

**ZAKŁAD MEDYCYNY RODZINNEJ
KATEDRY MEDYCYNY RODZINNEJ
GDAŃSKIEGO UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO**

Magdalena Reiwer-Gostomska

ANGIOGENINA W WYBRANYCH JEDNOSTKACH CHOROBYCH

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

PROMOTOR: prof. dr hab. n. med. Janusz Siebert

Gdańsk 2011

Spis treści

STRESZCZENIE	3
ABSTRACT	6
WYKAZ WYBRANYCH SKRÓTÓW	8
1. WSTĘP	11
1.1. DEFINICJA ANGIOGENEZY	11
1.1.1. <i>Epidemiologia cukrzycy</i>	19
1.1.2. <i>Angiogeneza w kontekście powikłań naczyniowych cukrzycy typu 2</i>	20
1.1.3. <i>Neuropatia cukrzycowa</i>	33
1.1.4. <i>Epidemiologia nadciśnienia tętniczego</i>	35
1.1.5. <i>Nadciśnienie tętnicze w kontekście konsekwencji zaburzeń procesu angiogenezy</i>	36
1.2. ANGIOGENINA	44
1.2.1. <i>Struktura biochemiczna angiogeniny</i>	44
1.2.2. <i>Mechanizm działania i regulacji angiogeniny</i>	45
1.2.3. <i>Działanie biologiczne angiogeniny</i>	47
1.2.4. <i>Dodatkowe właściwości angiogeniny</i>	49
1.2.5. <i>Angiogenina jako białko neuroprotektcyjne</i>	50
1.2.6. <i>Rola angiogeniny w procesie nowotworowym</i>	51
2. CELE PRACY	54
3. MATERIAŁ I METODY	55
3.1. PACJENCI I DANE KLINICZNE	55
3.2. BADANIA BIOCHEMICZNE	58
3.3. BADANIE POZIOMU ANGIOGENINY	58
3.3.1. <i>Uzyskiwanie materiału biologicznego</i>	60
3.3.2. <i>Procedura działania testu immunoenzymatycznego ELISA</i>	60
3.3.3. <i>Metody statystyczne</i>	61
4. WYNIKI	62
4.1. CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA BADANYCH PACJENTÓW	62
4.1.1. <i>Cukrzyca typu 2 a grupa kontrolna</i>	62
4.1.2. <i>Cukrzyca typu 2 w odniesieniu do poziomu HbA1c</i>	67
4.1.3. <i>Nadciśnienie tętnicze a grupa kontrolna</i>	73
4.1.4. <i>Zespół metaboliczny a grupa kontrolna</i>	78
4.2. ANALIZA ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY POZIOMEM ANGIOGENINY, A OKREŚLONYMI STANAMI KLINICZNYM	85
4.2.1. <i>Cukrzyca typu 2</i>	85
4.2.2. <i>Nadciśnienie tętnicze</i>	88
4.3. ANALIZA POZIOMU ANGIOGENINY U OSÓB ZDROWYCH	91
5. DYKUSJA	92
6. WNIOSKI	106
7. PIŚMIENNICTWO	107

STRESZCZENIE

Zjawisko angiogenezy jest od kilkunastu lat bardzo intensywnie badane. Jako pierwsi tym zagadnieniem zainteresowali się onkolodzy, gdyż dzięki hamowaniu rozrostu unaczynienia guzów nowotworowych znacząco poprawiła się przeżywalność pacjentów onkologicznych. Kolejne badania nad angiogenezą udowodniły, że powstawanie nowych naczyń lub zaburzenia tego procesu mają kluczowe znaczenie w rozwoju licznych zmian chorobowych, a szczegółowe jej poznanie pozwoli na opracowanie testów diagnostycznych oraz skutecznych metod leczenia wielu chorób. Wiedza dotycząca angiogenego działania różnych molekuł umożliwia lepsze zrozumienie patomechanizmu chorób cywilizacyjnych, takich jak cukrzyca i nadciśnienie tętnicze.

Angiogenina jest 14-kDa białkiem należącym do rodziny rybonukleaz. Jest stale obecna w krążeniu; jej poziom jest ściśle regulowany. Niemniej w pewnych fizjologicznych i patologicznych warunkach jej poziom w surowicy wzrasta, czego efektem jest tworzenie nowych naczyń krwionośnych.

Angiogenina uczestniczy w niemal każdym etapie angiogenezy: przyłączaniu się do komórki endotelialnej, uruchamianiu ścieżek sygnałowych, aktywacji proteaz rozkładających błonę podstawną, wzmacnia adhezję komórek, tworzenie struktur trójwymiarowych i proliferację komórek. Na poziomie molekularnym angiogenina łączy się z aktyną i 170-kDa receptorem.

Wzrost poziomu angiogeniny w surowicy obserwuje się między innymi w nowotworach: trzustki, prostaty, endometrium, żołądka i jelita grubego. Ponadto liczne badania donoszą o udziale angiogeniny w takich chorobach jak: choroby zapalne jelit, reumatoidalne zapalenie stawów, nadwaga i otyłość, proliferacyjna retinopatia cukrzycowa, niewydolność serca.

Większość badań nad angiogenezą skupia się na aktywności angiogennej tej

substancji. Natomiast coraz częściej mówi się o protekcyjnej roli angiogeniny w chorobach neurodegeneracyjnych: stwardnieniu zanikowym bocznym i chorobie Parkinsona.

Hipoteza badawcza: na podstawie doniesień literaturowych i poprzednich badań własnych założono, że modyfikacja poziomu angiogeniny może być odzwierciedleniem toczących się procesów chorobowych. Angiogenina może być wskaźnikiem postępu choroby lub skuteczności terapii.

Celem niniejszej pracy było określenie poziomu angiogeniny w cukrzycy typu 2, nadciśnieniu tętniczym oraz zespole metabolicznym w porównaniu z grupą kontrolną.

Materiał badawczy stanowiły 123 osoby: 49 pacjentów z cukrzycą typu 2, 49 pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz dobrana wiekiem i płcią grupa 25 osób zdrowych. Spośród badanych pacjentów 32 osoby spełniały kryteria rozpoznania zespołu metabolicznego.

U uczestników badania na podstawie wywiadu uzyskano szczegółowe informacje dotyczące obciążeń rodzinnych, stylu życia i stosowanych leków. Ponadto zostały określone: czas trwania cukrzycy albo nadciśnienia tętniczego, obwód talii, BMI, skurczowe i rozkurczowe ciśnienie tętnicze krwi, HbA1c, lipidogram, CRP, kreatynina, mikroalbuminuria oraz poziom angiogeniny metodą ELISA.

Z badania wykluczono osoby, u których stwierdzono ostre lub przewlekłe choroby zapalne lub nowotworowe i osoby z chorobą nowotworową w wywiadzie.

W prezentowanej pracy wykazano istotnie podwyższony poziom angiogeniny we wszystkich ocenianych grupach w porównaniu z grupą kontrolną: w cukrzycy typu 2 ($392,50 \pm 134,22$ ng/ml vs. $333,21 \pm 69,30$ ng/ml, $p=0,015$), nadciśnieniu tętniczym ($382 \pm 93,53$ ng/ml vs. $333,21 \pm 69,30$ ng/ml, $p=0,02$) oraz zespole metabolicznym ($404,82 \pm 107,86$ ng/ml vs. $325,50 \pm 69,53$ ng/ml, $p=0,005$). Pacjenci z cukrzycą typu 2 z dobrze wyrównaną chorobą ($HbA1c < 7\%$) mieli znacząco wyższy

poziom angiogeniny w porównaniu z grupą gorzej wyrównanych pacjentów ($HbA1c \geq 7\%$) ($446,37 \pm 134,10$ ng/ml vs. $361,23 \pm 126,03$ ng/ml, $p=0,03$).

Poziom angiogeniny ulega modyfikacji u pacjentów z cukrzycą typu 2 i nadciśnieniem tętniczym. Niewyrównana cukrzyca typu 2 charakteryzuje się istotnym obniżeniem poziomu angiogeniny w surowicy krwi pacjentów. Poziom angiogeniny wzrasta u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. Wzrost poziomu angiogeniny można zaobserwować u pacjentów z objawami zespołu metabolicznego.

ABSTRACT

The process of angiogenesis has been intensively investigated for the last years. At the beginning it was a matter of interest mainly of oncologists because inhibition of neoangiogenesis significantly improved long term outcomes of patients suffering from neoplastic diseases. Numerous research proved that forming new blood vessels or disorders of the process of angiogenesis plays a key role in the development of various diseases. A better understanding of the mechanisms of angiogenesis can result in a potential use of angiogenic growth factors in the diagnosis, prediction and treatment of a variety of clinical states such as diabetes and hypertension.

Angiogenin is a 14-kDa protein and belongs to the ribonuclease superfamily. It is a normal constituent of blood and its level is strictly regulated. However, in different pathological conditions its serum level increases in order to initiate formation of new blood vessels.

Angiogenin is involved in nearly all steps and phases of angiogenesis. That is: binding to endothelial cells, stimulation of second-messenger pathways, activation of basement membrane proteases, mediation of cell adhesion, and formation of tubular structures of endothelial cells and their proliferation. At the molecular level angiogenin binds to actin and a 170-kDa receptor.

Elevated serum levels of angiogenin can be observed in different neoplastic diseases: pancreatic, endometrial, prostate, gastric and colorectal cancers. Angiogenin is also involved in inflammatory diseases, rheumatoid arthritis, overweight and obesity, proliferative retinopathy and heart failure. A huge volume of research focus on the angiogenic activity of angiogenin. In addition, angiogenin can act as a neuroprotective factor in lateral sclerosis and Parkinson's disease.

On the basis of previous publications and own research I suggested that

modification of serum angiogenin level might reflect the presence of different diseases. Angiogenin might be used to evaluate the disease status and efficiency of applied therapy.

The aim of this study was to determine the level of angiogenin in diabetes type 2, hypertension, and metabolic syndrome.

A total of 123 patients were divided into groups: 49 patients with diabetes type 2, 49 patients with hypertension and 25 healthy volunteers as a control. 32 patients from the whole population met the criteria of metabolic syndrome.

All the patients and healthy control group had waist, BMI, systolic and diastolic pressure, HbA1c, total cholesterol and its LDL and HDL fractions, triglycerides, CRP, creatinine, microalbuminuria and angiogenin level measured.

Patients suffering from acute and chronic inflammatory and neoplastic diseases were excluded.

Serum angiogenin level was elevated in all the evaluated groups in comparison with the healthy control: diabetic ($392,50 \pm 134,22$ ng/ml vs. $333,21 \pm 69,30$ ng/ml, $p=0,015$), hypertensive ($382 \pm 93,53$ ng/ml vs. $333,21 \pm 69,30$ ng/ml, $p=0,02$) and with metabolic syndrome ($404,82 \pm 107,86$ ng/ml vs. $325,50 \pm 69,53$ ng/ml, $p=0,005$). Moreover, well controlled patients with diabetes type 2 ($HbA1c < 7\%$) had higher level of serum angiogenin level than poorly controlled group ($HbA1c \geq 7\%$) ($446,37 \pm 134,10$ ng/ml vs. $361,23 \pm 126,03$ ng/ml, $p=0,03$).

Results: serum angiogenin level is modified in patients with diabetes type 2 and hypertension. Poorly controlled diabetes type 2 is characterised by significantly lower level of angiogenin. Angiogenin level increases in sera of hypertensive patients. Serum angiogenin elevation can be observed in patients with metabolic syndrome.

WYKAZ WYBRANYCH SKRÓTÓW

AGE (z ang. advanced glycation end products) końcowe produkty glikacji białek

AIF (z ang. apoptosis inducing factor) czynnik indukujący apoptozę

ALS (z ang. amyotrophic lateral sclerosis) stwardnienie zanikowe boczne

AngBP (z ang. angiogenin binding protein) białko łączące dla angiogeniny

AngII angiotensyna II

α -syn alfa-synukleina

BMI (z ang. body mass index) indeks masy ciała

CD (z ang. cluster of differentiation) antygeny różnicowania komórkowego

CRP (z ang. C-reactive protein) białko C-reaktywne

DN (z ang. diabetic nephropathy) nefropatia cukrzycowa

ELISA (z ang. enzyme-linked immunosorbent assay) test immunoenzymatyczny

ENA-78 (z ang. epithelial neutrophil activating protein-78) nabłonkowe białko pobudzające neutrofile

EPC (z ang. endothelial progenitor cells) endotelialne komórki progenitorowe

ET-1 endotelina-1

FGF (z ang. fibroblast growth factor) fibroblastyczny czynnik wzrostu

GCP-2 (z ang. granulocyte chemoattractant protein) białko chemotaktyczne

dla granulocytów

G-CSF (z ang. granulocyte colony stimulating factor) czynnik pobudzający kolonizację granulocytów

GFR (z ang. glomerular filtration rate) wskaźnik filtracji kłębuszkowej

GIP (z ang. glucose-dependent insulinotropic polypeptide)

GLP-1 (z ang. glucagon-like peptide-1)

GM-CSF (z ang. granulocyte-macrophage colony stimulating factor) czynnik pobudzający kolonizację granulocytów i makrofagów

GRO (z ang. growth related genes) geny związane ze wzrostem

HDL (z ang. high density lipoprotein) lipoproteina o wysokiej gęstości

HGF (z ang. hepatocyte growth factor) czynnik wzrostu hepatocytów

HIF (z ang. hypoxia inducible factor) czynnik indukowany hipoksją

hRI (z ang. human placental inhibitor of ribonucleases) – ludzki łożyskowy inhibitor rybonukleaz

ICAM (z ang. intercellular adhesion molecule) cząsteczka adhezji międzykomórkowej

IGF (z ang. insulin-like growth factor) insulinopodobny czynnik wzrostu

kDa kilodalton

LDL (z ang. low density lipoprotein) lipoproteina o niskiej gęstości

MAPK – (z ang. mitogen-activated protein kinase) kinaza MAP

MCP-1 (z ang. monocyte chemoattractant protein) białko chemotaktyczne dla monocytów

MIG monokina indukowana przez interferon gamma

MMP (z ang. matrix metalloproteinase) metaloproteinaza macierzowa

NAP-2 białko pobudzające neutrofile

NGF (z ang. nerve growth factor) czynnik wzrostu nerwów

NOS (z ang. nitric oxide synthase) syntaza tlenku azotu

PAI-1 (z ang. plasminogen activator inhibitor) inhibitor aktywatora plazminogenu

PD-ECGF (z ang. platelet derived endothelial cell growth factor) czynnik wzrostu komórek śródbłónki uwalniany przez płytki

PDGF (z ang. platelet derived growth factor) płytkowy czynnik wzrostu

PEDF (z ang. pigment epithelium-derived factor)

PKC (z ang. protein kinase C) kinaza białkowa C

PIGF (z ang. placental growth factor) łożyskowy czynnik wzrostu

ROS (z ang. reactive oxygen species) wolne rodniki tlenowe

SAPK/JNK (stress-associated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase)

SIA (z ang. serum induced angiogenesis) test aktywności angiogennej surowicy

TC (z ang. total cholesterol) cholesterol całkowity

TG (z ang. Triglycerides) triglicerydy

TGF β (z ang. transforming growth factor) przekształcający czynnik wzrostu

TIMP (z ang. tissue inhibitor of metalloproteinases) tkankowy inhibitor metaloproteinaz

TNF (z ang. tumor necrosis factor) czynnik martwicy nowotworu

TonEBP (z ang. tonicity-responsive enhancer binding protein)

VEGF (z ang. vascular endothelial growth factor) naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu

1. WSTĘP

1.1. Definicja angiogenezy

Angiogenezę definiuje się jako proces prowadzący do powstawania nowych naczyń z uprzednio już istniejących, poprzez ich rozgałęzianie i wydłużanie [1]. Należy odróżniać to zjawisko od waskulogenezy, która określa formowanie nowych naczyń de novo z komórek macierzystych. Do waskulogenezy dochodzi głównie w okresie płodowym. Naczynia włosowate zbudowane są z komórek endotelialnych i pericytów. Oba te rodzaje komórek zawierają całą informację genetyczną niezbędną do produkcji nowych odgałęzień [3]. Budowanie nowych kapilar to proces wieloetapowy. Początkowo dochodzi do wzrostu przepuszczalności naczyń krwionośnego, następnie do degradacji jego błony podstawnej, migracji, adhezji i proliferacji komórek endotelialnych, i w efekcie do wytworzenia i dojrzewania nowej, trójwymiarowej struktury, której głównym zadaniem jest dostarczać krew do tkanek [2].

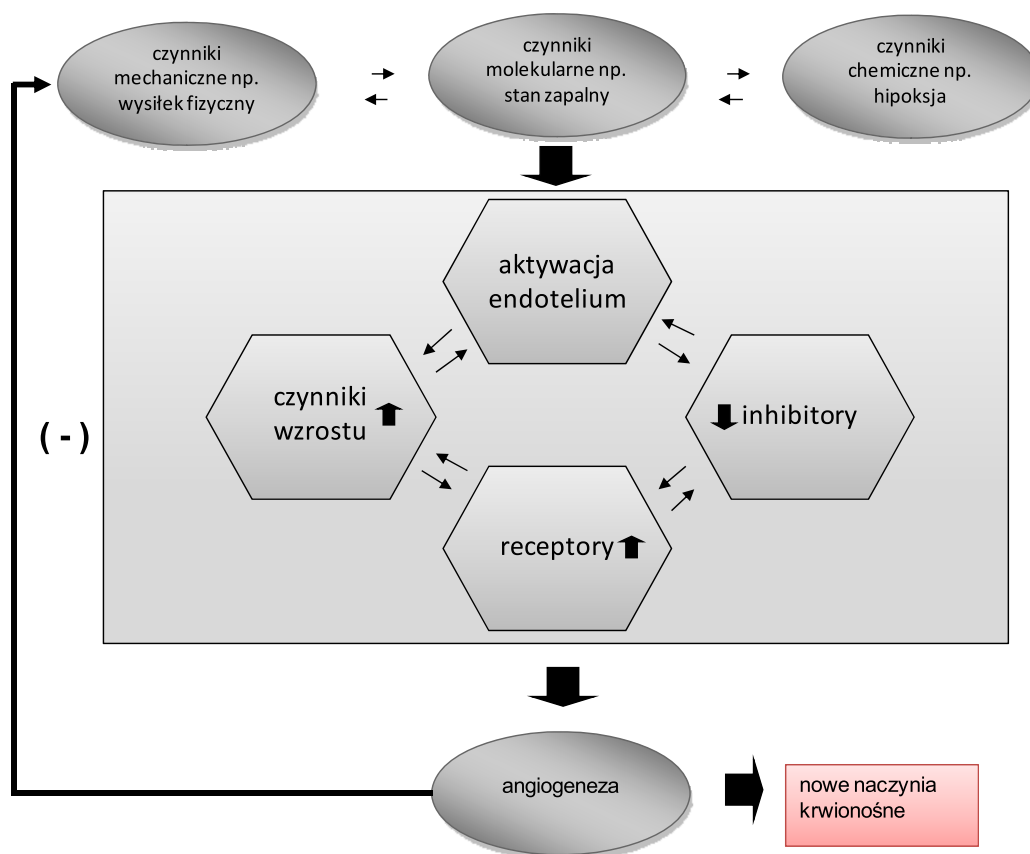
Tabela 1. Kluczowe etapy angiogenezy [12]

Faza	Mechanizm
Aktywacja komórek śródbłónka i pericytów	Morfologiczne zmiany komórek endotelialnych. Miejscowy rozkurcz naczyń krwionośnego, wzrost przepuszczalności jego ściany. Akumulacja zewnątrznaczyniowej fibryny.
Degradacja błony podstawnej	Enzymy proteolityczne rozkładają błonę podstawną i macierz pozakomórkową umożliwiając migrację komórek śródbłónka.
Migracja komórek endotelialnych	Czynniki chemotaktyczne produkowane przez fibroblasty, monocyty i płytki indukują wędrówkę komórek endotelialnych.
Proliferacja komórek endotelialnych	Lokalne mitogeny indukują syntezę DNA komórek endotelialnych i mitozę.
Różnicowanie komórek endotelialnych	Proliferacja ustaje, tworzy się nowa struktura trójwymiarowa.
Rekonstrukcja błony podstawnej	
Dojrzewanie i stabilizacja naczyń	

Angiogeneza pozapłodowa może mieć charakter zarówno pozytywny jak i negatywny. Odpowiada np. za tworzenie bardzo pożądanego krążenia obocznego w niedokrwionym mięśniu sercowym, gojenie ran i zarastanie złamań [4], w jajnikach dochodzi do neowaskularyzacji pęcherzyków i ciała żółtego. Z drugiej strony nowe naczynia krwionośne są niezbędne do zaopatrywania guzów nowotworowych i przerzutowych w substancje odżywcze i tlen. Angiogeneza jest również przyczyną rozwoju i destabilizacji płytek miażdżycowych i restenoz. Nowo utworzone naczynia są kruche i łatwo ulegają pękaniu, co skutkuje wewnątrzpłytkowymi krwotokami [10,11].

Wiele czynników może modulować proces angiogenezy. Każdy jej etap może być odpowiednio regulowany. Czynniki te można zasadniczo zakwalifikować do trzech podstawowych grup: mechanicznej, chemicznej i molekularnej [2].

Rysunek 1 Czynniki modulujące angiogenezę [2].



Do czynników mechanicznych zaliczamy np. wzrost przepływu krwi przez daną tkankę podczas wysiłku fizycznego, nadciśnienie tętna lub pod wpływem leków. Rozciąganie ściany naczynia krwionośnego staje się impulsem do zwiększonej produkcji molekuł adhezyjnych w komórkach endotelialnych, napływu komórek zapalnych i stymulacji komórek endotelialnych do wydzielania czynników wzrostu.

Chemicznym stymulatorem wzrostu naczyń może być hipoksja. Niedobór tlenu stymuluje makrofagi do uwalniania różnych czynników wzrostu takich jak: PDGF i FGF1 i FGF2. Lee i wsp. donieśli, że w odpowiedzi na niedokrwienie wzrasta poziom min. HIF-1 (hipoxia-inducible factor-1), który jest niezbędny do komórkowej odpowiedzi na niedobór tlenu [5]. Chung i wsp. przeprowadzili badanie, w którym udowodnili, że poziom czynników wzrostu naczyń, a w konsekwencji rozwój krążenia obocznego, jest wyższy u pacjentów z przewlekłą niedokrwinną chorobą serca w porównaniu z grupą osób, u których incydent wieńcowy wystąpił nagle po raz

pierwszy. W pierwszej dobie zawału dochodzi do wzrostu poziomu receptora VEGFR-1, natomiast nie podnosi się poziom samego VEGF. Natomiast pacjenci z przewlekłym niedokrwieniem mają wyższy poziom krążącego VEGF w surowicy [6].

Badania na zwierzętach dowodzą, że stan zapalny także może przyczyniać się do tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Napływ komórek zapalnych, takich jak makrofagi, monocyty i płytki prowadzi do uwolnienia różnych cytokin, które pobudzają uwalnianie czynników stymulujących angiogenezę takich jak FGF i VEGF [2].

Kolejną istotną grupą substancji mających wpływ na angiogenezę są czynniki wzrostu naczyń. Do ich odkrycia doszło po raz pierwszy w latach siedemdziesiątych, kiedy zaobserwowano, że pewne czynniki nowotworowe wpływają mitogennie na komórki endotelialne [7]. Od tego czasu poznano wiele nowych czynników pro-angiogennych: angiogenina, naczyniowo – śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF), zasadowy i kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów (β FGF i α FGF), śródbłonkowy czynnik wzrostu pochodzący z płytek, IL-8, heparyna, TGF α i TGF β , PGE1, PGE2, IGF-1 i inne.

Pomimo że czynniki angiogenne są stale obecne w zdrowym organizmie, tworzenie nowych naczyń ma miejsce wyłącznie w uzasadnionych przypadkach i podlega ścisłej regulacji.

Schaper i wsp. zauważyli, że infuzja czynników wzrostu do zdrowego mięśnia sercowego nie wywołuje angiogenezy, prawdopodobnie z powodu braku receptorów dla tych substancji [8]. Ponadto odkryto szereg inhibitorów angiogenezy takich jak: angiostatyna, interferon alfa, beta, gamma, IL-10, IL-12, trombospondyna, czynnik nekrozy nowotworów, niektóre antybiotyki i niesterydowe leki przeciwzapalne. W stanie zdrowia pozostają one w stanie równowagi z czynnikami pro – angiogennymi. Niemniej jednak u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca, u których rozwinęło się krążenie oboczne poziom inhibitorów angiogenezy jest o 40% niższy, niż u pacjentów bez kolaterali naczyń sercowych [9].

Tabela 2. Czynniki pobudzające i hamujące angiogenezę [13, 14].

Stymulatory angiogenezy	Inhibitory angiogenezy
VEGF	Trombospondyna-1
FGF α i β	Trombospondyna-2
Angiopoetyna-1	Angiopoetyna-2
Angiopoetyna-2	angiostatyna
PDGF	endostatyna
TGF β	TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3
TNF α	TGF β 1
EGF	TNF α
CSF (G-CSF, GM-CSF)	chemokiny CXC bez motywu ELR (IP-10, PF4,
Angiogenina	MIG)
Angiotropina	Metaloproteinazy
chemokiny CXC z motywem ELR (IL-8, GCP-2, NAP-2)	PEDF
IGF-1	IL-10
HGF	IL-12
PECAM-1	IL-18
integryny	INF- α , β , γ
VE-kadheryny	
Metaloproteinazy	
Erytropoetyna	
NO	
HIF-1	
MCP-1	

Podsumowując, do wzrostu nowego naczynia niezbędne są: czynniki angiogenne, odpowiednia liczba receptorów oraz redukcja poziomu inhibitorów angiogenezy.

W miarę jak poznawano zjawiska związane z tworzeniem nowych sieci naczyniowych, zaczęto dostrzegać różnicę pomiędzy angiogenezą a arteriogenezą. Okazuje się, że są to całkowicie odmienne procesy. Arteriogeneza opiera się na wzroście i przebudowie istniejących już anastomoz. Omawiane połączenia pomiędzy

tętnicami są uruchamiane aby służyć jako krążenie oboczne w momencie zamknięcia dużego naczynia tętniczego. Głównym czynnikiem wyzwalającym arteriogenezę są siły fizyczne takie jak naprężenie ścian naczynia. W rozwój krążenia obocznego zaangażowane są krążące komórki krwi. Dochodzi również do proliferacji komórek ściany naczynia oraz procesów rozpadu macierzy zewnątrzkomórkowej.

Powszechnie wiadomo, że naczynie, które nie jest perfundowane, ulega zanikowi. Natomiast gdy przepływ jest nadmierny, dochodzi do zgrubienia ścian na skutek wysokiego ciśnienia. W zależności od sił fizycznych jakie działają na naczynia, dochodzi do dwóch skrajnie odmiennych zjawisk. Jednakże dokładne komórkowe i molekularne mechanizmy odpowiedzialne za przebudowę naczyń nie są dokładnie wyjaśnione. Dojrzałe anastomozy histologicznie różnią się bardzo nieznacznie od normalnych tętnic. Natomiast anatomicznie są dużo bardziej kręte. Krążenie oboczne rozwija się dość szybko poprzez uruchomienie istniejących anastomoz i równie szybko ulega regresji gdy dochodzi do udrożnienia zamkniętego naczynia. Najczęściej okluzja dużego naczynia tętniczego zastępowana jest nie przez jedno duże naczynie ale przez kilka mniejszych. W miarę jak rozwija się krążenie oboczne, pomniejsze naczynka ulegają regresji, a większe rozrastają się tworząc wydajny system. Niemniej, w optymalnych warunkach krążenie oboczne jest w stanie zapewnić jedynie 40% pierwotnego przepływu [15].

Arteriogeneza i angiogeneza różnią się również miejscem, z którego zaczynają się tworzyć kolaterale. Przykładowo, po podwiązaniu tętnicy udowej na modelu zwierzęcym do arteriogenezy dochodzi w górnej części kończyny. Proces polega na uruchomieniu anastomoz pomiędzy bliższymi i dalszymi bocznymi odgałęzieniami, w bezpośrednim sąsiedztwie okluzji. Natomiast do angiogenezy dochodzi w dolnych partiach kończyny i w stopie, daleko od miejsca powstawania nowych tętnic [16].

Wbrew ogólnym przekonaniom, naczynia utworzone w procesie angiogenezy nie są w stanie zastąpić wyłączanej tętnicy. Zbyt wiele kapilar musiałoby powstać, aby zapewnić ten sam przepływ. Ponadto powstałaby ogromna ilość nowej tkanki,

czasem większa niż narząd, który miałaby zaopatrywać w krew [17].

Różnice pomiędzy arteriogenezą a angiogenezą dotyczą również środowiska pod którego wpływem do danego procesu dochodzi. Angiogeneza zachodzi w niedokrwionych tkankach, natomiast arteriogeneza odbywa się w warunkach właściwego zaopatrzenia w tlen. W mięśniu sercowym, gdy odległości pomiędzy obszarem niedokrwionym a rejonem tworzenia krążenia obocznego są niewielkie, zjawisko to trudno uzasadnić. Jednakże rozróżnienie to jest ewidentne na obwodzie. Hipoksja stymuluje wzrost HIF, a w efekcie ekspresję angiogennych czynników wzrostu. Deindl i wsp. zbadali poziom VEGF i jego receptorów po podwiązaniu tętnicy udowej kończyny królika [18]. Okazało się, że arteriogeneza nie wiązała się ze wzrostem ekspresji VEGF i HIF. Rozwój anastomoz wzrastał pod wpływem MCP-1, ale infuzja VEGF nie przyniosła żadnego efektu [18].

Tabela 3. Różnice pomiędzy angiogenezą i arteriogenezą.

	Angiogeneza	Arteriogeneza
Definicja	Tworzenie nowych naczyń z uprzednio istniejących przez rozgałęzianie i wydłużanie	Wzrost i przebudowa istniejących kolaterali
Źródło	Istniejące kapilary	Istniejące tętniczki
Umiejscowienie	Obszar poniżej zamkniętego naczynia	Obszar powyżej zamkniętego naczynia
Środowisko	Hipoksja	Normoksja
Bodziec	Niedotlenienie	Rozciągnięcie naczynia
Mechanizm na poziomie komórkowym	Stan zapalny spowodowany ogniskowym uszkodzeniem niedokrwionym	Stan zapalny spowodowany nadmiernym rozciągnięciem naczynia
Maksymalny wzrost przepływu	1,5 – 1,7x	10-20x
Całkowita kompensacja skutków zamknięcia naczynia	Niemożliwa	Możliwa

Podsumowując, hipoksja jest niezbędna do rozpoczęcia procesu angiogenezy. Arteriogeneza jest indukowana czynnikami mechanicznymi. Arteriogeneza następuje znacznie szybciej niż angiogeneza, ponieważ otwierają się już istniejące anastomozy, a równolegle dochodzi do mitozy wszystkich rodzajów komórek budujących naczynie. Dzięki temu organizm jest w stanie przywrócić właściwy przepływ krwi już w 3 dni [16].

Tabela 4. Charakterystyka najważniejszych czynników wzrostu i inhibitorów angiogenezy.

Czynnik wzrostu	Charakterystyka
VEGF	Odpowiada za początkowy rozkurcz naczyń przez wzrost produkcji NO, a także zwiększa przepuszczalność naczyń. Ponadto, indukuje syntezę aktywatorów plazminogenu i MMP-1 w komórkach endotelialnych. Wzmaga proliferację komórek śródbłonna, chroni je przed apoptozą i stymuluje ich migrację. VEGF wiąże się z dwoma receptorami: VEGF-R1 (flt-1) i VEGF-R2 (flk-1/KDR).
FGF	FGF-1 (FGF α) i FGF-2 (FGF β) działają chemotaktycznie i mitogennie na komórki śródbłonna, fibroblasty i wiele innych komórek. FGF-2 wzmaga ekspresję VEGF i integryn oraz innych molekuł adhezyjnych na komórkach endotelialnych. Indukuje tworzenie trójwymiarowej struktury naczyń.
Angiopoetyny	Substancje te działają specyficznie na komórki śródbłonna. Ang-1 jest wydzielana przez komórki mięśniówki gładkiej. Łącząc się z receptorem Tie-2 odpowiada za dojrzewanie i stabilizację nowopowstałego naczyń. Ang-2 jest substancją pro- albo antyangiogenną w zależności od rodzaju stymulacji. W obecności VEGF Ang-2 powoduje wzrost średnicy naczyń, indukuje migrację i proliferację komórek śródbłonna i stymuluje wzrost nowych naczyń. Bez VEGF Ang-2 powoduje apoptozę komórek i regresję naczyń krwionośnych.
TGFβ	Izoformy TGF β są wydzielane jako nieaktywne prekursor, które muszą być aktywowane przez proteazy, niskie pH lub ciepło. Komórki śródbłonna i pericyty produkują TGF β i posiadają dla niego receptor. TGF β 1 może być zarówno czynnikiem angiogennym jak i inhibitorem angiogenezy. Niskie stężenia tej substancji (<0,5 ng/ml) stymulują proliferację komórek endotelialnych i tworzenie trójwymiarowych struktur in vitro, natomiast wysokie stężenia powodują odwrotny skutek. TGF β 2 w niskich stężeniach

	nie stymuluje angiogenezy in vitro, ale w wysokich indukuje tworzenie struktury trójwymiarowej. TGF β ogranicza degradację macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez aktywowanie inhibitorów proteaz, np. TIMP. In vivo TGF wzmacnia angiogenezę poprzez rekrutację komórek zapalnych, które wydzielają proangiogenne cytokiny. TGF wpływa również na różnicowanie komórek śródbłonna i mięśniówki gładkiej.
TNFα	Jest to cytokina prozapalna wydzielana przez monocyty, astrocyty, fibroblasty i komórki mięśniówki gładkiej. W niskich dawkach umożliwia proliferację komórek endotelialnych i tworzenie struktur trójwymiarowych, zaś w wysokich zachowuje się jak inhibitor angiogenezy. Podobnie jak TGF TNF α indukuje tworzenie nowych naczyń in vivo poprzez swoje właściwości prozapalne. Aktywność angiogenna TNF α ustaje pod wpływem INF γ .
CXC	Chemokiny CXC z motywem ELR (Glu-Leu-Arg) mają działanie angiogenne. Do tej grupy należą GRO, IL-8, GCP-2, ENA-78. Mają działanie chemotaktyczne na komórki endotelialne. Chemokiny CXC bez motywu ELR (MIG, IP-10, PF4) są inhibitorami angiogenezy. Działają nie tylko antagonistycznie do ELR(+) CXC, ale również hamują VEGF i FGF.

1.1.1. Epidemiologia cukrzycy

Według raportu WHO ze stycznia 2011 roku 220 milionów ludzi na świecie choruje na cukrzycę [19].

85% wszystkich przypadków choroby w populacji rasy białej na świecie stanowi cukrzyca typu 2. Obserwuje się stały wzrost zachorowań i przewiduje się, że w roku 2025 dojdzie do wzrostu liczby chorych na cukrzycę na świecie sięgając 334 milionów [20].

Najwięcej nowych przypadków notuje się w krajach wysoko rozwiniętych, ze względu na starzejące się społeczeństwo i niezdrowy styl życia: brak aktywności fizycznej i dietę wysokokaloryczną. Jednakże szacunki zakładają, iż gwałtowny wzrost zapadalności na cukrzycę wystąpi głównie w krajach rozwijających się, takich jak

Chiny i Indie [20,21].

W Europie wskaźnik chorobowości waha się pomiędzy 5 a 7%. W Polsce, na podstawie badania Screen-Pol określono, że cukrzyca typu 2 dotyczy 12 – 15% chorych po 40. roku życia zgłaszających się do lekarza podstawowej opieki zdrowotnej. Według danych z badania Natpol Plus na cukrzycę w Polsce choruje co najmniej 1,6 miliona osób [22].

Częstość występowania cukrzycy typu 2 w populacji polskiej szacowano na około 5,3% na podstawie danych z 2000 roku. Jednakże aktualniejsze dane, opublikowane w 2009 roku pokazują, że częstość cukrzycy w populacji ogólnej jest wyższa i wynosi 6,54%. Wzrasta również częstość rozwoju upośledzonej tolerancji glukozy, stanu poprzedzającego wystąpienie cukrzycy [23]. W 2011 roku ukazało się badanie Sieberta i wsp. opierające się na danych wprowadzonych do internetowego programu „Ryzyko”. 6,3% internautów zadeklarowało obecność zaburzeń gospodarki węglowodanowej [24].

Struktura wiekowa pacjentów z cukrzycą w krajach wysoko rozwiniętych i rozwijających się jest znacząco odmienna. W krajach rozwiniętych choroba ta dotyczy częściej grupy wiekowej powyżej 60. roku życia, natomiast w krajach rozwijających się szczyt zachorowań przypada między 45 a 64 rokiem życia. W ostatnich latach obserwuje się stały wzrost zachorowań na cukrzycę typu 2 również u dzieci i młodzieży.

Różnice można zauważyć również w kontekście płci pacjentów z cukrzycą. W 1995 roku na świecie było więcej kobiet niż mężczyzn z cukrzycą. Nadmiar kobiet silnie zaznaczał się w krajach rozwiniętych, natomiast w krajach rozwijających się obserwowano jednakowe proporcje płci u osób cierpiących na cukrzycę [20].

1.1.2. Angiogeneza w kontekście powikłań naczyniowych cukrzycy typu 2

Wraz z rosnącą liczbą nowych przypadków cukrzycy rośnie potrzeba poznania przyczyn tej przewlekłej choroby. Pomimo skutecznego leczenia naczyniowe

komplikacje pozostają wiodącą przyczyną zgonu u pacjentów z cukrzycą [20]. Oprócz zmiany nawyków żywieniowych i stylu życia poszukuje się również alternatywnych metod leczenia cukrzycy celem ograniczenia epidemii chorób sercowo-naczyniowych.

Uszkodzenie naczyń spowodowane cukrzycą manifestuje się dysfunkcją śródbłónka. Dochodzi do zmian strukturalnych dużych i małych naczyń krwionośnych, co w konsekwencji prowadzi do hipoperfuzji i niedotlenienia tkanek. U pacjentów z cukrzycą dochodzi do przyspieszonej miażdżycy prowadzącej do ostrych zespołów wieńcowych, zawału serca, niedokrwienia kończyn dolnych i udarów [25]. Pomimo rozwoju technik inwazyjnych, pacjenci obciążeni cukrzycą mają gorsze rokowanie, a plastyka tętnic wieńcowych częściej kończy się u nich restenozą lub zgonem [26]. Co więcej, cukrzyca w dużej mierze uniemożliwia reperfuzję niedokrwionych obszarów poprzez rozwój krążenia obocznego [27]. Abaci i wsp. przeanalizowali wyniki koronarografii 205 pacjentów porównując je do wyników grupy z podobnymi zmianami bez cukrzycy. Okazało się, że u pacjentów z cukrzycą rozwój kolaterali naczyń wieńcowych był znacząco mniejszy niż u osób z prawidłową gospodarką węglowodanową [27].

Do podobnych wniosków doszli van Golde i wsp. badając tworzenie nowych naczyń na modelu zwierzęcym. Przewlekła hiperglikemia negatywnie wpływa na poszczególne etapy angiogenezy; zaburzenia można zaobserwować zarówno na etapie rozkurczu naczynia jak i podczas wytwarzania nowych struktur naczyniowych, dochodzi również do zahamowania chemotaksji monocytów. Zaburzenia są najbardziej wyraźne w ostrej fazie niedokrwienia [28].

Kiedy naczynie wieńcowe ulega całkowitemu lub częściowemu zatkaniu, w ciągu sekund dochodzi do zmian metabolicznych i strukturalnych w mięśniu sercowym [29]. Te wczesne zmiany umożliwiają przetrwanie komórki i zachowanie funkcji miokardium [30].

HIF-1 α jest czynnikiem produkowanym w odpowiedzi na spadek ciśnienia

parcjalnego tlenu w komórkach i aktywuje transkrypcję genów odpowiedzialnych za procesy adaptacyjne w stanie hipoksji. Substancja ta aktywuje czynniki wzrostu, np. VEGF oraz syntazę tlenku azotu. Ekspresja HIF-1, VEGF oraz NO umożliwia ograniczenie uszkodzenia spowodowanego niedoborem tlenu poprzez wzmożoną angiogenezę i zmiany strukturalne w naczyniach [31].

Marfella i wsp. ocenili ekspresję HIF-1 i VEGF w biopsjach mięśnia sercowego uzyskanych od pacjentów z cukrzycą i bez niej podczas zabiegu pomostowania tętnic wieńcowych. U pacjentów bez cukrzycy poziom HIF-1 i VEGF był istotnie wyższy w porównaniu z grupą cukrzycową. Ponadto wzrost ekspresji tych czynników był ograniczony wyłącznie do miejsca niedokrwienia [32]. Zwraca się uwagę na fakt, że niektóre doniesienia wykazały wzrost VEGF i procesów angiogennych w retinopatii i nefropatii cukrzycowej. Świadczy to o istnieniu lokalnych mechanizmów regulacyjnych, różnych dla tkanki mięśniowej i najmniejszych naczyń.

Rozbieżności pomiędzy poziomami ekspresji czynników wzrostu w mięśniu sercowym, siatkówce i kłębuszkach nerkowych skłoniły Chou i wsp. do oceny wpływu cukrzycy, insulinooporności i terapii insuliną na wspomniane tkanki. Ekspresja mRNA VEGF i samego białka oraz jego receptorów VEGF-R1 i VEGF-R2 w mięśniu sercowym była obniżona o 40 do 70 % zarówno u zwierząt z insulinoopornością jak i cukrzycą. Dwukrotne obniżenie poziomu VEGF i VEGF-R2 zaobserwowano w komorach serca modelu zwierzęcego w porównaniu do grupy zdrowej. Natomiast w siatkówce oka i kłębuszkach nerkowych dochodziło do dwukrotnego wzrostu ekspresji VEGF u zwierząt z insulinoopornością i cukrzycą. Terapia insuliną prowadziła do normalizacji poziomów czynników wzrostu zarówno w tkance sercowej jak i mikronaczyniach. Autorzy zasugerowali, że ze względu na fakt, że do zmian dochodziło już na etapie insulinooporności bez klinicznych objawów cukrzycy, nie tylko hiperglikemia ale również inne czynniki metaboliczne mogą mieć wpływ na regulację poziomu czynników wzrostu [33].

Kolejne badania dostarczyły nowych faktów. Sasso w wsp. zaobserwowali

podwyższony poziom VEGF w mięśniu sercowym pacjentów z przewlekłą niedokrwinną chorobą serca oraz cukrzycą, jednak poziom receptorów był obniżony. Wynika z tego, że upośledzenie neoangiogenezy może odpowiadać brak transdukcji sygnałów do komórki [34,35].

Badania Chen i Stinnett zdają się potwierdzać tą hipotezę. Okazuje się, że w komórkach endotelialnych mięśnia sercowego myszy narażonych na działanie hiperglikemii dochodzi do istotnego wzrostu poziomu angiopoetyny-2 i zmniejszenia ekspresji Tie-2 [36]. Angiopoetyna-1 (Ang-1) i angiopoetyna-2 (Ang-2) są ligandami dla receptora Tie-2 obecnego na komórkach endotelium. Równowaga pomiędzy poziomami angiopoetyn a poziomem receptora dla nich ma kluczowe znaczenie dla zachowania integralności naczynia. Angiopoetyny nie odgrywają znaczącej roli w proliferacji komórek endotelialnych; Ang-1 ma wpływ na przeżycie komórek. Ang-2 jest naturalnym antagonistą Ang-1 i zapobiega nadmiernemu rozrostowi naczyń. Niektóre doniesienia sugerują, że angiopoetyny mogą mieć znaczenie w regulacji procesów zapalnych, ponieważ Ang-1 ma działanie przeciwzapalne i przeciwmiażdżycowe [37]. Wzrost Ang-2, bez równoległego wzrostu Ang-1 sprzyja zakłóceniom procesu angiogenezy. Sytuacja taka ma miejsce w cukrzycy. Przesunięcie równowagi Ang-1/Ang-2 na korzyść Ang-2 prowadzi do znaczącego wzrostu obszaru uszkodzenia mięśnia sercowego na skutek zawału oraz apoptozy komórek miokardium [38].

Upośledzenie tworzenia nowych naczyń krwionośnych zależy również od zmian w sieci genów odpowiedzialnych za fizjologiczne procesy rewaskularyzacyjne. W niedokrwionych kończynach myszy pozbawionych receptora dla leptyny (zwierzęcy model cukrzycy typu 2) nie dochodzi do ekspresji VEGF-A, łożyskowego czynnika wzrostu, elastyny oraz neuropiliny-1 i neuropiliny-2. Z informacji tych wynika, że organizm z cukrzycą nie potrafi właściwie aktywować procesu rewaskularyzacji w warunkach niedotlenienia [39].

Cukrzyca typu 2 ma wpływ na każdy etap regulacji procesu angiogenezy.

Angiostatyna, silny inhibitor angiogenezy, hamuje działanie VEGF i ogranicza rozwój nowych naczyń krwionośnych. Metaloproteinazy macierzowe (matrix metalloproteinases, MMP) regulują angiogenezę zarówno poprzez rozkładanie macierzy pozakomórkowej, co umożliwia migrację komórek endotelialnych, jak i syntezę angiostatyny. Angiostatyna powstaje z plazminogenu rozkładanego przez metaloproteinazę MMP-2, MMP-7, MMP-9 i MMP-12. MMP-2 i MMP-9 są produkowane przez mięśniówkę gładką i komórki endotelialne, zaś MMP-7 i MMP-12 są wydzielane głównie przez makrofagi. Aktywacja metaloproteinaz jest regulowana na poziomie transkrypcji, aktywacji proenzymu i inhibitorów metaloproteinaz (TIMP-1 i TIMP-2). Zaburzenie regulacji MMP/TIMP może przyczyniać się do hamowania angiogenezy obserwowanej u pacjentów z cukrzycą [40,41].

Regulacja kaskady metaloproteinaz w cukrzycy jest dobrze poznana. Hiperglikemia zwiększa aktywność i ekspresję MMP-2 i MMP-9 w mięśniówce gładkiej aorty, tkance naczyniowej i surowicy [42]. Chung i wsp. udowodnili, że u pacjentów z cukrzycą aktywność MMP-2 i MMP-9 preferencyjnie wzrasta, czego konsekwencją jest wzrost stężenia angiostatyny o 67% [40].

Podobne badanie z udziałem angiostatyny i endostatyny przeprowadzili Sodha i wsp [43]. Ekspresja endostatyny w mięśniu sercowym wzrastała dwukrotnie u pacjentów z cukrzycą, a jej poziom silnie korelował z poziomem HbA1c.

Niezwykłe ciekawe badanie opublikowali Zhu i wsp. Opierając się na wcześniejszych doniesieniach, że poziom VEGF wzrasta podczas niedokrwienia mózgu, szczególnie w obszarze penumbry, a dokomorowe podanie VEGF wzmacnia angiogenezę mózgową, postanowili zbadać jak zachowuje się VEGF i angiostatyna u pacjentów po udarze z cukrzycą. Okazało się, że w grupie z cukrzycą istotnie obniżona była gęstość naczyń. Ponadto zaobserwowano znacząco podwyższony poziom angiostatyny i aktywność MMP-9, z równoczesnym istotnym obniżeniem poziomu VEGF [44].

Ponieważ komórki endotelialne, zlokalizowane pomiędzy strumieniem krwi a ścianą naczynia, pozbawione są zdolności regulacji napływu glukozy, są silnie narażone na uszkodzenia spowodowane cukrzycą [45]. Cukrzyca wiąże się ze stopniowym wzrostem apoptozy komórek endotelialnych. Wysoki poziom glukozy, oksydowane LDL, $\text{TNF}\alpha$, lipopolisacharydy bakteryjne, stres oksydacyjny, przepływ turbulentny w naczyniach przyczyniają się do planowej śmierci komórek [46].

Wzrost przepuszczalności śródbłonna jest wczesnym markerem jego dysfunkcji. Zmiany w tej fizjologicznej barierze uszkadzają funkcje różnych narządów poprzez akumulację białek surowicy w przestrzeni śródmiąższowej. Dochodzi do zaburzeń transportu płynów i substancji odżywczych do komórek docelowych. W rezultacie tkanki stają się bardziej wrażliwe na wszelkie uszkodzenia. Z tego powodu mikroalbuminuria jest tak istotnym parametrem i celem terapeutycznym powikłań naczyniowych u pacjentów z cukrzycą. Dlaczego dochodzi do wzrostu przepuszczalności śródbłonna nie jest do końca jasne. Scalia i wsp. zasugerowali, że hiperglikemia prowadzi do wzrostu ekspresji μ -kalpainy w mikrokrążeniu, czego skutkiem jest dysfunkcja śródbłonna. Kalpainy są grupą zależnych od wapnia proteaz cysteinowych. Odgrywają kluczową rolę w procesie zapalnej przebudowy naczyń poprzez proliferację i migrację komórek mięśniówki gładkiej i aktywację płytek [47].

Co więcej, do uszkodzeń śródbłonna prowadzi również wzrost poziomu końcowych produktów glikacji białek (AGE). Glikozylacja powoduje ilościowe i jakościowe zmiany w składnikach macierzy zewnątrzkomórkowej. Akumulacja AGE w błonie podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej powoduje wytworzenie swoistej „pułapki” dla lokalnych makromolekuł. AGE zmieniają właściwości kolagenu, witronektyny i lamininy. Zatrzymanie kolagenu typu I i elastyny powoduje wzrost ich ilości w macierzy zewnątrzkomórkowej. W efekcie dochodzi do wzrostu sztywności naczynia krwionośnego [48]. Natomiast glikozylacja białek wewnątrzkomórkowych w komórkach endotelialnych narażonych na działanie wysokich stężeń glukozy doprowadza między innymi do zmian w funkcji białek odpowiedzialnych za wzrost komórki i uruchamianie szlaków sygnałowych.

Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów jest magazynowany w komórce i uwalniany dopiero w momencie uszkodzenia śródbłónka. W środowisku hiperglikemii β FGF traci swoje zdolności mitogenne na skutek glikozylacji nawet w 90% [48,49].

W najdrobniejszych naczyniach krwionośnych komórki endotelialne i blaszka podstawna są otoczone przez nieciągłą warstwę pericytów, które pozostają w bezpośrednim kontakcie z komórkami endotelialnymi poprzez przerwy w blaszce podstawnej. Podobnie zachowują się podocyty w kłębuszkach nerkowych. Komórki te regulują przeżycie komórek endotelialnych, ich proliferację i migrację oraz stabilizują nowo utworzone naczynia w procesie angiogenezy. Pericyty posiadają wiele cech wspólnych z komórkami mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych na przykład zdolność do kurczenia się pod wpływem bodźca wazoaktywnego. Co więcej oba rodzaje komórek pochodzą od wspólnej komórki progenitorowej [45].

W warunkach fizjologii tlen powoduje kurczenie się pericytów. Jednakże wysoki poziom stresu oksydacyjnego wywołany przez hiperglikemię i AGE indukuje apoptozę pericytów w mechanizmie podobnym jak w komórkach endotelialnych. Uszkodzenie pericytów prowadzi do niekontrolowanego rozrostu niedojrzałych i nieszczelnych naczyń, które łatwo pękają przyczyniając się do krwotoków, co w retinopatii cukrzycowej często prowadzi do utraty wzroku [50].

Dyskutując na temat szkodliwego wpływu cukrzycy na kolejne etapy procesu angiogenezy i rozwój powikłań naczyniowych warto wspomnieć o roli endotelialnych komórek progenitorowych (EPC). EPC są mobilizowane ze szpiku kostnego do krążenia obwodowego w odpowiedzi na różne bodźce, takie jak czynniki wzrostu i cytokiny uwalniane zarówno przez niedokrwione lub uszkodzone tkanki, jak i w procesach fizjologicznych, takich jak wzrost tkanek. Kiedy EPC przylegają do śródbłónka, pełnią rolę swoistej łąty, odbudowującej uszkodzone endotelium. W sprzyjających warunkach, tzn. obecności czynników wzrostu i substancji odżywczych endotelialne komórki progenitorowe proliferują i organizują się w trójwymiarowe struktury, które dołączane są do istniejących naczyń, tworząc

nowe kolaterale. Podsumowując, EPC pełnią dwie niezwykle ważne dla krążenia funkcje: naprawczą dla uszkodzonego śródbłónka i tworzą nowe struktury naczyniowe [51]. Niestety hiperglikemia zaburza ten proces zarówno poprzez redukcję liczby krążących komórek progenitorowych, jak i ograniczenie zdolności do tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Redukcja liczby EPC dokonuje się już w stanie przedcukrzycowym takim jak nieprawidłowa glikemia na czczo i upośledzona tolerancja glukozy [52]. Mechanizmy, które są odpowiedzialne za obniżenie liczby EPC to: słaba mobilizacja ze szpiku kostnego, obniżona proliferacja i krótsze przeżycie [53]. Yan i wsp. przeprowadzili niedawno badanie oceniające poziom EPC w modelu zwierzęcym cukrzycy typu 1 i typu 2 po kontrolowanym niedokrwieniu kończyny dolnej. Niedokrwienie nie wywołało wzrostu liczby komórek progenitorowych w żadnej z badanych grup, natomiast liczba ta istotnie wzrosła w grupie kontrolnej. Ponadto w grupie zwierząt z cukrzycą typu 2 wytwarzanie struktur naczyniowych było mniej efektywne niż w grupie szczurów z cukrzycą typu 1 [54].

Warto się również przyjrzeć wpływom leków przeciwcukrzycowych na wzrost nowych naczyń i regenerację śródbłónka. W niniejszej pracy wspomniano już o roli insuliny na poziom czynników wzrostu i ich receptorów [33]. W badaniu UKPDS wykazano, że leczenie metforminą wiąże się z redukcją powikłań makronaczyniowych w porównaniu z innymi sposobami leczenia. Legtenberg i wsp. zaobserwowali, że metformina znacząco poprawia funkcję mięśnia sercowego po przejściowym incydencie niedokrwinnym [55]. Sporo ciekawych badań ukazało się na temat tiazolidynedionów. Pioglitazon i roziglitazon zmniejszają oporność na insulinę wiążąc się selektywnie z receptorem PPAR- γ . Receptor PPAR- γ reguluje ekspresję genów zaangażowanych w metabolizm glukozy, kwasów tłuszczowych i cholesterolu. Pioglitazon ma działanie dwukierunkowe; redukuje wysoki poziom glukozy uwrażliwiając tkanki na insulinę i wpływa na metabolizm lipidów a także hamuje ekspresję genów odpowiedzialnych za odpowiedź zapalną i tworzenie płytek miażdżycowych [56]. Vijay i wsp. przeprowadzili badanie porównujące działanie

rozigitazonu i pioglitazonu i oceniające ich wpływ na mediatory dysfunkcji śródbłonna, markery angiogenezy i cytokiny zapalne w cukrzycy typu 2. Oba tiazolidynediony znacząco obniżają poziom mediatorów dysfunkcji endotelium i doprowadzają do wzrostu poziomu markerów angiogenezy (w tym badaniu VEGF, IL-8, angiogeniny). CRP i TNF α są obecnie uważane za indykatory uszkodzenia śródbłonna. Ponadto CRP silnym niezależnym czynnikiem predykcyjnym zawału serca i udaru. Natomiast TNF α uwalniany przez tkankę tłuszczową wpływa na rozwój insulinooporności. Tiazolidynediony prowadzą do istotnego spadku poziomu CRP i TNF α w surowicy. Niestety jest również druga strona medalu. Istnieje niebezpieczeństwo, że stymulacja angiogenezy przez te leki może być odpowiedzialna za rozrost nowotworowy [57].

Hormony inkretynowe, GLP-1 (glucagon-like peptide-1) i GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide) w odpowiedzi na napływ składników odżywczych, są ważnymi regulatorami homeostazy węglowodanowej. GLP-1 wzmacnia wytwarzanie i wydzielanie insuliny w komórkach beta trzustki, jak również stymuluje proliferację i zapobiega apoptozie komórek beta. Ponadto zapobiega wzrostowi poziomu glukozy poprzez hamowanie wydzielania glukagonu przez komórki alfa oraz pośrednio przez hamowanie apetytu i opróżniania żołądka [58].

Niedawne badania wskazują, że GLP-1 może mieć korzystny wpływ na układ sercowo-naczyniowy niezależnie od wpływu na metabolizm glukozy i lipidów. Receptory GLP-1 znaleziono w komórkach mięśnia sercowego i niektórych obszarach mózgu, regulujących funkcje autonomiczne. Substancja ta podnosi ciśnienie tętnicze i przyspiesza akcję serca poprzez aktywację układu współczulnego. Ponadto GLP-1 może działać ochronnie na czynność lewej komory serca po incydencie niedokrwinnym [59], jak również w stabilnej chorobie wieńcowej [60]. W cukrzycy typu 2 i zaburzeniach tolerancji glukozy działanie inkretyn jest osłabione albo nie występuje w ogóle [61]. Liu i wsp. doszli do wniosku, że podawanie dawek terapeutycznych GLP-1 zapobiega dysfunkcji śródbłonna i przedwczesnej miażdżycy przez hamowanie TNF α , a w konsekwencji PAI-1 w komórkach endotelialnych [62].

Natomiast Arakawa i wsp. udowodnili, że podawanie exenatydu (agonisty receptora GLP-1) redukowało akumulację monocytów i makrofagów w ścianie naczynia tętniczego poprzez hamowanie odpowiedzi zapalnej w makrofagach, tym samym zapobiegając rozwojowi płytki miażdżycowej [63].

1.1.1.1 Retinopatia cukrzycowa

Za zaburzenia widzenia w cukrzycy w dużej mierze odpowiada proces tworzenia nowych naczyń. Z klinicznego punktu widzenia retinopatię dzielimy na przedproliferacyjną i proliferacyjną. Niemal wszyscy pacjenci z cukrzycą typu 1 i ponad połowa pacjentów z cukrzycą typu 2 rozwija retinopatię cukrzycową po dwóch dekadach trwania choroby [64]. Do najczęstszych zmian patofizjologicznych należą: pogrubienie błony podstawnej najmniejszych naczyń, utrata pericytów, mikrowłóśniaki, zwiększona przepuszczalność naczyń, wysięki twarde i mikrozawały siatkówki. W zaawansowanej fazie choroby dochodzi do nowotworzenia naczyń. Są one jednak pozbawione warstwy mięśniowej, co powoduje, że często dochodzi do ich pęknięcia i w konsekwencji do krwotoków [65].

Czynnik inicjujący powstawanie retinopatii cukrzycowej pozostaje nieznany do dzisiaj. Wydaje się jednak, że jedną z najwcześniejszych zmian jakie zachodzą w tym powikłaniu jest spadek przepływu w naczyniach siatkówki [66]. W odpowiedzi na zmniejszony napływ tlenu i składników odżywczych do siatkówki uruchamiane są komórkowe szlaki sygnałowe, takie jak szlak kinazy białkowej C. W konsekwencji wzrasta przepuszczalność naczyń, ponieważ dochodzi do naruszenia bariery krew-siatkówka. Specyficzne połączenia między komórkami endotelialnymi są podstawą utrzymania bariery krew-siatkówka. Wzrost przepuszczalności naczyń w cukrzycy wiąże się z fosforylacją i reorganizacją tych właśnie połączeń międzykomórkowych [67]. Substancje wazokonstrykcyjne, takie jak endotelina-1 mogą przyczyniać się do zmniejszenia przepływu krwi przez naczynia siatkówki. Zhu i wsp. udowodnili, że wzrost ET-1 jest związany z aktywacją kinazy białkowej C na wczesnym etapie cukrzycy [68]. Dochodzi do powstania przewlekłego stanu zapalnego, czego efektem

jest leukostaza i zamykanie naczyń krwionośnych. W procesie tym pośredniczą między innymi CD18 i ICAM-1 [69,70,71]. Ponadto dochodzi do wzrostu ekspresji czynników wzrostu naczyń i wzmożonego wydzielania cytokin prozapalnych, takich jak IL-6, TNF α i IL-1 β [72,73]. W efekcie mamy do czynienia z postępującą hipoksją siatkówki. Rozpoczynają się procesy naprawcze.

Komórki endotelialne i pericyty mają wspólną błonę podstawną. W retinopatii cukrzycowej dochodzi do pogrubienia błony podstawnej, spowodowanego odkładaniem się nadmiernych ilości fibronektyny, lamininy i kolagenu IV [74,75]. Białka macierzy zewnątrzkomórkowej kolagen i elastyna pod wpływem wysokich stężeń glukozy w środowisku ulegają glikozylacji [76]. Zmiany w składzie błony podstawnej uniemożliwiają właściwe przyleganie sąsiadujących komórek, jak również ograniczony zostaje dostęp do czynników wzrostu [77].

Utrata pericytów pojawia się bardzo wcześnie i jest charakterystycznym objawem retinopatii cukrzycowej. Geraldles i wsp. wiążą zmniejszone przeżycie pericytów i tworzenie niepełnowartościowych naczyń w retinopatii cukrzycowej ze wzrostem aktywności kinazy białkowej C. Hiperglikemia aktywuje PKC i MAPK, czego efektem jest wzrost poziomu białka SHP-1 (Src homology-2 domain-containing phosphatase-1). Ta kaskada sygnałowa prowadzi do defosforylacji beta-receptora PDGF i zahamowania przekazywania sygnałów tą ścieżką. W rezultacie dochodzi do apoptozy pericytów [78]. Pfister i wsp. zaproponowali inną koncepcję. Według autorów badania hiperglikemia indukuje wzrost poziomu angiopoetyny-2. Ta z kolei wpływa na odrywanie się pericytów od błony podstawnej i ich migrację do przestrzeni okołonaczyniowej [79]. W dojrzałych naczyniach krwionośnych angiopoetyna-1 pochodząca z pericytów przeważa nad angiopoetyną-2, prowadząc do fosforylacji Tie-2 w komórkach endotelialnych. Aktywacja Tie-2 kontroluje proliferację komórek śródbłonna i przyczynia się do zacieśniania połączeń międzykomórkowych. W ten sposób stabilizuje sieć naczyniową siatkówki i wytwarza barierę krew-siatkówka. Wzrost stężenia Ang-2 przyczynia się do regresji naczyń mimo odpowiednich warunków tlenowych [79].

Wczesne zmiany w narządzie wzroku pacjentów z cukrzycą prowadzą do niedotlenienia siatkówki i zapoczątkowania procesów naprawczych, które mają za zadanie zapewnienie właściwego poziomu perfuzji niedokrwionej tkanki. Klinicznym wyrazem tych zjawisk jest retinopatia proliferacyjna. Na tym etapie choroby dochodzi do znaczącego wzrostu poziomu czynników wzrostu [80]. Wiele rodzajów komórek jest zdolnych do produkcji VEGF: pericyty, komórki endotelialne, komórki Mullera i astrocyty. Poziom VEGF w cieple szklistym jest dwukrotnie wyższy u osób z retinopatią proliferacyjną niż u osób bez retinopatii, pomimo podobnego poziomu wyrównania glikemii. Warto podkreślić, że poziom VEGF wraca do normy po zabiegu fotokoagulacji [81,82]. Zabieg laserowy powoduje również wzrost poziomu angiostatyny w cieple szklistym [83].

Niezwykle ciekawego odkrycia dokonali Marek i wsp. Porównywali oni poziom VEGF i angiogeniny w surowicy i cieple szklistym. Pomimo proangiogennego charakteru obu substancji, poziom angiogeniny jest obniżony w cieple szklistym, a u osób z cukrzycą powikłaną retinopatią dochodzi do dwukrotnego obniżenia jej poziomu. Autorzy zasugerowali, że angiogenina nie jest odpowiedzialna za rozwój neowaskularyzacji w przebiegu retinopatii cukrzycowej. Ponadto zadali pytanie o ewentualną możliwość wykorzystania angiogeniny w terapii proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej [84].

1.1.1.2 Nefropatia cukrzycowa

Angiogenne czynniki wzrostu są niezbędne do prawidłowego rozwoju nerek, a także w utrzymaniu właściwej struktury kłębuszków i przesączania kłębuszkowego w dorosłym narządzie. Fizjologiczny poziom VEGF i angiopoetyny-1 odpowiadają za ścisłe przyleganie komórek budujących kłębuszek nerkowy i prawidłowe przesączanie. Efektem ubocznym terapii przeciwciałami przeciwko VEGF w chorobach nowotworowych jest proteinuria. Nefropatia cukrzycowa dotyka 30 do 40% pacjentów z cukrzycą typu 2, i jest najczęstszym schorzeniem prowadzącym do schyłkowej niewydolności nerek [85]. Wczesne zmiany obejmują przede wszystkim

hiperfiltrację kłębuszkową, przerost śródbłonna kłębuszków i cewek nerkowych i rozwój mikroalbuminurii. Kolejnym etapem jest pogrubienie błony podstawnej kłębuszków, akumulacja składników macierzy zewnątrzkomórkowej w mezangium i ostatecznie stopniowy zanik funkcji nerek [86]. Liczne badania wskazują, że wzrost powierzchni przesączania w cukrzycy jest wynikiem tworzenia się nowych naczyń krwionośnych a także wydłużania już istniejących kapilar. Analogiczne zmiany obserwuje się w retinopatii cukrzycowej [87].

Intensywna kontrola glikemii, hiperlipidemii i ciśnienia tętniczego redukuje ryzyko wystąpienia nefropatii cukrzycowej, jednak nie są wystarczające aby zapobiec postępowi choroby [88].

Czynniki wzrostu pełnią istotną rolę w rozwoju cukrzycowej choroby nerek. TGF β w kłębuszkach nerkowych jest odpowiedzialny za wzrost produkcji i zmniejszone rozkładanie białek macierzy zewnątrzkomórkowej takich jak fibronektyna i kolagen [88]. Kolejnym czynnikiem wzrostu zaangażowanym w DN jest VEGF. Udowodniono, że poziom VEGF wzrasta już na wczesnym etapie choroby [89,90]. Ponadto Zhang i wsp. zauważyli, że w modelu zwierzęcym cukrzycy dochodzi do znaczącego obniżenia poziomu angiostatyny, silnego inhibitora angiogenezy. Natomiast podanie egzogennej angiostatyny wyraźnie poprawia funkcję nerek. Autorzy zasugerowali, że angiostatyna może pełnić rolę inhibitora stanu zapalnego i włóknienia w zdrowej nerce. W związku z tym obniżenie jej poziomu w cukrzycy przyczynia się do rozwoju nefropatii. Co więcej badanie to dostarczyło interesujących informacji na temat plazminogenu, prekursora angiostatyny. Okazuje się, że poziom tej substancji jest podwyższony u szczurów z nefropatią, co może świadczyć albo o zaburzeniu ekspresji genów dla plazminogenu albo zmniejszonej aktywności enzymów proteolitycznych uczestniczących w rozkładzie plazminogenu. Autorzy przychylają się do tej drugiej tezy, jako że zaobserwowano, że poziom i aktywność MMP-2 są obniżone w nerce cukrzycowej [88]. Badania z udziałem różnych inhibitorów angiogenezy (endostatyną, tumstatyną, NM-3) przeprowadzili również między innymi Yamamoto z zespołem. Badacze doszli do wniosku, że

zahamowanie angiogenezy zatrzymuje negatywne zmiany w nerkach zwierząt z cukrzycą. Ponadto powoduje ograniczenie utraty z moczem ważnych białek, na przykład nefrony, odpowiedzialnej za ścisłe połączenia między podocytami i utrzymywanie bariery filtracyjnej [91,92,93]. Warto w tym miejscu wspomnieć również o PEDF (pigment epithelium-derived factor). Jest to glikoproteina należąca do grupy inhibitorów proteaz serynowych o działaniu antyangiogennym, przeciwzapalnym, neuroprotektoryjnym i neurotropowym. W nerkach ekspresja PEDF jest wysoka i zapobiega rozwojowi nefropatii. Hiperglikemia zmniejsza poziom PEDF w komórkach mezangialnych kłębuszków. Z kolei PEDF hamuje nadmierną ekspresję TGF β i fibronektyny, głównych czynników odpowiedzialnych za DN. Co więcej substancja ta podwyższa ekspresję MMP-2 w nerce cukrzycowej, tym samym przyczyniając się do wzrostu poziomu inhibitorów angiogenezy [94].

Dokładny mechanizm powstawania nefropatii cukrzycowej ciągle nie został poznany. Wiadomo, że ważną rolę w rozwoju cukrzycowej choroby nerek pełni stan zapalny. Wzrost ekspresji cytokin prozapalnych, takich jak TNF α , MCP-1, ICAM-1 i IL-18 jest ściśle związany z uszkodzeniem nerek [95,96,97]. U myszy z cukrzycą pozbawionych genu dla ICAM-1 mikroalbuminuria i przerost kłębuszków nerkowych były znacząco mniejsze niż u myszy wytwarzających ICAM-1 [98].

Hiperglikemia powoduje wzrost ekspresji i syntezy angiotensynogenu w komórkach endotelialnych cewek nerkowych. Ponadto doprowadza do wzrostu produkcji angiotensyny II i receptora AT2. Angiotensyna II pośredniczy w hamowaniu aktywności metaloproteinazy-2 i wzroście wydzielania TGF β 1 oraz endoteliny-1. Zwierzęta z cukrzycą mają podwyższony poziom ANGII w porównaniu z grupą zdrowych osobników [99]. Uszkodzenie nerek może się dokonywać również poprzez zmiany w ilości receptorów AT1 i AT2 [100].

1.1.3. Neuropatia cukrzycowa

Istnieje wiele kontrowersji dotyczących patomechanizmu powstawania neuropatii cukrzycowej. Co najmniej kilka mechanizmów odgrywa rolę w

degeneracji obwodowych włókien nerwowych u pacjentów z cukrzycą. Wszystkie mechanizmy prowadzące do powstania powikłań cukrzycowych: szlak poliolowy, aktywacja kinazy białkowej C, nieenzymatyczna glikacja i zwiększona aktywność szlaku heksozaminy są źródłem stresu oksydacyjnego i wolnych rodników tlenowych (ROS). Akumulacja ROS ma bardzo szkodliwe działanie na komórki. Włókna nerwowe są szczególnie narażone na ich niszczące właściwości. Neurony czuciowe w środowisku wysokich stężeń glukozy wytwarzają duże ilości wolnych rodników, co w konsekwencji prowadzi do utraty regulacji potencjału na błonie mitochondrialnej i aktywacji kaspaz [101].

Nie ulega wątpliwości, że stres oksydacyjny przyczynia się do rozwoju neuropatii cukrzycowej. Natomiast nie ma zgodnej opinii co do tego, w jaki sposób stres oksydacyjny wpływa na komórki nerwowe. Część badaczy uważa, że hiperglikemia i stres oksydacyjny powodują apoptozę neuronów. Do takiej koncepcji przychylił się Schmeichel i wsp. [102]. Istnieje również alternatywna hipoteza sugerująca, że kluczową przyczyną neuropatii cukrzycowej jest brak insuliny. Udowodniono, iż wraz ze spadkiem poziomu insuliny nasila się uszkodzenie obwodowego układu nerwowego. Insulina i IGF-1 aktywują podobny szlak sygnałowy, a jak wiadomo IGF-1 ma udowodnione działanie neuroprotekcyjne [103].

Cukrzyca przyczynia się do rozwoju neuropatii również poprzez wpływ na układ sercowo-naczyniowy. Pacjenci z cukrzycą typu 2 często są obciążeni nadciśnieniem tętniczym i miażdżycą naczyń, również vasa nervorum. Efektem tych chorób jest niedokrwienie włókien nerwowych i postępująca degeneracja neuronów [101].

Neuropatię cukrzycową można podzielić na kilka kategorii w zależności od objawów klinicznych i rodzaju dotkniętych włókien nerwowych. Uszkodzenie może objąć drobne włókna nerwowe, długie włókna nerwowe albo oba rodzaje. Utrata drobnych włókien nerwowych pojawia się wcześniej i objawia się bólem i przewrażliwieniem w kończynach dolnych, a następnie upośledzeniem czucia

temperatury i dotyku. U pacjentów z symetryczną dystalną polineuropatią (typu rękawiczki i skarpetki) mamy do czynienia z zajęciem obu rodzajów nerwów. Uszkodzenie długich włókien nerwowych objawia się przede wszystkim zaburzeniami czucia wibracji, położenia a także osłabieniem mięśniowym i osłabionymi odruchami ze ścięgien. Powikłaniami neuropatii cukrzycowej są przede wszystkim neuropatyczne owrzodzenie stopy i osteoartropatia Charcota [104].

Dużo badań jest prowadzonych w kierunku zastosowania czynników wzrostu w terapii neuropatii cukrzycowej. Wiadomo bowiem, że endogenne czynniki wzrostu zapewniają przeżycie komórek nerwowych, a także indukują regenerację uszkodzonych włókien nerwowych. Najbardziej obiecujące zdają się być neurotropiny, insulinopodobne czynniki wzrostu, cytokinopodobne czynniki wzrostu i VEGF. Neurotropiny, których najlepiej opisanym przedstawicielem jest NGF to grupa cząsteczek regulujących wzrost włókien nerwowych i mających działanie ochronne. Wpływ IGF na obwodowy układ nerwowy jest szczególnie ważna, ponieważ jest to jedyna grupa czynników wzrostu, którą wykryto w tkance nerwowej i mięśniowej, i działa regeneracyjnie zarówno na włókna czuciowe i ruchowe [101].

1.1.4. Epidemiologia nadciśnienia tętniczego

Nadciśnienie tętnicze jest jednym z najistotniejszych czynników ryzyka miażdżycy, której konsekwencją są: ostry zespół wieńcowy, udar mózgu i zgon z przyczyn sercowo- naczyniowych.

Styl życia współczesnych społeczeństw charakteryzuje się dużym spożyciem produktów wysokokalorycznych i zawierających znaczne ilości sodu, oraz ograniczeniem codziennego wysiłku fizycznego. Skutkuje to dodatnim bilansem energetycznym ze wszystkimi konsekwencjami: otyłością, zaburzeniami gospodarki węglowodanowej i lipidowej oraz nadciśnieniem tętniczym.

Przeprowadzono wiele badań epidemiologicznych, których wyniki wskazują, że nadciśnienie jest leczone prawidłowo tylko u niewielkiego odsetka pacjentów.

Sporo cennych i aktualnych informacji na temat występowania nadciśnienia tętniczego dostarczyło badanie Natpol Plus III, przeprowadzone w 2002 roku. Częstość występowania nadciśnienia w Polsce wynosiła 29%, a ciśnienia tętniczego wysokiego prawidłowego 30%; tylko u 21% Polaków ciśnienie okazało się prawidłowe, a u 20% optymalne. Odsetek niewykrytego nadciśnienia tętniczego wynosił 33% [22]

Bardziej aktualne dane pochodzą z badania WOBASZ, przeprowadzonego w latach 2003- 2005. Średnią częstość występowania nadciśnienia tętniczego określono na 36%, z tego częściej chorowali mężczyźni (42,1%) niż kobiety (32,9%) [105,106]

Ostatnio opublikowane badanie przeprowadzone przez Sieberta i wsp. opiera się na analizie ankiet z internetowego programu „Ryzyko”. Ponad 63600 internautów wprowadziło dane celem oszacowania ryzyka sercowo- naczyniowego, z czego 36,8% zadeklarowało nadciśnienie tętnicze [24].

1.1.5. Nadciśnienie tętnicze w kontekście konsekwencji zaburzeń procesu angiogenezy

Nadciśnienie tętnicze jest niezwykle rozpowszechnionym schorzeniem układu sercowo – naczyniowego. Wprowadzane są coraz skuteczniejsze metody leczenia, jednak w kwestii patomechanizmu wiele jeszcze pozostaje do wyjaśnienia.

Zjawisko zmniejszającej się gęstości tętniczek i naczyń włosowatych (z ang. rarefaction) w różnych tkankach i narządach osób z nadciśnieniem tętniczym zostało opisane już w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku [107]. Mikrokrążenie, a konkretnie ilość naczyń włosniczkowych i średnica ich światła, w dużej mierze odpowiada za opór obwodowy. Główny spadek ciśnienia hydrostatycznego następuje na poziomie tętnic oporowych: małych tętnic oporowych o średnicy < 350 μm , tętniczek (<100 μm średnicy) i naczyń włosowatych (około 7 μm średnicy). Za całkowity opór obwodowy w 45- 50% odpowiadają końcowe tętnice i tętniczki, naczynia włosowate w 23- 30%, drobne żyły w 3- 4% i w 3% większe żyły. Zatem

strukturalne zmiany w mikrokrażeniu mogą bezpośrednio i w dużym stopniu wpływać na wartości ciśnienia tętniczego [108]. Wzrost grubości ściany naczynia wraz ze spadkiem średnicy światła pełni istotną rolę we wzroście oporu naczyniowego, może być również reakcją adaptacyjną na wzrost obciążenia hemodynamicznego. Zgodnie z prawem Poiseuilla, nawet niewielkie zmiany promienia światła tętnicy mają istotny wpływ na opór naczyniowy [108]. Pewne okoliczności, takie jak niedotlenienie i stan zapalny mogą indukować rozwój nowych naczyń w miarę potrzeb. Nadciśnienie tętnicze wiąże się z kolei ze zmniejszoną ilością i gęstością naczyń. W konsekwencji rośnie opór obwodowy, ciśnienie krwi wzrasta i dochodzi do nasilenia nadciśnienia [109]. Spostrzeżenia te zostały udowodnione na modelu zwierzęcym. U szczurów, u których sztucznie wywołano nadciśnienie, usuwając znaczną powierzchnię nerek oraz dostarczając duże ilości sodu w diecie w ciągu pięciu dni doszło do uszkodzenia śródbłonna i zmniejszenia gęstości naczyń [110].

Nie można jednak jednoznacznie stwierdzić, że do zmniejszenia gęstości naczyń dochodzi na skutek nadciśnienia tętniczego a nie odwrotnie. Rozrzedzenie gęstości włósniczek skóry można zaobserwować już u młodych, zdrowych osób z genetyczną predyspozycją do chorób sercowo- naczyniowych, jak również u osób z łagodnym albo granicznym podwyższeniem ciśnienia tętniczego krwi [111]. Ponadto do podobnego zjawiska dochodzi fizjologicznie u osób starszych [112, 113].

Omawiane zmiany anatomiczne naczyń narzucają pytanie o rolę angiogenezy i angiogennych czynników wzrostu w patomechanizmie powstawania nadciśnienia tętniczego.

Sporo informacji na ten temat uzyskano podczas obserwacji pacjentów nowotworowych poddanych terapii polegającej na blokowaniu czynników wzrostu (vascular endothelial growth factor signalling pathway). Hamowanie angiogenezy jest niezwykle skutecznym sposobem leczenia nowotworów między innymi nerki, jelita grubego, piersi i płuc. Już w 1971 roku Judah Folkman sugerował, że terapia

mająca na celu hamowanie rozrostu naczyń guzów nowotworowych może odegrać istotną rolę w onkologii. Jednak pierwszy lek o działaniu antyangiogennym wprowadzono do użytku klinicznego dopiero w 2005 roku [114]. W chwili obecnej wykorzystywane są cztery preparaty: bevacizumab, sorafenib, sunitinib i pazopanib. Niestety terapia monoklonalnymi przeciwciałami przeciwko VEGF łączy się z efektami niepożądanymi w postaci nadciśnienia tętniczego, białkomoczu, zwiększonego ryzyka krwotoków [115]. Nadciśnienie tętnicze jako efekt uboczny terapii przeciwnowotworowej występuje u 11 do 43% pacjentów [114]. Z tego powodu wielu pacjentów nie kwalifikowało się do leczenia lub udziału w programach badawczych. W chwili obecnej trwają prace nad opracowaniem skutecznych procedur leczenia tych powikłań, aby jak największa ilość pacjentów mogła skorzystać z szansy leczenia.

Kilka mechanizmów może być zaangażowanych w zmniejszenie gęstości sieci naczyniowej u osób leczonych onkologicznie. Rozrzedzenie może być anatomiczne, spowodowane upośledzeniem angiogenezy lub nasiloną apoptozą komórek naczyń włosowatych, albo czynnościowe, związane z lokalnym obkurczeniem się włósniczek. Hashimoto i wsp. zasugerowali, że w nadciśnieniu początkowo dochodzi do czynnościowej eliminacji części sieci naczyniowej, a dopiero później do jej zaniku na skutek braku przepływu krwi [116]. Do wzrostu ciśnienia podczas terapii bevacizumabem dochodzi bardzo wcześnie i jest to proces odwracalny po zaniechaniu leczenia. Dlatego prawdopodobniejsze jest, że do nadciśnienia dochodzi na skutek rozrzedzenia funkcjonalnego, a nie faktycznego braku naczyń włosowatych [117]. Nie ma jednakże badań, które określiłyby wpływ takiego leczenia na rozrzedzenie anatomiczne i jego potencjalną odwracalność.

Cheng i wsp. przeprowadzili badanie sprawdzające gęstość i zachowanie kapilar u pacjentów z łagodnie podwyższonym ciśnieniem tętniczym krwi. We wcześniejszych badaniach uczestniczyli pacjenci z zaawansowanym nadciśnieniem i powikłaniami. Konstruktorom badania zależało, aby zbadać pacjentów młodych, na wczesnym etapie choroby, bez powikłań [118]. Wyniki potwierdziły wspomniane

już spostrzeżenia Hashimoto i wsp [116]. Młodzi chorzy z dyskretnym podwyższeniem wartości ciśnienia demonstrowali odwracalny funkcjonalny spadek gęstości naczyń. Odkrycie to uzupełnia wcześniejsze badania Vasana i wsp., który na podstawie wyników badania Framingham stwierdził, że ryzyko sercowo- naczyniowe wzrasta już na etapie ciśnienia wysokiego prawidłowego [119].

Wzajemne współzależności pomiędzy gęstością naczyń a nadciśnieniem są ciągle tematem dyskusji. Regulacja objętości łoża naczyniowego zależy między innymi od aktywności czynników angiogennych. Liczne badania zarówno na pacjentach jak i modelach zwierzęcych potwierdziło działanie obniżające ciśnienie tętnicze krwi różnych angiogennych czynników wzrostu. W badaniu VIVA (VEGF in Ischemia for Vascular Angiogenesis) udowodniono, że zarówno dożylne jak i bezpośrednie do naczyń wieńcowych infuzje VEGF skutkowały obniżeniem skurczowego ciśnienia krwi średnio o 22% [120]. Podobny efekt uzyskano podając FGF-2 [121].

Mechanizmów działania angiogennych czynników wzrostu może być kilka. Należy do nich aktywacja kinazy proteinowej B przez VEGF, która stymuluje fosforylację eNOS, w konsekwencji prowadząc do zwiększenia produkcji NO [122].

NO, substancja której poziom jest w nadciśnieniu tętniczym obniżony, odpowiada za przepuszczalność i rozkurcz naczyń, adhezję i agregację płytek. Odgrywa również istotną rolę w procesie powstawania nowych naczyń poprzez aktywację mRNA VEGF i ekspresję tego białka [123]. Spadek produkcji tlenu azotu jest związany z upośledzeniem angiogenezy, co zostało potwierdzone na badaniach z udziałem inhibitorów eNOS i na modelu zwierzęcym pozbawionym genu dla eNOS [124,125]. Interesujące, że VEGFR-2 może być aktywowany na skutek przepływu krwi, niezależnie od obecności ligandu, czego konsekwencją jest aktywacja eNOS [126].

Paradoksalnie wyniki badania ASCOT wykazały, że im większe nadciśnienie, tym wyższy poziom VEGF i niższy inhibitora VEGF- VEGFR1. Temu stanowi towarzyszy

znaczące podwyższenie poziomu czynnika von Willebranda. Autorzy zasugerowali, że zjawisko to może być procesem kompensacyjnym, wtórnym do uszkodzenia śródbłonna naczyń. Wyrównanie ciśnienia krwi prowadzi do redukcji poziomu VEGF [127, 128]. Podobną tendencję obserwuje się w przypadku HGF, IGF-1, endoteliny-1, TGFβ1 i andromeduliny [129].

Istnieje również hipoteza, że za wysokie poziomy angiogennych czynników wzrostu w nadciśnieniu odpowiada niedotlenienie tkanek. Na skutek hipoksji dochodzi do produkcji HIF1a, który wzmacnia ekspresję genów o kodujących VEGF, PDGF, TGFα, TGFγ, IGF-1 i eNOS [129].

Ciekawą koncepcję zaproponowali niedawno Machnik i wsp. Na modelu zwierzęcym udowodnili, że u szczurów poddanych diecie bogatosodowej dochodzi do akumulacji jonów sodowych w skórze, czego konsekwencją jest kompensacyjny wzrost gęstości naczyń włosnaczyniowych. Dzieje się tak dzięki aktywacji białka TonEBP (tonicity-responsive enhancer binding protein). TonEBP wiąże się z promotorem genu kodującego VEGF-C w makrofagach, doprowadzając do wzrostu produkcji VEGF i nasilenia procesu tworzenia nowych naczyń. Deplecja makrofagów lub zahamowanie aktywności VEGF-C doprowadza do szybkiego rozwoju nadciśnienia tętniczego. W kolejnym badaniu autorzy zauważyli, że nawet umiarkowane ilości sodu w diecie mają wpływ na ekspresję TonEBP, które można określić jako białko 'osmoprotekcyjne' [130,131].

VEGFR-2 pełni kluczową rolę w proliferacji i apoptozie komórek endotelialnych. Uszkodzenie szlaku sygnałowego z udziałem VEGFR-2 prowadzi do obumierania komórek budujących naczynia. Nie wiadomo dlaczego dochodzi do apoptozy endotelium w nadciśnieniu tętniczym. Tran i wsp. ocenili aktywność metaloproteinaz MMP-2, MMP-7 i MMP-9 w surowicy zwierząt z nadciśnieniem tętniczym. Metaloproteinazy rozkładają receptory błonowe, np. zewnątrzkomórkową domenę receptora dla insuliny, a także CD18 na leukocytach. Brak CD18 jest przyczyną nieprawidłowej adhezji leukocytów do śródbłonna.

Ponadto rozkładają substancje wazoaktywne, powodując wzrost produkcji substancji wazokonstrykcyjnych. Blokowanie aktywności metaloproteinaz zapobiega rozpadowi receptora dla insuliny i w konsekwencji oporności tkanek na insulinę. Aktywność tych trzech enzymów jest znacząco podwyższona u zwierząt z nadciśnieniem tętniczym [132].

Z uwagi na fakt, że zahamowanie apoptozy komórek endotelialnych może przyczynić się do ograniczenia zaburzeń mikrokrążenia, trwają badania nad potencjalną grupą leków hipotensyjnych. Czynniki działające protekcyjnie na śródbłonek chronią naczynia przed narażeniem na rozmaite czynniki uszkodzające, tym samym zapobiegając uszkodzeniom narządowym i wzrostowi ciśnienia tętniczego. (COMP)-Ang-1 (cartilage oligomeric matrix protein) jest zmodyfikowaną cząsteczką angiopoetyny-1. Cechuje się zdolnością protekcyjną na śródbłonek. Przykładowo, stwierdzono że ta substancja chroni komórki endotelialne kosmków jelitowych przed apoptozą na skutek promieniowania jonizującego. Na poziomie molekularnym jej działanie tłumaczy się aktywacją szlaku sygnałowego Akt poprzez receptory Tie2 w śródbłonku. Praca Lee i wsp. dostarcza dowodów na korzystne działanie (COMP)-Ang-1 na ograniczanie rozrzedzenia naczyń i uszkodzeń narządowych w sercu i nerkach. Ponadto Ang-1 jest w stanie zapobiec rozwojowi nadciśnienia u szczurów z predyspozycją genetyczną do nadciśnienia. Doświadczenia in vitro na komórkach HUVE wykazały, że (COMP)-Ang-1 wzmacnia produkcję tlenu azotu poprzez aktywację kaskady Tie2/eNOS w endotelium [133].

Badania kliniczne dotyczące nadciśnienia tętniczego skupiają się na obniżaniu ciśnienia tętniczego, skurczu i rozkurczu naczyń, lepkości krwi, rozwoju płytki miażdżycowej oraz zapobieganiu powikłaniom. Niewiele natomiast jest prac, które badają wpływ leków obniżających ciśnienie na mikrokrążenie.

Istnieją dowody na to, że hamowanie układu renina – angiotensyna - aldosteron wpływa na strukturę i gęstość naczyń włosowatych. Bradykinina, substancja działająca silnie rozkurczająco na naczynia krwionośne, pełni istotną rolę

w regulacji ciśnienia krwi. Wzmaga również proces tworzenia nowych naczyń poprzez nasilenie wydzielania β FGF poprzez receptor BK -B1 oraz nasilenie wydzielania VEGF i NO poprzez receptor BK - B2. Receptor BK -B2 może również aktywować receptor VEGF na komórkach endotelialnych [108].

Blokada układu renina angiotensyna aldosteron na poziomie receptora AT1 ma również korzystne działanie na gęstość naczyń. Renina i Angiotensyna II działają wówczas za pomocą receptora AT2, doprowadzając do wzrostu poziomu bradykininy i jej proangiogennych właściwości [108].

Rusai i wsp. zbadali wpływ inhibitora reniny – aliskirenu. Efekty działania tego leku można wytłumaczyć wpływem na poziom angiopoetyn. Angiopoetyna-1, jak już wcześniej wspomniano, stabilizuje ścisły kontakt sąsiadujących komórek endotelialnych i ma działanie ochronne. Z kolei angiopoetyna-2, substancja magazynowana w ciałkach Weibel Palade, jest markerem ryzyka sercowo-naczyniowego u osób z nadciśnieniem [134]. Aliskiren powoduje wzrost poziomu Ang-1 przy równoczesnym spadku Ang-2. Zmiana proporcji Ang-1/ Ang-2 na korzyść angiopoetyny-1 prowadzi do przewagi procesów naprawczych i ochronnych. Dodatkowo angiopoetyna-1 poprzez fosforylację kinaz Akt pobudza wytwarzanie tlenu azotu. Ten zaś stabilizuje ciałka Weibel Palade w komórkach endotelialnych, przeciwdziałając ich egzocytozie uwalnianiu Ang-2 [135,136].

Niestety badań dotyczących wpływu diuretyków, antagonistów wapnia i β -blokerów jest niewiele i nie pozwalają one na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Penna i wsp. spróbowali określić, czy obniżona gęstość naczyń utrzymuje się u pacjentów leczonych inhibitorami konwertazy angiotensyny, diuretykami tiazydowymi i α -blokerami, oraz ocenić jakie zmiany w mikrokrażeniu utrzymują się po leczeniu. Pacjenci z nadciśnieniem mieli o 21,5% rzadszą sieć naczyń w porównaniu z grupą zdrowych. Bez względu na rodzaj zastosowanego leczenia gęstość naczyń nie uległa zmianie [137]. Do odmiennych wniosków doszli Debbabi i wsp. Gęstość włósniczek w obrębie skóry była wyższa u pacjentów leczonych lekami

obniżającymi ciśnienie niż u pacjentów ze świeżo rozpoznanym nieleczonym nadciśnieniem i u grupy kontrolnej [138]. Wszystkie przytoczone badania mają pewne ograniczenia. Przeprowadzono je na małych grupach pacjentów, przez co siła badań jest niewielka. Ponadto wszyscy pacjenci byli leczeni schematami wielolekowymi, co w dużej mierze utrudnia wyciągnięcie konkretnych wniosków. Niemniej są to ważne spostrzeżenia, które warto sprawdzić na większej populacji. Sabino i wsp. opublikowali wyniki obserwacji na modelu zwierzęcym. Szczury z nadciśnieniem były leczone enalaprilem (ACEI), losartanem (antagonista AT1), atenololem (β -bloker) i nifedypiną (Ca-bloker). Wszystkie leki w podobnym stopniu obniżyły ciśnienie tętnicze. Atenolol nie miał żadnego wpływu na gęstość sieci naczyniowej. Terapia losartanem i nifedypiną spowodowała redukcję rozrzedzenia czynnościowego w tkance mięśniowej i w skórze. Natomiast korzystne działanie enalaprilu zaobserwowano jedynie w skórze. Leczenie enalaprilem i losartanem normalizowało gęstość naczyniową w mięśniu sercowym, natomiast efektu tego nie wywoływały atenolol i nifedypina [139].

Nascimento i wsp. ocenili rolę leków obniżających ciśnienie działających ośrodkowo, zmniejszających napięcie układu współczulnego. Leczenie klonidyną, rilmenidyną i moksonidyną regulowało ciśnienie tętnicze. Ponadto dochodziło do regresji czynnościowego rozrzedzenia włóściwek w mięśniach szkieletowych i w skórze. Co ciekawe, nie stwierdzono zmian w mikrokrażeniu mięśnia sercowego [140].

Coraz więcej wiadomo na temat zaburzonej angiogenezy w chorobach sercowo- naczyniowych i jej wpływie na rozwój nadciśnienia tętniczego. Niektóre z obecnie stosowanych leków ma korzystne działanie na rozwój nowych naczyń i poprawę gęstości sieci naczyniowej. W konsekwencji zapobiegają uszkodzeniu wielu narządów. Na odpowiedź w jakim stopniu ten potencjał może zostać wykorzystany w praktyce klinicznej potrzeba jeszcze wielu badań.

1.2. Angiogenina

1.2.1. Struktura biochemiczna angiogeniny

Angiogenina jest 14-kDa rozpuszczalnym białkiem po raz pierwszy wyizolowanym w 1985 roku z komórek gruczolakoraka jelita grubego (HT-29) [141]. Jej łańcuch składa się z 123 aminokwasów, których sekwencja jest w 33% identyczna i w 65% homologiczna z trzustkową RNAzą 1 (RNAzą A) [142]. Gen kodujący angiogeninę mieści się na chromosomie 14q11, w krótkim odcinku zawierającym również geny dla innych RNAz [169,196]. Substancję tę wykryto w wielu tkankach, jednak głównym źródłem angiogeniny jest wątroba [191].

Aktywność katalityczna angiogeniny jest niezwykle niska, co różni ją od siedmiu pozostałych członków rodziny rybonukleaz [143]. Pomimo słabej aktywności enzymatycznej, angiogenina ciągle posiada budowę niezbędną do spełniania funkcji endonukleazy [144,145].

Jedną z zasadniczych różnic pomiędzy angiogeniną a innymi rybonukleazami jest brak czwartego wiązania disulfidowego [146]. Ten fakt silnie rzutuje na właściwości angiogeniny – zdolność do pobudzania komórek endotelialnych do tworzenia nowych naczyń krwionośnych [147].

Właściwości angiogenne egzogennej angiogeniny po raz pierwszy zademonstrowano na błonach kosmówkowo- omoczniovych kurcząt i rogówkach królików [141]. Początkowo mechanizm aktywności biologicznej angiogeniny nie był jasny. Podejrzewano, że miejsce wiązania z receptorem nie jest tożsame z regionem katalitycznym. Poprzez specyficzną proteolizę wiązań białkowych pomiędzy Lys-60 a Asn-61 i pomiędzy Glu-67 a Asn-68 w cząsteczce angiogeniny zdołano wytworzyć dwie odmiany: angiogeninę K i angiogeninę E. Nowo utworzone odmiany substancji posiadają aktywność enzymatyczną, są jednak pozbawione zdolności angiogennych [148]. Niemniej, doświadczenia z wykorzystaniem inhibitorów rybonukleaz dowiodły, że substrat pasujący do miejsca katalitycznego jest konieczny również aby doszło do angiogenezy [144].

1.2.2. Mechanizm działania i regulacji angiogeniny.

Angiogenina łączy się z komórkami endotelialnymi za pomocą specyficznego receptora [149]. Mechanizm ten pozwala ściśle regulować procesy angiogenezy w zależności od potrzeb, podczas gdy poziom angiogeniny w surowicy jest stały [150]. Hu i wsp. odkryli 170-kDa receptor dla angiogeniny na powierzchni ludzkich komórek endotelialnych [150].

Zanim doszło do identyfikacji receptora dla angiogeniny, stosunkowo szczegółowo opisano mechanizm łączenia się angiogeniny z białkiem powierzchniowym komórki endotelialnej AngBP (angiogenin binding protein). Analiza sekwencji aminokwasów tej substancji pozwoliła stwierdzić, że jest to 42-kDa α -aktyna komórek mięśniówki gładkiej [151]. Powstanie kompleksu angiogenina - aktyna powoduje aktywację kaskad proteolitycznych i stymuluje tkankowy aktywator plazminogenu do produkcji plazminy z plazminogenu. W efekcie dochodzi do degradacji błony podstawnej naczynia krwionośnego [148]. Proces ten jest również ściśle regulowany. Hu i wsp. zauważyli, że ludzka elastaza neutrofilowa rozrywa wiązanie w miejscu Ile(29)-Met angiogeniny, co w efekcie prowadzi do powstania produktu, który nie ulega translokacji do jądra, pomimo że zachowuje aktywność rybonukleolityczną [152]. Ta sama elastaza może modyfikować plazminogen, w wyniku czego powstaje inhibitor angiogenezy – angiostatyna [153].

Angiogenina uczestniczy również w proliferacji komórek mięśniówki gładkiej poprzez wiązanie z α -aktyniną-2 [154]. α -aktynina-2 to również członek rodziny α -aktynin i jest izoformą obecną w mięśniach szkieletowych oraz mięśniu sercowym [155]. Rezultatem tego połączenia jest fosorylacja kinazy SAPK/JNK (stress-associated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) [156]. Co ciekawe, kaskada SAP/JNK nie jest aktywowana poprzez łączenie angiogeniny do jej specyficznego receptora. Świadczy to o tym, że komórki endotelialne i komórki mięśniówki gładkiej są stymulowane odmiennymi drogami.

W normalnych warunkach komórki endotelialne są nieruchome, otoczone przez błonę podstawną – gęstą, nieprzepuszczalną siatkę zbudowaną z kolagenu IV, lamininy, fibronektyny, entaktyny i proteoglikanów. Pod wpływem czynnika wzrostu dochodzi do zmiany fenotypu komórki endotelialnej na bardziej inwazyjny i zdolny do penetracji błony podstawnej [157].

Moroianu i wsp. dzięki metodzie immunofluorescencji z monoklonalnym przeciwciałem przeciw angiogeninie udało się precyzyjnie zidentyfikować losy angiogeniny w komórce endotelialnej. Białko ulega internalizacji i jest transportowane do jądra komórkowego, gdzie odkłada się w jąderku. W tym przypadku angiogenina zachowuje się jak wiele innych czynników wzrostu, takich jak β FGF, α FGF i EGF które również ulegają translokacji do jądra komórkowego [158]. Translokacja do jądra jest niezbędna w procesie angiogenezy; zahamowanie tego procesu powoduje, że aktywność angiogenna ustaje [159].

We wnętrzu komórki endotelialnej angiogenina uruchamia szereg kaskad sygnałowych: indukuje fosforylację kinaz Erk 1/2 [160], B/Akt [161] i aktywuje fosfolipazę C [162]. Trouillon i wsp. zauważyli niedawno, że angiogenina poprzez kaskadę kinaz PI-3/Akt indukuje syntezę NO [163].

Tlenek azotu jest małą cząsteczką wytwarzaną przez syntazę NO. Pełni ona niezwykle ważną rolę w procesie angiogenezy poprzez wzmacnianie syntezy czynników angiogennych oraz działanie anty-apoptotyczne na komórki endotelialne.

Wydaje się, że zarówno receptor dla angiogeniny jak i aktyna nie ulegają ekspresji na powierzchni komórki endotelialnej jednocześnie. Każdy z nich pełni konkretną rolę na różnych etapach procesu tworzenia nowego naczynia krwionośnego. Jak wspomniano wcześniej, kompleks angiogenina- aktyna aktywuje kaskady proteaz i zmienia fenotyp komórek endotelialnych. Kiedy komórki zaczynają migrować, dochodzi do zmniejszenia ich gęstości na danej powierzchni. Takie okoliczności zdają się wzmacniać ekspresję 170- kDa receptora dla angiogeniny na pozostałych komórkach, które stają się wrażliwe na stymulację angiogeniną i dzielą

się wypełniając powierzchnię utworzoną przez migrujące komórki. W momencie gdy komórki endotelialne ponownie ściśle do siebie przylegają, ekspresja receptora ustaje [149].

Angiogenina ma specyficzny inhibitor, ludzki łożyskowy inhibitor rybonukleazy (hRI), który skutecznie blokuje zarówno aktywność enzymatyczną jak i angiogenną. Jest to 50-kDa białko cytoplazmatyczne, którego pojedynczy łańcuch polipeptydowy układa się w kształcie końskiej podkowy [164]. Niedawno opisano, że inhibitor rybonukleaz obecny jest również w mitochondriach i jądrze komórkowym. Okazuje się, że to białko umożliwia ochronę komórki przed stresem oksydacyjnym i pełni rolę wymiatacza wolnych rodników [165].

1.2.3. Działanie biologiczne angiogeniny.

Angiogenina jest stale obecna w krążeniu; jej poziom waha się pomiędzy 250 a 360 ng/ml w zdrowym organizmie [166]. W rozwoju płodowym angiogenną wykryto w licznych organach takich jak: serce, śledziona, płuca, wątroba, jelito grube, prostata, sutek, mózg. Jej poziom wzrasta od 150 ng/ml w 10 tygodniu ciąży do 250 ng/ml w 40 tygodniu ciąży. Natomiast poziom angiogeniny w surowicy noworodka jest znacząco niższy od poziomu tej substancji u matki [167]. Podczas pierwszych czterech dni życia noworodka dochodzi do gwałtownego wzrostu poziomu angiogeniny u matki [168].

Wiele badań podkreśla potencjalną rolę angiogeniny w rozpoznawaniu i ustalaniu rokowania w różnych jednostkach chorobowych.

Angiogenina została po raz pierwszy wyizolowana z komórek nowotworowych i początkowo cała wiedza o niej koncentrowała się wokół angiogenezy guzów pierwotnych i przerzutowych [141]. Nie ulega wątpliwości, że nasilona angiogeneza jest niezbędna dla szybko rozrastającej się tkanki guza, celem zaopatrzenia w tlen i składniki odżywcze.

Podwyższony poziom angiogeniny zaobserwowano w licznych procesach

nowotworowych takich jak rak trzustki [169], żołądka, jelita grubego [170], prostaty [171] i endometrium [170]. Olson i wsp. używając monoklonalnych przeciwciał przeciwko angiogeninie uzyskali zahamowanie wzrostu guza nowotworowego [172]. Wiedza ta w przyszłości może mieć niebagatelne znaczenie w terapii.

Obserwacja angiogeniny w schorzeniach innych niż nowotworowe również jest bardzo ciekawa. Burgmann i wsp. zanalizowali poziom lamininy i angiogeniny u pacjentów z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych i doszli do wniosku, że zwiększone stężenie angiogeniny może być wskaźnikiem uszkodzenia komórek endotelialnych na skutek upośledzonej perfuzji naczyniowej lub konsekwencją nasilonej kompensacyjnej rewaskularyzacji [173]. Późniejsze badania Tello-Montoliu i wsp. zdają się potwierdzać tę tezę. U pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym również dochodzi do znaczącego podwyższenia poziomu angiogeniny w porównaniu z osobami zdrowymi i osobami ze stabilną chorobą wieńcową. Wysoki poziom angiogeniny świadczy również o złym rokowaniu u pacjentów z OZW [174]. Pacjenci z wielonaczyniową chorobą wieńcową mają o 35% podwyższony poziom angiogeniny w surowicy krwi w porównaniu z osobami bez zwężeń tętnic wieńcowych [175].

Patel z zespołem przeprowadzili dwa interesujące badania dotyczące poziomu angiogeniny w niewydolności serca. Angiogenina była znacząco podwyższona u pacjentów z przewlekłą niewydolnością serca. Jej poziom pozytywnie korelował z BNP (brain natriuretic peptide), markerem niewydolności serca. Najwyższe stężenia angiogeniny wykryto u pacjentów w klasie NYHA III. Okazało się ponadto, że stężenie tej substancji w surowicy krwi było odwrotnie proporcjonalne do objętości wyrzutowej serca, natomiast wprost proporcjonalne do ilości zmian miażdżycowych (coronary atheroma score). Należy nadmienić, że takiej korelacji nie stwierdzono dla VEGF i angiopoetyny-1. Autorzy zasugerowali, że działanie angiogeniny może być specyficznie ograniczone do mięśnia sercowego. Natomiast poziom VEGF i Ang-1 odnoszą się bardziej do ogólnie pojętego uszkodzenia śródbłonna i odzwierciedlają poziom angiogenezy generalnie. Ponadto,

angiogenina łączy się z alfa-aktyniną-2, a stwierdzono, że białko to jest uwalniane w niewydolności serca [176,177]. W tym świetle istotne znaczenie może mieć badanie przeprowadzone przez Liu i wsp. Udowodnili oni na modelu zwierzęcym zawału serca, że podanie do mięśnia sercowego mezenchymalnych komórek pnia z wbudowanym drogą inżynierii genetycznej genem dla angiogeniny poprawiało przeżycie komórek mięśnia sercowego w warunkach niedokrwienia. Badanie echo potwierdziło, że poprawiła się żywotność obszarów które uległy zawałowi, jak również funkcja skurczowa i rozkurczowa lewej komory. Histologicznie zaobserwowano znaczący wzrost waskulogenezy i zahamowanie remodelingu w badanym obszarze [178].

Liczne badania donoszą o udziale angiogeniny w chorobach takich jak [166]: choroby zapalne jelit [179], reumatoidalne zapalenie stawów [180], nadwaga i otyłość [181], proliferacyjna retinopatia cukrzycowa, polipy nosa [182], degeneracja ścięgien (choroba stożka rotatorów) [183] i dermatozy [184].

1.2.4. Dodatkowe właściwości angiogeniny.

Większość badań nad angiogeniną skupia się na aktywności rybonukleolitycznej i angiogennej tej substancji. Niemniej obecność angiogeniny w wielu różnych komórkach sugeruje, że angiogeneza to nie jedyna funkcja tej rybonukleazy [185,186].

Zaobserwowano, że angiogenina produkowana w komórkach Panetha w jelicie myszy jest następnie wydzielana do światła jelita i pełni funkcję czynnika bakteriobójczego i grzybobójczego na florę jelitową. Sugeruje się że angiogenina może mieć udział w odpowiedzi organizmu na infekcję [187].

W odpowiedzi na stres środowiskowy komórki eukariotyczne wdrażają programy ochronne mające na celu ograniczanie procesów wymagających dużych nakładów energetycznych, takich jak transkrypcja i translacja. Te regulacyjne programy redukują ekspresję rozmaitych genów na rzecz genów odpowiedzialnych za naprawę szkód spowodowanych przez stres i umożliwiają przetrwanie komórki.

Jest to możliwe poprzez modulowanie mRNA do zmian w aktywności różnych czynników inicjacyjnych, takich jak eIF2 α (eukaryotic translation initiator factor 2 α). Fosforylacja eIF2 α przez jedną z kinaz aktywowanych stresem zapobiega translacji większości transkryptów, ale umożliwia translację białek uczestniczących w programach naprawczych i adaptację komórki do niekorzystnych warunków środowiskowych. Rozpad tRNA do tiRNA pod wpływem stresu zapoczątkowuje programy ochronne. U ssaków proces ten odbywa się za pośrednictwem angiogeniny [188].

1.2.5. Angiogenina jako białko neuroprotekcyjne.

W ostatnich kilku latach wiele badań dotyczy protekcyjnej roli angiogeniny w chorobach neurodegeneracyjnych. Przyczyna stwardnienia zanikowego bocznego (ALS) jest nieznana, jednak 20% chorych z obciążeniem rodzinnym posiada mutację genu kodującego SOD1 (Cu/Zn superoxide dismutase-1). Transgeniczne myszy u których dochodzi do nadmiernej ekspresji SOD1 prezentują objawy niezmiernie podobne do ALS. Kieran i wsp. opublikowali badanie, które demonstruje, że angiogenina pełni kluczową rolę w ochronie neuronów przed uszkodzeniem. U pacjentów z ALS zidentyfikowano mutacje genu kodującego angiogeninę, jednak potencjalna rola tej substancji w patogenezie stwardnienia zanikowego bocznego nie została określona. Badanie potwierdziło, że produkt mutacji genu kodującego angiogeninę K40I, obserwowanej w ALS, nie ma zdolności ochronnych [189].

W lutym 2011 ukazała się niezwykle ciekawa praca Li i wsp. opisująca kolejne fakty dotyczące roli angiogeniny w chorobach neurodegeneracyjnych. AIF (apoptosis inducing factor) jest mitochondrialną flawoproteiną mającą aktywność oksydoreduktazy. W komórce przeznaczony do apoptozy AIF jest uwalniany z błony mitochondrialnej i transportowany do jądra komórkowego, gdzie odpowiada za kondensację chromatyny i degradację DNA. Angiogenina zapobiega apoptozie komórek poprzez szereg procesów zależnych od białka Bcl-2: aktywuje rozpad kaspazy-3, przeciwdziała rozpadowi PARP-1 i uniemożliwia transport AIF do

jądra komórkowego [190].

Warto również wspomnieć o roli angiogeniny w chorobie Parkinsona. Przyczyny tej choroby nie są dokładnie poznane; od niedawna mówi się o roli białka alfa-synukleiny (α -syn). Punktowe mutacje genu α -syn są przyczyną wrodzonej postaci choroby Parkinsona, natomiast w sporadycznych przypadkach agregaty alfa-synukleiny są wykrywane w substancji czarnej i innych obszarach mózgu. Steidinger i wsp. przeprowadzili badanie na modelu zwierzęcym choroby Parkinsona. U myszy wytwarzających nadmierne ilości α -syn dochodziło do 7,5-krotnej redukcji ekspresji genu dla angiogeniny w porównaniu z typem dzikim. Badanie dostarczyło również dowodów, że angiogenina pełni ochronną rolę w chorobie Parkinsona. Nie jest jasne w jaki sposób nadmiar α -syn wpływa na redukcję poziomu angiogeniny. Niemniej, egzogenne podanie angiogeniny ogranicza śmierć komórek w modelu zwierzęcym choroby Parkinsona. Jest więc szansa, że wzrost poziomu angiogeniny może być sposobem na zwolnienie tempa postępu tej choroby [192].

1.2.6. Rola angiogeniny w procesie nowotworowym.

Nowotwór charakteryzuje się intensywnym rozrostem komórkowym wymagającym wielkich ilości białek. Do realizacji tego procesu niezbędne są duże ilości rybosomów [193].

Coraz więcej dowodów świadczy o tym, że angiogenina może wpływać na regulację transkrypcji rybosomalnego RNA. Angiogenina ulega translokacji do jądra komórki epitelialnej, gdzie odkłada się w jąderku. Tam łączy się z regionem promotorowym rybosomalnego DNA i stymuluje transkrypcję rRNA. Jako że transkrypcja rRNA reguluje produkcję rybosomów, a w konsekwencji potencjał translacyjny komórki, zaburzenia tego procesu mogą prowadzić do transformacji nowotworowej [193].

Wpływ angiogeniny na proliferację zarówno komórek epitelialnych jak i komórek nowotworowych zależy od jej translokacji do jądra komórkowego. Fizjologicznie proces ten jest ściśle regulowany i zależy od gęstości komórek.

Jednakże w komórkach nowotworowych do translokacji angiogeniny dochodzi w sposób ciągły, bez względu na zagęszczenie komórek [193].

W procesie nowotworowym transkrypcja białek rybosomalnych zachodzi poprzez szlak Akt-PI3K-mTOR-S6K. Kinaza Akt wpływa zarówno na wzrost komórek, jak i na ich przeżywalność. Jej aktywność jest często podwyższona w raku prostaty. Celem Akt jest kinaza mTOR, która uczestniczy w onkogenezie zależnej od PI3K i Akt. mTOR aktywuje kinazę S6 (S6K). S6K fosforyluje niewielkie białko rybosomalne S6 i kontroluje translację specyficznego rodzaju mRNA (5'TOP mRNA), kodującego informacje o białkach rybosomalnych, czynnikach elongacyjnych i paru innych białkach zaangażowanych w tworzenie rybosomów lub kontrolę translacji [194].

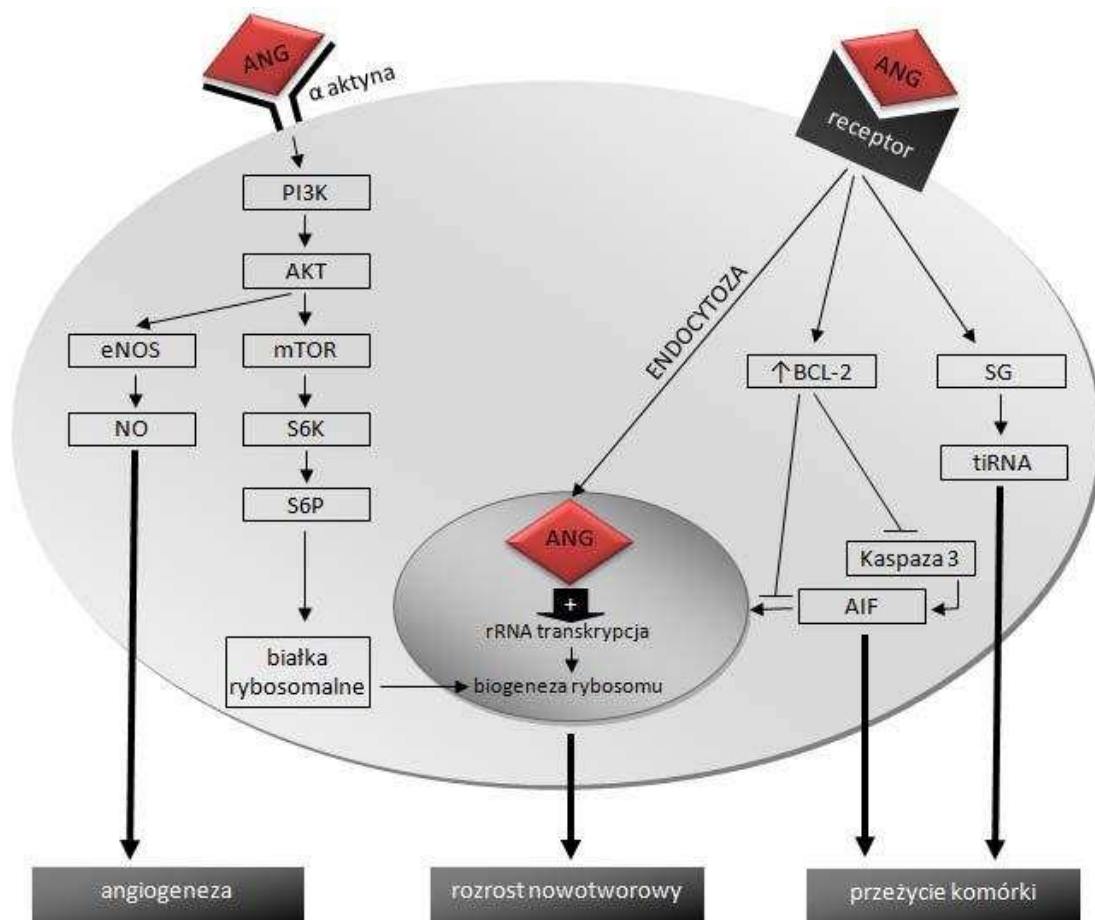
Produkcja rybosomów to proces wieloetapowy, polegający na łączeniu białek rybosomalnych i rRNA w równych proporcjach molarnych. Aktywacja Akt odpowiada za wzrost produkcji białek rybosomalnych, natomiast angiogenina stymuluje transkrypcję rRNA.

Co więcej, transkrypcja rRNA kontrolowana przez angiogeninę jest konieczna do proliferacji komórek indukowanej poprzez inne czynniki angiogenne: VEGF, β FGF, α FGF i EGF. Inhibicja translokacji angiogeniny do jądra komórkowego skutkuje hamowaniem aktywności angiogennej tych substancji. Neutralizacja angiogeniny w komórkach HeLa prowadzi do redukcji angiogenezy w obrębie nowotworu, nawet pomimo podwyższonych poziomów β FGF i VEGF [195]. Można więc wyciągnąć wniosek, że angiogenina stanowi niezbędny element w całym procesie angiogenezy.

Analiza informacji zgromadzonych na temat angiogeniny potwierdza fakt, że jest to substancja o niezwykłym potencjale, uczestnicząca w różnorodnych procesach fizjologicznych i patologicznych. Szczegółowe poznanie jej właściwości i roli w organizmie ludzkim może pomóc w opracowaniu nowych terapii i udoskonalić profilaktykę.

Rysunek 2

Funkcje angiogeniny [wg 191, w modyfikacji własnej]



PI3K – (ang. phosphoinositide 3-kinase) kinaza 3-fosfatydylinozytolu,
 Akt – kinaza Akt,
 mTOR (ang. mammalian target of rapamycin) – kinaza mTOR,
 S6K (ang. S6 kinase) – kinaza S6,
 S6P (ang. S6 protein) – białko S6,
 eNOS (ang. epithelial nitric oxide synthase) – śródbłonkowa syntaza tlenku azotu,
 NO (ang. nitric oxide) – tlenek azotu,
 SG (ang. stress granules),
 tiRNA (ang. tRNA-derived, stress-induced small RNA),
 AIF (ang. apoptosis inducing factor) – czynnik indukujący apoptozę.

2. CELE PRACY

Celem pracy było zbadanie angiogeniny w różnych jednostkach chorobowych z uwzględnieniem:

1. cukrzycy typu 2
2. nadciśnienia tętniczego
3. oraz zespołu metabolicznego.

3. MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto pacjentów z cukrzycą typu 2 i nadciśnieniem tętniczym leczonych ambulatoryjnie w latach 2008 -2011, kierowanych na rutynowe badanie okulistyczne do Kliniki Oftalmologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

3.1. Pacjenci i dane kliniczne

Grupa z cukrzycą typu 2

Badaniu została poddana grupa 49 pacjentów spełniających kryteria rozpoznania cukrzycy typu 2 według American Diabetes Association [197] i Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego [198] w wieku od 30 do 80 roku życia.

Kryteria rozpoznania cukrzycy typu 2:

1. Glikemia przygodna – oznaczona w próbce krwi o dowolnej porze dnia, niezależnie od pory ostatnio spożytego posiłku >200 mg/dl oraz gdy występują objawy hiperglikemii.
2. Glikemia na czczo – oznaczana dwukrotnie w próbce krwi pobranej 8-14 godzin po ostatnim posiłku >126 mg/dl.
3. Glikemia w 120. minucie trwania doustnego testu tolerancji glukozy (OGTT) >200 mg/dl.

U uczestników badania na podstawie wywiadu uzyskano szczegółowe informacje dotyczące obciążeń rodzinnych, stylu życia i stosowanych leków. Ponadto zostały określone: czas trwania cukrzycy, obwód talii, BMI, skurczowe i rozkurczowe ciśnienie tętnicze krwi, HbA1c, lipidogram CRP, kreatynina, mikroalbuminuria oraz poziom angiogeniny.

Celem zróżnicowania pacjentów z cukrzycą typu 2 zastosowano kryteriom wyrównania oparte o poziom HbA1c. Jako granicę przyjęto poziom HbA1c=7%

[197,198].

Grupa z nadciśnieniem tętniczym

Badaniu zostało poddanych 49 pacjentów spełniających kryteria nadciśnienia tętniczego.

Kryteria rozpoznania nadciśnienia tętniczego [199]:

1. Średnie wartości ciśnienia tętniczego (wyliczone co najmniej z dwóch pomiarów dokonanych podczas co najmniej dwóch różnych wizyt), są równe lub wyższe niż 140 mmHg dla ciśnienia skurczowego i/lub 90 mmHg dla rozkurczowego.
2. Średnie wartości ciśnienia tętniczego (wyliczone z dwóch pomiarów dokonanych podczas jednej wizyty), są równe lub wyższe niż 180 mmHg dla skurczowego i/lub 110 mmHg dla rozkurczowego ciśnienia tętniczego, po wykluczeniu czynników podwyższających wartości ciśnienia, np. lęku, bólu, spożycia alkoholu.
3. Na podstawie wiarygodnych danych z wywiadów lub dokumentacji pacjenta (wartości ciśnienia tętniczego lub fakt zażywania leków hipotensyjnych).

U uczestników badania zostały określone: czas trwania nadciśnienia tętniczego, HbA1c, lipidogram, CRP, kreatynina, mikroalbuminuria i poziom angiogeniny. Dodatkowo z wywiadu uzyskano szczegółowe dane na temat obciążeń rodzinnych, stylu życia oraz stosowanych leków. Ciśnienie tętnicze było mierzone dwukrotnie po 10 minutowym odpoczynku, w odosobnionym pomieszczeniu.

Grupa z zespołem metabolicznym

Do grupy z zespołem metabolicznym zakwalifikowano 32 pacjentów z grupy cukrzycowej i nadciśnieniowej spełniających kryteria rozpoznania zespołu metabolicznego.

Kryteria rozpoznania zespołu metabolicznego [200]:

1. Niezbędny element: otyłość centralna.
 - ✓ Obwód w talii >94 cm u mężczyzn
 - ✓ Obwód talii >80 cm u kobiet
 - ✓ Jeśli BMI >30 kg/m², pomiar obwodu talii nie jest wymagany
2. Oraz dwa z następujących:
 - ✓ Podwyższone triglicerydy $\geq 1,7$ mmol/l (151 mg/dl) lub leczenie z tego powodu
 - ✓ Obniżony cholesterol HDL:
 - <1,03 mmol/l (40 mg/dl) u mężczyzn
 - <1,29 mmol/l (50 mg/dl) u kobiet
 - ✓ Podwyższone ciśnienie tętnicze krwi:
 - skurczowe ≥ 130 mmHg
 - rozkurczowe ≥ 85 mmHg lub leczenie z tego powodu
 - ✓ Podwyższona glikemia na czczo
 - $\geq 5,6$ mmol/l (101 mg/dl) lub zdiagnozowana wcześniej cukrzyca

Grupa kontrolna

Grupę kontrolną utworzono z ochotników zgłaszających się profilaktycznie do poradni lekarza rodzinnego. Badaniu zostało poddanych 25 osób bez rozpoznanych chorób układu sercowo- naczyniowego oraz cukrzycy, wiekiem i płcią dopasowani do grup badanych.

Kryteria wykluczenia

Z badania wykluczono osoby, u których stwierdzono ostre lub przewlekłe choroby zapalne lub nowotworowe i osoby z chorobą nowotworową w wywiadzie.

Na realizację badań będących przedmiotem pracy uzyskano zgodę badanych pacjentów oraz Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym.

3.2. Badania biochemiczne

Stężenie hemoglobiny glikozylowanej oznaczano w surowicy krwi metodą immunturbidymetryczną używając Unimate 3 set (Hoffman-La Roche AG, Basel, Switzerland). Poziom CRP oznaczano testem Beckman Instr. Galway, Ireland.

Stężenie cholesterolu całkowitego, frakcji LDL, HDL i trójglicerydów oceniano przy użyciu zestawów CORMAY, Lublin, Polska.

Wydalenie albumin w moczu określano metodą immunturbidymetryczną przy użyciu testu Tina-quant (Boehringer Mannheim GmbH, Germany).

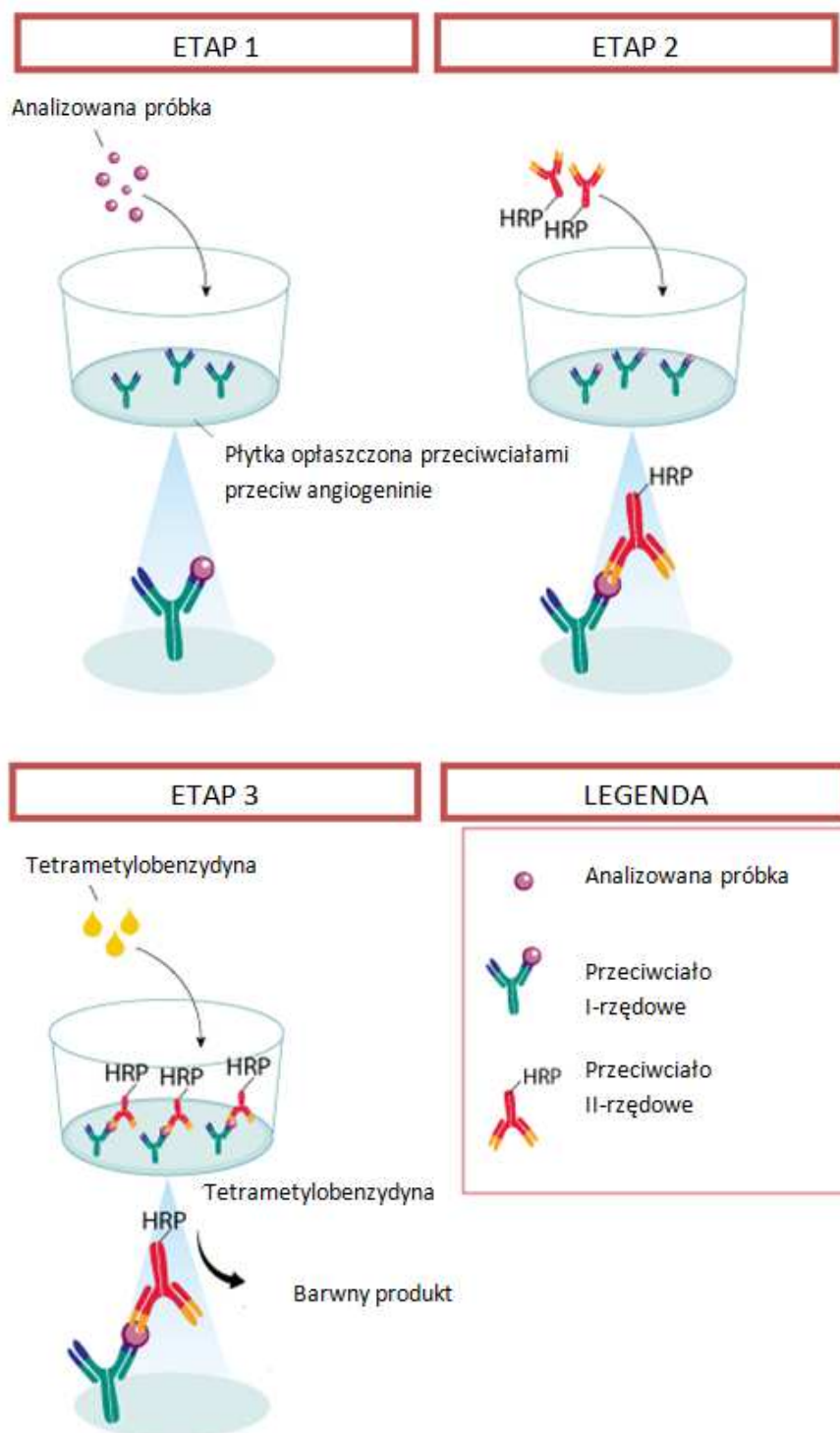
Wszystkie badania biochemiczne zostały wykonane Akademickim Centrum Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. (Kierownik : dr n. med. Zenon Jakubowski)

3.3. Badanie poziomu angiogeniny

Badanie poziomu angiogeniny wykonano u wszystkich badanych pacjentów metodą immunoenzymatyczną (ELISA). Badania poziomu angiogeniny przeprowadzono w Zakładzie Immunologii, Katedra Histologii i Immunologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. (Kierownik Katedry: prof. dr hab. Jolanta Myśliwska). Test immunoenzymatyczny ELISA wykonano przy użyciu zestawów Quantikine Human ANG Immunoassay firmy R&D Systems Mineapolis, USA według zaleceń producenta.

Schematycznie zasadę działania testu przedstawiono na rys. 3

Rysunek 3 **Schemat metody ELISA**



Źródło: www.rndsystems.com

3.3.1. Uzyskiwanie materiału biologicznego.

Zarówno od pacjentów badanych jak i zdrowej grupy kontrolnej pobrano 2 ml krwi żyłnej do probówek nie zawierających antykoagulantu, celem uzyskania surowicy. Ponadto od każdego z pacjentów pobrano próbkę krwi do badań biochemicznych. Pobraną krew odstawiano na 30 minut do wykrzepienia, a następnie wirowano przez 15 minut, przy prędkości 2500 obrotów/min (3K15, 4K15 Sigma, USA). W ten sposób uzyskaną surowicę przenoszono w komorze z laminarnym, pionowym przepływem powietrza (warunki jałowe) do sterylnych ependorfów w ilości ok. 500 µl. Uzyskane surowice przechowywano do dalszych badań w temperaturze -70 C.

Przed wykonaniem testu ELISA próbki surowicy rozcieńczano 200x roztworem rozcieńczającym Calibrator Diluent RD5C.

3.3.2. Procedura działania testu immunoenzymatycznego ELISA

Zestaw zawierał 96-dołkową płytkę (12 rzędów po 8 dołków) opłaszczoną przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko angiogeninie. Przed nałożeniem próbek, do każdego dołka dodano po 50 µl roztworu rozcieńczającego Assay Diluent RD1W. Następnie na płytkę наносono, po 200 µl na dołek, standard dołączony do zestawu przez producenta, surowice pacjentów zdrowych i surowice pacjentów badanych z cukrzycą typu 2 lub nadciśnieniem tętniczym. Każdą surowicę badano dwukrotnie. W ten sposób przygotowaną płytkę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie każdy dołek płukano trzykrotnie buforem Wash Buffer (400 µl). W kolejnym etapie dodawano po 200 µl koniugatu przeciwciał przeciwko angiogeninie do każdego dołka. Po 1 godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej dołki były ponownie trzykrotnie przepłukiwane buforem Wash Buffer. Następnie dodawano 200 µl Substrate Solution do każdego dołka i inkubowano płytkę przez 20 minut bez dostępu do światła. Po tym czasie do każdego dołka dodano 50 µl Stop Solution (kwas siarkowy). Wtedy mierzono absorbancję produktu barwnego reakcji enzymatycznej przy długości fali 450 nm za

pomocą czytnika (Bio-Tek FL600, Bio-Tek Instruments, Inc. USA). Na podstawie wyników uzyskanych z dołków standardowych utworzono krzywą standardową i na jej podstawie obliczono poziomy angiogeniny w badanych surowicach. Minimalne wykrywalne stężenie dla angiogeniny wynosi $< 6,0$ pg/mL.

3.3.3. Metody statystyczne

Obliczenia statystyczne zostały przeprowadzone przy użyciu pakietu statystycznego StatSoft, Inc. (2010). STATISTICA (data analysis software system), version 9.1. www.statsoft.com oraz arkusza kalkulacyjnego Excel.

Zmienne mierzalne zostały przedstawione za pomocą średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego, mediany, wartości minimalnej i maksymalnej. Zmienne jakościowe zostały scharakteryzowane jako licznosci oraz wartości procentowe.

Do weryfikacji, czy zmienna ilościowa pochodziła z populacji o rozkładzie normalnym zastosowano test W Shapiro-Wilka.

Istotność różnic pomiędzy dwoma grupami dla zmiennych mierzalnych została zweryfikowana testami istotności różnic: t-Studenta lub U Manna-Whitneya (w przypadku niespełnienia warunków stosowalności testu t-Studenta).

Istotność różnic pomiędzy więcej niż dwoma grupami dla zmiennych niepowiązanych zweryfikowano testem ANOVA lub Kruskala-Wallisa (w przypadku niespełnienia warunków stosowalności ANOVA).

Do oceny różnic licznosci występowania zmiennych jakościowych wykorzystano test niezależności Chi-kwadrat (lub odpowiednie skorygowane testy Chi-kwadrat z poprawkami).

Do oceny powiązania pomiędzy zmiennymi ilościowymi wykorzystano korelację Spearmana.

We wszystkich obliczeniach za poziom istotności przyjęto wartość $p=0,05$.

4. WYNIKI

4.1. Charakterystyka kliniczna badanych pacjentów

4.1.1. Cukrzyca typu 2 a grupa kontrolna

Tabela 5. Charakterystyka kliniczna pacjentów z cukrzycą oraz grupa kontrolna

Parametry kliniczne	Pacjenci z cukrzycą	Grupa kontrolna	p
Liczba (n)	49	25	
Płeć k/m (%)	28/21 57,14/42,86	15/10 60,00/40,00	0,82
Wiek (lata) mediana zakres	66,26±10,17 69 33-83	63,96±17,86 67 28-91	1,0
Waga (kg) mediana zakres	82,36±15,85 82,4 50-136	70,24±12,01 68 52-100	0,001
Wzrost (cm) mediana zakres	166,45±8,44 167 149-187	167,96±8,64 167 150-186	0,48
BMI (kg/m ²) mediana zakres	30,0±5,8 29,2 18,4-49,9	24,8±2,9 24,2 19,3-31,2	0,000015
Obwód talii (cm) mediana zakres	98,1±15,8 99 70-135	85,00±10,9 85 70-104	0,002
NT (n) (%)	42 85,71	0 0,00	0,0001
ChNS (n) (%)	18 36,73	-	-
Nefropatia (n) (%)	3 6,12	-	-
Stopa cukrzycowa (n) (%)	7 14,29	-	-
Angiogenina (ng/ml) mediana zakres	392,50±134,22 391,69 60,26-645,70	333,21±69,30 321,31 212,36-506,96	0,015
CRP (mg/l) mediana zakres	2,88±2,75 2,05 0,37-11,01	1,59±1,46 1,12 0,30-5,23	0,045
Cholesterol całkowity (mg/dl) mediana zakres	205,54±35,56 202,5 141-274	223,92±33,77 221 178-326	0,042
TG (mg/dl) mediana zakres	159,09±65,88 137 62-319	107,46±46,15 95,5 51-252	0,001
HDL (mg/dl)	49,36±17,34	60,87±17,00	0,001

mediana	48	55,5	
zakres	33-142	35-98	
LDL	124,25±31,85	142,00±30,55	0,02
mediana	115	138,5	
zakres	53-198	108-238	
HbA1c (%)	7,76±1,67	5,75±0,28	0,000001
mediana	7,40	5,80	
zakres	5,35-12,50	5,29-6,30	
Mikroalbuminuria (mg/l)	147,93±287,86	23,99±37,45	0,035
mediana	26,10	14,17	
zakres	2,30-998,85	0,00-154,80	
Ciśnienie skurczowe (mmHg)	138,34±16,48	122,48±12,26	0,00007
mediana	139	120	
zakres	110-180	90-140	
Ciśnienie rozkurczowe (mmHg)	76,81±13,34	76,60±6,57	0,33
mediana	80	80	
zakres	8-92	55-85	
Kreatynina (mg/dl)	1,15±0,31	0,89±0,27	0,001
mediana	1,05	0,80	
zakres	0,80-1,72	0,63-1,80	
ACEI (n)	33		
(%)	70,21	-	-
Statyna (n)	20		
(%)	43,48	-	-
Czas trwania cukrzycy (lata)	10,45±6,50		
mediana	10	-	-
zakres	1-30		
Retinopatia (n)	12		
(%)	25,53	-	-
Pochodne sulfonilomocznika (n)	12		
(%)	25,53	-	-
Biguanidy (n)	9		
(%)	18,37	-	-
Insulina (n)	11		
(%)	22,45	-	-

Kolorem czerwonym zaznaczono $p < 0,05$, czyli istotne statystycznie.

Materiał badawczy liczył 49 pacjentów z cukrzycą oraz 25 osobową grupę kontrolną. Wśród pacjentów z cukrzycą kobiety stanowiły 57,14% badanej grupy, a w grupie kontrolnej kobiety stanowiły 60% materiału badawczego.

Średni wiek w grupie osób z cukrzycą wynosił $66,26 \pm 10,17$ lat. Natomiast w grupie kontrolnej $63,96 \pm 17,86$ lat. Test statystyczny nie wykazał statystycznie istotnych różnic wieku w poszczególnych grupach, ale pacjenci z cukrzycą byli starsi od grupy kontrolnej.

Średnia waga w grupie osób z cukrzycą wynosiła $82,36 \pm 15,85$ kg, a w grupie kontrolnej $70,24 \pm 12,01$ kg. Test statystyczny wykazał statystycznie istotne różnice wagi pomiędzy pacjentami z cukrzycą i kontrolą ($p=0,001$); pacjenci z cukrzycą cechowali się istotnie wyższą wagą w porównaniu do kontroli.

Średni wzrost w grupie osób z cukrzycą wynosił $166,45 \pm 8,44$ cm, a w grupie kontrolnej $167,96 \pm 8,64$ cm. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic wzrostu w badanych grupach pacjentów ($p=0,48$).

Średni wskaźnik BMI w grupie osób z cukrzycą wynosił $30,0 \pm 5,8$ kg/m², a w grupie kontrolnej $24,8 \pm 2,9$ kg/m². Testy statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice wskaźnika BMI grupy pacjentów z cukrzycą w porównaniu do kontroli ($p=0,000015$). W tym przypadku pacjenci cechowali się wyższym wskaźnikiem BMI w stosunku do grupy kontrolnej.

Średni obwód talii w grupie osób z cukrzycą wynosił $98,1 \pm 15,8$ cm, a w grupie kontrolnej $85,0 \pm 10,9$ cm. Test statystyczny wykazał, że pacjenci z cukrzycą posiadali istotnie większy obwód talii w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,002$).

W grupie pacjentów z cukrzycą były 42 osoby z nadciśnieniem tętniczym, co stanowiło 85,71% materiału badawczego. W grupie kontrolnej nie stwierdzono występowania nadciśnienia tętniczego. Test statystyczny wykazał, że nadciśnienie tętnicze występowało istotnie częściej u chorych na cukrzycę w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,0001$).

Choroba niedokrwienna serca występowało u 36,73% pacjentów z cukrzycą.

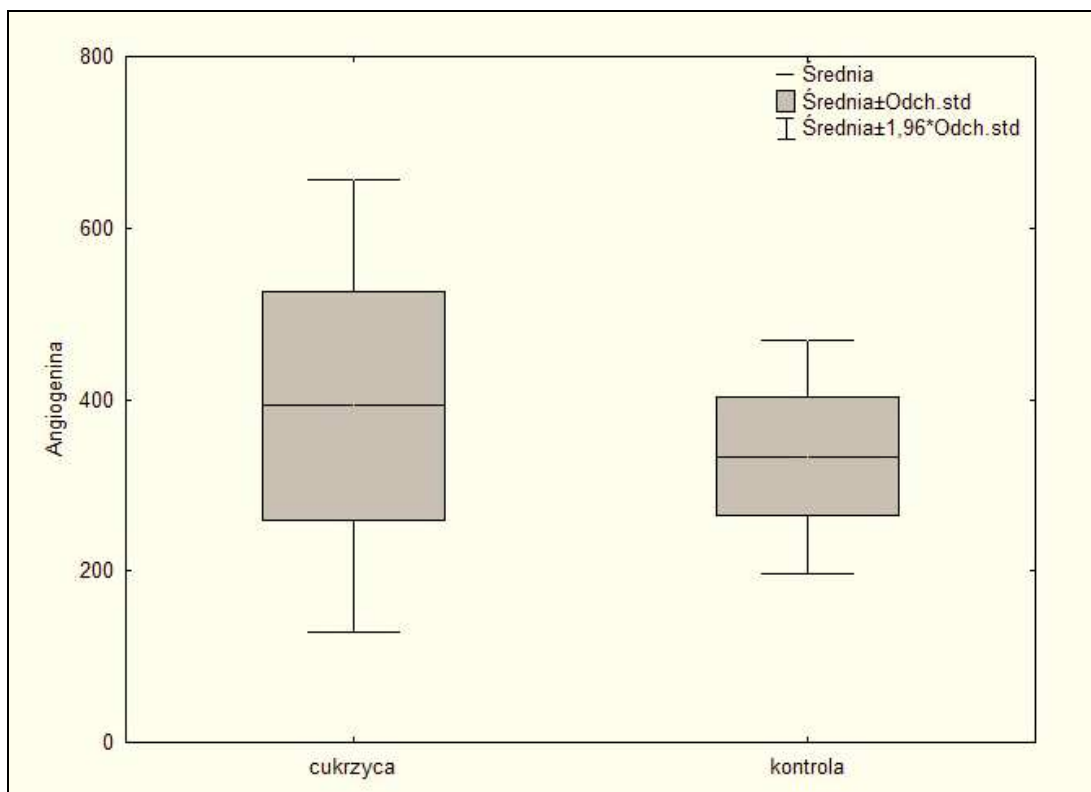
Nefropatia występowała tylko u chorych na cukrzycę w 6,12%.

Stopa cukrzycowa występowała tylko u chorych na cukrzycę w 14,29%.

Średnia wartość angiogeniny w grupie osób z cukrzycą wynosiła $392,50 \pm 134,22$ ng/ml, a w grupie kontrolnej $333,21 \pm 69,30$ ng/ml. Test statystyczny wykazał statystycznie istotne różnice angiogeniny w grupach ($p=0,015$), gdzie pacjenci z cukrzycą charakteryzowali się istotnie wyższą wartością, niż grupa

kontrolna.

Rysunek 4 Stężenie angiogeniny (ng/ml) w surowicy pacjentów z cukrzycą typu 2 i grupy kontrolnej



Średnia wartość CRP w grupie osób z cukrzycą wynosiła $2,88 \pm 2,75$ mg/l, a w grupie kontrolnej $1,59 \pm 1,46$ mg/l. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice CRP w grupie pacjentów z cukrzycą w porównaniu do kontroli ($p=0,045$). W tym przypadku pacjenci z cukrzycą cechowali się wyższym wskaźnikiem CRP w stosunku do grupy kontrolnej.

Średnia wartość cholesterolu całkowitego w grupie osób z cukrzycą wynosiła $205,54 \pm 35,56$ mg/dl, a w grupie kontrolnej $223,92 \pm 33,77$ mg/dl. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice, a średnia wartość cholesterolu całkowitego była większa w grupie kontrolnej ($p=0,042$).

Średnia wartość TG w grupie osób z cukrzycą wynosiła $159,09 \pm 65,88$ mg/dl,

a w grupie kontrolnej $107,46 \pm 46,15$ mg/dl. Testy statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice TG w grupie pacjentów z cukrzycą w porównaniu do kontroli ($p=0,001$). W tym przypadku pacjenci z cukrzycą cechowali się wyższym TG w stosunku do grupy kontrolnej.

Średnia wartość HDL w grupie osób z cukrzycą wynosiła $49,36 \pm 17,34$ mg/dl, a w grupie kontrolnej $60,87 \pm 17,00$ mg/dl. Testy statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice HDL w grupie pacjentów z cukrzycą w porównaniu do kontroli ($p=0,001$). W tym przypadku pacjenci z cukrzycą cechowali się niższym HDL w stosunku do grupy kontrolnej.

Średnia wartość LDL w grupie osób z cukrzycą wynosiła $124,25 \pm 31,85$ mg/dl, a w grupie kontrolnej $142,00 \pm 30,55$ mg/dl. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice ($p=0,02$). W tym przypadku pacjenci z cukrzycą cechowali się niższym LDL w stosunku do grupy kontrolnej.

Średnia wartość HbA1c w grupie osób z cukrzycą wynosiła $7,76 \pm 1,67\%$, a w kontrolnej $5,75 \pm 0,28\%$. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice HbA1c w grupie pacjentów z cukrzycą w porównaniu do kontroli ($p=0,000001$). W tym przypadku pacjenci z cukrzycą cechowali się wyższym HbA1c w stosunku do grupy kontrolnej.

Średnia wartość mikroalbuminurii w grupie osób z cukrzycą wynosiła $147,93 \pm 287,86$ mg/l, a w grupie kontrolnej $23,99 \pm 37,45$ mg/l. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnic ($p=0,035$). W tym przypadku pacjenci z cukrzycą cechowali się wyższą wartością mikroalbuminurii w stosunku do grupy kontrolnej.

Średnia wartość ciśnienia skurczowego w grupie osób z cukrzycą wynosiła $138,34 \pm 16,48$ mmHg, a w grupie kontrolnej $122,48 \pm 12,26$ mmHg. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice ciśnienia skurczowego w grupie pacjentów z cukrzycą w porównaniu do kontroli ($p=0,00007$). W tym przypadku pacjenci z cukrzycą cechowali się wyższym ciśnieniem skurczowym w stosunku do grupy kontrolnej.

Średnia wartość ciśnienia rozkurczowego w grupie osób z cukrzycą wynosiła $76,81 \pm 13,34$ mmHg, a w grupie kontrolnej $76,60 \pm 6,57$ mmHg. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic.

Średnia wartość kreatyniny w grupie osób z cukrzycą wynosiła $1,15 \pm 0,31$ mg/dl, a w grupie kontrolnej $0,89 \pm 0,27$ mg/dl. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnic ($p=0,001$), kreatynina była istotnie wyższa w grupie chorych na cukrzycę.

W grupie pacjentów z cukrzycą były 33 osoby, u których zastosowano ACEI, co stanowiło 70,21% materiału badawczego.

W grupie pacjentów z cukrzycą było 20 osób, u których zastosowano statyny, co stanowiło 43,48% materiału badawczego.

W grupie chorych na cukrzycę średni czas trwania choroby wynosił $10,45 \pm 6,50$ lat.

W grupie chorych na cukrzycę retinopatię miało 12 osób, co stanowiło 25,53% materiału badawczego.

W grupie pacjentów z cukrzycą było 12 osób, u których zastosowano pochodne sulfonilomocznika, co stanowiło 25,53% materiału badawczego.

W grupie pacjentów z cukrzycą było 9 osób, u których zastosowano biguanidy, co stanowiło 18,37% materiału badawczego.

W grupie pacjentów z cukrzycą było 11 osób, u których zastosowano insulinę, co stanowiło 22,45% materiału badawczego.

4.1.2. Cukrzyca typu 2 w odniesieniu do poziomu HbA1c

Tabela 6. Charakterystyka kliniczna pacjentów z cukrzycą dla HbA1c<7% oraz HbA1c≥7%

Parametry kliniczne	HbA1c<7%	HbA1c≥7%	p
Liczba (n)	18	31	
Płeć k/m (%)	8/10 44,44/55,56	20/11 64,52/35,48	0,17

Wiek (lata)	66,22±12,34	66,29±8,91	0,84
mediana	69	68	
zakres	43-83	33-82	
Waga (kg)	75,18±12,72	86,82±16,15	0,01
mediana	73,50	84,10	
zakres	50-98	56-136	
Wzrost (cm)	168,61±9,07	165,10±7,89	0,17
mediana	168	165	
zakres	155-187	149-180	
BMI (kg/m ²)	26,6±3,4	32,0±6,1	0,0003
mediana	26,5	31,1	
zakres	18,4-34,5	22,3-49,9	
Obwód talii (cm)	95,3±15,0	102,2±17,0	0,33
mediana	98	100	
zakres	70-120	75-135	
NT (n)	12	30	0,004
(%)	66,67	96,77	
ChNS (n)	2	16	0,005
(%)	11,11	51,61	
Nefropatia (n)	1	2	0,9
(%)	5,56	6,45	
Stopa cukrzycowa (n)	2	5	0,63
(%)	11,11	16,13	
Angiogenina(ng/ml)	446,37±134,10	361,23±126,03	0,03
mediana	449,42	357,80	
zakres	241,20-645,70	60,26-623,18	
CRP (mg/l)	2,05±1,20	3,99±3,81	0,11
mediana	1,93	2,73	
zakres	0,39-4,30	0,37-11,01	
Cholesterol całkowity (mg/dl)	195,18±29,25	212,07±38,09	0,13
mediana	199	210	
zakres	141-246	143-274	
TG (mg/dl)	145,56±68,53	167,11±64,20	0,31
mediana	126,50	177	
zakres	62-297	80-319	
HDL (mg/dl)	45,82±11,03	51,59±20,23	0,35
mediana	43	48	
zakres	33-66	35-142	
LDL (mg/dl)	118,81±23,87	127,48±35,80	0,39
mediana	113	116	
zakres	79-174	53-198	
Mikroalbuminuria (mg/l)	100,30±230,63	229,57±372,51	0,29
mediana	24,92	43,40	
zakres	2,30-824,90	14,20-998,85	
Ciśnienie skurczowe (mmHg)	130,53±12,76	142,77±16,87	0,013
mediana	130	140	
zakres	112-160	110-180	
Ciśnienie rozkurczowe (mmHg)	76,65±7,01	79,30±9,26	0,21
mediana	80	80	
zakres	60-90	60-92	
Kreatynina (mg/dl)	1,23±0,33	0,98±0,18	0,14
mediana	1,35	0,92	

zakres	0,80-1,72	0,81-1,23	
ACEI (n)	9	24	0,049
(%)	52,94	80,00	
Statyna (n)	5	15	0,16
(%)	29,41	51,72	
Retinopatia (n)	3	9	0,33
(%)	17,65	30,00	
Pochodne sulfonilomocznika(n)	11	1	0,0001
(%)	84,62	11,11	
Biguanidy (n)	7	2	0,005
(%)	53,85	22,22	
Insulina(n)	3	8	0,46
(%)	23,08	88,89	

Kolorem czerwonym zaznaczono $p < 0,05$, czyli istotne statystycznie.

Materiał badawczy liczył 18 pacjentów z $HbA1c < 7\%$ oraz 31 z $HbA1c \geq 7\%$. Wśród pacjentów z $HbA1c < 7\%$ kobiety stanowiły 44,44% badanej grupy, a w grupie $HbA1c \geq 7\%$ kobiety stanowiły 64,52% materiału badawczego.

Średni wiek w grupie osób z $HbA1c < 7\%$ wynosił $66,22 \pm 12,34$ lat. Natomiast w grupie z $HbA1c \geq 7\%$ $66,29 \pm 8,91$ lat. Test statystyczny nie wykazał statystycznie istotnych różnic wieku w poszczególnych grupach ($p = 0,84$).

Średnia waga w grupie osób z $HbA1c < 7\%$ wynosiła $75,18 \pm 12,72$ kg, a w grupie z $HbA1c \geq 7\%$ $86,82 \pm 16,15$ kg. Test statystyczny wykazał statystycznie istotne różnice wagi pomiędzy pacjentami w poszczególnych grupach ($p = 0,01$); pacjenci z $HbA1c \geq 7\%$ cechowali się istotnie wyższą wagą w porównaniu do grupy z $HbA1c < 7\%$.

Średni wzrost w grupie osób z $HbA1c < 7\%$ wynosił $168,61 \pm 9,07$ cm, a w grupie z $HbA1c \geq 7\%$ $165,10 \pm 7,89$ cm. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic wzrostu w badanych grupach pacjentów ($p = 0,17$).

Średni wskaźnik BMI w grupie osób z $HbA1c < 7\%$ wynosił $26,6 \pm 3,4$ kg/m², a w grupie z $HbA1c \geq 7\%$ $32,0 \pm 6,1$ kg/m². Testy statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice wskaźnika BMI grupy pacjentów z $HbA1c < 7\%$ w porównaniu do pacjentów z $HbA1c \geq 7\%$ ($p = 0,0003$). W tym przypadku pacjenci z $HbA1c \geq 7\%$ cechowali się wyższym wskaźnikiem BMI w stosunku do pacjentów z $HbA1c < 7\%$.

Średni obwód talii w grupie osób z $HbA1c < 7\%$ wynosił $95,3 \pm 15,0$ cm, a w grupie z $HbA1c \geq 7\%$ $102,2 \pm 17,0$ cm. Test statystyczny nie wykazał statystycznie istotnych różnic ($p=0,33$).

W grupie pacjentów z $HbA1c < 7\%$ było 12 osób z nadciśnieniem tętniczym, co stanowiło 66,67% materiału badawczego. W grupie z $HbA1c \geq 7\%$ było 30 osób z nadciśnieniem tętniczym, co stanowiło 96,77% materiału badawczego. Test statystyczny wykazał, że nadciśnienie tętnicze występuje istotnie częściej w grupie pacjentów z $HbA1c \geq 7\%$ ($p=0,004$).

Choroba niedokrwienna serca występowała u 11,11% pacjentów z $HbA1c < 7\%$ oraz u 51,61% z $HbA1c \geq 7\%$. Test statystyczny wykazał, że choroba niedokrwienna serca występowała istotnie częściej u chorych z $HbA1c \geq 7\%$ ($p=0,005$).

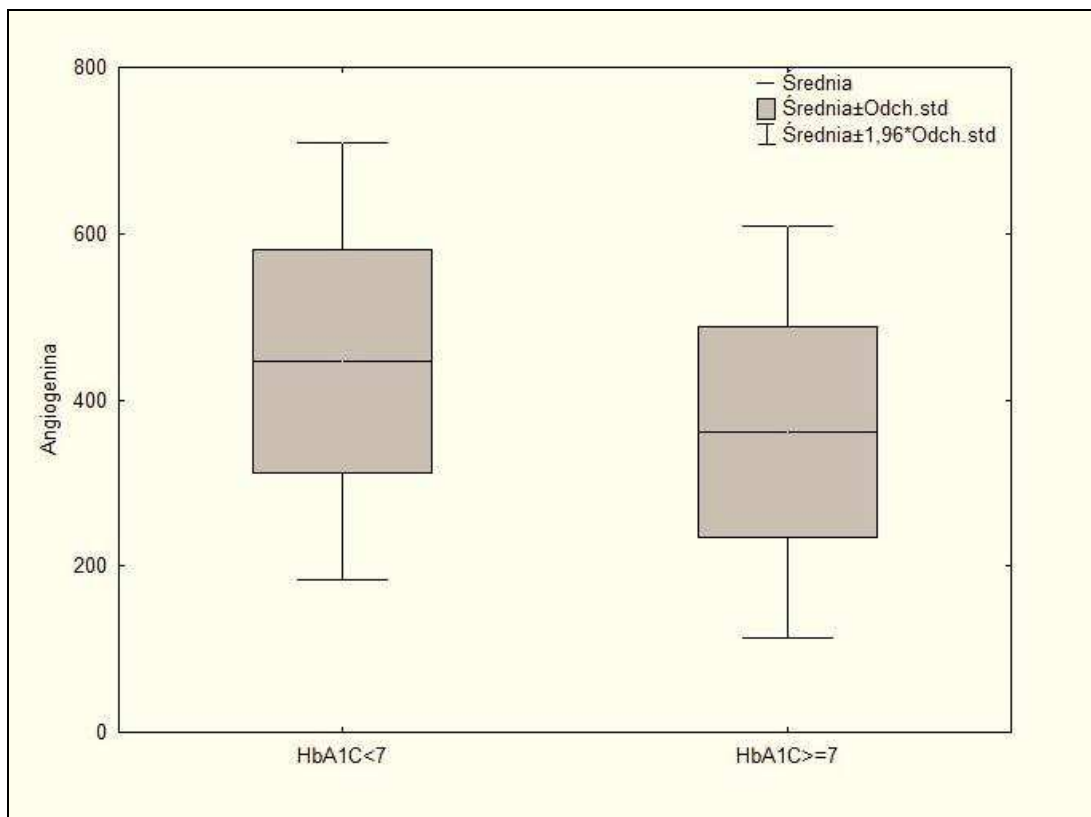
Nefropatia występowała u 5,56% pacjentów z $HbA1c < 7\%$ oraz u 6,45% z $HbA1c \geq 7\%$. Test statystyczny nie wykazał występowanie istotnych statystycznie różnic ($p=0,9$).

Stopa cukrzycowa występowała u 11,11% pacjentów z $HbA1c < 7\%$ oraz u 16,13% z $HbA1c \geq 7\%$. Test statystyczny nie wykazał występowanie istotnych statystycznie różnic ($p=0,63$).

Średnia wartość angiogeniny w grupie osób z $HbA1c < 7\%$ wynosiła $446,37 \pm 134,10$ ng/ml, a w grupie z $HbA1c \geq 7\%$ $361,23 \pm 126,03$ ng/ml. Test statystyczny wykazał statystycznie istotne różnice angiogeniny w grupach ($p=0,03$), gdzie pacjenci z $HbA1c < 7\%$ charakteryzowali się istotnie wyższą wartością, niż z $HbA1c \geq 7\%$.

Rysunek 5

Stężenie angiogeniny (ng/ml) w surowicy pacjentów z dobrze i słabo wyrównaną cukrzycą typu 2



Średnia wartość CRP w grupie osób z HbA1c<7% wynosiła $2,05 \pm 1,20$ mg/l, a w grupie z HbA1c≥7% $3,99 \pm 3,81$ mg/l. Test statystyczny nie wykazał występowanie istotnych statystycznie różnic ($p=0,11$).

Średnia wartość cholesterolu całkowitego w grupie osób z HbA1c<7% wynosiła $195,18 \pm 29,25$ mg/dl, a w grupie z HbA1c≥7% $212,07 \pm 38,09$ mg/dl. Test statystyczny nie wykazał występowanie istotnych statystycznie różnic ($p=0,13$).

Średnia wartość TG w grupie osób z HbA1c<7% wynosiła $145,56 \pm 68,53$ mg/dl, a w grupie z HbA1c≥7% $167,11 \pm 64,20$ mg/dl. Test statystyczny nie wykazał występowanie istotnych statystycznie różnic ($p=0,31$).

Średnia wartość HDL w grupie osób z HbA1c<7% wynosiła $45,82 \pm 11,03$ mg/dl, a w grupie z HbA1c≥7% $51,59 \pm 20,23$ mg/dl. Test statystyczny nie wykazał występowanie istotnych statystycznie różnic ($p=0,35$).

Średnia wartość LDL w grupie osób z HbA1c<7% wynosiła 118,81±23,87 mg/dl, a w grupie z HbA1c≥7% 127,48±35,80 mg/dl. Test statystyczny nie wykazał występowanie istotnych statystycznie różnic (p=0,39).

Średnia wartość mikroalbuminurii w grupie osób z HbA1c<7% wynosiła 100,30±230,63 mg/l, a w grupie z HbA1c≥7% 229,57±372,51 mg/l. Test statystyczny nie wykazał występowanie istotnych statystycznie różnic (p=0,29).

Średnia wartość ciśnienia skurczowego w grupie osób z HbA1c<7% wynosiła 130,53±12,76 mmHg, a w grupie z HbA1c≥7% 142,77±16,87 mmHg. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice ciśnienia skurczowego w grupie pacjentów z HbA1c<7% w porównaniu do pacjentów z HbA1c≥7% (p=0,01). W tym przypadku pacjenci z HbA1c≥7% cechowali się wyższym ciśnieniem skurczowym w stosunku do grupy z HbA1c<7%.

Średnia wartość ciśnienia rozkurczowego w grupie osób z HbA1c<7% wynosiła 76,65±7,01 mmHg, a w grupie z HbA1c≥7% 79,30±9,26 mmHg. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic (p=0,21).

Średnia wartość kreatyniny w grupie osób z HbA1c<7% wynosiła 1,23±0,33 mg/dl, a w grupie z HbA1c≥7% 0,98±0,18 mg/dl. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic (p=0,14).

ACEI stosowano u 52,94% pacjentów z HbA1c<7% oraz u 80,00% z HbA1c≥7%. Test statystyczny wykazał, że istotnie częściej stosowano ACEI w grupie pacjentów z HbA1c≥7% (p=0,049).

Statyny stosowano u 29,41% pacjentów z HbA1c<7% oraz u 51,72% z HbA1c≥7%. Test statystyczny nie wykazał występowanie istotnych statystycznie różnic (p=0,16).

Retinopatia występowała u 17,65% pacjentów z HbA1c<7% oraz u 30% z HbA1c≥7%. Test statystyczny nie wykazał występowanie istotnych statystycznie różnic (p=0,3319).

Pochodne sulfonylomocznika stosowano u 84,62% pacjentów z HbA1c<7% oraz u 11,11% z HbA1c≥7%. Test statystyczny wykazał, że istotnie częściej stosowano pochodne sulfonylomocznika w grupie pacjentów z HbA1c<7 (p=0,0001).

Biguanidy stosowano u 53,85% pacjentów z HbA1c<7% oraz u 22,22% z HbA1c≥7%. Test statystyczny wykazał, że istotnie częściej stosowano biguanidy w grupie pacjentów z HbA1c<7% (p=0,005).

Insulinę stosowano u 23,08% pacjentów z HbA1c<7% oraz u 88,89% z HbA1c≥7%. Test statystyczny nie wykazał występowanie istotnych statystycznie różnic (p=0,46).

4.1.3. Nadciśnienie tętnicze a grupa kontrolna

Tabela 7. Charakterystyka kliniczna pacjentów z NT oraz grupa kontrolna

Parametry kliniczne	Pacjenci z NT	Grupa kontrolna	p
Liczba (n)	49	25	
Płeć k/m (%)	27/22 55,10/44,90	15/10 60,00/40,00	0,69
Wiek (lata)	70,00±13,36	63,96±17,86	0,16
mediana	72	67	
zakres	30-92	28-91	
Waga (kg)	75,57±15,68	70,24±12,01	0,14
mediana	74	68	
zakres	47-125	52-100	
Wzrost (cm)	165,63±9,58	167,96±8,64	0,31
mediana	165	167	
zakres	150-190	150-186	
BMI (kg/m ²)	27,3±3,8	24,8±2,9	0,003
mediana	27,5	24,2	
zakres	19,9-35,5	19,3-31,2	
Obwód talii (cm)	92,5±13,8	85,0±10,9	0,027
mediana	90	85	
zakres	60-130	70-104	
NT (n)	49		
(%)	100,00	-	-
Czas trwania NT (lata)	12,16±11,54		
mediana	10	-	-
zakres	0-50		
ChNS (n)	13		
(%)	26,53	-	-
Angiogenina (ng/ml)	382,63±93,53	333,21±69,30	0,024
mediana	393,16	321,31	
zakres	219,84-679,10	212,36-506,96	

CRP (mg/l)	4,55±6,32	1,59±1,46	0,007
mediana	2,24	1,12	
zakres	0,20-38,40	0,30-5,23	
Cholesterol całkowity (mg/dl)	218,66±48,25	223,92±33,77	0,44
mediana	214	221	
zakres	150-330	178-326	
TG (mg/dl)	127,28±56,38	107,46±46,15	0,11
mediana	122	95,5	
zakres	54-363	51-252	
HDL (mg/dl)	53,45±11,76	60,87±17,00	0,035
mediana	54	55,5	
zakres	35-84	35-98	
LDL (mg/dl)	137,89±42,47	142,00±30,55	0,54
mediana	134,5	138,5	
zakres	78-240	108-238	
HbA1c(%)	5,81±0,44	5,75±0,28	0,76
mediana	5,80	5,80	
zakres	4,73-7,42	5,29-6,30	
Mikroalbuminy (mg/l)	24,84±25,34	23,99±37,45	0,4
mediana	16,67	14,17	
zakres	0,00-109,00	0,00-154,80	
Ciśnienie skurczowe (mmHg)	137,37±13,51	122,48±12,26	0,00002
mediana	140	120	
zakres	108-187	90-140	
Ciśnienie rozkurczowe (mmHg)	81,45±9,14	76,60±6,57	0,016
mediana	80	80	
zakres	60-105	55-85	
Kreatynina (mg/dl)	0,92±0,21	0,89±0,27	0,25
mediana	0,85	0,80	
zakres	0,59-1,65	0,63-1,80	
ACEI (n)	25		
(%)	55,56	-	-
Statyna (n)	15		
(%)	30,61	-	-
β-bloker (n)	26		
(%)	53,06	-	-
Diuretyk (n)	14		
(%)	28,57	-	-
Ca-bloker (n)	14		
(%)	28,57	-	-
Sartan (n)	10		
(%)	20,41	-	-
Terapia (1/2/3/4)	13/18/12/1		
(%)	26,53/36,73/24,49/2,04	-	-

Kolorem czerwonym zaznaczono $p < 0,05$, czyli istotne statystycznie.

Materiał badawczy był złożony z 49 pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. Natomiast grupa kontrolna liczyła 25 osób.

Wśród pacjentów z nadciśnieniem tętniczym było 55,10% kobiet. W grupie kontrolnej kobiety stanowiły 60% materiału badawczego.

Średni wiek w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym wynosił $70,00 \pm 13,36$ lat. Natomiast w grupie kontrolnej $63,96 \pm 17,86$ lat. Test statystyczny nie wykazał statystycznie istotnych różnic wieku w poszczególnych grupach ($p=0,16$).

Średnia waga w grupie z nadciśnieniem tętniczym wynosiła $75,57 \pm 15,68$ kg. Natomiast w grupie kontrolnej $70,24 \pm 12,01$ kg. Test statystyczny nie wykazał statystycznie istotnych różnic wagi pomiędzy pacjentami z nadciśnieniem tętniczym i kontrolą ($p=0,14$).

Średni wzrost w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym wynosił $165,63 \pm 9,58$ cm. Natomiast w grupie kontrolnej $167,96 \pm 8,64$ cm. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic wzrostu w badanych grupach pacjentów ($p=0,31$).

Średni wskaźnik BMI w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym wynosił $27,3 \pm 3,8$ kg/m². Natomiast w grupie kontrolnej $24,8 \pm 2,9$ kg/m². Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice wskaźnika BMI grup pacjentów z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do kontroli ($p=0,003$).

Średni obwód talii w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym wynosił $92,5 \pm 13,8$ cm, a w grupie kontrolnej $85,0 \pm 10,9$ cm. Test statystyczny wykazał, że pacjenci z nadciśnieniem tętniczym posiadali istotnie większy obwód talii w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,027$).

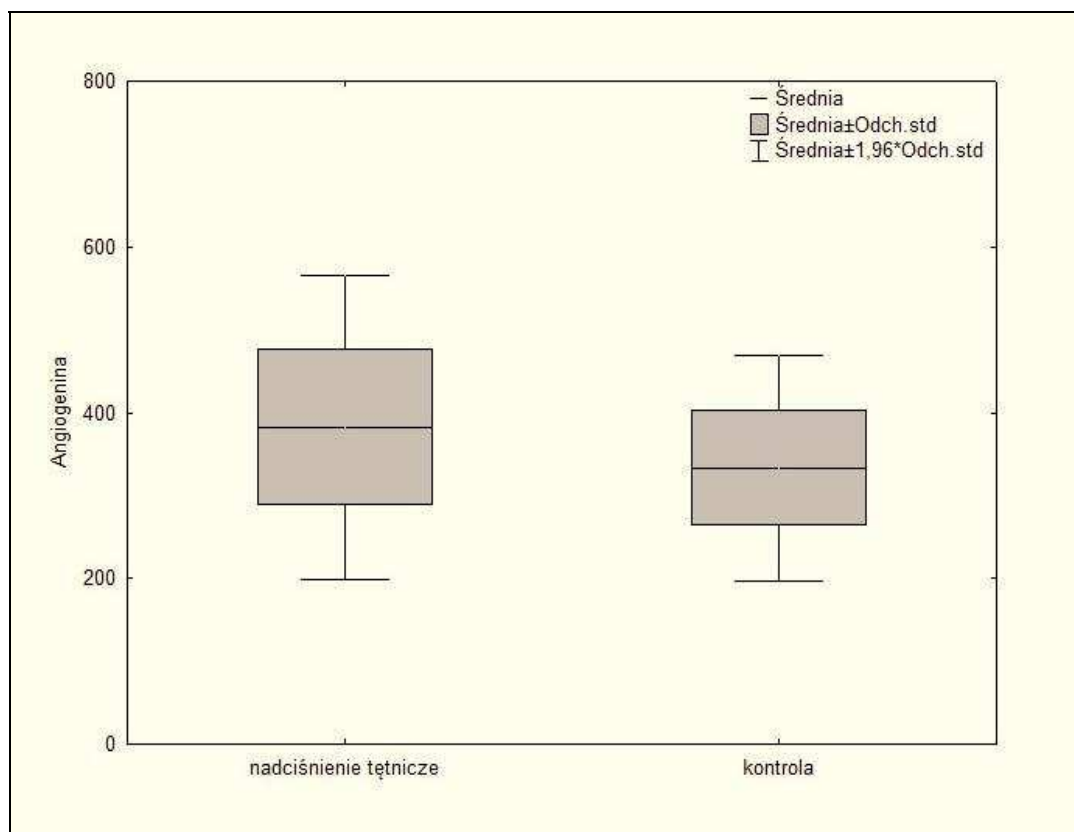
W grupie osób z nadciśnieniem tętniczym średni czas trwania choroby wynosił $12,16 \pm 11,54$ lat.

Choroba niedokrwienna serca występowała u 26,53% pacjentów z nadciśnieniem tętniczym.

Średnia wartość angiogeniny w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym wynosiła $382,63 \pm 93,53$ ng/ml. Natomiast w grupie kontrolnej $333,21 \pm 69,30$ ng/ml. Test statystyczny wykazał statystycznie istotne różnice angiogeniny w poszczególnych

grupach ($p=0,024$), pacjenci z nadciśnieniem tętniczym mają istotnie większą wartość angiogeniny w porównaniu do kontroli.

Rysunek 6 Stężenie angiogeniny (ng/ml) w surowicy pacjentów z nadciśnieniem i grupy kontrolnej



Średnia wartość CRP w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym wynosiła $4,55 \pm 6,32$ mg/l. Natomiast w grupie kontrolnej $1,59 \pm 1,46$ mg/l. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice CRP w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do kontroli ($p=0,007$). W tym przypadku pacjenci z NT cechowali się wyższym wskaźnikiem CRP w stosunku do grupy kontrolnej.

Średnia wartość cholesterolu całkowitego w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym wynosiła $218,66 \pm 48,25$ mg/dl. Natomiast w grupie kontrolnej $223,92 \pm 33,77$ mg/dl. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic, ale średnia wartość cholesterolu całkowitego była największa w grupie kontrolnej ($p=0,44$).

Średnia wartość TG w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym wynosiła $127,28 \pm 56,38$ mg/dl. Natomiast w grupie kontrolnej $107,46 \pm 46,15$ mg/dl. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic TG w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do kontroli ($p=0,11$).

Średnia wartość HDL w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym wynosiła $53,45 \pm 11,76$ mg/dl. Natomiast w grupie kontrolnej $60,87 \pm 17,00$ mg/dl. Testy statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice HDL w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do kontroli ($p=0,035$). W tym przypadku pacjenci z nadciśnieniem tętniczym cechowali się niższym HDL w stosunku do grupy kontrolnej.

Średnia wartość LDL w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym wynosiła $137,89 \pm 42,47$ mg/dl. Natomiast w grupie kontrolnej $142,00 \pm 30,55$ mg/dl. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic ($p=0,54$).

Średnia wartość HbA1c w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym wynosiła $5,81 \pm 0,44$ %. Natomiast w grupie kontrolnej $5,75 \pm 0,28$ %. Testy statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic HbA1c w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do kontroli ($p=0,76$).

Średnia wartość mikroalbuminurii w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym wynosiła $24,84 \pm 25,34$ mg/l, a w grupie kontrolnej $23,99 \pm 37,45$ mg/l. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic ($p=0,4$).

Średnia wartość ciśnienia skurczowego w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym wynosiła $137,37 \pm 13,51$ mmHg. Natomiast w grupie kontrolnej $122,48 \pm 12,26$ mmHg. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice ciśnienia skurczowego w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do kontroli ($p=0,00002$). W tym przypadku pacjenci z nadciśnieniem tętniczym cechowali się wyższym ciśnieniem skurczowym w stosunku do grupy kontrolnej.

Średnia wartość ciśnienia rozkurczowego w grupie osób z nadciśnieniem

tętnicznym wynosiła $81,45 \pm 9,14$ mmHg. Natomiast w grupie kontrolnej $76,60 \pm 6,57$ mmHg. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice ($p=0,016$). W tym przypadku pacjenci z nadciśnieniem tętnicznym cechowali się wyższym ciśnieniem rozkurczowym w stosunku do grupy kontrolnej.

Średnia wartość kreatyniny w grupie osób z nadciśnieniem tętnicznym wynosiła $0,92 \pm 0,21$ mg/dl, a w grupie kontrolnej $0,89 \pm 0,27$ mg/dl. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic ($p=0,25$).

W grupie pacjentów z nadciśnieniem tętnicznym było 25 osób, u których zastosowano ACEI, co stanowiło 55,56% materiału badawczego.

W grupie z nadciśnieniem tętnicznym było 15 osób, u których zastosowano statyny, co stanowiło 30,61% całej grupy.

W grupie pacjentów z nadciśnieniem tętnicznym było 26 osób, u których zastosowano beta-blokery, co stanowiło 53,06% materiału badawczego.

W grupie pacjentów z nadciśnieniem tętnicznym było 14 osób, u których zastosowano diuretyki, co stanowiło 28,57% materiału badawczego.

W grupie pacjentów z nadciśnieniem tętnicznym było 14 osób, u których zastosowano Ca-blokery, co stanowiło 28,57% materiału badawczego.

W grupie pacjentów z nadciśnieniem tętnicznym było 10 osób, u których zastosowano sartan, co stanowiło 20,41% materiału badawczego.

4.1.4. Zespół metaboliczny a grupa kontrolna

Tabela 8. Charakterystyka kliniczna pacjentów z zespołem metabolicznym oraz grupa kontrolna

Parametry kliniczne	Zespół metaboliczny	Grupa kontrolna	p
Liczba (n)	32	21	
Płeć k/m (%)	13/19 40,63/59,38	14/7 66,67/33,33	0,06
Wiek (lata) mediana zakres	64,81 $\pm$ 16,13 69 28-92	65,90 $\pm$ 16,19 67 30-91	0,81
Waga (kg) mediana zakres	84,73 $\pm$ 13,80 85 55-125	67,76 $\pm$ 11,04 67 52-100	0,00002

Wzrost (cm)	171,34±10,20	166,24±8,03	0,06
mediana	173	166	
zakres	150-190	150-181	
BMI (kg/m ²)	28,7±3,1	24,4±2,8	0,000004
mediana	29,1	24,1	
zakres	23,5-35,4	19,3-31,2	
Obwód talii (cm)	99,9±11,8	83,1±10,4	0,00007
mediana	100	85	
zakres	80-130	70-102	
NT (n)	24		
(%)	75,00	-	-
ChNS (n)	6		
(%)	18,75	-	-
Nefropatia (n)	3		
(%)	9,38	-	-
Stopa cukrzycowa (n)	3		
(%)	9,38	-	-
Angiogenina (ng/dl)	404,82±107,86	325,50±69,53	0,005
mediana	387,20	312,55	
zakres	253,86-679,10	212,36-506,96	
CRP (mg/l)	3,18±3,14	1,66±1,54	0,049
mediana	4,14	2,05	
zakres	0,39-13,10	0,30-5,23	
Cholesterol całkowity (mg/dl)	215,30±45,67	223,95±33,18	0,25
mediana	209	235	
zakres	141-330	178-326	
TG (mg/dl)	147,13±68,16	102,30±46,14	0,005
mediana	144	93,50	
zakres	54-363	51-252	
HDL (mg/dl)	48,17±13,15	61,40±15,12	0,0009
mediana	48	57,50	
zakres	34-98	40-93	
LDL (mg/dl)	134,38±38,58	142,60±30,61	0,25
mediana	130	142,50	
zakres	78-240	108-238	
HbA1c (%)	6,27±0,96	5,77±0,27	0,09
mediana	6,00	5,80	
zakres	4,73-8,92	5,40-6,30	
Mikroalbuminuria (mg/l)	42,94±82,75	26,22±39,56	0,26
mediana	18,35	14,17	
zakres	0,00-441,90	0,90-154,80	
Ciśnienie skurczowe (mmHg)	140,13±14,34	120,95±12,51	0,00002
mediana	137	120	
zakres	120-187	90-140	
Ciśnienie rozkurczowe (mmHg)	83,61±9,73	75,95±6,82	0,003
mediana	85	80	
zakres	60-105	55-85	
Kreatynina (mg/dl)	1,01±0,26	0,91±0,29	0,023
mediana	0,92	0,78	
zakres	0,68-1,65	0,63-1,80	
ACEI (n)	18		

(%)	69,23	-	-
Statyna (n)	8		
(%)	30,77	-	-
Pochodne sulfonilomocznika (n)	6		
(%)	18,75	-	-
Biguanidy (n)	5		
(%)	15,62	-	-
Insulina (n)	6		
(%)	18,75	-	-
β -bloker (n)	10		
(%)	31,25	-	-
Diuretyk (n)	6		
(%)	18,75	-	-
Ca-bloker (n)	3		
(%)	9,37	-	-
Sartan (n)	3		
(%)	9,37	-	-
Terapia (1/2/3)	3/5/6		
(%)	9,37/15,62/18,75	-	-

Kolorem czerwonym zaznaczono $p < 0,05$, czyli istotne statystycznie.

Materiał badawczy liczył 32 pacjentów z zespołem metabolicznym oraz 21-osobową grupę kontrolną. Wśród pacjentów z zespołem metabolicznym kobiety stanowiły 40,63% badanej grupy, a w grupie kontrolnej kobiety stanowiły 66,67% materiału badawczego.

Średni wiek w grupie osób z zespołem metabolicznym wynosił $64,81 \pm 16,13$ lat. Natomiast w grupie kontrolnej $65,90 \pm 16,19$ lat. Test statystyczny nie wykazał statystycznie istotnych różnic wieku w poszczególnych grupach ($p = 0,81$).

Średnia waga w grupie osób z zespołem metabolicznym wynosiła $84,73 \pm 13,80$ kg, a w grupie kontrolnej $67,76 \pm 11,04$ kg. Test statystyczny wykazał statystycznie istotne różnice wagi pomiędzy pacjentami z zespołem metabolicznym i kontrolą ($p = 0,00002$); pacjenci z zespołem metabolicznym cechowali się istotnie wyższą wagą w porównaniu do kontroli.

Średni wzrost w grupie osób z zespołem metabolicznym wynosił $171,34 \pm 10,20$ cm, a w grupie kontrolnej $166,24 \pm 8,03$ cm. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic wzrostu w badanych grupach pacjentów ($p = 0,06$), można powiedzieć, że jest „na granicy istotności”; pacjenci z zespołem metabolicznym są

wyżsi).

Średni wskaźnik BMI w grupie osób z zespołem metabolicznym wynosił $28,7 \pm 3,1$ kg/m², a w grupie kontrolnej $24,4 \pm 2,8$ kg/m². Testy statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice wskaźnika BMI grupy pacjentów z zespołem metabolicznym w porównaniu do kontroli ($p=0,000004$). W tym przypadku pacjenci z zespołem metabolicznym cechowali się wyższym wskaźnikiem BMI w stosunku do grupy kontrolnej.

Średni obwód talii w grupie osób z zespołem metabolicznym wynosił $99,9 \pm 11,8$ cm, a w grupie kontrolnej $83,1 \pm 10,4$ cm. Test statystyczny wykazał, że pacjenci z zespołem metabolicznym posiadali istotnie większy obwód talii w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,00007$).

W grupie pacjentów z zespołem metabolicznym były 24 osoby z nadciśnieniem tętniczym, co stanowiło 75% materiału badawczego.

Choroba niedokrwienna serca występowała u 18,75% pacjentów z zespołem metabolicznym.

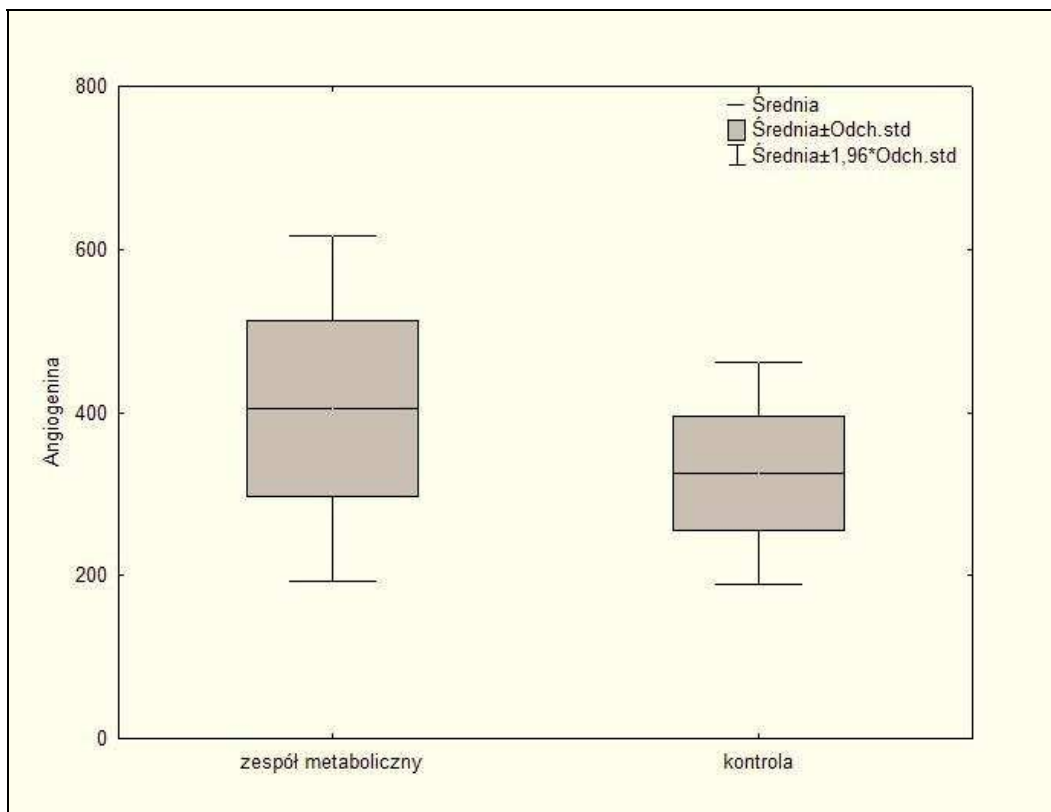
Nefropatia występowała u chorych z zespołem metabolicznym tylko w 9,38%.

Stopa cukrzycowa występowała u chorych z zespołem metabolicznym tylko w 9,38%.

Średnia wartość angiogeniny w grupie osób z zespołem metabolicznym wynosiła $404,82 \pm 107,86$ ng/ml, a w grupie kontrolnej $325,50 \pm 69,53$ ng/ml. Test statystyczny wykazał statystycznie istotne różnice angiogeniny w grupach ($p=0,005$), gdzie pacjenci z zespołem metabolicznym charakteryzowali się istotnie wyższą wartością, niż grupa kontrolna.

Rysunek 7

Stężenie angiogeniny (ng/ml) w surowicy pacjentów z zespołem metabolicznym i grupy kontrolnej



Średnia wartość CRP w grupie osób z zespołem metabolicznym wynosiła $3,18 \pm 3,14$ mg/l, a w grupie kontrolnej $1,66 \pm 1,54$ mg/l. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice CRP w grupie pacjentów z zespołem metabolicznym w porównaniu do kontroli ($p=0,05$). W tym przypadku pacjenci z zespołem metabolicznym cechowali się wyższym wskaźnikiem CRP w stosunku do grupy kontrolnej.

Średnia wartość cholesterolu całkowitego w grupie osób z zespołem metabolicznym wynosiła $215,30 \pm 45,67$ mg/dl, a w grupie kontrolnej $223,95 \pm 33,18$ mg/dl. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic ($p=0,25$).

Średnia wartość TG w grupie osób z zespołem metabolicznym wynosiła $147,13 \pm 68,16$ mg/dl, a w grupie kontrolnej $102,30 \pm 46,14$ mg/dl. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice TG w grupie pacjentów z zespołem metabolicznym w porównaniu do kontroli ($p=0,005$). W tym przypadku pacjenci

z zespołem metabolicznym cechowali się wyższym TG w stosunku do grupy kontrolnej.

Średnia wartość HDL w grupie osób z zespołem metabolicznym wynosiła $48,17 \pm 13,15$ mg/dl, a w grupie kontrolnej $61,40 \pm 15,12$ mg/dl. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice HDL w grupie pacjentów z zespołem metabolicznym w porównaniu do kontroli ($p=0,0009$). W tym przypadku pacjenci z zespołem metabolicznym cechowali się niższym HDL w stosunku do grupy kontrolnej.

Średnia wartość LDL w grupie osób z zespołem metabolicznym wynosiła $134,38 \pm 38,58$ mg/dl, a w grupie kontrolnej $142,60 \pm 30,61$ mg/dl. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic ($p=0,25$).

Średnia wartość HbA1c w grupie osób z zespołem metabolicznym wynosiła $6,27 \pm 0,96$ %, a w kontrolnej $5,77 \pm 0,27$ %. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic ($p=0,09$), ale pacjenci z zespołem metabolicznym cechowali się wyższym HbA1c w stosunku do grupy kontrolnej.

Średnia wartość mikroalbuminurii w grupie z zespołem metabolicznym wynosiła $42,94 \pm 82,75$ mg/l, a w grupie kontrolnej $26,22 \pm 39,56$ mg/l. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic ($p=0,26$).

Średnia wartość ciśnienia skurczowego w grupie osób z zespołem metabolicznym wynosiła $140,13 \pm 14,34$ mmHg, a w grupie kontrolnej $120,95 \pm 12,51$ mmHg. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice ciśnienia skurczowego w grupie pacjentów z zespołem metabolicznym w porównaniu do kontroli ($p=0,00002$). W tym przypadku pacjenci z zespołem metabolicznym cechowali się wyższym ciśnieniem skurczowym w stosunku do grupy kontrolnej.

Średnia wartość ciśnienia rozkurczowego w grupie osób z zespołem metabolicznym wynosiła $83,61 \pm 9,73$ mmHg, a w grupie kontrolnej $75,95 \pm 6,82$ mmHg. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice ($p=0,003$), pacjenci

z zespołem metabolicznym mają istotnie wyższe ciśnienie rozkurczowe.

Średnia wartość kreatyniny w grupie osób z zespołem metabolicznym wynosiła $1,01 \pm 0,26$ mg/dl, a w grupie kontrolnej $0,91 \pm 0,29$ mg/dl. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnic ($p=0,023$), kreatynina była istotnie wyższa w grupie chorych z zespołem metabolicznym.

W grupie pacjentów z zespołem metabolicznym było 18 osób, u których zastosowano ACEI, co stanowiło 69,23% materiału badawczego.

W grupie pacjentów z zespołem metabolicznym było 8 osób, u których zastosowano statyny, co stanowiło 30,77% materiału badawczego.

W grupie pacjentów z zespołem metabolicznym było 6 osób, u których zastosowano pochodne sulfonilomocznika, co stanowiło 18,75% materiału badawczego.

W grupie pacjentów z zespołem metabolicznym było 5 osób, u których zastosowano biguanidy, co stanowiło 15,62% materiału badawczego.

W grupie pacjentów z zespołem metabolicznym było 11 osób, u których zastosowano insulinę, co stanowiło 18,75% materiału badawczego.

W grupie pacjentów z zespołem metabolicznym było 10 osób, u których zastosowano beta-bloker, co stanowiło 31,25% materiału badawczego.

W grupie pacjentów z zespołem metabolicznym było 6 osób, u których zastosowano diuretyk, co stanowiło 18,75% materiału badawczego.

W grupie pacjentów z zespołem metabolicznym były 3 osoby, u których zastosowano Ca-bloker, co stanowiło 9,37% materiału badawczego.

W grupie pacjentów z zespołem metabolicznym było 3 osób, u których zastosowano sartan, co stanowiło 9,37% materiału badawczego.

4.2. Analiza zależności pomiędzy poziomem angiogeniny, a określonymi stanami klinicznymi.

4.2.1. Cukrzyca typu 2

Tabela 9. Podstawowe statystyki opisowe angiogeniny (ng/ml) w grupie kobiet i mężczyzn chorych na cukrzycę.

	Średnia	Ważnych	Minimum	Maksimum	Odch.std	Mediana
K	371,68	28	60,26	645,70	150,84	344,19
M	420,27	21	244,16	583,96	105,37	420,20
Ogół	392,51	49	60,26	645,70	134,22	391,69

Średnia wartość angiogeniny w grupie kobiet z cukrzycą wynosiła $371,68 \pm 150,84$ ng/ml, a w grupie mężczyzn wynosiła $420,27 \pm 105,37$ ng/ml. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic ($p=0,21$), ale mężczyźni cechowali się wyższą wartością angiogeniny.

Tabela 10. Podstawowe statystyki opisowe angiogeniny (ng/ml) w grupie pacjentów z zespołem metabolicznym chorych na cukrzycę

	Średnia	Ważnych	Minimum	Maksimum	Odch.std	Mediana
nie	377,81	36	60,26	637,16	138,79	358,64
tak	433,19	13	281,54	645,70	115,93	420,20
Ogół	392,51	49	60,26	645,70	134,22	391,69

Średnia wartość angiogeniny w grupie pacjentów bez zespołu metabolicznego wynosiła $377,81 \pm 138,79$ ng/ml, a w grupie pacjentów z zespołem metabolicznym wynosiła $433,19 \pm 115,93$ ng/ml. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic ($p=0,21$), ale pacjenci z zespołem metabolicznym cechowali się wyższą wartością angiogeniny.

Tabela 11. Podstawowe statystyki opisowe angiogeniny (ng/ml) w grupie pacjentów z BMI w normie i z nadwagą wśród chorych na cukrzycę

	Średnia	Ważnych	Minimum	Maksimum	Odch.std	Mediana
norma	392,16	6	281,54	543,04	97,54	372,25
nadwaga	396,96	39	60,26	645,70	142,45	397,92
Ogół	396,32	45	60,26	645,70	136,42	397,92

Średnia wartość angiogeniny w grupie pacjentów z normą BMI wynosiła $392,16 \pm 97,54$ ng/ml, a w grupie pacjentów z nadwagą wynosiła $396,96 \pm 142,45$ ng/ml. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic ($p=0,94$).

Tabela 12. Podstawowe statystyki opisowe angiogeniny (ng/ml) w grupie pacjentów z HbA1c<7% i HbA1c≥7% wśród chorych na cukrzycę.

	Średnia	Ważnych	Minimum	Maksimum	Odch.std	Mediana
HbA1c<7%	446,37	18	241,20	645,70	134,10	449,42
HbA1c≥7%	361,23	31	60,26	623,18	126,03	357,80
Ogół	392,50	49	60,26	645,70	134,22	391,69

Średnia wartość angiogeniny w grupie pacjentów z HbA1c<7% wynosiła $446,37 \pm 134,10$ ng/ml, a w grupie pacjentów z HbA1c≥7% wynosiła $361,23 \pm 126,03$ ng/ml. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnic ($p=0,03$), w grupie pacjentów z HbA1c<7% była istotnie wyższa wartość angiogeniny.

Tabela 13. Podstawowe statystyki opisowe angiogeniny (ng/ml) w grupie pacjentów, u których stosowano ACEI wśród chorych na cukrzycę.

	Średnia	Ważnych	Minimum	Maksimum	Odch.std	Mediana
tak	379,41	33	60,26	645,70	134,85	391,69
nie	419,50	16	241,20	637,16	133,03	368,23
Ogół	392,51	49	60,26	645,70	134,22	391,69

Średnia wartość angiogeniny w grupie pacjentów, którzy stosowali ACEI wynosiła $379,41 \pm 134,85$ ng/ml, a w grupie, którzy nie stosowali ACEI wynosiła $419,50 \pm 133,03$ ng/ml. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ($p=0,48$).

Tabela 14. Podstawowe statystyki opisowe angiogeniny (ng/ml) w grupie pacjentów, u których stosowano statyny wśród chorych na cukrzycę

	Średnia	Ważnych	Minimum	Maksimum	Odch.std	Mediana
tak	389,62	20	60,26	637,16	143,24	394,81
nie	394,50	29	169,35	645,70	130,20	359,48
Ogół	392,51	49	60,26	645,70	134,22	391,69

Średnia wartość angiogeniny w grupie pacjentów, którzy stosowali statyny wynosiła $389,62 \pm 143,24$ ng/ml, a w grupie, którzy nie stosowali statyny wynosiła $394,50 \pm 130,20$ ng/ml. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ($p=0,9$).

Tabela 15. Podstawowe statystyki opisowe angiogeniny (ng/ml) w grupie pacjentów, u których stosowano pochodne sulfonilomocznika wśród chorych na cukrzycę

	Średnia	Ważnych	Minimum	Maksimum	Odch.std	Mediana
tak	487,69	12	241,20	645,70	140,50	531,06
nie	361,63	37	60,26	623,18	118,27	353,25
Ogół	392,51	49	60,26	645,70	134,22	391,69

Średnia wartość angiogeniny w grupie pacjentów, którzy stosowali pochodne sulfonilomocznika wynosiła $487,69 \pm 140,50$ ng/ml, a w grupie pacjentów, którzy nie stosowali pochodnych sulfonilomocznika wynosiła $361,23 \pm 118,27$ ng/ml. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice ($p=0,004$), w grupie pacjentów, którzy stosowali pochodne sulfonilomocznika była istotnie wyższa wartość angiogeniny.

Tabela 16. Podstawowe statystyki opisowe angiogeniny (ng/ml) w grupie pacjentów, u których stosowano biguanidy wśród chorych na cukrzycę.

	Średnia	Ważnych	Minimum	Maksimum	Odch.std	Mediana
tak	495,35	9	284,84	645,70	128,06	543,04
nie	369,36	40	60,26	637,16	125,77	355,53
Ogół	392,51	49	60,26	645,70	134,22	391,69

Średnia wartość angiogeniny w grupie pacjentów, którzy stosowali biguanidy wynosiła $495,35 \pm 128,06$ ng/ml, a w grupie pacjentów, którzy nie stosowali biguanidów wynosiła $369,36 \pm 125,77$ ng/ml. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice ($p=0,009$), w grupie pacjentów, którzy stosowali biguanidy była

istotnie wyższa wartość angiogeniny.

Tabela 17. Podstawowe statystyki opisowe angiogeniny (ng/ml) w grupie pacjentów, u których stosowano insulinę wśród chorych na cukrzycę

	Średnia	Ważnych	Minimum	Maksimum	Odch.std	Mediana
tak	457,20	11	323,88	623,18	103,93	436,68
nie	373,78	38	60,26	645,70	137,28	355,53
Ogół	392,51	49	60,26	645,70	134,22	391,69

Średnia wartość angiogeniny w grupie pacjentów, którzy stosowali insulinę wynosiła $457,20 \pm 103,93$ ng/ml, a w grupie pacjentów, którzy nie stosowali insuliny wynosiła $373,78 \pm 137,28$ ng/ml. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ($p = 0,07$).

Tabela 18. Podstawowe statystyki opisowe angiogeniny (ng/ml) w grupie pacjentów w poszczególnych grupach wiekowych wśród chorych na cukrzycę

	Średnia	Ważnych	Minimum	Maksimum	Odch.std	Mediana
20-40	551,42	1	551,42	551,42		551,42
40-60	413,39	12	169,35	623,18	129,86	413,92
60-70	380,92	19	218,18	543,04	91,30	397,92
70-80	351,08	13	60,26	645,70	176,38	284,84
80-100	479,79	4	338,54	637,16	152,80	471,72
Ogół	392,51	49	60,26	645,70	134,22	391,69

Nie można wyliczyć testu statystycznego, ponieważ w grupie 20-40 lat jest 1 osoba oraz w grupie 80-100 lat są 4 osoby.

4.2.2. Nadciśnienie tętnicze

Tabela 19. Podstawowe statystyki opisowe angiogeniny (ng/ml) w grupie kobiet i mężczyzn chorych na NT

	Średnia	Ważnych	Minimum	Maksimum	Odch.std	Mediana
K	382,29	21	219,84	679,10	104,81	397,70
M	382,95	22	253,86	611,30	83,86	386,65
Ogół	382,63	43	219,84	679,10	93,53	393,16

Średnia wartość angiogeniny w grupie kobiet z NT wynosiła $382,29 \pm 104,81$

ng/ml, a w grupie mężczyzn wynosiła $382,95 \pm 83,86$ ng/ml. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic ($p=0,98$), ale mężczyźni cechowali się nieznacznie wyższą wartością angiogeniny.

Tabela 20. Podstawowe statystyki opisowe angiogeniny (ng/ml) w grupie pacjentów z zespołem metabolicznym chorych na NT

	Średnia	Ważnych	Minimum	Maksimum	Odch.std	Mediana
nie	379,18	28	219,84	611,30	85,44	395,43
tak	389,06	15	253,86	679,10	109,97	380,14
Ogół	382,63	43	219,84	679,10	93,53	393,16

Średnia wartość angiogeniny w grupie pacjentów bez zespołu metabolicznego wynosiła $379,18 \pm 85,44$ ng/ml, a w grupie pacjentów z zespołem metabolicznym wynosiła $389,06 \pm 109,97$ ng/ml. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic ($p=0,75$), ale pacjenci z zespołem metabolicznym cechowali się wyższą wartością angiogeniny.

Tabela 21. Podstawowe statystyki opisowe angiogeniny (ng/ml) w grupie pacjentów z BMI w normie i z nadwagą wśród chorych na NT

	Średnia	Ważnych	Minimum	Maksimum	Odch.std	Mediana
norma	387,10	30	219,84	679,10	94,79	395,98
nadwaga	372,31	13	272,80	611,30	93,46	338,86
Ogół	382,63	43	219,84	679,10	93,53	393,16

Średnia wartość angiogeniny w grupie pacjentów z normą BMI wynosiła $387,10 \pm 94,79$ ng/ml, a w grupie pacjentów z nadwagą wynosiła $372,31 \pm 93,46$ ng/ml. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic ($p=0,45$).

Tabela 22. Podstawowe statystyki opisowe angiogeniny (ng/ml) w grupie pacjentów w poszczególnych grupach wiekowych wśród chorych na NT

	Średnia	Ważnych	Minimum	Maksimum	Odch.std	Mediana
20-40	315,59	3	272,80	368,36	48,56	305,60
40-60	311,01	6	219,84	417,98	81,36	290,07
60-70	420,98	11	295,26	611,30	84,26	408,52
70-80	407,22	12	292,76	679,10	103,19	406,19
80-100	374,79	11	250,30	506,96	85,48	372,22
Ogół	382,63	43	219,84	679,10	93,53	393,16

Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic ($p=0,07$).

Tabela 23. Podstawowe statystyki opisowe angiogeniny (ng/ml) w grupie pacjentów, u których stosowano ACEI wśród chorych na NT

	Średnia	Ważnych	Minimum	Maksimum	Odch.std	Mediana
tak	415,22	22	253,86	679,10	99,81	402,49
nie	348,48	21	219,84	475,54	74,27	329,16
Ogół	382,63	43	219,84	679,10	93,53	393,16

Średnia wartość angiogeniny w grupie pacjentów, którzy stosowali ACEI wynosiła $415,22 \pm 99,81$ ng/ml, a w grupie, którzy nie stosowali ACEI wynosiła $348,48 \pm 74,27$ ng/ml. Test statystyczny wykazał istotne statystycznie różnice ($p=0,017$), w grupie pacjentów, którzy stosowali ACEI była istotnie wyższa wartość angiogeniny.

Tabela 24. Podstawowe statystyki opisowe angiogeniny (ng/ml) w grupie pacjentów, u których stosowano statyny wśród chorych na NT

	Średnia	Ważnych	Minimum	Maksimum	Odch.std	Mediana
tak	397,39	14	256,38	611,30	88,82	402,49
nie	375,50	29	219,84	679,10	96,42	372,22
Ogół	382,63	43	219,84	679,10	93,53	393,16

Średnia wartość angiogeniny w grupie pacjentów, którzy stosowali statyny wynosiła $397,39 \pm 88,82$ ng/ml, a w grupie, którzy nie stosowali statyny wynosiła $375,50 \pm 96,42$ ng/ml. Test statystyczny nie wykazał istotnych statystycznie różnic ($p=0,48$).

Dla pozostałych leków oraz terapii nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic.

4.3. Analiza poziomu angiogeniny u osób zdrowych

Tabela 25. Podstawowa statystyka opisowa wieku w grupie kontrolnej

	N ważnych	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odch.std
20-40	4	320,88	305,14	212,36	460,88	104,10
40-60	5	307,74	294,62	217,04	414,68	71,06
60-70	5	336,58	338,54	311,44	373,22	25,46
70-80	5	332,64	294,62	257,06	506,96	100,47
80-100	5	365,75	379,14	302,38	397,70	37,37

Średnie wartości angiogeniny w poszczególnych grupach wiekowych przedstawia TABELA 25. Najmniejsza średnia wartość angiogeniny była w grupie wiekowej 40-60 lat i wynosiła $307,74 \pm 71,06$ ng/ml. Natomiast największa średnia wartość angiogeniny była w grupie wiekowej 80-100 lat i wynosiła $365,75 \pm 37,37$ ng/ml. Test statystyczny nie wykazał statystycznie istotnych różnic angiogeniny w poszczególnych grupach wiekowych.

Tabela 26. Podstawowa statystyka opisowa płci w grupie kontrolnej.

	Średnia	Ważnych	Minimum	Maksimum	Odch.std	Mediana
K	306,56	15	212,36	460,88	62,74	294,62
M	377,64	9	313,66	506,96	58,04	373,22
Ogół	333,21	24	212,36	506,96	69,30	321,31

Test statystyczny wykazał, że angiogenina jest istotnie wyższa dla mężczyzn ($p = 0,011$).

5. DYSKUSJA

Angiogeneza jest procesem prowadzącym do powstawania nowych naczyń z uprzednio już istniejących. Jest to zjawisko niezbędne w procesie wzrostu i regeneracji organizmu. Jednakże nawet niewielkie zaburzenia w przebiegu tego procesu mogą stanowić przyczynę wielu chorób.

Cukrzyca typu 2 przybiera rozmiary epidemii na całym świecie. Choroby naczyniowe w tej grupie pacjentów są główną przyczyną niepełnosprawności i zgonów. Postępująca degeneracja naczyń prowadzi do rozwoju retinopatii, nefropatii i neuropatii cukrzycowej. Ponadto pacjenci z cukrzycą typu 2 obarczeni są podwyższonym ryzykiem wystąpienia choroby niedokrwiennej serca, choroby naczyń obwodowych, jak również udaru [201].

W prezentowanej pracy poziom angiogeniny w surowicy pacjentów z cukrzycą typu 2 i nadciśnieniem tętniczym był znacząco podwyższony w porównaniu z grupą kontrolną ($392,50 \pm 134,22$ ng/ml vs. $333,21 \pm 69,30$ ng/ml). Ponadto grupa z cukrzycą typu 2 charakteryzowała się wyższą masą ciała, BMI, obwodem talii, CRP oraz gorszym profilem lipidowym w zakresie wszystkich frakcji. Ponadto grupa z cukrzycą typu 2 miała istotnie wyższe ciśnienie skurczowe krwi oraz poziom kreatyniny.

Uzyskane wyniki dotyczące stanu klinicznego pacjentów są zgodne z opublikowanymi niedawno rezultatami badania EFFECTUS. Materiał badawczy stanowiło 9904 pacjentów, z których 3681 było obciążonych cukrzycą. W porównaniu z grupą osób bez cukrzycy, u diabetyków częściej występowała otyłość, nadciśnienie oraz dyslipidemia i związane z nią choroby sercowo-naczyniowe [225].

Na podstawie wyników badania stwierdzono, iż im słabszy poziom wyrównania cukrzycy, tym niższy poziom angiogeniny. Celem zróżnicowania

pacjentów z cukrzycą zastosowano kryterium wyrównania oparte o poziom HbA1c. Jako granicę dobrego wyrównania przyjęto poziom HbA1c<7% [197,198]. Pacjenci dobrze wyrównani, z poziomem HbA1c poniżej 7% mieli istotnie wyższy poziom angiogeniny w porównaniu z grupą pacjentów słabo wyrównanych ($446,37 \pm 134,10$ ng/ml vs. $361,23 \pm 126,03$ ng/ml). Może to świadczyć o stopniu uszkodzenia endotelium i nasileniu procesów naprawczych obecnych u pacjenta z cukrzycą typu 2. Poziom HbA1c różnicuje istotnie statystycznie grupę chorych dobrze wyrównanych od grupy niewyrównanej. Na podstawie uzyskanych wyników można wysnuć hipotezę, że we wczesnej lub wyrównanej cukrzycy typu 2 wzrost poziomu angiogeniny może świadczyć o uruchomieniu przez organizm mechanizmów naprawczych. Dlatego w całej grupie osób z cukrzycą typu 2 obserwuje się wzrost poziomu angiogeniny w porównaniu z grupą osób zdrowych. Jednakże zjawisko to zmienia swoje nasilenie w miarę postępu choroby i braku wyrównania poziomu glikemii. Poziom angiogeniny ulega obniżeniu. W omawianej pracy nie badano aktywności biologicznej surowic pacjentów. Być może również ulega ona obniżeniu. Świadczy o tym wynik eksperymentu przeprowadzonego na zwierzętach, w którym surowice osób z cukrzycą typu 2 oraz osób zdrowych oceniano w teście aktywności angiogennej surowic (serum induced angiogenesis test). Wykazano wtedy, iż surowica osób zdrowych odznacza się znacząco wyższą aktywnością angiogenną w porównaniu z surowicą pacjentów z cukrzycą [202]. Być może wpływ na taki stan rzeczy mają końcowe produkty glikacji białek. Wzrost nieenzymatycznej glikozylacji białek wewnątrzkomórkowych komórki endotelialnej narażonej na wysoki poziom glukozy, a z takim stanem mamy do czynienia w źle wyrównanej cukrzycy, doprowadza do upośledzenia funkcji wielu białek, które regulują wzrost komórki endotelialnej. Giardino i wsp. po raz pierwszy zademonstrowali, że liczba transporterów GLUT1 nie ulega zmniejszeniu na skutek hiperglikemii. Prędkość transportu glukozy do komórki endotelialnej w takich warunkach wzrasta ponad 11-krotnie, a stężenie wewnątrzkomórkowe glukozy rośnie sześciokrotnie w ciągu 24 godzin ekspozycji. Poziom białek cytosolu zmodyfikowanych przez końcowe

produkty glikacji białek wzrósł prawie 14-krotnie w ciągu 168 godzin. W takich warunkach aktywność mitogenna cytosolu komórki endotelialnej spadła o 70% [49]. Z takim zjawiskiem możemy mieć do czynienia u omawianej grupy pacjentów. Obniżony poziom angiogeniny u pacjentów źle wyrównanych może również świadczyć o niewydolności procesów naprawczych.

Warto również przyrzeć się leczeniu zastosowanemu u obu grup pacjentów z cukrzycą. Okazało się, że pacjenci lepiej wyrównani częściej stosowali metforminę i pochodne sulfonilomocznika, a zatem leczenie doustne. Natomiast u grupy pacjentów słabo wyrównanych częściej stosowano insulinę. Na poziom wyrównania gospodarki węglowodanowej mógł mieć wpływ czas trwania choroby. Leczenie doustne według wytycznych stosuje się we wczesnym etapie choroby. Dopiero gdy stosowanie maksymalnych dawek leków doustnych nie pozwala na efektywne wyrównanie, do terapii włącza się insulinę. Stosowanie iniekcji insuliny dotyczy najczęściej pacjentów z długotrwałą chorobą. Ten trend zaobserwowano również w grupie badanej.

Bardzo interesujące wyniki przyniosła analiza poziomu angiogeniny w kontekście stosowanych leków. Mianowicie, stosowanie biguanidów i pochodnych sulfonilomocznika w istotny sposób podwyższa stężenie angiogeniny w surowicy. Można zatem wysnuć wniosek, że leki te wspomagają procesy naprawcze u pacjentów z cukrzycą. Podobna zależność występowała w przypadku insuliny, pomimo że wynik nie był istotny statystycznie ($457,20 \pm 103,93$ vs. $373,78 \pm 137,28$ ng/ml; $p=0,06$).

Pacjenci z cukrzycą typu 2 bardzo często rozwijają powikłania naczyniowe pomimo stosowanego leczenia. W prezentowanej pracy 6% pacjentów miało objawy nefropatii, 25% retinopatii, 14,29% neuropatii cukrzycowej, natomiast choroba niedokrwienna serca dotyczyła 36,73%.

Obserwacje te potwierdzają wcześniejsze badanie Chiarelli i wsp., którzy przeprowadzili badanie poziomu angiogeniny w surowicy pacjentów z cukrzycą typu

1. Poziom angiogeniny u badanych był znacząco podwyższony, stopień wyrównania glikemii ściśle korelował z poziomem badanej substancji [203].

Istnieją liczne prace dowodzące, że cukrzyca prowadzi do wzrostu ekspresji angiogennych czynników wzrostu, głównie VEGF, w różnych tkankach (siatkówka oka, kłębuszki nerkowe) w odpowiedzi na hiperglikemię i niedotlenienie tkanek. Z drugiej strony, u pacjentów z cukrzycą niezwykle często dochodzi do rozwoju powikłań sercowo- naczyniowych, które prowadzą do ograniczenia perfuzji tkanek. Rozwój nowych naczyń krwionośnych pozwala na ograniczenie uszkodzeń spowodowanych niedokrwieniem; angiogenne czynniki wzrostu odgrywają niezwykle istotną rolę w tym procesie adaptacyjnym. Niemniej jednak wyniki prac oceniających poziomy czynników wzrostu w cukrzycy bywają sprzeczne [204]. Chou i wsp. zbadali poziom VEGF i jego receptorów w siatkówce oka, kłębuszkach nerkowych, aortalnej i mięśniu sercowym. Ekspresja VEGF w siatkówce oka i kłębuszkach nerkowych była dwukrotnie podwyższona, natomiast w mięśniu sercowym znacząco obniżona. Te paradoksalne rozbieżności w wynikach można tłumaczyć obecnością lokalnych czynników regulacyjnych, różnych dla mięśnia sercowego i mikronaczyń [33]. Wang i wsp. również zwrócili uwagę na fakt, że komórki endotelialne obecne w mikro- i makronaczyniach inaczej reagują na insulinę i glukozę. Okazało się, że komórki śródbłonna naczyń sercowych (MMVEC – myocardial microvascular endothelial cells) u szczurów z cukrzycą, w przeciwieństwie do komórek endotelialnych obecnych w aortalnej (AEC – aortic endothelial cells), mają ograniczone zdolności do angiogenezy *in vitro*. Badanie wykazało wzrost poziomu mRNA VEGF, VEGFR1 (Flt-1) i VEGFR2 (Flk-1) w komórkach endotelialnych mięśnia sercowego, natomiast nie stwierdzono wzrostu poziomu HIF-1 α , β FGF, Ang-1, Ang-2, Tie-1 i Tie-2 [35]. Badanie Sasso i wsp. polegające na analizie biopsji mięśnia lewej komory serca pacjentów z cukrzycą, również wykazało wzrost ekspresji VEGF w mięśniówce serca przy równoczesnym spadku ekspresji jego receptorów. Spadek ekspresji receptorów dla czynników wzrostu, a w konsekwencji spadek transdukcji sygnałów do komórki endotelialnej może być

odpowiedzialny za upośledzenie angiogenezy u pacjentów z cukrzycą typu 2 [34].

Z kolei Hazarika i wsp. inaczej tłumaczą wzrost poziomu czynników wzrostu, a konkretnie VEGF u pacjentów z cukrzycą typu 2. Według autorów zaburzony proces angiogenezy w cukrzycy spowodowany jest zmianami w systemie receptor- ligand. Rola VEGFR1 jako inhibitora angiogenezy jest dobrze poznana. Ekspresja tego receptora w mięśniach szkieletowych jest dość wysoka i jego funkcją może być ograniczanie nadmiernej angiogenezy. Natomiast wzrost poziomu VEGF i spadek poziomu VEGFR1 u pacjentów z cukrzycą może być procesem kompensacyjnym, mającym za zadanie utrzymanie właściwego unaczynienia [205].

Hamed i wsp. opublikowali niedawno badanie mające na celu określenie poziomu czynników wzrostu β FGF i PD-ECGF. Zarówno poziom badanych czynników wzrostu, jak i markerów stresu oksydacyjnego były podwyższone u pacjentów z cukrzycą. Wszystkie te parametry korelowały z wiekiem, poziomem kontroli glikemii i obecnością powikłań naczyniowych. Autorzy również przychylają się do opinii, że podwyższenie poziomu czynników wzrostu w cukrzycy może być wyrazem procesu naprawczego uszkodzeń spowodowanych przez chorobę [206].

Nadciśnienie tętnicze jest niezwykle powszechną chorobą, niestety jej patomechanizm nie jest do końca jasny. Z podwyższonym ciśnieniem tętniczym krwi wiążą się liczne powikłania: udar mózgu, zawał mięśnia sercowego i niewydolność serca.

Od dawna wiadomo, że u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym dochodzi do rozrzedzenia sieci naczyniowej w różnych narządach i tkankach. Nie do końca wiadomo, czy nadciśnienie jest jej przyczyną, czy efektem.

Prawie 20 lat temu Ku i wsp. zademonstrowali, że VEGF indukuje rozkurcz izolowanej tętnicy wieńcowej. VEGF powoduje rozkurcz drobnych tętniczek i żyłek, natomiast nie ma takiego efektu na średniej wielkości tętnice i żyły [207]. Wiele angiogennych czynników wzrostu indukuje angiogenezę poprzez uruchamianie kaskad sygnałowych, między innymi AKT/PKB. Za jej pośrednictwem dochodzi do

fosforylacji eNOS i wzrostu produkcji NO [122]. W ten sposób działają między innymi angiogenina i VEGF. Istnieje kilka prac donoszących o upośledzeniu rozkurczu naczyń zależnego od endotelium (epithelium-derived vasodilatation, EDV) u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. U takich osób zaburzenie EDV wiąże się ze wzrostem grubości intima media, przerostem lewej komory serca, wzrostem sztywności tętnic oraz rozwojem przewlekłej niewydolności nerek. Co więcej jest silnym czynnikiem predykcyjnym wystąpienia incydentu sercowo- naczyniowego u pacjentów z nadciśnieniem [208].

We wspomnianym już badaniu ASCOT analiza surowic 248 pacjentów wykazała pozytywną korelację pomiędzy nasileniem nadciśnienia a podwyższeniem poziomu VEGF [128]. Podobny trend można zaobserwować także w przypadku wątrobowego czynnika wzrostu, FGF-2, IGF-1, TGFβ1 i ET-1 [129].

Wyniki niniejszej pracy pokazują, że również poziom angiogeniny jest istotnie podwyższony u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym ($382,63 \pm 93,53$ vs. $333,21 \pm 69,30$ ng/ml). Prawdopodobnie zjawisko to odzwierciedla stopień uszkodzenia śródbłonna naczyniowego i jest wyrazem nasilonych procesów naprawczych podjętych przez organizm.

Sane i wsp. proponują jeszcze inne wyjaśnienie. Otóż efektem nadciśnienia tętniczego może być nadmierne mechaniczne rozciąganie ściany naczynia krwionośnego. Istnieją dowody na to, że stan ten indukuje wydzielanie VEGF i HIF1α [129]. Kuwahara i wsp. zasugerowali, że za wzrost poziomu czynników wzrostu w nadciśnieniu tętniczym może odpowiadać niedokrwienie tkanek. Na modelu zwierzęcym nadciśnienia oceniono między innymi proliferację komórek endotelialnych i ekspresję VEGF w aorcie wstępującej. Podwyższone ciśnienie nie tylko doprowadziło do pogrubienia ściany naczynia, ale również do wzrostu liczby vasa vasorum przydanki. Równocześnie obserwowano wzrost poziomu VEGF i HIF1α w komórkach mięśniówki gładkiej naczynia [209]. Jeśli ta hipoteza jest słuszna, poziom czynników wzrostu może być wykorzystywany jako marker niedokrwienia

tkanek.

Nasuwa się pytanie dlaczego, pomimo wysokich poziomów krążących czynników wzrostu nie dochodzi do powstawania nowych naczyń, które przywróciłyby właściwy przepływ krwi w tkankach. Najprawdopodobniejsze jest przypuszczenie, że endotelium pacjentów z nadciśnieniem tętniczym jest niewrażliwe na działanie AGF na poziomie komórkowym albo receptorowym [129]. Potwierdzają to badania na modelu zwierzęcym. Yang i wsp. Zauważyli, że dożylna infuzja VEGF prowadzi do znaczącego obniżenia ciśnienia tętniczego zarówno u szczurów z nadciśnieniem jak i zdrowych. Natomiast spadek ten jest bardziej nasilony u zwierząt z nadciśnieniem. Istnieją dwa mechanizmy, które mogłyby odpowiadać za ten stan rzeczy. Pierwszy to upośledzone oczyszczanie krwi z VEGF przez nerki. Drugi to zaburzenie funkcji baroreceptorów. U zdrowych zwierząt spadkowi ciśnienia towarzyszy wzrost akcji serca, przeciwdziałający dalszym spadkom. Nie dochodzi do tego u zwierząt z nadciśnieniem [210].

Bez względu na mechanizm podwyższenia stężenia angiogeniny i innych czynników wzrostu w nadciśnieniu, ich poziom odzwierciedla pewne cechy kliniczne pacjentów. W pracy stwierdzono, że zarówno ciśnienie skurczowe jak i rozkurczowe, jak również BMI i obwód talii były znacząco podwyższone w badanej grupie z nadciśnieniem. Poziom cholesterolu HDL był znacząco obniżony w porównaniu z wynikami grupy kontrolnej. Z uzyskanych danych wynika, że pacjenci z nadciśnieniem tętniczym prawdopodobnie odznaczają się niezdrowym stylem życia, wysokokaloryczną dietą i brakiem aktywności fizycznej. Modyfikacja stylu życia jest konieczna celem redukcji czynników ryzyka miażdżycy.

W kontekście tych wyników warto przypomnieć pracę Tello-Montoliou i wsp. Zbadali oni poziom angiogeniny u 396 pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym. Stężenie angiogeniny u tych pacjentów było istotnie podwyższone w porównaniu z osobami ze stabilną chorobą wieńcową. Ponadto, pacjenci z wyższymi poziomami angiogeniny odznaczali się większą ilością powikłań w ciągu sześciomiesięcznej

obserwacji [166]. Kolejne interesujące badanie przeprowadzili Patel i wsp. Poziom angiogeniny i BNP został oznaczony u pacjentów z przewlekłą niewydolnością serca. Okazało się, że poziom angiogeniny wzrasta wraz z pogorszeniem stanu klinicznego pacjenta wg skali NYHA [177].

W świetle przytoczonych badań niezwykle interesujące jest doświadczenie przeprowadzone przez Zhao i wsp. Celem badania było określenie, czy transfer genu dla angiogeniny może poprawić unaczynienie, zahamować remodeling lewej komory i zapobiec niewydolności serca u szczurów z zawałem mięśnia sercowego. Cztery tygodnie po podwiązaniu tętnicy wieńcowej transfekcja rAAV-ANG zwiększyła poziom ekspresji angiogeniny w miokardium badanych zwierząt. Ponadto doszło do zahamowania przebudowy mięśnia sercowego, określonego jako zmniejszenie późnoskurczowej i późnorozkurczowej średnicy lewej komory, spadku średnicy kardiomiocytów i włókienia śródmiąższowego. Co więcej zaobserwowano wzrost gęstości naczyń i poprawę wydolności mięśnia sercowego grupy poddanej badaniu [211]. Saif i wsp. również osiągnęli obiecujące wyniki. Opracowali oni biodegradowalny materiał nasączony kombinacjami różnych czynników wzrostu: VEGF, HGF i Ang-1 i obserwowali nowotworzenie naczyń na modelu niedokrwienia kończyny dolnej. W środowisku wzbogaconym o czynniki wzrostu, szczególnie trzy jednocześnie doszło do zagęszczenia sieci naczyniowej, co przekładało się na wzrost perfuzji niedokrwionej tkanki [212].

U starszych pacjentów występowanie nadciśnienia, zwłaszcza izolowane podwyższenie ciśnienia skurczowego wzrasta wraz z wiekiem [213]. Poziom VEGF i IGF-1 spadają wraz z wiekiem [214]. Być może u osób starszych mechanizm rozwoju nadciśnienia jest odmienny i wiąże się bezpośrednio ze spadkiem poziomu czynników wzrostu. Niemniej, u badanych przeze mnie pacjentów nie stwierdziłam spadku poziomu angiogeniny wraz z wiekiem. Być może tendencja, którą wykazuje VEGF nie dotyczy wszystkich czynników wzrostu. Zatem konieczne są dalsze badania dotyczące grupy osób wyłącznie starszych.

Wpływ leczenia na poziom różnych czynników wzrostu jest ciągle słabo poznany. Według Battegay i wsp. inhibitory konwertazy angiotensyny oraz sartany mogą w znaczący sposób pozytywnie wpływać na proces angiogenezy poprzez hamowanie rozpadu bradykininy [109]. Niestety doniesienia dotyczące diuretyków, beta- blokerów i blokerów kanału wapniowego są sprzeczne i nie pozwalają na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków.

Badani pacjenci byli leczeni za pomocą schematów jedno-, dwu- lub trzylekowych. Analiza wyników wykazała istotność statystyczną jedynie w przypadku inhibitorów konwertazy angiotensyny. Dla pozostałych leków nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic.

Od pewnego czasu do rozmiarów epidemii wzrasta występowanie zespołu metabolicznego, charakteryzującego się współistnieniem otyłości brzusznej, hipertriglicerydemii, insulinooporności lub hiperinsulinemii i nadciśnienia tętniczego. Pacjenci prezentujący ten obraz kliniczny są szczególnie narażeni na ryzyko miażdżycy i incydentów sercowo- naczyniowych. Angiogeneza może przyczyniać się do tego ryzyka, ponieważ jest zaangażowana w progresję płytki miażdżycowej. Siervo i wsp. zbadali poziom krążących markerów angiogenezy, między innymi VEGFi PIGF oraz ocenili ryzyko sercowo- naczyniowe na podstawie między innymi hsCRP, hs-TnT i NT-proBNP u 1000 pacjentów z zespołem metabolicznym. Okazało się, że wzrost poziomu czynników wzrostu oraz markerów ryzyka sercowo- naczyniowego u badanych pacjentów odzwierciedla patofizjologiczne zmiany dokonujące się w układzie krążenia [215].

Spośród przebadanej grupy pacjentów 32 osoby spełniały kryteria rozpoznania zespołu metabolicznego. Omawiana grupa miała istotnie wyższą masę ciała, BMI, obwód talii, CRP, poziom triglicerydów, ciśnienie skurczowe i rozkurczowe oraz obniżony poziom cholesterolu HDL w porównaniu z grupą osób zdrowych. Poziom angiogeniny również był w tej grupie istotnie podwyższony. Taki rezultat może być efektem zarówno obecności znaczącej ilości tkanki tłuszczowej obecnej

u takich pacjentów albo odzwierciedleniem procesów naprawczych uszkodzonego śródbłonna naczyń. Nie jest wykluczone, że oba te zjawiska odgrywają równorzędną rolę.

Uzyskane wyniki potwierdzają spostrzeżenia Silhy i wsp. którzy również zaobserwowali wzrost poziomu angiogeniny, a także VEGF, HGF, Ang-2 i endostatyny u osób otyłych [181]. Tkanka tłuszczowa jest silnie unaczyniona, i wydziela liczne czynniki wzrostu: VEGF, HGF, PlGF, angiopoetyny, FGF, TNF α oraz metaloproteinazy. Oprócz dojrzałych adipocytów, w tkance tłuszczowej obecne są również komórki endotelialne, komórki zapalne i progenitorowe. Otyłość wiąże się również z ekspansją nowych naczyń krwionośnych w obręb rozrastającej się tkanki tłuszczowej.

Bardzo ciekawe badanie opublikował niedawno Pasini i wsp. Celem jego pracy było określenie ekspresji białek zaangażowanych w szlaki sygnałowe uruchamiane przez insulinę (insulin signalling pathways, IS). mTOR (mammalian target of rapamycin) jest molekułą pełniącą ważną rolę w IS i jest obecna w każdej komórce. mTOR ma wpływ na metabolizm komórki, produkcję białek, cykl życiowy komórek i procesy naprawcze. Ponadto reguluje ekspresję molekuł adhezyjnych w komórkach endotelialnych. U pacjentów leczonych serolimusem lub everolimusem (inhibitory mTOR) po transplantacji nerki zaobserwowano znaczący wzrost występowania zakrzepicy. Świadczy to o istotnej roli mTOR w regulacji funkcji naczyń [226].

Pacjenci z zespołem metabolicznym charakteryzowali się znaczącym obniżeniem ekspresji mTOR. Autorzy zasugerowali, że zjawisko to może odzwierciedlać wzrost ryzyka rozwoju zakrzepicy [226].

Ten sam zespół badaczy wykazał również, że utrzymanie prawidłowego funkcjonowania mTOR, osiągnięte przez leki hipotensyjne (inhibitory konwertazy angiotensyny i sartany) poprawia IS poprzez wzrost ekspresji GLUT4 i zapobiega rozrzedzeniu naczyń u szczurów z nadciśnieniem tętniczym z insulinoopornością.

Efekt ten jest niezależny od redukcji ciśnienia tętniczego, natomiast zależy od mTOR [227].

Angiogenina poprzez kinazy Akt i PI3K również ma wpływ na mTOR. Istnieje więc możliwość, że podwyższony poziom angiogeniny jest wyrazem istnienia procesu kompensacyjnego w organizmie pacjentów z zespołem metabolicznym.

Nadciśnienie często współistnieje z cukrzycą. Około 60% pacjentów z cukrzycą cierpi na nadciśnienie tętnicze, zaś nawet 20% pacjentów z nadciśnieniem ma zaburzenia gospodarki węglowodanowej. W analizowanej grupie pacjentów z cukrzycą były 42 osoby z nadciśnieniem tętniczym, co stanowi 85,71% materiału badawczego. Pacjenci tacy mają dwukrotnie wyższe ryzyko incydentu sercowo-naczyniowego w porównaniu z osobami chorującymi jedynie na nadciśnienie. U osób, u których występują oba schorzenia patofizjologia choroby sercowo-naczyniowej jest wieloczynnikowa; dysfunkcja śródbłonna, stan zapalny w obrębie naczyń i wzrost wydalania albumin z moczem nasilają się z czasem i wiążą się z wysoką śmiertelnością [216].

Endotelium jest wspólnym mianownikiem dla licznych patologii: nadciśnienia tętniczego, dyslipidemii, cukrzycy, zastoinowej niewydolności serca. Hipercholesterolemia, nadciśnienie i insulinooporność przyczyniają się do uszkodzenia śródbłonna i stanu zapalnego w obrębie naczyń, jak również do wzrostu oksydacji lipoprotein, proliferacji mięśniówki gładkiej, odkładania się macierzy zewnątrzkomórkowej, adhezji komórek i tworzenia zakrzepów. Wszystkie te procesy uczestniczą w rozwoju miażdżycy i choroby niedokrwiennej serca.

Dysfunkcja śródbłonna prowadzi do nasilenia stanu zapalnego poprzez wzrost produkcji czynników wazokonstrykcyjnych, molekuł adhezji i czynników wzrostu. W ten sposób zapalenie staje się głównym mechanizmem przyczyniającym się do progresji chorób sercowo-naczyniowych [216]. Pacjenci z chorobami układu krążenia charakteryzują się podwyższonym poziomem mediatorów stanu zapalnego, takich jak CRP i molekuł adhezji: selektyn, ICAM-1 i VCAM-1. Wysoki poziom

mediatorów stanu zapalnego , szczególnie Il-6, ICAM-1 i CRP mogą być niezależnymi czynnikami ryzyka rozwoju nadciśnienia [217].

W prezentowanej pracy poziom CRP był istotnie wyższy zarówno w cukrzycy typu 2 jak i w grupie z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu z grupą kontrolną. Podwyższenie poziomu CRP stanowi czynnik predykcyjny wystąpienia i stopnia nasilenia wielu stanów chorobowych: insulinooporności, nadciśnienia tętniczego i zespołu metabolicznego. Liczne badania epidemiologiczne wykazały, że poziom tego białka koreluje ze stanem płytki miażdżycowej – im bardziej niestabilna, skłonna do pęknięcia płytka miażdżycowa, tym wyższy poziom CRP. Poziom CRP pozwala również przewidzieć ryzyko wystąpienia incydentu sercowo- naczyniowego u osób dotychczas zdrowych. Warto zaznaczyć, że CRP to nie tylko marker stanu zapalnego związanego z układem krążenia. Jego obecność zaobserwowano w samej płytce miażdżycowej, gdzie jest zaangażowane w tworzenie komórek piankowatych, wzmacnia chemotaksję monocytów i ułatwia wyłapywanie LDL przez makrofagi [216]. W komórkach endotelialnych CRP ułatwia uwalnianie PAI-1 i ET-1, jak również wzmacnia ekspresję molekuł adhezyjnych oraz bezpośrednio wpływa na redukcję ekspresji eNOS i biodostępność tlenu azotu [218].

W badaniu UKPDS wystąpienie powikłań cukrzycy silnie korelowało z obecnością nadciśnienia tętniczego, a ścisła kontrola ciśnienia u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i cukrzycą typu 2 pozwoliła obniżyć ryzyko wystąpienia powikłań sercowo- naczyniowych, udaru mózgu i śmierci [219]. Podsumowując, intensyfikacja leczenia stanu zapalnego naczyń krwionośnych, szczególnie u pacjentów z nietolerancją glukozy i cukrzycą może znacząco wpłynąć na osiągnięcie sukcesów terapeutycznych u tego typu pacjentów.

Leki z grupy inhibitorów reduktazy HMG-CoA, czyli statyny, posiadają właściwości kardioprotekcyjne, które uzupełniają ich działanie hipolipemiczne. Zdolność statyn do stabilizacji płytek miażdżycowych i hamowania procesu nowotworowego jest najprawdopodobniej związana wpływem na proces

angiogenezy. Urbich i wsp. udowodnili, że atorwastatyna, w zależności od dawki, może mieć działanie zarówno pro- jak i antyangiogenne. W niskich dawkach lek ten wzmacnia migrację dojrzałych komórek endotelialnych i tworzenie struktur trójwymiarowych. Ponadto przyczynia się do waskulogenezy poprzez pobudzanie endotelialnych komórek progenitorowych. Natomiast w wyższych stężeniach hamuje angiogenezę i migrację komórek śródbłona indukując proces zaprogramowanej śmierci komórek [220]. Zhu i wsp. zbadali wpływ simwastatyny na proces angiogenezy. Okazało się, że ta sama dawka leku może działać dwukierunkowo w zależności od okoliczności. Simwastatyna pobudza proces angiogenezy w warunkach niedotlenienia poprzez pobudzanie produkcji HIF-1, a tym samym poziomu VEGF [221]. Kureishi i wsp zasugerowali, że to aktywacja Akt/PKB jest mechanizmem, który odpowiada za omawiane korzystne właściwości statyn [222]. Z drugiej strony statyny hamują wzrost nowych naczyń stymulowany przez cytokiny prozapalne.

TNF α indukuje angiogenezę poprzez tworzenie wolnych rodników tlenowych (ROS) za pośrednictwem oksydazy NADPH. Statyna hamuje aktywność ROS, a tym samym tworzenie struktur trójwymiarowych dzięki swoim właściwościom antyoksydacyjnym. W środowisku zapalenia simwastatyna hamuje aktywność Akt i eNOS [221]. Ostatnio opublikowane badanie JUPITER podkreśla wpływ rosuwastatyny na obniżanie poziomu CRP, a tym samym jej działanie przeciwzapalne [223].

Zastosowanie statyn w badanej grupie przedstawiało się następująco: w grupie z nadciśnieniem 30,61% pacjentów było leczonych statyną, w grupie pacjentów z dobrze wyrównaną cukrzycą 29,41% oraz w grupie ze słabo wyrównaną cukrzycą 51,72% i w grupie z zespołem metabolicznym 30,77%. Zważywszy na fakt, że we wszystkich grupach badanych pacjentów mamy do czynienia z dysfunkcją śródbłona, można definitywnie stwierdzić, iż stosowanie tej grupy leków wśród pacjentów jest niewystarczające. Z uwagi na kardioprotekcyjne działanie leków z grupy inhibitorów reduktazy HMG-CoA, powinny one zostać zastosowane

u wszystkich badanych pacjentów.

Istnieje bardzo niewiele prac dotyczących poziomu angiogeniny u osób zdrowych. Pantsulaia i wsp. przeprowadzili badanie oceniające wpływ czynników endogennych takich jak: wiek, płeć i masę ciała na poziom angiogeniny u zdrowych osobników. Poziom angiogeniny był wyższy u mężczyzn niż u kobiet i ściśle korelował z wiekiem u obu płci [224]. W omawianym badaniu poziom angiogeniny u mężczyzn również był znamienne wyższy niż u kobiet, natomiast analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w poziomach angiogeniny w poszczególnych grupach wiekowych.

Ograniczenia pracy: w związku z brakiem homogenności grupy z cukrzycą typu 2 wynikającej z współwystępowania nadciśnienia tętniczego, należy uwzględnić w analizach możliwość wystąpienia odpowiedzi angiogennej wynikającej zarówno z obecności cukrzycy typu 2 jak i nadciśnienia tętniczego. Istnieje możliwość, że trendy ekspresji angiogeniny mogą być przeciwstawne w tych jednostkach chorobowych. Stąd poziom HbA1c stanowi punkt odniesienia do zmian koncentracji angiogeniny w surowicy. Dokonano badania poziomu angiogeniny bez oceny jej aktywności biologicznej, jednakże wiedząc o tym ograniczeniu posiłkowałam się wynikami prac, w których stwierdzono modyfikację aktywności angiogennej surowic pacjentów z cukrzycą typu 2 [202].

Ciekawe wyniki uzyskane w przeprowadzonej analizie obligują do przeprowadzenia badania na dużych populacjach chorych.

Analiza informacji zgromadzonych na temat angiogeniny potwierdza fakt, że jest to substancja o niezwykłym potencjale, uczestnicząca w różnorodnych procesach fizjologicznych i patologicznych. Szczegółowe poznanie jej właściwości i roli w organizmie ludzkim może pomóc w opracowaniu nowych terapii i udoskonalić profilaktykę.

6. WNIOSKI

1. Poziom angiogeniny ulega modyfikacji u pacjentów z cukrzycą typu 2 i nadciśnieniem tętniczym
2. Niewyrównana cukrzyca typu 2 charakteryzuje się istotnym obniżeniem poziomu angiogeniny w surowicy krwi pacjentów.
3. Poziom angiogeniny wzrasta u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym.
4. Wzrost poziomu angiogeniny można zaobserwować u pacjentów z zespołem metabolicznym.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-4.
2. Tabibiazar R, Rockson S. G. Angiogenesis and the ischaemic heart. *European Heart Journal*. 2001;22, 903- 918.
3. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 1992; 267: 10931- 10934.
4. Manjo G. Chronic inflammation. Links with angiogenesis and wound healing. *Am. Journ. Pathol.* 1998;153, 4: 1035- 39.
5. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Eng J Med* 2000; 342:626- 33.
6. Chung NAY, Lydakakis C, Belgore F, Blann AD, Lip GYH. Angiogenesis in myocardial infarction. An acute or chronic process? *European Heart Journal* 2002; 23, 1604- 1608.
7. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Eng J Med* 1971; 285: 1182-6.
8. Schaper W, Ito WD. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circulation Research* 1996;79:911-919.
9. Panchal VR, Rehman J, Nguyen AT, Brown JW, Turrentine MW, Mahomed Y, March KL. Reduced pericardial levels of endostatin correlate with collateral development in patients with ischemic heart disease. *Journal of American College of Cardiology*. 2004; 43(8): 1383- 7.
10. O'Brien ER, Garvin MR, Dev R, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM. Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2005;25:2054.

11. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP, Narula J. Atherosclerotic Plaque Progression and Vulnerability to Rupture. Angiogenesis as a Source of Intraplaque Hemorrhage. *Circulation*. 2005;112:1813-1824.
12. Felmeden DC, Blann AD, Lip GYH. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *European Heart Journal* 2003; 24, 586-603.
13. Distler JW, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 2003;47:149-61.
14. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473(7347):298-307.
15. Heil M, Schaper W. Influence of Mechanical, Cellular, and Molecular Factors on Collateral Artery Growth (Arteriogenesis). *Circ Res*. 2004;95:449-458.
16. Schaper W, Scholz D. Factors Regulating Arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1143-1151.
17. Carmeliet P. VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis? *Nat Med*. 2000;6(10):1102-3.
18. Deindl E, Buschmann I, Hoefer IE, Podzuweit T, Boengler K, Vogel S, van Royen N, Fernandez B, Schaper W. Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res*. 2001; 89(9):779-86.
19. World Health Organisation: Diabetes Mellitus: Raport WHO Study Group Geneva, 2011 (Fact sheet no 312).

20. King H, Aubert R, Herman WH. Global Burden of Diabetes, 1995-2025. Prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998;21:1414-1431.
21. 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.
22. Zdrojewski T, Bandosz P, Szpakowski P. Rozpowszechnienie głównych czynników ryzyka chorób układu sercowo- naczyniowego w Polsce. Wyniki badania NATPOL PLUS. *Kardiolog. Pol.* 2004; 61(supl. IV): 15-17.
23. Wittek A, Sokalski B, Grzeszczak W, Strojek K. Prevalence of diabetes and cardiovascular risk factors of industrial area on southern Poland. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2009;117(7):350-3.
24. Siebert J, Trzeciak BG, Jaśkiewicz M. Zastosowanie internetu do oceny ryzyka zgonu z powodu chorób sercowo-naczyniowych w populacji Polski. *Forum Medycyny Rodzinnej* 2011;5(3), 187-200.
25. Chaturvedi N. The burden of diabetes and its complications: trends and implications for intervention. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;76:S3-S12.
26. Mathew V, Gersh BJ, Williams BA, Laskey WK, Willerson JT, Tilbury RT, Davis BR, Holmes DR. Outcomes in patients with diabetes mellitus undergoing percutaneous coronary intervention in the current era: report from the Prevention of REStenosis with Tranilast and its Outcomes (PRESTO) trial. *Circulation* 2004; 109:476-480.
27. Abaci A, Oguzhan A, Kahraman S, Eryol NK, Unal S, Arinc H, Ergin A. Effect of Diabetes Mellitus on Formation of Coronary Collateral Vessels. *Circulation*. 1999;99:2239-2242.
28. van Golde JM, Ruiter MS, Schaper NC, Voo S, Waltenberger J, Backes WH, Post MJ, Huijberts MS. Impaired Collateral Recruitment and

Outward Remodelling in Experimental Diabetes. *Diabetes* 2008;57:2818-2823.

29. Heusch G, Schultz R. Features of short-term myocardial hibernation. *Mol Cell Biochem* 1998;186:177-184.
30. Hearse DJ. Myocardial protection during ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* 1998;186:177-184.
31. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Eng J Med* 2000;342:626-633.
32. Marfella R, Esposito K, Nappo F, Siniscalchi M, Sasso FC, Portoghesi M, Di Marino MP, Baldi A, Cuzzocrea S, Di Filippo C, Barbosa G, Baldi F, Rossi F, D'Amico M, Giuliano D. Expression of Angiogenic Factors During Acute Coronary Syndromes in Human Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2004;53:2383-2391.
33. Chou E, Suzuma I, Way KJ, Opland D, Clermont AC, Naruse K, Suzuma K, Bowling NL, Vlahos CJ, Aiello LP, King GL. Decreased Cardiac Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in Insulin-Resistant and Diabetic States. A Possible Explanation for Impaired Collateral Formation In Cardiac Tissue. *Circulation*. 2002;105:373-379.
34. Sasso FC, Torella D, Carbonara O, Ellison GM, Torella M, Scardone M, Marra C, Nasti C, Marfella R, Cozzolino D, Indolfi C, Cotrufo M, Torella R, Salvatore T. Increased vascular endothelial growth factor expression but impaired vascular endothelial growth factor receptor signalling in the myocardium of type 2 diabetic patients with chronic coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(5):827-34.
35. Wang XH, Chen SF, Jin HM, Hu RM. Differential analyses of angiogenesis and expression of growth factors in micro- and

macrovascular endothelial cells of type 2 diabetic rats. *Life Sciences* 2009;84:240-249.

36. Chen JX, Stinnet A. Disruption of Ang-1/Tie-2 Signalling Contributes to the Impaired Myocardial Vascular Maturation and Angiogenesis in Type II Diabetic Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1606-1613.
37. Lim HS, Blann AD, Chong AY, Freestone B, Lip GYH. Plasma Vascular Endothelial Growth Factor, Angiopoietin-1, and Angiopoietin-2 in Diabetes. Implications for cardiovascular risk and effects of multifactorial intervention. *Diabetes Care* 2004;27:2918-2924.
38. Tuo Q, Zeng H, Stinnett A, Yu H, Aschner JL, Liao DF, Chen JX. Critical role of angiopoietins/Tie-2 in hyperglycemic exacerbation of myocardial infarction and impaired angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294: H2547-H2557.
39. Schiekofer S, Galasso G, Sato K, Kraus BJ, Walsh K. Impaired Revascularisation in a Mouse Model of Type 2 Diabetes Is Associated With Dysregulation of a Complex Angiogenic-Regulatory Network. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1603-1609.
40. Chung AWY, Hsiang YN, Matzke LA, McManus BM, van Breemen C, Okon EB. Reduced Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Paralleled With the Increased Angiostatin Expression Resulting From the Upregulated Activities of Matrix Metalloproteinase-2 and -9 in Human Type 2 Diabetic Arterial Vasculature. *Circ Res.* 2006;99:140-148.
41. Weihrauch D, Lohr NL, Mraovic B, Ludwig LM, Chilian WM, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR. Chronic Hyperglycemia Attenuates Coronary Collateral Development and Impairs Proliferative Properties of Myocardial Interstitial Fluid by Production of Angiostatin. *Circulation.* 2004;109:2343-2348.

42. Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, Harisson DG, Tsao PS. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity. Role of oxidative stress. *Circ Res.* 2001;88:1291-1298.
43. Sodha NR, Clements RT, Boodhwani M, Xu SH, Laham RJ, Bianchi C, Sellke FW. Endostatin and angiostatin are increased in diabetic patients with coronary artery disease and associated with impaired coronary collateral formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296: H428-H434.
44. Zhu M, Bi X, Jia Q, Shangguan S. The possible mechanism for impaired angiogenesis after local transient focal ischemia in type 2 diabetic GK rats: Different expressions of angiostatin and vascular endothelial growth factor. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2010; 64: 208-213.
45. Spinetti G, Kraenkel N, Emanuelli C, Madeddu P. Diabetes and vessel wall remodelling: from mechanistic insights to regenerative therapies. *Cardiovascular Research* 2008; 78, 265-273.
46. Chen J, Brodsky SV, Goligorsky DM, Hampel DJ, Li H, Gross SS, Goligorsky MS. Glycated Collagen I Induces Premature Senescence-Like Phenotypic Changes in Endothelial Cells. *Circ Res.* 2002;90:1290-1298.
47. Scalia R, Gong Y, Berzins B, Zhao LJ, Sharma K. Hyperglycemia Is a Major Determinant of Albumin Permeability in Diabetic Microcirculation. *Diabetes* 2007;56:1842-1849.
48. Goldin A, Beckman JA, Schmidl AM, Creager MA. Advanced Glycation End Products. Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation.* 2006;114:597-605.
49. Giardino , Edelstein D, Brownlee M. Nonenzymatic Glycosylation In Vitro and in Bovine Endothelial Cells Alters Basic Fibroblast Growth

Factor Activity. A Model for Intracellular Glycosylation In Diabetes. *J Clin Invest.* 1994;94:110-117.

50. Sugiyama T, Kawamura H, Yamanishi S, Kobayashi M, Katsumura K, Puro DG. Regulation of P2X7-induced pore formation and cell death in pericyte-containing retinal microvessels. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288: C568- C576.
51. Fadini GP, Avogaro A. Potential manipulation of endothelial progenitor cells in diabetes and its complications. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2010;12: 570-583.
52. Fadini GP, Pucci L, Vanacore R, Baesso I, Penno G, Balbarini A, Di Stefano R, Miccoli R, Kreutzenberg S, Coracina A, Tiengo A, Agostini C, Del Prato S, Avogaro A. Glucose tolerance is negatively associated with circulating progenitor cell levels. *Diabetologia* 2007;50:2156-2163.
53. Avogaro A, Albiero M, Menegazzo L, Kreutzenberg S, Fadini GP. Endothelial Dysfunction in Diabetes. The role of reparatory mechanism. *Diabetes Care*, 2011; 34, Supplement 2.
54. Yan J, Tie G, Park B, Yang Y, Nowicki PT, Messina LM. Recovery from hindlimb ischemia is less effective in type 2 than type 1 diabetic mice: Roles of eNOS and endothelial progenitor cells. *J Vasc Surg.* 2009;50(6): 1412-1422.
55. Legtenberg RJ, Houston RJ, Oeseburg B, Smits P. Metformin improves cardiac functional recovery after ischemia in rats. *Horm Metab Res.* 2002;43(4):182-5.
56. Rodriguez A, Reviriego J, Karamanos V, Canizo FJ, Vlachogiannis N, Drossinos V, the ECLA Study Group. Management of cardiovascular risk factors with pioglitazone combination therapies in type 2 diabetes: an observational cohort study. *Cardiovascular Diabetology* 2011, 10:18.

57. Vijay SK, Mishra M, Kumar H, Tripathi K. Effect of pioglitazone and rosiglitazone on mediators of endothelial dysfunction, markers of angiogenesis and inflammatory cytokines in type-2 diabetes. *Acta Diabetol* 2009;46:27-33.
58. Ansar S, Koska J, Reaven PD. Postprandial hyperlipidemia, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: focus on incretins. *Cardiovasc Diabetol*. 2001;10(1):61.
59. Inzucchi SE, McGuireDK. New Drugs for the Treatment of Diabetes. Part II: Incretin-Based Therapy and Beyond. *Circulation*. 2008;117:574-584.
60. Nystrom T, Gutniak MK, Zhang Q, Zhang F, Holst JJ, Ahren B, Sjöholm A. Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes with stable coronary artery disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287: E1209-E1215.
61. Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, Hilsted LM, Hughes TE, Michelsen BK, Holst JJ. Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(8):3717-23.
62. Liu H, Dear AE, Knudsen LB, Simpson RW. A long-acting glucagon-like peptide-1 analogue attenuates induction of plasminogen activator inhibitor type-1 and vascular adhesion molecules. *J Endocrinol*. 2009;201(1):59-66.
63. Arakawa M, Mita T, Azuma K, Ebato C, Goto H, Nomiya T, Fujitani Y, Hirose T, Kawamori R, Watada H. Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of atherosclerotic lesion by glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4. *Diabetes*. 2010;59(4):1030-7.
64. Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD,

Ferris FL, Klein R, for the American Diabetes Association. Retinopathy in Diabetes. *Diabetes Care* 2004;27, Suppl I.

65. Khan ZA, Chakrabarti S. Growth Factors in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Experimental Diab Res.* 2003;4:287-301.
66. Curtis TM, Gardiner TA, Stitt AW. Microvascular lesions of diabetic retinopathy: clues towards understanding pathogenesis? *Eye (Lond).* 2009, 23(7):1496-508.
67. Kim JH, Kim JH, Jun HO, Yu YS, Kim KW. Inhibition of Protein Kinase C delta Attenuates Blood-Retinal Barrier Breakdown in Diabetic Retinopathy. *The Americam Journal of Pathology.* 2010, 176(3):1517-24.
68. Zhu Q, Xu X, Xia X, Gu Q, Ho PC. Role of protein kinase C on alteration of retinal endothelin-1 in streptozocin-induced diabetic rats. *Exp Eye Res.* 2005, 81(2):200-6.
69. Joussen AM, Poulaki V, Le ML, Koizumi K, Esser C, Janicki H, Schraermeyer U, Kociok N, Fauser S, Kirchhof B, Kern TS, Adamis AP. A central role for inflammation in th pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J.* 2004, 18(12):1450-2.
70. McLeod DS, Lefer DJ, Merges C, Luttly GA. Enhanced expression of intercellular adhesion molecule-1 and P-selectin in the diabetic human retina and choroid. *Am J Pathol.* 1995, 147(3):642-53.
71. Barouch FC, Miyamoto K, Allport JR, Fujita K, Bursell SE, Aiello LP, Luscinskas FW, Adamis AP. Integrin-mediated neutrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes. *Invest Ophtalmol Vis Sci.* 2000, 41(5):1153-8.
72. Abu el Asrar AM, Maimone D, Morse PH, Gregory S, Reder AT. Cytokines in the vitreous of patients with proliferative diabetic

retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 1992, 114(6):731-6.

73. Sapieha P, Hamel D, Shao Z, Rivera JC, Zaniolo K, Joyal JS, Chemtob S. Proliferative retinopathies: Angiogenesis that blinds. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 2010; 5-12.
74. Roy S, Cagliero E, Lorenzi M. Fibronectin overexpression in retinal microvessels of patients with diabetes. *Invest Ophtal Vis Sci.* 1996, 37(2):258-66.
75. Das A, Frank RN, Zhang NL, Samadani E. Increases in collagen type IV and laminin in galactose-induced capillary basement membrane thickening -prevention by an aldose reductase inhibitor. *Exp Eye Res.* 1990, 50(3):269-80.
76. Vasan S, Foiles P, Founds H. Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product-protein crosslinks. *Arch Biochem Biophys.* 2003,1;419(1):89-96.
77. Durham JT, Herman IM. Microvascular Modifications in Diabetic Retinopathy. *Curr Diab Rep* 2011;11:253-264.
78. Geraldès P, Hiraoka-Yamamoto J, Matsumoto M, Clermont A, Leitges M, Marette A, Aiello LP, Kern TS, King GL. Activation of PKC-delta and SHP-1 by hiperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nat Med.* 2009; 15(11):1298-306.
79. Pfister F, Feng Y, vom Hagen F, Hoffmann S, Molema G, Hillebrands JL, Shani M, Deutsch U, Hammes HP. A Novel Mechanism of Pericyte Loss in Experimental Diabetic Retinopathy. *Diabetes* 2008;57:2495-2502.
80. Hammes HP, Feng Y, Pfister F, Brownlee M. Diabetic Retinopathy: Targeting Vasoregression. *Diabetes.* 2011, 60(1):9-16.
81. Lip PL, Belgore F, Blann AD, Hope-Ross MW, Gibson JM, Lip GYH. Plasma VEGF and Soluble Receptor FLT-1 in Proliferative Retinopathy :

Relationship to Endothelial Dysfunction and Laser Treatment. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000;41:2115-2119

82. Manaviat MR, Rashdi M, Afkhami-Ardekani M, Mohiti-Ardekani J, Bandala-Sanchez ME. Effect of pan retinal photocoagulation on the serum levels of vascular endothelial growth factor in diabetic patients. Int Ophthalmol. 2011 Jun 7 (ahead of print).
83. Spranger J, Hammes HP, Preissner KT, Schatz H, Pfeiffer AF. Release of angiogenesis inhibitor angiostatin in patients with proliferative diabetic retinopathy: association with retinal photocoagulation. Diabetologia. 2000; 43(11):1404-7.
84. Marek N, Raczyńska K, Siebert J, Myśliwiec M, Zorena K, Myśliwska J, Reiwer-Gostomska M, Trzonkowski P. Decreased angiogenin concentration in vitreous and serum in proliferative diabetic retinopathy. Microvascular Research 2011;82:1-5.
85. Ritz E, Keller C, Bergis K, Strojek K. Pathogenesis and course of renal disease in IDDM/NIDDM: differences and similarities. Am J Hypertens 1997;10:202S-207S.
86. Maeschima Y, Makino H. Angiogenesis and chronic kidney disease. Fibrogenesis & Tissue Repair 2010, 3:13.
87. Guo M, Ricardo SD, Deane JA, Shi M, Cullen-McEwen L, Bertram JF. A stereological study of the renal glomerular vasculature in the db/db mouse model of diabetic nephropathy. J Anat. 2005; 207(6):813-21.
88. Zhang SX, Wang JJ, Lu K, Mott R, Longeras R, Ma J. Therapeutic Potential of Angiostatin in Diabetic Nephropathy. J Am Soc Nephrol 2006;17: 475-486.
89. Khamaisi M, Schrijvers BF, De Vriese AS, Raz I, Flyvbjerg A. The emerging role of VEGF in diabetic kidney disease. Nephrol Dial

Transplant (2003) 18: 1427-1430.

90. De Vriese AN, Tilton RG, Elger M, Stephan CC, Kriz W, Lameire NH. Antibodies Against Vascular Endothelial Growth Factor Improve Early Renal Disfunction in Experimental Diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:993-1000.
91. Yamamoto Y, Maeschim Y, Kitayama H, Kitamura S, Takazawa Y, Sugiyama H, Yamasaki Y, Makino H. Tumstatin Peptide, an Inhibitor of Angiogenesis, Prevents Glomerular Hypertrophy in the Early Stage of Diabetic Nephropathy. *Diabetes* 2004;53:1831-1840.
92. Ichinose K, Maeshima Y, Yamamoto Y, Kinomura M, Hirokoshi K, Kitayama H, Takazawa Y, Sugiyama H, Yamasaki Y, Agata N, Makino H. 2-(8-Hydroxy—Methoxy-1-Oxo-1H-2-Benzopyran-3-yl) Propionic Acid, an Inhibitor of Angiogenesis, Ameliorates Renal Alterations in Obese Type 2 Diabetic Mice. *Diabetes* 2006;55:1232-1242.
93. Ichinose K, Maeschima Y, Yamamoto Y, Kitayama H, Takazawa Y, Hirokoshi K, Sugiyama H, Yamasaki Y, Eguchi K, Makino H. Antiangiogenic Endostatin Peptide Ameliorates Renal Alterations in the Early Stage of a Type 1 Diabetic Nephropathy Model. *Diabetes* 2005;54:2891-2903.
94. Yamagishi S, Matsui T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2010;3:2, 101-108.
95. Moriwaki Y, Yamamoto T, Shibutani Y, Aoki E, Tsutsumi Z, Takahashi S, Okamura H, Koga M, Fukuchi M, Hada T. Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetic nephropathy. *Metabolism*. 2003, 52(5):605-8.

96. Guler S, Cakir B, Demirbas B, Yonem A, Odabasi E, Onde U, Aykut O, Gursoy G. Plasma soluble intercellular adhesion molecule 1 levels are increased in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Horm Res.* 2002;58(2):67-70.
97. Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Yoshimoto K, Shimizu M, Takeda SI, Takasawa K, Yoshimura M, Kida H, Kobayashi KI, Mukaida N, Naito T, Matsushima K, Yokoyama H. Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2000;58(4):1492-9.
98. Okada S, Shikata K, Matsuda M, Ogawa D, Usui H, Kido Y, Nagase R, Wada J, Shikata Y, Makino H. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are resistant against renal injury after induction of diabets. *Diabetes* 2003, 52(10):2586-93.
99. Schrijvers BF, De Vriese AS, Flyvbjerg A. From Hyperglycemia to Diabetic Kidney Disease: The Role of Metabolic, Hemodynamic, Intracellular Factors and Growth Factors/Cytokines. *Endocrine Reviews* 2004;25(6):971-1010.
100. Wehbi GJ, Zimpelmann J, Carey RM, Levine DZ, Burns KD. Early streptozocin-diabetes mellitus downregulates rat kidney AT2 receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280: F254-F265.
101. Leininger GM, Vincent AM, Feldman EL. The role of growth factors in diabetic peripheral neuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2004; 9:26-53.
102. Schmeichel AM, Schmelzer JD, Low PA. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes.* 2003;52(1):165-71.
103. Murakawa Y, Zhang W, Pierson CR, Brismar T, Ostenson CG, Efendic S,

- Sima AA. Impaired glucose tolerance and insulinopenia in the GK-rat causes peripheral neuropathy. *Diabetes Metab Res Rev.* 2002; 18(6):473-83.
104. Pittenger G, Vinik A. Nerve Growth Factor and Diabetic Neuropathy. *Experimental Diab. Res.* 2003;4:271-285.
105. Tykarski A, Posadzy-Mańczyńska A, Wyrzykowski B, .Rozpowszechnienie nadciśnienia tętniczego oraz skuteczność jego leczenia u dorosłych mieszkańców naszego kraju. Wyniki programu WOBASZ. *Kardiologia Polska.* 2005;63;S614-S619.
106. Kawecka-Jaszcz K, Pośnik-Urbańska A, Jankowski P. Rozpowszechnienie nadciśnienia tętniczego w zależności od płci w świetle badań epidemiologicznych w Polsce. *Arterial Hypertension* 2007;11(5):377-383.
107. Hutchins PM, Darnell AE. Observation of a decreased number of small arterioles in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1974; 34: 1161-5.
108. Rizzoni D, Agabiti-Rosei E. Structural abnormalities of small resistance arteries in essential hypertension. *Intern Emerg Med.* 2011 Mar 5 (ahead of print).
109. Battegay EJ, Sanchez de Miguel L, Petrimpol M, Humar R. Effects of anti-hypertensive drugs on vessel rarefaction. *Curr. Opin Pharmacol.* 2007;7:151-157.
110. Hansen-Smith FM, Morris LW, Greene AS et al. Rapid microvessel rarefaction with elevated salt intake and reduced renal mass hypertension in rats. *Circ Res* 1996; 79: 324-30.
111. Noon JP, Walker BR, Webb DJ et al. Impaired microvascular dilatation and capillary rarefaction in young adults with a predisposition to high

blood pressure. *J Clin Invest* 1997; 99: 1873-9.

112. Edelberg TM, Reed MJ. Aging and angiogenesis. *Front Biosci* 2003; 8: 1199-209.
113. Rivard A, FabreJE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, Manger M, Asahara T, Isner JM. Age-Dependent Impairment of Angiogenesis. *Circulation*. 1999;99:111-120.
114. Mourad JJ, Levy BI. Mechanisms of Antiangiogenic-Induced Arterial Hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2011;13:289-293.
115. Maitland ML, Bakris GL, Black HR, Cen HX, Durand JB, Elliott WJ, Percy Ivy S, Leier CV, Lindenfeld JA, Liu G, Remick SC, Steingart R, Wilson Tang WH,. Initial Assesment, Surveillance, and Management of Blood Pressure in Patients Receiving Vascular Endothelial Growth Factor Signalling Pathway Inhibitors *J Natl Cancer Inst* 2010;102:596-604.
116. Hashimoto H, Prewitt RL, Efaw CW. Alterations in the microvasculature of one-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1987;253 (4 Pt 2):H933-40.
117. Steeghs N, Rabelink TJ, Roodt J, Batman E, Cluitmans FHM, Weijl NI, Koning E, Gelderblom H. Reversibility of capillary density after discontinuation of bevacizumab treatment. *Annals of Oncology* 2010;21: 1100-1105.
118. Cheng C, Diamond JJ, Falkner B. Functional Capillary Rarefaction in Mild Blood Pressure Elevation. *Clin Transl Sci*. 2008;1(1):75-9.
119. Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Evans JC, O'Donnell CJ, Kannel WB, Levy D. Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2001;345(18):1291-7.
120. Henry TD, Annex BH, McKendall GR et al. The VIVA trial: Vascular Endothelial Growth Factor in ischemia for Vascular Angiogenesis.

Circulation 2003;107: 1359-65.

121. Cuevas P, Carceller F, Ortega S et al. Hypotensive activity of fibroblast growth factor. Science 1991; 254: 1208-10.
122. Freihl F, Liaudet L, Waeber B, Levy BI. Hypertension. A disease of the microcirculation? Hypertension. 2006;48:1012-1017
123. Kiefer FN, Neysari S, Humar R, Li W, Munk VC, Battegay EJ. Hypertension and angiogenesis. Curr Pharm Des 2003; 9: 1733-44.
124. Cooke JP. NO and angiogenesis. Atheroscler Suppl. 2003;4(4):56-60.
125. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. J Clin Invest. 1998;101(11):2567-78.
126. Jin ZG, Ueba H, Tanimoto T, Lungu AO, Frame MD, Berk BC. Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. Circ Res. 2003;93(4):354-63.
127. Felmeden DC, Spencer CG, Belorge FM, Blann AD, Beevers DG, Lip GY. Endothelial damage and angiogenesis in hypertensive patients: relationship to cardiovascular risk factor management. Am J Hypertens 2003; 16: 11-20.
128. Nadar SK, Blann A, Beevers DG, Lip GY. Abnormal angiopoietins 1&2, angiopoietin receptor Tie-2 and vascular endothelial growth factor levels in hypertension: relationship to target organ damage [a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT)]. J Intern Med. 2005; 258(4):336-43.
129. Sane DC, Anton L, Brosnihan KB. Angiogenic growth factors and hypertension. Angiogenesis 2004;7;193-201.

130. Machnik A, Neuhofer W, Jantsch J, Dahlmann A, Machura K, Park JK, Beck FX, Mueller DN, Derer W, Goss J, Ziomber A, Dietsch P, Wagner H, van Rooijen N, Kurtz A, Hilgers KF, Alitalo K, Eckardt KU, Luft FC, Kerjaschki D, Titze J. Macrophages regulate salt – dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat Med.* 2009;15(5):487-8.
131. Machnik A, Dahlmann A, Kopp C, Goss J, Wagner H, van Rooijen N, Eckardt KU, Mueller DN, Park JK, Luft FC, Kerjaschki D, Titze J. Mononuclear Phagocyte System Depletion Blocks Interstitial Tonicity-Responsive Enhancer Binding Protein/Vascular Endothelial Growth Factor C Expression and Induces Salt-Sensitive Hypertension in Rats. *Hypertension.* 2010;55:755-761.
132. Tran ED, DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. Enhanced Matrix Metalloproteinase Activity in the Spontaneously Hypertensive Rat: VEGFR-2 Cleavage, Endothelial Apoptosis, and Capillary Rarefaction. *J Vasc Res* 2010;47:423-431.
133. Lee JS, Song SH, Kim JM, Shin IS, Kim KL, Suh YL, Kim HZ, Koh GY, Byun J, Jeon ES, Suh W, Kim DK. Angiopoietin-1 prevents hypertension and target organ damage through its interaction with endothelial Tie2 receptor. *Cardiovascular Research* 2008; 78, 572-580.
134. Patel JV, Lim HS, Varughese GI, Hughes EA, Lip GY. Angiopoietin-2 levels as a biomarker of cardiovascular risk in patients with hypertension. *Ann Med.* 2008;40(3):215-22.
135. Russai K, Jianxing C, Schneider R, Struijker-Boudier H, Lutz J, Heeman U, Baumann M. Renin inhibition mitigates anti-angiogenesis in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension* 2011, 29:266-272.

136. Van Esch JHM, Moltzer E, van Veghel R, Garrelds IM, Leijten F, Bouhuizen AM, Danser AHJ. Beneficial cardiac effects of the renin inhibitor aliskiren in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension* 2010, 28:2145-2155.
137. Penna GLA, Garbero RF, Neves MF, Oigman W, Bottino DA, Bouskela E. Treatment of essential hypertension does not normalize capillary rarefaction. *Clinics*. 2008;63:613-8.
138. Debbabi H, Uzan L, Mourad JJ, Safar M, Levy BI, Tibirica E. Increased skin capillary density in treated essential hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2006;19(5):477-83.
139. Sabino B, Lessa MA, Nascimento AR, Rodriguez CA, Henriques MG, Garzoni LR, Levy BI, Tibirica E. Effects of antihypertensive drugs on capillary rarefaction in spontaneously hypertensive rats: intravital microscopy and histologic analysis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008;51(4):402-9.
140. Nascimento AR, Lessa MA, Sabino B, Bousquet P, Tibirica E. Microvascular Effects of Centrally Acting Antihypertensive Drugs in Spontaneously Hypertensive Rats. *J Cardiovascular Pharmacol* 2010;55:240-247.
141. Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, Vallee BL. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 1985; 24: 5480–6.
142. Strydom DJ, Fett JW, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, Vallee BL. Amino acid sequence of tumour derived Angiogenin. *Biochemistry* 1985; 24: 5486–94.
143. Shapiro R, Riordan JF, Vallee BL. Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Biochemistry* 1986; 25: 3527–32. Erratum in:

Biochemistry 1986; 25: 6730.

144. Maiti TK, De S, Dasgupta S, Pathak T. 3'-N-Alkylamino-3'-deoxy-ara-uridines: A new class of potential inhibitors of ribonuclease A and angiogenin. *Bioorg Med Chem* 2006; 14: 1221–8.
145. Russo N, Shapiro R, Acharya KR, Riordan JF, Vallee BL. Role of glutamine-117 in the ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2920–4.
146. Beintema JJ, Hofsteenge J, Iwama M, Morita T, Ohgi K, Irie M, Sugiyama RH, Schieven GL, Dekker CA, Glitz DG. Amino acid sequence of the nonsecretory ribonuclease of human urine. *Biochemistry* 1988; 27: 4530–8.
147. Bond MD, Vallee BL. Isolation and sequencing of mouse angiogenin DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171: 988-95.
148. Hallahan TW, Shapiro R, Vallee BL. Dual site model for the organogenic activity of angiogenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2222–6.
149. Hu GF, Riordan JF, Vallee BL. A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2204–9.
150. Shapiro R, Strydom DJ, Olson KA, Vallee BL. Isolation of angiogenin from natural human plasma. *Biochemistry* 1987; 26: 5141–6.
151. Hu GF, Strydom DJ, Fett JW, Riordan JF, Vallee BL. Actin is a binding protein for angiogenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1217–21.
152. Hu GF (1997). Limited proteolysis of angiogenin by elastase is regulated by plasminogen. *J. Protein Chem.* 16: 669-679
153. O'Reilly MS. Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *EXS* 1997;79:273-294.

154. Hu H, Gao X, Sun Y, Zhou J, Yang M, Xu Z. Alpha-actinin-2, a cytoskeletal protein, binds to angiogenin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 329(2):661-7.
155. Kostin S, Hein S, Arnon E, Scholz D, Schaper J. The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. *Heart Fail Rev.* 2000; 5(3):271-80.
156. Xu Z, Monti DM, Hu G. Angiogenin activates human umbilical artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 285(4):909-14.
157. Hu GF, Riordan JF, Vallee BL. Angiogenin promotes invasiveness of cultured endothelial cells by stimulation of cell-associated proteolytic activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12096–100.
158. Moroianu J, Riordan JF. Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cell is essential to its angiogenic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1677–81.
159. Hu GF. Neomycin inhibits angiogenin-induced angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9791–5.
160. Liu S, Yu D, Xu ZP, Riordan JF, Hu GF. Angiogenin activates Erk1/2 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;287(1):305-10.
161. Kim HM, Kang DK, Kim HY, Kang SS, Chang SI. Angiogenin-induced protein kinase B/Akt activation is necessary for angiogenesis but is independent of nuclear translocation of angiogenin in HUVE cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;352(2):509-13
162. Bicknell R, Vallee BL. Angiogenin activates endothelial cell phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5961-5.
163. Trouillon R, Kang DK, Park H, Chang SI, O'Hare D. Angiogenin Induces

Nitric Oxide Synthesis in Endothelial Cells through PI-3 and Akt Kinases. *Biochemistry* 2010; 49: 3282-3288.

164. Shapiro R, Vallee BL. Human placental ribonuclease inhibitor abolishes both angiogenic and ribonucleolytic activities of Angiogenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 24: 2238-41.
165. Furia A, Moscato M, Cali G, Pizzo E, Confalone E, Amoroso MR, Esposito F, Nitsch L, D'Alessio G. The ribonuclease/angiogenin inhibitor is also present in mitochondria and nuclei. *FEBS Letters* 585 (2011) 613-617.
166. Tello-Montoliu A, Patel JV, Lip GYH. Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. *J Thromb Haemost* 2006;4:1864-74.
167. Kolben M, Blaser J, Ulm K, Schmitt M, Schneider KT, Tschesche H, Graeff H. Angiogenin plasma levels during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 37-41.
168. Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Giannaki G, Rizos D, Phocas I. Changes of Angiogenin serum concentrations in the perinatal period. *Pediatr Res* 1997; 41: 909-11.
169. Shimoyama S, Gansauge F, Gansauge S, Negri G, Oohara T, Beger HG. Increased angiogenin expression in pancreatic cancer is related to cancer aggressiveness. *Cancer Res* 1996; 56: 2703-6.
170. Strydom DJ. The angiogenins. *Cell Mol Life Sci* 1998; 54: 811-24.
171. Jones MI, Ewing CM, Isaacs WB, Getzenberg RH. Prostate cancer-derived angiogenin stimulates the invasion of prostate fibroblasts. *J Cell Mol Med*. 2011 Feb 25 (ahead of print).
172. Olson KA, French TC, Valee BL, Fett JW. A Monoclonal Antibody to Human Angiogenin Supresses Tumor Growth in Athymic Mice. *Cancer*

Research 1994;54:4567-4579

173. Burgmann H, Hollenstein U, Maca T, Zedwitz-Liebenstein K, Thalhammer F, Koppensteiner R, Ehringer H, Graninger W. Increased serum laminin and angiogenin concentrations in patients with peripheral arterial occlusive disease. *J Clin Pathol* 1996;49:508-510.
174. Tello-Montoliu A, Marin F, Patel J, Roldan V, Mainar L, Vicente V, Sogorb F, Lip GYH. Plasma angiogenin levels in acute coronary syndromes: implications for prognosis. *European Heart Journal* 2007; 28,3006-3011.
175. Kręcki R, Krzemińska-Pakuła M, Drożdż J, Szcześniak P, Peruga JZ, Lipiec P, Orszulak-Michalak D, Kasprzak JD. Relationship of serum angiogenin, adiponectin and resistin levels with biochemical risk factors and the angiographic severity of three-vessel coronary disease. *Cardiology Journal* 2010; 17, 6, 599-606.
176. Patel JV, Abraheem A, Chackathayil J, Gunning M, Creamer J, Hughes EA, Lip GYH. Circulating biomarkers of angiogenesis as indicators of left ventricular systolic dysfunction amongst patients with coronary artery disease. *Journal of Internal Medicine* 2009;265: 562-567.
177. Patel JV, Sosin M, Gunarathne A, Hussain I, Davis RC, Hughes EA, Lip GY. Elevated angiogenin levels in chronic heart failure. *Ann Med.* 2008;40(6):479-9.
178. Liu XH, Bai CG, Xu ZY, Huang SD, Yuan Y, Gong DJ, Zhang JR. Therapeutic potential of angiogenin modified mesenchymal stem cells: Angiogenin improves mesenchymal stem cells survival under hypoxia and enhances vasculogenesis in myocardial infarction. *Microvascular Research* 2008;76:23-30.
179. Oikonomou KA, Kapsoritaki AN, Kapsoritaki Ai, Monolakis AC, Tiaka EK,

Tsiopoulos FD, Tsiompanidis IA, Potamianos SP. Angiogenin, angiopoietin-1, angiopoietin-2, and endostatin serum levels in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011; 17(4):963-70.

180. Hosaka S, Shah MR, Barquin N, Haines K, Koch AE. Expression of Basic Fibroblast Growth Factor and Angiogenin in Arthritis. *Pathobiology* 1995;63:249-256
181. Silha JV, Krsek M, Sucharda P, Murphy LJ. Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *International Journal of Obesity* (2005)29,1308-1314
182. Hwang KS, Park IH, Choi H, Lee SH, Lee SH, Lee HM. Increased expression of angiogenin in nasal polyps. *Am J Rhinol Allergy*. 2001; 25(1):23-6.
183. Savitskaya YA, Izaguirre A, Sierra L, Perez F, Cruz F, Villalobos E, Almazan A, Ibarra C. Effect of angiogenesis-related cytokines on rotator cuff disease: the search for sensitive biomarkers of early tendon degeneration. *Clin Med Insights Musculoskelet Disord*. 2011;4:43-53.
184. Poffet F, Tamarcaz P, Fontao L, Borradori L. Autoimmune Progesterone Dermatitis: Potential Role of Cutaneous Angiogenin Expression. *Dermatology*. 2011 Jul 16 (ahead of print).
185. Moenner M, Gusse M, Hatzi E, Badet J. The widespread expression of angiogenin in different human cells suggests a biological function not only related to angiogenesis. *Eur. J. Biochem*. 1994;226, 483-490.
186. Rybak SM, Fett JW, Yao QZ, Vallee BL. Angiogenin mRNA in human tumor and normal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 146: 1240–3.
187. Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JL. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat*

Immunol 2003; 4: 269–73.

188. Emara MM, Ivanov P, Hickman T, Dawra N, Trisdale S, Kedersha N, Hu GF, Anderson P. Angiogenin- induced tRNA-derived Stress- induced RNAs Promote Stress-induced Stress Granule Assembly. *J Biol Chem* 2010;285(14):10959-10968.
189. Kieran D, Sebastia J, Greenway MJ, King MA, Connaughton D, Concannon CG, Fenner B, Hardiman O, Prehn JHM. Control of Motoneuron Survival by Angiogenin. *J Neurosci* 2008;28(52):14056-14061.
190. Li S, Yu W, Hu GF. Angiogenin inhibits nuclear translocation of apoptosis inducing factor in Bcl-2-dependent manner. *J Cell Physiol*. 2011 Jun 15 (ahead of print).
191. Li S, Hu GF. Angiogenin-mediated rRNA transcription in cancer and neurodegeneration. *Int J Biochem Mol Biol*. 2010; 1(1):26-35.
192. Steidinger TU, Standaert DG, Yacoubian TA. A neuroprotective role for angiogenin in models of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2011; 116, 334-341.
193. Tsuji T, Sun Y, Kishimoto K, Olson KA, Liu S, Hirukawa S, Hu GF. Angiogenin Is Translocated to the Nucleus of HeLa Cells and Is Involved in Ribosomal RNA Transcription and Cell Proliferation. *Cancer Res* 2005; 65(4): 1352-60.
194. Aoki M, Blazek E, Vogt PK. A role of the kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins P3k and Akt. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(1):136-141.
195. Kishimoto K, Liu S, Tsuji T, Olson KA, Hu GF. Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene*. 2005;24(3):445-56.

196. Weremowicz S, Fox E, Morton C, Vallee B. Localisation of the human angiogenin gene to chromosome 14q11, proximal to the T cell receptor alpha/delta locus. *American Journal of Human Genetics* 1990;47,973-981.
197. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2005; 28(suppl. 1):S37-S47.
198. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę, 2011. *Diabetologia Praktyczna*, tom 12, Supl A.
199. Widecka K, Grodzicki T, Narkiewicz K, Tykarski A, Dziwura J. Zasady postępowania w nadciśnieniu tętniczym – 2011 rok. Wytyczne Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego. *Nadciśnienie Tętnicze* (2011)15(2):55-82.
200. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet* 2005;366:1059-62.
201. Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and Vascular Disease. Pathophysiology, Clinical Consequences, and Medical Therapy: Part 1. *Circulation* 2003;108:1527-1532.
202. Siebert J, Reiwer-Gostomska M, Babińska Z, Myśliwska J, Myśliwski A, Skopińska-Różewska E, Sommer E, Skopiński P. Low serum angiogenin concentrations in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30(12):3086-7.
203. Chiarelli F, Pomilio M, Mohn A, Tumini S, Verrotti A, Mezzetti A, Cipollone F, Wasniewska M, Morgese G, Spagnoli A. Serum angiogenin concentrations in young patients with diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Investigation* 2002;32,110-114.
204. Zygalaki E, Kaklamanis L, Nikolaou NI, Kyrzopoulos S, Houri M, Kyriakides Z, Lianidou ES, Kremastinos DT. Expression profile of total

VEGF, VEGF splice variants and VEGF receptors in the myocardium and arterial vasculature of diabetic and non-diabetic patients with coronary artery disease. *Clinical Biochemistry* 2008;41:82-87.

205. Hazarika S, Dokun AO, Li A, Popel AS, Kontos CD, Annex BH. Impaired Angiogenesis After Hindlimb Ischemia in Type 2 Diabetes Mellitus. Differential Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 and Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1. *Circ. Res.* 2007;101:948-956.
206. Hamed EA, Zakary MM, Abdelal RM, Abdel Moneim EM. Vasculopathy in type 2 diabetes mellitus: role of specific angiogenic modulators. *J Physiol Biochem* 2011;67:339-349.
207. Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol.* 1993;256(2 Pt 2):H586-92.
208. Schneider MP, Schmidt BM, John S, Schmieder RE. Effects of statin treatment on endothelial function, oxidative stress and inflammation in patients with arterial hypertension and normal cholesterol level. *Journal of Hypertension* 2001, 29:1757-1764.
209. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Shibata R, Kusaba K, Tahara N, Niiyama H, Nagata T, Imaizumi T. Hypoxia-inducible factor-1 α /vascular endothelial growth factor pathway for adventitial vasa vasorum formation in hypertensive rat aorta. *Hypertension.* 2002;39(1):46-50.
210. Yang R, Ogasawa AK, Zionchek TF, Ren Z, He GW, DeGuzman GG, Pelletier N, Shen BQ, Bunting S, Jin H. Exaggerated hypotensive effect of vascular endothelial growth factor in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2002;39(3):815-20.
211. Zhao XY, Hu SJ, Mou Y, Chan CF, Jin J, Sun J, Zhu ZH. RAAV-mediated

angiogenin gene transfer induces angiogenesis and modifies left ventricular remodeling in rats with myocardial infarction. *J Mol Med (Berl)* 2006;84(12):1033-46.

212. Saif J, Schwarz TM, Chau DY, Henstock J, Sami P, Leicht SF, Hermann PC, Alcala S, Mulero F, Shakesheff KM, Heeschen C, Aicher A. Combination of injectable multiple growth factor-releasing scaffolds and cell therapy as an advanced modality to enhance tissue neovascularisation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(10):1897-904.
213. Vasan RS, Beiser A, Seshadri S, Larson MG, Kannel WB, D'Agostino RB, Levy D. Residual lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: The Framingham Heart Study. *JAMA.* 2002;287(8):1003-10.
214. Scheubel RJ, Zorn H, Silber RE, Kuss O, Morawietz H, Holtz J, Simm A. Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42(12):2073-80.
215. Siervo M, Uggiero D, Sorice R, Nutile T, Aversano Stephan BCM, Ciullo M. Angiogenesis and biomarkers of cardiovascular risk in adults with metabolic syndrome. *J Intern Med* 2010;268:338-347.
216. Savoia C, Schiffrin EL. Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clinical Science* 2007;112,375-384.
217. Blake GJ, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. Blood pressure, C-reactive protein, and risk of future cardiovascular events. *Circulation.* 2003;108(24):2993-9.
218. Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I. Demonstration That C-Reactive Protein Decreases eNOS Expression and Bioactivity in

Human Aortic Endothelial Cells. *Circulation*. 2002;106:1439-1441.

219. Adler AI, Stratton IM, Neil HA, Yudkin JS, Matthews DR, Cull CA, Wright AD, Turner RC, Holman RR. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ*. 2000;321(7258):412-9.
220. Urbich C, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S. Double-Edged Role of Statins in Angiogenesis Signalling. *Circ Res*. 2002;90:737-744.
221. Zhu XY, Daghini E, Chade AR, Lavi R, Napoli C, Lerman A, Lerman LO. Disparate effects of simvastatin on angiogenesis during hypoxia and inflammation. *Life Sciences* 2008;83:801-809.
222. Kureishi Y, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med*. 2000;6(9):1004-10.
223. Ridker PM, MacFadyen J, Libby P, Glynn RJ. Relation of baseline high-sensitivity C-reactive protein level to cardiovascular outcomes with rosuvastatin in the Justification for Use of statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER). *Am J Cardiol*. 2010;106(2):204-9.
224. Pantsulaia I, Trofimov S, Kobylansky E, Livshits G. Genetic and environmental determinants of circulating levels of angiogenin in community-based sample. *Clinical Endocrinology* 2006;64,271-279.
225. Tocci G, Ferrucci A, Guida P, Avogaro A, Comaschi M, Corsini A, Cortese C, Giorda CB, Manzato E, Medea G, Mureddu GF, Riccardi G, Titta G, Ventriglia G, Zito GB, Volpe M; on behalf of the EFECTUS Screening Committee. Impact of Diabetes Mellitus on the Clinical Management of

Global Cardiovascular Risk: Analysis of the Results of the Evaluation of Final Feasible Effect of Control Training and Ultra Sensitization (EFFECTUS) Educational Program. Clin Cardiol. 2011;34(9):560-566.

226. Pasini E, Flati V, Paiardi S, Rizzoni D, Porteri E, Aquilani R, Assanelli D, Corsetti G, Specia S, Rezzani R, De Ciuceis C, Agabiti-Rosei E. Interacellular molecular effects of insulin resistance in patients with metabolic syndrome. Cardiovascular Diabetology 2010, 9:46.
227. Rizzoni D, Pasini E, Flati V, Rodella LF, Paiardi S, Assanelli D, De Ciuceis C, Porteri E, Boari GE, Rezzani R, Specia S, Favero G, Martinotti S, Toniato E, Platto C, Agabiti-Rosei E. Angiotensin receptor blockers improve insulin signaling and prevent microvascular rarefaction in the skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. J Hypertens. 2008;26(8):1595-601.