

Η συμπληρωματική από του στόματος χορήγηση ασβεστίου αυξάνει την ινσουλινική ευαισθησία σε ασθενείς με υπέρταση και μεταβολικό σύνδρομο*

Μ.Ι. Ποικιλίδου¹
Χ.Δ. Μπεφάνη²
Π.Α. Σαραφίδης¹
Γ.Γ. Κολιάκος²
Ι.Μ. Τζιόλας¹
Π.Ε. Ζεμπεκάκης¹
Κ.Α. Καζάκος¹
Ι.Γ. Γιώβος¹
Α.Ν. Λαζαρίδης¹

¹ Α' Παθολογική Κλινική ΑΠΘ,
Νοσοκομείο ΑΧΕΠΑ,
Θεσσαλονίκη
² Τμήμα Βιολογικής Χημείας,
Ιατρική Σχολή ΑΠΘ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της συμπληρωματικής χορήγησης Ca^{2+} στην ευαισθησία στην ινσουλίνη (EI) και τη συγκέντρωση των ενδοαίμοπεταλιακών ιόντων Ca^{2+} και Mg^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ και $[\text{Mg}^{2+}]_i$) σε ασθενείς με υπέρταση και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Στη μονή-τυφλή, προοπτική αυτή μελέτη, 31 ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 1500 mg Ca^{2+} per os καθημερινά (n=15) ή τίποτα (n=16) για 8 εβδομάδες. Στην αρχή και στο τέλος της περιόδου παρακολούθησης προσδιορίστηκε η EI με τη μέθοδο του ευγλυκαιμικού υπερινσουλιναϊμικού clamp καθώς και οι $[\text{Ca}^{2+}]_i$ και $[\text{Mg}^{2+}]_i$ με τη χρήση φθορίζουσών ουσιών fura-2 και mag-fura 2 αντίστοιχα. Στο τέλος της μελέτης, τα άτομα που έλαβαν συμπληρωματική χορήγηση Ca^{2+} είχαν σημαντικά υψηλότερη EI ($\Delta\text{M } 0,32 \pm 0,5 \text{ mmol} \times \text{min}^{-1}$, $p < 0,05$) και $[\text{Mg}^{2+}]_i$ (από $476,6 \pm 61,7 \text{ nmol/L}$ σε $736,1 \pm 92,7 \text{ nmol/L}$, $p < 0,001$) και χαμηλότερο $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (από $125,0 \pm 24,7$ σε $80,4 \pm 10,6 \text{ nmol} \times \text{L}^{-1}$, $p < 0,05$, μέσος όρος \pm SEM). Καμία από τις παραπάνω παραμέτρους δεν μεταβλήθηκε στην ομάδα ελέγχου. Η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι η $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ήταν ο πιο ισχυρός καθοριστής της μεταβολής της EI ($\beta_{\text{Ca}^{2+}} = -0,34$, $p < 0,05$). Η συμπληρωματική χορήγηση Ca^{2+} βελτιώνει την ινσουλινική αντίσταση σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και υπέρταση. Οι μεταβολές αυτές πιθανώς μεσολαβούνται από μεταβολές στο ενδοκυττάριο ιοντικό περιβάλλον των $[\text{Ca}^{2+}]_i$ και $[\text{Mg}^{2+}]_i$.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 είναι ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας, με συνεχώς αυξανόμενη επίπτωση στις ανεπτυγμένες χώρες¹. Σε προοπτικές μελέτες παρατήρησης έχει διαπιστωθεί η σχέση μεταξύ της χαμηλής/ ανεπαρκούς πρόσληψης Ca^{2+} και της επίπτωσης του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2²⁻⁴ ή του μεταβολικού συνδρόμου⁵.

Πράγματι έχει αποδειχθεί ότι η ινσουλινική αντίσταση,

* Το σχετικό με την ανασκόπηση ερευνητικό πρωτόκολλο ενισχύεται οικονομικά από την Ελληνική Αντιυπερτασική Εταιρεία βάσει απόφασης του Δ.Σ. στις 10-4-2006.

μία από τις κύριες διαταραχές του συνδρόμου, είναι ένα ιοντικό φαινόμενο και πιθανότατα, το αποτέλεσμα υποκείμενης διαταραχής των ενδοκυττάρων Ca^{2+} και Mg^{2+} 6-9. Αυξημένο βασικό ενδοκυττάριο Ca^{2+} καθώς και διαταραχές στη σύνδεση με την κυτταρική μεμβράνη και τη μεταφορά του Ca^{2+} έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και υπέρταση 8,10. Η αύξηση αυτή του ενδοκυττάρου Ca^{2+} επηρεάζει τη μεσολαβούμενη από την ινσουλίνη μεταφορά της γλυκόζης καθώς και την έκκριση της ινσουλίνης προκαλώντας έτσι την ανάπτυξη ινσουλινικής αντίστασης και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 11,12.

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες, οι τυχαιοποιημένες μελέτες που είχαν ως παρέμβαση τη συμπληρωματική χορήγηση Ca^{2+} επικεντρώθηκαν στις ευεργετικές δράσεις του στην οστική μάζα και το συμπληρωματικό Ca^{2+} χρησιμοποιείται ευρέως για την πρόληψη καταγμάτων στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες^{13,14}. Πρόσφατα μελετήθηκε η επίδραση διαιτητικής πρόσληψης και της συμπληρωματικής χορήγησης Ca^{2+} και βιταμίνης D στην επίπτωση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 με αντικρουόμενα αποτελέσματα^{2,15}. Τα συμπληρώματα Ca^{2+} έχουν ως αποτέλεσμα την παράδοξη μείωση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} μέσω μηχανισμών όπως μεταβολές στην Ca^{2+} -ΑΤΡάση, την ανταλλαγή Na^+ - Ca^{2+} και της επακόλουθης μείωσης των κυκλοφορούντων επιπέδων της παραθορμόνης και της 1,25-διυδροξυβιταμίνης D_3 ^{16,17}. Η μείωση αυτή πιθανώς επηρεάζει την ΕΙ¹⁸, μία υπόθεση που έχει ελάχιστα μελετηθεί.

Επομένως, ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί κατά πόσο η συμπληρωματική per os χορήγηση Ca^{2+} επηρεάζει τις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις των Ca^{2+} και Mg^{2+} καθώς και την ΕΙ.

ΑΤΟΜΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς

Στην παράλληλη τυχαιοποιημένη, μονή, τυφλή μελέτη, μελετήθηκαν 52 ασθενείς με ιδιοπαθή υπέρταση και διαβήτη τύπου 2 υπό αγωγή με γλιβενκλαμίδη, που προσήλθαν στο υπερτασιολογικό και διαβητολογικό ιατρείο της Α' Παθολογικής Κλινικής του νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ. Τα αρχικά στοιχεία του συνόλου των ασθενών έχουν δημοσιευτεί αλλού¹⁹. Από τα άτομα αυτά επιλέχθηκαν όσα είχαν πρωτοδιαγνωσθείσα υπέρταση (σταδίου

1) (n=34). Ασθενείς με επιπλεγμένο διαβήτη, πρωτοπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό, δευτεροπαθείς μορφές υπέρτασης, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, στεφανιαία νόσο, ιστορικό κακοήθειας, ενεργό ηπατική νόσο, νεφρική ανεπάρκεια, μεταβολική νόσο οστών, ιστορικό κατάχρησης αλκοόλ ή λήψης συμπληρωμάτων διατροφής εξαιρέθηκαν από τη μελέτη.

Το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την επιτροπή βιοηθικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (αριθμός έγκρισης Α3242) και όλοι οι ασθενείς υπέγραψαν έγγραφο συγκατάθεσης. Όλες οι εξετάσεις έγιναν σύμφωνα με τη διακήρυξη του Ελσίνκι (τροποποίηση του 1989). Σε δύο ασθενείς ήταν αδύνατη η διενέργεια του ευγλυκαιμικού clamp λόγω δυσκολιών στην τοποθέτηση ενδοφλέβιων γραμμών και ένας ασθενής διέκοψε το Ca^{2+} λόγω γαστρεντερικών διαταραχών. Επομένως, τον τελικό πληθυσμό της μελέτης αποτέλεσαν 31 ασθενείς (16 γυναίκες και 15 άνδρες) με πλήρη δεδομένα.

Πρωτόκολλο μελέτης

Μετά τη λήψη χαμηλής σε Ca^{2+} δίαιτας (≈ 500 mg/ημέρα) για 4 εβδομάδες οι ασθενείς προσήλθαν στο εργαστήριο Κλινικών Δοκιμασιών του Τμήματος Υπέρτασης της Α' Παθολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ (1^η μέρα) μετά από 12ώρη νηστεία και χωρίς τα πρωινά τους φάρμακα. Από τους ασθενείς λήφθηκαν δείγματα αίματος για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ενδοαιμοπεταλιακού Ca^{2+} [Ca^{2+}]_i και Mg^{2+} [Mg^{2+}]_i, της παραθορμόνης (PTH) ορού, της 1,25 υδροξυβιταμίνης D (1,25(OH)₂ Vit D), της γλυκόζης και ινσουλίνης νηστείας, της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) και των βασικών βιοχημικών παραμέτρων.

Την επόμενη μέρα (ημέρα 2^η), μετά από 12ωρη νηστεία και χωρίς τα πρωινά τους φάρμακα επανέρχονταν στο εργαστήριο για λήψη αίματος και προσδιορισμό γλυκόζης και ινσουλίνης καθώς και για τη μέτρηση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη με τη μέθοδο του ευγλυκαιμικού clamp.

Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε μέτρηση του βάρους και του ύψους για προσδιορισμό του δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ). Η σύσταση του σώματος προσδιορίστηκε για κάθε συμμετέχοντα με τη μέθοδο της βιοηλεκτρικής αντίστασης (BIA) με τη συσκευή Bodystat 1500 (Bodystat Ltd, Douglas, Isle of Man, British Isles)

Μετά το τέλος των παραπάνω εξετάσεων οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν είτε 1500mg στοιχειακού Ca^{2+} από το στόμα καθημερινά ($n=15$) ή τίποτα ($n=16$) για 8 εβδομάδες. Η τυχαιοποίηση έγινε με πρόγραμμα παραγωγής τυχαίων αριθμών στα άτομα που πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη. Η μελέτη ήταν τυφλή ως προς την τυχαιοποίηση αλλά και την επεξεργασία των δεδομένων. Η συμμόρφωση στην αγωγή έγινε με καταμέτρηση των δισκίων στο μέσο και στο τέλος της παρακολούθησης.

Στο τέλος της μελέτης (8 εβδομάδες), οι ασθενείς επανέρχονταν στο εργαστήριο κλινικών δοκιμασιών και επαναλάμβαναν όλες τις παραπάνω εξετάσεις.

Τα άτομα έλαβαν οδηγίες για περιορισμένη χρήση γαλακτοκομικών προϊόντων σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Η αγωγή των ασθενών με τη σουλφονυλουρία παρέμεινε σταθερή σε όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Μετρήσεις

Εργαστηριακές μέθοδοι

Μέτρηση ινσουλινοευσαιθησίας

Η EI υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την τεχνική του ευγλυκαιμικού υπερινσουλιναϊμικού clamp, όπως έχει περιγραφεί αλλού²⁴⁻²⁶. Συνοπτικά, μετά από 12ωρη νηστεία και χωρίς πρωινή λήψη φαρμάκων τοποθετήθηκαν δύο ενδοφλέβιες γραμμές, μία σε μια φλέβα της άκρας χειρός ή του καρπού με παλίνδρομη φορά για τις συχνές αιμοληψίες και άλλη μία σε μια φλέβα του αντιβραχίου για την έγχυση ινσουλίνης και γλυκόζης. Για να ελαχιστοποιηθεί η αρτηριοφλεβική διαφορά στη συγκέντρωση γλυκόζης πλάσματος και να ληφθούν φλεβικές τιμές γλυκόζης όσο το δυνατόν πλησιέστερες στις αντίστοιχες αρτηριακές, η άκρα χείρα παρέμεινε θερμαινόμενη στους 65 °C με χρήση ειδικής συσκευής καθ' όλη τη μέτρηση^{25,27}. Μετά από μια αρχική έγχυση διάρκειας 10 min, η έγχυση ινσουλίνης διατηρήθηκε σταθερή στα 100 $\text{mU} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ για άλλα 110 min. Η συγκέντρωση γλυκόζης αίματος μετρούνταν κάθε 5 min με σκοπό να διατηρηθεί στο ευγλυκαιμικό επίπεδο (90 mg/dl) μέσω μεταβαλλόμενης έγχυσης υδατικού διαλύματος δεξτρόζης 20%. Η μέση τιμή του ρυθμού έγχυσης γλυκόζης κατά τη διάρκεια των τελικών 40 min της μελέτης (δείκτης M) αντιπροσώπευσε την EI και ομαλοποιήθηκε περαιτέρω διαιρώντας με το σωματικό βάρος (body weight, bw)

και την άλιπο μάζα (fat-free mass, ffm) και προέκυψαν οι δείκτες M_{bw} και M_{ffm} . Στα 80, 100 και 120 λεπτά λήφθηκε αίμα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ινσουλίνης. Ο μέσος όρος των τριών μετρήσεων αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση της ινσουλίνης σταθερής κατάστασης και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του λόγου M/I που αντιπροσωπεύει το ποσό της γλυκόζης που μεταβολίζεται ανά μονάδα ινσουλίνης. Ο ρυθμός μεταβολικής κάθαρσης (Metabolic Clearance Rate, MCR) υπολογίστηκε διαιρώντας τους αντίστοιχους δείκτες M με τη μέση συγκέντρωση γλυκόζης πλάσματος σταθερής κατάστασης^{20,21}. Ο συντελεστής μεταβλητότητας για τη συγκέντρωση της γλυκόζης της σταθερής κατάστασης ήταν 5,6%.

Μέτρηση ενδοαιμοπεταλιακού ασβεστίου και μαγνησίου

Συλλογή του αίματος

Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε πρωινή αιμοληψία με τη μέθοδο των δύο συρίγγων, για την απομόνωση των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα το αίμα λήφθηκε με καθετηριασμό μίας φλέβας του αντιβραχίου χωρίς περίδεση, με φλεβοκαθετήρα διαμέτρου 20 gauge. Στη συνέχεια λήφθηκαν 10 ml αίματος για τη διεξαγωγή διαφόρων βιοχημικών εξετάσεων που αναφέρθηκαν και χωρίς διακοπή της ροής του αίματος με δεύτερη σύριγγα λήφθηκαν 9 ml αίματος που αμέσως μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες προπυλενίου οι οποίοι περιείχαν 1 ml διαλύματος citrate dextrose (2,5 g κιτρικό νάτριο, 1,5 g κιτρικό οξύ, 2,0 g δεξτρόζης και 100 ml απεσταγμένο νερό)(αναλογία όγκων 9:1)²⁸. Με τον τρόπο αυτόν απομακρυνόταν το ιστικό πλασμινογόνο που θα μπορούσε να προκαλέσει πήξη του αίματος.

Προετοιμασία των αιμοπεταλίων

Για τον προσδιορισμό της ενδοαιμοπεταλιακής συγκέντρωσης του Ca^{2+} και του Mg^{2+} χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που περιγράφηκε από τους Yoshimura και συν²²⁻²⁴.

Ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο με πάγο ενώ η επεξεργασία του δείγματος γινόταν μέσα σε 15-30 min από τη λήψη του αίματος. Μετά από φυγοκέντρηση στα 500g για 10 min στους 20 °C λαμβανόταν η πλούσια σε αιμοπετάλια υπερκείμενη στιβάδα (πλάσμα με αιμοπετάλια). Στη συνέχεια γινόταν η απομόνωση των αιμοπεταλίων με τη χρήση στήλης διαχωρισμού

Sepharose 2B-CL (Sigma, Germany) και η διάλυσή τους σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 10 mM HEPES και 5 mM γλυκόζης σε θερμοκρασία δωματίου. Τα αιμοπετάλια που εκπλύθηκαν από τη στήλη στη συνέχεια διαλύθηκαν ξανά στο προηγούμενο διάλυμα. Στη συνέχεια τα αιμοπετάλια μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας έναν δίσκο Newbauer μετά από 1:1 αραιώσή τους με ένα διάλυμα trypan blue. Για να μεγιστοποιηθεί η ακρίβεια και να ελαχιστοποιηθεί οποιοδήποτε σφάλμα που μπορεί να προκύψει από τη διαρροή των χρωστικών, οι μετρήσεις τόσο του Ca²⁺ όσο και του Mg²⁺ έγιναν τρεις φορές για κάθε ξεχωριστό δείγμα αίματος.

Μέτρηση ενδοαιμοπεταλιακού Ca²⁺ [Ca²⁺]_i

Χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο που περιέγραψε ο Grynkiewicz με μία μικρή τροποποίηση για τους ανθρώπους²⁵.

Τα αιμοπετάλια που εξήλθαν από τη στήλη επώαστηκαν με 1 μM fura 2-AM (Molecular Probes, Eugene, OR) και 0,02% Pluronic F-127 (Molecular Probes) στους 37 °C για 30 min σε συγκέντρωση 10⁸ κύτταρα/ml. Στη συνέχεια τα αιμοπετάλια πλύθηκαν ξανά με gel filtration για να απομακρυνθεί το εξωκυττάριο fura 2-AM, και η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων ρυθμίστηκε στα 10⁷ κύτταρα/ml και το διάλυμα επώαστηκε στους 37 °C για 7 min για να ολοκληρωθεί η υδρολύση του fura-2AM. Για τη μεγαλύτερη ακρίβεια παρασκευάστηκαν τρία ξεχωριστά διαλύματα αιμοπεταλίων από κάθε δείγμα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος της συγκέντρωσης Ca²⁺.

Η μέτρηση του φθορισμού έγινε με φασματοφθορισμόμετρο (RF-5000, Shimadzu, Kyoto, Japan), (dual excitation wavelength) σε μήκη κύματος διέγερσης 340 και 380 nm και μήκος κύματος εκπομπής 510 nm. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου Ca²⁺ υπολογίστηκε ο λόγος του σήματος 340/380 (R) χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος που περιγράφηκε από τον Grynkiewicz²⁵:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \cdot [R - R_{min}/R_{max} - R] \cdot Sf/Sb$$

όπου η σταθερά διάστασης K_d είναι 224 nM για το fura 2 R είναι ο λόγος του φθορισμού σε μήκη κύματος 340 και 380 nm στο κυτταρικό διάλυμα, R_{max} και R_{min} είναι οι λόγοι του φθορισμού στα 340 και 380 nm που προέκυψαν σε συγκεντρώσεις κορεσμού και μηδενικού Ca²⁺ αντίστοιχα και S₃₈₀ και S₃₄₀ είναι οι εντάσεις του φθορισμού στα 380 nm για το fura 2 σε συγκεντρώσεις μη-

δενικού και περίσσειας ενδοκυττάριου Ca²⁺ αντίστοιχα. Για τον προσδιορισμό του R_{max} έγινε προσθήκη 1mM CaCl₂ και Digitonin 50 μM, ενώ για τον προσδιορισμό του R_{min} έγινε προσθήκη EGTA σε Tris. Διορθώσεις έγιναν για την περίπτωση της εκροής fura 2 στον εξωκυττάριο χώρο με την προσθήκη EGTA και για τον αυτοφθορισμό αφαιρώντας το φθορισμό των μη φθορισμένων αιμοπεταλίων και των αντιδραστηρίων. Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του fura 2 εκτιμήθηκε από μία in vitro καμπύλη βαθμονόμησης η οποία έγινε μετρώντας γνωστές συγκεντρώσεις της fura-2.

Μέτρηση ενδοαιμοπεταλιακού Mg²⁺ [Mg²⁺]_i

Το ενδοαιμοπεταλιακό Mg²⁺ μετρήθηκε με τη χρήση της φθορίζουσας ουσίας mag-fura 2 όπως περιγράφηκε από τους Raju και συν²⁶. Συγκεκριμένα, τα αιμοπετάλια επώαστηκαν με 2μM mag-fura 2 acetoxymethyl ester (mag-fura 2 AM) (Molecular Probes, Eugene, OR) και 0,02% Pluronic F-127 (Molecular Probes, Eugene, OR) για 30 min στους 37 °C σε συγκέντρωση ~5 × 10⁷ κύτταρα/ml. Τα αιμοπετάλια πλύθηκαν ξανά με gel-filtration για την απομάκρυνση της εξωκυττάριας χρωστικής και τα αιμοπετάλια διαλύθηκαν σε διάλυμα HEPES σε συγκέντρωση 10⁷ κύτταρα/ml. Για τις μετρήσεις φθορισμού, κυβέτες 3-ml κυτταρικού διαλύματος αναδεύτηκαν συνεχόμενα με μαγνητικό αναδευτήρα σε μία κυβέτα quartz στους 37° C, και η μέτρηση του φθορισμού έγινε με φασματοφθορισμόμετρο (RF-5000, Shimadzu, Kyoto, Japan), (dual excitation wavelength) σε μήκη κύματος διέγερσης 340 και 380 nm και μήκος κύματος εκπομπής 510 nm. Διορθώσεις έγιναν για την περίπτωση της εκροής mag fura 2 στον εξωκυττάριο χώρο με την προσθήκη 3 mM EDTA και για τον αυτοφθορισμό αφαιρώντας το φθορισμό των μη φθορισμένων αιμοπεταλίων και των αντιδραστηρίων. Για τον υπολογισμό του [Mg²⁺]_i χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

$$[Mg^{2+}]_i = K_d \cdot [R - R_{min}/R_{max} - R] \cdot Sf/Sb$$

όπου K_d είναι 1,5 mM για το mag-fura 2, R είναι ο λόγος του φθορισμού σε μήκη κύματος 340 και 380 nm στο κυτταρικό διάλυμα, R_{max} και R_{min} είναι οι λόγοι του φθορισμού στα 340 και 380 nm που προέκυψαν σε συγκεντρώσεις κορεσμού και μηδενικού Mg²⁺ αντίστοιχα και S₃₈₀ και S₃₄₀ είναι οι εντάσεις του φθορισμού στα 380 nm για το mag fura 2 σε συγκεντρώσεις μηδενικού και περίσσειας ενδοκυττάριου Mg²⁺ αντίστοιχα²⁶.

Για τον προσδιορισμό του R_{max} έγινε προσθήκη 1mM CaCl₂ και Digitonin 50μM ενώ για τον προσδιορι-

σμό του Rmin έγινε προσθήκη 50 mM digitonin και 6 mM EDTA μετά από διόρθωση του pH σε 8,3 με 7 mM Tris σε διάλυμα που δεν περιείχε Mg^{2+} .

Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του mag fura 2 εκτιμήθηκε από μία in vitro καμπύλη βαθμονόμησης η οποία έγινε μετρώντας γνωστές συγκεντρώσεις της mag fura-2. Ο συντελεστής μεταβλητότητας της μεθόδου για το Mg^{2+} ήταν 3%.

Βιοχημικές Μέθοδοι

Όλες οι βιοχημικές παράμετροι μετρήθηκαν με αυτόματο αναλυτή Roche/Hitachi 912 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), χρησιμοποιώντας συνήθεις εργαστηριακές μεθόδους.

Οι αιματολογικές εξετάσεις έγιναν με αυτόματο μετρητή Coulter MicroDiff II (Coulter Corporation, Miami, Florida, U.S.A.). Η παραθορμόνη μετρήθηκε με ανοσοραδιομετρική μέθοδο (Diasorin, Minnesota, USA) με συντελεστές μεταβλητότητας (intra-assay και inter-assay) 2,4% και 4,8% αντίστοιχα. Η 1,25 διυδροξυβιταμίνη D μετρήθηκε μετά από εξαγωγή (extraction) με ανοσοραδιομετρική μέθοδο (Diasorin, Minnesota, USA) με συντελεστές μεταβλητότητας (intra-assay και inter-assay) 5,5% και 7,7% αντίστοιχα. Η γλυκόζη κατά τη διάρκεια του clamp μετρήθηκε με το HemoCue B-Glucose αναλυτή (Hemocue AB, Ängelholm, Sweden) και η ανάλυση έγινε με Roche/Hitachi 912 αυτόματο αναλυτή. Το φωτόμετρο HemoCue έχει βρεθεί να είναι υψηλής ακρίβειας όταν συγκρίθηκε με τις συνήθεις εργαστηριακές μεθόδους²⁷. Στο εργαστήριό μας το Hemo Cue B-Glucose βρέθηκε να έχει συντελεστή συσχέτισης $r = 0,98$ και συντελεστή μεταβλητότητας μικρότερο από 1,5%. Η συγκέντρωση της ινσουλίνης προσδιορίστηκε με ραδιοανοσολογική μέθοδο με συντελεστές μεταβλητότητας (intra-assay και inter-assay) 4,3% και 3,4% αντίστοιχα (DiaSorin, Saluggia, Italy). Η γλυκόζη και η ινσουλίνη νηστείας για κάθε άτομο ήταν ο μέσος όρος των δύο ημερών της αξιολόγησης των ασθενών.

Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση της στατιστικής δύναμης έγινε με το λογισμικό NQuery Advisor version 5.0 software (Statistical Solutions, Boston, MA). Η μελέτη είχε 90% στατιστική δύναμη να ανιχνεύσει διαφορά της τάξης του $0,31 \pm 0,5$ (μέση μεταβολή \pm τυπική απόκλιση $mg \cdot Kg^{-1} \cdot min^{-1}$ στην EI που ήταν και το πρωταρχικό τελικό σημείο.

Οι μεταβλητές αναφέρονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα. Για τη σύγκριση των διαφόρων παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε το t-test κατά ζεύγη για τις παραμετρικές μεταβλητές και το Wilcoxon rank sum test για τις μη παραμετρικές μεταβλητές. Οι μεταβλητές εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα (standard error of the mean-SEM).

Για την αποφυγή σφάλματος από διαφορές στην αρχική τιμή των παραμέτρων EI που προέκυψαν από το clamp και των $[Ca^{2+}]_i$, $[Mg^{2+}]_i$, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης της συνδιακύμανσης (analysis of covariance ANCOVA) για την εύρεση διαφορών μεταξύ των δύο ομάδων μετά από διόρθωση για τις αρχικές τιμές²⁸.

Η απλή γραμμική παλινδρόμηση χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστούν οι συσχετίσεις μεταξύ δύο μεταβλητών. Το $p < 0,05$ θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντικό. Η πολυπαραγοντική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε να προσδιορίσει τη συμμετοχή των μεταβολών του $[Ca^{2+}]_i$ και $[Mg^{2+}]_i$ στις μεταβολές της EI.

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το λογισμικό Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 13.0 software (SPSS PC Inc, Chicago, Illinois, USA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά την τυχαιοποίηση δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ των δημογραφικών, σωματομετρικών και κλινικών χαρακτηριστικών μεταξύ της ομάδας Ca^{2+} και της ομάδας ελέγχου (Πίν. 1).

Συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, σημαντική

Πίνακας 1. Βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών της ομάδας παρέμβασης και της ομάδας ελέγχου.

	Ομάδα Ca^{2+} (n=15)	Ομάδα ελέγχου (n=16)	p
Ηλικία (χρόνια)	58,4 \pm 6,8	59,7 \pm 9,0	>0,05
Φύλο (Α/Θ)	6/9	6/10	>0,05
ΔΜΣ (Kg/m ²)	32,7 \pm 6,9	32,6 \pm 6,4	>0,05
Διάρκεια Διαβήτη (έτη)	4,0 \pm 3,0	5,8 \pm 5,5	>0,05
Βάρος (Kg)	85,4 \pm 16,8	89,7 \pm 17,1	>0,05

Πίνακας 2. Σωματομετρικά χαρακτηριστικά και των παραμέτρων μεταβολισμού της γλυκόζης και του Ca²⁺ στην ομάδα παρέμβασης και στην ομάδα ελέγχου (μέσος όρος±τυπικό σφάλμα).

	Ομάδα Ca ²⁺ (n=15)			Ομάδα ελέγχου (n=16)		
	Αρχή	8-εβδομάδες	p	Αρχή	8-εβδομάδες	p
Βάρος (Kg)	85,3±4,3	84,3±3,9	0,13	89,7±4,3	89,1±4,4	0,14
ΔΜΣ (Kg/m ²)	32,7±1,8	32,2±1,6	0,13	32,6±1,6	32,4±1,6	0,10
Γλυκόζη νηστείας (mmol/L)	8,6 ± 3,5	7,1 ± 1,2	0,06	8,1 ± 1,9	7,9 ± 1,8	0,32
Ινσουλίνη νηστείας (pmol/L)	94,8 ± 57,2	94,7 ± 57,4	0,74	90,2 ± 40,6	88,3 ± 32,5	0,21
HbA _{1c} %	6,3 ± 1,7	5,8 ± 0,9	0,08	6,1 ± 1,1	6,0 ± 1,1	0,53
1,25-υδροξυβιταμίνη D (pmol/L)	120,0 ± 16,6	117,9 ± 18,2	0,62	121,1 ± 19,3	125,8 ± 23,9	0,64
Παραθορμόνη (ng/L)	43,1 ± 19,9	31,5 ± 15,1	0,01*	30,3 ± 10,1	36,0 ± 9,5	0,09

ΔΜΣ: Δείκτης Μάζας Σώματος

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσος όρος±τυπική απόκλιση

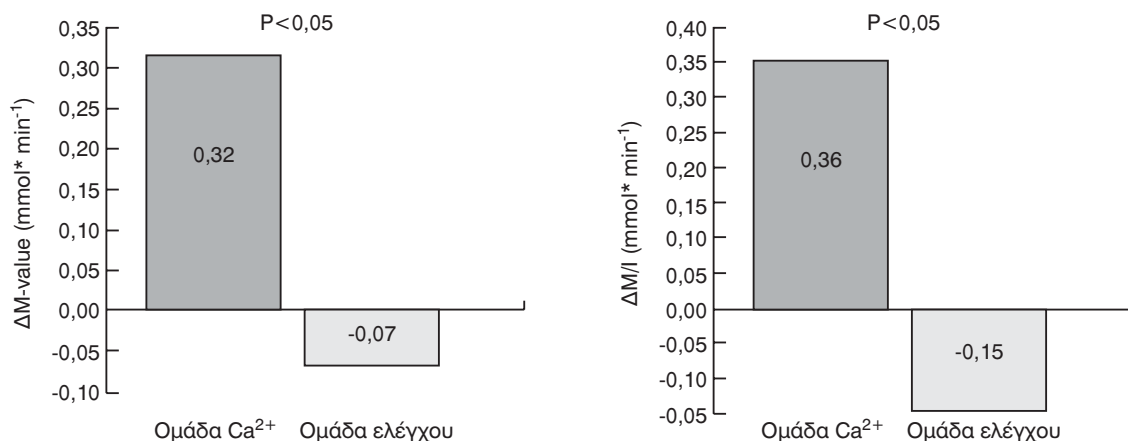
αύξηση όλων των δεικτών EI που προέκυψαν από το clamp παρατηρήθηκε στην ομάδα του Ca²⁺ μετά από 8 εβδομάδες περί ου συμπληρωματικής χορήγησης Ca²⁺. (ΔM-value 0,32±0,5 mmol * min⁻¹ p<0,05, ΔM/I 0,36±0,6 mmol * min⁻¹ * nmol * L p<0,01 και ΔMCR 0,08±0,1 ml * min⁻¹ * kg⁻¹ p<0,01 στην ομάδα του Ca²⁺).

Οι διαφορές αυτές παρέμειναν σημαντικές ακόμη και μετά από σύγκριση μεταξύ των τελικών τιμών των δυο ομάδων. (Πίν. 2, Εικ. 1.).

Τόσο η γλυκόζη νηστείας όσο και η γλυκοξυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA_{1c}) μειώθηκαν στην ομάδα παρέμβασης όχι όμως σημαντικά (από 8,6 ± 3,5 σε 7,1 ± 1,2 mmol * L⁻¹, p=0,06 για τη γλυκόζη και από 6,3 ± 1,7 σε 5,8 ± 0,9 % για την HbA_{1c} p=0,08) στην ομάδα του Ca²⁺.

Στην ομάδα ελέγχου οι παραπάνω παράμετροι παρέμειναν αμετάβλητες. Η παραθορμόνη μειώθηκε μόνο στην ομάδα του Ca²⁺ (43,1 ± 19,9 σε 31,5 ± 15,1 ng*L⁻¹) σε αντίθεση με την 1,25(OH)₂Vit D που δεν μεταβλήθηκε και στις δύο ομάδες. (Πίν. 3).

Επιπλέον, σημαντική μείωση στη συγκέντρωση του [Ca²⁺]i παρατηρήθηκε στην ομάδα του Ca²⁺ (125,0±24,7 σε 80,4±10,6 nmol x L⁻¹) αλλά όχι και στην ομάδα ελέγχου. Η μείωση αυτή παρέμεινε σημαντική μετά από διόρθωση για την αρχική συγκέντρωση Ca²⁺. Τα επίπεδα του [Mg²⁺]i αυξήθηκαν σημαντικά μετά από τη χορήγηση Ca²⁺ στην ομάδα παρέμβασης (από 476,6±61,7 nmol/L σε 736,1±92,7 nmol/L, p<0,001) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ακόμη και μετά από διόρ-



Εικ. 1. Μέση μεταβολή των δεικτών της ινσουλινικής ευαισθησίας M-value και M/I στην αρχή και το τέλος της μελέτης για την ομάδα παρέμβασης και την ομάδα ελέγχου.

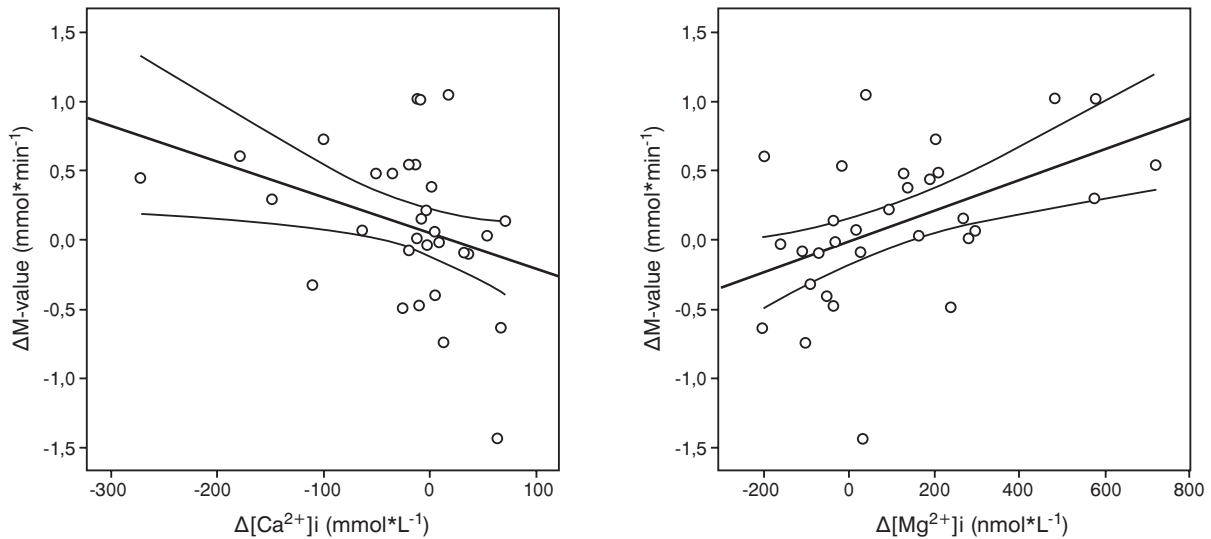
Πίνακας 3. Δείκτες που προέκυψαν από το ενγλυκαιμικό clamp και οι διαφορές τους (μεταξύ των τιμών στην αρχή και στο τέλος της μελέτης)

	Ομάδα Ca ²⁺ (Αρχή)	Ομάδα ελέγχου (Αρχή)	Μεταβολή μετά από 8 εβδομάδες (95% ΔΑ) Ομάδα Ca ²⁺	Μεταβολή μετά από 8 εβδομάδες (95% ΔΑ) Ομάδα ελέγχου	P	P διορθωμένο για τις αρχικές τιμές
M (mmol*min ⁻¹)	2,5 ± 0,9	2,3 ± 0,7	0,32 ± 0,5 (0,04 to 0,59)	-0,07 ± 0,5 (-0,21 to 0,36)	0,028	0,032
M _{bw} (mmol*min ⁻¹ *kg ⁻¹)	30,1 ± 11,7	26,6 ± 9,6	4,2 ± 5,8 (0,98 to 7,4)	0,05 ± 6,8 (-3,5 to 3,7)	0,014	0,050
M _{firm} (mmol*min ⁻¹ *kg ⁻¹)	71,7 ± 37,1	72,7 ± 44,3	24,2 ± 20,9 (10,4 to 38,1)	3,2 ± 28,4 (-12,9 to 19,4)	0,002	0,038
M/I (mmol*min ⁻¹ *mmol ⁻¹ *I)	1,7 ± 0,7	1,65 ± 0,5	0,36 ± 0,6 (0,01 to 0,7)	-0,15 ± 4,1 (-0,05 to 0,42)	0,043	0,030
M _{bw} /I (mmol*min ⁻¹ *kg ⁻¹ *mmol ⁻¹ *I)	19,9 ± 7,8	19,1 ± 7,2	4,6 ± 7,8 (0,23 to 8,9)	-2,1 ± 4,2 (-4,3 to 0,15)	0,040	0,006
M _{firm} /I (mmol*min ⁻¹ *kg ⁻¹ *mmol ⁻¹ *I)	47,7 ± 25,9	52,2 ± 30,8	21,4 ± 27,8 (6,1 to 36,8)	-2,1 ± 22,9 (-14,4 to 10,1)	0,010	0,008
MCR (L*min ⁻¹)	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,08 ± 0,1 (0,02 to 0,13)	-0,01 ± 0,1 (-0,06 to 0,05)	0,008	0,019
MCR _{bw} (mL*min ⁻¹ *kg ⁻¹)	5,7 ± 2,2	5,0 ± 1,7	1,1 ± 1,2 (0,38 to 1,7)	0,07 ± 1,33 (-0,64 to 0,78)	0,005	0,041
MCR _{firm} (mL*min ⁻¹ *kg ⁻¹)	13,7 ± 7,0	13,7 ± 8,0	5,4 ± 5,6 (2,3 to 8,5)	0,7 ± 5,9 (-2,4 to 3,9)	0,002	0,027

M, M_{bw} και M_{firm} ο συνολικός μεταβολισμός της γλυκόζης σε απόλυτες τιμές και ομαλοποιημένος με το σωματικό βάρος και την άλιπο μάζα αντίστοιχα, M/I, M_{bw}/I, και M_{firm}/I, οι ίδιοι δείκτες διαιρεμένοι με τη συγκέντρωση ινσουλίνης σταθερής κατάστασης, MCR, MCR_{bw} και MCR_{firm} οι μεταβολικοί ρυθμοί κάθαρσης που προκύπτουν με διαίρεση των αντίστοιχων M-δεικτών με τη μέση συγκέντρωση γλυκόζης σταθερής κατάστασης.

95% ΔΑ: 95% διαστήματα αξιοπιστίας

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση



Εικ. 2. Απλή γραμμική παλινδρόμηση μεταξύ της διαφοράς της EI (ΔM -value) και της μεταβολής α . Στο ενδοαιμοπεταλιακό Ca^{2+} ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) και β . Στο ενδοαιμοπεταλιακό Mg^{2+} ($\Delta[\text{Mg}^{2+}]_i$).

θωση για τις αρχικές τιμές. Οι συγκεντρώσεις του Ca^{2+} και Mg^{2+} στον ορό δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά στις δύο ομάδες στο τέλος της παρακολούθησης.

Η συγκέντρωση του Ca^{2+} στα ούρα 24ώρου σημαντικά αυξήθηκε στην ομάδα παρέμβασης (από 18.8 ± 4.6 σε 24.3 ± 3.1 mg/24ωρο, $p < 0.05$) αλλά όχι και στην ομάδα ελέγχου (από 22.4 ± 4.2 σε 24.1 ± 3.9 mg/24ωρο, $p > 0.05$) ενώ η συγκέντρωση του Mg^{2+} στα ούρα 24ώρου δεν μεταβλήθηκε στις δύο ομάδες στην αρχή και στο τέλος της μελέτης (από 7.0 ± 1.1 σε 10.0 ± 3.9 mg/24ωρο, $p > 0.05$ στην ομάδα του Ca^{2+} και από 10.6 ± 2.5 σε 8.7 ± 1.7 mg/24ωρο στην ομάδα ελέγχου).

Η απλή γραμμική παλινδρόμηση έδειξε ότι στο σύνολο των ασθενών, η μεταβολή στην EI (ΔM -value) συσχετίστηκε σημαντικά με τη μεταβολή στη συγκέντρωση του Ca^{2+} ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) ($\beta_{\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i} = -0.361$, $p < 0.05$). Αντίθετα, η μεταβολή στο ενδοκυττάριο Mg^{2+} ($\Delta[\text{Mg}^{2+}]_i$) είχε ισχυρή τάση για συσχέτιση με τη ΔM -value ($\beta_{\Delta[\text{Mg}^{2+}]_i} = 0.324$, $p = 0.074$) (Πίν. 4, Εικ. 2).

Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, οι μεταβολές των δύο ιόντων θεωρήθηκαν ως ανεξάρτητες μεταβλητές και φάνηκε ότι η ΔM -value στο σύνολο του πληθυσμού της μελέτης καθορίστηκε σημαντικά από την $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\beta_{\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i} = -0.341$, $p < 0.05$), ενώ η σχέση αυτή δεν μεταβλήθηκε από την εισαγωγή στο μοντέλο της $\Delta[\text{Mg}^{2+}]_i$ ($\beta_{\Delta[\text{Mg}^{2+}]_i} = 0.320$, $p = 0.065$) ($R^2 = 0.23$, $p < 0.05$) (Πίν. 5).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 και υπέρταση, η συμπληρωματική χορήγηση 1500 mg στοιχειακού Ca^{2+} από του στόματος, σχετίστηκε με μείωση του συνολικού $[\text{Ca}^{2+}]_i$, αύξηση του $[\text{Mg}^{2+}]_i$ και αύξηση στην EI. Η μελέτη αυτή επίσης έδειξε ανεξάρτητους ρόλους για το $[\text{Ca}^{2+}]_i$ και το $[\text{Mg}^{2+}]_i$ στη φυσιολογία της EI. Φαίνεται ότι και τα δύο ιόντα συνέβαλαν στις μεταβολές της EI και η μεταβολή στη συγκέντρωση και των δύο εξηγεί το 22,4% των μεταβολών της EI.

Η συμπληρωματική χορήγηση 1500 mg στοιχειακού Ca^{2+} στηρίχθηκε στο γεγονός ότι μελέτες στο παρελθόν με δόσεις Ca^{2+} μικρότερες από 1000mg/ημέρα απέτυχαν να δείξουν σημαντική διαφορά σε παραμέτρους μεταβολισμού της γλυκόζης όπως είναι η γλυκόζη νηστείας και η HbA1c^{29} . Αντίθετα, οι Zemel και συν., βρήκαν ότι 1300mg στοιχειακού Ca^{2+} μείωσε την ινσουλινική αντίσταση που προσδιορίστηκε από την ινσουλίνη νηστείας που όμως θεωρείται μη αξιόπιστος δείκτης³⁰. Η μέγιστη ημερήσια δόση λαμβανόμενου Ca^{2+} είναι 2500 mg. Τα άτομα στην ομάδα παρέμβασης της μελέτης έλαβαν συνολικά περίπου 2000mg Ca^{2+} (500 mg διαιτητικού και 1500 mg συμπληρωματικού Ca^{2+}) που είναι μία ασφαλής δόση.

Το αυξημένο $[\text{Ca}^{2+}]_i$, έχει προταθεί ότι αποτελεί κοινό παρονομαστή του ΣΔ τύπου 2, της υπέρτασης και της παχυσαρκίας^{8,31}. Πράγματι, τα

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις των ενδοαμινοπεπταλιακών Ca^{2+} και Mg^{2+} και οι διαφορές τους (μεταξύ των τιμών στην αρχή και στο τέλος της μελέτης).

	Ομάδα Ca^{2+} (Αρχή)	Ομάδα ελέγχου (Αρχή)	Μεταβολή μετά από 8 εβδομάδες (95% ΔΑ) Ομάδα Ca^{2+}	Μεταβολή μετά από 8 εβδομάδες (95% ΔΑ)	P	P
$[Ca^{2+}]_i$ (nmol/L)	125,0±24,7	105,9±19,1	-44,7 (-87,6 to -1,8)	3,4 (-38,5 to 31,6)	0,042	0,047
$[Mg^{2+}]_i$ (nmol/L)	476,6±61,7	565,7±76,3	259,5 (123,9 to 395,1)	-60,5 (-179,3 to 58,3)	=0,001	<0,001

Η τιμή του P προέκυψε από τη σύγκριση των τιμών με τη βοήθεια του κατά ξύγη *t*-test. Το P διορθωμένο για τις αρχικές τιμές προέκυψε μετά από διόρθωση για τις αρχικές τιμές με τη δοκιμασία ANCOVA.

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση

Πίνακας 5. Απλή γραμμική παλινδρόμηση με τις $\Delta[Ca^{2+}]_i$ και $\Delta[Mg^{2+}]_i$, ως ανεξάρτητες μεταβλητές και την ΔEI ως εξαρτημένη μεταβλητή και πολυπαραγοντική γραμμική παλινδρόμηση με ανεξάρτητες μεταβλητές τις $\Delta[Ca^{2+}]_i$, $\Delta[Mg^{2+}]_i$ και εξαρτημένη μεταβλητή την ΔEI .

Παράμετρος	Απλή γραμμική παλινδρόμηση		Πολυπαραγοντική γραμμική παλινδρόμηση		P
	Απλή ΔEI	γραμμική παλινδρόμηση	Απλή ΔEI	γραμμική παλινδρόμηση	
$\Delta[Ca^{2+}]_i$ (nmol/L)	-	-	ΔEI	ΔEI	0,05
$\Delta[Mg^{2+}]_i$ (μ mol/L)	-	-	-	0,324	0,065
R^2	-0,152	0,42	0,130	0,106	0,029

$\Delta[Ca^{2+}]_i$: Μεταβολή στο ενδοαμινοπεπταλιακό Ca^{2+} στην αρχή και στο τέλος της παρακολούθησης.

$\Delta[Mg^{2+}]_i$: Μεταβολή στο ενδοαμινοπεπταλιακό Mg^{2+} στην αρχή και στο τέλος της παρακολούθησης.

$\Delta NHE-1$: Μεταβολή στο ενδοαμινοπεπταλιακό NHE-1 στην αρχή και στο τέλος της παρακολούθησης.

ΔEI : Μεταβολή στην εναισθησία στην ινσουλίνη στην αρχή και στο τέλος της παρακολούθησης

υψηλά επίπεδα $[Ca^{2+}]_i$ καθώς και οι διαταραχές στους μηχανισμούς διαμεμβρανικής μεταφοράς του Ca^{2+} έχουν παρατηρηθεί σε όλους τους τύπους κυττάρων σε άτομα με υπέρταση, αλλά και σε άτομα με διαβήτη χωρίς υπέρταση^{8,32,33}.

Έχει προταθεί ότι η κυτταρική υπερφόρτωση με Ca^{2+} μπορεί να μειώσει τόσο την έκκριση όσο και τη δράση της ινσουλίνης και να οδηγήσει σε γλυκαιμία^{8,9,34}. Άμεση ένδειξη ότι το κυτταροπλασματικό Ca^{2+} προάγει την εξωκυττάρωση σφαιριδίων ινσουλίνης προήλθε από πειράματα με β-κύτταρα στα οποία η κυτταρική μεμβράνη έγινε διαπερατή με τεχνητά μέσα. Στα κύτταρα αυτά, η αύξηση του ελεύθερου ενδοκυττάρου Ca^{2+} αύξησε την έκκριση ινσουλίνης περισσότερο από κάθε άλλη μεταβολή. Η περίσσεια όμως κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , δυσχεραίνει το σηματοδοτικό του ρόλο στην παραγωγή της ινσουλίνης¹¹. Επιπλέον, αύξηση του $[Ca^{2+}]_i$ μπορεί εν μέρει να οδηγεί σε αντίσταση στην ινσουλίνη, μέσω της φωσφορυλίωσης και απενεργοποίησης του μεταφορέα της γλυκόζης τύπου 4 (Glucose Transporter Type 4-GLUT-4) και άλλων ινσουλινοευαίσθητων υποστρωμάτων μέσα στο κύτταρο. Επομένως, αυτή η αύξηση του $[Ca^{2+}]_i$ στα κύτταρα στόχους της ινσουλίνης μπορεί να μειώσει την κυτταρική απάντηση στην ινσουλίνη^{9,35}.

Επιπλέον, μία πρόδρομη μελέτη έδειξε ότι εμποδίζοντας την είσοδο Ca^{2+} στα κύτταρα σε υπέρβαρους ηλικιωμένους ανθρώπους αυξήθηκε η περιφερική EI⁸. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα για την επίδραση της συμπληρωματικής χορήγησης Ca^{2+} αλλά και του Ca^{2+} που λαμβάνεται από τα γαλακτοκομικά προϊόντα στην EI σε ασθενείς με υπέρταση ή/και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2^{18,29,36}.

Μέχρι σήμερα, υπάρχει μόνο μία τυχαιοποιημένη μελέτη που εξέτασε την επίδραση του συμπληρωματικού Ca^{2+} στην αντίσταση στην ινσουλίνη. Στη μελέτη αυτή, σε 20 μη-διαβητικούς υπέρτασικούς ασθενείς η χορήγηση 1500 mg Ca^{2+} per os είχε σαν αποτέλεσμα τη βελτίωση της ινσουλινοευαισθησίας όπως αυτή μετρήθηκε με το ενγλυκαιμικό υπερινσουλιναϊμικό clamp όχι όμως και της γλυκαιμίας¹⁸.

Η παρούσα μελέτη βρήκε παρόμοια αποτελέσματα αλλά και μία ισχυρή τάση προς βελτίωση τόσο της γλυκαιμίας όσο και της HbA1c στην ομάδα της παρέμβασης. Όλες οι άλλες μελέτες μέχρι στιγμής, ήταν μικρές σε αριθμό συμμετεχόντων, περιέλαβαν μη διαβητικούς ασθενείς και διερεύ-

νησαν την επίδραση του προερχόμενου από τα γαλακτοκομικά προϊόντα Ca^{2+} στη γλυκαιμία και την αντίσταση στην ινσουλίνη καταλλήγοντας σε αντικρουόμενα αποτελέσματα^{29,36,37}.

Πρόσφατα, οι ερευνητές της Nurses Health Study μελέτησαν τη σχέση της συνδυασμένης πρόσληψης Ca^{2+} και βιταμίνης D τόσο από τη διατροφή όσο και από συμπληρώματα και βρήκαν ότι οι ασθενείς στο υψηλότερο πεμπτημόριο πρόσληψης Ca^{2+} και βιταμίνης D, είχαν 33% χαμηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν ΣΔ τύπου 2².

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, στα β-κύτταρα του παγκρέατος υπάρχουν υποδοχείς για τη βιταμίνη D³⁸, επομένως η συμβολή της στην ομοίωση της γλυκόζης δεν μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά στην αύξηση της εντερικής απορρόφησης του Ca^{2+} . Παρόλα αυτά, η μελέτη έδειξε ότι ακόμη και μετά από διόρθωση για την πρόσληψη της βιταμίνης D, η συνολική πρόσληψη Ca^{2+} συσχετίστηκε αντίστροφα με την επίπτωση του ΣΔ τύπου 2, ενώ η συνολική πρόσληψη βιταμίνης D δεν συσχετίστηκε με την επίπτωση του ΣΔ τύπου 2 μετά από διόρθωση για το προσλαμβανόμενο Ca^{2+} .

Επιπλέον, οι Pittas και συν. σε μία τυχαιοποιημένη μελέτη έδειξαν ότι σε ηλικιωμένους ασθενείς, με διαταραχή στην ανοχή της γλυκόζης, η συμπληρωματική χορήγηση Ca^{2+} και βιταμίνης D για 3 χρόνια, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της εξέλιξης της γλυκαιμίας και της ινσουλινικής αντίστασης που παρατηρείται με το πέρασμα του χρόνου³⁹. Αντίθετα, στη μεγάλη μελέτη Women's Health Initiative Study, η συνδυασμένη χορήγηση Ca^{2+} και βιταμίνης D, δεν μείωσε τον κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη σε διάστημα 7 ετών παρακολούθησης¹⁵. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι όσο μεγαλύτερη ήταν η πρόσληψη Ca^{2+} και βιταμίνης D στην αρχή της μελέτης, τόσο μεγαλύτερος ήταν και ο κίνδυνος εμφάνισης διαβήτη. Σε μία άλλη πρόσφατη μελέτη τη British Women's Heart and Health Study, όταν συγκρίθηκαν γυναίκες που κατανάλωναν γάλα, με αυτές που δεν κατανάλωναν, βρέθηκε ότι οι δεύτερες είχαν μικρότερη πιθανότητα να έχουν μεταβολικό σύνδρομο (OR=0,55)⁴⁰.

Η συμπληρωματική χορήγηση Ca^{2+} στην παρούσα μελέτη επίσης προκάλεσε μία αύξηση στο $[Mg^{2+}]_i$ στην ομάδα παρέμβασης. Υπάρχουν δεδομένα που συνεχώς συσσωρεύονται και δείχνουν ότι τόσο η γλυκόζη όσο και η ινσουλίνη ανεξάρτητα συμβάλλουν στην ομοίωση του κυτταρικού Mg^{2+} ⁷. Συγκεκριμένα από του στόματος χορήγηση

γλυκόζης προκαλεί άμεσα μείωση του $[Mg^{2+}]_i$ ενώ η ινσουλίνη μεταβάλλει τη μεταφορά των ιόντων από την κυτταρική μεμβράνη, κυρίως διεγείροντας την ανταλλαγή Na^+-H^+ , ή διεγείροντας την Ca^{2+} -ΑΤΡάση⁴¹. Τόσο η υπεργλυκαιμία όσο και η υπερινσουλιναμία έχουν συσχετιστεί με τις αυξημένες απώλειες Mg^{2+} που οδηγούν σε έλλειμμα Mg^{2+} στους διαβητικούς ασθενείς⁷. Είναι πιθανό, τόσο η μείωση της υπεργλυκαιμίας όσο και της υπερινσουλιναμίας που παρατηρήθηκε μετά τη συμπληρωματική χορήγηση Ca^{2+} βελτίωσε το $[Mg^{2+}]_i$. Ακόμη, είναι ενδιαφέρον ότι η αναστολή των διαύλων Ca^{2+} , έχει φανεί στο παρελθόν ότι αποκαθιστά την ιοντική ισορροπία στην αλατοευαίσθητη υπέρταση μειώνοντας τα επίπεδα του $[Ca^{2+}]_i$ και αυξάνοντας τα επίπεδα του $[Mg^{2+}]_i$. Τα ενδοκυττάρια Ca^{2+} και Mg^{2+} αλληλεπιδρούν καθώς οι συγκεκριμένες τους εξαρτώνται από τη σύνδεσή τους με τις ίδιες πρωτεΐνες, ώστε μεταβολές στην $[Ca^{2+}]_i$ προκαλούν μεταβολές στην $[Mg^{2+}]_i$. Επίσης μία αύξηση στην ενεργότητα της λιγότερο γνωστής Ca^{2+} - Mg^{2+} -ΑΤΡάσης, η δράση της οποίας αναστέλλεται σε καταστάσεις ινσουλινικής αντίστασης, μπορεί επίσης να έπαιξε ρόλο στην αύξηση της $[Mg^{2+}]_i$ μετά τη χορήγηση Ca^{2+} δεδομένου ότι η ενεργότητά της εξαρτάται και από την ποσότητα του συμπλέγματος Ca^{2+} /καλμοδουλίνη.^{42,43}

Η παρούσα μελέτη είχε κάποιους περιορισμούς που πρέπει να αναφερθούν. Συγκεκριμένα, τον πληθυσμό της μελέτης αποτέλεσαν ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 και υπέρταση επομένως είχαν κάποιου βαθμού αντίσταση στην ινσουλίνη και αυξημένο $[Ca^{2+}]_i$ και δεν είναι γνωστό το κατά πόσο μία ομάδα με μικρότερη αντίσταση στην ινσουλίνη θα απαντούσε με την ίδια αύξηση στην ΕΙ μετά τη χορήγηση συμπληρωματικού Ca^{2+} . Ακόμη πρέπει να σημειωθεί ότι η ομάδα ελέγχου δεν έλαβε placebo. Επίσης, η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία καθορίζει την υποδόρια σύνθεση της βιταμίνης D, επομένως τα αποτελέσματά μας δεν θα μπορούσαν να γενικευθούν σε άλλους πληθυσμούς οι οποίοι έχουν μικρότερη ηλιακή έκθεση και έχουν έλλειψη βιταμίνης D.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη αποκάλυπτε έναν πιθανό μηχανισμό ινσουλινικής αντίστασης σε υπέρτατικούς ασθενείς. Επιπλέον, υπογραμμίστηκε σημαντικός ρόλος και για το Mg^{2+} . Η συμπληρωματική χορήγηση Ca^{2+} είναι μία οικονομική παρέμβαση που μπορεί να βελτιώσει την ινσουλινική ευαισθησία και πιθανώς και το μεταβολισμό της γλυκόζης σε ασθενείς με υπέρταση και

ΣΔ τύπου 2. Περισσότερες μελέτες χρειάζονται για να φωτίσουν τη σημασία του Ca^{2+} στην παθοφυσιολογία της αντίστασης στην ινσουλίνη και να αποκαλύψουν μηχανισμούς ρύθμισης του Ca^{2+} που μπορεί να αποτελέσουν μελλοντικούς στόχους θεραπείας.

Ευχαριστίες

Ευχαριστούμε την Ελληνική Αντιυπερτασική Εταιρεία για την οικονομική υποστήριξη της μελέτης.

SUMMARY

Pikilidou M, Befani H, Sarafidis P, Koliakos G, Tziolas I, Zebekakis P, Kazakos K, Givovos I, Lasaridis A. Calcium supplementation, per os, increases insulin sensitivity in hypertensive patients with metabolic syndrome. Arterial Hypertension 2008; 17: 140-152.

To investigate the effect of oral calcium (Ca^{2+}) supplementation on insulin sensitivity (IS) measured by the euglycemic hyperinsulinemic clamp, intraplatelet cationic concentrations of Ca^{2+} and magnesium ($[Ca^{2+}]_i$ and $[Mg^{2+}]_i$) in subjects with type 2 diabetes and hypertension. This parallel, randomized controlled, single-blinded trial, consisted of thirty one patients who were allocated to receive either 1500mg of Ca^{2+} per os daily (n=15) or no treatment (n=16) for 8 weeks. At baseline and at the end of the 8-week period IS, $[Ca^{2+}]_i$ and $[Mg^{2+}]_i$ were evaluated. At the end of the study, subjects who received Ca^{2+} supplementation showed higher IS (ΔM -value $0.32 \pm 0.5 \text{ mmol} \times \text{min}^{-1} p < 0.05$) and $[Mg^{2+}]_i$ (from $476.6 \pm 61.7 \text{ nmol/L}$ to $736.1 \pm 92.7 \text{ nmol/L}$, $p < 0.001$) and lower $[Ca^{2+}]_i$ (125.0 ± 24.7 to $80.4 \pm 10.6 \text{ nmol} \times \text{L}^{-1}$, $p < 0.05$, mean \pm SEM). None of the above parameters were changed in the control group. Multivariate regression analysis demonstrated the change in $[Ca^{2+}]_i$ to be the strongest determinant of IS change ($\beta = -0.34$, $p < 0.05$). Oral Ca^{2+} supplementation improves IS in patients with type 2 diabetes and hypertension. These changes are likely to be mediated by changes in intracellular ionic environment of $[Ca^{2+}]_i$ and $[Mg^{2+}]_i$.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27: 1047-1053.
2. Pittas AG, Dawson-Hughes B, Li T, et al. Vitamin D and calcium intake in relation to type 2 diabetes in women. *Diabetes Care* 2006; 29: 650-656.

3. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 2017-2029.
4. Liu S, Song Y, Ford ES, Manson JE, Buring JE, Ridker PM. Dietary calcium, vitamin D, and the prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and older U.S. women. *Diabetes Care* 2005; 28: 2926-2932.
5. Pereira MA, Jacobs DR, Jr., Van Horn L, Slattery ML, Kartashov AI, Ludwig DS. Dairy consumption, obesity, and the insulin resistance syndrome in young adults: the CARDIA Study. *JAMA* 2002; 287: 2081-2089.
6. Henquin JC. *Cell Biology of insulin secretion*. Joslin's Diabetes Mellitus. Boston: Lippincott Williams and Wilkins, 2005: 84-90.
7. Barbagallo M, Dominguez LJ, Galioto A. et al. Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardio-metabolic syndrome X. *Mol Aspects Med* 2003; 24: 39-52.
8. Byyny RL, LoVerde M, Lloyd S, Mitchell W, Draznin B. Cytosolic calcium and insulin resistance in elderly patients with essential hypertension. *Am J Hypertens* 1992; 5: 459-464.
9. Draznin B, Sussman KE, Eckel RH, Kao M, Yost T, Sherman NA. Possible role of cytosolic free calcium concentrations in mediating insulin resistance of obesity and hyperinsulinemia. *J Clin Invest* 1988; 82: 1848-1852.
10. Resnick LM, Gupta RK, Bhargava KK, Gruenspan H, Alderman MH, Laragh JH. Cellular ions in hypertension, diabetes, and obesity. A nuclear magnetic resonance spectroscopic study. *Hypertension* 1991; 17: 951-957.
11. Hellman B, Berne C, Grapengiesser E, Grill V, Gylfe E, Lund PE. The cytoplasmic Ca²⁺ response to glucose as an indicator of impairment of the pancreatic beta-cell function. *Eur J Clin Invest* 1990; 20: S10-S17.
12. Pershadsingh HA, Shade DL, Delfert DM, McDonald JM. Chelation of intracellular calcium blocks insulin action in the adipocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 1025-1029.
13. Heaney RP. Does daily calcium supplementation reduce the risk of clinical fractures in elderly women? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007; 3: 18-19.
14. Matkovic V, Goel PK, Badenhop-Stevens NE, et al. Calcium supplementation and bone mineral density in females from childhood to young adulthood: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 175-188.
15. de B, I, Tinker LF, Connelly S, et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of incident diabetes in the Women's Health Initiative. *Diabetes Care* 2008; 31: 701-707.
16. Resnick LM. Alterations of dietary calcium intake as a therapeutic modality in essential hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 1986; 64: 803-807.
17. Turner ST, Sing CF. Erythrocyte sodium transport and the probability of having hypertension. *J Hypertens* 1996; 14: 829-837.
18. Sanchez M, de la Sierra A, Coca A, Poch E, Giner V, Urbano-Marquez A. Oral calcium supplementation reduces intraplatelet free calcium concentration and insulin resistance in essential hypertensive patients. *Hypertension* 1997; 29: 531-6.
19. Ποικιλίδου MI, Μπεφάνη ΧΔ, Σαραφίδης ΠΑ. Η σχέση της ανταλλαγής Na⁺/H⁺ με την 24ωρη αρτηριακή πίεση, την ευαισθησία στην ινσουλίνη και το ενδοκυττάριο ασβέστιο σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. *Αρτηριακή Υπέρταση* 2007; 16: 128-139.
20. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979; 237: 214-223.
21. Ferrannini E, Mari A. How to measure insulin sensitivity. *J Hypertens* 1998; 16: 895-906.
22. Yoshimura M, Oshima T, Matsuura H, et al. Assessment of platelet cytosolic concentration of free magnesium in healthy subjects. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1995; 125: 743-747.
23. Yoshimura M, Oshima T, Matsuura H, et al. Effect of the transmembrane gradient of magnesium and sodium on the regulation of cytosolic free magnesium concentration in human platelets. *Clin Sci* 1995; 89: 293-298.
24. Yoshimura M, Oshima T, Hiraga H, et al. Increased cytosolic free Mg²⁺ and Ca²⁺ in platelets of patients with vasospastic angina. *Am J Physiol* 1998; 274(2Pt): R548-R554.
25. Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260: 3440-3450.
26. Raju B, Murphy E, Levy LA, Hall RD, London RE. A fluorescent indicator for measuring cytosolic free magnesium. *Am J Physiol - Cell Physiology* 1989; 256: 540-548.
27. Karcher RE, Ingram RL, Kiechle FL, Sykes E. Comparison of the HemoCue beta-glucose photometer and reflotron for open heart surgery. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 130-134.
28. Vickers AJ, Altman DG. Statistics notes: Analysing controlled trials with baseline and follow up measurements. *BMJ* 2001; 323: 1123-1124.
29. Barr SI, McCarron DA, Heaney RP, et al. Effects of increased consumption of fluid milk on energy and nutrient intake, body weight, and cardiovascular risk factors in healthy older adults. *J Am Diet Assoc* 2000; 100: 810-817.
30. Zemel MB, Thompson W, Milstead A, Morris K, Campbell P. Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. *Obes Res* 2004; 12: 582-590.
31. Resnick L. The cellular ionic basis of hypertension and allied clinical conditions. *Prog Cardiovasc Dis* 1999; 42: 1-22.
32. Barbagallo M, Dominguez LJ, Licata G, Resnick LM. Effects of aging on serum ionized and cytosolic free calcium: relation to hypertension and diabetes. *Hypertension* 1999; 34: 902-906.
33. Erne P, Burgisser E, Bolli P, Ji BH, Buhler FR. Free calcium concentration in platelets closely relates to blood pressure in normal and essentially hypertensive subjects. *Hypertension* 1984; 6: 166-169.
34. Draznin B, Lewis D, Houlder N, et al. Mechanism of in-

- sulin resistance induced by sustained levels of cytosolic free calcium in rat adipocytes. *Endocrinology* 1989; 125: 2341-2349.
35. *Zemel MB, Kim JH, Woychik RP, et al.* Agouti regulation of intracellular calcium: role in the insulin resistance of viable yellow mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4733-4737.
36. *Bowen J, Noakes M, Clifton PM.* Effect of calcium and dairy foods in high protein, energy-restricted diets on weight loss and metabolic parameters in overweight adults. *Int J Obes* 2005; 29: 957-965.
37. *Thompson WG, Rostad HN, Janzow DJ, Slezak JM, Morris KL, Zemel MB.* Effect of energy-reduced diets high in dairy products and fiber on weight loss in obese adults. *Obes Res* 2005; 13: 1344-1353.
38. *Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Kumar R.* Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)2D3 receptor and calbindin D28k in human and rat pancreas. *Am J Physiol* 1994; 267: E356-E360.
39. *Pittas AG, Harris SS, Stark PC, Dawson-Hughes B.* The effects of calcium and vitamin D supplementation on blood glucose and markers of inflammation in nondiabetic adults. *Diabetes Care* 2007; 30: 980-986.
40. *Lawlor DA, Ebrahim S, Timpson N, Davey Smith G.* Avoiding milk is associated with a reduced risk of insulin resistance and the metabolic syndrome: findings from the British Women's Heart and Health Study. *Diabetic Medicine* 2005; 22: 808-811.
41. *Resnick LM.* Hypertension and abnormal glucose homeostasis. Possible role of divalent ion metabolism. *Am J Med* 1989; 87: 17S-22S.
42. *Resnick LM.* Cellular ions in hypertension, insulin resistance, obesity, and diabetes: a unifying theme. *J Am Soc Nephrol* 1992; 3: 78-85.
43. *Takaya J, Higashino H, Kobayashi Y.* Intracellular magnesium and insulin resistance. *Magnes Res* 2004; 17: 126-136.