



Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Magdalena Borowska

**Wybrane nieklasyczne czynniki proaterogenne
u chorych na cukrzycę typu 2
w aspekcie stosowanej farmakoterapii.**

Promotor

Dr hab. n. med. Marzena Dworacka

Poznań 2011

Słowa kluczowe:

- cukrzyca typu 2,
- miażdżyca,
- metformina,
- pochodne sulfonilomocznika,
- insulina.

Praca przedstawiona
Radzie Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu
celem uzyskania stopnia
doktora nauk farmaceutycznych
przez
Magdalенę Borowską

**Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Farmakologii
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

przy współpracy
Katedry i Zakładu Immunologii Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Podziękowania

Pragnę złożyć wyrazy wdzięczności Pani dr hab. n. med. Marzenie Dworackiej za nieocenioną pomoc merytoryczną, wyrozumiałość i życzliwość – okazywaną w trakcie konsultacji oraz za opiekę naukową, co sprawiło, iż nasza współpraca zaowocowała niniejszą rozprawą.

Składam serdeczne podziękowania Pani Prof. dr hab. Teresie Bobkiewicz-Kozłowskiej za umożliwienie mi wykonania niniejszej pracy doktorskiej w Katedrze i Zakładzie Farmakologii UM w Poznaniu oraz za zainteresowanie nad jej przebiegiem.

	Spis treści	
	Wykaz skrótów.....	8
	Wykaz tabel.....	9
	Wykaz rycin.....	10
I.	Część teoretyczna.....	13
I.1.	Wprowadzenie.....	13
I.2.	Udział wybranych czynników w patogenezie procesu zapalnego związanego z rozwojem miażdżycy.....	15
I.2.1.	Homocysteina.....	16
I.2.2.	Adipocytokiny.....	20
I.2.2.1.	Adiponektyna.....	20
I.2.2.2.	Rezystyna.....	23
I.2.3.	Cytokiny.....	24
I.2.3.1.	Interleukina 1 β	25
I.2.3.2.	Interleukina 6.....	26
I.2.3.3.	Interleukina 12.....	27
I.2.3.4.	Interleukina 10.....	28
I.2.3.5.	RANTES (CCL5).....	30
I.2.4.	Poposiłkowa hiperglikemia.....	30
I.3.	Farmakoterapia cukrzycy typu 2 a miażdżycą.....	32
I.3.1.	Związek pomiędzy stosowaniem metforminy a patomechanizmem miażdżycy.....	33
I.3.2.	Związek pomiędzy stosowaniem insuliny a patomechanizmem miażdżycy.....	34
I.3.3.	Związek pomiędzy stosowaniem insuliny w skojarzeniu z metforminą a patomechanizmem miażdżycy.....	36
I.3.4.	Związek pomiędzy stosowaniem pochodnych sulfonilomocznika a patomechanizmem miażdżycy.....	37
I.3.5.	Związek pomiędzy stosowaniem tiazolidynedionów (glitazonów) a patomechanizmem miażdżycy.....	39
I.3.6.	Związek pomiędzy stosowaniem meglitynidów (glinidów) a patomechanizmem miażdżycy.....	40
I.3.7.	Związek pomiędzy stosowaniem inhibitorów α -glukozydaz a patomechanizmem miażdżycy.....	40
I.3.8.	Związek pomiędzy stosowaniem analogów inkretyn i gliptyn a patomechanizmem miażdżycy.....	41
II.	Cel pracy.....	43
III.	Część doświadczalna.....	44

III.1.	Materiały i metodyka.....	44
III.1.1.	Badane grupy chorych.....	44
III.1.2	Metodyka badań.....	47
III.1.2.1	Szczegółowa metodyka oznaczania stężenia 1,5-AG w osoczu.....	49
III.1.2.2	Szczegółowa metodyka oznaczania stężenia homocysteiny w osoczu.....	50
III.1.2.3	Szczegółowa metodyka oznaczania stężenia adiponektyny w osoczu.....	53
III.1.2.4	Szczegółowa metodyka oznaczania stężenia rezystyny w osoczu.....	53
III.1.2.5	Szczegółowa metodyka oznaczania stężenia peptydu C w osoczu.....	56
III.1.2.6	Szczegółowa metodyka oznaczania stężenia insuliny w osoczu.....	56
III.1.2.7	Ocena sekrecji cytokin przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej – badanie <i>in vitro</i>	57
III.1.2.7.1	Izolacja limfocytów i monocytów z krwi obwodowej.....	57
III.1.2.7.2	Hodowle komórkowe.....	57
III.1.2.7.3	Metodyka oznaczania stężenia cytokin Il-1 β , Il-6, Il-10, Il-12 oraz RANTES w surowicy.....	58
III.1.2.7.4	Statystyczne opracowanie wyników.....	61
IV	Wyniki.....	62
IV.1	Charakterystyka badanych grup.....	62
IV.2	Porównanie wybranych czynników związanych z rozwojem miażdżycy pomiędzy chorymi na cukrzycę typu 2 a grupą osób zdrowych.....	68
IV.3	Porównanie wybranych czynników związanych z rozwojem miażdżycy pomiędzy chorymi na cukrzycę typu 2 różniącymi się sposobem farmakoterapii.....	75
IV.4	Sumaryczna ocena oddziaływania badanych sposobów farmakoterapii cukrzycy na rozpatrywane czynniki pro- i antyaterogenne.....	87
IV.5	Badania związku pomiędzy wybranymi czynnikami pro- i antyaterogennymi a parametrami charakteryzującymi przebieg kliniczny cukrzycy typu 2.....	89
IV.6	Badania wzajemnych relacji pomiędzy wybranymi czynnikami pro- i antyaterogennymi.....	89
IV.7.	Wyniki analizy wielokrotnej regresji przeprowadzonej w grupie chorych na cukrzycę typu 2 niezależnie od sposobu leczenia farmakologicznego.....	97
IV.8	Badania sekrecji wybranych cytokin przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej pochodzące od osób zdrowych.....	100
V.	Omówienie wyników i dyskusja.....	103
VI.	Wnioski.....	116
VII	Streszczenie.....	118
VIII	Summary.....	122
IX	Piśmiennictwo.....	126

Wykaz skrótów

1,5-AG (*1,5-anhydro-D-glucitol*) – 1,5-anhydro-D-glucitol

HbA_{1c} (*Glycated Hemoglobin*) – hemoglobina glikowana A_{1c}

HHcy (*hyperhomocysteinemie*) – hiperhomocysteinemia

HOMA_{IR} (*Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance*) – wskaźnik insulinooporności

IL (*Interleukin*) - interleukina

Wykaz tabel

Tab. 1.	Charakterystyka wszystkich badanych grup – część I.....	67
Tab. 2.	Charakterystyka wszystkich badanych grup – część II.....	68
Tab. 3.	Charakterystyka chorych na cukrzycę typu 2 - część I.....	69
Tab. 4.	Charakterystyka chorych na cukrzycę typu 2 - część II.....	70
Tab. 5.	Zestawienie badanych czynników pro- i antyaterogennych we wszystkich badanych grupach.....	72
Tab. 6.	Zestawienie badanych czynników pro- i antyaterogennych u chorych na cukrzycę typu 2.....	80
Tab. 7.	Wyniki analizy kowariancji, dla modelu, w którym zmienną zależną było stężenie homocysteiny.....	81
Tab. 8.	Wyniki analizy kowariancji, dla modelu, w którym zmienną zależną było stężenie adiponektyny.....	82
Tab. 9.	Wyniki analizy kowariancji, dla modelu, w którym zmienną zależną było stężenie rezystyny.....	83
Tab. 10.	Wyniki analizy kowariancji, dla modelu, w którym zmienną zależną było stężenie interleukiny 1 β	84
Tab. 11.	Wyniki analizy kowariancji, dla modelu, w którym zmienną zależną było stężenie interleukiny 6.....	85
Tab. 12.	Wyniki analizy kowariancji, dla modelu, w którym zmienną zależną było stężenie interleukiny 12.....	86
Tab. 13.	Wyniki analizy kowariancji, dla modelu, w którym zmienną zależną było stężenie interleukiny 10.....	87
Tab. 14.	Wyniki analizy kowariancji, dla modelu, w którym zmienną zależną było stężenie RANTES.....	88
Tab. 15.	Wyniki analizy kowariancji, dla modelu, w którym zmienną zależną było stężenie 1,5-anhydro-D-glucitolu.....	89
Tab. 16.	Przegląd wartości współczynników korelacji w grupie chorych na cukrzycę typu 2.....	98
Tab. 17.	Przegląd wartości współczynnika korelacji w grupie chorych na cukrzycę typu 2, leczonych metforminą.....	99
Tab. 18.	Wyniki analizy wielokrotnej regresji u chorych na cukrzycę typu 2, w której zmienną zależną jest stężenie interleukiny 6.....	101
Tab. 19.	Wyniki analizy wielokrotnej regresji u chorych na cukrzycę typu 2, w której zmienną zależną jest stężenie RANTES.....	102

Wykaz rycin

Ryc. 1.	Reakcja utleniania 1,5-anhydro-D-glucitolu.....	49
Ryc. 2.	Reakcja redukcji związanych form homocysteiny do formy wolnej.....	50
Ryc. 3.	Reakcja pomiędzy wolną homocysteiną a adenozyną katalizowana przez hydrolazę SAH.....	50
Ryc. 4.	Schemat oznaczania homocysteiny w surowicy metodą immunoenzymatyczną Elisa, testem IBL Axis.....	53
Ryc. 5.	Schemat oznaczania adiponektyny/rezystyny w surowicy metodą immunoenzymatyczną ELISA za pomocą testu Axis ELISA Kit.....	57
Ryc. 6.	Schemat oznaczania stężenia cytokin Il-1 β , Il-6, Il-12, Il-10, RANTES we krwi metodą cytofluorymetrii przepływowej za pomocą testu Flex Set Becton Dickinson Bioscience.....	63
Ryc. 7.	Porównanie stężeń homocysteiny pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Kruskal-Wallis).....	70
Ryc. 8.	Porównanie stężeń adiponektyny pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Kruskal-Wallis).....	70
Ryc. 9.	Porównanie stężeń rezystyny pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Kruskal-Wallis).....	71
Ryc. 10.	Porównanie stężeń interleukiny 1 β pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Kruskal-Wallis).....	71
Ryc. 11.	Porównanie stężeń interleukiny 6 pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Kruskal-Wallis).....	72
Ryc. 12.	Porównanie stężeń interleukiny 12 pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Kruskal-Wallis).....	72
Ryc. 13.	Porównanie stężeń RANTES pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Kruskal-Wallis).....	73
Ryc. 14.	Porównanie stężeń interleukiny 10 pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Kruskal-Wallis).....	73
Ryc. 15.	Porównanie stężeń 1,5-anhydro-D-glucitolu pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Kruskal-Wallis).....	74
Ryc. 16.	Porównanie stężeń homocysteiny pomiędzy grupami terapeutycznymi u chorych na cukrzycę typu 2 z zastosowaniem analizy kowariancji.....	78
Ryc. 17.	Porównanie stężeń rezystyny pomiędzy grupami terapeutycznymi u chorych na cukrzycę typu 2 z zastosowaniem analizy kowariancji.....	80
Ryc. 18.	Porównanie stężeń interleukiny 1 β pomiędzy grupami terapeutycznymi u chorych na cukrzycę typu 2 z zastosowaniem analizy kowariancji.....	81

Wykaz rycin

Ryc. 19.	Porównanie stężeń interleukiny 6 pomiędzy grupami terapeutycznymi u chorych na cukrzycę typu 2 z zastosowaniem analizy kowariancji.....	82
Ryc. 20.	Porównanie stężeń interleukiny 10 pomiędzy grupami terapeutycznymi u chorych na cukrzycę typu 2 z zastosowaniem analizy kowariancji.....	84
Ryc. 21.	Porównanie stężeń RANTES pomiędzy grupami terapeutycznymi u chorych na cukrzycę typu 2 z zastosowaniem analizy kowariancji.....	85
Ryc. 22.	Sumaryczna ocena punktowa siły proaterogennego oddziaływania poszczególnych sposobów leczenia.....	88
Ryc. 23.	Sumaryczna ocena punktowa siły antyaterogennego oddziaływania poszczególnych sposobów leczenia.....	88
Ryc. 24.	Zależność pomiędzy stężeniem RANTES a stężeniem 1,5- anhydro-D - glucitolu u chorych na cukrzycę typu 2.....	91
Ryc. 25.	Zależność pomiędzy stężeniem interleukiny 1 β a stężeniem homocysteiny u chorych na cukrzycę typu 2.....	91
Ryc. 26.	Zależność pomiędzy stężeniem interleukiny 6 a stężeniem rezystyny u chorych na cukrzycę typu 2.....	92
Ryc. 27.	Zależność pomiędzy stężeniem interleukiny 1 β a stężeniem homocysteiny u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych metforminą.....	92
Ryc. 28.	Zależność pomiędzy stężeniem interleukiny 10 a stężeniem adiponektyny u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych metforminą.....	93
Ryc. 29.	Zależność pomiędzy stężeniem interleukiny 6 a stężeniem rezystyny u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych metforminą.....	93
Ryc. 30.	Zależność pomiędzy stężeniem interleukiny 1 β a stężeniem interleukiny 6 u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych metforminą.....	94
Ryc. 31.	Stężenie interleukiny 1 β w nadsączu, wydzielanej przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, w zależności od obecności homocysteiny w podłożu.....	100
Ryc. 32.	Stężenie interleukiny 6 w nadsączu, wydzielanej przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, w zależności od obecności homocysteiny w podłożu.....	101
Ryc. 33.	Stężenie RANTES w nadsączu, wydzielanej przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, w zależności od obecności homocysteiny w podłożu.....	101
Ryc. 34.	Stężenie interleukiny 10 w nadsączu, wydzielanej przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, w zależności od obecności homocysteiny w podłożu.....	102

Ryc. 35. Stężenie interleukiny 12 w nadsączu, wydzielanej przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, w zależności od obecności homocysteiny w podłożu.....

Wstęp

I.1. Wprowadzenie

Miażdżyca jest przewlekłą chorobą tętnic, w przebiegu której dochodzi do powstawania wielogniskowych zmian w błonie wewnętrznej i środkowej naczyń prowadzących do znacznego pogrubienia ich ściany i utraty elastyczności. Proces miażdżycowy rozpoczyna się jako odpowiedź obronna na działanie bodźców działających destrukcyjnie na ścianę naczyń i wiodzie do wytworzenia tzw. blaszki miażdżycowej zwężającej światło tętnic [Libby^d 2002]. Klinicznym objawem zaawansowanych zmian miażdżycowych jest choroba niedokrwienna serca, zawał mięśnia sercowego, udar mózgu czy niedokrwienie kończyn [Libby^f 2001; Warlow et al., 2003].

Do niedawna, w doniesieniach na temat patogenezы miażdżycy, rozpatrywano proces aterogenezy wyłącznie jako następstwo zaburzeń lipidowych. Obecnie powszechną akceptację uzyskała koncepcja, iż w przebiegu miażdżycy fundamentalną rolę pełni przewlekły proces zapalno-immunologiczny, w który zaangażowane są komórki układu odpornościowego, interleukiny (IL), chemokiny, czynniki wzrostu oraz liczne bioaktywne związki [Libby^a et al., 2009; Libby^c et al., 2002; Packard et al., 2008].

Istnieje wiele czynników ryzyka biorących udział w rozwoju miażdżycy. Do tzw. klasycznych czynników ryzyka zalicza się wiek, płeć, palenie tytoniu, cukrzycę, nadciśnienie tętnicze, otyłość, wzrost frakcji cholesterolu LDL oraz obecność zaawansowanych produktów glikacji białek [Mazzone et al., 2008; Venkatapuram et al., 2006]. Coraz częściej podkreśla się również udział innych, nie do końca jeszcze poznanych czynników proaterogennych, do których należy zaliczyć:

- nasilony stres oksydacyjny [Fonseca^c et al., 2004],
- zwiększoną aktywność prozakrzepową [Fruchart et al., 2004; Fonseca^c et al., 2004],
- hiperhomocysteinemię [Fruchart et al., 2004; Akalin et al., 2008; Fonseca^b et al., 1994],
- zmiany stężenia cytokin w surowicy (IL-1- β , IL-6, IL-10, IL-12, chemokiny RANTES) [Akalin et al., 2008; Fisman^a et al., 2008; Zernecke et al., 2010],
- zmiany stężenia adipocytokin w surowicy, a zwłaszcza adiponektyny [Tretjakovs et al., 2009; Han^b et al., 2009] i rezystyny [Reilly et al., 2005]

oraz

- poposiłkową hiperglikemię [Ceriello^a 2005].

Współcześnie stosowane metody farmakoterapii cukrzycy zostały nieźle zweryfikowane pod względem ich skuteczności w zakresie kontroli wyrównania metabolicznego. Istnieje jednak szereg niejasności i rozbieżności w odniesieniu do wpływu poszczególnych leków stosowanych w leczeniu cukrzycy na procesy wiodące do rozwoju miażdżycy w tej grupie chorych. Dokładne poznanie ich roli i związku ze stosowaną farmakoterapią może mieć istotne znaczenie w ustaleniu skutecznych schematów leczniczych dla chorych na cukrzycę typu 2, tak znacznie narażonych na rozwój miażdżycy. Tak więc farmakoterapia, oparta na znajomości patomechanizmów rozwoju miażdżycy może okazać się jednym z ważniejszych elementów taktyki prewencyjnej powikłań sercowo-naczyniowych u chorych na cukrzycę typu 2 [Theuma et al.,2003].

I.2. Udział wybranych czynników w patogenezie procesu zapalnego związanego z rozwojem miażdżycy

Przewlekłe powikłania o etiologii miażdżycowej określane mianem makroangiopatii cukrzycowej uznawane są za wiodącą przyczynę zgonów u osób chorych na cukrzycę typu 2. Postępujący proces miażdżycowy jest głównym czynnikiem sprawczym odpowiedzialnym za wystąpienie choroby niedokrwiennej serca, zawału mięśnia sercowego czy też udaru mózgu [Janeczko 2007;Huysman 2009].

U podłoża patogenezy miażdżycy, zarówno na poziomie inicjacji jak i jej progresji, leży przewlekły, niezbyt nasilony proces zapalny. Już na wczesnych etapach aterogenezy stwierdza się obecność wykładników procesu zapalnego, tj. zwiększenie liczebności monocytów, stężenia fibrynogenu, Il-6, TNF- α (*Tumor Necrosis Factor* - czynnik martwicy nowotworów) czy stężenia molekuł adhezji monocytów VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molekule 1* – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń -1) i ICAM-1 (*Intracellular Cell Adhesion Molecule* – cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1) w surowicy [Libby^a, et al.,2009]. Niezależnie od wspomnianych zmian, udowodniono również związek pomiędzy obecnością wykładników reakcji zapalnej a występowaniem klinicznej manifestacji powikłań w układzie sercowo-naczyniowym u osób chorych na cukrzycę, ze szczególnym uwzględnieniem choroby niedokrwiennej serca [Schalkwijk, et al.,2005; Krasnodębski 2005].

Początkowym etapem związanym z kaskadą procesu zapalnego w świetle naczyń jest dysfunkcja śródbłonna [Schalkwijk et al.2005;Huerta et al.,2002]. W przebiegu tego zaburzenia obserwuje się aktywację leukocytów i płytek krwi, uwalnianie czynników o

potencjale chemotaktycznym – Il-8 i MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein* - czynnik chemotaktyczny monocytów) oraz wzrost ekspresji cząstek adhezyjnych: selektyn P i E oraz ICAM-1 i VCAM-1 na powierzchni śródbłonna. Zwiększona ekspresja VCAM-1 i ICAM-1 ułatwia przyleganie monocytów, limfocytów T i innych komórek obecnych we krwi do komórek *endotelium*, co warunkuje ich penetrację w głąb ściany naczyń [Miliotti et al.,2008]. Kontakt monocytów z komórkami śródbłonna inicjuje wydzielanie przez nie PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor* - tkankowy inhibitor plazminogenu) i jednocześnie hamuje sekrecję substancji o właściwościach fibrynolitycznych - tPa (*Tissue Plasminogen Activator* - tkankowy aktywator plazminogenu) [Packard et al.,2008]. Uwolnione cytokiny chemotaktyczne, zwłaszcza MCP-1, sprzyjają migracji monocytów w głąb ściany naczyń i ich gromadzeniu w błonie wewnętrznej [Kugiyama et al.,1993;Gu et al.,1998;Boring et al.,1998]. Pod wpływem czynników wydzielanych przez komórki śródbłonna zachodzi proces różnicowania monocytów w makrofagi, które pochłaniając utlenione lipoproteiny LDL (oxLDL), przekształcają się w tzw. komórki piankowate [Boring et al.,1998;Libby^c 2000]. Dalszy przebieg formowania się zmian miażdżycowych przebiega z udziałem mediatorów wydzielanych przez makrofagi, do których zalicza się: FGF (*Fibroblast Growth Factor* - czynnik wzrostu fibroblastów), IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor* - insulinopodobny czynnik wzrostu), Il-1 i Il-6 oraz TNF- α [Luster 1998;Fuster et al.,1992]. Związki te m.in. stymulują migrację komórek mięśni gładkich z błony środkowej naczynia do błony wewnętrznej, indukują ich proliferację i wytwarzanie przez nie łącznotkankowych elementów w postaci kolagenu i elastyny [Libby^b 1995]. Ostatecznie zostaje uformowana bogata w lipidy blaszka miażdżycowa zawierająca struktury łącznotkankowe, której pęknięcie skutkuje zazwyczaj wytworzeniem zakrzepu zwięzającego naczynie, a nawet całkowicie zamykającego jego światło [Miliotti, et al., 2008; Fuster, et al.,1992;Weissberg, et al., 1996].

Kluczowym czynnikiem pośredniczącym w syntezie cytokin m.in. Il-8, MCP-1, RANTES oraz Il-1, Il-6, TNF- α i cząstek adhezji (VCAM-1, ICAM-1) jest jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*) [Wysocki 2004;Hatada et al.,2000;Libby^d et al.,2002]. Dotychczas przeprowadzone badania pozwalają przypuszczać, że właśnie ten czynnik transkrypcyjny odgrywa wiodącą rolę w indukcji i modulowaniu reakcji zapalnej.

Współczesna teoria zakładająca zapalno-immunologiczny patomechanizm miażdżycy, uwzględnia udział w tym procesie homocysteiny, adipokin oraz wielu cytokin, zwłaszcza Il-1 β , Il-6, Il-10 i Il-12, niemal na każdym etapie powstawania blaszki miażdżycowej. Poznanie roli tych czynników w rozwoju makroangiopatii cukrzycowej nabrało szczególnego znaczenia w obliczu ciągle rosnącej liczby chorych na cukrzycę [Fisman^a et al.,2008;Libby^d et

al.,2002;Miliotti et al.,2008;Wegner i wsp.,2007]. Dramatycznie wysoka śmiertelność u osób z cukrzycą typu 2 spowodowana miażdżycą skłania do tego, aby wnikliwie poznać wszelkie aspekty patogenezy tego procesu.

I.2.1. Homocysteina

Homocysteina (Hcy) jest aminokwasem siarkowym, który nie ulega wbudowaniu w cząsteczki białek, a stanowi rodzaj biochemicznego łącznika pomiędzy metioniną a cysteiną. Związek ten powstaje w wyniku enzymatycznej demetylacji metioniny, dostarczanej wraz z białkami pokarmowymi pochodzenia zwierzęcego [Hankey et al.,1999]. Dalszy szlak przemian homocysteiny zależy od aktualnych potrzeb organizmu i może przebiegać w kierunku odbudowy zasobów metioniny (remetylacja), bądź też aminokwas ten może uczestniczyć w praktycznie nieodwracalnym procesie syntezy cysteiny (transulfuracja). Pierwsza z wspomnianych metabolicznych przemian homocysteiny wymaga obecności kwasu foliowego jako donora grupy metylowej oraz witaminy B₁₂ jako kofaktora tej reakcji, natomiast w procesie transulfuracji najistotniejszą rolę odgrywa witamina B₆ [Trabetti 2008;Stam et al.,2005]. Stężenie homocysteiny zatem w znacznej mierze zależy od wydolności szlaków metabolicznych uwarunkowanej zasobami kwasu foliowego, witamin B₆ i B₁₂ oraz aktywności enzymów uczestniczących w tych przemianach. Stężenia homocysteiny w surowicy u ludzi zdrowych mieszczą się w granicach 5-15 μmol/L, a przekroczenie wartości progowej stężenia czyli tzw. hiperhomocysteinemia (HHcy) może wywierać szkodliwe działanie na śródbłonek naczyń [Libby^d 2002;Yang et al.,2005]. Liczne badania epidemiologiczne potwierdzają powiązania pomiędzy podwyższonym poziomem homocysteiny a występowaniem miażdżycy i choroby zakrzepowo-zatorowej. Zależność ta jest znacznie mocniej zaznaczona u osób chorych na cukrzycę typu 2 w porównaniu z populacją ogólną [Becker^a et al.,2003]. Potwierdzeniem nie tylko współwystępowania, ale i współzależności pomiędzy wysokimi stężeniami homocysteiny a nasileniem miażdżycy jest fakt, że u osób dotkniętych hiperhomocysteinemią odnotowano zwiększoną śmiertelność z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego o etiologii miażdżycowej. Wzrost stężenia homocysteiny zaledwie o 5 μmol/L zwiększa śmiertelność ogólną o 17% w grupie osób bez cukrzycy i aż o 60% wśród osób chorych na cukrzycę typu 2 [Becker^a et al.,2003]. W związku z charakterem przemian metabolicznych, w których bierze udział homocysteina, należy wziąć pod uwagę wiele czynników zwiększających jej stężenie we krwi i w ten sposób promujących rozwój hiperhomocysteinemii.

Do najczęstszych przyczyn hiperhomocysteinemii należą:

- genetycznie uwarunkowany niedobór enzymów uczestniczących w metabolizmie homocysteiny, tj. β -syntazy cystationiny (CBS) i reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR) [Konrad et al., 2004],
- niedobory witamin B₆, B₁₂ i kwasu foliowego związane ze spożywaniem znacznych ilości mięsa (będącego źródłem metioniny) przy niewielkim spożyciu ryb, warzyw i zbóż bogatych w te witaminy [Refsum et al., 2004],
- stosowanie kawy, alkoholu, tytoniu [Refsum et al., 2004; Kośmicki, 2004],
- niektóre schorzenia, w przebiegu których rozwija się hiperhomocysteinemia wtórna, tj.: cukrzyca, niewydolność wątroby i nerek, niedoczynność tarczycy, białaczka limfoblastyczna [Fonseca^b et al., 1999],
- leki, które indukują hiperhomocysteinemię oddziałując poprzez:
 - hamowanie wchłaniania z przewodu pokarmowego i hamowanie metabolizmu kwasu foliowego - metotreksat, sulfonamidy, cholestyramina, fenytoina i karbamazepina [Refsum et al., 2004; Apeland et al., 2001],
 - hamowanie wchłaniania z przewodu pokarmowego witaminy B₁₂ – metformina i kolchicyna [Refsum et al., 2004],
 - obniżenie zawartości witaminy B₆ w ustroju - izoniazyd, niacyna, teofilina [Refsum et al., 2004].

Efekt aterogeny **hiperhomocysteinemii** jest przede wszystkim wynikiem wielokierunkowego działania homocysteiny w stosunku do śródbłonka naczyń krwionośnych. Szkodliwe działanie nadmiaru tego aminokwasu obejmuje m.in. nasilenie proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń, wzrost syntezy kolagenu i jego odkładanie w ścianie naczyń oraz zwiększoną degradację elastyny w błonie wewnętrznej, co sprzyja procesowi wapnienia i włóknienia ściany tętnic [Majors et al., 1997; McCully 2005; Nappo et al., 1999].

Hiperhomocysteinemia nasila także **stres oksydacyjny**. Autooksydacja grup tiolowych homocysteiny sprzyja powstawaniu toksycznych, reaktywnych form tlenu, takich jak anion ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy oraz związanego z nimi - nadtlenu wodoru, odpowiedzialnych za uszkodzenie śródbłonka i nasilenie peroksydacji lipidów zawartych w cząsteczkach LDL. Wytwarzane w tym procesie utlenione lipoproteiny LDL biorą udział w dalszej progresji miażdżycy [Fonseca^a et al., 2000]. Należy dodać, że homocysteina nasila

działanie reaktywnych form tlenu poprzez obniżenie aktywności peroksydazy glutationu - enzymu o potencjale antyoksydacyjnym [Sierakowska-Fijałek i wsp.,2008].

Pod wpływem homocysteiny dochodzi również do znacznego **obniżenia puli tlenu azotu NO** [Signorello et al.,2009;Emsley et al.,1999;Zhang et al.,1998]. Jest to tym bardziej istotne, że w warunkach fizjologicznych NO neutralizuje potencjalnie szkodliwe działanie homocysteiny biorąc udział w przekształcaniu jej w S-nitrozohomocysteinę, substancję posiadającą właściwości wazodylatacyjne i antyagregacyjne [Stamler et al.,1993]. Niestety, w stanie długotrwałej hiperhomocysteinemii ten mechanizm kompensacyjny jest nieefektywny z powodu wolnych rodników, które powstają przy udziale homocysteiny i inaktywują tlenek azotu [Domagała i wsp.,2002].

Zauważono również, że aterogenne działanie wykazuje nie tylko substancja macierzysta, ale i metabolit homocysteiny, tj. **tiolakton homocysteiny**. Związek ten posiada szczególną zdolność do modyfikacji (N-homocysteinyłacji) białek osocza oraz lipoprotein o małej gęstości [Jakubowski 2008;Karolczak et al.,2009]. Zmodyfikowane cząstki ulegają łatwiej agregacji, a następnie są wychwytywane przez makrofagi. Jest to jeden z wielu mechanizmów, za pośrednictwem którego homocysteina uczestniczy w wytwarzaniu komórek piankowatych [Naruszewicz et al.,1994].

Szczególną rolę w rozwoju powikłań o podłożu miażdżycowym w układzie sercowo-naczyniowym przypisuje się **prozakrzepowemu działaniu** homocysteiny [Willoughby et al.,2002]. Stwierdzono, że homocysteina może zaburzać procesy krzepnięcia na drodze kilku mechanizmów. Poprzez nasilenie adhezji i agregacji płytek krwi aminokwas ten ułatwia tworzenie zakrzepów w miejscach uszkodzenia śródbłonna [Willoughby et al.,2002;Thambyrajah et al.,2000;Karolczak et al.,2009]. Za sprawą homocysteiny dochodzi również do wzrostu aktywności czynników krzepnięcia V, VII i IX, zmniejszenia zdolności wiązania antytrombiny III na powierzchni śródbłonna, a także do upośledzenia fibrynolizy [Thambyrajah et al.,2000;Karolczak et al.,2009;Schreiner et al.,2002].

Współczesna koncepcja promiażdżycowego działania homocysteiny zakłada również jej udział w wywoływaniu oraz wzmacnianiu **procesu zapalnego**, który się toczy w ścianach naczyń [Su et al.,2005]. Dokładny mechanizm prozapalnego działania homocysteiny nie jest poznany, jednakże w wielu badaniach wykazano dodatnią korelację między stężeniami homocysteiny a stężeniem i ekspresją niektórych wykładników procesu zapalnego: Il-6 [Araki et al.,2005], Il-1 β , Il-8, Il-12 [Su et al. 2005], Il-10 [Dawson et al.,2004], RANTES [Holven^a et al.,2002;Sun et al.,2005], VCAM-1 [Koga^a et al.,2002] i MCP-1 [Dai^a et al.,2006]. Prawdopodobny mechanizm, za pomocą którego homocysteina wywiera swój prozapalny

wpływ związany jest z aktywacją limfocytów T oraz monocytów i makrofagów będących źródłem licznych cytokin i chemokin promujących miażdżycę [Su et al.,2005;Dai^b, et al.,2007]. W licznych badaniach *in vivo* i *in vitro* potwierdzono wpływ homocysteiny również na nasilenie adhezji limfocytów T i monocytów do komórek śródbłonna, co stanowi bardzo istotny element zarówno na etapie inicjacji, jak i progresji procesu zapalnego w przebiegu miażdżycy [Koga^a et al.,2002].

Zatem udział homocysteiny w patogenezie zmian miażdżycowych jest bardzo złożony. Obecnie uważa się, że aminokwas ten może zarówno stanowić czynnik sprawczy wiodący do formowania się blaszki miażdżycowej jak również nasilać może już istniejące zmiany w obrębie naczyń [Gąsiorowska i wsp.,2009]. Związek pomiędzy podwyższonym poziomem homocysteiny a występowaniem powikłań naczyniowych został potwierdzony w większości badań klinicznych. Udowodniono również, że umieralność z powodu powikłań sercowo-naczyniowych u osób chorych na cukrzycę charakteryzujących się podwyższonym poziomem homocysteiny jest większa niż w populacji ogólnej. Mimo to, nadal istnieje wiele wątpliwości co do ostatecznej, klinicznie istotnej roli tego aminokwasu w rozwoju procesu miażdżycowego. Homocysteinową teorię miażdżycy podważyły bowiem w pewnym stopniu wyniki opublikowanych badań NORVIT [Bønaa et al.,2005] oraz HOPE-2 [Lonn et al.,2006], które nie potwierdziły tego, że działania prowadzące do obniżenia stężenia homocysteiny w surowicy powodują jednocześnie zmniejszenie częstości występowania incydentów sercowo-naczyniowych. Z drugiej strony jednak, badania te były obarczone pewnym błędem metodycznym, bowiem obejmowały pacjentów obciążonych czynnikami i schorzeniami, które mogłyby modyfikować stężenie homocysteiny. Ponadto podczas interpretacji wyników tych badań pominięto potencjalny, bezpośredni proaterogenny wpływ witamin z grupy B, które podawano badanym w celu obniżenia stężenia homocysteiny [Bønaa et al.,2006;Lonn et al.,2006].

I.2.2. Adipocytokiny

I.2.2.1. Adiponektyna

W ostatnich latach uwaga wielu badaczy została zogniskowana na fizjologicznej roli tkanki tłuszczowej, która dzięki temu obecnie jest postrzegana jako aktywny „organ wydzielniczy” będący źródłem licznych substancji białkowych, tzw. adipokin, uczestniczących prawdopodobnie w patogenezie cukrzycy i miażdżycy. Do grupy tych bioaktywnych związków wydzielanych przez tkankę tłuszczową zlokalizowaną w jamie brzusznej należą m.in. Il-1, Il-6, TNF- α , chemokiny (MCP-1, Il- 8, RANTES, wisfatyna,

leptyna, **adiponektyna** i **rezystyna** [Thalmann et al.,2007;Malinowski i wsp.,2008;Tilg et al.,2006;Koerner et al.,2005].

Adiponektyna jest białkiem zbliżonym strukturalnie do kolagenu typu VIII i X [Pajvani et al.,2003] oraz do czynnika martwicy nowotworów TNF- α [Comuzzie et al.,2001]. W surowicy ludzkiej występuje w formie małowcząstkowych dimerów i trimerów lub kompleksów o dużej masie cząsteczkowej - oligomerów [Menzagi et al.,2007]. Syntetyzowana jest niemal wyłącznie w tkance tłuszczowej, a główne czynniki stymulujące jej wytwarzanie to insulinopodobny czynnik wzrostu – IGF, insulina [Halleux et al.,2001] oraz ligandy receptora PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* - receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów) [Banga et al.,2009]. Na powierzchni komórek docelowych adiponektyna wiąże się z receptorem błonowym, występującym w dwóch izoformach: AdipoR1 i AdipoR2 [Kadowaki^a et al.,2005]. Ekspresję receptora AdipoR1 zaobserwowano przede wszystkim w komórkach mięśni szkieletowych natomiast receptora AdipoR2 w hepatocytach. Obie izoformy swą strukturą i funkcją przypominają receptor dla białka G. Interakcja adiponektyny z receptorem inicjuje szereg wewnątrzkomórkowych reakcji, w tym aktywację kinazy AMP [Yamauchi^b et al.,2002]. Zakres wartości stężeń adiponektyny w surowicy osób zdrowych wynosi 5-30 $\mu\text{g/ml}$, natomiast u osób otyłych, u chorych na cukrzycę typu 2 lub u osób z nadciśnieniem tętniczym stężenie tego białka przyjmuje wartości poniżej dolnej granicy zakresu referencyjnego [Miczke i wsp.,2002]. W licznych badaniach wykazano, że w przeciwieństwie do pozostałych substancji wydzielanych przez tkankę tłuszczową, niskie stężenia adiponektyny korelują z wysokim ryzykiem rozwoju cukrzycy typu 2 i chorób sercowo-naczyniowych [Fu et al.,2005;Kumada et al.,2003;Salmenniemi et al.,2004].

Najważniejszą cechą adiponektyny jest jej zdolność do uwrażliwiania tkanek docelowych na działanie insuliny oraz zapobieganie otyłości i progresji zmian miażdżycowych [Fu et al.,2005]. **Przeciwmiażdżycowe właściwości** tej adipokiny polegają na regulacji wczesnej fazy reakcji zapalnej w przebiegu aterosklerozy i jej protekcyjnym wpływie na ścianę naczyń krwionośnych [Miczke i wsp.,2002]. Takie działanie jest efektem nagromadzenia się adiponektyny w miejscu uszkodzenia tętnic, a następnie zahamowania, w wyniku jej oddziaływania, ekspresji czynnika jądrowego NF- κB oraz ekspresji cząstek adhezji VCAM-1 i ICAM-1 [Tomizawa et al.,2009]. Jednocześnie adiponektyna zmniejsza zależną od TNF- α adhezję monocytów do śródbłonna naczyń [Han^b et al.,2009]. Wśród przeciwmiażdżycowych właściwości adiponektyny należy uwzględnić także jej wpływ wzmagający syntezę tlenu azotu w komórkach śródbłonna [Chen et al.,2003] oraz działanie

hamujące wychwyty utlenionych lipoprotein przez makrofagi i dalsze ich przemiany w komórki piankowate. Jeszcze inne przeciwmiażdżycowe mechanizmy działania adiponektyny obejmują zmniejszenie ekspresji prozapalnych cytokin tj. Il-8 i Il-6 w komórkach śródbłonka oraz wzrost syntezy cytokiny o działaniu przeciwzapalnym tj. Il-10 [Han^b et al.,2009;Tomizawa et al.,2009], a także hamowanie agregacji płytek krwi [Faber et al.,2009]. Istnieją również dowody na to, że adiponektyna, poprzez zmniejszenie aktywności niektórych czynników wzrostu, w szczególności PDGF-BB (*Platelet-Derived Growth Factor* - płytkowy czynnik wzrostu), FGF oraz HB-EGF (*Heparin Binding Epithelial Growth Factor* – nabłonkowy czynnik wzrostu wiążący heparyny), hamuje proliferację komórek mięśni gładkich naczyń oraz proces angiogenezy [Wang et al.,2005;Arita et al.,2002]. Proces „nowotworzenia” naczyń sprzyja penetracji komórek zapalnych w obręb blaszki miażdżycowej. Komórki te stają się następnie źródłem licznych prozapalnych cytokin, takich jak TNF- α , IFN- γ , Il-1 β i Il-6, które nasilają odpowiedź zapalną i jednocześnie hamują procesy naprawcze. Zwiększona aktywność komórek zapalnych zapoczątkowuje proces apoptozy w obrębie blaszki miażdżycowej prowadzący do obumierania komórek mięśni gładkich, odpowiedzialnych za mechaniczną odporność pokrywy włóknistej osłaniającej blaszkę miażdżycową od strony światła naczynia. Przewaga procesów rozpadu nad intensywnością tworzenia elementów strukturalnych blaszki sprzyja osłabieniu pokrywy włóknistej blaszki, dzięki czemu staje się ona bardziej podatna na rozerwanie. Zatem wspomniane działanie adiponektyny obejmuje także prewencję progresji miażdżycy [Libby^b 1995].

Adiponektyna niewątpliwie **poprawia wrażliwość tkanek obwodowych na działanie insuliny** [Lara-Castro et al.,2006]. Poprzez nasilenie fosforylacji AMPK tj. kinazy białkowej aktywowanej przez AMP, a następnie na skutek aktywacji receptora PPAR- α adiponektyna hamuje proces glukoneogenezy w wątrobie, zwiększa komórkowy wychwyty glukozy oraz nasila β -oksydację kwasów tłuszczowych w mięśniach szkieletowych. Efektem tych procesów jest poprawa tolerancji węglowodanów oraz zwiększenie insulino-wrażliwości, a także normalizacja stężenia lipidów w surowicy [Kadowaki^b et al.,2003;Hotta^a et al.,2000;Hotta^b et al.,2001]. Jednocześnie z oddziaływaniem na AMPK, adiponektyna pobudza fosforylację karboksylazy acetyl-CoA przez co wpływa na wzrost oksydacji kwasów tłuszczowych, zużycia glukozy i produkcji mleczanów w mięśniach szkieletowych. Rezultatem takiego działania adiponektyny jest zmniejszenie stężenia triacylogliceroli w surowicy i związany z tym wzrost wrażliwości tkanek na działanie insuliny [Yamauchi^a et al.,2001;Yamauchi^b et al.,2002]. Kolejnym mechanizmem działania adiponektyny

prowadzącym do zmniejszenia obwodowej insulinooporności jest supresja wydzielania TNF- α przez centralnie zlokalizowaną tkankę tłuszczową. Efekt ten, niestety, ulega pewnemu osłabieniu w obecności wysokich stężeń TNF- α [Hivert et al.,2009].

Podsumowując można stwierdzić, że adiponektyna jest substancją, która z uwagi na swoje właściwości i działanie może hamować postęp aterogenezy i związany z nim rozwój powikłań sercowo-naczyniowych. Jednocześnie można zaryzykować twierdzenie, iż stan obniżonego stężenia adiponektyny, czyli tzw. hipoadiponektynemia stanowi istotny czynnik patogenezы miażdżycy i cukrzycy typu 2 [Simońska i wsp.,2004]. Należy podkreślić, że w wielu badaniach klinicznych i epidemiologicznych wykazano, iż niskie stężenie adiponektyny jest związane z rozwojem miażdżycy, cukrzycy typu 2 czy chorób układu sercowo-naczyniowego [Kumada et al.,2003;Salmenniemi et al.,2004;Han^a et al.,2007]. Dlatego też uważa się hipoadiponektynię za jeden z nieklasycznych czynników proaterogennych.

I.2.2.2. Rezystyna

Jednym z ostatnio zidentyfikowanych produktów tkanki tłuszczowej jest bogata w cysteinę rezystyna, inaczej nazywana Fizz 3 (*Found in Inflammatory Zone 3*) [Banerjee et al.,2004]. Ta wyjątkowa proteina o masie 12,5 kD, należy do rodziny tzw. białek RELM (*Resistins Like Molecules* – cząsteczki podobne do rezystyny) [Mc Ternan et al.,2006;Pang et al.,2006]. U człowieka miejscem syntezy rezystyny są przede wszystkim monocyty, makrofagi i komórki zapalne krwi obwodowej oraz adipocyty. Obecność rezystyny stwierdzono również w komórkach wysp trzustki, szpiku, łożysku i płucach. Fizjologiczne stężenie rezystyny we krwi ludzkiej kształtuje się w zakresie 5-20 ng/ml. Sekrecja rezystyny oraz ekspresja genów dla rezystyny jest regulowana przez szlak sygnałowy zależny od czynnika jądrowego NF- κ B. Na kształtowanie się stężenia rezystyny w surowicy ma wpływ wiele różnych substancji np. cytokiny prozapalne (IL-6, TNF- α), insulina, glukoza, glikokortykosteroidy, hormon wzrostu, hormony tarczycy, witamina A oraz napięcie autonomicznego układu nerwowego. Badaczom udało się wykazać, że ekspresję rezystyny hamują leki poprawiające insulinowrażliwość w mechanizmie aktywacji receptora PPAR- γ , np. tiazolidinediony [Pang et al.,2006;Lehrke et al.,2004;Jung et al.,2005].

Wobec braku jednoznacznych danych dotyczących budowy i czynności receptorów dla rezystyny i ewentualnych białek transportujących, molekularne mechanizmy działania tego hormonu pozostają niewyjaśnione do chwili obecnej.

Wyniki wielu eksperymentów sugerują, że rezystyna odgrywa znaczącą rolę w patomechanizmie **otyłości** oraz **insulinooporności** i na tej drodze wpływa na zwiększone ryzyko zachorowania na cukrzycę typu 2 [Blagoev et al.,2002]. Wiadomo, że białko to

uczestniczy w metabolizmie glukozy i hamowaniu przekaźnictwa sygnału do receptora insulinowego. Prawdopodobny wpływ na wyżej wymienione procesy polega na osłabieniu między innymi: aktywności enzymów zaangażowanych w glukoneogenezę w wątrobie tj. glukozo-6-fosfatazy, fosforylacji receptora insulinowego oraz substratu dla tego receptora, a także aktywacji kinazy białkowej C. Konsekwencją takich funkcjonalnych zmian jest insulinooporność tkanek obwodowych [Banerjee et al.,2004]. Przypuszczalny udział rezystyny w patogenezie insulinooporności może być również związany z indukowanym rezystyną stanem zapalnym tkanki tłuszczowej białej, któremu towarzyszy nasilenie lipolizy i wzrost ilości wolnych kwasów we krwi oraz kumulacja lipidów, zwłaszcza diacylogliceroli, w mięśniach szkieletowych. Diacyloglicerole wpływają na zahamowanie fosforylacji tyrozyny oraz stymulują fosforylację seryny IRS-1 przez co zmniejsza się powinowactwo IRS-1 do receptora insulinowego i przekaźnictwo sygnału z tego receptora ulega osłabieniu [Qatanani et al.,2009].

Interesujące są spostrzeżenia na temat roli rezystyny jako cząsteczki o potencjale **prozapalnym** i **proaterogennym**. W licznych pracach eksperymentalnych stwierdzono proporcjonalną dodatnią zależność pomiędzy stężeniem rezystyny w surowicy a stężeniem Il-6, TNF- α i białka CRP [Reilly et al.,2005]. Badania *in vitro* z kolei wykazały zależny od rezystyny wzrost ekspresji VCAM-1, ICAM-1 oraz MCP-1 [Reilly et al.,2005]. Bezpośredni udział rezystyny w rozwoju dysfunkcji śródbłonna wynika również z jej zdolności do indukowania wzmożonej syntezy nadtlenków, co istotnie pogarsza wazodylatację naczyń [Kougias et al.,2005]. Udowodniono także nasilenie ekspresji inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu spowodowane działaniem rezystyny [Jung et al.,2006]. Pośrednim potwierdzeniem roli omawianej adipokiny w rozwoju miażdżycy jest udokumentowana obecność rezystyny w obrębie blaszek miażdżycowych [Verma et al.,2003]. Jej proaterogenne działanie wyraża się także poprzez nasilenie proliferacji i migracji komórek śródbłonna oraz ułatwienie procesu angiogenezy [Calabro et al.,2004;Mu et al.,2006]. Inne badania wykazują, że rezystyna sprzyja kumulacji lipidów wewnątrz makrofagów, co stanowi kolejną przesłankę do tego, aby uznać jej rolę za istotną w procesie aterogenezy [Rae et al.,2006].

I.2.3. Cytokiny

Aktualna koncepcja dotycząca rozwoju powikłań naczyniowych wśród chorych na cukrzycę typu 2 uwzględnia udział licznych cytokin traktowanych jako istotne elementy patogenezy procesu zapalnego [Mizia-Stec i wsp.,2003;Goldberg et al.,2009;Signorelli 2007;Gacka et al.,2010]. Podkreśla się, że pod wpływem powszechnie uznanych czynników

działających destrukcyjnie na ścianę naczyń (siły ścinające, hipercholesterolemia, stres oksydacyjny) a zwłaszcza pod wpływem hiperglikemii, zwiększa się sekrecja **interleukiny 1 β** , **interleukiny 6**, **interleukiny 12** oraz chemokiny **RANTES** i jednocześnie zmniejsza się wydzielanie przeciwzapalnej **interleukiny 10** [Prokopczuk i wsp.,2006;Devaraj et al.,2005;Wen et al.,2006;Blüher et al.,2005;Herder et al.,2008]. Udział tych mediatorów zaobserwowano już na wczesnych etapach aterogenezy jak również w dalszym przebiegu miażdżycy [Prokopczuk i wsp.,2006;Gacka et al.,2010].

Wymienione cytokiny są peptydami o budowie najczęściej jednołańcuchowej, wydzielanymi przez komórki układu immunologicznego, tkankę tłuszczową, fibroblasty, keratynocyty i komórki śródbłonka. Podstawową cechą wszystkich cytokin jest ich plejotropizm, czyli wielokierunkowe działanie [Gołąb i wsp.,2009]. Na komórki docelowe cytokiny działają poprzez swoiste receptory powierzchniowe. Związanie z receptorem uruchamia szlak sygnalizacyjny JAK/STAT. Skrótom JAK określa się kinazę Janusową, uczestniczącą w fosforylacji białek STAT (*Signal Transducer and Activator Transcription*). Aktywowane w procesie fosforylacji białka STAT migrują do jądra komórki i działają jako jądrowy czynnik transkrypcyjny dla wielu genów [Ivashkiv 2000;Bacon et al.,1995;Park et al.,2005]. Główna rola cytokin polega na regulacji procesów biologicznych, z których najważniejszym w aspekcie rozwoju miażdżycy, jest przewlekły proces zapalny [Mizia-Stec i wsp. 2003;Goldberg et al., 2009;Signorelli 2007;Gacka et al.,2010].

I.2.3.1. Interleukina 1 β

Il-1 β jest jedną z cytokin zapalnych o udowodnionym działaniu promiażdżycowym [Kłucinski i wsp.,2006;Jawień et al.,2008;Merhi-Soussi et al.,2005]. Miejscem syntezy Il-1 β są głównie aktywowane makrofagi, komórki śródbłonka oraz adipocyty a głównym bodźcem odpowiedzialnym za jej wydzielanie jest TNF- α [Henrichot et al.,2005;Arai et al.,1999]. Biologiczna aktywność Il-1 β uwarunkowana jest jej interakcją ze specyficznym receptorem powierzchniowym Il-1R. Najlepiej poznane są dwa typy tego receptora: IL-1R1 występujący na limfocytach T, keratynocytach i fibroblastach oraz IL-1R2 obecny na neutrofilach, monocytach i limfocytach B [Dinarello 1997]. Transdukcja sygnału i odpowiedź komórkowa jest możliwa jedynie po pobudzeniu receptora Il-1R1, gdyż Il-1R2 funkcjonuje jako tzw. receptor-przynęta (*decoy receptor*) – jest niezdolny do przekazywania sygnału, pełni funkcję negatywnego regulatora aktywności Il-1 β [Lang et al.,1998]. Il-1 β przejawia bardzo szeroką aktywność stymulując limfocyty T do wydzielania innych interleukin: Il-2, Il-6, Il-8, TNF- α , w tym również samej Il-1 β , oraz cząstek adhezyjnych (VCAM-1, ICAM-1) [Lederman et

al.,1997;Kampoli, et al.,2009;Galea et al.,1996]. Ponadto, Il-1 β uczestniczy w procesie przebudowy ściany naczyń poprzez zwiększenie adhezji leukocytów do komórek śródbłonna, zwiększeniu jego przepuszczalności i nasileniu proliferacji mięśni gładkich naczyń [Kleemann, et al.,2008]. Ze względu na zdolność aktywacji wydzielania metaloproteinaz macierzy MMPs (*Matrix Metalloproteinases*) - enzymów odpowiedzialnych za rozkład macierzy zewnątrzkomórkowej i destabilizację blaszki miażdżycowej - Il-1 β przyczynia się do uszkodzenia ściany naczyń [Merhi-Soussi, et al.,2005;Kościów, i wsp.,2007]. Kolejnym efektem działania Il-1 β promującym miażdżycę jest jej wpływ na wewnątrzkomórkową akumulację utlenionych LDL i w następstwie nasilenie formowania komórek piankowatych [Kampoli et al.,2009;Von der Thusen et al.,2003;Libby^d et al.,2002]. Duże znaczenie w rozwoju powikłań naczyniowych przypisuje się także prozakrzepowej aktywności Il-1 β , która polega na aktywacji czynnika tkankowego TF (*Tissue Factor* - główny czynnik inicjujący kaskadę krzepnięcia) oraz na stymulacji agregacji płytek krwi [Shebuski et al.,2002]. Inne istotne efekty działania Il-1 β obejmują jej wpływ na zwiększenie produkcji białek ostrej fazy w wątrobie, czyli czynników o potwierdzonej roli w etiopatogenezie miażdżycy [Kampoli et al.,2009;Eklund,2009].

Biorąc zatem pod uwagę profil działania Il-1 β , można się spodziewać dużego zaangażowania tej cytokiny w rozwój miażdżycy i powikłań naczyniowych u osób z cukrzycą typu 2 i uznać ją za jeden z kluczowych czynników proaterogennych.

I.2.3.2. Interleukina 6

Kolejną cytokiną, która odgrywa znaczącą rolę w rozwoju miażdżycy jest **interleukina 6** [Kolcowa i wsp.,2003;Signorelli et al.,2007;Tuttle et al.,2004;Lindmark et al.,2001]. Ludzka Il-6 jest glikoproteiną zbudowaną z 212 aminokwasów [Barton 1997]. Białko to wytwarzane jest w monocytach, makrofagach, limfocytach T i B, komórkach śródbłonna oraz adipocytach. Szacuje się, że ok. 35% krążącej Il-6 pochodzi z tkanki tłuszczowej [Mohammed-Ali et al.,1997]. Czynnikiem wywołującymi jej wydzielanie są: TNF- α , Il-1 β i wirusy oraz utlenione lipoproteiny [Dubieński i wsp.,2007;Volk et al.,2000]. Il-6 wywiera różnorodne efekty biologiczne po związaniu się ze swoistym receptorem o aktywności kinazy tyrozynowej – IL-6R, zbudowanym z podjednostki gp80 wiążącej ligand (łańcuchy α o masie 80 kD) oraz z podjednostki gp130 przekazującej sygnał do wnętrza komórek (łańcuchy β o masie 130kD) [Barton 1997;Dubieński, i wsp.,2007;Rawstron, et al.,2000;Rose-John 2003]. Transmisja sygnału może również zachodzić z udziałem kompleksu Il-6 z rozpuszczalną formą receptora sIL-6R oraz z podjednostką gp130. W

odróżnieniu od większości rozpuszczalnych receptorów, sIL-6R po połączeniu z Il-6 wzmacnia jej działanie i wydłuża okres półtrwania [Rose-John 2003; Jones, et al., 2005; Kallen, 2002]. Ekspresję receptora IL-6R wykazują monocyty, makrofagi, aktywowane limfocyty T i B oraz komórki *endotelium* [Barton 1997]. Efekty działania Il-6 wynikają przede wszystkim z aktywacji limfocytów. Poprzez stymulację pobudzonych limfocytów B, Il-6 powoduje dalsze ich różnicowanie w komórki plazmatyczne wydzielające immunoglobuliny różnych klas [Jego et al., 2005]. Wraz z Il-1 β , Il-6 wzmacnia proliferację limfocytów T, natomiast poprzez indukcję wytwarzania Il-2 podtrzymuje różnicowanie limfocytów cytotoksycznych Tc [Barton 1997]. Wpływ Il-6 na rozwój powikłań w układzie sercowo-naczyniowym związany jest głównie z jej prozapalnym działaniem. Il-6 bierze znaczący udział, tak w inicjacji, jak i w podtrzymaniu odpowiedzi zapalnej [Eklund 2009]. Wytwarzane pod wpływem Il-6 białka ostrej fazy - CRP (*C-reactive protein*) i fibrynogen są uznanymi markerami i składowymi reakcji zapalnej w przebiegu aterogenezy [Szcześniak i wsp., 2008]. Ponadto, poprzez aktywację w pętli sprzężenia zwrotnego innych cytokin prozapalnych takich jak Il-1 i TNF- α , Il-6 nasila toczący się już proces zapalny [Yudkin et al., 2000]. Rola Il-6 nie ogranicza się tylko do indukcji zapalenia, bierze bowiem ona udział w innych procesach istotnych dla rozwoju miażdżycy. Udowodniono, że poprzez oddziaływanie ze swoistym receptorem IL-6R α , Il-6 nasila migrację i proliferację komórek mięśni gładkich naczyń oraz wpływa na wzrost syntezy adhezyn (VCAM-1, ICAM-1, E-selektyny) i czynników chemotaktycznych (MCP-1) [Von der Thusen et al., 2003; Siminiak et al., 1997; Romano et al., 1997; Schieffer et al., 2000]. Podobnie jak Il-1 β , Il-6 wpływa na destabilizację blaszek miażdżycowych poprzez degradację jej łącznotkankowych elementów za pośrednictwem metaloproteinaz MMPs [Yuong et al., 2002]. Uważa się, że za sprawą Il-6 dochodzi także do wzrostu aktywności prozakrzepowej na skutek stymulacji przez tę cytokinę megakariocytów do przekształcania się w płytki krwi, a tym samym do wzrostu ich wytwarzania. Jednocześnie Il-6 nasila agregację płytek [Dubiński i wsp., 2007].

Podkreślając prozapalne działanie Il-6 należy mieć jednocześnie na uwadze jej przeciwzapalne właściwości. Jak wspomniano, za sprawą Il-6 dochodzi do zahamowania syntezy Il-1 i TNF- α . Wykazano również, iż proces wytwarzania przeciwzapalnych mediatorów jakimi są Il-10, antagonistą receptora dla Il-1 oraz rozpuszczalny receptor TNF- α , poprzedzony jest wydzielaniem Il-6. Tak więc ostateczne efekty działania Il-6 są wynikiem dwóch przeciwstawnych składowych [Barton 1997]. Te efekty obserwowane są zwłaszcza w przebiegu ciężkich infekcji przebiegających ze wstrząsem septycznym. Niemniej interesujące wydają się być inne, korzystne z punktu widzenia patomechanizmu cukrzycy typu 2 i

miażdżycy, właściwości Il-6. Zaobserwowano, że podczas wysiłku fizycznego dochodzi do wydzielania tej cytokiny przez komórki mięśni szkieletowych i wówczas Il-6 zwiększa wrażliwość tkanek na insulinę [Fisman^a et al., 2008].

Zaznaczyć należy, że liczne badania wykazały podwyższone stężenia Il-6 u osób z cukrzycą typu 2 i co więcej jej udział w rozwoju powikłań w układzie sercowo-naczyniowym u tych chorych [Spranger, et al.,2003; Signorelli, et al.,2007].

I.2.3.3. Interleukina 12

Zgodnie ze współczesnymi poglądami dotyczącymi zapalnego podłoża miażdżycy, znaczącą pozycję w procesie aterogenezy zajmuje także Il-12 [Kleeman et al.,2008]. Il-12 jest heterodimerem zbudowanym z dwóch kowalencyjnie połączonych podjednostek: p35 i p40, przy czym p40 może występować w formie homodimeru o właściwościach antagonistycznych w stosunku do Il-12 [Goodridge et al.,2003]. Il-12 wytwarzana jest przede wszystkim przez komórki prezentujące antygen – komórki dendrytyczne i makrofagi, już na wczesnych etapach odpowiedzi immunologicznej [Trinchieri^a 2003]. Wyróżnia się 2 odmienne mechanizmy aktywacji produkcji IL-12 przez APC (*Antygen Presenting Cell*): na drodze niezależnej od komórek T, w której stymulatorami są komórki zainfekowane przez patogeny (grzyby, bakterie). Druga droga oparta jest na interakcji cząsteczki CD40 z jego ligandem na APC, jest to droga zależna od komórek T [Skovbjerg et al.,2010;Kang et al.,2005]. Na komórki docelowe Il-12 działa dzięki związaniu ze swoistym receptorem IL-12R zbudowanym z dwóch podjednostek β_1 i β_2 , obecnym na powierzchni komórek NK i limfocytów T [Wu et al.,2000]. Spośród wielu różnych właściwości Il-12, jednym z najważniejszych, w aspekcie rozwoju procesu miażdżycowego, wydaje się być jej wpływ na regulację różnicowania limfocytów w kierunku komórek Th1 z jednoczesnym zahamowaniem odpowiedzi typu Th2 [Jawień 2008;Trinchieri^b 1998;Kang et al., 2005]. Przewaga odpowiedzi immunologicznej mediowanej przez limfocyty Th1 stwarza warunki do rozwoju procesu zapalnego i formowania się blaszki miażdżycowej z uwagi na panel cytokin wydzielanych przez te komórki wskutek ich aktywacji [Hansson 2009]. Rola Il-12 w rozwoju aterogenezy jest również związana z nasileniem proliferacji i cytotoksyczności limfocytów T i komórek NK oraz wytwarzaniem przez nie interferonu gamma IFN- γ i TNF- α . Obie te molekuły są odpowiedzialne za nasilenie reakcji zapalnej i osłabienie mechanizmów naprawczych [Kriegel et al.,2006]. Niekontrolowane wydzielanie IFN- γ czy TNF- α sprzyja silnej stymulacji makrofagów do wydzielania metaloproteinaz degradujących elementy łącznotkankowe blaszki miażdżycowej [Brånén et al.,2004;Koga^b et al.,2007]. Oprócz tego

IFN- γ dezaktywuje miocyty, co wyraża się zahamowaniem ich proliferacji i syntezy kolagenu. W konsekwencji płaszcz włóknisty blaszki miażdżycowej staje się coraz cieńszy, a sama blaszka bardziej podatna na pęknięcie. Poprzez oddziaływanie na wydzielanie IFN- γ i TNF- α , IL-12 pośrednio bierze udział w destabilizacji blaszki miażdżycowej [Brånén et al., 2004].

I.2.3.4. Interleukina 10

Do substancji o potencjale antyaterogennym zalicza się IL-10 [Choi et al., 2007]. Strukturalnie IL-10 przypomina IFN- γ i występuje jako homodimer zbudowany z dwóch polipeptydowych łańcuchów [Moore et al., 2001]. Jest to cytokina o szerokim spektrum efektów, której działanie prowadzi do osłabienia odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego i hamowania odpowiedzi zapalnej. Znaczącym źródłem IL-10 są aktywowane makrofagi, limfocyty Th2, limfocyty regulatorowe Treg, limfocyty B oraz monocyty [Tedgui, et al., 2001; Becher-Allan, et al., 2004]. Biologiczna aktywność IL-10 jest możliwa dzięki interakcji ze swoistym receptorem IL-10R obecnym na powierzchni limfocytów T i B, monocytów, makrofagów i komórek NK. Receptor IL-10R składa się z dwóch podjednostek: α (IL-10R α , IL-10R1) i β (IL-10R β , IL-10R2), przy czym podjednostka α pełni dominującą rolę w transdukcji sygnału [Moore et al., 2001; Liu^c et al., 1994]. IL-10 wykazuje wielokierunkowe działanie przeciwzapalne oparte głównie na hamowaniu wydzielania cytokin prozapalnych: IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 i TNF- α przez limfocyty Th1 z jednoczesnym przesunięciem różnicowania się linii limfocytarnej w kierunku odpowiedzi typu Th2 i zwiększeniu wydzielania IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 [Tedgui et al., 2001; Adler 2009]. Dominacja odpowiedzi Th2 sprzyja spowolnieniu procesów związanych z patogenezą miażdżycy i jest m.in. wynikiem wpływu IL-10 na spadek zdolności do prezentowania antygeny przez komórki APCs [Mocellin et al., 2003]. Za sprawą IL-10 dochodzi również do wzrostu syntezy przeciwzapalnych mediatorów jakimi są rozpuszczalne receptory dla TNF- α i antagoniści receptora dla IL-1 [Moore et al., 2001]. Protekcyjna rola IL-10 jest związana również z regulacją ekspresji wielu cząsteczek aktywnie uczestniczących w progresji miażdżycy w obrębie ściany naczyń. Ten antyaterogenny efekt, IL-10 wywiera poprzez hamowanie szlaku sygnałowego zależnego od czynnika NF- κ B. Zmniejszona aktywność tego czynnika wynika z hamującego wpływu IL-10 na aktywność kinazy I κ B – enzymu odpowiedzialnego za fosforylację białek inhibitorowych I κ B, niezbędnych do translokacji czynnika NF κ B z cytoplazmy do jądra komórkowego i jego aktywację [Nelson et al., 2004]. Dzięki takim

właściwościom Il-10 uczestniczy w regulacji ekspresji cząstek prozapalnych (Il-1, Il-6, Il-8, czynnik tkankowy TF), molekuł adhezyjnych (VCAM-1; ICAM-1) i chemotaktycznych [Tedgui et al.,2001]. Poza zaangażowaniem Il-10 w procesy prowadzące do zmniejszenia rekrutacji komórek zapalnych, interleukina ta wpływa bezpośrednio na ścianę naczyń, hamując proliferację komórek mięśni gładkich tętnic we wczesnej fazie miażdżycy [Mazighi et al.,2004]. Wykazano również, że Il-10 hamuje syntezę anionorodników tlenowych O_2^- , zdolnych do obniżania produkcji i zasobów NO [Gunnnett et al., 2002]. Nie można także pominąć udziału Il-10 w hamowaniu syntezy metaloproteinaz, odpowiedzialnych za destabilizację blaszki miażdżycowej [Holven^b et al.,2006].

I.2.3.5. RANTES (CCL5)

Chemokina CCL5 (RANTES - *Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted*) to kolejna cytokina zaangażowana w rozwój zmian miażdżycowych. Należy do podrodziny CC białek o relatywnie małej masie cząsteczkowej zawierających w swojej budowie 4 cysteiny tworzące mostki disiarczkowe [Baggiolini 2001]. Istotnym źródłem omawianej chemokiny są monocyty, makrofagi, komórki NK, limfocyty T oraz płytki krwi [Mariani et al.,2002; Kraaijeveld et al.,2007]. Produkcja CCL5 jest indukowana przez TNF- α , Il-1 β i IFN- γ oraz hamowana przez Il-10 [John et al.,1997;Thalmann et al.,2007]. Efekty działania CCL5 są rezultatem oddziaływania ze swoistymi receptorami CCR1, CCR3, CCR5, CCR8 związanymi z białkiem G – wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem sygnału [Banas et al.,1999]. Receptor CCR1 wykazuje ekspresję na monocytach, makrofagach i komórkach NK [Dalton et al.,2005;Weber et al.,2001], CCR3 i CCR5 związane są z fenotypem Th1, natomiast silną ekspresję CCR8 przypisuje się tylko aktywowanym limfocytom Th2 [Zlotnik et al.,2000].

Chemokina CCL5 jest szeroko wyspecjalizowana w przyciąganiu do obszaru objętego procesem zapalnym komórek odpowiedzi immunologicznej [Baggiolini 2001]. W przebiegu miażdżycy CCL5 jest mediatorem napływu limfocytów T [Zernecke et al.,2010] i monocytów [Von Hundelshausen et al.,2005] do ściany naczynia. Jako czynnik rekrutujący komórki zapalne, CCL5 bierze udział w proliferacji mięśni gładkich naczyń oraz w formowaniu blaszki miażdżycowej [Barlic et al.,2007]. Udowodniono również znaczenie CCL5 w zmniejszeniu produkcji kolagenu w ścianie naczyń [Böger et al.,2005]. W rozwoju miażdżycy znaczącą rolę może również odgrywać jej wpływ na wzrost ekspresji Il-6 i TNF- α [Shahrara et al.,2006].

I.2.4. Poposiłkowa hiperglikemia

Na szczególną uwagę zasługuje bez wątpienia poposiłkowa hiperglikemia, mimo pewnych trudności w sformułowaniu definicji i związanych z tym trudności w standaryzacji czasu i sposobu badania tego zjawiska. Wartości glikemii występujące po posiłku, zarówno u chorych na cukrzycę, jak i u osób bez cukrzycy, są silnie powiązane z występowaniem epizodów sercowo-naczyniowych i zwiększonym ryzykiem zgonu [Bonora et al.,2001;Meigs^b et al.,2003]. Udowodniono, iż u chorych na cukrzycę typu 2, jest ona silnym czynnikiem prognostycznym ryzyka sercowo-naczyniowego [Hanefeld^a et al.,1996;Cavalot et al.,2006;Sorkin et al.2005]. Wyjściowym czynnikiem sprawczym uszkodzeń komórek i tkanek generowanych przez poposiłkową hiperglikemię jest stres oksydacyjny, znacznie bardziej nasilony, aniżeli w przebiegu przewlekłej hiperglikemii [Monnier et al.,2006]. Ostatecznie jednak poposiłkowa hiperglikemia aktywuje wiele mechanizmów wiodących do progresji miażdżycy. Wzmaga wtórnie nasilenie stresu oksydacyjnego (przemiany na szlaku polioliowym i nieenzymatycznej glikacji), prowadzi do wzmożenia wytwarzania molekuł adhezji (VCAM-1 i ICAM-1), selektywnych, prozapalnych cytokin (IL-6, TNF- α), nasilenia glikacji i oksydacji lipoprotein LDL, zmniejszenia biodostępności tlenku azotu i zwiększenia wytwarzania nitrotyrozyny – czynnika bezpośrednio uszkadzającego DNA [Quagliaro et al.,2005;Ceriello^d et al.,2002]. Poposiłkowa hiperglikemia jest też przyczyną apoptozy komórek śródbłonna i mięśni gładkich naczyń [Piconi et al.,2006]. Ponadto poposiłkowa hiperglikemia jest czynnikiem sprawczym proaterogennych zaburzeń krzepnięcia i fibrynolizy, upośledzenia zależnej od śródbłonna relaksacji naczyń; prowadzi do proarytmogennego wydłużenia odstępu QT, nasila insulinooporność poprzez zmniejszenie utylizacji wolnych kwasów tłuszczowych i nitrozylację reszt tyrozynowych substratu dla receptora insulinowego-1 (*IRS-1-Insulin Receptor Substrate 1*), nasila katabolizm HDL i wytwarzanie małych gęstych cząsteczek LDL [Ceriello^a et al.,2005;Nomiyama et al.,2004]. Monitorowanie poposiłkowej hiperglikemii wymaga wielokrotnych pomiarów glukozy w ciągu dnia i w związku z tym stwarza spore problemy w praktyce. Oznaczanie stężenia 1,5-AG (1,5-anhydro-D-glucitolu) stanowi pomocne i coraz powszechniej akceptowane rozwiązanie tego problemu [Dworacka^b 2002].

1,5-Anhydroglucitol (1,5-AG, 1,5-anhydro-D-glucitol, właśc. 1,5-deoksyglukoza) jest monosacharydem występującym m.in. w surowicy krwi, pod względem budowy chemicznej niezwykle podobnym do D-glukozy [Pitkanen 1990]. Jego stężenie u ludzi zdrowych nie podlega istotnym wahaniom w ciągu doby, głównie dlatego, że 1,5-AG tylko w nieznacznym stopniu uczestniczy w procesach metabolicznych, jego podstawowym źródłem jest pokarm, a

ilość 1,5-AG przyjmowana z pokarmem jest równa ilości wydalanej [Yamanouchi^a et al.,1992]. Co więcej ilość ta stanowi tylko niewielki odsetek całkowitej puli 1,5-AG obecnej w ustroju ludzkim (4,5-5,0 mg/24h versus 500-1000 mg). Warto dodać, że chociaż poszczególne składniki pokarmowe różnią się dość wyraźnie pod względem zawartości 1,5-AG, różnice w ich spożyciu w zakresie diety określonego typu (wschodnioazjatycka, zachodnia, środkowoeuropejska) nie mają wpływu na wahania stężenia tego związku w surowicy krwi. 1,5-AG wydalany jest przez nerki i resorbowany zwrótnie w 99,9% z udziałem transportera wspólnego dla 1,5-AG, fruktozy i mannozy. W warunkach hiperglikemii związanej z przekroczeniem progu nerkowego dla glukozy obserwuje się natychmiastowy wzrost wydalania 1,5-AG z moczem, a w konsekwencji obniżenie jego stężenia w surowicy. Glukoza bowiem, pojawiająca się w znacznych ilościach w moczu jest transportowana zwrótnie nie tylko z udziałem swoistych dla niej mechanizmów transportowych w cewkach nerkowych, ale także współzawodniczy z 1,5-AG o dostęp do transportera 1,5-AG/fruktoza/mannoza. To właśnie zjawisko, pozwala na podstawie zmian stężenia 1,5-AG w surowicy, wykrywać epizody ostrej hiperglikemii u chorych na cukrzycę a w tym ich najczęstszą postać – hiperglikemię poposiłkową [Yamanouchi^a et al.,1992; Akanuma et al.,1988].

Pojawienie się ostrej, nawet krótkotrwałej, hiperglikemii prowadzi zatem do natychmiastowego obniżania się stężenia 1,5-AG w surowicy. 1,5-AG jest, podobnie jak białka glikowane, retrospektywnym markerem hiperglikemii. Jego stężenie zdradza występowanie pojedynczego epizodu hiperglikemii w ciągu 1-2 dni przed badaniem, lub wielokrotnych takich epizodów występujących w czasie 5 tygodni poprzedzających badanie. Żaden z dotychczas stosowanych retrospektywnych wskaźników takich jak stężenie HbA_{1c} czy fruktozaminy nie wykazuje dostatecznej czułości wobec szybkich i krótkotrwałych wzrostów glikemii, tak charakterystycznych dla zaburzeń obserwowanych zwłaszcza u chorych we wczesnej fazie cukrzycy typu 2, u chorych z upośledzeniem tolerancji glukozy oraz u wielu chorych na cukrzycę typu 1 [Yamanouchi^b et al.,1992;Dworacka^c et al.,2002].

I.3. Farmakoterapia cukrzycy typu 2 a miażdżycy

Biorąc pod uwagę wyniki badań interwencyjnych z ostatnich lat ADVANCE [MacMahon et al.], ACCORD [Rosenberg et al.,2008] i VADT [Duckworth et al.,2008] stwierdzić można, że cele leczenia cukrzycy typu 2 obejmują wyłącznie dążenia do uzyskania okołonormoglikemii. Współczesne metody leczenia cukrzycy typu 2 powinny być

skuteczne nie tylko w zakresie efektu hipoglikemizującego i/lub przeciwhiperglikemicznego, ale również powinny spełniać kryteria optymalnego wyrównania metabolicznego w zakresie gospodarki lipidowej i, co najważniejsze, zmniejszać ryzyko występowania powikłań w układzie sercowo-naczyniowym, a przynajmniej znacząco opóźnić ich wystąpienie. W leczeniu chorych na cukrzycę typu 2 obecnie znajdują zastosowanie leki z grupy pochodnych biguanidu, sulfonilomocznika, inhibitorów alfa-glukozydaz, tiazolidinedionów, meglitynidów, leki inkretynowe oraz insuliny [Jasik i wsp.,2005;Neumiller et al.,2009]. Wymienione środki farmakologiczne w różnym stopniu oddziałują na patogenezę powikłań cukrzycy o podłożu miażdżycowym.

I.3.1. Związek pomiędzy stosowaniem metforminy a patomechanizmem miażdżycy

Metformina jest jedynym stosowanym w praktyce lekiem z tej grupy, ale dla większości chorych na cukrzycę typu 2 stanowi ona lek pierwszego wyboru. Profil działania metforminy zapewnia wyrównanie glikemii na czczo jak i glikemii poposiłkowej, a jej mechanizm jest związany z aktywacją kinazy białkowej zależnej od AMP (AMP-activated protein kinase). Enzym ten reguluje proces lipogenezy oraz wewnątrzkomórkowe przemiany glukozy i zwiększa ekspresję transportera GLUT-4. Wpływ metforminy na aktywację AMP-kinazy prawdopodobnie jest podstawowym mechanizmem działania odpowiedzialnym za wielokierunkową skuteczność terapeutyczną tego leku [Zhou et al.,2001]. Metformina redukuje podwyższoną glikemię poprzez zmniejszenie wątrobowej produkcji glukozy (zahamowanie procesu glukoneogenezy i glikogenolizy), opóźnianie jelitowego wchłaniania glukozy i innych heksoz, nasilenie glikolizy beztlenowej w mięśniach szkieletowych, a w ostatecznym efekcie - zmniejsza insulinooporność obwodową [Gianarelli et al.,2003]. Zwiększenie wrażliwości tkanek obwodowych na działanie insuliny wynika także ze zwiększenia przez metforminę liczby i powinowactwa receptorów insulinowych do insuliny oraz zwiększenia aktywności kinazy tyrozynowej podjednostki β receptora insulinowego. Bardzo istotne jest również nasilenie transportu białek nośnikowych GLUT 4 z wnętrza komórek do błony komórkowej [Giannarelli et al.,2003;Zhou et al.,2001;Kozka et al.,1993]. Poza niewątpliwymi zaletami metforminy związanymi z jej zdolnością redukcji hiperglikemii, niezwykle cenne są jej kardioprotekcyjne właściwości. Udowodniono, że metformina reguluje czynność ATP-zależnej pompy sodowo-potasowej w komórkach mięśnia sercowego, dzięki czemu stwarza warunki do transportu jonów Ca^{2+} na zewnątrz kardiomiocytów, a tym samym poprawia relaksację mięśnia sercowego [Ren et al.,1999]. Niezależnie od działania

przeciwhiperglykemicznego metformina wywiera wyjątkowo korzystny wpływ spowalniający rozwój miażdżycy na wielu etapach tego procesu, przede wszystkim poprzez modyfikację czynników jej ryzyka. Poza zwiększeniem wrażliwości tkanek na działanie insuliny [Nagi et al.,1993], lek ten w tkance tłuszczowej reguluje procesy lipolizy i lipogenezy, co skutkuje obniżeniem stężenia wolnych kwasów tłuszczowych, triglicerydów oraz cholesterolu frakcji LDL we krwi [Patane et al.,2002]. Poza poprawą profilu lipidowego, metformina sprzyja obniżeniu masy ciała [Evans 1998]. Udowodniono również pozytywny wpływ metforminy na procesy hemostazy. Za sprawą tego leku dochodzi do obniżenia aktywności czynnika krzepnięcia VII i XIII oraz inhibitora PAI-1 i tPA co wzmacnia fibrylizację i jednocześnie zmniejsza ryzyko wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych [Carew et al.,2009;Gianarelli et al.,2003;Charles et al.,1998]. Wykazano ponadto, że stosowanie metforminy skutkuje poprawą funkcji śródbłonna z uwagi na to, że metformina stymuluje wydzielanie tlenu azotu oraz ogranicza sekrecję molekuł adhezji (VCAM-1, ICAM-1, i E-selektyny) i MCP-1 [Wiernsperger,2000;Mather et al.,2001]. Ze zjawiskiem tym związane jest spowodowane działaniem metforminy zmniejszone przyleganie monocytów do *endotelium* oraz osłabienie migracji i proliferacji komórek mięśni gładkich ściany naczyń [Lund et al.,2008;Bailey^b 2008]. Postuluje się również antyoksydacyjne właściwości metforminy. Dzięki zwiększeniu stężenia zredukowanego glutationu oraz aktywności katalazy i dysmutazy nadtlenkowej metformina wykazuje działania prewencyjne w odniesieniu do zagrożenia stresem oksydacyjnym [Beisswenger et al.,1999;Pavlovic et al.,2000]. Natomiast potwierdzeniem uczestnictwa metforminy w hamowaniu przewlekłej reakcji zapalnej są wyniki badań dokumentujące zmniejszone stężenie białka CRP u osób leczonych metforminą [Isoda et al.,2006;Huang et al.,2009;De Jager et al.,2005].

W świetle badań ostatnich lat i wyników stosowania leków inkretynowych godne podkreślenia wydaje się także inkretynopodobne działanie metforminy. Działanie to związane jest ze zwiększeniem ekspresji genów kodujących receptory endogennych inkretyn oraz z nasilaniem wpływu tych ostatnich na komórki beta poprzez szlak receptora PPAR- α [Cho et al.,2011]. Biorąc zatem pod uwagę plejotropowość działania metforminy, można spodziewać się pewnej skuteczności prewencyjnej względem powikłań w układzie sercowo-naczyniowym tego leku. Należy jednak mieć na uwadze fakt, iż metformina poprzez hamowanie wchłaniania witaminy B₁₂ przyczyniać się może do wzrostu stężenia homocysteiny [Wile et al.,2010]. Niewiele wiadomo także, jakie jest znaczenie leczenia metforminą w odniesieniu do szerszego profilu cytokin biorących udział w patogenezie miażdżycy, a wyniki badań

odnoszące się do kształtowania się stężenia rezystyny i adiponektyny w surowicy chorych na cukrzycę pozostają bardzo rozbieżne [Fujita et al.,2005;Huypens et al.,2005].

I.3.2. Związek pomiędzy stosowaniem insuliny a patomechanizmem miażdżycy

Egzogenna insulina tak jak jej endogenna matryca, działa poprzez receptor dla insuliny, który jest heterotetramerem zbudowanym z dwóch podjednostek α i dwóch podjednostek β złączonych mostkami disarczkowymi. Podjednostki α są zlokalizowane po zewnętrznej stronie komórki i odpowiadają za przyłączenie insuliny podczas kiedy podjednostki β przenikają przez błonę komórkową do wnętrza komórki i posiadają aktywność kinazy tyrozynowej. Aktywowana kinaza tyrozynowa wzbudza fosforylację wielu substratów, którymi są niektóre białka komórkowe. Najlepiej poznanym tego typu białkiem jest IRS-1 (*Insulin Receptor Substrate-1*). Po aktywacji białek sygnałowych dochodzi do uruchomienia szlaków metabolicznych zależnych od insuliny [Canivet et al.,1992;Goodyear et al.,1995]. Celem terapeutycznym leczenia insuliną u osób z cukrzycą typu 2 jest uzupełnienie niedoborów endogennej insuliny i/lub poprawa insulinowrażliwości. Obecnie stosowane preparaty insuliny to przede wszystkim insuliny ludzkie i ich analogi. Wyróżnia się kilka schematów insulinoterapii. Najczęściej rekomendowany sposób leczenia insuliną w cukrzycy typu 2 to tzw. insulinoterapia konwencjonalna czyli 2 wstrzyknięcia w ciągu dnia, zwykle mieszaniny insuliny krótko lub szybko działającej i insuliny o pośrednim czasie działania. Konwencjonalna „intensyfikowana” insulinoterapia zakłada dodatkowe wstrzyknięcie preparatu insuliny krótko lub szybko działającej przed posiłkiem w godzinach południowych [Gumprecht i wsp.,2003]. Znacznie rzadziej chorym na cukrzycę typu 2 zaleca się tzw. intensywną insulinoterapię wymagającą kilka wstrzyknięć insuliny w ciągu dnia. Najczęściej w tym modelu są to 3 wstrzyknięcia insuliny krótko działającej przed planowanymi posiłkami oraz 2 wstrzyknięcia insuliny o pośrednim czasie działania. Funkcjonalna intensywna insulinoterapia przewiduje bolusy posiłkowe ale w zmienianych porach posiłku. Ten model wymaga samodzielnie podejmowanych decyzji przez chorego co do dawki insuliny w zależności od zapotrzebowania tj. składu i kaloryczności posiłku [Pietrzak,2005]. Alternatywną do wielokrotnych wstrzyknięć metodą podawania insuliny jest tzw. osobista pompa insulinowa, która zapewnia ciągle tj. co 3 min., niezależne od posiłku, podawanie insuliny krótko lub szybko działającej jako baza z możliwością podania dodatkowego bolusu

w porze posiłku lub w celu obniżenia wysokiego poziomu cukru we krwi [Scheiner et al.,2009].

Dotychczasowe badania potwierdzają udział insuliny nie tylko w regulacji metabolizmu węglowodanów, ale również znaczenie tego hormonu w rozwoju miażdżycy naczyń. Aterogenność insuliny wiąże się z nasileniem proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń oraz z pobudzeniem migracji miocytów w kierunku błony wewnętrznej [Low Wang et al.,2003;Rhodes et al.,2002]. Istotą tego zjawiska jest aktywacja MAPK-zależnego szlaku sygnałowego prowadzącego do ekspresji genów warunkujących syntezę czynników wzrostu i proliferacji [Desbosis-Mouthon et al.,2000;Isenovic et al.,2009]. Postuluje się również udział insuliny w procesie kumulacji lipidów w ścianie tętnic [DeFronzo 1992]. Proaterogenne działanie insuliny manifestuje się także jej wpływem na wzrost ekspresji cząsteczek adhezji leukocytów oraz nasilenie syntezy kolagenu w naczyniach [Madonna et al.,2004]. Hormon ten ponadto wywołuje dysfunkcję lipazy lipoproteinowej w tkance tłuszczowej co sprzyja hipertriglicydemii, nadmiernej produkcji frakcji LDL cholesterolu oraz obniżeniu frakcji HDL [Steiner et al.,1982;Caufield et al.,2002]. Insulina wykazuje także zdolność uruchamiania mechanizmów odpowiedzialnych za zmniejszenie fibrynolizy poprzez stymulację aktywności PAI-1 i nasilenie jego syntezy [Pandolfi et al.,1996;Schneider et al.,1997]. Podkreślić należy, iż opisane promiażdżycowe właściwości insuliny stanowią istotny klinicznie problem u osób z nasiloną insulinoopornością obwodową, u których występuje nadmierna aktywacja szlaku sygnałowego kontrolowanego przez kinazę MAP [Low Wang 2003].

Godne uwagi wydają się potencjalne antymiażdżycowe właściwości insuliny, które prowadzą się do aktywacji szlaku sygnałowego zależnego od aktywacji PI3K [*Phosphoinositide 3-kinase* – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu]. Pobudzenie kinazy PI3 na skutek interakcji insuliny z jej receptorem przejawia się wzrostem syntezy NO i relaksacją mięśni gładkich naczyń [Montagnani et al.,2002]. Sugeruje się również przeciwzapalne właściwości insuliny. Wykazano, że hormon ten poprzez blokadę białka STAT3 przerywa zainicjowaną przez Il-6 reakcję zapalną [Andersson et al.,2007]. Udowodniono również zaangażowanie insuliny w obniżaniu stężenia jednego z czynników reakcji zapalnej jakim jest CRP [Chaudhuri et al.,2004]. Antyaterogeny potencjał insuliny jest również związany z jej wpływem na supresję czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, zmniejszeniem ekspresji cząstek adhezji ICAM-1 oraz molekuł chemotaktycznych MCP-1 [Dandona et al.,2002]. Niemniej, w warunkach oporności na insulinę, wówczas, gdy przekazywanie sygnału szlakiem zależnym od kinazy PI3 jest osłabione, przeciwmiażdżycowe działanie insuliny może być znacznie słabiej wyrażone. Istnieją zdecydowane różnice zaobserwowane na podstawie dużych badań

klinicznych odnośnie skuteczności różnych schematów insulinoterapii w zakresie kontroli gospodarki węglowodanowej i lipidowej. Wiedza dotycząca związku pomiędzy nieklasycznymi czynnikami ryzyka miażdżycy u chorych na cukrzycę typu 2 a powszechnie stosowanym u tych chorych modelem konwencjonalnej insulinoterapii jest z całą pewnością niewystarczająca dla jednoznacznej oceny tego sposobu leczenia pod kątem profilaktyki przeciwmiażdżycowej.

I.3.3. Związek pomiędzy stosowaniem insuliny w skojarzeniu z metforminą a patomechanizmem miażdżycy

Dzięki nieco odmiennym profilom działania metforminy i insuliny, duże korzyści przynosi terapia skojarzona insuliny z metforminą. Taka kombinacja leków ma zastosowanie u osób, u których nie udało się uzyskać zadowalającego wyrównania metabolicznego podczas monoterapii lekiem doustnym lub insuliną [Jasik i wsp.,2005]. Zadaniem metforminy stosowanej w skojarzeniu z insuliną jest przede wszystkim przełamywanie insulinooporności obwodowej. Ocena wpływu tej formy terapii na rozwój bądź zahamowanie procesu miażdżycowego pozostaje ciągle zagadnieniem wymagającym rozpatrzenia. Aktualny stan wiedzy na ten temat ogranicza się jedynie do założenia, które potwierdza korzystny wpływ insuliny w skojarzeniu z metforminą na gospodarkę lipidową i normalizację stężenia frakcji LDL cholesterolu [Wulffele et al.,2002].

I.3.4. Związek pomiędzy stosowaniem pochodnych sulfonilomocznika a patomechanizmem miażdżycy

Aktualnie znanych jest wiele leków będących pochodnymi sulfonilomocznika. Stosowane obecnie należą do II lub III generacji. W Polsce do najpopularniejszych należą gliklazyd i glimepiryd [Jasik i wsp.,2005]. Mechanizm działania pochodnych sulfonilomocznika polega na pobudzaniu komórek β wysp trzustki do wydzielania insuliny oraz w znacznie mniejszym stopniu na zwiększeniu wrażliwości tkanek obwodowych na działanie tego hormonu [Ahmann i wsp.,2002]. Uruchomienie mechanizmów prowadzących do zwiększonego wydzielania insuliny poprzedzone jest związaniem z receptorem SUR, sprzężonym z kanałem potasowym ATP-zależnym (K_{ATP}), zamykającym się po przyłączeniu pochodnej sulfonilomocznika [Proks i wsp.,2001]. Światło kanału tworzą ułożone wewnątrznie podjednostki Kir6.2, związane z zewnątrznie zlokalizowanymi podjednostkami regulacyjnymi, będącymi jednocześnie receptorami SUR dla pochodnych sulfonilomocznika [Brunton 2007]. Dotychczas opisano trzy podjednostki SUR różniące się miejscem

występowania. W komórkach β jest obecna podjednostka SUR1, w komórkach mięśni szkieletowych i kardiomiocytach występuje podjednostka SUR2A, natomiast SUR2B stwierdzono w komórkach mięśni gładkich [Isomoto et al.,1996]. Zamknięcie kanałów potasowych wzbudza depolaryzację błon komórkowych i otwarcie kanałów wapniowych z następnym napływem jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki. W rezultacie zostaje uruchomiona kaskada sygnałów zakończona wydzielaniem insuliny z ziarnistości komórek β i obniżeniem stężenia glukozy [Ashcroft^a et al.,1999]. Redukcja glikemii jest przede wszystkim konsekwencją wpływu pochodnych sulfonylomocznika na wzrost wydzielania insuliny przez komórki β , a zmniejszenie insulinooporności przez PSM jest następstwem zwiększenia liczby błonowych transporterów glukozy GLUT 4 w komórkach mięśniowych i tłuszczowych oraz aktywacji IRS (*Insulin Receptor Substrates*) - przekaźników kaskady sygnałowej do kinaz białkowych [Rodríguez et al.,2004].

Omawiając pochodne sulfonylomocznika nie można pominąć ich wpływu na zjawisko hartowania mięśnia sercowego w stanach niedokrwienia [Scognamiglio et al.,2002]. Niedokrwienie indukuje otwarcie ATP-zależnych kanałów oraz uwalnianie jonów potasu z kardiomiocytów. W następstwie powyższych procesów dochodzi do hiperpolaryzacji komórek oraz do zmniejszonego napływu jonów wapnia do cytozolu [Brunton 2007]. W efekcie końcowym zmniejsza się kurczliwość mięśnia sercowego i zużycie substancji wysokoenergetycznych, a jego czynność ulega poprawie [Murry et al.,1990]. Ten adaptacyjny mechanizm, nazywany zjawiskiem „hartowania serca przez niedokrwienie” (*preconditioning*), pełni rolę ochronną w stanie silnego niedotlenienia komórek mięśnia sercowego [Maddock et al.,2004]. Pochodne sulfonylomocznika wchodząc w interakcję z receptorem SUR2A mogą eliminować to niezwykle ważne kardioprotekcyjne zjawisko. Nie dotyczy to jednak wszystkich pochodnych sulfonylomocznika w równym stopniu. Wykazano, że działania takiego pozbawiony jest gliklazyd. Te odmienne właściwości gliklazydu tłumaczy się wybiórczością wiązania z receptorem SUR1 obecnym na komórkach β trzustki [Ashcroft^b et al.,2000;Maddock et al.,2004].

Niektóre leki z grupy pochodnych sulfonylomocznika, charakteryzują się również dodatkowymi efektami działania, istotnymi z punktu widzenia zmian miażdżycowych. Dotyczy to zwłaszcza gliklazydu i glimepirydu. Oba leki posiadają pewne przeciwzapalne właściwości, i powodują obniżenie stężenia TNF- α i zmniejszenie aktywności NF- κ B oraz sprzyjają podwyższeniu stężenia adiponektyny [Drzewoski et al.,2006;Kinalska i wsp.,2007;Araki et al.,2009]. Stosowanie glimepirydu i gliklazydu prowadzi do poprawy profilu lipidowego, tj. obniżenia stężenia cholesterolu całkowitego i frakcji LDL oraz

podwyższenie frakcji HDL [Araki et al.,2009;Katra i wsp.,2004]. Korzystne działanie gliklazylu jest związane z jego antyoksydacyjną aktywnością, którą lek zawdzięcza obecności w swojej strukturze unikatowego pierścienia azabicyklooktylowego, zawierającego dwa słabo związane atomy wodoru [Brunton 2007]. Wykazano, że gliklazyl powstrzymuje proces oksydacji lipoprotein oraz zwiększa całkowitą zdolność antyoksydacyjną osocza TRAP (*Total Radical Anti-oxidant Parametr*), podczas kiedy pozostałe leki z tej grupy nie wykazują takich właściwości [Fava et al.,2002;De Mattia et al.,2003]. Innym, przeciwwzapalnym efektem działania gliklazylu jest hamowanie adhezji monocytów do komórek śródbłonna oraz modulacja wazodylatacyjnej funkcji naczyń [Renier et al.,2000; Sena et al.,2009]. Poza tym gliklazyl oraz glimepiryd działają antyagregacyjnie i wzmagają zależną od tPA fibrylizę [Xu et al.,2010;Konya et al.,2010].

Niestety, wpływ pochodnych sulfonilomocznika na komórki beta wysp trzustki odpowiadający w wielu wypadkach za hiperinsulinemię i hiperproinsulinemię w chwili obecnej odsuwa te leki na plan dalszy w leczeniu cukrzycy typu 2. Szczegóły dotyczące oddziaływania tej grupy leków na nieklasyczne czynniki ryzyka miażdżycy badane w niniejszej pracy nie są dotychczas poznane.

I.3.5. Związek pomiędzy stosowaniem tiazolidynedionów (glitazonów) a patomechanizmem miażdżycy

Tiazolidynediony reprezentują grupę leków, które zwiększają wrażliwość tkanek obwodowych na działanie insuliny, normalizują glikemię i lipidemię. Obecnie, w praktyce stosuje się wyłącznie jeden preparat - pioglitazon [Katra i wsp.,2004]. Dzięki interakcji z receptorem PPAR- γ , tiazolidynediony regulują ekspresję wielu genów odpowiedzialnych za wrażliwość tkanek na działanie insuliny oraz za metabolizm węglowodanów i lipidów [Biscetti et al.,2009]. Modulacja insulinowrażliwości odbywa się poprzez wpływ tych leków na wzrost aktywności kinazy tyrozynowej receptora insulinowego, nasilenie syntezy transporterów glukozy GLUT 1 i GLUT 4 oraz wzrost liczby receptorów insulinowych [Lennon et al.,2009;Martinez et al.,2009]. Tiazolidynediony spowalniają również procesy glukoneogenezy i nasilają glikolizę w wątrobie [Yki-Järvinen 2004]. Pobudzenie receptora PPAR- γ wiedzie do różnicowania i dojrzewania preadipocytów do adipocytów. Nowo powstałe adipocyty są mniejsze i bardziej wrażliwe na działanie insuliny [Yki-Järvinen 2004]. Za sprawą tiazolidynedionów dochodzi także do korzystnej redystrybucji i magazynowania wolnych kwasów tłuszczowych w adipocytach kosztem ich stężenia we krwi [Yki-Järvinen 2004]. Dowiedziono również, że tiazolidynediony wykazują antyaterogenne właściwości. W

licznych doniesieniach potwierdzono wpływ tych leków na zmniejszenie aktywności czynnika NF- κ B i redukcję stężenia prozapalnych cytokin, tj. TNF- α , Il-1 β , Il-6, zwiększenie stężenia adiponektyny [Dasu et al.,2009;Higuchi et al.,2010] oraz obniżanie stężenia białka CRP [Haffner et al.,2002]. W wyniku działania tiazolidynedionów ulega zmniejszeniu aktywność PAI-1 [Liu^a et al.,2005], nasila się eliminacja utlenionych LDL z krążenia i zwiększa stężenie cholesterolu HDL [Parulkar et al.,2001]. Zaobserwowano również zmniejszenie proliferacji mięśni gładkich naczyń pod wpływem tiazolidynedionów [Little et al.,2007]. Dodatkowy efekt przeciwmiażdżycowy tej grupy leków wiąże się z przyspieszaniem usuwania cholesterolu z wnętrza makrofagów, co może sprzyjać spowolnieniu transformacji makrofagów do komórek piankowatych [Chinetti et al.,2001].

Niezależnie od reakcji z receptorem PPAR- γ , tiazolidynediony uczestniczą w hamowaniu indukcji syntazy tlenku azotu iNOS w makrofagach [Nishio et al.,2008]. Niezależnie od zaobserwowanych właściwości przeciwmiażdżycowych tiazolidynodionów, ich działanie na układ sercowo-naczyniowy w ostatnich kilku latach budzi wiele zastrzeżeń przede wszystkim za sprawą rozyglitazonu – leku do niedawna jeszcze zarejestrowanego w Polsce. Lek ten jednak został wycofany z lekospisu w 2010 roku z uwagi na zwiększone ryzyko sercowo-naczyniowe u leczonych chorych, a tym samym pozycja tej grupy leków w leczeniu cukrzycy typu została poważnie zachwiana.

I.3.6. Związek pomiędzy stosowaniem meglitynidów (glinidów) a patomechanizmem miażdżycy

Leki z grupy meglitynidów, w sposób analogiczny do pochodnych sulfonylomocznika, pobudzają wydzielanie insuliny w odpowiedzi na hiperglikemię oraz zmniejszają poposiłkowy przyrost glikemii. Przykładami takich leków jest repaglinid i nateglinid [Paolisso et al.,2003]. W wyniku połączenia meglitynidów z podjednostką Kir6.2/SUR1 receptora w komórkach β , otwierają się ATP-zależne kanały potasowe inicjując napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórek. W efekcie końcowym insulina ulega wyrzuceniu z ziarnistości do przestrzeni międzykomórkowej a następnie do krwi [Shigeto et al.,2007]. W ten sposób meglitynidy korzystnie wpływają na jeden z powszechnie uznanych, klasycznych czynników proaterogennych jakim jest hiperglikemia poposiłkowa. Zaangażowanie meglitynidów w modulacji procesu zapalno-immunologicznego nie zostało jednoznacznie udokumentowane. Sugeruje się przeciwzapalne i antyoksydacyjne właściwości repaglinidu [Gumieniczek et al.,2005]. Nieliczne doniesienia wskazują na udział repaglinidu w obniżeniu

stężenia II-6 [Esposito et al.,2004]. Są to jednak niewystarczające dowody na potwierdzenie wpływu meglitynidów na przebieg procesu zapalnego.

I.3.7. Związek pomiędzy stosowaniem inhibitorów α -glukozydaz a patomechanizmem miażdżycy

Inhibitory α -glukozydaz (akarboza, miglitol) należą do leków, które blokują enzymy jelitowe rozrywające wiązania α obecne w cząsteczkach dwu- i wielocukrów, dzięki czemu spowalniają proces ich trawienia i w następstwie wchłanianie cukrów prostych, w tym glukozy. Taki mechanizm działania pozwala zapobiegać przyrostom glikemii, zwłaszcza poposiłkowej, i jednocześnie korzystnie wpływać na odsetek HbA_{1C} [Chiasson et al.,2002]. Rola poposiłkowej hiperglikemii w inicjacji procesów sprzyjających uszkodzeniu śródbłonna naczyń jest obecnie dobrze poznana zatem nie budzi wątpliwości fakt, że akarboza działa prewencyjnie w stosunku do powikłań sercowo-naczyniowych. Istnieją również doniesienia potwierdzające korzystny wpływ akarbozy na poprawę insulinowrażliwości [Laube 2002] oraz na optymalizację profilu lipidowego w zakresie triglicerydów oraz frakcji LDL i HDL cholesterolu [Kado et al.,1998]. Biorąc pod uwagę wyżej wymienione efekty, można przypuszczać, że i one mają duże znaczenie dla zmniejszenia występowania i rozwoju powikłań naczyniowych o podłożu miażdżycowym [Charpentier et al.,2006]. Zaobserwowano także wpływ akarbozy na redukcję stresu oksydacyjnego oraz na obniżenie aktywacji procesów krzepnięcia [Ceriello^b et al.,1996] co wyraźnie zaowocowało zmniejszeniem występowania powikłań sercowo-naczyniowych [Hanefeld^b et al.,2004]. Korzystny jest również wpływ akarbozy na jeden z nieklasycznych czynników proaterogennych – adiponektynę. Dowiedziono znaczący wzrost stężenia tego czynnika pod wpływem akarbozy [Shimazu et al.,2009]. Istnieją także przesłanki, że akarboza wywiera wpływ na supresję chemotaktycznego czynnika MCP-1 [Nakamura et al.,2006].

I.3.8. Związek pomiędzy stosowaniem analogów inkretyn i gliptyn a patomechanizmem miażdżycy

Nową, obiecującą grupą leków hipoglikemizujących wydają się analogi endogennych hormonów inkretynowych GLP-1 (*Glucagon-Like Peptide-1* - glukagonopodobny peptyd-1) – eksenatyd, liraglutyd oraz inhibitory dipeptydylo-peptydazy IV (DPP IV) – sitagliptyna, widagliptyna i sakstagliptyna. Skuteczność przeciwcukrzycowa tych leków polega na

przywróceniu prawidłowego funkcjonowania osi jelitowo-trzustkowej u osób z cukrzycą typu 2 tzn. zapewnieniu właściwej odpowiedzi insulinowej na bodźce pokarmowe [Holst^a et al.,2004]. Endogenny GLP-1 jest hormonem peptydowym zbudowanym z 30 aminokwasów, wydzielanym w dwóch aktywnych biologicznie formach GLP-1 (7-37) i GLP-1 (7-36) przez obecne w jelicie cienkim komórki L. Efekt działania tego hormonu uwarunkowany jest oddziaływaniem z receptorem wiążącym białko G, obecnym na komórkach β trzustki oraz w tkankach obwodowych t.j. układzie nerwowym, sercu, nerkach, płucach i przewodzie pokarmowym. Fizjologiczna rola GLP-1 polega na pobudzeniu wydzielania insuliny przez komórki β przy jednoczesnym hamowaniu sekrecji glukagonu oraz spowolnieniu procesu opróżniania żołądka. Niemalże natychmiastowa biodegradacja egzogennych inkretyn przez jelitową DPP IV znacznie skraca okres ich półtrwania i w związku z tym także ich przeciwcukrzycowe działanie [Holst^b 2007]. DPP IV należy do enzymów z grupy proteaz serynowych, dla których hormony inkretynowe są substratem [Hiramatsu et al.,2007]. Ekspresję DPP IV stwierdzono w krążącym osoczu, na powierzchni komórek śródbłonna naczyń, w nerkach, jelitach, trzustce, i limfocytach T [Mentlein 1999]. Aktywność enzymatyczna DPP IV polega na odcinaniu NH₂-końcowych dipeptydów od białek zawierających na przedostatniej pozycji alaninę lub prolinę [Ahren 2007]. Zastosowanie egzogennych związków blokujących aktywność DPP IV pozwala zmniejszyć enzymatyczny rozkład inkretyn i zwiększyć zależne od GLP-1 poposiłkowe wydzielanie insuliny [Lankas et al.,2005]. Rola doustnych analogów GLP-1 polega na stymulowaniu zależnego od glukozy wydzielania insuliny przez komórki β wysp trzustki przy jednoczesnym hamowaniu wydzielania glukagonu i glukoneogenezy wątrobowej, co istotnie wpływa na normalizację glikemii na czczo i glikemii poposiłkowej. Jednocześnie, z uwagi na ścisły związek sekrecji insuliny z aktualnym poziomem glikemii, podczas stosowania leków inkretynowych w monoterapii, chorym praktycznie nie zagraża hipoglikemia [Zarowitz et al., 2009]. Na uwagę zasługuje także znakomity wpływ na redukcję masy ciała w mechanizmie zmniejszenia tempa opróżniania żołądka i związanego z tym uczucia sytości [Parkes et al.,2001]. Dotyczy to zwłaszcza analogów inkretyn i ma niemały związek ze zmniejszaniem insulinooporności obwodowej. Dotychczasowe doniesienia wskazują również na zmniejszenie odsetka HbA_{1c} pod wpływem zarówno analogów inkretyn jak i inhibitorów DPP IV [Blonde et al.,2006;Hollander et al.,2010]. Jak się okazało, związki te wykazują również pewną skuteczność w zakresie poprawy funkcji śródbłonna i pozytywny wpływ na wykładniki

istotne dla rozwoju miażdżycy. Antyaterogenne działanie jest wynikiem korzystnego wpływu na stężenie w surowicy poszczególnych frakcji cholesterolu i triglicerydów oraz białka CRP [Rizzo et al.,2009]. Udało się także udowodnić, że liraglutyd wpływa na wzrost syntezy tlenku azotu, spowolnienie formowania blaszki miażdżycowej i supresję jądrowego czynnika NF- κ B [Hattori^a et al.,2010;Watanabe et al.,2010]. Dzięki modulacji ekspresji NF- κ B, liraglutyd hamuje zależną od TNF- α aktywność cząstek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1 oraz PAI-1 [Liu^b et al.,2009]. Pod wpływem sitagliptyny z kolei zaobserwowano zmniejszenie ekspresji Il-6, Il-12, TNF- α oraz MCP-1 [Dobrian et al.,2011]. Uwzględniając profilaktykę miażdżycy jako najistotniejszy cel podawania tych leków przyjąć należy jednak, że dominującym efektem działania zapewniającym skuteczność leków z tej grupy, jest ich zdolność do korygowania poposiłkowej hiperglikemii [Mikhail,2008].

Cel pracy

Skuteczne leczenie cukrzycy typu 2, również leczenie farmakologiczne, powinno prowadzić nie tylko do zniwelowania bieżących objawów choroby, ale także winno maksymalnie ograniczać ryzyko rozwoju przewlekłych powikłań, w tym powikłań naczyniowych na podłożu miażdżycy – głównej przyczyny zwiększonej śmiertelności i chorobowości w tej grupie osób. Bazując na współczesnej wiedzy, która stanowi podstawę do realizacji tego celu, wykorzystuje się przede wszystkim zależność pomiędzy farmakoterapią cukrzycy a wyrównaniem metabolicznym i występowaniem klasycznych czynników ryzyka miażdżycy.

Istnieje jednak szereg niejasności i rozbieżności w odniesieniu do wpływu poszczególnych leków i schematów terapeutycznych stosowanych w leczeniu cukrzycy na kształtowanie się tzw. nieklasycznych czynników proaterogennych.

Głównym celem pracy jest wyjaśnienie, która z często stosowanych w praktyce klinicznej metod farmakoterapii cukrzycy jest związana z najkorzystniejszym, z punktu widzenia profilaktyki miażdżycy, profilem nieklasycznych czynników proaterogennych takich jak stężenie homocysteiny, adiponektyny i rezystyny w surowicy, stężenie cytokin Il-1 β , Il-6, Il-12, Il-10, RANTES w surowicy oraz nasilenie poposiłkowej hiperglikemii. Dla realizacji tego założenia zaplanowano także porównanie badanych czynników pomiędzy chorymi na cukrzycę typu 2 różniącymi się sposobem farmakoterapii a osobami zdrowymi.

Zaplanowane badania mają także na celu ocenę statystyczną związków przyczynowo-skutkowych pomiędzy poddanymi analizie nieklasycznymi czynnikami proaterogennymi.

Istotnym celem zaplanowanych badań jest również wykazanie ewentualnych zależności pomiędzy badanymi nieklasycznymi czynnikami proaterogennymi a wyrównaniem metabolicznym cukrzycy, jak również pomiędzy tymi czynnikami a czynnością komórek beta wysp trzustki i/lub nasileniem obwodowej insulinooporności.

Wśród metod farmakoterapii cukrzycy typu 2 uwzględniono leki i schematy terapeutyczne najczęściej stosowane w praktyce klinicznej, to jest leczenie metforminą, leczenie pochodnymi sulfonylomocznika, stosowanie insulinoterapii konwencjonalnej oraz insulinoterapii konwencjonalnej w skojarzeniu z metforminą.

III. Część doświadczalna.

III.1. Materiały i metodyka badań.

III.1.1. Badane grupy chorych.

Ogółem zbadano 219 osób w tym:

- 89 osób w wieku 35-80 lat (średnia wieku $61,2 \pm 8,9$ lat),

chorych na cukrzycę typu 2

leczonej od co najmniej 3 miesięcy metforminą (500-2550 mg/doba),

- 31 osób w wieku 44-77 lat (średnia wieku $61,2 \pm 8,8$ lat),

chorych na cukrzycę typu 2

leczonej od co najmniej 3 miesięcy insuliną w skojarzeniu z metforminą (insulina 35-60 j./doba + metformina 500-2550 mg/doba),

- 31 osób w wieku 40-88 lat (średnia wieku $67,1 \pm 12,1$ lat),

chorych na cukrzycę typu 2

leczonej od co najmniej 3 miesięcy pochodną sulfonilomocznika (gliklazyd 30 mg/doba lub glimepiryd 2-6 mg/doba)

- 31 osób w wieku 50-83 lat (średnia wieku $65,0 \pm 10,0$ lat),

chorych na cukrzycę typu 2

leczonej od co najmniej 3 miesięcy insuliną (35-60 j./doba),

- 37 osób zdrowych w wieku 30-65 lat (średnia wieku $48,2 \pm 7,7$ lat)

Cukrzycę typu 2 rozpoznawano w oparciu o kryteria Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego [PTD 2009].

Badani chorzy byli w latach 2004 – 2010 pacjentami jednego z niżej wymienionych ośrodków leczenia otwartego:

- Poradni Lekarza Rodzinnego „Akademicka” w Poznaniu,

- Poradni Diabetologicznej w Wągrowcu,

- Poradni Diabetologicznej Wielkopolskiego Ośrodka Specjalistycznego w Poznaniu,

- Poradni Zaburzeń Metabolicznych PSK 5 przy Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Zaburzeń Metabolicznych i Nadciśnienia Tętniczego UM w Poznaniu,
- Poradni Lekarza Rodzinnego w Rokietnicy

Dane dotyczące przebiegu choroby u poszczególnych osób uzyskano na podstawie kart pacjentów wraz z dzienniczkami zawierającymi wyniki samokontroli glikemii i ciśnienia tętniczego oraz bezpośredniego wywiadu i badania przedmiotowego.

Farmakoterapia cukrzycy typu 2 obejmowała stosowanie:

- w grupie chorych leczonych metforminą: preparatów Metformax[®] 500, 850, 1000; Siofor[®] 500, 850, 1000; Glucophage[®] 500, 850, 1000; Glucophage XR 500; 750; Formetic 850;
 - w grupie chorych leczonych insuliną w skojarzeniu z metforminą: preparatów Mixtard[®] Penfill 30, Gensulin M 30, Novo Mix 30 Penfill[®], Polhumin N, preparatów Metformax[®] 500, 850, 1000; Siofor[®] 500, 850, 1000; Glucophage[®] 500, 850, 1000; Glucophage XR 500; 750; Formetic 850;
 - w grupie chorych leczonych pochodnymi sulfonilomocznika: preparatów gliklazydu (Diaprel[®], Diaprel MR[®], Diabrezide[®]) lub glimepirydu (Amaryl[®], Glimehexal[®]);
 - w grupie chorych leczonych insuliną w monoterapii: preparatów Mixtard[®] Penfill 30, Mixtard[®] 40 Penfill, Gensulin M 30, Humalog Mix 50[®], Novo Mix 30 Penfill[®], Polhumin N.
- U wszystkich chorych leczonych insuliną stosowano konwencjonalne jej podawanie pod postacią mieszanek insulinowych podawanych 2-krotnie w ciągu doby.

Chorobę niedokrwienną serca w grupie leczonych metforminą stwierdzono u 13 osób, wśród pacjentów leczonych insuliną w skojarzeniu z metforminą znajdowało się 11 takich osób, w grupie pacjentów poddanych terapii pochodnymi sulfonilomocznika znajdowało się 5 osób z chorobą niedokrwienną serca natomiast 15 przypadków z tym schorzeniem stwierdzono u pacjentów leczonych insuliną.

Udar niedokrwienny lub krwotoczny mózgu przeżyły 4 osoby leczone metforminą, 3 osoby leczone terapią skojarzoną, 1 osoba leczona pochodną sulfonilomocznika oraz 2 osoby leczone insuliną.

Nadciśnienie tętnicze występowało u 51 osób leczonych metforminą, u 21 osób leczonych terapią skojarzoną, u 26 osób leczonych pochodną sulfonilomocznika oraz u 23 osób leczonych insuliną.

Objawy mikroangiopatii (retinopatii, nefropatii) i/lub neuropatii stwierdzano u 11 osób leczonych metforminą, u 9 osób leczonych terapią skojarzoną, u 2 osób leczonych pochodnymi sulfonilomocznika oraz u 4 osób leczonych insuliną.

Ze względu na towarzyszące cukrzycy schorzenia, takie jak: choroba niedokrwienna serca i/lub nadciśnienie tętnicze i/lub zaburzenia gospodarki lipidowej i/lub dna moczanowa i/lub łagodny przerost stercza, u badanych stosowano następujące grupy leków:

- antagoniści kanałów wapniowych z grupy dihydropirydyn
- azotany
- diuretyki tiazydopodobne – indapamid
- antagoniści receptora GP IIb/IIIa
- selektywne α_1 -adrenolityki.

Poza tym wszyscy badani chorzy na cukrzycę otrzymywali leki z następujących grup:

- inhibitorów konwertazy angiotensyny II i/lub antagonistów receptora angiotensyny II AT_1 ,
- β -blokerów
- statyn
- oraz
- kwas acetylosalicylowy w dawkach antyagregacyjnych.

Z badań wykluczono osoby z następującymi schorzeniami towarzyszącymi:

- niewydolność nerek,
- niewydolność wątroby,
- niewydolność serca,
- zaburzenia funkcji tarczycy,
- niedokrwistość,
- choroby nowotworowe,
- choroby infekcyjne,
- ostre i przewlekłe choroby zapalne i autoimmunologiczne.

Grupa badana nie obejmowała także osób spożywających alkohol w ilości przekraczającej 25 g dziennie oraz palaczy tytoniu.

Grupa osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej to honorowi krwiodawcy lub pacjenci wymienionych ośrodków medycznych poddawani okresowym badaniom kontrolnym, u których wykluczono dysglikemię, a którzy spełniali wszystkie kryteria wykluczenia stosowane w odniesieniu do chorych na cukrzycę.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (nr 438/04; 921/04;1286/06; 1069/07; 696/09). Wszystkie osoby były poinformowane o ich celu i wyraziły na nie pisemną zgodę.

Krew przeznaczoną do badań pobierano na czczo ze zgięcia łokciowego. Materiał biologiczny poddany analizie stanowiły: krew pełna, osocze i surowica.

Oznaczenia były wykonywane w Katedrze i Zakładzie Farmakologii (1,5-AG, adiponektyna, rezystyna, homocysteina, insulina, peptyd C), Katedrze i Zakładzie Immunologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (II-1 β , II-6, II-10, II-12, RANTES), natomiast parametry wyrównania metabolicznego (glikemia na czczo, HbA_{1c}, profil lipidowy) oznaczane były *ex tempore* w laboratorium „Diagnostika” w Poznaniu, w laboratorium PSK-5 w Poznaniu, w laboratorium szpitala w Wągrowcu oraz w laboratorium „Medic-Lab” w Szamotułach.

III.1.2. Metodyka badań.

U badanych chorych na cukrzycę typu 2 oraz u osób należących do grupy kontrolnej oznaczono:

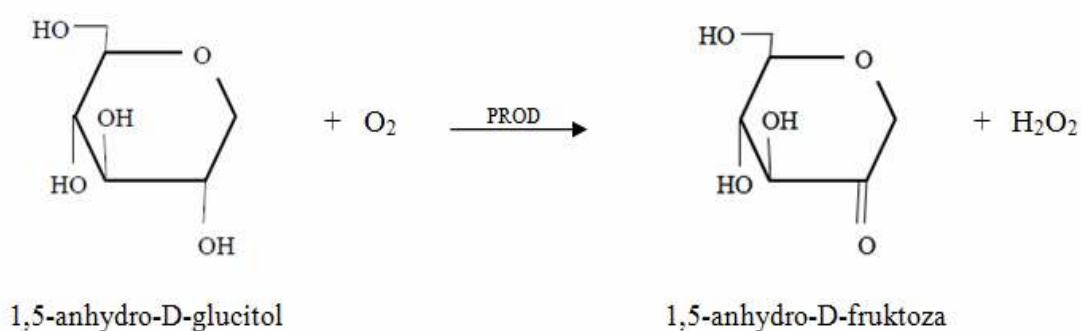
1. glikemię na czczo w osoczu krwi żyłnej
 - metodą enzymatyczną z zastosowaniem reakcji katalizowanej przez oksydazę glukozy,
2. stężenie hemoglobiny glikowanej HbA_{1c} we krwi pełnej
 - metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) stosując testy VariantTM Hemoglobin A_{1c} BIO-RAD,
3. stężenie 1,5-anhydro-D-glucitolu w osoczu
 - metodą enzymatyczną wg Yabuuchi w modyfikacji Dworackiej i wsp. [Dworacka 2004],
4. stężenie cholesterolu całkowitego, jego frakcji HDL i LDL oraz stężenie triglicerydów w surowicy
 - metodą enzymatyczną z zastosowaniem testów komercyjnych Biosystem, opartych na reakcjach katalizowanych przez: esterazę cholesterolową (stężenie cholestreolu całkowitego, HDL, LDL) lub oksydazę glicerofosforanu (stężenie triglicerydów),

5. stężenie insuliny i peptydu C w surowicy na czczo
 - metodą immunoenzymatyczną z zastosowaniem testów komercyjnych DAKO (insulina) i DIAsource Immuno Assays (peptyd C),
6. stężenie homocysteiny w surowicy
 - metodą immunoenzymatyczną z zastosowaniem testów komercyjnych Axis[®] Human Homocysteine ELISA Kit firmy IBL,
7. stężenie adiponektyny w surowicy
 - metodą immunoenzymatyczną z zastosowaniem testów komercyjnych Human Total Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA Kit firmy R&D Systems,
8. stężenie rezystyny w surowicy
 - metodą immunoenzymatyczną z zastosowaniem testów komercyjnych Human Resistin Quantikine ELISA Kit firmy R&D Systems,
9. stężenie cytokin Il-1 β , Il-6, Il-10, Il-12, RANTES
 - metodą cytofluorymetrii przepływowej z zastosowaniem komercyjnych testów macierzy kulkowych Il-1 β , Il-6, Il-10, Il-12, RANTES Flex Set firmy Becton Dickinson Biosciences.

III.1.2.1. Szczegółowa metodyka oznaczania stężenia 1,5-AG w osoczu.

Do oznaczania stężenia 1,5-anhydro-D-glucitolu w osoczu stosuje się metodę enzymatyczną [Umera et al.,1991;Dworacka^b 2004].

Zasada enzymatycznej metody oznaczania stężenia 1,5-anhydro-D-glucitolu w osoczu opiera się na przeprowadzeniu reakcji oksydacyjno-redukcyjnej katalizowanej przez oksydazę pyranozy – PROD (pyranoza: tlen 2-oksydoreduktaza). W wyniku tej reakcji następuje utlenianie grupy hydroksylowej w pozycji 2 cząsteczki 1,5-anhydro-D-glucitolu przez tlen cząsteczkowy przy udziale PROD (Ryc.1) do 1,5-anhydro-D-fruktozy. Dodatkowym produktem tej reakcji jest nadtlenek wodoru.



Nadtlenek wodoru oznacza się ilościowo, przeprowadzając reakcję barwną z udziałem peroksydazy chrzanowej. Rolę do norawodoru w tej reakcji pełni kwas 2,2-azino-bis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy), czyli ABTS.

Pomiaru absorbancji ABTS-u w postaci utlenionej dokonuje się przy długości fali 420 nm wobec ślepej próby.

Zanim 1,5-anhydro-D-glucitol zostanie utleniony przez PROD, glukoza i inne monosacharydy obecne w osoczu usuwane są przy pomocy chromatografii jonowymiennej.

Do każdej serii oznaczeń wykonuje się równolegle 4 punkty krzywej kalibracyjnej. Wzorzec stanowi roztwór 1,5-anhydro-D-glucitolu o stężeniu wyjściowym 50 mg/L, z którego sporządza się kolejne rozcieńczenia.

Wartości referencyjne stężenia 1,5-anhydro-D-glucitolu oznaczonego metodą enzymatyczną w osoczu wynoszą 13,9 - 31,8 mg/L [Macugowska, 2002].

Ocena stężenia 1,5-anhydro-D-glucitolu w osoczu stanowi ważne źródło informacji dotyczące stopnia metabolicznego wyrównania cukrzycy. Wskaźnik ten jest niezwykle czuły na epizody krótkotrwałej, ostrej hiperglikemii, dlatego też jest przydatny dla

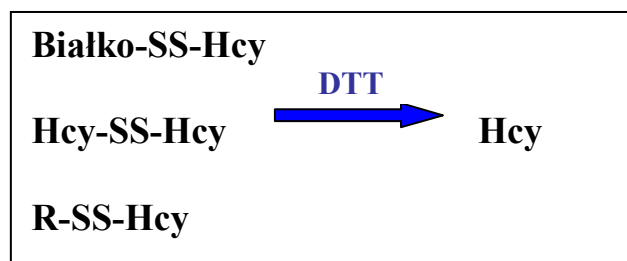
wykrywania poposiłkowej hiperglikemii u chorych, u których nie stosuje się ciągłego monitorowania profilu dobowego glikemii [Dworacka^b, 2002].

III.1.2.2. Szczegółowa metodyka oznaczania stężenia homocysteiny w surowicy.

Stężenie homocysteiny w surowicy oznaczono metodą immunoenzymatyczną, testem Axis[®] Human Homocysteine ELISA Kit firmy IBL. Test ten pozwala na oznaczenie całkowitego stężenia L-homocysteiny obecnej w surowicy krwi.

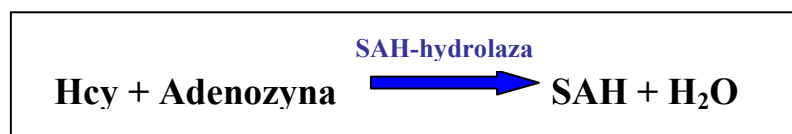
Etap wstępny polegał na uwolnieniu homocysteiny z połączeń z białkami lub aminokwasami i uzyskaniu wolnej frakcji tego aminokwasu, a następnie na konwersji wolnej homocysteiny do S-adenozylu-L-homocysteiny (SAH).

Ryc. 2. Reakcja redukcji związanych form homocysteiny do formy wolnej.



Białko-SS-Hcy - homocysteina połączona z białkami osocza mostkiem disiarczkowym
Hcy-SS-Hcy – 2 cząsteczki homocysteiny połączone mostkiem disiarczkowym
R-SS-Hcy – homocysteina połączona mostkiem disiarczkowym z grupą tiolową aminokwasu
DTT – dithiotreitol, reduktor

Ryc. 3. Reakcja pomiędzy wolną homocysteiną a adenozyną, katalizowana przez hydrolazę SAH.



Hcy - homocysteina
SAH – S-adenozylu-L-homocysteina
SAH-hydrolaza - hydrolaza S – adenozylo-L-homocysteiny

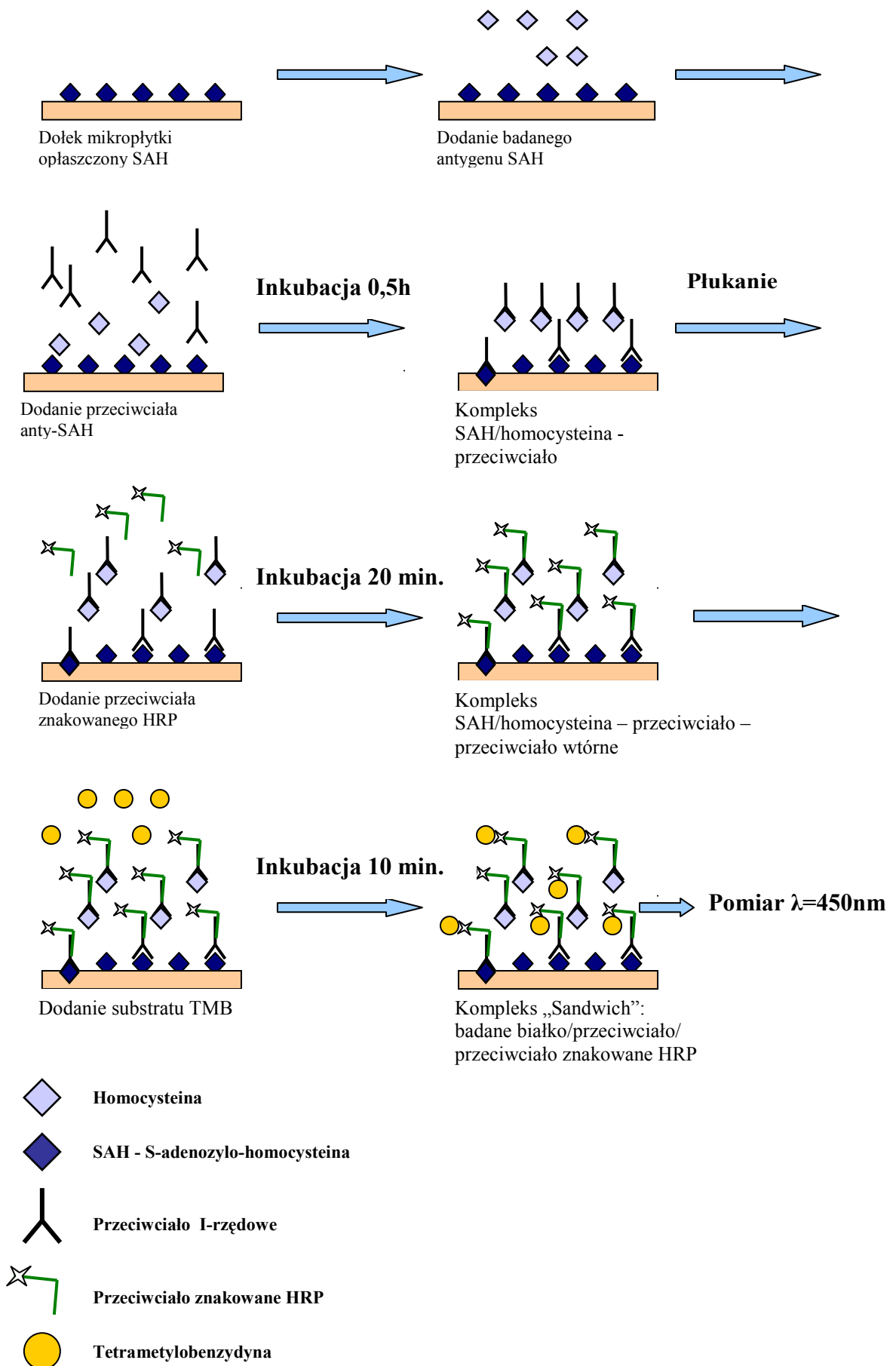
W dalszym etapie wykorzystywano płytki mikrotitracyjne opłaszczone antygenem tj. cząsteczkami S-adenozylu-L-homocysteiny. Do odpowiednich dołków nanoszono po 25 µl roztworów wzorcowych lub surowic zawierających badany antygen SAH oraz po 200 µl roztworu zawierającego mysie, monoklonalne przeciwciała anty-SAH skierowane przeciwko L-homocysteinie. Podczas półgodzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej zachodzi interakcja między przeciwciałem anty-SAH a S-adenozylu-L-homocysteiną

opłaszczającą płytkę, jak i z homocysteiną zawartą w badanej próbce. Po trzykrotnym płukaniu buforem dla usunięcia kompleksów przeciwciała monoklonalne-homocysteina zawarta w próbce lub w roztworze wzorcowym dodawano 100 μ l roztworu zawierającego monoklonalne przeciwciała wtórne, sprzężone z peroksydazą chrzanową (HRP-*Horse Radish Peroxidase*), ulegające związaniu z anty-SAH. Po kolejnym trzykrotnym płukaniu buforem w celu usunięcia nadmiaru przeciwciał na mikroplótkę наносzono 100 μ l roztworu tetrametylbenzydyny (TMB), będącej substratem dla peroksydazy chrzanowej. Następnie całość poddawano inkubacji przez 10 min. w temperaturze pokojowej; w tym czasie zachodziła reakcja barwna, którą przerywano poprzez dodanie 100 μ l 0,8M roztworu kwasu siarkowego.

Pomiaru absorbancji dokonano przy pomocy czytnika Sunrise Tecan Basic przy długości fali $\lambda=450\text{nm}$. Stężenie S-adenozylu-L-homocysteiny odczytywano z krzywej wzorcowej otrzymanej na podstawie roztworów wzorcowych o następujących stężeniach: 2 $\mu\text{mol/L}$, 4 $\mu\text{mol/L}$, 8 $\mu\text{mol/L}$, 15 $\mu\text{mol/L}$, 30 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$. Każde z oznaczeń wykonywano w 2 powtórzeniach.

Zakres referencyjny dla osób zdrowych mieści się w granicach 5-15 $\mu\text{mol/L}$. Precyzja metody wynosiła 9-10%.

Dla tej metody wykazano reakcje krzyżowe z adenozyną, adenozylo-L-metioniną, cystationiną, L-cysteiną, glutationem i tiolaktonem. Podczas interpretacji uzyskanych wyników uwzględniono możliwość wystąpienia wymienionych reakcji krzyżowych.



yc. 4. Schemat oznaczania homocysteiny w surowicy metodą immunoenzymatyczną Elisa, testem IBL Axis.

III.1.2.3. Szczegółowa metodyka oznaczania stężenia adiponektyny w surowicy.

Stężenie adiponektyny w surowicy oznaczono testem immunoenzymatycznym Human Total Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA Kit firmy R&D Systems. Test ten pozwala oznaczyć wszystkie krążące w surowicy krwi frakcje adiponektyny łącznie.

Oznaczenie przeprowadzano na płytkach mikrotitracyjnych opłaszczonych monoklonalnym przeciwciałem skierowanym przeciwko ludzkiej cząsteczce adiponektyny. Do każdego dołka nanoszono po 50 μ l roztworów wzorcowych lub badanej surowicy uprzednio rozcieńczonej w stosunku 1:100 i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po czterokrotnym płukaniu buforem do każdego dołka dodawano po 200 μ l roztworu zawierającego przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiej adiponektynie, znakowane peroksydazą chrzanową HRP. Ponowna dwugodzinna inkubacja w temperaturze pokojowej zapewniła utworzenie kompleksów „kanapki”, w których cząsteczka adiponektyny znajduje się pomiędzy dwiema warstwami przeciwciał. Kolejny etap polegał na czterokrotnym płukaniu buforem i usunięciu niezwiązanych przeciwciał, a następnie na dodawaniu 200 μ l roztworu zawierającego substrat dla peroksydazy chrzanowej czyli tetrametylobenzydinę. Po upływie kolejnej półgodzinnej inkubacji, w czasie której zachodziła reakcja barwna dodawano 50 μ l 2N roztworu kwasu siarkowego wstrzymującego dalszy przebieg reakcji enzymatycznej.

Pomiaru absorbancji dokonano za pomocą czytnika Sunrise Tecan Basic przy długości fali $\lambda=450$ nm. Stężenie adiponektyny odczytano z krzywej wzorcowej uzyskanej na podstawie szeregu seryjnych rozcieńczeń z roztworu wyjściowego o stężeniu 250 ng/ml. Wartości stężeń roztworów wzorcowych wynosiły: 3,9 ng/ml; 7,8 ng/ml; 15,6 ng/ml; 31,2 ng/ml; 62,5 ng/ml; 125 ng/ml; 250 ng/ml.

Każde z oznaczeń wykonywano w 2 powtórzeniach.

Zakres referencyjny dla osób zdrowych mieści się w granicach: 5-30 μ g/ml.

Czułość metody wynosi 0,246 ng/ml.

Współczynniki powtarzalności międzyseryjnej (Intra-assay) i wewnątrzseryjnej (Inter-assay) dla tego testu wynoszą odpowiednio CV – 2,5% - 4,7% oraz CV-5,8%-6,9%.

Nie wykazano dla tej metody występowania reakcji krzyżowych.

III.1.2.4. Szczegółowa metodyka oznaczania stężenia rezystyny w surowicy.

Do oznaczenia stężenia rezystyny w surowicy wykorzystano testy Human Resistin Quantikine ELISA Kit firmy R&D Systems. Analizę wykonano na płytce mikrotitracyjnej opłaszczonej specyficznymi przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciw ludzkiej rezystynie. Na płytkę napipetowywano po 100 μ l roztworów wzorcowych oraz surowicy uprzednio rozcieńczonej w stosunku 1:4 po czym inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 godz. Etap ten miał na celu zwiążanie antygeny zawartego w surowicy jakim była rezystyna przez przeciwciała opłaszczające płytkę. Po czterokrotnym płukaniu buforem na płytkę nanoszono 200 μ l roztworu zawierającego przeciwciała przeciwko ludzkiej rezystynie sprzężone z HRP. Efekt końcowy tego etapu polegał na wytworzeniu kompleksu: przeciwciała opłaszczające płytkę-rezystyna-przeciwciała wyznakowane enzymem. Następnie wykonano czterokrotne płukanie buforem dla usunięcia niezwiążanych przeciwciał, po czym dodawano 200 μ l roztworu chromogenu dla HRP, czyli tetrametylobenzydyny. Kolejna półgodzinna inkubacja w temperaturze pokojowej zapewniła powstanie barwnego produktu. Reakcję barwną zatrzymano poprzez dodanie 50 μ l 2N roztworu kwasu siarkowego. Pomiaru absorbancji dokonano za pomocą czytnika Sunrise Tecan Basic wobec fali $\lambda=450$ nm. Krzywą wzorcową, na podstawie której dokonano analizy ilościowej stanowiły roztwory wzorcowe uzyskane metodą seryjnych rozcieńczeń z roztworu wyjściowego o stężeniu 100ng/ml. Wartości stężeń dla poszczególnych punktów krzywej wzorcowej wynosiły: 0,16ng/ml; 0,31ng/ml; 0,62ng/ml; 1,25ng/ml; 2,5ng/ml; 5ng/ml; 10ng/ml.

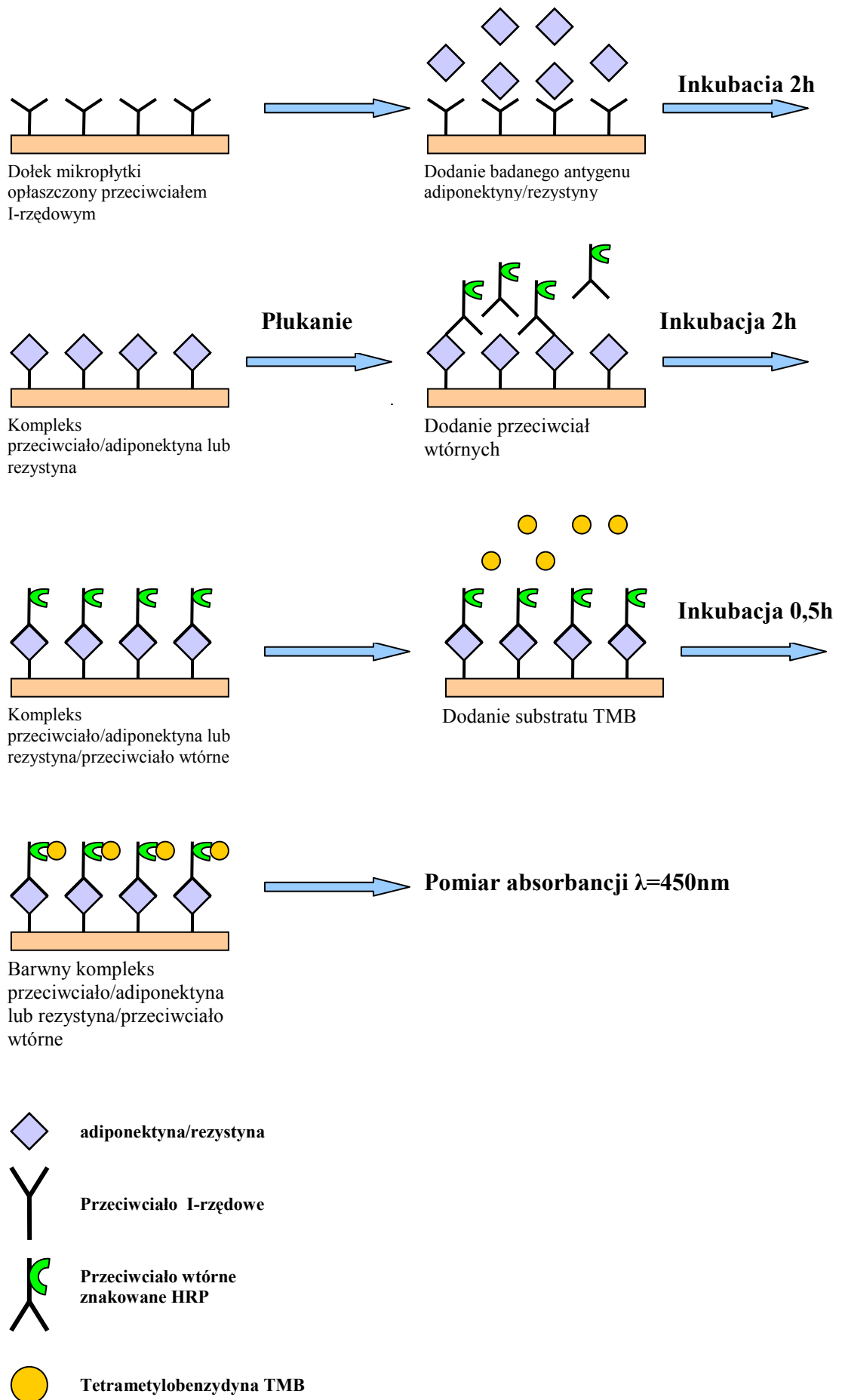
Każde z oznaczeń wykonywano w 2 powtórzeniach.

Zakres referencyjny dla osób zdrowych mieści się w granicach 5-20 ng/ml.

Czułość metody wynosi 0,026 ng/ml.

Współczynnik powtarzalności międzyseryjnej (intra-assay) i wewnątrzseryjnej (inter-assay) dla tego testu wynosił odpowiednio CV – od 3,8% do 5,3%; oraz CV- od 7,8 % do 9,2%.

Nie wykryto dla tej metody występowania reakcji krzyżowych.



Źyc. 5. Schemat oznaczania adiponektyny/rezystyny w surowicy metodą immunoenzymatyczną ELISA za pomocą testu Axis ELISA Kit.

III.1.2.5. Szczegółowa metodyka oznaczania stężenia peptydu C w surowicy.

W celu oznaczenia stężenia peptydu C w surowicy użyto komercyjnych testów immunoenzymatycznych C-pep-EASIA DIASource.

Oznaczenie wykonano na mikropłytkce opłaszczonej przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko badanym antygenom tj. ludzkiemu peptydowi C. Do każdego dołka nakładano 100 µl badanej surowicy lub roztworów wzorcowych oraz 50 µl roztworu przeciwciał znakowanych HRP, skierowanych przeciwko peptydowi C. Następnie płytkę poddano 2-godzinnej inkubacji w temp. pokojowej, w czasie której badane antygeny zawarte w surowicy łączyły się ze swoistymi przeciwciałami. Po trzykrotnym płukaniu buforem na płytkę nanoszono 100µl roztworu chromogenu dla HRP. W czasie kolejnej półgodzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej powstał barwny produkt reakcji. Reakcję barwną zatrzymano poprzez dodanie 100 µl 1N roztworu kwasu solnego. Pomiaru absorbancji dokonano za pomocą czytnika Sunrise Tecan Basic wobec fali $\lambda=450\text{nm}$. Krzywą wzorcową, na podstawie której dokonano analizy ilościowej stanowiły roztwory wzorcowe: 0,05 pmol/L, 0,13 pmol/L; 0,48 pmol/L; 1,6 pmol/L; 4,9 pmol/L.

Zakres referencyjny dla osób zdrowych mieści się w granicach 0,28-2,0 pmol/L.

Czułość metody wynosi 0,01 pmol/L.

Współczynnik powtarzalności międzyseryjnej (intra-assay) i wewnątrzseryjnej (inter-assay) dla tego testu wynosił odpowiednio CV – od 5,8% do 8,4%; oraz CV- od 7,2 % do 9,2%.

Nie wykryto dla tej metody występowania reakcji krzyżowych.

III.1.2.6. Szczegółowa metodyka oznaczania stężenia insuliny w surowicy.

Stężenie insuliny w surowicy oznaczono testem immunoenzymatycznym ELISA Kit firmy DAKO.

Oznaczenie przeprowadzano na płytkach mikrotitracyjnych opłaszczonych monoklonalnym przeciwciałem skierowanym przeciwko ludzkiej cząsteczce insuliny. Do każdego dołka nanoszono po 25 µl roztworów wzorcowych lub badanej surowicy oraz 100 µl koniugatu zawierającego monoklonalne przeciwciała sprzężone z peroksydazą chrzanową, skierowane przeciw insulinie. Następnie płytkę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym płukaniu buforem do każdego dołka dodawano po 100 µl roztworu zawierającego substrat dla peroksydazy chrzanowej. Po upływie kolejnej dziesięciominutowej

inkubacji, w czasie której powstał barwny produkt reakcji, dodawano 100 µl 0,46 mol/L roztworu kwasu siarkowego wstrzymującego dalszy przebieg reakcji enzymatycznej.

Pomiaru absorbancji dokonano za pomocą czytnika Sunrise Tecan Basic przy długości fali $\lambda=450$ nm. Stężenie insuliny odczytano z krzywej wzorcowej. Wartości stężeń roztworów wzorcowych wynosiły: 0 pmol/L, 30 pmol/L, 90 pmol/L, 450 pmol/L, 1080 pmol/L.

Każde z oznaczeń wykonywano w 2 powtórzeniach.

Zakres referencyjny dla osób zdrowych mieści się w granicach: 11-86 pmol/L

Czułość metody wynosi 3,0 pmol/L.

Współczynniki powtarzalności międzyseryjnej (Intra-assay) i wewnątrzseryjnej (Inter-assay) dla tego testu wynoszą odpowiednio CV – 5,1% - 7,5% oraz CV-4,2%-9,3%.

Wykazano dla tej metody występowanie reakcji krzyżowych z insuliną wołową oraz z insuliną świńską. Podczas interpretacji uzyskanych wyników uwzględniono możliwość wystąpienia wymienionych reakcji krzyżowych.

III.I.2.7. Ocena sekrecji cytokin przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej - badania *in vitro*.

III.I.2.7.1. Izolacja limfocytów i monocytów z krwi obwodowej.

Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMCs- *peripheral blood mononuclear cells*) pochodzące od poszczególnych badanych izolowano z krwi obwodowej pobranej do probówki zawierającej EDTA. Krew rozcieńczano zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej PBS w stosunku 1:1, nawarstwiano w probówce wirówkowej na odczynniku Ficoll-Paque i wirowano przez 20 min., 400xg w temperaturze pokojowej. Komórki płukano roztworem PBS i do dalszej analizy zawieszono w podłożu hodowlanym RPMI-1640. Stężenie końcowe zawiesiny komórek w podłożu wynosiło 2×10^6 /ml. Gęstość zawiesiny oceniono w komorze hematocytarnej Thoma. Żywotność komórek sprawdzono w teście z błękitem trypanu.

III.I.2.7.2. Hodowle komórkowe.

72-godzinne hodowle prowadzono na sterylnych 96-dołkowych płytkach hodowlanych w atmosferze 5% CO₂ w temperaturze 37°C. W studzienkach umieszczano po 200 µl zawiesiny komórek, dodawano czynnik mitogenny, który stanowiła fitohemaglutynina (PHA) o stężeniu końcowym 2,5 µg/ml oraz dodawano roztwory homocysteiny. Stosowano roztwór homocysteiny o stężeniu końcowym 185 µmol/L. Próby kontrolne stanowiły studzienki

zawierające wyłącznie podłoże hodowlane lub zawierające zawiesinę komórek bez żadnych dodatków a także dołki zawierające zawiesinę komórek z dodatkiem PHA bez homocysteiny, o równoważnej objętości.

Końcowy skład zawartości dołków przygotowywanych dla poszczególnych badanych przedstawiał się następująco:

- 200 µl zawiesiny komórek, 10 µl PHA, 40 µl roztworu homocysteiny 185 µmol/L
- 240 µl zawiesiny komórek, 10 µl PHA
- 240 µl zawiesiny komórek,
- 250 µl podłoża RPMI

Bezpośrednio po zakończeniu hodowli próbki odwirowywano, a nasącz przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych oznaczeń.

III.1.2.7.3. Metodyka oznaczania stężenia cytokin Il-1β, Il-6, Il-10, Il-12 oraz RANTES w surowicy.

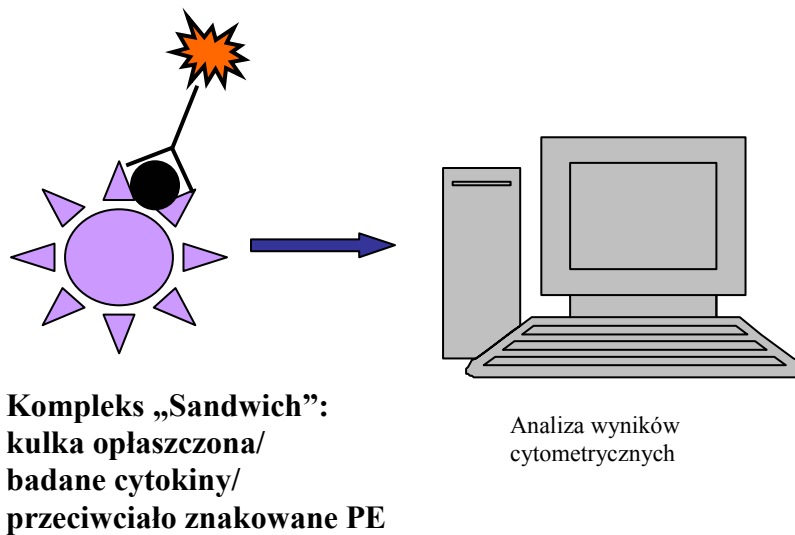
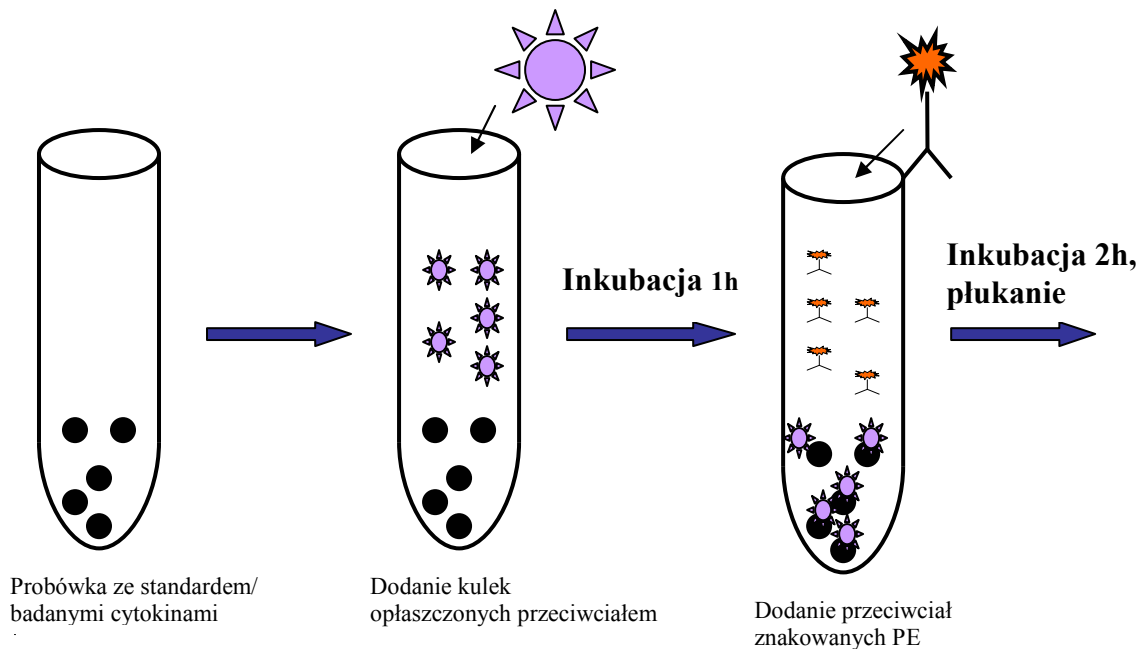
Podstawą analizy ilościowej Il-1β, Il-6, Il-10, Il-12 oraz RANTES była metoda cytofluorymetrii przepływowej z wykorzystaniem testów Human Il-1β, Il-6, Il-10, Il-12, RANTES Flex Set firmy Becton Dickinson Bioscience. Test ten umożliwia jednoczesną analizę stężenia kilku cytokin w jednej próbce.


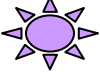

Oznaczenie przeprowadzono w próbkach, w których umieszczono 50 µl surowicy rozcieńczonej w stosunku 1: 0,25 oraz dodano 50 µl roztworu zawierającego kulki opłaszczone przeciwciałami (captures beads) skierowanymi przeciwko oznaczanym cytokinom. Każda populacja opłaszczonych kulek charakteryzowała się ściśle określoną pozycją, na wykresie macierzowym kanałów fluorescencji FL3 i FL4, co umożliwiło ich odróżnienie. Po godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej dodano 50 µl roztworu przeciwciał sprzężonych z barwnikiem fluoroscencyjnym PE tj. fikoerytryną. Kolejny etap oznaczenia polegał na dwugodzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła i utworzeniu złożonych kompleksów kulek, badanych cytokin i przeciwciał znakowanych PE. Oba typy przeciwciał były specyficzne dla innych miejsc wiązania badanych molekuł, a fluorescencja przeciwciał wyznakowanych fikoerytryną była wprost proporcjonalna do stężenia badanych cytokin. Po wypłukaniu buforem niezwiązanych przeciwciał wykonano pomiar fluorescencji barwnika sprzężonego z przeciwciałem. Jednocześnie wykonano szereg seryjnych rozcieńczeń roztworów wzorcowych i poddano je takiej samej procedurze jak analizowane próby. Analiza seryjnych rozcieńczeń roztworów

wzorcowych pozwoliła uzyskać krzywą standardową, na podstawie której obliczono stężenia badanych molekuł w próbie. Wartości stężeń poszczególnych punktów krzywej wzorcowej wynosiły: 10 pg/ml; 20 pg/ml; 40 pg/ml; 80 pg/ml; 156 pg/ml; 312,5 pg/ml; 625 pg/ml; 1250 pg/ml; 2500 pg/ml. Po wykonaniu pomiaru w cytoflorymetrze przepływowym uzyskano wykresy przedstawiające ilość badanych cytokin, następnie dane te analizowano za pomocą programu FCAP Array™ Software (Becton Dickinson) w celu uzyskania wartości stężeń badanych cytokin.

Współczynnik powtarzalności wewnątrz- i zewnątrzseryjnej dla użytego testu wynosił odpowiednio dla:

- Il-1 β CV – 10%, 8%, 7% oraz CV- 3%, 2%, 4%,
- Il-6 CV- 6%, 6%, 8% oraz CV- 3%, 3%, 2%,
- Il-10 CV- 6%, 10%, 11% oraz CV- 6%, 2%, 3%,
- Il-12 CV- 4%, 2%, 3% oraz CV - 2%, 5%, 3%,
- RANTES CV- 10%, 7%, 3% oraz CV- 4%, 5%, 3%.



-  **Badana cytokina**
-  **Kulka opłaszczona przeciwciałami**
-  **Przeciwciało znakowane fikoerytryną**

Rys. 6. Schemat oznaczania stężenia **cytokin II-1 β , II-6, II-12, II-10, Rantes** we krwi metodą cytofluometry przepływową za pomocą testu Flex Set Becton Dickinson Bioscience.

III.1.2.7.4. Metody statystycznego opracowania wyników.

Obliczeń statystycznych dokonano z zastosowaniem programu komputerowego firmy StatSoft, Inc. STATISTICA, version 8 (nr licencji AXAP812E209518FA-6).

Normalność rozkładu danych badano testem Kołmogorowa-Smirnowa z poprawką Lilleforce'a oraz testem Shapiro-Wilka.

Na podstawie zebranych danych i wyników przeprowadzonych oznaczeń wykonano charakterystyki metaboliczno-epidemiologiczne badanych grup, przedstawiając rezultaty w postaci średniej arytmetycznej z podaniem odchylenia standardowego i wartości mediany.

Hipotezy statystyczne sprawdzono w zależności od rozkładu danych testem (Kruskal-Wallis , ANCOVA).

Zależności pomiędzy zmiennymi analizowano obliczając współczynniki korelacji rang Spearmana.

Dla oceny, który z czynników determinował w sposób niezależny od pozostałych wartość stężenia zmiennej zależnej, zastosowano analizę wielokrotnej regresji.

Dla oceny, który z czynników determinował różnice pomiędzy badanymi grupami, zastosowano analizę kowariancji.

Za znamienne statystycznie przyjęto wartości uzyskane dla założonego poziomu istotności $p \leq 0,05$.

IV. WYNIKI

IV.1 Charakterystyka badanych grup

Przebadano 182 osoby chore na cukrzycę typu 2 i 37 osób zdrowych. Szczegółową charakterystykę grup przedstawiono w tabelach 1-4.

Chorzy na cukrzycę ze wszystkich grup terapeutycznych byli starsi i wykazywali się większym obwodem talii w porównaniu do osób zdrowych, a pacjenci leczeni insuliną w skojarzeniu z metforminą oraz chorzy leczeni insuliną w monoterapii charakteryzowali się większą masą ciała w porównaniu do osób zdrowych. Nie stwierdzono natomiast różnic pomiędzy wszystkimi analizowanymi grupami w odniesieniu do wskaźnika WHR (Tab.1).

Stężenie HbA_{1c}, glikemia na czczo były wyższe, a stężenie 1,5-AG było niższe u wszystkich chorych na cukrzycę w odniesieniu do osób zdrowych. Nie stwierdzono tak wyraźnych różnic w zakresie parametrów gospodarki lipidowej. Podczas gdy stężenie cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL było podobne u wszystkich badanych, stężenie cholesterolu HDL było niższe wśród leczonych metforminą, leczonych insuliną w skojarzeniu z metforminą oraz leczonych wyłącznie insuliną w porównaniu do grupy zdrowych osób. Stężenie triacylogliceroli w surowicy było natomiast wyższe w każdej z grup terapeutycznych chorych na cukrzycę typu 2 niż obserwowane w grupie kontrolnej (Tab.2).

Dla oceny insulinooporności obwodowej zastosowano wskaźnik HOMA_{IR} i oznaczono stężenie insuliny w surowicy na czczo. Z uwagi na charakter tych wskaźników ich pomiar przeprowadzono wyłącznie w grupach chorych na cukrzycę typu 2 leczonych metforminą, u chorych leczonych pochodną sulfonylomocznika i u osób zdrowych. Zaobserwowano, że oba wskaźniki insulinooporności przyjmują znamienne wyższe wartości u chorych na cukrzycę, niezależnie od sposobu farmakoterapii, niż u osób zdrowych (Tab.2).

Czynność komórek beta wysp trzustki oceniana była na podstawie stężenia peptydu C w surowicy na czczo. Stężenie peptydu C było zbliżone w grupach chorych na cukrzycę leczonych insuliną w skojarzeniu z metforminą, leczonych insuliną w monoterapii, leczonych pochodną sulfonylomocznika oraz w grupie osób zdrowych. Wśród chorych leczonych metforminą stężenie peptydu C było znamienne wyższe niż we wszystkich pozostałych grupach (Tab.2).

Biorąc pod uwagę **wyłącznie chorych na cukrzycę typu 2** różniących się sposobem farmakoterapii wykazano, że leczeni metforminą w monoterapii chorowali krócej niż pacjenci z pozostałych grup i charakteryzowali się mniejszym obwodem talii w porównaniu do leczonych pochodną sulfonylomocznika oraz w porównaniu do leczonych insuliną. Wszyscy

chorzy na cukrzycę typu 2 byli natomiast w podobnym wieku, ich masa ciała i typ otyłości wyrażony za pomocą wskaźnika WHR były zbliżone we wszystkich grupach terapeutycznych (Tab.3).

Glikemia na czczo była istotnie niższa u chorych leczonych metforminą w porównaniu do leczonych pochodną sulfonilomocznika oraz w porównaniu do leczonych insuliną, podczas gdy stężenie HbA_{1c} było znacząco niższe wśród leczonych metforminą aniżeli we wszystkich innych grupach chorych na cukrzycę typu 2. Stężenia 1,5-AG w osoczu przyjmowały wartości wyższe w grupie chorych leczonych metforminą oraz w grupie chorych leczonych pochodną sulfonilomocznika w porównaniu do wartości obserwowanych u chorych leczonych insuliną (Tab.4).

Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami terapeutycznymi chorych na cukrzycę typu 2 w zakresie parametrów gospodarki lipidowej, to jest stężenia cholesterolu całkowitego, LDL, HDL oraz stężenia triacylogliceroli w surowicy (Tab.4).

Jak wspomniano, ze względów technicznych, wskaźniki insulinooporności oceniono tylko w grupach nie otrzymujących egzogennej insuliny i zaobserwowano podobne nasilenie insulinooporności obwodowej wśród chorych leczonych metforminą i w grupie leczonych pochodną sulfonilomocznika, niezależnie od tego, czy wyrażone było ono stężeniem insuliny w surowicy na czczo, czy też wskaźnikiem HOMA_{IR} (Tab.4).

Stężenie peptydu C w surowicy na czczo było wyższe w grupie leczonych metforminą w porównaniu do grupy chorych leczonych wyłącznie insuliną (Tab.4).

Tab.1. Charakterystyka wszystkich badanych grup – część I.

	Metformina mediana x±SD	Insulina + metformina mediana x±SD	Pochodna sulfonilomocznika mediana x±SD	Insulina mediana x±SD	Zdrowi mediana x±SD
	n=89	n=31	n=31	n=31	n=37
K/M	47/42	13/18	14/17	15/16	12/19
WIEK [lata]	62,0* 61,2±8,9	60,0* 61,4±8,8	68,0* 67,1±12,1	63,0* 65,0±10,0	47,0 48,2±7,7
Czas trwania cukrzycy [lata]	4,0 5,1±5,0	9,0 10,8±8,7	7,0 9,7±7,5	9,0 11,2±7,9	-
BMI [kg/m ²]	30,7* 31,3±5,3	32,8* 34,9±6,9	30,5 31,8±7,6	32,0* 35,4±11,1	25,8 25,8±4,6
Obwód talii [cm]	103,0* 103,8±10,9	109,0* 110,2±12,4	118,0* 116,2±10,8	117,0* 115,1±13,9	94,0 92,5±16,2
WHR	1,0 1,0±0,1	1,0 1,0±0,1	1,0 1,0±0,1	1,0 1,0±0,1	0,9 0,9±0,1

* różnica znamienna statystycznie wobec osób zdrowych dla $p \leq 0,05$
(Test Kruskal-Wallis)

Tab.2. Charakterystyka wszystkich badanych grup – część II.

	Metformina mediana x±SD	Insulina + metformina mediana x±SD	Pochodna sulfonylomocznika mediana x±SD	Insulina mediana x±SD	Zdrowi mediana x±SD
	n=89	n=31	n=31	n=31	n=37
K/M	47/42	13/18	14/17	15/16	12/19
Cholesterol całkowity [mg/dl]	201,0 201,7±46,3	188,0 190,0±47,6	226,0 217,8±53,3	196,8 200,5±53,0	217,0 205,1±38,3
Cholesterol LDL [mg/dl]	119,0 118,8±37,3	110,0 110,6±39,6	120,0 119,6±39,6	104,3 105,6±42,4	130,0 123,0±33,5
Cholesterol HDL [mg/dl]	47,0* 50,2±14,4	44,0* 44,3±9,6	54,0 53,4±13,5	42,0* 47,5±14,7	60,0 63,0±12,1
Triacyloglicerole [mg/dl]	150,0* 173,9±94,5	164,7* 190,2±90,1	147,0* 206,3±154,8	162,0* 188,5±113,7	66,0 74,7±37,2
Glikemia na czczo [mg/dl]	126,0* 129,7±28,3	137,0* 148,4±45,5	148,0* 160,1±48,5	157,5* 176,3±60,4	87,7 86,6±9,7
HbA_{1c} [%]	6,6* 6,7±1,1	7,5* 7,7±1,4	7,3* 7,6±1,8	8,0* 8,3±1,2	5,7 5,7±0,6
1,5-AG [mg/L]	16,4* 15,6±5,9	12,4* 12,5±6,1	13,5* 14,3±6,7	8,5* 9,4±4,2	19,4 20,2±5,6
HOMA_{IR}	2,1* 2,9±2,4	-	2,7* 3,1±2,2	-	0,9 0,9±0,5
Insulina [pmol/L]	39,5* 53,0±38,2	-	42,5* 47,7±33,5	-	24,1 24,0±12,0
Peptyd C [ng/ml]	2,7* 2,8±1,3	2,0 2,2±1,6	1,9 2,2±1,8	1,2 1,4±0,9	1,2 1,2±0,3

* różnica znamienista statystycznie wobec osób zdrowych dla $p \leq 0,05$
(Test Kruskal-Wallis)

Tab.3. Charakterystyka chorych na cukrzycę typu 2 - część I.

	Metformina mediana x±SD	Insulina + metformina mediana x±SD	Pochodna sulfonylomocznika mediana x±SD	Insulina mediana x±SD
	n=89	n=31	n=31	n=31
K/M	47/42	13/18	14/17	15/16
WIEK [lata]	62 61,195±8,9	60 61,387±8,8	68 67,06±12,1	63 65,03±10,0
Czas trwania cukrzycy [lata]	4,0* 5,05±5,0	9,0 10,76±8,7	7,0 9,68±7,5	9,0 11,2±7,9
BMI [kg/m ²]	30,65 31,279±5,3	32,81 34,866±6,9	30,47 31,765±7,6	32 35,436±11,1
Obwód talii [cm]	103 [#] 103,79±10,8	109 110,19±12,4	118 116,19±10,8	117 115,06±13,9
WHR	0,95 0,95±0,1	0,97 0,97±0,1	0,98 0,95±0,1	0,98 0,95±0,1

różnica znamionna statystycznie wobec grupy leczonej pochodną sulfonylomocznika oraz wobec grupy leczonej insuliną dla $p \leq 0,05$

* różnica znamionna statystycznie wobec pozostałych grup dla $p \leq 0,05$
(Test Kruskal-Wallis)

Tab.4. Charakterystyka chorych na cukrzycę typu 2 - część II

	Metformina mediana x±SD	Insulina + metformina mediana x±SD	Pochodna sulfonilomocznika mediana x±SD	Insulina mediana x±SD
	n=89	n=31	n=31	n=31
K/M	47/42	13/18	14/17	15/16
Cholesterol całkowity [mg/dl]	201,0 201,7±46,3	188,0 190,0±47,6	226,0 217,8±53,2	196,8 200,4±53,0
Cholesterol LDL [mg/dl]	119,0 118,8±37,3	110,0 110,6±39,6	120,0 119,6±39,6	104,3 105,6±42,3
Cholesterol HDL [mg/dl]	47,0 50,2±14,4	44,0 44,3±9,6	54,0 53,4±13,5	42,0 47,4±14,7
Triacyloglicerole [mg/dl]	150,0 173,9±94,5	164,7 190,2±90,1	147,0 206,3±154,7	162,0 188,5±113,7
Glikemia na czczo [mg/dl]	126 ^{#‡} 129,6±28,3	137,0 148,4±45,5	148,0 160,1±48,5	157,5 176,3±60,3
HbA_{1c} [%]	6,6 * 6,7±1,1	7,5 7,7±1,4	7,3 7,6±1,8	8,0 8,3±1,2
1,5-AG [mg/L]	16,4 [‡] 15,6±5,9	12,4 12,5±6,1	13,5 [‡] 14,3±6,7	8,5 9,4±4,2
HOMA_{IR}	2,1 2,9±2,4	-	2,7 3,1±2,2	-
Insulina [pmol/L]	39,5 53,0±38,2	-	42,5 47,6±33,5	-
Peptyd C [ng/ml]	2,6 [‡] 2,8±1,3	2,0 2,2±1,5	1,87 2,2±1,8	1,2 1,4±0,9

różnica znamienista statystycznie wobec grupy leczonej pochodną sulfonilomocznika dla $p \leq 0,05$

[‡] różnica znamienista statystycznie wobec grupy leczonej insuliną dla $p \leq 0,05$

* różnica znamienista statystycznie wobec pozostałych grup dla $p \leq 0,05$
(Test Kruskal-Wallis)

IV.2 Porównanie wybranych czynników związanych z rozwojem miażdżycy pomiędzy chorymi na cukrzycę typu 2 a grupą osób zdrowych

We wszystkich badanych grupach oceniono potencjalnie proaterogenne czynniki, takie jak stężenie homocysteiny, adiponektyny, rezystyny, stężenie cytokin IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-10 i RANTES w surowicy krwi oraz stężenie 1,5-AG w osoczu krwi obwodowej, a rezultaty porównano stosując test Kruskal-Wallis.

Stężenie homocysteiny w surowicy u chorych leczonych pochodną sulfonilomocznika i u chorych leczonych insuliną było wyższe niż u osób zdrowych, natomiast u chorych leczonych metforminą i leczonych insuliną w skojarzeniu z metforminą było zbliżone do stężenia homocysteiny w surowicy obserwowanego w grupie kontrolnej (Tab.5., Ryc.7).

Stężenie adiponektyny u wszystkich chorych na cukrzycę, niezależnie od sposobu farmakoterapii, było niższe niż u osób zdrowych (Tab.5., Ryc.8).

Stężenie rezystyny u chorych na cukrzycę było znamienne wyższe niż zaobserwowane w grupie kontrolnej wyłącznie u leczonych insuliną w monoterapii (Tab.5., Ryc.9).

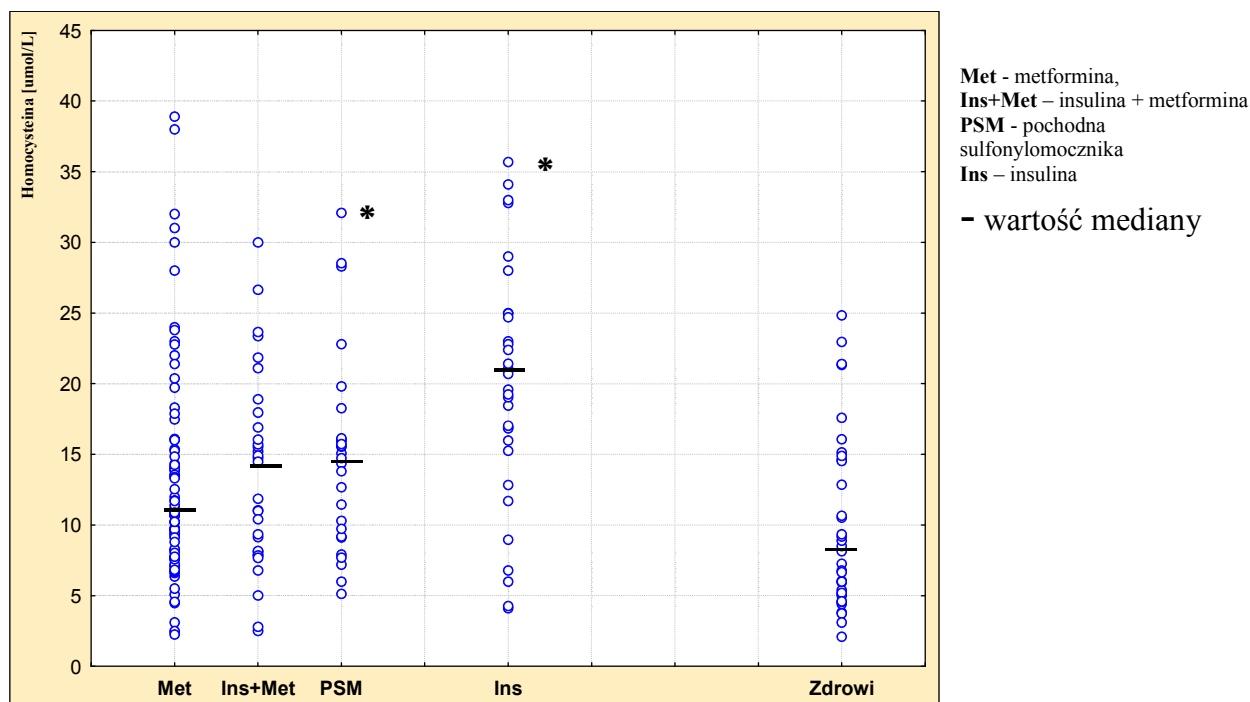
Stężenia cytokin IL-1 β , IL-6, IL-12 i RANTES w surowicy chorych na cukrzycę typu 2 było wyższe niż wśród osób zdrowych, niezależnie od rodzaju farmakoterapii cukrzycy (Tab.5., Ryc. 10-13). Natomiast stężenie IL-10 w surowicy i 1,5-AG w osoczu chorych na cukrzycę było niższe dla każdego rodzaju farmakoterapii w porównaniu z grupą kontrolną (Tab.5., Ryc.14-15).

Tab.5. Zestawienie badanych czynników pro- i antyaterogennych we wszystkich badanych grupach.

	Metformina mediana x±SD	Insulina + metformina mediana x±SD	Pochodna sulfonylomocznika mediana x±SD	Insulina mediana x±SD	Zdrowi mediana x±SD
	n=89	n=31	n=31	n=31	n=37
K/M	47/42	13/18	14/17	15/16	12/19
Homocysteina [μmol/l]	10,9 12,8±7,4	14,5 13,8±6,9	14,7* 14,8±6,9	21,4* 21,1±9,4	8,2 9,9±6,2
Adiponektyna [μg/ml]	6,1* 7,4±5,5	5,3* 6,7±4,1	6,9* 9,0±5,0	4,6* 5,7±3,5	13,5 14,5±5,2
Rezystyna [ng/ml]	8,5 9,7±5,3	9,6 10,7±4,4	9,2 9,4±3,6	16,8* 18,7±10,1	7,4 7,8±3,3
1,5-anhydro- D-glucitol [mg/L]	16,4* 15,6±5,9	12,4* 12,5±6,1	13,5* 14,3±6,7	8,5* 9,4±4,2	19,4 20,2±5,6
IL-1β [pg/ml]	3,3* 3,5±0,9	3,1* 3,3±0,8	3,3* 3,3±0,6	5,8* 5,0±1,7	0,6 0,5±0,3
IL-6 [pg/ml]	3,4* 3,4±1,8	4,2* 4,4±2,0	3,9* 4,2±1,3	7,6* 7,0±2,2	0,5 0,5±0,2
IL-12 [pg/ml]	6,8* 8,0±3,7	7,2* 8,3±2,4	6,3* 6,7±1,5	6,7* 6,7±0,7	1,8 1,9±1,1
IL-10 [pg/ml]	1,9* 2,9±2,4	1,6* 1,9±0,9	1,3* 1,6±0,7	1,1* 1,2±0,3	8,2 8,3±1,6
Rantes [pg/ml]	2492,4* 2251,6±448,8	2528,4* 2537,2±133,9	2567,0* 2580,8±164,3	2851,1* 2910,6±162,6	591,6 540,6±111,9

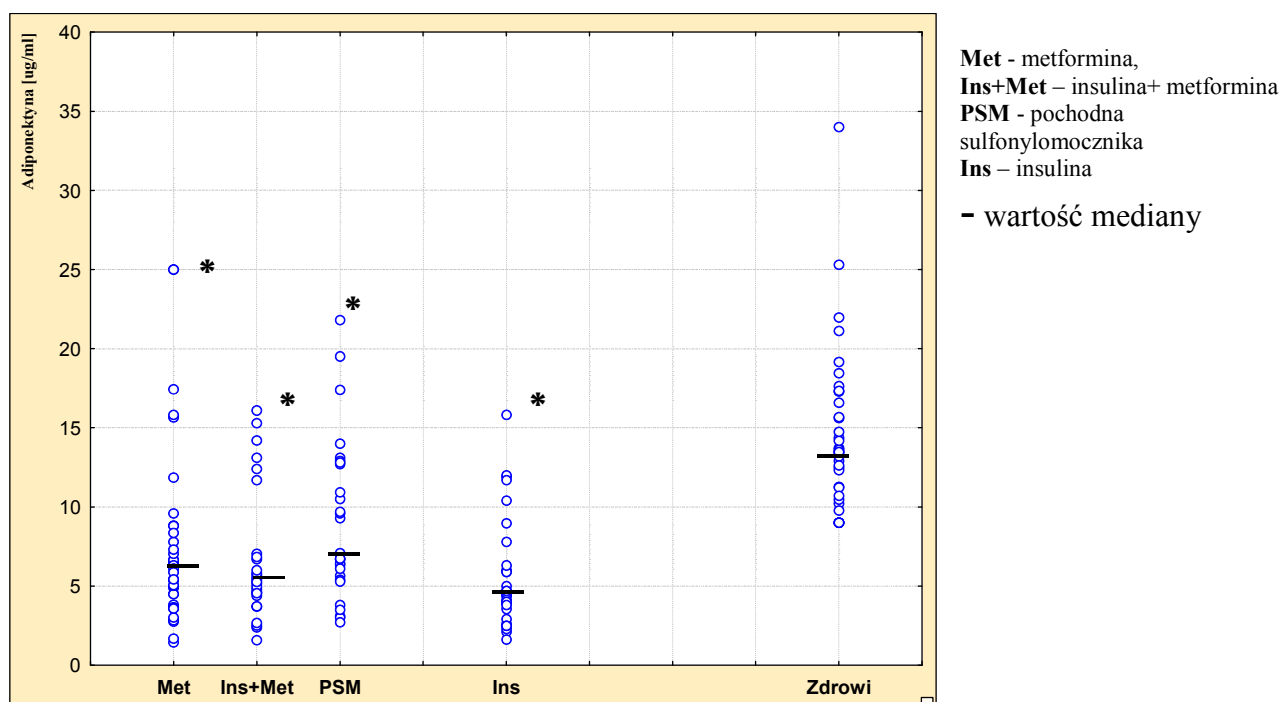
* różnica znamienista statystycznie wobec osób zdrowych dla $p \leq 0,05$
(Test Kruskal-Wallis)

Ryc. 7. Porównanie stężeń **homocysteiny** pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Kruskal-Wallis)



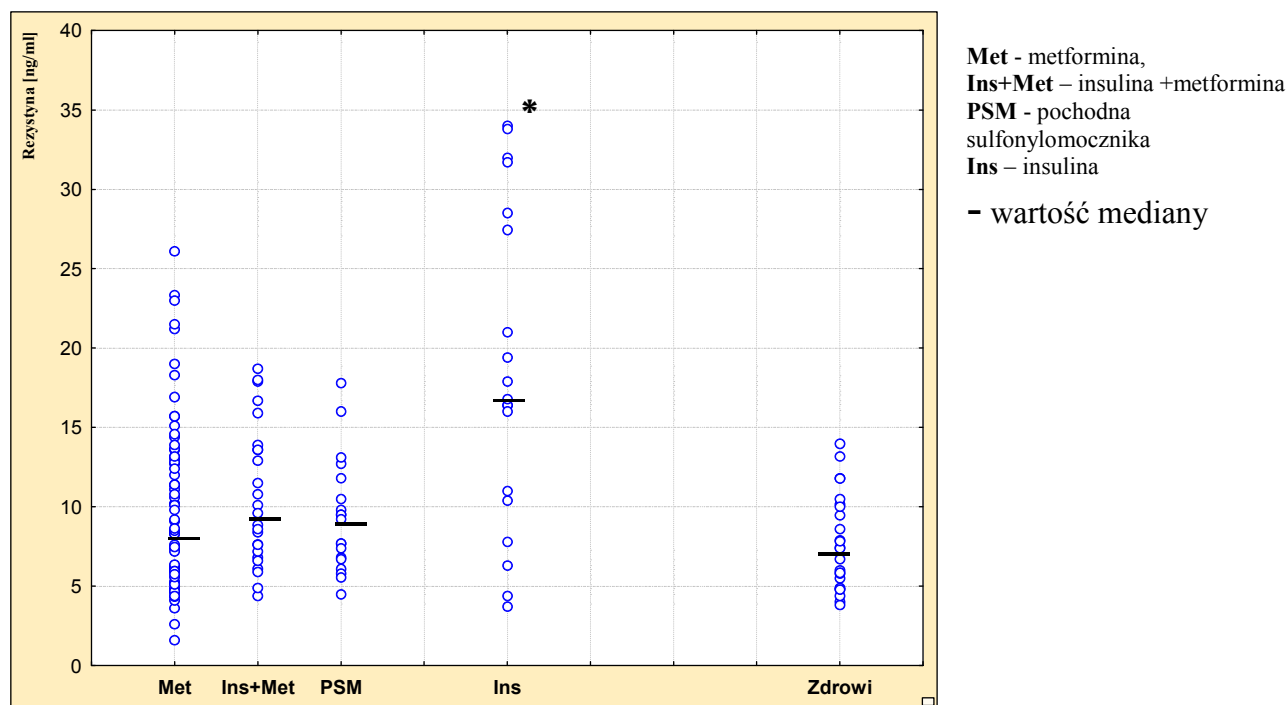
* różnica znamionna statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec osób zdrowych

Ryc. 8. Porównanie stężeń **adiponektyny** pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Kruskal-Wallis)



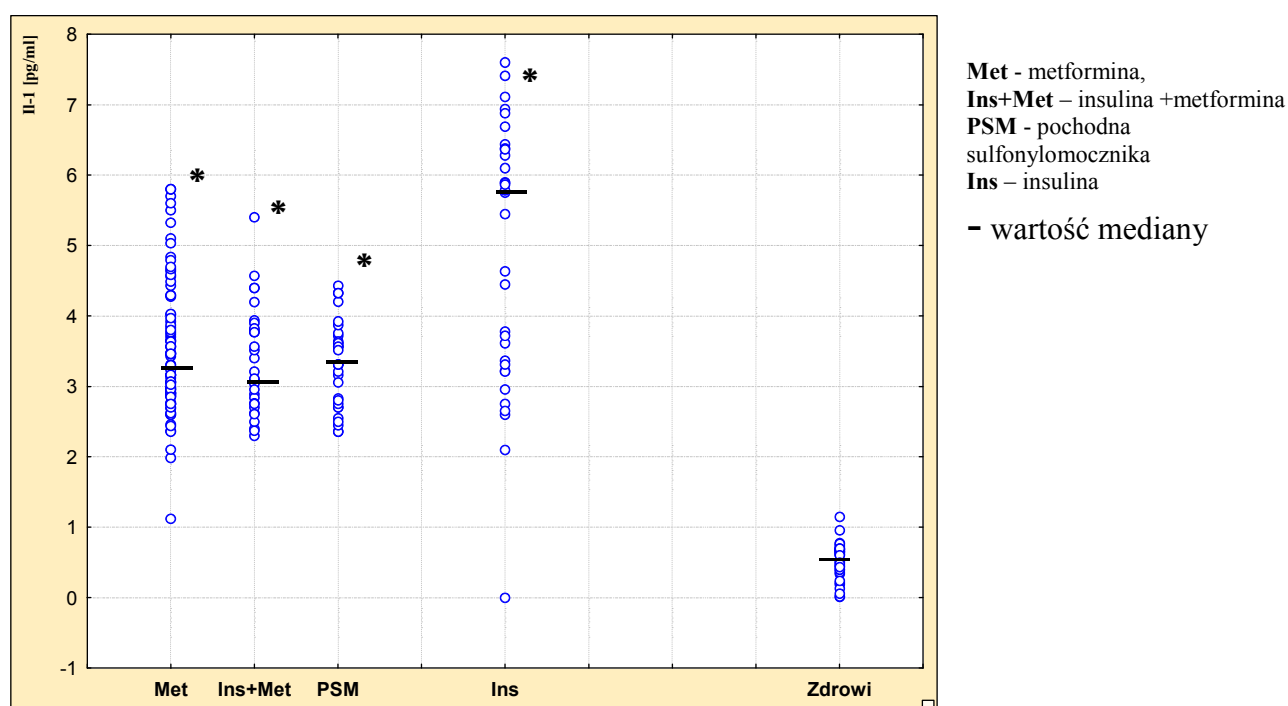
* różnica znamionna statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec osób zdrowych

Ryc. 9. Porównanie stężeń **rezystyny** pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Kruskal-Wallis)



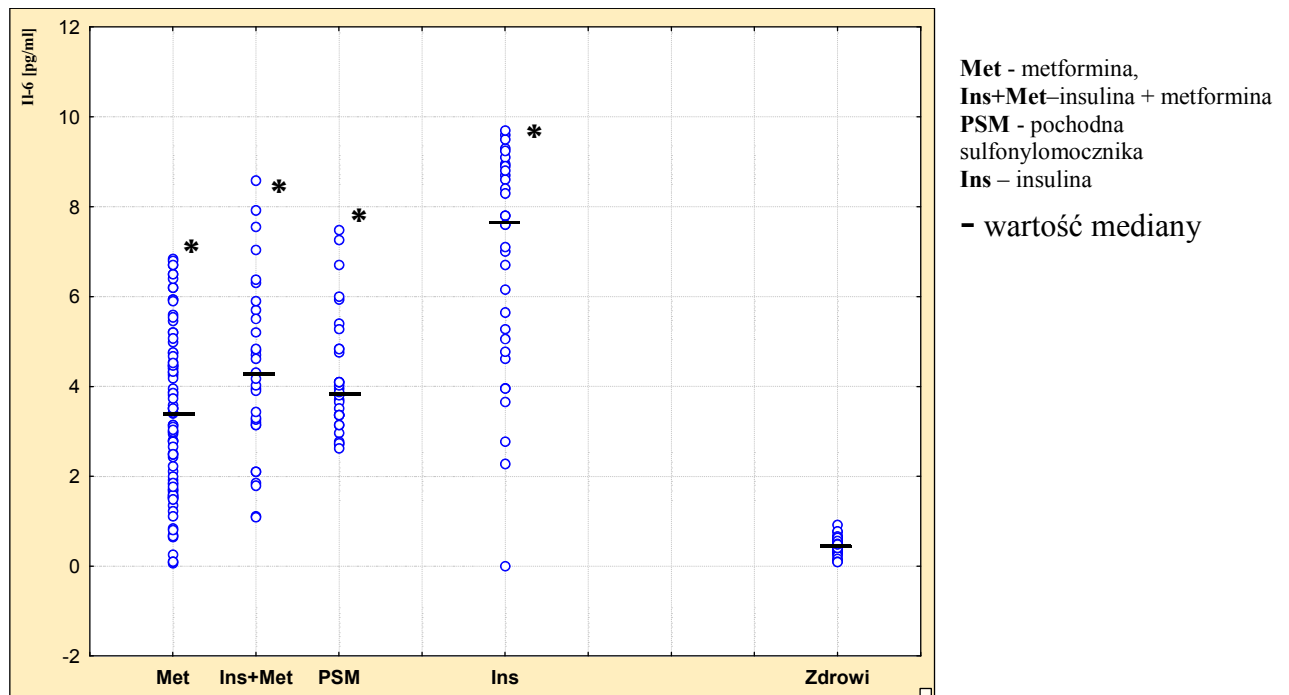
* różnica znamienna statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec osób zdrowych

Ryc. 10. Porównanie stężeń **interleukiny 1 β** pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Kruskal-Wallis)



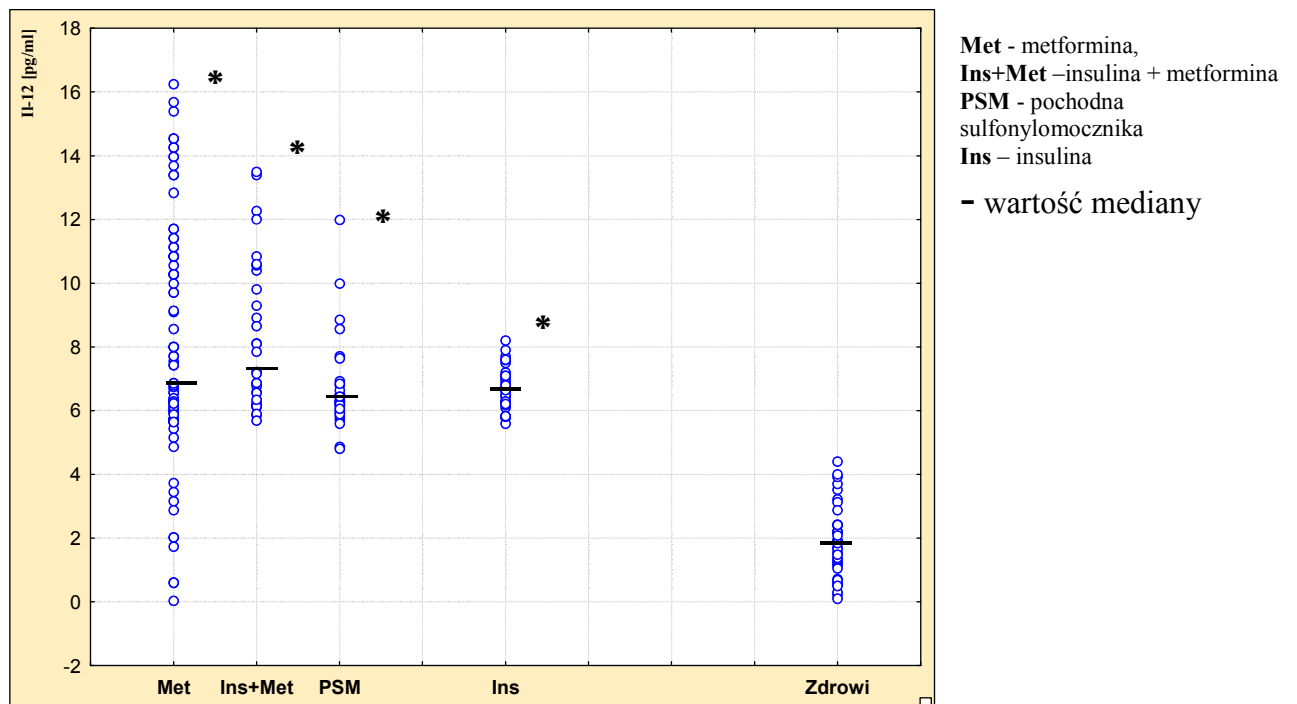
* różnica znamienna statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec osób zdrowych

Ryc. 11. Porównanie stężeń **interleukiny 6** pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Kruskal-Wallis)



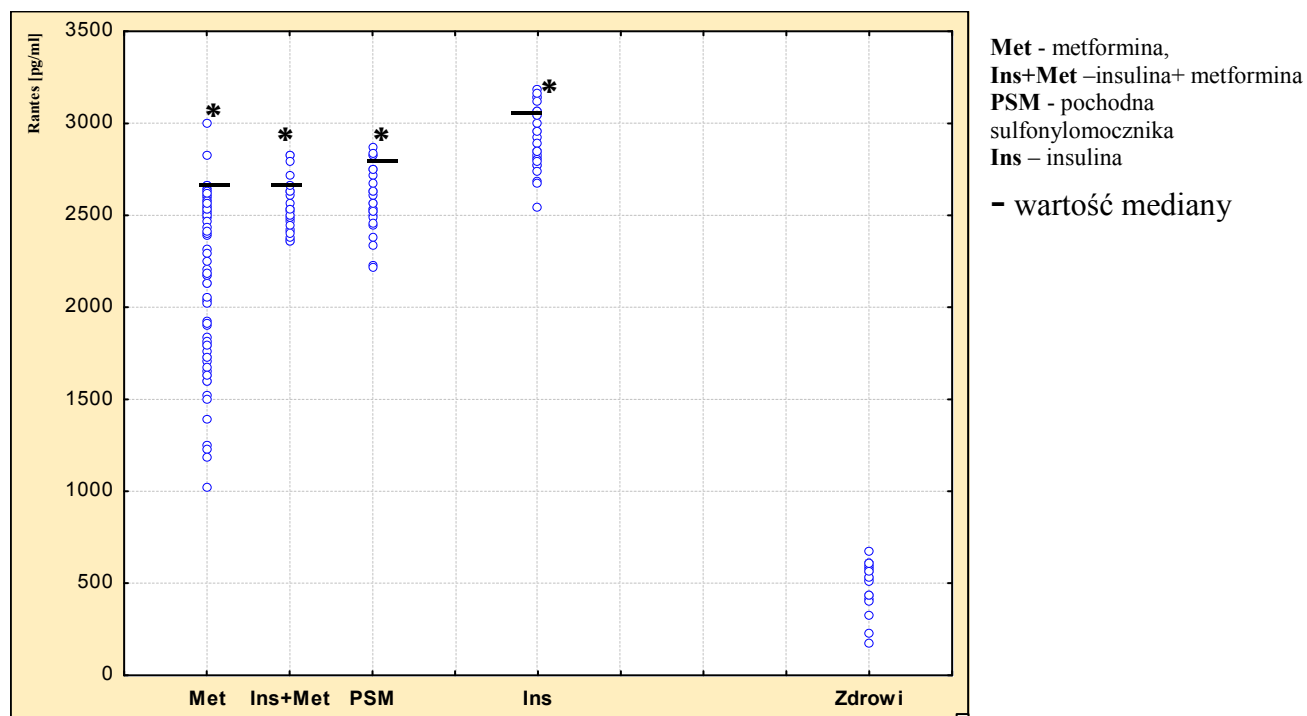
* różnica znamienna statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec osób zdrowych

Ryc. 12. Porównanie stężeń **interleukiny 12** pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Kruskal-Wallis)



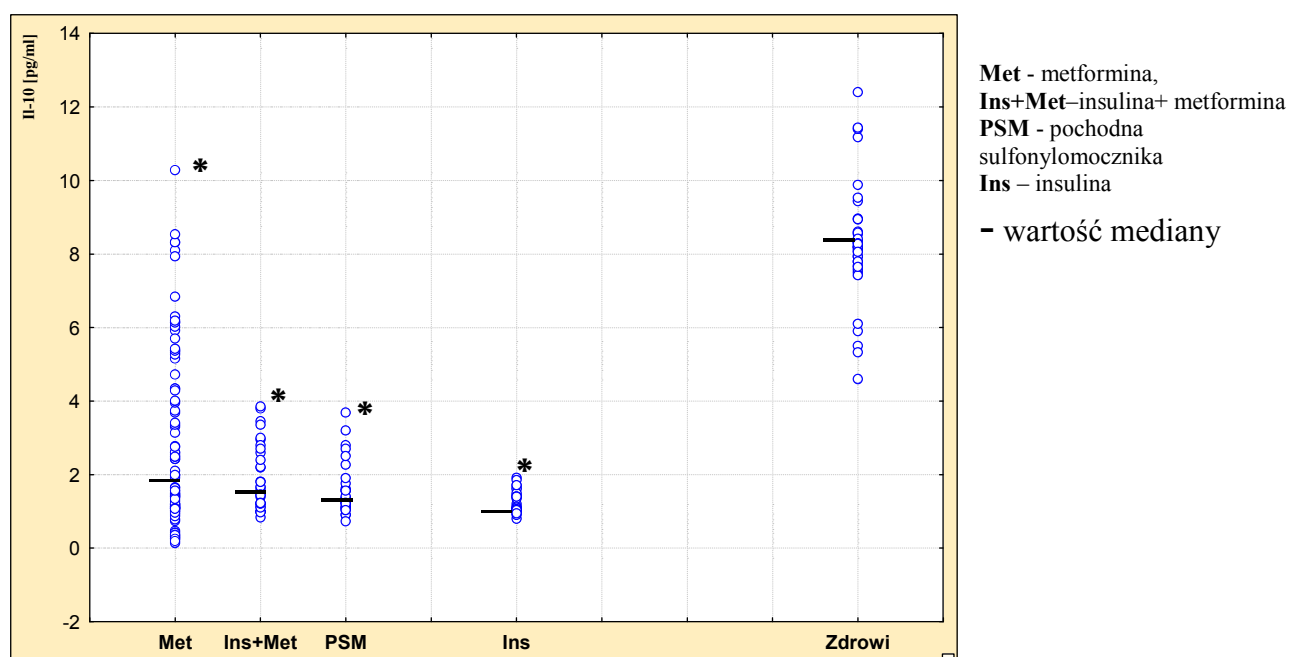
* różnica znamienna statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec osób zdrowych

Ryc. 13. Porównanie stężeń **RANTES** pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Kruskal-Wallis)



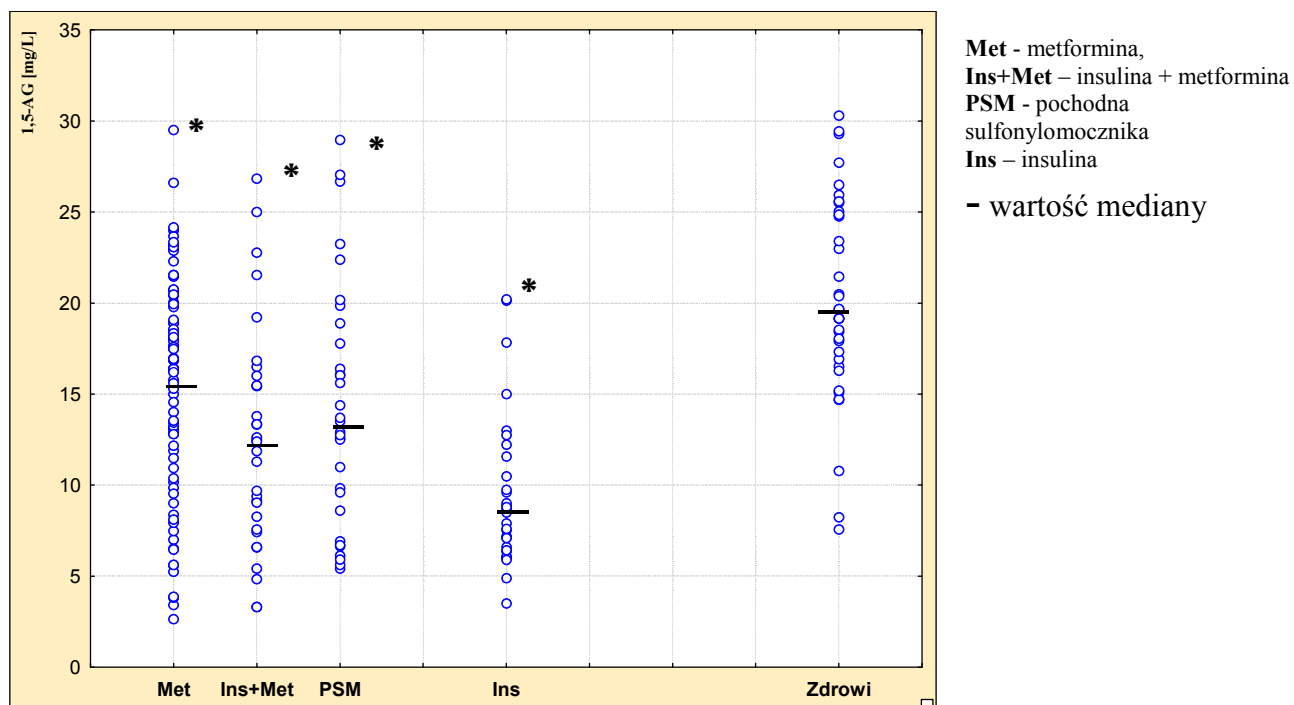
*różnica znamienna statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec osób zdrowych

Ryc. 14. Porównanie stężeń **interleukiny 10** pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Kruskal-Wallis)



* różnica znamienna statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec osób zdrowych

Ryc. 15. Porównanie stężeń **1,5-anhydro-D-glucitolu** pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Kruskal-Wallis)



* różnica znamionna statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec osób zdrowych

IV.3 Porównanie wybranych czynników związanych z rozwojem miażdżycy pomiędzy chorymi na cukrzycę typu 2 różniącymi się sposobem farmakoterapii.

Stężenia homocysteiny, adiponektyny rezystyny, IL-1 β , Il-6, Il-12, Il-10 i RANTES w surowicy krwi oraz stężenie 1,5-AG w osoczu krwi obwodowej zostały zbadane w każdej z grup chorych na cukrzycę typu 2 różniących się sposobem leczenia farmakologicznego (Tab.6, Ryc.16-21).

Porównań między tymi grupami dokonano testem Kruskall-Wallis, a w następnym etapie zastosowano analizę kowariancji eliminującą wpływ innych czynników (tzw. zmiennych towarzyszących) mogących wpływać na nasilenie aterosyzy i przyjmujących jednocześnie różne wartości w badanych grupach. Dlatego też zastosowano model, w którym zmienną zależną stanowił badany czynnik proaterogeny, a zmiennymi towarzyszącymi były: czas trwania cukrzycy, obwód talii, stężenie HbA_{1c}, stężenie 1,5-AG, glikemia na czczo i stężenie peptydu C.

Stężenie homocysteiny w surowicy było niższe u chorych leczonych metforminą i u chorych leczonych insuliną w skojarzeniu z metforminą niż w grupie chorych leczonych insuliną (test Kruskall-Wallis) (Tab.6). Analiza kowariancji potwierdziła istnienie różnic w odniesieniu do stężenia homocysteiny pomiędzy badanymi grupami terapeutycznymi wskazując na to, że różnice między tymi grupami uwarunkowane są jednocześnie obwodem talii chorych oraz stężeniem peptydu C (Tab.7). Wykazano, że stężenie homocysteiny w surowicy chorych leczonych insuliną w monoterapii jest znamienne wyższe niż we wszystkich pozostałych grupach terapeutycznych, które jednocześnie nie różniły się pomiędzy sobą w odniesieniu do badanego czynnika (ANCOVA, test Schaeffe) (Ryc.16).

Stosując test Kruskall-Wallis stwierdzono, że **stężenie adiponektyny** w surowicy chorych na cukrzycę typu 2 leczonych pochodną sulfonilomocznika było znamienne wyższe niż w grupie leczonej insuliną (Tab.6). Natomiast ANCOVA nie potwierdziła takich różnic pomiędzy badanymi grupami (Tab.8).

Stężenie rezystyny oceniane w grupach chorych na cukrzycę testem Kruskall-Wallis było niższe u chorych leczonych metforminą oraz u chorych leczonych pochodną sulfonilomocznika w porównaniu do grupy leczonej insuliną (Tab.6). Zróznicowanie stężenia rezystyny pomiędzy grupami potwierdziła analiza kowariancji, która wykazała, że stężenie rezystyny w grupie leczonej insuliną jest wyższe niż w pozostałych grupach nie różniących się pod względem stężenia tej adipocytkiny (Tab.9, Ryc.17)

Badane grupy terapeutyczne różniły się także pod względem **stężenia IL-1 β** w surowicy (test Kruskall-Wallis i ANCOVA). Analiza kowariancji ujawniła ponadto, że

zróznicowanie pomiędzy grupami jest uwarunkowane stężeniem IL-1 β w surowicy, ale także stężeniem peptydu C i wartościami glikemii na czczo. Oba testy wykazały, że stężenie tej cytokiny u chorych leczonych insuliną jest wyższe niż we wszystkich pozostałych grupach terapeutycznych, które nie wykazują różnic pomiędzy sobą pod względem wartości stężeń IL-1 β (Tab.6,10, Ryc.18).

Podobne rezultaty uzyskano w odniesieniu do **stężenia IL-6** w surowicy. W tym przypadku także oba testy wykazały najwyższe stężenie tej cytokiny u chorych leczonych insuliną i brak różnic pomiędzy pozostałymi grupami, przy czym analiza kowariancji pozwoliła stwierdzić, że obserwowane różnice są zdeterminowane nie tylko stężeniem IL-6, ale także wartościami glikemii na czczo i stężeniem HbA_{1c} (Tab.6,11; Ryc.19).

Test Kruskall-Wallis nie pozwolił zaobserwować istotnych różnic pomiędzy grupami terapeutycznymi w zakresie **stężeń IL-12** w surowicy (Tab. 6), natomiast analiza kowariancji wskazywała wprawdzie na zróznicowanie pomiędzy grupami chorych na cukrzycę typu 2 w zakresie stężenia IL-12, jednakże testy post-hoc nie potwierdziły tych różnic (Tab. 12).

Stężenie IL-10 w surowicy chorych leczonych metforminą i chorych leczonych insuliną w skojarzeniu z metforminą było istotnie wyższe niż grupie leczonej insuliną wówczas, gdy oceniano różnice testem Kruskall-Wallis (Tab.6). Natomiast analiza kowariancji wykazała istnienie takiej różnicy wyłącznie pomiędzy grupą leczoną metforminą, a leczonymi pochodną sulfonylomocznika i leczonymi insuliną, przy czym stężenie IL-10 było jedynym czynnikiem różniącym badane grupy (test Schaeffe) (Tab.6,13; Ryc.20).

Badane grupy terapeutyczne różniły się także pod względem **stężenia cytokiny RANTES** w surowicy (test Kruskall-Wallis i ANCOVA). Stosując test Kruskall-Wallis stwierdzono, że stężenie RANTES w surowicy leczonych metforminą jest niższe w porównaniu do leczonych pochodną sulfonylomocznika oraz w porównaniu do leczonych insuliną, a w grupach leczonych pochodną sulfonylomocznika oraz leczonych insuliną w skojarzeniu z metforminą jest niższe tylko w porównaniu do leczonych insuliną. Analiza kowariancji wykazała różnicę znamioną statystycznie zarówno między grupą leczoną insuliną a pozostałymi grupami jak i pomiędzy grupą leczoną metforminą i pozostałymi grupami. Co więcej, wyniki analizy kowariancji wskazują na to, że różnice pomiędzy grupami zdeterminowane są także stężeniem 1,5-AG w osoczu (Tab.6,14; Ryc.21).

Dla oceny różnic w zakresie **stężenia 1,5-AG** w osoczu – wykładnika ostrej hiperglikemii z tego względu uważanego za czynnik proaterogeny – zastosowano, poza testem Kruskal-Wallis, nieco zmodyfikowany model analizy kowariancji, w którym zmienne towarzyszące stanowiły glikemia na czczo, HbA_{1c}, peptyd C, czas trwania cukrzycy i obwód

talii. Wprawdzie test Kruskal-Wallis pozwolił na zaobserwowanie wyższych stężeń 1,5-AG w osoczu w grupie leczonej metforminą oraz w grupie leczonej pochodną sulfonilomocznika w porównaniu do grupy chorych poddawanych wyłącznie insulinoterapii, analiza kowariancji wykazała, że różnice pomiędzy grupami terapeutycznymi w tym modelu są zdeterminowane przede wszystkim stężeniem HbA_{1c} i stężeniem peptydu C. Uwzględniając wpływ tych czynników, nie można potwierdzić istotnych statystycznie różnic w odniesieniu do stężenia 1,5-AG pomiędzy grupami terapeutycznymi (Tab.6,15).

Tab.6. Zestawienie badanych czynników pro- i antyaterogennych u chorych na cukrzycę typu 2.

	Metformina mediana x±SD	Insulina + metformina mediana x±SD	Pochodna sulfonylomocznika mediana x±SD	Insulina mediana x±SD
	n=89	n=31	n=31	n=31
K/M	47/42	13/18	14/17	15/16
Homocysteina [μmol/l]	10,9‡ 12,7±7,4	14,5‡ 13,8±6,9	14,7 14,8±6,9	21,4 21,1±9,4
Adiponektyna [μg/ml]	6,1 7,4±5,5	5,3 6,7±4,1	6,9‡ 9,0±5,0	4,6 5,6±3,5
Rezystyna [ng/ml]	8,5‡ 9,7±5,3	9,6 10,6±4,4	9,2‡ 9,4±3,6	16,8 18,7±10,1
1,5-anhydro-D- glucitol [mg/L]	16,4‡ 15,6±5,9	12,4 12,5±6,1	13,5‡ 14,3±6,7	8,5 9,4±4,2
IL-1β [pg/ml]	3,3‡ 3,5±0,9	3,1‡ 3,3±0,7	3,3‡ 3,3±0,6	5,7 5,0±1,7
IL-6 [pg/ml]	3,4‡ 3,4±1,8	4,2‡ 4,3±1,9	3,9‡ 4,2±1,3	7,6 7,0±2,2
IL-12 [pg/ml]	6,8 8,0±3,7	7,2 8,3±2,4	6,3 6,7±1,4	6,6 6,7±0,7
IL-10 [pg/ml]	1,9‡ 2,8±2,4	1,6‡ 1,9±0,9	1,3 1,6±0,7	1,1 1,2±0,3
Rantes [pg/ml]	2492,4#‡ 2251,5±448,8	2528,4‡ 2537,2±133,9	2567,0‡ 2580,8±164,3	2851,0 2910,6±162,6

różnica znamienna statystycznie wobec grupy leczonej pochodną sulfonylomocznika dla p≤0,05

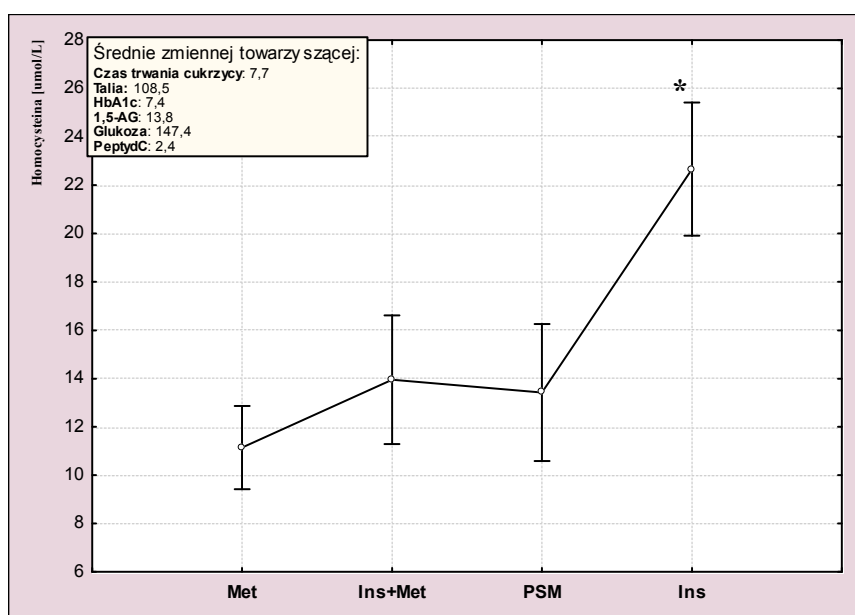
‡ różnica znamienna statystycznie wobec grupy leczonej insuliną dla p≤0,05

Tab. 7. Wyniki analizy kowariancji dla modelu, w którym zmienną zależną było stężenie homocysteiny.

	F	p
Czas trwania cukrzycy [lata]	0,6	NS
Obwód talii [cm]	5,1	0,03*
HbA_{1c} [%]	0,5	NS
1,5-anhydro-D-glucitol [mg/L]	2,0	NS
Glikemia na czczo [mg/dl]	2,4	NS
Peptyd C [ng/ml]	18,4	0,001*
Sposób leczenia	14,5	0,001*

* wartość znamiennej statystycznie dla $p \leq 0,05$

Ryc. 16. Porównanie stężeń **homocysteiny** pomiędzy grupami terapeutycznymi u chorych na cukrzycę typu 2 z zastosowaniem analizy kowariancji.



Met - metformina,
Ins+Met –insulina+metformina
PSM - pochodna sulfonylomocznika
Ins – insulina

Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

* różnica znamiennej statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec grupy leczonej metforminą, wobec grupy leczonej metforminą w skojarzeniu z insuliną oraz wobec grupy leczonej pochodną sulfonylomocznika

Tab. 8. Wyniki analizy kowariancji dla modelu, w którym zmienną zależną było stężenie **adiponektyny**

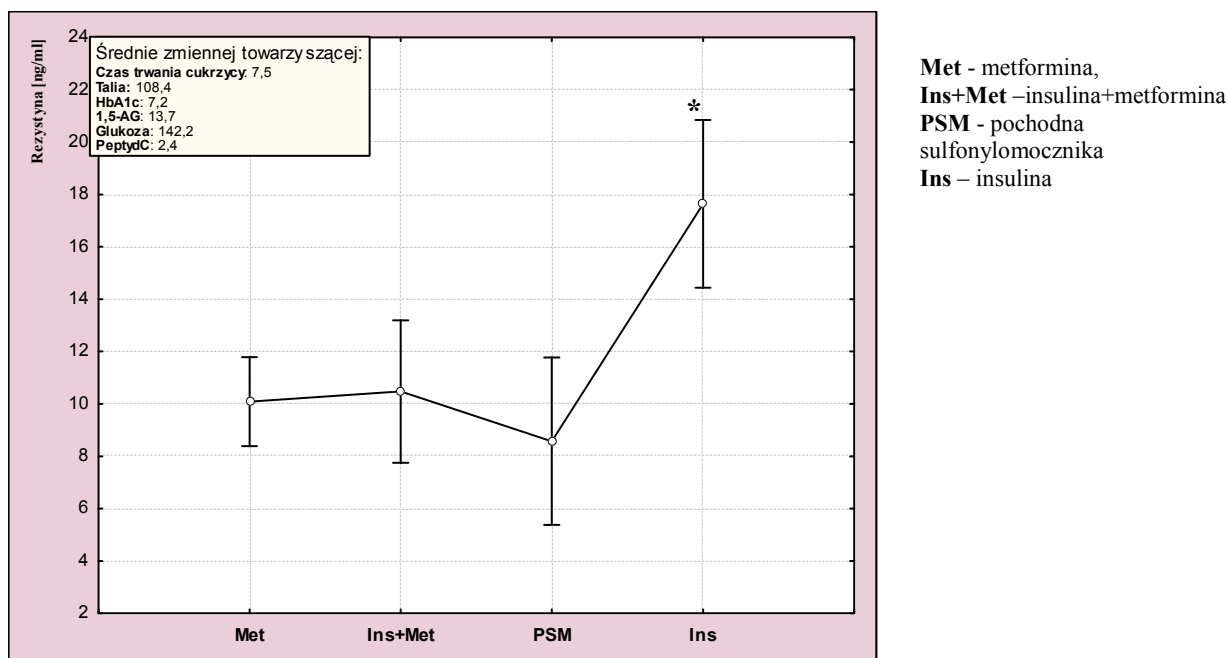
	F	p
Czas trwania cukrzycy [lata]	2,9	NS
Obwód talii [cm]	0,1	NS
HbA_{1c} [%]	0,7	NS
1,5-anhydro-D-glucitol [mg/L]	0,2	NS
Glikemia na czczo [mg/dl]	3,6	NS
Peptyd C [ng/ml]	0,2	NS
Sposób leczenia	2,1	NS

Tab. 9. Wyniki analizy kowariancji dla modelu, w którym zmienną zależną było stężenie rezystyny

	F	p
Czas trwania cukrzycy [lata]	0,1	NS
Obwód talii [cm]	2,2	NS
HbA_{1c} [%]	0,3	NS
1,5-anhydro-D-glucitol [mg/L]	0,7	NS
Glikemia na czczo [mg/dl]	0,9	NS
Peptyd C [ng/ml]	0,1	NS
Sposób leczenia	7,2	0,01*

* wartość znamionna statystycznie dla $p \leq 0,05$

Ryc. 17. Porównanie stężeń **rezystyny** pomiędzy grupami terapeutycznymi u chorych na cukrzycę typu 2 z zastosowaniem analizy kowariancji



Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności

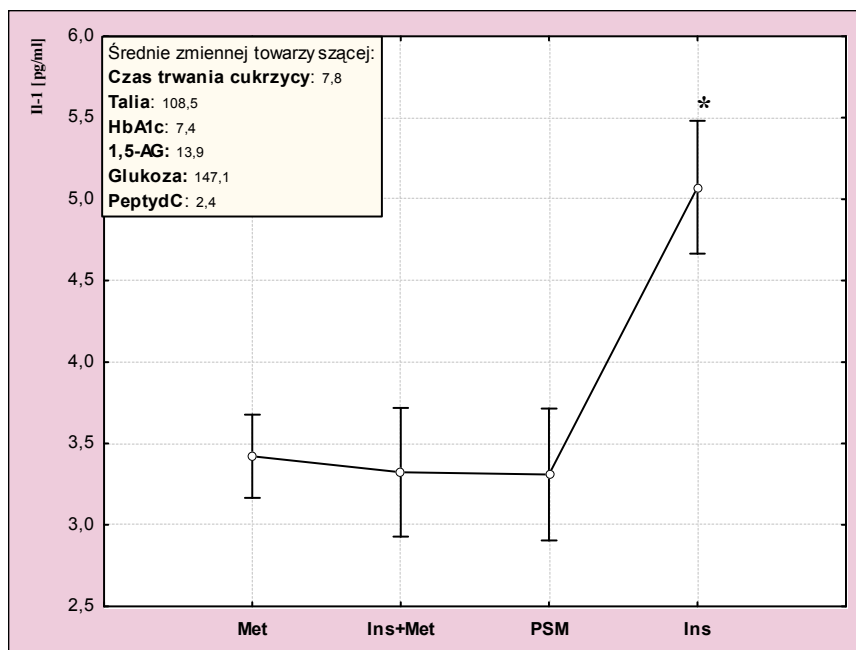
* różnica znamionna statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec grupy leczonej metforminą, wobec grupy leczonej metforminą w skojarzeniu z insuliną oraz wobec grupy leczonej pochodną sulfonylomocznika

Tab. 10. Wyniki analizy kowariancji dla modelu, w którym zmienną zależną było stężenie interleukiny 1 β

	F	p
Czas trwania cukrzycy [lata]	1,4	NS
Obwód talii [cm]	2,7	NS
HbA_{1c} [%]	0,8	NS
1,5-anhydro-D-glucitol [mg/L]	1,1	NS
Glikemia na czczo [mg/dl]	5,9	0,02*
Peptyd C [ng/ml]	8,2	0,005*
Sposób leczenia	18,7	0,001*

* wartość znamiennej statystycznie dla $p \leq 0,05$

Ryc. 18. Porównanie stężeń interleukiny 1 β pomiędzy grupami terapeutycznymi u chorych na cukrzycę typu 2 z zastosowaniem analizy kowariancji



Met - metformina,
Ins+Met insulina+metformina
PSM - pochodna sulfonilomocznika
Ins - insulina

Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności

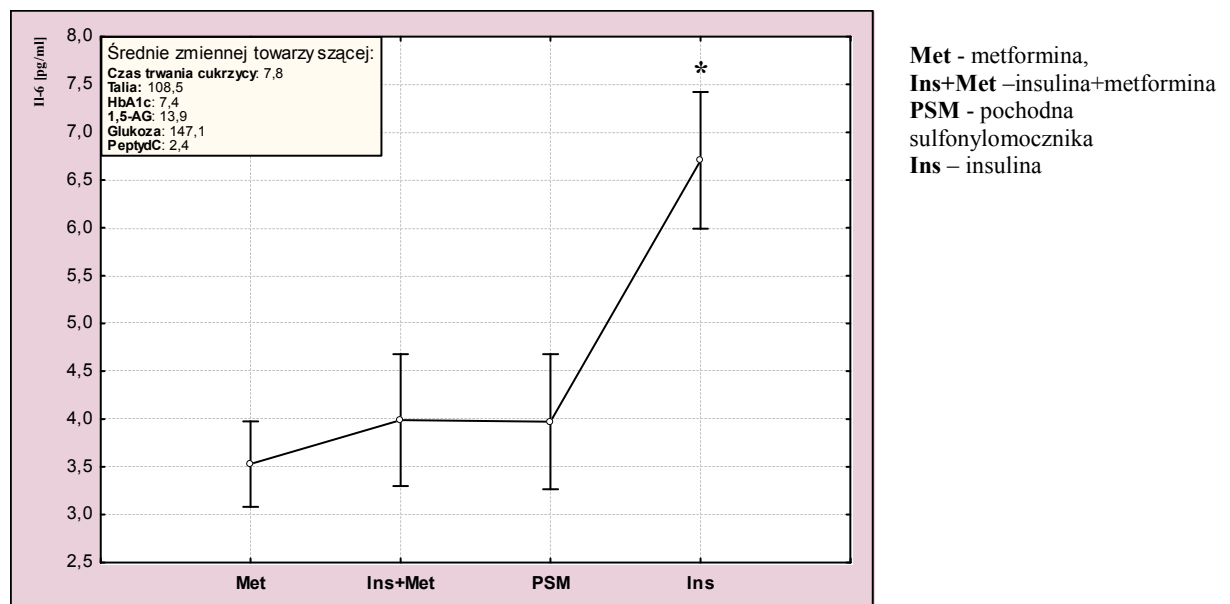
* różnica znamiennej statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec grupy leczonej metforminą, wobec grupy leczonej metforminą w skojarzeniu z insuliną oraz wobec grupy leczonej pochodną sulfonilomocznika

Tab. 11. Wyniki analizy kowariancji dla modelu, w którym zmienną zależną było stężenie interleukiny 6.

	F	p
Czas trwania cukrzycy [lata]	0,1	NS
Obwód talii [cm]	3,3	NS
HbA_{1c} [%]	9,0	0,003*
1,5-anhydro-D-glucitol [mg/L]	1,4	NS
Glikemia na czczo [mg/dl]	4,3	0,04*
Peptyd C [ng/ml]	1,2	NS
Sposób leczenia	17,5	0,001*

* wartość znamiennej statystycznie dla $p \leq 0,05$

Ryc. 19. Porównanie stężeń interleukiny 6 pomiędzy grupami terapeutycznymi u chorych na cukrzycę typu 2 z zastosowaniem analizy kowariancji



Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności

* różnica znamiennej statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec grupy leczonej metforminą, wobec grupy leczonej metforminą w skojarzeniu z insuliną oraz wobec grupy leczonej pochodną sulfonilomocznika

Tab. 12. Wyniki analizy kowariancji dla modelu, w którym zmienną zależną było stężenie interleukiny 12.

	F	p
Czas trwania cukrzycy [lata]	0,1	NS
Obwód talii [cm]	1,6	NS
HbA_{1c} [%]	0,9	NS
1,5-anhydro-D-glucitol [mg/L]	1,9	NS
Glikemia na czczo [mg/dl]	0,5	NS
Peptyd C [ng/ml]	0,1	NS
Sposób leczenia	3,5	0,02*

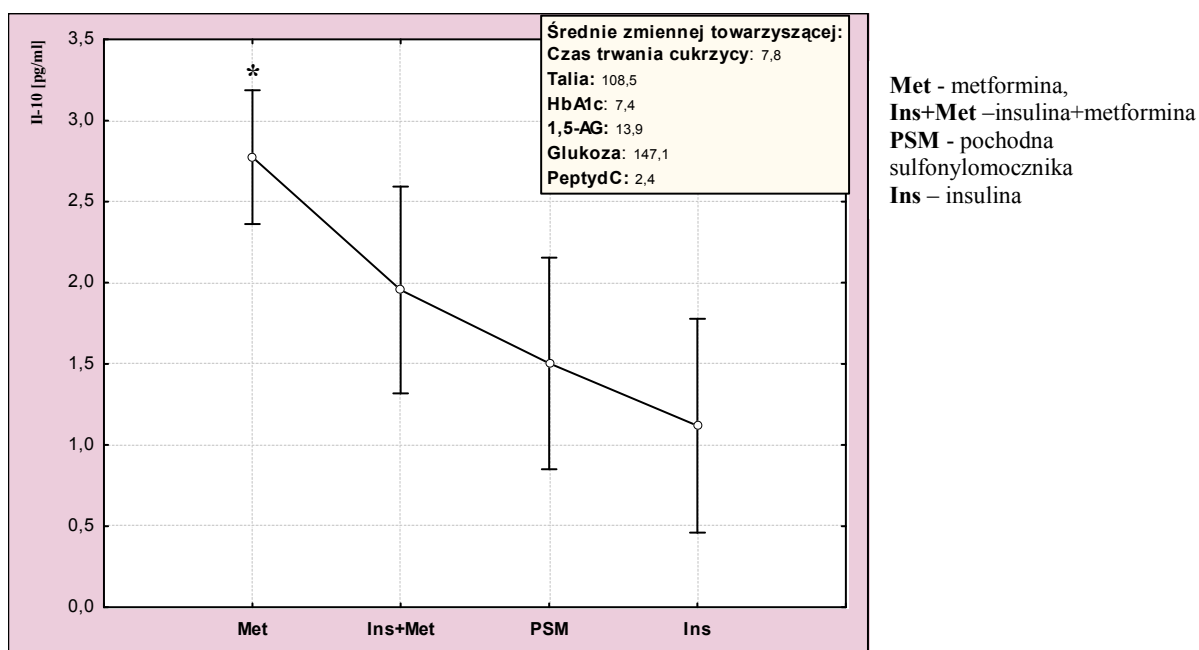
* wartość znamionna statystycznie dla $p \leq 0,05$

Tab. 13. Wyniki analizy kowariancji dla modelu, w którym zmienną zależną było stężenie **interleukiny 10**.

	F	p
Czas trwania cukrzycy [lata]	1,0	NS
Obwód talii [cm]	0,2	NS
HbA_{1c} [%]	0,1	NS
1,5-anhydro-D-glucitol [mg/L]	0,7	NS
Glikemia na czczo [mg/dl]	0,1	NS
Peptyd C [ng/ml]	1,4	NS
Sposób leczenia	5,7	0,001*

* wartość znamiennej statystycznie dla $p \leq 0,05$

Ryc. 20. Porównanie stężeń **interleukiny 10** pomiędzy grupami terapeutycznymi u chorych na cukrzycę typu 2 z zastosowaniem analizy kowariancji



Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności

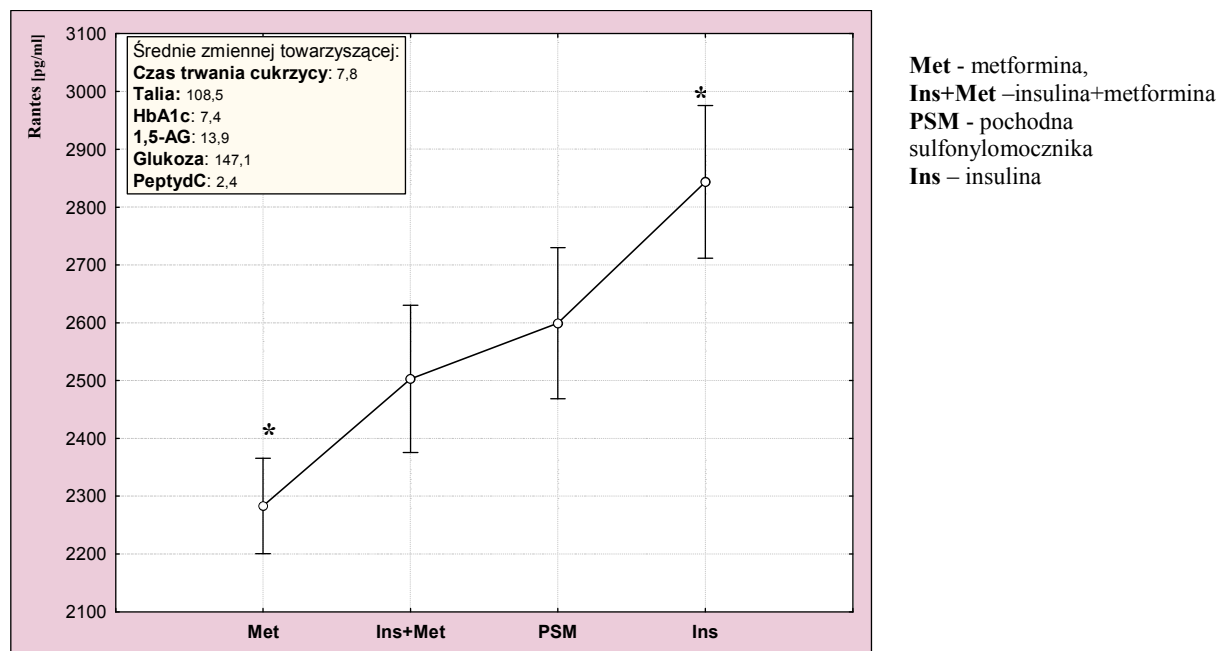
* różnica znamiennej statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec grupy leczonej pochodną sulfonilomocznika oraz wobec grupy leczonej insuliną

Tab. 14. Wyniki analizy kowariancji dla modelu, w którym zmienną zależną było stężenie **RANTES**

	F	p
Czas trwania cukrzycy [lata]	0,7	NS
Obwód talii [cm]	1,3	NS
HbA_{1c} [%]	2,8	NS
1,5-anhydro-D-glucitol [mg/L]	13,5	0,001*
Glikemia na czczo [mg/dl]	0,1	NS
Peptyd C [ng/ml]	0,3	NS
Sposób leczenia	14,4	0,001*

* wartość znamiennej statystycznie dla $p \leq 0,05$

Ryc. 21. Porównanie stężeń **RANTES** pomiędzy grupami terapeutycznymi u chorych na cukrzycę typu 2 z zastosowaniem analizy kowariancji



Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności

* różnica znamiennej statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup

Tab. 15. Wyniki analizy kowariancji, dla modelu, w którym zmienną zależną było stężenie **1,5-anhydro-D-glucitolu**

	F	p
Czas trwania cukrzycy [lata]	0,4	NS
Obwód talii [cm]	0,1	NS
HbA_{1c} [%]	21,8	0,001*
Glikemia na czczo [mg/dl]	0,9	NS
Peptyd C [ng/ml]	5,1	0,02*
Sposób leczenia	1,9	NS

* wartość znamiennej statystycznie dla $p \leq 0,05$

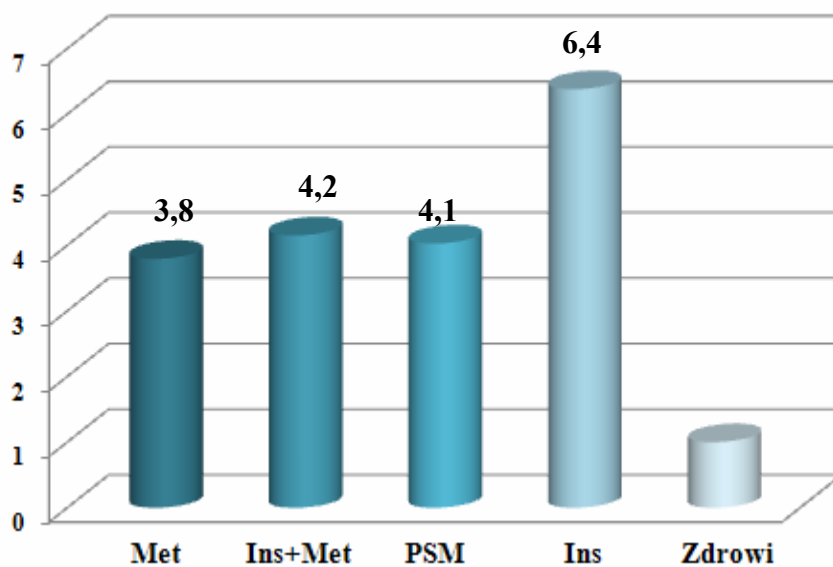
IV. 4. Sumaryczna ocena oddziaływania badanych sposobów farmakoterapii cukrzycy na rozpatrywane czynniki pro- i antyaterogenne.

Siłę oddziaływania poszczególnych metod farmakoterapii wyrażono pod postacią mediany badanej zmiennej (czynnika) obliczanej dla danego sposobu farmakologicznego leczenia cukrzycy w stosunku do mediany tej zmiennej obliczonej w grupie kontrolnej. Następnie zsumowano otrzymane wartości liczbowe osobno dla czynników pro- i przeciwmiażdżycowych. Uzyskano w ten sposób umowny, wyrażony punktowo, sposób oceny siły oddziaływania pro- i przeciwmiażdżycowego każdego z badanych sposobów leczenia.

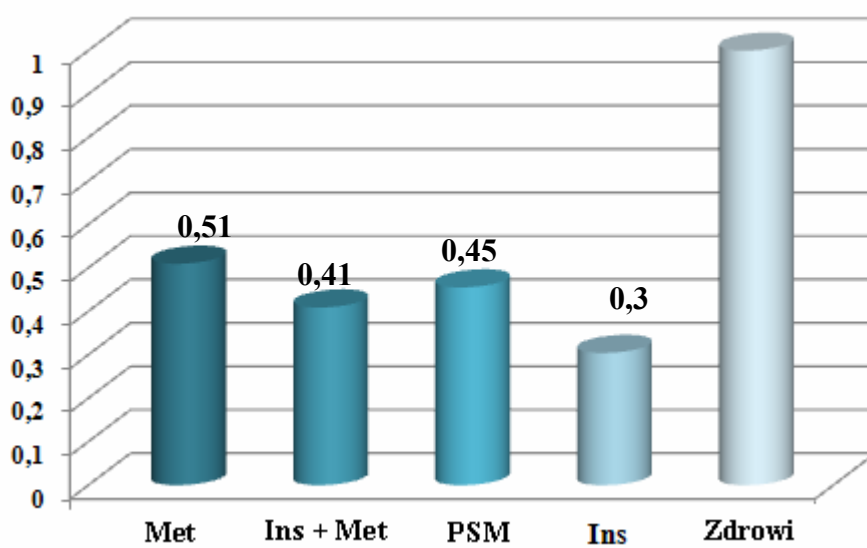
Najwyższą wartość ilustrującą siłę oddziaływania przeciwmiażdżycowego – 6,4 pkt. - przypisano leczeniu insuliną metodą konwencjonalną w monoterapii, leczenie pochodną sulfonilomocznika otrzymało ocenę 4,1, a leczenie insuliną w skojarzeniu z metforminą – ocenę 4,2. Monoterapia metforminą oceniona została na 3,8 pkt (Ryc.22).

Analizując w powyższy sposób oddziaływanie poszczególnych metod leczenia w zakresie efektu przeciwmiażdżycowego najniższą notę otrzymała monoterapia insuliną – 0,3 pkt, nieco wyższą ocenę, bo 0,41 pkt. i 0,45 pkt. leczenie insuliną w skojarzeniu z metforminą i leczenie pochodną sulfonilomocznika, podczas gdy leczenie metforminą oceniono na 0,51 pkt. (Ryc.23).

Ryc.22. Sumaryczna ocena punktowa siły proaterogennego oddziaływania poszczególnych sposobów leczenia.



Ryc.23. Sumaryczna ocena punktowa siły antyaterogennego oddziaływania poszczególnych sposobów leczenia.



IV.5. Badania związku pomiędzy wybranymi czynnikami pro- i antyaterogennymi a parametrami charakteryzującymi przebieg kliniczny cukrzycy typu 2.

Badania dotyczyły 182-osobowej grupy chorych na cukrzycę typu 2 zaanalizowanej łącznie, bez uwzględnienia różnic w zakresie farmakoterapii. Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli 16 i na rycinie 24.

Stężenie homocysteiny w surowicy chorych na cukrzycę korelowało dodatnio z obwodem talii ($r = 0,30$). Natomiast stężenie adiponektyny wykazywało ujemną korelację ze stężeniem insuliny w surowicy [$r = (-0,34)$]. Stwierdzono istotną korelację pomiędzy obwodem talii, HbA_{1c} i 1,5-AG a stężeniem Il-6 w surowicy [odpowiednio: $r = 0,31$; $r = 0,37$; $r = (-0,32)$]. Wykazano ponadto, że wzrost stężenia RANTES w surowicy jest związany z dłuższym czasem trwania klinicznie jawnej choroby ($r = 0,30$), niższymi wartościami stężeń 1,5-AG w surowicy [$r = (-0,39)$] (Ryc.24.) i wyższymi poziomami glikemii na czczo ($r = 0,32$).

Analogiczne badania związku pomiędzy czynnikami pro- i antyaterogennymi a parametrami charakteryzującymi przebieg kliniczny cukrzycy typu 2 przeprowadzono także w 89-osobowej grupie chorych leczonych metforminą (Tab.17).

W grupie tej wykazano związek pomiędzy stężeniem adiponektyny i stężeniem Il-6 w surowicy a stężeniem insuliny w surowicy na czczo i wartościami współczynnika HOMA_{IR} [odpowiednio: $r = (-0,42)$ i $r = (-0,37)$ oraz $r = 0,44$ i $r = 0,39$] oraz ujemne korelacje pomiędzy stężeniem 1,5-anhydro-D-glucitolu w osoczu a stężeniem Il-12 [$r = (-0,31)$] i stężeniem RANTES [$r = (-0,31)$] w surowicy.

IV.6. Badania wzajemnych relacji pomiędzy wybranymi czynnikami pro- i antyaterogennymi

Szczegółowe wyniki dotyczące chorych na cukrzycę analizowanych łącznie, bez uwzględniania sposobu farmakoterapii przedstawiono w tabeli 16 i na rycinach 25-26.

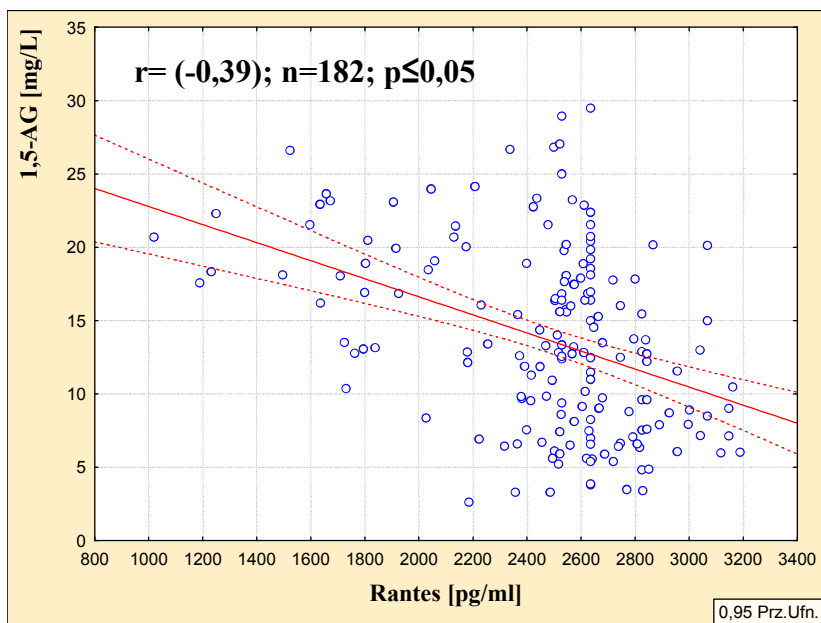
W grupie chorych na cukrzycę typu 2 analizowanej łącznie zaobserwowano, że wyższym poziomom Il-1 β i Il-6 w surowicy towarzyszą wyższe wartości stężeń homocysteiny ($r = 0,43$ i $r = 0,37$) (Ryc.25). Stężenie Il-6 korelowało dodatnio także ze stężeniem rezystyny ($r = 0,51$) (Ryc.26).

W grupie chorych leczonych metforminą wykazano, że wzrost stężenia homocysteiny w surowicy związany był ze wzrostem stężenia Il-1 β i Il-6 [odpowiednio: $r = 0,42$ i $r = 0,30$] (Ryc.27). Stężenie adiponektyny skorelowane było dodatnio ze stężeniem Il-10 [$r = 0,56$]

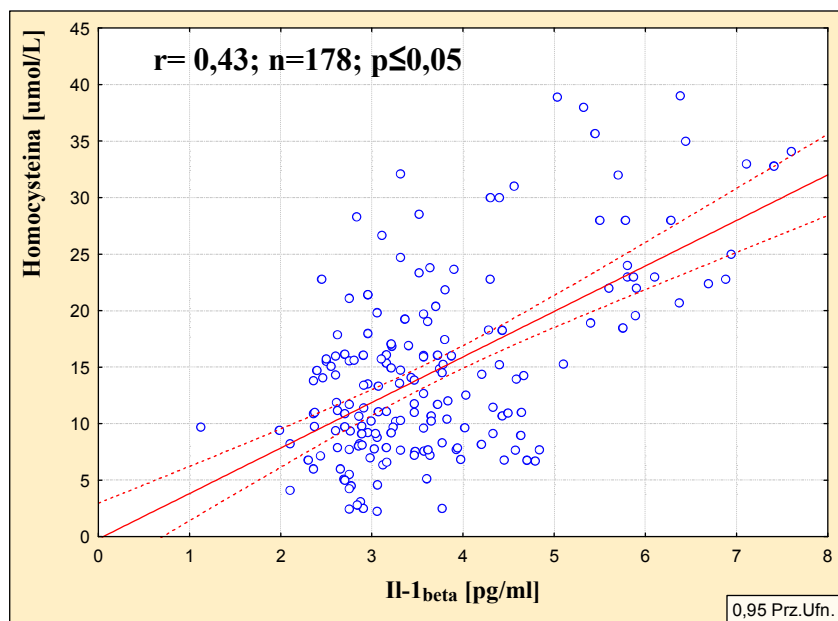
(Ryc.28), natomiast stężenie rezystyny ze stężeniem Il-6 [$r = 0,41$] (Ryc.29). Stwierdzono także, że istnieje związek pomiędzy stężeniem Il-1 β i Il-6 [$r = 0,58$] (Ryc.30) oraz pomiędzy stężeniem RANTES a stężeniem Il-12 [$r = 0,31$] w surowicy (Tab.17).

Korelacje pomiędzy stężeniem 1,5-AG a innymi badanymi czynnikami związanymi z patogenezą miażdżycy przedstawiono w punkcie IV.5.

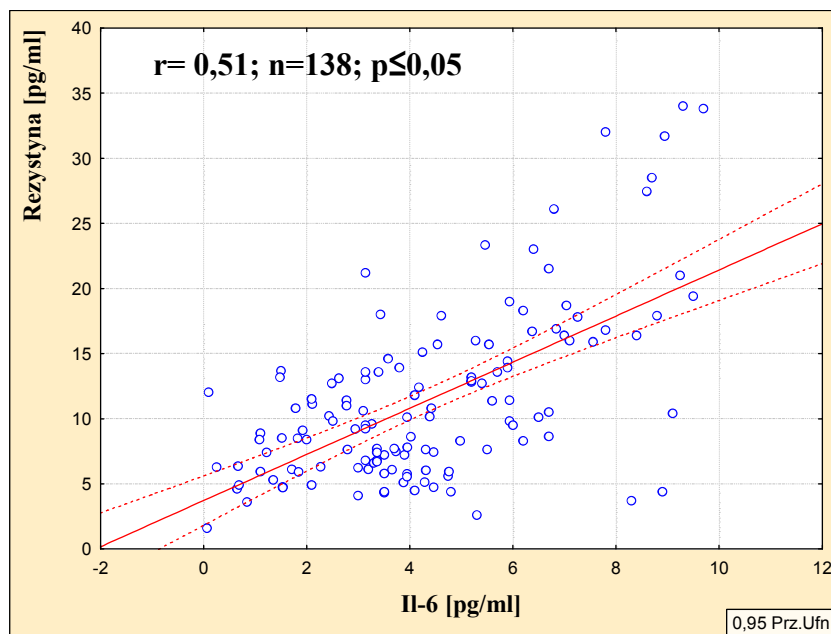
Ryc. 24. Zależność pomiędzy stężeniem **RANTES** a stężeniem **1,5- anhydro-D - glucitolu** u chorych na cukrzycę typu 2.



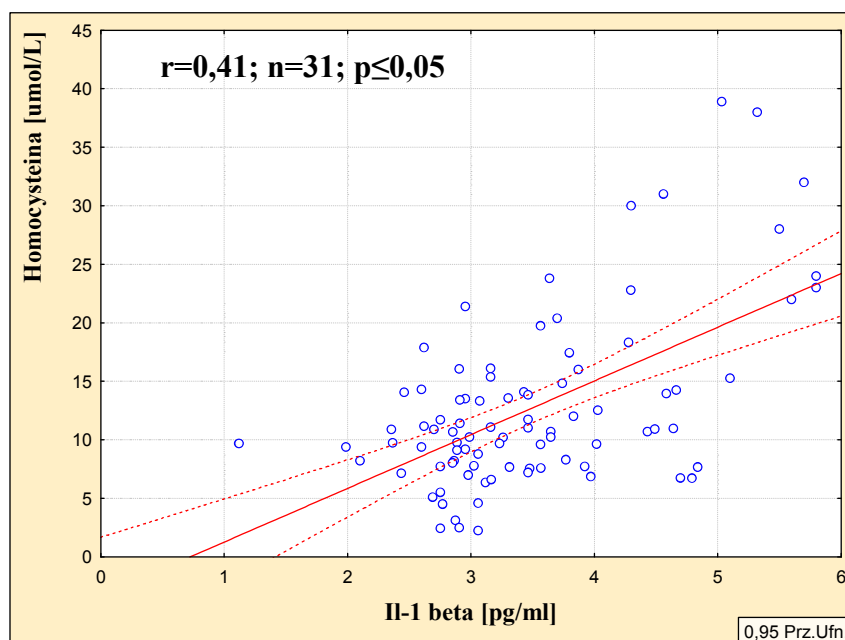
Ryc. 25. Zależność pomiędzy stężeniem **interleukiny 1 β** a stężeniem **homocysteiny** u chorych na cukrzycę typu 2.



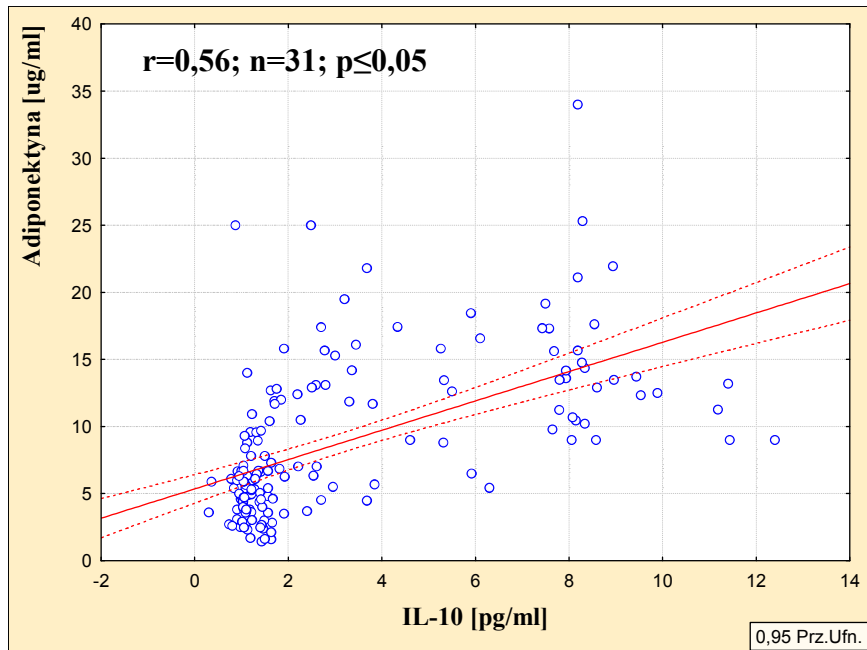
Ryc. 26. Zależność pomiędzy stężeniem **interleukiny 6** a stężeniem **rezystyny** u chorych na cukrzycę typu 2.



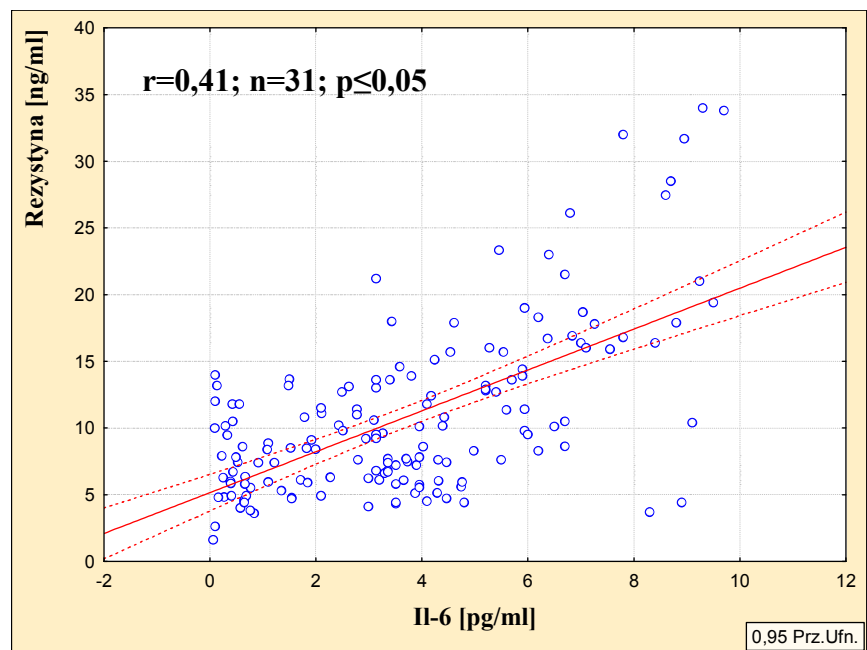
Ryc. 27. Zależność pomiędzy stężeniem **interleukiny 1 β** a stężeniem **homocysteiny** u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych metforminą



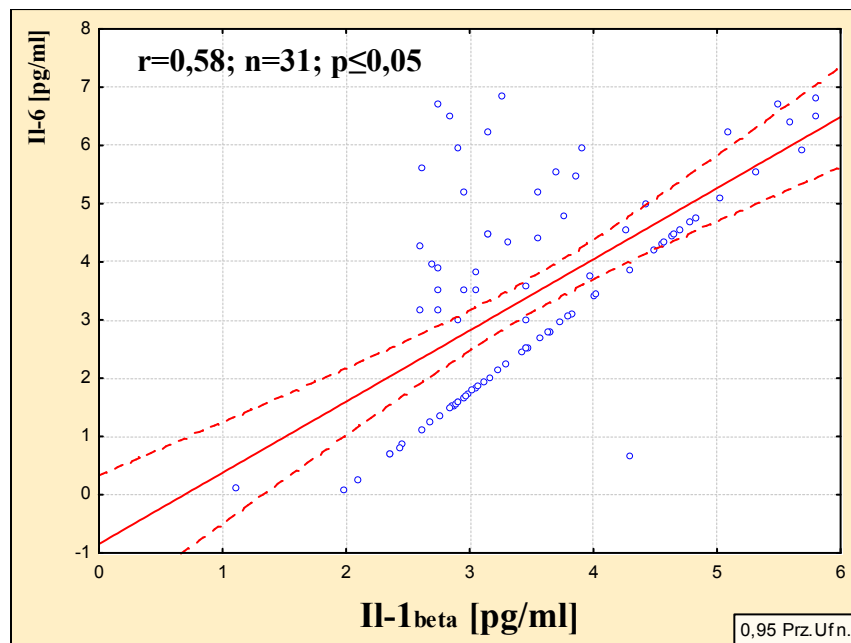
Ryc. 28. Zależność pomiędzy stężeniem **interleukiny 10** a stężeniem **adiponektyny** u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych metforminą



Ryc. 29. Zależność pomiędzy stężeniem **interleukiny 6** a stężeniem **rezystyny** u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych metforminą



Ryc. 30. Zależność pomiędzy stężeniem **interleukiny 1 β** a stężeniem **interleukiny 6** u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych metforminą



Tab. 17. Przegląd wartości współczynników korelacji w grupie chorych na cukrzycę typu 2, leczonych metforminą.

n=89	1,5-AG	Homocysteina	Adiponektyna	Rezystyna	II-1β	II-6	II-12	II-10	Rantes
Wiek [lata]	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Czas trwania cukrzycy [lata]	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BMI [kg/m ²]	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Obwód talii [cm]	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
WHR	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
HbA _{1c} [%]	r = (-0,35); p≤0,05	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
1,5-AG [mg/L]	NS	NS	NS	NS	NS	NS	r = (-0,31); p≤0,05	NS	r = 0,31; p≤0,05
Glukoza [mg/dl]	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cholesterol całkowity [mg/dl]	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cholesterol LDL [mg/dl]	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cholesterol HDL [mg/dl]	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Triacyloglicerole [mg/dl]	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
HOMA _{IR}	NS	NS	r = (-0,37); p≤0,05	NS	NS	r = 0,39; p≤0,05	NS	NS	NS
Insulina [pmol/L]	NS	NS	r = (-0,42); p≤0,05	NS	NS	r = 0,44; p≤0,05	NS	NS	NS
Peptyd C [ng/ml]	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Homocysteina [μmol/L]	NS	NS	NS	NS	r = 0,42; p≤0,05	r = 0,30; p≤0,05	NS	NS	NS
Adiponektyna [μg/ml]	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	r = 0,56; p≤0,05	NS
Rezystyna [ng/ml]	NS	NS	NS	NS	NS	r = 0,41; p≤0,05	NS	NS	NS
II-1 β [pg/ml]	NS	r = 0,42; p≤0,05	NS	NS	NS	r = 0,58; p≤0,05	NS	NS	NS
II-6 [pg/ml]	NS	r = 0,30; p≤0,05	NS	r = 0,41; p≤0,05	r = 0,58; p≤0,05	NS	NS	NS	NS
II-10 [pg/ml]	NS	NS	r = 0,56; p≤0,05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
II-12 [pg/ml]	r = (-0,31); p≤0,05	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	r = 0,31; p≤0,05
Rantes [pg/ml]	r = (-0,31); p≤0,05	NS	NS	NS	NS	NS	r = 0,31; p≤0,05	NS	NS

IV.7. Wyniki analizy wielokrotnej regresji przeprowadzonej w grupie chorych na cukrzycę typu 2 niezależnie od sposobu leczenia farmakologicznego

W oparciu o modele wielokrotnej regresji zbadano, które z parametrów antropologiczno-epidemiologicznych, wykładników kontroli cukrzycy oraz parametrów związanych z przebiegiem klinicznym cukrzycy modyfikują w sposób niezależny badane czynniki proaterogenne. W tym celu zastosowano model, w którym zmienne zależne stanowiły kolejno stężenia badanych cytokin w surowicy, natomiast zmiennymi niezależnymi były : wiek, czas trwania cukrzycy, BMI, obwód talii, glikemia na czczo, HbA_{1c}, 1,5-AG, stężenie cholesterolu całkowitego, LDL, HDL, triacylogliceroli w surowicy, wskaźnik HOMA_{IR} oraz stężenie peptydu C w surowicy, a ponadto stężenie homocysteiny, rezystyny i adiponektyny w surowicy.

Założenia tego modelu okazały się prawdziwe tylko dla niektórych badanych cytokin. Wykazano, że stężenie Il-6 jest uwarunkowane w sposób niezależny stężeniem rezystyny w surowicy, a wartości R² wskazywały na znaczne dopasowanie modelu do badanej populacji (R² = 0,57; β= 0,4), natomiast stężenie RANTES uwarunkowane było przede wszystkim poziomem 1,5-AG w osoczu [R² = 0,32; β= (-0,3) (Tab. 18-19).

Tab. 18. Wyniki analizy wielokrotnej regresji u chorych na cukrzycę typu 2, w której zmienną zależną jest stężenie **interleukiny 6**.

n=62	Współczynnik β	$R^2=0,57$; $p \leq 0,05$
WIEK [lata]	0,1	
Czas trwania cukrzycy [lata]	0,01	
BMI [kg/m ²]	-0,1	
Obwód talii [cm]	0,1	
HbA_{1c} [%]	0,2	
1,5-anhydro-D-glucitol [mg/L]	-0,1	
Glikemia na czczo [mg/dl]	-0,1	
Cholesterol całkowity [mg/dl]	0,1	
Cholesterol LDL [mg/dl]	-0,1	
Cholesterol HDL [mg/dl]	-0,2	
Triacyloglicerole [mg/dl]	0,1	
HOMA_{IR}	0,2	
Peptyd C [ng/ml]	-0,2	
Homocysteina [μ mol/l]	0,2	
Adiponektyna [μ g/ml]	0,1	
Rezystyna [ng/ml]	0,4*	

* wartość znamiennej statystycznie dla $p \leq 0,05$

Tab. 19. Wyniki analizy wielokrotnej regresji u chorych na cukrzycę typu 2, w której zmienną zależną jest stężenie **Rantes**

n=62	Współczynnik β	$R^2=0,32$; $p \leq 0,05$
WIEK [lata]	0,1	
Czas trwania cukrzycy [lata]	0,1	
BMI [kg/m ²]	0,1	
Obwód talii [cm]	0,1	
HbA_{1c} [%]	-0,1	
1,5-anhydro-D-glucitol [mg/L]	-0,3*	
Glikemia na czczo [mg/dl]	0,2	
Cholesterol całkowity [mg/dl]	0,2	
Cholesterol LDL [mg/dl]	-0,2	
Cholesterol HDL [mg/dl]	-0,1	
Triacyloglicerole [mg/dl]	-0,1	
HOMA_{IR}	-0,2	
Peptyd C [ng/ml]	-0,2	
Homocysteina [μ mol/l]	0,2	
Adiponektyna [μ g/ml]	0,1	
Rezystyna [ng/ml]	-0,1	

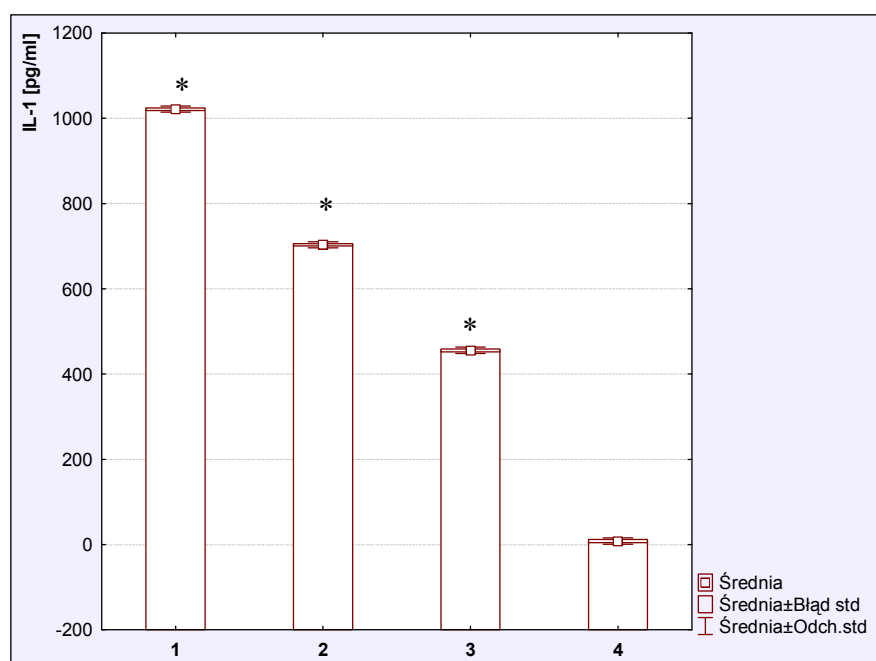
* wartość znamienna statystycznie dla $p \leq 0,05$

IV.8. Badania sekrecji wybranych cytokin przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej pochodzące od osób zdrowych.

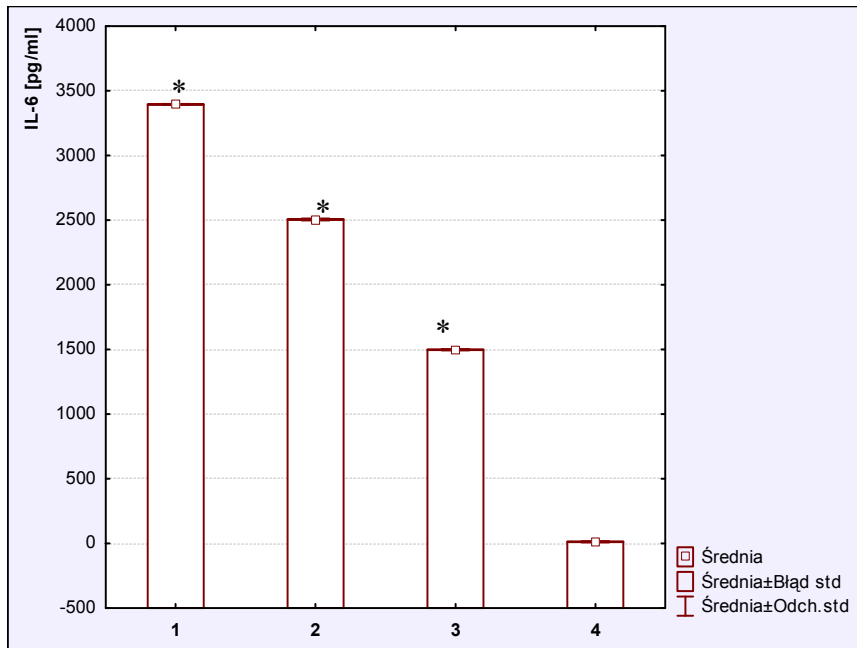
W kolejnym etapie przeprowadzono ocenę nasilenia sekrecji cytokin pro- i antyaterogennych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej. Komórki wyizolowane z krwi osób zdrowych poddano 72-godzinnej hodowli, a następnie oznaczono stężenie cytokin w nadsączu.

Wykazano, że sekrecja Il-1 β , Il-6 oraz RANTES przez stymulowane mitogenem komórki jednojądrzaste krwi obwodowej wzrasta w obecności homocysteiny (Ryc. 31-33). Natomiast stężenie Il-10 w nadsączu pochodzącym z hodowli komórek stymulowanych mitogenem w obecności homocysteiny jest istotnie niższe, niż w nadsączu pochodzącym z hodowli komórek stymulowanych mitogenem bez dodatku homocysteiny do podłoża (Ryc.34). Sekrecja Il-12 przez komórki pochodzące od osób zdrowych eksponowane wyłącznie na mitogen nie różniła się w odniesieniu do komórek poddanych także działaniu homocysteiny (Ryc.35).

Ryc. 31. Stężenie **interleukiny 1 β** w nadsączu wydzielanej przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej w zależności od obecności homocysteiny w podłożu.



Ryc. 32. Stężenie **interleukiny 6** w nadsączy wydzielanej przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej w zależności od obecności homocysteiny w podłożu.



* różnica znamiennej statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec pozostałych przypadków

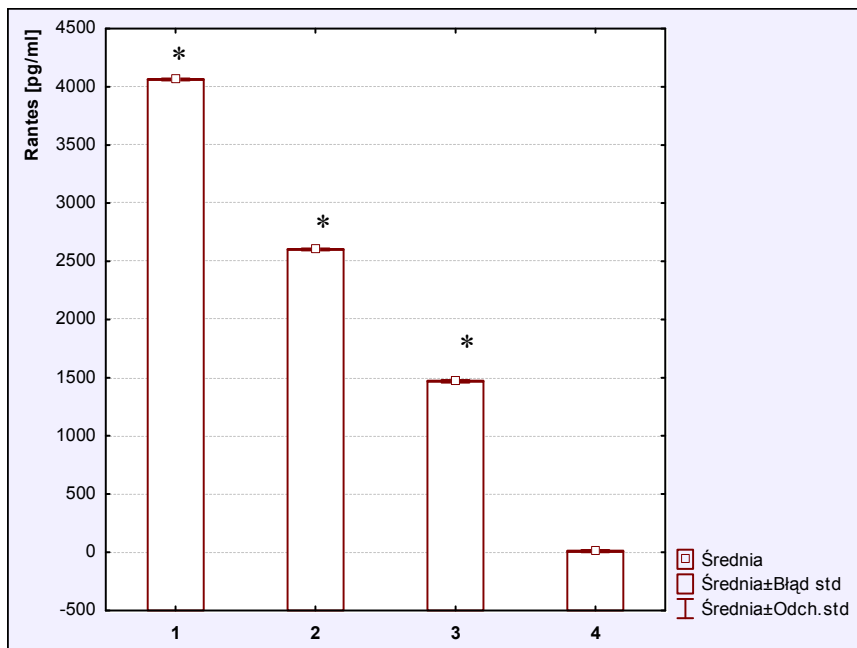
1 – komórki + mitogen + homocysteina

2 – komórki + mitogen

3 – komórki

4 – medium

Ryc. 33. Stężenie **RANTES** w nadsączy wydzielanej przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej w zależności od obecności homocysteiny w podłożu.



* różnica znamiennej statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec pozostałych przypadków

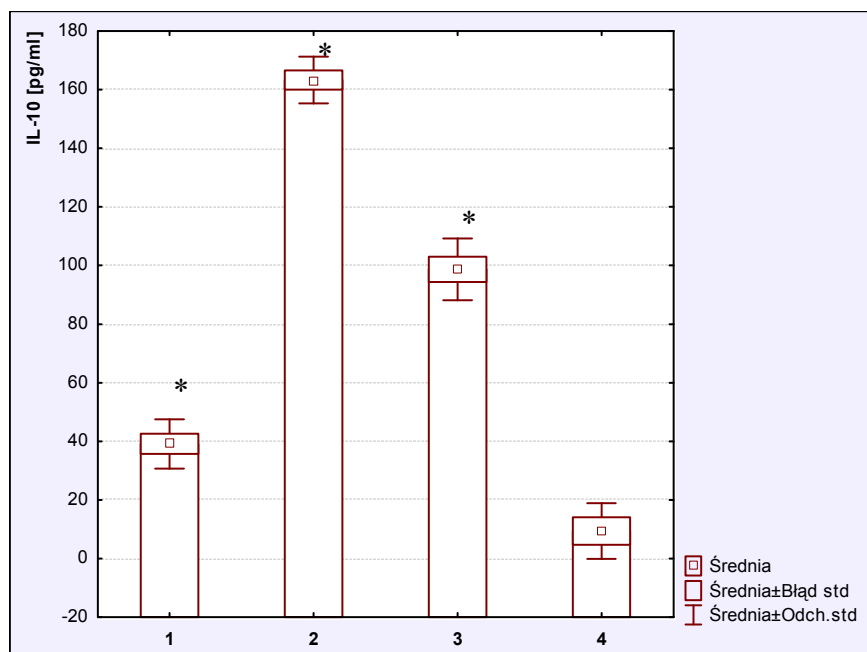
1 – komórki + mitogen + homocysteina

2 – komórki + mitogen

3 – komórki

4 – medium

Ryc. 34. Stężenie **interleukiny 10** w nadsączu wydzielanej przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej w zależności od obecności homocysteiny w podłożu.



* różnica znamiennej statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec pozostałych przypadków

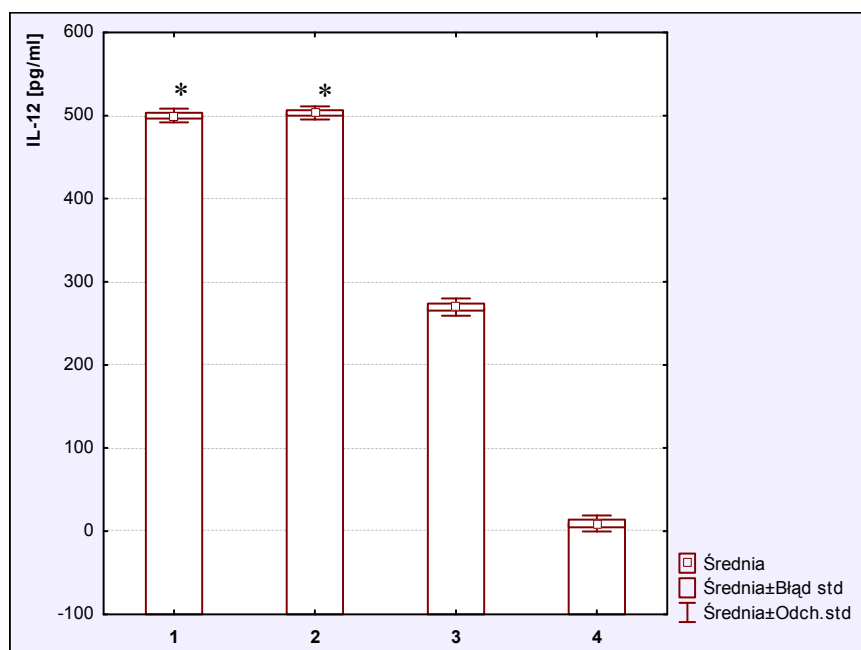
1 – komórki + mitogen + homocysteina

2 – komórki + mitogen

3 – komórki

4 – medium

Ryc. 35. Stężenie **interleukiny 12** w nadsączu wydzielanej przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej w zależności od obecności homocysteiny w podłożu.



* różnica znamiennej statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec 3 i 4

1 – komórki + mitogen + homocysteina

2 – komórki + mitogen

3 – komórki

4 – medium

V. Omówienie wyników i dyskusja

Badania ostatnich kilkunastu lat wskazują na istnienie ścisłego związku pomiędzy procesem miażdżycowym a odczynem o charakterze zapalno-immunologicznym w ścianie naczyń, na rozwój którego mają wpływ m.in. interleukiny, chemokiny czy adipocytokiny [Libby^a et al.,2009;Libby^c et al.,2002;Packard et al.,2008]. Zwraca się również uwagę na inne czynniki zaangażowane w przebiegu procesu miażdżycowego tj. insulinooporność obwodową, hiperinsulinemia czy też hiperhomocysteinemia [Venkatapuram et al.,2006, Akalin et al.,2008]. Nadmiernie nasiloną aktywność zapalno-immunologiczną jest szczególnie widoczna u osób chorych na cukrzycę typu 2. Ma ona bowiem istotny wpływ na występowanie rozległych powikłań naczyniowych i w związku z tym znacznie pogarsza rokowania u tych chorych [Huysman 2009]. O ile jednak postęp farmakoterapii cukrzycy typu 2 przyniósł zadowalające efekty w zakresie kontroli wyrównania metabolicznego, nadal bez jednoznacznej odpowiedzi pozostaje pytanie, czy którakolwiek ze współcześnie stosowanych metod farmakologicznego leczenia cukrzycy istotnie spowalnia postęp miażdżycy poprzez wpływ na czynniki wiodące do jej rozwoju.

Metody farmakologicznego leczenia cukrzycy typu 2 stosowane współcześnie w Polsce stanowią kompromis pomiędzy wypełnianiem zaleceń klinicznych a względami ekonomicznymi i dlatego sprowadzają się przede wszystkim do stosowania metforminy, pochodnych sulfonilomocznika, przede wszystkim pod postacią gliklazydu i glimepirydu, stosowania inhibitorów alfa-glukozydaz oraz do stosowania preparatów insuliny, zarówno w monoterapii, jak i w połączeniu z wymienionymi doustnymi lekami przeciwcukrzycowymi. Rekomendowanym lekiem przeciwhiperlikemicznym dla większości chorych na cukrzycę typu 2 jest metformina, posiadająca wiele wcześniej udowodnionych właściwości ograniczających postęp miażdżycy [Jasik i wsp.,2005;Neumiller et al.,2009].

Dlatego też przeprowadzone badania objęły dość liczną grupę chorych leczonych metforminą, a także, nieco mniej liczne grupy, w tym leczonych jedną z pochodnych sulfonilomocznika (gliklazydem bądź glimepirydem), leczonych insuliną w sposób konwencjonalny oraz grupę chorych leczonych preparatami insuliny w skojarzeniu z metforminą. Podjęte badania były próbą jednoczesnej oceny występowania kilku czynników pro- i antyaterogennych u chorych różniących się metodą stosowanej farmakoterapii cukrzycy typu 2, a właściwości biologiczne badanych czynników umiejscawiały je, na powiązanych ze sobą, lecz różnych, kluczowych etapach patogenezy miażdżycy. Dlatego też ocenie poddano zmiany stężenia w surowicy cytokin o prozapalnym charakterze (Il-1 β , Il-6, Il-12, RANTES), stężenie Il-10 – jako najbardziej reprezentatywnej, w świetle współczesnej wiedzy, cytokiny przeciwzapalnej;

stężenia rezystyny i adiponektyny w surowicy - najlepiej poznanych pod względem udziału w rozwoju insulinooporności adipocytoki, stężenie homocysteiny w surowicy - czynnika metabolicznego o wybitnie promiażdżycowym charakterze, a także zbadano nasilenie ostrej (poposiłkowej) hiperglikemii – czynnika ściśle związanego z rozwojem powikłań w obrębie dużych naczyń.

Analiza stężeń badanych cytokin wykazała, że insulinoterapia konwencjonalna prowadzona w badanej grupie w zdecydowanej większości za pomocą ludzkich mieszanek insulinowych, jest najmniej korzystna z punktu widzenia profilaktyki rozwoju miażdżycy w porównaniu do pozostałych grup terapeutycznych o czym świadczą znacznie wyższe **stężenia interleukiny 1 β , interleukiny 6 i RANTES** wśród leczonych insuliną. Jednocześnie ta **metoda farmakoterapii cukrzycy** związana była z występowaniem znacznie niższych **stężeń interleukiny 10** w surowicy w stosunku do pozostałych badanych metod farmakoterapii cukrzycy. Można przypuszczać zatem, że przeciwzapalna rola insulinoterapii konwencjonalnej u chorych na cukrzycę typu 2 jest dość ograniczona. Dane z piśmiennictwa na ten temat są raczej skąpe, a co więcej, część z nich dokumentuje raczej korzystny wpływ stosowania insuliny na przebieg procesu zapalnego. Udowodniono na przykład, że insulina zmniejsza ekspresję niektórych czynników odpowiedzi zapalnej - chemokin, cząsteczek adhezji, białka CRP w surowicy oraz hamuje istotne dla procesu zapalnego reakcje uwarunkowane aktywnością interleukiny 6 w adipocytach [Aljada et al.,2000;Dandona et al.,2002; Chaudhuri et al.,2004;Andersson et al.,2007;Ghanim et al. 2010]. Doniesienia tego rodzaju współistnieją z innymi o przeciwnym wydzźwięku. Pradhan et al. [Pradhan et al. 2009] nie wykazali istotnego negatywnego wpływu stosowania insulinoterapii na niektóre biomarkery procesu zapalnego odgrywające istotną rolę w patogenezie miażdżycy, takie jak Il-6, białko C-reaktywne czy TNF- α w porównaniu do leczenia metforminą, czy leczenia insuliną w skojarzeniu z metforminą, a Mavridis et al. [Mavridis et al. 2008] zaobserwowali, że stosowanie insulinoterapii u chorych na cukrzycę typu 2 wiąże się ze wzrostem stężenia prozapalnych czynników w surowicy w porównaniu do efektu, jaki wywierają pochodne sulfonilomocznika.

To niepokojące zróżnicowanie wyników badań uzyskiwanych przez różnych badaczy oraz rezultatów badań własnych może mieć kilka przyczyn. Po pierwsze, większość badań świadczących o przeciwzapalnym działaniu insuliny to badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* polegające na poddawaniu działaniu insuliny komórek śródbłonna lub adipocytów. Wyniki uzyskane tą drogą, są tylko pozornie sprzeczne z wynikami badań prowadzonych bezpośrednio u ludzi i świadczą wyłącznie o swoistej dla danego typu

komórek czy tkanek odpowiedzi na działanie insuliny, a niekoniecznie odnoszą się do organizmu ludzkiego jako całości. Co więcej, nawet w badaniach dotyczących bezpośrednio chorych na cukrzycę insulinę podawano pod postacią krótkotrwałego wlewu dożylnego, co generuje takie zmiany stężeń tego hormonu, które nie występują podczas prowadzenia konwencjonalnej insulinoterapii [Ghanim et al., 2010]. Niewykluczone więc, że krótkotrwałe utrzymujące się w środowisku wysokie stężenia insuliny, jak to ma miejsce w eksperymencie *in vitro* oraz podczas podania dożylnego tego hormonu, hamują aktywację czynnika transkrypcyjnego NFκ-B [Ghanim et al. 2010] lub też aktywację czynnika transkrypcyjnego STAT-5 [Jeschke et al. 2008], co wiedzie do zmniejszenia stężenia cytokin prozapalnych w surowicy, podczas gdy niewielkie, choć dłużej utrzymujące się stężenia insuliny pojawiające się w surowicy w przebiegu konwencjonalnej insulinoterapii nie wywierają istotnego wpływu na stan czynników transkrypcyjnych i nie dochodzi do zmniejszenia wytwarzania cytokin o proaterogennym i prozapalnym charakterze. Przyczyna tego związana jest najprawdopodobniej z krótkim okresem półtrwania insuliny i różnicami w zakresie jej dystrybucji w zależności od drogi podania. Po podaniu dożylnym insulina prawie natychmiast i w całości transportowana jest na obwód, przechodząc przez krążenie płucne, gdzie może oddziaływać bezpośrednio na skupione w tym rejonie liczne makrofagi, zdolne do wytwarzania czynników o prozapalnym charakterze. Podanie podskórne insuliny pod postacią mieszanek zawierających insuliny o pośrednim czasie działania ma na celu uwalnianie niewielkich jej porcji do krążenia w ciągu wielu godzin, co uniemożliwia bezpośrednie oddziaływanie hormonu na komórki procesu zapalnego w taki sposób, jak obserwuje się to w warunkach *in vitro*, czy po dożylnym podaniu insuliny.

Jednocześnie należy zauważyć, że wyniki badań własnych zaprojektowanych jako badania przekrojowe nie dają podstaw do ostatecznej odpowiedzi na pytanie, czy konwencjonalna insulinoterapia związana jest ze wzmożeniem wytwarzania czynników prozapalnych o proaterogennym charakterze, czy też tylko nie jest wystarczająco efektywna w hamowaniu reakcji zapalnej typowej dla cukrzycy typu 2 i miażdżycy. Uwzględniając fakt, że stężenia interleukiny 1β, interleukiny 6 i RANTES kształtują się na niższych poziomach w surowicy u chorych, u których stosuje się inny niż monoterapia insuliną sposób farmakoterapii cukrzycy, można przypuszczać, że konwencjonalna insulinoterapia po prostu nie koryguje wystarczająco zmian wywołanych przebiegiem cukrzycy.

Intrygujące wydają się także obserwacje dotyczące niskich stężeń Il-10 w surowicy u chorych leczonych insuliną. Uważa się, że wytwarzanie Il-10 jest uwarunkowane aktywacją szlaków sygnałnych związanych z aktywacją kinazy MAP (*Mitogen-Activated Protein kinase*

– kinaza aktywowana mitogenami) [Saraiva et al.,2009], które są aktywowane wskutek oddziaływania insuliny z jej receptorem, a których stymulacja nie ulega zmianie w warunkach insulinooporności [Cusi et al.,2000]. Można zatem przypuszczać, że u niektórych chorych leczonych konwencjonalną insulinoterapią nie dochodzi do wygenerowania wystarczającego sygnału wiodącego do aktywacji tego szlaku i jednym ze skutków jest niedostateczne wytwarzanie Il-10 przez monocyty i limfocyty. Z drugiej strony, wykazano zależność pomiędzy nasileniem insulinooporności obwodowej a zmniejszonym wytwarzaniem Il-10 u chorych z zespołem metabolicznym [Van Exel et al.,2000]. Znalazło to po części potwierdzenie w wynikach badań własnych pod postacią dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem adiponektyny i stężeniem Il-10 w surowicy chorych na cukrzycę typu 2 prezentujących cechy zespołu metabolicznego. Wydaje się jednak, że wspomniany związek polega przede wszystkim na korzystnym oddziaływaniu Il-10 na nasilenie obwodowej insulinooporności [Hong et al., 2009]. U badanych chorych leczonych insuliną w monoterapii nie oceniano wprawdzie nasilenia obwodowej insulinooporności jedyną dostępną w trakcie prowadzenia badań metodą, czyli na podstawie wartości wskaźnika HOMA_{IR}, niestety bezużytecznego w odniesieniu do osób otrzymujących egzogenną insulinę, jednakże różnice stężeń rezystyny w surowicy dają podstawy, aby przypuszczać, że nasilenie insulinooporności w tej grupie było wyższe niż u pozostałych chorych na cukrzycę typu 2.

Niejako na przeciwstawnym biegunie w stosunku do grupy leczonej konwencjonalną insulinoterapią znalazły się wyniki badań własnych odnoszące się do stosowania leków doustnych, a zwłaszcza metforminy. Wskazują one na to, że leczenie metforminą, zarówno w monoterapii jak i w połączeniu z insuliną, a także leczenie pochodną sulfonilomocznika może mieć pewne pozytywne znaczenie dla modulacji procesu zapalnego towarzyszącego cukrzycy typu 2. Przeciwwzapalne działanie metforminy zostało wcześniej potwierdzone m.in. w oparciu o badania Isoda i wsp. [Isoda et al.,2008]. Autorzy wykazali, że pod wpływem metforminy dochodzi do zmniejszenia zależnego od interleukiny 1 β wydzielania Il-6 i Il-8 przez makrofagi oraz przez komórki śródbłonna i mięśnie gładkich ścian naczyń. Podobne efekty uzyskali Huang i wsp. [Huang et al.,2009] w badaniach *in vitro*, w których dodanie metforminy do hodowli komórek śródbłonna naczyń skutkowało zmniejszeniem zależnej od TNF- α sekrecji interleukiny 6. Na protekcyjną rolę metforminy mogą wskazywać również wyniki badań Hattori i wsp. [Hattori^b et al.,2006], które potwierdziły wpływ metforminy na supresję jądrowego czynnika NF- κ B. Wątpliwości co do przeciwwzapalnego działania metforminy mogą wzbudzać natomiast wyniki badań Pradhan et al. [Pradhan et al.,2009], w

których nie wykazano ograniczenia odpowiedzi zapalnej indukowanej przez białko CRP oraz Il-6 u osób leczonych metforminą.

Badania własne udowodniły bezsprzeczną „wyższość” stosowania metforminy w aspekcie przeciwdziałania procesowi zapalnemu związanemu z progresją miażdżycy w porównaniu do leczenia pochodną sulfonilomocznika, leczenia insuliną, zarówno w monoterapii, jak i w skojarzeniu z metforminą, tylko w odniesieniu do stężenia cytokin RANTES i Il-10. Natomiast w zakresie modulacji stężeń Il-1 β i Il-6 w surowicy efekt działania metforminy, jakkolwiek bardziej korzystny niż wpływ konwencjonalnej insulinoterapii, nie przewyższał działania pochodnej sulfonilomocznika czy też terapii skojarzonej z zastosowaniem insuliny i metforminy łącznie.

Odmienne wnioski sformułował Pradhan [Pradhan et al.,2009]. Badając różne schematy leczenia pod kątem ich wpływu na proces zapalny u chorych na cukrzycę typu 2 zanegował korzystny wpływ leczenia zarówno metforminą, insuliną, jak i oboma tymi lekami w skojarzeniu na nasilenie odczynu zapalnego wyrażonego stężeniem białka CRP oraz Il-6. Natomiast obserwacje poczynione na podstawie badań własnych pozwalają w sposób pośredni potwierdzić korzystne oddziaływanie metforminy na proces zapalny. W przypadku Il-1 β , Il-6 oraz chemokiny RANTES terapia insuliną w skojarzeniu z metforminą jest związana ze znacznie bardziej korzystnym profilem tych cytokin w surowicy aniżeli monoterapia insuliną. Warto przy tym podkreślić, że w grupie leczonej metodą skojarzoną przeważali chorzy, którzy byli uprzednio leczeni mieszkankami insulin w monoterapii i z powodu problemów z osiągnięciem odpowiedniego stopnia kontroli cukrzycy zastosowano u tych pacjentów dodatkowo metforminę. Pamiętając o tym, że u chorych leczonych insulinią w monoterapii nie wykazano jej korzystnego oddziaływania na nasilenie związanego z aterogenezą procesu zapalnego można przyjąć, że pozytywny wpływ metody skojarzonego leczenia insulinią z metforminą chorzy zawdzięczają przede wszystkim działaniu metforminy.

Jak wspomniano, nasilenie proaterogennego procesu zapalnego obserwowane w badaniach własnych w grupie chorych leczonych pochodnymi sulfonilomocznika wyrażone stężeniem Il-6 i Il-1 β w surowicy nie różniło się od efektów działania metforminy. Pozytywne skutki działania pochodnych sulfonilomocznika względem profilu cytokin przeciwzapalnych znalazły potwierdzenie w badaniu Drzewoskiego i wsp. [Drzewoski et al.,2006]. U chorych na cukrzycę typu 2 w wyniku leczenia gliklazidem zaobserwowano wyraźną zmniejszenie stężeń interleukiny 6 jak i TNF- α w surowicy. Podobne rezultaty uzyskał w badaniu przeprowadzonym w warunkach *in vitro* Mamputu i wsp. [Mamputu et al.,2006]. W tym

samym badaniu wykazano również wpływ gliklazydu w dawkach terapeutycznych na spowolnienie procesu różnicowania się monocytów w komórki piankowate, zatem można się spodziewać, że modulacja stężeń cytokin prozapalnych indukowana gliklazydem ma znaczenie dla zahamowania procesu miażdżycowego. Porównywalny do gliklazydu przeciwzapalny efekt działania glimepirydu potwierdzono w badaniu Koshiba i wsp. [Koshiba et al.,2006], w którym zaobserwowano reakcję na leczenie tym lekiem wyrażoną obniżeniem stężenia interleukiny 6, TNF- α i białka CRP w surowicy. Pacjenci leczeni pochodną sulfonilomocznika w ramach badań własnych otrzymywali także jeden z dwu wyżej wymienionych leków: gliklazyd lub glimepiryd. W odniesieniu do obu tych pochodnych sulfonilomocznika wielokrotnie udokumentowano działanie antyoksydacyjne towarzyszące działaniu hipoglikemizującemu [O'Brien et al.,2000;Shakuto et al. 2005] i w tym należy zapewne upatrywać przyczyn ich korzystnego wpływu na proces zapalny, tak ściśle powiązany patogenetycznie ze zjawiskiem stresu oksydacyjnego.

Badania własne obejmowały **analizę stężeń w surowicy Il-1 β i Il-6** - cytokin o dobrze udokumentowanej roli, jaką odgrywają w przebiegu procesu zapalnego i w patogenezie miażdżycy [Fisman^b et al.,2003]. Uzyskane wyniki pozwoliły spostrzec u chorych na cukrzycę typu 2 potencjalny równoległy wpływ obu tych cytokin na wspomniane procesy, niezależnie od rodzaju farmakoterapii. Tak bowiem w grupie chorych leczonych metforminą, jak i wówczas, gdy analizowano wszystkie grupy terapeutyczne łącznie, wykazano, że wyższe stężenie Il-1 β współistnieją z podwyższonymi stężeniami Il-6 w surowicy chorych na cukrzycę typu 2. Obserwacja ta pozostaje w zgodzie z wiedzą na temat funkcjonowania cytokin w organizmie ludzkim. Il-1 β bowiem stymuluje wytwarzanie wielu cytokin, w tym także Il-6 [Gołąb 2009].

Działanie Il-10 w aspekcie progresji miażdżycy i rozwoju powikłań naczyniowych u chorych na cukrzycę typu 2 ma charakter całkowicie przeciwny do efektów Il-6 i Il-1 β [Mazighi et al.2004;Fisman^b et al. 2003]. Badania własne nie ujawniły żadnych znaczących związków pomiędzy stężeniem tej cytokiny w surowicy a pozostałymi badanymi interleukinami. Natomiast ocena związku pomiędzy **zmianami stężeń Il-12 w surowicy** a nasileniem procesów proaterogennych nie jest tak jednoznaczna. Wprawdzie większość publikacji naukowych podkreśla prozapalną rolę Il-12 [Stern et al. 1996;Bacon et al.,1995], należy jednak wspomnieć, że Il-12 aktywując limfocyty T indukuje ekspresję białek tworzących struktury transporterów glukozy [Li et al.,2000], co pośrednio może mieć korzystny wpływ na nasilenie zaburzeń metabolizmu u chorych na cukrzycę. Wyniki badań własnych wykazały

istnienie ujemnej, niezbyt silnej wprawdzie, korelacji pomiędzy stężeniem Il-12 w surowicy a wartościami stężeń 1,5-AG w osoczu – wykładnika ostrej hiperglikemii u chorych leczonych metforminą. W badaniach Wegner [Wegner et al.,2008] także nie zaobserwowano żadnego istotnego związku pomiędzy parametrami kontroli cukrzycy a stężeniem Il-12 w surowicy w grupie chorych leczonych pochodnymi sulfonilomocznika. Wydaje się zatem, że istotne znaczenie w patogenezie miażdżycy może mieć wyłącznie prozapalne oddziaływanie Il-12. Jak jednak wykazano na podstawie badań własnych analizowane metody farmakologicznego leczenia nie wpływają znacząco na zmiany stężenia tej cytokiny w surowicy chorych na cukrzycę typu 2.

Interesujące okazały się wyniki badań własnych odnoszące się do najmniej dokładnie poznanej **chemokiny RANTES**. Wiedza na temat roli tej cytokiny w procesie miażdżycowym wskazuje na udział RANTES w procesie rekrutacji komórek zapalnych tj. limfocytów T, monocytów i makrofagów T do ściany naczynia [Zernecke et al.,2010;Von Hundelshausen et al.,2005;Shanmugham et al.,2006]. Efektem jej działania jest wzmożona proliferacja mięśni gładkich naczyń oraz wzrost dynamiki formowania blaszki miażdżycowej [Barlic et al.,2007]. Dodatkowo RANTES może zwiększać poziom ekspresji interleukiny 6 oraz TNF- α [Shahrara et al.,2006]. Wszystkie te procesy sprzyjają ekspansji miażdżycy, a zatem mogą niekorzystnie wpływać na występowanie powikłań u chorych na cukrzycę typu 2. Na taką możliwość wskazują wyniki badań, potwierdzające udział RANTES w rozwoju nefropatii [Nakajima et al.,2003] oraz neuropatii obwodowej [Doupis et al.,2009] towarzyszącej cukrzycy typu 2. Z szeroko zakrojonych badań MONICA/KORA [Herder et al.,2008) wynika, że na zwiększenie stężenia RANTES w surowicy chorych na cukrzycę typu 2 wpływa przede wszystkim nasilenie hiperglikemii, niezależnie od rodzaju zaburzeń dysglikemicznych. Przeprowadzona w ramach badań własnych analiza korelacyjna oraz analiza wielokrotnej regresji wykazały, że spośród licznych czynników o charakterze metabolicznym (glikemia na czczo, HbA_{1c}, 1,5-AG, profil lipidowy, stężenie homocysteiny, rezystyny, adiponektyny), czynników związanych z przebiegiem cukrzycy (wskaźnik HOMA_{IR}, stężenie peptydu C w surowicy) oraz czynników epidemiologiczno-antropometrycznych (wiek badanych, czas trwania klinicznie jawnej cukrzycy, BMI, obwód talii) w sposób niezależny od pozostałych na stężenie RANTES wpływa jedynie nasilenie ostrej hiperglikemii wyrażone stężeniem 1,5-AG w osoczu. W zgodzie z tymi wynikami pozostaje obserwacja wskazująca na występowanie najniższych stężeń 1,5-AG w grupie leczonej metforminą (test Kruskal-Wallis), w której stężenia RANTES przyjmowały wartości niższe niż we wszystkich pozostałych grupach i całkowicie odwrotna sytuacja w grupie

leczonej insulinią metodą konwencjonalną. Warto jednocześnie zauważyć, że podczas gdy stężenie 1,5-AG w wśród leczonych metforminą przyjmowało wartości mieszczące się w dolnym zakresie wartości referencyjnych przyjętych dla osób zdrowych, stężenie RANTES w surowicy tych chorych nie osiągało wartości charakterystycznych dla osób bez cukrzycy.

Cennych danych, spójnych z wynikami badań własnych, dostarczyło również badanie Lixia [Lixia et al.,2010], w którym udało się wykazać nie tylko dodatnią korelację między wartościami stężeń RANTES i nasileniem hiperglikemii, ale również związek pomiędzy wzrostem stężenia RANTES z występowaniem ostrych epizodów wieńcowych.

Wyniki wielu badań wyraźnie wskazują na udział **hiperhomocysteinemii** w progresji zmian miażdżycowych u chorych na cukrzycę typu 2 [McCully 2005]. Wiadomo także, iż proaterogenne efekty działania homocysteiny korelują ze stężeniem tego aminokwasu we krwi i przekładają się na śmiertelność osób chorych na cukrzycę typu 2 z powodu powikłań o charakterze makroangiopatii [Becker^b et al.,2003]. Wiadomo, że działanie homocysteiny jest wielokierunkowe, a tzw. hiperhomocysteinemia jest co prawda nieklasycznym, ale uznanym, czynnikiem ryzyka miażdżycy u osób chorych na cukrzycę typu 2 i ma wpływ na rozwój powikłań naczyniowych [Fruchart et al.,2004;Akalin et al.,2008; Fonseca^b et al.,2004]. Złożone proaterogenne działanie homocysteiny polega przede wszystkim na wzmaganiu procesu zapalnego [Bogdański i wsp.,2003;Su et al.,2005] i aktywności prozakrzepowej [Willoughby et al.,2002], nasilaniu stresu oksydacyjnego [Fonseca^a et al.,2000] oraz ograniczaniu wazodylatacji naczyń z uwagi na zdolności homocysteiny do indukcji wolnych rodników inaktywujących tlenku azotu [Domagała i wsp.,2002]. Istotne znaczenie ma również metabolit homocysteiny tj. tiolakton homocysteiny, zdolny do modyfikacji białek osocza i lipoprotein o małej gęstości, co sprzyja tworzeniu komórek piankowatych [Jakubowski 2008;Karolczak et al.,2009;Naruszewicz et al.,1994]. W związku z powyższymi przesłankami podjęto próbę oceny związku pomiędzy leczeniem z zastosowaniem powszechnie stosowanych leków przeciwcukrzycowych a stężeniami homocysteiny w surowicy badanych chorych. Wykazano, że stosowanie konwencjonalnej insulinoterapii wiąże się z występowaniem wyższych stężeń homocysteiny w surowicy niż w u pozostałych chorych, to jest u leczonych metforminą, u leczonych pochodną sulfonilomocznika czy też u leczonych insulinią w skojarzeniu z metforminą. Na pierwszy rzut oka wyniki te są zaskakujące w świetle obecnej wiedzy, zwłaszcza w odniesieniu do terapii metforminą. Udowodniono bowiem, że lek ten posiada zdolność do indukcji wysokich stężeń homocysteiny i może być czynnikiem sprawczym hiperhomocysteinemii [Refsum et al.,2004]. Związek pomiędzy hiperhomocysteinemią a stosowaniem metforminy został

udokumentowany w licznych pracach badawczych, jednak siła tego związku była odmienna w różnych eksperymentach [Refsum et al.,2004;Hoogeveen et al.,1997;Carlsen et al.,1997]. Wiadomo, że metformina sprzyja hiperhomocysteinemii przede wszystkim dzięki hamowaniu wchłaniania witaminy B₁₂ w jelitach [Refsum et al.,2004;Stam et al.,2005]. W badaniu Wile i wsp. [Wile et al.,2010] wykazano dodatnią korelację pomiędzy ekspozycją na działanie metforminy, podwyższeniem stężenia homocysteiny we krwi i stopniem nasilenia neuropatii obwodowej. Analogiczne wyniki badań uzyskał Bell [Bell 2010]. Prawdopodobną przyczyną tego typu powikłań jest uszkodzenie nerwów obwodowych spowodowane niedoborem witaminy B₁₂ [Bell 2010], a rola metforminy w tym przypadku ogranicza się przypuszczalnie do ingerencji w procesy wchłaniania tej witaminy z wykluczeniem roli hiperhomocysteinemii indukowanej metforminą jako bezpośredniego czynnika sprawczego. Nieoczekiwanie niskie stężenia tego proaterogennego czynnika w grupie badanych chorych stosujących metforminę mogły być spowodowane tym, iż zasoby endogennej witaminy B₁₂ u badanych były wystarczające, aby zapewnić prawidłowy przebieg procesu remetylacji homocysteiny do metioniny, mimo negatywnego oddziaływania metforminy na proces wchłaniania witaminy B₁₂. Chorzy z grupy leczonej metforminą przyjmowali bowiem ten lek zgodnie z protokołem badawczym od co najmniej trzech miesięcy poprzedzających przeprowadzenie badań, ale dla większości z nich całkowity czas trwania leczenia metforminą nie był dłuższy niż 6 miesięcy. Podobne okoliczności towarzyszyły stosowaniu metforminy w grupie chorych leczonych insuliną w skojarzeniu z metforminą. Rozwój niedoboru witaminy B₁₂ w tym stosunkowo krótkim okresie jest bardzo mało prawdopodobny i być może to stanowi po części wyjaśnienie braku niekorzystnego wpływu na stężenie metforminy w badaniach własnych. Jednocześnie nadużyciem byłoby określenie leczenia metforminą jako szczególnie korzystnie oddziałującego na poziomy homocysteiny we krwi. Wprawdzie stężenie tego proaterogennego aminokwasu wśród leczonych metforminą było zbliżone do obserwowanego u ludzi zdrowych, jednakże nie zaobserwowano różnic w odniesieniu do poziomów homocysteiny we krwi pomiędzy leczonymi metforminą a leczonymi pochodną sulfonilomocznika, czy też leczonymi insuliną w skojarzeniu z metforminą.

Wyjaśnienia, dlaczego spośród porównywanych sposobów terapii insulinoterapia konwencjonalna charakteryzuje się najbardziej niekorzystnym profilem stężeń homocysteiny w surowicy, a co więcej, jedynie ten rodzaj farmakoterapii jest związany z występowaniem zjawiska hiperhomocysteinemii, należy wiązać z rodzajem przemian metabolicznych, w których swój udział ma homocysteina i insulina. Wyniki zbliżone do uzyskanych w ramach badań własnych przedstawił Jacobs [Jacobs et al.,1998], który w badaniu na zwierzęcych

modelu cukrzycy wykazał, że stosowanie analogu insuliny ludzkiej ultralente powoduje wzrost poziomu homocysteiny we krwi. Autor ten uważa, że przyczyną takiej zmiany stężeń był wpływ insuliny na spadek aktywności β -syntazy cystationiny, odpowiedzialnej za proces transsulfuracji w wątrobie, co ostatecznie prowadzi do zwiększenia stężenia homocysteiny. Jednoznacznych dowodów na istnienie związku pomiędzy stosowaniem insuliny a zwiększeniem poziomu homocysteiny we krwi dostarczył również Gurs i wsp. [Gursu et al.,2002]. W badaniu na zwierzęcym modelu cukrzycy udowodnił, że wzrost stężenia homocysteiny jest zależny od dawki insuliny. Autor ten uważa, że zależny od insuliny wzrost stężenia homocysteiny jest prawdopodobnie uwarunkowany spowolnieniem wątrobowego metabolizmu homocysteiny na etapie transsulfuracji homocysteiny do cysteiny. Natomiast Ratman i wsp. [Ratman et al.,2002] wskazuje, iż w przebiegu cukrzycy katabolizm homocysteiny w wątrobie jest bardziej nasilony, a zatem oczywiście jest zmniejszone jej stężenie. Dopiero ekspozycja na egzogenną insulinę odwraca to zjawisko na niekorzyść, tj. powstrzymuje przemiany metaboliczne homocysteiny wynikające ze spadku aktywności enzymów katabolizujących, sprzyjając jednocześnie zwiększeniu zasobów homocysteiny i jej poziomu we krwi.

Wyniki analizy kowariancji badań własnych, wskazują na to, że nie tylko sposób leczenia cukrzycy typu 2 determinuje różnice stężeń homocysteiny pomiędzy badanymi grupami terapeutycznymi, ale również obwód talii i stężenie peptydu C we krwi. To oznacza, że na wartość stężenia homocysteiny we krwi wpływa poza metodą farmakoterapii występowanie otyłości brzusznej i czynność wydzielnicza komórek β . Jakkolwiek dostępne w piśmiennictwie publikacje raczej nie wskazują na powiązania pomiędzy występowaniem hiperhomocysteinemii i otyłości brzusznej, to potencjalny wpływ czynności wydzielniczej komórek β wysp trzustki na kształtowanie się stężeń homocysteiny we krwi wykazał Araki [Araki et al.,2005].

Z drugiej strony udowodniono, że to właśnie homocysteina wpływa na czynność wydzielniczą komórek β . W badaniu *in vitro* Patterson i wsp. [Patterson et al.,2006] zarejestrował uwarunkowane zmianami stężenia homocysteiny zmniejszenie wydzielania insuliny przez komórki β w odpowiedzi na stymulację glukozą.

Warto także poświęcić nieco uwagi roli hiperhomocysteinemii w rozwoju procesu zapalnego. Uprzednio wykazano wielokrotnie korelacje między stężeniem homocysteiny a stężeniem i ekspresją niektórych cytokin i czynników prozapalnych i proaterogennych: interleukiny 6 [Araki et al.,2005], interleukiny 1 β , interleukiny 8, interleukiny 12 [Su et al.,2005], interleukiny 10 [Dawson et al.,2004], RANTES [Holven^a et al.,2002;Sun et al.,2005],

VCAM-1 [Koga^a et al.,2002] i MCP-1 [Dai^a et al.,2006]. Mimo to, niewiele jest jednoznacznych dowodów na istnienie bezpośredniego związku między hiperhomocysteinemią a generowaniem odpowiedzi immunologicznej prowadzącej do nasilenia lub zahamowania wydzielania cytokin. Dlatego też przeprowadzone badania wzbogacono o część wykonywaną w warunkach *in vitro*, której celem było zbadanie oddziaływania homocysteiny na sekrecję wybranych cytokin przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej. Wykazano, że homocysteina posiada zdolność stymulacji tych komórek do wydzielania cytokin, jednak jej wpływ był różny w odniesieniu do poszczególnych badanych substancji. Bez wątplenia homocysteina stymuluje sekrecję interleukiny 1 β , interleukiny 6 oraz chemokiny RANTES. Badania te stanowią bezpośredni dowód na występowanie ścisłego związku pomiędzy stężeniem homocysteiny we krwi a nasileniem procesu zapalnego o proaterogennym potencjale. Należy przy tym wspomnieć, że zarówno w grupie chorych na cukrzycę typu 2 analizowanej łącznie, jak i w grupie leczonej metforminą stężenia homocysteiny w surowicy były istotnie skorelowane dodatnio ze stężeniami Il-6 i Il-1 β .

Niejako logiczną ciągłość stanowią rezultaty uzyskane w odniesieniu do wydzielania interleukiny 10 pod wpływem homocysteiny. W obecności tego aminokwasu ekspresja Il-10 ulegała wyraźnemu stłumieniu. Biorąc pod uwagę antyaterogenny profil działania interleukiny 10, występowanie tej cytokiny w niskich stężeniach należy uznać jako stan sprzyjający progresji procesu miażdżycowego i wręcz nazwać czynnikiem proaterogennym. Ciekawe rezultaty uzyskał Holven i wsp. [Holven^b et al.,2006], który udowodnił zależne od hiperhomocysteinemii nie tyle zmniejszenie wytwarzania Il-10, ile osłabienie jej działania u osób z hiperhomocysteinemią.

Pewnym zaskoczeniem okazały się wyniki badań własnych co do odpowiedzi immunologicznej uwarunkowanej obecnością homocysteiny, ocenianej na podstawie sekrecji interleukiny 12 przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej. Nie zaobserwowano bowiem żadnego istotnego wpływu homocysteiny w tym zakresie. Opinie ekspertów odnoszące się do zależności wydzielania interleukiny 12 od obecności homocysteiny są wyjątkowo skąpe. Takie zjawisko zostało potwierdzone w badaniach Su i wsp. [Su et al.,2005].

Podsumowując wyniki badań własnych, należy uznać homocysteinę jako proaterogenny czynnik, który swoją rolę w progresji miażdżycy zawdzięcza zdolności do bezpośredniego wzbudzania reakcji zapalnej, co znajduje odzwierciedlenie w panelu niektórych cytokin prozapalnych wydzielanych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej, takich jak interleukina 1 β , interleukina 6, interleukina 10 i RANTES.

Interesującym odkryciem ostatnich lat okazały się dwie adipokiny wytwarzane przede wszystkim przez tkankę tłuszczową jamy brzusznej – **adiponektyna i rezystyna**. Nie ulega obecnie wątpliwości, że obniżone stężenia adiponektyny i podwyższone stężenia rezystyny w surowicy krwi są związane z występowaniem reakcji zapalnej i wzmożeniem insulinooporności obwodowej [Brochu-Gaudreau et al. 2010;Stofkova 2010]. Jednak dane na temat wpływu farmakoterapii cukrzycy typu 2 na kształtowanie się tych czynników są wciąż niejednoznaczne [Nagi et al.,1993;Giannarelli et al.,2003;Fujita et al.,2005]. Z tego względu jednym z elementów oceny powiązań pomiędzy sposobem leczenia cukrzycy typu 2 a profilem nieklasycznych czynników proaterogennych przeprowadzonej w ramach niniejszych badań była analiza stężeń adiponektyny i rezystyny w surowicy chorych na cukrzycę typu 2 różniących się rodzajem stosowanej farmakoterapii. Wprawdzie porównanie stężeń adiponektyny poczynione przy zastosowaniu testu Kruskal-Wallis wykazało, że stosowanie pochodnej sulfonilomocznika w tym zakresie jest korzystniejsze niż leczenie konwencjonalne insuliną, ale analiza kowariancji uwzględniająca wpływ także i innych czynników na różnice w stężeniach adiponektyny pomiędzy badanymi grupami wykazała, że stężenia adiponektyny we wszystkich badanych grupach są zbliżone i, niestety, niższe niż u osób bez cukrzycy. Sugeruje to, że żadna z badanych metod farmakoterapii cukrzycy nie wywiera pożądanego wpływu stężenie adiponektyny w surowicy. Natomiast wspomniany wcześniej Drzewoski i wsp. [Drzewoski et al.,2006] wykazał wpływ gliklazydu na wzrost wydzielania adiponektyny, a w badaniu *in vitro* Kanada et al. [Kanada et al.,2008] udowodnili, że nie tylko gliklazyd, ale również glimepiryd stymuluje adipocyty do sekrecji adiponektyny. Także i Nagasaka et al. [Nagasaka et al.,2003] potwierdził korzystny wpływ glimepirydu na poziom adiponektyny, a jednocześnie okazało się, że podobny sposób działania w tym zakresie prezentuje metformina. W badaniach *in vitro* i *in vivo* prowadzonych przez Zulian et al. [Zulian et al.,2011] stwierdzono wpływ stosowania metforminy na wzrost sekrecji adiponektyny przez tkankę tłuszczową trzewną. Niemniej, zdecydowana większość prac badawczych wyklucza hipotezę, iż metformina może modulować czynność wydzielniczą tkanki tłuszczowej w odniesieniu do adiponektyny [Philips et al.,2003;Huypens et al.,2005;Fujita et al.,2005;Moreno-Navarrete et al.,2011]. Jak widać, opinie na temat stężenia adiponektyny w kontekście stosowanej metody farmakoterapii cukrzycy nie są spójne.

Podobnej analizie poddano inną adipokinę - rezystynę, której nazwa związana jest z faktem współistnienia jej wysokich stężeń w surowicy wraz z nasiloną insulinoopornością obwodową [Blagoev et al.,2002]. Analiza kowariancji przeprowadzona w ramach badań własnych wykazała różnice stężeń tej adipokiny w surowicy zarówno między grupami

leczonymi metforminą, leczonymi insuliną w skojarzeniu z metforminą oraz leczonymi pochodną sulfonilomocznika, a grupą chorych poddawanych konwencjonalnej insulinoterapii. W tej ostatniej grupie stężenie rezystyny było znamienne wyższe niż we wszystkich pozostałych grupach. Prace badawcze oceniające ewentualny związek między farmakoterapią cukrzycy a stężeniem rezystyny w surowicy nie dostarczają jednoznacznych dowodów na określony kierunek tych zależności. Wykazano m.in., że pod wpływem metforminy maleje stężenie rezystyny we krwi [Żurawska-Kliś i wsp.,2011], bądź zmniejsza się jej ekspresja w obrębie wątroby [Sheng et al.,2008]. Inne badania na modelu zwierzęcym [Fujita et al.,2005] udowodniły, że metformina zwiększa ekspresję rezystyny, a insulina powoduje przeciwny efekt. Powyższe wyniki mogą też sugerować, iż metformina poprzez redukcję hiperinsulinemii może jednocześnie modulować ekspresję rezystyny i pośrednio wpływać na jeden z czynników proaterogennych, jakim jest insulinooporność. Nie udało się potwierdzić tej hipotezy w badaniach własnych. Brak zależności pomiędzy stężeniem rezystyny a insulinoopornością obwodową wyrażoną wskaźnikiem $HOMA_{IR}$ w grupie osób leczonych metforminą, pozwala sądzić, że wpływ tej metody leczenia na poziom rezystyny nie związku z poprawą wrażliwości tkanek obwodowych na działanie insuliny.

W przypadku obu badanych cytokin uwagę przykuwa dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem adiponektyny a stężeniem Il-10 w surowicy oraz pomiędzy stężeniem rezystyny a stężeniem Il-6 w surowicy chorych na cukrzycę. Można uznać tę obserwację za pośredni dowód na istnienie związku pomiędzy zmianami stężenia tych cytokin w surowicy a występowaniem czynników prozapalnych odgrywających istotną rolę w procesie miażdżycowym.

Warto zwrócić uwagę na kolejny czynnik o znaczeniu proaterogennym – **hiperglikemię poposiłkową**, tym bardziej, że jej zdolność do generowania promiażdżycowych mechanizmów została dość dobrze poznana. Niestety, brak wystandaryzowanych metod badania tego parametru znacznie utrudnia jego ocenę. Pomimo tych problemów, opanowanie hiperglikemii poposiłkowej jest jednym z najważniejszych celów terapeutycznych z uwagi na wybitnie niekorzystne następstwa tego zjawiska, dotyczące powikłań o charakterze mikro- i makroangiopatii [Ceriello^a 2005]. Rola hiperglikemii poposiłkowej w przebiegu procesu miażdżycowego jest ściśle związana z nasileniem stresu oksydacyjnego [Monnier et al.,2006] oraz insulinooporności obwodowej [Nomiya et al.,2004], z upośledzeniem uwalniania tlenu azotu z komórek śródbłonna, co determinuje zaburzenia relaksacji mięśni gładkich naczyń [Ceriello^d et al.,2002]. Ponadto hiperglikemia poposiłkowa wzmaga wytwarzanie molekuł adhezji (VCAM-1 i ICAM-1), selektyn [Quagliari et al.,2005], prozapalnych cytokin (Il-6, TNF- α) [Morohoshi et al.,1996], nasila procesy glikacji i oksydacji lipoprotein LDL [Ceriello^c

et al.,1999] oraz nasila procesy krzepnięcia spowalniając jednocześnie procesy fibrynolizy [Ceriello^a et al.,2005]. W badaniach własnych, dla oceny ostrych epizodów hiperglikemii wykorzystano pomiar stężenia 1,5-AG w osoczu. Opierając się o wyniki analizy przeprowadzonej w celu porównania badanych grup terapeutycznych, zaobserwowano, że poziom 1,5-AG jest niższy u leczonych konwencjonalną insulinoterapią niż u leczonych metforminą i u leczonych pochodną sulfonilomocznika. Wydawałoby się zatem, że metoda terapeutyczna cukrzycy typu 2 może mieć znaczenie w modyfikacji hiperglikemii poposiłkowej i dzięki temu odgrywać rolę w prewencji powikłań u osób chorych na cukrzycę typu 2. Takie przypuszczenie podważyła jednak analiza kowariancji, która wskazała, iż różnice te mają charakter wtórny i uwarunkowane są przede wszystkim stanem czynnościowym komórek β wyrażonym pod postacią stężeń peptydu C w surowicy na czczo oraz poziomem HbA_{1c}. Uzyskane wyniki znajdują uzasadnienie w patomechanizmie ostrej hiperglikemii, której występowanie w dużej mierze uzależnione jest od zaburzeń sekrecji insuliny [Suzuki et al. 2003;Del Prato et al.2003] oraz w znajomości właściwości 1,5-AG, jako wskaźnika ostrej hiperglikemii. Należy bowiem wziąć pod uwagę, że długotrwałe zaburzenia gospodarki węglowodanowej wyrażone wyższymi poziomami HbA_{1c} prawie zawsze korelują z wartościami stężeń 1,5-AG w osoczu. Nie istnieją bowiem wówczas warunki, w których mogłoby dojść do szybkiej normalizacji tego ostatniego parametru i w tym wypadku wartości HbA_{1c} kształtują wartości 1,5-AG. Dlatego też proponuje się stosowanie oznaczania 1,5-AG przede wszystkim u tych chorych, u których poziomy HbA_{1c} nie odbiegają od wartości charakterystycznych dla osób zdrowych w celu wykrycia przemijających i krótkotrwałych epizodów ostrej hiperglikemii [Dworacka^a et al.,2005]. Chorzy z badanych grup charakteryzowali się jednak tylko umiarkowanie dobrym wyrównaniem metabolicznym cukrzycy wyrażonym przez stężenia HbA_{1c} we krwi i z tego powodu przewlekła hiperglikemia znacznie silniej różnicowała badane grupy, aniżeli wartości stężeń 1,5-AG w osoczu. Biorąc to pod uwagę należy przypuszczać, iż rodzaj farmakoterapii cukrzycy typu 2 *per se*, w odniesieniu do stężeń 1,5-anhydro-D-glucitolu, ma znaczenie tylko dla części chorych, zwłaszcza dla tych charakteryzujących się mniejszymi zaburzeniami w zakresie funkcji wydzielniczej komórek β i mniejszym nasileniem przewlekłej hiperglikemii.

Podsumowując można stwierdzić, że badane metody farmakoterapii cukrzycy typu 2 nie zapewniają pożądanej modyfikacji wielu badanych nieklasycznych czynników proaterogennych, jakkolwiek najkorzystniejszym profilem w tym zakresie charakteryzuje się leczenie metforminą, a najmniej korzystnym – stosowanie konwencjonalnej insulinoterapii.

Wnioski

1. Stosowanie metforminy lub stosowanie pochodnych sulfonilomocznika oraz stosowanie terapii skojarzonej insuliną z metforminą u chorych na cukrzycę typu 2 jest związane z podobną ekspresją nieklasycznych czynników proaterogennych, takich jak zwiększone stężenie w surowicy homocysteiny, rezystyny, interleukin Il-1 β i Il-6.
2. Chorzy na cukrzycę typu 2 leczeni insuliną metodą konwencjonalną charakteryzują się najmniej korzystnym profilem takich czynników proaterogennych jak wysokie stężenie homocysteiny, rezystyny, Il-1 β , Il-6 i RANTES oraz obniżone stężenie Il-10 w surowicy w porównaniu do chorych leczonych metforminą, leczonych pochodnymi sulfonilomocznika, a także w porównaniu do leczonych insuliną w skojarzeniu z metforminą.
3. Stosowanie metforminy u chorych na cukrzycę typu 2 może skuteczniej ograniczać wpływ takich czynników proaterogennych jak niskie stężenie Il-10 i wysokie stężenie RANTES w surowicy w porównaniu do leczenia pochodną sulfonilomocznika czy insuliną w skojarzeniu z metforminą.
4. Żadna z badanych metod farmakologicznego leczenia cukrzycy nie pozwala na zmodyfikowanie większości badanych czynników proaterogennych do poziomu obserwowanego u osób zdrowych.
5. Na kształtowanie się poszczególnych, badanych czynników proaterogennych, poza sposobem farmakoterapii cukrzycy, mają w różnym stopniu wpływ takie czynniki jak zaawansowanie otyłości brzusznej, nasilenie poposiłkowej i przewlekłej hiperglikemii, nasilenie insulinooporności obwodowej oraz czynność komórek beta wysp trzustki.
6. Homocysteina stanowi silny czynnik potęgujący sekrecję proaterogennych cytokin Il-1 β , Il-6, RANTES i ograniczający wydzielanie antyaterogennej cytokiny Il-10 przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej.
7. Można przypuszczać, że przyczyną podwyższonych stężeń cytokin Il-1 β i Il-6 występujących w surowicy chorych na cukrzycę typu 2 jest zwiększone stężenie rezystyny i homocysteiny, natomiast obniżone stężenia Il-10 związane są z niedoborem adiponektyny w surowicy.

Wniosek końcowy:

Badane metody farmakoterapii cukrzycy typu 2 nie zapewniają pożądanej modyfikacji wielu nieklasycznych czynników proaterogennych, jakkolwiek najkorzystniejsze ich wartości obserwowano w czasie leczenia metforminą, a najmniej korzystne – gdy stosowano konwencjonalną insulinoterapię.

Streszczenie

Skuteczne leczenie cukrzycy typu 2, również leczenie farmakologiczne, powinno prowadzić nie tylko do zniwelowania bieżących objawów choroby, ale także winno maksymalnie ograniczać ryzyko rozwoju przewlekłych powikłań, w tym powikłań naczyniowych na podłożu miażdżycy – głównej przyczyny zwiększonej śmiertelności i chorobowości w tej grupie osób. Istnieje jednak szereg niejasności i rozbieżności w odniesieniu do wpływu poszczególnych leków i schematów terapeutycznych stosowanych w leczeniu cukrzycy na kształtowanie się tzw. nieklasycznych czynników proaterogennych.

Głównym celem pracy było wyjaśnienie, która z często stosowanych w praktyce klinicznej metod farmakoterapii cukrzycy jest związana z najkorzystniejszym, z punktu widzenia profilaktyki miażdżycy, profilem nieklasycznych czynników proaterogennych takich jak stężenie homocysteiny, adiponektyny i rezystyny w surowicy, stężenie cytokin Il-1 β , Il-6, Il-12, Il-10, RANTES w surowicy oraz nasilenie poposiłkowej hiperglikemii. Dla realizacji tego założenia przeprowadzono także porównanie nasilenia badanych czynników pomiędzy chorymi na cukrzycę typu 2 różniącymi się sposobem farmakoterapii a grupą osób zdrowych.

Zaplanowane badania miały także na celu ocenę związków przyczynowo-skutkowych pomiędzy poddanymi analizie nieklasycznymi czynnikami proaterogennymi.

Istotnym celem zaplanowanych badań było również wykazanie ewentualnych zależności pomiędzy badanymi nieklasycznymi czynnikami proaterogennymi a wyrównaniem metabolicznym cukrzycy, jak również pomiędzy tymi czynnikami a czynnością komórek beta wysp trzustki i/lub nasileniem obwodowej insulinooporności.

Ogółem zbadano 219 osób w tym 182 chorych na cukrzycę typu 2 leczonych od co najmniej 3 miesięcy jednym z wymienionych schematów terapeutycznych: 89 osób - metforminą w monoterapii, 31 osób - insuliną w skojarzeniu z metforminą, 31 osób - pochodną sulfonylomocznika i 31 osób – insuliną metodą konwencjonalną, a także przebadano 37 osób bez zaburzeń metabolicznych.

U badanych chorych na cukrzycę typu 2 oraz u osób należących do grupy kontrolnej oznaczono: metodami standardowymi - glikemię na czczo w osoczu krwi żyłnej, stężenie hemoglobiny glikowanej HbA_{1c} we krwi pełnej, stężenie cholesterolu całkowitego, jego frakcji HDL i LDL oraz stężenie triglicerydów w surowicy, metodą enzymatyczną oznaczono stężenie 1,5-anhydro-D-glucitolu w osoczu, metodami immunoenzymatycznymi - stężenie insuliny i peptydu C w surowicy na czczo, stężenie homocysteiny, adiponektyny i rezystyny w surowicy, metodą cytofluorymetrii przepływowej zbadano natomiast stężenie cytokin Il-

1 β , Il-6, Il-10, Il-12, RANTES w surowicy. Przeprowadzono także izolację i 72-godzinną hodowlę komórek jednojądrzastych krwi obwodowej pochodzących od osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej w obecności homocysteiny oraz bez jej obecności w podłożu. W nadsącach pochodzących z hodowli oznaczono stężenie cytokin Il-1 β , Il-6, Il-10, Il-12, RANTES metodą cytofluorymetrii przepływowej.

Porównując chorych na cukrzycę typu 2 z osobami zdrowymi testem Kruskal-Wallis wykazano, że stężenie homocysteiny w surowicy u chorych leczonych pochodną sulfonilomocznika i u chorych leczonych insuliną było wyższe niż u osób zdrowych, natomiast u chorych leczonych metforminą i leczonych insuliną w skojarzeniu z metforminą było zbliżone do stężenia homocysteiny w surowicy obserwowanego w grupie kontrolnej. Stężenie adiponektyny u wszystkich chorych na cukrzycę, niezależnie od sposobu farmakoterapii, było niższe niż u osób zdrowych, podczas gdy stężenie rezystyny u chorych na cukrzycę u leczonych insuliną w monoterapii było znamienne wyższe niż zaobserwowane w grupie kontrolnej. Stężenia cytokin Il-1 β , Il-6, Il-12 i RANTES w surowicy chorych na cukrzycę typu 2 było wyższe niż wśród osób zdrowych, niezależnie od rodzaju farmakoterapii cukrzycy. Natomiast stężenie Il-10 w surowicy i stężenie 1,5-anhydro-D-glucitolu w osoczu chorych na cukrzycę było niższe dla każdego rodzaju farmakoterapii w porównaniu z grupą kontrolną.

Analizując zróżnicowanie pomiędzy poszczególnymi grupami terapeutycznymi chorych na cukrzycę typu 2 w zakresie badanych parametrów stwierdzono, że stężenie homocysteiny w surowicy u chorych leczonych insuliną w monoterapii było znamienne wyższe niż we wszystkich pozostałych grupach terapeutycznych, które jednocześnie nie różniły się pomiędzy sobą w zakresie stężeń homocysteiny. Stężenie adiponektyny w surowicy chorych na cukrzycę typu 2, u których uwzględniono wpływ czynników metaboliczno-antropologicznych na kształtowanie się tego czynnika, nie wykazywało różnic związanych ze sposobem farmakoterapii cukrzycy, natomiast stężenie rezystyny w grupie leczonej insuliną było wyższe niż pozostałych grupach nie różniących się istotnie pomiędzy sobą. Podobnie kształtowały się stężenia IL-1 β i Il-6 w surowicy. Nie stwierdzono natomiast różnic pomiędzy badanymi grupami terapeutycznymi w zakresie stężeń Il-12 w surowicy. Stężenie Il-10 w surowicy było istotnie wyższe w grupie chorych leczonych metforminą w porównaniu do leczonych insuliną w monoterapii oraz w odniesieniu do leczonych pochodną sulfonilomocznika. Stwierdzono, że leczeni metforminą charakteryzują się niższymi stężeniami cytokiny RANTES, a leczeni insuliną w monoterapii - wyższymi stężeniami tej cytokiny w surowicy niż wszystkie pozostałe grupy terapeutyczne. Na podstawie analizy

kowariancji wykazano, że na różnice w zakresie analizowanych czynników wpływają także niektóre czynniki antropometryczne i metaboliczne: obwód talii i stężenie peptydu C modyfikują różnice w zakresie stężeń homocysteiny, stężenie peptydu C i glikemia na czczo – różnice w zakresie stężeń Il-1 β , glikemia na czczo i HbA_{1c} - w zakresie stężeń Il-6 oraz stężenie 1,5-anhydro-D-glucitol w osoczu - w zakresie stężeń RANTES.

Zbadano także zależności pomiędzy wybranymi czynnikami pro- i antyaterogennymi a parametrami charakteryzującymi przebieg kliniczny cukrzycy typu 2 oraz wzajemne relacje badanych czynników związanych z patogenezą miażdżycy. Najistotniejsze statystycznie korelacje dodatnie, zarówno w grupie chorych na cukrzycę typu 2 analizowanej łącznie, jak i wśród leczonych metforminą, zaobserwowano pomiędzy stężeniami Il-1 β i Il-6 a stężeniem homocysteiny w surowicy, oraz pomiędzy stężeniem Il-6 a stężeniem rezystyny w surowicy. W grupie leczonej metforminą wykazano dodatnią zależność pomiędzy stężeniem adiponektyny i stężeniem Il-6 a stężeniem insuliny w surowicy na czczo i wartościami współczynnika HOMA_{IR}, a także pomiędzy stężeniem adiponektyny a stężeniem Il-10 w surowicy. Analiza wielokrotnej regresji pozwoliła wskazać na stężenie rezystyny w surowicy jako na czynnik modyfikujący w sposób niezależny stężenie Il-6 w surowicy, a także wykazała, że stężenie RANTES w surowicy uwarunkowane jest przede wszystkim poziomem 1,5-anhydro-D-glucitol w osoczu.

Na podstawie badania sekrecji cytokin pro- i antyaterogennych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej pochodzące od osób zdrowych zaobserwowano, że wytwarzanie Il-1 β , Il-6 oraz RANTES przez te komórki wzrasta, podczas gdy wytwarzanie Il-10 ulega obniżeniu w obecności homocysteiny. Natomiast sekrecja Il-12 nie ulega zmianie pod jej wpływem.

Na podstawie przeprowadzonych badań, sformułowano następujące **wnioski**:

8. Stosowanie metforminy lub stosowanie pochodnych sulfonilomocznika oraz stosowanie terapii skojarzonej insuliną z metforminą u chorych na cukrzycę typu 2 jest związane z podobną ekspresją nieklasycznych czynników proaterogennych, takich jak zwiększone stężenie w surowicy homocysteiny, rezystyny, interleukin Il-1 β i Il-6.
9. Chorzy na cukrzycę typu 2 leczeni insuliną metodą konwencjonalną charakteryzują się najmniej korzystnym profilem takich czynników proaterogennych jak wysokie stężenie homocysteiny, rezystyny, Il-1 β , Il-6 i RANTES oraz obniżone stężenie Il-10 w surowicy w porównaniu do chorych leczonych metforminą, leczonych pochodnymi

sulfonylomocznika, a także w porównaniu do leczonych insuliną w skojarzeniu z metforminą.

10. Stosowanie metforminy u chorych na cukrzycę typu 2 może skuteczniej ograniczać wpływ takich czynników proaterogennych jak niskie stężenie Il-10 i wysokie stężenie RANTES w surowicy w porównaniu do leczenia pochodną sulfonylomocznika czy insuliną w skojarzeniu z metforminą.
11. Żadna z badanych metod farmakologicznego leczenia cukrzycy nie pozwala na zmodyfikowanie większości badanych czynników proaterogennych do poziomu obserwowanego u osób zdrowych.
12. Na kształtowanie się poszczególnych, badanych czynników proaterogennych, poza sposobem farmakoterapii cukrzycy, mają w różnym stopniu wpływ takie czynniki jak zaawansowanie otyłości brzusznej, nasilenie poposiłkowej i przewlekłej hiperglikemii, nasilenie insulinooporności obwodowej oraz czynność komórek beta wysp trzustki.
13. Homocysteina stanowi silny czynnik potęgujący sekrecję proaterogennych cytokin Il-1 β , Il-6, RANTES i ograniczający wydzielanie antyaterogennej cytokiny Il-10 przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej.
14. Można przypuszczać, że przyczyną podwyższonych stężeń cytokin Il-1 β i Il-6 występujących w surowicy chorych na cukrzycę typu 2 jest zwiększone stężenie rezystyny i homocysteiny, natomiast obniżone stężenia Il-10 związane są z niedoborem adiponektyny w surowicy.

Wniosek końcowy:

Badane metody farmakoterapii cukrzycy typu 2 nie zapewniają pożądanej modyfikacji wielu nieklasycznych czynników proaterogennych, jakkolwiek najkorzystniejsze ich wartości obserwowano w czasie leczenia metforminą, a najmniej korzystne – gdy stosowano konwencjonalną insulinoterapię.

The selected non-classical pro-atherogenic factors in relation to the pharmacotherapy of type 2 diabetes.

Summary

The effective treatment of type 2 diabetes, including pharmacotherapy, should lead not only to overcome the current symptoms, but also should maximally reduce the risk of development of chronic complications, including vascular complications of atherosclerosis – the main cause of increased mortality and morbidity in this group. However, there are a lot of ambiguities and discrepancies regarding to the impact of individual drugs or therapeutic regimens for the treatment of diabetes affecting non-classical, pro-atherogenic factors.

The main goal of this work was to explain which of the pharmacotherapy methods of diabetes frequently used in clinical practice, is associated with the most beneficial profile of non-classical, pro-atherogenic factors, from the atherosclerosis prevention point of view, like homocysteine, adiponectin and resistin serum concentrations, serum concentrations of Il-1 β , Il-6, Il-12, Il-10, RANTES and severity of postprandial hyperglycaemia. To realize these assumptions the comparison of the selected factors between patients with diabetes type 2 varying in pharmacotherapy and the healthy subjects was scheduled.

The aim of the study was also to assess the cause-and-effect relations between the examined non-classical pro-atherogenic factors.

The essential aim of this study was to show the potential relationship between the studied non-classical pro-atherogenic factors and metabolic control of diabetes as well as between these factors and pancreatic beta cells function and/or peripheral insulin resistance.

The total of 219 persons were examined including 182 patients with type 2 diabetes treated for at least 3 months with one of the following therapeutic regimens: 89 persons – with metformin alone, 31 people – with insulin in combination with metformin, 31 people – with sulfonylurea, 31 people – with conventional insulin therapy and 37 people with no metabolic disorders were examined, too.

Measurements were made in diabetic patients and control group of: venous fasting plasma glucose, the concentration of glycated hemoglobin HbA_{1c} in blood, total serum cholesterol level, HDL and LDL fractions and serum triglyceride concentration using routine laboratory methods, 1,5-anhydro-D-glucitol plasma level by enzymatic method, the fasting serum insulin and C peptide levels, homocysteine, adiponectin and resistin serum concentrations by immunoenzymatic method and serum concentration of Il-1 β , Il- 6, Il-12, Il-10, RANTES

using flow cytometry. The isolation and 72-hour culture of peripheral blood mononuclear cells from people without disorders of carbohydrate metabolism was also carried out with or without homocysteine in the culture medium. The concentrations of IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, RANTES were detected in the culture supernatants using flow cytometry method.

Comparing patients with type 2 diabetes with healthy subject using Kruskal-Wallis test it was shown that homocysteine levels in patients treated with sulfonylurea and in patients treated with insulin were higher than in healthy subjects, whereas in patients treated with metformin and insulin in combination with metformin were similar to those observed in the control group. Adiponectin serum levels in all patients with diabetes, regardless of pharmacotherapy, were lower than in healthy subjects, whereas resistin serum concentrations in patients with diabetes treated with insulin only were significantly higher than those observed in the control group. Concentrations of IL-1 β , IL-6, IL-12 and RANTES in the sera of type 2 diabetic patients with were higher than in healthy individuals, independent on type of diabetes treatment. However, IL-10 concentrations in sera and 1,5-anhydro-D-glucitol plasma levels of patients with diabetes were lower for each type of pharmacotherapy when compared to the control group.

Analyzing differences among the therapeutic groups of diabetic patients considering examined parameters, it was found that the concentration of homocysteine in the serum of patients treated with insulin in monotherapy was significantly higher than observed in every other therapeutic groups, which didn't vary among themselves in this matter. There were no significant differences among serum adiponectin concentrations in patients with type 2 diabetes varying in pharmacotherapy, when metabolic and anthropometric factors were taken into consideration, while resistin serum concentration was higher in insulin-treated group than in other diabetic groups, similar each to other in this case. The differences in serum IL-1 β and IL-6 levels were the same as described with resistin. There were no differences between the therapeutic groups in the IL-12 serum concentrations. IL-10 concentrations in sera were significantly higher in patients treated with metformin than in patients treated with insulin in monotherapy and than patients receiving sulfonylurea. It was revealed that for patients treated with metformin lower concentrations of cytokine RANTES and for patients treated with insulin alone - higher concentrations of this cytokine in the sera than in each other therapeutic groups are characteristic. Analysis of covariance showed that differences in the analyzed factors are also affected by some anthropometric and metabolic factors: waist circumference and C-peptide levels modify the differences in the homocysteine concentrations, C-peptide level and fasting glucose - in terms of concentrations of IL-1 β , fasting plasma glucose and

HbA_{1c} – in relation to the serum concentrations of Il-6, and 1,5-anhydro-D-glucitol concentration in plasma modifies RANTES serum levels.

The relationship between selected pro- and anti-atherogenic factors and parameters related to the clinical course of type 2 diabetes were examined as well as and the reciprocal relations between analyzed factors related to the pathogenesis of atherosclerosis. The most significant positive correlations, considering patients with type 2 diabetes analyzed together or patients treated with metformin, were observed between serum concentrations of Il-1 β and Il-6 and serum homocysteine levels and between Il-6 and resistin serum concentrations. In the metformin group a positive correlation was found between serum adiponectin, Il-6 levels and fasting insulin serum concentrations or HOMA_{IR} index value and also positive correlation between adiponectin and IL-10 concentrations in the serum. Multiple regression analysis showed that resistin concentration in serum is a factor independently modifying Il-6 levels in sera of diabetic patients. It was also found that RANTES serum concentrations are mainly determined by the 1,5-anhydro-D-glucitol plasma levels.

The examination of the secretion of pro- and antiatherogenic cytokines by peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects was revealed that the production of Il-1 β , IL-6 and RANTES by these cells increases, while the Il-10 production is reduced in the presence of homocysteine in culture medium. However, Il-12 secretion is not altered by homocysteine.

Conclusions

1. The therapeutic regimes in type 2 diabetic patients including metformin or sulfonylureas or insulin combined with metformin are related to the similar expression of the non-classical pro-atherogenic factors like the increased homocysteine, resistin, Il-1 β and Il-6 serum levels.
2. Type 2 diabetic patients treated with conventional insulin therapy are characterized by much less beneficial profile of pro-atherogenic factors like increased homocysteine, resistin, Il-1 β , Il-6 and RANTES levels and decreased Il-10 serum concentrations in comparison to metformin-treated, to sulfonylurea-treated and to insulin in combination with metformin – treated subjects.
3. Metformin given alone could be more effective in beneficial modification of Il-10 and RANTES levels comparing to sulfonylurea or to insulin combined with metformin.
4. None of examined therapeutic regimens allows to modify the most of selected pro-atherogenic factors to the range observed in healthy subjects.
5. The expression of individual pro-atherogenic factors are affected, except by the type pharmacotherapy, in different extent by another factors like abdominal obesity,

postprandial and chronic hyperglycaemia, peripheral insulin resistance and beta-cells function.

6. Homocysteine is a potent factor inducing increased Il-1 β , Il-6, RANTES secretion and decreased Il-10 secretion peripheral blood mononuclear cells.
7. It could be supposed that the reason of the increased serum Il-1 β and Il-6 levels in type 2 diabetic patients is the increased resistin and homocysteine serum concentrations, while the decreased Il-10 serum levels in those patients are related to the adiponectin deficiency.

The final conclusion

The examined pharmacotherapeutic regimens used in patients with diabetes type 2 do not provide them the desired modification of non-classical pro-atherogenic factors. Nevertheless, the most beneficial profile of those factors is related to the metformin use and the last beneficial – to the conventional insulin treatment.

Adler G.: Cytokiny w początkowych etapach odpowiedzi odpornościowej. *Reumatologia* 2009;47,4:230-235.

Ahmann A.J., Riddle M.C.: Współczesne leki przeciw cukrzycy typu 2. *Medycyna po Dyplomie* 2002;11:145-56.

Ahren B.: Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors clinical data and clinical implications. *Diabetes care* 2007;30,6:1344-1350.

Akalin A., Alatas O., Colak O.: Relation of plasma homocysteine levels to atherosclerotic vascular disease and inflammation markers in type 2 diabetic patients. *Eur J Endocrinol* 2008; 158(1):47-52.

Akanuma Y., Morita M., Fukuzawa N., Yamanouchi T., Akanuma H.: Urinary excretion of 1,5-anhydro-D-glucitol accompanying glucose excretion in diabetic patients. *Diabetologia* 1988;11: 831–835

Aljada A., Saadeh R., Assian E., Ghanim H., Dandona P.: Insulin inhibits the expression of intercellular adhesion molecule-1 by human aortic endothelial cells through stimulation of nitric oxide. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2572–2575.

Andersson C.X., Sopasakis V.R., Wallerstedt E., Smith U.: Insulin antagonizes interleukin-6 signaling and is anti-inflammatory in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2007;282: 9430-5.

Apeland T., Mansoor M.A., Strandjord R.E.: Antiepileptic drugs are as independent predictors of plasma total homocysteine levels. *Epilepsy Res* 2001;47:27-36.

Arai K., Lee F., Miyajima A., Miyatake S., Arai N., Yokota T.: Cytokines: coordinators of immune and inflammatory response. *Ann Rev Biochem* 1999;59:783-836.

Araki A., Hosoi T., Orimo H., Ito H.: Association of plasma homocysteine with serum interleukin-6 and C-peptide levels in patients with type 2 diabetes. *Metab* 2005;54(6):809-14.

Araki T., Emoto M., Konishi T., Ikuno Y., Lee E., Teramura M., Motoyama K., Yokoyama H., Mori K., Koyama H., Shoji T., Nishizawa Y.: Glimepiride increases high-density lipoprotein cholesterol via increasing adiponectin levels in type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2009;58,143–148.

Arita Y., Kihara S., Ouchi N., Maeda K., Kuriyama H., Okamoto Y., Kumada M., Hotta K., Nishida M., Takahashi M., Nakamura T., Shimomura I., Muraguchi M., Ohmoto Y., Funahashi T., Matsuzawa Y.: Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation* 2002;105:2893-2898.

Ashcroft^a F.M., Gribble F.M.: ATP-sensitive K⁺channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 1999;42:903–919.

Ashcroft^b F.M., Gribble F.M.: Tissue-specific effects of sulfonylureas lessons from studies of cloned K(ATP) channels. *J Diabetes Complications* 2000;14(4):192-6.

Bacon C.M., Petricoin E.F., Ortaldo J.R., Rees R.C., Lerner A.C., Johnston J.A., O'Shea J.J.: Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7307-11.

Baggiolini M.: Chemokines in pathology and medicine. *J Int Med* 2001;250:91-104.

Bailey^b C.J.: Metformin: effect on micro- and macrovascular complications in type 2 diabetes. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2008;22(3):215-24.

Banas B., [Luckow B.](#), [Möller M.](#), [Klier C.](#), [Nelson P.J.](#), [Schadde E.](#), [Brigl M.](#), [Halevy D.](#), [Holthöfer H.](#), [Reinhart B.](#), [Schlöndorff D.](#): Chemokine and chemokine receptor expression in a novel human mesangial cell line. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(11):2314-22.

Banerjee R., Rangwala S., Shapiro J., Rich A.S., Rhoades B., Qi Y., Wang J., Rajala M.W., Szwegold N.R., Greaves D.R., Ahima R.S., Lazar M.A.: Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 2004;303:1195-1198.

Banga A., Unal R., Tripathi P., Pokrovskaya I., Owens R.J., Kern P.A., Ranganathan G.: Adiponectin translation is increased by the PPARgamma agonists pioglitazone and omega-3 fatty acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;(296) 3:E480-9.

Barlic J., Murphy M.: Chemokine regulation of atherosclerosis. *J Leukocyte Biol* 2007;82.

Barton B.: Il-6: insight into novel biological activities. *Clin Immunol Immunop* 1997; 85,1,16-20.

Beacher-Allan C., Viglietta V., Hafler D.A.: Human CD4+CD25+ regulatory cells. *Semin Immunol* 2004;16(2) 89-98.

Becker^a A., Smulders Y.M., van Guldener C.: Epidemiology of homocysteine as a risk factor in diabetes. *Metab Syndr Relat Disord* 2003;1(2):105-20.

Becker^b A., Henry R.M., Kostense P.J., Jakobs., T. Teerlink, A. Zweegman, J.M. Dekker, G. Nijpels, R.J. Heine, L.M. Bouter, Y.M. Smulders, C.D.A. Stehouwer .: Plasma homocysteine and S-adenosylmethionine in erythrocytes as determinants of carotid intima-media thickness: different effects in diabetic and non-diabetic individuals. The Hoorn Study. *Atherosclerosis* 2003;169:323-330.

Beisswenger P.J., Howell S.K., Touchette A.D., Lal S., Szwegold B.S.: Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;48:198-202.

Bell D.S.: Metformin-induced vitamin B12 deficiency presenting as a peripheral neuropathy. [South Med J](#) 2010;103(3):265-7.

Biscetti F., Straface G., Pitocco D., Zaccardi F., Ghirlanda G., Flex A.: Peroxisome proliferator-activated receptors and angiogenesis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009;19(11):751-9.

Blagoev B., Kratchmarova I., Nielsen M. M., Fernandez M. M., Voldby J., Andersen J. S., Kristiansen K., Pandey A., Mann M.: Inhibition of Adipocyte Differentiation by Resistin-like Molecule alpha. *J Biol Chem* 2002;277,44,42011–42016.

Blonde L., Klein E.J., Han J., Zhang B., Mac S. M., Poon T. H.: Interim analysis of the effects of exenatide treatment on A1C, weight and cardiovascular risk factors over 82 weeks in 314 overweight patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2006;8: 436–447.

Blüher M., Fasshauer M., Tönjes H., Kratzsch J., Schön M.R., Paschke R.: Association of interleukin-6, C-reactive protein, interleukin-10 and adiponectin plasma concentrations with measures of obesity, insulin sensitivity and glucose metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2005;113:534-537.

Bogdański P., Pupek-Musialik D., Łuczak M., Cymerys M., Kopczyński J., Bryl W.: Ocena stężenia homocysteiny i wybranych markerów procesu zapalnego u osób z klinicznymi cechami insulinooporności. *Diabet Dośw Klin* 2003;3(3):261-7.

Bønaa K.H., Njolstad I., Ueland P.M., [Schirmer H.](#), [Tverdal A.](#), [Steigen T.](#), [Wang H.](#), [Nordrehaug J.E.](#), [Arnesen E.](#), [Rasmussen K.](#): NORVIT Trial Investigators: Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 254:1578–1588.

Bonora E., Muggeo M.: Postprandial blood glucose as a risk factor for cardiovascular disease in type II diabetes: the epidemiological evidence. *Diabetologia* 2001;44:2107-14.

Boring L., Gosling J., Cleary M., Charo I.F.: Decreased lesion formation in CCR2 mice reveals a role of chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998;394:894-897.

Brånén L., Hovgaard L., Nitulescu M., Bengtsson E., Nilsson J., Jovinge S.: Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 2004;24,2137–2142.

Brochu-Gaudreau K., Rehfeldt C., Blouin R., Bordignon V., Murphy B.D., Palin M.F.: Adiponectin action from head to toe. *Endocrine*. 2010;37(1):11-32.

Brunton L., Lazo J., Parker K.L. i wsp.: *Farmakologia Goodmana&Gilmana*. Wydawnictwo Czelej, wydanie I, Lublin 2007.

Calabro P., [Samudio I.](#), [Willerson J.T.](#), [Yeh E.T.](#): Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circulation* 2004;110(21):3335-40.

Canivet B., Jullien D., Sadoul J.L., Freychet P.: Insulin receptors: structure and physiology. *Rev Prat* 1992;42(11):1400-5.

Carew J.A., Cronin K.R.: Metformin decreased factor VII expression. *J Thromb Haemost* 2009;7,2.

Carlsen S.M., Følling I., Grill V., Bjerve K.S., Schneede J., Refsum H.: Metformin increases total serum homocysteine levels in non-diabetic male patients with coronary heart disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1997;57(6):521-7.

Caufield M.T., O'Brien K.D.: Cardiovascular safety of oral antidiabetic agents. *Clinical Diabetes* 2002;2: 81–89.

Cavalot F., Petrelli A., Traversa M., Bonomo K, Fiora E, Conti M., Anfossi G., Costa G., Trovati M.: Postprandial blood glucose is stronger predictor of cardiovascular events than fasting blood glucose in Type 2 diabetes mellitus, particularly in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91: 813-19.

Ceriello^a A.: Postprandial hyperglycemia and diabetes complications. Is it time to treat? *Diabetes* 2005;54,1-7.

Ceriello^b A., Taboga A., Tonutti L., Giacomello R., Stel L., Motz E., Pirisi M.: Post-meal coagulation activation in diabetes mellitus: the effect of acarbose. *Diabetologia* 1996;39:469-473.

Ceriello^c A., Bortolotti N., Motz E., Lizzio S., Catone B., Assaloni R.: Meal-induced oxidative stress and low-density lipoprotein oxidation in diabetes: the possible role of hyperglycemia. *Metabolism* 1999;48: 1503-08.

Ceriello^d A., Quagliario L., D'Amico M., Di Filippo C., Marfella R., Nappo F., Berrino L., Rossi F., Giuglia D.: Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes* 2002;51:1076-82.

Charles M.A., Morange P., Eschwège E., André P., Vague P., Juhan-Vague I.: Effect of weight change and metformin on fibrinolysis and the von Willebrand factor in obese nondiabetic subjects: the BIGPRO1 Study. *Biguanides and the Prevention of the Risk of Obesity. Diabetes Care* 1998;21(11):1967-72.

Charpentier G., Riveline J.P., Dardari D., Varroud-Vial M.: Should postprandial hyperglycaemia in prediabetic and type 2 diabetic patients be treated? *Drugs* 2006;66(3):273-86.

Chaudhuri A., Janicke D., Wilson M.F., Tripathy D., Garg R., Bandyopadhyay A., Calieri J., Hoffmeyer D., Syed T., Ghanim H., Aljada A., Dandona P.: Anti-inflammatory and

profibrinolytic effect of insulin in acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Circulation* 2004;109:849-854.

Chen H., Montagnani M., Funahashi T., Shimomura I., Quon M.J.: Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2003;278:45021-45026.

Chiasson J.L., Josse R.G, Gomis R., Hanefeld M., Karasik A., Laakso M.: Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised Trial. *Lancet* 2002; 359:2072-2077.

Chinetti G., Lestavel S., Bocher V., [Remaley AT](#), [Neve B](#), [Torra IP](#), [Teissier E](#), [Minnich A](#), [Jaye M](#), [Duverger N](#), [Brewer HB](#), [Fruchart JC](#), [Clavey V](#), [Staels B](#).: PPAR- α and PPAR- γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of ABCA1 pathway. *Nat Med* 2001;7: 53–58.

Cho Y.M., Kieffer T.J.: New aspects of an old drug: metformin as glukagon-like peptide 1 (GLP-1) enhancer and sensitizer. *Diabetologia* 2011;54,219-222.

Choi K.M., Ryu O.H., Lee K.W., Kim H.Y., Seo J.A., Kim N.H., Choi D.S., Baik S.H.: Serum adiponectin, interleukin-10 levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pr* 2007;235-240.

Comuzzie A.G., Funahashi T., Sonnenberg G., Martin L.J., Jacob H.J., Kwitek-Black A.E., Maas D., Takahashi M., Kihara S., Tanaka S., Matsuzawa Y., Blangero J., Cohen D., Kissebah A.: The genetic basis of plasma variation in adiponectin, a global andophenotype for obesity and metabolic syndrome. *J Clin Endocr Metab* 2001;86 (9):4321-4325.

Cusi K., Maezono K., Osman A., Pendergrass M., Patti M.E., Pratipanawatr T., DeFronzo R.A., Kahn C.R., Mandarino L.J.: Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase and MAP kinase-mediated signaling in human muscle *J Clin Invest.* 2000;105(3):311–320.

Dai^a J., Li W., Chang L., Zhang Z., Tang Ch., Wang N., Zhu Y., Wang X.: Role of redox factor-1 in hyperhomocysteinemia-accelerated atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2006;41 1566-1577.

Dai^b J., Wang X.: Immunoregulatory effects of homocysteine on cardiovascular disease. *Acta Physiol Sinica* 2007,59(5):585-592.

Dalton RS, Webber JN, Pead P, Gibbs PJ, Sadek SA, Howell WM.: Immunomonitoring of renal transplant recipients in the early posttransplant period by sequential analysis of chemokine and chemokine receptor gene expression in peripheral blood mononuclear cells. *Transplant Proc* 2005;37: 747–751.

Dandona P., Aljada A., Mohanty P.: The anti-inflammatory and potential anti-atherogenic effect of insulin: a new paradigm. [Diabetologia](#) 2002;45(6):924-30.

Dasu M.R., Park S., Devaraj S., Jilal L.: Pioglitazone inhibits Toll-like receptor expression and activity in human monocytes and db/db mice. *Endocrinology* 2009;150(8):3457-64.

Dawson H., Collins G., Pyle R., Deep-Dixit V., Taub D.D.: The immunoregulatory effects of homocysteine and its intermediates on T-lymphocyte function. *Mech Ageing Dev* 2004; 125:107-110.

De Jager J., Kooy A., Lehert P., Bets D., Wulffelé M.G., Teerlink T., Scheffer P.G., Schalkwijk C.G., Donker A.J.M., Stehouwer C.D.A.: Effects of short-term treatment with metformin on marker of endothelial function and inflammatory activity in type 2 diabetes mellitus: a randomized placebo-controlled trial. *J Intern Med* 2005;257: 100–109.

Del Prato S.: Loss of early insulin secretion leads to postprandial hyperglycaemia. *Diabetologia* 2003;46,(1)1,M2-M8.

De Mattia G., Laurenti O., Fava D.: Diabetic endothelial dysfunction: effect of free radical scavenging in Type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complicat* 2003;17(2):30-5.

DeFronzo R.A.: Insulin resistance, hyperinsulinemia, and coronary artery disease: a complex metabolic web. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20,11:S1-16.

Desbosis-Mouthon Ch., Cadoret A., Blivet-Van Eggelpoël M.J., Bertrand F., Caron M., Atfi A., Cherqui G., Capeau J.: Insulin-mediated cell proliferation and survival involve inhibition of c-Jun N-terminal kinases through a Phosphatidylinositol 3-Kinase- and Mitogen-Activated Protein kinase Phosphatase-1-dependent pathway. *Endocrinology* 2000;141,3:922-931.

Devaraj S., Venugopal S.K., Singh U., Jialal I.: Hyperglycemia induces monocytes release of interleukin-6 via induction of protein kinase C- α and $-\beta$. *Diabetes* 2005,54, 85-91.

Dinarello CA.: Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:253—65.

Dobrian A.D., Ma Q., Lindsay J.W., Leone K.A., Ma K., Coben J., Galkina E.V., Nadler J.L.: Dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin reduces local inflammation in adipose tissue and in pancreatic islets of obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300(2):E410-21

Domagała T.B.: Rodzina hiperhomocysteinemia a miażdżyca tętnic. *Medycyna Praktyczna* 2002;9-29.

Doupis J., Lyons T.E., Wu Sz., Gnardellis Ch., Thanh Dinh., Veves A.: Microvascular reactivity and inflammatory cytokines in painful and painless peripheral diabetic neuropathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(6):2157–2163.

Drzewoski J., Żurawska-Klis M.: Effect of gliclazide modified release on adiponectin, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha plasma levels in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Curr Med Res Opin* 2006;22(10):1921-6.

- Dworacka^a M.**, Winiarska H.: The application of plasma 1,5-anhydro-D-glucitol for monitoring type 2 diabetic patients. *Dis Markers* 2005;21(3),127-132.
- Dworacka^b M.**: 1,5-anhydro-D-glucitol: a novel marker of glucose excursions. *Intern J Clin Pract* 2002;129:40-44.
- Dworacka^c M.**, Winiarska H., Szymańska M., Kuczyński S., Szczawińska K., Wierusz-Wysocka B. 1,5-Anhydro-D-glucitol: a novel marker of glucose excursions. *Int. J. Clin. Pract.* 2002;19: 40–44.
- Dubiński A.**, Zdrojewicz Z.: Rola interleukiny 6 w wystąpieniu i progresji miażdżycy. *Pol Merk Lek* 2007;XXII, 130, 291.
- Duckworth W.**, Abraira C., Moritz T. i wsp.: VADT (*Veterans Affairs Diabetes Trial*). Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2008; 360: 129–139.
- Eklund C.M.**: Proinflammatory cytokines in CRP baseline regulation. *Adv Clin Chem* 2009; 48: 111-136.
- Emsley A.**, Jeremy J.Y., Gomes G.N., Angelini G.D., Plane F.: Investigation of the inhibitory effects of homocysteine and copper on nitric oxide-mediated relaxation of rat isolated aorta. *Br J Pharmacol* 1999;126:1034-1040.
- Esposito K.**, Gugliano D., Nappo F., Marfella R.: Regression of carotid atherosclerosis by control of postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2004,110:214-219.
- Evans M.**: U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 1998;352:854–865.
- Faber D.R.**, de Groot P.G., Visseren F.L.: Role of adipose tissue in haemostasis, coagulation and fibrinolysis. *Obesity Review* 2009;10,554-563.
- Fava D.**, [Cassone-Faldetta M.](#), [Laurenti O.](#), [De Luca O.](#), [Ghiselli A.](#), [De Mattia G.](#): Gliclazide improves anti-oxidant status and nitric oxide-mediated vasodilation in Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2002;19(9):752-7.
- Fisman^a E.Z.**, Adler Y., Tenenbaum A.: Biomarkers in cardiovascular diabetology: interleukins and matrixins. *Adv Cardiol* 2008;45:44-64.
- Fisman^b E.Z.**, Motro M., Tenenbaum A.: Cardiovascular diabetology in the core of a novel interleukins classification: the bad, the good and the aloof. *Cardiovasc Diabetol* 2003;12;2:11.
- Fonseca^a R.**, Carvajal C., Almarza C.: Endothelial cell oxidative stress and signal transduction. *Biol Res* 2000;33:89-96.

Fonseca^c V., Desouza C., Asnani S., Jialal I.: Nontraditional risk factors for cardiovascular disease in diabetes. *Endocr Rev* 2004;25:153-175.

Fonseca^b V., Guba S.C., Fink L.M.: Hyperhomocysteinemia and the endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. *Endocr Rev* 1999;20(5):738-759.

Fruchart J.Ch., Nierman M., Stroes S.G., Kastelein J.J., Duriez P.: New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation* 2004;109:III15-III19.

Fu Y., Luo N., Klein R., Garvey W.T.: Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res* 2005;46:1369-1379.

Fujita H., **Fujishima H.**, **Koshimura J.**, **Hosoba M.**, **Yoshioka N.**, **Shimotomai T.**, **Morii T.**, **Narita T.**, **Kakei M.**, **Ito S.**: Effects of antidiabetic treatment with metformin and insulin on serum and adipose tissue adiponectin levels in db/db mice. *Endoc J* 2005;52(4):427-33.

Fuster V., Badimon J., Badimon J.J., Chesebro J.H.: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992;326:310-318.

Fonseca^a R., Carvajal C., Almarza C.: Endothelial cell oxidative stress and signal transduction. *Biol Res* 2000;33:89-96.

Fonseca^b V., Desouza C., Asani S., Jialal I.: Nontraditional risk factors for cardiovascular disease in diabetes. *Endocr Rev* 2004;25:153-175.

Fruchart J.Ch., Nierman M., Stroes S.G., Kastelein J.J., Duriez P.: New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation* 2004;109:15-19

Gacka M., Dobosz T., Szymaniec S., Bednarska-Chabowska D., Adamiec R., Sadakierska-Chudy: Proinflammatory and atherogenic activity of monocytes in type 2 diabetes. *J Diabet Compl* 2010;24(1):1-8.

Galea J., Armstrong J., Gadsdon P., Holden H., Francis S.E., Holt C.M.: Interleukin-1 beta in coronary arteries of patients with ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16(8):1000-6.

Gąsiorowska D., Korzeniowska K., Jabłeczka A.: Ocena stężenia homocysteiny u chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych. *Farmacja Współczesna* 2009;2:24-35.

Gerich J.E.: Oral hypoglycemic agents. *N Engl J Med* 1989;321:1231-1245.

Ghanim H., Korzeniewski K., Sia C.H.L., Abuaysheh S., Lochano T., Chaudhuri A., Dantona P.: Suppressive effect of insulin infusion on chemokines and chemokine receptors. *Diabetes Care* 2010;33,5,1103-1108.

Giannarelli R., Dragona M., Coppelli A., Del Prato S.: Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today. *Diabetes Metab* 2003;29:S28-S35.

Goldberg R.B.: Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab*, September 2009;94(9):3171–3182.

Gołab J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T.: *Immunologia*. Wydawnicywo Naukowe PWN 2009.

Goodridge H.S., Harnett W., Liew F.Y., Harnett M.M.: Differential regulation of interleukin-12 p40 and p35 induction via Erk mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent mechanisms and the implications for bioactive IL-12 and IL-23 responses. *Immunology* 2003;109(3):415-25.

Goodyear L.J., Giorgino F., Sherman L.A., Carey J., Smith R.J., Dohm GL.: Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest* 1995;95(5):2195-204.

Grossman S., Lessem J.: Mechanisms and clinical effects of thiazolidinediones. *Expert Opin Invest. Drug* 1997;6:1025–1040.

Gu L., Okada Y., Clinton S., Gerard C, Sukhova G.K., Libby P., Rollins B.J.: Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein-deficient mice. *Mol Cell* 1998;2:275-281.

Gumieniczek A., Hopkała H., Roliński J., Bojarska-Junak A.: Antioxidative and anti-inflammatory effects of repaglinide in plasma of diabetic rats. *Pharmacol Res* 2005;52(2):162-6.

Gumprecht J., Grzeszczak W.: Zasady insulinoterapii u chorych na cukrzyce typu 2. *Przew Lek* 2003;6,5,10-14.

Gunneth C.A., Heistad D.D., Faraci F.M.: [Interleukin-10 protects nitric oxide-dependent relaxation during diabetes: role of superoxide.](#) *Diabetes*. 2002;51(6):1931-7.

Gursu M.F., Baydas G., Cikim G., Canatan H.: Insulin increases homocysteina levels in a dose-dependent manner in diabetic rats. *Arch Med Res* 2002;33,305–307.

Haffner S.M., Greenberg A.S., Weston W.M., Chen H., Williams K., Freed M.I.: Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2002;106:679-684.

Halleux C.M., Takahashi M.L., Delporte M.L., Detry R., Funahashi T., Matsuzawa Y., Brichard S.M.: Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem Bioph Res Co* 2001;288,1102-1107.

Han^a S.H., Quon M.J., Kim J.: Adiponectin and cardiovascular disease: response to therapeutic interventions. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:531-538.

Han^b S.H.; Sakuma I., Shin E.K., Koh K.K.: Antiatherosclerotic and anti-insulin resistance effects of adiponectin: basic and clinical studies. *Prog Cardiovasc Dis* 2009;52,126-140.

Hanefeld^a M., Fischer S., Julius U., [Schulze J](#), [Schwanebeck U](#), [Schmechel H](#), [Ziegelasch HJ](#), [Lindner J](#): Risk factors for myocardial infarction and death in newly detected NIDDM; the Diabetes Intervention Study, 11-year follow-up. *Diabetologia* 1996;39:1577-1583.

Hanefeld^b M., Cagatay M., Petrowitsch T., Neuser D., Petzinna D., Rupp M.: Acarbose reduces the risk of myocardial infarction in type 2 diabetes mellitus: meta-analysis of seven long-term studies. *Eur Heart J* 2004;25, 10–16.

Hankey G.J., Eikelboom J.W.: Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999;354,407-413.

Hansson G.K.: Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 2009;7 (1):328-331.

Hatada E.N., Krappmann D., Scheidereit C.: NF- κ B and the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000;12:52-58.

Hattori^a Y., Jojima T., Tomizawa A., Satoh H., Hattori S., Kasai K., Hayashi T.: A glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, liraglutide, upregulates nitric oxide production and exerts anti-inflammatory action in endothelial cells. *Diabetologia* 2010;53(10):2256-63.

Hattori^b Y., [Suzuki K](#), [Hattori S](#), [Kasai K](#): Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. [Hypertension](#) 2006;47(6):1183-8.

Henrichot E., Juge-Aubry C.E., Pernin A., Pache J.C., Velebit V., Dayer J.M., Meda P., Chizzolini C., Meier Ch., A.: Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the pathogenesis of atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2594-2599.

Herder Ch., Illig T., Baumert J., Müller M., Klopp N., Khuseyinova N., Meisinger Ch., Poschen U., Martin S., Koenig W., Thorand B.: RANTES/CC15 gene polymorphisms, serum concentrations, and incident type 2 diabetes: result from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002. *Eur J Endocrinol* 2008;158 R1-R5.

Higuchi A., Ohashi K., Shibata R., Sono-Romanelli S., Walsh K., Ouchi N.: Thiazolidinediones reduce pathological neovascularization in ischemic retina via an adiponectin-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30(1):46-53.

Hiramatsu H., Kyono, K., Kyono K., Higashiyama Y., Fukushima C., Shima H., Sugiyama S., Inaka K., Shimizu R.: The structure and function of human dipeptidyl peptidase IV in its Apo and diprotin B-complexed Forms. *Acta Biochim Biophys* 2007;39(5): 335–343.

Hivert M.F., Sullivan L.M., Shrader P., Fox C.S., Nathan D.M., D’Agostino R.B., Wilson P.W., Benjamin E.J., Meigs J.B.: The association of Tumor Necrosis Factor – α receptor 2 with insulin resistance and the influence of adipo tissue biomarkers in humans. *Metabolism* 2009;9(4):540-6.

Hollander P.A., Kushner P.: Type 2 diabetes comorbidities and treatment challenges: rationale for DPP-4 inhibitors. *Postgrad Med* 2010;122(3):71-80.

Holven^a K.B., Aukrust P., Holm T., Ose L., Nenseter M.S.: Folic acid treatment reduces chemokine release from peripheral blood mononuclear cells in hyperhomocysteinemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:699-703.

Holven^b K.B., Halvorsen B., Bjerkeli V., Damås J.K., Retterstøl K., Mørkrid L., Ose L., Aukrust P., Nenseter M.S.: Hyperhomocysteinemic subjects, metalloproteinase-9 and its inhibitor in mononuclear cells from impaired inhibitory effect of interleukin-10 on the balance between matrix. *Stroke* 2006;37,1731-1736.

Hong E.G., Ko H.J., Cho Y.R., Kim H.J., Ma Z., Yu T.Y., Friedline R.H., Kurt-Jones E., Finberg R., Fischer M.A., Granger E.L., Norbury C.C., Hauschka S.D., Philbrick W.M., Lee C.G., Elias J.A., Kim J.K.: Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. *Diabetes* 2009;58(11):2525-35.

Hoogeveen E.K., Kostense P.J., Jakobs C., Bouter L.M., Heine R.J., Stehouwer R.W.: Does metformin increase the serum total homocysteine level in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Intern Med* 1997;242:289-394.

Holst^a J.J., Gromada J.: Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287: E199–E206.

Holst^b J.J.: The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* 2007;87:1409-1430.

Holven^a K.B., Aukrust P., Holm T., Ose L., Nenseter M.S.: Folic acid treatment reduces chemokine release from peripheral blood mononuclear cells in hyperhomocysteinemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:699-703.

Holven K.B., Halvorsen B., Bjerkeli V., Damås J.K., Retterstøl K., Mørkrid L., Ose L., Aukrust P., Nenseter M.S.: Hyperhomocysteinemic subjects Metalloproteinase-9 and its inhibitor in mononuclear cells from impaired inhibitory effect of interleukin-10 on the balance between matrix. *Stroke* 2006;37; 1731-1736.

Hotta^a K., Funahashi T., Arita Y., [Takahashi M.](#), [Matsuda M.](#), [Okamoto Y.](#), [Iwahashi H.](#), [Kuriyama H.](#), [Ouchi N.](#), [Maeda K.](#), [Nishida M.](#), [Kihara S.](#), [Sakai N.](#), [Nakajima T.](#), [Hasegawa K.](#), [Muraguchi M.](#), [Ohmoto Y.](#), [Nakamura T.](#), [Yamashita S.](#), [Hanafusa T.](#), [Matsuzawa Y.](#): Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1595-1599.

Hotta^b K., Funahashi T., Bodkin N.L., Ortmeier H.K., Arita Y., Hansen B.C., Matsuzawa Y.: Circulation concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 2001;50:1126-1133.

Huang N.L., Chiang S.H., Hsueh C.H., Liang Y.J., Chen Y.J., Lai L.P.: Metformin inhibits TNF- α induced I κ B kinase phosphorylation, I κ B- α degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3K-dependent AMPK phosphorylation. *International J Cardiol* 2009;134,69-175.

Huerta M.G., Nadler J.L.: Role of inflammatory pathways in the development and cardiovascular complications of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 2002;2:396-402.

Huypens P., Quartier E., Pipeleers D., Van der Castele M.: Metformin reduces adiponectin protein expression and release in 3T3-L1 adipocytes involving activation of AMP activated protein kinase. *Eur J Pharm* 2005;518,2-3:90-95.

Huypens P., Quartier E., Pipeleers D., Van der Castele M.: Metformin reduces adiponectin protein expression and release in 3T3-L1 adipocytes involving activation of AMP activated protein kinase. *Eur J Pharm* 2005,518,2-3:90-95.

Huysman E., Mathieu C.: Diabetes and peripheral vascular disease. [Acta Chir Belg](#) 2009; 109(5):587-94.

Isenovic E.R., [Fretaud M.](#), [Dobutovic B.](#), [Sudar E.](#), [Smiljanic K.](#), [Zaric B.](#), [Trpkovic A.](#), [Marche P.](#): A novel hypothesis regarding the possible involvement of cytosolic phospholipase 2 in insulin-stimulated proliferation of vascular smooth muscle cells. [Cell Biol Int](#) 2009;33(3):386-92.

Isoda K., Young J.L., Zirlik A., MacFarlane L.A., Tsuboi N., Gerdes N., Schönbeck U., Libby P.: Metformin inhibits proinflammatory responses and Nuclear Factor- κ B in human vascular wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:611-617.

Isomoto S., Kondo C., Yamada M. i wsp.: A novel sulphonylurea receptor forms with BIR (Kir 6.2) a smooth muscle type of ATP-sensitive K⁺ channel. *J Biol Chem* 1996; 271:24321.24325.

Ivashkiv L.B.: Jak-STAT signaling pathways in cells of the immune system. *Rev Immunogenet* 2000;2,220-230.

Jacobs R.L., House J.D., Brosnan M.E., Brosnan J.T.: Effects of Streptozotocin-Induced diabetes and of insulin treatment on homocysteine metabolism in the rat. *Diabetes* 1998;47,1967-1970.

Jakubowski H.: The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *J Physiol Pharmacol* 2008;59,9,155-167.

Janeczko D.: Epidemiologia chorób układu krążenia u chorych na cukrzycę. *Kardiologia na co dzień* 2007;2(1):12-16.

Jasik M., Dębce K., Karnafel W.: Doustne leki przeciwcukrzycowe w terapii cukrzycy typu 2. *Przew Lek* 2005;3:74-80.

Jawień J.: New insights into immunological aspects of atherosclerosis. *Pol Arch Med Wewn* 2008;118(3):127-131.

Jego G., Pascual V., Palucka A.K., Banchereau J.: Dendritic cells control B cell growth and differentiation. *Curr Dir Autoimmun* 2005;8:124-139.

Jennings P.E., Scott N.A., Saniabadi A.R., Belch J.J.: Effects of gliclazide on platelet reactivity and free radicals in type II diabetes patients: clinical assessment. *Metabolism* 1992;41:36-9.

Jeschke M.G., Klein D., Thasler W.E., Bolder U., Schlitt H.J., Jauch K.W., Weiss T.S.: Insulin decreases inflammatory signal transcription factor expression in primary human liver cells after LPS challenge. *Mol Med* 2008;14(1-2):11-9.

John M., Hirst S.J., Jose P.J., Robichaud A., Berkman N., Witt C., Twort C.G., Barnes P.J., Chung K.F.: Human airway smooth muscle cells express and release RANTES in response to T helper 1 cytokines: regulation by T helper 2 cytokines and corticosteroids. *J Immunol* Vol 1997;158,1841-1847.

Jones S, Richards P, Scheller J., Rose-John, S.: IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J Int Cyt Res* 2005;25: 241-53.

Jung H.S., **Youn B.S.,** **Cho Y.M.,** **Yu K.Y.,** **Park H.J.,** **Shin C.S.,** **Kim S.Y.,** **Lee H.K.,** **Park K.S.:** The effects of rosiglitazone and metformin on the plasma concentrations of resistin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2005;54(3):314-20.

Kado S., **Murakami T.,** **Aoki A.,** **Nagase T.,** **Katsura Y.,** **Noritake M.,** **Matsuoka T.,** **Nagata N.:** Effect of acarbose on postprandial lipid metabolism in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1998;41(1):49-55.

Kadowaki^a T., Yamauchi T.: Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine Rev* 2005; 26(3):439-451.

Kadowaki^b T., Hara K., Yamauchi T., Terauchi Y., Tobe K., Nagai R.: Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp Biol Med* 2003;228:1111-1117.

Kallen K.: The role of transsignalling via agonistic soluble IL-6 receptor in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592: 323-43.

Kampoli A.M., Tousolis D., Antoniadis Ch., Siasos G., Stefanadis Ch.: Biomarkers of premature atherosclerosis. *Trends Mol Med* 2009;15, No.7,323-332.

Kanada Y., Matsuda M., Tawaramoto K., Kawasaki F., Hashiramoto M., Matsuki M., Kaku K.: Effects of sulfonylurea drugs on adiponectin production from 3T3-L1 adipocytes: Implication of different mechanism from pioglitazone. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;81,1,13-18.

Kang B.Y., Kim E., Sung Kim T.: Regulatory mechanisms and their therapeutic implications of interleukin-12 production in immune cells. *Cel Signal* 2005;17:665-673.

Karolczak K., Olas B.: Mechanism of action of homocysteine and its thiolactone in hemostasis system. *Physiol Res* 2009;58:623-633.

Katra B., Sieradzki J.: Nowe trendy w doustnym leczeniu cukrzycy. *Przew Lek* 2004;7,1, 42-52.

Kinalska I., Siewko K.: Rola glimepirydu w terapii cukrzycy typu 2 z chorobą niedokrwinną serca. *Przegląd Kardiodiabetologiczny* 2007;2,3: 179–183.

Kleeman R., Zadelaar S., Kooistra T.: Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res.* 2008;79(3): 360–376.

Kłuciński P., Martirosian G.: Rola odpowiedzi immunologicznej Th1 I Th2 w rozwoju miażdżycy. *Polski Przegląd Kardiologiczny* 2006;8, 2,119-123.

Koerner A., [Kratzsch J.](#), [Kiess W.](#): Adipocytokines: leptin-the classical, resistin-the controversial, adiponectin-the promising, and more to come. [Best Pract Res Clin Endocrinol Metab](#) 2005;19(4):525-46.

Koga^a T., Claycombe K., Meydani M.: Homocysteine increases monocyte and T-cell adhesion to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 2002;161,365-374.

Koga^b M., Kai H., Yasukawa H., Yamamoto T., Kawai Y., Kato S., Kusaba K., Kai M., Egashira K., Kataoka Y., Imaizumi T.: Inhibition of progression and stabilization of plaques by postnatal interferon-gamma function blocking in ApoE-knockout mice. *Circ Res* 2007; 101,348-356.

Kolcowa O., Orłowska-Kunikowska E., Semetkowska-Jurkiewicz E., Narkiewicz K., Wyrzykowski B.: Ocena wybranych markerów procesu zapalnego u osób chorych na cukrzycę typu 2. *Diabetologia Doświadczalna i Kliniczna* 2003; tom 3, nr 1.

Konrad C., Müller G.A., Langer C., Kuhlenbäumer G., Berger K., Nabavi D.G., Dziewas R., Stögbauer F., Ringelstein E.B., Junker R.: Plasma homocysteine, MTHFR C677T, CBS 844ins68bp, and MTHFD1 G198A polymorphisms in spontaneous cervical artery dissections. *J Neurol* 2004;251:1242-1248.

Konya H., [Hasegawa Y.](#), [Hamaguchi T.](#), [Satani K.](#), [Umehara A.](#), [Katsuno T.](#), [Ishikawa T.](#), [Miuchi M.](#), [Kohri K.](#), [Suehiro A.](#), [Kakishita E.](#), [Miyagawa J.I.](#), [Namba M.](#): Effects of gliclazide on platelet aggregation and the plasminogen activator inhibitor type 1 level in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2010;59,9,1294-1299.

Kościów K., Małecki R., Adamiec R.: Cytokiny, metaloproteinazy i neopteryna a śmiertelność sercowo-naczyniowa chorych na przewlekłą niewydolność nerek. *Pol Merk Lek* 2007,XXII,127,54.

Kośmicki M.: Wieńcowe czynniki ryzyka, cz.II. *Przew Lek* 2004;3:106-114.

Kougias P., Chai H., Lin P.H., Lumsden A.B., Yao Q., Chen C.: Adipocyte-derived cytokine resistin causes endothelial dysfunction of porcine coronary arteries. *J Vasc Surg* 2005;41: 691–698.

Kozka I.J., Holman G.D.: Metformin blocks downregulation of cell surface GLUT 4 caused by chronic insulin treatment of rat adipocytes. *Diabetes* 1993;42:1159–1165.

Kraaijeveld A.O., de Jager S.C.A., de Jager W.J., Prakken B.J., McColl S.R., Haspels I., Putter H., van Berkel T.J.C., Nagelkerken L., Jukema J.W., Giessen E.A.L.: CC Chemokine Ligand-5 (CCL5/RANTES) and CC Chemokine Ligand-18 (CCL18/PARC) are specific markers of refractory unstable angina pectoris and are transiently raised during severe ischemic symptoms. *Circulation* 2007;116;1931-1941

Krasnodębski P.: Czynniki ryzyka chorób układu krążenia u pacjentów z cukrzycą typu 2. *Przew Lek* 2005;3:46-52.

Kriegel M.A., Tretter T., Blank N., Schiller M., Gabler CH., Winkler S., Kalden J.R., Lorenz H.M.: Interleukin-4 supports interleukin-12-induced proliferation and interferon- γ secretion in human activated lymphoblasts and T helper type 1 cells. *Immunol* 2006;119, 43-53.

Kugiyama K., Sakamoto T., Misumi I., Sugiyama S, Ohgushi M, Ogawa H, Horiguchi M, Yasue H.: Transferable lipids in oxidized LDL stimulate PAI-1 and inhibit tPA release from endothelial cells. *Circulation Res* 1993;73:335-43.

Kumada M., Kihara S., Sumitsuji S., Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, Arita Y, ... Hiraoka H, Nakamura T, Funahashi T, Matsuzawa Y.: Osaka CAD Study Group: coronary artery disease. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:85-89.

Lang D., Knop J., Wesche H., Raffetseder U., Kurrle R., Boraschi D., Martin M.U.: The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness. *J Immunol* 1998;161: 6871–6877.

Lankas G.R., Leiting B., Roy R.S., Eiermann G.J., Beconi M.G., Biftu T., Chan Ch., Edmondson S., Feeney W.P., He H., Ippolito D.I., Kim D., Lyons K.A., Ok H.O., Patel R.A., Petrov A.N., Pryor K.A., Qian X, Reigle L., Woods A, Wu J.K., Zaller D, Zhang X, Zhu L, Weber A.E., Thornberry N.A.: Dipeptidyl Peptidase IV inhibition for the treatment of Type 2 diabetes. Potential importance of selectivity over dipeptidyl peptidases 8 and 9. *Diabetes*. 2005;54,10:2988-2994.

Lara-Castro C., Luo N., Wallace P., Klein R.L., Garvey W.: Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. *Diabetes* 2006;55:249-259.

Laube H.: Acarbose. An update of its therapeutic use in diabetes treatment. *Clin Drug Invest* 2002;22:141-156.

Lederman H.M., Brill C.R., Murphy P.A.: Interleukin 1-driven secretion of interleukin 2 is highly temperature- dependent. *J Immunol* 1987;138:3808-3811.

Lehrke M., Reilly M.P., Millington S.C., Iqbal N., Rader D.J., Lazar M.A.: An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. *PLoS Med* 2004;1:161–168.

Lennon R., [Welsh G.I.](#), [Singh A.](#), [Satchell S.C.](#), [Coward R.J.](#), [Tavaré J.M.](#), [Mathieson P.W.](#), [Saleem M.A.](#): Rosiglitazone enhances glucose uptake in glomerular podocytes using the glucose transporter GLUT1. *Diabetologia* 2009;52(9):1944-52.

Li B., Cao D., Xu H., Chang J., Zhou G., Tian J., Li D., Theze J., Wu C.: Interleukin-12 induces gene expression in interleukin-2 stimulated human T lymphocytes. *Eur Cytokine Netw* 2000;11:602-607

Libby^a P., Ridker P.M., Hansson G.K.: Inflammation and atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:2129-2138.

Libby^b P.: Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995;91:2844-2850.

Libby^c P.: Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis and stabilization. *Am J Cardiol* 2000;86:3J-9J.

Libby^d P.: Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-874.

Libby^e P., Ridker P.M., Maseri A.: Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105: 1135-1143.

Libby^f P.: Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;104,365-372.

Lindmark E., Diderholm E., Wallentin L.: Relationships between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive and noninvasive strategy. *JAMA* 2001;286(17): 2107-2113.

Little J., Osman N., de Dios T., Cemerlang N., Ballinger M., Nigro J.: Anti-proliferative activity of oral anti-hyperglycemic agents on human vascular smooth muscle cells: thiazolidinediones (glitazones) have enhanced activity under high glucose conditions. *Cardiovasc Diabetol* 2007;28;6:33.

Liu^a H.B., Hu Y.S., Medcalf R.F., Simpson R.W., Dear A.E.: Thiazolidinediones inhibit TNF α induction of PAI-1 independent of PPAR γ activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;334,30-37.

Liu^b H., Dear A., Knudsen L., Simpson R.: A long-acting glucagon-like peptide-1 analogue attenuates induction of plasminogen activator inhibitor type-1 and vascular adhesion molecules. *J Endocrinol* 2009;201,59-66.

Liu^c Y., Wei SH, Ho AS, de Waal Malefyt R, Moore KW. Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol* 1994;152:1821–1829.

Lixia Y., Feng Q., Ruiwei G., Xianmei W., Chuanming G.: The role of RANTES factor in the study of hyperglycemia and coronary heart disease. *Heart* 2010;96:A207.

Lonn E., Yusuf S., Arnold M.J., Sheridan P., Pogue J., Micks M., McQueen M.J., Probstfield J., Fodor G., Held C., Genest J.: Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators: homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* 2006;354:1567–1577.

Low Wang C.C., Gurevich I., Draznin B.: Insulin affects vascular smooth muscle cell phenotype and migration via distinct signaling pathways. *Diabetes* 2003;52:2562–2569.

Lund S., [Tarnow L.](#), [Stehouwer C.D.](#), [Schalkwijk C.G.](#), [Teerlink T.](#), [Gram J.](#), [Winther K.](#), [Frandsen M.](#), [Smidt U.M.](#), [Pedersen O.](#), [Parving H.H.](#), [Vaag A.A.](#): Impact of metformin versus repaglinide on non-glycaemic cardiovascular risk markers related to inflammation and endothelial dysfunction in non-obese patients with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 2008;158(5):631-41.

Luster A.D.: Chemokine-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338(7):436-45.

MacMahon S. and Collaborative Group. ADVANCE Trial (Action in Diabetes and Vascular Disease Preterax and Dimicron MR Controlled Evaluation). *N Engl J Med* 2008;358:2560-72.

Macugowska M.: Biochemiczne różnicowanie pomiędzy reaktywną hiperglikemią a upośledzoną tolerancją glukozy. Praca magisterska wykonana w UM w Poznaniu 2002.

Maddock H.L., Siedlecka S.M., Yellon D.M.: Myocardial protection from either ischemic preconditioning or nicorandil is not blocked by gliclazide. *Cardiovasc Drugs and Therapy* 2004;2,18,113-119.

Madonna R., Pandolfi A., Massaro M., Consoli A., De Caterina R.: Insulin enhances vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) expression in human cultured endothelial cells through a pro-atherogenic p38MAPkinase-mediated pathway. *Diabetologia* 2004;47:532–536.

Majors A., Ehrhart L.A.; Pezacka E.: Homocysteine as a risk factor for vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2074-2081.

Malinowski M., Deja M.A., Gołba K.S., Janusiewicz P., Roleder T., Woś S.: Wpływ okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej na funkcje naczyń. *Kardiologia Polska* 2008; 66:10(supl.3).

Mamputu J.C., Li L., Renier G.: Gliclazide inhibits differentiation-associated biologic events in human monocyte-derived macrophages. [Metabolism](#) 2006;55(6):778-85.

Mariani E., Pulsatelli L., Neri S., Dolani P., Meneghetti A., Silvestri T., Ravaglia G., Forti P., Cattini L., Facchini A.: RANTES and MIP-1 α production by T lymphocytes, monocytes and NK cells from nonagenarian subjects. *Exp Gerontol* 2002;37(2-3):219-26.

Martinez L., Berenguer M., Bruce M.C., Le Marchand-Brustel Y., Govers R.: Rosiglitazone increases cell surface GLUT4 levels in 3T3-L1 adipocytes through an enhancement of endosomal recycling. *Biochem Pharmacol* 2009;79(9):1300-9.

[Mavridis G., Souliou E., Diza E., Symeonidis G., Pastore F., Vassiliou A.M., Karamitsos D.:](#) Inflammatory cytokines in insulin-treated patients with type 2 diabetes. [Nutr Metab Cardiovasc Dis](#) 2008;18(7):471-6.

Mather K.J., Verma S., Andersen T.J.: Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1344-1350.

Mazighi M., Pelle A., Gonzalez W., Mtairag el M, Philippe M., Henin D., Michel J.B., Feldman L.J.: IL-10 inhibits vascular smooth muscle cell activation in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H866-H871.

Mazzone T., Chait A., Plutzky J.: Addressing cardiovascular disease risk in diabetes: insights from mechanistic study. *Lancet* 2008;371(9626):1800-1809.

- Mc Ternan P.G.**, Kusminski C.M., Kumar S.: Resistin. *Curr Opin Lipidol* 2006;17(2),17-175.
- McCully K.S.**: Hyperhomocysteinemia and arteriosclerosis: historical perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:980-986.
- Meigs^a JB**, Nathan DM, D'Agostino RB Sr et al. Fasting and postchallenge glycemia and cardiovascular disease risk: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care* 2002;25:1845-50.
- Meigs^b J.B.**: Epidemiology of cardiovascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2003;40:S358-S361.
- Mentlein R.**: Dipeptidyl-peptidase IV CD26 – role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory Peptides* 1999;85,9–24.
- Menzagi C.**, Trischitta V., Doria A.: Genetic influences of adiponectin on insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetologia* 2007;56,1198-1209.
- Merhi-Soussi F.**, Kwak B.R., Magne D., Chadjichristos Ch., Berti M., Pelli G., James R.W., Mach W., Gabay C.: Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res* 2005;66,583-593.
- Miczke A.**, Bryl W., Pupek-Musialik D.: Adiponektyna – nowy element w patogenezie insulinooporności i miażdżycy. *Nadciśnieni tętnicze* 2002;tom 6, nr 3.
- Mikhail N.**: Incretin mimetics and dipeptidyl peptidase 4 inhibitors in clinical trials for the treatment of type 2 diabetes. [Expert Opin Investig Drugs](#) 2008;17(6):845-53.
- Milioti N.**, Bermudez-Fajardo A., Penichet M.L., Oviedo-Orta E.: Antigen-induced immunomodulation in pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Dev Immunol* 2008;1-15.
- Mizia-Stec K.**, Gąsior Z., Zahorska-Markiewicz B., Janowska J., Mizia M., Holeccki M.: Aktywacja immunologiczna w cukrzycy typu 2 u osób z chorobą wieńcową. *Diabet Dośw Klin* 2003;3,6,523-529.
- Mocellin S.**, Panelli M.C., Wang E., Nagorsen D., Marincola F.M.: The dual role of Il-10. *Trends Immunol* 2003;24,1.
- Modur V.**, Li Y., Zimmerman G.A., Prescott S.M., McIntyre T.M.: Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha. *J Clin Invest* 1997;100:2752-2756.
- V Mohamed-Ali.**, Goodrick, S., Rawesh, A., Katz, D. R., Miles, J. M., Yudkin, J. S., Klein, S. & Coppel, S. W.: Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82: 4196–4200.

Monnier L., Mas E., Ginet C., Michel F., Villon L., Cristol J.P.: Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 2006;295(14): 1681-1687.

Montagnani M., Golovchenko I., Kim I., Koh G.Y., Goalstones M.L., Mundhekar A.M., Johansen M., Kucik D.F., Quon M.J., Draznin B.: Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:1794 –1799

Moore K., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O’Garra A.: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.

Moreno-Navarrete J.,M., Ortega F.J., Rodriguez-Hermosa J.I., Sabater M., Pardo G., Ricart W., Fernandez-Real J.M.: OCT1 Expression in adipocytes could contribute to increased metformin action in obese subjects. *Diabetes* 2011;60,1,168-176.

Morohoshi M., Fujisawa K., Uchimura I., Numano F.: Glucose-dependent interleukin 6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes in vitro. *Diabetes* 1996;45,7,954-959.

Mu H., [Ohashi R.](#), [Yan S.](#), [Chai H.](#), [Yang H.](#), [Lin P.](#), [Yao Q.](#), [Chen C.](#): Adipokine resistin promotes in vitro angiogenesis of human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2006;1;70(1):146-57.

Mullberg J., Oberthur W., Lottspeich F., Mehl, E Dittrich, L Graeve, PC Heinrich and S Rose-John: The soluble human IL-6 receptor. *J Immunol* 1994;152: 4958-70.

Murry C.E., Richard V.J., Reimer K.A., Jennings R.B. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultra structural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res* 1990;66: 913–931.

Nagasaka S., Taniguchi A., Aiso Y., Yatagi T., Nakamura T., Nakai Y., Fukushima M., Kuroe A., Ishibashi S.: Effect of glimepiride on serum adiponectin level in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003;26,7,2215-2216.

Nagi D.K., Yudkin J.S.: Effect of metformin on insulin resistance, risk factors for cardiovascular disease and plasminogen activator inhibitor in NIDDM subjects. A study of two ethnic groups. *Diabetes Care* 1993;16:621-629.

Nakajima K., Tanaka Y., [Nomiyama T.](#), [Ogihara T.](#), [Ikeda F.](#), [Kanno R.](#), [Iwashita N.](#), [Sakai K.](#), [Watada H.](#), [Onuma T.](#), [Kawamori R.](#): RANTES promoter genotype is associated with diabetic nephropathy in type 2 diabetic subjects. [Diabetes Care](#) 2003;26(3):892-8.

Nakamura K., [Yamagishi S.](#), [Matsui T.](#), [Yoshida T.](#), [Imaizumi T.](#), [Makino T.](#), [Shimizu T.](#), [Inoue H.](#): Acarbose, an alpha-glucosidase inhibitor, decreases aortic gene expression and

serum levels of monocyte chemoattractant protein-1 in fructose-fed rats. *J Int Med Res* 2006;34(5):525-30.

Nappo F., De Rosa N., Marfella R.; De Lucia D, Ingrosso D, Perna AF, Farzati B, Giugliano D.: Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *JAMA* 1999;281:2113-2118.

Naruszewicz M., Mirkiewicz E., Olszewski A.J., McCullUy K.S.: Thiolacton of low-density lipoprotein by homocysteine thiolactone causes increased aggregation and altered interaction with cultured macrophages. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1994;4:7077.

Nelson D.E., Ihekweba A.E., Elliott M., Johnson J.R., Gibney C.A., Foreman B.E., Nelson G., See V., Horton C.A., Spiller D.G., Edwards S.W., McDowell H.P., Unitt J.F., Sullivan E., Grimley R., Benson N., Broomhead D., Kell D.B., White M.R.: Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science* 2004;306:704–708.

Neumiller J.J., Setter S.M.: Pharmacologic management of the older patient with type 2 diabetes mellitus. [Am J Geriatr Pharmacother](#) 2009;7(6):324-342.

Nishio K., Shigemitsu M., Kodama Y., Itoh S., Konno N., Satoh R., Katagiri T., Kobayashi Y.: The effect of pioglitazone on nitric oxide synthesis in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Cardiometab Syndr* 2008;3(4):200-4.

Nomiyama T., Igarashi Y., Taka H., Mineki R., Uchida T., Ogihara T., Choi J.B., Uchino H.: Reduction of insulin-stimulated glucose uptake by peroxynitrite is concurrent with tyrosine nitration of insulin receptor substrate-1. *Biochem Biophys Res Comm* 2004;320: 639-47.

O'Brien R.C., Luo M., Balazs N., Mercuri J.: In vitro and in vivo antioxidant properties of gliclazide. *J Diabetes Complications* 2000;14, 201-6.

Packard R.R., Libby P.: Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clinical Chemistry* 2008;54:1, 24-38

Pajvani U.B., Du X., Combs T.P., Berg A.H., Rajala M.W., Schulthess T., Engel J., Brownlee M., Scherer P.: Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. *J Biol Chem* 2003; 278,11,9073-9085.

Pandolfi A., Iacoviello L., Capani F., Vitacolonna E., Donati M.B., Consoli A.: Glucose and insulin independently reduce the fibrinolytic potential of human vascular smooth cells in culture. *Diabetologia* 1996;39:1425–1431.

Pang S.S., Le Y.Y.: Role of resistin in inflammation and inflammation-related diseases. *Cell Mol Immunol* 2006;3:29-34.

Paolisso G., Rizzo M.R., Barbieri M., Manzella D., Ragno E., Maugeri D.: Cardiovascular risk in type 2 diabetics and pharmacological regulation of mealtime glucose excursions. *Diabetes Metab* 2003;29(4 Pt 1):335-40.

Park J.I., Strock C.J., Ball D.W., Nelkin B.D.: Interleukin-1beta can mediate growth arrest and differentiation via the leukemia inhibitory factor/JAK/STAT pathway in medullary thyroid carcinoma cells. *Cytokine* 2005;29(3):125-34.

Parkes DG., Pittner R., Jodka C., Smith P., Young A.: Insulinotropic actions of exendin-4 and glucagon-like peptide-1 in vivo and in vitro. *Metabolism* 2001;50:583-589.

Parulkar A.A., Pendergrass M.L., Granda-Ayala R., Lee T.R., Fonseca V.A.: Nonhypoglycemic effects of thiazolidinediones. *Ann Intern Med* 2001;134, 61-71.

Patané G., Piro S., Rabuazzo A.M., Anello M., Vigneri R., Purrello F.: Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or high glucose: a direct metformin effect on pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2002;49: 735-740.

Patterson S., [Flatt P.R.](#), [Brennan L.](#), [Newsholme P.](#), [McClenaghan N.H.](#): Detrimental actions of metabolic syndrome risk factor, homocysteine, on pancreatic beta-cell glucose metabolism and insulin secretion. [J Endocrinol.](#) 2006;189(2):301-10.

Pavlovic D., Kocic R., Kocic G., Jevtovic T; Radenkovic S; Mikic D; Stojanovic M; Djordjevic P.B.: Effect of fourweek metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidative develope enzymes in newly diagnosed obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2000;2:251-256.

Phillips S.A., Ciaraldi T.P., Kong A.P., Bandukwala R., Aroda V., Carter L., Baxi S., Sunder R. M., Henry R.: Modulation of circulating and adipose tissue adiponectin levels by antidiabetic therapy. *Diabetes* 2003;52,667-674.

Piconi L., Quagliario L., Assaloni R., [Da Ros R.](#), [Maier A.](#), [Zuodar G.](#), [Ceriello A.](#): Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22:198-203.

Pietrzak M.: Intensywna czynnościowa insulinoterapia – analogi czy insuliny krótko działające. *Przew Lek* 2005;3:133-139.

Pitkanen E. 1,5-Anhydro-D-glucitol — a novel type of sugar in the human organism. *Scand. J. Clin. Lab. Invest* 1990; 201: 55-62.

Pradhan A.D., [Everett B.M.](#), Cook N.R., Rifai N., [Ridker P.M.](#): Effects of initiating insulin and metformin on glycemic control and inflammatory biomarkers among patients with type 2 diabetes. *JAMA* 2009;302(11):1186-1194.

Prokopczuk P.: Znaczenie procesu zapalnego w powstawaniu powikłań sercowo-naczyniowych w cukrzycy. Przegląd kardiologiczny 2006;1,1:61-66.

Proks P., Ashcroft F.M.: Nowe spojrzenie na specyficzność tkankową pochodnych sulfonilomocznika. Diabet Prakt 2001,tom 2,supl. B.

Quagliaro L., Piconi L., Assaloni R., [Da Ros R.](#), [Maier A.](#), [Zuodar G.](#), [Ceriello A.](#): Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: the distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production. Atherosclerosis 2005;183:259-67.

Qatanani M., Szwegold N.R., Greaves D.R., Ahima R.S., Lazar M.A.: Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. J Clin Invest 2009;119: 531–539.

Rae C., Graham A.: Human resistin promotes macrophage lipid accumulation. Diabetologia 2006,49:1112-1114.

Ratnam S., Maclean K.N., Jacobs R.L., Brosnan M.E., Kraus J.P., Brosnan J.T.: Hormonal regulation of cystathionine-synthase expression in liver. J Biol Chem 2002;277,8, 42912-42918.

[Rawstron A.C.](#), [Fenton J.A.](#), [Ashcroft J.](#), [English A.](#), [Jones R.A.](#), [Richards S.J.](#), [Pratt G.](#), [Owen R.](#), [Davies F.E.](#), [Child JA](#), [Jack A.S.](#), [Morgan G.](#): The interleukin-6 receptor alpha-chain (CD126) is expressed by neoplastic but not normal plasma cells. Blood 2000;1;96(12):3880-6.

Refsum H., Smith A.D., Ueland M., Nexø E., Clarke R., McPartlin J., Johnston C., Engbaek F., Schneede J., McPartlin C., Scott J.M.: Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. Clin Chem Acta 2004;50:3-32.

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.

Ren J., Dominiguez L.J., Sowers J.R. i wsp.: Metformin but not glyburide prevents high glucose induced abnormalities in relaxation and intracellular Ca²⁺ transients in adult rat ventricular monocytes. Diabetes 1999;48:2059–2065.

Renier G., Desfaits A.C., Serri O.: Effect of gliclazide on monocyte-endothelium interactions in diabetes. J Diab Compl 2000;14:207–214.

Reusch J.E., Draznin B.B.: Atherosclerosis in diabetes and insulin resistance. Diabetes Obesity Metab 2007;9,455-463.

Rhodes C.J., White M.F.: Molecular insights into insulin action secretion. Eur J Clin Invest 2002;32(3): 3-13.

Rizzo M., Rizvi A.A., Spinass G.A., Rini G.B., Berneis K.: Glucose lowering and anti-atherogenic effects of incretin-based therapies: GLP-1 analogues and DPP-4-inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18(10):1495-503.

Romano M., Sironi M., Toniatti C., Polentarutti N., Fruscella P., Ghezzi P., Faggioni R., Luini W., van Hinsbergh V., Sozzani S., Bussolino F., Poli V., Ciliberto G., Mantovani A.: Role of Il-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997;6:1–20.

Rose-John S.: Interleukin-6 biology is coordinated by membrane bound and soluble receptors. *Acta Biochim Pol.* 2003;50:603-11.

Rosenberg Y., et al. ACCORD Trial (*Action to Control Cardiovascular In Diabetes*). Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Eng J Med* 2008;358:2545-2559.

Rutkowski R., Pancewicz S.A., Skrzydlewska E.: Właściwości biologiczne czynnika transkrypcji jądrowej NF-κB. *Alergia Astma Immunologia* 2005;10(3), 125-131.

Salmenniemi U., Ruotsalainen E., Pihlajamaki., Vauhkonen I., Kainulainen S., Punnonen K., Vanninen E., Laakso M.: Multiple abnormalities in glucose and energy metabolism and coordinated changes in levels of adiponectin, cytokines, and adhesion molecules in subjects with metabolic syndrome. *Circulation* 2004;110:3842-3848.

Saraiva M., Christensen J.R., Veldhoen M., Murphy T.L., Murphy K.M., O'Garra A.: Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. *Immunity* 2009;31(2-3): 209–219.

Schalkwijk C.G., Stehouwer C.D.: Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 2005;109(2):143-59.

Scheiner G., Sobel R.J., Smith D.E., Pick A.J., Kruger D., King J., Green K.: Insulin pump therapy: guidelines for successful outcomes. *Diabetes Educ* 2009;35(2):29S-41S.

Schieffer B., Schieffer D., Hilfiker-Kleiner D., Hilfiker A., Kovanen P.T., Kaartinen M., Nussberger J., Harringer W., Drexler H.: Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques : potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation* 2000;101;1372-1378.

Schneider D.J., Absher P.M., Ricci M.A.: Dependence of augmentation of arterial endothelial cell expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by insulin on soluble factors released from vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1997;96:2868 –2876.

Schreiner P.J., Wu K.K., Malinow M.R., Stinson V.L., Szklo M., Nieto F.J., Heiss G.: Hyperhomocysteinemia and hemostatic factors: the atherosclerosis risk in communities study. *AEP* 2002;12,4:228-236.

Scognamiglio R., Avogaro A., Vigili de Kreutzenberg S., Negut Ch., Palisi M., Bagolin E., Tiengo A.: Effects of treatment with sulfonylurea drugs or insulin on ischemia-induced myocardial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;52,808-812.

Sena C.M., **Louro T.**, **Matafome P.**, **Nunes E.**, **Monteiro P.**, **Seiça R.**: Antioxidant and vascular effects of gliclazide in type 2 diabetic rats fed high-fat diet. *Physiol Res* 2009;58(2):203-9.

Shakuto S., Oshima K., Tsuchiya E.: Glimepiride exhibits prophylactic effect on atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 2005;182,209-217.

Shahrara S., Park C.C., Temkin V., Jarvis J.W., Volin M.V., Pope R.M.: RANTES modulates TLR4-induced cytokine secretion in human peripheral blood monocytes. *J Immunol.* 2006;177(8):5077-87.

Shanmugham L.N., **Petrarca C.**, **Castellani M.L.**, **Frydas S.**, **Vecchiet J.**, **Conti P.**, **Tete S.**: Rantes potentiates human macrophage aggregation and activation responses to calcium ionophore (A23187) and activates arachidonic acid pathways. *J Biol Regul Homeost Agents* 2006;20(1-2):15-23.

Shebuski R.J., Kilgore K.S.: Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300:729-735.

Sheng CH., Di J., Jin Y., Zhang Y.CH., Wu M., Sun Y., Zhang G.Z.: Resistin is expressed in human hepatocytes and induces insulin resistance. *Endocrine* 2008;33,2,135-143.

Shigeto M., **Katsura M.**, **Matsuda M.**, **Ohkuma S.**, **Kaku K.**: Nateglinide and mitiglinide, but not sulfonylureas, induce insulin secretion through a mechanism mediated by calcium release from endoplasmic reticulum. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322(1):1-7.

Shimazu T., Inami N., Satoh D., Kajiura T., Yamada K., Iwasaka T., Nomura S.: Effect of acarbose on platelet-derived microparticles, soluble selectins, and adiponectin in diabetic patients. *J Thromb Thrombolysis* 2009;28(4):429-35.

Sierakowska-Fijałek A., Baj Z., Kaczmarek P., Stępień M., Rysz J.: Ocena zależności pomiędzy stężeniem homocysteiny a stężeniem wybranych parametrów przemiany lipidowej i cząsteczek adhezyjnych u dzieci z czynnikami ryzyka miażdżycy. *Pol Merk Lek* 2008, XXV, 148,356.

Signorelli S., Mazzarino M.C., Spandidos D.A., Malaponte G.: Proinflammatory circulating molecules in peripheral arterial disease. *Int J Mol Med* 2007;20:279-286.

Signorello M.G., Segantin A., Passalacqua M., Leoncini G.: Homocysteine decreased platelet NO level via protein kinase C activation. *Nitric Oxide* 2009;20,104–113.

Siminiak T., Dye J.F., Egdell R.M., More R., Wysocki H., Sheridan D.J.: The release of soluble adhesion molecules ICAM-1 and E-selectin after acute myocardial infarction and following coronary angioplasty. *Inter J Cardiol* 1997;61,113-118.

Simońska E., Gumprecht J., Skubala A., Zychma M., Żywiec J., Grzeszczak W.: Adiponektyna – znaczenie w patogenezie cukrzycy typu 2. *Diabetologia Doświadczalna i Kliniczna* 2004;4,4,249-254.

Skovbjerg S., Martner A., Hynsjö L., Hessle C., Olsen I., Dewhirst FE., Tham W., Wold AE.: Gram-positive and gram-negative bacteria induce different patterns of cytokine production in human mononuclear cells irrespective of taxonomic relatedness. *J Interferon Cytokine Res* 2010;30(1):23-32.

Sorkin JD., Muller D.C., Fleg J.L., Andres L.: The relation of fasting and 2-h postchallenge plasma glucose concentrations to mortality: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging with a critical review of the literature. *Diabetes Care* 2005;28(11):2626-2632.

Spranger J., [Kroke A.](#), [Möhlig M.](#), [Hoffmann K.](#), [Bergmann M.M.](#), [Ristow M.](#), [Boeing H.](#), [Pfeiffer A.F.](#): Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 2003;52(3):812-7.

Stam F., Smulders Y.M., van Guldener C., Jakobs C., Stehouwer C.D., de Meer K.: Folic acid treatment increases homocysteine remethylation and methionine transmethylation in healthy subjects. *Clin Sci* 2005;108:449-456.

Stamler J.S., Osborne J.A., Jaraki O., Rabbani L.E., Mullins M., Singel D., Loscalzo J.: Adverse vascular effects of homocystine are modulated by endothelium –derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993;91:308-318.

Steiner G., Vranic M.: Hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia, a vicious cycle with atherogenic potential. *Int J Obes* 1982;1:117–124.

Stern A.S., Presky D.H.: Interleukin 12 – an integral cytokine in the immune response. *Life Sciences* 1996;58, No 8,639-654.

Stofkova A.: Resistin and visfatin: regulators of insulin sensitivity, inflammation and immunity. *Endocr Regul* 2010;44(1):25-36.

Su S.J., Huang L.W., Pai L.S., Liu H.W., Chang K.L.: Homocysteine and pathophysiologic concentrations activates human monocyte and induces cytokine expression and inhibits macrophage migration inhibitory factor expression. *Nutr* 2005;21,994-1002

Sun W., Wang G., Zhang Z.M., Zeng X.K., Wang X.: Chemokine RANTES is upregulated in monocytes from patients with hyperhomocysteinemia. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26:1317-1321.

Suzuki H., Fukushima M., Usami M., Ikeda M., Taniguchi A., Nakai Y., Matsuura T., Kuroe A., Yasuda K., Kurose T., Seino Y., Yamada Y.: Factors responsible for development from normal glucose tolerance to isolated postchallenge hyperglycemia. *Diabetes Care* 2003;26, 1211-1215.

Szcześniak P., Kręcki R., Owczarek A., Orszulak-Michalak D.: Nowe czynniki ryzyka choroby wieńcowej. *Farmacja Współczesna* 2008;1:42-46.

Tedgui A., Mallat Z.: Anti-inflammatory mechanism in vascular wall. *Circ Res* 2001;88; 877-887.

Thalman S., Meier C.A.: Local adipose tissue depots as cardiovascular risk factors. *Cardiovasc Res* 2007;75:690-701.

Thambyrajah J., Townend J.N.: Homocysteine and atherothrombosis – mechanism for injury. *Eur Hear J* 2000;21,967–974.

Theuma P., Fonseca V.A.: Inflammation and emerging risk factors in diabetes mellitus and atherosclerosis. *Current diabetes reports* 2003;3,3:248-254.

Tilg H. Moschen A.: Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology* 2006;6,772-783.

Tomizawa A., Hattori Y., Kasai K.: Induction of gene expression in response to globular adiponectin in vascular endothelial cells. *Life sciences* 2009;85,457-461.

Trabetti E.: Homocysteine, MTHFR gene polymorphism, and cardio-cerebrovascular risk. *J Appl Genet* 2008;49:267-282.

Tretjakovs P., Jurka A., Bormane I., Mackevics V., Mikelsone I., Balode L., Reihmane D., Stukena I., Bahs G., Aivars J.I., Pirags V.: Relation on inflammatory chemokines to insulin resistance and hypoadiponectinemia in coronary artery disease patients. *European Journal Intern Med* 2009;20,712-717.

Trinchieri^a G.: Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3(2):133-146.

Trinchieri^b G.: Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. *Int Rev Immunol* 1998;16(3-4):365-96.

Tuttle H.A., Gorman G.D., Goldman S., Copeland J.G., McDonagh P.F.: Proinflammatory cytokines are increased in type 2 diabetic woman with cardiovascular disease. *J Diabetes Complicat* 2004;18,343-351.

Umera F., Yamauchi T., Ishii H., Nakashima N., Hisatomi A., Nawata H.: Serum 1,5-anhydro-D-glucitol and glycemic control In patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Tohoku J Exp Med* 1991;163:93-100.

van Exel E., Gussekloo J., de Craen A.J., Frölich M., Bootsma-Van Der Wiel A., Westendorp R.G., Leiden 85 Plus Study: Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes : the Leiden 85-Plus Study *Diabetes* 2002;51(4):1088-92.

Venkatapuram S., Shannon R.P.: Managing atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Am J Ther* 2006;13(1):64-71.

Verma S., Li S.H., Wang Ch.H., Fedan P.W.M., Li R.K., Weisel R.D., Mickle D.A.G.: Resistin promotes endothelial cell activation further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 2003;108: 736-740.

Volk T., Hensel M., Schuster H., Kox W.J.: Secretion of MCP-1 and Il-6 by cytokine stymuleted production of reactive oxygen species in endothelial cells. *Mol Cell Biochem* 2000;206:105-112.

Von der Thüsen J.H., Kuiper J., Van Berkel T.J., Biessen E.A.: Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacol Review* 2003;55: 133-166.

Von Hundelshausen P., [Koenen R.R.](#), [Sack M.](#), [Mause S.F.](#), [Adriaens W.](#), [Proudfoot A.E.](#), [Hackeng T.M.](#), [Weber C.](#): Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood* 2005;105(3):924-30.

Wang Y., Lam K.S., Xu J.Y., Lu G., Xu L.Y., Cooper G.J.S., Xu A.: Adiponectin inhibits cell proliferation by interacting with several growth factors in an oligomerization-dependent manner. *J Biol Chem* 2005;280,18,18341-18347.

Warlow C., Sudlow C., Dennis M., Wardlaw J., Sandercock P.: Stroke. *Lancet* 2003;362, 1211-1224.

Watanabe T., Nagashima M., Terasaki M., Nohtomi K., Miyazaki A., Hirano T.: Incretin-based treatments prevent the development of atherosclerotic lesions in Apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 2010;122:A10278.

Weber C., Weber K.S., Klier C., Wank R., Koruk R., Nelson P.J.:Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T(H)1-like/CD45RO(†) T cells. *Blood* 2001;97:1144–1146.

Wegner M., Dworacka M., Winiarska H.: Interleukina 12-kolejne ogniwo łączące cukrzycę typu 2 z miażdżycą. *Diabetologia Praktyczna* 2007;tom 8, nr 11,425-430.

Weissberg P.L., Cleshman G.J., Bennett M.R.: Is vascular smooth muscle cell proliferation beneficial? *Lancet* 1996;347:305-307.

Wen Y., Gu J., Li S.L., Reddy M.A., Natarajan R., Nadler J.L.: Elevated glucose and diabetes promote interleukin-12 cytokine gene expression in mouse macrophage. *Endocrinology* 2006;147(5):2518-2525.

Wiernsperger N.F. Metformin: intrinsic vasculoprotective properties. *Diabetes Technol Ther* 2000;2:259-72.

Wile D.J., Toto C.: Association of metformin, elevated homocysteine, and methylmalonic acid levels and clinically worsened diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Care* 2010; 33:156-161.

Willoughby S., Holmes A., Loscalzo J.: Plateles and cardiovascular disease. *European Journal Cardiovasc Nur* 2002;1,273–288.

Wu C.Y., Gadina M., Wang K., O’Shea J., Seder R.A.: Cytokine regulation of Il-12 receptor β 2 expression: differential effects on human T and NK cells. *Eur J Immunol* 2000; 30(5):1364-1374.

Wulffele M.G., Kooy A., Lehert P., Bets D., Ogterop J.C., van der Burg B.B., Donker J.M., Stehouwer D.A.: Combination of insulin and metformin in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25,12:2133-2140.

Wysocki H.: Miażdżyca – etiopatogeneza, aktualne zasady prewencji i terapii. *Przewodnik Lekarza* 2004;7,80-88.

Xu D., Zhao S.P., Huang Q., Du W., Liu Y., Liu L., Xie X.: Effects of Glimepiride on metabolic parameters and cardiovascular risk factors in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Diab Res Clin Pract* 2010;88,1,77-75.

Yamanouchi^a T., Tachibana Y., Akanuma H. i wsp.: Origin and disposal of 1,5 anhydroglucitol, a major polyol in the human body. *Am. J Physiol* 1992;263: 268–273.

Yamanouchi^b T., Moramizato H., Shinohara T., Minoda S., Miyashita H., Akaoka I.: Estimation of plasma glucose fluctuation with a combination test of hemoglobin A1c and 1,5-anhydroglucitol. *Metabolism* 1992; 8: 862–867.

Yamauchi^a T., Kamon J., Waki H.: The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941-946.

Yamauchi^b T., Kamon J, Minokoshi Y. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002;8:1288-1295.

Yang F., Tan H.M., Wang H.: Hyperhomocysteinemia and atherosclerosis. *Acta Physiol Sin* 2005;57:103-114.

Yki-Järvinen H.: Thiazolidinediones. *N Engl J Med* 2004;351:1106-1118.

Young J.L., Libby P., Schonbeck U.: Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2002;88:554-567.

Yudkin J.S., Kumari M., Humphries S.E., Mohamed-Ali V.: Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 2000;148(2):209-14.

Zarowitz B.J., Conner C.: The intersection of safety and adherence: new incretin-based therapies in patients with type 2 diabetes mellitus. *Pharmacotherapy* 2009;29:55S-67S

Zernecke A., Weber Ch.: Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardio Res* 2010;86,2:192-201.

Zhang F., Slungaard A., Vercellotti G.M., Iadecola C.: Superoxide-dependent cerebrovascular effects of homocysteine. *Am J Physiol* 1998;274: R1704-R1711.

Zhou G., Myers R., Li Y., [Chen Y](#), [Shen X](#), [Fenyk-Melody J](#), [Wu M](#), [Ventre J](#), [Doebber T](#), [Fujii N](#), [Musi N](#), [Hirshman MF](#), [Goodyear LJ](#), [Moller DE.](#): Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Investig* 2001;108:1167-1174.

Zlotnik A., Yoshie O.: Chemokines. A new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12: 121-7.

Zulian A., Canello R., Girola A., Gilardini L., Alberti L., Croci M., Micheletto G., Danelli P., Invitti C.: In vitro and in vivo effects of metformin on human adipose tissue adiponectin. *Obes Facts* 2011;4:27-33.

Żurawska-Kliś M., Kosmowski M., Andrzejczak D., Drzewoski J.: Metformin lowers resistin, while insulin decreases C-reactive protein and elevates adiponectin concentrations in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabet Dośw Klin* 2011;11,1: 8–13.