

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ORIGINAL PAPER

Συσχέτιση του πολυμορφισμού *T-138C* Matrix Gla Protein με τη διαβητική νεφροπάθεια και την αγγειακή επασβέστωση

ΣΚΟΠΟΣ Ο προσδιορισμός των επιπέδων της dp-ucMGP σε διάφορα στάδια διαβητικής νεφροπάθειας (ΔΝ) και η συσχέτισή της με τους πολυμορφισμούς *aroE*, *VKORC1-1639 G>A* και *MGP T-138C* και το πάχος του έσω-μέσου χιτώνα της καρωτίδας (E-MXK). **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Σε 40 ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2) χωρίς νεφροπάθεια (δείγμα ελέγχου) και σε 118 ασθενείς σε διάφορα στάδια της ΔΝ (88 σε στάδια 1-4 και 30 σταδίου 5-αιμοκάθαρση υπό τεχνητό νεφρό) καθορίστηκε υπερηχογραφικά το πάχος του E-MXK ως δείκτης πρώιμης αγγειακής επασβέστωσης. Τα επίπεδα της dp-ucMGP προσδιορίστηκαν με ELISA σε 67 από αυτούς. Η γονοτύπηση των πολυμορφισμών *aroE*, *VKORC1-1639 G>A* και *MGP T-138C* πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο PCR-RFLP. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων της dp-ucMGP στο πλάσμα με το πάχος του E-MXK και την εξέλιξη της ΔΝ ($p<0,0001$ και $p=0,004$, αντίστοιχα, Kruskal-Wallis test). Παρ' όλο που το μέσο και το μέγιστο πάχος του E-MXK δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των γονοτύπων του *VKORC1-1639 G>A* και της *aroE*, σημαντικές διαφορές τους ανευρέθηκαν μεταξύ των γονοτύπων του πολυμορφισμού *MGP T-138C*. Οι TT ομοζυγώτες εμφάνιζαν υψηλότερες τιμές μέσου/μέγιστου πάχους E-MXK συγκριτικά με τους γονότυπους TC και CC ($p=0,01$ και $p=0,05$, αντίστοιχα, Kruskal-Wallis test). Όταν οι TT ομοζυγώτες συγκρίθηκαν με την κοινή ομάδα στην οποία εντάχθηκαν οι γονότυποι TC+CC, παρουσιάστηκε ακόμη μεγαλύτερη συσχέτιση με τις τιμές μέσου/μέγιστου πάχους E-MXK (γονότυποι TT συγκριτικά με TC+CC γονότυπους, $p=0,006$ και $p=0,022$, αντίστοιχα, Kruskal-Wallis test). Η συχνότητα των TT ομοζυγωτών συγκριτικά με τους άλλους γονότυπους ήταν στατιστικά υψηλότερη στην υποομάδα των αιμοκαθαιρομένων σε σχέση με τις υπόλοιπες υποομάδες (γονότυποι TT συγκριτικά με TC+CC γονότυπους, $p=0,002$, Kruskal-Wallis test). **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Εφόσον η MGP αποτελεί έναν σημαντικό αναστολέα αγγειακής επασβέστωσης, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης συνηγορούν στην υπόθεση ότι ενδεχομένως να υπάρχει γενετική βάση στον μηχανισμό της αγγειακής επασβέστωσης στη ΔΝ.

Ο επιπολασμός της αγγειακής επασβέστωσης (ΑΕ) είναι ιδιαίτερα υψηλός σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο (ΧΝΝ) και προβλέπει την εμφάνιση καρδιαγγειακών επεισοδίων.¹⁻³ Οι ασθενείς με ΧΝΝ έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να καταλήξουν από καρδιαγγειακά συμβάντα παρά να εμφανίσουν τελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (ΧΝΑΤΣ).⁴⁻⁶ Η ΑΕ κατατάσσεται σε δύο κατηγορίες: (α) Στην επασβέστωση του έσω χιτώνα που αναπτύσσεται κοντά σε εναποθέσεις χοληστερόλης στην αθηρωματική πλάκα και συμβάλλει στη στένωση και στη ρήξη της και (β) σε αυτή του μέσου χιτώνα

(σκλήρυνση τύπου Mönckeberg), όπου ανευρίσκονται εναποθέσεις ασβεστίου στον μέσο μυϊκό χιτώνα των αγγείων και η οποία οδηγεί προοδευτικά σε σκλήρυνση των αγγείων, αρτηριακή υπέρταση και υπερτροφία της αριστερής κοιλίας της καρδιάς (ΥΑΚ).⁷ Οι ασθενείς με ΧΝΝ εμφανίζουν κίνδυνο ανάπτυξης ΑΕ τόσο στον έσω όσο και στον μέσο χιτώνα.⁸ Επί πλέον, ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2) εμφανίζουν υψηλή επίπτωση καρδιαγγειακών συμβάντων λόγω επιταχυνόμενης ΑΕ, ενώ οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί δεν έχουν απολύτως εξακριβωθεί.

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2019, 36(1):96-106
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2019, 36(1):96-106

Σ. Ρουμेलιώτης,^{1,3}
Α. Ρουμελιώτης,¹
Σ. Παναγιώτσος,¹
Μ. Θεοδωρίδης,¹
Κ. Κανταρτζή,¹
Α. Ταυρίδου,²
Π. Πασαδάκης¹

¹Πανεπιστημιακή Νεφρολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη
²Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη
³Αχιλλειον Νεφρολογικό Κέντρο, Θεσσαλονίκη

Association of matrix Gla Protein *T-138C* polymorphism with diabetic nephropathy and vascular calcification

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Αγγειακή επασβέστωση
Διαβητική νεφροπάθεια
Matrix Gla protein
Πάχος έσω-μέσου χιτώνα καρωτίδας

Υποβλήθηκε 9.1.2018
Εγκρίθηκε 23.1.2018

Υπάρχουν φυσιολογικοί μηχανισμοί αναστολής της ΑΕ,^{9,10} οι οποίοι διαταράσσονται σε ουραιμικούς ασθενείς, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ΑΕ.⁹⁻¹¹ Μέσω γενετικών και βιοχημικών μελετών έχει αναγνωριστεί η πρωτεΐνη Gla της θεμέλιας ουσίας (matrix Gla protein, MGP) ως η πρώτη πρωτεΐνη που δρα ως αναστολέας της επασβεστόωσης τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*,¹²⁻¹⁴ εμποδίζοντας την εναπόθεση ασβεστίου στον μέσο χιτώνα των αγγείων¹⁵ μέσω σύνδεσής της με τη μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών (bone morphogenetic protein-2, BMP-2),¹⁶ που συνιστά γνωστό παράγοντα επιμετάλλωσης και ασβεστοποίησης των αγγείων.^{17,18} Για να καταστεί βιολογικά ενεργή η MGP πρέπει να υποστεί γ-γλουταμική μετα-μεταγραφική καρβοξυλίωση και κατόπιν φωσφορυλίωση,²² δύο διαδικασίες που εξαρτώνται από την επάρκεια της βιταμίνης Κ.¹⁹⁻²¹ Ανεπαρκής καρβοξυλίωση της MGP έχει συσχετιστεί και με τους δύο τύπους της ΑΕ και υποστρέφει όταν αυξηθεί η πρόσληψη της βιταμίνης Κ.²³ Επίσης, η μειωμένη διαιτητική πρόσληψη βιταμίνης Κ έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα ανενεργού MGP και εμφάνιση ΑΕ σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς και ασθενείς με μεταμόσχευση νεφρού.²⁴⁻²⁶

Εκτός από διαιτητικούς παράγοντες, εμπλέκονται και γενετικοί παράγοντες στον κύκλο της βιταμίνης Κ (ανακύκλωση της βιταμίνης Κ) και μπορούν να οδηγήσουν σε μειωμένη δραστηριότητα της MGP.^{27,28} Μονονουκλεοτιδικό γονιδιακό πολυμορφισμός (single nucleotide polymorphisms, SNPs) στο γονίδιο που κωδικοποιεί το υπεύθυνο ένζυμο για την ανακύκλωση της βιταμίνης Κ (*VKORC1*, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1) έχουν συσχετιστεί με επιταχυνόμενη ΑΕ της αορτής.²⁹ Φαρμακογενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι φορείς του Α αλληλόμορφου του πολυμορφισμού *VKORC1-1639 G>A* εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα και αυξημένη δραστηριότητα του *VKORC1* και ως επακόλουθο αυξημένη δραστηριότητα της MGP.^{28,30} Η απολιποπρωτεΐνη Ε (apolipoprotein E, *apoE*) διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην κάθαρση του πλάσματος από τα χυλομικρά, που συνιστούν γνωστούς μεταφορείς της βιταμίνης Κ.³¹ Τα τρία αλληλόμορφα της *apoE* σχετίζονται με τα επίπεδα της κυκλοφορούσας βιταμίνης Κ με την εξής σειρά: *apoE2>E3>E4* και εμπλέκονται στον μηχανισμό της αθηροσκλήρωσης μέσω της επίδρασής τους στα επίπεδα της κυκλοφορούσας LDL (*apoE2<E3<E4*).³¹

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την MGP έχει οκτώ SNPs στον υποκινητή και στις περιοχές κωδικοποίησης. Ο πολυμορφισμός *T-138C* βρίσκεται σε περιοχή του υποκινητή και ο CC γονότυπος έχει συσχετιστεί με καθυστέρηση στην εξέλιξη της ΑΕ και υψηλότερες συγκεντρώσεις HDL χοληστερόλης συγκριτικά με τον TT γονότυπο τόσο σε ηλικιωμένα άτομα της κοινότητας όσο και σε ασθενείς υπό αιμοκάθαρση.³²⁻³⁴ Προηγούμενη μελέτη σε αιμοκαθαιρό-

μενους ασθενείς έδειξε ότι οι εν λόγω ασθενείς εμφανίζουν διαφορετική κατανομή του πολυμορφισμού *T-138C* της MGP σε σύγκριση με τον υγιή πληθυσμό.³⁵ Σε μια πρόσφατη μελέτη έχει φανεί ότι τα επίπεδα της ανενεργού, αποφωσφορυλιωμένης, μη καρβοξυλιωμένης MGP (dp-ucMGP) στο πλάσμα αυξάνονται προοδευτικά σε ασθενείς σε διάφορα στάδια της ΧΝΝ, ενώ επίσης σχετίζονται και με τη βαρύτητα της επασβεστόωσης της αορτής.³⁶

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της συσχέτισης των πολυμορφισμών της *apoE*, του *VKORC1-1639 G>A* και του *MGP T-138C* με το πάχος του έσω-μέσου χιτώνα της καρωτίδας (E-MXK) και τα επίπεδα πλάσματος dp-ucMGP σε ασθενείς σε διαφορετικά στάδια διαβητικής νεφροπάθειας (ΔΝ), καθώς και σε ασθενείς με ΣΔ2 με φυσιολογική νεφρική λειτουργία (ομάδα ελέγχου). Επίσης, διερευνήθηκε η κατανομή του πολυμορφισμού *T-138C* της MGP στις εν λόγω ομάδες των ασθενών.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Πληθυσμός

Συνολικά, 158 ασθενείς ελληνικής καταγωγής συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Τα κριτήρια για τη διάγνωση του ΣΔ2 στους εν λόγω ασθενείς έχουν περιγραφεί σε προηγούμενες εργασίες,³⁷ ενώ όλοι οι ασθενείς παραχώρησαν έγγραφη συγκατάθεση συμμετοχής στη μελέτη. Ο πληθυσμός του δείγματος κατατάχθηκε σε δύο υποομάδες: Στη μία συμπεριλήφθηκαν 118 διαβητικοί ασθενείς σε διάφορα στάδια ΔΝ και 40 ασθενείς ως ομάδα ελέγχου (control) που έπασχαν από ΣΔ2 από 10ετία τουλάχιστον, με φυσιολογική λευκωματινουρία (normoalbuminuria), εκτιμώμενο ρυθμό σπειραματικής διήθησης (estimated glomerular filtration rate, eGFR) >60 mL/min, με φυσιολογική βυθοσκόπηση (απουσία διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας). Κριτήρια αποκλεισμού αποτελούσαν η ύπαρξη μη διαβητικής αιτιολογίας νεφροπάθειας, η αποφρακτική ουροπάθεια, η προχωρημένη νεοπλασματική νόσος και η παρουσία άλλης οξείας κατάστασης κατά τον χρόνο της ένταξης στη μελέτη. Κριτήρια για τη διάγνωση της ΔΝ ήταν (α) ΣΔ2 για >10 έτη, (β) βυθοσκόπηση θετική για διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, (γ) eGFR <60 mL/min και (δ) παρουσία λευκωματινουρίας. Όπως έχει περιγραφεί σε άλλη μελέτη, η λευκωματινουρία διαγνώστηκε ως η παρουσία λευκωματίνης στα ούρα σε τυχαίο δείγμα ούρων, σε τρεις συνεχόμενες μετρήσεις.³⁸ Στην παρούσα μελέτη, η διάγνωση της ΧΝΝ και η κατάταξή της σε στάδια προέκυψαν σύμφωνα με τα κριτήρια των οδηγιών Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease από το National Kidney Foundation-Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF-KDOQI).⁵⁵ Το eGFR υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση CKD-EPI (chronic kidney disease epidemiology collaboration).³⁹ Τα δείγματα αίματος των ασθενών γονιοτυπήθηκαν για τους τρεις πολυμορφισμούς: *VKORC1-1639 G>A*, *apoE* και *MGP T-138C*. Σε μια υποομάδα 67 ασθενών με ΔΝ σε διάφορα στάδια της ΧΝΝ όσο και στην υποομάδα των ασθενών ελέγχου μετρήθηκε και η dp-ucMGP.

Όλοι οι ασθενείς βρίσκονταν υπό παρακολούθηση στα εξωτερικά ιατρεία της Πανεπιστημιακής Νεφρολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Αλεξανδρούπολης και τους ζητήθηκε έγγραφη συγκατάθεση προκειμένου να συμμετάσχουν στη μελέτη. Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Νοσοκομείου και ήταν σύμφωνο με τη διακήρυξη των ανθρωπίνων δικαιωμάτων του Helsinki.

Εργαστηριακές μέθοδοι

Σε όλους τους ασθενείς της μελέτης ελήφθη δείγμα αίματος μετά από τουλάχιστον οκτάωρη νηστεία και μετά τη φυγοκέντρωση το πλάσμα αποθηκεύτηκε στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής του. Στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε σε ημέρα που δεν υποβάλλονταν σε συνεδρία αιμοκάθαρσης, ή, εάν αυτό δεν ήταν δυνατό, μετά από 8 ώρες βραδινή νηστεία και αμέσως πριν από την έναρξη της συνεδρίας, όπως έχει περιγραφεί και σε άλλες μελέτες.^{36,38} Η ανάλυση του δείγματος αίματος για γλυκόζη νηστείας, HbA_{1c} , ολική χοληστερόλη, LDL- και HDL-χοληστερόλη (low-density και high-density lipoprotein), τριγλυκερίδια, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και κρεατινίνη πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά την αιμοληψία στο εργαστήριο του νοσοκομείου. Για την dp-ucMGP, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν άμεσα και το πλάσμα αποθηκεύτηκε στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής του. Επί πλέον, ολικό αίμα σε φιαλίδια με EDTA αποθηκεύτηκε αμέσως στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη στιγμή της γονοτύπησής του. Η παρουσία λευκωματινουρίας και λευκωματουρίας εκτιμήθηκε σε τυχαίο πρωινό δείγμα ούρων. Ως λευκωματουρία ορίστηκε ο λόγος της συγκέντρωσης λευκωματίνης (σε mg/dL) προς τη συγκέντρωση κρεατινίνης (σε mg/dL) σε ένα τυχαίο πρωινό δείγμα ούρων (καθαρός αριθμός) και ως λευκωματινουρία ορίστηκε ο λόγος της συγκέντρωσης της λευκωματίνης (σε mg/dL) προς τη συγκέντρωση της κρεατινίνης (σε g/dL) σε τυχαίο δείγμα ούρων (μονάδες: mg λευκωματίνης ανά g κρεατινίνης).

Τα επίπεδα της dp-ucMGP του πλάσματος υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) του διπλού αντισώματος (dual sandwich antibody), χρησιμοποιώντας δύο αντι-MGP μονοκλωνικά αντισώματα, όπως περιγράφεται και από τους Schurgers et al.³⁶ Το ένα αντίσωμα (capture antibody) δεσμεύει την ακολουθία 3–15 της μη φωσφορυλιωμένης MGP (mAb-dpMGP, VitaK BV, Maastricht, the Netherlands), ενώ το άλλο (detecting antibody) κατευθύνεται εναντίον της ακολουθίας 35–49 της μη καρβοξυλιωμένης μορφής της MGP (mAbucMGP, VitaK BV). Ως πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το συνθετικό πεπτίδιο dpMGP-(AADO)-ucMGP. Οι συντελεστές διακύμανσης (intra-/inter-assay) ήταν 5,6% και 9,9%, αντίστοιχα.

Γονοτύπηση των γονιδιακών πολυμορφισμών του *VKORC1-1639 G>A*, *apoE* και *MGP T-138C*

Περίπου 3 mL ολικού αίματος συλλέχθηκαν σε φιαλίδιο αιμοληψίας με EDTA. Το DNA για τη γονοτύπηση εξήχθη από λευκοκύτταρα του ολικού περιφερικού αίματος με βάση γνωστά πρωτόκολλα

της Qiagen QIAamp με χρήση DNA kit, και αποθηκεύτηκε στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι τη χρήση. Η γονοτύπηση των πολυμορφισμών του *VKORC1-1639 G>A*, της *MGP-138 T>C* και της *apoE* πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) με τη συσκευή της PCR, PTC-200 (MJ Research, Watertown, MA, USA).

Η γονοτύπηση του πολυμορφισμού *VKORC1-1639 G>A* έγινε με τη μέθοδο PCR-RFLP, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενη μελέτη.⁴⁰

Για τον πολυμορφισμό της *MGP-138 T>C* η PCR εφαρμόστηκε σύμφωνα με τους Farzaneh-Far et al, με μερικές μετατροπές.³² Το DNA ενισχύθηκε με τη χρήση του υποκινητή: 5'AAG CAT ACG ATG GCC AAA ACT TCT GCA 3' (ορθόδρομα) και 5'GAA CTA GCA TTG GAA CTTTTC CCA ACC 3' (ανάστροφα). Ως παράμετροι ενίσχυσης εφαρμόστηκαν οι εξής: Αρχικά, 5 min μετουσίωση στους $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 36 κύκλοι για 1 min στους $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min στους $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min στους $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ και 10 min, τελικά, στους $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Στο 142 βάσεων-προϊόν της PCR ακολούθησε πέψη με τη χρήση 5U του περιοριστικού ενζύμου BsrI (New England Bio) στους $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ κατά τη διάρκεια της νύκτας και στη συνέχεια θερμική αδρανοποίηση στους $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 20 min. Το πρότυπο περιορισμού (restriction pattern) για το αλληλόμορφο -138 C αποτελείται από ένα θραύσμα 142 βάσεων. Ο πολυμορφισμός -138T δημιουργεί ένα σημείο περιορισμού και το προϊόν της PCR πέπτεται σε θραύσματα 118–24 βάσεων. Τα προϊόντα περιορισμού διαχωρίστηκαν σε gel αгарόζης 2,5% και ανιχνεύθηκαν με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου.

Για τον πολυμορφισμό του γονιδίου της *apoE*, η PCR εφαρμόστηκε σε 50 μL του μίγματος αντίδρασης με 3 μL DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποίησαν οι Dallinga-Thie et al, με μερικές τροποποιήσεις.⁴¹ Το προϊόν των 225 βάσεων της PCR ενισχύθηκε με τη χρήση του υποκινητή 5'AGA ATT CGC CCC GGC CTG GTA CAC 3' (ορθόδρομα) και 5' TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A 3' (ανάστροφα) και ακολούθησε πέψη με τη χρήση 5U του περιοριστικού ενζύμου HhaI (Takara Bio Inc) στους 37 $^{\circ}\text{C}$ κατά τη διάρκεια της νύκτας. Το πρότυπο περιορισμού για τα αλληλόμορφα της *apoE* αποτελείται από τις εξής ζώνες: *apo E2* αλληλόμορφο-91 και 81 βάσεις, *apo E3* αλληλόμορφο-91, 48 και 33 βάσεις και για το *apo E4* αλληλόμορφο-72, 48 και 33 βάσεις. Τα θραύσματα της *apoE* μετά την πέψη διαχωρίστηκαν σε gel αгарόζης 3% και ανιχνεύθηκαν με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου.

Μέτρηση του πάχους του έσω-μέσου χιτώνα της καρωτίδας

Σε όλους τους ασθενείς της μελέτης διενεργήθηκε μέτρηση του πάχους των δύο χιτώνων, του έσω και του μέσου χιτώνα της κοινής καρωτίδας αρτηρίας, άμφω. Οι ασθενείς υπό εξέταση βρίσκονταν σε ύπτια θέση. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν από εκπαιδευμένο ιατρό, με υψηλής ευκρίνειας υπερηχογραφικό μηχάνημα Doppler, χρησιμοποιώντας γραμμικό μορφομετατροπέα 7,5 MHz (ATL Ultrasound HDI 1300, Philips, Bothell, WA, USA). Στο υπερηχογράφημα παρατηρούνται δύο παράλληλες ηχογενείς γραμμές που χωρίζονται από μια υποηχοϊκή περιοχή, η οποία συνιστά τον μέσο χιτώνα. Η πρώτη γραμμή συνιστά το

όριο ανάμεσα στον αυλό και στον έσω χιτώνα, ενώ η δεύτερη το όριο μεταξύ μέσου και έξω χιτώνα. Ως πάχος του E-MXK ορίστηκε η απόσταση ανάμεσα στις δύο αυτές γραμμές. Σε κάθε κοινή καρωτίδα διενεργήθηκαν τρεις μετρήσεις σε απόσταση 0,5 cm, 1 cm, και 1,5 cm από τον καρωτιδικό βολβό, ενώ η μέση τιμή του πάχους του E-MXK υπολογίστηκε ως ο μέσος όρος των εν λόγω έξι μετρήσεων. Ως μέγιστο πάχος E-MXK ορίστηκε ο μέσος όρος των δύο μέγιστων μετρήσεων σε κάθε καρωτίδα.

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση διενεργήθηκε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Statistical Package for Social Sciences για τα Windows (SPSS IBM), έκδοση 18.0. Τα δεδομένα ελέγχθηκαν για την κανονικότητά τους με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov. Οι συνεχείς μεταβλητές με κανονική κατανομή παρουσιάζονται ως μέσος όρος με σταθερή απόκλιση (mean και standard deviation [SD]), ενώ οι συνεχείς μεταβλητές με μη κανονική κατανομή παρουσιάζονται ως διάμεση τιμή και εύρος διακύμανσης (median και range). Τα χαρακτηριστικά των ασθενών αναλύθηκαν για όλα τα στάδια της ΧΝΝ με τη χρήση της δοκιμασίας χ^2 για τις κατηγορικές μεταβλητές, την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για τις συνεχείς μεταβλητές με κανονική κατανομή και της δοκιμασίας Mann-Whitney ή Kruskal-Wallis για τις συνεχείς μεταβλητές που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Οι γονότυποι της apoE ορίστηκαν ως E2 (e2/e2 or e2/e3), E3 (e3/e3) και E4 (e3/e4 or e4/e4), ενώ αποκλείστηκαν ασθενείς με γονότυπο e2/e4 (n=2), όπως έχει περιγραφεί ξανά, καθώς δεν μπορούσαν να ταξινομηθούν ως E2 ή E4.⁴² Οι συσχετίσεις μεταξύ δύο μεταβλητών εξετάστηκαν με τη χρήση του συντελεστή συσχέτισης κατά Spearman. Η ανάλυση συσχέτισης του πάχους του E-MXK και της dp-ucMGP με διάφορους παράγοντες κινδύνου (ηλικία, φύλο, δείκτη μάζας σώματος [BMI], διάρκεια ΣΔ2, αρτηριακής υπέρτασης και δυσλιπιδαιμίας, τριγλυκερίδια, ολική-, LDL- και HDL-χοληστερόλη, HbA_{1c}, CRP, λευκωματουρία, λευκωματινουρία και eGFR) διενεργήθηκε σε διερευνητική βάση, ώστε να ελεγχθούν πιθανοί προγνωστικοί παράγοντες του πάχους του E-MXK και της dp-ucMGP. Ως όριο σημαντικότητας ορίστηκε το επίπεδο <5% (two-tailed p<0,05).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα ανθρωπομετρικά, τα βιοχημικά και τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΔΝ στα διάφορα στάδια της ΧΝΝ και της ομάδας ελέγχου χωρίς ΔΝ παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην αναλογία των φύλων ανάμεσα στις υποομάδες, ενώ η πρόοδος της νόσου εμφάνιζε συσχέτιση με την αύξηση της ηλικίας (p=0,04). Αν και η διαστολική και η μέση αρτηριακή πίεση (ΑΠ) [υπολογιζόμενη ως ο μέσος όρος 3 τιμών συστολικής και διαστολικής ΑΠ με βάση τον τύπο: (2×διαστολική ΑΠ+συστολική ΑΠ)/3] δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις υποομάδες, η συστολική ΑΠ έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση με την πρόοδο της ΧΝΝ, ενώ μειωνόταν μόνο

στο 5ο τελικό της στάδιο (p=0,04). Η διάρκεια του ΣΔ2 εμφάνιζε στατιστικά σημαντική διαφορά στα στάδια της ΔΝ και ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα τελικά στάδια της νόσου (p=0,004). Παρ' όλο που η ολική- και η LDL-χοληστερόλη δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις κατηγορίες της ΔΝ και της υποομάδας ελέγχου, η HDL-χοληστερόλη εμφάνιζε μείωση και τα τριγλυκερίδια αύξηση με την εξέλιξη της νόσου (p=0,001 και p=0,013, αντίστοιχα). Παρατηρήθηκε ότι η CRP, η κρεατινίνη, η λευκωματουρία και η λευκωματινουρία παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική αύξηση με την πρόοδο της ΧΝΝ, ενώ ο eGFR στατιστικά σημαντική μείωση (p<0,0001 για όλες τις μεταβλητές). Παρά το γεγονός ότι η επίπτωση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου, της στηθάγχης και των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων δεν διέφερε στατιστικώς σημαντικά ανάμεσα στις υποομάδες των ασθενών, η επίπτωση της περιφερικής αγγειακής νόσου αυξανόταν με την εξέλιξη της ΔΝ (p=0,001). Τόσο το μέσο όσο και το μέγιστο πάχος E-MXK παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική αύξηση με την επιδείνωση της νεφρικής νόσου (p<0,0001 και p=0,017, αντίστοιχα).

Παρ' όλο που το μέσο και το μέγιστο πάχος του E-MXK δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των γονοτύπων του VKORC1-1639 G>A και της apoE, σημαντικές διαφορές τους ανευρέθηκαν μεταξύ των γονοτύπων του πολυμορφισμού MGP T-138C (πίν. 2). Οι TT ομοζυγώτες εμφάνιζαν υψηλότερες τιμές μέσου/μέγιστου πάχους E-MXK συγκριτικά με τους γονότυπους TC και CC (p=0,01 και p=0,05, αντίστοιχα). Όταν οι TT ομοζυγώτες συγκρίθηκαν με την κοινή ομάδα στην οποία εντάχθηκαν οι γονότυποι TC+CC, παρουσιάστηκε ακόμη μεγαλύτερη συσχέτιση με τις τιμές μέσου/μέγιστου πάχους E-MXK (γονότυποι TT συγκριτικά με TC+CC γονότυπους, p=0,006 και p=0,022, αντίστοιχα). Παρ' όλα αυτά, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στους τρεις πολυμορφισμούς και στην dp-ucMGP (VKORC1-1639 G>A: p=0,75, apoE: p=0,09 και MGP T-138C: p=0,86, δοκιμασία Kruskal-Wallis, τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

Δεν προέκυψε συσχέτιση ανάμεσα στους πολυμορφισμούς του VKORC1-1639 G>A, της apoE και της MGP T-138C και της χρήσης αντιδιαβητικών ή αντιυπερτασικών φαρμακευτικών προϊόντων (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Η κατανομή των γονοτύπων της MGP T-138C στην ομάδα ελέγχου, στην ομάδα ασθενών με ΧΝΝ (στάδια 1-4) και στην ομάδα ασθενών υπό αιμοκάθαρση παρουσιάζεται στον πίνακα 3. Διαπιστώθηκε σημαντική υπεροχή του γονοτύπου TT στους ασθενείς υπό αιμοκάθαρση συγκριτικά με τους ασθενείς σταδίων ΧΝΝ 1-4 και την ομάδα ελέγχου (p=0,012). Η συχνότητα των TT ομοζυγωτών συγκριτικά με τους άλλους γονότυπους ήταν στατιστικά υψηλότερη στην υποομάδα των αιμοκαθαιρομένων σε σχέση με τις

Πίνακας 1. Ανθρωπομετρικά, κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2) χωρίς νεφροπάθεια (δείγμα ελέγχου) και σε διάφορα στάδια διαβητικής νεφροπάθειας (ΔΝ).

n=158	Στάδια ΔΝ					p*
	Δείγμα ελέγχου (n=40)	1 και 2 (n=23)	3 (n=34)	4 (n=31)	5-TN (n=30)	
Ηλικία (έτη)	64,7 (7,8)	68,2 (8,6)	68,1 (8,6)	70,8 (9,1)	69,3 (9,6)	0,04
Φύλο (Α/Θ)	17/23	11/12	19/15	22/9	14/16	0,16
BMI (kg/m ²)	31,5 (5,7)	30,6 (4,0)	32,4 (5,3)	29,7 (4,3)	29,5 (5,3)	0,12
ΣΑΠ (mmHg)	133,3 (17,0)	139,8 (12,8)	143,7 (16,6)	140,7 (17,7)	134,0 (17,0)	0,04
ΔΑΠ (mmHg)	76,2 (8,6)	77,5 (8,6)	79,4 (7,5)	77,8 (11,4)	77,3 (14,5)	0,53
Έτη ΣΔ2	11,4 (6,2)	13,5 (6,9)	16,1 (8,9)	18,1 (8,5)	16,0 (6,6)	0,004
HbA _{1c} (%)	7,4 (0,9)	7,2 (0,9)	7,6 (1,3)	7,9 (1,4)	7,3 (0,9)	0,24
CHOL (mg/dL)	180,4 (48,2)	170,8 (38,9)	179,9 (45,0)	186,4 (70,1)	163,4 (48,7)	0,60
LDL (mg/dL)	101,8 (40,7)	97,2 (34,0)	101,6 (33,6)	107,0 (58,8)	89,8 (43,3)	0,60
HDL (mg/dL)	48,1 (11,7)	50,9 (17,0)	46,2 (10,3)	42,2 (10,8)	38,0 (9,6)	0,001
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	125,5 (27–292)	140,0 (53–320)	156,0 (59–450)	184,0 (60–966)	170,5 (61–551)	0,013
Κάπνισμα (%)	12,5	21,7	26,4	19,3	20,0	0,67
OEM (%)	17,5	30,0	38,2	41,9	30,0	0,20
AEE (%)	15,0	0	8,8	19,4	13,3	0,25
Στηθάγχη (%)	15,0	34,8	23,5	25,8	33,3	0,31
ΠΑΝ (%)	20,0	30,4	55,9	51,6	63,3	0,001
CRP (mg/dL)	0,10 (0–0,8)	0,20 (0–1,1)	0,25 (0–2,6)	0,40 (0–14,0)	0,80 (0–4,5)	<0,0001
eGFR (mL/min)	84,4 (13,9)	77,2 (12,3)	42,6 (8,1)	20,4 (4,3)	6,7 (1,8)	<0,0001
Λευκωματουρία	0,07 (0,01–0,29)	0,19 (0,01–1,2)	0,25 (0,01–0,37)	2,8 (0,03–9,7)	4,7 (2,5–7,0)	<0,0001
Λευκωματινουρία (mg/g)	13,3 (1,0–29)	57,5 (2,4–806)	89,0 (3,0–2.200)	965,0 (2,8–9.700)	4.700 (2.400–7.000)	<0,0001
Μέσο πάχος E-MXK (mm)	0,76 (0,40–1,61)	0,86 (0,60–1,25)	0,90 (0,58–1,50)	0,80 (0,46–1,50)	0,95 (0,70–1,45)	<0,0001
Μέγιστο πάχος E-MXK (mm)	0,88 (0,60–1,30)	1,00 (0,65–1,50)	1,00 (0,70–1,50)	0,89 (0,60–1,50)	1,03 (0,75–1,50)	0,017

Οι μεταβλητές με κανονική κατανομή παρουσιάζονται ως μέσες τιμές±τυπική απόκλιση και αυτές με μη κανονική κατανομή ως διάμεσες (ελάχιστη-μέγιστη τιμή)

* Οι τιμές του p καθορίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA και τη δοκιμασία Kruskal-Wallis για τις διαφορές των μεταβλητών στα διάφορα στάδια ΔΝ

A/Θ: Άρρεν/θήλυ, E-MXK: Έσω-μέσος χιτώνας καρωτίδας, BMI: Δείκτης μάζας σώματος (body mass index), ΣΑΠ: Συστολική αρτηριακή πίεση (ΑΠ), ΔΑΠ: Διαστολική ΑΠ, CHOL: Χοληστερόλη, LDL: LDL-χοληστερόλη, HDL: HDL-χοληστερόλη, OEM: Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, AEE: Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, ΠΑΝ: Περιφερική αγγειακή νόσος, 5-TN: Τελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας υπό αιμοκάθαρση

υπόλοιπες υποομάδες (γονότυποι TT συγκριτικά με TC+CC γονότυπους, $p=0,002$), ενώ, όταν συγκρίθηκε η κατανομή εμφάνισης των γονοτύπων του MGP T-138C ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και τους ασθενείς στα στάδια 1–4 ΧΝΝ, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,71$, εικ. 1).

Στον πίνακα 4 αναγράφονται οι συσχετίσεις ανάμεσα στο πάχος του E-MXK και την dp-ucMGP με διάφορες ανθρωπομετρικές, βιοχημικές και κλινικές παραμέτρους των ασθενών. Σε όλον τον πληθυσμό των ασθενών ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του πάχους του E-MXK και του eGFR ($r=-0,23$, $p=0,004$). Παρ' όλα αυτά, το πάχος του E-MXK δεν συσχετίστηκε με άλλους δείκτες επιδείνωσης της διαβητικής νεφρικής νόσου, όπως η λευκωματινουρία και η πρωτεϊνουρία. Επί πλέον, βρέθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση του πάχους E-MXK

με την ηλικία, τα τριγλυκερίδια ($r=0,20$, $p=0,012$ και $r=0,16$, $p=0,05$, αντίστοιχα), αλλά όχι με την ολική, την HDL- και την LDL-χοληστερόλη. Η αύξηση του πάχους του E-MXK συσχετίστηκε σημαντικά με την αύξηση στη διάρκεια της αρτηριακής υπέρτασης, του διαβήτη και της δυσλιπιδαιμίας. Αντίθετα, δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο πάχος του E-MXK και την dp-ucMGP ($r=0,14$, $p=0,27$), το φύλο, τον BMI, τη CRP και την HbA_{1c}. Η dp-ucMGP συσχετίστηκε θετικά σημαντικά με τη λευκωματινουρία, την πρωτεϊνουρία ($r=0,48$, $p<0,0001$ και $r=0,32$, $p=0,01$, αντίστοιχα) και τα τριγλυκερίδια ($r=0,35$, $p=0,004$), ενώ η dp-ucMGP συσχετίστηκε αντίστροφα με τον eGFR ($r=-0,69$, $p<0,0001$) και την HDL-χοληστερόλη ($r=-0,24$, $p=0,05$). Επίσης, η dp-ucMGP συσχετίστηκε σημαντικά με τη CRP ($r=0,26$, $p=0,03$) και την HbA_{1c} ($r=0,31$, $p=0,01$). Δεν βρέθηκε

Πίνακας 2. Συσχέτιση του μέσου και του μέγιστου πάχους E-MXK με τους πολυμορφισμούς *VKORC1-1639G>A*, *αροE*, *MGP T-138C*.

<i>VKORC1-1639 G>A</i> γονότυποι	Μέσο πάχος E-MXK (mm)	ρ	Μέγιστο πάχος E-MXK (mm)	ρ
GG (n=32)	0,86 (0,43–1,50)	0,93	0,95 (0,57–1,50)	0,91
AG (n=94)	0,86 (0,40–1,50)		0,95 (0,50–1,50)	
AA (n=32)	0,87 (0,50–1,50)		0,95 (0,60–1,50)	
GG/AG (n=126)	0,86 (0,40–1,50)		0,95 (0,50–1,50)	
AA (n=32)	0,87 (0,50–1,50)	0,85	0,95 (0,60–1,50)	0,67
<i>MGP T-138C</i> γονότυποι	Μέσο πάχος E-MXK (mm)	ρ	Μέγιστο πάχος E-MXK (mm)	ρ
TT (n=53)	0,90 (0,60–1,50)		1,00 (0,65–1,50)	
TC (n=76)	0,80 (0,43–1,50)	0,01	0,90 (0,57–1,50)	0,05
CC (n=29)	0,78 (0,40–1,16)		0,90 (0,50–1,30)	
TT (n=53)	0,90 (0,60–1,50)		1,00 (0,65–1,50)	
TC/CC (n=105)	0,80 (0,40–1,50)	0,006	0,90 (0,50–1,50)	0,022
<i>ΑροE</i> γονότυποι	Μέσο πάχος E-MXK (mm)	ρ	Μέγιστο πάχος E-MXK (mm)	ρ
E2: e2e2/e2e3 (n=18)	0,83 (0,43–1,50)		0,90 (0,57–1,50)	
E3: e3e3 (n=112)	0,86 (0,46–1,50)	0,98	0,95 (0,50–1,50)	0,91
E4: e3e4/e4e4 (n=26)	0,85 (0,40–1,50)		0,98 (0,55–1,50)	

*Οι τιμές του ρ καθορίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA και τη δοκιμασία Kruskal-Wallis για τις διαφορές του μέσου και μέγιστου πάχους E-MXK στους διαφορετικούς γονότυπους (εκτός από τις ομάδες γονοτύπων TC/CC – TT του πολυμορφισμού *MGP T-138C* και GG/AG – AA του πολυμορφισμού *VKORC1-1639 G>A* όπου χρησιμοποιήθηκε Mann-Whitney U test)
E-MXK: Έσω-μέσος χιτώνας καρωτίδας

Πίνακας 3. Συχνότητα κατανομής των γονοτύπων του πολυμορφισμού *MGP T-138C* στα διάφορα στάδια διαβητικής νεφροπάθειας (ΔΝ).

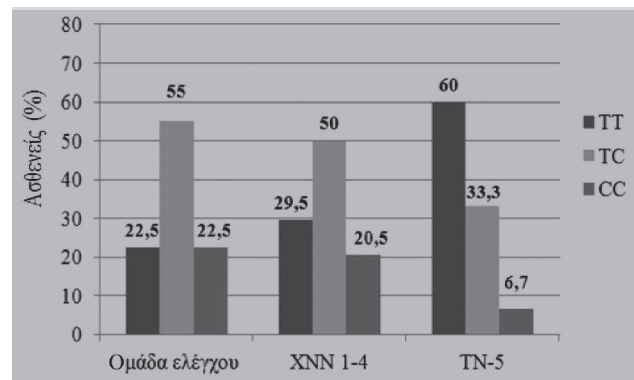
<i>MGP T-138C</i> γονότυποι	Ομάδα ελέγχου	Στάδια ΔΝ		ρ*
	0 (n=40)	1–4 (n=88)	5-TN (n=30)	
	n (%)	n (%)	n (%)	
TT	9 (22,5)	26 (29,5)	18 (60,0)	0,012
TC	22 (55,0)	44 (50,0)	10 (33,3)	
CC	9 (22,5)	18 (20,5)	2 (6,7)	0,002
TT	9 (22,5)	26 (29,5)	18 (60,0)	
TC/CC	31 (77,5)	62 (70,5)	12 (40,0)	

*Οι τιμές του ρ καθορίστηκαν με τη μέθοδο χ² για τη διαφορά στη συχνότητα κατανομής των γονοτύπων του πολυμορφισμού *MGP T-138C* στα διάφορα στάδια ΔΝ
5-TN: Τελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας υπό αιμοκάθαρση

στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην dp-ucMGP και τον BMI, το φύλο, την ολική- και την LDL-χοληστερόλη.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο αυξημένος καρδιαγγειακός (ΚΑ) κίνδυνος που παρα-

**Εικόνα 1.** Κατανομή των γονοτύπων του πολυμορφισμού *MGP T-138C* σε ομάδα ελέγχου (διαβητικοί χωρίς νεφροπάθεια), διαβητικούς με χρόνια νεφρική νόσο (XNN) σταδίων 1–4 και διαβητικούς με τελικού σταδίου χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (XNA) υπό αιμοκάθαρση (TN).**Πίνακας 4.** Συσχέτιση μεταξύ πάχους E-MXK/dp-ucMGP και ηλικίας, φύλου, δείκτη μάζας σώματος (BMI), συστολικής αρτηριακής πίεσης (ΑΠ), διάρκειας σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2), αρτηριακής υπέρτασης (ΑΥ), δυσλιπιδαιμίας, τριγλυκεριδίων, ολικής χοληστερόλης, LDL-χοληστερόλης, HDL-χοληστερόλης, HbA_{1c}, CRP, λευκωματουρίας, λευκωματινουρίας και eGFR με τη μέθοδο Spearman's correlation test.

	Πάχος E-MXK		dp-ucMGP	
	r	p	r	p
Ηλικία	0,20*	0,012	0,22	0,077
Φύλο	-0,05	0,54	-0,15	0,25
BMI	0,10	0,21	0,16	0,20
Συστολική ΑΠ	0,10	0,20	-0,07	0,58
Διάρκεια ΣΔ2	0,20*	0,012	0,01	0,43
Διάρκεια ΑΥ	0,22**	0,008	0,13	0,29
Διάρκεια δυσλιπιδαιμίας	0,19*	0,024	0,05	0,70
Τριγλυκερίδια	0,16*	0,05	0,35**	0,004
Ολική χοληστερόλη	0,03	0,68	0,05	0,70
LDL-χοληστερόλη	-0,002	0,98	0,07	0,56
HDL-χοληστερόλη	-0,07	0,37	-0,24*	0,05
HbA _{1c}	-0,09	0,26	0,31**	0,01
CRP	0,11	0,18	0,26*	0,03
Λευκωματουρία	0,04	0,67	0,32**	0,01
Λευκωματινουρία	0,08	0,41	0,48**	<0,0001
eGFR	-0,23**	0,004	-0,69**	<0,0001
Πάχος E-MXK	1,00	–	0,14	0,27
dpucMGP	0,14	0,27	1,00	–

* Η συσχέτιση είναι σημαντική με όριο την τιμή 0,05

** Η συσχέτιση είναι σημαντική με όριο την τιμή 0,01

E-MXK: Έσω-μέσος χιτώνας καρωτίδας

τηρείται σε ασθενείς με ΣΔ2 και νεφροπάθεια δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο στους κλασικούς παράγοντες κινδύνου. Εκτός των ήδη γνωστών παραγόντων κινδύνου που αφορούν σε βιοχημικές εξετάσεις και στις συνήθειες, καθώς και

στον τρόπο ζωής, νεότεροι γενετικοί και μοριακοί παράγοντες φαίνεται να συνεισφέρουν στον ολικό ΚΑ κίνδυνο.

Στην παρούσα μελέτη, σε διαβητικούς ασθενείς με ΔΝ και σε διαβητικούς χωρίς ΔΝ, μετρήθηκαν τα επίπεδα της κυκλοφορούσας dp-ucMGP, το πάχος του έσω-μέσου χιτώνα της καρωτίδας –ως υποκλινικού δείκτη αθηροσκλήρωσης– και εκτιμήθηκε η επίδραση γενετικών πολυμορφισμών των γονιδίων των MGP, VKORC1 και apoE σε σχέση με το πάχος του E-MXK και τα επίπεδα της dp-ucMGP.

Όπως φάνηκε και σε προηγούμενη μελέτη, τα επίπεδα της dp-ucMGP του πλάσματος αυξάνονταν σημαντικά με την πρόοδο της ΧΝΝ.³⁶ Προηγούμενες μελέτες ανέφεραν χαμηλότερες συγκεντρώσεις της μη καρβοξυλιωμένης dp-ucMGP (uncarboxylated-ucMGP) σε ασθενείς υπό χρόνια αιμοκάθαρση και σε παιδιατρικούς ασθενείς συγκριτικά με υγιείς (control).⁴³⁻⁴⁵ Επί πλέον, η ucMGP συσχετίστηκε αντίστροφα με την επιδείνωση της ΧΝΝ σε ασθενείς με γνωστή ΚΑ νόσο⁴⁶ και με την ΑΕ των στεφανιαίων αρτηριών σε ασθενείς υπό χρόνια αιμοκάθαρση.⁴⁷ Στις σχετικές μελέτες, η μέθοδος προσδιορισμού ήταν εκλεκτική για την ucMGP και δεν διαχώριζε τη φωσφορυλιωμένη από την αποφωσφορυλιωμένη της μορφή. Τα επίπεδα της dp-ucMGP του πλάσματος συσχετίστηκαν επίσης με θνητότητα σε ασθενείς με ΧΝΝ³⁶ και σε ασθενείς με συμπτωματική στένωση αορτής.⁴⁸ Επί πλέον, μειωμένη διαιτητική πρόσληψη βιταμίνης Κ συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα της ανενεργού μορφής της dp-ucMGP σε μεταμοσχευμένους και αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς.^{25,26} Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι η dp-ucMGP συσχετίστηκε θετικά με τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου για ΑΕ, χρόνια φλεγμονή, και οξειδωτικό stress, δηλαδή: ηλικία, λευκωματινουρία, πρωτεϊνουρία, τριγλυκερίδια, CRP, HbA_{1c} και πρόοδο της ΔΝ, ενώ συσχετίστηκε αντίστροφα με την HDL-χοληστερόλη. Τα εν λόγω αποτελέσματα συμφωνούν και με αποτελέσματα προγενέστερων μελετών.^{24,26,48} Όπως στη μελέτη των Schurgers et al,³⁶ έτσι και στην παρούσα μελέτη φάνηκε ότι τα επίπεδα της dp-ucMGP αυξάνονταν προοδευτικά με την πρόοδο της διαβητικής νεφρικής νόσου, αποδεικνύοντας ότι μάλλον συνιστά έναν σημαντικό παράγοντα και ενδεχομένως πρώιμο βιοδείκτη της σοβαρότητας της αθηροσκλήρωσης στη ΔΝ. Τα αυξημένα επίπεδα της dp-ucMGP ίσως αντανακλούν τη μειωμένη διαιτητική πρόσληψη βιταμίνης Κ σε ασθενείς με προχωρημένη ΧΝΝ. Επί πλέον, πλήθος μελετών έχουν δείξει ότι γενετικοί παράγοντες όπως και οι πολυμορφισμοί του VKORC1 μπορεί να οδηγήσουν σε χαμηλά επίπεδα βιταμίνης Κ, με επακόλουθο τη μειωμένη λειτουργικότητα της MGP.^{27,28} Επιπρόσθετα, σε παλαιότερη εργασία έχει βρεθεί ότι ο πολυμορφισμός VKORC1-1639 G>A συσχετίστηκε με την παρουσία ΣΔ2 και με το πάχος E-MXK.⁴⁰ Ενώ ο πολυμορφισμός του VKORC1-1639 G>A

έχει δειχθεί ότι επηρεάζει τα επίπεδα της βιταμίνης Κ, στην παρούσα μελέτη δεν φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση με τα επίπεδα της dp-ucMGP και το πάχος του E-MXK.

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει τα επίπεδα της βιταμίνης Κ είναι η απολιποπρωτεΐνη Ε, η οποία διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στον μεταβολισμό των λιπιδίων, ιδίως στην απομάκρυνση αθηρογενετικών υπολειμμάτων των λιποπρωτεϊνών που μεταφέρουν τη βιταμίνη Κ.³¹ Σε μια ομάδα χρονίως αιμοκαθαιρομένων, ασθενείς με γονότυπους E3/E4 και E4/E4 εμφάνιζαν μεγαλύτερη συχνότητα καταγμάτων συγκριτικά με ασθενείς με γονότυπους E2/E3 και E2/E2, λόγω της επίδρασης του apoE γονοτύπου στα κυκλοφορούντα επίπεδα της βιταμίνης Κ.⁴⁹ Η υπόθεσή μας ότι τα τρία αλληλόμορφα της apoE ίσως ασκούν διαφορετική επίδραση στα επίπεδα της dp-ucMGP του ορού και στις τιμές του CIMT δεν επιβεβαιώθηκε. Ομοίως, δεν διαπιστώθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της dp-ucMGP και στον πολυμορφισμό του γονιδίου MGP T-138C.

Νεότερες μελέτες δείχνουν ότι ο πολυμορφισμός MGP T-138C σχετίζεται με την ΑΕ, ανεξάρτητα από τα επίπεδα της MGP στον ορό. Στην παρούσα μελέτη, οι ΤΤ ομοζυγώτες του MGP T-138C συσχετίστηκαν με την αύξηση των τιμών του πάχους E-MXK, συγκριτικά με τους γονότυπους ΤC και CC. Ενώ έχει φανεί ότι το T αλληλόμορφο εμφανίζει σημαντικά μεγαλύτερη δραστηριότητα υποκινητή σε σχέση με το C,⁵⁰ παραμένει αμφιλεγόμενο αν ο T-138C πολυμορφισμός επηρεάζει τη συγκέντρωση της MGP στον ορό. Αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι δεν έχει βρεθεί σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις της MGP του ορού μεταξύ των τριών διαφορετικών γονοτύπων.^{34,51} Παρ' όλο που ο πολυμορφισμός T-138C δεν έχει συσχετιστεί με τα επίπεδα της MGP του ορού στους ασθενείς με ΧΝΝ, οι ομοζυγώτες CC εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα της MGP (χωρίς όμως να φθάνουν το όριο της στατιστικής σημαντικότητας), υποδηλώνοντας ότι οι ομοζυγώτες ΤΤ μπορεί να παρουσιάζουν επιταχυνόμενη εμφάνιση της ΑΕ.⁵¹ Επί πλέον, έχει δειχθεί ότι οι 138ΤΤ ομοζυγώτες εμφανίζουν 30% χαμηλότερα επίπεδα MGP στον ορό συγκριτικά με τους 138CC ομοζυγώτες, με αποτέλεσμα επιτάχυνση της ΑΕ.^{32,35} Η συγκεκριμένη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της MGP στον ορό και της ΑΕ είναι αμφιλεγόμενη.^{11,52-54} Άλλοι δεν κατέληξαν σε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της MGP στον ορό και της επασβέστωσης σε στεφανιαία αγγεία και στην αορτή σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς,¹¹ ενώ άλλοι ανέφεραν υψηλά επίπεδα MGP ορού σε ασθενείς με προχωρημένη αθηροσκλήρωση.⁵³

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συνάδουν με τα αποτελέσματα άλλων μελετών που επισημαίνουν τον καθοριστικό ρόλο του C αλληλόμορφου του πολυμορφισμού της MGP T-138C στην αναστολή της ΑΕ. Μια προηγούμενη

μελέτη αναφέρει ότι ο γονότυπος CC του T-138C ίσως διαδραματίζει ρόλο στην αναστολή της ΑΕ σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, ανεξάρτητα από τα επίπεδα της MGP του ορού.³⁴ Επίσης, έχει αναφερθεί ότι οι ομοζυγώτες για το CC εμφάνιζαν χαμηλότερα επίπεδα αθηροσκλήρωσης στεφανιαίων αγγείων σε άνδρες ασθενείς με φυσιολογική νεφρική λειτουργία, συγκριτικά με τους ομοζυγώτες TT.³³ Επί πλέον, ασθενείς ομόζυγοι για το TT σε διάφορα στάδια της ΧΝΝ και υπό αιμοκάθαρση εμφανίζουν αυξημένη ΚΑ θνησιμότητα.³⁵ Σε έναν πληθυσμό διαβητικών ασθενών με ΧΝΝ, οι ομοζυγώτες TT για την MGP εμφάνιζαν σημαντική συσχέτιση με την αύξηση των τιμών του πάχους E-MXK, σε σχέση με τους TC και CC γονότυπους. Αυτό ενδεχομένως μπορεί να αποδοθεί στην επίδραση του T αλληλόμορφου στην έκφραση της MGP, αλλά και στο γεγονός ότι η πλειοψηφία των ομοζυγών TT ήταν ασθενείς στο τελικό στάδιο της ΧΝΝ, όπου πλέον έχει εγκατασταθεί σοβαρή ΑΕ. Η παρούσα μελέτη υποδεικνύει ότι υπάρχει διαφορετική κατανομή του πολυμορφισμού της MGP T-138C, με το T αλληλόμορφο να εμφανίζει μεγαλύτερο επιπολασμό στους αιμοκαθαιρόμενους, συγκριτικά με τους ασθενείς σε στάδια ΧΝΝ 1–4 και την ομάδα ελέγχου. Το εύρημα αυτό σχετίζεται με την κατανομή των γονοτύπων της MGP T-138C και συνάδει με εκείνο προηγούμενης μελέτης, που έδειξε διαφορετική κατανομή των εν λόγω γονοτύπων σε ασθενείς με ΧΝΝ και υπό χρόνια αιμοκάθαρση συγκριτικά με τον φυσιολογικό πληθυσμό.³⁵ Η TT ομοζυγωτία φαίνεται να είναι πιο συχνή στους ασθενείς υπό αιμοκάθαρση σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό.³⁵

Από όσα μέχρι σήμερα είναι γνωστά, η παρούσα είναι

η πρώτη μελέτη που εξετάζει τη συσχέτιση του πολυμορφισμού της MGP T-138C και των επιπέδων της dp-ucMGP, όπως επίσης και της επίδρασής τους στις τιμές του πάχους του E-MXK σε ασθενείς σε διάφορα στάδια της διαβητικής νεφρικής νόσου. Παρ' όλα αυτά, η μελέτη εμφανίζει και κάποιους περιορισμούς.

Ο σχεδιασμός της μελέτης αποκλείει την τεκμηρίωση αιτιώδους συνάφειας. Ο αριθμός των ασθενών σε κάθε στάδιο ΔΝ ήταν αρκετά μικρός για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Εν τούτοις, η ταυτοποίηση γενετικών και μοριακών παραγόντων θα μπορούσε να βοηθήσει στην εμβάθυνση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών που διέπουν την ΑΕ στη ΔΝ, η οποία, με τη σειρά της, θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών πρωτοκόλλων.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη φάνηκε ότι τα επίπεδα της dp-ucMGP συσχετίστηκαν με αρκετούς κλασικούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ΑΕ και αυξάνονταν προοδευτικά με την επιδείνωση της νόσου. Καθώς η MGP αποτελεί σημαντικό αναστολέα της ιστικής και της αγγειακής επασβέστωσης, η μελέτη μας υποδεικνύει ότι μάλλον υπάρχει γενετική βάση στην επασβέστωση των ασθενών με ΔΝ. Θα μπορούσε να υποτεθεί ότι ο πολυμορφισμός T-138C της MGP ίσως προδιαθέτει γενετικά στην έκφραση της αγγειακής επασβέστωσης. Περισσότερες μελέτες είναι απαραίτητες για την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων και την πλήρη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που υπόκεινται αυτών των συσχετίσεων. Τέλος, οι εν λόγω συσχετίσεις πρέπει να διερευνηθούν και σε διαφορετικούς πληθυσμούς.

ABSTRACT

Association of matrix Gla Protein T-138C polymorphism with diabetic nephropathy and vascular calcification

S. ROUMELIOTIS,^{1,3} A. ROUMELIOTIS,¹ S. PANAGOUSTOS,¹ M. THEODORIDIS,¹ K. KANTARTZI,¹ A. TAVRIDOU,² P. PASSADAKIS¹

¹Department of Nephrology, School of Medicine, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, ²Laboratory of Pharmacology, School of Medicine, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, ³Achilleion Nephrology Center, Thessaloniki, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2019, 36(1):96–106

OBJECTIVE To determine the plasma level of dp-uc matrix Gla protein (dpucMGP) in patients at all stages of diabetic nephropathy, including patients on hemodialysis, and to investigate its possible association with *apoE*, *VKORC1-1639 G>A* and *MGP T-138C* polymorphisms and carotid intima media thickness (cIMT). **METHOD** Study was made of 40 patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) with normal renal function (control group) and 118 patients presenting all five stages of diabetic nephropathy (88 at stages 1–4 and 30 at stage 5 – hemodialysis). cIMT was measured using real-time B-mode ultrasonography (US), and *apoE*, *VKORC1-1639 G>A* and *MGP T-138C* polymorphisms were genotyped by PCR-RFLP. The plasma level of dp-ucMGP was determined in 67 of the patients by ELISA. The statistical significance of association was determined using the Kruskal-Wallis test. **RESULTS** The plasma dp-ucMGP level

was shown to be associated with both cIMT and progression of diabetic nephropathy ($p < 0.0001$ and $p = 0.004$, respectively). No association was found between *ApoE* and *VKORC1-1639 G>A* polymorphism and plasma level of dp-ucMGP. Although neither mean nor maximum cIMT showed significant difference among patients with *VKORC1-1639 G>A* and *apoE* polymorphisms, MGP TT homozygotes presented significantly higher mean/maximum cIMT than TC and CC genotypes ($p = 0.01$ and $p = 0.05$, respectively). The association between MGP T-138C and cIMT became even stronger when the genotypes were grouped (TT vs TC+CC genotypes, $p = 0.006$ and $p = 0.022$, respectively). An excess of TT homozygotes was observed in the hemodialysis group compared with the control and diabetic nephropathy groups 1–4 ($p = 0.012$), which was more pronounced when TC and CC genotypes were grouped ($p = 0.002$). **CONCLUSIONS** The inactive form of MGP and its polymorphism appear to play a key role in both the pathogenesis of arterial calcification and the progression of diabetic nephropathy. These findings indicate that vascular calcification in diabetic nephropathy may have a genetic basis.

Key words: Carotid intima-media thickness, Diabetic nephropathy, Matrix Gla protein (MGP), Vascular calcification

Βιβλιογραφία

- GO AS, CHERTOW GM, FAN D, McCULLOCH CE, HSU CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004, 351:1296–1305
- COLLINS AJ. Cardiovascular mortality in end-stage renal disease. *Am J Med Sci* 2003, 325:163–167
- LEVIN A, DJURDJEV O, BARRETT B, BURGESS E, CARLISLE E, ETHIER J ET AL. Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease: Getting to the heart of the matter. *Am J Kidney Dis* 2001, 38:1398–1407
- SHULMAN NB, FORD CE, HALL WD, BLAUFox MD, SIMON D, LANGFORD HG ET AL. Prognostic value of serum creatinine and effect of treatment of hypertension on renal function. Results from the hypertension detection and follow-up program. The Hypertension Detection and Follow-up Program Cooperative Group. *Hypertension* 1989, 13(Suppl 5):I80–I93
- FOLEY RN, MURRAY AM, LI S, HERZOG CA, McBEAN AM, EGGERS PW ET AL. Chronic kidney disease and the risk for cardiovascular disease, renal replacement, and death in the United States Medicare population, 1998 to 1999. *J Am Soc Nephrol* 2005, 16:489–495
- DALRYMPLE LS, KATZ R, KESTENBAUM B, SHLIPAK MG, SARNAK MJ, STEHMAN-BREEN C ET AL. Chronic kidney disease and the risk of end-stage renal disease versus death. *J Gen Intern Med* 2011, 26:379–385
- LONDON GM, MARCHAIS SJ, GUERIN AP, METIVIER F, ADDA H. Arterial structure and function in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2002, 17:1713–1724
- DHORE CR, CLEUTJENS JP, LUTGENS E, CLEUTJENS KB, GEUSENS PP, KITSLAAR PJ ET AL. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001, 21:1998–2003
- HUJAIIRI NM, AFZALI B, GOLDSMITH DJ. Cardiac calcification in renal patients: What we do and don't know. *Am J Kidney Dis* 2004, 43:234–243
- SCHLIEPER G, WESTENFELD R, BRANDENBURG V, KETTELER M. Inhibitors of calcification in blood and urine. *Semin Dial* 2007, 20:113–121
- MOE SM, RESLEROVA M, KETTELER M, O'NEILL K, DUAN D, KOCZMAN J ET AL. Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease (CKD). *Kidney Int* 2005, 67:2295–2304
- LUO G, DUCY P, McKEE MD, PINERO GJ, LOYER E, BEHRINGER RR ET AL. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997, 386:78–81
- MUNROE PB, OLGUNTURK RO, FRYNS JP, VAN MALDERGEM L, ZIEREISEN F, YUKSEL B ET AL. Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nat Genet* 1999, 21:142–144
- TEEBI AS, LAMBERT DM, KAYE GM, AL-FIFI S, TEWFIK TL, AZOUZ EM. Keutel syndrome: Further characterization and review. *Am J Med Genet* 1998, 78:182–187
- SHANAHAN CM. Mechanisms of vascular calcification in renal disease. *Clin Nephrol* 2005, 63:146–157
- BOSTRÖM K, TSAO D, SHEN S, WANG Y, DEMER LL. Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells. *J Biol Chem* 2001, 276:14044–14052
- ZEBBOUDJ AF, IMURA M, BOSTRÖM K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 2002, 277:4388–4394
- SHEA CM, EDGAR CM, EINHORNTA, GERSTENFELD LC. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem* 2003, 90:1112–1127
- MURSHED M, SCHINKE T, McKEE MD, KARSENTY G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol* 2004, 165:625–630
- SHEARER MJ. Vitamin K. *Lancet* 1995, 345:229–234
- WALLIN R, CAIN D, HUTSON SM, SANE DC, LOESER R. Modulation of the binding of matrix Gla protein (MGP) to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Thromb Haemost* 2000, 84:1039–1044
- SCHURGERS LJ, SPRONK HM, SKEPPER JN, HACKENG TM, SHANAHAN CM, VERMEER C ET AL. Post-translational modifications reg-

- ulate matrix Gla protein function: Importance for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Thromb Haemost* 2007, 5:2503–2511
23. SCHURGERS LJ, TEUNISSEN KJ, KNAPEN MH, KWAIJTAAL M, VAN DIEST R, APPELS A ET AL. Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: Undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25:1629–1633
 24. DELANAYE P, KRZESINSKI JM, WARLING X, MOONEN M, SMELTEN N, MÉDART L ET AL. Dephosphorylated-uncarboxylated matrix Gla protein concentration is predictive of vitamin K status and is correlated with vascular calcification in a cohort of hemodialysis patients. *BMC Nephrol* 2014, 15:145
 25. CALUWÉ R, VANDECASTEELE S, VAN VLEM B, VERMEER C, DEVRIESE AS. Vitamin K2 supplementation in haemodialysis patients: A randomized dose-finding study. *Nephrol Dial Transplant* 2013, 29:1385–1390
 26. BOXMA PY, VAN DEN BERG E, GELEIJNSE JM, LAVERMAN GD, SCHURGERS LJ, VERMEER C ET AL. Vitamin K intake and plasma desphospho-uncarboxylated matrix Gla-protein levels in kidney transplant recipients. *PLoS One* 2012, 7:e47991
 27. GARCIA AA, REITSMA PH. *VKORC1* and the vitamin K cycle. *Vitam Horm* 2008, 78:23–33
 28. STAFFORD DW. The vitamin K cycle. *J Thromb Haemost* 2005, 3:1873–1878
 29. TEICHERT M, VISSER LE, VAN SCHAİK RH, HOFMAN A, UITTERLINDEN AG, DE SMET PA ET AL. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (*VKORC1*) polymorphism and aortic calcification: The Rotterdam Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008, 28:771–776
 30. RIEDER MJ, REINER AP, GAGE BF, NICKERSON DA, EBY CS, McLEOD HL ET AL. Effect of *VKORC1* haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 2005, 352:2285–2293
 31. WEINTRAUB MS, EISENBERG S, BRESLOW JL. Dietary fat clearance in normal subjects is regulated by genetic variation in apolipoprotein E. *J Clin Invest* 1987, 80:1571–1577
 32. FARZANEH-FAR A, DAVIES JD, BRAAM LA, SPRONK HM, PROUDFOOT D, CHAN SW ET AL. A polymorphism of the human matrix gamma-carboxyglutamic acid protein promoter alters binding of an activating protein-1 complex and is associated with altered transcription and serum levels. *J Biol Chem* 2001, 276:32466–32473
 33. CROSIER MD, BOOTH SL, PETER I, DAWSON-HUGHES B, PRICE PA, O'DONNELL CJ ET AL. Matrix Gla protein polymorphisms are associated with coronary artery calcification in men. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2009, 55:59–65
 34. YOSHIKAWA K, ABE H, TOMINAGA T, NAKAMURA M, KISHI S, MATSURA M ET AL. Polymorphism in the human matrix Gla protein gene is associated with the progression of vascular calcification in maintenance hemodialysis patients. *Clin Exp Nephrol* 2013, 17:882–889
 35. BRANCACCIO D, BIONDI ML, GALLIENI M, TURRI O, GALASSI A, CECCHINI F ET AL. Matrix GLA protein gene polymorphisms: Clinical correlates and cardiovascular mortality in chronic kidney disease patients. *Am J Nephrol* 2005, 25:548–552
 36. SCHURGERS LJ, BARRETO DV, BARRETO FC, LIABEU F, RENARD C, MAGDELEYN S ET AL. The circulating inactive form of matrix gla protein is a surrogate marker for vascular calcification in chronic kidney disease: A preliminary report. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010, 5:568–575
 37. IORDANIDOU M, TAVRIDOU A, PETRIDIS I, ARVANITIDIS KI, CHRISTAKIDIS D, VARGEMEZIS V ET AL. The serotonin transporter promoter polymorphism (*5-HTTLPR*) is associated with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta* 2010, 411:167–171
 38. TAVRIDOU A, GEORGOULIDOU A, ROUMELIOTIS A, ROUMELIOTIS S, GIANNAKOPOULOU E, PAPANAS N ET AL. Association of plasma adiponectin and oxidized low-density lipoprotein with carotid intima-media thickness in diabetic nephropathy. *J Diabetes Res* 2015, 2015:507265
 39. LEVEY AS, STEVENS LA, SCHMID CH, ZHANG YL, CASTRO AF 3rd, FELDMAN HI ET AL. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009, 150:604–612
 40. TAVRIDOU A, PETRIDIS I, VASILEIADIS M, RAGIA G, HELIOPOULOS I, VARGEMEZIS V ET AL. Association of *VKORC1 -1639 G>A* polymorphism with carotid intima-media thickness in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2011, 94:236–241
 41. DALLINGA-THIE GM, VAN LINDE-SIBENIUS TRIP M, KOCK LA, DE BRUIN TW. Apolipoprotein E2/E3/E4 genotyping with agarose gels. *Clin Chem* 1995, 41:73–75
 42. PATERNOSTER L, MARTÍNEZ GONZÁLEZ NA, LEWIS S, SUDLOW C. Association between apolipoprotein E genotype and carotid intima-media thickness may suggest a specific effect on large artery atherothrombotic stroke. *Stroke* 2008, 39:48–54
 43. HERMANS MM, VERMEER C, KOOMAN JP, BRANDENBURG V, KETTELER M, GLADZIWA U ET AL. Undercarboxylated matrix GLA protein levels are decreased in dialysis patients and related to parameters of calcium-phosphate metabolism and aortic augmentation index. *Blood Purif* 2007, 25:395–401
 44. SHROFF RC, SHAH V, HIORNS MP, SCHOPPET M, HOFBAUER LC, HAWA G ET AL. The circulating calcification inhibitors, fetuin-A and osteoprotegerin, but not matrix Gla protein, are associated with vascular stiffness and calcification in children on dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2008, 23:3263–3271
 45. SCHURGERS LJ, CRANENBURG EC, VERMEER C. Matrix Gla-protein: The calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thromb Haemost* 2008, 100:593–603
 46. CRANENBURG EC, BRANDENBURG VM, VERMEER C, STENGER M, MÜHLENBRUCH G, MAHNKEN AH ET AL. Uncarboxylated matrix Gla protein (ucMGP) is associated with coronary artery calcification in haemodialysis patients. *Thromb Haemost* 2009, 101:359–366
 47. PARKER BD, IX JH, CRANENBURG EC, VERMEER C, WHOOLEY MA, SCHURGERS LJ. Association of kidney function and uncarboxylated matrix Gla protein: Data from the Heart and Soul Study. *Nephrol Dial Transplant* 2009, 24:2095–3101
 48. UELAND T, GULLESTAD L, DAHL CP, AUKRUST P, AAKHUS S, SOLBERG OG ET AL. Undercarboxylated matrix Gla protein is associated with indices of heart failure and mortality in symptomatic aortic stenosis. *J Intern Med* 2010, 268:483–492
 49. KOHLMIEIER M, SAUPE J, SCHAEFER K, ASMUS G. Bone fracture history and prospective bone fracture risk of hemodialysis pa-

- tients are related to apolipoprotein E genotype. *Calcif Tissue Int* 1998, 62:278–281
50. HERRMANN SM, WHATLING C, BRAND E, NICAUD V, GARIEPY J, SIMON A ET AL. Polymorphisms of the human matrix gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20:2386–2393
51. KARSLI CEPPIOĞLU S, YURDUN T, CANBAKAN M. Assessment of matrix Gla protein, Klotho gene polymorphisms, and oxidative stress in chronic kidney disease. *Ren Fail* 2011, 33:866–874
52. MOE SM, CHEN NX. Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Circ Res* 2004, 95:560–567
53. BRAAM LA, DISSEL P, GIJSBERS BL, SPRONK HM, HAMULYÁK K, SOUTE BA ET AL. Assay for human matrix gla protein in serum: Potential applications in the cardiovascular field. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20:1257–1261
54. JONO S, IKARIY, VERMEER C, DISSEL P, HASEGAWA K, SHIOI A ET AL. Matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification as assessed by electron-beam computed tomography. *Thromb Haemost* 2004, 91:790–794
55. NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002, 39(Suppl 2):S1–S266

Corresponding author:

S. Panagoutsos, Department of Nephrology, University General Hospital, Medical School, Democritus University of Thrace, Dragana, 681 00 Alexandroupolis, Greece
e-mail: spanagou@med.duth.gr