



Gdański Uniwersytet Medyczny

Wydział Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa
i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej

Rozprawa doktorska

lek. med. Olga Jachimowicz-Duda

**Ocena surowiczych stężeń interleukiny 34
oraz fibronektyny u pacjentów chorujących
na cukrzycę typu 2**

Promotor

dr hab. n. med. Katarzyna Zorena

Gdańsk 2015

*Składam serdeczne podziękowania
Pani dr hab. n. med. Katarzynie Zorena,
Kierownik Zakładu Immunobiologii
i Mikrobiologii Środowiska
Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
za merytoryczną i zaangażowaną opiekę promotorską
oraz życzliwość i wyrozumiałość w trakcie pisania
niniejszej rozprawy.*

*Dziękuję
Pani Beacie Zbroi ,
Prezes Zarządu NZOZ „Działki Leśne” w Gdyni
za życzliwość i umożliwienie mi realizacji niniejszej pracy
w Poradni Diabetologicznej mieszczącej się w tej
Przychodni.*

*Dziękuję
Panu dr hab. n. med. Dominikowi Rachoń, prof. nadzw.
Kierownikowi Zakładu Endokrynologii Klinicznej
i Doświadczalnej Instytutu Medycyny Morskiej
i Tropikalnej w Gdyni Gdańskiego Uniwersytetu
Medycznego
za życzliwość oraz umożliwienie wykonania badań
immunoenzymatycznych.*

Dziękuję mojemu mężowi i córkom za nieustające wsparcie.

*Rozprawę tę dedykuję moim Rodzicom,
z wyrazami wdzięczności.*

Spis treści

Streszczenie	8
Summary	13
Lista skrótów	17
I Wstęp	21
1. Historia badań nad cukrzycą	21
2. Epidemiologia cukrzycy	23
3. Patogeneza i obraz kliniczny cukrzycy	23
3.1. Definicja oraz kryteria rozpoznania cukrzycy	23
3.2. Czynniki ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2	24
3.2.1 Otyłość w rozwoju cukrzycy typu 2	24
3.2.2. Starzenie się społeczeństwa	28
3.2.3. Insulinooporność	28
3.2.4. Palenie tytoniu	29
3.2.5. Niska masa ciała noworodka a otyłość	30
3.2.6. Czynniki genetyczne	30
3.2.7. Zmniejszenie aktywności fizycznej	31
3.2.8. Dieta wysokokaloryczna	32
4. Przewlekłe powikłania naczyniowe	33
4.1. Patogeneza powikłań mikronaczyniowych w przebiegu cukrzycy	33
4.1. Klasyczne czynniki ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań naczyniowych	33
4.1.1. Hiperglikemia	33
4.1.2. Czas trwania cukrzycy a rozwój późnych powikłań naczyniowych	35
4.1.3. Nadciśnienie tętnicze	36
4.1.4. Zaburzenia gospodarki lipidowej	37
4.1.5. Predyspozycje genetyczne do rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy	39
4.1.6. Palenie tytoniu a rozwój powikłań naczyniowych cukrzycy	40
4.2. Czynniki stanu zapalnego	41
4.2.1. Białko C-reaktywne (CRP)	41
4.2.2. Fibronektyna	42
4.3. Cytokiny	45

4.3.1. Czynniki martwicy nowotworów- α (TNF- α).....	45
4.3.2. Interleukina 34 (IL34)	46
4.4. Adipokiny i inne wskaźniki stanu zapalnego	49
4.4.1. Leptyna	50
4.4.2. Adiponektyna	52
4.4.3. Rezystyna	53
4.4.4. Białko wiążące retinol 4 (<i>RBP4</i>)	54
4.4.5 Wisfatyna.....	55
4.4.6 Omentyna	56
4.4.7 Chemeryna.....	57
II. Cel pracy.....	59
III. Materiał i metody.....	60
1. Charakterystyka kliniczna pacjentów	60
2. Badania biochemiczne	60
3. Grupa wysokiego ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 – grupa kontrolna	63
4. Pomiary antropometryczne.....	63
5. Uzyskiwanie surowic	64
5.1. Pomiar surowiczego poziomu interleukiny 34 oraz fibronektyny.....	65
5.2. Procedura działania testów immunoenzymatycznych ELISA IL-34 oraz FN	65
IV. Metody statystyczne.....	67
V. Wyniki.....	68
5.1. Charakterystyka kliniczna badanych pacjentów z cukrzycą typu 2 oraz osób z grupy ryzyka rozwoju cukrzycy – jako grupy kontrolnej.....	68
5.2. Porównanie surowiczych stężeń czynników zapalnych (CRP, IL34, fibronektyny) u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 oraz w grupie kontrolnej	76
5.3. Badanie związku pomiędzy parametrami klinicznymi a surowiczym stężeniem białka CRP, IL-34 oraz fibronektyny u pacjentów chorujących na T2DM oraz w grupie kontrolnej.....	79

5.3.1. Badanie związku pomiędzy surowiczym stężeniem CRP a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 oraz w grupie kontrolnej.....	79
5.3.1.1. Związek pomiędzy surowiczym poziomem CRP a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM.....	79
5.3.1.2. Związek pomiędzy surowiczym poziomem CRP a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u osób w grupie kontrolnej.	81
5.3.2. Badanie związku pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 oraz w grupie kontrolnej.....	82
5.3.2.1. Związek pomiędzy surowiczym poziomem IL-34 a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM.....	82
5.3.2.2. Związek pomiędzy surowiczym poziomem IL-34 a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM oraz mikroangiopatią	85
5.3.2.3 Związek pomiędzy stężeniem IL-34 a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM oraz z makroangiopatią.....	88
5.3.2.4 Związek pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM oraz z nadciśnieniem tętniczym.....	88
5.3.2.5. Związek pomiędzy poziomem IL-34 a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u osób z grupy kontrolnej.	90
5.3.3. Analiza zależności pomiędzy surowiczym poziomem fibronektyny a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 oraz w grupie kontrolnej	93
5.3.3.1. Związek pomiędzy surowiczym poziomem fibronektyny a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM.....	93
5.3.3.2. Związek pomiędzy surowiczym poziomem fibronektyny a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM oraz z mikroangiopatią.....	97
5.3.3.3 Związek pomiędzy surowiczym poziomem fibronektyny a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM oraz z makroangiopatią.....	97
5.3.3.4. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM oraz z nadciśnieniem tętniczym.....	98
5.3.3.5 Związek pomiędzy poziomem fibronektyny a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u osób grupy kontrolnej.	102
5.4. Wieloczynnikowa analiza regresji.....	103
5.5. Analiza AUC_{ROC} dla pacjentów chorujących na T2DM oraz osób grupy kontrolnej	106

5.5.1 Analiza porównawcza krzywych ROC dla pięciu badanych parametrów o najwyższych wartościach AUC_{ROC} jako czynników prognostycznych w przewidywaniu ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych.	108
5.5.2. Analiza porównawcza krzywych ROC dwóch badanych parametrów o najwyższych wartościach AUC_{ROC} w celu wykrycia czynnika o najwyższych wartościach dyskryminacyjnych jako czynnika prognostycznego w przewidywaniu ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych.	109
5.5.3 Wykrycie progów granicznych badanych parametrów klinicznych i biochemicznych w przewidywaniu ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych.	112
Dyskusja.....	117
Wnioski	127
Wniosek końcowy	128
Piśmiennictwo	129

Streszczenie

Cukrzyca jako choroba społeczna i cywilizacyjna przybrała na przełomie XX i XXI wieku rozmiary epidemii. Szczególnie wzrost liczby chorych na cukrzycę typu 2 (T2DM) obserwuje się w krajach rozwijających się, co ma związek ze światową epidemią otyłości wynikającej z wysokokalorycznej i aterogennej diety, predyspozycji genetycznej, zmniejszającej się aktywności fizycznej współczesnego społeczeństwa.

Cukrzyca typu 2 ma często bezobjawowy początek i już w momencie rozpoznania u około 50% chorych stwierdza się powikłania narządowe, które są główną przyczyną inwalidztwa, pogorszenia jakości życia jak też przedwczesnej umieralności. Dobra kontrola glikemii i nadciśnienia tętniczego oraz zaburzeń lipidowych znacznie zmniejsza ryzyko rozwoju powikłań cukrzycowych. Jednak ścisła kontrola glikemii i nadciśnienia może jedynie zmniejszyć, ale nie wyeliminować ryzyka rozwoju angiopatii cukrzycowej, stąd ciągła potrzeba poszukiwania nowych metod badawczych. Zarówno w Polsce jak też na świecie poszukiwania dotyczą wykrycia czynników ryzyka powikłań cukrzycy, ich skutków i wzajemnych powiązań. Biorąc pod uwagę złożoną patogenezę przewlekłych powikłań cukrzycowych, należy uwzględnić to, że wpływ na ich występowanie mają zarówno zaburzenia metaboliczne, jak i współistniejący stan zapalny. Wykrycie etapu inicjującego procesy patologiczne prowadzące do rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych są niezwykle ważne. Zakładam, że nowa prozapalna cytokina: interleukina 34 (IL-34) może mieć związek z powikłaniami naczyniowymi u pacjentów z T2DM. Dlatego też celem moich badań była ocena surowiczych stężeń interleukiny 34 oraz fibronektyny (FN) u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2.

Główny cel pracy był realizowany przez cele szczegółowe a w tym podjęto próbę oceny parametrów klinicznych i biochemicznych u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 w zależności od obecności mikroangiopatii, makroangiopatii oraz nadciśnienia tętniczego. Ponadto badano związek pomiędzy surowiczym poziomem białka C-reaktywnego (CRP), IL-34, fibronektyną a parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM oraz w grupie kontrolnej. Następnie podjęto próbę wykrycia, który z badanych parametrów klinicznych i biochemicznych można uznać za prognostyczny w przewidywaniu ryzyka późnych powikłań cukrzycowych. W ostatnim etapie badań określono wartości graniczne dla nowej cytokiny IL-34 oraz fibronektyny jak też pozostałych badanych

przez mnie parametrów klinicznych i biochemicznych dla ryzyka rozwoju późnych powikłań cukrzycowych.

Badaniem objęto łącznie 72 osoby (dorosłe rasy białej) w tym 49 pacjentów (24 kobiety oraz 25 mężczyzn) z cukrzycą typu 2 (T2DM) oraz 23 osoby (13 kobiet i 10 mężczyzn) z grupy ryzyka: bez rozpoznanej cukrzycy typu 2 lecz obciążone co najmniej 1 czynnikiem wystąpienia cukrzycy typu 2 wg aktualnych wytycznych Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (PTD 2014). Pacjenci chorujący na T2DM byli leczeni ambulatoryjnie w Poradni Diabetologicznej NZOZ „Działki Leśne” w Gdyni w latach 2010-2014. T2DM rozpoznano w oparciu o aktualne standardy i zalecenia Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (PTD) zgodne z wytycznymi American Diabetes Association (ADA). Średni wiek pacjentów T2DM wynosił 60.9 ± 9.9 lat a czas trwania klinicznie jawnej cukrzycy 7.5 ± 6.3 lat. U wszystkich badanych pacjentów z T2DM oraz osób grupy kontrolnej przeprowadzono badanie podmiotowe-wywiad, oraz pomiary parametrów antropometrycznych (wskaźnik masy ciała-BMI, obwód talii, obwód bioder, wskaźnik talia-biodro-WHR a także ciśnienie skurczowe i rozkurczowe krwi) metodami standardowymi. Oznaczono także glikemię na czczo w osoczu krwi żyłnej, hemoglobinę glikowaną (HbA1C), CRP, stężenie cholesterolu całkowitego oraz jego frakcji: LDL, HDL, triglicerydów a także kreatyniny w surowicy krwi oraz C-peptydu i albuminurii. W kolejnym etapie u wszystkich badanych oznaczono stężenia interleukiny 34 (IL34) oraz fibronektyny (FN) w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną ELISA.

W badanej grupie pacjentów chorujących na T2DM u 44 wykryto nadciśnienie tętnicze a u 17 chorych przewlekłe powikłania naczyniowe pod postacią mikroangiopatii. Albuminurię rozpoznano u 9 chorych, neuropatię cukrzycową u 3 natomiast retinopatię cukrzycową u 6 pacjentów chorujących na T2DM. Natomiast makroangiopatię rozpoznano u 12 pacjentów chorujących na T2DM w tym u 7 pacjentów wykryto chorobę niedokrwinną serca udokumentowaną u 3 osób rozpoznano miażdżycę tętnic kończyn dolnych u 2 pacjentów z T2DM wykryto występowanie blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych (miażdżycy tętnic szyjnych) natomiast jeden pacjent z T2DM przeżył udar niedokrwenny mózgu.

W pierwszym etapie badań dokonano charakterystyki badanych parametrów klinicznych i biochemicznych. Grupa pacjentów z T2DM była starsza i charakteryzowała się statystycznie znamionym wyższym poziomem BMI,

wskaźnikiem WHR, obwodem talii, obwodem bioder, poziomem wydalanych albumin z moczem, kreatyniny, wyższym poziomem HbA1c, glukozy na czczo oraz ciśnieniem skurczowym w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie wykazano istotnie statystycznych różnic w zakresie płci, ciśnienia rozkurczowego jak też palenia papierosów pomiędzy grupą pacjentów z T2DM a grupą kontrolną. W grupie pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 wykazano istotnie statystycznie niższy poziom cholesterolu całkowitego, jak też cholesterolu frakcji LDL i HDL natomiast wykryto wyższy poziom trójglicerydów w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto grupa pacjentów chorująca na T2DM charakteryzowała się statystycznie znamionym wyższym poziomem białka CRP jak też wyższym stężeniem IL-34 oraz fibronektyny w porównaniu z grupą kontrolną.

Pacjentów z T2DM podzielono na 3 grupy według występowania powikłań – u 17 osób stwierdzono mikroangiopatię, u 12 makroangiopatię a u 44 nadciśnienie. Pomiedzy grupami nie wykazano istotnie znamionych różnic w zakresie badanych parametrów klinicznych i biochemicznych oprócz znamionnie statystycznie wyższych wartości IL-34 oraz fibronektyny w grupach odpowiednio z mikro i makroangiopatią.

Celem następnego etapu badań było wykrycie związku pomiędzy parametrami klinicznymi i biochemicznymi a stężeniem IL-34 oraz fibronektyny w surowicy krwi pacjentów chorujących na T2DM oraz w grupie kontrolnej. Wykrycie współczynników rang Spearmana pozwoliło na wykazanie zależności badanych parametrów u pacjentów chorujących na T2DM oraz w grupie kontrolnej. W badaniach własnych wykryłam dodatnią zależność pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a czasem trwania cukrzycy, poziomem HbA1C, wskaźnikami WHR, BMI, CRP oraz fibronektyną. Badając fibronektynę u chorych na T2DM w poszczególnych podgrupach wykryłam dodatnią zależność pomiędzy surowiczym stężeniem FN a wiekiem pacjentów oraz pomiędzy FN a stężeniem IL-34. Natomiast ujemną zależność wykryłam pomiędzy fibronektyną a cholesterolem całkowitym jak też cholesterolem frakcją LDL.

W celu wskazania, który z badanych parametrów klinicznych i biochemicznych istotnie wpływa na wzrost poziomu IL-34 oraz fibronektyny u pacjentów chorujących na T2DM oraz w grupie kontrolnej zastosowano model wieloczynnikowej regresji. W grupie pacjentów chorujących na T2DM wykazano, że niezależnymi czynnikami istotnie wpływającymi na wzrost IL-34 w kolejności według siły działania jest HbA1c, cholesterol LDL, wskaźnik WHR oraz białko CRP. W grupie pacjentów chorujących

na T2DM wykazano, że niezależnym czynnikiem istotnie wpływającym na wzrost fibronektyny jest cholesterol frakcji LDL. Natomiast w grupie kontrolnej wykazano, że wskaźnik BMI jest niezależnym czynnikiem istotnie wpływającym na wzrost stężenia zarówno IL-34 jak i fibronektyny.

W celu wykrycia, który z piętnastu badanych parametrów u pacjentów z T2DM i osób grupy kontrolnej wykazuje najwyższą wartość dyskryminacyjną w przewidywaniu ryzyka rozwoju późnych powikłań cukrzycowych zastosowano analizę statystyczną krzywych ROC (*Receiver Operating Characteristics*). Z badanych parametrów biochemicznych i klinicznych znaczenie prognostyczne w przewidywaniu ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych wg. kolejności siły dyskryminacyjnej określonej polem powierzchni pod krzywą wykryto dla HbA1c ($AUC_{ROC}=94.85\%$), IL-34 ($AUC_{ROC}=89.88\%$) białka CRP ($AUC_{ROC}=83.96\%$) glukozy na czczo ($AUC_{ROC}=82.25\%$) oraz BMI ($AUC_{ROC}=82.21\%$). Fakt wykrycia przez mnie najwyższej wartości dyskryminacyjnej z piętnastu badanych parametrów dla HbA1c - znanego i klinicznie użytecznego parametru wyrównania metabolicznego być może stanowi przesłankę do pierwotnej koncepcji zaproponowanej przez ekspertów ADA i dopracowania technologii pomiaru HbA1c, aby poszerzyć możliwości diagnostyczne nie tylko jako wskaźnika stopnia wyrównania cukrzycy ale także jako markera późnych powikłań cukrzycowych. Ponadto, w badaniach własnych wykazałam, że cytokina IL-34 posiada lepsze wartości dyskryminacyjne dla ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy niż białko CRP. Co więcej interleukina 34 ma większą siłę dyskryminacyjną niż glikemia na czczo. Ma także przewagę w tym względzie nad fibronektyną ($AUC=75.16\%$). Próg referencyjny dla IL-34 określono na poziomie 91.2 pg/ml. W dostępnej literaturze nie ma danych odnośnie wartości granicznych dla nowej cytokiny IL-34. Dlatego też określenie przez mnie progu granicznego dla IL-34 uważam za nowatorskie. Zastosowanie klinicznie testu do oznaczeń surowiczych stężeń IL-34 może być dodatkowym markerem zapalnym w przewidywaniu ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych. W przeciwieństwie do badanej fibronektyny, dla której analiza statystyczna krzywych ROC nie wykazała wartości dyskryminacyjnej i nie może być przydatnym markerem w przewidywaniu ryzyka rozwoju późnych powikłań cukrzycy.

W podsumowaniu: istotą moich badań jest z jednej strony wykrycie znanego klinicznie użytecznego parametru HbA1c dla którego z 15 badanych czynników wykazano najwyższą wartość dyskryminacyjną. Z drugiej strony nowatorskim

odkryciem jest wskazanie nowej cytokiny IL-34 jako dodatkowego markera zapalnego, który być może w przyszłości będzie miał zastosowanie w diagnostyce w przewidywaniu ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych. Uważam, że wskazane są dalsze badania na większej liczbie zarówno pacjentów chorujących na cukrzycę jak też osób z grup ryzyka oraz badania in vitro aby dogłębnie zbadać potencjał zapalny cytokiny IL-34.

Summary

Diabetes as a civilization disease has become an epidemic of XX and XXI century. Particularly significant increase of number of patients with Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is being observed in developing countries what is related to worldwide epidemic of obesity due to atherogenic diet rich in calories, genetic predispositions and decreased physical activity. Onset of T2DM is usually asymptomatic and 50% of cases at the time of diagnosis present with severe complications leading to disability, deterioration of quality of life and premature death. Good glycemic control, blood pressure monitoring as well as control of lipid profile may significantly decrease the risk of diabetes complications. However precise glycemic control and blood pressure monitoring may only diminish, but not completely eliminate the risk of diabetic angiopathy, hence the search of new scientific methods is needed. In Poland alike worldwide new ways of scientific search are related to diabetes complications risk factors, their consequences and connections. Due to very complex pathogenesis of chronic diabetes complications, influence of metabolic abnormalities and coexisting inflammation should be considered. Recognition of initiation of pathologic process is essential. I assume that new proinflammatory cytokine: interleukine 34 (IL-34) is connected with vascular complications in patients with T2DM. Therefore the aim of my study was to assess serum concentration of interleukin 34 and fibronectin (FN) in patients with T2DM. The main purpose of the study was established by realization of detailed goals including assessment of clinical and biochemical parameters in patients with T2DM in comparison to microangiopathy, macroangiopathy and hypertension. Moreover the correlation between serum concentration of C-reactive protein (CRP), IL-34, fibronectin and clinical and biochemical parameters was studied in patients with T2DM and control group. Afterwards I attempted to assess which from the studied parameters may be recognized as a prognostic factor of late diabetes complications. Last stage of the study included determination of threshold values for new cytokine IL-34 and fibronectin as well as for remaining clinical and biochemical parameters for risk of late diabetes complications.

The study included 72 cases (adult Caucasians) including 49 patients (24 females and 25 males) with T2DM and 23 patients (13 females and 10 males) from group of risk: no T2DM but with at least one risk factor due to actual clinical guidelines of Polish Diabetes Association (2014). Patients with T2DM were treated in outpatient

Diabetes Clinic “NZOZ - Działki Leśne” in Gdynia in years 2010-2014. Type 2 Diabetes was diagnosed due to actual standards of Polish Diabetes Association consistent with American Diabetes Association (ADA) guidelines. Mean age of T2DM patients was 60.9 ± 9.9 years and time from diagnosis of clinically symptomatic diabetes was 7.5 ± 6.3 years. In all patients enrolled to the study with T2DM and in control group medical history was taken and anthropometric measures (body mass index-BMI, waist circumference, hips circumference, waist-to-hip ratio-WHR, systolic and diastolic blood pressure) were performed by standard methods. Fasting glucose, glycated hemoglobin (HbA1C), CRP, total cholesterol level and its fractions: LDL, HDL, triglycerides, creatinine, C-peptide and albumin levels were measured. Next stage included measurement of interleukin 34 (IL34) and fibronectin (FN) serum level with immunoenzymatic method ELISA in all patients.

First stage of the study included clinical characteristic of studied clinical and biochemical parameters. Group of patients with T2DM was older and characterized with statistically significant higher level of BMI, WHR, waist circumference, hips circumference, urea albumin level, creatinine level, higher HbA1c, fasting glucose and systolic blood pressure comparing to the control group. There were no statistically significant differences between gender, diastolic pressure and cigarette smoking in T2DM patients and control group. In patients with type 2 diabetes significantly lower levels of total cholesterol and fractions: LDL and HDL were observed, whereas higher level of triglycerides was noted comparing to control group. Moreover group of patients with T2DM was characterized by significantly higher CRP levels, as well as higher IL-34 and fibronectin levels comparing to control group.

Subsequently patients with T2DM were divided into 3 groups due to presented complications: 17 cases with microangiopathy, 12 with macroangiopathy and 44 with hypertension. There were no differences between groups regarding clinical and biochemical parameters apart from significantly higher levels of IL-34 and fibronectin in groups with micro and macroangiopathy. The aim of following stage of the study was to indicate the correlation between clinical and biochemical parameters and serum concentration of IL-34 and fibronectin in T2DM patients and control group. Spearman rank correlation coefficient calculation allowed to recognize relationship between studied parameters in patients with T2DM and in control group. Following study revealed positive correlation between serum IL-34 level and duration of diabetes, HbA1c level, WHR, BMI, CRP and fibronectin. During fibronectin assessment in particular

groups of T2DM patients I have observed positive correlation between fibronectin and patients age and between FN and IL-34 levels. Instead I have observed negative correlation between fibronectin and total cholesterol and LDL fraction. In order to indicate which of the clinical and biochemical parameters significantly influences increase of IL-34 and fibronectin levels in patients with T2DM and in control group multifactor regression model was applied. Following study revealed that in group of T2DM patients independent factors influencing increase of IL-34 level included respectively: HbA1c, cholesterol LDL, WHR and CRP. In addition in patients with T2DM it was observed that LDL cholesterol independently influenced increase of fibronectin level. On the other hand it was observed that in control group BMI significantly influenced increase of both IL-34 and fibronectin.

In order to detect which out of 15 studied parameters in T2DM and control group presents the highest discriminatory value in predicting the risk of late diabetes complications Receiver Operating Characteristics Analysis was applied. From analyzed clinical and biochemical parameters prognostic value in predicting the risk of diabetes complications in sequence of discriminatory power described by surface area under the curve was revealed for HbA1c ($AUC_{ROC}=94.85\%$), IL-34 ($AUC_{ROC}=89.88\%$), CRP ($AUC_{ROC}=83.96\%$), fasting glucose ($AUC_{ROC}=82.25\%$) and BMI ($AUC_{ROC}=82.21\%$). The fact of finding the highest discriminatory value out of 15 studied parameters for HbA1c which is commonly known parameter of metabolic control and may be a rationale for primary conception proposed by ADA experts as well as for improving the technology of measurement of HbA1c in order to explore the diagnostic possibilities not only as metabolic control factor but also as a late complications marker. In addition the study revealed that the cytokine IL-34 has better discriminatory values of late diabetes complications than CRP. Moreover IL-34 has also higher discriminatory value than fasting glucose. It has also the advantage over the fibronectin in that matter ($AUC=75.16\%$). Reference threshold for IL-34 was described at level of 91.2 pg/ml. There are no data regarding threshold values for new cytokine IL-34 in literature. Therefore establishment of this value is being considered as novel. Clinical application of testing serum levels of IL-34 could be an additional inflammatory marker predicting the risk of chronic diabetes complications. On the contrary the fibronectin, for which statistical analysis of ROC revealed no discriminatory value cannot be useful clinical marker of late diabetic complications.

In summary: The essence of the study was to detect clinically known useful parameter HbA1c for which out of 15 factors the discriminatory value was the highest. On the other hand indication of new cytokine IL-34 as an additional inflammatory marker that could be applied in assessment of risk of chronic diabetes complications is considered as novel finding. Further studies regarding larger group of patients with diabetes as well as patients from the risk groups including in vitro studies are required to properly assess inflammatory potential of cytokine IL-34.

Lista skrótów

ADA - American Diabetes Association - Amerykańskie Towarzystwo Diabetologiczne

ACE1 - karboksypeptydaza 1, enzym konwertujący angiotensynę I do angiotensyny II

ACE2 - karboksypeptydaza 2, enzym rozkładający angiotensynę II i angiotensynę I do angiotensyny1-7 i angiotensyny1-9

ADH - wazopresyna

AGEs- advanced glycation end products- końcowe produkty zaawansowanej glikacji białek

AGRP (aguti-related peptide) - białko agouti

AMPK - kinaza białkowa aktywowana przez AMP

Ang I - angiotensyna I (angiotensyna1-10)

Ang II- angiotensyna II (angiotensyna1-8)

Ang 1-7 - angiotensyna 1-7

BMI - body mass index - wskaźnik masy ciała

bFGH- basic fibroblast growth factor- zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów

CAD - coronary artery disease - Choroba tętnic wieńcowych, znana również jako miażdżycowa choroba serca, miażdżycowa choroba sercowo-naczyniowa, choroba wieńcowa serca, lub choroba niedokrwienna serca (IHD)

CRP – C-Reactive Protein, białko C-reaktywne

CsF-1 - colony stimulating factor-1, receptorem czynnika stymulującego kolonie-1

DAG- diacyloglicerol, diacyloglicerole, organiczne związki chemiczne z grupy glicerydów

DBP – diastolic blood pressure- ciśnienie rozkurczowe krwi

DCCT - Diabetes Control and Complications Trial

DM- diabetes mellitus- cukrzyca

DN –diabetic nephropathy – nefropatia cukrzycowa

DPP-Diabetes Prevention Programme- badanie dotyczące leczenia behawioralnego u osob z nadwagą i nietolerancją glukozy

DR- diabetic retinopathy- retinopatia cukrzycowa

ECM- extracellular matrix – macierz pozakomórkowa

EDIC – Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications

EGF- epidermal growth factor- naskórkowy czynnik wzrostu

ESH/ESC - Europejskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego / Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne

eNOS- epithelial nitric oxide synthase- śródbłonkowa syntaza tlenu azotu

ET- endothelin- endotelina

EURODIAB (The Epidemiology and prevention of Diabetes) – Badania dot. epidemiologii i profilaktyki cukrzycy

FDA- Food and Drug Administration- Amerykańska Agencja do Spraw Żywności i Leków

FFA- free fatty acids - wolne kwasy tłuszczowe

FN- fibronectin - fibronektyna

FGF- fibroblast growth factor- czynnik wzrostu fibroblastów

GAPDH- dehydrogenaza aldehydu glicerofosforanowego

GFR - glomerular filtration rate - wielkość przesączania kłębuszkowego

GSH- reduced glutathione- zredukowana forma glutationu

GSSG- oxidized glutathione- utleniona forma glutationu

HbA1c - glycated hemoglobin -hemoglobina glikowana

HDL - high density lipoprotein - frakcja lipoproteiny osocza krwi o wysokiej gęstości

HGF- hepatocyte growth factor- czynnik wzrostu hepatocytów

HIF-1 (hypoxia-inducible factor -1) - czynnik transkrypcyjny indukowany przez hipoksję

HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance) - wskaźnik insulinooporności

ICAM-1- intercellular adhesion molecule- międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna

IDF - International Diabetes Federation – Międzynarodowa Organizacja ds. Cukrzycy

IDL - Intermediate Density Lipoprotein – lipoproteiny o średniej gęstości

IGF- insulin-like growth factor- insulinopodobny czynnik wzrostu

IL- interleukine- interleukina

IL-1b - interleukina - 1b

IL-6 - interleukina - 6

IL-34 – interleukin 34 – interleukina 34

IP3- trójfosforan fosfatydyloinozytolu

IRMA- intraretinal microvascular abnormalities- śródsiatkówkowe nieprawidłowości naczyniowe

LDL-low density lipoprotein – frakcja lipoprotein osocza o niskiej gęstości

MCP-1 monocyte chemoattractant protein-1, chemotaktyczne białko dla monocytów

MMPs- matrix metalloproteinases- metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej

MODY- maturity onset diabetes of the young- cukrzyca typu dorosłych u osób młodych(monogenowa)

NATPOL I-III - program badań epidemiologicznych na reprezentatywnej grupie dorosłych Polaków realizowany w latach 1994-2002

NF κ B- nuclear factor kappa B- jądrowy czynnik kappa B

NO/ EDRF (endothelial derived relaxing factor) - tlenek azotu

NOS - syntaza tlenku azotu

NPDR- non-proliferative diabetic retinopathy- retinopatia cukrzycowa nieproliferacyjna

NPY – neuropeptyd Y

NYHA - New York Heart Association (klasyfikacja Nowojorskiego Towarzystwa Kardiologicznego w niewydolności serca)

OGTT (oral glucose tolerance test) - doustny test obciążenia glukozą

ox-LDL - utleniona forma frakcji LDL-cholesterolu

PAI-1- plasminogen activator inhibitor- inhibitor aktywatora plazminogenu

PD-ECGF- platelet-derived endothelial cell growth factor- płytkopochodny czynnik wzrostu

PDGF- platelet derived growth factor- płytkowy czynnik wzrostu

PDR- proliferative diabetic retinopathy- retinopatia cukrzycowa proliferacyjna

PIGF- placental growth factor- łożyskowy czynnik wzrost

PKB (protein kinase B)/Akt - kinaza białkowa B; aktywowana przez PI3K

PKC (protein kinase C) - kinaza białkowa C, cytoplazmatyczna kinaza serynowo-treoninowa PLC - fosfolipaza C

Pol-MONICA/ Pol-MONICA Bis - polskie badania epidemiologiczne; składowa międzynarodowego programu WHO-MONICA

PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor) - receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów

PPDR- pre-proliferative diabetic retinopathy- retinopatia cukrzycowa przedproliferacyjna

PTNT - Polskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego

PTD- Polskie Towarzystwo Diabetologiczne

RA - rheumatoid arthritis - reumatoidalne zapalenie stawów

RAA- układ renina-angiotensyna-aldosteron

RAGE- receptor for advanced glycation end products- receptor dla końcowych produktów zaawansowanej glikacji białek

RELM - family of cysteine-rich resistin-like molecules – rodzina białek bogatych w cysteinę

RBP4 - retinol-binding protein 4 - białko wiążące retinol 4

ROC - Receiver Operating Characteristics - charakterystyka krzywych

ROS- reactive oxygen species- reaktywne formy tlenu

Roux-en-Y gastric bypass – zabieg bariatryczny

RFT- reaktywne formy tlenu

rTPA- recombinant tissue plasminogen activator- rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu

TGF α - transforming growth factor alpha- transformujący czynnik wzrostu alfa

TG – triglycerides –triglicerydy

TGF β - transforming growth factor beta- transformujący czynnik wzrostu beta

TNF α - tumor necrosis factor alpha- czynnik martwicy nowotworu alfa

T1DM- diabetes mellitus type 1- cukrzyca typu 1

T2DM- diabetes mellitus type 2- cukrzyca typu 2

SAT - subcutaneous adipose tissue –tkanka tłuszczowa podskórna

SBP - systolic blood pressure- ciśnienie skurczowe krwi

SREBPs - Sterol Regulatory Elements-Binding Proteins – białka regulujące wiążący element steroli

SRE – Sterol Regulatory Element – element wiążący sterole

UKPDS - United Kingdom Prospective Diabetes Study – Prospektywne Badania Cukrzycy Wielkiej Brytanii

vWF-von Willebrand factor - czynnika von Willebranda

VAT - Visceral Adipose Tissue - tkanka tłuszczowa trzewna

VEGF- vascular endothelial growth factor- naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu

VLDL-very low density lipoprotein- lipoproteina o niskiej gęstości

VCAM-1- vascular endothelial adhesion molecule- śródbłonkowa cząsteczka adhezyjna

WAT - white adipose tissue – biała tkanka tłuszczowa

WESDR - Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy - Badania Epidemiologiczne Wisconsin dot. Retinopatii Cukrzycowej

WHO - World Health Organization – Światowa Organizacja Zdrowia

WRT- wolne rodniki tlenowe

I Wstęp

1. Historia badań nad cukrzycą

Pierwsze wzmianki o cukrzycy jako chorobie przebiegającej z oddawaniem zwiększonych ilości słodkiego moczu i wzmożonym pragnieniem pochodzą ze staroindyjskich oraz staroegipskich tekstów sprzed kilku tysięcy lat. Najbardziej znany opis tej choroby z czasów starożytnych pochodzi od Areteusza z Kapadocji z 150 r p.n.e. Przedstawił on cukrzycę jako "rzadką chorobę (...) w której uszkodzony pęcherz moczowy i nerki bezustannie produkują ogromne ilości moczu (...) pragnienie nie daje się zaspokoić (...) ciało topnieje gwałtownie a śmierć przychodzi szybko". Areteusz jako pierwszy użył nazwy *diabetes* pochodzącej od greckiego słowa oznaczającego syfon dla podkreślenia, iż „wypity płyn nie pozostaje w ciele ale przepływa przezeń jak przez kanał lub sito” [1,2].

Przeświadczenie, że cukrzyca jest przede wszystkim chorobą układu moczowego panowało do XVII wieku n.e i do tego czasu nie poświęcano jej zbytnej uwagi. W tym okresie jednak zaobserwowano wzrastającą liczbę zachorowań co wiązało się z modą na biesiadny styl życia. Thomas Willis, lekarz i profesor Oksfordu w swojej pracy z 1674 roku pt. „*Diabetes or the Pissing Evil*” wykazał powiązanie pomiędzy większą częstością nowych rozpoznań cukrzycy a coraz popularniejszym sposobem życia polegającym na „spędzaniu czasu w wesołym towarzystwie przy jedzeniu i winie” [1,3].

W 1776 roku angielski lekarz Matthew Dobson po odparowaniu moczu chorego na cukrzycę uzyskał słodką substancję i doszedł do przekonania, że nerki wydzielają do moczu cukier, który musi być uprzednio obecny we krwi [1,4]. Dalszy krok w badaniu patofizjologii cukrzycy uczynił chirurg królewskiej artylerii z Edynburga John Rollo, który w 1797 roku wykrył, że ilość wydalanego z moczem cukru zależy od rodzaju pożywienia. Co więcej autor wykazał także, że pokarmy roślinne wpływają na zwiększenie ilości cukru w moczu a z kolei wysokobiałkowe (mięsne) na zmniejszenie [1,5]. John Rollo był pierwszym lekarzem, który zastosował leczenie dietetyczne w cukrzycy zalecając dietę ubogą w węglowodany i bogatą w białko i tłuszcz. Przedstawiony sposób leczenia cukrzycy przetrwał aż do początków XX wieku, kiedy odkryto insulinę. Doktor Rollo jako pierwszy użył też w nazwie choroby przymiotnika *mellitus* (z łac. miodowy) [1,5].

Wiek XIX przyniósł kolejne odkrycia dotyczące cukrzycy. Dostrzeżono korzystny wpływ wysiłku na obniżanie poziomu cukru i opisano dwa typy chorych na cukrzycę: młodych i szczupłych (*diabete maigre*-cukrzyca osób szczupłych) oraz starszych, otyłych u których szczególnie skuteczna okazywała się dieta i wysiłek fizyczny (*diabete gras*-cukrzyca otyłych). Francuski fizjolog Claude Bernard wykazał obecność glukozy we krwi zdrowych zwierząt niezależnie od czasu jaki upłynął od posiłku. Odkrył też obecność substancji magazynującej glukozę w wątrobie i nazwał ją *glikogenem* [1,6]. W 1869 Paul Langerhans opisał budowę mikroskopową trzustki i wykrył występowanie grup komórek wybarwiających się odmiennie od reszty narządu. Zostały one już po jego śmierci nazwane „wyspami Langerhansa”. Wysłunięto też hipotezę, że mogą one produkować substancję obniżającą stężenie glukozy i nazwano ją insuliną (*z lac. insula-wyspa*) [1,7]. Przełomowym odkryciem okazały się prace Josefa von Meringa i Oskara Minkowskiego, niemieckich naukowców, którzy spostrzegli, że usunięcie trzustki u psów powoduje wystąpienie cukrzycy a wszczepienie jej fragmentu pod skórę cofa objawy. Dowiodło to, że przyczyną wystąpienia cukrzycy musi być choroba trzustki [1,8]. Wielu naukowców w licznych ośrodkach na całym świecie pracowało na przełomie XIX i XX wieku nad wyizolowaniem „wyciągu z trzustki”, a właściwie samej insuliny w postaci, w której można by ją zastosować u ludzi [1,9]. Udało się to dopiero naukowcom z Toronto. Młody chirurg Grant Banting, profesor fizjologii John Macleod, jego pomocnik, student Charles Best oraz biochemik James Collip stali się autorami jednego z największych wydarzeń w historii medycyny. Badacze 11 stycznia 1922 roku podali pierwszemu choremu na cukrzycę uzyskany przez siebie preparat insuliny [1,10]. Od 1992 r. zmienił się przebieg naturalny tej choroby a rozpoznanie cukrzycy przestało oznaczać wyrok śmierci. Autorzy tego historycznego wydarzenia zostali już w 1923 roku uhonorowani Nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii. Od 1923 roku insulina zaczęła być dostępna na świecie a już w 1924 roku w Polsce, poprzez działania biochemika Kazimierza Funka [1,11]. Dzięki wysiłkom wielu badaczy cukrzyca, która do 1922 roku była chorobą śmiertelną została uznana za chorobę przewlekłą.

2. Epidemiologia cukrzycy

Cukrzyca jako choroba społeczna i cywilizacyjna przybrała na przełomie XX i XXI wieku rozmiary epidemii. Najnowsze dane Międzynarodowej Federacji Diabetologicznej (International Diabetes Federation, IDF) opublikowane 14 listopada 2013 roku wykazały, że 382 milionów osób na świecie choruje na cukrzycę. IDF szacuje, że liczba chorych na cukrzycę wzrośnie do 592 mln do 2035 roku, co stanowić będzie ok.7 % populacji świata [12]. Większość bo ponad 90% stanowią będą chorzy na cukrzycę typu 2 (T2DM) występującą zazwyczaj po 40 roku życia. Szczególnie wzrost liczby chorych na T2DM obserwuje się w krajach rozwijających się co ma związek ze światową epidemią otyłości wynikającej z wysokokalorycznej i aterogennej diety, predyspozycji genetycznej, zmniejszającej się aktywności fizycznej współczesnego społeczeństwa [1,12-13]. Nawet niewielkie zmniejszenie masy ciała w bardzo znaczący sposób przyczynia się zarówno do zmniejszenia ryzyka rozwoju cukrzycy *de novo*, jak i do redukcji zagrożenia rozwoju późnych powikłań cukrzycowych. Nauka o prawidłowym żywieniu, w tym o zapobieganiu rozwojowi nadwagi i otyłości, powinna być ważnym elementem edukacyjnym na każdym szczeblu szkolenia. *De facto*, takie postępowanie powinno być wdrażane od szkoły podstawowej poprzez kolejne etapy edukacji. Cukrzyca typu 2 ma często bezobjawowy początek i już w momencie rozpoznania u około 50% chorych stwierdza się powikłania narządowe, które są główną przyczyną inwalidztwa, pogorszenia jakości życia jak też przedwczesnej umieralności [1,14-15]. W Polsce liczba chorych na cukrzycę wzrosła w latach 2001-2011 o 25 % w/g badania NATPOL i obecnie osiąga ok.3 mln osób. Po 60 roku życia co 4 osoba choruje na cukrzycę, głównie typu 2 zaś połowę sumy przypadającej na roczny koszt leczenia cukrzycy przypada na leczenie jej powikłań [13].

3. Patogeneza i obraz kliniczny cukrzycy

3.1. Definicja oraz kryteria rozpoznania cukrzycy

Cukrzyca (*diabetes mellitus*) to grupa chorób metabolicznych charakteryzujących się przewlekłą hiperglikemią powstałą w wyniku zaburzeń wydzielania i/lub działania insuliny. Przewlekła hiperglikemia wiąże się

z uszkodzeniem, zaburzeniem czynności i niewydolnością narządów, zwłaszcza oczu, nerek, nerwów, serca i naczyń krwionośnych [16,17]. Według zaleceń Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (PTD) zgodnego w wytycznymi Amerykańskiego Towarzystwa Diabetologicznego (ADA - American Diabetes Association) rozpoznanie cukrzycy opiera się na diagnostyce laboratoryjnej dotyczącej oznaczenia stężenia glukozy w osoczu krwi żyłnej [16]. W przypadku występowania objawów klinicznych diagnostyka dotyczy oznaczenia tzw. glikemii przygodnej czyli w próbce krwi pobranej o dowolnej porze dnia, niezależnie od pory ostatnio spożywanego posiłku. Przy braku występowania objawów w grupie ryzyka w badaniach przesiewowych lub przy podejrzeniu cukrzycy oznacza się dwukrotnie (każde oznaczenie innego dnia) glikemię na czczo w próbce krwi pobranej 8-14 godzin od ostatniego posiłku. Jeżeli jedno- lub dwukrotny pomiar glikemii na czczo wyniesie 100-125 mg/dl (5,6-6,9 mmol/l) zaleca się wykonanie doustnego testu tolerancji glukozy (OGTT- oral glucose tolerance test) [16,17]. OGTT wykonuje się bez uprzedniego ograniczania spożywania węglowodanów, u pacjenta będącego na czczo, który dwugodzinny okres pomiędzy wypiciem wodnego roztworu zawierającego 75 g glukozy a pobraniem próbki krwi powinien spędzić w miejscu wykonywania testu, w spoczynku. Oznaczenie stężenia glukozy wykonuje się zawsze w osoczu krwi żyłnej. Kryterium rozpoznania cukrzycy stanowi poziom glikemii po 2 godzinach od obciążenia ≥ 200 mg/dl [16].

3.2. Czynniki ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2

3.2.1 Otyłość w rozwoju cukrzycy typu 2

Czynniki ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 (T2DM) jest otyłość, dieta o wysokiej zawartości tłuszczów nasyconych i cukrów prostych, malejąca aktywność fizyczna, wiek, palenie tytoniu i predyspozycja genetyczna prowadzące do insulinooporności, nadciśnienia tętniczego i hiperlipidemii. W większości składają się one na obraz zespołu metabolicznego i przyczyniają do rozwoju pełnoobjawowej T2DM. Otyłość jest jednym z najsilniejszych czynników ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2. U 60 do 80% osób ze świeżo rozpoznaną T2DM występuje otyłość [12-14]. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO – World Health Organization) otyłość jest definiowana jako nieprawidłowe lub nadmierne nagromadzenie tłuszczu w tkance

tłuszczowej prowadzące do pogorszenia stanu zdrowia [17]. W prowadzonych na dużą skalę badaniach populacyjnych i klinicznych do określenia otyłości używa się wskaźników wagowo-wzrostowych. Najszersze zastosowanie uzyskał wskaźnik Queteleta II, znany też jako wskaźnik masy ciała (BMI – Body Mass Index), który obliczamy, dzieląc masę ciała w kilogramach przez wzrost w metrach podniesiony do kwadratu zgodnie ze wzorem:

$$\text{BMI} = \text{masa ciała [kg]} / (\text{wysokość ciała})^2 \text{ [m]} \text{ [13]}.$$

W praktyce klinicznej otyłość w wieku dorosłym definiowana jest jako BMI większe od 30, a nadwaga jako BMI większe od 25. BMI powyżej 40 wskazuje na otyłość z bezpośrednim zagrożeniem życia, charakteryzującą się podwyższonym ryzykiem zgonu Tabela 1.

Tabela 1. Klasyfikacja otyłości wg WHO (w oparciu o BMI).

BMI [kg/m ²]	STOPIEŃ OTYŁOŚCI
18.5-24.9	Norma
25.0-29.9	Nadwaga
30.0-34.9	otyłość I ^o
35.0-39.9	otyłość II ^o
>40	otyłość III ^o (chorobliwa)

Wyniki badań wykazały, że zapadalność na T2DM zwiększa się liniowo wraz ze wzrostem BMI [18-19]. W populacji dorosłych Amerykanów wykazano, że wzrost masy ciała o 1 kg zwiększał ryzyko rozwoju cukrzycy o 4,5-9 % . U dorosłych osób z BMI \geq 40 (stanowiących do 5% populacji) występuje nie tylko zwiększone ryzyko cukrzycy (ok. 7 krotne), ale i nadciśnienia tętniczego (ok. 6 krotne), podwyższonego poziomu cholesterolu (ok. 2 krotne) a także wzrost ogólnej umieralności w porównaniu z osobami z prawidłowym BMI [19]. Dotychczasowe badania wykazały, że BMI, które koreluje z zawartością tłuszczu w organizmie nie odzwierciedla jednak rozkładu tkanki tłuszczowej. Okazało się bowiem, iż tłuszcz „brzuszny” i otyłość typu centralnego z przewagą gromadzenia tkanki tłuszczowej w obrębie jamy brzusznej najbardziej koreluje z wystąpieniem zespołu metabolicznego i w konsekwencji może dojść do rozwoju T2DM. Tkanka tłuszczowa trzewna (wisceralna) jest najbardziej aktywna metabolicznie gdyż ze względu na zwiększoną gęstość receptorów β - adrenergicznych (zwłaszcza β 3) i glikokortykosterydowych dochodzi do zwiększenia lipolizy i uwalniania wolnych kwasów tłuszczowych (free fatty acids-FFA) do krążenia

wrotnego. FFA napływają do wąroby i uruchamiają mechanizmy insulinooporności [19,20]. Zwiększenie objętości tkanki tłuszczowej trzewnej towarzyszące otyłości brzusznej skutkuje nadprodukcją cytokin i czynników prozapalnych (IL-6, TNF- α , PAI-1) i adipokin np. leptyny, rezystyny, apeliny i innych sprzyjających rozwojowi insulinooporności i cukrzycy. Z drugiej strony dochodzi do zmniejszenia produkcji adipokin np. adiponektyny czy obestatyny chroniących przed insulinoopornością i zapaleniem [21,22].

Innym wskaźnikiem antropometrycznym stosowanym w praktyce do oceny dystrybucji tkanki tłuszczowej jest wskaźnik WHR (waist- to-hip ratio) obliczany jako stosunek obwodu talii do obwodu bioder. Jest to prosty miernik tzw. otyłości centralnej, czyli nadmiernego nagromadzenia tłuszczu w okolicy brzusznej [1,12,17]. Najnowsze rekomendacje International Diabetes Federation dla Europy definiują otyłość brzuszną (nazywaną centralną, trzewną, androidalną, typu jabłko, górnej części ciała) gdy WHR wynosi $\geq 0,80$ u kobiet i $\geq 0,95$ u mężczyzn a otyłość pośladkowo - udową (gynoidalną) gdy WHR $< 0,80$ u kobiet i $< 0,95$ u mężczyzn [12]. Ryzyko pojawienia się schorzeń powiązanych z otyłością zależy nie tylko od jej stopnia ale jest również powiązane z dystrybucją tkanki tłuszczowej. W otyłości typu trzewnego (centralnej) wzrasta przede wszystkim ryzyko rozwoju cukrzycy, nadciśnienia tętniczego i miażdżycy. Otyłość pośladkowo-udowa sprzyja zaś wystąpieniu nowotworów hormonozależnych: macicy, jajnika, sutka oraz przewodu pokarmowego [18,19,23].

Badania epidemiologiczne wskazały, że sam obwód talii wykazuje także istotną korelację z zakresami BMI i na jego podstawie można określić ryzyko powikłań metabolicznych otyłości [1,12].

Tabela 2. Stopnie otyłości w/g obwodu talii (dla Europejczyków) w/g[1,12]

TALIA (CM)	KOBIETY	TALIA (CM)	MĘŻCZYŹNI	STOPIEŃ OTYŁOŚCI
<80		<94		Norma
80-88		94-102		Nadwaga
>89		>102		Otyłość

Ryzyko rozwoju zaburzeń metabolicznych a szczególnie ujawnienia cukrzycy wzrasta proporcjonalnie do obwodu talii- przy prawidłowych wartościach jest niewielkie

natomiast wzrasta 3,5 krotnie przy obwodzie talii >89cm u kobiet i >102 cm u mężczyzn [18]. Gromadzenie tkanki tłuszczowej wewnątrzbrzusnie predysponuje szczególnie do rozwoju nadciśnienia tętniczego a najwyższe wartości zarówno ciśnienia skurczowego jak i rozkurczowego stwierdza się u osób z dużym obwodem pasa [18,19]. W 1998 r. World Health Organization (WHO) ogłosiła otyłość ogólnoswiatową epidemią, która obejmuje dorosłych i dzieci uznając otyłość za jedno z największych zagrożeń dla zdrowia ludzkości. W większości przypadków otyłość wieku rozwojowego staje się, po latach, otyłością ludzi dorosłych, a wraz z przedłużaniem czasu jej trwania dochodzi do rozwoju nadciśnienia, miażdżycy, choroby niedokrwiennej serca [23-26]. W badaniu Pol-MONICA występowanie nadwagi i otyłości w Polsce stwierdzono u ponad 65% kobiet i mężczyzn w średnim wieku, w tym otyłości u 30% kobiet i 20% mężczyzn. Natomiast według danych badania NATPOL III szacuje się, że 53% dorosłych Polaków ma nadwagę lub otyłość (w populacji w wieku powyżej 45 lat – 77%), a średni wskaźnik BMI w populacji polskiej wynosi 25,9 kg/m². Z kolei Badanie Pol MONICA BIS dotyczące ludności Warszawy wykazało występowanie otyłości (BMI \geq 30 kg/m²) u 26% mężczyzn i 24% kobiet. Z kolei w badaniu NATPOL PLUS z 2002 nadwagę i otyłość (BMI \geq 25 kg/m²) stwierdzono u 53% badanych [27,28].

Dotychczasowe badania wykazały, że podłoże rozwoju otyłości jest wieloczynnikowe. Istotny wpływ odgrywają czynniki genetyczne, endokrynologiczne, metaboliczne jak też środowiskowe oraz psychologiczno-behawioralne [18-21, 29]. U osoby dorosłej prawidłowa procentowa zawartość tkanki tłuszczowej wynosi 17-23%. W wyniku zaburzenia równowagi energetycznej ustroju polegającej na większym spożyciu pokarmu w stosunku do wysiłku fizycznego dochodzi do gromadzenia nadmiernej ilości tłuszczu w ustroju. W dobie powszechnego i nieograniczonego dostępu do obfitego pożywienia i zmniejszania się aktywności fizycznej wzrasta liczba osób otyłych na całym świecie [30-32].

Otyłość stanowi główny, wyjściowy czynnik etiologiczny zarówno insulinooporności jak i zaburzeń gospodarki węglowodanowej. W otyłości i powiązanej z nią etiologicznie insulinooporności obserwuje się zarówno zwiększony rozplem komórek β -trzustki jak i zaburzenia ich funkcji polegające na upośledzeniu pierwszej fazy wydzielania insuliny w odpowiedzi na zwiększenie glikemii oraz przedłużeniu i nadmiernym nasileniu drugiej fazy wydzielania insuliny co prowadzi do przedłużonej hiperinsulinemii. Zjawisko to zaobserwować można w OGTT gdzie w tym przypadku

mamy do czynienia z nadmiernie obniżonymi wartościami glikemii po 2 godzinach od obciążenia przy często już podwyższonej glikemii na czczo [20,31].

3.2.2. Starzenie się społeczeństwa

Chorobowość z powodu T2DM wzrasta wraz z wiekiem we wszystkich grupach etnicznych zwłaszcza pomiędzy 40-70 rokiem życia. Wraz z wiekiem wzrasta ilość trzewnej tkanki tłuszczowej, zwiększa się produkcja mediatorów zapalenia nasila się proces zapalny co może doprowadzić do rozwoju insulinooporności oraz cukrzycy typu 2 [23]. W związku z postępującym procesem starzenia się społeczeństw szczególnie w krajach wysokorozwiniętych wynikającym ze zmniejszania przyrostu naturalnego i wydłużania długości życia wzrasta populacja najbardziej zagrożona rozwojem cukrzycy typu 2. Zwiększa się liczba pacjentów z późnymi powikłaniami naczyniowymi, które są główną przyczyną inwalidztwa, pogorszenia jakości życia jak też przedwczesnej umieralności. W Polsce liczba chorych na cukrzycę wzrosła w latach 2001-2011 o 25 %w/g badania NATPOL i obecnie osiąga wartość ok.3 mln osób. Po 60 roku życia co 4 osoba choruje na cukrzycę (głównie typu2) zaś połowę sumy przypadającej na roczny koszt leczenia cukrzycy przypada na leczenie jej powikłań [13, 27-29].

3.2.3. Insulinooporność

Tkanka tłuszczowa oprócz pełnienia funkcji rezerwuaru nadmiaru energii jest także organem odgrywającym bardzo istotną rolę w regulacji i utrzymaniu równowagi metabolicznej organizmu. Jej nadmiar, zwłaszcza w obrębie jamy brzusznej prowadzi do rozwoju chorób metabolicznych. Tkanka tłuszczowa trzewna jest bowiem organem para i endokrynnym wydzielającym do krwioobiegu substancje o działaniu ogólnoustrojowym w tym liczne adipokiny; leptyna , rezystyna , adiponektyna, wisfatyna, apelina czy cytokiny interleukina 6 (IL-6), czynnik martwicy guza- α (TNF- α). Ponadto czynniki wzrostu; insulinopodobny czynnik wzrostu 1 - IGF-1 czy PPAR γ , czynniki związane z procesami krzepnięcia; inhibitor aktywatora plazminogenu-1 (PAI-1), estrogeny a także enzymy odpowiedzialne za metabolizm lipidów jak lipaza lipoproteinowa oraz wolne kwasy tłuszczowe (FFA). Komórki tkanki tłuszczowej (adipocyty) poprzez receptor jądrowy i czynnik transkrypcyjny PPAR γ wpływają

poprzez autoregulację na masę tkanki tłuszczowej oraz regulację magazynowania tłuszczów i węglowodanów [1,21-22, 32]. Zwiększenie masy ciała prowadzi przede wszystkim do wzrostu insulinooporności i w jej konsekwencji także hiperinsulinemii ale również do aktywacji układu immunologicznego i przewlekłego stanu zapalnego. Przewlekły stan zapalny z kolei wydaje się być ogniwem łączącym otyłość z insulinoopornością i cukrzycą typu 2 (T2DM) [34,35].

Insulinooporność jako konsekwencja otyłości to spowodowana brakiem wrażliwości tkanek docelowych na działanie insuliny oraz niezdolność organizmu do adekwatnej odpowiedzi na ten hormon. Wyraża się ona zwiększeniem wątrobowej produkcji glukozy, zahamowaniem syntezy glikogenu i wychwytu glukozy przez tkanki docelowe oraz zwiększeniem lipolitycznej aktywności tkanki tłuszczowej prowadzącej do zwiększonego uwalniania wolnych kwasów tłuszczowych (FFA). FFA z kolei hamują antylipolityczne działanie insuliny. Spadek wrażliwości na insulinę stwierdza się u osób predysponowanych, np. Indian Pima, nawet na 10 lat przed ujawnieniem cukrzycy. Jest to za razem najsilniejszy predyktor wystąpienia T2DM [13]. Obniżenie wrażliwości na insulinę jest często kompensowane przez wzrost sekrecji insuliny co prowadzi do hiperinsulinemii i zwiększenia ryzyka przedwczesnej miażdżycy a także cukrzycy. Zwiększona sekrecja insuliny prowadzi bowiem do wyczerpania się rezerwy wydzielniczej komórek β i w dalszym etapie do niedoboru insuliny. Konsekwencją kaskady zdarzeń jest pełnoobjawowa cukrzyca. Dodatkowo hiperinsulinemia zwiększa insulinooporność poprzez deregulację aktywności receptora insulinowego w tkankach docelowych takich jak mięśnie czy wątroba [13]. Dotychczasowe badania wykazały, że insulinooporność jest mechanizmem uruchamiającym kaskadę zaburzeń metabolicznych łączących otyłość i cukrzycę. Zależności pomiędzy endo i parakrynną aktywnością adipocytów, insulinoopornością i przewlekłym stanem zapalnym prowadzą w konsekwencji do rozwoju T2DM. Najnowsze badania wskazują, że także nadmierna aktywacja wrodzonego układu odpornościowego może być także uznana jako czynnik ryzyka rozwoju T2DM [31-34].

3.2.4. Palenie tytoniu

Nikotyna odgrywa niekorzystną rolę w patogenezie T2DM i insulinooporności poprzez hamowanie sekrecji insuliny przez komórki β trzustki, aktywację i podtrzymanie wysokiej aktywności układu współczulnego oraz redukcję liczby

receptorów insulinowych i transporterów białkowych glukozy. U większości palących papierosy stwierdza się także nadmiar tkanki tłuszczowej trzewnej co także sprzyja rozwojowi insulinooporności. W dużych badaniach obserwacyjnych stwierdzono 2-krotny wzrost ryzyka rozwoju T2DM u palących >20 papierosów dziennie [36- 37].

3.2.5. Niska masa ciała noworodka a otyłość

Badania ostatnich lat dowodzą, że na rozwój otyłości bardzo istotny wpływ wywiera już okres życia płodowego oraz niemowlęcego i wczesnego dzieciństwa. Szczególne znaczenie przypisuje się zbyt niskiej urodzeniowej masie ciała, gdyż niedożywienie w życiu płodowym może wywierać wpływ na zaburzenia metaboliczne oraz powikłania narządowe [38]. Wykazano że urodzeniowa masa ciała jest odwrotnie proporcjonalna do insulinooporności, ryzyka T2DM, nadciśnienia tętniczego, choroby niedokrwiennej serca i udaru mózgu. Wynika to z tego iż noworodki z niską masą ciała wykazują skłonność do nadmiernego gromadzenia tłuszczu zwłaszcza trzewnego i do rozwijania otyłości brzusznej (centralnej) w życiu dorosłym. Najważniejszy okazał się przy tym zbyt duży przyrost masy ciała dziecka w pierwszym roku życia gdyż jest najbardziej powiązany z rozwojem chorób metabolicznych w przyszłości [38-40].

3.2.6. Czynniki genetyczne

Występowanie otyłości jest często przypisywane całym rodzinom, co stało się przyczyną do szukania rozwiązań tego problemu w predyspozycjach genetycznych [30, 41-43]. Nie jest to potwierdzone prostym modelem dziedziczenia, sugeruje natomiast istnienie wielu genów wpływających na powstawanie otyłości oraz występowanie interakcji pomiędzy nimi. Badania nad genetyką otyłości ujawniły istnienie tak zwanego genu otyłości FTO (fat mass and obesity associated). Osoby, które posiadają ten gen są w większym stopniu podatne na gromadzenie tkanki tłuszczowej. W badanej grupie, gdzie gen otyłości występował u 16% zauważono około 3kg. wyższą masę ciała, niż u osób nie wykazujących obecności genu FTO [41]. Czynniki genetyczne odpowiadają za trzy rodzaje otyłości: uwarunkowaną jednogennowo, otyłość będącą elementem zespołu oraz otyłość powszechnie występującą. Dotychczas rozpoznano rzadkie zespoły genetyczne towarzyszące otyłości, które są wynikiem wrodzonych

zaburzeń w rozwoju tkanki tłuszczowej i innych narządów np.: zespół Cohena, zespół Pradera – Williiego, zespół Alstroma, zespół Bardet-Biedl, zespół Borjeson-Forssman-Lehman. Wykazano także typy otyłości zależne od mutacji pojedynczego genu [41-43].

- LEP – mutacja genu leptyny, hormonu zmniejszającego łaknienie.
- LEPR – mutacja genu receptora leptyny, wywołująca niewrażliwość na ten hormon
- POMC – mutacja genu proopiomelanokortyny, inicjująca wczesne stadia otyłości
- mutacja genu PPAR – związana z wyraźną otyłością. Odgrywa znaczącą rolę w metabolizmie lipidów, równowadze energetycznej oraz wrażliwości na insulinę.

Do tej pory nie zadeklarowano głównego genu czy mutacji bezpośrednio powiązanej z rozwojem otyłości. Pojedyncze mutacje zlokalizowane u osób zmarłych z powodu otyłości nie wyjaśniają epidemiologicznych skutków tej choroby. Niemożliwe staje się aby uwarunkowania genetyczne były w tak krótkim czasie przyczyną wzrostu zachorowalności na otyłość, gdyż przypuszcza się, że genom ludzki nie uległ w istotny sposób zmianie od ponad 35000 lat [43]. Intersującego odkrycia dokonali nasi polscy badacze Łuczynski i wsp. Autorzy ocenili częstość występowania czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego, jak również wariantu genu FTO w dużej grupie dzieci z cukrzycą typu 1. Autorzy wykazali, że dziewczynki z wyższym BMI, gorszym wyrównaniem metabolicznym oraz długim czasem trwania cukrzycy są grupą bardziej narażoną na rozwój chorób sercowo-naczyniowych. W modelu wieloczynnikowej regresji wykazano, że kliniczne a nie genetyczne czynniki mają większy wpływ na rozwój nadwagi i otyłości u dzieci leczonych insuliną [44].

3.2.7. Zmniejszenie aktywności fizycznej

Mała aktywność fizyczna przyczynia się do ujawnienia T2DM poprzez zwiększone gromadzenie tkanki tłuszczowej oraz przez hamowanie utleniania glukozy. Dzieje się tak z powodu przemieszczenia transporterów glukozy GLUT-4 z wnętrza komórek do okolicy podbłonowej przez co zmniejsza się komórkowy wychwyt glukozy przez mięśnie szkieletowe [23]. Wiele badań potwierdziło ochronny wpływ wysiłku fizycznego (ćwiczeń) na ryzyko rozwoju cukrzycy, szczególnie u osób otyłych.

Wykazano, że wysiłek fizyczny zmniejsza ryzyko cukrzycy od 17 do 76 % w zależności od stopnia aktywności, płci i stopnia otyłości nawet jeśli nie powoduje spadku masy ciała gdyż zmniejsza insulinooporność poprzez zwiększenie wrażliwości na insulinę i poprawia tolerancję glukozy. Systematyczna (min. 3x w tygodniu 30 minut) aktywność fizyczna powodują nie tylko zmniejszenie ilości tkanki tłuszczowej ale i wielkości adipocytów. Wpływa na przyrost tkanki mięśniowej i zwiększenie jej wrażliwości na insulinę. Poprzez zmniejszenie insulinooporności zwiększa się też podstawowa przemiana materii i termogeneza spoczynkowa oraz obniża się ciśnienie tętnicze [20, 23, 45].

3.2.8. Dieta wysokokaloryczna

Z powodu nieograniczonego dostępu do wysokoprzetworzonej i wysokokalorycznej żywności zwłaszcza w krajach rozwiniętych a także mody na „zachodni styl życia” w krajach rozwijających się obserwujemy dramatyczny wzrost otyłości wśród dorosłych jak i w coraz większym stopniu młodzieży i dzieci. Dieta prowadząca do otyłości i towarzyszących jej schorzeń, a zwłaszcza T2DM jest przede wszystkim zbyt wysoko kaloryczna, zawiera zbyt dużą ilość tłuszczu (zwłaszcza nasyconych) oraz zbyt dużą ilość cukrów prostych a także węglowodanów o wysokim indeksie glikemicznym takich jak słodzone płyny, białe pieczywo, ziemniaki. Zazwyczaj w diecie wysokokalorycznej brakuje produktów zbożowych bogatych w błonnik, warzyw i owoców oraz ryb. W badaniu DPP (Diabetes Prevention Program) dotyczącym osób z nadwagą i nietolerancją glukozy skuteczność leczenia behawioralnego (dieta: 400 kcal dziennie mniej i wysiłek 150 min ćwiczeń tygodniowo) okazała się znacznie skuteczniejsza od leczenia metforminą i badanie przerwano rok przed terminem [45-46].

4. Przewlekłe powikłania naczyniowe

4.1. Patogeneza powikłań mikronaczyniowych w przebiegu cukrzycy

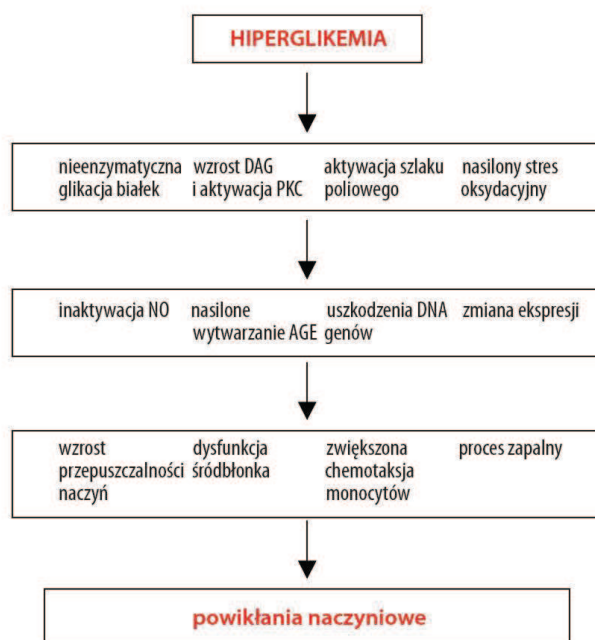
Globalny wzrost zachorowalności na cukrzycę ma znaczący wpływ na częstość występowania przewlekłych powikłań naczyniowych związanych z mikro- i makrokrażeniem [13-14, 45-48]. W przebiegu mikroangiopatii cukrzycowej najważniejsze klinicznie zmiany zachodzą w obrębie naczyń siatkówki, nerek, oraz układu nerwowego [14,48]. Natomiast makroangiopatia cukrzycowa dotyczy choroby niedokrwiennej serca, udarów mózgu oraz miażdżycy zarostowej tętnic kończyn dolnych. Zmiany zachodzą w średnich i dużych naczyniach tętniczych [19, 21, 23]. Obejmują zarówno błonę wewnętrzną jak i środkową naczyń. W porównaniu z osobami niechorującymi na cukrzycę zmiany naczyniowe w cukrzycy są bardziej uogólnione i w mniejszym stopniu podatne na leczenie. Przewlekłe powikłania u pacjentów chorujących na T2DM prowadzą do istotnego pogorszenia jakości życia chorych jak też do skrócenia czasu ich przeżycia średnio o ok. 10 lat [14,15,47].

4.1. Klasyczne czynniki ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań naczyniowych

4.1.1. Hiperglikemia

Do uznanych – „klasycznych” czynników ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań naczyniowych należy nadciśnienie tętnicze, hipercholesterolemia, czas trwania cukrzycy jak też stopień wyrównania metabolicznego [16]. Hiperglikemia jest głównym zaburzeniem metabolicznym w cukrzycy. Z większości doniesień wynika, że działanie uszkodzające w obrębie komórek odbywa się przez aktywację kilku szlaków metabolicznych w tym nieenzymatyczną glikację białek, nasilenie przemiany glukozy w cyklu polioliowym, zwiększenie powstawania diacylogliceroli oraz wzrost aktywności kinazy białkowej C [49-50]. Wymienione mechanizmy powodują nasilenie stresu oksydacyjnego poprzez nadprodukcję anionu nadtlenkowego przez mitochondria metabolizujące nadmiar glukozy. Glikacja-uważana za główny patomechanizm rozwoju powikłań cukrzycy- to nieenzymatyczny proces, który zachodzi w stanie przedłużającej się hiperglikemii. Prowadzi do kowalentnego wiązania form glukozy do białek krwi,

kolagenu, białek błony podstawnej, i wielu innych cząsteczek, m.in. kwasów nukleinowych i lipidów. W procesie powstają nierozpuszczalne, powiązane krzyżowo białkowe polimery nazywane końcowymi produktami zaawansowanej glikacji białek (*Advanced Glycation End products* (AGEs) [49-50]. AGEs zmieniają strukturę białek i mają zdolność oddziaływania poprzez specyficzne receptory błonowe tzw. receptor dla końcowych produktów zaawansowanej glikacji białek *Receptor for Advanced Glycation end Products* (sRAGE) makrofagów. Wiązanie z sRAGE prowadzi do nasilenia stresu oksydacyjnego, zaburza przekazywanie sygnałów międzykomórkowych, ekspresję genów, nasila uwalnianie cytokin prozapalnych np. interleukinę 6 (IL6) czynników wzrostu, molekuł adhezyjnych jak też wolnych rodników tlenowych. W konsekwencji zjawiska te prowadzą do rozwoju przewlekłych powikłań naczyniowych w tym retinopatii, nefropatii, neuropatii czy kardiomiopatii cukrzycowej [48-49]. U dotychczasowych badaniach wykazano, że u pacjentów z T2DM osoczowe stężenie AGEs jest o 34% wyższe niż w zdrowej grupie kontrolnej [50]. W progresji retinopatii cukrzycowej AGEs prowadzą do dysfunkcji i obumierania komórek siatkówki. Co więcej w wyniku wiązania AGEs z RAGE doprowadzają do uszkodzenia i rozłączania podocytów w nerkach pacjentów chorujących na cukrzycę. Z kolei w rozwoju neuropatii cukrzycowej AGEs przyczyniają się do uszkodzenia neuronów czuciowych oraz mikronaczyń odżywiających nerwy obwodowe [47-49]. Nasilenie przemian glukozy w cyklu polioliowym prowadzi do gromadzenia się sorbitolu, który słabo przechodząc przez błony komórkowe, prowadzi do obrzęku i uszkodzenia komórek. W szczególnie nasilony sposób zjawisko to zachodzi w siatkówce, soczewce, kłębuszkach nerkowych oraz nerwach obwodowych [49]. Kolejnym szlakiem metabolicznym u pacjentów chorujących na cukrzycę jest zwiększone powstawanie diacyloglicerolu (DAG) i wzrost aktywności kinazy białkowej C (PKC). Proces ten zachodzi w komórkach o małej ekspresji reduktazy aldozowej w którym hiperglikemia wywołuje nasilone wytwarzanie diacyloglicerolu [49,50]. W badaniach doświadczalnych wykazano, że diacyloglicerol zwiększa aktywność kinazy białkowej C, która powoduje zaburzenie funkcjonowania i struktury komórek np. nasila rozplam komórek śródbłonna naczyń co prowadzi do ich zamykania. Również nasilenie stresu oksydacyjnego wynikające ze zwiększonego powstawania wolnych rodników w procesie autooksydacji glukozy powoduje oksydację lipidów, AGE, szlaku przemian kinazy białkowej C [48, 50-52]. Rolę hiperglikemii w rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy przedstawia zaproponowana przez Mrowicką Rycina 1 [53].



Ryc. 1. Rola hiperglikemii w tworzeniu stresu oksydacyjnego i powikłań cukrzycy wg. [53].

4.1.2. Czas trwania cukrzycy a rozwój późnych powikłań naczyniowych

Liczne badania wskazują, że czynnikiem determinującym rozwój powikłań naczyniowych jest czas trwania cukrzycy [15, 53-57]. Makulopatia cukrzycowa jest główną przyczyną utraty wzroku u chorych z cukrzycą i jej częstość także wzrasta z czasem trwania choroby: u 2-3% chorych po 5 latach, 13% po 15 latach, 59% po 30 latach (w T2DM leczonej insuliną) [55,56]. Czas trwania cukrzycy wpływa także na ryzyko rozwoju mikroalbuminurii zarówno w T1DM (ze szczytem w 2giej dekadzie trwania cukrzycy) jak i w T2DM, niezależnie od wieku w jakim doszło do rozwoju cukrzycy [48]. U chorych na T2DM i T1DM skumulowane ryzyko przewlekłej niewydolności nerek wynosi 8% po 25 latach, i 15% po 35 latach trwania choroby [56,57] Także makroangiopatia a wśród nich choroba wieńcowa mają związek z czasem trwania cukrzycy. U osób rasy białej po 20-40 latach cukrzycy jest wysoka chorobowość objawowej i bezobjawowej choroby wieńcowej. Skumulowane ryzyko CAD u chorych na T1DM rozpoznanej w młodym wieku wynosi 50% w wieku 55 lat jest podobne u mężczyzn i u kobiet [57,60]. Jednakże należy mieć na uwadze, że to nie

sam czas choroby *per se* wpływa na ryzyko rozwoju przewlekłych powikłań naczyniowych, ale czynniki metaboliczne oraz cytokiny, czynniki wzrostu, które w czasie trwania choroby inicjują stan zapalny i determinują rozwój mikro i makroangiopatii cukrzycowej.

4.1.3. Nadciśnienie tętnicze

Nadciśnienie tętnicze w/g definicji ESH/ESC (Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego i Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego) zawartej w wytycznych dotyczących postępowania w nadciśnieniu tętniczym w 2013 roku określone jest jako ciśnienie skurczowe (systolic blood pressure-SBP) ≥ 140 mmHg i/ lub rozkurczowe (diastolic blood pressure - DBP) ≥ 90 mmHg [60]. Polskie Towarzystwo Diabetologiczne zaleca jako docelowe wartości ciśnienia tętniczego u chorych z cukrzycą poniżej 140/90 mmHg a w przypadku towarzyszącej nefropatii poniżej 130/80 mmHg nie mniej jednak niż 120/70 mmHg [16,]. Etiopatogeneza nadciśnienia tętniczego różni się w poszczególnych postaciach cukrzycy. W cukrzycy typu 1 (T1DM) nadciśnienie tętnicze wiąże się ściśle z nefropatią oraz retinopatią cukrzycową oraz z dodatnim wywiadem rodzinnym [64]. W cukrzycy typu 2 (T2DM) nadciśnienie tętnicze często wyprzedza rozwój cukrzycy i jest związane z rozwijającą się chorobą niedokrwienną serca lub może też stanowić element zespołu metabolicznego [61-62]. Nadciśnienie tętnicze występuje 3x częściej u chorych na T2DM w momencie rozpoznania niż w populacji ogólnej [60,61]. Cechy nadciśnienia tętniczego w cukrzycy skojarzonej z otyłością stanowiące czynniki ryzyka choroby niedokrwiennej serca to:

- skłonność do zwiększonej retencji sodu
- zwiększona objętość krwi krążącej
- skłonność do białkomoczu
- brak nocnych spadków ciśnienia
- izolowane nadciśnienie skurczowe
- niedociśnienie ortostatyczne

Badanie UKPDS wykazało, że ścisła kontrola RR istotnie redukuje ryzyko makroangiopatii u chorych na T2DM. Każde obniżenie wartości RR skurczowego o 10 mm Hg wiązało się m.in. ze zmniejszeniem ryzyka wystąpienia powikłań

cukrzycowych o 12% oraz z redukcją mikroangiopatii o 13% [66]. Nadciśnienie tętnicze jest czynnikiem ryzyka rozwoju i progresji retinopatii udokumentowanym w wielu badaniach; m.in. UKPDS i ABCD (Appropriate Blood Pressure Control in Diabetes) które udowodniły zmniejszenie ryzyka retinopatii u pacjentów z intensywną kontrolą RR [66]. Badanie WESDR (Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy) wykazało, iż podwyższone skurczowe ciśnienie tętnicze sprzyja rozwojowi retinopatii nieproliferacyjnej natomiast rozkurczowe progresji do retinopatii proliferacyjnej [63-65]. W badaniach polskich częstość retinopatii u pacjentów T2DM istotnie wiązała się z nadciśnieniem tętniczym a w grupie chorych z makulopatią odsetek ten wynosił 96%. Jedynym czynnikiem rozwoju i progresji makulopatii cukrzycowej okazało się w tym badaniu długotrwałe nadciśnienie tętnicze, które zwiększało ryzyko makulopatii >6x, a wystąpienie retinopatii >7x [64]. Podwyższone ciśnienie skurczowe koreluje także z wystąpieniem nefropatii cukrzycowej a intensywne leczenie nadciśnienia tętniczego może zwolnić progresję przewlekłej choroby nerek [65]. W badaniu EURODIAB PCS (EURODIAB Prospective Study) nadciśnienie tętnicze przyczynia się także do rozwoju neuropatii cukrzycowej [67].

4.1.4. Zaburzenia gospodarki lipidowej

Hiperglikemia powoduje wzrost glikacji krążących lipoprotein ponadto upośledza metabolizm lipoprotein przez aktywację kinazy białkowej C. Dotychczasowe badania wykazały, że zaburzenia lipidowe i nieprawidłowości lipoprotein występują częściej w T2DM niż w T1DM i są wynikiem zwiększenia stężenia lipoprotein bogatych w TG (zwłaszcza VLDL-very low density lipoprotein) oraz zmniejszenie stężenia lipoprotein o dużej gęstości-HDL (high density lipoprotein). Przyczyniają się one do rozwoju zmian miażdżycowych u chorych na cukrzycę [68-69], Lipoproteiny o małej gęstości LDL u chorych na cukrzycę mają zmieniony skład, są mniejsze, gęstsze, wzbogacone w TG i bardziej aterogenne, bo bardziej podatne na glikację i oksydację. Mają zwiększoną zdolność do uszkodzenia śródbłonna, łatwiejsze przechodzenie do przestrzeni podśródbłonkowej i upośledzenia wiązania z natywnym receptorem LDL [68-70]. W dotychczasowych badaniach wykazano, że u chorych na cukrzycę obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego i frakcji LDL wiąże się z korzystnym efektem redukcji głównych epizodów wieńcowych, umieralności na choroby układu krążenia i śmiertelności ogólnej (HPS – obniżenie głównych incydentów wieńcowych o 25% u

pacjentów z cukrzycą leczonych simvastatyną niezależnie od wyjściowego stężenia LDL) [70]. Ponadto, dyslipidemia odgrywa istotną rolę w rozwoju cukrzycowej choroby nerek. Wielośrodkowe badania epidemiologiczne wskazują na występowanie zaburzeń lipidowych u pacjentów z nefropatią cukrzycową. Zaburzenia lipidowe związane z nefropatią cukrzycową obejmują zwiększony poziom VLDL, lipoprotein o pośredniej gęstości oraz obniżony poziom cholesterolu frakcji HDL. Wykazano, że obniżony poziom HDL jest związany z większym ryzykiem nefropatii cukrzycowej [69-70]. Lipidy mogą inicjować uszkodzenie nerek przez stymulację TGF-beta a za jego przyczyną do powstawania reaktywnych form tlenu prowadzących do uszkodzenia kłębuszków i ich glikokaliksu. Szczególną rolę w tym procesie zdają się odgrywać TGRLs (triglyceride-rich proteins). Ponadto w długotrwałej cukrzycy wykazano odkładanie lipidów i lipoprotein w siatkówce narządu wzroku, głównie w plamce i tworzenie „twardych wysięków”. Pojawiają się one w dnie oka w postaci kropek, plamek lub płytek. Odkładanie się „twardych wysięków” w plamce stanowi główny element procesu tworzenia się makulopatii cukrzycowej [72,73].

Interesujące badania przeprowadziła Golubovic-Arsovska M. Autorka przebadła 38 pacjentów z cukrzycą typu 2, którzy mieli zmiany dna oka o charakterze retinopatii, jak również zmiany w obszarze plamki żółtej, objawiające się obrzękiem siatkówki i obecnością twardych wysięków. Grupa kontrolna składała się z chorych na cukrzycę typu 2 bez zmian związanych z makulopatią cukrzycową. W badanej grupie u pacjentów z cukrzycą oraz zwyrodnieniem plamki cukrzycowej stwierdzono istotnie wyższe wartości cholesterolu całkowitego oraz triglicerydów w porównaniu do grupy kontrolnej. Jakkolwiek wartości cholesterolu frakcji HDL oraz LDL w osoczu były wyższe w grupie badanej niż w grupie kontrolnej pierwszej. Autorka wykazała, że hiperlipidemia jest czynnikiem ryzyka dla rozwoju twardych wysięków w makulopatii cukrzycowej u pacjentów z T2DM [72].

Z kolei w badaniach Popescu T i współ., autorzy przebadali 100 pacjentów z cukrzycą typu 2, bez klinicznych objawów makroangiopatii lecz z wykrytą retinopatią cukrzycową u 59,5% mężczyzn i 40,5% kobiet. Pacjenci, którzy wykazali retinopatię cukrzycową mieli znacznie wyższe wartości cholesterolu całkowitego cholesterolu frakcji LDL natomiast niższe wartości cholesterolu HDL w porównaniu z pacjentami z T2DM lecz bez retinopatii. Jakkolwiek wartości triglicerydów były wyższe w grupie z retinopatią niż w grupie kontrolnej autorzy nie stwierdzili różnic znamiennej statystycznie. Ponadto wykazali istotną statystycznie korelację między retinopatią i dyslipidemią. Sugerowano, że stosowanie terapii

obniżającej poziom lipidów w cukrzycy typu 2 jest korzystny u pacjentów ze zmianami siatkówki w celu zapobieżenia utraty wzroku [73].

4.1.5. Predyspozycje genetyczne do rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy

Udział predyspozycji genetycznych w rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy znajduje odzwierciedlenie w wynikach wielu badań epidemiologicznych i genetycznych. Stwierdzono m.in. rodzinne nasilenie występowania retinopatii i jej niepomysłnego przebiegu u rodzeństwa chorych na T1DM. Częstsze występowanie u krewnych (zwł. nefropatii, retinopatii i CAD) wykazało badanie DCCT [73-75]. Także badanie przeprowadzone w Indiach pokazało rodzinne występowanie retinopatii niezależnie od hiperglikemii u rodzeństwa chorych na T2DM [76]. Dowody na rodzinne występowanie nefropatii są jeszcze silniejsze. Krewni chorych z nefropatią charakteryzują się większym ryzykiem wystąpienia tego powikłania zarówno w T1DM jak i T2DM. W badaniach przeprowadzonych wśród chorych na T2DM i z nefropatią cukrzycową istotnie większa ilość chorych miała krewnych z przewlekłą niedomogą nerek w porównaniu z chorymi z T2DM bez nefropatii cukrzycowej [77-81]. Jak wynika z przeprowadzonych w Turcji, u Indian Pima, Afroamerykanów ale także Brazylii, Włoszech i Finlandii badań epidemiologicznych i rodzinnych gen odpowiedzialny za zwiększone ryzyko rozwoju nefropatii u chorych na T2DM jest zlokalizowany na chromosomie 18. Również homozygoty genu karnozynazy częściej występują u chorych bez nefropatii niż u chorych na nefropatię. Na podstawie dotychczasowych badań wyłoniono geny zwiększające ryzyko nefropatii cukrzycowej. Są to m.in. gen HLA-A2, gen regionu insuliny (VNTP-region 50), allele genów MODY 1 i 3 oraz 5, gen układu RAA, gen enzymu konwertującego- polimorfizm D, gen wrażliwości na insulinę, gen ANP, gen karnozynazy, allel Ala12 genu PPAR gamma, polimorfizm genu śródbłonkowej syntazy NO i wiele innych [77]. Z drugiej strony jednak wyniki prowadzonych badań nad predyspozycją genetyczną do rozwoju zarówno nefropatii jak i retinopatii cukrzycowej są niejednoznaczne. Na większość opublikowanych badań składa się zbyt mała liczba pacjentów, a ich wyniki opierają się na niewystarczająco wystandaryzowanych kryteriach. Ponadto wiele genów kandydatów do rozwoju retinopatii cukrzycowej jest jednocześnie zaangażowanych

w prawidłowe funkcjonowanie i regulację mikrokrążenia siatkówkowego [78]. Nie mniej jednak sugeruje się genetyczną predyspozycję do rozwoju retinopatii cukrzycowej wiąże się z obecnością antygenów HLA DR3/DR4. Ponadto wykazano wpływ istnienia różnych form allelicznych danego genu kodującego cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu na jego funkcjonalne właściwości na poziomie transkrypcji, jak też związek z retinopatią cukrzycową u pacjentów chorujących na T1DM oraz T2DM. Z punktu widzenia diabetologa oraz okulisty wysoce istotne stało się odkrycie istnienia miejsc polimorficznych w genach kodujących cytokiny VEGF, TGFβ, genu reduktazy aldozowej, paraoxonase (PON1) jak też genu syntazy tlenu azotu [78-82]. Autorzy Ray i wsp. przebadali 267 pacjentów z T1DM oraz T2DM w tym 69 pacjentów z retinopatią proliferacyjną i wykryli że allel C genu VEGF w pozycji -460 częściej występuje w grupie osób chorych na retinopatię niż nefropatię cukrzycową [82].

4.1.6. Palenie tytoniu a rozwój powikłań naczyniowych cukrzycy

Palenie tytoniu jest jednym z klasycznych czynników ryzyka rozwoju angiopatii cukrzycowej, który może być potencjalnie modyfikowany [83-89]. Jednak zaprzestanie palenia stanowi nadal poważne wyzwanie kliniczne. Jest to tym bardziej istotne, ponieważ istnieją dowody na zwiększenie ryzyka powikłań naczyniowych u palących pacjentów z cukrzycą. Ryzyko makroangiopatii czyli chorób sercowo-naczyniowych, zwiększa się 5-krotnie u palących chorych z T1DM [83]. Badanie EDIC przeprowadzone 8 lat po DCCT wykazało, że palenie było jednym z głównych czynników progresji miażdżycy tętnic wyrażonej stopniem pogrubienia kompleksu intima-media. Prawdopodobnie ma to związek z gorszą kontrolą metaboliczną (wyrażoną poziomem HbA1c) i gorszym profilem lipidowym u palących chorych z cukrzycą co wykazały badania DCCT i EURODIAB [66, 83-85]. Nie można też nie uwzględnić wpływu jaki wywiera sama nikotyna i pozostałe substancje dymu tytoniowego na zwiększenie stresu oksydacyjnego poprzez zwiększenie powstawania wolnych rodników i aktywację kinazy C a w konsekwencji dysfunkcji śródbłonna [15, 83]. W badaniach prospektywnych wykazano, że palenie tytoniu jest niezależnym czynnikiem ryzyka rozwoju nefropatii cukrzycowej (ujemny wpływ palenia na budowę i czynność kłębuszka nerkowego i że albuminuria występuje znamienne częściej u osób aktualnie palących i palących w przeszłości w porównaniu z osobami niepalącymi

w ogóle [86,87]. Również progresja mikroalbuminurii do jawnego białkomoczu oraz do terminalnej niewydolności nerek jest szybsza u palących [88]. Natomiast czy palenie tytoniu wpływa na ryzyko rozwoju retinopatii u pacjentów z cukrzycą? Wyniki dotychczasowych badań są niejednoznaczne. Pojawiały się bowiem doniesienia o protekcyjnym wpływie palenia na zmiany w naczyniach siatkówki. W badaniu UKPDS występowanie i progresja retinopatii były częstsze u niepalących chorych [66]. Z kolei w badaniu EURODIAB Complications study aktualni i dawni palacze narażeni byli na zwiększone ryzyko wystąpienia i progresji neuropatii cukrzycowej [67]. W ostatnich swoich badaniach Uruska i wsp. z poznańskiego ośrodka wykazali zależność pomiędzy paleniem papierosów a mikroangiopatią - szczególnie retino i neuropatią niezależnie od poziomu wyrównania metabolicznego u pacjentów z cukrzycą [89].

4.2.Czynniki stanu zapalnego

W dotychczasowych badaniach wykazano także związek przewlekłych powikłań cukrzycy typu 2 z czynnikami zapalnymi takimi jak białko C-reaktywne (CRP), fibrynogenu interleukina 6, czynnik martwicy nowotworów typu alfa a także adipocytokinami i innymi mediatorami stanu zapalnego [90-122].

Charakterystyka wybranych czynników zapalnych

4.2.1. Białko C-reaktywne (CRP)

Szczególą pozycję wśród białek ostrej fazy zajmuje białko C-reaktywne (CRP, *C-reactive protein*), które jest czułym i powtarzalnym markerem stanu zapalnego [90,91,93-97]. Syntetyzowane jest głównie w wątrobie w odpowiedzi na działanie cytokin prozapalnych, interleukiny-1 β (IL-1 β , *interleukin-1 β*), czynnika martwicy guza TNF α (*tumour necrosis factor*) oraz interleukiny-6 (IL-6, *interleukin-6*) [93,32]. Stężenie CRP w przebiegu zapalenia lub procesu martwiczego szybko wzrasta, co pozwala na wykorzystanie białka jako markera procesów zapalnych. Krótki okres półtrwania CRP, wynoszący średnio 6 godzin, sprawia, że stężenie zależy głównie od jego syntezy i szybko maleje po ustaniu czynnika sprawczego. Nieznacznie podwyższone wartości CRP, oznaczane bardzo czułą metodą (hs CRP, *high-sensitivity*

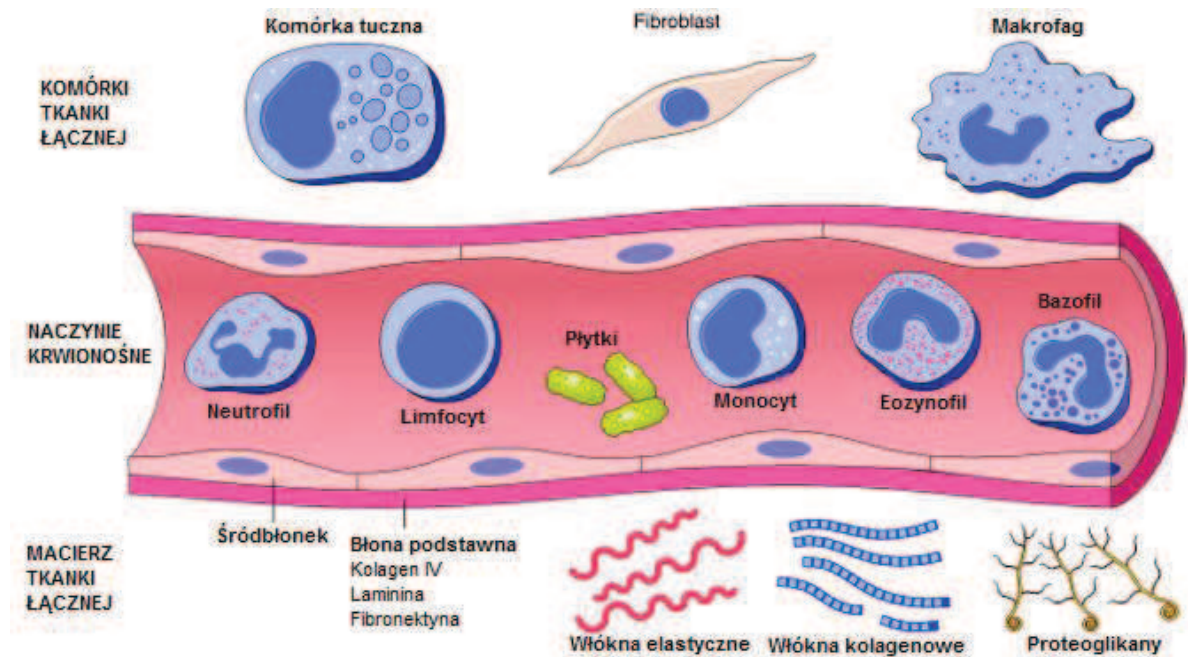
CRP), wskazują na toczący się w ścianie naczyniowej proces zapalny. Hs-CRP jest głównym markerem zapalnym powiązany z aterosclerozą o powszechnej dostępności, miarodajnej standaryzacji i precyzji. Stopień ryzyka CAD: niski, średni i wysoki koreluje odpowiednio z wartościami <1.0 od 1.0 do 3 i >3 mg/L- co zaobserwowano w wielu badaniach populacyjnych, także prospektywnych. Stężenie białka CRP>3 mg/l zostało także określone jako niezależny czynnik ryzyka rozwoju nefropatii i retinopatii cukrzycowej [92-95]. Autorzy Del Cañizo Gómez i wsp. na początku badań prospektywnych w 2004 roku przebadali 376 pacjentów z cukrzycą typu 2 bez powikłań cukrzycowych i w końcowym etapie w 2007 r. wykryli u dziewięćdziesięciu pięciu osób (25,2%) mikroangiopatię cukrzycową. W analizie regresji logistycznej wykazali, że stężenie białka hs-CRP> 3 mg/l oraz obecność nadciśnienia były głównymi niezależnymi czynnikami ryzyka rozwoju mikroangiopatii u chorych na cukrzycę typu 2 [95]. W świetle ostatnich badań *European Study on Cardiovascular Risk Prevention and Management in Usual Daily Practice (EURIKA study, 2014 ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00882336)* wykazano, że białko C-reaktywne aktywnie uczestniczy w miażdżycy. Badania przeprowadzono w celu wykrycia czynników ryzyka rozwoju choroby niedokrwiennej serca w 12 krajach europejskich wśród 7565 osób obciążonych co najmniej jednym czynnikiem ryzyka choroby sercowo-naczyniowej (w tym z nadciśnieniem 5496 osób, otyłych 3288 z dyslipidemią 4372 z cukrzycą 2027 osób). Wyniki badań wykazały, że poziom CRP był dodatnio skorelowany z indeksem masy ciała jak też z poziomem hemoglobiny glikowanej natomiast negatywnie związany z wysokim stężeniem cholesterolu HDL [96]. Interesujące wyniki badań przedstawił także Firdous S [97]. Autor wykrył podwyższony poziom białka C-reaktywnego i jego związek z triglicerydami u osób otyłych bez wykrytej cukrzycy. Autor sugeruje że wzrost poziomu CRP może być w przyszłości stosowany jako marker do przewidywania ryzyka rozwoju cukrzycy. Ponadto autor zaproponował, że w przypadku braku dyslipidemii wyższy surowiczy poziom CRP może być nadal uważany za silny prognostyczny wskaźnik CAD oraz udaru [97].

4.2.2. Fibronektyna

Macierz pozakomórkowa nie jest obecnie postrzegana tylko jako statyczne rusztowanie utrzymujące właściwą strukturę tkanki oraz miejsce zakotwiczenia dla

dojrzewających komórek. Najnowsze badania wskazują, iż jest to struktura dynamiczna. Jej elastyczne składniki ulegają ciągłemu przemieszczaniu i odkształceniom. Fibrylarne i mikrofibrylarne składniki macierzy oddziałują wzajemnie ze sobą, z jednej strony utrzymując mocną, elastyczną i zwartą strukturę tkanki, z drugiej strony kontrolując funkcjonowanie komórek poprzez regulację oddziaływań komórka-macierz, modulację zewnątrzkomórkowych sygnałów oraz zapewnienie miejsc magazynowania czynników wzrostu i cytokin. Jednym ze składników macierzy jest fibronektyna [98,99]. Pierwsze informacje o fibronektynie (FN), pojawiły się w 1948 [98]. Określana była jako duże osoczowe białko nierozpuszczalne w niskich temperaturach, antygen powierzchniowy fibroblastów, białko niewrażliwe na transformację [99]. W połowie lat siedemdziesiątych XXw, zaproponowano nazwę fibronektyna (FN) [99]. W wyniku prac badawczych oraz zastosowaniem coraz doskonalszych technik molekularnych wykazano, że FN jest glikoproteina o mozaikowej budowie, której segmenty układają się w aktywne biologicznie domeny. Podstawową jednostką strukturalną FN jest dimer składający się z dwóch podobnych, ale nie zawsze identycznych łańcuchów polipeptydowych o zbliżonych masach cząsteczkowych 250 kDa [100-102]. Każdy z łańcuchów FN zbudowany jest z powtarzających się motywów aminokwasowych oznaczonych jako typ I, II i III, rozmieszczonych nieregularnie i tworzących tzw. strukturę mozaikową białka [102]. Fibronektyna może występować w wielu postaciach powstałych w wyniku molekularnego składania (*alternative splicing*) lub/oraz posttranslacyjnej glikozylacji. Jedną z nich jest postać rozpuszczalna – osoczowa (pFN). Wykryto także dwie formy nierozpuszczalne: związana z błoną komórkową oraz usieciowana wielkocząsteczkowa, obecna w macierzy pozakomórkowej [102]. Rozpuszczalna postać FN występuje nie tylko w osoczu, ale i innych płynach biologicznych: płynie owodniowym, mózgowo-rdzeniowym, ślinie [102-103]. Osoczowa FN jest wytwarzana w wątrobie przez hepatocyty. Postać nierozpuszczalna występuje na powierzchni różnego typu komórek oraz w macierzy pozakomórkowej, głównie w tkance łącznej. Ta postać jest wytwarzana przeważnie lokalnie w tkankach [104-107]. FN wytwarzana przez komórki inne niż hepatocyty (fibroblasty, limfocyty, makrofagi, komórki nabłonkowe, czy miocyty naczyń krwionośnych) nazywana jest komórkową (cFN). Obie formy są produktem tego samego genu, a różnice strukturalne pomiędzy nimi są wynikiem alternatywnego składania na poziomie mRNA. W postaci nierozpuszczalnej cząsteczka FN ulega rozciągnięciu do postaci fibrylarnej, której włókienka asocjują, tworząc usieciowaną macierz (G) [108-109]. FN będąca

składnikiem macierzy pozakomórkowej (ECM) odgrywa główną rolę w adhezji, migracji, angiogenezie oraz procesach naprawczych [110-113].



Ryc. 2 Budowa naczynia krwionośnego
 źródło: <http://medicinembbs.blogspot.com/2011/02/inflammation.html>

Innym białkiem powszechnie występującym w macierzy jest kolagen. Wykazano za pomocą metod immunofluorescencyjnych, że w macierzy pozakomórkowej fibronektyna współwystępuje z kolagenem i jej nieobecność uniemożliwia tworzenie prawidłowych fibryli kolagenowych [114]. Powszechnie występującymi makrocząsteczkami w macierzy pozakomórkowej są też proteoglikany i glikozoaminoglikany. FN oddziałuje głównie z siarczanami heparanu i chondroityny i ich proteoglikanami. W pracy Chen i wsp. [117] wskazują, że oddziaływanie FN z proteoglikanami bogatymi w siarczan heparanu może być jednym ze sposobów regulacji aktywności np. transformującego czynnika wzrostu beta (TGF-beta). Czynniki te są odkładane i wbudowywane w macierz w postaci nieaktywnych kompleksów z białkiem wiążącym latentny TGF- β (LTBP1) za pośrednictwem wiązania proteoglikanów siarczanu heparanu z FN i w ten sposób zostaje magazynowany. FN jest głównym regulatorem odkładania LTBP1 w macierzy, a zatem i lokalnej aktywności TGF- β , wielofunkcyjnego czynnika kontrolującego proliferację, różnicowanie, transformację czy apoptozę komórek [114-117]. FN przyczynia się także do powstawania skrzepu fibrynowego. W początkowej fazie krzepnięcia uczestniczy głównie osoczowa FN. Skrzep przywraca integralność naczynia

krwionośnego a jednocześnie tworzy tymczasową macierz fibrynowo-fibronektynową. Badania *in vivo* nad rolą pFN w gojeniu zranień skóry wykazały, że czasowe wyłączenie wytwarzania osoczowej FN nie zatrzymuje procesów naprawczych, jednakże przebiegają one znacznie wolniej, a obszar objęty stanem zapalnym jest istotnie większy niż w przypadku stałej obecności pFN [111-112]. Z drugiej strony wykazano patologiczną rolę FN [118-120]. Badania ostatnich lat ukazują powiązanie podwyższonego stężenia FN z nefropatią cukrzycową. Jednym z nich jest badanie Hala O. El Mesallamy i wsp. [118]. Autorzy wykryli w grupie pacjentów z T2DM wzrastające surowicze stężenia TGF-beta1, CTGF, MCP-1 i FN. Autorzy wskazali zaangażowanie fibronektyny i innych czynników zapalnych w zwiększenie objętości macierzy pozakomórkowej, pogrubienie błony podstawnej kłębuszków i cewek oraz zwiększenie objętości macierzy mezangialnej co ostatecznie prowadzi do stwardnienia (szkliwienia) kłębuszków i włóknienia śródmiąższu. Inni autorzy także wykazali obecność zwiększonych stężeń FN jako jednego z głównych składników ECM w nefropatii cukrzycowej [119,120,121].

4.3. Cytokiny

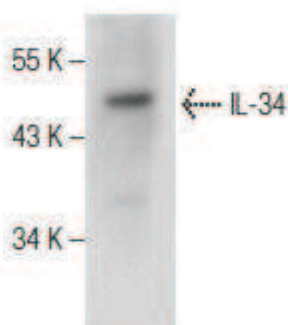
4.3.1. Czynniki martwicy nowotworów-alpha (TNF- α)

Czynnik martwicy nowotworów-alpha (TNF- α) jest jedną z głównych cytokin odpowiedzi zapalnej [122]. Efekty biologiczne zależą w dużym stopniu od ilości oraz intensywności wydzielania. Produkcja dużych ilości TNF- α prowadzi do wystąpienia objawów wstrząsu, wzrostu wydzielania hormonów katabolicznych, zespołu przesiąkania włośniczkowego, ostrej niewydolności oddechowej, martwicy w obrębie przewodu pokarmowego rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego i wysokiej gorączki. Natomiast przewlekłe wydzielanie niewielkich ilości TNF- α powoduje utratę masy ciała, jadłowstręt, katabolizm białek i lipidów, powiększenie wątroby i śledziony, insulinooporność oraz zmiany zapalne w ścianie wewnętrznej tętnic prowadzące między innymi do zmian miażdżycopodobnych [122-124]. TNF- α jest produkowany przede wszystkim przez monocyty i makrofagi na które oddziałuje w sposób endo-, para- i autokryny. Działa chemotaktycznie na monocyty i neutrofile oraz aktywuje je jak makrofagi. Wzmaga cytotoksyczność monocytów i makrofagów, będąc zarazem jednym z mediatorów tej cytotoksyczności [122]. Cukrzycowe powikłania wiążą się

z komponentą zapalną, dlatego istnieje hipoteza, że deregulacja cytokin z rodziny TNF- α może być zaangażowana w rozwój przewlekłych powikłań zarówno u pacjentów chrujących na cukrzycę typu 1 jak też typu 2 [123, 125-126]. TNF- α jest jedną z cytokin indukujących przerwanie bariery krew-siatkówka przez rozluźnienie ścisłych połączeń między poszczególnymi komórkami śródbłona naczyń siatkówki, a także między komórkami nabłona barwnikowego siatkówki. Co więcej TNF- α poprzez stymulację i aktywację naczyniowych molekuł adhezyjnych przyczynia się do procesu aterogenezy [122]. TNF- α oprócz udziału w procesach zapalnych, odgrywa znaczącą rolę w neowaskularyzacji i reakcjach naczynioruchowych [122]. Czynnikiem znacznie pobudzającym wydzielanie opisywanej cytokiny jest niedotlenienie oraz patologicznie zmodyfikowane białka, które zwiększają stopień ekspresji mRNA TNF- α . Swoje liczne funkcje spełnia między innymi dzięki zdolnościom do pobudzania syntezy innych cytokin sprzężonych czynnościowo z TNF- α , białek macierzy pozakomórkowej, modulację chemotaksji monocytów i fibroblastów, a także ma wpływ na stopień ekspresji molekuł adhezyjnych w naczyniach [122-126]. Wykazano, że z badanych czynników prozapalnych, surowiczy poziom TNF- α może być niezależnym wskaźnikiem w przewidywaniu występowania NPDR u dzieci z T1DM [125].

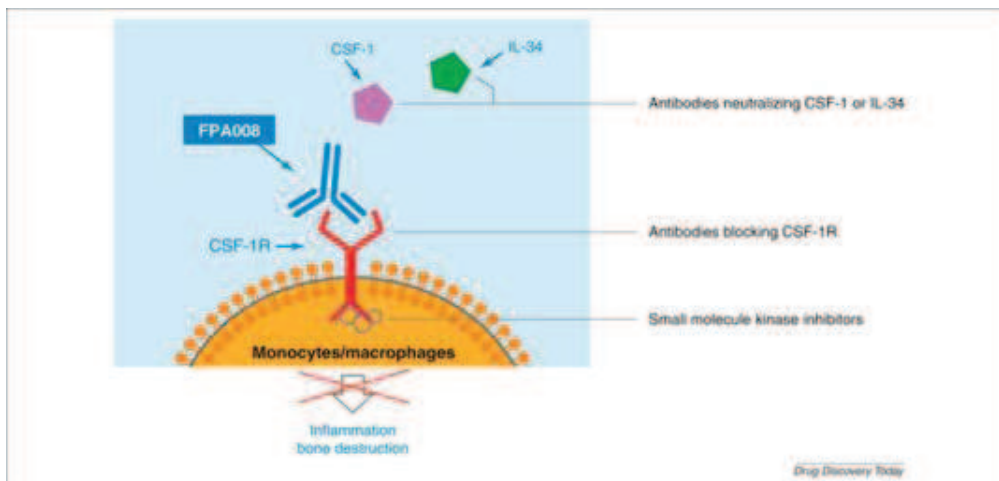
4.3.2. Interleukina 34 (IL34)

Odkryta w 2008 roku interleukina 34 uznana została za nową prozapalną cytokinę zaliczaną do grupy interleukin. Jest białkiem składającym się z 242 aminokwasów o masie 39 kilodaltonów (Ryc. 3), tworzącym homodimery [127].



Ryc. 3. Analiza Western –blot wykazująca ekspresję IL-34 (in SK-N-MC whole cell lysate) [127].

Obecność IL34 stwierdzana jest przede wszystkim w ludzkiej śledzionie ale także w grasicy, wątrobie, jelicie cienkim i grubym, płucach, sercu, prostaty, mózgu, nerkach, jądrach jak też w jajnikach oraz w skórze. IL34 jest wydzielana między innymi przez keratynocyty, neurony i fibroblasty błony maziowej a także komórki epitelium zatok śledzionowych [128-129]. IL-34 odkryta w guzach wielkokomórkowych kości (bone tissue giant –cell tumours) jako jeden z czynników stymulujących różnicowanie monocytów i makrofagów oraz czynnik pobudzający kolonie makrofagów do uwalniania cytokin prozapalnych. Podobnie jak interleukina 8 (IL-8), białko chemotaktyczne dla monocytów-1 (MCP-1) odgrywa kluczową rolę w receptorowej aktywacji czynnika jądrowego kappa/beta ($\text{NF}\kappa\beta$) inicjującego proliferację i dojrzewanie osteoklastów (osteoklastogenezę) Ryc. 4 [129].



Ryc.4. Rola Il-34 w osteoklastogenezie [129].

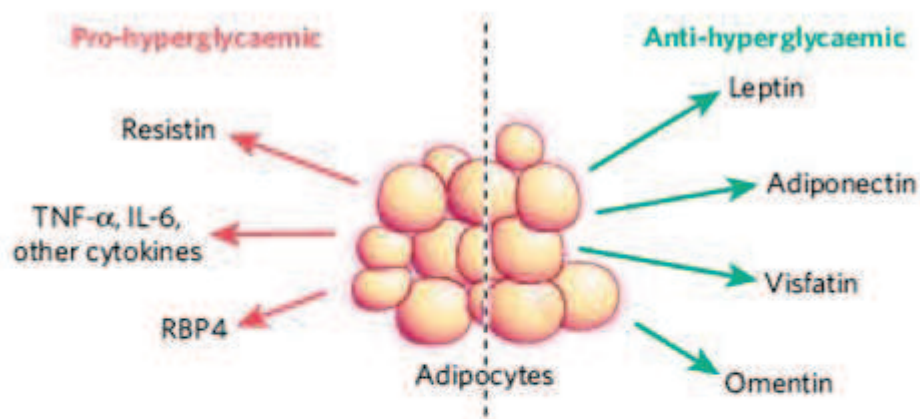
IL-34 odgrywa rolę przy wzroście IL-1, IL-6 i TNF-alfa i odwrotnie wzrost tych czynników zwiększa uwalnianie IL34 [129]. IL-34 działa jako alternatywny ligand poprzez wiązanie z receptorem czynnika stymulującego kolonie-1, colony stimulating factor-1, (CsF-1). W badaniach Greter M i wsp. zaobserwowano wpływ IL34 na rozwój i przeżycie komórek Langerhansa skóry (nieodjrzałe komórki dendrytyczne zwane gwiazdzistymi mające zdolność do migracji, identyfikacji niszczenia obcych antygenów i cząstek np. wirusów) i mikrogleju (makrofagi rezydujące w mózgu i rdzeniu przedłużonym) zarówno w życiu płodowym jak i dorosłym [128]. Znany jest także związek IL-34 z reumatoidalnym zapaleniem stawów (rheumatoid arthritis RA), w stanie zapalnym gruczołów ślinowych pacjentów z zespołem Sjogrena (SS) oraz w chorobach nowotworowych. W badaniu Chemel M. i wsp. wykazano obecność IL34

w błonie maziowej pacjentów z RA. W badaniu tym wykazano związek poziomu IL 34 w dotkniętej zapaleniem tkance z ciężkością zmian zapalnych w maziówce oraz innymi wykładnikami zapalenia tj. leukocytoza w płynie stawowym. Wykazano także stymulujące działanie TNF-alfa i IL-1 na poziom uwalniania IL34 [131]. Można na tej podstawie rozważyć uznanie IL 34 jako markera ciężkości stanu zapalnego oraz czynnika korelującego ze stopniem resorpcji kości w RA. Podobny związek i obecność IL 34 w tankach stawowych pacjentów dotkniętych RA wykazali autorzy Hwang SJ. i wsp. [129]. Z kolei w badaniu Chen Z. i wsp. [127] badacze zaobserwowali wpływ IL34 na różnicowanie się osteoklastów z prekursorów krążących w krwi obwodowej. Po podaniu rekombinowanej IL34 do krążenia systemowego obserwowano zaś wzrost obecności komórek CD11b i redukcję gęstości kości. Badanie to potwierdza, że IL34 jest czynnikiem odgrywającym istotną rolę w osteoklastogenezie i chorobach kości [127].

W świetle ostatnich badań wykazano, że cytokiny prozapalne TNF- α , IL-6, IL-18, HMGB-1, jak też białko C-reaktywne może być wskaźnikami miażdżycy i CAD. Jeszcze do niedawna uważano, że miażdżycą jest procesem wynikającym z gromadzenia się lipidów, obecnie wiadomo że czynnikiem odgrywającym czołową rolę w inicjacji rozwoju i powikłań miażdżycy jest odpowiedź zapalna w obrębie naczyń [90-94, 96-97]. Opublikowane niedawno badania Li Z. i wsp. również wykazały powiązanie innych cytokin zapalnych w tym interleukiny 34 z głównym powikłaniem wynikającym z miażdżycy tętnic jakim jest choroba wieńcowa (coronary artery disease –CAD) [130]. W powyższym badaniu stężenie IL-34 istotnie wzrastało u pacjentów obciążonych CAD w porównaniu z pacjentami bez CAD. Zaobserwowano również wyższe stężenie IL-34 u pacjentów z niestabilną vs stabilną CAD ale różnica nie była znamienna. Ponadto autorzy wykazali związek pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a poziomem białka CRP oraz z wiekiem, poziomem cholesterolu LDL jak też z BMI. Badacze sugerują, że peptyd IL-34 może być niezależnym wskaźnikiem CAD. Wieloczynnikowa analiza wsteczna wykazała bowiem, że IL-34 i CRP były niezależnymi wskaźnikami choroby niedokrwiennej serca [130].

4.4. Adipokiny i inne wskaźniki stanu zapalnego

Tkanka tłuszczowa jest obecnie uważana nie tylko za organ będący magazynem energii ale także organ czynny endokrynnie który wydziela wiele różnych cytokin nazywanych *adipocytokinami*. Adipocytokiny oddziałują w sposób auto-, para- i endokrynnie na adipocyt oraz odległe narządy i tkanki w tym na system naczyniowy chroniąc lub nasilając choroby zależne od otyłości: angiopatię cukrzycową, nadciśnienie, miażdżycę [21-22, 123-124,132]. Badania ostatnich lat wskazują na szczególne znaczenie otyłości brzusznej w patogenezie zaburzeń metabolicznych, która jest związana z czynnością endokrynną tkanki tłuszczowej trzewnej. Tkanka tłuszczowa wytwarza liczne cytokiny m.in. TNF- α , IL-6, leptynę, adiponektynę, rezystynę, apelinę, które mogą zmniejszać wrażliwość tkanek na insulinę oraz indukować proces zapalny, dysfunkcję śródbłonna i tworzenie zmian miażdżycowych [132-134]. Adipocytokiny uwalniane do krwi dzięki obecności swoistych receptorów na powierzchni komórek docelowych działają jak klasyczne hormony wpływające na metabolizm tkanek i narządów: wątroby, mięśni szkieletowych, komórek beta trzustki, mózgu, układu naczyniowego i rozrodczego. Przypuszcza się, że adipocytokiny przyczyniają się do ryzyka rozwoju powikłań naczyniowych u pacjentów z T2DM [123, 134]. Otyłość i cukrzyca T2DM to dwa stany charakteryzujące się przewlekłym miernie nasilonym stanem zapalnym. Ten stan zapalny inicjuje i prowadzi do powikłań sercowo-naczyniowych w cukrzycy T2DM. Powiązanie pomiędzy wpływem różnych adipokin ze stanem zapalnym w cukrzycy T2DM może być kluczem do lepszego zrozumienia patomechanizmu choroby i jej powikłań. Wzrastająca ilość tłuszczu trzewnego jest związana z opornością na insulinę, prowadzi to zaburzenia naturalnej równowagi adipocytokin, dysfunkcji śródbłonna, stanu pro-zapalnego, pro-aterogennego co prowadzi do powikłań i narastającego ryzyka metabolicznego i sercowo-naczyniowego [134].



Adipocytes secrete proteins with varied effects on glucose homeostasis. Adipocyte-derived proteins with anti-diabetic action (green arrows) include leptin, adiponectin, omentin and visfatin. Other factors tend to raise blood glucose (red arrows), including resistin, TNF- α and RBP4. TNF- α and human resistin are probably secreted by non-adipocytes within the fat pad. IL, interleukin.

Ryc.5. Produkty sekrecji adipocytów [134].

4.4.1. Leptyna

Leptyna (z gr. leptos - szczupły) jest hormonem polipeptydowym, będącym produktem tzw. genu otyłości ob. U ludzi gen LEP znajduje się na ramieniu długim chromosomu 7 (7q31.3).

Leptyna powstaje głównie w dojrzałych komórkach białej tkanki tłuszczowej (white adipose tissue-WAT), a jej biosynteza i wydzielanie zależy od masy WAT i odzwierciedla zawartość zasobów energetycznych. Jest białkiem o ciężarze gatunkowym 16kDa, składającym się z 167 aminokwasów. Głównymi czynnikami wpływającymi na stężenie leptyny we krwi są masa tkanki tłuszczowej i wielkość adipocytów – oba te parametry są dodatnio skorelowane z biosyntezą leptyny w tkance tłuszczowej i stężeniem tej adipokiny w krążeniu [136]. Leptyna uważana jest dzisiaj za hormon sytości. Wydzielana do krwi leptyna dociera z krążeniem do mózgu i wiąże się ze swoimi receptorami w podwzgórze, gdzie pod jej wpływem dochodzi m.in. do represji genów kodujących neuropeptyd Y (NPY) oraz do indukcji genów kodujących proopiomelanokortynę (POMC) i kortykoliberynę (CRH). Prowadzi to do obniżenia

łaknienia i zmniejszenia spożycia pokarmu, a także do obniżenia masy tkanki tłuszczowej i zwiększenia ilości wydatkowanej energii – skutkiem tych zmian jest spadek masy ciała [137]. Zdaniem niektórych autorów w czasie przemian ewolucyjnych leptyna powstała jako czynnik zabezpieczający organizm przed głodem lub otyłością w okresach, kiedy dysponowano nadmierną ilością pożywienia. Przyjmuje się, że działanie leptyny jest plejotropowe, wpływające na wiele szlaków metabolicznych. Wczesne badania nad stężeniem i ekspresją leptyny w narządach człowieka ujawniły, że wraz ze wzrostem ilości tkanki tłuszczowej w organizmie rośnie także stężenie leptyny w surowicy krwi, co stało się podstawą hipotezy, że adipocyty białej tkanki tłuszczowej stanowią bogate źródło tego hormonu [136-137]. Wszystkie swoje działania leptyna wywiera przez specyficzne receptory. Rola leptyny w homeostazie ciała nie ogranicza się jedynie do regulacji łaknienia:

- wchodzi w reakcje z hormonem wzrostu (GH), receptory dla GH należą do tej samej rodziny co receptory dla leptyny

- wydają się stymulować przysadkę do wydzielania GH poprzez hamowanie podwzgórzowej produkcji somatostatyny oraz przez bezpośrednią stymulację komórek somatotropowych przysadki

- wpływa na wydzielanie hormonów tarczycy i insuliny-zmniejszone wydzielanie leptyny powoduje zmniejszenie wydzielania hormonów tarczycy, leptyna zwiększa wrażliwość komórek na insulinę w tkankach obwodowych oraz zwiększa wychwyty i utlenianie glukozy w mięśniach szkieletowych.

- wpływa na termogenezę przez regulacje białek mitochondrialnych specyficznych dla brunatnej tkanki tłuszczowej

Ponadto, leptyna bierze udział nie tylko w metabolizmie lipidów i glukozy, w odpowiedziach immunologicznych ustroju ale także w kontroli ciśnienia tętniczego, w procesie krzepnięcia krwi, wpływa na płodność [137]. Jest ważnym czynnikiem wzrostu i rozwoju płodu o czym świadczy wysoki poziom ekspresji jej receptora w łożysku i tkankach płodu. Jej stężenie zależy wprost proporcjonalnie od ilości tkanki tłuszczowej. Jest niższe u noworodków przedwcześnie urodzonych i o zbyt niskiej urodzeniowej masie ciała a wyższe u noworodków o zbyt dużej masie ciała. leptyna wewnątrzmacicznie odpowiada za wykształcenie się szlaków nerwowych związanych z przyjmowaniem pokarmu i regulacją łaknienia. Zmiany w jej syntezie, sekrecji i działaniu będące wynikiem niedożywienia lub nadmiaru substancji odżywczych w życiu płodowym mogą odgrywać rolę w powstawaniu otyłości w życiu dorosłym

[38]. Autrzoy badań sugerują, że leptyna może być markerem chorób zależnych od otyłości. Jej zwiększone poziomy korespondują z CAD i powikłaniami sercowo-naczyniowymi gdyż wykazuje ona właściwości aterogenne [139-140]. W badaniu Jung CH i wsp. wykazano, że surowiczy poziom leptyny nie różnił się u pacjentów z retino i nefropatią cukrzycową natomiast był znamienne wyższy u pacjentów z T2DM i neuropatią w odniesieniu do grupy pacjentów z T2DM lecz bez neuropatii [123]. Z kolei wyższe stężenie leptyny wykazano u pacjentów z T1DM oraz mikroangiopatią cukrzycową [140].

4.4.2. Adiponektyna

Adiponektyna jest 28 KDa białkiem, ma podobną strukturę do TNF α , kolagenu VIII i IX oraz składowej C1q dopełniacza. Jak wykazano w badaniach in vitro adiponektyna ma działanie antyaterogenne przez hamowanie adhezji monocytów do komórek śródbłonna oraz transformacji makrofagów do komórek piankowatych oraz przez aktywację komórek śródbłonna. (przez zmniejszoną produkcję molekuł adhezyjnych i hamowanie TNF α oraz czynnika transkrypcyjnego NF κ B) [141,142]. Potwierdzeniem tego są badania [143] w których wykazano, że w ścianach naczyń krwionośnych adiponektyna hamuje przyleganie monocytów do komórek śródbłonna przez zmniejszenie ekspresji białek adhezyjnych oraz hamuje transformację makrofagów w komórki piankowate, zmniejsza proliferację komórek mięśni gładkich i zwiększa syntezę tlenu azotu oraz stymuluje angiogenezę [143]. Wiele badań przedstawia adiponektynę jako cytokinę o działaniu przeciwzapalnym. Przeciwzapalne działanie adiponektyny jest częściowo wynikiem zmiany aktywności TNF α . W badaniach in vitro stwierdzono, że TNF α hamuje ekspresję genu adiponektyny przez supresję czynnika jądrowego NF κ B, pobudzanego przez adiponektynę. W badaniach u ludzi stwierdzono, że u osób z wysokim stężeniem mRNA adiponektyny jest obniżona sekrecja TNF- α w tkance tłuszczowej, natomiast narastająca insulinooporność i wzrost masy tkanki tłuszczowej zwiększa ekspresję TNF- α , prowadząc do obniżenia stężenia adiponektyny [144]. Dodatkowo udowodniono, że adiponektyna bezpośrednio pobudza produkcję IL10 przez makrofagi [145] i zmniejsza produkcję cytokin prozapalnych TNF α i IL6 [146]. Adiponektyna hamuje ekspresję molekuł adhezyjnych w komórkach śródbłonna naczyń i produkcję cytokin w makrofagach, przez co hamuje proces zapalny, który pojawia się we wczesnej fazie miażdżycy i mikroangiopatii [143].

Adiponektyna wykazuje działania antyzapalne także poprzez zależnie od stężenia hamowanie stymulowanego przez TNF α przylegania monocytów do kultury komórek ludzkiego śródbłonna naczyń [146]. Wzrost stężenia adiponektyny w surowicy uważany jest za odpowiedź na uszkodzenie śródbłonna naczyń [147]. Odmienne wyniki przedstawili autorzy u pacjentów chorujących na T2DM oraz mikroangiopatii [123, 135, 148-150]. Jung CH i wsp. w swoim badaniu wykazali, iż surowicze stężenia adiponektyny były znamienne wyższe u pacjentów z T2DM i współistniejącą retinopatią i neuropatią [123]. Z kolei Fujita i wsp. wykryli związek pomiędzy stężeniem osoczym adiponektyny i stężeniem albuminy w moczu u pacjentów z T2DM oraz nefropatią [135]. Podobnie wyższe stężenia adiponektyny w surowicy i moczu wykryto także u pacjentów z T1DM oraz nefropatią cukrzycową [148] jak też retinopatią cukrzycową [149-150].

4.4.3. Rezystyna

Rezystyna jest adipocytokiną, której nazwa obrazuje udział cząsteczki w rozwoju insulinooporności (insulin resistance) [151]. Rezystyna, odkryta w roku 2001, jest polipeptydem o masie cząsteczkowej 12 kDa, należącym do unikatowej rodziny białek bogatych w cysteinę – family of cysteine-rich resistin-like molecules [RELM]. W badaniach in vivo wykazano, że podanie rekombinowanej rezystyny otyłym myszom wywoływało insulinooporność, natomiast leczenie przeciwciałami przeciw rezystynie powoduje immunoneutralizację [152]. Głównym źródłem syntezy rezystyny są komórki zapalne krwi obwodowej, monocyty i makrofagi [151]. Obecność rezystyny wykazano także w szpiku kostnym, płucach, łożysku, komórkach wysp trzustkowych oraz komórkach tkanki tłuszczowej, które nie są bezpośrednio odpowiedzialne za magazynowanie lipidów [152, 153]. Niektórzy badacze wykrywali rezystynę bezpośrednio w tych komórkach, a ponadto w obszarach zapalenia i we krwi obwodowej. Reilly i wsp. oceniali związek między rezystyną a stanem zapalnym, czynnikami metabolicznymi i miażdżycą w populacji zdrowych osób oraz w grupie chorych z T2DM. Wykazali wyższe stężenie rezystyny u kobiet niż u mężczyzn w obu grupach oraz wyższe stężenie rezystyny u chorych z T2DM niż u osób bez objawów klinicznych. Stężenie rezystyny ściśle korelowało ze stężeniem markerów zapalnych, zwłaszcza TNF-R2, w obu badanych populacjach. U osób z zespołem metabolicznym rezystyna była predyktorem miażdżycy naczyń wieńcowych. Badanie potwierdziło, że

rezystyna jest niezależnym zapalnym markerem miażdżycy, a jej stężenie w osoczu może być ważnym czynnikiem w przewidywaniu ryzyka sercowo-naczyniowego [154]. Rezystyna *in vitro* zwiększa ekspresję VCAM-1, ICAM-1, nasila działanie MCP-1 oraz aktywuje komórki śródbłonna, które uwalniają endotelinę 1 (ET-1) [153,154]. Polimorfizm – *single nucleotide polymorphism* (SNP) genu RETN, kodującego rezystynę, jest odpowiedzialny za metaboliczny fenotyp u chorych z otyłością i jadłowstrętem psychicznym [154-156]. Ponadto wiadomo, że niektóre czynniki jak TNF- α , IL-6 czy lipopolisacharyd (LPS), stymulują ekspresję genu rezystyny. W badaniu obejmującym 238 chorych z T2DM wykazano, że surowicze stężenie rezystyny wiąże się ze stadiem retinopatii cukrzycowej, stadiem nefropatii i neuropatii u chorych na T2DM, niezależnie od wieku, płci i BMI [157]. Nowe teorie dotyczące roli rezystyny w procesach regulacji, proliferacji i różnicowania komórek – w tym hamowania dojrzewania adipocytów jak również udziału w przewlekłych stanach zapalnych związanych z otyłością wymagają jednak dalszych badań .

4.4.4. Białko wiążące retinol 4 (RBP4)

Kolejną adipocytokiną, mającą potencjalny związek z zapaleniem oraz późnymi powikłaniami cukrzycowymi jest białko wiążące retinol 4 (retinol-binding protein 4 – RBP4). Białko to stymuluje insulinooporność i w ten sposób zwiększa ryzyko wystąpienia cukrzycy typu 2. Białko to należy do rodziny lipokalin transportujących małe hydrofobowe cząsteczki (m.in. retinol – witaminę A z wątroby do tkanek obwodowych). RBP-4 jest kodowane przez gen zlokalizowany na chromosomie 10 i produkowane głównie w wątrobie i dojrzałych adipocytach (20-40%) . W kilku badaniach wykazano, iż podwyższone poziomy surowiczego RBP4 koreluje z insulinoopornością i cukrzycą typu 2 [158-160]. W badaniach Kelly i wsp.. zaobserwowano znamienne wyższą ekspresję RBP-4 u osób otyłych oraz z T2DM niż u osób szczupłych oraz istotną korelację między RBP-4 a stężeniem glukozy ($R=0,76$; $p=0,004$) oraz wskaźnikiem BMI ($R=0,37$; $p=0,04$) [160]. Warto podkreślić, że stężenie RBP-4 ulega znacznemu obniżeniu pod wpływem utraty masy ciała, zbilansowanej diety i wysiłku fizycznego, prowadząc do zwiększenia wrażliwości tkanek na insulinę [160]. Ponadto kilka badań pokazało, że osoczowe stężenie RBP4 w może być biomarkerem retinopatii, nefropatii i schorzeń układu sercowo naczyniowego w T2DM [161,162]. W badaniach klinicznych wykazano związek pomiędzy podwyższonym

stężeniem RBP4 w surowicy a nadciśnieniem i stanem zapalnym. Ci sami autorzy wykazali także wpływ RBP4 na stymulację makrofagów do produkcji cytokin prozapalnych [162,163].

4.4.5 Wisfatyna

Wisfatyna - odkryta w 2005 r- jest białkowym produktem genu czynnika wzrostu dla wczesnych komórek B (PEBF) o masie 52 kDa, syntetyzowanym głównie przez adipocyty i makrofagi tkanki tłuszczowej, a w mniejszym stopniu także przez hepatocyty i neutrofile. Adipokina ta bierze udział w procesach różnicowania preadipocytów do adipocytów a także jako czynnik stymulujący różnicowanie kolonii limfocytów pre-beta. Stymuluje również syntezę i magazynowanie triacylogliceroli w tkance tłuszczowej. Jej produkcja jest regulowana przez wiele czynników, przy czym najważniejszą rolę odgrywają: TNF- α , poprzez stymulację jej syntezy i wolny testosteron [132, 164-166] . Jej biologiczne efekty zachodzą za pośrednictwem i poprzez receptor insulinowy. Wykazuje działanie wzaodylatacyjne (pobudza syntezę NO) ale także prozapalne- indukując ekspresję molekuł proadhezyjnych takich jak VCAM-1, a także indukując prozapalne cytokiny TNF alfa, IL-1 beta, i IL-6 [132]. Dodatkowo wisfatyna stymuluje proliferację komórek endotelium przez produkcję śródbłonkowego czynnika wzrostu oraz rozrost komórek mięśni gładkich [132]. Jej poziom wzrasta w otyłości trzewnej a wysiłek fizyczny i związana z nim utrata wagi obniżają poziom wisfatyny [132]. Jednakże badania nad jej znaczeniem w rozwoju insulinooporności przyniosły sprzeczne wyniki. Prawdopodobnie wisfatyna może wykazywać działanie insulinomimetyczne, poprzez wiązanie się z IRS-1 i IRS-2 i ich fosforylację. W badaniach na myszach Fukuhara i wsp. wykazali, że dożylnie podanie wisfatyny działało hipoglikemizująco, bez wpływu na stężenie insuliny. Sugeruje to, że u osób otyłych zwiększone stężenie wisfatyny, podobnie jak adiponektyny, może wykazywać działanie protekcyjne, niemniej jednak ze względu na jej względnie niewielkie stężenie w organizmie wpływ na gospodarkę węglowodanową jest niewielki, a tym samym regulacja metabolizmu glukozy nie jest efektywna [164]. Z drugiej strony istnieją silne dowody, wskazujące na niekorzystne działanie wisfatyny w aspekcie insulinooporności. Wisfatyna posiada właściwości prozapalne poprzez aktywację leukocytów i stymulację wydzielania m.in. TNF- α , IL-6, IL-1 β , które zakłócają szlaki sygnałowe dla insuliny [132,165-166].

Chemeryna i omentyna to nowo odkryte adipocytokiny które mogą modulować działanie insuliny. Są także powiązane z indukowaną otyłością opornością na insulinę. Są potencjalnymi kandydatami mogącymi odgrywać rolę w patogenezie otyłości oraz chorób z nią powiązanych takich jak cukrzyca 2 bez lub z komplikacjami naczyniowymi.

4.4.6 Omentyna

Omentyna 313 aminokwasowe białko (adipocytokina) odkryte w 2005 w tkance tłuszczowej trzewnej (Visceral Adipose Tissue - VAT). W mniejszych mianach omentyna występuje w tkance tłuszczowej podskórnej (subcutaneous adipose tissue-SAT) i innych tkankach [167-170]. Omentyna zwiększa insulinozależny wychwyty glukozy i fosforylację w ludzkich adipocytach (in vitro). Jej gen zlokalizowany jest na 1q22-q23 regionie chromosomu, który jest związany z T2DM. Znane są 2 izoformy: omentyna-1 i omentyna-2. Pierwsza głównie krąży we krwi. Odkryto, że pacjenci z nieprawidłową tolerancją glukozy i świeżo wykrytą, nieleczoną T2DM wykazują obniżone poziomy omentyny 1 [167-169]. Jej stężenie maleje u otyłych i z nadwagą a rośnie gdy otyli chudną. Omentyna zwiększa efekt wazodylatacyjny przez zwiększenie produkcji śródbłonkowego NO. Omentyna może odgrywać ochronną rolę przed progresją miażdżycy przez jej wpływ na stan zapalny w endotelium naczyniowym: stymulując enzymy śródbłonkowe do produkcji NO hamuje pobudzaną przez TNF- α cyklooksygenazę², a aktywowana przez omentynę AMPK(5-AMP-activated protein kinase) może bezpośrednio hamować adhezję limfocytów do komórek śródbłonka [165]. Omentyna hamuje różnicowanie osteoblastów i wapnienie komórek mięśni gładkich naczyń. Sugerowano, że obniżony poziom omentyny u chorych z otyłością trzewną prowadzi do progresji zwapnienia tętnic [169]. W badaniu El – Messallamy i wsp. wykryto, że pacjenci z T2DM oraz z CAD charakteryzują się obniżonym poziomem osoczowej omentyny-1. Dodatkowo poziom omentyny był odwrotnie proporcjonalny do otyłości, hiperglikemii, oporności na insulinę, zapalenia i osoczowego stężenia chemeryny [171]. Ten obniżony poziom może prowadzić do zmniejszenia insulinozależnego wychwyty glukozy w trzewnej i podskórnej tkance tłuszczowej-adipocytach, oraz innych insulinowrażliwych tkankach. Z kolei stężenie IL6 okazało się niezależnym czynnikiem wpływającym na poziom omentyny1 [171].

4.4.7 Chemeryna

Chemeryna to nowa 131-137 aminokwasowa adipocytokina odkryta w 2007 roku. Zwiększa insulinozależny wychwyty glukozy przez adipocyt podobnie jak omentyna. Występuje w znacznych ilościach w tkance tłuszczowej, wątrobie oraz w komórkach układu immunologicznego. Moduluje funkcje tych komórek. Początkowo była znana jako czynnik chemotaktyczny dla komórek immunologicznych: makrofagów i komórek dendrytycznych [169-171]. Chemeryna jest uważana za ogniwo łączące otyłość i stan zapalny. Jej stężenie u ludzi jest powiązane z wieloma kluczowymi składowymi zespołu metabolicznego: BMI, trójglicerydami, nadciśnieniem tętniczym. Jej poziom jest szczególnie wysoki u bardzo otyłych ludzi (ciężka otyłość) [170]. Wydzielana jako nieaktywny prekursor aktywowany przez proteazy serynowe powiązane z kaskadami krzepnięcia, fibrynolizy i stanu zapalnego. Rosen i wsp. sugeruje, że podwyższony poziom i aktywność proteaz serynowych powiązanych zarówno z krzepnięciem jak i fibrynolizą może prowadzić do wzrostu poziomu chemeryny u pacjentów z T2DM [134]. W modelu obserwacji zwierzęcej indukuje produkcję NO w endotelium. Indukowany chemeryną NO wywiera efekt przeciwzapalny działając anty-adhezyjnie poprzez hamowanie VCAM- naczyniowy czynnik adhezyjny [132]. W badaniu El-Mesallamy i wsp. poziom chemeryny był znacząco podwyższony u chorych z T2DM ale tylko otyłych. Oprócz dodatkowej korelacji z otyłością wykryto także dodatnią zależność z CRP, natomiast ujemną z cholesterolem frakcją HDL oraz omentyną. Wskazuje to na istotną rolę chemeryny jako łącznika między zapaleniem i otyłością w T2DM [171].

Pomimo licznych badań eksperymentalnych, jak również zaawansowanych badań klinicznych, mechanizm odczynu zapalnego, w którym dochodzi do powstania, a następnie rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych, nie został w pełni poznany. Zdolność adipocytów i innych komórek do wytwarzania substancji prozapalnych u pacjentów otyłych, upośledzoną tolerancją glukozy jak też cukrzycą typu 2 stanowi przedmiot zainteresowania wielu badaczy. Zakładam że nowa prozapalna cytokina IL-34 może mieć związek z powikłaniami naczyniowymi u pacjentów z T2DM. Dlatego też celem moich badań było zbadanie interleukiny-34 oraz fibronektyny u pacjentów chorujących na T2DM. Być może określenie roli IL-34 oraz FN u pacjentów z T2DM umożliwi szersze poznanie mechanizmów rozwoju i progresji powikłań naczyniowych.

Potwierdzenie zależności pomiędzy czynnikami zapalnymi a powikłaniami mikro i makronaczyniowymi mogłoby się również przyczynić do wykorzystania ich jako markerów określających ryzyko wystąpienia lub progresji powikłań cukrzycowych. Co z tym idzie ukierunkowania i większej skuteczności farmakoterapii w zapobieganiu rozwojowi i postępowi powikłań naczyniowych będących w grupie ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2.

II. Cel pracy

Celem pracy była ocena surowiczych stężeń interleukiny 34 oraz fibronektyny u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2

Główny cel pracy był realizowany przez cele szczegółowe:

1. Ocena parametrów klinicznych i biochemicznych u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 oraz osób z grupy kontrolnej
2. Ocena badanych parametrów klinicznych i biochemicznych w zależności od obecności mikroangiopatii, makroangiopatii oraz nadciśnienia tętniczego u pacjentów chorujących na T2DM
3. Badanie związku pomiędzy surowiczym poziomem białka CRP, IL-34, fibronektyną a parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM oraz w grupie kontrolnej
4. Próba oceny, który z badanych parametrów klinicznych i biochemicznych można uznać za prognostyczny w przewidywaniu ryzyka rozwoju późnych powikłań cukrzycowych
5. Określenie wartości granicznej dla nowej cytokiny IL-34 oraz fibronektyny dla ryzyka rozwoju późnych powikłań cukrzycowych

III. Materiał i metody

1. Charakterystyka kliniczna pacjentów

Badaniem objęto łącznie 72 osoby (dorośle rasy białej) w tym 49 pacjentów (24 kobiety oraz 25 mężczyzn) z cukrzycą typu 2 (T2DM) oraz 23 osoby (13 kobiet i 10 mężczyzn) z grupy ryzyka: bez rozpoznanej cukrzycy typu 2 lecz obarczone co najmniej 1 czynnikiem wystąpienia T2DM wg aktualnych wytycznych Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (PTD 2014) [16]. Pacjenci chorujący na T2DM byli leczeni ambulatoryjnie w Poradni Diabetologicznej NZOZ „Działki Leśne” w Gdyni w latach 2010-2014. Cukrzycę typu 2 rozpoznano w oparciu o aktualne standardy i zalecenia Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (PTD) zgodne z wytycznymi American Diabetes Association (ADA) [16, 17]. Średni wiek pacjentów T2DM wynosił 60.9 ± 9.9 lat a czas trwania klinicznie jawnej cukrzycy 7.5 ± 6.3 lat. Dane dotyczące przebiegu choroby uzyskano na podstawie dokumentacji zawartej w historii choroby, badania podmiotowego (wywiadu), dzienników samokontroli glikemii i ciśnienia tętniczego oraz pełnego badania przedmiotowego. Z badanej grupy pacjentów chorujących na T2DM, 6 pacjentów zalecono dobrze zbilansowaną dietę cukrzycową pozostali natomiast farmakoterapią w skojarzeniu z dietą zalecaną w cukrzycy. Trzydziestu ośmiu pacjentów z T2DM było leczonych doustnymi lekami hipoglikemizującymi (metforminą i pochodnymi sulfonilomocznika) z tego 15 w skojarzeniu z insuliną. Natomiast 4 pacjentów z T2DM było leczonych insuliną w monoterapii. Średnia dobową dawką u wszystkich leczonych insuliną pacjentów wyniosła 43.4 IU/dobę.

2. Badania biochemiczne

Stopień wyrównania metabolicznego cukrzycy oceniono na podstawie stężenia hemoglobiny glikowanej (HbA1C) oznaczonej w surowicy metodą immunoturbidymetryczną używając analizatora Cobas 8000 (Roche, Basel, Szwajcaria). Poziom białka C-reaktywnego wysoko czułego (hsCRP) oznaczono metodą immunoturbidymetryczną (analizator Cobas 8000, firma Roche, Szwajcaria). U wszystkich pacjentów oznaczono ponadto poziom kreatyniny w surowicy metodą kolorymetryczną, testem kinetycznym (analizator Cobas 8000, Roche, Szwajcaria). U

wszystkich badanych oceniono ponadto dobowe wydalanie albumin w przygodnej (porannej) próbce moczu metodą immunoturbidymetryczną (analizator Cobas 8000, Roche, Szwajcaria).

Albuminurię rozpoznano na podstawie ilości albuminy wykrytej w przygodnej próbce moczu w przeliczeniu na 1 g kreatyniny zgodnie ze standardami PTD w oparciu o wytyczne American Diabetes Association [16-17]. Poziom cholesterolu całkowitego oraz trójglicerydów w surowicy krwi oznaczono metodą kolorymetryczną przy zastosowaniu analizatora Cobas 8000, Roche, Szwajcaria a także cholesterolu LDL i HDL bezpośrednią metodą kolorymetryczną (Cobas 8000, Roche, Szwajcaria). Glukozę w osoczu krwi żyłnej zarówno w grupie chorych jak i grupie kontrolnej wykonano metodą heksokinazową, spektrofotometrią (analizator Cobas 8000, Roche, Szwajcaria).

W badanej grupie chorych z T2DM wykryto nadciśnienie tętnicze u 44 pacjentów na podstawie 2-krotnego pomiaru ciśnienia tętniczego przeprowadzanego w czasie każdej wizyty kontrolnej, bądź na wywiadzie dotyczącym wcześniejszej diagnozy i przyjmowania leków hipotensyjnych. Pomiar ciśnienia tętniczego były wykonywane w Poradni Diabetologicznej NZOZ „Działki Leśne” w Gdyni w pozycji siedzącej po 10 minutowym odpoczynku przy użyciu ciśnieniomierza Omron M5-1 Intelli SenseTM (Omron Matsusaka Co.Ltd. Japonia). Nadciśnienie tętnicze u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 rozpoznano na gdy średnie ciśnienie tętnicze było $\geq 140/90$ mmHg. Rozpoznanie przeprowadzono zgodnie z wytycznymi PTD opartymi na wytycznych European Society of Hypertension i European Society of Cardiology [ESH/ESC] z 2013 roku [173-174]. U pacjentów z T2DM określono także średnie wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego krwi, będące średnią wartością kilkunastu pomiarów w ciągu roku. Wszyscy pacjenci z T2DM i z rozpoznaniem nadciśnieniem tętniczym byli leczeni farmakologicznie inhibitorami konwertazy angiotensyny (ACE-I) lub blokerami receptora angiotensynowego (ARB), ponadto β -blokerami, Ca-blokerami, oraz lekami moczopędnymi.

Ponadto w badanej grupie pacjentów chorujących na T2DM wykryto u 17 chorych przewlekłe powikłania naczyniowe pod postacią mikroangiopatii. Albuminurię rozpoznano u 9 chorych, neuropatię cukrzycową u 3 natomiast retinopatię cukrzycową u 6 pacjentów chorujących na T2DM. Retinopatię cukrzycową oceniono badaniem

oftalmoskopowym i angiografią fluoresceinową. Badanie dna oka przeprowadzono po podaniu kropli 1% Sol. Tropicaimd, soczewką +90D firmy (Okular Instruments - USA). Oceny przedniego odcinka gałki ocznej dokonano lampą szczelinową (Topcon SL-8Z - Japonia). Angiografię fluoresceinową (FLA) wykonano kamerą cyfrową Topcon Imagenet 2000 (Japonia). Analizę obrazu dna oczu badanych pacjentów przeprowadzono wg. obowiązującej klasyfikacji [175].

Somatyczną neuropatię obwodową rozpoznano na podstawie badania neurologicznego po stwierdzeniu ≥ 3 z 4 elementów badania podmiotowego oraz przedmiotowego obejmującego badanie siły mięśniowej, odruchów ścięgniastych, czucia bólu (sterylna igła), badanie czucia nacisku - monofilament ucisku 10 g - (Semes-Weinstein 5.07), badanie czucia wibracji przy użyciu kalibrowanego stroika 128 Hz, czucia temperatury przy użyciu tip-term, wskaźnika badawczego o 2 zakończeniach: metalowym i plastikowym oraz badania elektroneurofizjologicznego (EMG). Rozpoznanie somatycznej neuropatii obwodowej u pacjentów chorujących na T2DM przeprowadzono zgodnie z zaleceniami PTD [16].

Makroangiopatię rozpoznano u 12 pacjentów chorujących na T2DM. U 7 pacjentów wykryto chorobę niedokrwienną serca udokumentowaną na podstawie koronarografii wykazującej istotne zwężenia $>50\%$ w naczyniach wieńcowych. U 3 osób na podstawie objawów podmiotowych, badania klinicznego oraz USG Dopplerowskiego tętnic (aparatus USG Siemens G60 S) rozpoznano miażdżycę tętnic kończyn dolnych. Natomiast u 2 pacjentów z T2DM również w badaniu USG Dopplerowskim (aparatus USG Siemens G60 S) wykryto występowanie blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych (miażdżycy tętnic szyjnych) natomiast jeden pacjent z T2DM przebył udar niedokrwienny mózgu potwierdzony w badaniu tomografii komputerowej głowy wykonanym w trakcie hospitalizacji.

Ponadto w badanej grupie pacjentów chorujących na T2DM wykryto grupę palaczy papierosów. Na podstawie wywiadu 21 pacjentów palących w chwili badania lub niepalących do 3 lat wstecz uznano za czynnych palaczy. Natomiast pacjenci z T2DM, którzy nie palili papierosów w ogóle lub palili > 3 lat wstecz zakwalifikowano do grupy niepalących (28 osób).

3. Grupa wysokiego ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 – grupa kontrolna

Do grupy kontrolnej zakwalifikowane zostały osoby obarczone występowaniem min. 1 czynnika ryzyka rozwoju cukrzycy w/g aktualnych wytycznych PTD po wykluczeniu obecności samej choroby [1,16]. Średni wiek osób w grupie kontrolnej wynosił 37.9 ± 10.3 lat. W badanej grupie kontrolnej wykryto co najmniej 1 czynnik ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2.

*nadwagę lub otyłość (BMI ≥ 25)

*cukrzycę u rodziców i/lub rodzeństwa

* wcześniej rozpoznany stan przedcukrzycowy

* u kobiet- przebytą cukrzycę ciążową lub jeśli urodziły dziecko o masie ciała ≥ 4 kg

* nadciśnienie tętnicze ($\geq 140/90$)

*dyslipidemię (HDL <40 mg/dl i/lub TG > 150 mg /dl)

*lub chorobę układu sercowo naczyniowego.

Nadciśnienie tętnicze w grupie kontrolnej występowało u 12 osób, u 6 badanych prowadzona była oprócz leczenia behawioralnego obejmującego prawidłowo zbilansowaną dietę oraz wysiłek fizyczny także farmakoterapię metforminą. Ponadto 8 osób potwierdziło palenie papierosów (obecnie i do 3 lat wstecz).

4. Pomiary antropometryczne

U wszystkich pacjentów z T2DM jak i w grupie kontrolnej dokonano pomiarów antropometrycznych używając jednakowych skal dla każdego badanego. Pomiary wzrostu wykonane były z dokładnością do 0,5 cm a pomiary masy ciała z dokładnością do 0,1 kg. Indeks masy ciała (body mass index -BMI) wyliczono w/g wzoru: BMI= masa ciała(kg)/wzrost (m)². Wykonano także pomiary obwodu talii w pozycji stojącej (w połowie odległości między łukami żebrowymi a górnym brzegiem talerza kości biodrowej) i obwodu bioder (na wysokości krętarzy większych) za pomocą nieelastycznej miary (z dokładnością do 0.5 cm). Następnie wyliczono dla każdego

pacjenta wskaźnik talia- biodro (waist-to-hip ratio, WHR) wg wzoru: $WHR = \frac{\text{obwód talii(cm)}}{\text{obwód bioder(cm)}}$ [16].

Z badań zostali wykluczeni pacjenci chorujący na cukrzycę typu 1 (T1DM), osoby poniżej 20 i powyżej 75 roku życia oraz u których na podstawie wywiadu, badań klinicznych, biochemicznych, bakteriologicznych i immunologicznych stwierdzono :

- *schorzenia zapalne bądź niewydolność wątroby
- *niewydolność serca
- *zaburzenia funkcji tarczycy
- *niedokrwistość
- *choroby nowotworowe
- *choroby infekcyjne
- *ostre i przewlekłe choroby autoimmunologiczne

Wszyscy pacjenci chorujący na T2DM oraz osoby z grupy wysokiego ryzyka rozwoju cukrzycy (grupa kontrolna) zostali poinformowani celu badań i wyrazili pisemną zgodę na udział. Badania przeprowadzono za zgodą Niezależnej Komisji Bioetycznej Do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym w Gdańsku. Zezwolenie *NKBBN/124/2014*.

5. Uzyskiwanie surowic

Pacjentom chorującym na cukrzycę typu 2 oraz osobom z grupy kontrolnej po uzyskaniu zgody na oddanie krwi do celów badawczych, pobierano 5 ml krwi żyłnej do sterylnej probówki (Vacuette^R Z Serum Clot Activator, Greiner Bio-one GmbH, Austria) na skrzep. Krew odwirowywano w wirówce Humax 4K, Emapol, Polska przez 15 minut, przy szybkości 2500 obr/min a następnie surowicę rozdzielano do sterylnych plastikowych ependorfów o pojemności 0.5 ml. Po zamrożeniu surowicę przechowywano w temperaturze -80° C do dnia badań.

5.1. Pomiar surowiczego poziomu interleukiny 34 oraz fibronektyny.

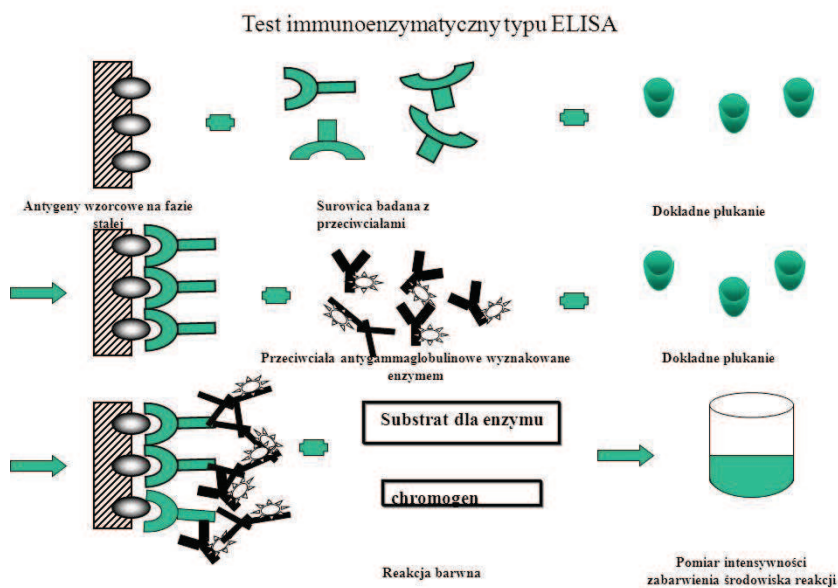
Stężenie interleukiny 34 (IL-34) w surowicy krwi pacjentów z T2DM oraz osób z grupy kontrolnej oznaczono metodą immunoenzymatyczną (ELISA) przy użyciu zestawu Quantikine® firmy R&D Systems (USA), według instrukcji podanej przez producenta. Natomiast stężenie fibronektyny (FN) w surowicy krwi pacjentów z T2DM w surowicy oznaczono metodą immunoenzymatyczną (ELISA) przy użyciu zestawu Technoclone GmbH (Vienna), według instrukcji podanej przez producenta. Odczytu pomiaru absorbancji IL-34 oraz FN dokonano przy pomocy czytnika mikropłytek CHROMATE 4300 (Awareness Technology, Inc. USA) przy długości fali $\lambda=450$ nm. Dolna granica wykrywalności dla IL-34 to 1.78 pg/ml natomiast dla FN 0.002 $\mu\text{g/ml}$.

Badania immunoenzymatyczne zostały wykonane w Zakładzie Endokrynologii Klinicznej i Doświadczalnej Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Kierownik Zakładu - dr hab. n. med. Dominik Rachoń, prof. nadzw.

5.2. Procedura działania testów immunoenzymatycznych ELISA IL-34 oraz FN

Każdy z zestawów zawierał 96-dołkową płytkę opłaszczoną przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko badanemu czynnikowi. Przed nałożeniem badanych próbek, do każdego z dołków dodawano po 100 μl roztworu rozcieńczającego. Następnie na płytkę dodano standard rozcieńczony wg. zaleceń producenta po 200 μl na dołek oraz badane surowice pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 oraz surowice osób z grupy wysokiego ryzyka. Tak przygotowana płytka była inkubowana przez 2 godziny na wstrząsarce (700 ± 100 rpm) w temperaturze pokojowej. Następnie każdy dołek był na płytce był płukany trzykrotnie buforem przygotowanym przez producenta. W kolejnym etapie dodawano po 200 μl koniugatu przeciwciał skierowanych przeciwko badanemu czynnikowi, który sprzężony był z peroksydazą chrzanową. Po 2 godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej, dołki ponownie były płukane, a następnie do każdego z nich dodawano po 200 μl substratu peroksydazy chrzanowej (TMB-tetrametylo-benzydyna). Po 30-minutowej

inkubacji z wytrząsaniem i bez dostępu światła dodawano po 50 μ l kwasu siarkowego (Stop Solution) i była mierzona absorbancja produktu barwnego reakcji enzymatycznej przy długości fali 450 nm na czytniku płytek ChromoMat firmy AWARENESS TECHNOLOGY, INC, USA. Na podstawie absorbancji zmierzonej w dołkach standardowych utworzono krzywą standardową według której był obliczony poziom IL34 oraz FN w surowicach krwi badanych prób. Procedurę działania testów immunoenzymatycznych ELISA przedstawia Rycina 6.



Ryc 6. Działanie testu ELISA

IV. Metody statystyczne

Obliczenia statystyczne zostały przeprowadzone przy użyciu RKWard Data Analysis Tool Version 0.6.1 using KDE Development Platform 4.13.3. Zmienne ilościowe zostały scharakteryzowane za pomocą średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego. Natomiast zmienne typu jakościowego zostały przedstawione za pomocą licznosci oraz wartości procentowych. Do sprawdzenia, czy zmienna ilościowa pochodziła z populacji o rozkładzie normalnym posłużono się testem W Shapiro-Wilka. Istotność różnic dla dwóch zbiorów danych przeprowadzano test F-Snedecora na jednorodność wariancji. W przypadku wykrycia niejednorodności stosowano test Wilcoxon/U-Manna-Whitneya służący stwierdzeniu równości średnich. W przypadku jednorodności użyto testu t-Studenta dla dwóch średnich. Dla większej grupy danych analizę wariancji wykonano testem Bartletta (rozwnięcie testu F-Snedecora na większą liczbę prób). W przypadku wykrycia niejednorodności wariancji, różnice pomiędzy grupami badano stosując test Kruskala-Wallisa. Dla grup z jednorodną wariancją zastosowano test ANOVA. Ponadto wykorzystano test niezależności Chi-kwadrat dla zmiennych jakościowych. W celu stwierdzenia powiązania siły oraz kierunku między dwiema zmiennymi zastosowano analizę korelacji obliczając współczynniki korelacji Pearsona i Spearmana. Do analizy wpływu kilku zmiennych niezależnych na zmienną zależną typu mierzalnego posłużono się regresją wieloraką.

Wartość poszczególnych parametrów klinicznych i biochemicznych w prognozowaniu ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 określono za pomocą krzywych ROC (ROC – *Receiver Operating Curve*) analizując pole pod krzywą AUC (AUC – *Area Under Curve*) oraz czułość i swoistość, podając punkt odcięcia, który charakteryzował się najwyższą czułością i swoistością.

Idealny dyskryminator ma wartość AUC=1, a losowy AUC=0.5. Idealny punkt odcięcia ma czułość i specyficzność równa 1. W prezentowanych analizach do oszacowania punktu odcięcia użyto indeksu Youden'a [176]. Wartości statystyczne dla AUC wyliczano stosując nieparametryczną metodę DeLong'a [177]. Krzywe ROC były porównywane również metodą DeLong'a. W przypadkach koniecznego dopasowania krzywych ROC oraz krzywych ROC z różnymi kierunkami zastosowano nieparametryczną metodą Bootstrap z 2000 krotnym losowaniem próby [178]. Prawdopodobieństwo testowe P lub inaczej graniczny poziom istotności ustalono jako wartość 0.05.

V. Wyniki

5.1. Charakterystyka kliniczna badanych pacjentów z cukrzycą typu 2 oraz osób z grupy ryzyka rozwoju cukrzycy – jako grupy kontrolnej

Badaniem objęto łącznie 72 osoby w tym 49 pacjentów (49% kobiet oraz 51% mężczyzn) chorujących na cukrzycę typu 2 (T2DM) oraz 23 osoby (57% kobiet i 43% mężczyzn) bez rozpoznanej cukrzycy typu 2 lecz obarczone co najmniej 1 czynnikiem ryzyka wystąpienia cukrzycy typu 2, stanowiących grupę kontrolną. Średni wiek badanych pacjentów chorujących na T2DM wynosił 60.9 ± 9.9 lat a czas trwania klinicznie jawnej cukrzycy 7.5 ± 6.3 lat. Natomiast średni wiek grupy kontrolnej wynosił 37.9 ± 10.3 lat. Grupa pacjentów z T2DM była starsza (p=0.00000001) i charakteryzowała się statystycznie znamienne wyższym poziomem BMI (p=0.00001), wskaźnikiem WHR (p=0.0009), obwodem talii (p=0.0004391), obwodem bioder (p=0.01363), poziomem wydalanych albumin z moczem (p=0.000003), kreatyniny (p=0.034), wyższym poziomem HbA1c (p=0.000000001), glukozy na czczo (p=0.000011) oraz ciśnieniem skurczowym (p=0.0022) w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w zakresie płci (p=0.7307), ciśnienia rozkurczowego (p=0.2405) jak też palenia papierosów (p=0.70) pomiędzy grupą pacjentów z T2DM a grupą kontrolną [Tab.3].

Tabela 3. Charakterystyka kliniczna i biochemiczna pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 oraz grupy kontrolnej

Parametry kliniczne	Pacjenci z T2DM	Grupa kontrolna	P
Liczba (n)	49	23	
Płeć kobiety, mężczyźni (%)	49, 51	57, 43	0.7307
Wiek (lata)	60.9 ± 9.9	37.9 ± 10.3	0.00000001*
Czas trwania cukrzycy (lat)	7.47± 6.32	_____	_____
BMI (kg/m ²)	31.90 ± 4.32	25.30 ± 5.54	0.00001*
WHR	0.98 ± 0.10	0.90 ± 0.08	0.0009*
Obwód talii (cm)	103.80± 11.10	90.35± 14.73	0.0004391*
Obwód bioder (cm)	105.55± 7.79	99.22± 11.73	0.01363*

Albuminy (mg/l)	5.10 (3-70.6)	2.77 ± 0.46	0.000003*
Kreatynina (mg/dl)	0.91 ± 0.25	0.80 ± 0.13	0.034*
HbA1c (%)	6.90 ± 1.24	5.37 ± 0.30	0.000000001*
Glukoza na czczo (0 min mg/dl)	122 ± 28	97 ± 8	0.000011*
Ciśnienie skurczowe (mm Hg)	133 ± 9	129 ± 8	0.0022*
Ciśnienie rozkurczowe (mm/Hg)	75 ± 5	78 ± 8	0.2405
Palenie papierosów (obecnie lub w przeszłości do 3 lat)			
Tak (n,%)	21, 43	8, 35	0.70
Nie (n,%)	28, 57	15, 65	

Wyniki przedstawione za pomocą średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego (\pm SD) lub mediany w przypadku rozkładu nienormalnego. Zmienne jakościowe zostały scharakteryzowane jako licznosci oraz wartości procentowe. We wszystkich obliczeniach za poziom istotności przyjęto wartość $p < 0.05$, * różnice znamienne statystycznie pomiędzy grupą pacjentów z cukrzycą typu 2 a badaną grupą kontrolną.

Tabela 4. Charakterystyka kliniczna pacjentów z T2DM oraz osób z grupy kontrolnej w zakresie gospodarki lipidowej

Parametry kliniczne	Pacjenci z T2DM	Grupa kontrolna	P
Cholesterol całkowity (mg/dl)	180.90 ± 47.43	205.04 ± 36.47	0.0213*
Cholesterol HDL (mg/dl)	50.14 ± 15.35	62.04 ± 11.96	0.0007*
Cholesterol LDL (mg/dl)	97.47 ± 40.18	124.39 ± 31,05	0.0029*
Triglicerydy (mg/dl)	163.88 ± 79.10	122.09 ± 58.22	0.0146*

Wyniki przedstawione za pomocą średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego (\pm SD). Za poziom istotności przyjęto wartość $p < 0.05$, * różnice znamienne statystycznie pomiędzy grupą pacjentów z cukrzycą typu 2 a badaną grupą kontrolną.

W grupie pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 wykazano statystycznie istotnie niższy poziom cholesterolu całkowitego ($p = 0.0213$), cholesterolu HDL ($p = 0.0007$), cholesterolu LDL ($p = 0.0029$) natomiast wyższy poziom triglicerydów ($p = 0.0146$) w porównaniu z grupą kontrolną [Tab. 4].

Tabela 5. Porównanie pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 oraz grypy kontrolnej w zakresie leczenia insuliną i/lub doustnymi lekami przeciwcukrzycowymi

Leczenie	Pacjenci z T2DM	Grupa kontrolna	P
Insulina (n,%)			
Tak (n,%)	19, 39	0, 0	0.0014*
Nie (n,%)	30, 61	23, 100	
Dobowa dawka insuliny (IU)	43.37± 24.95	_____	0.0639
Doustne leki przeciwcukrzycowe			
Tak (n, %)	38, 78	6, 26	0.00008*
Nie (n, %)	11, 22	17, 74	

Zmienne jakościowe zostały scharakteryzowane jako liczności oraz wartości procentowe. Za poziom istotności przyjęto wartość $p < 0.05$, * różnice znamienne statystyczne pomiędzy grupą pacjentów z cukrzycą typu 2 a badaną grupą kontrolną.

W badanej grupie pacjentów chorujących na T2DM, 19 (39%) pacjentów było leczonych insuliną, natomiast w grupy kontrolnej żadna osoba (0%) nie była leczona insuliną ($p=0.0014$). Średnia dobowa dawka insuliny u pacjentów z T2DM wyniosła 43.3 ± 24.9 IU. Ponadto w grupie pacjentów chorujących na T2DM 38 (78%) była leczona doustnymi lekami przeciwcukrzycowymi w grupie kontrolnej z kolei 6 osób (26%) była leczona doustnymi lekami przeciwcukrzycowymi ($p=0.00008^*$) [Tab.5].

Tabela 6. Charakterystyka czynników zapalnych w surowicy krwi pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 oraz grupy kontrolnej

Parametry kliniczne	Pacjenci z T2DM	Grupa kontrolna	P
Liczba (n)	49	23	
CRP (mg/l)	2.57 ± 1.78	0.98 ± 0.38	0.00013*
IL-34 (pg/ml)	169.99 ± 94.06	69.67±22.59	0.000000058*
Fibronektyna (µg/ml)	132.25 ± 64.29	86.12 ± 14.52	0.00063*

Wyniki przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego (\pm SD). Za poziom istotności przyjęto wartość $p < 0.05$, *różnice znamienne statystycznie pomiędzy grupą pacjentów z cukrzycą typu 2 a badaną grupą kontrolną.

Grupa pacjentów chorująca na T2DM charakteryzowała się statystycznie znamienne wyższym poziomem białka CRP ($p=0.00013$) jak też wyższym stężeniem IL-34 ($p=0.000000058$) oraz fibronektyny ($p=0.00063$) w porównaniu z grupą kontrolną [Tab. 6].

Tabela 7. Obecność mikroangiopatii, makroangiopatii oraz nadciśnienia tętniczego u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 oraz w grupie kontrolnej

Powikłania	Pacjenci z T2DM	Grupa kontrolna	P
Liczba (n)	49	23	
Mikroangiopatia			
Tak (n, %)	17, 35	0, 0	0.00334*
Nie (n, %)	32, 65	23, 100	
Makroangiopatia			
Tak (n, %)	12, 25	0, 0	0.02378*
Nie (n, %)	37, 75	23, 100	
Nadciśnienie tętnicze			
Tak (n, %)	44, 90	12, 52	0.00105*
Nie (n, %)	5, 10	11, 48	

Zmienne jakościowe zostały scharakteryzowane jako licznosci oraz wartosci procentowe. Za poziom istotności przyjęto wartość $p<0.05$, *różnice znamienne statystyczne pomiędzy grupą pacjentów z cukrzycą typu 2 a badaną grupą kontrolną.

W badanej grupie wykazano pacjentów z T2DM oraz przewlekłymi powikłaniami naczyniowymi a także nadciśnieniem tętniczym. W grupie pacjentów z T2DM obecność mikroangiopatii wykryto u 17 (35%), makroangiopatii u 12 (25%) oraz nadciśnienie tętnicze aż u 44 (90%) chorych. W grupie kontrolnej nie zdiagnozowano mikroangiopatii jak też makroangiopatii cukrzycowej. Natomiast nadciśnienie tętnicze wykryto u 12 (52%) badanych osób [Tab. 7].

Tabela 8. Charakterystyka kliniczna pacjentów z cukrzycą typu 2, powikłaniami naczyniowymi oraz nadciśnieniem tętniczym

Parametry Kliniczne	Pacjenci z cukrzycą typu 2 oraz z			P
	Mikroangopatią	Makroangopatią	nadciśnieniem tętniczym	
Liczba (n)	17	12	44	
Płeć, K/ M (%)	64.71 , 35.29	33.33 , 66.67	47.73 , 52.27	0.2367
Wiek	64.41 ± 7.87	64.33 ± 7.52	60.91 ± 10.37	0.1535
Wiek (lat)				
I. > 60 lat (61+)	I. 67.28 ± 3.93	I. 67.89 ± 3.98	I. 66.77 ± 4.04	0.6173
II. ≤ 60 lat	II. 51 ± 8.19	II. 53.67 ± 4.51	II. 48.36 ± 8.37	0.4310
Czas trwania cukrzycy (lat)	10.82 ± 8.72	8.75 ± 9.09 5.50 (2 - 34)	7.39 ± 6.42	0.1082
Czas trwania choroby (lat)				
I. ≥10 lat	I. 18.25 ± 7.19	I. 16.2 ± 10.16	I. 15.67 ± 6.71	0.4632
II. < 10 lat	II. 4.22 ± 1.64	II. 3.43 ± 1.81	II. 4.28 ± 2.16	0.7444
BMI (kg/m²)	33.24 ± 4.24	32.25 ± 3.49	32.20 ± 4.16	0.4059
BMI (kg/m²)				
I. do 29,9 (norma+ nadw)	I. 28 ± 1.41	I. 28.25 ± 0.96	I. 27.75 ± 1.24	0.5898
II. 30-34,9	II. 33.16 ± 1.33	II. 32.8 ± 0.8	II. 32.63 ± 1.26	0.3570
III. ≥ 35	III. 37.67 ± 1.75	III. 36.67 ± 1.53	III. 37.58 ± 1.62	0.9830
WHR (cm/cm)	0.98 ± 0.1	1.00 ± 0.10	0.99 ± 0.10	0.8469
Obwód talii (cm)	106.47 ± 12.98	107.42 ± 10.25	104.64 ± 10.85	0.3985
Obwód bioder (cm)	108.53 ± 9.12	107.67 ± 9.06	105.98 ± 8.06	0.3985
Albuminy (mg/l)	27.11 ± 25.43	5.10 (3-68)	5.10 (3-7.60)	0.0679
Kreatynina (mg/dl)	0.97 ± 0.33	1.02 ± 0.27	0.92 ± 0.26	0.3965
HbA1c (%)	7.31 ± 1.37	7.28 ± 1.66	6.79 ± 1.24	0.1406
Glukoza na czczo (0 min, mg/dl)	122.35 ± 31.63	117.25 ± 32.05	121.5 ± 27.12	0.9961
Ciśnienie skurczowe (mm/Hg)	136 ± 9	134 ± 10	133 ± 9	0.3681
Ciśnienie rozkurczowe (mm/Hg)	75 ± 5	74 ± 6	75 ± 5	0.9646
Palenie papierosów (obecnie lub w przeszłości do 3 lat)				
Tak (n,%)	Tak 8 , 47	Tak 5 , 42	Tak 18 , 41	0.9078
Nie (n,%)	Nie 9 , 53	Nie 7 , 58	Nie 26 , 59	

Wyniki przedstawione za pomocą średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego (± SD) lub mediany(albuminy) w przypadku rozkładu nienormalnego. Znamienne jakościowe zostały scharakteryzowane jako licznosci oraz wartości procentowe. We wszystkich obliczeniach za poziom istotności przyjęto wartość p<0.05.

W dalszym etapie badań porównując grupę pacjentów z T2DM oraz mikroangiopatią z grupą T2DM oraz makroangiopatią oraz z T2DM i nadciśnieniem tętniczym nie wykazano istotnie znamienych różnic odnośnie płci, wieku, czasu trwania cukrzycy zarówno do 10 lat trwania choroby jak też powyżej 10 lat (odpowiednio $p=0.2367$; $p=0.1535$; $p=0.4632$; $p=0.7444$). Nie wykazano także istotnie znamienych różnic pomiędzy badanymi grupami w zakresie BMI, do 29.9 kg/m^2 , $30\text{-}34,9 \text{ kg/m}^2$ oraz $\geq 35 \text{ kg/m}^2$ (odpowiednio $p=0.5898$; $p=0.3570$; $p=0.9830$) jak też w zakresie WHR ($p=0.8469$) oraz obwodu talii ($p=0.3985$) i bioder ($p=0.3985$). Co więcej nie wykryto istotnie znamienych różnic pomiędzy badanymi grupami w zakresie poziomu wydalanych albumin ($p=0.0679$), kreatyniny ($p=0.3965$) jak też poziomu HbA1c ($p=0.1406$) oraz poziomu glukozy na czczo ($p=0.9961$), ciśnienia skurczowego ($p=0.3681$), rozkurczowego ($p=0.9646$) a także palenia papierosów ($p=0.9078$) [Tab.8].

Tabela 9. Charakterystyka kliniczna pacjentów z T2DM, powikłaniami naczyniowymi oraz nadciśnieniem tętniczym w zakresie gospodarki lipidowej

Parametry Kliniczne	Pacjenci z cukrzycą typu 2 oraz z			P
	Mikroangopatią	Makroangopatią	nadciśnieniem tętniczym	
Cholesterol całkowity (mg/dl)	168.35 ± 29.22	150.08 ± 49.75	181.73 ± 47.82	0.1661
Triglicerydy (mg/dl)	156.82 ± 55.82	142.92 ± 78.31	167.52 ± 81.43	0.5091677
Triglicerydy(mg/dl)				
I. <150 (mg/dl)	I. 97.33 ± 20.33	I. 94.43 ± 11.55	I. 106.55 ± 31.69	0.5229926
II. > 150 (mg/dl)	II. 189.27 ± 38.69	II. 210.8 ± 82.41	II. 228.5 ± 69.17	0.09898975
HDL (mg/dl)	49.94 ± 16.90	41.5 ± 8.28	50.45 ± 16.01	0.2324147
HDL (mg/dl)				
I. K \geq 45	I. 66 ± 16.41	I. --	I. 62.84 ± 11.92	
II. K<45	II. 36.2 ± 4.55	II. 35.67 ± 3.06	II. 37.13 ± 4.12	0.6604785
III. M \geq 40	III. 48.8 ± 6.34	III. 44.8 ± 3.19	III. 56 ± 14.18	0.1499071
IV. M<40	IV. -	IV. 35.33 ± 4.73	IV. 33.25 ± 4.40	0.5346669
LDL (mg/dl)	85.71 ± 25.43	80 ± 40.62	97.18 ± 40.69	0.206291
LDL (mg/dl)				
I. <100	I. 75.86 ± 11.17	I. 64.3 ± 19.32	I. 71.15 ± 16.53	0.5099705
II. >100	II. 131.67 ± 22.72	II. 158.5 ± 2.12	II. 134.78 ± 35.39	0.890909

Wyniki przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego (\pm SD). Za poziom istotności przyjęto wartość $p<0.05$.

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w zakresie poziomu cholesterolu całkowitego ($p=0.1661$), triglicerydów (zarówno w zakresie <150 mg/dl jak i >150 mg/dl, $p=0.5229926$ i $p=0.09898975$ odpowiednio), cholesterolu HDL (dla kobiet w zakresie ≥ 45 mg/dl i <45 mg /dl , $p=0.6604785$ oraz dla mężczyzn ≥ 40 mg/dl i <40 mg /dl , $p=0.1499071$ i $p=0.5346669$ odpowiednio) jak i cholesterolu LDL (dla wartości <100 mg/dl i >100 mg/dl , $p=0.5099705$ i $p=0.890909$ odpowiednio) w grupie pacjentów z T2DM oraz mikroangiopatią z makroangiopatią oraz nadciśnieniem tętniczym [Tab. 9]

Tabela 10. Porównanie pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2, powikłaniami naczyniowymi oraz nadciśnieniem tętniczym w zakresie stosowanej farmakoterapii

Parametry Kliniczne	Pacjenci z cukrzycą typu 2 oraz z			P
	Mikroangiopatią	makroangiopatią	nadciśnieniem tętniczym	
Leki cholesterolowe:				0.6956
Statyna (n, %)	12 , 71	12 , 100.00	31 , 70	
Fibrat (n, %)	5 , 29	1 , 8	10 , 23	
Terapia łączona (statyna+fibrat)	1 , 6	1 , 8	3 , 7	
Insulina (n, %)	Tak (11, 64.71) Nie (6, 35,29)	Tak 7, 58.33 Nie 5, 41,67	Tak 17, 38.64 Nie 27, 61,36	0.1381
Leki przeciwcukrzycowe (n, %)	14 , 82.35	11 , 91.67	34 , 77.27	0.9771
SM (sulfonilomocznik) (n, %)	7, 41.18	7, 58.33	19 , 43.18	
MET (metformina) (n, %)	10 , 58.82	8, 66.67	30 , 68.18	

Zmienne jakościowe zostały scharakteryzowane jako licznosci oraz wartosci procentowe. Za poziom istotności przyjęto wartość $p<0.05$.

Nie wykryto istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą pacjentów z T2DM oraz mikroangiopatią, makroangiopatia jak też nadciśnieniem tętniczym w zakresie leczenia lekami hipolipemizującymi, insuliną oraz/lub lekami przeciwcukrzycowymi $p=0.6956$, $p=0.1381$, $p=0.9771$ odpowiednio.[Tab.10]

Tabela 11. Ocena czynników zapalnych w surowicy krwi pacjentów chorujących na T2DM z mikroangiopatią, makroangiopatią oraz nadciśnieniem tętniczym

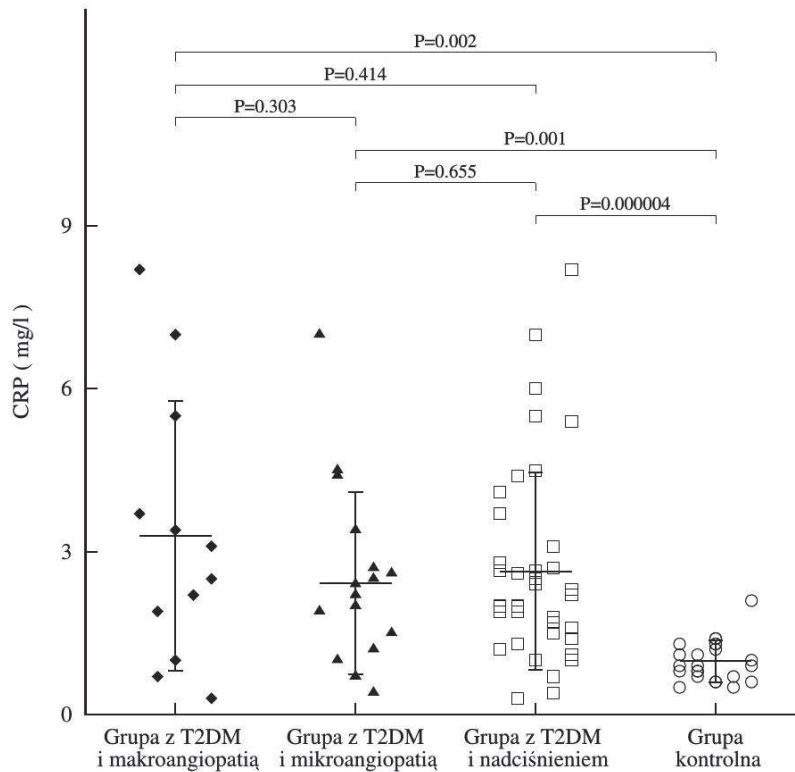
Parametry Kliniczne	Pacjenci z cukrzycą typu 2 oraz z			P
	Mikroangiopatią	makroangiopatią	nadciśnieniem tętniczym	
CRP (mg/l)	2.42 ± 1.68	3.29 ± 2.48	2.64 ± 1.82	0.8537
IL-34 (pg/ml)	243.4 ± 100.37	225.14 ± 85.93	173.84 ± 92.84	0.0070*
Fibronektyna (µg/ml)	173.89 ± 73.86	200.45 ± 64.48	135.08 ± 66.47	0.0189*

Wyniki przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego (\pm SD). Za poziom istotności przyjęto wartość $p < 0.05$, *różnice znamienne statystyczne pomiędzy grupą pacjentów z cukrzycą typu 2 mikroangiopatią, makroangiopatią oraz nadciśnieniem tętniczym.

W badanej grupie pacjentów z T2DM oraz z mikro- i makroangiopatią oraz nadciśnieniem tętniczym wykazano natomiast statystycznie istotną różnicę w zakresie surowiczych stężeń IL-34 ($p=0.0070$) oraz fibronektyny ($p=0.0189$) ale nie wykryto istotnie znamienych różnic poziomu białka CRP ($p=0.8537$) pomiędzy badanymi grupami [Tab.11].

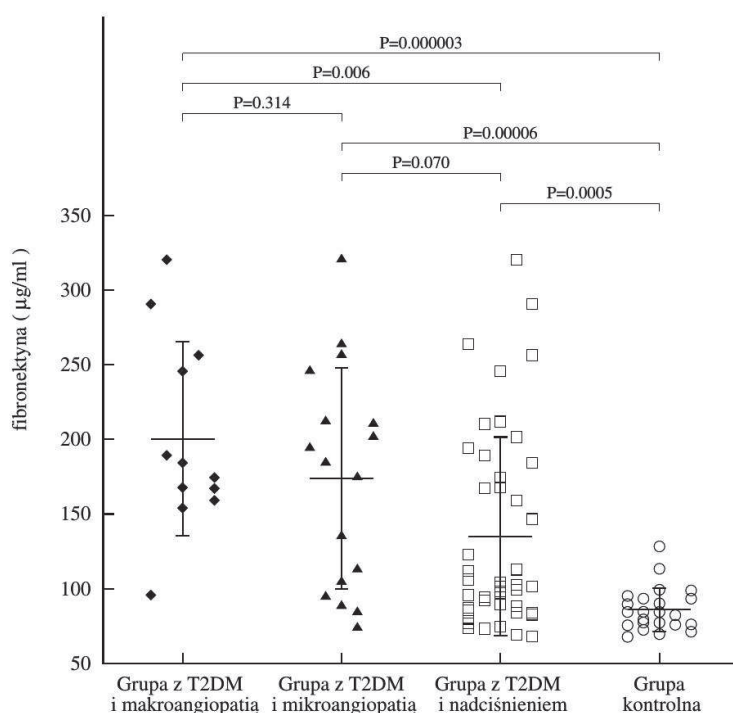
5.2. Porównanie surowiczych stężeń czynników zapalnych (CRP, IL34, fibronektyny) u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 oraz w grupie kontrolnej

Rycina 7. Stężenie białka CRP u pacjentów chorujących na T2DM oraz z mikroangiopatią, makroangiopatią, nadciśnieniem tętniczym oraz w grupie kontrolnej.



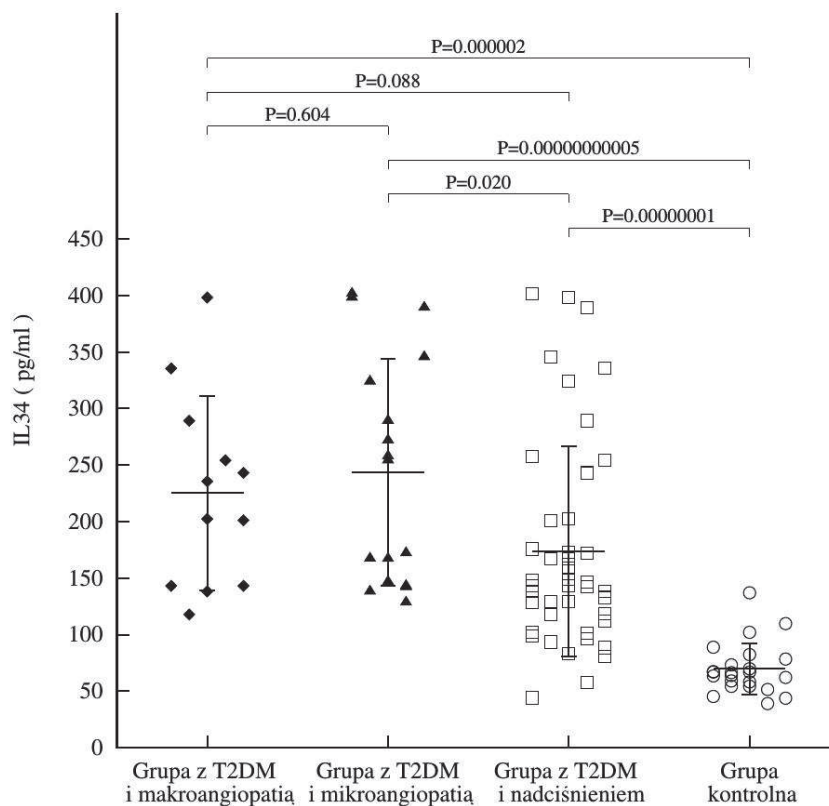
Poziom białka C-reaktywnego u pacjentów z T2DM oraz makroangiopatią był statystycznie istotnie wyższy w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0.002$). Natomiast nie wykazano istotnych różnic ($p=0.303$) w poziomie białka CRP w grupie pacjentów z T2DM i makroangiopatią w porównaniu do grupy chorych z T2DM i mikroangiopatią jak też w porównaniu z grupą pacjentów z T2DM lecz z nadciśnieniem tętniczym ($p=0.414$). Nie wykazano również istotnych statystycznie różnic surowiczego stężenia białka CRP w grupie pacjentów z T2DM oraz mikroangiopatią w porównaniu do chorych z T2DM lecz z nadciśnieniem tętniczym ($p=0.655$). Wykryto natomiast istotnie wyższe stężenie białka CRP w grupie pacjentów z T2DM oraz mikroangiopatią w porównaniu ze stężeniem surowiczego CRP u osób z grupy kontrolnej ($p=0.001$). Wyższe stężenie białka CRP wykryto także u pacjentów z T2DM oraz nadciśnieniem tętniczym w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0.000004$).

Rycina 8. Stężenie fibronektyny u pacjentów chorujących na T2DM oraz z mikroangiopatią, makroangiopatią, nadciśnieniem tętniczym oraz w grupie kontrolnej



W grupie chorych z T2DM i makroangiopatią wykryto istotnie wyższe ($p=0.006$) surowicze stężenie fibronektyny w porównaniu do grupy pacjentów z T2DM i nadciśnieniem tętniczym oraz w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0.000003$). Natomiast nie wykazano istotnych różnic surowiczego stężenia fibronektyny w grupie pacjentów z T2DM i makroangiopatią w porównaniu do grupy chorych z T2DM i mikroangiopatią ($p=0.314$). Ponadto w grupie pacjentów z T2DM oraz mikroangiopatią stwierdzono statystycznie znamienne wyższe surowicze stężenie fibronektyny ($p=0.000006$) w porównaniu do osób z grupy kontrolnej. Jednakże nie wykazano istotnie znamienych różnic stężenia fibronektyny w grupie pacjentów z T2DM oraz mikroangiopatią w porównaniu do chorych z T2DM lecz z nadciśnieniem tętniczym ($p=0.070$). Natomiast istotnie wyższe ($p=0.0005$) stężenie fibronektyny wykryto u pacjentów z T2DM oraz nadciśnieniem tętniczym w porównaniu z grupą kontrolną.

Rycina 9. Stężenie IL34 u pacjentów chorujących na T2DM oraz z mikroangiopatią, makroangiopatią, nadciśnieniem tętniczym oraz w grupie kontrolnej



W badanej grupie chorych z T2DM i makroangiopatią wykryto istotnie wyższe ($p=0.000002$) surowicze stężenie IL34 w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast nie wykazano istotnych różnic ($p=0.604$) surowiczego stężenia IL34 w grupie pacjentów z T2DM i makroangiopatią w porównaniu do grupy chorych z T2DM i mikroangiopatią jak też w porównaniu z grupą pacjentów z T2DM oraz nadciśnieniem tętniczym ($p=0.088$). Natomiast wykryto statystycznie znamienne wyższe surowicze stężenie IL34 w grupie pacjentów z T2DM oraz mikroangiopatią w porównaniu ze średnim stężeniem IL34 u pacjentów z T2DM i nadciśnieniem tętniczym ($p=0.020$) jak też w porównaniu do osób z grupy kontrolnej ($p=0.0000000005$). Znamienne ($p=0.00000001$) wyższe stężenie IL34 wykryto także w grupie pacjentów z T2DM oraz nadciśnieniem w porównaniu do grupy kontrolnej.

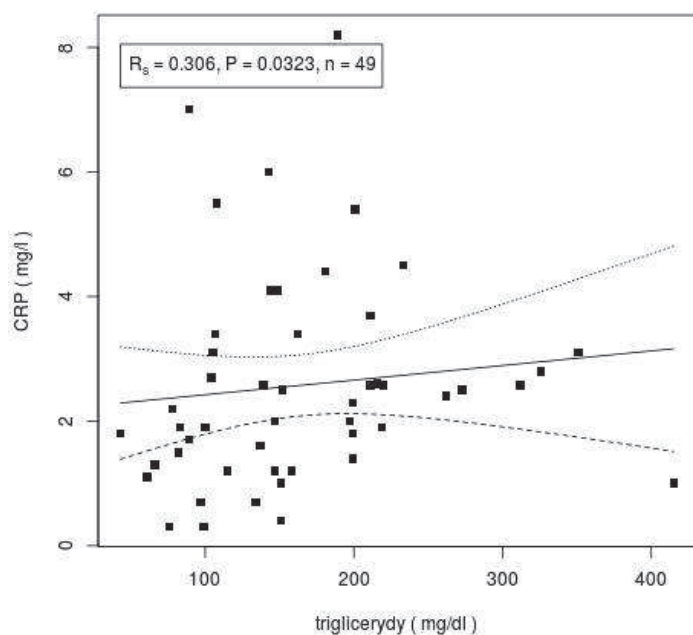
5.3. Badanie związku pomiędzy parametrami klinicznymi a surowiczym stężeniem białka CRP, IL-34 oraz fibronektyny u pacjentów chorujących na T2DM oraz w grupie kontrolnej

Celem następnego etapu pracy było badanie związku pomiędzy parametrami klinicznymi i biochemicznymi a stężeniem CRP, IL-34 oraz fibronektyny w surowicy krwi pacjentów chorujących na T2DM oraz w grupie kontrolnej. Obliczono zatem współczynniki korelacji rang Spearmana w 5 grupach tj. grupie pacjentów chorujących na T2DM, w grupie pacjentów z T2DM oraz z mikroangiopatią w grupie z T2DM oraz makroangiopatią w grupie z T2DM oraz nadciśnieniem tętniczym jak też w grupie kontrolnej.

5.3.1. Badanie związku pomiędzy surowiczym stężeniem CRP a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 oraz w grupie kontrolnej

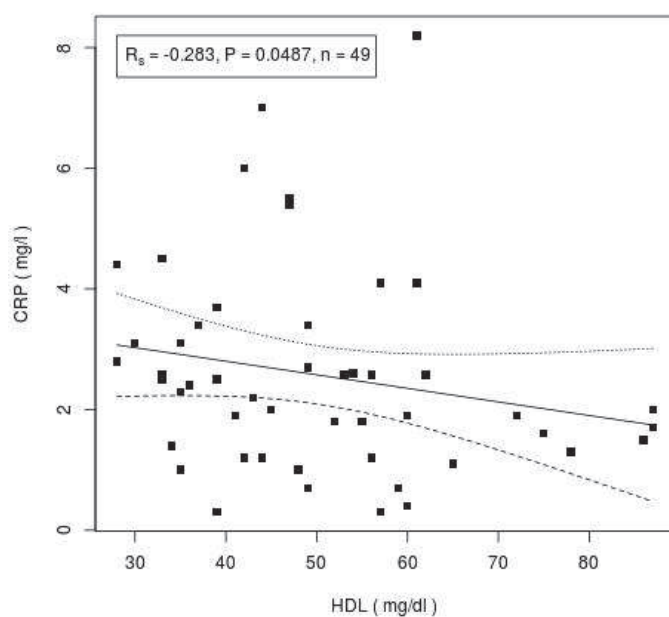
5.3.1.1. Związek pomiędzy surowiczym poziomem CRP a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM

Ryc. 10. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem białka CRP a poziomem triglicerydów u pacjentów chorujących na T2DM ($R_s=0.306$; $p=0.0323$)



W grupie pacjentów chorujących na T2DM wykryto statystycznie istotną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem CRP a poziomem triglicerydów ($R_s=0.306$; $p=0.0323$), **Ryc. 10**.

Ryc. 11. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem białka CRP a poziomem cholesterolu frakcji HDL u pacjentów chorujących na T2DM ($R_s=-0.283$; $p=0.0487$)

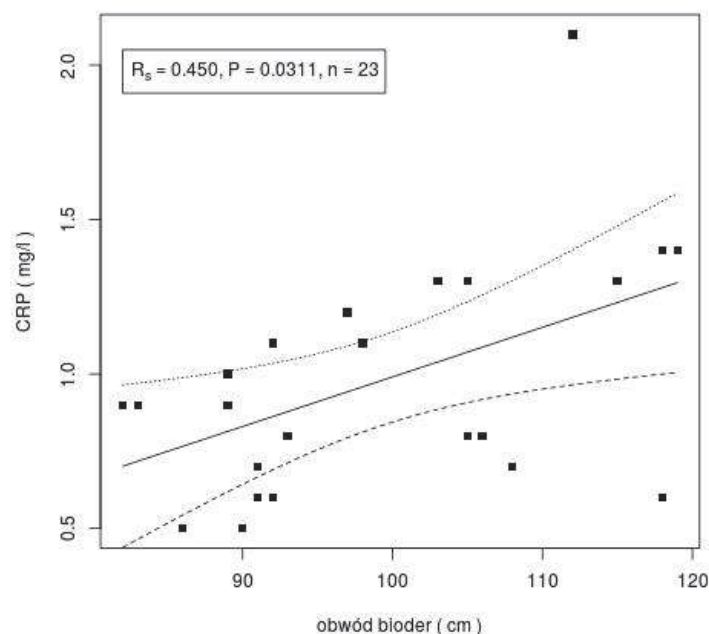


W grupie pacjentów chorujących na T2DM wykryto statystycznie istotną ujemną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem CRP a poziomem cholesterolu frakcji HDL ($R_s = -0.283$; $p = 0.0487$). **Ryc.11.**

Poza tym nie wykryto zależności statystycznie istotnych w grupie pacjentów chorujących na T2DM pomiędzy poziomem CRP a wiekiem, czasem trwania cukrzycy, wskaźnikiem BMI, WHR, obwodem bioder, obwodem talii, poziomem HbA1c, fibronektyny, jak też ciśnieniem skurczowym i rozkurczowym, poziomem cholesterolu całkowitego oraz cholesterolu frakcji LDL.

5.3.1.2. Związek pomiędzy surowiczym poziomem CRP a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u osób w grupie kontrolnej

Ryc. 12. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem CRP a obwodem bioder u osób w grupie kontrolnej ($R_s = 0.450$; $p = 0.0311$)



W grupie kontrolnej wykazano statystycznie istotną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem CRP a obwodem bioder ($R_s = 0.450$; $p = 0.0311$), **Ryc. 12.**

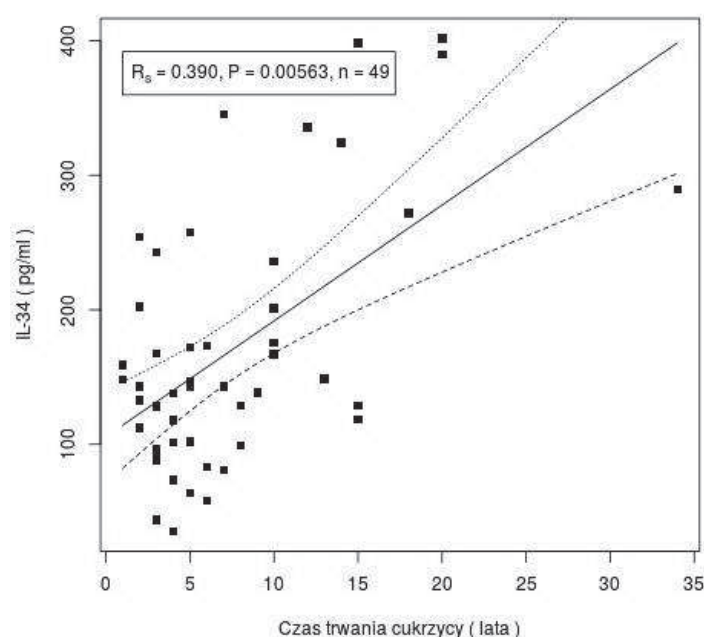
Poza tym nie wykryto statystycznie istotnych zależności w grupie kontrolnej pomiędzy poziomem CRP a wiekiem, wskaźnikiem BMI, WHR, poziomem glukozy na czczo, poziomem HbA1c jak też ciśnieniem skurczowym i rozkurczowym, poziomem cholesterolu całkowitego, cholesterolu zarówno frakcji LDL jak też HDL oraz triglicerydów.

5.3.2. Badanie związku pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 oraz w grupie kontrolnej

5.3.2.1. Związek pomiędzy surowiczym poziomem IL-34 a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM

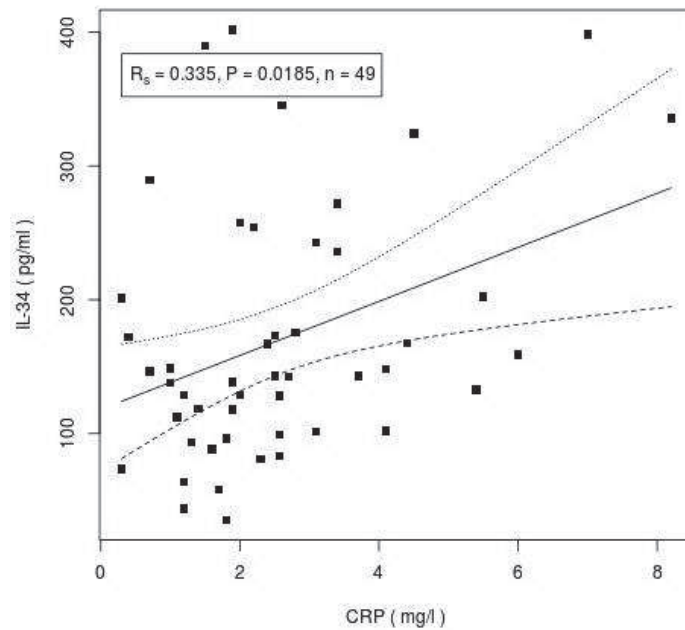
Badanie związku pomiędzy surowiczym poziomem IL-34 a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi w grupie wszystkich pacjentów chorujących na T2DM.

Ryc. 13. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a czasem trwania cukrzycy u pacjentów chorujących na T2DM ($R_s=0.390$, $p=0.00563$)



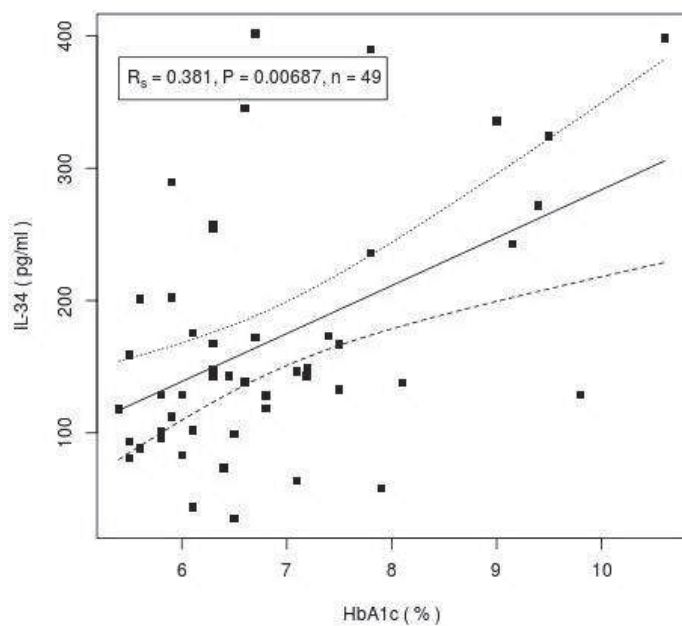
W grupie pacjentów chorujących na T2DM wykryto statystycznie istotną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a czasem trwania cukrzycy ($R_s=0.390$, $p=0.00563$) **Ryc. 13**

Ryc. 14. Związek między surowiczym stężeniem IL-34 a poziomem białka CRP u pacjentów chorujących na T2DM ($R_s= 0.335$, $p= 0.0185$)



W grupie pacjentów chorujących na T2DM wykryto statystycznie istotną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a białkiem CRP ($R_s= 0.335$; $p= 0.0185$) **Ryc. 14.**

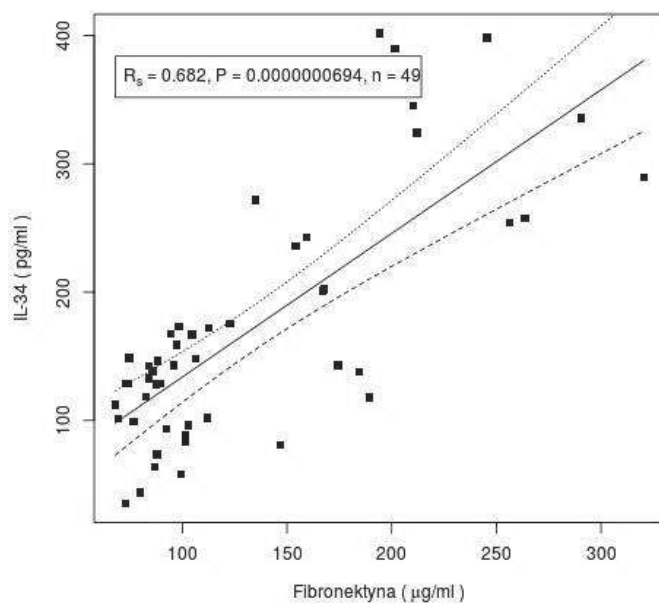
Ryc. 15. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a poziomem HbA1c u pacjentów chorujących na T2DM ($R_s=0.381$; $p=0.00687$)



W grupie pacjentów chorujących na T2DM wykryto statystycznie istotną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a poziomem HbA1c ($R_s=0.381$; $p=0.00687$)

Ryc. 15.

Ryc. 16. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a stężeniem fibronektyny u pacjentów chorujących na T2DM ($R_s=0.682$; $p=0.0000000694$)



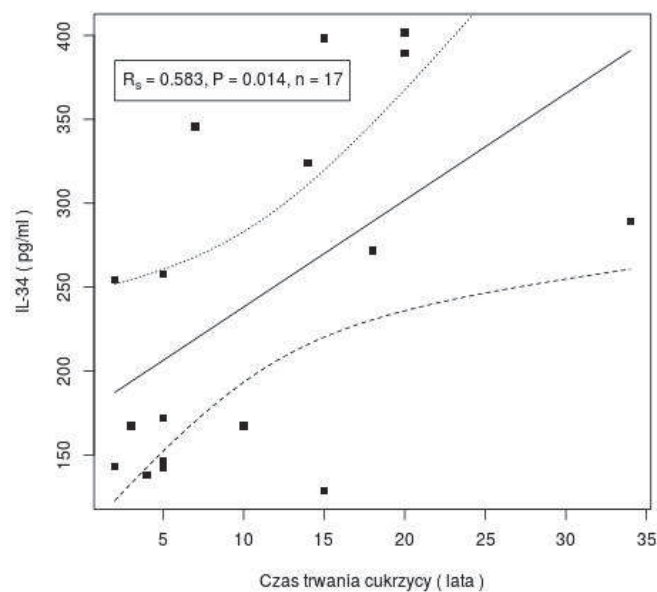
W grupie pacjentów chorujących na T2DM wykryto statystycznie istotną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a poziomem fibronektyny ($R_s=0.682$; $p=0.0000000694$), **Ryc. 16**.

Poza tym nie wykryto zależności statystycznie istotnych w grupie pacjentów chorujących na T2DM pomiędzy poziomem IL-34 a wiekiem, wskaźnikiem BMI, obwodem bioder, poziomem białka CRP, fibronektyny, poziomem HbA1c, jak też ciśnieniem skurczowym i rozkurczowym, poziomem cholesterolu całkowitego, cholesterolu HDL, cholesterolu LDL oraz triglicerydów.

5.3.2.2. Związek pomiędzy surowiczym poziomem IL-34 a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM oraz mikroangiopatią

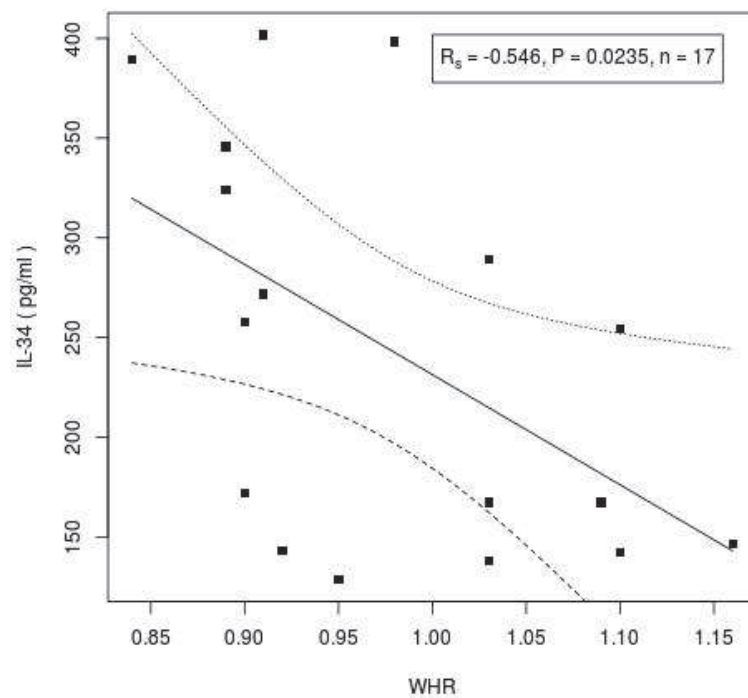
Badanie związku pomiędzy poziomem IL34 a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi w grupie pacjentów chorujących na T2DM oraz z mikroangiopatią

Ryc. 17. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a czasem trwania cukrzycy u pacjentów chorujących na T2DM oraz z mikroangiopatią ($R_s=0.583$, $p=0.014$)



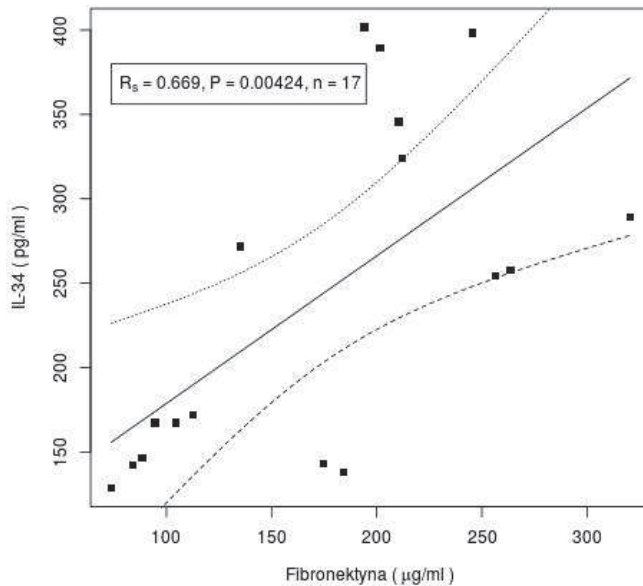
W badanej grupie pacjentów chorujących na T2DM oraz z mikroangiopatią wykryto statystycznie istotną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a czasem trwania cukrzycy ($R_s=0.583$, $p=0.014$), **Ryc.17**.

Ryc.18. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a WHR u pacjentów chorujących na T2DM oraz z mikroangiopatią ($R_s=-0.546$, $p=0.0235$)



W badanej grupie pacjentów chorujących na T2DM oraz z mikroangiopatią wykryto statystycznie istotną ujemną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a wskaźnikiem WHR ($R_s=-0.546$, $p=0.0235$) **Ryc.18**.

Ryc. 19. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a fibronektyną u pacjentów chorujących na T2DM oraz z mikroangiopatią ($R_s=0.669$, $p=0.00424$)



W badanej grupie pacjentów chorujących na T2DM oraz z mikroangiopatią wykryto istotną zależność pomiędzy surowiczym poziomem IL-34 a poziomem fibronektyny ($R_s=0.669$, $p=0.00424$) **Ryc. 19.**

Poza tym nie wykryto statystycznie istotnych zależności w grupie pacjentów chorujących na T2DM oraz z mikroangiopatią pomiędzy poziomem IL-34 a wiekiem, wskaźnikiem BMI, obwodem bioder, poziomem białka CRP, fibronektyny, poziomem HbA1c, jak też ciśnieniem skurczowym i rozkurczowym, poziomem cholesterolu całkowitego, cholesterol HDL, cholesterol LDL oraz triglicerydów.

5.3.2.3 Związek pomiędzy stężeniem IL-34 a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM oraz z makroangiopatią

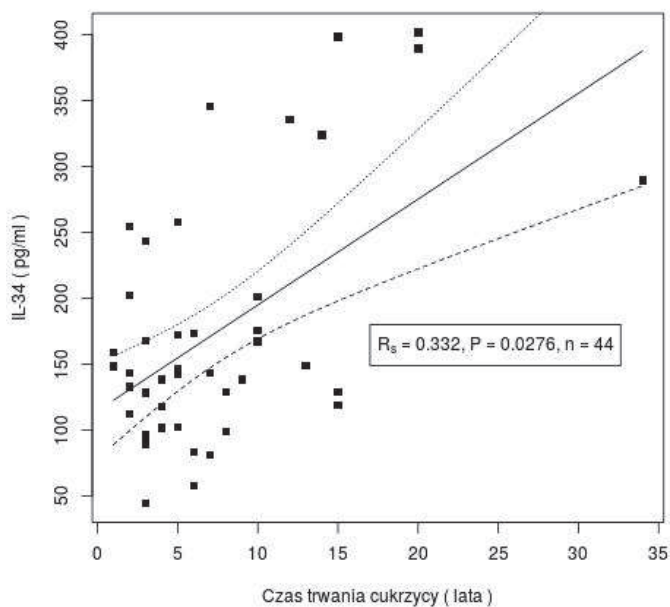
Badano związek pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi w grupie pacjentów chorujących na T2DM oraz z makroangiopatią.

Nie wykryto zależności istotnie statystycznych pomiędzy poziomem IL-34 a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi w grupie pacjentów chorujących na T2DM oraz z makroangiopatią.

5.3.2.4 Związek pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM oraz z nadciśnieniem tętniczym

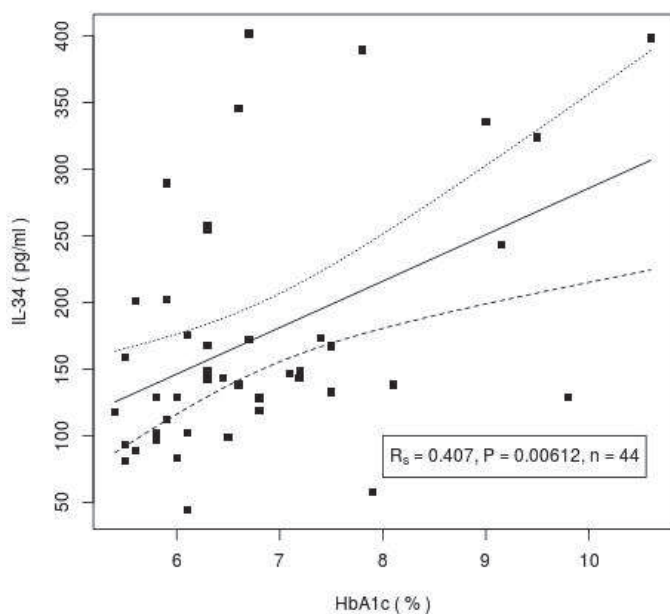
Badanie związku pomiędzy poziomem IL-34 a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi w grupie pacjentów chorujących na T2DM i z nadciśnieniem tętniczym.

Ryc.20. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a czasem trwania cukrzycy u pacjentów chorujących na T2DM oraz z nadciśnieniem tętniczym ($R_s=0.332$, $p=0.0276$)



W badanej grupie pacjentów chorujących na T2DM oraz z nadciśnieniem tętniczym wykryto statystycznie istotną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a czasem trwania cukrzycy ($R_s=0.332$, $p=0.0276$), **Ryc. 20**.

Ryc. 21. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a poziomem HbA1c u pacjentów chorujących na T2DM oraz z nadciśnieniem tętniczym ($R_s=0.407$, $p=0.00612$)

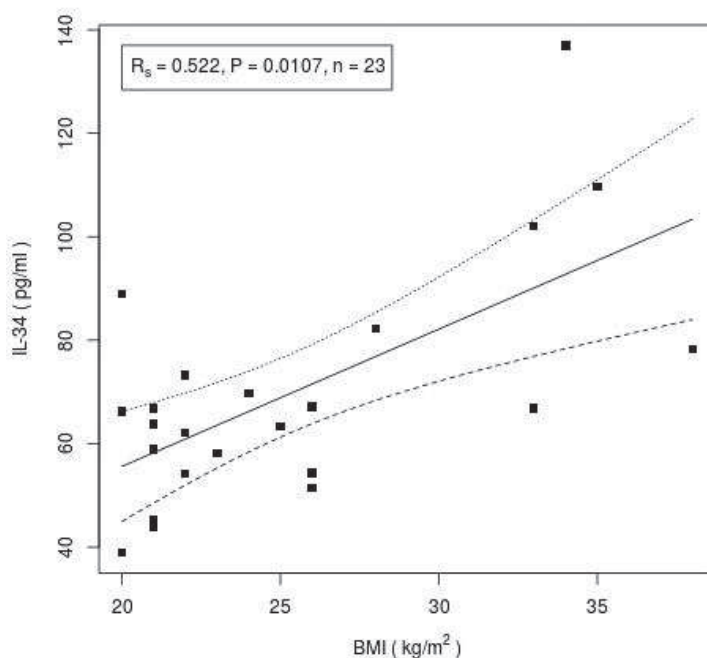


W badanej grupie pacjentów chorujących na T2DM oraz z nadciśnieniem tętniczym wykryto statystycznie istotną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem IL34 a poziomem HbA1c ($R_s=0.407$, $p=0.00612$) **Ryc. 21**.

5.3.2.5. Związek pomiędzy poziomem IL-34 a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u osób z grupy kontrolnej

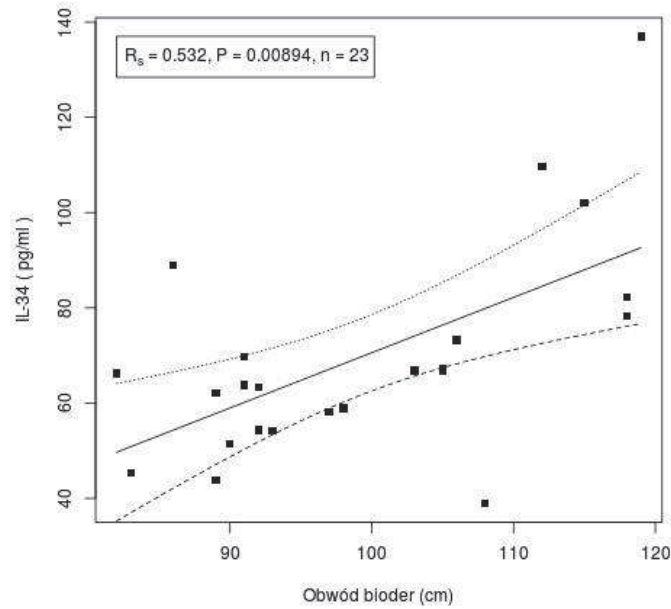
Badanie związku pomiędzy poziomem IL-34 a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u osób z grupy kontrolnej.

Ryc.22. Związek pomiędzy surowiczym poziomem IL-34 a wskaźnikiem BMI u osób z grupy kontrolnej ($R_s=0.522$, $P= 0.0107$)



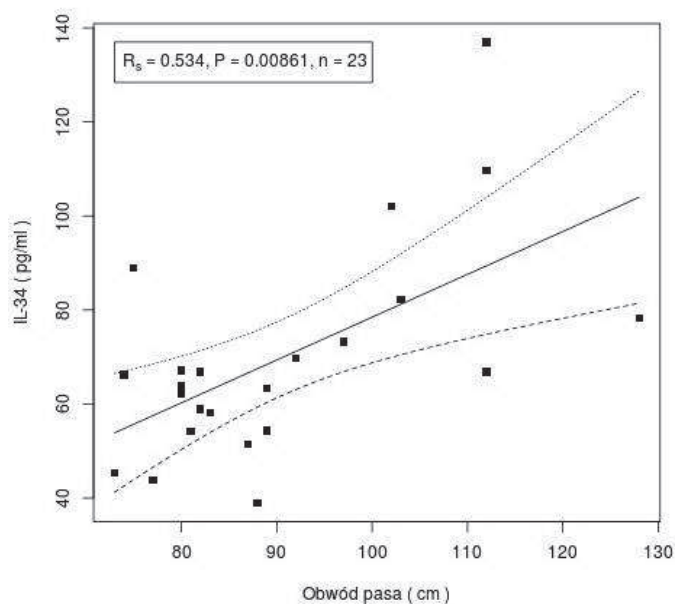
W badanej grupie osób grupy kontrolnej wykryto statystycznie istotną zależność pomiędzy surowiczym poziomem IL-34 a wskaźnikiem BMI ($R_s=0.522$, $P= 0.0107$) **Ryc. 22**.

Ryc. 23 Związek pomiędzy poziomem IL-34 a obwodem bioder u osób z grupy kontrolnej ($R_s=0.532$, $P=0.00894$)



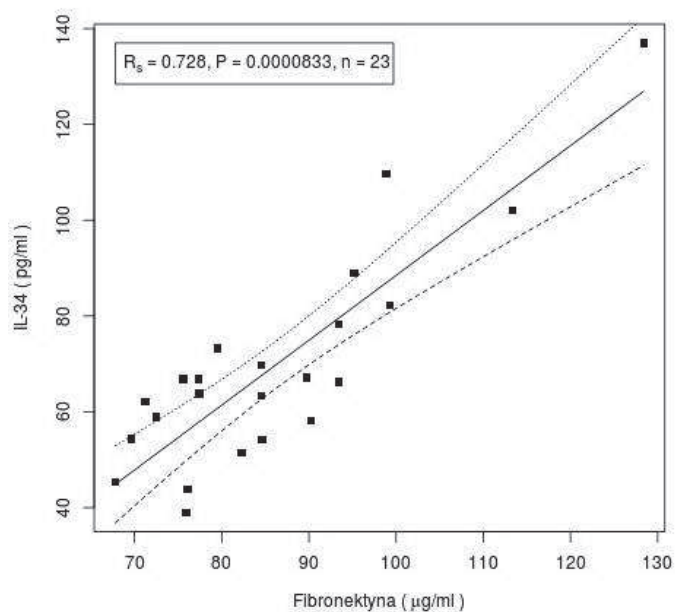
W badanej grupie osób grupy kontrolnej wykryto statystycznie istotną zależność pomiędzy surowiczym poziomem IL-34 a obwodem bioder ($R_s=0.532$, $P=0.00894$) (**Ryc. 23**)

Ryc.24. Związek pomiędzy surowiczym poziomem IL-34 a obwodem pasa u pacjentów z grupy kontrolnej ($R_s=0.534$, $P=0.00861$)



W badanej grupie osób grupy kontrolnej wykryto statystycznie istotną zależność pomiędzy surowiczym poziomem IL-34 a obwodem pasa ($R_s=0.534$, $P=0.00861$) **Ryc. 24.**

Ryc.25. Związek pomiędzy surowiczym poziomem IL-34 a poziomem fibronektyny u osób z grupy kontrolnej ($R_s=0.782$, $P=0.0000833$)



W badanej grupie osób z grupy kontrolnej wykryto istotną zależność pomiędzy surowiczym poziomem IL-34 a poziomem fibronektyny ($R_s=0.782$, $P=0.0000833$) **Ryc. 25.**

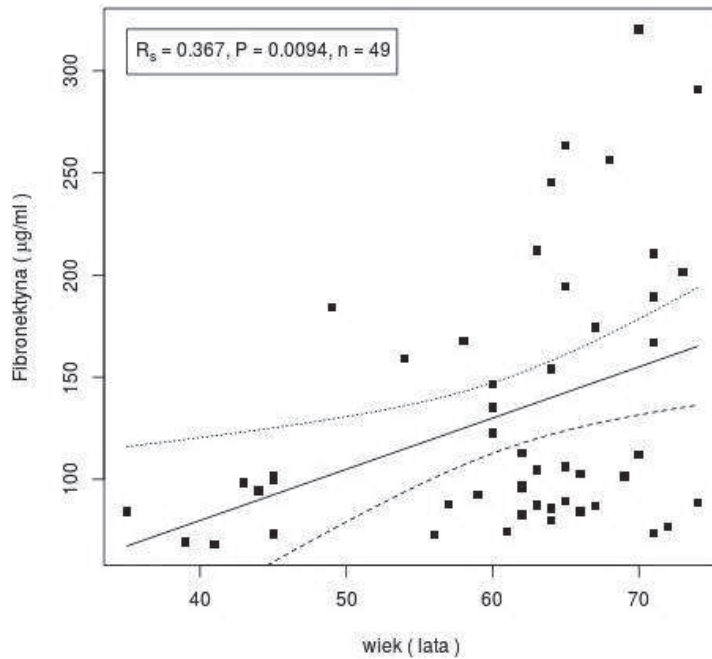
Poza tym nie wykryto zależności statystycznie istotnych w grupie kontrolnej pomiędzy poziomem IL-34 a wiekiem WHR, poziomem białka CRP, poziomem HbA1c jak też ciśnieniem skurczowym i rozkurczowym, poziomem cholesterolu całkowitego, cholesterolu HDL, cholesterolu LDL oraz triglicerydów.

5.3.3. Analiza zależności pomiędzy surowiczym poziomem fibronektyny a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 oraz w grupie kontrolnej

5.3.3.1. Związek pomiędzy surowiczym poziomem fibronektyny a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM

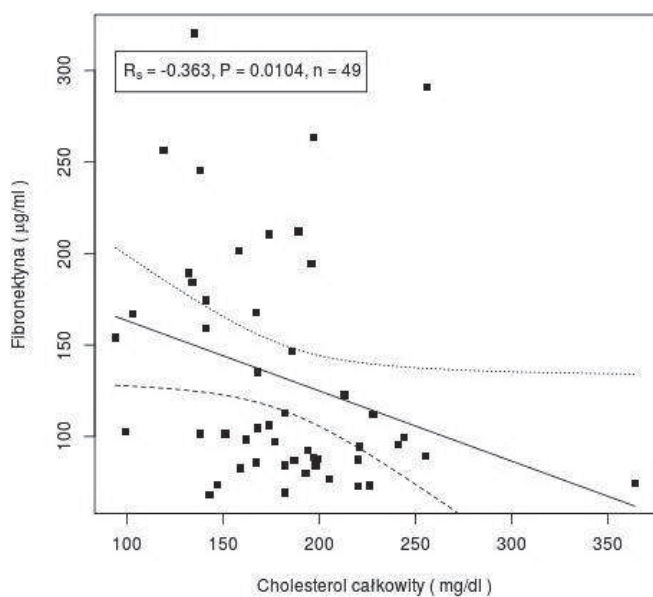
Badanie związku pomiędzy surowiczym poziomem fibronektyny a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi w grupie pacjentów chorujących na T2DM.

Ryc. 26. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a wiekiem pacjentów chorujących na T2DM ($R_s=0.367$, $p=0.0094$)



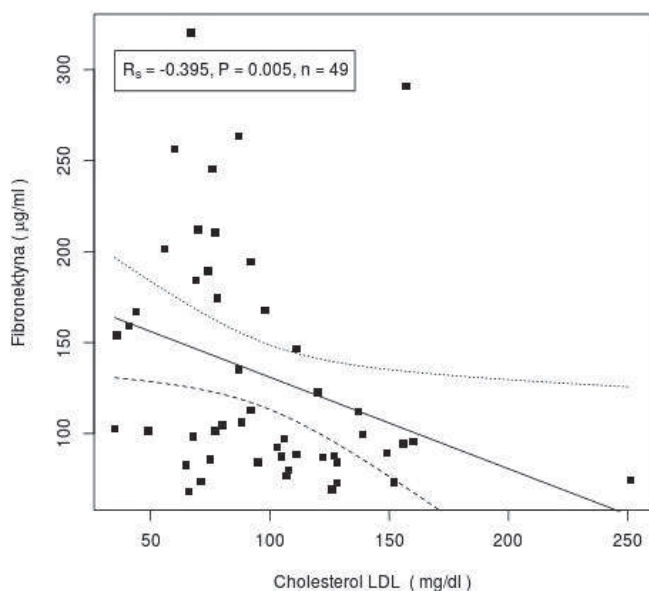
W badanej grupie pacjentów chorujących na T2DM wykryto statystycznie istotną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a wiekiem pacjentów ($R_s=0.367$, $p=0.0094$) **Ryc. 26.**

Ryc.27. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a poziomem cholesterolu całkowitego u pacjentów chorujących na T2DM ($R_s=-0.363$, $p=0.0104$)



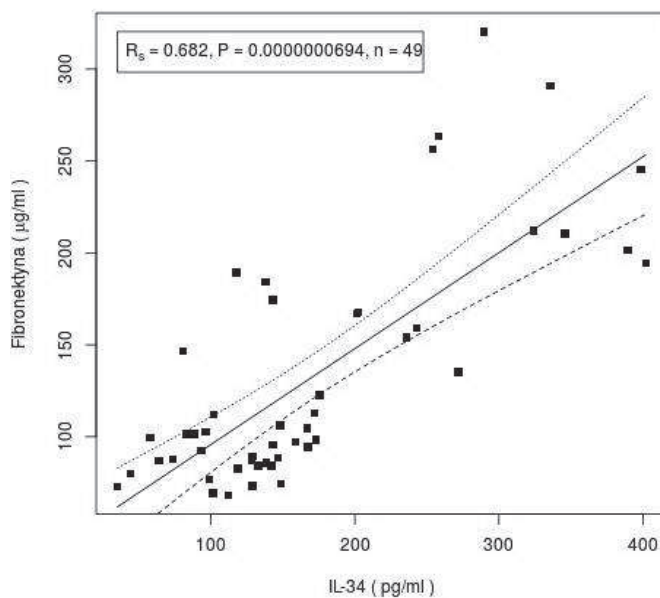
W badanej grupie pacjentów chorujących na T2DM wykryto statystycznie istotną ujemną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a poziomem cholesterolu całkowitego ($R_s = -0.363, p = 0.0104$), **Ryc. 27**.

Ryc. 28. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a poziomem cholesterolu LDL u pacjentów chorujących na T2DM ($R_s = -0.395, p = 0.005$)



W badanej grupie pacjentów chorujących na T2DM wykryto statystycznie istotną ujemną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a poziomem cholesterolu LDL ($R_s = -0.395$, $p = 0.005$), **Ryc. 28**.

Ryc. 29. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a poziomem IL-34 u pacjentów chorujących na T2DM ($R_s = 0.682$, $p = 0.0000000694$)



W badanej grupie pacjentów chorujących na T2DM wykryto statystycznie istotną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a poziomem IL-34 ($R_s = 0.682$, $p = 0.0000000694$), **Ryc. 29**

Poza tym nie wykryto zależności statystycznie istotnych w grupie pacjentów chorujących na T2DM pomiędzy poziomem fibronektyny a czasem trwania choroby, wskaźnikiem BMI jak też WHR, obwodem talii, bioder, poziomem białka CRP, poziomem HbA1c, jak też ciśnieniem skurczowym i rozkurczowym oraz poziomem cholesterolu HDL i triglicerydów.

5.3.3.2. Związek pomiędzy surowiczym poziomem fibronektyny a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM oraz z mikroangiopatią

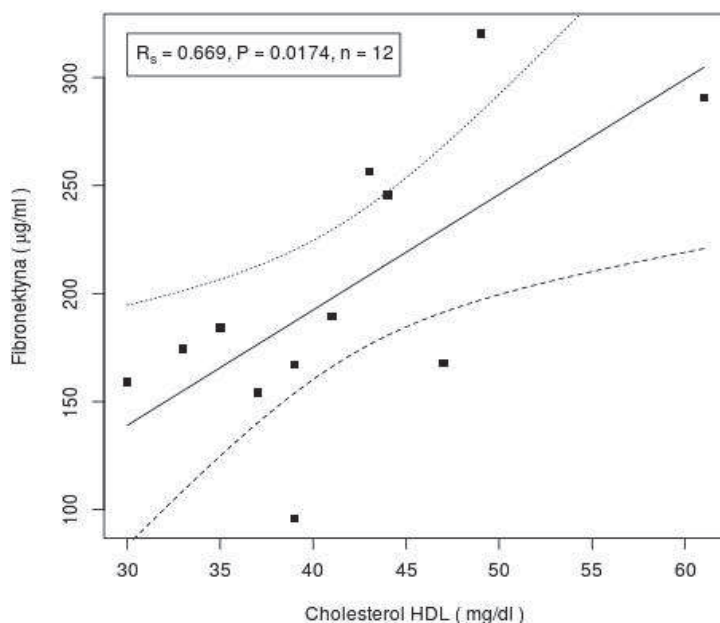
Badanie związku pomiędzy surowiczym poziomem fibronektyny a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi w grupie pacjentów chorujących na T2DM oraz z mikroangiopatią.

Nie wykryto zależności statystycznie istotnych pomiędzy surowiczym poziomem fibronektyny a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi w grupie pacjentów chorujących na T2DM oraz z mikroangiopatią.

5.3.3.3 Związek pomiędzy surowiczym poziomem fibronektyny a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM oraz z makroangiopatią

Badanie związku pomiędzy poziomem fibronektyny a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM oraz z makroangiopatią.

Ryc. 30. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a poziomem cholesterolu HDL u pacjentów z T2DM oraz makroangiopatią ($R_s=0.0669$, $p=0.0174$)



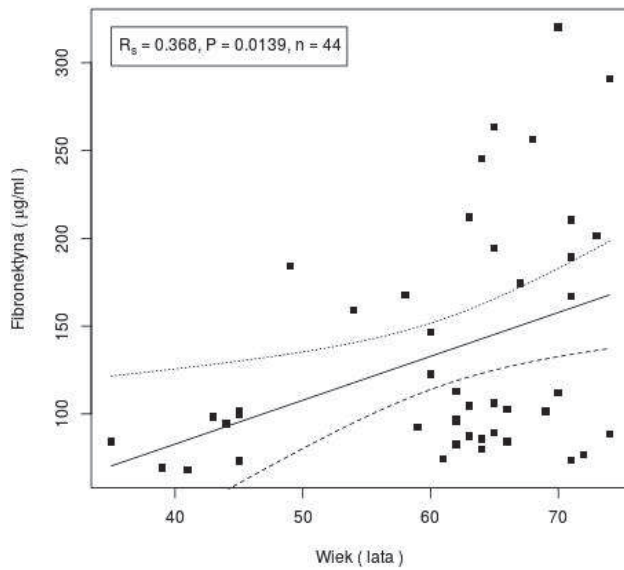
W badanej grupie pacjentów z T2DM oraz makroangiopatią wykryto statystycznie istotną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a poziomem cholesterolu HDL ($R_s=0.669$, $p=0.0174$), **Ryc. 30**.

Poza tym nie wykryto zależności statystycznie istotnych pomiędzy surowiczym poziomem fibronektyny a pozostałymi badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi w grupie pacjentów chorujących na T2DM oraz z makroangiopatią.

5.3.3.4. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów chorujących na T2DM oraz z nadciśnieniem tętniczym

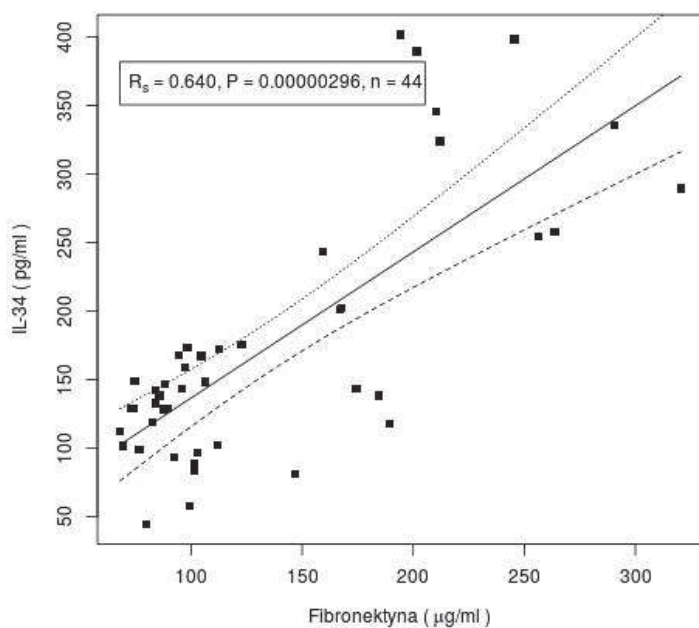
Badanie związku pomiędzy poziomem fibronektyny a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi w grupie pacjentów chorujących na T2DM i z nadciśnieniem tętniczym.

Ryc. 31. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a wiekiem pacjentów chorujących na T2DM oraz z nadciśnieniem tętniczym ($R_s=0.368$, $p=0.0139$)



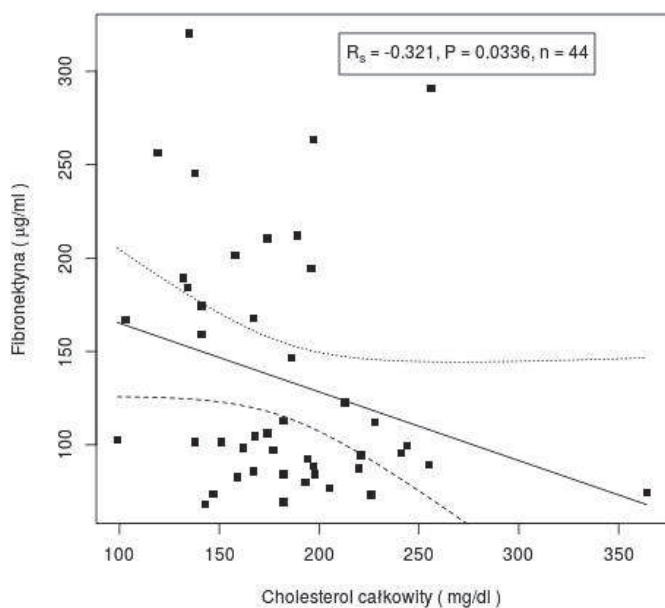
W badanej grupie pacjentów z T2DM oraz nadciśnieniem tętniczym wykazano statystycznie istotną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a wiekiem pacjentów ($R_s=0.368$, $p=0.0139$) **Ryc. 31.**

Ryc. 32. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a poziomem IL-34 pacjentów chorujących na T2DM oraz z nadciśnieniem tętniczym ($R_s=0.640$, $p=0.000000296$)



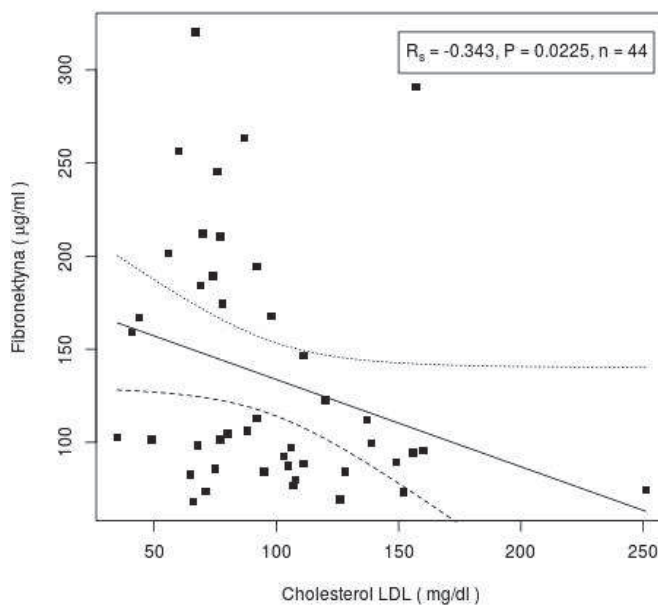
W badanej grupie pacjentów z T2DM oraz nadciśnieniem tętniczym wykazano statystycznie istotną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a poziomem IL-34 ($R_s=0.640$, $p=0.00000296$) **Ryc. 32**.

Ryc. 33. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a poziomem cholesterolu całkowitego ($R_s=-0.321$, $p=0.0336$) u pacjentów chorujących na T2DM oraz z nadciśnieniem tętniczym



W badanej grupie pacjentów z T2DM oraz nadciśnieniem tętniczym wykryto statystycznie istotną ujemną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a poziomem cholesterolu całkowitego ($R_s = -0.321$; $p = 0.0336$) **Ryc. 33**.

Ryc. 34. Związek pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a poziomem cholesterolu LDL u pacjentów chorujących na T2DM oraz z nadciśnieniem tętniczym ($R_s = -0.343$, $p = 0.0225$)



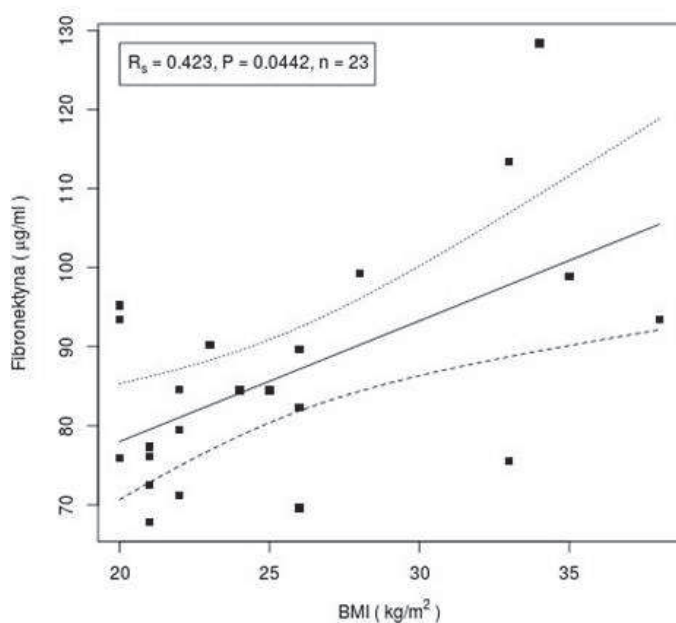
W badanej grupie pacjentów z T2DM oraz nadciśnieniem tętniczym wykryto statystycznie istotną ujemną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a poziomem cholesterolu LDL ($R_s = -0.343$, $p = 0.0225$) **Ryc. 34**.

Poza tym nie wykryto zależności statystycznie istotnych w grupie pacjentów chorujących na T2DM oraz z nadciśnieniem tętniczym pomiędzy poziomem fibronektyny a czasem trwania choroby, wskaźnikiem BM jak też WHR., obwodem talii, bioder, poziomem białka CRP, IL-34, poziomem HbA1c, jak też ciśnieniem skurczowym i rozkurczowym oraz poziomem cholesterolu HDL i triglicerydów.

5.3.3.5 Związek pomiędzy poziomem fibronektyny a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u osób grupy kontrolnej

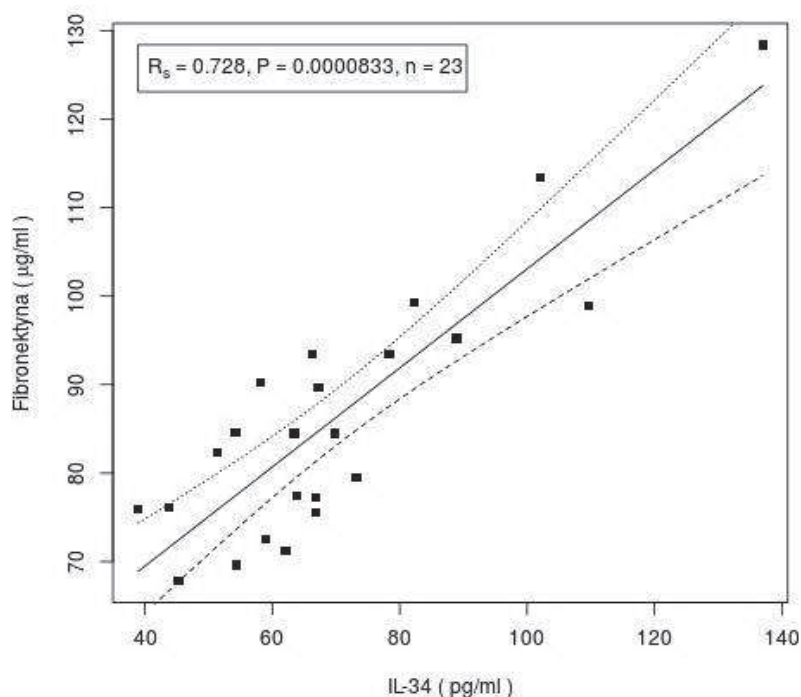
Badanie związku pomiędzy poziomem fibronektyny a badanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi u osób grupy kontrolnej.

Ryc. 35. Zależność pomiędzy surowiczym poziomem fibronektyny a wskaźnikiem BMI u osób grupy kontrolnej ($R_s = 0.423$, $P = 0.0442$).



W badanej grupie kontrolnej wykazano istotny statystycznie związek pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a wskaźnikiem BMI ($R_s = 0.423$, $P = 0.0442$) **Ryc. 35.**

Rys. 36. Zależność pomiędzy surowiczym poziomem fibronektyny a poziomem IL-34 u osób grupy kontrolnej ($R_s = 0.728$, $P = 0.0000833$)



W badanej grupie kontrolnej wykazano statystycznie istotny związek pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a stężeniem IL-34 ($R_s=0.728$; $P=0.0000833$) **Ryc. 36.**

Poza tym nie wykryto zależności statystycznie istotnych w grupie kontrolnej pomiędzy poziomem fibronektyny a wiekiem, wskaźnikiem WHR, obwodem talii, bioder, poziomem białka CRP, jak też ciśnieniem skurczowym i rozkurczowym oraz poziomem cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL, cholesterolu HDL i triglicerydów.

5.4. Wieloczynnikowa analiza regresji

W celu zbadania który z badanych paramentów klinicznych i biochemicznych istotnie wpływa na wzrost poziomu IL34 oraz fibronektyny u pacjentów chorujących na T2DM oraz w grupie kontrolnej zastosowano model wieloczynnikowej regresji.

Tabela12. Wpływ wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych na poziom IL-34 u pacjentów chorujących na T2DM

Zmienne zależne	B	Odchylenie Standardowe	T	P(> t)
BMI	5.3223	2.7787	1.915	0.0623
LDL	-0.7702	0.2953	-2.608	0.0125
CRP	14.0493	6.9167	2.031	0.0486
HbA1c	29.8541	9.6162	3.105	0.0034
TG	0.0695	0.1527	0.455	0.6513
WHR	-271.3158	126.2531	-2.149	0.0374
R²	0.4465			

W pierwszym etapie badań do modelu wieloczynnikowej regresji włączono jako zmienną zależną poziom IL34 natomiast jako zmienne niezależne BMI, WHR, cholesterol LDL, TG, białko CRP oraz HbA1c. W grupie pacjentów chorujących na T2DM wykazano, że niezależnymi czynnikami istotnie wpływającymi na wzrost IL34 u pacjentów chorujących na T2DM jest HbA1c ($\beta=29.8541$; $p=0.0034$), cholesterol LDL ($\beta=-0.7702$; $p=0.0125$), wskaźnik WHR ($\beta=-271.3158$; $p=0.0374$) oraz białko CRP ($\beta=14.0493$; $p=0.0486$). Współczynnik determinacji dla tego modelu został określony na poziomie $R^2=0.4465$ [Tab.12].

Tabela 13. Wpływ wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych na poziom IL-34 u osób w grupie kontrolnej

Zmienne objaśniające	B	Odchylenie Standardowe	T	P(> t)
BMI	2.57922	1.03873	2.483	0.0245
LDL	-0.08388	0.11282	-0.744	0.4679
CRP	18.34647	11.48063	1.598	0.1296
HbA1c	18.82838	11.54906	1.630	0.1226
TG	-0.12740	0.06450	-1.975	0.0658
WHR	-8.47204	66.22048	-0.128	0.8998
R	0.6624			

W grupie kontrolnej wykazano, że niezależnym czynnikiem istotnie wpływającym na wzrost IL34 jest wskaźnik BMI ($\beta=2.5792$; $p=0.0245$). Współczynnik determinacji dla tego modelu został określony na poziomie $R^2=0.6624$ [Tab. 13]

Następnie do modelu wieloczynnikowej regresji włączono jako zmienną zależną poziom fibronektyny natomiast jako zmienne niezależne BMI, WHR, cholesterol LDL, TG, białko CRP oraz HbA1c. Wyniki analizy przedstawiono w tabeli 14.

Tabela 14. Wpływ wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych na poziom fibronektyny u pacjentów chorujących na T2DM

Zmienne objaśniające	B	Odchylenie Standardowe	T	P(> t)
BMI	2.09650	2.17600	0.963	0.3408
LDL	-0.54391	0.23124	-2.352	0.0234
CRP	8.40266	5.41651	1.551	0.1283
HbA1c	10.64382	7.53052	1.413	0.1649
TG	-0.07934	0.11957	-0.664	0.5106
WHR	-172.59217	98.86982	-1.746	0.0882
R²	0.2734			

W grupie pacjentów chorujących na T2DM wykazano, że niezależnym czynnikiem istotnie wpływającym na wzrost fibronektyny jest cholesterol LDL ($\beta=-0.5439$; $p=0.0234$), Współczynnik determinacji dla tego modelu został określony na poziomie $R^2=0.2734$ [Tab. 14].

Tabela 15. Wpływ wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych na poziom fibronektyny u osób w grupie kontrolnej

Zmienne objaśniające	B	Odchylenie Standardowe	T	P(> t)
BMI	2.11217	0.78005	2.708	0.0155
LDL	-0.10024	0.08472	-1.183	0.2540
CRP	4.15946	8.62161	0.482	0.6360
HbA1c	10.24515	8.67300	1.181	0.2548
TG	-0.03428	0.04844	-0.708	0.4894
WHR	-71.58612	49.72962	-1.440	0.1693
	0.5393			

Badając wpływ wskaźnika BMI, WHR oraz poziom cholesterolu LDL, TG, białka CRP oraz poziomu HbA1c wykazano, że niezależnym czynnikiem istotnie wpływającym na wzrost fibronektyny w grupie kontrolnej jest wskaźnik BMI ($\beta=2.11217$; $p=0.0155$). Współczynnik determinacji dla tego modelu został określony na poziomie $R^2=0.5393$ [Tab. 15].

Celem następnego etapu pracy było zbadanie, który z badanych parametrów klinicznych i biochemicznych u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 oraz w grupie kontrolnej wykazuje największą wartość dyskryminacyjną w przewidywaniu ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych.

5.5. Analiza AUC_{ROC} dla pacjentów chorujących na T2DM oraz osób grupy kontrolnej

W celu zbadania, który z 15 badanych parametrów zamieszczonych w tab. 14 tj. wskaźnika BMI, WHR, obwodu talii i bioder, ciśnienia skurczowego jak też rozkurczowego krwi, HbA1c, CRP, cholesterolu całkowitego, jak też cholesterolu frakcji LDL oraz HDL, TG, poziomu glukozy na czczo, IL-34 oraz fibronektyny u pacjentów z T2DM oraz osób grupy kontrolnej wykazuje najwyższą wartość dyskryminacją w przewidywaniu ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych. Jedną z metod statystycznych wyznaczania wartości dyskryminacyjnych jak też granicznych badanych parametrów jest analiza krzywych ROC (*Relative Operating Characteristic*). Krzywe ROC pozwalają na wizualizację i dobór optymalnej wartości granicznej, która zapewnia najwyższą trafność decyzji.

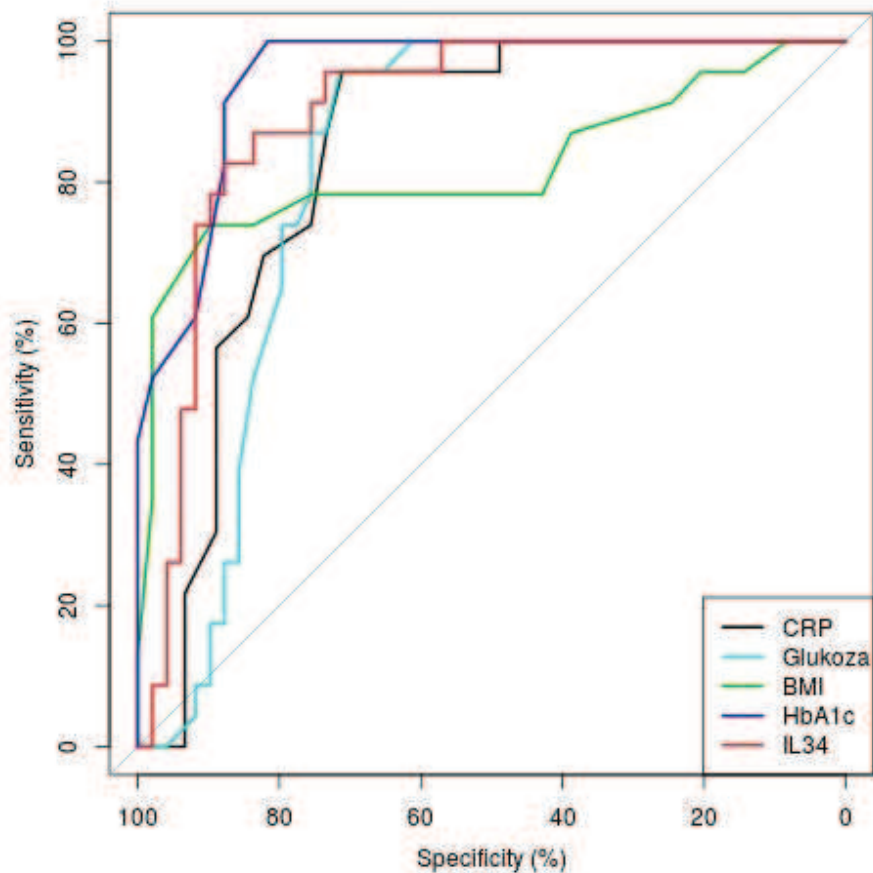
Tabela 16. Analiza AUC_{ROC} badanych parametrów klinicznych i biochemicznych u pacjentów z T2DM oraz w grupie kontrolnej

Zmienna	AUC (95%)	Specyficzność (Specificity)	Czułość (Sensitivity)	Wartość graniczna
WHR	73.43 % (61.31 % - 85.54 %)	77.6 %	60.9 %	0.9 cm/cm
BMI	82.21 % (69.71 % - 94.71 %)	89.8 %	73.9 %	26.5 kg/m ²
Ciśnienie skurczowe	72.14 % (59.37 % - 84.91 %)	75.5 %	65.2%	129 mm/Hg
Ciśnienie rozkurczowe	58.61 % (42.73 % - 74.49 %)	98.0 %	30.4 %	82.5 mm/Hg
CRP	83.96 % (74.43 % - 93.49 %)	71.1 %	95.7 %	1.4 mg/l
IL-34	89.88 % (82.51 % - 97.26 %)	83.7 %	87.0 %	91.2 pg/ml
Fibronektyna	75.16 % (63.97 % - 86.34 %)	55.1 %	91.3 %	99.4 µg/ml
Glukoza 0 min	82.25 % (72.56 % - 91.95 %)	71.4 %	95.7 %	108.5 mg/dl
HbA1c	94.85 % (90.4 % - 99.31 %)	81.6 %	100 %	5.8 %
Cholesterol	67.66 % (55.15 % - 80.17 %)	55.1 %	78.3 %	183.5 mg/dl
HDL	75.55 % (63.1 % - 88.01 %)	69.4 %	82.6 %	56.5 mg/dl
LDL	73.47 % (62.1 % - 84.83 %)	57.1 %	91.3 %	98.5 mg/dl
TG	66.37 % (53.00 % - 79.74 %)	38.8 %	91.3 %	174 mg/dl
Obwód biodra	68.15 % (52.43 % - 83.86 %)	100 %	47.8 %	94 cm
Obwód pasa	77.42 % (63.54 % - 91.29 %)	87.8 %	65.2 %	89.5 cm

Z piętnastu badanych parametrów klinicznych i biochemicznych zamieszczonych w tabeli 16 dla pięciu z nich tj. HbA1c, IL-34, CRP, glukozy oraz BMI wykazano przydatność dyskryminacyjną. Najwyższą dla parametru **HbA1c (AUC_{ROC} = 94.85 %)** (Tab. 16)

5.5.1 Analiza porównawcza krzywych ROC dla pięciu badanych parametrów o najwyższych wartościach AUC_{ROC} jako czynników prognostycznych w przewidywania ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych

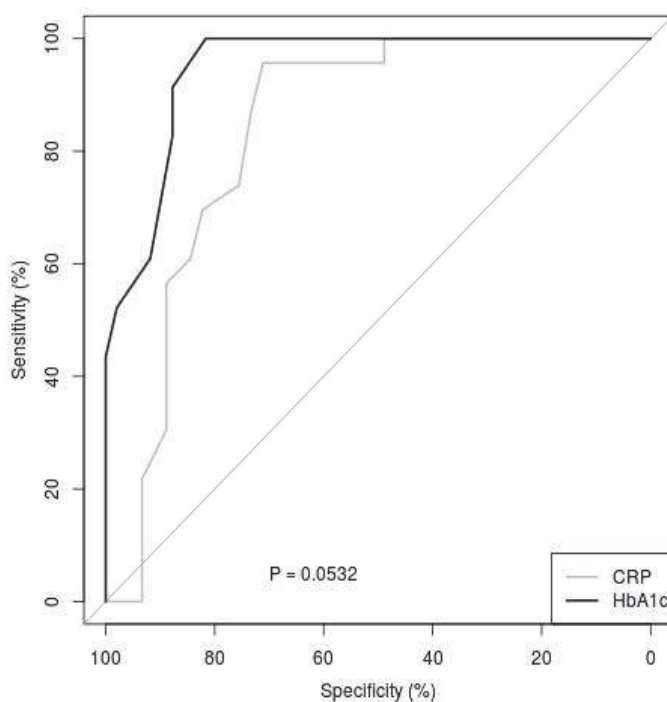
Ryc. 37. Porównanie wykresów krzywych ROC pięciu parametrów HbA1c, IL-34, CRP, glukozy oraz BMI u pacjentów z T2DM oraz w grupie kontrolnej



Z piętnastu badanych parametrów klinicznych i biochemicznych zamieszczonych w tabeli 16 dla pięciu z nich tj. HbA1c, IL-34, CRP, glukozy oraz BMI wykazano najwyższą wartość dyskryminacyjną w przewidywaniu ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych (**Tab.16, Ryc. 37**).

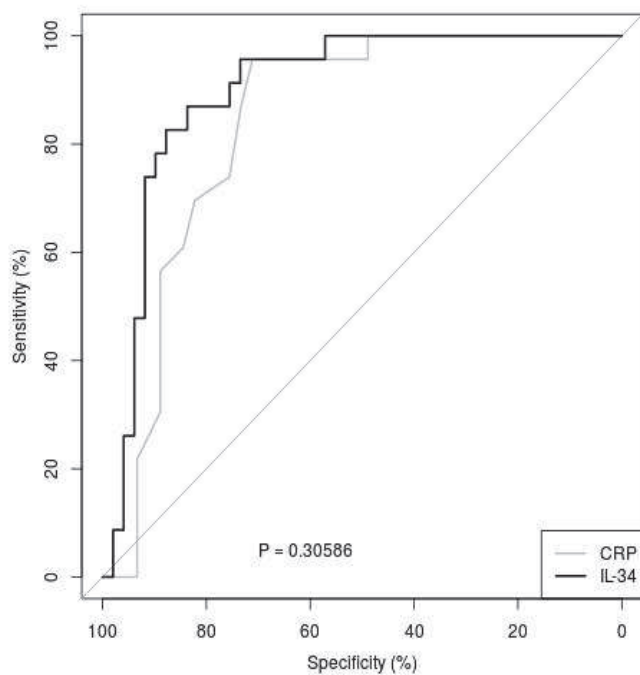
5.5.2. Analiza porównawcza krzywych ROC dwóch badanych parametrów o najwyższych wartościach AUC_{ROC} w celu wykrycia czynnika dyskryminacyjnego jako wskaźnika prognostycznego w przewidywania ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych

Ryc.38. AUC_{ROC} dla surowiczych stężeń CRP oraz HbA1c



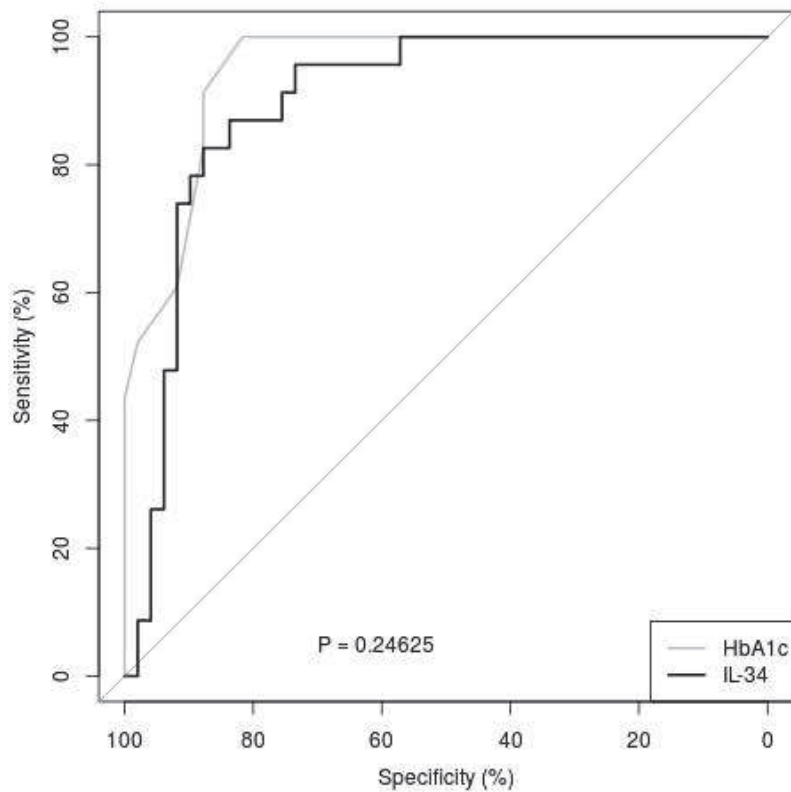
Krzywa ROC parametru CRP leży pod krzywą ROC wskaźnika HbA1c a różnica pól wynosi $p=0.0532$. W badaniu wykazano, że lepszą wartość dyskryminacyjną posiada parametr HbA1c w przewidywania ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych Ryc 38.

Ryc. 39. AUC_{ROC} dla surowiczych stężeń CRP oraz IL-34.



Krzywa ROC parametru CRP leży pod krzywą ROC IL-34. W badaniu wykazano, że lepszą wartość dyskryminacyjną w przewidywania ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych posiada parametr IL-34. Różnica pól wynosi $p=0.30586$ **Ryc. 39.**

Ryc. 40. AUC_{ROC} dla surowicznych stężeń HbA1c oraz IL-34

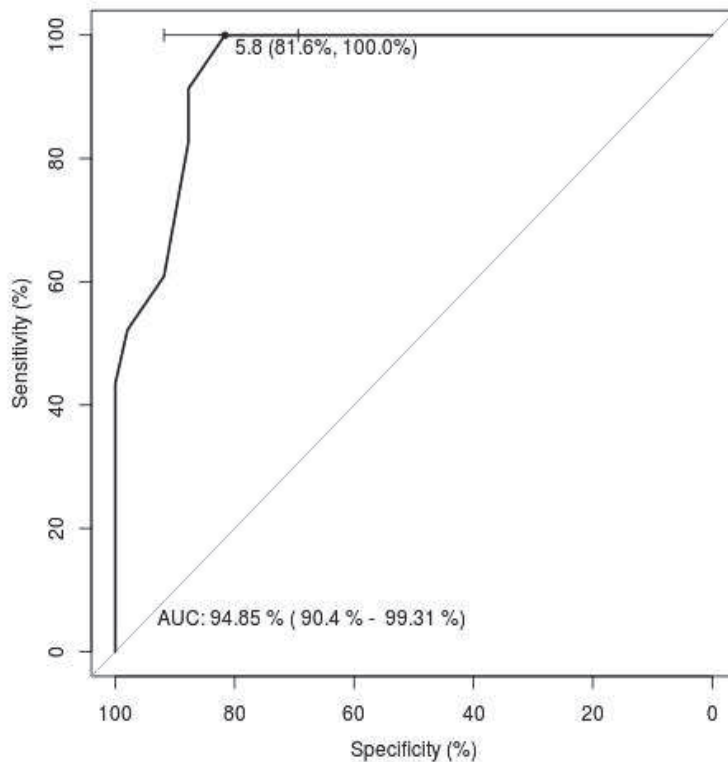


Krzywa ROC parametru IL34 leży pod krzywą HbA1c. W badaniu wykazano, że lepszą wartość dyskryminacyjną w przewidywaniu ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych posiada parametr HbA1c. Różnica pól wynosi ($p=0.24625$), **Ryc. 40**.

Celem kolejnego etapu pracy była próba wykrycia wartości granicznych dla badanych parametrów klinicznych i biochemicznych w grupie pacjentów chorujących na T2DM oraz w grupie kontrolnej.

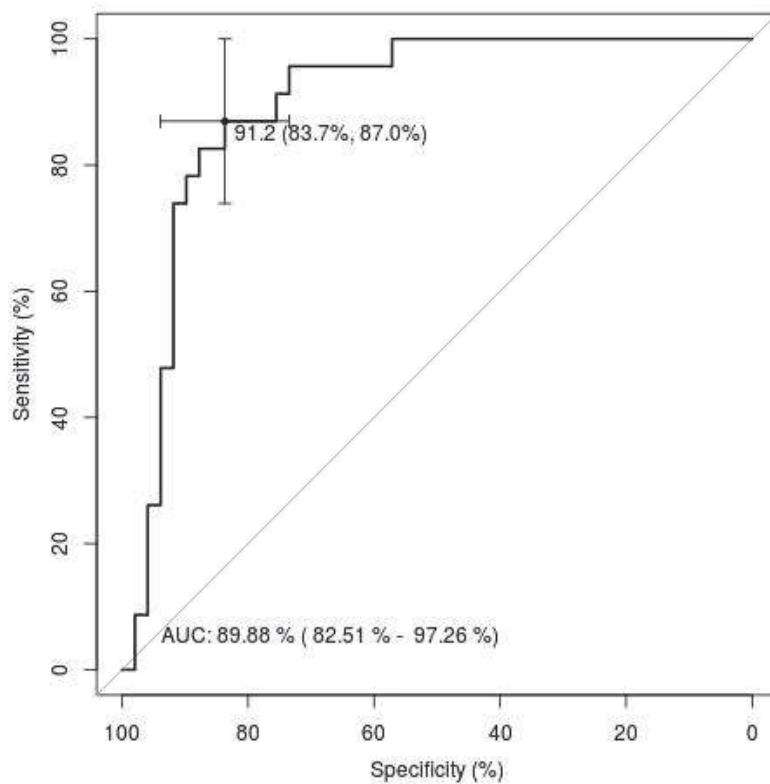
5.5.3 Wykrycie progów granicznych badanych parametrów klinicznych i biochemicznych w przewidywaniu ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych

Ryc. 41 Krzywe AUC_{ROC} dla HbA1c



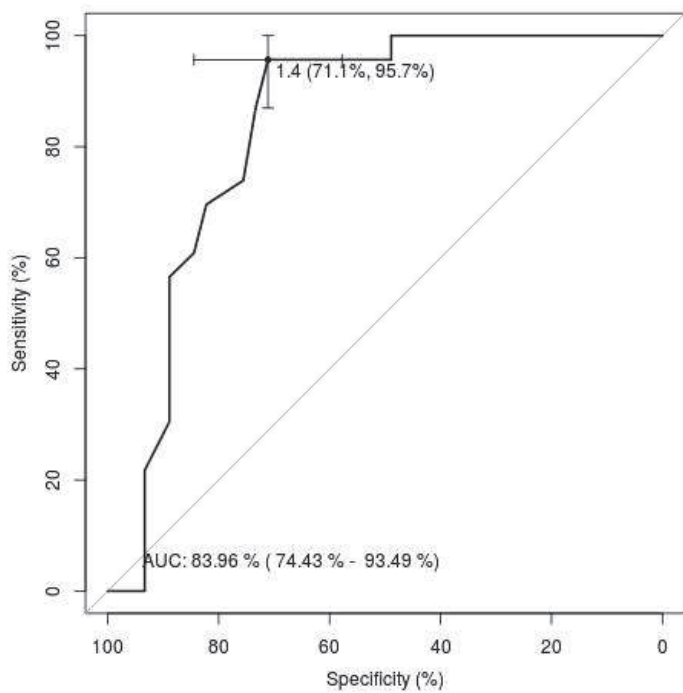
W badanej grupie pacjentów z T2DM oraz grupie kontrolnej dla czynnika wyrównania metabolicznego HbA1c wykryto największą wartość prognostyczną dla ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych. Próg odcięcia określono na poziomie 5.8%. Pole powierzchni pod krzywą ROC_{AUC} określono na poziomie 94.85% a jego wartość populacyjna mieści się w przedziale (90.4- 99.31%). Czulość wynosi 100% a specyficzność 81.6% **Ryc.41.**

Ryc. 42. Krzywe AUC_{ROC} dla surowiczych stężeń IL-34



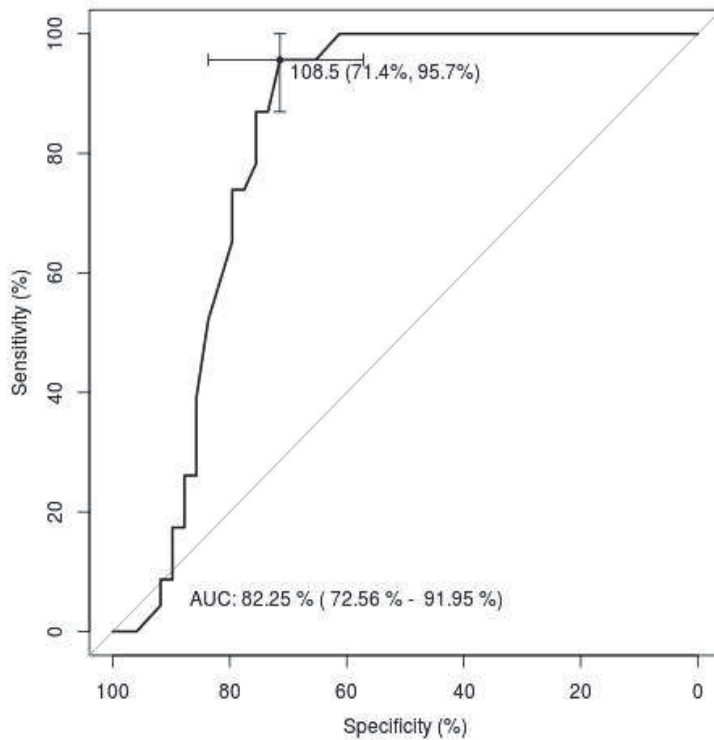
Próg graniczny dla interleukiny 34 określono na poziomie 91.2 pg/ml. Pole powierzchni pod krzywą AUC_{ROC} dla IL-34 wykryto na poziomie 89.88% a jego wartość populacyjna mieści się w przedziale (82.51% - 97.26%). Czulość wykryto na poziomie 87%, a specyficzność 83.7% **Ryc. 42.**

Ryc. 43. Krzywe AUC_{ROC} dla surowiczych stężeń CRP



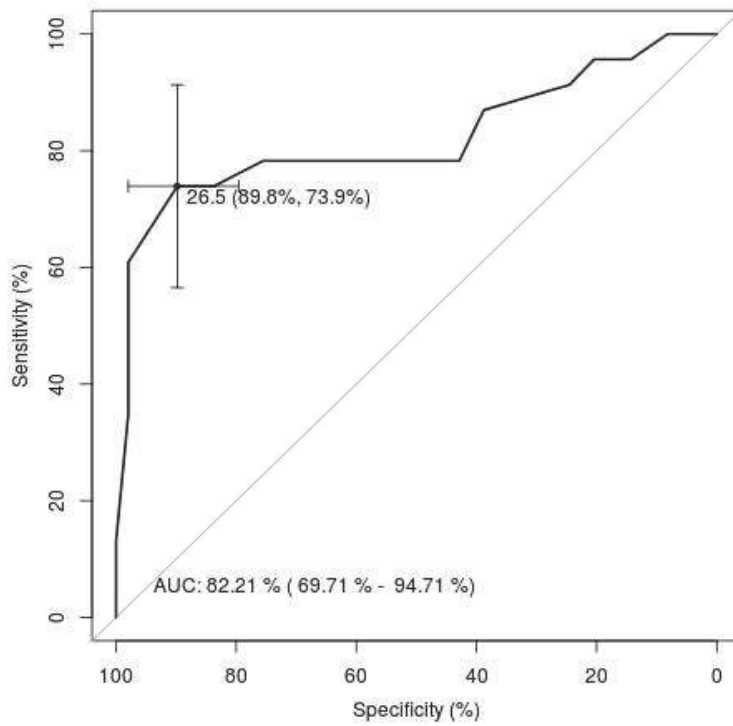
W badanej grupie pacjentów z T2DM oraz grupie kontrolnej próg odcięcia dla białka CRP wynosi 1.4 pg/ml. Pole powierzchni pod krzywą AUC_{ROC} określono na poziomie 83.96%, a jego wartość populacyjna mieści się w przedziale (74.43% - 93.49%). Czulość została zdefiniowana na poziomie 95.7%, natomiast specyficzność 71.7% **Ryc. 43.**

Ryc. 44. Krzywe AUC_{ROC} dla glukozy



Próg graniczny dla glukozy wykryto na poziomie 108.5 mg/dl. Pole powierzchni pod krzywą AUC_{ROC} dla glukozy określono na poziomie 82.25%, a jego wartość populacyjna mieści się w przedziale (72.56% - 91.95%). Czulość została zdefiniowana na poziomie 95.7%, natomiast specyficzność 71.4% (**Ryc. 44**).

Ryc. 45. Krzywe AUC_{ROC} dla BMI



Wartość graniczna dla wartości BMI określono jako 26.5 m/kg. Pole powierzchni pod krzywą AUC_{ROC} wynosi 82.21%, a jego wartość populacyjna mieści się w przedziale 69.71% - 94.17%. Czulość wykryto na poziomie 73.9% a specyficzność 89.80% , **Ryc. 45**

Dyskusja

W XXI wieku problem otyłości przybrał rozmiary epidemii. Zgodnie z danymi ogłoszonymi przez Światową Organizację Zdrowia w 2005 roku liczba osób ze wskaźnikiem masy ciała (BMI) powyżej 30 kg/m^2 na całym świecie przekroczyła już 400 milionów [12,17]. Nadmierna masa ciała nie stanowi jedynie problemu kosmetycznego. Udowodniono, że otyłość zwiększa ryzyko rozwoju nadciśnienia tętniczego, cukrzycy, a także prowadzi do powikłań sercowo-naczyniowych, takich jak udar czy zawał serca [21,33]. Ponadto w dotychczasowych badaniach wykazano, że wzrost wskaźnika BMI koreluje również znacznie z gorszym wyrównaniem metabolicznym cukrzycy, spadkiem cholesterolu HDL oraz wzrostem triglicerydów [38,43]. Szacuje się, że w Europie na cukrzycę choruje ponad 55 milionów osób, a przedwczesne zgony z powodu jej powikłań dotyczą od 5 do 15% ludzi w tzw. wieku produkcyjnym [12,13]. Najważniejszym problemem diagnostycznym w cukrzycy jest jej późne rozpoznanie, związane z brakiem charakterystycznych objawów hiperglikemii w początkowych etapach choroby, które skłoniłyby pacjentów do wizyty u lekarza oraz wykonania badań. Szansą na uniknięcie rozwoju cukrzycy jest, oprócz pierwotnej profilaktyki, wczesne rozpoznanie tzw. stanu przedcukrzycowego, charakteryzującego się nieprawidłową glikemią na czczo i/lub nieprawidłową tolerancją glukozy w OGTT oraz wdrożenie odpowiednich działań prewencyjnych w tym prawidłowo zbilansowanej diety prowadzącej do zmniejszenia masy ciała, aktywności fizycznej i/lub leczenia hipoglikemizującego) [173]. Globalny wzrost otyłości, zachorowalności na cukrzycę ma znaczący wpływ na częstość rozwoju mikro i makroangiopatii cukrzycowej [38,43,47]. Dobra kontrola glikemii i ścisłe leczenie nadciśnienia znacznie zmniejsza ryzyko powikłań cukrzycy [43,52,55]. Jednak ścisła kontrola glikemii i nadciśnienia może jedynie zmniejszyć, ale nie wyeliminować ryzyko angiopatii cukrzycowej, stąd ciągła potrzeba poszukiwania nowych strategii interwencji. Badania na świecie jak też w Polsce dotyczą wykrycia czynników ryzyka powikłań cukrzycy, ich skutków i wzajemnych powiązań. Biorąc pod uwagę złożoną patogenezę przewlekłych powikłań cukrzycowych, należy uwzględnić to, że wpływ na ich występowanie mają zarówno zaburzenia metaboliczne, jak i współistniejący stan zapalny. Wykrycie etapu inicjującego procesy patologiczne prowadzące do rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych jest niezwykle ważne. Dlatego też celem moich badań była ocena surowiczych stężeń interleukiny 34 oraz fibronektyny u pacjentów

chorujących na cukrzycę typu 2 oraz ich związek z powikłaniami mikro- i makronaczyniowymi.

W przedstawionej pracy w grupie pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 u wszystkich badanych (100%) wykryto przewlekłe powikłania w tym obecność mikroangiopatii u 35%, makroangiopatii u 25%, natomiast nadciśnienie tętnicze aż u 90% badanych chorych na T2DM. Z kolei w grupie kontrolnej aż u 52% badanych osób wykryto nadciśnienie tętnicze lecz u żadnej badanej osoby nie wykryto mikroangiopatii ani też makroangiopatii. Grupa pacjentów z T2DM charakteryzowała się bowiem znamienne wyższym poziomem HbA1C. ponadto była starsza i miała istotnie wyższy poziom BMI, wskaźnik WHR, obwód talii i bioder, oraz znamienne wyższy poziom wydalanych albumin z moczem, kreatyniny, glukozy na czczo i ciśnienia skurczowego w porównaniu do grupy kontrolnej. Poza tym w badanej grupie pacjentów z T2DM wykazano istotnie niższy poziom cholesterolu całkowitego, cholesterolu HDL, cholesterolu LDL w porównaniu z grupą kontrolną. Niższy poziom lipidów w badanej grupie pacjentów chorujących na T2DM w porównaniu z grupą kontrolną jest najprawdopodobniej związany z wdrożonym leczeniem statyną i/lub fibratem. Statyny, czyli inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo koenzymu A (HMG-CoA – 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A) są grupą leków zalecanych przez PTD w zaburzeniach lipidowych u pacjentów chorujących na cukrzycę [16,179]. W licznych badaniach wykazano, że statyny dzięki strukturalnemu podobieństwu do naturalnych substratów, blokują przekształcanie HMG-CoA do mewalonianu, hamując jeden z kluczowych etapów biosyntezy cholesterolu [68,69,179]. Główne działanie statyn polega na zmniejszeniu endogennej syntezy cholesterolu. W odpowiedzi na zahamowanie wytwarzania cholesterolu w hepatocytach, na drodze enzymatycznej dochodzi do uwolnienia z siateczki śródplazmatycznej białka SREBPs (Sterol Regulatory Elements-Binding Proteins). Na skutek wiązania białka SREBPs z elementem regulatorowym wrażliwym na sterol (SRE – Sterol Regulatory Element), dochodzi do nasilenia ekspresji kilku genów uczestniczących w metabolizmie cholesterolu w tym genu kodującego receptor dla LDL (Low Density Lipoprotein) [68, 70, 180-182]. Jednocześnie następuje zmniejszenie degradacji receptorów dla LDL. W efekcie dochodzi do znacznego zwiększenia ilości tych receptorów na powierzchni hepatocytów, co umożliwia większy wychwyt i szybsze usuwanie LDL z krwi, prowadząc w konsekwencji do obniżenia stężenia cholesterolu LDL we krwi [178,181]. Ponadto statyny mogą redukować stężenie LDL także nasilając usuwanie prekursorów

LDL, czyli VLDL (Very Low Density Lipoprotein) oraz IDL (Intermediate Density Lipoprotein) [68,69]. Obniżenie stężenia LDL przez statyny może mieć także związek z redukcją wątrobowej produkcji VLDL, która jest zależna od zmniejszenia stężenia cholesterolu, będącego niezbędnym składnikiem VLDL [69,180-181]. Dlatego też przedstawiona w niniejszej pracy badana przez mnie grupa pacjentów z T2DM charakteryzowała się niższym poziomem cholesterolu w porównaniu do grupy kontrolnej, która nie była leczona statynami.

Doniesienia ostatnich lat sugerują, że decyzja o rozpoczęciu terapii statynami powinna być podejmowana po wcześniejszej ocenie nie tylko poziomu cholesterolu frakcji LDL ale również stężenia białka C-reaktywnego, (CRP -*C Reactive Protein*). Okazuje się bowiem, że skuteczność działania statyn jest większa u pacjentów z wyższym stężeniem hsCRP [181-183]. Na podstawie badań klinicznych JUPITER stwierdzono, że rozpoczęcie terapii statynami powinno być podejmowane po wcześniejszej ocenie stężenia hsCRP jak też poziomu cholesterolu frakcji LDL. Dlatego też sugeruje się, aby wprowadzić rutynowe monitorowanie stężenia hsCRP w celu wyselekcjonowania pacjentów „wysokiego ryzyka”, u których terapia statynami rzeczywiście jest efektywna [181]. W badaniach własnych w grupie pacjentów chorujących na T2DM wykazano istotnie ($p=0.0013$) wyższy surowiczy poziom białka C-reaktywnego (2.57 ± 1.78 mg/l vs 0.98 ± 0.38 mg/l) w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto wykryto ujemną istotnie statystyczną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem CRP a poziomem cholesterolu frakcji HDL ($R_s=-0.283$; $p=0.0487$) w grupie pacjentów chorujących na T2DM. Poza tym w badaniach własnych wykazano wyższy poziom białka CRP u pacjentów chorujących na T2DM oraz makroangiopatią a także nadciśnieniem tętniczym pierwotnym w porównaniu z grupą kontrolną. Co więcej zarówno w grupie pacjentów chorujących na T2DM i makroangiopatią oraz nadciśnieniem tętniczym wykryto dodatnią zależność pomiędzy surowiczym stężeniem białka CRP a poziomem cholesterolu frakcji LDL. Wyniki badań wskazują, że pacjenci chorujący na T2DM i z nadciśnieniem tętniczym, których było 44/49 badanych, oraz z podwyższonym poziomem białka CRP jak też wyższym poziomem cholesterolu frakcji LDL są narażeni na większe ryzyko rozwoju choroby niedokrwiennej serca czy udaru mózgu. Otrzymane wyniki badań własnych są zgodne z wynikami badań EURIKA study 2014. Wieloośrodkowe badania miały na celu wykrycie czynników ryzyka rozwoju choroby niedokrwiennej serca wśród 7565 osób obciążonych co

najmniej jednym czynnikiem ryzyka choroby sercowo-naczyniowej. Wyniki badań wykazały, że poziom CRP korelował dodatnio z indeksem masy ciała jak też z poziomem hemoglobiny glikowanej natomiast negatywnie związany był z wysokim stężeniem cholesterolu HDL. Z kolei wśród pacjentów bez cukrzycy jak też bez wykrytej choroby sercowo-naczyniowej, którzy nie otrzymywali statyn, u około 30% pacjentów wykryto białko CRP w stężeniu ≥ 3 mg/l, a u około 50% stężenie CRP wynosiło ≥ 2 mg/l. [96]. Z kolei inni badacze wykazali, że oznaczanie stężenia białka CRP w osoczu jest dobrym, niezależnym czynnikiem prognostycznym zawału mięśnia sercowego, udaru czy też choroby tętnic obwodowych [183,184]. Osoby mające podwyższony poziom CRP w osoczu obarczone są około 2-krotnie wyższym ryzykiem udaru lub choroby naczyń obwodowych oraz około 3-krotnie wyższym ryzykiem zawału serca. Zależność między podwyższonym poziomem CRP, a zwiększonym ryzykiem choroby sercowo-naczyniowej utrzymuje się nawet przy prawidłowym profilu lipidowym. Natomiast u osób ze znacząco podwyższonym stężeniem CRP i cholesterolu ryzyko incydentów sercowo naczyniowych wzrasta nawet 9-krotnie w porównaniu do osób z prawidłowymi wartościami obu parametrów [183,184]. Analiza porównawcza znaczenia podwyższonych stężeń białka C-reaktywnego i cholesterolu (frakcji LDL) w prognosyce chorób naczyniowych u pozornie zdrowych kobiet wskazuje, że CRP jest bardziej istotnym czynnikiem ryzyka niż LDL-cholesterol. Nie tylko u osób zdrowych, ale i u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym, stabilną dusznicą bolesną, zespołem metabolicznym oraz u chorych po przebytych zawale mięśnia sercowego, wykryto istotny związek między stężeniem CRP a ryzykiem wystąpienia incydentów wieńcowych [93-94,182-183]. Poza tym, w dotychczasowych badaniach dowiedziono, że białko CRP posiada zdolność wiązania się z cząsteczkami lipidów frakcji LDL przez co ułatwia wnikanie lipidów do makrofagów. Co więcej dostępne badania wykazały białko CRP jako ważny czynnik chemotaktyczny, którego odkładanie się w ścianie naczyniowej poprzedza infiltrację monocytów do ściany tętniczej we wczesnej fazie miażdżycy i przyczynia się do tworzenia komórek piankowatych [183-185] Zjawisko to może zachodzić w wyniku opsonizacji natywnych lipoprotein o małej gęstości przez białko C-reaktywne oddziałujące z receptorem CD32 na makrofagach. Powyższa idea podważa zatem powszechnie znany i przyjęty mechanizm, przypisujący pierwszorzędną rolę modyfikowanym biochemicznie LDL w powstawaniu blaszki miażdżycowej [93].

Ponadto, w prezentowanej pracy u pacjentów z T2DM oraz u osób z grupy kontrolnej podjęto próbę określenia progu granicznego dla białka CRP. Poprzez zastosowanie analizy krzywych ROC wykazano, że pole powierzchni pod krzywą AUC_{ROC} wynosi 83.96%, a jego wartość populacyjna mieści się w przedziale (74.43% - 93.49%). Czulość została zdefiniowana na poziomie 95.7%, natomiast specyficzność 71.7%. Wartość graniczna dla białka CRP określono na poziomie 1.4 mg/l. Jednakże dalsza analiza statystyczna krzywych ROC (*Receiver Operating Characteristics*) wykazała wyższą przydatność dyskryminacyjną dla nowej prozapalnej cytokiny IL-34. W badaniach własnych wykazano, że pole powierzchni pod krzywą AUC_{ROC} dla IL-34 określono na poziomie 89.88%, a jej wartość populacyjna mieści się w przedziale (82.51% - 97.26%). Czulość wykryto na poziomie 87%, a specyficzność jako 83.7%. Ponadto, wg. kolejności siły dyskryminacyjnej określonej polem powierzchni pod krzywą wykryto, że pole powierzchni AUC_{ROC} było wyższe dla IL-34 ($AUC=89.88\%$) niż dla białka CRP ($AUC=83.96\%$) ale i glukozy na czczo ($AUC=82.25\%$) oraz BMI ($AUC=82.21\%$). Potwierdza to fakt, że parametr IL-34 posiada lepsze wartości dyskryminacyjne dla ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy niż białko CRP i pozostałe badane parametry. Co więcej interleukina 34 ma większą siłę dyskryminacyjną niż glikemia na czczo. Ma także przewagę w tym względzie nad fibronektyną ($AUC=75.16\%$). Próg referencyjny dla IL-34 określono na poziomie 91.2 pg/ml. W dostępnej literaturze nie ma badań odnośnie wartości granicznych dla IL-34. Dlatego też określenie przeze mnie progu granicznego dla IL-34 uważam za nowatorskie. Zastosowanie klinicznie testu do oznaczeń surowiczych stężeń IL-34 może być dodatkowym markerem zapalnym w przewidywaniu ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych.

W niniejszym badaniu wykazano także, że surowicze stężenie IL-34 było istotnie wyższe u pacjentów z T2DM w porównaniu do grupy kontrolnej, a wzrost stężenia IL34 był dodatnio skorelowany z poziomem hs-CRP. Ponadto wykryto istotnie wyższe surowicze stężenia IL-34 w grupie pacjentów z T2DM i mikroangiopatią, makroangiopatią jak też z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki badań wskazują, że IL-34 podobnie jak inne prozapalne cytokiny, może brać udział w patogenezie przewlekłych powikłań cukrzycowych. Co więcej wykryto istotną zależność pomiędzy stężeniem IL-34 a czasem trwania choroby u pacjentów chorujących na T2DM. Dodatnią istotnie statystyczną zależność wykazano także pomiędzy surowiczym stężeniem IL-34 a poziomem wyrównania metabolicznego.

Otrzymane wyniki są zgodne z nielicznymi dotychczas badaniami dotyczącymi IL-34 w cukrzycy. Jedyne dostępne wyniki badań autorów Chang i wsp., w których wykazano istotnie wyższe stężenie IL-34 u osób otyłych niż stężenia IL-34 w grupie kontrolnej. Ekspresja mRNA IL-34 była istotnie wyższa w tkance tłuszczowej trzewnej (VAT) niż w podskórnej (SAT). Co więcej autorzy wykryli, że na wzrost ekspresji IL-34 wpływa TNF α oraz IL-1 β . Ponadto, stężenie IL-34 w surowicy krwi było istotnie niższe u osób po zabiegach bariatrycznych (Roux-en-Y gastric bypass). Wykazano, że IL-34 ulega ekspresji w ludzkich tkankach tłuszczowych i stężenie IL-34 jest znacznie podwyższone u pacjentów otyłych. Autorzy sugerują, że IL-34 jest związane z opornością na insulinę [186]. Z kolei w innych badaniach autorzy Li i wsp. wykryli, że stężenie IL-34 i białko CRP było niezależnymi wskaźnikami choroby niedokrwiennej serca [187].

W dalszym etapie, w badaniach własnych poprzez zastosowanie analizy wieloczynnikowej regresji w grupie pacjentów chorujących na T2DM wykazano, że niezależnymi czynnikami istotnie wpływającymi na wzrost IL34 u pacjentów chorujących na T2DM jest HbA1c ($\beta=29.8541$; $p=0.0034$), cholesterol LDL ($\beta=-0.7702$; $p=0.0125$), wskaźnik WHR ($\beta=-271.3158$; $p=0.0374$) oraz białko CRP ($\beta=14.0493$; $p=0.0486$). Współczynnik determinacji dla tego modelu został określony na poziomie $R^2=0.4465$. Mechanizm poprzez który dochodzi do wzrostu czynników prozapalnych u pacjentów z cukrzycą jest wynikiem najprawdopodobniej przewlekłego podwyższonego stężenia glukozy. Jak wykazano w dotychczasowych badaniach in vivo oraz in vitro hiperglikemia nasila nieenzymatyczną glikację białek strukturalnych, enzymatycznych, receptorowych oraz transpotorowych oraz autooksydacji glukozy, którym towarzyszy produkcja znacznej ilości toksycznych pochodnych tlenu (*ROS-reactive oxygen species*). Końcowe produkty glikacji białek (AGEs) poprzez swoje receptory dla końcowych produktów glikacji (RAGE) aktywują monocyty, makrofagi, komórki śródbłonna, które stają się źródłem prozapalnych cytokin w tym interleukiny-6 (IL-6), IL-8 IL-1, TNF- α oraz czynników wzrostu.[49-50]. Ponadto dotychczasowe wyniki badań wykazały związek pomiędzy stężeniem cytokin zapalnych a stopniem otyłości, insulinooporności, upośledzeniem tolerancji glukozy[192] Co ciekawe w grupie kontrolnej w badaniach własnych wykryto także dodatnią zależność pomiędzy wskaźnikami antropometrycznymi takimi jak BMI, obwód bioder i talii a surowiczym stężeniem białka IL-34. Przedstawione wyniki wskazują na obecność stanu zapalnego już w grupie osób predysponowanych do rozwoju cukrzycy, czyli na bardzo wczesnym

etapie zmian metabolicznych. W dotychczasowych dostępnych badaniach dowiedziono także udziału cytokin zapalnych w rozwoju T2DM jak też T1DM oraz przewlekłych powikłań cukrzycowych [32,52,55]. Wykazano bowiem, że IL-6 pobudza wydzielanie innych cytokin zapalnych, między innymi IL-1, CRP, fibrynogenu, PAI-1, czynnika von Willebranda (*vWF-von Willebrand factor*) i innych [32,92-94]. Podobnie jak białko CRP, IL-6 jest czynnikiem rokowniczym w niestabilnej chorobie wieńcowej, a jej podwyższone stężenie wiąże się ze wzrostem ryzyka zgonu u tych chorych [191,192]. Jednakże należy mieć na uwadze, że zmiany naczyniowe w przebiegu mikro i mikroangiopatii u chorych z cukrzycą typu 2 nie są wynikiem działania jednego czynnika, ale wielu czynników współdziałających ze sobą. Dlatego też kolejnym czynnikiem badanym przeze mnie była fibronektyna (FN). W wielu badaniach wykazano rolę fibronektyny, jednakże jej przydatność jako markera późnych powikłań cukrzycowych jest kontrowersyjna [107-111,193]. Dlatego też w dalszej części badań podjęto próbę zbadania fibronektyny u pacjentów z T2DM i powikłaniami cukrzycowymi. Fibronektyna jest glikoproteiną występującą w macierzy pozakomórkowej głównie w tkance łącznej oraz na powierzchni komórek. Rola FN polega na udziale w adhezji, proliferacji, migracji, różnicowaniu jak też apoptozie komórek [98,99]. Ponadto FN uczestniczy w procesach embriogenezy oraz w tkankowych procesach naprawczych po zranieniach. Osobliwością fibronektyny jest wielorakie oddziaływanie z innymi białkami, w tym z fibryną, kolagenem i innymi składnikami układu krzepnięcia, takim jak np. aktywatorem plazminogenu 1 (PAI-1). [98-100].

W badaniach własnych wykryto wyższe stężenie surowiczej fibronektyny w grupie chorych z T2DM w porównaniu do osób z grupy kontrolnej. Ponadto wyższe stężenie fibronektyny u pacjentów z T2DM oraz makroangiopatią i mikroangiopatią w porównaniu z grupą kontrolną. Poza tym w grupie pacjentów z T2DM oraz nadciśnieniem tętniczym stwierdzono także statystycznie znamienne wyższe surowicze stężenie fibronektyny w porównaniu do osób z grupy kontrolnej. Co więcej, wykazano istotnie statystyczną ujemną zależność pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a poziomem cholesterolu całkowitego jak też cholesterolu frakcji LDL. Z kolei dodatnią zależność wykryto pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a poziomem cholesterolu frakcji HDL lecz tylko w grupie pacjentów z T2DM oraz makroangiopatią ($R_s=0.0669$, $p=0.0174$). Otrzymane wyniki są spójne z wynikami innych badaczy Orem C i wsp.[105], którzy u pacjentów z dyslipidemią badali poziom fibronektyny,

fibrynogenu, białka CRP oraz poziom cholesterolu całkowitego i jego frakcje HDL oraz LDL. W badanej grupie pacjentów z dyslipidemią przed leczeniem hipolipemizującym autorzy wykryli, że poziom fibronektyny był pozytywnie skorelowany z białkiem CRP i cholesterolem całkowitym ($r = 0,38$; $p < 0,05$ oraz $r = 0,33$; $p < 0,05$ odpowiednio), natomiast ujemnie skorelowany z cholesterolem frakcji HDL ($r = -0,42$, $p < 0,01$). Z kolei po terapii hipolipemizującej wykazano niższy poziom cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL jak też stężenia triglicerydów, podczas gdy poziom cholesterolu frakcji HDL był wyższy niż przed leczeniem [105]. Natomiast badacze nie zaobserwowali zależności fibronektyny z czynnikiem zapalnym jakim jest CRP po leczeniu hipolipemizującym. W badaniach własnych co prawda nie wykazano zależności pomiędzy surowiczym stężeniem fibronektyny a białkiem CRP ale, co ciekawe wykryto silną zależność fibronektyny z surowiczym stężeniem nowej badanej prozapalnej cytokiny IL-34 ($R_s=0.782$, $p=0.0000833$) w badanej grupie pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 pomimo stosowania leczenia hipolipemizującego. Wyniki otrzymanych badań własnych wskazują na toczący się proces zapalny w grupie pacjentów chorujących na T2DM. Cytokina IL-34 jest nową interleukiną i nie jest jeszcze dobrze zbadana i opisana w wielu jednostkach chorobowych w tym cukrzycy. Uważam, że wyniki moich badań są nowatorskie i mogą posłużyć do dalszych badań nad powiązaniem czynników związanych z zapaleniem w cukrzycy. W dotychczasowych badaniach wykazano związek stężenia FN z mikro i makroangiopatią cukrzycową [105-108,118,193]. Autorzy Hala O. El Mesallamy i wsp. wykryli wyższe surowicze stężenia czynników wzrostu, chemokin jak też FN w grupie pacjentów z T2DM w porównaniu do grupy kontrolnej. Co więcej badacze wykazali związek fibronektyny z nefropatią cukrzycową [118]. Z kolei w badaniach eksperymentalnych wykazano, że ekspresja VEGF wpływa na wzrost stężenia fibronektyny w odpowiedzi na wysokie stężenia glukozy a tym samym może przyczyniać się do rozwoju i progresji retinopatii cukrzycowej [106]. Z drugiej strony inni badacze nie wykazali związku obecności osoczowej fibronektyny z przebiegiem i ciężkością choroby wieńcowej [107]. Należy zaznaczyć jednak, że była to grupa osób z chorobą wieńcową ale bez rozpoznanej cukrzycy. Autorzy stwierdzili, że poziom osoczowy fibronektyny u pacjentów CAD jest znacznie wyższy niż u zdrowych osób z grupy kontrolnej, jednak nie odgrywa żadnej roli w przewidywaniu ciężkości choroby wieńcowej [107]. W kolejnym etapie badań podjęłam próbę wykrycia wartości granicznych dla fibronektyny w celu identyfikacji pacjentów predysponowanych do grupy ryzyka

rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych. W badaniach własnych analiza statystyczna krzywych ROC wykazała, że fibronektyna nie stanowi czynnika dyskryminującego w przewidywaniu ryzyka rozwoju powikłań naczyniowych cukrzycy jak omawiana wyżej IL-34 w badanej grupie pacjentów z T2DM oraz w grupie kontrolnej. Wartość graniczną dla fibronektyny określono na poziomie 99.4 µg/ml. Pole powierzchni pod krzywą AUC_{ROC} dla fibronektyny określono na poziomie 75.16 % we porównaniu (dla IL-34 była to wartość 89.86%) a jego wartość populacyjna mieściła się w przedziale (63.97% - 86.34%). Czułość wykryto na poziomie 91.3%, ale swoistość tylko 55.1%. Sugeruję, że fibronektyna nie jest przydatnym markerem w przewidywaniu ryzyka rozwoju późnych powikłań cukrzycy typu 2. Moje wyniki są zgodne z wynikami badań hiszpańskiej grupy Simó R., i wsp. [108]. Autorzy wykryli wyższe poziomy FN u pacjentów z cukrzycą typu 2 w porównaniu z badaną grupą pacjentów z cukrzycą typu 1 sugerując, że różnica wynika z wyższych stężeń triglicerydów oraz wyższego wskaźnika BMI u pacjentów z cukrzycą typu 2. Analiza regresji logistycznej wykazała że tylko BMI ma znaczący wpływ na stężenie FN ($r = 0,330$; $p = 0.004$), natomiast nie zaobserwowali zależności pomiędzy FN a późnymi powikłaniami cukrzycy [108].

Wyniki wielu badań wykazały, że hiperglikemia jest jednym z głównych czynników rozwoju powikłań zarówno mikro jak też makronaczyniowych cukrzycy [49,50,188]. Zarówno badanie United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) dotyczące ok. 5 tysięcy pacjentów z T2DM jak i Diabetes Complications Control Trial (DCCT) przeprowadzone u 1.4 tys. chorych na T1DM wykazały, iż obniżenie stężenia HbA1c skutkowało zmniejszeniem ryzyka przewlekłych powikłań zarówno mikro jak i makroangiopatii oraz umieralności [66,85]. Hiperglikemia w istotny sposób wpływa na rozwój mikroangiopatii. Przy wzroście poziomu HbA1C z 5.5 % do 9.5% stwierdzono w badaniu UKPDS dziesięciokrotny wzrost ryzyka mikroangiopatii i dwukrotny wzrost ryzyka mikroangiopatii [66,189]. Z kolei wyniki badania DCCT wskazują na powiązanie stopnia hiperglikemii z wystąpieniem retinopatii nieproliferacyjnej i jej progresji do postaci proliferacyjnej [66]. Podobnie jak w ostatnich badaniach autorów Tomić i wsp. wykazano, że niewyrównanie metaboliczne jak też czas trwania cukrzycy były niezależnymi wskaźnikami wystąpienia retinopatii u pacjentów chorujących na T2DM [63]. Wysokie stężenie glukozy jest także czynnikiem ryzyka progresji mikroalbuminurii do jawnej nefropatii

[86]. Wykazano, że ryzyko szybkiego zmniejszenia GFR i rozwoju niewydolności nerek rośnie wraz ze wzrostem HbA1c u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 1 [86].

W badaniach własnych wykazano istotnie ($p=0.000000001$) wyższy poziom HbA1c $6.90 \pm 1.24\%$ u pacjentów z T2DM w porównaniu z $5.37 \pm 0.30\%$ w grupie kontrolnej. Natomiast porównując grupę pacjentów z T2DM oraz mikroangiopatią z grupą T2DM oraz makroangiopatią oraz z T2DM i nadciśnieniem tętniczym nie wykazano istotnie znamiennej różnicy w poziomie HbA1c $p=0.1406$. Jednakże w dalszym etapie badań podjęto próbę wykrycia, który z badanych parametrów klinicznych i biochemicznych zamieszczonych w tab. 16 wykazuje największą wartość dyskryminacyjną w przewidywaniu ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych. Z piętnastu badanych parametrów, dla pięciu z nich tj. HbA1c, IL-34, CRP, glukozy na czczo oraz BMI wykazano przydatność dyskryminacyjną. Co do pozostałych badanych parametrów nie stwierdzono przydatności dyskryminacyjnej. W badanej populacji pacjentów z T2DM oraz osób z grupy ryzyka rozwoju cukrzycy największą wartość dyskryminacyjną w *przewidywaniu ryzyka rozwoju powikłań cukrzycowych, co interesujące wykryto dla HbA1c*. Próg referencyjny wykryto na poziomie 5,8 %. Pole powierzchni pod krzywą ROC_{AUC} dla parametru HbA1c zdefiniowana na poziomie 94.49% a jego wartość populacyjna mieściła się w przedziale 89.69-99.29%. Czulość i swoistość określono na poziomie 100% oraz 82.2% odpowiednio. Już w 2009 roku, eksperci American Diabetes Association stwierdzili, że poziom hemoglobiny glikowanej (HbA1c) może być używany jako narzędzie diagnostyczne dla cukrzycy [190]. Być może przedstawione wyniki badań własnych stanowią przesłankę do powrotu do powyższej koncepcji i dopracowania technologii pomiaru HbA1c, aby poszerzyć możliwości diagnostyczne nie tylko jako wskaźnika stopnia wyrównania cukrzycy ale także jako markera późnych powikłań cukrzycowych.

Reasumując istotą moich badań jest z jednej strony wykrycie znanego klinicznie użytecznego parametru HbA1c dla którego z 15 badanych czynników wykazano najwyższą wartość dyskryminacyjną. Z drugiej strony nowatorskim odkryciem jest wskazanie IL-34 jako dodatkowego markera zapalnego, który być może znajdzie zastosowanie w diagnostyce w przewidywaniu ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych. Uważam, że wskazane są dalsze badania na większej liczbie zarówno pacjentów chorujących na cukrzycę jak też osób z grup ryzyka oraz badania in vitro aby dogłębnie zbadać potencjał zapalny cytokiny IL-34.

Wnioski

1. Pacjenci chorujący na T2DM charakteryzują się znamienne wyższymi osoczymi stężeniami czynników zapalnych w tym białka CRP, oraz IL-34 a także fibronektyny w porównaniu z grupą kontrolną.
2. W grupie pacjentów chorujących na T2DM oraz z mikroangiopatią, makroangiopatią i nadciśnieniem tętniczym wykryto istotne różnice jedynie w zakresie stężenia IL-34 oraz fibronektyny.
3. W grupie pacjentów chorujących na T2DM wykazano, że niezależnymi czynnikami istotnie wpływającymi na wzrost IL-34 jest poziom HbA1c, cholesterol LDL, wskaźnik WHR oraz białko CRP, natomiast niezależnym czynnikiem istotnie wpływającym na wzrost fibronektyny jest cholesterol frakcji LDL.
4. Z piętnastu badanych parametrów klinicznych i biochemicznych dla pięciu z nich tj. HbA1c, IL-34, CRP, glukozy oraz BMI wykazano przydatność dyskryminacyjną w przewidywaniu ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych. Najwyższą przydatność dyskryminacyjną wykryto dla parametru **HbA1c ($AUC_{ROC} = 94.85\%$)**.
5. Fibronektyna, dla której nie wykazano wartości dyskryminacyjnej w badanych grupach, nie jest przydatnym markerem w przewidywaniu ryzyka rozwoju późnych powikłań cukrzycy.
6. Nowa prozapalna cytokina IL-34 posiada lepsze wartości dyskryminacyjne, jako marker zapalenia dla ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy typu 2 niż białko CRP. Próg referencyjny dla IL-34 określono na poziomie 91.2 pg/ml

Wniosek końcowy

Wykryto wyższe stężenie interleukiny 34 oraz fibronektyny grupie pacjentów chorujących na T2DM oraz z mikro- i makroangiopatią. Jednakże IL-34 a nie fibronektyna może być dodatkowym markerem zapalenia w diagnostyce w przewidywaniu ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych u pacjentów z T2DM.

Piśmiennictwo

- [1] Sieradzki J. i wsp.: Cukrzyca. Wydawnictwo Via Medica, Gdańsk 2006
- [2] Henschen F. On the term Diabetes in the works of Aretaeus and Galen. *Med.Hist.* 1969;13:190-192
- [3] Willis T. *Pharmaceutice Rationalis; sive, Diatriba de Medicamentorum Operationibus in Humano Corpore.* Oxford, Sheldonian Theatre, 1674
- [4] Dobson M. experiments and observations on the urine in diabetes. *Med.Obs.Inq.* 1776;5:298-316
- [5] Rollo J. An account of two cases of the diabetes mellitus, with remarks as they arose during the progress of the cure. C. Dilly, Londyn 1797, 1798, 1806
- [6] Lefebvre P. Claude Bernard (1813-1878). *Diabetologia* 2005;48(6):V
- [7] Hausen B.M. Paul Langerhans (1847-1888). *Diabetologia* 2005;48(2):V
- [8] von Mering J., Minkowski O. Diabetes mellitus nach Pancreasextirpation. *Arch.Exper.Path..Pharm.* Leipzig 1890;26:371-387
- [9] Feudtner C. Słodko-gorzkie historie. Elliot P. Joslin i jego pacjenci. PTBPC, Łódź 2005
- [10] Banting F.G., Best C.H., Collip J.B., Campbell W.R., Fletcher A.A. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report. *Can.Med.Asoc.J* 1922;12:141-146
- [11] Funk K. The chemical nature of insulin. *Proc.Soc.exp.Biol.Med.* 1926;23:281
- [12] International Diabetes Federation (IDF) Diabetes Atlas http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf
- [13] Czupryniak L. i wsp. *Diabetologia. Kompendium.* Termedia Wydawnictwa Medyczne, Poznań 2014
- [14] Herrera-Rangel A, Aranda-Moreno C, Mantilla-Ochoa T, Zainos-Saucedo L, Jáuregui-Renaud K. The influence of peripheral neuropathy, gender, and obesity on the postural stability of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Res.* 2014;2014:787202. doi: 10.1155/2014/787202. Epub 2014 Sep 2.
- [15] Petrica L, Vlad A, Gluhovschi G, Gadalean F, Dumitrascu V, Vlad D, Popescu R, Velciov S, Gluhovschi C, Bob F, Ursoniu S, Petrica M, Jianu DC. Glycated peptides are associated with the variability of endothelial dysfunction in the cerebral vessels and the kidney in type 2 diabetes mellitus patients: a cross-

- sectional study. *J Diabetes Complications*. 2014 Dec 3. pii: S1056-8727(14)00368-7. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2014.11.014. [Epub ahead of print]
- [16] Polskie Towarzystwo Diabetologiczne. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2014. *Diabetologia Kliniczna* 2014; 3 supl.A:A3-A4
- [17] WHO: Definition. Diagnosis and classification of Diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation. Part 1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. WHO. Geneva, 2006.
- [18] Vistisen D, Witte DR, Tabák AG, Herder C, Brunner EJ, Kivimäki M, Færch K. Patterns of obesity development before the diagnosis of type 2 diabetes: the Whitehall II cohort study. *PLoS Med*. 2014 Feb 11;11(2):e1001602
- [19] Chandra A, Neeland IJ, Berry JD, Ayers CR, Rohatgi A, Das SR, Khera A, McGuire DK, de Lemos JA, Turer AT. The relationship of body mass and fat distribution with incident hypertension: observations from the Dallas Heart Study. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Sep 9;64(10):997-1002
- [20] Strączkowski M., Kowalska I., Dzieńis–Strączkowska S. Mediators insulinooporności. W: I. Kinalska (red.). *Patofizjologia i następstwa kliniczne insulinooporności*. WIG-Press, Warszawa 2005; 8:135-153
- [21] Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes Res Clin Pract*. 2013 Sep-Oct;7(5):e330-41
- [22] Granata R, Gallo D, Luque RM, Baragli A, Scarlatti F, Grande C, Gesmundo I, Córdoba-Chacón J, Bergandi L, Settanni F, Togliatto G, Volante M, Garetto S, Annunziata M, Chanclón B, Gargantini E, Rocchietto S, Matera L, Datta G, Morino M, Brizzi MF, Ong H, Camussi G, Castaño JP, Papotti M, Ghigo E. Obestatin regulates adipocyte function and protects against diet-induced insulin resistance and inflammation. *FASEB J*. 2012 Aug;26(8):3393-411
- [23] Voulgari C, Pagoni S, Vinik A, Poirier P. Exercise improves cardiac autonomic function in obesity and diabetes. *Metabolism*. 2013 May;62(5):609-21
- [24] Machnica L, Deja G, Polanska J, Jarosz-Chobot P. Blood pressure disturbances and endothelial dysfunction markers in children and adolescents with type 1 diabetes. *Atherosclerosis*. 2014 Nov;237(1):129-34.
- [25] Toledo E, Beunza JJ, Núñez-Córdoba JM, Bes-Rastrollo M, Basterra-Gortari FJ, Martínez-González MA. Metabolic risk factors in a cohort of young adults

- and their association with a body-mass index between 22 and 25 kg/m². *Med Clin (Barc)*. 2009 May 9;132(17):654-60.
- [26] Maggio AB, Martin XE, Saunders Gasser C, Gal-Duding C, Beghetti M, Farpour-Lambert NJ, Chamay-Weber C. Medical and non-medical complications among children and adolescents with excessive body weight. *BMC Pediatr*. 2014 Sep 14;14:232.
- [27] Milewicz A., Jędzrejuk D. Lwow F. Prevalence of obesity in Poland. *Obesity reviews*.2005;6:113-114
- [28] Rywik S., Pająk A., Broda G. Częstość występowania nadwagi i otyłości w wybranych populacjach Polski POL-MONICA BIS. *Medycyna Metaboliczna* 2003;7:8-15
- [29] Zdrojewski T., Wyrzykowski B. Homocysteina i inne czynniki ryzyka choroby niedokrwiennej serca w populacji Polaków w świetle badania NATPOL Plus. Czynniki ryzyka. Konferencja naukowo szkoleniowa. Warszawa 16.kwietnia 2005
- [30] Adamska E, Ostrowska L: Nutrigenetyka i nutrigenomika a leczenie otyłości i chorób towarzyszących. *Forum Zaburzeń Metabolicznych*. 2010; 1(3): 156-167.
- [31] Wyrzykowski B. Zespół metaboliczny w praktyce klinicznej. Wydawnictwo Medyczne Via Medica , Gdańsk 2010
- [32] Daniele G, Guardado Mendoza R, Winnier D, Fiorentino TV, Pengou Z, Cornell J, Andreozzi F, Jenkinson C, Cersosimo E, Federici M, Tripathy D, Folli F. The inflammatory status score including IL-6, TNF- α , osteopontin, fractalkine, MCP-1 and adiponectin underlies whole-body insulin resistance and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol*. 2014 Feb;51(1):123- 128
- [33] Hrnčiar J, Avdicova M, Gabor D, Hrnčiarova M, Chamulova M, Jakubikova K, Kaliska G, Kikova V, Kovar F, Kreze A Jr, Lepej J, Okapcova J, Szentivanyi M. Prevalence of metabolic syndrome, insulin resistance, and microvascular angina pectoris in 500 consecutive patients referred to coronarography. *Endocr Regul*. 2013 Jan;47(1):33-8.
- [34] Kinalska I.[red]. *Patofizjologia i następstwa kliniczne insulinooporności*. WIG Press, Warszawa 2004

- [35] Grant RW, Dixit VD. Mechanisms of disease: inflammasome activation and the development of type 2 diabetes. *Front Immunol.* 2013 Mar 8;4:50.
- [36] Yeh HC, Duncan BB, Schmidt MI, Wang NY, Brancati FL. Smoking, smoking cessation, and risk for type 2 diabetes mellitus: a cohort study. *Ann Intern Med.* 2010 Jan 5;152(1):10-7
- [37] Feng D, Liu T, Wang H, Karp E, Ling W, Chen WQ. Mediation role of C-reactive protein on the association between smoking quantity and type 2 diabetes in current Chinese smokers. *J Diabetes Res.* 2014;2014:171538. doi: 10.1155/2014/171538.
- [38] Bergmann K., Olender K., Odrowąż –Sypniewska G. Rola otyłości i stanu zapalnego w cukrzycy typu 2- znane fakty, nowe kontrowersje. *Jour. Lab. Diag.* 2012;3:313-322
- [39] Lederman S.A., Akabas S.R., Moore B.J. Preventing childhood obesity: a national conference focusing on pregnancy, infancy, and early childhood factors. *Pediatrics* 2004;114:1139-1145
- [40] Liew G, Wang JJ, Duncan BB, Klein R, Sharrett AR, Brancati F, Yeh HC, Mitchell P, Wong TY; Low birthweight is associated with narrower arterioles in adults. *Atherosclerosis Risk in Communities Study. Hypertension.* 2008 Apr;51(4):933-8
- [41] Chuenta W, Phonrat B, Tungtrongchitr A, Limwongse C, Chongviriyaphan N, Santiprabhob J, Tungtrongchitr R. Common variations in the FTO gene and obesity in Thais: A family-based study. *Gene.* 2014 Dec 24. pii: S0378-1119(14)01461-9.
- [42] Bessesen D.H. Update on obesity. *Jour. Clin. End. Meth.* 2008; 93 (6): 2027 – 2034
- [43] Ichichara S., Hamada Y. Genetic Factors for human obesity. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008; 65:1086-1098
- [44] Łuczyński W, Szypowska A, Głowińska-Olszewska B, Szadkowska A, Bossowski A; PolPeDiab Polish Research Group. Disease associated clinical factors and FTO polymorphism: effect on body mass in children with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes.* 2014 Aug;15(5):363-71.
- [45] Bašić M, Butorac A, Landeka Jurčević I, Bačun-Družina V. Obesity: genome and environment interactions. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2012 Sep;63(3):395-405

- [46] Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin. *N. Engl. J. Med.* 2002;346:393-403
- [47] Ginter E., Simko V. Global prevalence and future of diabetes mellitus. *Adv. Exp. Med. and Biol.* 2012;771:35-41
- [48] Bello NA, Pfeffer MA, Skali H, McGill JB, Rossert J, Olson KA, Weinrauch L, Cooper ME, de Zeeuw D, Rossing P, McMurray JJ, Solomon SD. Retinopathy and clinical outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus, chronic kidney disease, and anemia. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2014 Apr 6;2(1):e000011. doi: 10.1136/bmjdr-2013-000011. eCollection 2014.
- [49] Varun Singh, Anjana Bali, Nirmal Singh : Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean J Physiol Pharmacol* 2014;18(1):1-14
- [50] Scheetz M.J., King G.L. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA* 2002;288:2579-2588
- [51] Granieret C. et al. Gene and protein markers of DN. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2008;23:792-799
- [52] Preciado-Puga MC, Malacara JM, Fajardo-Araujo ME, Wröbel K, Wröbel K, Kornhauser-Araujo C, Garay-Sevilla ME. Markers of the progression of complications in patients with type 2 diabetes: a one-year longitudinal study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2014 Sep;122(8):484-90. doi: 10.1055/s-0034-1372594. Epub 2014 Sep 17.
- [53] Mrowicka M. Znaczenie zaburzeń układu prooksydacyjno-antyoksydacyjnego dla etiopatologii cukrzycy. *Post. Hig. Med. Dosw.*,2011; 65: 534-541
- [54] Kaminska-Winciorek G, Deja G, Polańska J, Jarosz-Chobot P. Diabetic microangiopathy in capillaroscopic examination of juveniles with diabetes type 1. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2012 Jan 30;66:51-9.
- [55] Kamoi K, Takeda K, Hashimoto K, Tanaka R, Okuyama S. Identifying risk factors for clinically significant diabetic macula edema in patients with type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev.* 2013 May;9(3):209-17
- [56] Raman R, Ganesan S, Pal SS, Kulothungan V, Sharma T. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy in rural India. Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy Epidemiology and Molecular Genetic Study III (SN-DREAMS III), report no 2. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2014 Jun 6;2(1):e000005. doi: 10.1136/bmjdr-2013-000005. eCollection 2014.

- [57] Tanamas SK, Wong E, Backholer K, Abdullah A, Wolfe R, Barendregt J, Peeters A. Duration of obesity and incident hypertension in adults from the Framingham Heart Study. *J Hypertens*. 2014 Dec 4. [Epub ahead of print]
- [58] Ziegler D, Papanas N, Vinik AI, Shaw JE. Epidemiology of polyneuropathy in diabetes and prediabetes. *Handb Clin Neurol*. 2014;126:3-22
- [59] Shay CM, Evans RW, Orchard TJ. Do plant sterol concentrations correlate with coronary artery disease in type 1 diabetes? A report from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *J Diabetes*. 2009 Jun;1(2):112-7.
- [60] 2013 Practice guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and the European Society of Cardiology (ESC): ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension. ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens*. 2013 Oct;31(10):1925-38
- [61] Barengo NC, Tuomilehto JO. Blood pressure treatment target in patients with diabetes mellitus--current evidence. *Ann Med*. 2012 Jun;44 Suppl 1:S36-42
- [62] Izzo R, de Simone G, Trimarco V, Gerdtts E, Giudice R, Vaccaro O, De Luca N, Trimarco B. Hypertensive target organ damage predicts incident diabetes mellitus. *Eur Heart J*. 2013 Nov;34(44):3419-26.
- [63] Tomić M, Ljubić S, Kaštelan S, Gverović Antunica A, Jazbec A, Poljičanin T. Inflammation, haemostatic disturbance, and obesity: possible link to pathogenesis of diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:818671.
- [64] Klein R., Klein B.E.K., Moss S.E., Davis M.D., De Mets D.L. Is blood pressure a predictor of the incidence of progression of diabetic retinopathy? *Arch. Intern. Med*.1989;149:2427-2432
- [65] Takao T, Matsuyama Y, Yanagisawa H, Kikuchi M, Kawazu S. Visit-to-visit variability in systolic blood pressure predicts development and progression of diabetic nephropathy, but not retinopathy, in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2014;28(2):185-90
- [66] Kohner EM. Microvascular disease: what does the UKPDS tell us about diabetic retinopathy? *Diabet Med*. 2008;25 Suppl 2:20-4

- [67] Tesfaye S., Chatuverdi N., Eaton S.E. EURODIAB prospective Complications Study Group. vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N.Engl. J. Med.* 2005;352:341-350
- [68] Hafiane A, Kellett S, Genest J. Curr Opin Endocrinol Treatment options for low high-density lipoproteins. *Diabetes Obes.* 2014;21(2):134-9
- [69] Sacks FM, Hermans MP, Fioretto P, Valensi P, Davis T, Horton E, Wanner C, et al.. Association between plasma triglycerides and high-density lipoprotein cholesterol and microvascular kidney disease and retinopathy in type 2 diabetes mellitus: a global case-control study in 13 countries. *Circulation.* 2014;129(9):999-1008.
- [70] Heart Protection Study Collaborative Group: MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol – lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomized placebo controlled trial. *Lancet* 2003;361:200-2016
- [71] Rosales-Hernandez A, Cheung A, Podgorny P, Chan C, Toth C. Absence of clinical relationship between oxidized low density lipoproteins and diabetic peripheral neuropathy: a case control study. *Lipids Health Dis.* 2014 Feb 12;13:32. doi: 10.1186/1476-511X-13-32.
- [72] Golubovic-Arsovska M Association of dyslipidaemia with macular oedema and hard exudates in diabetic maculopathy. *Prilozi.* 2007; 28(2): 149-60.
- [73] Popescu T, Moța M. Dyslipidemia and hypertension in patients with type 2 diabetes and retinopathy. *Rom J Intern Med.* 2009; 47(3): 235-41
- [74] Minuto N, Emmanuele V, Vannati M, Russo C, Rebora C, Panarello S, Pistorio A, Lorini R, d'Annunzio G. Retinopathy screening in patients with type 1 diabetes diagnosed in young age using a non-mydratic digital stereoscopic retinal imaging. *J Endocrinol Invest.* 2012; 35(4):389-94
- [75] Mayer-Davis EJ, Davis C, Saadine J, D'Agostino RB Jr, Dabelea D, Dolan L, Garg S, Lawrence JM, Pihoker C, Rodriguez BL, Klein BE, Klein R; SEARCH for Diabetes in Youth Study Group. Diabetic retinopathy in the SEARCH for Diabetes in Youth Cohort: a pilot study. *Diabet Med.* 2012;29(9):1148-52
- [76] Rema M., Saravanan G., Deepa R., Mohan V. Familial clustering of diabetic retinopathy in South Indian type 2 diabetic patients. *Diabet. Med.* 2002;19:910-919

- [77] Granier C., Makni K, Molina L, Jardin-Watelet B, Ayadi H, Jarraya F. Gene and protein markers of diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplan.* 2008;23:792-799
- [78] Kaidonis G, Abhary S, Daniell M, Gillies M, Fogarty R, Petrovsky N. Genetic study of diabetic retinopathy: recruitment methodology and analysis of baseline characteristics. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2014 Jul;42(5):486-93
- [79] Hofer SE, Bennetts B, Chan AK. Association between PON 1 polymorphisms, PON activity and diabetes complications. *J Diabetes Complications* 2006;20:322-328.
- [80] Wiltshire EJ, Mohsin F, Chan A. Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase gene polymorphisms and protection from microvascular complications in adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2008;9:348-353.
- [81] Mamoulakis D, Bitsori M, Galanakis E, Vazgiourakis V, Panierakis C, Goulielmos GN. Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase eNOS gene and early microangiopathy in type 1 diabetes. *Int J Immunogenet.* 2009 ;36(3):153-157
- [82] Ray D, Mishra M, Ralph S, Read I, Davies R, Brenchley P. Association of the VEGF gene with proliferative diabetic retinopathy but not proteinuria in diabetes. *Diabetes.* 2004 ;53(3):861-864.
- [83] Lietz M, Berges A, Lebrun S, Meurrens K, Steffen Y, Stolle K, Schueller J, Boue S, Vuillaume G, Vanscheeuwijck P, Moehring M, Schlage W, De Leon H, Hoeng J, Peitsch M. Cigarette-smoke-induced atherogenic lipid profiles in plasma and vascular tissue of apolipoprotein E-deficient mice are attenuated by smoking cessation. *Atherosclerosis.* 2013 Jul;229(1):86-93
- [84] Choe EY, Wang HJ, Kwon O, Kim KJ, Kim BS, Lee BW, Ahn CW, Cha BS, Lee HC, Kang ES, Mantzoros CS. Variants of the adiponectin gene and diabetic microvascular complications in patients with type 2 diabetes. *Metabolism.* 2013 May;62(5):677-85
- [85] Fähmann ER, Adkins L, Loader CJ, Han H, Rice KM, Denvir J, Driscoll HK. Severe hypoglycemia and coronary artery calcification during the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications (DCCT/EDIC) study. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014 Oct 23. pii: S0168-8227(14)00467-7.

- [86] Giorgino F, Laviola L, Cavallo Perin P, Solnica B, Fuller J, Chaturvedi N. Factors associated with progression to macroalbuminuria in microalbuminuric Type 1 diabetic patients: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia*. 2004 Jun;47(6):1020-8
- [87] Ritz E., Benck V., Orth S.R. Acute effects of cigarette smoking on renal hemodynamics. *Contrib. Nephrol*. 2000;130:31-38
- [88] Baggio B., Budecovic A., Vortre M.D., Soller A., Bonseghin M., Fioretto P. Effects of cigarette smoking on glomerular structure and function in type 2 diabetes patients. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2002; 13:2730-2736
- [89] Uruska A, Araszkiwicz A, Uruski P, Zozulińska-Ziółkiewicz D. Higher risk of microvascular complications in smokers with type 1 diabetes despite intensive insulin therapy. *Microvasc Res*. 2014 Mar;92:79-84
- [90] Schöttker B, Herder C, Rothenbacher D, Roden M, Kolb H, Müller H, Brenner H. Proinflammatory cytokines, adiponectin, and increased risk of primary cardiovascular events in diabetic patients with or without renal dysfunction: results from the ESTHER study. *Diabetes Care*. 2013 Jun;36(6):1703-11.
- [91] Ahmadi-Abhari S, Luben RN, Wareham NJ, Khaw KT. Seventeen year risk of all-cause and cause-specific mortality associated with C-reactive protein, fibrinogen and leukocyte count in men and women: the EPIC-Norfolk study. *Eur J Epidemiol*. 2013 Jul;28(7):541-50.
- [92] Ofstad AP, Gullestad L, Orvik E, Aakhus S, Endresen K, Ueland T, Aukrust P, Fagerland MW, Birkeland KI, Johansen OE. Interleukin-6 and activin A are independently associated with cardiovascular events and mortality in type 2 diabetes: the prospective Asker and Bærum Cardiovascular Diabetes (ABCD) cohort study. *Cardiovasc Diabetol*. 2013 Aug 30;12:126. doi: 10.1186/1475-2840-12-126.
- [93] Yeh E.T., Willerson J.T.: Coming of age of C-reactive protein: using inflammation markers in cardiology. *Circulation*, 2003; 107:370–371
- [94] Al-Shukaili A, Al-Ghafri S, Al-Marhoobi S, Al-Abri S, Al-Lawati J, Al-Maskari M. Analysis of inflammatory mediators in type 2 diabetes patients. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:976810.
- [95] Del Cañizo Gómez FJ, Fernández Pérez C, Moreno Ruiz I, de Gorospe Pérez-Jáuregui C, Silveira Rodríguez B, González Losada T, Segura Galindo A.

- Microvascular complications and risk factors in patients with type 2 diabetes. *Endocrinol Nutr.* 2011 Apr;58(4):163-8.
- [96] Halcox JP, Roy C, Tubach F, Banegas JR, Dallongeville J, De Backer G, Guallar E, Sazova O, Medina J, Perk J, Steg PG, Rodríguez-Artalejo F, Borghi C. C-reactive protein levels in patients at cardiovascular risk: EURIKA study. *BMC Cardiovasc Disord.* 2014 Feb 24;14:25
- [97] Firdous S. Correlation of CRP, fasting serum triglycerides and obesity as cardiovascular risk factors. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2014; 24(5): 308-313
- [98] Morrison P.R., Edsall J.T., Miller S.G.: Preparation and properties of serum and plasma proteins. XVIII. The separation of purified fibrinogen from fraction I of human plasma. *J. Am. Chem. Soc.*, 1948; 70:3103–3108
- [99] Krzyżanowska-Gołąb D., Lemańska –Perek A., Kątnik-Prastowska I.: Fibronektyna jako aktywny składnik macierzy pozakomórkowej. *Postepy Hig Med Dosw*, 2007;61:655-663
- [100] MW Mosesson. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005; 8: 1894-904
- [101] Ingham K.: Fibronectin – molecular interactions. <http://home.comcast.net/~kennethingham/newsite/index.htm> (18.10.2007)
- [102] R Testa, AR Bonfigli, C Sirolla, G De Grazia, P Compagnucci, S Manfrini, D Fumelli, I Testa. Fibronectin and lipoprotein(a) are inversely related to plasminogen activator inhibitor type-1 levels in Type 2 diabetic patients without complications. *Diabetes Nutr Metab.* 2000; 5: 269-75.
- [103] Hirnle L., Kątnik-Prastowska I.: Amniotic fibronectin fragmentation and expression of its domains, sialyl and fucosyl glykotoxes associated with pregnancy complicated by intrauterine infection. *Clin. Chem.Lab. Med.*, 2007; 45: 208–214
- [104] Silvestre FJ, Puente A, Bagán JV, Castell JV. Presence of fibronectin peptides in saliva of patients with Sjögren's syndrome: a potential indicator of salivary gland destruction. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009 Aug 1;14(8):e365-70.
- [105] Orem C, Orem A, Calapoğlu M, Baykan M, Uydu HA, Erdöl C. Plasma fibronectin level and its relationships with lipids, lipoproteins and C-reactive protein in patients with dyslipidaemia during lipid-lowering therapy. *Acta Cardiol.* 2002 Dec;57(6):421-5.

- [106] Chen S, Chakrabarti R, Keats EC, Chen M, Chakrabarti S, Khan ZA. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by extra domain B segment of fibronectin in endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Dec 17;53(13):8333-43
- [107] Ozcelik F, Erdogan O, Aktoz M, Ekuklu G, Tatli E, Demir M. Diagnostic value of plasma fibronectin level in predicting the presence and severity of coronary artery disease. *Ann Hematol.* 2009 Mar;88(3):249-53.
- [108] Simó R, Segura RM, García-Pascual L, Masmiquel L, Burgos R, Hernández C, Martí R, Mesa J. Fibronectin and diabetes mellitus: the factors that influence its plasma concentrations and its usefulness as a marker of late complications. *Med Clin (Barc).* 1999 Jan 23;112(2):45-50.
- [109] Stamov DR, Stock E, Franz CM, Jähnke T, Haschke H. Imaging collagen type I fibrillogenesis with high spatiotemporal resolution. *Ultramicroscopy.* 2014 Oct 28;149C:86-94.
- [110] Peters JH, Greasby T, Lane N, Woolf A. Correlations between plasma levels of a fibronectin isoform subpopulation and C-reactive protein in patients with systemic inflammatory disease. *Biomarkers.* 2009 Jun;14(4):250-7
- [111] Ghosh K., Ren X.D., Shu X., Prestwich G., Clark R.: Fibronectin functional domain coupled to hyaluronan stimulate adult human dermal fibroblast responses critical for wound healing. *Tissue Eng.*, 2006; 12:601–613
- [112] Midwood K.S., Williams L.V., Schwarzbauer J.E.: Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36: 1031–1037
- [113] Meland MN, Herndon ME, Stipp CS. Expression of alpha5 integrin rescues fibronectin responsiveness in NT2N CNS neuronal cells. *J Neurosci Res.* 2010 Jan;88(1):222-32
- [114] Sivakumar P., Czirok A., Rongish B.J., Divakara V.P., Wang Y.P., Dallas S.L.: New insights into extracellular matrix assembly and reorganization from dynamic imaging of extracellular matrix proteins in living osteoblasts. *J. Cell Sci.*, 2006; 119: 1350–1360
- [115] Park IH, Um JY, Hong SM, Cho JS, Lee SH, Lee SH, Lee HM. Metformin reduces TGF- β 1-induced extracellular matrix production in nasal polyp-derived fibroblasts. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014 Jan;150(1):148-53.

- [116] Makogonenko E., Ingham K.C., Medved L.: Interaction of the fibronectin COOH-terminal Fib-2 regions with fibrin: further characterization and localization of the Fib-2-binding sites. *Biochemistry*, 2007; 46: 5418–5426
- [117] Chen Q., Sivakumar P., Barley C., Peters D.M., Gomes R.R., Farach-Carson M.C., Dallas S.L.: Potential role for heparan sulfate proteoglycans in regulation of TGF- β by modulating assembly of latent TGF- β binding protein-1 (LTBP1). *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 26418–26430
- [118] Hala O. El Mesallamy, Hanaa H. Ahmed, Atef A. Bassyouni, Amira S. Ahmed. Clinical significance of inflammatory and fibrogenic cytokines in diabetic nephropathy. *Clinical Biochemistry* 2012; 45:646-650
- [119] Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2005; 54: 1626–1634.
- [120] Sato S, Kawamura H, Takemoto M, Maezawa Y, Fujimoto M, Shimoyama T. Halofuginone prevents extracellular matrix deposition in diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 379:411–416.
- [121] Thomson SE, McLennan SV, Kirwan PD, Heffernan SJ, Hennessy A, Yue DK. Renal connective tissue growth factor correlates with glomerular basement membrane thickness and prospective albuminuria in a non-human primate model of diabetes: possible predictive marker for incipient diabetic nephropathy. *J. Diab. Comp.* 2008; 22:284–294
- [122] Gołab J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T. Cytokiny. *Immunologia*. Warszawa, Wyd Nauk PWN, 2007; 9: 108-152
- [123] Jung CH, Kim BY, Mok JO, Kang SK, Kim CH.: Association between serum adipocytokine levels and microangiopathies in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Investigation* 2014 May 4;5(3):333-9
- [124] Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):2548-56
- [125] Zorena K., Kula M., Malinowska E., Raczyńska D., Myśliwiec M., Raczyńska K. Threshold serum concentrations of tumour necrosis factor alpha (TNF α) as a potential marker of the presence of microangiopathy in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus (T1DM). *Hum. Immunol.* 2013 Jan;74(1):75-81

- [126] Zorena K., Raczyńska D., Raczyńska K. Biomarkers in Diabetic Retinopathy and the Therapeutic Implications. *Med. Inflamm.* 2013; 2013: 193604.
- [127] Chen Z., Buki K., Vaaraniemi J., Gu G., Kalervo-Vaananen H. The critical Role of IL34 in Osteoclastogenesis. *PLoS One* 2011; 6(4): e18689
- [128] Greter M., Lelios I, Pelczar P., Hoeffel G. et al: Stroma –derived interleukin 34 controls the development and maintenance of Langerhans cells and the maintenance of mikroglia. *Immunity* 2012; 37(6): 1050-1060
- [129] Hwang SJ, Choi B, Kang SS, Chang JH, Kim YG, Chung YH, Sohn DH, So MW, Lee CK, Robinson WH, Chang EJ. Interleukin- 34 produced by human fibroblast like synovial cells in rheumatoid arthritis supports osteoclastogenesis. *Arthritis Research & Therapy* 2012; 14: R14
- [130] Li Z, Jin D, Wu Y, Zhang K, Hu P, Cao X, Chen Z. Increased serum interleukin-34 in patients with coronary artery disease. *J Int Med Res.* 2012; 40(5): 1866-70.
- [131] Chemel M, Le Goff B, Brion R, Cozic C, Berreur M, Amiaud J, Bougras G, Touchais S, Blanchard F, Heymann MF, Berthelot JM, Verrecchia F, Heymann D. Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patient. *Ann RheumDis* 2012;71(1): 150-154
- [132] Yamawaki H. Vascular effects of novel adipocytokines: Focus on Vascular Contractility and Inflammatory Responses. *Biol. Pharm. Bull.* 2011; 34(3): 307-310
- [133] Bury A., Kulik-Rechberger B. Programowanie otyłości zaczyna się w okresie płodowym- rola leptyny. *Endokr. Pediatr.* 2010; 9(4): 44-47
- [134] Rosen E.D., Spiegelman B.M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 2006; 444 (14):doi:10.1038/nature 05483
- [135] Fujita H, Morii T, Koshimura J, Ishikawa M, Kato M, Miura T, Sasaki H, Narita T, Ito S, Takei M Possible relationship between adiponectin and renal tubular injury in diabetic nephropathy. *Endocr J.* 2006 Dec;53(6):745-52.
- [136] Brennan A.M., Mantzoros C.S. Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology—emerging clinical applications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2: 318–327

- [137] Belgardt B.F., Brüning J.C.: CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2010; 1212: 97–113
- [138] Morioka T, Emoto M, Yamazaki Y, Kawano N, Imamura S, Numaguchi R, Urata H, Motoyama K, Mori K, Fukumoto S, Koyama H, Shoji T, Inaba M. Leptin is associated with vascular endothelial function in overweight patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2014 Jan 10;13:10.
- [139] Krasnodębski P., Bąk M., Opolski G., Karnafel W: Leptin in acute myocardial infarction and period of coalescence in patients with type 2 DM. *Kardiol Pol* 2010; 68: 648-653.
- [140] Celi F, Bini V, Papi F, Santilli E, Castellani MS, Ferretti A, Mencacci M, Berioli MG, De Giorgi G, Falorni A. Circulating adipocytokines in non-diabetic and Type 1 diabetic children: relationship to insulin therapy, glycaemic control and pubertal development. *Diabet Med.* 2006 Jun;23(6):660-665.
- [141] Tan K.C., Xu A., Chow W.S, Lam M.C., Ai V.H., Tam S.C, Lam K.S. Hypoadiponectinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004 Feb;89(2):765-773
- [142] Abi Khalil C, Mohammedi K., Aubert R, Travert F., Hadjadj S., Roussel R., Fumeron F., Marre M. Intensifying glycaemic control with insulin reduces adiponectin and its HMW isoform moderately in type 2, but not in type 1, diabetes. *Diabetes Metab.* 2011;37(3):259-61.
- [143] Díez J.J, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur. J. Endocrinol.* 2003;148(3): 293-300.
- [144] Savino F., Petrucci E., Nanni G. Adiponectin: an intriguing hormone for paediatricians. *Acta Paediatr.* 2008 ;97(6):701-705.
- [145] Kumada M, Kihara S., Ouchi N Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* 2004; 109(17): 2046-2049
- [146] Wulster-Radcliffe M.C, Ajuwon K.M, Wang J., Christian J.A, Spurlock M.E Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;316(3): 924-929
- [147] Matsuzawa Y., Funahashi T., Kihara S., Shimomura I. Adiponectin and Metabolic Syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2004; 24: 29-33

- [148] Schalkwijk C.G., Chaturvedi N., Schram M.T., Fuller J.H., Stehouwer C.D.; EURODIAB Prospective Complications Study Group. Adiponectin is inversely associated with renal function in type 1 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(1):129-135
- [149] Frystyk J., Tarnow L., Hansen T.K., Parving H.H., Flyvbjerg A. Increased serum adiponectin levels in type 1 diabetic patients with microvascular complications. *Diabetologia* 2005; 48(9):1911-1918
- [150] Habeeb NM, Youssef OI, Saab AA, El Hadidi ES. Adiponectin as a marker of complications in type 1 diabetes. *Indian Pediatr.* 2012 Apr;49(4):277-80.
- [151] Stepan CM, Lazar MA. The current biology of resistin. *J. Intern. Med.* 2004;255:439–447.
- [152] Banerjee R.R., Rangwala S.M., Shapiro J.S., Rich A.S., Rhoades B., Qi Y., Wang J., Rajala M.W., Poci A., Scherer P.E., Stepan C.M., Ahima R.S., Obici S., Rossetti L., Lazar M.A.: Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science*, 2004; 303: 1195–1198
- [153] Pang S.S., Le Y.Y.: Role of resistin in inflammation and inflammation-related diseases. *Cell. Mol. Immunol.*, 2006; 3: 29–34
- [154] Reilly M.P., Lehrke M., Wolfe M.L., Rohatgi A., Lazar M.A., Rader D.J.: Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation*, 2005; 111: 932–939
- [155] Holcomb I.N., Kabakoff R.C., Chan B., Baker T.W., Gurney A., Henzel W., Nelson C., Lowman H.B., Wright B.D., Skelton N.J., Frantz G.D., Tumas D.B., Peale F.V.Jr., Shelton D.L., Hebert C.C.: FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J.*, 2000; 19: 4046–4055
- [156] Kunnari A., Ukkola O., Päivänsalo M., Kesäniemi J.A.: High plasma resistin level is associated with enhanced highly sensitive C-reactive protein and leukocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2006; 91: 2755–2760
- [157] Osawa H, Ochi M, Kato K, Yamauchi J, Nishida W, Takata Y, Kawamura R, Onuma H, Takasuka T, Shimizu I, Fujii Y, Ohashi J, Makino H. Serum resistin is associated with the severity of microangiopathies in type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Apr 6;355(2):342-6

- [158] Uslu S, Kebapçı N, Kara M, Bal C. Relationship between adipocytokines and cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus. *Exp Ther Med.* 2012 Jul;4(1):113-120
- [159] Bremer AA, Devaraj S, Afify A, Jialal I. Adipose tissue dysregulation in patients with metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;96:E1782–E1788
- [160] Kelly KR, Kashyap SR, O’Leary VB. Retinol-binding protein 4 (RBP4) protein expression is increased in omental adipose tissue of severely obese patients. *Obesity* 2010; 18: 663-6.
- [161] Oh EG, Bang SY, Kim SH, Hyun SS, Chu SH, Jeon JY, Im JA, Lee JE, Lee MK. Therapeutic lifestyle modification program reduces plasma levels of the chemokines CRP and MCP-1 in subjects with metabolic syndrome. *Biol Res Nurs.* 2013 Jan;15(1):48-55
- [162] Cabré A, Lázaro I, Girona J, Manzanares J, Marimón F, Plana N, Heras M, Masana L. Retinol-binding protein 4 as a plasma biomarker of renal dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *J Intern Med.* 2007 Oct;262(4):496-503.
- [163] Norseen J, Hosooka T, Hammarstedt A, Yore MM, Kant S, Aryal P, Kiernan UA, Phillips DA, Maruyama H, Kraus BJ, Usheva A, Davis RJ, Smith U, Kahn BB. Retinol-binding protein 4 inhibits insulin signaling in adipocytes by inducing proinflammatory cytokines in macrophages through a c-Jun N-terminal kinase- and toll-like receptor 4-dependent and retinol-independent mechanism. *Mol Cell Biol.* 2012 May;32(10):2010-9
- [164] Derosa G, Cicero AF, Carbone A, Querci F, Fogari E, D’Angelo A, Maffioli P. Variation of some inflammatory markers in hypertensive patients after 1 year of olmesartan/amlodipine single-pill combination compared with olmesartan or amlodipine monotherapies. *J Am Soc Hypertens.* 2013 ;7(1):32-39
- [165] Gulcelik N.E., Usman A., Gürlek A. Role of adipocytokines in predicting the development of diabetes and its late complications. *Endocrine.* 2009 ;36(3):397-403
- [166] Gulcelik N.E., Karakaya J., Gedik A., Usman A., Gurlek A. Serum vaspin levels in type 2 diabetic women in relation to microvascular complications. *Eur J Endocrinol.* 2009 Jan;160(1):65-70

- [167] Flehmig G, Scholz M, Klötting N, Fasshauer M, Tönjes A, Stumvoll M, Youn BS, Blüher M. Identification of adipokine clusters related to parameters of fat mass, insulin sensitivity and inflammation. *PLoS One*. 2014 Jun 26;9(6):e99785.
- [168] Syed Ikmal SI, Zaman Huri H, Vethakkan SR, Wan Ahmad WA. Potential biomarkers of insulin resistance and atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus patients with coronary artery disease. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:698567
- [169] Jialal I, Devaraj S, Kaur H, Adams-Huet B, Bremer AA. Increased chemerin and decreased omentin-1 in both adipose tissue and plasma in nascent metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Mar;98(3):E514-7
- [170] Neuparth MJ, Proença JB, Santos-Silva A, Coimbra S. Adipokines, oxidized low-density lipoprotein, and C-reactive protein levels in lean, overweight, and obese portuguese patients with type 2 diabetes. *ISRN Obes*. 2013 Jan 17;2013:142097
- [171] El-Mesallamy HO El-Derany MOHamdy NM Serum omentin-1 and chemerin levels are interrelated in patients with Type 2 diabetes mellitus with or without ischaemic heart disease. *Diabet Med*. 2011 Oct;28(10):1194-200.
- [172] Panagiotou G, Mu L, Na B, Mukamal KJ, Mantzoros CS. Circulating irisin, omentin-1, and lipoprotein subparticles in adults at higher cardiovascular risk. *Metabolism*. 2014 Oct;63(10):1265-71.
- [173] Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC); European Association for the Study of Diabetes (EASD), Rydén L, I wsp.. ESC guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD - summary. *Diab Vasc Dis Res*. 2014 May;11(3):133-73.
- [174] ESC guidelines on diabetes, pre-diabetes and diseases of the cardiovascular system developed in cooperation with the EASD. Grupa Robocza Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ESC), Rydén L, I wsp. European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Kardiol Pol*. 2013;71 Suppl 11:S319-94
- [175] ETDRS Research Group, ETDRS Report No 11. Classification of diabetic retinopathy from fluorescein angiograms, *Ophthalmology* 1991; 98: 807-822

- [176] Youden, W.J. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 1950, 3, 32-35.
- [177] DeLong E.R., DeLong D.M., Clarke-Pearson D.L. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a non-parametric approach. *Biometrics*, 1988, 44, pp. 837–842
- [178] Carpenter J and Bithell J. Bootstrap condence intervals: when, which, what? A practical guide for medical statisticians. *Statistics in Medicine* 2000; 19, 1141–1164. DOI: 10.1002/(SICI)1097 0258(20000515)19:9<1141::AID-SIM479>3
- [179] Holmquist G.N.: *Statins: Indications and Uses, Safety and Modes of Action*. Nova Science Publishers, Inc., New York 2009.
- [180] Banach M., Filipiak K., Opolski G.: *Aktualny stan wiedzy na temat statyn*. Wydawnictwo Medyczne Termedia, Poznań 2008.
- [181] Włoch-Kopeć D., Bała M., Jaeschke R.: Skuteczność leczenia statynami u chorych na cukrzycę – meta analiza. *Medycyna Praktyczna* 2008;5:82-87.
- [182] Mora S, Ridker PM. Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER)-can C-reactive protein be used to target statin therapy in primary prevention? *Am J Cardiol*. 2006 Jan 16;97(2A):33A-41A
- [183] Ridker P.M., Rifai N., Rose L., Buring J.E., Cook N.R.: Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.*, 2002; 347: 1557–1565
- [184] Mitu F, Rezuş E, Banu C, Jufă C, Mitu O, Dima-Cozma C. Inflammatory markers in hypertensive patients and influence of some associated metabolic risk factor. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2014 Jul-Sep;118(3):631-6.
- [185] Odden MC, Shlipak MG, Whitson HE, Katz R, Kearney PM, Defilippi C, Shastri S, Sarnak MJ, Siscovick DS, Cushman M, Psaty BM, Newman AB. Risk factors for cardiovascular disease across the spectrum of older age: The Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis*. 2014 Nov;237(1):336-42
- [186] Chang EJ, Lee SK, Song YS, Jang YJ, Park HS, Hong JP, Ko AR, Kim DY, Kim JH, Lee YJ, Heo YS. IL-34 is associated with obesity, chronic inflammation, and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Jul;99(7):E1263-71.

- [187] Li Z, Jin D, Wu Y, Zhang K, Hu P, Cao X, Chen Z. *J Int Med Res.* 2012;40(5):1866-70. Increased serum interleukin-34 in patients with coronary artery disease.
- [188] Wang X, DuBois DC, Sukumaran S, Ayyar V, Jusko WJ, Almon RR. Variability in Zucker diabetic fatty rats: differences in disease progression in hyperglycemic and normoglycemic animals. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2014 Nov 11;7:531-41
- [189] Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS35): prospective observation study. *BMJ.* 2000 Aug 12;321(7258):405-12.
- [190] The International Expert Committee. International Expert Committee Report on the Role of the A1C Assay in the Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care.* 2009;32:1327–1334
- [191] Scheetz M.J., King G.L. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA* 2002;288:2579-2588
- [192] Mahalle N, Garg M, Kulkarni M, Naik S. Association of Inflammatory Cytokines with Traditional and Nontraditional Cardiovascular Risk Factors in Indians with known Coronary Artery Disease. *Ann Med Health Sci Res.* 2014 Sep;4(5):706-712
- [193] Kengne AP, Czernichow S, Stamatakis E, Hamer M, Batty GD. Fibrinogen and future cardiovascular disease in people with diabetes: aetiological associations and risk prediction using individual participant data from nine community-based prospective cohort studies. *Diab Vasc Dis Res.* 2013; 10(2):143-51