

## ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

# Η συμβολή των νεότερων βιοδεικτών στην πρόληψη και στην αντιμετώπιση του διαβητικού έλκους

Τα έλκη διαβητικού ποδιού είναι μια από τις βασικές χρόνιες σοβαρές επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη. Τα έλκη διαβητικού ποδιού δεν ακολουθούν τη φυσιολογική διαδικασία της επούλωσης. Στην καθ' ημέρα κλινική πράξη χρησιμοποιούνται κλινικά κριτήρια για τη διαστρωμάτωση του κινδύνου και την πρόληψη των ελκών στα άτομα με διαβήτη. Η χρήση νέων βιοδεικτών μπορεί να συμβάλλει στην πρόληψη των ελκών με επακόλουθη μείωση στις νοσηλείες, στους ακρωτηριασμούς, στην αναπηρία, στο κόστος και στη θνησιμότητα. Εκτός από τους φλεγμονώδεις βιοδείκτες που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα και χρησιμοποιούνται, όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και η προκαλσιτονίνη, υπάρχουν και άλλα πιθανά βιομόρια, όπως η πεντραξίνη 3, οι ιντερλευκίνες και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου α. Πρόσφατες εξελίξεις στη μοριακή βιολογία, στη γονιδιωματική, στη μεταγραφωμική, στην πρωτεομική, στη μεταβολομική και στη μικροβιωματική έχουν οδηγήσει στον εντοπισμό βιομορίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες για τη διαστρωμάτωση κινδύνου του διαβητικού έλκους και μελλοντικά να γενικευτεί η χρήση τους στην κλινική πράξη.

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι μια χρόνια νόσος που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία και διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών.<sup>1</sup> Ο ΣΔ οφείλεται στη μειωμένη έκκριση ή στη μειωμένη δράση της ινσουλίνης ή σε συνδυασμό και των δύο, με αποτέλεσμα την απόλυτη ή τη σχετική έλλειψη ινσουλίνης.<sup>1</sup> Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) εκτιμά ότι 422 εκατομμύρια άνθρωποι σε όλο τον πλανήτη (1 στους 11 ενήλικες) πάσχουν από ΣΔ. Ο αριθμός των ατόμων που ζουν με ΣΔ αναμένεται να προσεγγίσει τα 700 εκατομμύρια μέχρι το 2045.<sup>2</sup> Ο ΣΔ «είναι ήδη μια μεγάλη επιδημία, με τέτοια

δυναμική που ο αριθμός των ατόμων οι οποίοι πάσχουν από αυτόν τετραπλασιάστηκε τα τελευταία 30 έτη» επισημαίνει ο ΠΟΥ. Η χρόνια αυτή νόσος εισήχθη στην κορυφαία λίστα με τις 10 σημαντικές αιτίες θανάτου, παρουσιάζοντας θεαματική αύξηση (70%) από το 2000. Τα φάρμακα που αφορούν στη θεραπεία του ΣΔ μπορούν να ρυθμίσουν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, αλλά δεν είναι ικανά να θεραπεύσουν πλήρως τη νόσο.<sup>2</sup> Ο ΣΔ δεν αυξάνει μόνο την πιθανότητα πρόωρου θανάτου, αλλά ενδέχεται να προκαλέσει πολλές επιπλοκές, όπως αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, τύφλωση, έμφραγμα μυοκαρδίου, νεφρική ανεπάρκεια και έλκη των άκρων.<sup>3</sup> Ο κίνδυνος ανάπτυξης έλκους εκτιμάται στο 15–25%, δηλαδή 1 στους 4 ασθενείς με ΣΔ θα εμφανίσουν

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2023, 40(6):754–764  
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2023, 40(6):754–764

Ι.Α. Αναστασίου,  
Κ. Τεντολούρης,  
Ι. Ελευθεριάδου,  
Ο. Κώστα,  
Α. Κοντογιαννάτου,  
Α. Κατσαούνη,  
Α. Κουλουρή,  
Χ. Σιαφαρίκας

1η Προπαιδευτική Παθολογική  
Κλινική και Ειδική Νοσολογία, Γενικό  
Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό», Ιατρική  
Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

The contribution of new  
biomarkers in the prevention  
and treatment of diabetic ulcer

Abstract at the end of the article

### Λέξεις ευρετηρίου

Βιοδείκτες  
Βιομόρια  
Γονιδιωματική  
Έλκος διαβητικού ποδιού  
Μεταβολομική και μικροβιωματική  
Μεταγραφωμική  
Πρωτεομική  
Σακχαρώδης διαβήτης  
C-αντιδρώσα πρωτεΐνη

Υποβλήθηκε 16.12.2022

Εγκρίθηκε 31.12.2022

έλκος κατά τη διάρκεια της ζωής τους.<sup>4</sup> Οι επιπλοκές του «διαβητικού ποδιού» εμφανίζονται πιο συχνά στους άνδρες ηλικίας >60 ετών.<sup>4</sup> Τα έλκη στα κάτω άκρα αυξήθηκαν από 20,7 σε 33,1 ανά 1.000 άτομα ( $p < 0,0001$ ) κατά το χρονικό διάστημα 2003–2017.<sup>5</sup> Ωστόσο, ο επιπολασμός του διαβητικού ποδιού ποικίλλει σε διάφορες χώρες.<sup>4</sup> Δεδομένου ότι ο ΣΔ σχετίζεται με μακροχρόνιες μικρο- και μακροαγγειοπαθητικές επιπλοκές είναι απαραίτητος ο έγκαιρος εντοπισμός των επιπλοκών αυτών.<sup>6</sup> Εάν η διαστρωμάτωση κινδύνου του έλκους μπορεί να επιτευχθεί νωρίτερα σε ασθενείς με ΣΔ, το ποσοστό νοσηλείας, αναπηρίας και θνησιμότητας θα μειωθεί σημαντικά.

Οι βιοδείκτες έχουν μεγάλη σημασία στην έγκαιρη κλινική διάγνωση της νόσου, στην πρόληψη και στην πρόβλεψη της εξέλιξής της. Οι βιοδείκτες κατέχουν επίσης σημαντικό ρόλο στην ανακάλυψη και στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών φαρμακευτικών προϊόντων ή στην αξιολόγηση των ήδη υπαρχόντων θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Πρόσφατες εξελίξεις στη μοριακή βιολογία, στη γονιδιωματική, στη μεταγραφωμική, στην πρωτεομική, στη μεταβολομική και στη μικροβιωματική έχουν οδηγήσει στον εντοπισμό περισσότερων βιοδεικτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί υποψήφιοι βιοδείκτες σε κλινικές εφαρμογές.<sup>7</sup> Η εξέλιξη του έλκους μπορεί να προβλεφθεί από βιομόρια που σχετίζονται με την παθογένεια του έλκους. Για την εύρεση αξιόπιστων βιοδεικτών είναι σημαντικό να συσχετιστούν ποσοτικά μετρήσιμα μόρια και να γίνει σύνδεση με κλινικά αποτελέσματα, ώστε οι βιοδείκτες να έχουν πρακτική αξία στην κλινική πράξη. Σε αυτή την ανασκόπηση θα επικεντρωθούμε στους νέους πιθανούς βιοδείκτες για την πρόληψη, την έγκαιρη διάγνωση και την αντιμετώπιση του διαβητικού έλκους, χρησιμοποιώντας τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα.<sup>7</sup>

## 2. ΣΤΑΔΙΑ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ

Η επούλωση είναι ένα συγχρονισμένο δυναμικό γεγονός που περιλαμβάνει τέσσερις διαφορετικές και εν μέρει αλληλεπικαλυπτόμενες φάσεις: την αιμόσταση, τη φλεγμονώδη φάση, την παραγωγική φάση και τη φάση αναδιαμόρφωσης.<sup>8,9</sup> Η αιμόσταση αρχίζει αμέσως μετά τον τραυματισμό του δέρματος. Αρχικά, εμφανίζεται τοπική αγγειακή συστολή, ενώ σχηματίζεται θρόμβος ινώδους μαζί με την προσωρινή εξωκυττάρια μήτρα.<sup>9</sup> Στη συνέχεια, τα φλεγμονώδη κύτταρα εισέρχονται στο σημείο του τραύματος και εκκρίνουν ένζυμα και ουσίες που έχουν ως αποτέλεσμα τα κλασικά χαρακτηριστικά της φλεγμονής: πόνο, ερυθρότητα, αυξημένη θερμοκρασία και οίδημα.<sup>10</sup> Τα ουδετερόφιλα καθαίρουν την περιοχή του τραύματος από εισβάλλοντα βακτήρια και κυτταρικά υπολείμματα

και απελευθερώνουν πρωτεολυτικά ένζυμα.<sup>11</sup> Καθώς η φλεγμονή συνεχίζεται, τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται γρήγορα σε ώριμα μακροφάγα και εισέρχονται στην πληγή.<sup>12,13</sup> Τα μακροφάγα διαδραματίζουν πολλαπλούς ρόλους στην επούλωση του τραύματος. Ενεργοποιημένα ή προφλεγμονώδη μακροφάγα (μακροφάγα M1) κατά την πρώιμη φλεγμονώδη φάση καθαρίζουν την πληγή από βακτήρια, ξένα υπολείμματα και νεκρά κύτταρα, ενώ τα αντιφλεγμονώδη μακροφάγα (μακροφάγα M2) εμφανίζονται αργότερα και εκφράζουν μια ποικιλία αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών, πρωτεάσες και αναστολείς πρωτεασών, καθώς και αυξητικούς παράγοντες που προάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Τα T-λεμφοκύτταρα εισέρχονται στο σημείο του τραύματος στην όψιμη φλεγμονώδη φάση και φαίνεται να έχουν ρυθμιστική δραστηριότητα στην αναδιαμόρφωση ιστού.<sup>12,13</sup> Η αγγειογένεση συμβαίνει για να παρέχει οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα,<sup>14</sup> ενώ τα κερατινοκύτταρα μεταναστεύουν από τις άκρες του τραύματος και επιθηλιοποιούν το τραύμα. Κατά τη φάση αναδιαμόρφωσης η πυκνότητα των αιμοφόρων αγγείων επιστρέφει στο φυσιολογικό, ενώ η ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης νέου κολλαγόνου και της αποδόμησης του κολλαγόνου εξισορροπείται κυρίως από τις μεταλλοπρωτεϊνάσες (matrix metalloproteinases, MMPs).<sup>15</sup>

## 3. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΔΙΑΒΗΤΙΚΩΝ ΕΛΚΩΝ

Η επούλωση των ελκών συνιστά μια περίπλοκη δυναμική διαδικασία που αρχίζει όταν διαταράσσεται η ακεραιότητα του ιστού και απαιτεί στενή συνεργασία και αλληλεπίδραση πολλών κυττάρων, αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών, πρωτεασών και εξωκυττάρων συστατικών.<sup>16</sup> Στα διαβητικά έλκη, η διαδικασία της επούλωσης διακόπτεται και καθυστερεί σε όλες τις φάσεις αυτής.<sup>8</sup> Ο κακός γλυκαιμικός έλεγχος, η χρόνια φλεγμονή, η καθυστερημένη απάντηση του ανοσοποιητικού, η μειωμένη αντίσταση στις λοιμώξεις, οι μικρο- και οι μακροαγγειακές επιπλοκές, η μειωμένη αγγειογένεση και η ελαττωμένη ενεργοποίηση των νευροπεπτιδίων συνιστούν γνωστούς παράγοντες κινδύνου που ευθύνονται για τη μειονεκτική επούλωση των ελκών σε ασθενείς με ΣΔ.<sup>8</sup> Παρά τη μεγάλη ερευνητική προσπάθεια για την καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας του διαβητικού έλκους τα τελευταία έτη, κενά γνώσης συνεχίζουν να υφίστανται, ενώ οι υπάρχουσες θεραπείες έχουν υψηλά ποσοστά αποτυχίας και απαιτούν επαναλαμβανόμενες εφαρμογές ή παρατεταμένη νοσηλεία.<sup>17</sup> Υπάρχει λοιπόν επιτακτική ανάγκη για περαιτέρω κατανόηση των παθολογικών μηχανισμών της επούλωσης των διαβητικών ελκών με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων θεραπειών για την αντιμετώπισή τους.

#### 4.1. Φλεγμονώδεις βιοδείκτες

**4.1.1. C-αντιδρώσα πρωτεΐνη.** Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, CRP) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη του ορού που παράγεται από το ήπαρ κατά τη διάρκεια οποιασδήποτε οξείας φλεγμονής.<sup>18,19</sup> Η CRP είναι ανιχνεύσιμη μέσα σε 6–10 ώρες μετά τη φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού και μπορεί να αυξηθεί μέχρι και 4.000 φορές, όταν η φλεγμονώδης απόκριση οξείας φάσης βρίσκεται στην κορύφωσή της. Επειδή εξαφανίζεται γρήγορα όταν υποχωρεί η φλεγμονή, η ανίχνευσή της είναι ενδεικτική της παρουσίας της φλεγμονώδους διαδικασίας. Είναι ο καλύτερος δείκτης της σοβαρότητας της παγκρεατίτιδας όταν μετράται 48 ώρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων. Η CRP έχει συνδεθεί με το μεταβολικό σύνδρομο, μια ομάδα σημείων που περιλαμβάνουν την κοιλιακή παχυσαρκία, την υπερτριγλυκεριδαιμία, τη χαμηλή HDL (καλή χοληστερόλη), την υπέρταση και τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης νηστείας στο αίμα.<sup>18,19</sup> Η μέτρηση της CRP μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως «εργαλείο» για την αξιολόγηση ασθενών με κίνδυνο ανάπτυξης καρδιακών παθήσεων.<sup>20</sup>

Ο ρόλος της CRP, ως ερευνητικού εργαλείου, έχει αποσαφηνιστεί πλήρως από την τρέχουσα ανάπτυξη των ερευνών σε διάφορες νόσους και συναφείς καταστάσεις.<sup>21</sup> Μελέτες έχουν δείξει ότι τα αυξημένα επίπεδα της CRP σχετίζονται με τον ΣΔ.<sup>20</sup> Σε μια μελέτη που διεξήχθη σε 282 ασθενείς με ΣΔ και οξύ διαβητικό έλκος και σε 175 ασθενείς με ΣΔ χωρίς έλκος, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι οι ασθενείς με οξύ διαβητικό έλκος είχαν σημαντική αύξηση της CRP, του ινωδογόνου και της ιντερλευκίνης 6 (interleukin 6, IL-6) σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς έλκος.<sup>22</sup> Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το οξύ διαβητικό έλκος και η σοβαρότητά του έχουν άμεση συσχέτιση με την αύξηση των φλεγμονωδών παραγόντων.<sup>22</sup> Σε μια άλλη αναδρομική μελέτη αναλύθηκαν τα επίπεδα της CRP σε 56 ασθενείς με διαβητικό έλκος και γάγγραινα πριν και μετά τον ακρωτηριασμό.<sup>23</sup> Η μελέτη έδειξε ότι 42% των ασθενών (24 άτομα) πέθαναν μέσα σε δύο εβδομάδες μετά την επέμβαση. Η αύξηση της θνητότητας σχετιζόταν με προεγχειρητική/μετεγχειρητική CRP  $\leq 1,5$  ( $p < 0,001$ ) και με την ηλικία (73 ετών και άνω,  $p < 0,001$ ). Επομένως οι δύο αυτοί παράγοντες, η CRP και η μεγάλη ηλικία, ήταν αξιόπιστοι προγνωστικοί παράγοντες στους ασθενείς με διαβητικό έλκος.<sup>23</sup> Σε μια άλλη μελέτη συμμετείχαν 93 ασθενείς με διαβητικό έλκος. Κύριο κριτήριο ένταξης στη μελέτη ήταν να μη λαμβάνουν αντιβιοτικά 6 μήνες πριν από τη μελέτη.<sup>24</sup> Οι συμμετέχοντες χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες. Ομάδα 1: ασθενείς με διαβητικό έλκος με λοίμωξη, ομάδα 2: ασθενείς με διαβητικό έλκος χωρίς λοίμωξη, και ομάδα 3: η ομάδα ελέγχου, ασθενείς με ΣΔ χωρίς έλκος. Η ανάλυση των δειγμάτων αίματος έδειξε ότι η CRP, ως μεμονωμένος βιοδείκτης, ήταν ο πλέον αποτελεσματικός δείκτης για τη

διάκριση των ελκών. Από την άποψη της ανοσολογίας, η αύξηση της CRP και της προκαλσιτονίνης (procalcitonin, PCT) θα μπορούσαν να είναι βιοδείκτες ανοσιακών αποκρίσεων που μεσολαβούνται από τα φλεγμονώδη μόρια, όπως τον παράγοντα νέκρωσης όγκου  $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) και τις IL-6, IL-1. Αντίθετα, οι μετρήσεις στα λευκοκύτταρα και στα ουδετερόφιλα δεν είχαν προγνωστικό αποτέλεσμα.<sup>24</sup> Τέλος, σε μια προοπτική μελέτη στην οποία έλαβαν μέρος 29 υγιή άτομα, 39 ασθενείς με ΣΔ χωρίς κίνδυνο εμφάνισης διαβητικού έλκους, 25 ασθενείς με ΣΔ και κίνδυνο εμφάνισης διαβητικού έλκους και 29 ασθενείς με διαβητικό έλκος, η παρακολούθηση των ασθενών με έλκος έγινε για 12 εβδομάδες.<sup>25</sup> Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι τα χαμηλά βασικά επίπεδα της CRP και της IL-1 $\alpha$  στον ορό συσχετίστηκαν με την πλήρη επούλωση του έλκους και ενδέχεται να χρησιμεύσουν ως προγνωστικοί δείκτες της επούλωσης του διαβητικού έλκους.<sup>25</sup> Συμπερασματικά, η CRP λειτουργεί ως ισχυρός προγνωστικός παράγοντας για τους ασθενείς με διαβητικό έλκος.

**4.1.2. Προκαλσιτονίνη.** Η PCT είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 116 αμινοξέα και συνιστά την προδρομική μορφή της καλσιτονίνης.<sup>26</sup> Παράγεται και εκκρίνεται από τον θυρεοειδή αδέντα και φυσιολογικά είναι μη ανιχνεύσιμη στο αίμα των υγιών ατόμων. Ως απάντηση σε μόλυνση και συστηματική φλεγμονή, αυξάνεται η έκκριση της PCT στην κυκλοφορία του αίματος και σε συνδυασμό με πρωτεολυτικά ένζυμα διασπάται προς την ενεργό ορμόνη, την καλσιτονίνη. Μετά την εμφάνιση λοίμωξης, η PCT αυξάνεται μέσα στις 3 πρώτες ώρες, κορυφώνεται μέσα σε 12–24 ώρες και έχει χρόνο ημίσειας ζωής 22–29 ώρες. Όταν η φλεγμονή προκαλείται από βακτηριακή λοίμωξη, η παρουσία της PCT είναι ιδιαίτερα έντονη, επειδή απελευθερώνεται επίσης από το ήπαρ, τους νεφρούς, τους πνεύμονες, τους μυς και τον λιπώδη ιστό, αυξάνοντας τα επίπεδα της PCT στον ορό σε σημαντικό βαθμό πάνω από το φυσιολογικό. Έτσι, η μέτρηση της PCT είναι χρήσιμη στη διαφοροποίηση των βακτηριακών λοιμώξεων από άλλες παθολογικές καταστάσεις και έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί πλέον ευαίσθητο και ειδικό δείκτη για τον σκοπό αυτόν, σε σχέση με τη CRP.<sup>26</sup>

Σε μια κλινική μελέτη οι ερευνητές κατέταξαν τους 185 ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2), σε τρεις ομάδες.<sup>27</sup> Ομάδα 1: ασθενείς με ΣΔ2 χωρίς διαβητικό έλκος, ομάδα 2: ασθενείς με ΣΔ2 και διαβητικό έλκος με λοίμωξη, και ομάδα 3: ασθενείς με ΣΔ2 και διαβητικό έλκος χωρίς λοίμωξη. Στη συνέχεια μέτρησαν τα επίπεδα της PCT στο αίμα των ασθενών. Φάνηκε ότι στους ασθενείς με ΣΔ2 και διαβητικό έλκος με λοίμωξη η PCT (0,99) είχε τη μεγαλύτερη τιμή στην καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (receiver operating characteristic curves, ROC), ακολουθούμενη από τη CRP (0,78), τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων

(white blood cell, WBC) (0,76) και τον ρυθμό καθίζησης των ερυθροκυττάρων (ΤΚΕ) (0,74). Όταν η κρίσιμη τιμή ήταν 0,5 ng/mL, η ευαισθησία της PCT ήταν 54% και η ειδικότητά της 100%, ενώ για τη διάγνωση του διαβητικού έλκους με λοίμωξη η θετική προγνωστική αξία ήταν 100% και η αρνητική προγνωστική αξία 12%. Επί πλέον, συγκρίνοντας το διαβητικό έλκος με λοίμωξη και χωρίς λοίμωξη, η διαφορά των επιπέδων της PCT μεταξύ τους ήταν έως και 7 φορές μεγαλύτερη από τους παραδοσιακούς δείκτες, δηλαδή τη CRP, τα WBC και την ΤΚΕ, και είχε μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα. Επομένως, η PCT μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως σημαντικός βιοδείκτης για τη διάγνωση του διαβητικού έλκους με λοίμωξη.<sup>27</sup> Σε μια άλλη κλινική μελέτη έλαβαν μέρος 15 ασθενείς με ΣΔ και έλκος με λοίμωξη και 15 ασθενείς με ΣΔ και έλκος χωρίς λοίμωξη και μετρήθηκαν οι δείκτες φλεγμονής στο αίμα τους.<sup>28</sup> Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα της PCT ( $p < 0,00001$ ) και της CRP ( $p = 0,0009$ ) στην ομάδα του έλκους ήταν σημαντικά υψηλότερα από τα επίπεδα της ομάδας χωρίς το έλκος, ενώ τα επίπεδα ΤΚΕ και WBC ήταν επίσης υψηλότερα, αλλά με μικρή στατιστική σημαντικότητα ( $p = 0,4661$  και  $p = 0,0095$ , αντίστοιχα). Συνεπώς, από τα αποτελέσματα των μετρήσεων φάνηκε ότι η PCT μπορεί να αποτελεί βασικό δείκτη για τη διάγνωση ασθενών με διαβητικό έλκος με λοίμωξη. Σε μια μελέτη οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η PCT είναι ικανή για τη διάγνωση διαβητικού έλκους με και χωρίς λοίμωξη και τη διάκριση μεταξύ λοιμώξεων μαλακών μορίων και οστεομυελίτιδας.<sup>26</sup> Σε μια άλλη μελέτη όπου έλαβαν μέρος 38 ασθενείς με διαβητικό έλκος με λοίμωξη, 38 ασθενείς με διαβητικό έλκος χωρίς λοίμωξη και 43 ασθενείς με ΣΔ χωρίς έλκος υπήρξε σημαντική διαφορά στα αποτελέσματα συγκριτικά με τις παραπάνω μελέτες.<sup>29</sup> Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης έδειξαν ότι τα επίπεδα των WBC, CRP, IL-6, ΤΚΕ και ινωδογόνου των ασθενών με λοίμωξη ήταν σημαντικά υψηλότερα από εκείνα των ασθενών χωρίς λοίμωξη ( $p < 0,01$ ). Κατά την κατάταξη του έλκους με λοίμωξη και χωρίς, η CRP ορού είχε την υψηλότερη τιμή ROC (0,998) ( $p < 0,001$ ), ενώ η PCT δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά. Σύμφωνα με αποτελέσματα της μελέτης αυτής, η IL-6 ορού και το ινωδογόνο θεωρούνται ως δύο πιθανοί φλεγμονώδεις βιοδείκτες για την κατάταξη του έλκους με λοίμωξη.<sup>29</sup> Καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η PCT μπορεί πιθανότατα να χρησιμοποιηθεί ως ένας σημαντικός βιοδείκτης για τη διάγνωση της λοίμωξης στο διαβητικό έλκος.

**4.1.3. Πεντραξίνη 3.** Η πεντραξίνη 3 (pentraxin 3, PTX-3) είναι μια πρωτεΐνη οξείας φάσης που παράγεται ταχέως σε τοπικά σημεία φλεγμονής από μακροφάγα, ουδετερόφιλα, ενδοθηλιακά κύτταρα, δένδριτικά κύτταρα, ινοβλάστες και άλλους τύπους κυττάρων σε απόκριση στην IL-1 και στον TNF- $\alpha$ .<sup>30</sup> Η PTX-3 διαφέρει από τη CRP, η οποία παράγεται αποκλειστικά στο ήπαρ ως απόκριση στην IL-6 και θεωρείται

δείκτης συστημικής φλεγμονώδους απόκρισης.<sup>30</sup> Επομένως, τα επίπεδα της PTX-3 μπορεί να αντανακλούν πιο άμεσα την αγγειακή φλεγμονή. Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, άφθονη PTX-3 παράγεται στο αγγειακό τοίχωμα και δρα ως ενδοθηλιακός ρυθμιστής σε θρόμβωση και ισχαιμική αγγειακή νόσο. Ακόμα, συνδέεται με τον αγγειογενετικό αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών 2, αναστέλλοντας έτσι την αγγειογένεση.<sup>31</sup>

Μια κλινική μελέτη που διεξήχθη σε 60 ασθενείς με ΣΔ και έλκος με λοίμωξη, 45 ασθενείς με ΣΔ χωρίς έλκος και 45 υγιείς κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η PTX-3 είναι ένας έγκυρος δείκτης για τη διάγνωση της λοίμωξης.<sup>32</sup> Τα επίπεδα της PTX-3 στην ομάδα ελέγχου, στην ομάδα με το έλκος και στην ομάδα χωρίς έλκος ήταν 5,83 (3,41–20,00) ng/mL, 1,47 (0,61–15,13) ng/mL και 3,26 (0,67–20,00) ng/mL, αντίστοιχα. Οι ασθενείς με έλκος κατατάχθηκαν σε τρεις υποομάδες ανάλογα με τη σοβαρότητα της λοίμωξης: ήπια, μέτρια, σοβαρή. Σύμφωνα με τη μέτρηση των δειγμάτων αίματος, οι συγκεντρώσεις της PTX-3 στο πλάσμα συσχετίστηκαν αρνητικά με τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Επί πλέον, υπήρχαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα της CRP και της ΤΚΕ μεταξύ ασθενών με ήπια και μέτρια λοίμωξη και μεταξύ εκείνων της ήπιας και της σοβαρής λοίμωξης ( $p < 0,05$ ), ενώ δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ της μέτριας και της σοβαρής λοίμωξης.<sup>32</sup> Σε μια άλλη κλινική μελέτη οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η PTX-3 συσχετίστηκε θετικά με την παρουσία ΣΔ και τη γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη.<sup>33</sup> Η χρόνια υπεργλυκαιμία αύξησε τα επίπεδα του ορού της PTX-3, γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει ότι η PTX-3 ρυθμίζεται θετικά από τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα.<sup>33</sup> Ωστόσο, σύμφωνα με τα τρέχοντα δεδομένα των δύο αυτών μελετών,<sup>32,33</sup> η PTX-3 ως βιοδείκτης της αγγειακής φλεγμονής εξακολουθεί να είναι ανεπαρκής.

**4.1.4. Ιντερλευκίνες.** Οι ILs παράγονται από τα μονοκύτταρα του αίματος και τα μακροφάγα των ιστών. Οι ιντερλευκίνες είναι μια ομάδα κυτταροκινών κρίσιμης σημασίας για τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, τόσο για την έμφυτη όσο και για την προσαρμοστική ανοσία. Όταν ο οργανισμός μολυνθεί, οι ιντερλευκίνες εκκρίνονται στα κύτταρα-στόχους και συνδέονται με τα σήματα στην επιφάνεια που ενεργοποιούν τα κύτταρα-στόχους, αλλάζοντας τη συμπεριφορά των κυττάρων. Τα επίπεδα των ιντερλευκινών είναι αυξημένα σε ασθενείς με διαβητικό έλκος σε συνδυασμό με την αντίσταση στην ινσουλίνη και τη μη φυσιολογική επούλωση των ελκών.<sup>34,35</sup>

Σε μια μελέτη οι ερευνητές συμπεριέλαβαν 20 ασθενείς με οξύ διαβητικό έλκος, 21 ασθενείς με ΣΔ χωρίς έλκος και 21 υγιείς εθελοντές.<sup>36</sup> Η μέτρηση των επιπέδων της IL-18 είχε στατιστικά σημαντική αύξηση στους ασθενείς με οξύ διαβητικό έλκος σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς έλ-

κος και τα υγιή άτομα ( $p < 0,001$  και  $p = 0,020$ , αντίστοιχα). Ωστόσο, αυτά τα ευρήματα μέχρι στιγμής δεν έχουν δείξει αν η αύξηση της IL-18 ήταν η αιτία ή η συνέπεια του οξέος διαβητικού έλκους.<sup>36</sup> Συνεπώς, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να αποδειχθεί ο ρόλος της IL-18 στο διαβητικό έλκος.<sup>37</sup> Σε μια άλλη μελέτη τα επίπεδα της IL-6 σε ασθενείς με ΣΔ και έλκος ήταν υψηλότερα σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς έλκος ( $p < 0,01$ ).<sup>22</sup> Επίσης, σε μια μελέτη μετρήθηκαν τα επίπεδα των ILs κατά την επούλωση των πληγών σε διαβητικά ποντίκια.<sup>38</sup> Μεταξύ των IL-20, IL-22 και IL-24, μόνο η IL-22 φάνηκε ότι συμβάλλει στην επούλωση μέσω της επιθηλιοποίησης και του σχηματισμού νέου ιστού.<sup>38</sup>

**4.1.5. TNF- $\alpha$ .** Ο TNF- $\alpha$  είναι ένας από τους κύριους ρυθμιστές της φλεγμονής. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη σηματοδότησης των κυττάρων που αναγνωρίζεται ως βασικός παράγοντας στο δίκτυο των κυτταροκινών.<sup>39</sup> Ο TNF- $\alpha$ , ως ευέλικτος μεσολαβητής και ένα σημαντικό μέλος της οικογένειας TNF που παράγεται κυρίως από τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα T-κύτταρα, επηρεάζει πολλά βιολογικά μονοπάτια, περιλαμβανομένης της κυτταρικής/μοριακής διαδικασίας προσκόλλησης, της μετανάστευσης, της αγγειογένεσης και της απόπτωσης. Η κύρια λειτουργία του TNF- $\alpha$  εξασκείται στα μακροφάγα, επάγοντας την έκφραση άλλων κυτταροκινών και μορίων κυτταρικής προσκόλλησης. Επί πλέον, ο ρόλος του TNF- $\alpha$  στην επούλωση τραύματος φαίνεται και από τη σημαντική έκφρασή του στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα. Στον TNF- $\alpha$ , το  $\alpha$  έχει αναφερθεί ότι έχει έμμεση αγγειογενετική δράση, ανάλογα με τη σύνθεση δευτερογενών μεσολαβητών, π.χ. του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor, VEGF). Ωστόσο, είναι δύσκολο να κατανοηθεί ο διπλός ρόλος αγγειογένεσης (προ/αντι) του TNF- $\alpha$  υπό διαφορετικές συνθήκες. Συνολικά, εκτός από αρκετούς κακοήθεις όγκους, η απορρύθμιση του TNF- $\alpha$  έχει επίσης συνδεθεί με μια ποικιλία ανθρώπινων φλεγμονωδών νόσων.<sup>39</sup> Επίσης, ο TNF- $\alpha$  μπορεί να προκαλέσει αντίσταση στην ινσουλίνη, μειώνοντας τη σηματοδότηση της ινσουλίνης μέσω της προαγωγής της φωσφορυλίωσης της σερίνης του υποστρώματος 1 του υποδοχέα της ινσουλίνης.<sup>40</sup> Ο παράγοντας ενεργοποίησης B-κυττάρων (B cell-activating factor, BAFF), που περιλαμβάνεται επίσης στην οικογένεια TNF- $\alpha$ , προκαλεί δυσλειτουργία στα B-κύτταρα.<sup>40</sup>

Σε μια μελέτη έλαβαν μέρος 44 ασθενείς με ΣΔ και έλκος με λοίμωξη και 40 ασθενείς με ΣΔ και έλκος χωρίς λοίμωξη και μετρήθηκαν στο αίμα των ασθενών τα επίπεδα του BAFF και της CRP κατά τη διάρκεια της χρόνιας διαδικασίας της επούλωσης.<sup>41</sup> Από τις μετρήσεις φάνηκε ότι η ROC για τον BAFF (0,89, [95% ΔΕ: 0,73–1,0]) ήταν υψηλότερη από εκείνη της CRP (0,68, [95% ΔΕ: 0,61–0,76]). Το βέλτιστο διαγνωστικό επίπεδο για τον BAFF ήταν  $\geq 2,35$  pg/mL με ευαισθησία 62%

και ειδικότητα 85,7%. Επί πλέον, τα επίπεδα του BAFF είχαν σημαντική θετική συσχέτιση με τα επίπεδα της CRP, τα επίπεδα των κυτταροκινών της οικογένειας ιντερφερονών και τα επίπεδα των κυτταροκινών της οικογένειας IL-10 (όπως IL-19, IL-22 και IL-26), καθώς και αρνητική συσχέτιση με την οικογένεια της IL-6.<sup>41</sup>

## 4.2. Γονιδιωματικοί βιοδείκτες

**4.2.1. MicroRNA.** Τα MicroRNA (miRNAs), μη κωδικοποιητικά RNA, μήκους 18–22 νουκλεοτιδίων, ρυθμίζουν περίπου το ένα τρίτο του ανθρώπινου γονιδιώματος κατά το μεταμεταγραφικό επίπεδο. Τα miRNAs συμμετέχουν σχεδόν σε όλες τις βιολογικές διεργασίες του οργανισμού, όπως η ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση, αλλά κατέχουν και σημαντικό ρόλο στην παθογένεια πολλών νοσημάτων. Τα περισσότερα miRNAs εκφράζονται ανεξάρτητα. Λόγω διαφόρων μεταφορών από κύτταρα, όπως τα εξωσώματα, τα miRNAs που κυκλοφορούν μπορούν να βρίσκονται στο αίμα, στον σίελο, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, στα ούρα και αλλού. Ως δυνητικός μη επεμβατικός βιοδείκτης, τα κυκλοφορούντα miRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία όγκων, της δυσλιπιδαιμίας, του ΣΔ και των καρδιαγγειακών παθήσεων.<sup>42,43</sup> Επίσης, εκτός από την αντιπροσώπευση πιθανών βιοδεικτών, τα miRNAs μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως νέος θεραπευτικός δείκτης στις σύγχρονες κλινικές εφαρμογές.<sup>44</sup> Σε μια μελέτη, οι ερευνητές μέτρησαν τα επίπεδα του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα (hypoxia inducible factor, HIF)-1 $\alpha$ , του VEGF και του miR-217 σε ανθρώπους και πειραματόζωα.<sup>45</sup> Οι ομάδες της μελέτης ήταν ασθενείς με ΣΔ και έλκος, ασθενείς με ΣΔ χωρίς έλκος, και υγιείς μάρτυρες, καθώς και μοντέλα αρουραίων με διαβητικό έλκος που έλαβαν θεραπεία με αναστολείς miR-217 ή και HIF-1 $\alpha$  μικρό παρεμβαλλόμενο RNA (small interfering RNA, siRNA). Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι, σε σύγκριση με τους ασθενείς με ΣΔ και τους υγιείς μάρτυρες, τα επίπεδα του miR-217 στους ασθενείς με το έλκος ήταν αυξημένα, ενώ τα επίπεδα των HIF-1 $\alpha$  και VEGF μειώθηκαν (όλα  $p < 0,05$ ). Ο HIF-1 $\alpha$  είναι το γονίδιο στόχος του miR-217. Στους αρουραίους με έλκος που έλαβαν θεραπεία με αναστολείς miR-217 παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός επούλωσης του έλκους επιταχύνθηκε, οι φλεγμονώδεις παράγοντες (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  και IL-6) μειώθηκαν σημαντικά, καθώς και ο HIF-1 $\alpha$  και ο VEGF (όλα  $p < 0,05$ ) και, συνεπώς, υπήρξε και μείωση της επιφάνειας του έλκους. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αναστολή του miR-217 στους αρουραίους θα μπορούσε να τροποποιήσει το μονοπάτι HIF-1 $\alpha$ /VEGF και να επιταχύνει την αγγειογένεση και τη φλεγμονώδη κατάσταση του έλκους, προάγοντας αποτελεσματικά την επούλωσή του.<sup>45</sup> Αναδυόμενα στοιχεία από βιοψίες δέρματος ασθενών με έλκος διαβητικού ποδιού

έδειξαν ότι τα miRNA διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στην τροποποίηση της αγγειογένεσης, συλλογικά, και ανήκουν στην οικογένεια miR-23 που σχετίζεται με διάφορα είδη αγγειογενετικών παραγόντων, π.χ. του παράγοντα 1 που προέρχεται από τα στρωματικά κύτταρα (stromal cell derived factor 1α, SDF-1α).<sup>46</sup> Σε μια άλλη μελέτη όπου έλαβαν μέρος υγιείς μάρτυρες, ασθενείς με ΣΔ2, ασθενείς με ΣΔ2 και έλκος χωρίς λοίμωξη και ασθενείς με ΣΔ2 και έλκος με λοίμωξη οι ερευνητές μέτρησαν τον παράγοντα SDF-1α στο αίμα των συμμετεχόντων και έλαβαν και βιοψίες από τα έλκη.<sup>46</sup> Από τα αποτελέσματά τους φάνηκε ότι ο SDF-1α μειώθηκε σημαντικά. Επί πλέον, στις βιοψίες μελετήθηκαν οι εκφράσεις των miR-23a και miR-23b, οι οποίες έδειξαν μείωση, ενώ το miR-23c ήταν αυξημένο στην ομάδα ασθενών με ΣΔ2 και έλκος με λοίμωξη. Η ανάλυση συσχέτισης έδειξε ότι ο SDF-1α συσχετίστηκε σημαντικά αρνητικά με το miR-23c. Συνοπτικά, το miR-23c μπορεί να γίνει υποψήφιος αναστολέας αγγειογένεσης στοχεύοντας τον SDF-1α.<sup>46</sup> Σε μια ερευνητική μελέτη διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του miR-126 mRNA στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΣΔ μειώθηκε σημαντικά σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες ( $p < 0,001$ ).<sup>47</sup> Επί πλέον, η έκφρασή του σε ασθενείς με διαβητικό έλκος μειώθηκε περαιτέρω ( $p < 0,001$ ), υποδεικνύοντας ότι το miR-126 mRNA μπορεί να είναι ένας ελκυστικός βιοδείκτης.<sup>47</sup> Συνολικά, η οικογένεια των miR περιλαμβάνει πιθανούς βιοδείκτες για τη θεραπεία του διαβητικού ποδιού.

**4.2.2. Πολυμορφισμοί γονιδίων.** Η μελέτη των γονιδιακών πολυμορφισμών θα μπορούσε να δώσει μια πρώτη ένδειξη για την ανάπτυξη πιθανής νόσου και να συνδράμει στην κατανόηση της γενετικής του πληθυσμού. Η γενετική ανάλυση μπορεί να καθορίσει φλεγμονώδεις και επολυτικές αποκρίσεις. Μια από τις μείζονες επιπλοκές του ΣΔ που σχετίζονται με το έλκος είναι η περιφερική νευροπάθεια και η περιφερική αγγειακή νόσος. Οι ασθενείς με διαβητικό έλκος έχουν ένα ευρύ φάσμα μεταλλάξεων σε πολυμορφισμούς γονιδίων.

Σε μια μελέτη, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ο πολυμορφισμός του γονιδίου της πρωτεΐνης του θερμικού shock (heat shock protein, HSP)-70 και, συγκεκριμένα, ο γονότυπος *HSPA1B* συσχετίστηκε με τη σοβαρότητα του διαβητικού έλκους.<sup>48</sup> Σε μια προοπτική μελέτη διερευνήθηκε ο πιθανός ρόλος του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (single nucleotide polymorphism, SNP) C2437T (Met493Thr) της HSP-70.<sup>49</sup> Οι ομάδες της μελέτης ήταν ασθενείς με ΣΔ και έλκος, ασθενείς με ΣΔ και υγιείς εθελοντές ( $n=50$  σε κάθε ομάδα). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στους ασθενείς με έλκος οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *hspHSP70* είχαν σημαντική θετική συσχέτιση με το αλληλόμορφο T.<sup>49</sup> Σε μια άλλη μελέτη παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού FokI του υποδοχέα της βιταμίνης D και

των διαβητικών ελκών στον πληθυσμό του Ιράν.<sup>50</sup> Επίσης, σε άλλη μελέτη οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι πολυμορφισμοί στο γονίδιο του VEGF συσχετίστηκαν με το διαβητικό έλκος.<sup>51</sup> Η χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης του αλληλόμορφου A σε ασθενείς με διαβητικό έλκος είχε προστατευτική δράση, η οποία μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη αγγειογένεση σε ασθενείς που φέρουν το συγκεκριμένο αλληλόμορφο.<sup>51</sup> Τα τελευταία έτη, τα δεδομένα από τις μελέτες έχουν δείξει ότι η αύξηση της υποξίας προκαλεί μη φυσιολογικές κυτταρικές αποκρίσεις και είναι ένας σημαντικός παράγοντας καθυστέρησης κατά τη διαδικασία της επούλωσης του διαβητικού έλκους.<sup>52</sup> Ο HIF-1 (ένα ετεροδιμερές των HIF-1α και HIF-1β) είναι ο κύριος ρυθμιστής της ομοιόστασης του οξυγόνου. Ο HIF-1 παρεμβαίνει στην προσαρμοστική κυτταρική απάντηση στην υποξία με ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης που σχετίζεται με τον μεταβολισμό, την αγγειογένεση, τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την κυτταρική επιβίωση.<sup>53,54</sup> Η υπεργλυκαιμία επάγει την ασταθή κατάσταση του HIF-1α και καταστέλλει τη λειτουργία του. Η αύξηση της έκφρασης του HIF-1α επιταχύνει την επούλωση ελκών σε πειραματόζωα μέσω της προαγωγής της αγγειογένεσης.<sup>55,56</sup> Επομένως, η σηματοδότηση του HIF-1 είναι ένας πιθανός στόχος για τη θεραπεία του διαβητικού έλκους. Τα μονοπάτια που σχετίζονται με τη ρύθμιση του HIF-1α μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό της επούλωσης των διαβητικών ελκών. Η περαιτέρω κατανόηση των εν λόγω μονοπατιών θα αποτελέσει τη βάση για ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων στην αντιμετώπιση του διαβητικού έλκους.

### 4.3. Πρωτεομικοί βιοδείκτες

Τις προηγούμενες δεκαετίες, με την εντυπωσιακή ανάπτυξη της νέας πρωτεομικής τεχνολογίας έχει σημειωθεί ουσιαστική πρόοδος στο αρχικό στάδιο διάγνωσης της νόσου και της ακριβούς πρόγνωσης. Η τυποποίηση όμως των πρωτεομικών προσεγγίσεων παραμένει ακόμη δύσκολη και η ετερογενής ιδιότητα των πρωτεϊνών σε διάφορους ιστούς οδηγεί σε ατέλειες για την εύρεση του ολικού πρωτεώματος. Ωστόσο, οι εξελίξεις αυτού του τεχνολογικού τομέα θα επεκτείνουν τη γνώση της βιολογίας των ασθενειών σε μεγάλη κλίμακα, ανακαλύπτοντας νέους βιοδείκτες ή πάνελ βιοδεικτών, για την πλέον αποτελεσματική και έγκαιρη διάγνωση, για την παρακολούθηση της νόσου και για τη μετάβαση προς την εξατομικευμένη θεραπεία. Νεότερες μελέτες έδειξαν ότι ο προερχόμενος από τα ουδετερόφιλα ιστικός παράγοντας συνεισφέρει σημαντικά στις θρομβωτικές διαδικασίες.<sup>57</sup> Τα ουδετερόφιλα είναι ικανά να παράγουν ιστικό παράγοντα κάτω από συγκεκριμένες φλεγμονώδεις συνθήκες. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο ενεργοποιείται ο ιστικός παράγοντας των ουδετεροφίλων δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Η

απελευθέρωση των εξωκυττάρων ουδετεροφιλικών δικτύων χρωματίνης (neutrophil extracellular traps, NET) συνιστά έναν μηχανισμό με τον οποίο τα ουδετερόφιλα μπορούν να φονεύουν παθογόνα χωρίς φαγοκυττάρωση. Τα NET αποτελούνται από ινίδια χρωματίνης τα οποία σχηματίζουν ένα δίκτυο από DNA, ιστόνες και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες των ουδετεροφίλων οι οποίες έχουν αντιβακτηριακή δράση. Έχει προταθεί ότι τα ουδετερόφιλα μπορούν κάτω από ορισμένες συνθήκες να απελευθερώνουν NET, τα οποία εκφράζουν στην επιφάνειά τους λειτουργικό ιστικό παράγοντα. Επί πλέον, τα NET εγκλωβίζουν αιμοπετάλια, τα οποία ενεργοποιούν και τα οποία, με τη σειρά τους, προκαλούν την απελευθέρωση επί πλέον NET από άλλα ουδετερόφιλα και με αυτόν τον τρόπο αρχίζει η διαδικασία της NETosis. Η NETosis είναι μια φυσική διαδικασία άμυνας. Το σύνολο των φαινομένων αυτών φαίνεται ότι αποτελεί έναν μηχανισμό με τον οποίο τα ουδετερόφιλα συνεισφέρουν σε θρομβωτικές διαδικασίες.<sup>57</sup> Τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης βρέθηκαν να προκαλούν NETosis και τα NETs εμπλέκονται επίσης στην παθογένεση του ΣΔ. Τα NET περιγράφονται ως οδηγιοί διαβητικών επιπλοκών, περιλαμβανομένων των διαβητικών ελκών και της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας.<sup>58</sup> Σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές, τα επίπεδα των κυκλοφορούντων μονοπυρήνων, το DNA και η ελασάση των ουδετεροφίλων αυξήθηκαν σημαντικά σε ασθενείς με ΣΔ2.<sup>57,59</sup> Χρησιμοποιώντας την πρωτεομική ανάλυση, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι τα στοιχεία NET (ελασάση, ουδετεροφιλική ζελατινάση λιποκαλίνη, πρωτεάση 3, και πεπτιδυλαργινινο-απιδνάση 4 [reptidyl arginine deiminase 4, PAD4]) αυξήθηκαν στα μη επουλωμένα διαβητικά έλκη σε ανθρώπους και ποντικούς.<sup>60</sup> Η PAD4 προάγει τον σχηματισμό των ουδετεροφίλων. Στο δέρμα διαβητικών ποντικών η δραστηριότητα του PAD4 αυξήθηκε και εμφανίστηκε NETosis στο σημείο του έλκους. Η αναστολή του PAD4 σε διαβητικούς ποντικούς μείωσε τον σχηματισμό των ουδετεροφίλων και επιτάχυνε την επούλωση των ελκών. Συμπερασματικά, η NETosis επιβραδύνει την επούλωση του διαβητικών ελκών. Επί πλέον, σε μια άλλη μελέτη οι επιστήμονες επέλεξαν 75 ασθενείς με ΣΔ και έλκος και τους χώρισαν σε δύο ομάδες. Ομάδα 1: μη επούλωσης και ομάδα 2: ταχείας επούλωσης.<sup>61</sup> Η πρωτεομική ανάλυση έδειξε ότι υπήρχαν διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών μεταξύ μη επούλωσης και ταχείας επούλωσης, οι οποίες συμμετέχουν στα μονοπάτια της επιθηλιακής διαφοροποίησης, της αναστολής πρωτεάσης, της απόπτωσης, της ενεργοποίησης ενδοπεπτιδάσης της σερίνης, της πήξης και της ρύθμισης της ανοσιακής απάντησης.<sup>61</sup> Σε μια μελέτη που διεξήχθη σε ποντικούς και ανθρώπους με ΣΔ και έλκος οι επιστήμονες μέτρησαν τα επίπεδα των MMP-8 και MMP-9<sup>62</sup> και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η MMP-9 έχει επιβλαβή ρόλο στην επούλωση των διαβητικών ελκών, ενώ η MMP-8 έχει ευεργετικό ρόλο.<sup>62</sup>

#### 4.4. Μεταβολομικοί βιοδείκτες

Η μεταβολομική είναι μια πολυδιάστατη προσέγγιση του προφίλ των μεταβολιτών των βιολογικών δειγμάτων, όπως σωματικών υγρών, κυττάρων και ιστών. Η μέθοδος έχει σημειώσει ταχεία τεχνολογική ανάπτυξη κατά τις δύο τελευταίες δεκαετίες. Η εφαρμογή της έχει οδηγήσει στην εύρεση προγνωστικών βιοδεικτών για την αποσαφήνιση κυρίως των παθοφυσιολογικών μηχανισμών παθήσεων που σχετίζονται με μεταβολική δυσλειτουργία.<sup>63,64</sup> Ορός, πλάσμα και ούρα είναι τα πλέον συχνά χρησιμοποιούμενα δείγματα για μεταβολομικές αναλύσεις, στα οποία μπορούν να ανιχνευτούν και να ποσοτικοποιηθούν οι ενδογενείς μεταβολίτες του συστημικού μεταβολισμού. Η μεταβολομική του ορού ή του πλάσματος αξιολογεί τους κυκλοφορούντες μεταβολίτες, ενώ η μεταβολομική των ούρων χρησιμοποιείται για την ανακάλυψη μη επεμβατικών βιοδεικτών μέσω μεταβολικών τελικών προϊόντων που απεκκρίνονται από τους νεφρούς. Υπάρχουν ερευνητικά δεδομένα που δείχνουν ότι τα άτομα με ΣΔ1 και ΣΔ2 γενικά εμφανίζουν μεταβολές στους μεταβολίτες, όπως τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη, τα αμινοξέα και τα λιπίδια. Επίσης, οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες έχει φανεί ότι διαθέτουν σημαντικές προοπτικές και προγνωστικές ικανότητες και για τον προδιαβήτη. Επομένως, οι τεχνικές της μεταβολομικής μπορούν να εφαρμοστούν για τον εντοπισμό αυτών των εσωτερικών μεταβολιτών και των βιοδεικτών.<sup>65</sup> Επί πλέον, η μεταβολομική έχει χρησιμοποιηθεί για να συνδράμει στην κατανόηση του διαβητικού έλκους σε βιοχημικό επίπεδο. Τόσο το διαβητικό έλκος όσο και η διαβητική νεφρική νόσος είναι καταστάσεις που έχουν χαρακτηριστικά μικροαγγειακής δυσλειτουργίας. Μια μεταβολομική ανάλυση έγινε σε ούρα ασθενών με διαβητικό έλκος που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με υπερβαρικό οξυγόνο για 6 εβδομάδες.<sup>66</sup> Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι το υπερβαρικό οξυγόνο μπορεί να μειώσει τους βιοδείκτες της νεφρικής βλάβης, το οξειδωτικό stress και τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.<sup>66</sup> Σε άλλη μελέτη διενεργήθηκε στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση αίματος σε 57 ασθενείς με ΣΔ και έλκος, από τους οποίους οι 19 είχαν χρόνια έλκος και οι 38 είχαν επουλωμένα έλκη.<sup>67</sup> Στόχος της μελέτης ήταν η αξιολόγηση και η ταυτοποίηση συγκεκριμένων αμινοξέων που σχετίζονται με την επούλωση των ελκών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα στον ορό της αργινίνης, της ισολευκίνης και της λευκίνης στην ομάδα με τα επουλωμένα έλκη ήταν αξιοσημείωτα αυξημένα σε σύγκριση με εκείνα της ομάδας των ασθενών με χρόνια έλκη. Η αργινίνη είναι ένα βασικό αμινοξύ και συνιστά βασική μήτρα στη διαδικασία επούλωσης των ελκών.<sup>67</sup> Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η αργινίνη μπορεί να βελτιώσει την επούλωση των ελκών.<sup>67-69</sup> Η ισολευκίνη και η λευκίνη είναι αμινοξέα διακλαδισμένης

αλυσίδας που επιταχύνουν την πρωτεϊνοσύνθεση στους μύς.<sup>67</sup> Τα αμινοξέα που σχετίζονται με την επούλωση των διαβητικών ελκών δεν είναι τα ίδια με εκείνα που έχουν αναφερθεί στα κοινά τραύματα. Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαίωσαν την ανάγκη εκπόνησης έρευνας σε ευρεία κλίμακα σχετικά με την εφαρμογή των συγκεκριμένων αμινοξέων στη θεραπεία διαβητικών ελκών και για την καθιέρωσή τους ως δεικτών πρόγνωσης του έλκους.

#### 4.5. Μικροβιακοί βιοδείκτες

Ένας μεγάλος αριθμός βακτηρίων, ιών και μονοκύτταρων ευκαρυωτικών διαβιούν στο ανθρώπινο σώμα.<sup>70</sup> Οι μικροοργανισμοί που συμβιών με τον ξενιστή τους ονομάζονται μικροβίωμα. Περίπου 100 τρισεκατομμύρια μικροοργανισμοί (οι περισσότεροι από αυτούς βακτήρια, αλλά και ιοί, μύκητες και πρωτόζωα) υπάρχουν στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα.<sup>70</sup> Το μικροβίωμα πρέπει να θεωρείται ως ένα εικονικό όργανο του σώματος.<sup>70</sup> Αν και το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από περίπου 23.000 γονίδια, το μικροβίωμα κωδικοποιεί περισσότερα από 3 εκατομμύρια γονίδια που παράγουν χιλιάδες μεταβολίτες, οι οποίοι αντικαθιστούν πολλές από τις λειτουργίες του ξενιστή και κατά συνέπεια επηρεάζουν τη φυσική κατάσταση του ξενιστή, τον φαινότυπο και την υγεία.<sup>71,72</sup>

Έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες για τον ρόλο της μικροχλωρίδας του εντέρου στις μεταβολικές καταστάσεις, όπως ο ΣΔ.<sup>73-75</sup> Σε μια μελέτη, οι ερευνητές τόνισαν μια νέα σχέση μεταξύ της διατροφής, της φλεγμονώδους σηματοδότησης και του μικροβιώματος του εντέρου.<sup>76</sup> Μελέτες σε πειραματόζωα υποστηρίζουν την αιτιώδη σχέση μεταξύ του μικροβιώματος του εντέρου και της ανάπτυξης ΣΔ2, της αντίστασης στην ινσουλίνη και της παχυσαρκίας.<sup>77</sup> Για το διαβητικό έλκος, οι μελέτες του μικροβιώματος εστιάζονται κυρίως στην περιοχή του τραύματος.<sup>78</sup> Μια ποικιλία βακτηριακών αποικιών που εντοπίζονται σε διαβητικά έλκη διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόγνωση της λοίμωξης. Με τη βακτηριακή καλλιέργεια και την αξιοποίηση της μοριακής τεχνολογίας, στο έλκος μπορούν να ανιχνευτούν διάφορα αερόβια και αναερόβια βακτήρια.<sup>78</sup> Τα έλκη βραχύτερης πορείας φαίνεται να έχουν απλούστερο μικροβίωμα και αποικίζονται κυρίως από θετικά κατά Gram βακτήρια (*Staphylococcus* και *Streptococcus* spp), ενώ τα χρόνια έλκη ενδέχεται να εμφανίζουν λοιμώξεις με ένα περισσότερο περίπλοκο μικροβίωμα που περιλαμβάνει διάφορους τύπους αερόβιων βακτηρίων, περιλαμβανομένων των *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* spp κ.λπ., και αναερόβιων παθογόνων.<sup>79</sup> Το *Bacteroides fragilis* είναι το συχνότερο αναερόβιο βακτήριο στα διαβητικά έλκη με

λοίμωξη.<sup>80</sup> Έχει αναφερθεί ότι η αφθονία των αναερόβιων βακτηρίων είναι περιορισμένη και έχει μικρή επίδραση στην πρόοδο της λοίμωξης.<sup>81</sup> Στα επιφανειακά έλκη, το μικροβίωμά τους αποτελείται κυρίως από θετικά κατά Gram βακτήρια, περιλαμβανομένων των *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, β-αιμολυτικών στρεπτοκόκκων ή αρνητικών στην πηκτάση σταφυλοκόκκων. Ασθενείς με βαθύτερα έλκη πιθανόν να έχουν μολυνθεί από εντερόκοκκους, ψευδομονάδες ή αναερόβια βακτήρια.<sup>74</sup> Εκτός από τους μικροοργανισμούς στο σημείο του έλκους, οι εντερικοί μικροοργανισμοί σχετίζονται επίσης με το έλκος μέσω της ανάπτυξης ΣΔ, περιλαμβανομένου του ενεργειακού μεταβολισμού, της φλεγμονής, του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος και της εντερικής λειτουργίας του εντερικού φραγμού.<sup>82</sup> Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι αλλαγές στο μικροβίωμα του εντέρου μπορούν να προστατεύσουν τους ασθενείς με διαβητικό έλκος από την υπερανάπτυξη βακτηρίων, π.χ. *Clostridium difficile*.<sup>83</sup> Η μικροβιωματική ανάλυση και οι μελέτες συσχέτισής της έχουν προκαλέσει επανάσταση στις κλινικές έρευνες, παρέχοντας νέους βιοδείκτες για τη νόσο.<sup>84</sup> Η συνεχιζόμενη έρευνα στη μικροχλωρίδα του εντέρου και του γαστρεντερικού σωλήνα σε ασθενείς με ΣΔ και έλκος μπορεί να οδηγήσει στην κατανόηση του ρόλου της στο διαβητικό έλκος.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Λαμβάνοντας υπ' όψιν την αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης του ΣΔ και των επιπλοκών του παγκοσμίως, είναι απαραίτητο να διεξαχθούν μελέτες σχετικά με τους πιθανούς προγνωστικούς δείκτες για το διαβητικό έλκος. Τα τελευταία έτη έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της παθογένειας και της θεραπείας του διαβητικού έλκους. Οι βιοδείκτες, ως κλειδί της παθογένεσης των διαβητικών ελκών, μπορεί να είναι χρήσιμοι για την περαιτέρω κατανόηση του έλκους, βελτιώνοντας την πρώιμη κλινική διάγνωση, την πρόβλεψη εξέλιξης της νόσου και ακόμη την αξιολόγηση της θεραπείας του διαβητικού έλκους. Οι βιοχημικοί και οι μοριακοί στόχοι που αποκαλύπτονται από τις σύγχρονες προσεγγίσεις της βιοτεχνολογίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως νέοι πιθανοί βιοδείκτες για τα διαβητικά έλκη, βελτιώνοντας τη θεραπεία και αποτρέποντας έτσι τους ακρωτηριασμούς. Οι βιοδείκτες αυτοί χρήζουν συνεχών ερευνών από τον εργαστηριακό πάγκο μέχρι το έλκος του ασθενούς. Ουσιαστικά, η μελέτη των βιοδεικτών στο διαβητικό έλκος τελεί ακόμη υπό εξέλιξη. Οι συνεχείς προσπάθειες σε αυτόν τον τομέα θα βοηθήσουν στην αποκάλυψη νέας πληροφορίας σχετικά με την πρόληψη, τη διάγνωση και τη θεραπεία του διαβητικού έλκους.



## ABSTRACT

### The contribution of new biomarkers in the prevention and treatment of diabetic ulcer

I.A. ANASTASIOU, K. TENTOLOURIS, I. ELEFThERiADOU, O. KOSTA, A. KONTOGIANNA TOU, A. KATSAOUNI, A. KOULOURI, C. SIAFARIKAS

First Department of Propedeutic Internal Medicine, "Laiko" General Hospital, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

*Archives of Hellenic Medicine 2023, 40(6):754–764*

Diabetic foot ulcers concern one of the main chronic serious complications of diabetes mellitus that do not follow the normal healing process. In daily clinical practice, clinical criteria are used for risk stratification and ulcer prevention in people with diabetes. The use of new biomarkers may contribute to the prevention of ulcers with consequent reductions in hospitalizations, amputations, disability, costs and mortality. In addition to the most extensively studied and used inflammatory biomarkers, such as C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT), there are other potential biomarkers such as pentraxin-3 (PTX-3), interleukins (IL), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Recent advances in molecular biology, genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics and microbiome have led to the identification of biomolecules that can be used as potential biomarkers for diabetic ulcer risk stratification and in the future to generalize their use in clinical practice.

**Key words:** Biomarkers, Biomolecules, C-reactive protein, Diabetes mellitus, Diabetic foot ulcer, Genomics, Metabolomics and microbiome, Proteomics, Transcriptomics

## Βιβλιογραφία

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes – 2020. *Diabetes Care* 2020, 43(Suppl 1):S14–S31
- CHO NH, SHAW JE, KARURANGA S, HUANG Y, DA ROCHA FERNANDES JD, OHLROGGE AW ET AL. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 2018, 138:271–281
- HARDING JL, PAVKOV ME, MAGLIANO DJ, SHAW JE, GREGG EW. Global trends in diabetes complications: A review of current evidence. *Diabetologia* 2019, 62:3–16
- ZHANG P, LU J, JING Y, TANG S, ZHU D, BI Y. Global epidemiology of diabetic foot ulceration: A systematic review and meta-analysis. *Ann Med* 2017, 49:106–116
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 11. Microvascular complications and foot care: Standards of medical care in diabetes – 2020. *Diabetes Care* 2020, 43(Suppl 1):S135–S151
- FOWLER MJ. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clin Diabetes* 2008, 26:77–82
- WANG Y, SHAO T, WANG J, HUANG X, DENG X, CAO Y ET AL. An update on potential biomarkers for diagnosing diabetic foot ulcer at early stage. *Biomed Pharmacother* 2021, 133:110991
- BALTZIS D, ELEFThERiADOU I, VEVES A. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: New insights. *Adv Ther* 2014, 31:817–836
- VELNART T, BAILEY T, SMRKOLJ V. The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 2009, 37:1528–1542
- BENNETT JM, REEVES G, BILLMAN GE, STURMBERG JP. Inflammation – nature's way to efficiently respond to all types of challenges: Implications for understanding and managing "the epidemic" of chronic diseases. *Front Med (Lausanne)* 2018, 5:316
- WANG J. Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Res* 2018, 371:531–539
- KRZYSZCZYK P, SCHLOSS R, PALMER A, BERTHIAUME F. The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. *Front Physiol* 2018, 9:419
- SNYDER RJ, LANTIS J, KIRSNER RS, SHAH V, MOLYNEAUX M, CARTER MJ. Macrophages: A review of their role in wound healing and their therapeutic use. *Wound Repair Regen* 2016, 24:613–629
- DINH T, TECILAZICH F, KAFANAS A, DOUPIS J, GNARDELLIS C, LEAL E ET AL. Mechanisms involved in the development and healing of diabetic foot ulceration. *Diabetes* 2012, 61:2937–2947
- GONZALEZ ACO, COSTA TF, ANDRADE ZA, MEDRADO ARAP. Wound healing – a literature review. *An Bras Dermatol* 2016, 91:614–620
- WILKINSON HN, HARDMAN MJ. Wound healing: Cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol* 2020, 10:200223
- ELEFThERiADOU I, SAMAKIDOU G, TENTOLOURIS A, PAPANAS N, TENTOLOURIS N. Nonpharmacological management of diabetic foot ulcers: An update. *Int J Low Extrem Wounds* 2021, 20:188–197
- SPROSTON NR, ASHWORTH JJ. Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. *Front Immunol* 2018, 9:754
- ANSAR W, GHOSH S. C-reactive protein and the biology of disease. *Immunol Res* 2013, 56:131–142
- McFADYEN JD, KIEFER J, BRAIG D, LOSEFF-SILVER J, POTEMPA LA, EISENHARDT SU ET AL. Dissociation of C-reactive protein localizes and amplifies inflammation: Evidence for a direct biological

- cal role of C-reactive protein and its conformational changes. *Front Immunol* 2018, 9:1351
21. RAJAB IM, HART PC, POTEPA LA. How C-reactive protein structural isoforms with distinctive bioactivities affect disease progression. *Front Immunol* 2020, 11:2126
  22. WEIGELT C, ROSE B, POSCHEN U, ZIEGLER D, FRIESE G, KEMPF K ET AL. Immune mediators in patients with acute diabetic foot syndrome. *Diabetes Care* 2009, 32:1491–1496
  23. METINEREN H, DÜLGEROĞLU TC. Comparison of the neutrophil/lymphocyte ratio and C-reactive protein levels in patients with amputation for diabetic foot ulcers. *Int J Low Extrem Wounds* 2017, 16:23–28
  24. JEANDROT A, RICHARD JL, COMBESCURE C, JOURDAN N, FINGE S, RODIER M ET AL. Serum procalcitonin and C-reactive protein concentrations to distinguish mildly infected from non-infected diabetic foot ulcers: A pilot study. *Diabetologia* 2008, 51:347–352
  25. TECILAZICH F, DINH T, PRADHAN-NABZDYK L, LEAL E, TELLECHEA A, KAFANAS A ET AL. Role of endothelial progenitor cells and inflammatory cytokines in healing of diabetic foot ulcers. *PLoS One* 2013, 8:e83314
  26. VELISSARIS D, PANTZARIS ND, PLATANAKI C, ANTONOPOULOU N, GOGOS C. Procalcitonin as a diagnostic and prognostic marker in diabetic foot infection. A current literature review. *Rom J Intern Med* 2018, 56:3–8
  27. UMAPATHY D, DORNADULA S, RAJAGOPALAN A, MURTHY N, MARIAPPANADAR V, KESAVAN R ET AL. Potential of circulatory procalcitonin as a biomarker reflecting inflammation among South Indian diabetic foot ulcers. *J Vasc Surg* 2018, 67:1283–1291. e2
  28. MASSARA M, DE CARIDI G, SERRA R, BARILLÀ D, CUTRUPI A, VOLPE A ET AL. The role of procalcitonin as a marker of diabetic foot ulcer infection. *Int Wound J* 2017, 14:31–34
  29. KORKMAZ P, KOÇAK H, ONBAŞI K, BIÇICI P, ÖZMEN A, UYAR C ET AL. The role of serum procalcitonin, interleukin-6, and fibrinogen levels in differential diagnosis of diabetic foot ulcer infection. *J Diabetes Res* 2018, 2018:7104352
  30. KUNES P, HOLUBCOVA Z, KOLACKOVA M, KREJSEK J. Pentraxin 3 (PTX 3): An endogenous modulator of the inflammatory response. *Mediators Inflamm* 2012, 2012:920517
  31. SEMAN NA, WITASP A, MOHAMUD WNW, ANDERSTAM B, BRISMAR K, STENVINKEL P ET AL. Evaluation of the association of plasma pentraxin 3 levels with type 2 diabetes and diabetic nephropathy in a Malay population. *J Diabetes Res* 2013, 2013:298019
  32. BALIN SO, TARTAR AS, UĞUR K, KILINÇ F, TELO S, BAL A ET AL. Pentraxin-3: A new parameter in predicting the severity of diabetic foot infection? *Int Wound J* 2019, 16:659–664
  33. TAKASHI Y, KOGA M, MATSUZAWA Y, SAITO J, OMURA M, NISHIKAWA T. Circulating pentraxin 3 is positively associated with chronic hyperglycemia but negatively associated with plasma aldosterone concentration. *PLoS One* 2018, 13:e0196526
  34. ZUBAIR M, AHMAD J. Role of growth factors and cytokines in diabetic foot ulcer healing: A detailed review. *Rev Endocr Metab Disord* 2019, 20:207–217
  35. AVITABILE S, ODORISIO T, MADONNA S, EYERICH S, GUERRA L, EYERICH K ET AL. Interleukin-22 promotes wound repair in diabetes by improving keratinocyte pro-healing functions. *J Invest Dermatol* 2015, 135:2862–2870
  36. SABUNCU T, EREN MA, TABUR S, DAG OF, BODUROĞLU O. High serum concentration of interleukin-18 in diabetic patients with foot ulcers. *J Am Podiatr Med Assoc* 2014, 104:222–226
  37. NAVARRO-GONZÁLEZ JF, MORA-FERNÁNDEZ C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2008, 19:433–442
  38. KOLUMAM G, WU X, LEE WP, HACKNEY JA, ZAVALA-SOLORIO J, GANDHAM V ET AL. IL-22R ligands IL-20, IL-22, and IL-24 promote wound healing in diabetic db/db mice. *PLoS One* 2017, 12:e0170639
  39. WANG X, LIN Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol Sin* 2008, 29:1275–1288
  40. HAMADA M, ABE M, MIYAKE T, KAWASAKI K, TADA F, FURUKAWA S ET AL. B cell-activating factor controls the production of adipokines and induces insulin resistance. *Obesity (Silver Spring)* 2011, 19:1915–1922
  41. DHAMODHARAN U, TEENA R, KUMAR RV, CHANGAM SS, RAMKUMAR KM, RAJESH K. Circulatory levels of B-cell activating factor of the TNF family in patients with diabetic foot ulcer: Association with disease progression. *Wound Repair Regen* 2019, 27:442–449
  42. PICHU S, PATEL BM, APPARSUNDARAM S, GOYAL RK. Role of biomarkers in predicting diabetes complications with special reference to diabetic foot ulcers. *Biomark Med* 2017, 11:377–388
  43. FABIAN MR, SONENBERG N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: A look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol* 2012, 19:586–593
  44. BEYLERLI O, BEERAKA NM, GAREEV I, PAVLOV V, YANG G, LIANG Y ET AL. MiRNAs as noninvasive biomarkers and therapeutic agents of pituitary adenomas. *Int J Mol Sci* 2020, 21:7287
  45. LIN CJ, LAN YM, OU MQ, JI LQ, LIN SD. Expression of miR-217 and HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway in patients with diabetic foot ulcer and its effect on angiogenesis of diabetic foot ulcer rats. *J Endocrinol Invest* 2019, 42:1307–1317
  46. AMIN KN, UMAPATHY D, ANANDHARAJ A, RAVICHANDRAN J, SASIKUMAR CS, CHANDRA SKR ET AL. miR-23c regulates wound healing by targeting stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ /CXCL12) among patients with diabetic foot ulcer. *Microvasc Res* 2020, 127:103924
  47. ZHANG J, SUN XJ, CHEN J, HU ZW, WANG L, GU DM ET AL. Increasing the miR-126 expression in the peripheral blood of patients with diabetic foot ulcers treated with maggot debridement therapy. *J Diabetes Complications* 2017, 31:241–244
  48. MIR KA, PUGAZHENDHI S, PAUL MJ, NAIR A, RAMAKRISHNA BS. Heat-shock protein 70 gene polymorphism is associated with the severity of diabetic foot ulcer and the outcome of surgical treatment. *Br J Surg* 2009, 96:1205–1209
  49. ZUBAIR M, AHMAD J. Heat shock protein 70 gene single nucleotide polymorphism and diabetic foot ulcer. Is there any relationship? *J Clin Med* 2018, 7:187
  50. SOROUSH N, RADFAR M, HAMIDI AK, ABDOLLAHI M, QORBANI M, RAZI F ET AL. Vitamin D receptor gene *FokI* variant in diabetic foot ulcer and its relation with oxidative stress. *Gene* 2017,

- 599:87–91
51. AMOLI MM, HASANI-RANJBAR S, ROOHIPOUR N, SAYAHPOUR FA, AMIRI P, ZAHEDI P ET AL. *VEGF* gene polymorphism association with diabetic foot ulcer. *Diabetes Res Clin Pract* 2011, 93:215–219
  52. MOHANTY S, KAMOLVIT W, ZAMBRANA S, GONZALES E, TOVI J, BRISMAR K ET AL. HIF-1 mediated activation of antimicrobial peptide LL-37 in type 2 diabetic patients. *J Mol Med (Berl)* 2022, 100:101–113
  53. SEMENZA GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 2012, 148:399–408
  54. SERGIU-BOGDAN C, ZHENG X. Disturbed hypoxic responses as a pathogenic mechanism of diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab Res Rev* 2016, 32(Suppl 1):179–185
  55. BOTUSAN IR, SUNKARI VG, SAVU O, CATRINA AI, GRÜNLER J, LINDBERG S ET AL. Stabilization of HIF-1alpha is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105:19426–19431
  56. SARETT SM, NELSON CE, DUVALL CL. Technologies for controlled, local delivery of siRNA. *J Control Release* 2015, 218:94–113
  57. BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, FAULER B, UHLEMANN Y, WEISS DS ET AL. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004, 303:1532–1535
  58. BONAVENTURA A, VECCHIÉ A, ABBATE A, MONTECUCCO F. Neutrophil extracellular traps and cardiovascular diseases: An update. *Cells* 2020, 9:231
  59. MENEGAZZO L, CICLIOT S, PONCINA N, MAZZUCATO M, PERSANO M, BONORA B ET AL. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 2015, 52:497–503
  60. MASUDA S, NAKAZAWA D, SHIDA H, MIYOSHI A, KUSUNOKI Y, TOMARU U ET AL. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta* 2016, 459:89–93
  61. FADINI GP, ALBIERO M, MILLIONI R, PONCINA N, RIGATO M, SCOTTON R ET AL. The molecular signature of impaired diabetic wound healing identifies serpinB3 as a healing biomarker. *Diabetologia* 2014, 57:1947–1956
  62. JONES JI, NGUYEN TT, PENG Z, CHANG M. Targeting MMP-9 in diabetic foot ulcers. *Pharmaceuticals (Basel)* 2019, 12:79
  63. NEWGARD CB. Metabolomics and metabolic diseases: Where do we stand? *Cell Metab* 2017, 25:43–56
  64. SINCLAIR K, DUDLEY E. Metabolomics and biomarker discovery. *Adv Exp Med Biol* 2019, 1140:613–633
  65. ARNETH B, ARNETH R, SHAMS M. Metabolomics of type 1 and type 2 diabetes. *Int J Mol Sci* 2019, 20:2467
  66. HARRISON LE, GIARDINA C, HIGHTOWER LE, ANDERSON C, PERDRIZET GA. Might hyperbaric oxygen therapy (HBOT) reduce renal injury in diabetic people with diabetes mellitus? From preclinical models to human metabolomics. *Cell Stress Chaperones* 2018, 23:1143–1152
  67. HUNG SY, TSAI JS, YEH JT, CHEN KH, LIN CN, YANG HM ET AL. Amino acids and wound healing in people with limb-threatening diabetic foot ulcers. *J Diabetes Complications* 2019, 33:107403
  68. WITTE MB, BARBUL A. Arginine physiology and its implication for wound healing. *Wound Repair Regen* 2003, 11:419–423
  69. RENNIE MJ, TIPTON KD. Protein and amino acid metabolism during and after exercise and the effects of nutrition. *Annu Rev Nutr* 2000, 20:457–483
  70. VALDES AM, WALTER J, SEGAL E, SPECTOR TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *Br Med J* 2018, 361:k2179
  71. VYAS U, RANGANATHAN N. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Gut and beyond. *Gastroenterol Res Pract* 2012, 2012:872716
  72. RATH CM, DORRESTEIN PC. The bacterial chemical repertoire mediates metabolic exchange within gut microbiomes. *Curr Opin Microbiol* 2012, 15:147–154
  73. TANG WHW, KITAIT, HAZEN SL. Gut microbiota in cardiovascular health and disease. *Circ Res* 2017, 120:1183–1196
  74. CITRON DM, GOLDSTEIN EJC, MERRIAM CV, LIPSKY BA, ABRAMSON MA. Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and *in vitro* activity of antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* 2007, 45:2819–2828
  75. LIPSKY BA, BERENDT AR, DEERY HG, EMBIL JM, JOSEPH WS, KARCHMER AW ET AL. Diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Plast Reconstr Surg* 2006, 117(Suppl 7):212S–238S
  76. RALSTON JC, MITCHELSON KAJ, LYNCH GM, TRAN TTT, WANG H, STRAIN CL ET AL. Microbiome transfer partly overrides lack of IL-1RI signaling to alter hepatic but not adipose tissue phenotype and lipid handling following a high-fat diet challenge. *Mol Nutr Food Res* 2021, 65:e2000202
  77. KREZNAR JH, KELLER MP, TRAEGER LL, RABAGLIA ME, SCHUELER KL, STAPLETON DS ET AL. Host genotype and gut microbiome modulate insulin secretion and diet-induced metabolic phenotypes. *Cell Rep* 2017, 18:1739–1750
  78. BADER MS. Diabetic foot infection. *Am Fam Physician* 2008, 78:71–79
  79. JNEID J, LAVIGNE JP, LA SCOLA B, CASSIR N. The diabetic foot microbiota: A review. *Hum Microbiome J* 2017, 5–6:1–6
  80. ABDULRAZAK A, BITAR ZI, AL-SHAMALI AA, MOBASHER LA. Bacteriological study of diabetic foot infections. *J Diabetes Complications* 2005, 19:138–141
  81. HERAVI FS, ZAKRZEWSKI M, VICKERY K, ARMSTRONG DG, HU H. Bacterial diversity of diabetic foot ulcers: Current status and future perspectives. *J Clin Med* 2019, 8:1935
  82. HE C, SHAN Y, SONG W. Targeting gut microbiota as a possible therapy for diabetes. *Nutr Res* 2015, 35:361–367
  83. COLLIER A, McLAREN J, GODWIN J, BAL A. Is *Clostridium difficile* associated with the “4C” antibiotics? A retrospective observational study in diabetic foot ulcer patients. *Int J Clin Pract* 2014, 68:628–632
  84. GILBERT JA, BLASER MJ, CAPORASO JG, JANSSON JK, LYNCH SV, KNIGHT R. Current understanding of the human microbiome. *Nat Med* 2018, 24:392–400
- Corresponding author:*
- I.A. Anastasiou, 5–11 Heroon Skopeutiriou street, 161 21 Kessariani, Attica, Greece  
e-mail: anastasiouiwna@gmail.com