετά (analysis gating) την ανάλυση του δείγματος. [263][264]

### 1.6.3. Μονοκλωνικά αντισώματα και ανοσοφθορισμός

Η τεχνολογία μονοκλωνικών αντισωμάτων προσφέρει ένα ευρύ φάσμα συγκεκριμένων αντισωμάτων που το κάθε ένα από αυτά έχει ως στόχο ένα χαρακτηριστικό σύμπλεγμα-σύμπλοκο διαφοροποίησης (cluster of differentiation, CD) που βρίσκεται στην επιφάνεια των προς ανάλυση κυττάρων. Κάθε σύμπλοκο διαφοροποίησης αποτελεί ειδική διάταξη πρωτεϊνών, διαφορετική και χαρακτηριστική για το κάθε είδος κυττάρου και το στάδιο ανάπτυξής του, και η καθεμία έχει καταγραφεί και αριθμηθεί ως διαφορετικό CD προκειμένου να είναι δυνατή η ανεύρεση και η διαφοροποίηση των κυττάρων που τα φέρουν.

Στην κυτταρομετρία ροής, τα αντισώματα χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τα φθοριοχρώματα, ώστε να μπορεί να ανιχνευθεί η σύνδεση των αντισωμάτων στην επιφάνεια κάθε κυττάρου. Ο ανοσοφθορισμός είναι η μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση και εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα. Με τον ανοσοφθορισμό δίδεται η δυνατότητα στον κυτταρομετρητή να μετρήσει μόνο τα κύτταρα με τα οποία συνδέθηκαν τα αντισώματα. Με αυτόν τον τρόπο, είναι δυνατή η μελέτη συγκεκριμένων υποπληθυσμών κυττάρων με τη χρήση περισσότερων αντισωμάτων. [9]

Ο ανοσοφθορισμός διακρίνεται σε άμεσο, όταν το φθοριόχρωμα είναι δεσμευμένο στο χορηγούμενο αντίσωμα που έχει προσδεθεί στο κύτταρο, και έμμεσο όταν χρησιμοποιούνται πολλά διαφορετικά αντισώματα. Δηλαδή στο κύτταρο προσδένεται ένα ειδικό προς το κύτταρο αντίσωμα χωρίς φθοριόχρωμα, και σε αυτό εν συνεχεία προστίθεται δεύτερο αντίσωμα ειδικό προς το πρώτο και ακολούθως τρίτο αντίσωμα ειδικό προς το δεύτερο, διαδικασία που συνεχίζεται μέχρι να ανευρεθεί αντίσωμα που να έχει προσδεμένο φθοριόχρωμα.

#### Φθοριοχρώματα ή φθορίζουσες χρωστικές

Είναι οι χημικές ουσίες που έχουν την ιδιότητα να φθορίζουν και χρησιμοποιούνται στον ανοσοφθορισμό για τη σήμανση των αντισωμάτων. Κάθε φθοριόχρωμα απελευθερώνει φθορίζον φως συγκεκριμένου μήκους κύματος το οποίο καθορίζεται από το ποσό της ενέργειας που καταναλώνεται κατά την διέγερση των ηλεκτρονίων του. Τα σημαντικότερα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται στον ανοσοφθορισμό είναι τα:

1. Ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), εκπέμπει πράσινο χρώμα.
2. Ισοθειοκυανική τετραμεθυλοραδαμίνη (TMRITC), εκπέμπει κόκκινο χρώμα.
3. Φυκοερυθρίνη (RE), εκπέμπει πορτοκαλί χρώμα. [265][138][262]

#### **1.6.4. Κυτταρομετρία ροής και EPCs**

Έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές τεχνικές για την ανίχνευση των EPCs, συμπεριλαμβανομένης της καλλιέργειας in vitro, του διαχωρισμού μαγνητικών σφαιριδίων και της μικροσκοπίας φθορισμού, της ανοσοκυτταροχημείας και της κυτταρομετρίας ροής καθεμία από τις οποίες έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και περιορισμούς. [266]

Επί του παρόντος, η πιο κοινή τεχνική που εφαρμόζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των CECs είναι η πολύχρωματική κυτταρομετρία ροής. [159]

Η πολυχρωματική κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FCM) γίνεται ολοένα και πιο σημαντική για μελέτες σε κλινικούς βιοδείκτες και είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ανάλυση σπάνιων συμβάντων (events), συμπεριλαμβανομένων των CECs και των EPCs, αφού είναι μια γρήγορη, ποσοτική τεχνική που έχει επίσης το πλεονέκτημα ταυτόχρονου προσδιορισμού πολλαπλών δεικτών. Μέχρι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι βασισμένες στην FCM για τον εντοπισμό CECs και EPCs σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους. [267]

Η εξαιρετική σπανιότητα αυτών των κυττάρων (τα οποία αντιπροσωπεύουν κάπου μεταξύ 0,01% και 0,0001% των εμπύρηνων κυττάρων) και η έλλειψη ειδικών χαρακτηριστικών δεικτών καθιστούν την ανάλυση τους τεχνικά πολύπλοκη, καθώς τα κύτταρα που απομονώνονται θα πρέπει να είναι σαφώς διακριτά από άλλα αγγειογόνα κύτταρα, όπως τα ώριμα CECs. Οι Asahara και συν. για πρώτη φορά απομόνωσαν CEPs από ανθρώπινο περιφερικό αίμα, αποδεικνύοντας ότι τα CD34<sup>+</sup> κύτταρα θα μπορούσαν να διαφοροποιηθούν σε ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro*. [86] Στη συνέχεια, η ανακάλυψη του CD133 (AC133) που προσδιορίζει τα πρωτόγονα βλαστοκύτταρα, παρείχε επίσης ένα εργαλείο διαχωρισμού των CECs από τα EPCs. [266]

Η FCM είναι ιδανική για ταχεία επεξεργασία μεγάλου αριθμού κυττάρων ανά δευτερόλεπτο και χρησιμοποιείται συνήθως για τον ποσοτικό προσδιορισμό των CECs και των EPCs, ωστόσο, υπάρχει τυποποιημένο πρωτόκολλο για τον εντοπισμό και την απαρίθμηση αυτών των σπάνιων συμβάντων. [267]

Σε μελέτες σε ανθρώπους, η πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής για τον ποσοτικό προσδιορισμό των EPCs επικεντρώθηκε σε έναν συνδυασμό αντιγόνων, τόσο για τον προγονικό όσο και για το ενδοθηλιακό φαινότυπο. Με βάση το εύρημα ότι καλλιεργηθέντα *in vitro* CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κύτταρα ενσωματώνονται σε σημεία νεοαγγείωσης, οι Asahara και συν. διατύπωσαν ότι αυτό το ζεύγος αντιγόνων μπορεί να χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό των κυκλοφορούντων EPCs. [138] Ωστόσο, το αντιγόνο CD34 δεν είναι ειδικό και εκφράζεται επίσης και σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σε μια προσπάθεια διάκρισης των EPCs από τα ώριμα CECs, το CD133, ως δείκτης των ανώριμων βλαστικών κυττάρων, προτάθηκε ως τρίτος δείκτης. [147] Ωστόσο, περισσότερο από το 99% των τριπλά θετικών κυττάρων CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> εκφράζουν επίσης το CD45, το οποίο είναι παν-δείκτης λευκοκυττάρων (εκφράζεται σε όλους τους τύπους λευκοκυττάρων).

Τόσο τα εμβρυικά HSCs όσο και τα HECs συνεκφράζουν VEGFR-2 και CD34, και εξαιτίας αυτού του δεδομένου οι δείκτες αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για την αναγνώριση των CEPs. Από μελέτες έχει δειχθεί πως κανείς από τους δύο προαναφερθέντες πληθυσμούς δεν εκφράζει το κοινό αντιγόνο λευκοκυττάρων CD45, αλλά αποκτούν αυτόν τον δείκτη μόνο κατά τη διαφοροποίησή τους σε HPCs (και έτσι γίνονται CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>), και όχι κατά την εξέλιξή τους προς την ενδοθηλιακή σειρά.

Επομένως, η έκφραση του δείκτη CD45 σηματοδοτεί τη διαφοροποίηση προς την αιμοποιητική σειρά από την εμβρυϊκή έως την ενήλικη ζωή, ενώ δεν εκφράζεται σε κύτταρα ενδοθηλιακής σειράς. [127]

Ταυτόχρονα, η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής έχει εξελιχθεί και επιτυγχάνεται υψηλότερη ευαισθησία για σπάνια συμβάντα και για κύτταρα που εκφράζουν ασθενώς (αμυδρώς) δείκτες επιφανείας, κάνοντας καλύτερη διάκριση μεταξύ CD45 αρνητικών, αμυδρών (*dim*) και φωτεινών (*bright*) συμβάντων. Στην πραγματικότητα, τα CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κύτταρα εκφράζουν αμυδρώς το CD45. Με βάση μια ανασκόπηση των διαθέσιμων μελετών που εξετάζουν διαφορετικούς φαινοτύπους EPCs ως βιοδείκτες νοσημάτων, ο φαινότυπος CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>/CD45<sup>dim</sup> φαίνεται να είναι προσδιοριστικός όσον αφορά την ευαισθησία, την εξειδίκευση και την αξιοπιστία για την μέτρηση του αριθμού των EPCs. [149]

## 1.7. Θεραπευτικές προσεγγίσεις με EPCs

### 1.7.1. Καρδιαγγειακό σύστημα

Σε μελέτες σε ζώα, θεραπευτικές παρεμβάσεις που στοχεύουν στην αύξηση των EPCs και στη μείωση του οξειδωτικού στρες βελτίωσαν τη λειτουργία του μυοκαρδίου. [18]

Ολοένα αυξανόμενα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η βιολογία των EPCs μπορεί να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο στην καρδιαγγειακή ιατρική. Μερικά από τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος για την αγγειοπροστατευτική τους δράση φαίνεται να επηρεάζουν ευμενώς τη λειτουργία των EPCs, επομένως είναι πιθανό ότι οι επιδράσεις στα EPCs αποτελούν μέρος των πλειοτροπικών επιδράσεων αυτών των φαρμάκων. Δεδομένου του υψηλού επιπολασμού της καρδιαγγειακής νόσου στον Σ.Δ., η χρήση αυτών των αγγειοπροστατευτικών παραγόντων φαίνεται πως έχει ευεργετικό αποτέλεσμα σε αυτή την ομάδα των ασθενών. [93]

Μελέτες με περισσότερους από 1300 ασθενείς έδειξαν ότι η έγχυση διαφορετικών προγονικών κυττάρων μετά από ΟΕΜ είναι ασφαλής, αλλά η αποτελεσματικότητά τους για τη βελτίωση των διαφόρων παραμέτρων της νόσου δεν είναι σαφής. [154]

Στη δοκιμή TOPCARE-AMI (Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction), χρησιμοποιήθηκαν EPCs για την ενεργοποίηση της αποκατάστασης μετά από επαναιμάτωση σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και αποκατέστησαν τη λειτουργία της αριστερής κοιλίας σε 4 μήνες σε 20 ασθενείς, σε σύγκριση με μια ομάδα αναφοράς. Η μελέτη TACT έδειξε ότι τα συμπτώματα της περιφερικής αγγειακής νόσου βελτιώνονται μετά από αύξηση της παροχής οξυγόνου στους ιστούς από τη δράση προγονικών κυττάρων. [93]

### 1.7.2. Πνεύμονες-Ήπαρ- Οστά

Οι κυτταρικές θεραπείες έχουν δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα για την αποκατάσταση του οστικού ιστού. [268][269][270] Ωστόσο, οι περισσότερες από αυτές τις προσεγγίσεις αποτελούν χρονοβόρες και δαπανηρές διαδικασίες, για αυτό αναπτύχθηκαν στρατηγικές που ενισχύουν τα κύτταρα του οργανισμού, όπως η χορήγηση παραγόντων που κατευθύνουν τη μετανάστευση των EPCs προς τη θέση του κατάγματος ως μικροσφαιρίδια ή υδρογέλες, ή χορήγηση προσροφημένων EPCs σε βιοϋλικά. Ο συνδυασμός ενός προαγγειογόνου διεγέρτη (π.χ., VEGF) και ενός οστεοεπαγωγικού σήματος, όπως η μορφογενετική πρωτεΐνη οστών 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2), έχει δείξει ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Επιπλέον, η κινητοποίηση προγονικών κυττάρων έχει αποδειχθεί ότι διευκολύνει την επούλωση των οστών. [18][15] Τα μεταμοσχευμένα EPCs έχουν αποδειχθεί ότι βελτιώνουν την επιβίωση των ποντικών μετά από ηπατική βλάβη. [271] Άλλη προοπτική τυχαίοποιημένη μελέτη συνέκρινε τις επιδράσεις της μεταμόσχευσης EPCs σε ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική αρτηριακή υπέρταση έναντι της συμβατικής θεραπείας και έδειξε ότι μετά από 12 εβδομάδες, οι ασθενείς που είχαν λάβει EPCs είχαν σημαντική βελτίωση στη μέση πνευμονική αρτηριακή πίεση, στις πνευμονικές αγγειακές αντιστάσεις και την καρδιακή παροχή. [272]

Η χορήγηση λιποπολυσακχαρίτη LPS στους πνεύμονες των ποντικών έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί ταχεία απελευθέρωση στην κυκλοφορία προγονικών κυττάρων που προέρχονται από μυελό των οστών, ανάμεσα στα οποία και EPCs, τα οποία φαίνεται να ακολουθούν τη συστηματική φλεγμονώδη απάντηση στην πνευμονική βλάβη που προκαλείται από τον λιποπολυσακχαρίτη. Αυτά τα προγονικά κύτταρα, ικανά να διαφοροποιηθούν σε πολλούς φαινότυπους, τοποθετήθηκαν στο σημείο της αγγειακής βλάβης που προκλήθηκε από λιποπολυσακχαρίτη και συνέβαλαν στην αποκατάσταση του κατεστραμμένου επιθηλίου και ενδοθηλίου. [114]

### 1.7.3. Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια

Στη Δ.Α. τα EPCs θα μπορούσαν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν στη διαχείριση ασθενών με δύο διαφορετικούς ρόλους: (1) ως βιοδείκτες κυττάρων ή «προγνωστικοί δείκτες» και (2) ως πιθανή θεραπεία.

Τα EPCs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε μια προσπάθεια επαναγγείωσης των περιοχών ισχαιμίας του αμφιβληστροειδούς σε ασθενείς που έχουν ήδη αναπτύξει αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων του αμφιβληστροειδούς, όπως αυτή προσδιορίζεται με φλουοροαγγειογραφία. Θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση της λειτουργίας των αγγείων του αμφιβληστροειδούς σε ασθενείς με αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων και επακόλουθο οίδημα ωχράς κηλίδας με ή χωρίς ισχαιμία αμφιβληστροειδούς. Εάν και εφόσον αποδειχθεί ότι το όφελος υπερτερεί του κόστους τα EPCs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ακόμη και σε πολύ πρώιμα στάδια αμφιβληστροειδοπάθειας, πριν εμφανιστούν σημαντικές ανωμαλίες των αγγείων του αμφιβληστροειδούς σε μια προσπάθεια να ανασταλεί η εξέλιξη σε απειλητικές για την όραση επιπλοκές. [44]

### 1.7.4. Διαβητική Νευροπάθεια

Η ΔΠΝ είναι μια επιπλοκή που εξελίσσεται προοδευτικά και οι εκδηλώσεις της μπορεί να χρειαστούν πολλά χρόνια για να αναπτυχθούν. Η έλλειψη νευροτροφικών παραγόντων έχει θεωρηθεί σημαντικός παθοφυσιολογικός μηχανισμός της ΔΠΝ. [78][273]

Έχει δειχθεί ότι αγγειογενείς παράγοντες όπως ο VEGF-A, ο VEGF-C, ο serum “sonic hedgehog”, SHH (ή C24II) και οι στατίνες αποκαθιστούν τη μικροκυκλοφορία στα προσβεβλημένα νεύρα και ακολουθεί λειτουργική βελτίωση. [274][275][276]

Η κυτταρική θεραπεία προσελκύει επί του παρόντος αυξανόμενη προσοχή καθώς προσφέρει προοπτική βελτίωσης της πρόγνωσης ασθενών με καρδιαγγειακά νοσήματα. Παρά το γεγονός ότι μπορεί να μην είναι μια τυπική επιλογή θεραπείας για όλα τα στάδια της ΔΠΝ επειδή διαφορετικά στάδια της χαρακτηρίζονται από διαφορετικές δομικές ή λειτουργικές αλλαγές, ωστόσο η δυνατότητα μετανάστευσης των EPCs στα σημεία βλάβης των αιμοφόρων αγγείων και συμμετοχής στην αποκατάσταση της βλάβης με τη διαφοροποίησή τους σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να έχει θεραπευτική εφαρμογή στην θεραπεία της αγγειακής βλάβης στην ισχαιμική καρδιοπάθεια, στην πνευμονική υπέρταση, περιφερική αρτηριοπάθεια, την επαναστένωση ενδοπρόθεσης αγγειοπλαστικής. [101][277]

Η σημασία των EPCs στην ομοίωση της μικροκυκλοφορίας των νευρώνων ενισχύεται περαιτέρω από την εισαγωγή της μεταμόσχευσης βλαστικών κυττάρων ως θεραπεία της ΔΠΝ

τόσο σε πειραματικές όσο και σε κλινικές δοκιμές. [213][212][278][279] Μια πρόσφατη μελέτη ανέφερε ότι η εξωτερική ηλεκτρική μυϊκή διέγερση των μηριαίων μυών ασθενών με επώδυνη ΔΠΝ οδήγησε σε μείωση των συμπτωμάτων πιθανώς μέσω διαφοροποίησης των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων σε EPCs και αυξημένης προσκόλλησης και ενσωμάτωσης αυτών στο ενδοθήλιο των αγγείων. [278]

Οι ταχύτητες αγωγιμότητας, η ροή του αίματος και η τριχοειδική πυκνότητα βρέθηκαν μειωμένες στα ισχιακά νεύρα των διαβητικών ποντικών, αλλά επανήλθαν σε φυσιολογικά επίπεδα μετά από έγχυση EPCs στα οπίσθια άκρα. Τα ενέσιμα EPCs εμφυτεύθηκαν στα ισχιακά νεύρα. Ένα μέρος των μεταμοσχευμένων EPCs εγκαταστάθηκαν κοντά στα *vasa nervorum*, και ένα μικρότερο μέρος αυτών των EPCs ενσωματώθηκαν ανάμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Το SDF-1 και η MCP-1 που παράγονται από διαβητικά νεύρα φαίνεται να είναι σε θέση να προσελκύουν τα EPCs που ενίονται στην περιοχή. [212] Πολλαπλοί αγγειογενείς και νευροτροφικοί παράγοντες αυξήθηκαν σημαντικά στα νεύρα όπου έγινε η έγχυση EPCs. Αυτές οι διπλές αγγειογενετικές και νευροτροφικές επιδράσεις των EPCs επιβεβαιώθηκαν με την ανεύρεση υψηλότερου πολλαπλασιασμού κυττάρων Schwann και ενδοθηλιακών κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικά μέσα με παρουσία EPCs. Προκύπτει λοιπόν το συμπέρασμα ότι τα EPCs που προέρχονται από μυελό των οστών θα μπορούσαν να αντιστρέψουν διάφορες εκδηλώσεις ΔΝ. [109][212]

### 1.7.5. Έλκος διαβητικού ποδιού

Τα EPCs μειώνονται σε ασθενείς σε κίνδυνο για εμφάνιση διαβητικού έλκους ποδός ή με διαβητικό έλκος, ενώ η πλήρης επούλωση των πληγών σχετίζεται με τη μείωση του CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, υποδηλώνοντας πιθανή αυξημένη ενσωμάτωσή τους στο ενδοθήλιο. Τα χαμηλά επίπεδα CRP, IL-1α και GM-CSF στον ορό συσχετίστηκαν με πλήρη επούλωση τραυμάτων και ενδέχεται να χρησιμεύσουν ως προγνωστικοί δείκτες επούλωσης διαβητικού έλκους. [280]

Παρόλο που ο ρόλος των EPCs στην θεραπεία του διαβητικού έλκους δεν έχει διερευνηθεί, προκαταρκτικές μελέτες σε ασθενείς με ΣΔ με κρίσιμη ισχαιμία άκρων έδειξαν ότι η αυτόλογη μεταμόσχευση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος κινητοποιημένων από GCSF βελτίωσε τη ροή αίματος και οδήγησε σε πλήρη επούλωση πληγών. [281]

## 2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

## 2.1. Σκοπός

Από πολλές μελέτες έχειδειχθεί ότι ο αριθμός των EPCs είναι μειωμένος σε ασθενείς με ΣΔ και μειώνεται ακόμη περισσότερο όταν συνυπάρχουν μακροαγγειακές επιπλοκές. [69][211] Μολαταύτα, η συσχέτιση της δυσλειτουργίας των EPCs με τις διαβητικές μικροαγγειακές επιπλοκές είναι πιο σύνθετη και όχι εκτενώς μελετημένη. Ο κύριος υποκείμενος παθοφυσιολογικός μηχανισμός στη ΔΑ είναι η παθολογική αγγειογένεση, και έχει βρεθεί ότι σε ασθενείς με παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια ο αριθμός των EPCs είναι αυξημένος. [211]

Ο ρόλος των EPCs στη ΔΠΝ δεν έχει διερευνηθεί, ωστόσο πειραματικές μελέτες υποδεικνύουν ότι κατόπιν τοπικής έγχυσης EPCs - προερχόμενων από το μυελό των οστών ή από το περιφερικό αίμα ανθρώπινου ομφάλιου λώρου - παρουσιάστηκε βελτίωση των συμπτωμάτων που εκδηλώνονται στη ΔΠΝ. [283]

Ο κύριος σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αξιολογηθούν οι διαφορές που προκύπτουν στον αριθμό των CPCs και σε 6 διαφορετικούς φαινοτύπους των EPCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΣΔ τύπου 2, με και χωρίς ΔΠΝ, καθώς επίσης να διερευνηθούν μεταβολές των επιπέδων VEGF, SDF-1 και κυτοκινών στο πλάσμα.



## 2.2. Άτομα και πληθυσμός της μελέτης

### 2.2.1. Πληθυσμός της μελέτης

Στη μελέτη έλαβαν μέρος συνολικά 105 άτομα : 50 ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 και ΔΠΝ (group 1), 30 ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 χωρίς ΔΠΝ (group 2) οι οποίοι παρακολουθούνται στο Διαβητολογικό Κέντρο του Λαϊκού Νοσοκομείου, και 25 υγιείς μάρτυρες (group 3) παρόμοιας ηλικίας οι οποίοι ανήκουν στο προσωπικό του Νοσοκομείου.

Η διάγνωση του ΣΔ ετέθη με βάση τα κριτήρια από την Αμερικανική Διαβητολογική Εταιρεία (American Diabetes Association). [2] Στη μελέτη έλαβαν μέρος άτομα ηλικίας 40-75 ετών, με ικανοποιητική γλυκαιμική ρύθμιση (HbA1c <8.5%) και δείκτη μάζας σώματος (BMI, body mass index) <40 kg/m<sup>2</sup>.

Κριτήρια αποκλεισμού αποτέλεσαν: η παρουσία κλινικής μακροαγγειακής νόσου [ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου, συμπτωματική ισχαιμική καρδιακή νόσος, εγκεφαλικό επεισόδιο ή/και σοβαρή περιφερική αγγειακή νόσος (ABI ≤0.90)], η παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια, το ενεργό έλκος διαβητικού ποδιού ή οποιαδήποτε κλινική κατάσταση κατά την οποία θα μπορούσε να συνυπάρχει νεοαγγειογένεση. Επιπλέον κριτήρια αποκλεισμού υπήρξαν το κάπνισμα, η παρουσία σοβαρής νεφρικής ανεπάρκειας (eGFR ≤ 30 ml/min ή λόγος αλβουμίνης προς κρεατινίνη (albumin to creatinine ratio, ACR) >300 mg/g), σοβαρής ηπατικής ανεπάρκειας, ιστορικό κακοήθειας, αιμοποιητικών διαταραχών και αυτοάνοσων νοσημάτων, η παρουσία περιφερικής νευροπάθειας άλλης αιτιολογίας πλην της διαβητικής, η παρουσία νευρο – οστεοαρθροπάθειας Charcot, πρόσφατη χειρουργική επέμβαση ή τραύμα (≤3 μήνες), οξεία νόσηση 48 ώρες προ των μετρήσεων και η παρουσία εμπύρετου νοσήματος κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, καθώς και η χρόνια λήψη κορτικοστεροειδών και ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων.

Όλοι οι εξεταζόμενοι υπέγραψαν έντυπο ενημέρωσης και συγκατάθεσης πριν τη συμμετοχή τους στη μελέτη το οποίο ενεκρίθη από την Αρχή Προστασίας Προσωπικών Δεδομένων και την Επιτροπή Δεοντολογίας του Νοσοκομείου μας.

### 2.2.2. Άτομα της μελέτης

Η παρούσα είναι μία συγχρονική μελέτη παρατήρησης και όλοι οι εξεταζόμενοι διαβητικοί ασθενείς παρακολουθούνταν στο Διαβητολογικό Εργαστήριο του Διαβητολογικού Κέντρου. Ο κάθε εξεταζόμενος προσήλθε στο Ερευνητικό Εργαστήριο το πρωί, μετά από νηστεία 10-12 ωρών, σε σταθερή θερμοκρασία δωματίου 23±1 °C, έχοντας αποφύγει την κατανάλωση αλκοόλ και καφέ για το ίδιο χρονικό διάστημα, ενώ η λήψη των αντιδιαβητικών δισκίων ή η χορήγηση ινσουλίνης και της λοιπής φαρμακευτικής αγωγής έγιναν μετά το πέρας της εξέτασης. Σε όλους τους εξεταζόμενους ελήφθη πλήρες ατομικό ιστορικό για συνύπαρξη νόσων και λήψη φαρμάκων, καθώς και για τις συνήθειες και τον τρόπο ζωής και διενεργήθηκε σε όλους πλήρης κλινική εξέταση κατά συστήματα.

Όλες οι εξετάσεις διενεργήθηκαν κατόπιν εγκλιματισμού των εξεταζομένων στον εξεταστικό χώρο. Έγινε μέτρηση των σωματομετρικών παραμέτρων (βάρος, ύψος) με ελαφρύ ρουχισμό

και υπολογίστηκε ο δείκτης μάζας σώματος BMI ως το πηλίκο του βάρους δια το τετράγωνο του ύψους.

$$BMI = \frac{\text{βάρος (kg)}}{\text{ύψος}^2 (\text{m}^2)}$$

Η μέτρηση της αρτηριακής πίεσης έγινε σε καθιστή θέση, δύο φορές με μεσοδιάστημα πέντε λεπτών μεταξύ των δύο μετρήσεων και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων.

Ως αρτηριακή υπέρταση θεωρήθηκε η λήψη αντιυπερτασικής αγωγής ή/και η μέτρηση τιμών συστολικής αρτηριακής πίεσης (ΣΑΠ) μεγαλύτερες από ή ίσες με 140 mmHg ή/και τιμών διαστολικής αρτηριακής πίεσης (ΔΑΠ) μεγαλύτερες από ή ίσες με 90, σύμφωνα με τις παρούσες κατευθυντήριες οδηγίες [284]

Έγινε πλήρης κλινική εξέταση και ψηλάφηση των περιφερικών σφύξεων των δύο κάτω άκρων (οπίσθια κνημιαία αρτηρία και ραχιαία αρτηρία του άκρου ποδός).

Ακολούθησε ο έλεγχος για παρουσία περιφερικής αγγειοπάθειας με μέτρηση του ABI. Έγινε δηλαδή μέτρηση της ΣΑΠ της οπίσθιας κνημιαίας και της ραχιαίας αρτηρίας του άκρου ποδός και στα δύο κάτω άκρα με μικρό φορητό μηχάνημα υπερήχων Doppler 5-10 Hz (dopplex II, Huntleigh Healthcare Ltd, Cardiff, UK) και ακολούθησε μέτρηση της ΣΑΠ της βραχιόνιου αρτηρίας και στα δύο άνω άκρα με τον ίδιο τρόπο και στη συνέχεια προσδιορισμός του ABI, ως ο λόγος της υψηλότερης τιμής ΣΑΠ των κάτω άκρων προς αυτήν των άνω άκρων.

Τιμές ABI μικρότερες ή ίσες του 0,9 θεωρήθηκαν ενδεικτικές παρουσίας περιφερικής αγγειοπάθειας.

$$ABI = \frac{\text{συστολική αρτηριακή πίεση σε οπ. κνημιαία ή ραχιαία αρτηρία}}{\text{συστολική αρτηριακή πίεση σε βραχιόνιο αρτηρία}}$$

Ως νεφροπάθεια ορίστηκε η τιμή eGFR <60 ml/min/1.73m<sup>2</sup> ή/και η τιμή του λόγου ACR >30 mg/g ή παθολογικά ευρήματα στον απεικονιστικό έλεγχο. [285]

Για την εκτίμηση της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας, αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματα βυθοσκόπησης στην οποία είχαν υποβληθεί οι ασθενείς κατά τη διάρκεια χρονικού διαστήματος όχι μεγαλύτερου των 3 μηνών προ της μελέτης, κατόπιν μυδρίασης της κόρης του οφθαλμού από έμπειρο οφθαλμίατρο.

Οι φόρμες μελέτης που συμπληρώνονταν για κάθε συμμετέχοντα εξεταζόμενο είναι οι ακόλουθες (Εικόνα 8, Εικόνα 9)

**EPCs**

A/A..... Ομάδα: χωρίς ΠΝ / με ΠΝ / control  
 Ημερομηνία εξέτασης.....  
 Ονοματεπώνυμο.....  
 Ηλικία..... Ημερομηνία γέννησης.....  
 Επάγγελμα.....  
 Τηλέφωνο.....  
 Διεύθυνση.....

Βάρος..... Ύψος ..... BMI ( Β/Υ²).....  
 Waist..... Hip..... WHR.....

Κάπνισμα: Δεν κάπνισε ποτέ  
 Ex-smokers: Packyears.....  
 Πότε διέκοψε το κάπνισμα.....(έτος)

Έτος διάγνωσης του διαβήτη (τύπου 2) .....

Θεραπεία (τρωινή):  
 .....  
 .....

ΣΑΠ..... ΔΑΠ..... (ύπτια θέση)  
 ΑΥ: Ναι / Όχι  
 α-MEA / AT1: ναι / όχι (.....)

Δυσλιπιδαιμία: Ναι / Όχι  
 στατίνη: ναι / όχι (.....)

Άλλα φάρμακα.....  
 .....

Σάκχαρο..... HBA1c.....  
 Χοληστερίνη..... Τριγλυκερίδια.....  
 HDL-C..... LDL-C.....  
 Ουρία..... Κρεατινίνη.....  
 Ουρ. Οξύ..... CRP.....  
 Hb / Hct..... MCV / MCH .....  
 WBC..... Π/Λ/Μ/Η..... Αιμοπετάλια.....

A/C (τυχαίο δείγμα).....  
 Μικρολευκωματουρία: Ναι / Όχι  
 (Έτος διάγνωσης της μικρολευκωματουρίας.....)

**Αμφιβληστροθεία:** Όχι  
 Υποστρώματος Παραγωγική Ωχροπάθεια  
 Θεραπεία με **Laser** Δ / Α

**Άλλα**.....  
 .....  
 .....  
 .....

Εικόνα 8. Φόρμα μελέτης

<b>Περιφερική αρτηριοπάθεια: ναι / όχι</b>					
ψηλαφητές περιφερικές σφύξεις:	οπ.κνημιαία	Δ Ναι / Όχι	ραχιαία	Δ Ναι / Όχι	
		A Ναι / Όχι		A Ναι / Όχι	
διαλείπουσα χωλότητα: Ναι / Όχι					
<b>Κνημοβραχιόνιος δείκτης (ΣΑΠ κ.άκρων / ΣΑΠ α.άκρων)</b>					
ΣΑΠβραχ.....	ΣΑΠοπ.κν.....				
	ΣΑΠραχ.....	Δ.....			
ΣΑΠβραχ.....	ΣΑΠοπ.κν.....				
	ΣΑΠραχ.....	A.....			
<b>Περιφερική νευροπάθεια: ναι / όχι</b>					
<b>Δείκτης συμπτωμάτων νευροπάθειας (NSS)</b>					
Περιγραφή:	Κόπωση, κράμπες, πόνος σα σουβλιά	1			
	Καύσος, αιμωδία, βελόνες	2			
Εντόπιση:	Μηρός	0			
	Γάμπες	1			
	Πόδια	2			
Χρόνος επιδείνωσης:	Ημέρα	0			
	Διαλείπων	1			
	Νύχτα	2			
Ξυπνάει από τον ύπνο:	Όχι	0			
	Ναι	1			
Ανακούφιση με:	Ανάπαυση	0			
	Όρθια θέση	1			
	Περπάτημα	2			
<b>NSS...../9</b>					
<b>Δείκτης ευρημάτων νευροπάθειας (NDS)</b>					
		ΔΕΞΙΑ		ΑΡΙΣΤΕΡΑ	
Μεγάλο δάχτυλο:	πόνος	φυσιολ.	0	φυσιολ.	0
		παθολ.	1	παθολ.	1
	δονήσεις	φυσιολ.	0	φυσιολ.	0
		παθολ.	1	παθολ.	1
Ράχη ποδιού:	ράβδοι	φυσιολ.	0	φυσιολ.	0
(αίσθημα θερμού/ψυχρού)		παθολ.	1	παθολ.	1
Αχίλλεια ανταν/κά:		φυσιολ.	0	φυσιολ.	0
		επίταση	1	επίταση	1
		παθολ.	2	παθολ.	2
<b>NDS...../10</b>					
<b>Ουδός αντίληψης των δονήσεων (ΟΑΔ) :</b>					
Δ.....Volts	φυσιολ.	0	παθολ.	1	
A.....Volts	φυσιολ.	0	παθολ.	1	

Εικόνα 9. Φόρμα μελέτης

## 2.3. Εκτίμηση της ΔΠΝ

Ο έλεγχος για παρουσία ΔΠΝ βασίστηκε στο ατομικό ιστορικό και την φυσική εξέταση.

**Τα συμπτώματα της ΔΠΝ** αξιολογήθηκαν με τον προσδιορισμό NSS ο οποίος εξετάζει την παρουσία άλγους, κραμπών ή διαξιφιστικών πόνων στους άκρους πόδες. [283][84] (Πίνακας 6)

**Τα ευρήματα της ΔΠΝ** εκτιμήθηκαν με τον προσδιορισμό του NDS, με τον οποίο εξετάζονται: τα Αχίλλεια αντανακλαστικά, η αντίληψη θερμού/ψυχρού στη ράχη του ποδός, η αντίληψη των δονήσεων και το αίσθημα νυγμού κατόπιν σκαρφισμού στην πελματιαία επιφάνεια του μεγάλου δακτύλου του άκρου ποδός. [83] (Πίνακας 7)

Αναλυτικά:

- Το αίσθημα νυγμού ελέγχθηκε με απλή βελόνα στην ραχιαία επιφάνεια του άκρου ποδός στην περιοχή του μεγάλου δακτύλου. Οι απαντήσεις των ασθενών βαθμολογήθηκαν με 0, όταν η αίσθηση ήταν παρούσα και με 1, όταν η αίσθηση ήταν απύουσα.
- Η αίσθηση των δονήσεων εξετάσθηκε με διαπασών 128 Hz (Εικόνα 10). στη ραχιαία επιφάνεια της άπω φάλαγγας του μεγάλου δακτύλου. Οι απαντήσεις των ασθενών βαθμολογήθηκαν με 0, όταν η αίσθηση ήταν παρούσα και με 1, όταν η αίσθηση ήταν απύουσα.



Εικόνα 10. Διαπασών 128 Hz

- Η αίσθηση της θερμότητας εξετάσθηκε με μια ειδική ράβδο με δύο άκρα, εκ των οποίων το ένα είναι μεταλλικό (ψυχρό) και το άλλο άκρο είναι πλαστικό (θερμό)

(Εικόνα 11). Η ράβδος τοποθετείται στη ραχιαία επιφάνεια του άκρου ποδός. Οι απαντήσεις των ασθενών βαθμολογήθηκαν με 0, όταν η αίσθηση ήταν παρούσα και με 1, όταν η αίσθηση ήταν απύουσα.



Εικόνα 11. Ράβδος θερμού - ψυχρού

- Στη συνέχεια εκτιμήθηκε η έκλυση των Αχιλλειων αντανακλαστικών. Ο ασθενής βαθμολογήθηκε με 0 όταν τα Αχιλλεία αντανακλαστικά εκλύονταν φυσιολογικά, με 1 όταν εκλύονταν με επίταση και με 2 όταν τα αντανακλαστικά δεν εκλύονταν.
- Το ελάχιστο σκορ του NDS είναι το 0, δηλαδή απουσία ευρημάτων και το μέγιστο σκορ είναι το 10, που είναι ενδεικτικό παρουσίας σημείων σοβαρής περιφερικής νευροπάθειας.
- Επιπλέον, έγινε εξέταση της παλλαισθησίας με υπολογισμό VPT με την χρήση βιοθεσιόμετρου. Το βιοθεσιόμετρο είναι μία φορητή συσκευή που μεταδίδει ερεθίσματα δονήσεων βαθμονομημένα σε volts. Οι εξεταζόμενοι δηλώνουν ότι ξεκινούν να αντιλαμβάνονται το ερέθισμα της δόνησης που εφαρμόζεται στην κορυφή του μεγάλου δακτύλου του ποδός, καθώς η ένταση των δονήσεων αυξάνεται προοδευτικά από το μηδέν μέχρι το σημείο που αναφέρεται από τον εξεταζόμενο. Ως VPT προσδιορίζεται η τάση του ρεύματος που αντιστοιχεί στο αναφερόμενο αντιλαμβανόμενο από τον εξεταζόμενο αίσθημα. Τα όρια φυσιολογικών τιμών του VPT με βάση την ηλικία φαίνονται στον πίνακα 9.

**Η διάγνωση της ΔΠΝ** ετέθη με βάση τα ακόλουθα κριτήρια: (Πίνακας 8)

$NSS \geq 5$  και  $NDS = 3-5$ ,

ή

$NDS \geq 6$  ανεξάρτητα από την τιμή του  $NSS$ . [84]

Πίνακας 6. Δείκτης συμπτωμάτων νευροπάθειας (NSS: Neuropathy symptom score)

Περιγραφή	Κόπωση, κράμπες, πόνος στα σουβλιά	1
	Καύσος, αιμωδία, βελόνες	2
Εντόπιση	Μηρός	0
	Γάμπες	1
	Πόδια	2
Χρόνος επιδείνωσης	Ημέρα	0
	Διαλείπων	1
	Νύχτα	2
Ξυπνάει από τον ύπνο	Όχι	0
	Ναι	1
Ανακούφιση με	Ανάπαυση	0
	Όρθια θέση	1
	Περπάτημα	2

NSS = .... / 9

Πίνακας 7. Δείκτης ευρημάτων νευροπάθειας (NDS: neuropathy disability score)

		ΔΕΞΙΑ	ΑΡΙΣΤΕΡΑ
Μεγάλο δάκτυλο	Αίσθηση του πόνου	φυσιολογικό = 0 παθολογικό = 1	φυσιολογικό = 0 παθολογικό = 1
	Αίσθηση δονήσεων	φυσιολογικό = 0 παθολογικό = 1	φυσιολογικό = 0 παθολογικό = 1
Ράχη άκρου ποδός	Αίσθηση θερμού-ψυχρού	φυσιολογικό = 0 παθολογικό = 1	φυσιολογικό = 0 παθολογικό = 1
Αχίλλεια αντανακλαστικά		φυσιολογικό = 0 με επίταση = 1 παθολογικό = 2	φυσιολογικό = 0 με επίταση = 1 παθολογικό = 2

NDS = .../10



## Πίνακας 8. Διαγνωστικά κριτήρια ΔΠΝ

Δείκτης συμπτωμάτων νευροπάθειας (NSS)

<3	Απουσία νευροπάθειας
3-4	Ήπια συμπτώματα
5-6	Μέτρια συμπτώματα
7-9	Σοβαρά συμπτώματα

Δείκτης ευρημάτων νευροπάθειας (NDS)

<3	Απουσία νευροπάθειας
3-5	Σημεία ήπιας βαρύτητας
6-8	Σημεία μέτριας βαρύτητας
9-10	Σημεία σοβαρής νευροπάθειας

Διαβητική Νευροπάθεια:

**NDS  $\geq$  6** με ή χωρίς συμπτώματα ή

**5  $\geq$  NDS  $\geq$  3 και NSS  $\geq$  5**

Παθολογική τιμή **ΟΑΔ** και παθολογικό **NSS ( $\geq$ 3) ή NDS ( $\geq$ 3)**

Πίνακας 9. Ουδός αντίληψης δονήσεων (ΟΑΔ)–Όρια με βάση την ηλικία

Ηλικία	VPT
18-21	≤ 8
22-25	≤ 9
26-29	≤10
30-32	≤11
33-36	≤12
37-38	≤13
39-41	≤14
42-44	≤15
45-46	≤16
47-48	≤17
49-50	≤18
51-52	≤19
53-54	≤20
55-56	≤21
57-58	≤22
59	≤23
60-61	≤24
62	≤25
63-64	≤26
65	≤27
66-67	≤28
68-70	≤30
80+	Φυσιολογικό

## 2.4. Εργαστηριακός έλεγχος

Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν νωρίς τις πρωινές ώρες, κατόπιν νηστείας 10-12 ωρών, φυγοκεντρήθηκαν και διατηρήθηκαν σε βαθιά κατάψυξη στους -80°C.

- Η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA<sub>1c</sub>), τα λιπίδια ορού (ολική χοληστερόλη, λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL), τριγλυκερίδια) και η κρεατινίνη ορού μετρήθηκαν με ενζυματική μέθοδο σε αυτόματο αναλυτή.
- Η LDL χοληστερόλη υπολογίσθηκε με βάση την εξίσωση Friedewald:

$$LDL \text{ χοληστερόλη} = \text{ολική χοληστερόλη} - \left( HDL \text{ χοληστερόλη} + \frac{\text{τριγλυκερίδια}}{5} \right)$$

- Ο υπολογισμός του eGFR έγινε με βάση τον τύπο MDRD (Modification of Diet in Renal Disease).

### Τύπος MDRD (Modification of Diet in Renal Disease)

Παραλλαγή 4 (απλοποιημένος τύπος):

$$GFR \text{ (ml/min/1.73m}^2\text{)} = 186.3 * \text{κρεατινίνη ορού (mg/dl)}^{-1.154} * \text{ηλικία}^{-0.203} \\ (*0.742 \text{ αν η ασθενής είναι γυναίκα, } *1.212 \text{ αν ο ασθενής είναι της μαύρης φυλής)}$$

- Τα επίπεδα VEGF and SDF-1 πλάσματος μετρήθηκαν σε EDTA, με ενζυμικό ανοσοπροσοροφητικό προσδιορισμό enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια διαθέσιμα στο εμπόριο (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA).
- Η μέτρηση του VCAM-1, του ICAM-1 και του TNFα έγινε με Luminex Multiplex immunoassay (MILLIPLEX MAP Kit Human Cardiovascular Disease Magnetic Bead Panel 2, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

- Ο υπολογισμός της CRP έγινε με νεφελομετρία (C-Reactive Protein Gen 3, Roche Diagnostics, Germany).
- Ο ACR υπολογίστηκε σε πρωινό δείγμα ούρων σε αναλυτή DCA.

## 2.5. Απομόνωση των EPCs – Κυτταρομετρία ροής

### 2.5.1. Διαχωρισμός κυττάρων και χρώση με μονοκλωνικά αντισώματα σημασμένα με φθοριοχρώματα

Η απομόνωση των κυττάρων και η μέτρηση των φαινοτύπων των EPCs με κυτταρομετρία ροής, καθώς και η ανάλυση των δεδομένων έλαβαν χώρα στην εγκατάσταση κυτταρομετρίας ροής του τμήματος Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του ΓΝΑ Λαϊκού Νοσοκομείου.

Κατόπιν της φλεβοκέντησης ελήφθησαν δείγματα 8 mL αίματος και συλλέχθηκαν σε σωληνάρια που περιέχουν EDTA για την απομόνωση των CPCs/EPCs. Τα δείγματα φυλάχθηκαν άμεσα σε θερμοκρασία 4 °C, και τα PBMCs απομονώθηκαν εντός 2 ωρών χρησιμοποιώντας διάλυμα Ficoll για το διαχωρισμό τους, με φυγοκέντρηση με κλίση πυκνότητας. Τα συλλεχθέντα κύτταρα υπεβλήθησαν σε 3 διαδοχικές πλύσεις με PBS.

Μετά την απομόνωση των PBMCs, ακολούθησε χρώση 100 μl εκ των PBMCs με άμεσα συζευγμένα μονοκλωνικά αντισώματα (CD45, CD34, CD309 ή KDR/VEGFR2, CD133 και CD31), σεσημασμένα με φθοριοχρώματα και επώασή τους για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ παράλληλα 100 μl εκ των PBMCs χωρίς χρώση χρησιμοποιήθηκαν ως πληθυσμός ελέγχου.

Αρχικά, τα ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα τοποθετήθηκαν στα σωληνάρια και εν συνεχεία προσετέθησαν 100 μl εκ των PBMCs σε κάθε σωληνάριο καθώς και σε κάθε ένα από τα αντίστοιχα control.

Η χρώση των κυττάρων με ανοσοφθορισμό πραγματοποιήθηκε με τα εξής μονοκλωνικά αντισώματα:

CD45-allophycocyanin-H7 (APC-H7) (5μl, BD Biosciences, San Jose, CA, USA),

CD34-fluorescein isothiocyanate (FITC) (10μl, BD Biosciences, San Jose, CA, USA),

CD309 or KDR/VEGFR2-phycoerythrin (PE) (20μl, BD Biosciences, San Jose, CA, USA),

CD133-allophycocyanin (APC) (10μl, Miltenyi Biotec) and

CD31-phycoerythrin-Cy7 (PE-Cy7) (10μl, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) σύμφωνα με πρότυπες τεχνικές. [280][230]

## 2.5.2. Μέθοδος για χρώση EPCs

Συγκεκριμένα, τιτλοδοτημένες ποσότητες από 5μl CD45-APC-H7, 10μl CD31-PE-Cy7, 10μl CD133-APC, 20 μl CD309-PE, 10 μl CD34-FITC μαζί με 100μl PBMCs προστέθηκαν στα σωληνάρια και επώαστηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 2 μl υγρού λύσεως FACS Lysing solution για τη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων για 10 λεπτά και μετά από πλύση και φυγοκέντρηση των δειγμάτων τα δείγματα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής στο λογισμικό του κυτταρομετρητή ροής υψηλής απόδοσης (FACSCanto II, BD Biosciences).

Στην Εικόνα 12 και Εικόνα 13 φαίνονται αναλυτικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν.

A/A	Περιγραφή βήματος	Έλεγχος
1	Προσθέτουμε 8 ml Histopaque-1077 σε ένα κωνικό σωληνάριο των 50 ml και το αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 30min σε σκοτεινό χώρο	
2	Προσθέτουμε 8 ml PBS	
3	Προσεκτικά επιστοιβάζουμε 8 ml ολικού αίματος με μια Pasteur pipette στο σωληνάριο με το Histopaque-1077	
4	Φυγοκεντρούμε για 30 min στα 400g σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς φρένο	
5	Προσεκτικά μεταφέρουμε με μια Pasteur pipette το στρώμα της αδιαφανούς επιφάνειας σε ένα καινούργιο κωνικό σωληνάριο των 15 ml (PBMCs)	
6	1 <sup>η</sup> πλύση: προσθέτουμε 10 ml ισότονο PBS και αναμειγνύουμε ήπια με μια Pasteur pipette	
7	Φυγοκεντρούμε για 10 min στα 250g σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς φρένο	
8	Αποχύνουμε το υπερκείμενο και το απορρίπτουμε	
9	2 <sup>η</sup> πλύση: στο κυτταρικό ίζημα (cell pellet) προσθέτουμε σταδιακά 5 ml ισοτονικού PBS και αναμειγνύουμε ήπια με το χέρι και με μια Pasteur pipette	

10	Φυγοκεντρούμε για 10 min στα 250g σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς φρένο	
11	Αποχύνουμε το υπερκείμενο και το απορρίπτουμε	
12	3 <sup>η</sup> πλύση: στο κυτταρικό ίζημα (cell pellet) προσθέτουμε σταδιακά 5 ml ισοτονικού PBS και αναμειγνύουμε ήπια με το χέρι και μια Pasteur pipette	
13	Φυγοκεντρούμε για 10 min στα 250g σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς φρένο	
14	Αποχύνουμε το υπερκείμενο με προσοχή	
15	Στο κυτταρικό ίζημα (cell pellet) προσθέτουμε 500μl Cell Wash και αναμειγνύουμε ήπια με μια Pasteur pipette και με αναδευτήρα	

Εικόνα 12. Μέθοδος χρώσης EPCs – Στάδιο 1

A/A	Περιγραφή βήματος	Έλεγχος
16	Μαρκάρουμε τα δύο σωληνάρια που θα χρησιμοποιηθούν (stained και unstained)	
17	Προσθέτουμε στο stained σωληνάριο τους κατάλληλους όγκους μονοκλωνικών σύμφωνα με το πλάνο στον πυθμένα του σωληναρίου	
18	Προσθέτουμε 100 μl PBMCs και στα δύο σωληνάρια (προσέχουμε να μην ακουμπήσει το tip στα μονοκλωνικά και όλη η ποσότητα των PBMCs να πάει στον πυθμένα του σωληναρίου)	
19	Αναμειγνύουμε με ανάδευση και επώαζουμε για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι	
20	Προσθέτουμε 2 ml υγρού λύσεως 1: 10 (1 μέρος FACS Lysing Solution και 9 μέρη dH <sub>2</sub> O)	
21	Αναμειγνύουμε με ανάδευση και επώαζουμε 10 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι	
22	Φυγοκεντρούμε για 5 min στις 1200 στροφές/min σε θερμοκρασία δωματίου	
23	Αποχύνουμε το υπερκείμενο με προσοχή να μην αναδευτούν τα κύτταρα	
24	4 <sup>η</sup> πλύση: προσθέτουμε 2 ml Cell Wash και αναμειγνύουμε με ανάδευση	
25	Φυγοκεντρούμε για 5 min στις 1200 στροφές/min σε θερμοκρασία δωματίου	
26	Αποχύνουμε το υπερκείμενο με προσοχή να μην αναδευτούν τα κύτταρα	

27	Προσθέτουμε 400 μl Cell Fix	
28	Αναμειγνύουμε καλά με ανάδευση	
29	Μέχρι να γίνει η ανάλυση στον κυτταρομετρητή τα βαμμένα κύτταρα φυλάσσονται στους 4°C στο σκοτάδι	

Εικόνα 13. Μέθοδος χρώσης EPCs – Στάδιο 2

### 2.5.3. Συλλογή και ανάλυση δεδομένων

Η ανάλυση των δεδομένων διενεργήθηκε με το λογισμικό του κυτταρομετρητή FACS. (Εικόνα 14) Οι μετρήσεις για κάθε εξεταζόμενο αποτελούν υπολογισμό απόλυτου αριθμού κυττάρων ο οποίος αποκτήθηκε κατόπιν συλλογής δεδομένων από  $1 \times 10^6$  κύτταρα ανά δείγμα. Εν συνεχεία ακολουθήθηκε μία ιεραρχική στρατηγική ανάλυσης με σκοπό να προσδιορισθούν κύτταρα που δεν εκφράζουν ή που εκφράζουν ασθενώς το δείκτη CD45 (CD45<sup>dim</sup>).



Εικόνα 14. Κυτταρομετρητής BD FACSCanto II™, BD Biosciences

Ο φθορισμός των κυττάρων μετρήθηκε αμέσως και η συλλογή των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με κυτταρόμετρο ροής υψηλής απόδοσης έξι χρωμάτων (BDFACSCanto™, BD Biosciences). Η ανάλυση δεδομένων έγινε σύμφωνα με το λογισμικό FACS DIVA. Συλλέχθηκαν δεδομένα από 1,000,000 συμβάντα ανά δείγμα και μετρήθηκε ο απόλυτος αριθμός κυττάρων που ελήφθησαν από αυτά. Αποκτήθηκε ένας ελάχιστος αριθμός 100 συμβάντων CD34<sup>+</sup> σύμφωνα με τις συστάσεις. Στην περίπτωση συλλογής λιγότερων από 1.000.000 συμβάντων, γινόταν χρώση κυττάρων με την προαναφερθείσα μεθοδολογία σε

ένα δεύτερο σωληνάριο και τα αποκτηθέντα συμβάντα προσαρτούνταν μέχρι επίτευξη του απαιτούμενου συνόλου.

Η οριοθέτηση της κατάλληλης περιοχής ως κατωφλιού χαμηλής πλευρικής σκέδασης (χαμηλό SSC) και η ασθενής έκφραση CD45<sup>dim</sup> βασίστηκαν στο τροποποιημένο πρωτόκολλο ISHAGE. [230]

Το σύστημα BD FACS 7-Color Setup Beads βρισκόταν σε καθημερινή χρήση προκειμένου να γίνεται έλεγχος των ρυθμίσεων και ελαχιστοποιείται η πιθανότητα διαρροών κατά τη εκτέλεση των διαδικασιών.

Τα BD™ stem cell controls με υψηλό και χαμηλό αριθμό CD34<sup>+</sup> αιμοποιητικών προγονικών κύτταρων χρησιμοποιούνταν καθημερινά. Τα BD FACSDiva™ CS & T Beads χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο σε τακτική βάση για τον έλεγχο της απόδοσης του κυτταρομετρητή.

Πραγματοποιήθηκε ιεραρχική οριοθέτηση (gating) που κατά τη μέτρηση επιτρέπει την εξαίρεση ζευγών κυττάρων – και άρα ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων- ακολουθώντας τη στρατηγική διαδοχικής οριοθέτησης του τροποποιημένου πρωτόκολλου ISHAGE που περιγράφεται παρακάτω, και έχει χρησιμοποιηθεί και σε άλλες μελέτες. [280][230]

Οι φαινότυποι των EPCs, προσδιορίζονται ως συνδυασμοί συν-έκφρασης των παραπάνω επιφανειακών δεικτών σε μεμονωμένα κύτταρα, και ποσοτικοποιούνται σε απόλυτους αριθμούς καθώς αυτά τα κύτταρα μπορούν να είναι υποπληθυσμός των κυττάρων CD34<sup>+</sup> που έχουν χαμηλή έκφραση του CD45 (dim) και μόνο, και όχι άλλος πληθυσμός κυττάρων.

Για την ακριβή αντιστοίχιση της συν-έκφρασης των φαινοτύπων πολλαπλών αντιγόνων σε μεμονωμένα κύτταρα εφαρμόστηκε η στρατηγική Boolean gating.

Ως CPCs ορίστηκαν τα κύτταρα που εκφράζουν τον φαινότυπο:

CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>, δηλαδή τα κύτταρα που εκφράζουν στην επιφάνειά τους δείκτες CD45, CD34 και CD133.

Για την ταυτοποίηση των διαφορετικών φαινοτύπων των EPCs χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι συνδυασμοί δεικτών :

CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>,

CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD309<sup>+</sup>,

CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>,

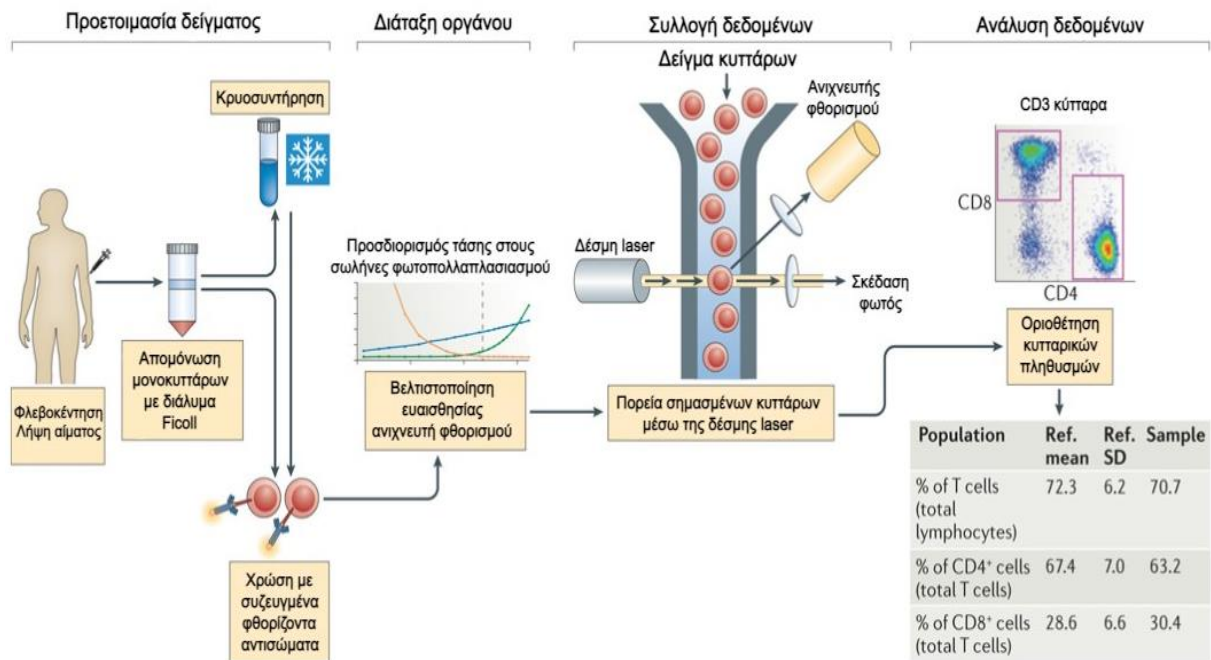
CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD309<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>,

CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD309<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> and

CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD309<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>.

Στην Εικόνα 15 απεικονίζονται τα βήματα της μεθοδολογίας για την απομόνωση των κυττάρων και του ποσοτικού προσδιορισμού EPCs που περιγράφηκαν αναλυτικά.





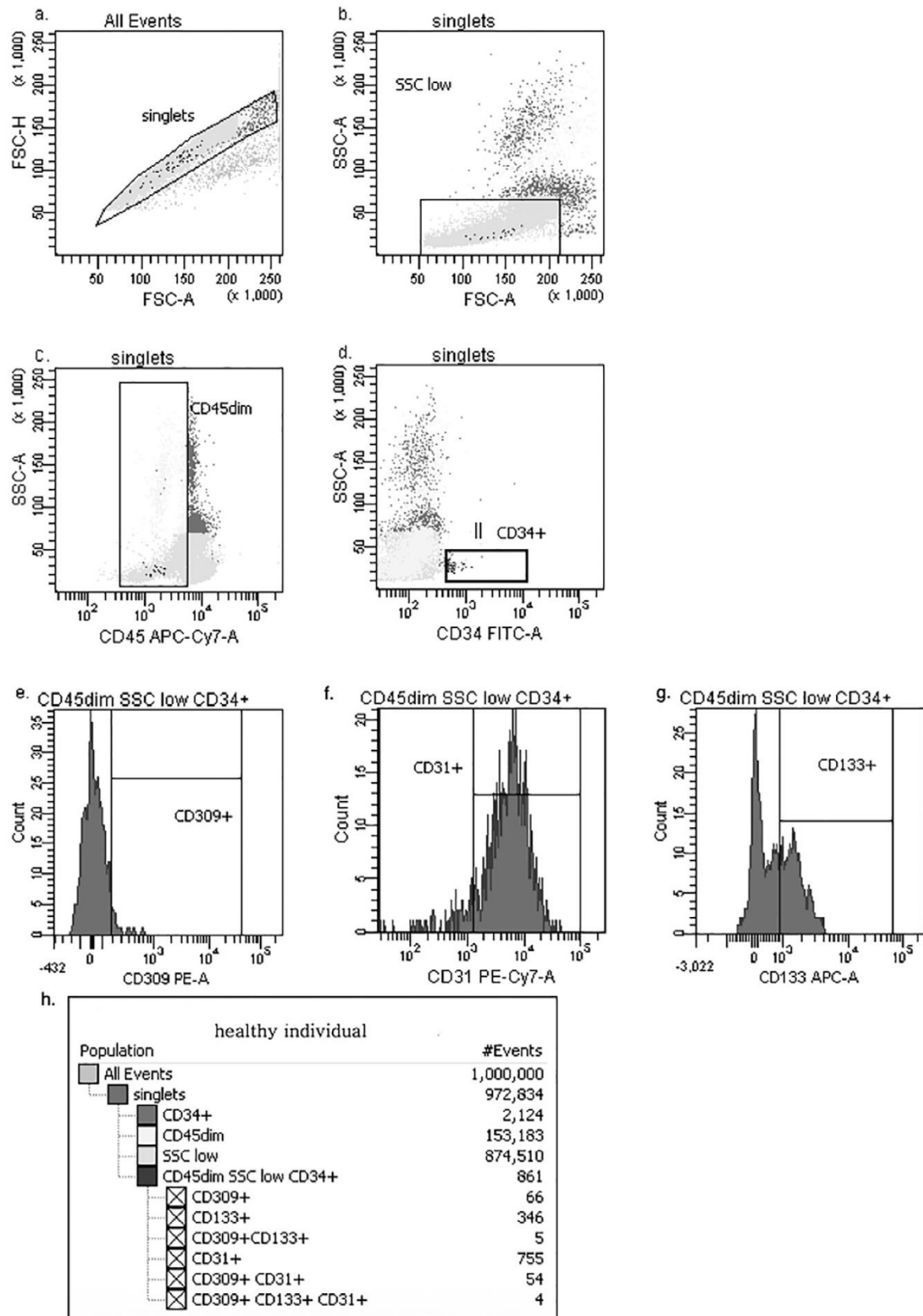
Εικόνα 15. Η τεχνική απομόνωσης κυττάρων με κυτταρομετρία ροής

Nat Rev Immunol. 2012 Feb 17 12(3): 191-200

Η προετοιμασία του δείγματος για την απομόνωση των PBMCs από το αίμα περιλαμβάνει λύση των μονοπύρηνων κυττάρων με λυτικό διάλυμα και φυγοκέντρηση κλίσης και μερικές φορές κρυσσαυτήρηση πριν από τη χρώση με φθοριοχρώματα. Η ρύθμιση του κυτταρόμετρου περιλαμβάνει τη ρύθμιση της τάσης στις σωληνώσεις του φωτοπολλαπλασιαστή, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η βέλτιστη ευαισθησία.

Η απόκτηση δεδομένων περιλαμβάνει τη διέλευση των σημασμένων κυττάρων μέσω μιας δέσμης λέιζερ και την καταγραφή της εκπομπής φθορισμού από όλα τα συζευγμένα αντισώματα. Ακολουθεί ανάλυση δεδομένων, στην οποία καθορίζονται και αναφέρονται οι πληθυσμοί κυττάρων που ενδιαφέρουν.

Στην Εικόνα 16 απεικονίζεται η διαδικασία της ανάλυσης δεδομένων σε υγιή εξεταζόμενο βήμα προς βήμα.



Εικόνα 16. Αντιπροσωπευτική εικόνα ποσοτικού προσδιορισμού των CPCs/EPCs ενός υγιούς ατόμου με κυτταρομετρία ροής

- a. Αρχική οριοθέτηση (gating). Συλλέχτηκαν 1.000.000 συμβάντα (όλα τα γεγονότα) και τοποθετήθηκαν σε δισδιάστατο γράφημα – στικτόγραμμα με την πρόσθια σκέδαση, όπου στον οριζόντιο άξονα τοποθετήθηκε η forward scatter-area (FSC-A) έναντι forward scatter-high (FSC-H) στον κατακόρυφο άξονα. Οι διπλέτες (doublets) αποκλείστηκαν και αναλύθηκαν τα μοναδικά κύτταρα.
- b. Τα μοναδικά κύτταρα τοποθετήθηκαν σε στικτόγραμμα με οριζόντιο άξονα την πρόσθια σκέδαση (FSC-A) και κατακόρυφο άξονα την πλάγια σκέδαση (SSC-A) ώστε να περιλαμβάνονται μόνο κύτταρα με χαμηλή πλάγια σκέδαση (κύτταρα χαμηλής κοκκιοποίησης).
- c. Τα μοναδικά κύτταρα τοποθετήθηκαν σε στικτόγραμμα CD45 έναντι πλευρικής περιοχής διασποράς πλάγιας σκέδασης στον κατακόρυφο άξονα (SSC-A) ώστε να περιλαμβάνονται μόνο CD45<sup>dim</sup> κύτταρα.
- d. Τα μοναδικά κύτταρα τοποθετήθηκαν σε στικτόγραμμα CD34 έναντι πλευρικής περιοχής διασποράς πλάγιας σκέδασης στον κατακόρυφο άξονα (SSC-A) ώστε να περιλαμβάνονται μόνο CD34<sup>+</sup> κύτταρα.
- e. Έκφραση CD309 σε CD45<sup>dim</sup>/side scatter low CD34<sup>+</sup> κύτταρα.
- f. Έκφραση CD31 στα CD45<sup>dim</sup> / side scatter low CD34<sup>+</sup> κύτταρα.
- g. Έκφραση CD133 σε CD45<sup>dim</sup> /side scatter low/CD34<sup>+</sup> κύτταρα.
- h. Η ιεράρχηση των πληθυσμών που εκτελείται από το λογισμικό BD FACS (Fluorescence - Activated Cell Sorting) Diva.

Η στρατηγική του Boolean gating εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό της συνέκφρασης πολλαπλών δεικτών επιφάνειας.

CPCs: κυκλοφορούντα προγονικά κύτταρα,

EPCs: ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα,

FSC Forward Scattering: πρόσθια σκέδαση, σκέδαση παράλληλα με τη δέσμη laser,

SSC Side Scattering: πλάγια σκέδαση, σκέδαση κάθετα στη δέσμη laser.

## 2.5.4. Πρωτόκολλο ISHAGE – Τυποποιημένο και τροποποιημένο πρωτόκολλο ISHAGE

### 2.5.4.1. Τυποποιημένο πρωτόκολλο ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering)

Λαμβάνοντας υπόψη την κατανομή Poisson των σπάνιων γεγονότων, είναι υποχρεωτική η απόκτηση ενός πολύ μεγάλου αριθμού συνολικών συμβάντων (1.000.000-2.000.000) προκειμένου να συγκεντρωθεί ένας αντιπροσωπευτικός αριθμός CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>/CD45<sup>dim</sup> κυττάρων.

Η ανασκόπηση των Estes και συν. έδειξε ότι με την χρήση διαδοχικών οριοθετήσεων (gating) η ακρίβεια στον ποσοτικό προσδιορισμό των EPCs και στην ταυτοποίηση νέων υποπληθυσμών EPCs είναι αυξημένη. [287] Οι Schmidt-Lucke και συν. ανέπτυξαν και εφάρμοσαν ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο του τυποποιημένου ISHAGE για απαρίθμηση των CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>/CD45<sup>dim</sup> κυττάρων. [230]

**Το τυποποιημένο πρωτόκολλο ISHAGE** έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε πολυκεντρικές δοκιμές για την ανίχνευση των CD34 αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων σε αιματολογικές μελέτες. [230] Αυτό το πρωτόκολλο διαμορφώθηκε προκειμένου να διευκολυνθεί η ακριβέστερη απαρίθμηση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων με χρήση διαδοχικών οριοθετήσεων και η ασθενής (αμυδρή) έκφραση του CD45, [288] και καθιστά δυνατή τη σύγκριση κλινικών και εργαστηριακών δεδομένων. [230][149]

Με την χρήση του τροποποιημένου πρωτοκόλλου αυτού, επιτυγχάνεται με πολύ μεγάλη ακρίβεια ο εντοπισμός των υποπληθυσμών των EPCs. [230] Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιείται ακολουθώντας στρατηγική διαδοχικής οριοθέτησης και τα κύτταρα CD34<sup>+</sup> υποδιαίρονται επιπλέον σε υποπληθυσμούς CD45<sup>dim</sup> και CD45<sup>bright</sup>.

#### 2.5.4.2. Τροποποιημένο πρωτόκολλο ISHAGE

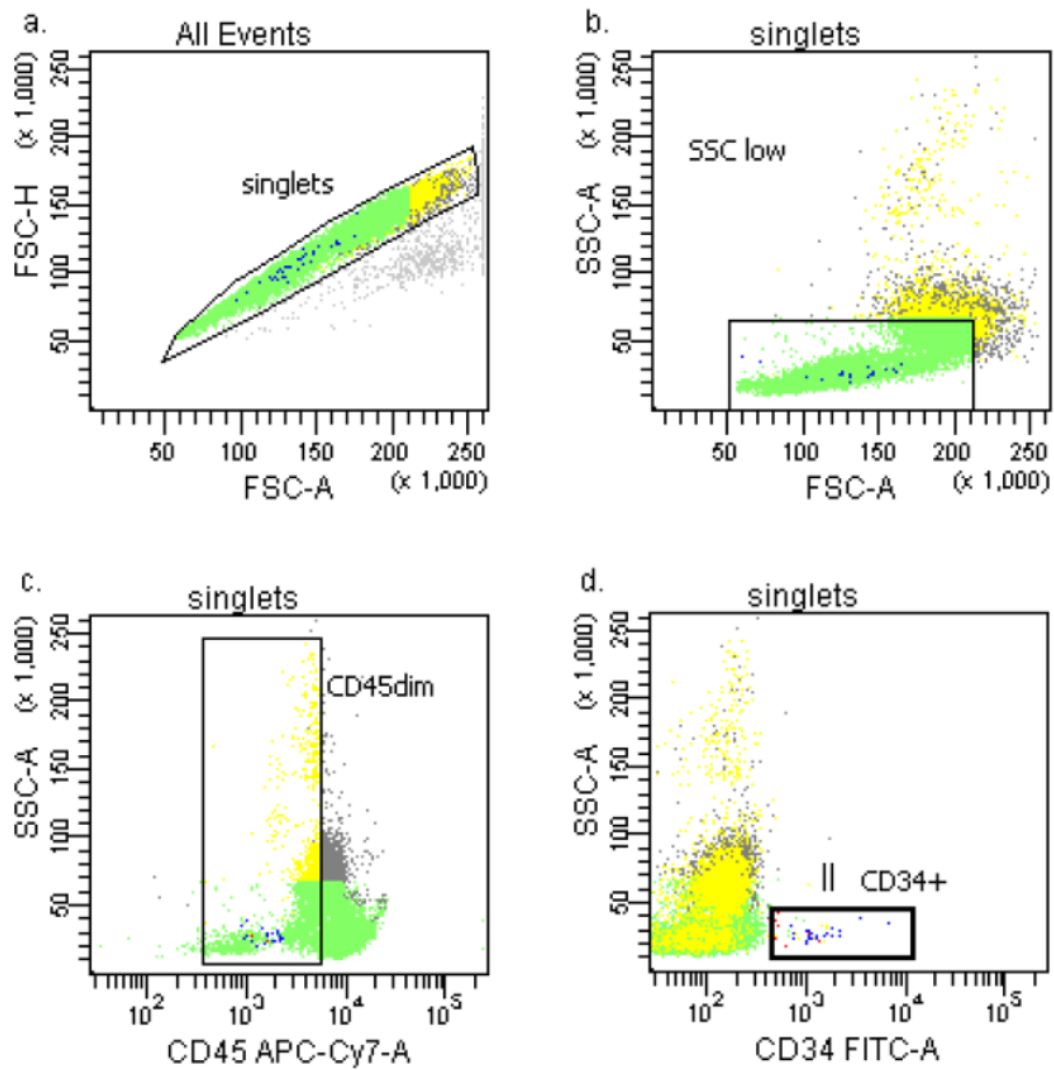
Μια αρχική οριοθέτηση (πύλη) ρυθμίζεται σε ένα δισδιάστατο γράφημα CD45 – στικτόγραμμα τοποθετώντας στον κατακόρυφο άξονα την πλάγια σκέδαση (SSC) ώστε να περιέχονται όλα τα συμβάντα CD45<sup>+</sup> συμπεριλαμβανομένων των CD45<sup>dim</sup> και CD45<sup>bright</sup>. Το κατώτερο όριο έκφρασης του CD45 προσαρμόζεται στο ιστόγραμμα αυτό, έναντι του CD34 στον κατακόρυφο άξονα, και η οριοθέτηση περιέχει επίσης μια πύλη, η οποία ορίζει τα SSC low CD45<sup>bright</sup> κύτταρα.

Τα συμβάντα εμφανίζονται στη συνέχεια σε ένα διάγραμμα σημείων CD34 έναντι πλάγιας σκέδασης SSC και παράγεται μια δεύτερη πύλη που περιλαμβάνει το σύμπλεγμα συμβάντων CD34<sup>+</sup>. Η τρίτη οριοθέτηση λαμβάνεται με τη γραφική παράσταση των συμβάντων που πληρούν τα κριτήρια των δύο πρώτων πυλών (δηλαδή διαδοχική οριοθέτηση). Τα κύτταρα τα οποία ταυτοχρόνως εμφανίζουν χαμηλή πλάγια σκέδαση SSC και χαμηλό φθορισμό CD45 (SSC low CD45<sup>dim</sup> κύτταρα) περικλείονται στην τρίτη αυτή οριοθέτηση. Για τη διαφοροποίηση μεταξύ των κυττάρων CD45<sup>dim</sup> και CD45<sup>bright</sup>, το δεξί περιθώριο των κυττάρων CD34<sup>+</sup> στη δεύτερη οριοθέτηση χρησιμεύει ως όριο.

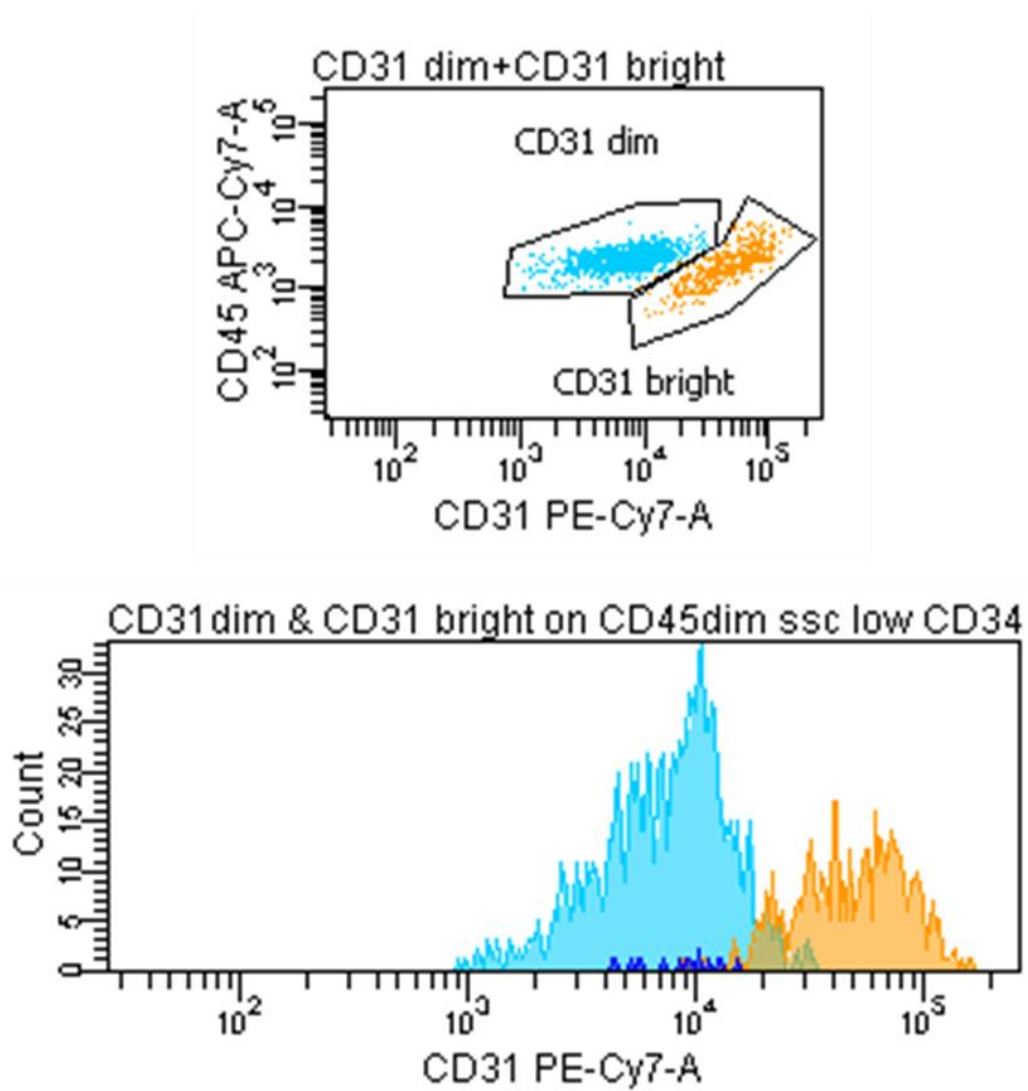
Στο στάδιο αυτό έχουν προσδιορισθεί τα CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>dim</sup> κύτταρα με την ιεραρχική οριοθέτηση. Τέλος, τα συμβάντα που πληρούν τα κριτήρια και των τριών πυλών εμφανίζονται στη συνέχεια σε ένα διάγραμμα πρόσθιας σκέδασης φωτός (FSC) έναντι πλάγιας σκέδασης φωτός (SSC). Τα κύτταρα CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> απομονώνονται από το επάνω δεξιό τεταρτημόριο της τελικής γραφικής παράστασης. [230]

Στην Εικόνα 17 και Εικόνα 18 φαίνεται η οριοθέτηση κατά στάδια βάση τροποποιημένου πρωτοκόλλου ISHAGE και στη συνέχεια η ανάλυση δεδομένων για:

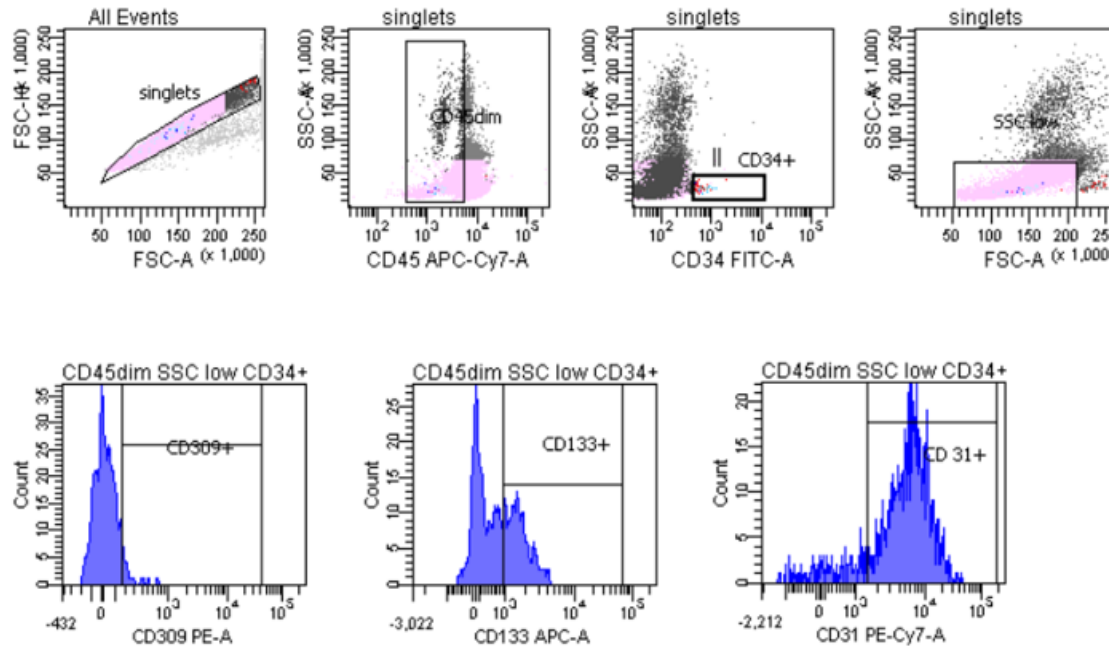
- υγιή εξεταζόμενο, (Εικόνα 19)
- ασθενή με Σ.Δ. χωρίς Δ.Π.Ν. (Εικόνα 20) και
- ασθενή με Σ.Δ. και Δ.Π.Ν. (Εικόνα 21)



Εικόνα 17. Στάδια οριοθέτησης κατά ISHAGE (gating)



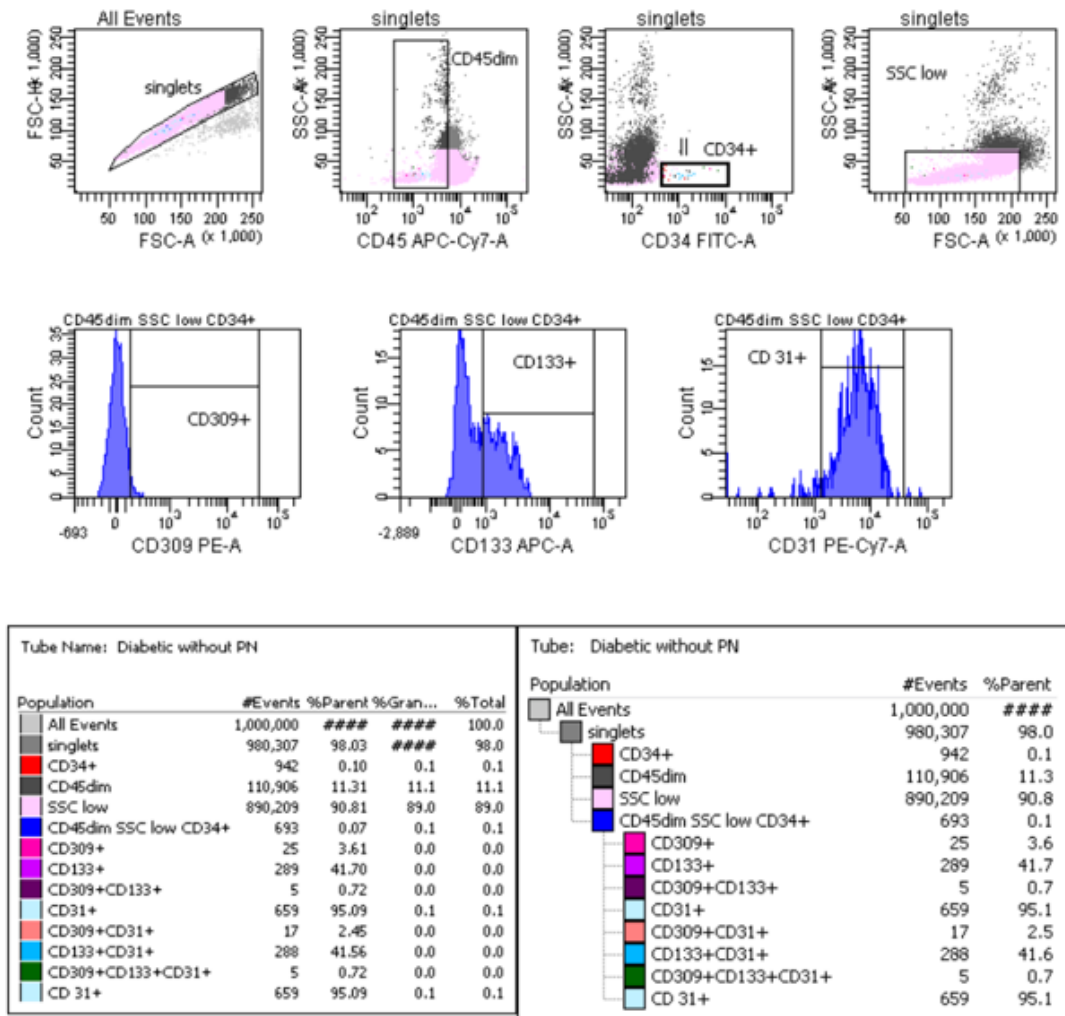
Εικόνα 18. Στάδια οριοθέτησης κατά ISHAGE (gating)



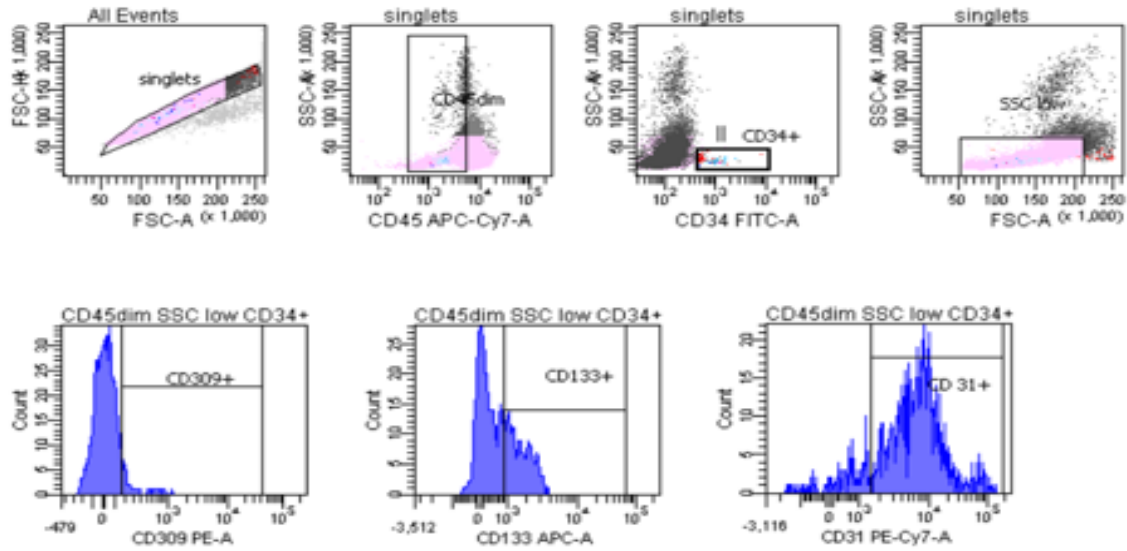
Tube Name: Non-Diabetic Control					Tube: Non-Diabetic Control				
Population	#Events	%Parent	%Gran...	%Total	Population	#Events	%Parent		
All Events	1,000,000	####	####	100.0	All Events	1,000,000	####		
singlets	972,834	97.28	####	97.3	singlets	972,834	97.3		
CD34+	2,124	0.22	0.2	0.2	CD34+	2,124	0.2		
CD45dim	153,183	15.75	15.3	15.3	CD45dim	153,183	15.7		
SSC low	874,510	89.89	87.5	87.5	SSC low	874,510	89.9		
CD45dim SSC low CD34+	861	0.09	0.1	0.1	CD45dim SSC low CD34+	861	0.1		
CD309+	66	7.67	0.0	0.0	CD309+	66	7.7		
CD133+	346	40.19	0.0	0.0	CD133+	346	40.2		
CD309+CD133+	5	0.58	0.0	0.0	CD309+CD133+	5	0.6		
CD31+	740	85.95	0.1	0.1	CD31+	740	85.9		
CD309+CD31+	53	6.16	0.0	0.0	CD309+CD31+	53	6.2		
CD133+CD31+	340	39.49	0.0	0.0	CD133+CD31+	340	39.5		
CD309+CD133+CD31+	4	0.46	0.0	0.0	CD309+CD133+CD31+	4	0.5		
CD 31+	740	85.95	0.1	0.1	CD 31+	740	85.9		

Εικόνα 19. Ανάλυση δεδομένων για υγιή εξεταζόμενο





Εικόνα 20. Ανάλυση δεδομένων για ασθενή με ΣΔ χωρίς ΔΠΝ.



Tube Name: Diabetic with PN					Tube: Diabetic with PN		
Population	#Events	%Parent	%Gran...	%Total	Population	#Events	%Parent
All Events	1,000,000	####	####	100.0	All Events	1,000,000	####
singlets	956,489	95.65	####	95.6	singlets	956,489	95.6
CD34+	2,315	0.24	0.2	0.2	CD34+	2,315	0.2
CD45dim	142,784	14.93	14.3	14.3	CD45dim	142,784	14.9
SSC low	844,215	88.26	84.4	84.4	SSC low	844,215	88.3
CD45dim SSC low CD34+	958	0.10	0.1	0.1	CD45dim SSC low CD34+	958	0.1
CD309+	92	9.60	0.0	0.0	CD309+	92	9.6
CD133+	341	35.59	0.0	0.0	CD133+	341	35.6
CD309+CD133+	8	0.84	0.0	0.0	CD309+CD133+	8	0.8
CD31+	835	87.16	0.1	0.1	CD31+	835	87.2
CD309+CD31+	85	8.87	0.0	0.0	CD309+CD31+	85	8.9
CD133+CD31+	320	33.40	0.0	0.0	CD133+CD31+	320	33.4
CD309+CD133+CD31+	8	0.84	0.0	0.0	CD309+CD133+CD31+	8	0.8
CD 31+	834	87.06	0.1	0.1	CD 31+	834	87.1

Εικόνα 21. Ανάλυση δεδομένων για ασθενή με ΣΔ και ΔΠΝ

## 2.6. Στατιστική ανάλυση

Όλα τα δεδομένα καταχωρήθηκαν σε ηλεκτρονική βάση δεδομένων, για τη στατιστική επεξεργασία. Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS 24.0 (Statistical Package for the Social Sciences IBM SPSS software version 24.0 for Windows, Armonk, NY, USA) για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

Αρχικά έγινε έλεγχος της κανονικότητας των μεταβλητών με το τεστ Kolmogorov-Smirnov. Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση (standard deviation, SD), ή ως διάμεσος τιμή με το ενδο-τεταρτημοριακό εύρος (25% - 75%).

Για τη σύγκριση των κατηγορικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε το Chi-square test ή/και το Fisher's exact test.

Για τη σύγκριση ανάμεσα στις ομάδες των δεδομένων με κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε το student's t-test ή one-way analysis of variance (ANOVA).

Εκτελέστηκαν post-hoc αναλύσεις για τη διάκριση διαφορών ανάμεσα στις τρεις ομάδες εξεταζομένων. Για την ισότητα των διακυμάνσεων ανάμεσα στις 3 ομάδες χρησιμοποιήθηκε το Levene's test. Όπου η υπόθεση ίσων διακυμάνσεων έγινε δεκτή, εφαρμόστηκε Διόρθωση κατά Bonferroni με πολλαπλές συγκρίσεις προκειμένου να διορθωθεί το σφάλμα τύπου Α. Όπου απορρίφθηκε η υπόθεση ίσων διακυμάνσεων πραγματοποιήθηκε το Dunnett's T3 test.

Για τη σύγκριση των μεταβλητών με μη κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε το Mann-Whitney U test ή το Kruskal-Wallis H test.

Οι διμεταβλητές συσχετίσεις για τις συνεχείς μεταβλητές έγιναν με το συντελεστή συσχέτισης Pearson ή το συντελεστή συσχέτισης Spearman, σύμφωνα με τις ειδικές ενδείξεις.

Ο συντελεστής μερικής συσχέτισης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της επίδρασης άλλων πιθανών μεταβλητών.

Οι τιμές σημαντικότητας (τιμή του κριτηρίου P)  $p$  values  $< 0.05$ , θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

## 2.7. Αποτελέσματα

### 2.7.1. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά

Τα κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ομάδων μελέτης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10)

- Οι υγιείς συμμετέχοντες είχαν χαμηλότερο BMI, είχαν λιγότερο συχνά αρτηριακή υπέρταση, λάμβαναν λιγότερο συχνά στατίνες, και είχαν χαμηλότερο ACR, συγκρινόμενοι με τους ασθενείς με και χωρίς ΔΠΝ.
- Στο σύνολο των ασθενών με ΣΔ, η μόνη διαφορά ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς ήταν η υψηλότερη τιμή του ACR στους ασθενείς με ΔΠΝ, παρά το γεγονός ότι ο αριθμός των ασθενών με μικροαλβουμινουρία δε διέφερε ανάμεσα στους ασθενείς με ΔΠΝ και χωρίς.
- Η χρήση φαρμακευτικής αγωγής με στατίνες, αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου αγγειοτασίνης ή ανταγωνιστές του υποδοχέα αγγειοτασίνης II, μετφορμίνη, αναστολείς DPP4 και ινσουλίνη, τα οποία θα μπορούσαν να επηρεάσουν τον αριθμό των EPCs δε διέφερε ανάμεσα στις δύο ομάδες ασθενών με ΣΔ.
- Στην ομάδα των ασθενών με ΣΔ και ΔΠΝ δεκαπέντε ασθενείς ανέφεραν επώδυνα συμπτώματα.

Πίνακας 10. Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα των τριών ομάδων

	Με ΔΠΝ (group 1) n=50	Χωρίς ΔΠΝ (group 2) n=30	controls (group 3) n=25	p all groups	p 1 vs. 2	p 1 vs. 3	p 2 vs. 3
Φύλο (άρρενες) n (%)	24 (48.0)	16 (53.3)	9 (36.0)	0.424 <sup>†</sup>	-	-	-
Ηλικία (έτη)	62.5 ± 8.1	61.1 ± 7.8	61.7 ± 10.8	0.774*	-	-	-
Διάρκεια ΣΔ (έτη)	12.5 (7.8, 20.0)	13.0 (5.0, 20.0)	-	-	0.403 <sup>†</sup>	-	-
Βάρος (kg)	93.8 ± 16.7	88.5 ± 16.7	76.5 ± 14.7	<b>&lt;0.001*</b>	0.185 <sup>#</sup>	<b>&lt;0.001<sup>#</sup></b>	<b>0.009<sup>#</sup></b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31.4 ± 5.2	32.2 ± 6.0	25.8 ± 3.8	<b>0.005*</b>	0.753 <sup>#</sup>	<b>0.011<sup>#</sup></b>	<b>0.002<sup>#</sup></b>
Περίμετρος μέσης (cm)	111.4 ± 12.6	107.9 ± 13.6	100.5 ± 10.5	<b>0.009*</b>	0.283 <sup>#</sup>	<b>0.002<sup>#</sup></b>	<b>0.051<sup>#</sup></b>
ΣΑΠ (mmHg)	143.6 ± 20.7	142.4 ± 19.8	129.9 ± 17.4	<b>0.023*</b>	0.803 <sup>#</sup>	<b>0.008<sup>#</sup></b>	<b>0.021<sup>#</sup></b>
ΔΑΠ (mmHg)	88.2 ± 13.1	86.6 ± 9.8	81.0 ± 9.7	0.056*	-	-	-
Υπέρταση n (%)	39 (78.0)	20 (66.7)	4 (16.0)	<b>&lt;0.001<sup>†</sup></b>	0.265 <sup>×</sup>	<b>&lt;0.001<sup>×</sup></b>	<b>&lt;0.001<sup>×</sup></b>
Λήψη ACEi ή ARBs n (%)	34 (68.0)	20 (66.7)	4 (16.0)	<b>&lt;0.001<sup>†</sup></b>	0.902 <sup>×</sup>	<b>&lt;0.001<sup>×</sup></b>	<b>&lt;0.001<sup>×</sup></b>
HbA1c (%)	6.4 (5.9, 7.1)	6.7 (6.1, 7.4)	5.4 (5.3, 5.5)	<b>&lt;0.001<sup>^</sup></b>	0.336 <sup>†</sup>	<b>&lt;0.001<sup>†</sup></b>	<b>&lt;0.001<sup>†</sup></b>
Γλυκόζη (mg/dl)	121.5 ± 36.0	127.7 ± 26.4	89.5 ± 11.4	<b>&lt;0.001*</b>	0.426 <sup>#</sup>	<b>&lt;0.001<sup>#</sup></b>	<b>&lt;0.001<sup>#</sup></b>
Λήψη μετφορμίνης n (%)	43 (86.0)	28 (93.3)	-	-	0.471 <sup>×</sup>	-	-
Λήψη DPP4i n (%)	17 (34.0)	8 (26.7)	-	-	0.493 <sup>×</sup>	-	-
Λήψη ινσουλίνης n (%)	23 (46.0)	9 (30.0)	-	-	0.157 <sup>×</sup>	-	-
Ουρικό οξύ (mg/dl)	5.3 (4.4, 6.3)	5.6 (5.2, 6.5)	4.7 (3.8, 5.8)	0.056 <sup>^</sup>	-	-	-
Ολική χοληστερόλη(mg/dl)	172.1 ± 48.0	188.3 ± 52.4	200.2 ± 35.2	<b>0.049*</b>	0.163 <sup>#</sup>	<b>0.014<sup>#</sup></b>	0.358 <sup>#</sup>
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	98.8 ± 41.8	118.0 ± 46.4	121.1 ± 33.3	<b>0.047*</b>	0.063 <sup>#</sup>	<b>0.028<sup>#</sup></b>	0.790 <sup>#</sup>
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	49.8 ± 12.0	46.2 ± 11.9	57.6 ± 14.0	<b>0.006*</b>	0.204 <sup>#</sup>	<b>0.018<sup>#</sup></b>	<b>0.003<sup>#</sup></b>
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	123.0 (72.0, 157.0)	127.0 (106.0, 147.5)	106.0 (73.0, 147.0)	0.155 <sup>^</sup>	-	-	-
Λήψη στατινών n (%)	31 (62.0)	22 (73.3)	6 (24.0)	<b>&lt;0.001<sup>†</sup></b>	0.299 <sup>×</sup>	<b>0.002<sup>×</sup></b>	<b>&lt;0.001<sup>×</sup></b>
Αμφιβληστροειδοπάθεια	10 (20.0)	4 (13.3)	0	-	0.447 <sup>×</sup>	-	-

	Με ΔΠΝ (group 1) n=50	Χωρίς ΔΠΝ (group 2) n=30	controls (group 3) n=25	p all groups	p 1 vs. 2	p 1 vs. 3	p 2 vs. 3
n (%)							
ACR (mg/gr)	15.2 (6.3, 39.5)	6.5 (3.1, 26.5)	5.0 (3.0, 11.2)	<b>0.005<sup>^</sup></b>	<b>0.048<sup>†</sup></b>	<b>0.001<sup>†</sup></b>	0.394 <sup>†</sup>
Μικρολευκωματινουρία n (%)	15 (30.0)	7 (23.3)	8 (8.7)	0.742 <sup>‡</sup>	-	-	-
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	101.2 (80.0, 114.2)	94.2 (79.9, 102.4)	83.0 (76.6, 88.3)	<b>0.005<sup>^</sup></b>	0.215 <sup>†</sup>	<b>0.002<sup>†</sup></b>	<b>0.022<sup>†</sup></b>
Νεφροπάθεια n (%)	16 (32.0)	7 (23.3)	2 (8.0)	0.071 <sup>‡</sup>	-	-	-
NSS	6 (4, 7)	0 (0, 4)	0	<b>&lt;0.001<sup>^</sup></b>	<b>&lt;0.001<sup>†</sup></b>	<b>&lt;0.001<sup>†</sup></b>	<b>&lt;0.001<sup>†</sup></b>
NDS	6 (4, 6)	0 (0, 0)	0	<b>&lt;0.001<sup>^</sup></b>	<b>&lt;0.001<sup>†</sup></b>	<b>&lt;0.001<sup>†</sup></b>	0.114 <sup>†</sup>

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως n (%), μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση ή διάμεσος τιμή με το ενδο-τεταρτημοριακό εύρος (25% - 75%).

Τιμές σημαντικότητας (p values):

\* p values για συγκρίσεις ανάμεσα στις 3 ομάδες με one-way analysis of variance(ANOVA).

<sup>^</sup> p values για συγκρίσεις ανάμεσα στις 3 ομάδες με Kruskal-Wallis H test.

<sup>‡</sup>p values για συγκρίσεις ανάμεσα στις 3 ομάδες με Chi-squared test.

# p values για post-hoc συγκρίσεις μεταξύ ζευγών ομάδων (1 έναντι 2, 1 έναντι 3, 2 έναντι 3) με Bonferroni rule ή Dunnett's T3 test.

<sup>†</sup>p values για συγκρίσεις ανάμεσα σε ζεύγη ομάδων (έναντι 2, 1 έναντι 3, 2 έναντι 3) με Mann-Whitney U test.

<sup>x</sup> p valuesγια συγκρίσεις μεταξύ ζευγών ομάδων (έναντι 2, 1 έναντι 3, 2 έναντι 3) με Chi-squared test.

ΔΠΝ: Διαβητική περιφερική νευροπάθεια, ΣΔ: Σακχαρώδης Διαβήτης, BMI: body mass index, Δείκτης μάζας σώματος, ΣΑΠ: Συστολική αρτηριακή πίεση, ΔΑΠ: Διαστολική αρτηριακή πίεση, ACEi: angiotensin converting enzyme inhibitors, (Αμεα: Αναστολείς μετατρεπτικού ενζύμου αγγειοτασίνης) ARBs: angiotensin II receptor antagonists (ανταγωνιστές υποδοχέων αγγειοτασίνης), HbA1c: γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη, DPP4i: dipeptidylpeptidase 4 inhibitors (αναστολείς της διπεπτιδυλικής πεπτιδάσης 4)LDL: low density lipoprotein (λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας), HDL: high density lipoprotein (λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας), ACR: albumin to creatinine ratio (λόγος αλβουμίνης προς κρεατινίνη), eGFR:

estimated glomerular filtration rate, NSS: neuropathy symptom score (δείκτης ευρημάτων νευροπάθειας), NDS: neuropathy disability score (δείκτης συμπτωμάτων νευροπάθειας).

### 2.7.2. CPCs και φαινότυποι των EPCs

Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στον αριθμό των CPCs ανάμεσα στις τρεις ομάδες εξεταζομένων, ενώ όλοι οι φαινότυποι EPCs διέφεραν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ανάμεσα στις 3 ομάδες (πίνακας 8).

Η υποανάλυση έδειξε ότι:

- Οι ασθενείς με ΣΔ και ΔΠΝ είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο αριθμό και των 6 φαινοτύπων EPCs σε σύγκριση με τους ασθενείς με ΣΔ χωρίς ΔΠΝ.
- Σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες οι ασθενείς με ΣΔ και ΔΠΝ είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο αριθμό 5 φαινοτύπων EPCs, ενώ υπήρχε μία τάση για στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD309<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> κυττάρων.
- Οι φαινότυποι των EPCs δε διέφεραν μεταξύ των υγιών μαρτύρων και των ασθενών με ΣΔ χωρίς ΔΠΝ.

Στον πίνακα παρακάτω (Πίνακας 11), φαίνονται οι φαινότυποι CPCs και EPCs όλων των ομάδων.

Πίνακας 11. Φαινότυποι CPCs and EPCs όλων των ομάδων

	Με ΔΠΝ (group 1) n=50	Χωρίς ΔΠΝ (group 2) n=30	controls (group 3) n=25	p all groups	p 1 vs. 2	p 1 vs. 3	p 2 vs. 3
CD45 <sup>dim</sup> /CD34 <sup>+</sup> /CD133 <sup>+</sup> (CPCs)	304.5 (199.8, 442.0)	235.0 (116.0, 302.3)	241.0 (167.5, 354.5)	0.164 <sup>^</sup>	-	-	-
CD45 <sup>dim</sup> /CD34 <sup>+</sup>	1196.5 (703.0, 2342.3)	754.0 (456.5, 1006.0)	571.0 (414.0, 1346.0)	<b>0.011<sup>^</sup></b>	<b>0.014<sup>†</sup></b>	<b>0.014<sup>†</sup></b>	0.774 <sup>†</sup>
CD45 <sup>dim</sup> /CD34 <sup>+</sup> /CD309 <sup>+</sup>	195.0 (34.5, 433.0)	49.0 (20.0, 107.3)	30.0 (23.5, 243.5)	<b>0.020<sup>^</sup></b>	<b>0.013<sup>†</sup></b>	<b>0.036<sup>†</sup></b>	0.933 <sup>†</sup>
CD45 <sup>dim</sup> /CD34 <sup>+</sup> /CD31 <sup>+</sup>	1084.5 (657.5, 2116.5)	696.5 (429.5, 941.0)	567.0 (402.5, 1280.5)	<b>0.023<sup>^</sup></b>	<b>0.021<sup>†</sup></b>	<b>0.029<sup>†</sup></b>	0.826 <sup>†</sup>
CD45 <sup>dim</sup> /CD34 <sup>+</sup> /CD309 <sup>+</sup> /CD 31 <sup>+</sup>	160.5 (30.5, 374.0)	45.0 (16.5, 102.3)	27.0 (19.5, 236.0)	<b>0.048<sup>^</sup></b>	<b>0.027<sup>†</sup></b>	0.070 <sup>†</sup>	0.966 <sup>†</sup>
CD45 <sup>dim</sup> /CD34 <sup>+</sup> /CD309 <sup>+</sup> /CD 133 <sup>+</sup>	9.0 (5.0, 17.0)	5.0 (2.0, 8.3)	5.0 (2.5, 10.5)	<b>0.009<sup>^</sup></b>	<b>0.007<sup>†</sup></b>	<b>0.020<sup>†</sup></b>	0.986 <sup>†</sup>
CD45 <sup>dim</sup> /CD34 <sup>+</sup> /CD309 <sup>+</sup> /CD 133 <sup>+</sup> /CD31 <sup>+</sup>	8.0 (4.0, 16.3)	4.0 (2.0, 6.3)	4.0 (2.5, 9.5)	<b>0.014<sup>^</sup></b>	<b>0.010<sup>†</sup></b>	<b>0.028<sup>†</sup></b>	0.986 <sup>†</sup>

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεση τιμή με το ενδο-τεταρτημοριακό εύρος (25% - 75%).

<sup>^</sup> p values για συγκρίσεις ανάμεσα στις 3 ομάδες με Kruskal-WallisHtest.

<sup>†</sup> p values για συγκρίσεις ανάμεσα σε ζεύγη ομάδων (έναντι 2, 1 έναντι 3, 2 έναντι 3) με Mann-Whitney U test.

CPCs: circulating progenitor cells (κυκλοφορούντα προγονικά κύτταρα), EPCs: endothelial progenitor cells (προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα), ΔΠΝ: Διαβητική περιφερική νευροπάθεια



### 2.7.3. Επίπεδα VEGF, SDF-1 και κυτοκινών

Τα επίπεδα των VEGF, VCAM-1, ICAM-1, TNF $\alpha$ , and CRP δε διέφεραν ανάμεσα στις 3 ομάδες εξεταζομένων (Πίνακας 12).

Υπήρχε μία τάση για στατιστική σημαντικότητα για τα επίπεδα του SDF-1 ανάμεσα στις 3 ομάδες (group 1: 1701.0 (1187.2, 1847.9) pg/mL, group 2: 1755.3 (1193.3, 1937.2) pg/ mL, group 3: 1877.2 (1730.5, 1935.7) pg/mL,  $p=0.080$ ) και ειδικότερα, οι ασθενείς με ΣΔ και ΔΠΝ παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα SDF-1 σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες ( $p=0.021$ ) (Εικόνα 22, Εικόνα 23).

Πίνακας 12. Επίπεδα VEGF και κυτοκινών όλων των ομάδων

	Με ΔΠΝ (group 1) n=50	Χωρίς ΔΠΝ (group 2) n=30	controls (group 3) n=25	p all groups	p 1 vs. 2	p 1 vs. 3	p 2 vs. 3
VEGF (pg/ml)	62.8 (38.7, 87.1)	64.7 (44.6, 80.5)	51.2 (38.3, 99.1)	0.777 <sup>^</sup>	0.610 <sup>†</sup>	0.907 <sup>†</sup>	0.453 <sup>†</sup>
SDF-1 (pg/ml)	1701.0 (1187.2, 1847.9)	1755.3 (1193.3, 1937.2)	1877.2 (1730.5, 1935.7)	0.080 <sup>^</sup>	0.451 <sup>†</sup>	<b>0.021<sup>†</sup></b>	0.192 <sup>†</sup>
VCAM-1 (ng/ml)	1054.0 (886.2, 1428.3)	974.1 (834.4, 1228.0)	804.7 (602.1, 1442.9)	0.214 <sup>^</sup>	0.512 <sup>†</sup>	0.090 <sup>†</sup>	0.234 <sup>†</sup>
ICAM-1 (ng/ml)	231.1 (166.5, 299.7)	212.5 (176.5, 262.1)	193.1 (145.7, 347.1)	0.771 <sup>^</sup>	0.507 <sup>†</sup>	0.649 <sup>†</sup>	0.679 <sup>†</sup>
TNF $\alpha$ (pg/ml)	11.2 (6.2, 18.2)	11.2 (8.0, 13.2)	9.9 (6.5, 12.0)	0.333 <sup>^</sup>	0.882 <sup>†</sup>	0.283 <sup>†</sup>	0.137 <sup>†</sup>
CRP (mg/L)	3.0 (3.0, 3.0)	3.0 (3.0, 3.0)	3.0 (3.0, 3.0)	0.855 <sup>^</sup>	0.580 <sup>†</sup>	0.801 <sup>†</sup>	0.800 <sup>†</sup>

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεση τιμή με το ενδο-τεταρτημοριακό εύρος (25% - 75%).

<sup>^</sup> p values για συγκρίσεις ανάμεσα στις 3 ομάδες με Kruskal-Wallis H test.

<sup>†</sup> p values για συγκρίσεις ανάμεσα σε ζεύγη ομάδων (έναντι 2, 1 έναντι 3, 2 έναντι 3) με Mann-Whitney U test.

ΔΠΝ: Διαβητική περιφερική νευροπάθεια

VEGF: vascular endothelial growth factor, αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου

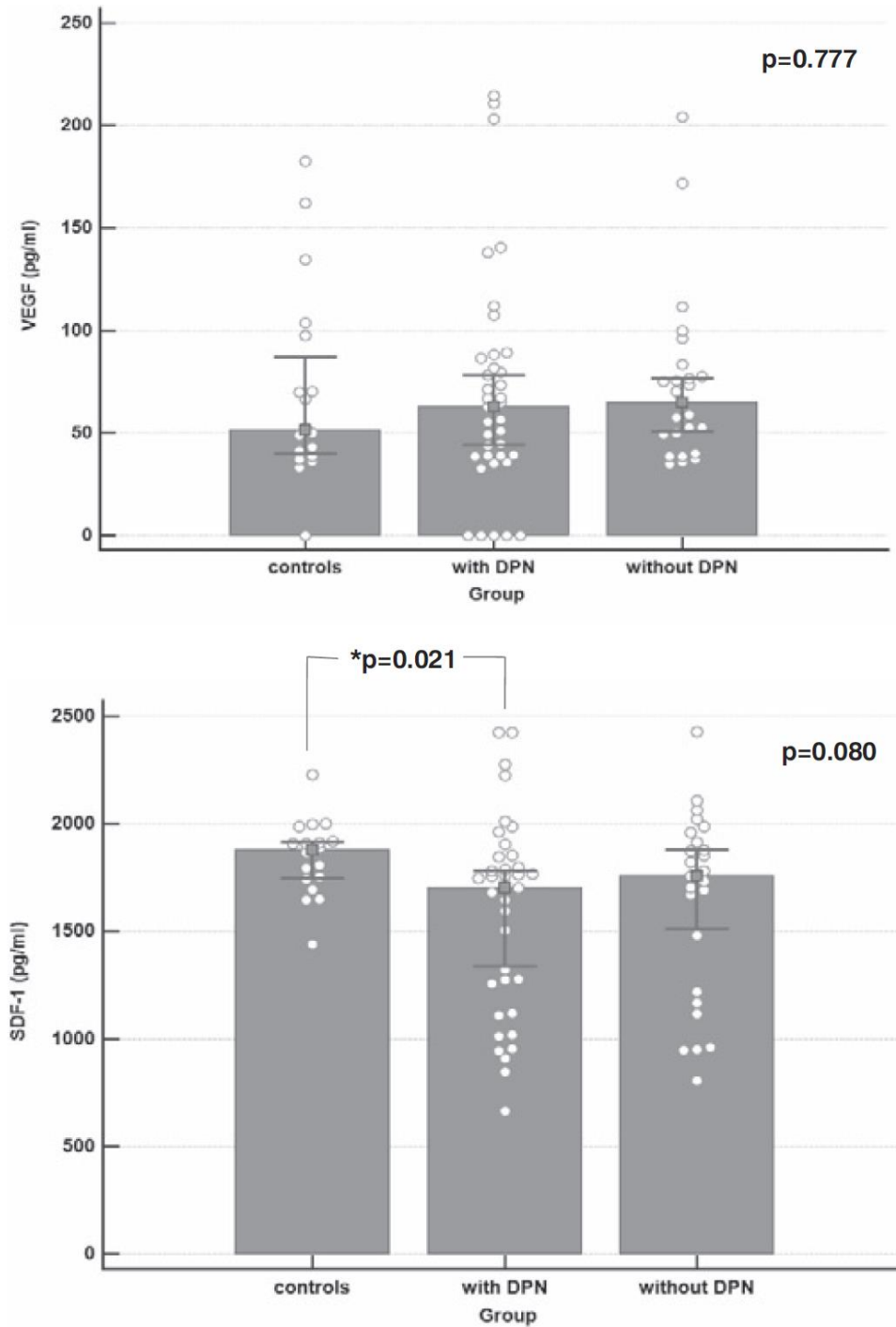
SDF-1: stromal-derived factor 1, προερχόμενο από κύτταρα του στρώματος παράγοντα – 1

VCAM-1: vascular cell adhesion protein 1, μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων -1

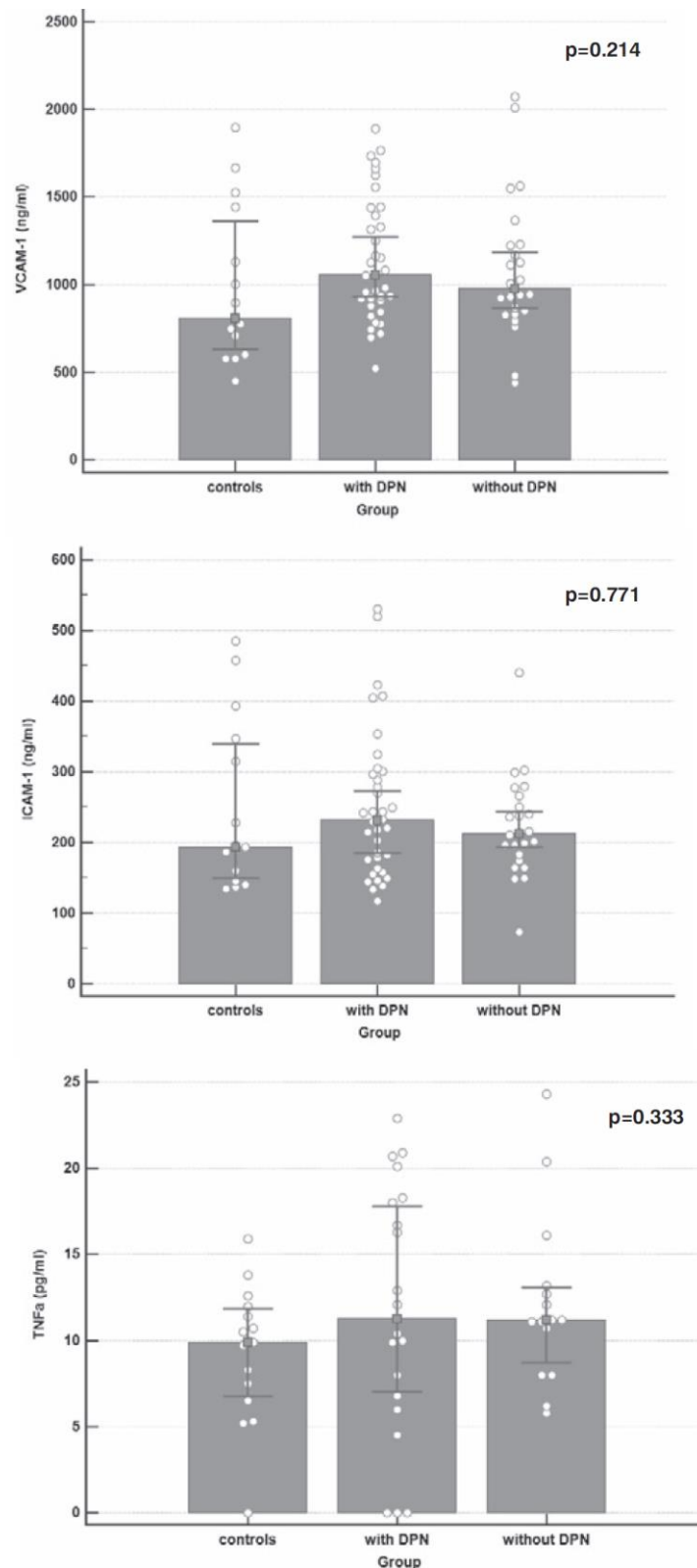
ICAM-1: intracellular adhesion molecule 1, μόριο διακυτταρικής προσκόλλησης-1

Οι τιμές p είναι για τις συγκρίσεις μεταξύ των 3 ομάδων με Kruskal-Wallis H test. Η τιμή \*p είναι για τη σύγκριση μεταξύ υγιών μαρτύρων και συμμετεχόντων με ΔΠΝ με Mann-Whitney U- test.

VEGF: αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, SDF-1: προερχόμενος από κύτταρα του στρώματος παράγοντας 1, VCAM-1: μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων-1, ICAM-1: μόριο διακυτταρικής προσκόλλησης-1, TNF $\alpha$ : παράγοντας νέκρωσης όγκου  $\alpha$ , DPN: Διαβητική περιφερική νευροπάθεια



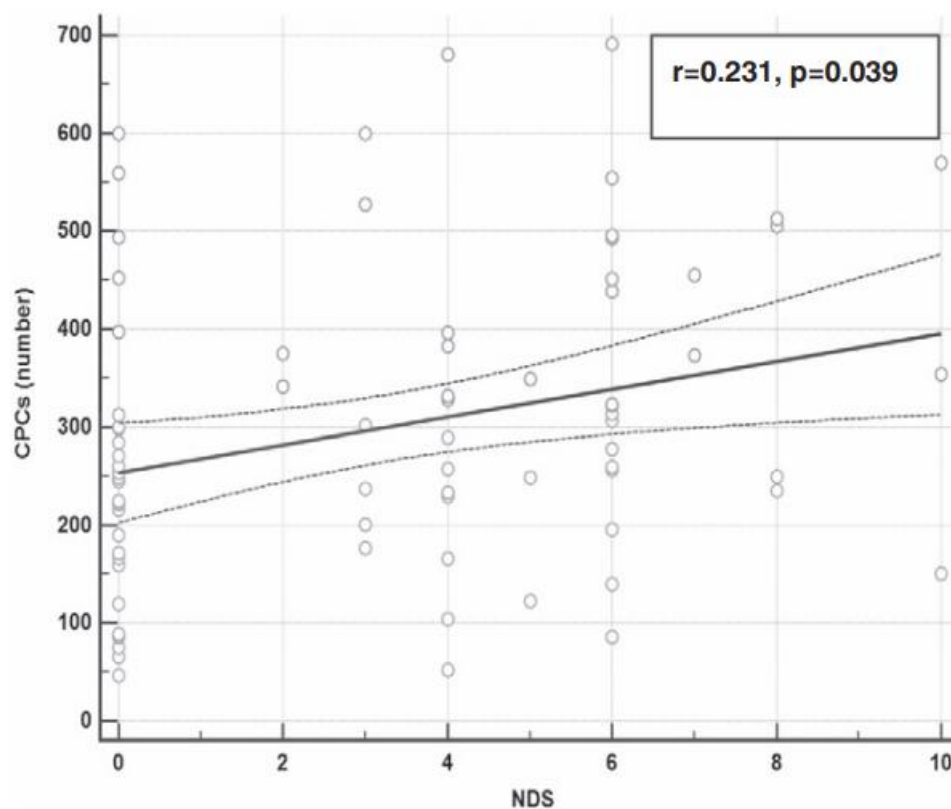
Εικόνα 22. Διαμέσες τιμές (95% διαστήματα εμπιστοσύνης των διαμέσων τιμών) των συγκεντρώσεων στο πλάσμα των VEGF, SDF-1, VCAM-1 και TNFα στις 3 ομάδες συμμετεχόντων



Εικόνα 23. Διαμέσες τιμές (95% διαστήματα εμπιστοσύνης των διαμέσων τιμών) των συγκεντρώσεων στο πλάσμα των VEGF, SDF-1, VCAM-1 και TNFα στις 3 ομάδες συμμετεχόντων

#### 2.7.4. Συσχετίσεις με τους δείκτες νευροπάθειας

- Στην ομάδα των ασθενών με ΣΔ ο **NSS** δε βρέθηκε να έχει συσχέτιση με τα CPCs ή με οποιονδήποτε από τους 6 φαινότυπους των EPCs.
- Ωστόσο, τα CPCs και οι περισσότεροι φαινότυποι των EPCs βρέθηκε ότι σχετίζονται θετικά με το **NDS**. (Spearman's  $r = 0.231$ ,  $p=0.039$  for CPCs,  $r = 0.264$ ,  $p=0.018$  for  $CD45^{dim}/CD34^+$ ,  $r = 0.226$ ,  $p=0.044$  for  $CD45^{dim} / CD34^+/CD309^+$ ,  $r = 0.236$ ,  $p=0.035$  for  $CD45^{dim} /CD34^+/CD31^+$ ,  $r = 0.184$ ,  $p=0.102$  for  $CD45^{dim} /CD34^+/CD309^+/CD31^+$ ,  $r = 0.268$ ,  $p= 0.016$  for  $CD45^{dim} /CD34^+/CD309^+/CD133^+$  and  $r = 0.235$ ,  $p=0.036$  for  $CD45^{dim} /CD34^+/CD309^+/CD133^+/CD31^+$ ) (εικόνα 24)



Εικόνα 24. Συσχέτιση μεταξύ NDS και CPCs σε εξεταζόμενους με διαβήτη τύπου 2 με γραμμική παρεμβολή

Ο αριθμός των CPCs σχετίζεται θετικά με το NDS σε άτομα με διαβήτη τύπου 2. Συνεχής γραμμή: γραμμική παρεμβολή, διακεκομμένες γραμμές: 95% διάστημα εμπιστοσύνης γύρω από τη γραμμή γραμμικής παρεμβολής.

CPCs: κυκλοφορούντα προγονικά κύτταρα, NDS: δείκτης συμπτωμάτων νευροπάθειας.

## 2.8. Συζήτηση

Κύριο εύρημα της συγχρονικής αυτής μελέτης αποτελεί η εύρεση αυξημένου αριθμού ορισμένων φαινοτύπων των EPCs σε ασθενείς με ΣΔ και ΔΠΝ χωρίς κλινική μακροαγγειακή νόσο, σε σύγκριση με ασθενείς με ΣΔ χωρίς ΔΠΝ, καθώς και σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, ενώ ο αριθμός των CPCs δεν διέφερε μεταξύ τους. Τα επίπεδα των VEGF, VCAM-1, ICAM-1 και TNF $\alpha$  πλάσματος δεν διέφεραν ανάμεσα στις 3 ομάδες εξεταζομένων, ωστόσο τα επίπεδα του SDF-1 ήταν χαμηλότερα σε ασθενείς με ΔΠΝ σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η ΔΠΝ θα μπορούσε να σχετίζεται με διαταραχή της μετανάστευσης των EPCs και διαταραχή της προσκόλλησής τους στο σημείο βλάβης του ενδοθηλίου.

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα σε σχέση με τον αριθμό των EPCs σε ασθενείς με ΣΔ είναι αντικρουόμενα, ωστόσο η δυσλειτουργία των EPCs στο ΣΔ σε ό,τι αφορά τον πολλαπλασιασμό, την κινητοποίηση, τη μετανάστευση, την προσκόλληση και την ενσωμάτωση στο ενδοθήλιο που έχει υποστεί βλάβη αποτελεί σταθερό εύρημα. [209][211][168] Η διαταραχή της προσκόλλησης στη βασική μεμβράνη και της ενσωμάτωσης στα τριχοειδή έχει αποδοθεί στις μεταβολές που υφίσταται η βασική μεμβράνη από τα προϊόντα τελικής γλυκοζυλίωσης. [289]

Η σχέση ανάμεσα στο μειωμένο αριθμό των EPCs και τις μακροαγγειακές επιπλοκές του ΣΔ είναι εξακριβωμένη, ωστόσο ο πιθανός υποκείμενος μηχανισμός δεν έχει διευκρινιστεί. [96][290] Η περιφερική αρτηριακή νόσος σε ασθενείς με ΣΔ σχετίζεται με μειωμένο αριθμό κυκλοφορούντων CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> και CD133<sup>+</sup> κυττάρων και επιπλέον, ο αριθμός των CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κυττάρων έχει συσχετισθεί αρνητικά με την κλινική βαρύτητα της νόσου. [150] Μειωμένος αριθμός CPCs και EPCs και συγκεκριμένα των CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> κύτταρων και CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προβλέψει μελλοντικά καρδιαγγειακά συμβάματα σε άτομα με και χωρίς ΣΔ, [291] ενώ μειωμένα CD34<sup>+</sup> κύτταρα έχουν σχετιστεί με διάφορους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου και παραμέτρους του μεταβολικού συνδρόμου. [292]

Ωστόσο, δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί εάν η μείωση του αριθμού των EPC και η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία είναι το πρώτο βήμα στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης, εάν αυτή η συσχέτιση προκύπτει λόγω της διαταραγμένης επανορθωτικής ικανότητας του τραυματισμένου ισχαιμικού ενδοθηλίου ή εάν ο μειωμένος αριθμός των EPCs είναι αποτέλεσμα παρατεταμένης μακροαγγειακής επιβάρυνσης που οδηγεί σε εξάντληση των EPCs. Στη βιβλιογραφία, τα δεδομένα σχετικά με τη συσχέτιση των προγονικών κυττάρων με τη διαβητική μικροαγγειακή νόσο είναι περιορισμένα και αντικρουόμενα.

Σε μία ομάδα μελέτης 187 ασθενών με ΣΔ τύπου 2 σε περίοδο περίπου 4 ετών βρέθηκε ότι χαμηλοί αριθμοί CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> και CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> κυττάρων αποτέλεσαν προγνωστικούς δείκτες ανάπτυξης ή επιδείνωσης της μικροαγγειοπάθειας. [193] Εντούτοις, οι συμμετέχοντες στη μελέτη αυτή είχαν υψηλότερα επίπεδα HbA<sub>1c</sub> σε σύγκριση με τον πληθυσμό της δικής μας μελέτης, ενώ οι περισσότεροι από τους μισούς παρουσίαζαν μακροαγγειακή νόσο. Επιπλέον, νέα εμφάνιση ή εξέλιξη και των τριών μικροαγγειακών επιπλοκών υπολογίστηκαν ως σύνολο με σκοπό να ενισχυθεί η στατιστική ανάλυση. Η ΔΠΝ και η νευροπάθεια του αυτονόμου νευρικού συστήματος, δεν σχετίστηκε αμετάβλητα με τους φαινοτύπους CPCs/EPCs σε προσαρμοσμένα μοντέλα, ενώ η ισχυρότερη συσχέτιση

παρατηρήθηκε ανάμεσα στους φαινοτύπους των CPCs και το ρυθμό απέκκρισης αλβουμίνης ούρων.

Η παθολογική νεοαγγειογένεση αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό στη ΔΠΑ. [293] Σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 χωρίς μακροαγγειακές επιπλοκές με μη-παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια, έχει βρεθεί ότι τα EPCs είναι μειωμένα, ενώ όταν υπάρχει παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια τα EPCs είναι αυξημένα. [294] Συγχρόνως έχουν αναφερθεί υψηλοί αριθμοί κυκλοφορούντων κυττάρων με φαινότυπο CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> σε ασθενείς με ΣΔ και παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, παρά την υψηλότερη συχνότητα μακροαγγειακών επιπλοκών στο διαβητικό πληθυσμό. [293]

Η αποκλίνουσα συμπεριφορά των EPCs, δηλαδή η πτωχή αγγειογένεση που εμφανίζεται σε μακροαγγειακές παθήσεις και η αυξημένη αγγειογένεση στην παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια, έχει ονομαστεί διαβητικό παράδοξο και ο παθογενετικός μηχανισμός ακόμη δεν έχει ακριβώς προσδιοριστεί. [208] Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι τα CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> κύτταρα από ασθενείς με παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια μπορούν να κινητοποιηθούν στην κυκλοφορία, αλλά μπορεί να έχουν μειωμένη ικανότητα προσκόλλησης και ενσωμάτωσης στο ενδοθήλιο και συγχρόνως διαταραχή στη δυνατότητα ενδοθηλιακής επιδιόρθωσης. [293] Ο ίδιος μηχανισμός πιθανότατα ισχύει και εξηγεί την ανεύρεση αυξημένου αριθμού κυκλοφορούντων EPCs στους ασθενείς μας με ΔΠΝ.

Σύμφωνα με όσα γνωρίζουμε ως τώρα, δεν έχει μελετηθεί καθεαυτή η συσχέτιση της ΔΠΝ με τον αριθμό των CPCs/EPCs σε ασθενείς με ΣΔ.

Οι Tecilazich και συν. μελέτησαν τις αλλοιώσεις σε διάφορους φαινοτύπους EPCs ανάμεσα σε 4 ομάδες εξεταζομένων: ασθενείς με διαβητικό έλκος, ασθενείς με κίνδυνο να παρουσιάσουν διαβητικό έλκος (θεωρήθηκαν όσοι είχαν NDS  $\geq 5$  και αδυναμία αντίληψης του 5.07 Semmes-Weinstein μονοϊνιδίου), ασθενείς χωρίς κίνδυνο εμφάνισης διαβητικού έλκους ποδίο (θεωρήθηκαν όσοι είχαν NDS  $< 5$ ), και υγιείς μάρτυρες. [280] Όπως και στη δική μας μελέτη, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στον αριθμό των διάφορων φαινοτύπων EPCs (CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>, CD45<sup>dim</sup>/KDR<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> και CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>) ανάμεσα στους ασθενείς με ΣΔ οι οποίοι δε διέτρεχαν κίνδυνο εμφάνισης έλκους και στους υγιείς μάρτυρες. Ωστόσο, οι ασθενείς με ΔΠΝ τέτοιας βαρύτητας ώστε να διατρέχουν κίνδυνο εμφάνισης διαβητικού έλκους είχαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα κυττάρων με τους εξής φαινότυπους: CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>, και CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>, αλλά όχι αυτών με τους φαινότυπους CD45<sup>dim</sup>/KDR<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> και CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>s, σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς κίνδυνο εμφάνισης έλκους, και σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Ωστόσο, οι συμμετέχοντες στην προαναφερθείσα μελέτη είχαν σχετικά μεγαλύτερη διάρκεια διαβήτη και χειρότερη γλυκαιμική ρύθμιση σε σχέση με τους ασθενείς της δικής μας μελέτης. Το σημαντικότερο είναι ότι η μακροαγγειακή νόσος και η παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια, τα οποία είναι δυνατό να συσχετίζονται με μειωμένα ή αυξημένα EPCs, δεν αποτελούσαν κριτήρια αποκλεισμού στη μελέτη των Tecilazich και συν. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το πειραματικό μέρος της μελέτης έδειξε ότι όλοι οι φαινότυποι των EPCs παρουσίαζαν μία τάση αύξησης σε διαβητικά ποντίκια και κουνέλια σε σύγκριση με μη-διαβητικά πειραματόζωα. [280]

Εσχάτως έχει εισαχθεί ο όρος διαβητική διαταραχή κινητοποίησης από το μυελό των οστών (diabetic bone marrow mobilopathy). Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι ο ΣΔ επιδρά στο μυελό των οστών, επηρεάζει τη δομή και τη λειτουργία του, και διαταράσσει την κινητοποίηση και απελευθέρωση στην κυκλοφορία των αρχέγονων κυττάρων καθώς και την ενσωμάτωσή τους στο ενδοθήλιο. [295] Επιπλέον, η ΔΠΝ έχει αναφερθεί ότι ελαττώνει την απελευθέρωση στην κυκλοφορία και την εγκατάσταση και ενσωμάτωση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στο ενδοθήλιο, διαδικασίες που προκαλούνται από την ισχαιμία. [296] Στη μελέτη μας, δεν βρέθηκε διαφορά στον αριθμό των CPCs ανάμεσα στις 3 ομάδες εξεταζομένων, ενώ οι ασθενείς με ΔΠΝ είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο αριθμό EPCs συγκρινόμενοι με τους ασθενείς χωρίς ΔΠΝ και με τους υγιείς μάρτυρες. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η παρουσία ΔΠΝ σε μία ομάδα μελέτης ασθενών με συνολικά καλή γλυκαιμική ρύθμιση και δίχως μακροαγγειακές επιπλοκές δεν παρακωλύει την απελευθέρωση των προγονικών κυττάρων από το μυελό των οστών, αλλά διαταράσσει την προσκόλληση και εγκατάστασή τους στα σημεία της βλάβης στους περιφερικούς ιστούς, αυξάνοντας κατά συνέπεια τον αριθμό τους στην κυκλοφορία.

Το γεγονός ότι σε πειραματικές και κλινικές δοκιμές έχει εφαρμοσθεί η διαδικασία της μεταμόσχευσης αρχέγονων κυττάρων ως θεραπεία της ΔΠΝ ενδυναμώνει τη σπουδαιότητα του ρόλου των EPCs στην ομοίωση της μικροκυκλοφορίας στους νευρώνες και τα νεύρα. [213][212][278][279]

Μία πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι σε ασθενείς με επώδυνη ΔΠΝ η εξωγενής ηλεκτρική διέγερση των μηριαίων μυών είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επώδυνων συμπτωμάτων πιθανώς λόγω διαφοροποίησης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε EPCs, και αύξηση της προσκόλλησης και ενσωμάτωσής τους στο ενδοθήλιο των αγγείων. [278]

Επίσης έχει μελετηθεί η κινητοποίηση προς την περιοχή της βλάβης του ενδοθηλίου, των ενδογενών προερχομένων από το μυελό των οστών EPCs κατόπιν διέγερσής τους με χορήγηση παραγόντων κινητοποίησης σε διαβητικά ζώα. [279] Η συστηματική χορήγηση του παράγοντα AMD3100 ο οποίος έχει βρεθεί ότι επάγει την κινητοποίηση των EPCs στην κυκλοφορία του αίματος, συγχորηγούμενος με τοπικά εγχυόμενο SDF-1, οδήγησε σε αποκατάσταση των αγγείων των ισχιακών νεύρων και βελτίωσε την ταχύτητα αγωγιμότητας. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι τα δυσλειτουργικά EPCs και τα μειωμένα επίπεδα SDF-1 της περιοχής μπορεί να αποτελούν παθογενετικές διαδικασίες που οδηγούν σε ελάττωση των τροφικών αγγείων των νεύρων (vasa nervorum) στα ισχιακά νεύρα στην ΔΠΝ. Στη μελέτη μας οι ασθενείς με ΔΠΝ είχαν χαμηλότερα επίπεδα SDF-1 σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, και υψηλότερους αριθμούς EPCs στην κυκλοφορία, πιθανότατα μέσω διαταραχής της ενσωμάτωσής τους στο τοίχωμα των μικρών αγγείων.

Τα EPCs βρίσκονται εγκαταστημένα σε νησίδες αρχέγονων κυττάρων στο μυελό των οστών και μπορούν να απελευθερώνονται στην κυκλοφορία υπό την επίδραση κυτοκινών, όπως οι VEGF ή ο SDF-1 που συντίθενται από τους ιστούς που ισχαιμούν. [211][82] Στη μελέτη μας δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα του VEGF ανάμεσα στις 3 ομάδες εξεταζομένων. Σύμφωνα με όσα ως τώρα γνωρίζουμε, λίγες πληροφορίες διαθέτουμε όσον αφορά τη συσχέτιση της ΔΠΝ με τον VEGF.

Κατά την εμφάνιση ερεθίσματος, τα EPCs απελευθερώνονται από το μυελό των οστών στην κυκλοφορία και εγκαθίστανται σε περιοχές του ενδοθηλίου που έχουν υποστεί βλάβες όπου και αναλαμβάνουν και συντονίζουν την αγγειακή αποκατάσταση. Ο φυσιολογικός αριθμός των κυκλοφορούντων EPCs θα μπορούσε να θεωρηθεί δείκτης υγείας του ενδοθηλίου, ενώ ο



υψηλός ή ο χαμηλός αριθμός τους θα μπορούσε να υποδηλώνει εξελισσόμενη ενδοθηλιακή βλάβη.

Κατόπιν ερεθισμάτων τα EPCs μετακινούνται προς τις περιοχές της βλάβης όπου κυλούν, ενσωματώνονται στο ενδοθήλιο που έχει υποστεί βλάβες και προάγουν την επανενδοθηλιοποίηση. Ο παράγων SDF-1 θεωρείται ένας από τους ισχυρότερους χημειοτακτικούς παράγοντες για τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, καθώς ο υποδοχέας του συνδέεται στην επιφάνεια των EPCs και στη συνέχεια ακολουθεί η προσκόλληση και ενσωμάτωσή τους στο ενδοθήλιο. [211][168][297] Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του SDF-1 είναι μειωμένη σε δερματικές βλάβες, ενώ παράλληλα τοπική έγχυση SDF-1 αύξησε την προσκόλληση και εγκατάσταση των EPCs στους πάσχοντες ιστούς. [180] Παρ' όλα αυτά, τα στοιχεία που αφορούν ασθενείς με ΣΔ είναι ελάχιστα.

Στη μελέτη μας, οι ασθενείς με ΔΠΝ είχαν χαμηλότερα επίπεδα SDF-1 πλάσματος σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Τα ευρήματά μας θα μπορούσαν να υποδηλώνουν ότι η ΔΠΝ συσχετίζεται με χαμηλές συγκεντρώσεις SDF-1, που συνεπάγονται διαταραχή της προσκόλλησης και εγκατάστασης των EPCs στο πάσχον ενδοθήλιο και ακολούθως αύξηση του αριθμού τους στην κυκλοφορία.

Οι VCAM-1 και ICAM-1 είναι μόρια κυτταρικής προσκόλλησης τα οποία εκφράζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και προάγουν την προσκόλληση των αιμοποιητικών κυττάρων στο τοίχωμα των μικρών αγγείων. [298]

Στη μελέτη μας τα επίπεδα VCAM-1 και ICAM-1 δε διέφεραν ανάμεσα στις 3 ομάδες συμμετεχόντων, πράγμα το οποίο αποκλείει την πιθανότητα οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις των μορίων προσκόλλησης να εμπλέκονται στη διαταραχή της εγκατάστασης των EPCs στο αγγειακό δίκτυο. Οι Koga και συν. ανέφεραν ότι η τιμή του VCAM-1 ορού ήταν αυξημένη σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 και ΔΠΝ ή νευροπάθεια του αυτονόμου νευρικού συστήματος σε σύγκριση με εξεταζόμενους χωρίς διαβητική νευροπάθεια, ωστόσο στην πολυπαραγοντική ανάλυση οι συγκεντρώσεις VCAM-1 ορού σχετίστηκαν μόνο με τη διαβητική νεφροπάθεια. [299]

Ο TNFα είναι μια προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη η οποία επίσης θεωρείται ότι εμπλέκεται στο μηχανισμό κινητοποίησης και προσκόλλησης των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων στην περιοχή βλάβης του ενδοθηλίου, ωστόσο ακόμη δεν είναι ξεκάθαρο αν η χρόνια φλεγμονώδης αντίδραση ενισχύει ή παραβιάζει την κινητοποίηση των EPCs από το μυελό των οστών. [211][239][300] Στη μελέτη μας δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα του TNFα πλάσματος.

Όσον αφορά άλλους παράγοντες που θα μπορούσαν να συσχετίζονται με τον αριθμό των EPCs, σε μελέτες έχει αναφερθεί ότι η θεραπεία με στατίνες, κάποια αντιδιαβητικά δισκία όπως μετφορμίνη, DPP4 αναστολείς, πιογλιταζόνη, καθώς και αντιυπερτασικά φάρμακα όπως αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης και ανταγωνιστές του υποδοχέα της αγγειοτενσίνης II μπορεί να αυξάνουν τον αριθμό των EPCs. [211][301] Στη μελέτη μας δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην χρήση των θεραπευτικών σκευασμάτων ανάμεσα σε ασθενείς με και χωρίς ΔΠΝ, ενώ στους υγιείς μάρτυρες η χρήση στατινών και αντιυπερτασικών ήταν μικρότερη. Παράλληλα, έχει καταδειχθεί ότι ο αριθμός των EPCs σχετίζεται αρνητικά με την ηλικία και τους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου όπως η τιμή της LDL-χοληστερόλης.[211][301] Στη μελέτη μας, και σε σχέση με τους εν λόγω παράγοντες δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ ασθενών με και χωρίς ΔΠΝ, ενώ

διαπιστώθηκε ότι οι υγιείς συμμετέχοντες είχαν υψηλότερα επίπεδα LDL-χοληστερόλης σε σχέση με τους ασθενείς με ΔΠΝ.

Στη μελέτη μας θα πρέπει να επισημανθούν δεδομένα δυνατά σημεία ως πλεονεκτήματα. Πραγματοποιήθηκε μια συστηματική συλλογή και ανάλυση αρκετών υποθετικών φαινοτύπων EPCs, πολλών εκ των οποίων φέρονται μέχρι στιγμής ως χαρακτηριστικοί των EPCs, προκειμένου να παράσχουμε στοιχεία για ένα συγκεκριμένο πρότυπο κυττάρων EPCs σε ασθενείς με ΔΠΝ. Πραγματοποιήσαμε μια σχολαστική επιλογή των συμμετεχόντων στη μελέτη. Οι ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 έχουν συνήθως πολλές συννοσηρότητες ή επιπλοκές που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τον αριθμό των EPCs. Επιλέξαμε συμμετέχοντες με καλό γλυκαιμικό έλεγχο και χωρίς κλινική μακροαγγειακή νόσο, παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια ή σοβαρές συννοσηρότητες προκειμένου να αποκλείσουμε παράγοντες που θα μπορούσαν να σχετίζονται με μειωμένο ή αυξημένο αριθμό EPCs.

Παράλληλα ωστόσο θα πρέπει να ληφθούν υπόψη δεδομένοι περιορισμοί. Καταρχήν, πρόκειται για μία συγχρονική μελέτη, η οποία αφενός δεν μπορεί να παρέχει πληροφορίες σε βάθος χρόνου ή ακόμη να προσφέρει εξηγήσεις ως προς τη σχέση αιτίου – αιτιατού στις συσχετίσεις που παρατηρούνται, και αφετέρου αδυνατεί να περιγράψει και να εξηγήσει την υποκείμενη παθοφυσιολογία. Τεχνικά, δε γνωρίζουμε κατά πόσον ο αυξημένος αριθμός των φαινοτύπων EPCs προκαλεί τη ΔΠΝ καθαυτή ή εάν η αύξηση του αριθμού αντιπροσωπεύει την αδυναμία των κυττάρων αυτών να προσκολληθούν και να εγκατασταθούν στο κατεστραμμένο ενδοθήλιο και κατά συνέπεια την διαταραχή της νεοαγγείωσης και αποκατάστασης των περιφερικών νεύρων. Παρά το ότι θα ήταν ελκυστική η ιδέα να προτείνουμε ότι η υπέρμετρη αύξηση των EPCs εμπλέκεται στην παθογένεια της ΔΠΝ καθώς μάλιστα παθολογικές μελέτες έχουν δείξει να αυξάνεται ο αριθμός των τριχοειδών των νεύρων κατά τα αρχικά στάδια του ΣΔ ως απάντηση στην ισχαιμία του νευρικού ιστού, εντούτοις δεδομένου του όγκου των κλινικών δεδομένων φαίνεται πιο πιθανό ότι ο αυξημένος αριθμός EPCs συσχετίζεται με διαταραχή της προσκόλλησης και ενσωμάτωσης στο ενδοθήλιο.

Δεύτερον, τα EPCs αποτελούνται από ετερογενείς πληθυσμούς κυττάρων σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης οι οποίοι εκφράζουν στην επιφάνειά τους ποικίλα αντιγόνα, και μέχρι στιγμής δεν υπάρχει συμφωνία όσον αφορά μία αμετάβλητη στρατηγική οριοθέτησης των περιοχών μελέτης των πληθυσμών ενδιαφέροντος (gating). Έχουν χρησιμοποιηθεί πολλοί δείκτες επιφανείας και διαφορετικές στρατηγικές οριοθέτησης προκειμένου να χαρακτηρισθούν τα EPCs, κατά συνέπεια τα αντικρουόμενα αποτελέσματα τα οποία αναφέρονται σε διάφορες μελέτες μπορούν να αποδοθούν, εν μέρει τουλάχιστον, στην απουσία ενός σαφούς ορισμού του πληθυσμού των EPCs. Ένας ακόμη περιορισμός είναι ότι η εκτίμηση της ΔΠΝ έγινε με βάση την κλινική εξέταση και δε διενεργήθηκε ηλεκτροφυσιολογικός έλεγχος.

## 2.9. Συμπεράσματα

Τα ευρήματα μας καταδεικνύουν ότι ο αριθμός των κυκλοφορούντων EPCs είναι αυξημένος σε καλά ρυθμισμένους διαβητικούς ασθενείς με ΔΠΝ χωρίς μακροαγγειακές επιπλοκές σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς ΔΠΝ και σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες.

Παρά το γεγονός ότι η μελέτη μας δεν είναι σε θέση να παρέχει άμεση τεκμηρίωση, θα μπορούσε να υποθεθεί ότι τα EPCs αδυνατούν να εξέλθουν από την κυκλοφορία και να προσκολληθούν στα σημεία βλάβης του ενδοθηλίου εξαιτίας της μη αύξησης των μορίων που απαιτούνται για την εγκατάσταση και ενσωμάτωσή τους στο ενδοθήλιο, όπως ο παράγων SDF-1. Βάση των δεδομένων που προέκυψαν στη μελέτη μας, φαίνεται ότι υπάρχει στενή αλληλεπίδραση ανάμεσα στα EPCs και την ΔΠΝ, ωστόσο απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να εξιχνιασθεί ο ακριβής ρόλος των κυττάρων αυτών στην παθογένεια της ΔΠΝ.

Επιπλέον, η ΔΠΝ είναι μία προοδευτικά εξελισσόμενη διαβητική επιπλοκή και οι εκδηλώσεις της αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια πολλών ετών. Ως εκ τούτου, θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι ο αριθμός των EPCs πιθανώς να μεταβάλλεται επίσης κατά τα διάφορα στάδια της ΔΠΝ εφόσον αυτά χαρακτηρίζονται από διαφορετικές δομικές και λειτουργικές αλλαγές.

Εν κατακλείδι, τα EPCs συμμετέχουν και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ΔΠΝ. Ωστόσο, το ερώτημα που αφορά στη σημασία και στη θεραπευτική τους χρήση παραμένει ανοιχτό. Θα χρειαστεί η διεξαγωγή μεγάλων κλινικών μελετών με μακροχρόνια παρακολούθηση και προσθήκη αντικειμενικών μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού των EPCs ώστε να επιβεβαιωθεί η σημασία και ο ρόλος τους στην παθογένεια και την θεραπεία της ΔΠΝ.

## 2.10. Περίληψη

Η υπεργλυκαιμία αποτελεί τον κύριο παράγοντα που συμβάλλει στην ανάπτυξη της διαβητικής περιφερικής νευροπάθειας (ΔΠΝ) στους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ) τύπου 2, καθώς επιδρά στα νευρικά κύτταρα και προκαλεί μικροαγγειοπάθεια στα μικρά αγγεία των περιφερικών νεύρων (στα αγγεία του ενδονευρίου, του περινευρίου και του επινευρίου). Κύριος συντελεστής της νευρικής βλάβης θεωρείται το οξειδωτικό στρες και οι δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) φαίνεται ότι διαταράσσουν την αγγειοδιαστολή στα αγγεία του επινευρίου οδηγώντας με τον τρόπο αυτό σε αγγειοσύσπαση και λειτουργική ισχαιμία του νευρικού ιστού.

Τα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (endothelial progenitor cells, EPCs) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση των τροφικών αγγείων των νεύρων (vasa nervorum), καθώς ελαττωματικοί μηχανισμοί στην επιδιόρθωση του ενδοθηλίου και στη νεοαγγειογένεση πιθανώς συμβάλλουν ακόμη περισσότερο στην ισχαιμία του νευρικού ιστού. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα EPCs κινητοποιούνται από το μυελό των οστών στο σημείο της βλάβης όπου παράγουν διάφορους αγγειογενετικούς και νευροτροφικούς παράγοντες ή διαφοροποιούνται σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα και συντονίζουν την επανενδοθηλιοποίηση και τη νεοαγγειογένεση.

Από πολλές μελέτες έχειδειχθεί ότι ο αριθμός των EPCs είναι μειωμένος σε ασθενείς με ΣΔ και μειώνεται ακόμη περισσότερο όταν συνυπάρχουν μακροαγγειακές επιπλοκές. Μολαταύτα, η συσχέτιση της δυσλειτουργίας των EPCs με τις διαβητικές μικροαγγειακές επιπλοκές είναι πιο σύνθετη και όχι εκτενώς μελετημένη και ο ρόλος των EPCs στη διαβητική περιφερική νευροπάθεια (ΔΠΝ) δεν έχει διερευνηθεί.

Ο σκοπός της συγχρονικής αυτής μελέτης ήταν να αναζητηθούν διαφορές στον αριθμό των κυκλοφορούντων προγονικών κυττάρων (circulating progenitor cells, CPCs) και σε 6 φαινότυπους των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων (endothelial progenitor cells, EPCs) στον ορό ασθενών με ΣΔ τύπου 2, με και χωρίς ΔΠΝ.

Εξετάσθηκαν συνολικά 105 άτομα χωρίς κλινική μακροαγγειακή νόσο: 50 ασθενείς με ΣΔ2 και ΔΠΝ, 30 ασθενείς με ΣΔ2 χωρίς ΔΠΝ, και 25 υγιείς μάρτυρες. Η μέτρηση των CPCs και των 6 διαφορετικών φαινοτύπων EPCs έγινε με κυτταρομετρία ροής. Για την ταυτοποίηση των διαφορετικών φαινοτύπων των EPCs χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι συνδυασμοί δεικτών: CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD309<sup>+</sup>, CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>, CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD309<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>, CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD309<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>, CD45<sup>dim</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD309<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>.

Ταυτόχρονα μετρήθηκαν τα επίπεδα των: αυξητικού παράγοντα αγγειακού ενδοθηλίου (vascular endothelial growth factor, VEGF), προερχόμενου από κύτταρα του στρώματος παράγοντα-1 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1), μόριου προσκόλλησης αγγειακού κυττάρου-1 (vascular cell adhesion protein-1, VCAM-1), μόριου διακυτταρικής προσκόλλησης-1 (intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1) και του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (tumor necrosis factor, TNFα) στον ορό των εξεταζομένων και οι μετρήσεις έγιναν με διαθέσιμα στο εμπόριο αντιδραστήρια.

Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στον αριθμό των CPCs μεταξύ των 3 ομάδων εξεταζομένων, ενώ όλοι οι μελετηθέντες φαινότυποι των EPCs διέφεραν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ανάμεσα στις 3 ομάδες. Οι ασθενείς με ΣΔ2 και ΔΠΝ είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο

αριθμό των 5 φαινοτύπων EPCs σε σύγκριση με τους ασθενείς με ΣΔ2 χωρίς ΔΠΝ, καθώς επίσης στατιστικά σημαντικά υψηλότερο αριθμό EPCs σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Οι τιμές των VEGF, VCAM-1, ICAM-1 και TNF $\alpha$  δε διέφεραν ανάμεσα στις 3 ομάδες, ωστόσο οι ασθενείς με ΔΠΝ είχαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα SDF-1 σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.

Συμπερασματικά, αρκετοί φαινότυποι EPCs είναι αυξημένοι σε ασθενείς με ΔΠΝ σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς ΔΠΝ και σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, ενώ συγχρόνως τα επίπεδα SDF-1 είναι μειωμένα στους ασθενείς με ΔΠΝ. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η ΔΠΝ πιθανώς σχετίζεται με διαταραχή στη μεταναστευτική ικανότητα των EPCs και στην ικανότητα τους για προσκόλληση, σχηματισμό αποικιών και ενσωμάτωση στο ενδοθήλιο που έχει υποστεί βλάβες.

## 2.11. Abstract

*Aims:* The pathophysiological mechanisms underlying diabetic peripheral neuropathy (DPN) are still unclear. DPN is characterized by structural and functional alterations in the microvasculature and endothelial progenitor cells (EPCs) may play an important role in the homeostasis of vasa nervosum. The association of EPCs with diabetic microvascular disease is ambiguous, while data regarding its association with DPN per se are scarce. The aim of our study was to evaluate the differences that occur in circulating progenitor cells (CPCs) and 6 different EPCs phenotypes in peripheral blood in patients with and without DPN, as well as to investigate for alterations in plasma vascular endothelial growth factor (VEFG), stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and cytokines levels.

*Methods:* A total of 105 participants without clinical macrovascular disease and severe comorbidities were included in the study: 50 patients with type 2 diabetes (DM) and DPN, 30 patients with type 2 DM without DPN and 25 healthy individuals. Diagnosis of DPN was based on symptoms and signs of DPN. CPCs and 6 different EPCs phenotypes were assessed with flow cytometry. Plasma levels of VEGF, SDF-1, vascular cell adhesion protein-1 (VCAM-1), intracellular adhesion molecule-1 (ICAM) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) were measured using commercially available ELISA kits.

*Results:* No difference was observed in the number of CPCs among the 3 groups of participants, while all studied EPCs phenotypes differed significantly among the 3 groups. Patients with DPN had significantly higher numbers of all 6 EPCs phenotypes when compared with patients without DPN and significantly higher number of 5 EPCs phenotypes when compared with healthy individuals. VEGF, VCAM-1, ICAM-1 and TNF $\alpha$  levels did not differ among the 3 groups of participants, but patients with DPN had significantly lower SDF-1 levels when compared with healthy individuals.

*Conclusion:* Several EPCs phenotypes are increased in patients with DPN with good glycaemic control and without clinical macrovascular disease or other severe comorbidities when compared with patients without DPN and with healthy individuals, while SDF-1 levels are decreased in the presence of DPN. Our findings suggest that DPN could be associated with impaired trafficking of EPCs and impaired EPCs homing to the injured endothelium.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- [1] International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. Ninth Edition 2019
- [2] American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care* 2020;43(Suppl. 1): 14–31.
- [3] Tentolouris N, Edmonds ME, Jude EB, Vas PRJ, Manu CA, Tentolouris A and Eleftheriadou I (2021) Editorial: Understanding Diabetic Foot Disease: Current Status and Emerging Treatment Approaches. *Front. Endocrinol.* 12:753181.
- [4] Fadini GP & Avogaro A. Potential manipulation of endothelial progenitor cells in diabetes and its complications. *Diabetes Obes Metab* 2010, 12: 570–583.
- [5] Tentolouris A, Eleftheriadou I, Tzeravini E, et al. Endothelium as a Therapeutic Target in Diabetes Mellitus: From Basic Mechanisms to Clinical Practice. *Curr Med Chem* 2020, 27: 1089-1131(43).
- [6] Avogaro A, Fadini GP, Gallo A, et al. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006, 16: 39-45.
- [7] Avogaro A, Saula Vigili de Kreutzenberg, Fadini GP. Endothelial dysfunction: Causes and consequences in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2008, 82: 94-101.
- [8] Beckman J, Creager M, Libby P. Diabetes and Atherosclerosis: Epidemiology Pathophysiology, and Management. *JAMA.* 2002;287(19):2570-2581.
- [9] Eleftheriadou I, Tentolouris A, Grigoropoulou P, Tsilingiris D, Anastasiou I, Kokkinos, et al. The association of diabetic microvascular and macrovascular disease with cutaneous circulation in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications.* 2019 Feb;33(2):165-170.
- [10] Orasanu G, Plutzky J. The Pathologic Continuum of Diabetic Vascular Disease. *JACC* 2009, 53(5):35– 42
- [11] Cines D, Pollak E, Buck C, et al. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood* 1998,91,(10): 3527-3561
- [12] Kubes P, Suzuki M, Granger D. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88:4651-4655.
- [13] Vallet B, Wiel E. Endothelial cell dysfunction and coagulation. *Crit Care Med.* 2001; 29(7 Suppl):S36–S41.
- [14] Zhao B, Bowden RA, Stavchansky SA, Bowman PD. Human endothelial cell response to gram negative lipopolysaccharide assessed with cDNA microarrays. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 281:C1587–C1595.
- [15] Cribbs S, Martin G, Rojas M. Monitoring of endothelial dysfunction in critically ill patients: The role of endothelial progenitor cells. *Current opinion in critical care.* 2008, 14. 354-60.

- [16] Ceradini, D. J., Kulkarni, A. R., Callaghan, M. J., et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat. Med.* 2004, 10, 858–864. doi:10.1038/nm1075
- [17] Kitaori, T., Ito, H., Schwarz, E. M., et al. (2009). Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum.* 2009, 60, 813–823. doi:10.1002/art.24330
- [18] Herrmann M, Verrier S and Alini M. Strategies to stimulate mobilization and homing of endogenous stem and progenitor cells for bone tissue repair. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2015, 3:79
- [19] Tousoulis D, Kampoli A, Tentolouris C, et al. The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. *Curr Vasc Pharmacol* 2012, 10: 4-18
- [20] De Vriese A, Verbeuren T, Van de Voorde J, et al. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000, 130: 963-974.
- [21] Capellini VK, Celotto AC, Baldo CF, et al. Diabetes and vascular disease: basic concepts of nitric oxide physiology, endothelial dysfunction, oxidative stress and therapeutic possibilities. *Curr Vasc Pharmacol* 2010;8:526–44.
- [22] Tesfamariam B, Brown M, Deykin D, Cohen R. Elevated Glucose Promotes Generation of Endothelium-derived Vasoconstrictor Prostanoids in Rabbit Aorta. *J. Clin. Invest.* 1990 (85): 929-932.
- [23] Libby P, Aikawa M. New Insights into Plaque Stabilisation by Lipid Lowering. *Drugs*, 1998; 56 (1): 9-13.
- [24] Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1983–92.
- [25] Fowler M. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes* 2008, 26: 77-82.
- [26] Nugent A, McGurk C, Randal Hayes J and G. Dennis Johnston. Impaired Vasoconstriction to Endothelin 1 in Patients With NIDDM. *Diabetes* 1996 (45):105-107
- [27] Suzuki, L.A. & Poot, Martin & Gerrity, Ross & Bornfeldt, Karin. Diabetes Accelerates Smooth Muscle Accumulation in Lesions of Atherosclerosis Lack of Direct Growth-Promoting Effects of High Glucose Levels. *Diabetes*. 50. 851-60.
- [28] Assert R, Scherk G, Bumbure A, et al. Regulation of protein kinase C by short term hyperglycaemia in human platelets. *Diabetologia* 2001,44:188-95.
- [29] Vinik A, Erbas T, Park TS, et al. Platelet Dysfunction in Type 2 Diabetes. *Diabetes care* 2001, 24. 1476-85.
- [30] Carr, Marcus. (2001). Diabetes mellitus: A hypercoagulable State. *J Diabetes Complications*. 2001,15: 44-54.
- [31] Nordt T, Bode C. Impaired Endogenous Fibrinolysis in Diabetes Mellitus: Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Semin Thromb Hemost* 2000, 26:495-501.



- [32] Keenan H, Costacou T, Sun J, et al. Clinical Factors Associated With Resistance to Microvascular Complications in Diabetic Patients of Extreme Disease Duration: The 50-year Medalist Study. *Diabetes care* 2007, 30: 1995-7.
- [33] Wong TY, Klein R, Islam FM, et al. Diabetic retinopathy in a multi-ethnic cohort in the United States. *Am J Ophthalmol.* 2006;141(3):446-455.
- [34] Zhang X, Saaddine JB, Chou CF, et al. Prevalence of diabetic retinopathy in the United States, 2005-2008. *JAMA.* 2010;304(6):649-656.
- [35] Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 2012;35(3):556-564.
- [36] Mathenge W, Bastawrous A, Peto T, et al. Prevalence and correlates of diabetic retinopathy in a population-based survey of older people in Nakuru, Kenya. *Ophthalmol Epidemiol.* 2014;21(3):169-177.
- [37] Grant, M.B., Russell, B., Fitzgerald, C. & Merimee, T.J. Insulin-like growth factors in vitreous: studies in control and diabetic subjects with neovascularization. *Diabetes* 1986, 35:416–420.
- [38] Limb, G.A., Chignell, A.H., Green, W., et al. Distribution of TNF  $\alpha$  and its reactive vascular adhesion molecules in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.* 1996,80:168–173
- [39] Tan GS, Cheung N, Simo R, et al. Diabetic macular oedema. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5(2):143-155.
- [40] Wong, T-Y, Sun, J, Kawasaki, Ryo, et al. Guidelines on Diabetic Eye Care: The International Council of Ophthalmology Recommendations for Screening, Follow-up, Referral, and Treatment Based on Resource Settings. *Ophthalmology* 2018, 125:1608-1622.
- [41] Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med.* 2012;366(13):1227e1239.
- [42] DCCT Research Group. Diabetes control and complications trial (DCCT): the effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med,* 1993 329:977–86.
- [43] Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *BMJ* (1998) 317:703–13.
- [44] Lois N, McCarter R, O'Neill, C, et al. Endothelial Progenitor Cells in Diabetic Retinopathy. *Frontiers in endocrinology,* 2014, 5:44.
- [45] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group . Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *The Lancet,* 1998, 352: 837-853.
- [46] Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet* 2010; 376: 124–136.
- [47] Gui F, You Z, Fu S, Wu H and Zhang Y. Endothelial Dysfunction in Diabetic Retinopathy. *Front. Endocrinol.* 2020, 11:591.

- [48] Jousseaume AM, Murata T, Tsujikawa A, Kirchhof B, Bursell SE, Adamis AP. Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina. *Am J Pathol* 2001; 158: 147–152.
- [49] Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, et al. Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 10836–10841
- [50] Olson JA, Whitelaw CM, McHardy KC, Pearson DW, Forrester JV. Soluble leucocyte adhesion molecules in diabetic retinopathy stimulate retinal capillary endothelial cell migration. *Diabetologia* 1997; 40: 1166–1171.
- [51] van Hecke MV, Dekker JM, Nijpels G, Moll AC, Heine RJ, Bouter LM et al. Inflammation and endothelial dysfunction are associated with retinopathy: the Hoorn Study. *Diabetologia* 2005; 48: 1300– 1306
- [52] Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ Res* 2001; 89: 763–771.
- [53] Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003; 111: 1805–1812.
- [54] Haefliger I, Flammer J, Luscher T. Nitric oxide and endothelin-1 are important regulators of human ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992, 33: 2340.
- [55] Sarman B, Toth M, Somogyi A. Role of endothelin-1 in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1998; 14: 171–175.
- [56] Schneider JG, Tilly N, Hierl T, Sommer U, Hamann A, Dugi K et al. Elevated plasma endothelin-1 levels in diabetes mellitus. *Am J Hypertens* 2002; 15: 967–972.
- [57] Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία, ΕΔΕ: Κατευθυντήριες Οδηγίες για τη Διαχείριση του ατόμου με Σακχαρώδη Διαβήτη 2021
- [58] Rovin, Brad H. et al., KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases, *Kidney International*, Volume 100, Issue 4, S1 - S276
- [59] Boulton AJ, et al. Diabetic Neuropathies: A statement by the American Diabetes Association. *Diabetes care*. 2005, 28:956-62.
- [60] Maser R, et al. Epidemiological Correlates of Diabetic Neuropathy: Report From Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes*. 1989,38: 1456-61.
- [61] Pop-Busui R, Boulton AJ, Feldman E. et al. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association, 2017, *Diabetes Care*. 40:136-154.
- [62] Feldman EL, Russell JW, Sullivan KA, Golovoy D. New insights into the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Curr. Opin. Neurol.*,1999 12(5): 553-563.
- [63] Verrotti A, Giuva PT, Morgese G and Chiarelli F. New trends in the etiopathogenesis of diabetic peripheral neuropathy. *J. Child Neurol*, 2001, 16(6):389-394.
- [64] Tentolouris N, et al. Evaluation of the self-administered indicator plaster neuropad for the diagnosis of neuropathy in diabetes. *Diabetes Care*. 2008 Feb;31(2):236-7.
- [65] Sugimoto K, Yasujima M, Yagihashi S. (2008) Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Curr. Pharm. Des*, 2008, 14(10):953-961

- [66] Obrosova, IG, Van Huysen C, Fathallah, L, Cao XC, Greene DA and Stevens MJ. An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense. *FASEB J.*,2002, 16(1): 123-125.
- [67] Kuhad A, Chopra K. Tocotrienol attenuates oxidative nitrosative stress and inflammatory cascade in experimental model of diabetic neuropathy. *Neuropharmacology*, 2009, 57(4):456-462.
- [68] Vincent AM, McLean LL, Backus C, Feldman EL. Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons. *FASEB J.* 2005, 19(6):638-640.
- [69] Kim H, Kim J, Yoon Y. Emerging Therapy for Diabetic Neuropathy: Cell Therapy Targeting Vessels and Nerves. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, 2012, 12:168-78.
- [70] Lazarovici P, Marcinkiewicz C, Lelkes PI. Cross talk between the cardiovascular and nervous systems: neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenic effects of nerve growth factor (NGF)-implications in drug development. *Curr. Pharm. Des.*,2006, 12(21):2609-2622
- [71] Unsicker K, Reichert-Preibsch H, Schmidt R, Pettmann B, Labourdette G, Sensenbrenner M. Astroglial and fibroblast growth factors have neurotrophic functions for cultured peripheral and central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84(15):5459-5463.
- [72] Simovic D, Isner J.M, Ropper A.H, Pieczek A, Weinberg D.H. Improvement in chronic ischemic neuropathy after intramuscular phVEGF165 gene transfer in patients with critical limb ischemia. *Arch. Neurol.* 2001, 58(5):761-768.
- [73] Salis, MB, Graiani G, Desortes E, Caldwell R, Madeddu, P, Emanuelli C. Nerve growth factor supplementation reverses the impairment, induced by Type 1 diabetes, of hindlimb post-ischaemic recovery in mice. *Diabetologia*, 2004, 47(6):1055-1063.
- [74] Biessels GJ, Bril V, Calcutt NA, et al. Phenotyping animal models of diabetic neuropathy: a consensus statement of the Diabetic Neuropathy Study Group of the EASD (Neurodiab). *J Peripher Nerv Syst* 2014;19:77–87.
- [75] O’Brien PD, Hinder LM, Sakowski SA, Feldman EL. ER stress in diabetic peripheral neuropathy: a new therapeutic target. *Antioxid Redox Signal* 2014;21:621–633.
- [76] Vincent AM, Callaghan BC, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nat Rev Neurol* 2011;7:573–583
- [77] Zenker J, Ziegler D, Chrast R. Novel pathogenic pathways in diabetic neuropathy. *Trends Neurosci* 2013;36:439–449
- [78] Leininger G.M, Vincent AM, and Feldman EL. The role of growth factors in diabetic peripheral neuropathy. *J. Peripher. Nerv. Syst.*,2004, 9(1):26-53.
- [79] Sima AA. New insights into the metabolic and molecular basis for diabetic neuropathy. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003, 60(11):2445-2464.
- [80] Bonhof GJ, Herder C, Strom A, Papanas N, et al. Emerging Biomarkers, Tools, and Treatments for Diabetic Polyneuropathy. *Endocr Rev.* 2019;40:153-92

- [81] Yagihashi S. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy. *Diabetes Metab Rev.* 1995;11:193-225
- [82] Han JW, Sin MY, Yoon YS. Cell therapy for diabetic neuropathy using adult stem or progenitor cells. *Diabetes Metab J.* 2013;37:91-105
- [83] Boulton A, Malik R, Arezzo J, Sosenko J. Diabetic Somatic Neuropathies. *Diabetes care*, 2004, 27:1458-86.
- [84] Young MJ, et al. A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population. *Diabetologia*, 1993. 36(2):150-4.
- [85] Tentolouris N et al. Moisture Status of the Skin of the Feet Assessed by the Visual Test Neuropad Correlates With Foot Ulceration in Diabetes. *Diabetes care.* 2010, 33:1112-4.
- [86] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964–967.
- [87] Shi Q, Rafii S, Wu M, et al. Evidence for Circulating Bone Marrow-Derived Endothelial Cells. *Blood*, 1998, 92:362-367.
- [88] Aicher A, Zeiher A, Dimmeler S. Mobilizing Endothelial Progenitor Cells. *Hypertension*, 2005, 45:321-5.
- [89] Fina L, Molgaard HV, Robertson D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990;75:2417–2426.
- [90] Fadini GP, Vigili de Kreutzenberg S, Coracina A et al. Circulating CD34(+) cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *European heart journal*, 2006, 27:2247-55.
- [91] Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, et al. Biology and plasticity of CD133 hematopoietic stem cells. *Ann NY Acad Sci.* 2003, 996:141–151.
- [92] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circulation research.* 2004, 95:343-53
- [93] Fadini GP, Agostini C, Avogaro A. Endothelial Progenitor Cells and Vascular Biology in Diabetes Mellitus: Current Knowledge and Future Perspectives. *Current diabetes reviews*, 2005, 1:41-58
- [94] Pearson, Jeremy. Endothelial progenitor cells-an evolving story. *Microvascular research.* 2010, 79:162-8.
- [95] Rustemeyer P, Wittkowski, W, Jurk K, Koller A. Optimized Flow Cytometric Analysis of Endothelial Progenitor Cells in Peripheral Blood. *J Immunoassay Immunochem* , 2006, 27:77-88.
- [96] Fadini GP, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Significance of Endothelial Progenitor Cells in Subjects With Diabetes. *Diabetes care.* 2007, 30:1305-13.
- [97] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:3422–3427.

- [98] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999; 18:3964–3972.
- [99] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003; 348:593–600.
- [100] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999; 85:221–228.
- [101] Asahara, T, Kawamoto, A, Masuda H. Concise Review: Circulating Endothelial Progenitor Cells for Vascular Medicine. *Stem cells*, 2011, 29: 1650-5.
- [102] Urbich C, Aicher A, Heeschen C, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 39:733-42.
- [103] Dai Y, Ashraf M, Zuo S, et al. Mobilized bone marrow progenitor cells serve as donors of cytoprotective genes for cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 44: 607-17.
- [104] Li M, Nishimura H, Iwakura A, et al. Endothelial Progenitor Cells Are Rapidly Recruited to Myocardium and Mediate Protective Effect of Ischemic Preconditioning via "Imported" Nitric Oxide Synthase Activity. *Circulation*, 2005, 111:1114-20.
- [105] Jujo K, Li M, Losordo D. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 45: 530-44.
- [106] Miyamoto Y, Suyama T, Yashita T, et al. Bone marrow subpopulations contain distinct types of endothelial progenitor cells and angiogenic cytokine-producing cells. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 43: 627-35.
- [107] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med* 2004;14:318–22.
- [108] Ribatti D. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. *Leukemia research*, 2006, 31:439-44.
- [109] Bailey A, Jiang S, Afentoulis M, et al. Transplanted adult hematopoietic stems cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood*, 2004, 103:13-9.
- [110] Kachamakova-Trojanowska N, Bukowska-Strakova K, Zukowska M, Dulak J, Jozkowicz A. The real face of endothelial progenitor cells – Circulating angiogenic cells as endothelial prognostic marker?. *Pharmacological Reports*, 2015, 67.
- [111] Rehman, J., Li, J., Orschell, C.M., March, K.L. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, 2003. 107, 1164–1169
- [112] Fadini GP, Vigili de Kreutzenberg S, Albiro M, et al. Gender Differences in Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Risk Profile The Role of Female Estrogens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28: 997-1004.
- [113] Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Medicine*, 1999, 5(4): 434-438.

- [114] Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, et al. Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Immunol.* 2004; 172:1266–1272.
- [115] Hur J, Yoon C.H., Lee C, et al. Akt is a key modulator of endothelial progenitor cell trafficking in ischemic muscle. *Stem cells*, 2007, 25:1769-1778.
- [116] Ben Shoshan J, George J. Endothelial progenitor cells as therapeutic vectors in cardiovascular disorders: from experimental models to human trials. *Pharmacol Ther.* 2007; 115:25–36
- [117] Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med.* 2003; 9:702–712.
- [118] Arai M, Misao Y, Nagai H, et al. Granulocyte colony- stimulating factor: A noninvasive regeneration therapy for treating atherosclerotic peripheral artery disease. *Circ. J.*, 2006, 70:1093-1098.
- [119] Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003;425:841– 846.
- [120] Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell.* 1997;88:287–298
- [121] Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003;425:836 – 841
- [122] Aicher, Alexandra & Zeiher, Andreas & Dimmeler, Stefanie. Mobilizing Endothelial Progenitor Cells. *Hypertension*, 2005, 45. 321-5.
- [123] Kim K-A, Shin Y-J, Kim J-H, et al. Dysfunction of endothelial progenitor cells under diabetic conditions and its underlying mechanisms. *Archives of pharmacal research*, 2012, 35: 223-34.
- [124] Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol.* 2002;30:973–981
- [125] Golligorsky, Michael & Salven, Petri. Concise Review: Endothelial Stem and Progenitor Cells and Their Habitats. *Stem cells translational medicine.* 2013;2:499–504.
- [126] Grant M, May S, W. Caballero S, et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nature medicine*, 2002, 8: 607-12.
- [127] Masuda H, Shizuno T, Ishihara T, et al. Methodological development of a clonogenic assay to determine endothelial progenitor cell potential. *J Thromb Haemost*, 2011, 9:275-275.
- [128] Timmermans F, Plum J, Yoder M, et al. Endothelial progenitor cells: identity defined? *J. Cell. Mol. Med.*, 2009, 13, (1): 87-102
- [129] Sharpe E, Teleron A, Li B, et al. The Origin and in Vivo Significance of Murine and Human Culture-Expanded Endothelial Progenitor Cells. *Am J Pathol.* 2006, 168: 1710-21.

- [130] Romagnani P, Annunziato F, Liotta F, et al. CD14+CD34<sup>low</sup> Cells With Stem Cell Phenotypic and Functional Features Are the Major Source of Circulating Endothelial Progenitors. *Circulation research*. 2005, 97: 314-22.
- [131] Moldovan N. Role of Monocytes and Macrophages in Adult Angiogenesis: A Light at the Tunnel's End. *J Hematother Stem Cell Res*. 2002, 11: 179-94.
- [132] Pelosi E, Castelli G, Padura I, et al. Human Haemato-Endothelial Precursors: Cord Blood CD34+ Cells Produce Haemogenic Endothelium. 2012, *PLoS one*. 7. e51109.
- [133] Timmermans F, Hauwermeiren F, De Smedt M, et al. Endothelial Outgrowth Cells Are Not Derived From CD133+ Cells or CD45+ Hematopoietic Precursors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1572-1579.
- [134] Fadini GP, Miorin M, Facco M, et al. Circulating Endothelial Progenitor Cells Are Reduced in Peripheral Vascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *JACC*, 2005, 45:1449-57.
- [135] Verfaillie C. Hematopoietic stem cells for transplantation. *Nat Immunol*. 2002;3:314 – 317
- [136] Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol*. 2006;169:338 –346.
- [137] Faramarz N, P. Nagesh R, Song S X, Phan RT. Chapter 2 - Principles of Immunophenotyping, *Atlas of Hematopathology (Second Edition)*, ISBN 9780128098431, Academic Press, 2018, Pages 29-56.
- [138] Hirschi K, Ingram D, Yoder M. Assessing Identity, Phenotype, and Fate of Endothelial Progenitor Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1584-1595
- [139] Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;90:5002–12.
- [140] Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC 133 positive progenitor cells. *Blood* 2000;95:3106–12
- [141] Penninger J, Irie-Sasaki, J, Sasaki T, et al. CD45: New jobs for an old acquaintance. *Nature immunology*. 2001, 2: 389-96
- [142] Gleason B.C., and Hornick JL, Bovee J. Vascular Tumors in Practical Soft Tissue Pathology: A Diagnostic Approach. 2nd edition. *Virchows Archiv*. 473. 1-2. 2018: 341-390.
- [143] Imhof B, Dunon-Bluteau D. Leukocyte Migration and Adhesion. *Advances in immunology*. 1995, 58:345-416.
- [144] Hristow M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells. Isolation and characterization. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13:201–206.
- [145] Szmítko PE, Fedak PWM, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. Endothelial peichevprogenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation*. 2003;107:3093–3100
- [146] Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest*. 2005;115:572–583.

- [147] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34 cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95:952–958.
- [148] Zubair A, Malik S, Russell A, et al. Evaluation of mobilized peripheral blood CD34+ cells from patients with severe coronary artery disease as a source of endothelial progenitor cells. *Cytotherapy*. 2010, 12: 178-89.
- [149] Van Craenenbroeck E, Craenenbroeck A, Ierssel, S, et al. Quantification of circulating CD34(+)/KDR+/CD45(dim) endothelial progenitor cells: Analytical considerations. *Int J Cardiol*, 2012, 167.
- [150] Fadini GP, Sartore S, Albiero M, et al. Number and Function of Endothelial Progenitor Cells as a Marker of Severity for Diabetic Vasculopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006, 26:2140-6.
- [151] Hur, J., Yoon, C. H., Kim, H. S., et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004. 24, 288-293
- [152] Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 2000;105:71-7
- [153] Shantsila, E., Watson, T., Tse, H. F., and Lip, G. Y., New insights on endothelial progenitor cell subpopulations and their angiogenic properties. 2008, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 51, 669- 671
- [154] Pelosi E, Castelli G, Testa U. Endothelial progenitors. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 2014, 52:186–194
- [155] Williamson K, Hamilton A, Reynolds J, et al. Age-related impairment of endothelial progenitor cell migration correlates with structural alterations of heparan sulfate proteoglycans. *Aging cell*. 2012, 12:139–147
- [156] Cappellari R, D'Anna M, Avogaro A, et al. Plerixafor improves the endothelial health balance. The effect of diabetes analysed by polychromatic flow cytometry. *Atherosclerosis*, 2016, 251.
- [157] Untergasser G, Koeck R, Wolf D, et al. CD34+/CD133– circulating endothelial precursor cells (CEP): Characterization, senescence and in vivo application. *Experimental gerontology*. 41: 600–608
- [158] Duda D, Cohen K, Scadden D, Jain R. A protocol for phenotypic detection and enumeration of circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in human blood. *Nature protocols*, 2007, 2: 805-10.
- [159] Steurer M, Kern J, Zitt M, et al. Quantification of circulating endothelial and progenitor cells: Comparison of quantitative PCR and four-channel flow cytometry. *BMC research notes*, 2008, 1. 71.
- [160] Ingram D, Caplice N, Yoder M. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood*. 2005, 106: 1525-31.
- [161] Dignat-George F, Sampol J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept. *Eur J Haematol*. 2000;65:215- 220



- [162] Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, et al. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost.* 2005; 93: 228–3
- [163] Alvarez DF, Huang L, King J.A., et al. Lung microvascular endothelium is enriched with progenitor cells that exhibit vasculogenic capacity, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 294 (2008) L419–L430
- [164] Westerweel P, Luijten R, Hoefler I et al. Haematopoietic and endothelial progenitor cells are deficient in quiescent systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2007;66:865– 870.
- [165] Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH et al. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation* 2003; 108:457– 463
- [166] Krahnkel N, Adams V, Linke A et al. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:698– 703.
- [167] Chen J, Li H, Addabbo F et al. Adoptive transfer of syngeneic bone marrow-derived cells in mice with obesity-induced diabetes: Selenoorganic antioxidant ebselen restores stem cell competence. *Am J Pathol* 2009;174: 701–711.
- [168] Yiu K-H, Tse H-F. Specific Role of Impaired Glucose Metabolism and Diabetes Mellitus in Endothelial Progenitor Cell Characteristics and Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:1136-1143.
- [169] Fadini GP. An underlying principle for the study of circulating progenitor cells in diabetes and its complications. *Diabetologia*, 2008, 51:1091-4.
- [170] Fadini G.P., Avogaro A. Diabetes impairs mobilization of stem cells for the treatment of cardiovascular disease: a meta-regression analysis, *Int. J. Cardiol.* 2013, 168:892-897.
- [171] Fadini G.P., Albiero M, Vigili de Kreutzenberg S, et al. Diabetes impairs stem cell and proangiogenic cell mobilization in humans, *Diabetes Care*, 2013, 36: 943-949.
- [172] Fadini GP. Is bone marrow another target of diabetic complications? *Eur J Clin Invest*, 2011, 41:457–463
- [173] Fadini G.P. A reappraisal of the role of circulating (progenitor) cells in the pathobiology of diabetic complications. *Diabetologia*, 2013, 57:4–15
- [174] Fadini GP, Sartore S, Schiavon M, Albiero M, Baesso I, Cabrelle A, Agostini C, Avogaro A. Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats. *Diabetologia.* 2006;49:3075–3084.
- [175] Fadini GP, Madeddu P, Waltenberger J, Fiorina P. Vascular stem and progenitor cells in diabetic complications. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:580343.
- [176] Ikenaga, S., Hamano, K., Nishida, M., et al. Autologous bone marrow implantation induced angiogenesis and improved deteriorated exercise capacity in a rat ischemic hindlimb model. *J. Surg. Res.*, 2001, 96: 277-283.
- [177] Liew, A., McDermott, J. H., Barry, F., and O'Brien, T., Endothelial progenitor cells for the treatment of diabetic vasculopathy: Panacea or pandora's box? *Diabetes Obes. Metab.*, 2008, 10: 353-366.

- [178] Assmus, B., Schachinger, V., Teupe, C., et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (topcare-ami). *Circulation*, 2002, 106: 3009-3017.
- [179] Chen M-C, Sheu J-J, Wang P-W, Chen C-Y, Kuo M-C, Hsieh C-J, et al. Complications impaired endothelial progenitor cell function in Type 2 diabetic patients with or without critical leg ischaemia: implication for impaired neovascularization in diabetes. *Diabet Med* 2009;26:134–41.
- [180] Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest*. 2007;117:1249–1259.
- [181] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414: 813-820.
- [182] Griending KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003 21; 108(16): 1912-6.
- [183] Strehlow K, Werner N, Berweiler J, et al. Estrogen Increases Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cell Production and Diminishes Neointima Formation. *Circulation*. 2003, 107. 3059-65.
- [184] Fadini GP, Schiavon M, Cantini M, et al. Circulating Progenitor Cells Are Reduced in Patients with Severe Lung Disease. *Stem cells*, 2006. 24: 1806-13.
- [185] Avogaro A, Pagnin E, Calo L. Monocyte NADPH oxidase subunit p22(phox) and inducible hemeoxygenase-1 gene expressions are increased in type II diabetic patients: relationship with oxidative stress. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(4): 1753-9.
- [186] Marchetti V, Menghini R, Rizza S, et al. Benfotiamine Counteracts Glucose Toxicity Effects on Endothelial Progenitor Cell Differentiation via Akt/FoxO Signaling. *Diabetes*. 2006, 55:2231-7.
- [187] Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001;44:129 –146
- [188] Grant M, May W, Caballero S, et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nature medicine*. 2002, 8:607-12.
- [189] Hu L, Dai S-C, Luan X, et al. (2018). Dysfunction and Therapeutic Potential of Endothelial Progenitor Cells in Diabetes Mellitus. *J Clin Med Res*, 2018, 10: 752-757.
- [190] Tsukada S, Masuda H, Jung S.Y., et al. Impaired development and dysfunction of endothelial progenitor cells in type 2 diabetic mice. *Diabetes & Metabolism*, 2016, 43.
- [191] Sosale B, Srikantiah C, Aravind S, Panchagnula R, Anupama K. Influence of cytokine status on insulin resistance and circulating endothelial progenitor cells in type 2 diabetes mellitus. *Cytokine*. 2017,99. 179-185.
- [192] Fadini GP, Pucci L, Vanacore R et al. Glucose tolerance is negatively associated with circulating progenitor cell levels. *Diabetologia*, 2007, 50:2156–2163

- [193] Rigato M, Bittante C, Albiero M, Avogaro A, Fadini GP. Circulating Progenitor Cell Count Predicts Microvascular Outcomes in Type 2 Diabetic Patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015, 100(7):2666–2672.
- [194] Nowak WN, Borys S, Kusinska K, Bukowska-Strakova K, Witek P, Koblik T, et al. Number of circulating pro-angiogenic cells, growth factor and antioxidative gene profiles might be altered in type 2 diabetes with and without diabetic foot syndrome. *J Diabetes Investig* 2014;5:99–107.
- [195] van Ark J, Moser J, Lexis C, et al. Type 2 diabetes mellitus is associated with an imbalance in circulating endothelial and smooth muscle progenitor cell numbers. *Diabetologia.* 2012, 55: 2501-12.
- [196] Zhao C, Wang M, Siu D, et al. Myocardial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus: Role of endothelial progenitor cells and oxidative stress. *Cardiovascular diabetology*, 2012, 11. 147
- [197] Hristov M, Fach C, Becker C, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary disease associated with long term statin treatment. *Atherosclerosis*, 2007, 192:413-420.
- [198] Kissel, C. K.; Lehmann, R.; Assmus, B., et al. . Selective functional exhaustion of hematopoietic progenitor cells in the bone marrow of patients with postinfarction heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007, 49:2341–2349.
- [199] Jie KE, Zaikova MA, Bergevoet MW, et al. Progenitor cells and vascular function are impaired in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:1875-82
- [200] Lin CJ, Wu CJ, Wu PC, Pan CF, Wang TJ, Sun FJ, et al. Indoxyl sulfate impairs endothelial progenitor cells and might contribute to vascular dysfunction in patients with chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res* 2016;41:1025-1036.
- [201] Ozkok A, Yildiz A. Endothelial Progenitor Cells and Kidney Diseases. *Kidney Blood Press Res.* 2018, 43. 701-718.
- [202] Choi J-H, Kim K, Huh W. et al. Decreased Number and Impaired Angiogenic Function of Endothelial Progenitor Cells in Patients With Chronic Renal Failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004, 24:1246-52.
- [203] Duh E, Aiello LP. Vascular endothelial growth factor and diabetes: the agonist versus antagonist paradox. *Diabetes* 1999; 48(10): 1899-906
- [204] Aiello LP, Wong JS. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int Suppl* 2000; 77: S113- 9.
- [205] Brunner S, Schernthaner GH, Satler M, et al. Correlation of different circulating endothelial progenitor cells to stages of diabetic retinopathy: first in vivo data. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:392–398.
- [206] Asnagli V, Lattanzio R, Mazzolari G, et al. Increased clonogenic potential of circulating endothelial progenitor cells in patients with type 1 diabetes and proliferative retinopathy. *Diabetologia.* 2006;49:1109–1111

- [207] Lee IG, Chae SL, Kim JC. Involvement of circulating endothelial progenitor cells and vasculogenic factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Eye*. 2006;20(5):546–552.
- [208] Fadini GP, Sartore S, Baesso I, et al. Endothelial progenitor cells and the diabetic paradox. *Diabetes Care*. 2006;29(3):714–716
- [209] Menegazzo L, Albiero M, Avogaro A, Fadini GP. Endothelial progenitor cells in diabetes mellitus. *Biofactors*. 2012;38:194-202
- [210] Mizukami H, Yagihashi S. Exploring a new therapy for diabetic polyneuropathy - the application of stem cell transplantation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:45
- [211] Kang H, Ma X, Liu J, Fan Y, Deng X. High glucose-induced endothelial progenitor cell dysfunction. *Diab Vasc Dis Res*. 2017;14:381-94
- [212] Jeong J-O, Kim M-O, Kim H, et al. Dual Angiogenic and Neurotrophic Effects of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells on Diabetic Neuropathy. *Circulation*. 2009, 119: 699-708..
- [213] Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, et al. Therapeutic Neovascularization Using Cord Blood-Derived Endothelial Progenitor Cells for Diabetic Neuropathy. *Diabetes*. 2004, 54:1823-8.
- [214] Jie KE, Goossens MHJ, van Oostrom O, Lilien MR, Verhaar MC. Circulating endothelial progenitor cell levels are higher during childhood than in adult life. *Atherosclerosis* 2009;202:345–7.
- [215] Masuda H, Kalka C, Takahashi T, Yoshida M, Wada M, Kobori M, et al. Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and kinetics for physiological postnatal vasculogenesis. *Circ Res* 2007;101:598–606
- [216] Hoetzer GL, Van Guilder GP, Irmiger HM, Keith RS, Stauffer BL, DeSouza CA. Aging, exercise, and endothelial progenitor cell clonogenic and migratory capacity in men. *J Appl Physiol* 2007;102:847–52
- [217] Busik JV, Tikhonenko M, Bhatwadekar A, Opreanu M, Yakubova N, Caballero S, et al. Diabetic retinopathy is associated with bone marrow neuropathy and a depressed peripheral clock. *J Exp Med* 2009;206:2897–906.
- [218] Croce G, Passacuale G, Necozone S, et al. Nonpharmacological Treatment of Hypercholesterolemia Increases Circulating Endothelial Progenitor Cell Population in Adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:38-39
- [219] Fukai T, Siegfried M, Fukai M, et al. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest*, 2000, 105: 1631-9.
- [220] Han X, Tao Y, Deng Y, et al. Metformin accelerates wound healing in type 2 diabetic db/db mice. *Mol Med Rep*, 2017, 16: 8691-8698
- [221] Laufs U, Urhausen A, Werner N, et al. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2005;12:407-14.

- [222] Adams V, Lenk K, Linke A, et al. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:684-90.
- [223] Shaffer RG, Greene S, Arshi A, et al. Effect of acute exercise on endothelial progenitor cells in patients with peripheral arterial disease. *Vasc Med* 2006;11: 219-26.
- [224] Dai X, Zhai Lu, Su Q, et al. Effect of Aerobic and Resistance Training on Endothelial Progenitor Cells in Mice with Type 2 Diabetes. *Cellular Reprogramming*. 2020, 22.
- [225] Müller-Ehmsen J, Braun D, Schneider T, et al. Decreased number of circulating progenitor cells in obesity: Beneficial effects of weight reduction. *European heart journal*. 2008, 29. 1560-8.
- [226] Buitrago-Lopez A, Sanderson J, Johnson L, et al. Chocolate consumption and cardiometabolic disorders: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2011;343:d4488.
- [227] Heiss C, Jahn S, Taylor M, et al. Improvement of endothelial function with dietary flavanols is associated with mobilization of circulating angiogenic cells in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:218-24.
- [228] Kim W, Jeong MH, Cho SH, et al. Effect of green tea consumption on endothelial function and circulating endothelial progenitor cells in chronic smokers. *Circ J* 2006;70:1052-7
- [229] Balestrieri ML, Fiorito C, Crimi E, et al. Effect of red wine antioxidants and minor polyphenolic constituents on endothelial progenitor cells after physical training in mice. *Int J Cardiol* 2008;126:295-7.
- [230] Schmidt-Lucke C, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Quantification of Circulating Endothelial Progenitor Cells Using the Modified ISHAGE Protocol. *PloS one*. 2010, 5. e13790.
- [231] Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow– derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*. 2001; 108:399 – 405
- [232] Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*. 2001;108:391–397
- [233] Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, et al. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2004;110:1933–1939.
- [234] Loomans CJ, van Haperen R, Duijs JM, et al. Differentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells is shifted into a proinflammatory phenotype by hyperglycemia. *Mol Med*. 2009;15:152–159
- [235] Bahlmann FH, de Groot K, Mueller O, et al. Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. *Hypertension*. 2005;45:526–529

- [236] Steinmetz M, Brouwers C, Nickenig G, Wassmann S. Synergistic effects of telmisartan and simvastatin on endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med*. 2010;14:1645–1656.
- [237] Kayashima Y, Smithies O, Kakoki M. The kallikrein-kinin system and oxidative stress. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012;21:92–9
- [238] Berezin, Alexander & Kremzer, Alexander & Martovitskaya, Y.V. The effect of angiotensin-2 receptor blocker valsartan on circulating level of endothelial progenitor cells in diabetic patients with asymptomatic coronary artery disease. 2015, *Diabet Metabol Syndr Clin Res Rev*. 9. 305-309.
- [239] Yu J W, Deng Y-P, Han X, et al. Metformin improves the angiogenic functions of endothelial progenitor cells via activating AMPK/eNOS pathway in diabetic mice. *Cardiovascular Diabetology*. 2016, 15: 88.
- [240] Chen LL, Liao YF, Zeng TS, Yu F, Li HQ, Feng Y. Effects of metformin plus gliclazide compared with metformin alone on circulating endothelial progenitor cell in type 2 diabetic patients. *Endocrine*. 2010 Oct;38(2):266-75.
- [241] Fadini GP, Avogaro A. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and vascular repair by mobilization of endogenous stem cells in diabetes and beyond. *Atherosclerosis*. 2013;229:23–29.
- [242] Fadini GP, Boscaro E, Albiero M, et al. The oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin increases circulating endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes: possible role of stromal-derived factor-1alpha. *Diabetes Care*. 2010 ;33(7):1607-9.
- [243] Liu H, Guo L, Xing J, et al. The protective role of DPP4 inhibitors in atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2020, 875. 173037.
- [244] Spigoni V, Picconi A, Cito M, et al. Pioglitazone improves in vitro viability and function of endothelial progenitor cells from individuals with impaired glucose tolerance. *PLoS One*. 2012;7(11):e48283.
- [245] Makino H, Okada S, Nagumo A, et al. Pioglitazone treatment stimulates circulating CD34-positive cells in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008 Sep;81(3):327-30.
- [246] Wang CH, Ting MK, Verma S, et al. Pioglitazone increases the numbers and improves the functional capacity of endothelial progenitor cells in patients with diabetes mellitus. *Am Heart J*. 2006 Dec;152(6):1051.e1-8.
- [247] Nandula S, Kundu N, Awal H, et al. Role of Canagliflozin on function of CD34+ve endothelial progenitor cells (EPC) in patients with type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology*. 2021, 20:44
- [248] Bonora B, Cappellari R, Albiero M, et al. Effects of SGLT2 Inhibitors on Circulating Stem and Progenitor Cells in Patients With Type 2 Diabetes. 2018, *J Clin Endocrinol Metab*, 103(10):3773–3782
- [249] Bahlmann F, DeGroot K, Duckert T, et al. Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin Rapid Communication. *Kidney international*. 2003,64. 1648-52.

- [250] Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*. 2004;103:921–926
- [251] Seeger F, Haendeler J, Walter D, et al. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Downregulates Endothelial Progenitor Cells. *Circulation*. 2005, 111. 1184-91.
- [252] Verma S, Kuliszewski M, Li S-H, et al. C-Reactive Protein Attenuates Endothelial Progenitor Cell Survival, Differentiation, and Function: Further Evidence of a Mechanistic Link Between C-Reactive Protein and Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2004, 109:2058-67.
- [253] Humpert P, Djuric Z, Zeuge U, et al. Insulin Stimulates the Clonogenic Potential of Angiogenic Endothelial Progenitor Cells by IGF-1 Receptor-Dependent Signaling. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*. 2008, 14. 301-8.
- [254] Oikonomou D, Kopf S, von Bauer R, et al. Influence of insulin and glargine on outgrowth and number of circulating endothelial progenitor cells in type 2 diabetes patients: a partially double-blind, randomized, three-arm unicenter study. *Cardiovasc Diabetol*. 2014 Oct 11;13:137.
- [255] Breen D, Chan K, Dhaliwall J, et al. Insulin Increases Reendothelialization and Inhibits Cell Migration and Neointimal Growth After Arterial Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* , 2009, 29. 1060-6.
- [256] Yoon YS, Uchida S, Masuo O, et al. Progressive attenuation of myocardial vascular endothelial growth factor expression is a seminal event in diabetic cardiomyopathy: restoration of microvascular homeostasis and recovery of cardiac function in diabetic cardiomyopathy after replenishment of local vascular endothelial growth factor. *Circulation*. 2005;111:2073–2085.
- [257] Ho JC, Lai WH, Li MF, et al. Reversal of endothelial progenitor cell dysfunction in patients with type 2 diabetes using a conditioned medium of human embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012;28:462–473.
- [258] Foresta, C., De Toni, L., Di Mambro, A., et al. The PDE5 inhibitor sildenafil increases circulating endothelial progenitor cells and CXCR4 expression. *J. Sex. Med*. 2009. 6, 369–372.
- [259] Hart, K., Baur, D., Hodam, J., Lesoon-Wood, L., Parham, M., Keith, K., et al. Short- and long-term effects of sildenafil on skin flap survival in rats. *Laryngoscope*. 2006. 116, 522–528.
- [260] Koneru, S., Varma Penumathsa, S., Thirunavukkarasu, M., et al. Sildenafil-mediated neovascularization and protection against myocardial ischaemia reperfusion injury in rats: role of VEGF/angiopoietin-1. *J. Cell. Mol. Med*. 2008. 12, 2651–266
- [261] Humpert P, Neuwirth R, Battista M, et al. SDF-1 Genotype Influences Insulin-Dependent Mobilization of Adult Progenitor Cells in Type 2 Diabetes. *Diabetes care*. 2005, 28: 934-6.
- [262] Tomlinson M, Tomlinson S, Yang X, Kirkham J. Cell separation: Terminology and practical considerations. *Journal of tissue engineering*. 2013, 4: 2041731412472690.

- [263] McCoy J P Jr. Basic principles of flow cytometry. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2002, 16(2):229-243
- [264] Becton, Dickinson and Company. (2002). *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide.* 11-11032-03: rev. A
- [265] Abcam plc. *Introduction to flow cytometry: Antibody staining.* (1998-2018).
- [266] Mariucci S, Rovati B, Bencardino K, Manzoni M, Danova M. Flow cytometric detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Int J Lab Hematol.* 2010, 32. e40-48.
- [267] Danova M, Comolli G, Manzoni M, Torchio M, Mazzini G. Flow cytometric analysis of circulating endothelial cells and endothelial progenitors for clinical purposes in oncology: A critical evaluation (Review). *Molecular and Clinical Oncology.* 2016, 4.
- [268] Ma, J., Both, S. K., Yang, F., Cui, F. Z., Pan, J., Meijer, G. J., et al. Concise review: cell-based strategies in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Stem Cells Transl. Med.* 2014. 3, 98–107
- [269] Romagnoli, C., and Brandi, M. L. Adipose mesenchymal stem cells in the field of bone tissue engineering. *World J. Stem Cells,* 2014. 6, 144–152.
- [270] Asatrian, G., Pham, D., Hardy, W. R., James, A. W., and Peault, B. Stem cell technology for bone regeneration: current status and potential applications. *Stem Cells Cloning,* 2015. 8, 39–48.
- [271] Taniguchi E, Kin M, Torimura T, et al. Endothelial progenitor cell transplantation improves the survival following liver injury in mice. *Gastroenterology.* 2006; 130:521–531.
- [272] Wang XX, Zhang FR, Shang YP, et al. Transplantation of autologous endothelial progenitor cells may be beneficial in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension: a pilot randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49:1566–1571.
- [273] Anand, P. Neurotrophic factors and their receptors in human sensory neuropathies. *Prog. Brain Res.,* 2004, 146, 477-492
- [274] Schratzberger P., Walter D.H., et al. Reversal of experimental diabetic neuropathy by VEGF gene transfer. *J. Clin. Invest.,* 2001, 107(9), 1083- 1092
- [275] Kusano, K.F., Allendoerfer, K.L., Munger, W., et al. Sonic hedgehog induces arteriogenesis in diabetic vasa nervorum and restores function in diabetic neuropathy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.,* 2004, 24(11), 2102-2107
- [276] Li, M., Nishimura, H., Kusano, K.F., et al. Neuronal nitric oxide synthase mediates statin-induced restoration of vasa nervorum and reversal of diabetic neuropathy. *Circulation,* 2005, 112(1), 93-102
- [277] Hung, H-S, Shyu W, Tsai C-H, et al. Transplantation of Endothelial Progenitor Cells as Therapeutics for Cardiovascular Diseases. *Cell transplantation.* 2009, 18. 1003-12.
- [278] Hidmark A, Spanidis I, Fleming TH, et al. Electrical muscle stimulation induces an increase of VEGFR2 on circulating hematopoietic stem cells in patients with diabetes. *Clin Ther* 2017;39:1132-44 e1132



- [279] Kim BJ, Lee JK, Schuchman EH, Jin HK, Bae JS. Synergistic vasculogenic effects of AMD3100 and stromal-cell-derived factor-1 $\alpha$  in vasa nervorum of the sciatic nerve of mice with diabetic peripheral neuropathy. *Cell Tissue Res* 2013;354: 395-407
- [280] Tecilazich F, Dinh T, Pradhan L, et al. Role of Endothelial Progenitor Cells and Inflammatory Cytokines in Healing of Diabetic Foot Ulcers. *PloS one*. 2013, 8. e83314.
- [281] Huang P, Li S, Han M, Xiao Z, Yang R et al. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes Care*, 2005, 28: 2155-2160.
- [282] Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *Lancet Neurol*. 2012;11:521-34
- [283] Dyck PJ. Detection, characterization, and staging of polyneuropathy: assessed in diabetics. *Muscle Nerve*. 1988;11:21-32
- [284] Stergiou, G., Palatini P, Parati G., et al.; on behalf of the European Society of Hypertension Council and the European Society of Hypertension Working Group on Blood Pressure Monitoring and Cardiovascular Variability 2021 European Society of Hypertension practice guidelines for office and out-of-office blood pressure measurement, *J. Hypertens*: July 2021 – Vol 39 - Issue 7 - p 1293-1302
- [285] Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from kidney disease: improving global outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2005;67:2089-100.
- [286] Tentolouris, N., et al., Peripheral neuropathy does not invariably coexist with autonomic neuropathy in diabetes mellitus. *Eur J Intern Med*, 2001. 12(1): p. 20-27
- [287] Estes ML, Mund JA, Mead LE, et al. Application of polychromatic flow cytometry to identify novel subsets of circulating cells with angiogenic potential. *Cytometry A* 2010;77:831-9.
- [288] Barnett D, Janossy G, Lubenko A, Matutes E, Newland A, Reilly JT. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34+ haematopoietic stem cells. Prepared by the CD34+ Haematopoietic Stem Cell Working Party. General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. *Clin Lab Haematol* 1999;21:301-8
- [289] Caballero S, Sengupta N, Afzal A, et al. Ischemic vascular damage can be repaired by healthy, but not diabetic, endothelial progenitor cells. *Diabetes* 2007;56:960-7.
- [290] Fadini GP, Rigato M, Cappellari R, Bonora BM, Avogaro A. Long-term prediction of cardiovascular outcomes by circulating CD34+ and CD34+CD133+ stem cells in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2017;40:125-31.
- [291] Rigato M, Avogaro A, Fadini GP. Levels of circulating progenitor cells, cardiovascular outcomes and death: a meta-analysis of prospective observational studies. *Circ Res* 2016;118:1930-9.
- [292] Fadini GP, de Kreutzenberg S, Agostini C, et al. Low CD34+ cell count and metabolic syndrome synergistically increase the risk of adverse outcomes. *Atherosclerosis* 2009;207:213-9.

- [293] Tan K, Lessieur E, Cutler A, et al. Impaired function of circulating CD34(+) CD45 (-) cells in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Exp Eye Res* 2010;91:229-37.
- [294] Brunner S, Hoellerl F, Schmid-Kubista KE, et al. Circulating angiopoietic cells and diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus, with or without macrovascular disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:4655
- [295] Fadini GP, Ferraro F, Quaini F, Asahara T, Madeddu P. Concise review: diabetes, the bone marrow niche, and impaired vascular regeneration. *Stem Cells Transl Med* 2014;3:949-57.
- [296] Dang Z, Maselli D, Spinetti G, et al. Sensory neuropathy hampers nociception-mediated bone marrow stem cell release in mice and patients with diabetes. *Diabetologia* 2015;58:2653-62.
- [297] Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol* 2007;28
- [298] Perlin JR, Sporrij A, Zon LI. Blood on the tracks: hematopoietic stem cell-endothelial cell interactions in homing and engraftment. *J Mol Med (Berl)* 2017;95:809-19.
- [299] Koga M, Otsuki M, Kubo M, Hashimoto J, Kasayama S. Relationship between circulating vascular cell adhesion molecule-1 and microvascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1998;15:661
- [300] Prisco AR, Prisco MR, Carlson BE, Greene AS. TNF-alpha increases endothelial progenitor cell adhesion to the endothelium by increasing bond expression and affinity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015;308:H1368-81.
- [301] Yu CG, Zhang N, Yuan SS, et al. Endothelial progenitor cells in diabetic microvascular complications: friends or foes? *Stem Cells Int* 2016;2016, 1803989.