

Karolina Wyszomirska

**„Ocena stężenia śródbłonkowej selektyny
w surowicy pacjentów
z otyłością brzusznią i zaburzeniami glikemii”**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor: Prof. dr hab. med. Lech Torliński

Praca wykonana

w Zakładzie Biochemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej

Katedry Chemii i Biochemii Klinicznej

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań 2012

Panu Prof. dr hab. med. Lechowi Torlińskiemu

**Kierownikowi Katedry Chemii i Biochemii Klinicznej
oraz Zakładu Biochemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

**składam serdeczne podziękowania
za opiekę podczas realizacji pracy**

**Wszystkim Życzliwym
pragnę serdecznie podziękować**

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ SKRÓTÓW	5
2. WSTĘP	8
2.1 Wprowadzenie	8
2.2 Fizjologiczna rola śródbłonna naczyniowego	9
2.3 Otyłość w praktyce klinicznej	12
2.4 Hiperglikemia a rozwój miażdżycy	14
2.5 Etapy rozwoju procesu aterogennego	15
2.6 Etapy reakcji zapalnej	16
2.7 Selektyny	19
2.8 Selektyna E	21
3. ZAŁOŻENIE I CEL BADAŃ	24
4. MATERIAŁ I METODY	25
4.1 Klasyfikacja zaburzeń glikemii zaproponowana przez PTD	25
4.2 Metodyka badań	26
4.2.1 Wskaźnik masy ciała (BMI)	27
4.2.2 Wykonanie testu doustnego obciążenia glukozą (OGTT)	27
4.2.3 Oznaczenie selektyny E w surowicy	27
4.2.4 Oznaczenie lipidów	29
4.2.4.A Oznaczenie stężenia cholesterolu całkowitego w surowicy krwi	29
4.2.4.B Oznaczenie stężenia cholesterolu frakcji HDL w surowicy krwi	29
4.2.4.C Obliczanie stężenia cholesterolu frakcji LDL w surowicy krwi	29
4.2.4.D Oznaczanie stężenia triglicerydów w surowicy krwi	29
4.2.4.E Wyliczanie stężenia cholesterolu nie-HDL	30
4.2.5 Oznaczanie stężenia hemoglobiny glikowanej HbA1C w krwi pełnej	30
4.2.6 Metoda oznaczania insuliny w surowicy krwi	30
4.2.7 Wskaźnik insulinooporności	30
4.2.8 Pomiar ciśnienia tętniczego	31
4.3 Analiza statystyczna wyników	31

5. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE	31
5.1 Charakterystyka szczegółowa badanych grup	31
5.2 Ocena współzależności stężeń selektyny E i wybranych parametrów	52
6. DYSKUSJA	60
7. WNIOSKI	64
8. STRESZCZENIE	65
9. SUMMARY	67
10. WYKAZ TABEL, RYCIN I WYKRESÓW	68
11. PIŚMIENNICTWO	71

1. WYKAZ SKRÓTÓW

ABCA-1 – białko transportowe wiążące ATP (*ang. ATP – binding cassette transporter-1*)

AGE - produkty glikacji białek (*ang. advanced glycation end products*)

AT-II - angiotensyna II

Bcl-2 - (*ang. B-cell lymphoma 2*)

BMI – wskaźnik masy ciała (*ang. body mass index*)

CD – (*ang. cluster of differentiation*)

COX 2 – cyklooksygenaza 2

CR - białka regulujące dopęlniacza

CSF- czynnik stymulujący tworzenie komórek (*ang. colony-stimulating factor*)

CV – współczynniki zmienności (*ang. coefficient of variation*)

CVD – choroba sercowo- naczyniowa (*ang. cardiovascular disease*)

DBP- ciśnienie rozkurczowe (*ang. diastolic blood pressure*)

DM t2 – cukrzyca typu 2 (*ang. diabetes mellitus*)

DXA - podwójna absorpcjometria

EC- komórki śródbłonka (*ang. endothelial cells*)

EDHF - śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (*ang. endothelium-derived hyperpolarizing factor*)

EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy (*ang. ethylenediaminetetraacetic acid*)

Selektyna E – selektyna śródbłonkowa

ELISA – test immunoenzymatyczny (*ang. sandwich enzyme – linked immunosorbent assa*)

EGF - naskórkowy czynnik wzrostu (*ang. epidermal growth factor*)

ESL-1 - ligand dla selektyny E (*ang. E selectin ligand 1*)

E-sel - selektyna E

ET-1- endotelina –1

HDL – lipoproteiny o dużej gęstości (*ang. high density lipoprotein*)

HEV – naczynia żyłne z wysokim śródbłonkiem (*ang. high endothelial venules*)

HOMA-IR- (*ang. Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance*)

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (*ang. High Performance Liquid Chromatography*)

ICAM-1 – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna -1 (*ang. intercellular adhesion molecule 1*)

ICAM-2 - międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna -2 (*ang. intercellular adhesion molecule 2*)

IDF – Międzynarodowa Federacja Cukrzycowa (*ang. International Diabetes Federation*)

IFG – nieprawidłowa glikemia na czczo (*ang. impaired fasting glucose*)

IFN- γ - interferon γ

IGT – upośledzona tolerancja glukozy (*ang. impaired glucose tolerance*)

IL - interleukiny

LDL – lipoproteiny o niskiej gęstości (*ang. low density lipoprotein*)

LPR - (*ang. lipoprotein receptor-related protein*)

L-selektyna – selektyna leukocytarna

LT - leukotrieny

MAdCAM – (*ang. mucosal addressin cell adhesion molecule*)

MAKAM-1 - cząsteczka adhezyjna

MCP-1 - białko chemotaktyczne dla monocytów (*ang. monocyte chemotactic protein-1*)

M-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów
(*ang. macrophage colony-stimulating factor*)

MMP - metaloproteinazy macierzy (*ang. matrix metalloproteinases*)

MMP-9 – metaloproteinaza 9

NH₂ – grupa aminowa

NO - tlenek azotu

NOS – syntazy tlenku azotu

NPH – insulina – insulina długodziałająca (*ang. neutral protamine Hagedorn*)

ox LDL- oksydowane lipoproteiny o niskiej gęstości

PAF - czynnik aktywujący płytki (*ang. platelet-activating factor*)

PAI-1- aktywator plazminogenu 1 (*ang. plasminogen activator inhibitor-1*)

PF 4 – czynnik płytkowy 4 (*ang. platelet factor 4*)

PGI₂ - prostacyklina 2

PGSL- 1 - ligand dla P-selektyny (*ang. P-selectin glycoprotein ligand-1*)

P-selektyna - selektyna płytkowa

SBP - ciśnienie skurczowe (*ang. systolic blood pressure*)

SR-A - receptory oczyszczania klasy A

sE-selektyna – *ang. soluble endothelial selectin*

TAG - triglicerydy (*ang. triacylglyceride*)

T-CHL - całkowity cholesterol (*ang. total cholesterol*)

TF - czynnik tkankowy (*ang. tissue factor*)

TFPI- inhibitor zewnątrzpoходnego układu krzepnięcia (*ang. tissue factor pathway inhibitor*)

TNF - czynnik martwicy guza (*ang. tumor necrosis factor*)

tPA - tkankowy aktywator plazminogenu (*ang. tissue plasminogen activator*)

TXA₂- tromboksan A₂

VASP - fosfoproteina stymulująca wazodylatację (*ang. vasodilator-stimulated phosphoprotein*)

VCAM-1- naczyniowa cząsteczka adhezyjna -1 (*ang. vascular cell adhesion molecule*)

WHR – iloraz talia/biodro (*ang. waist to hip ratio*)

2. WSTĘP

2.1 Wprowadzenie

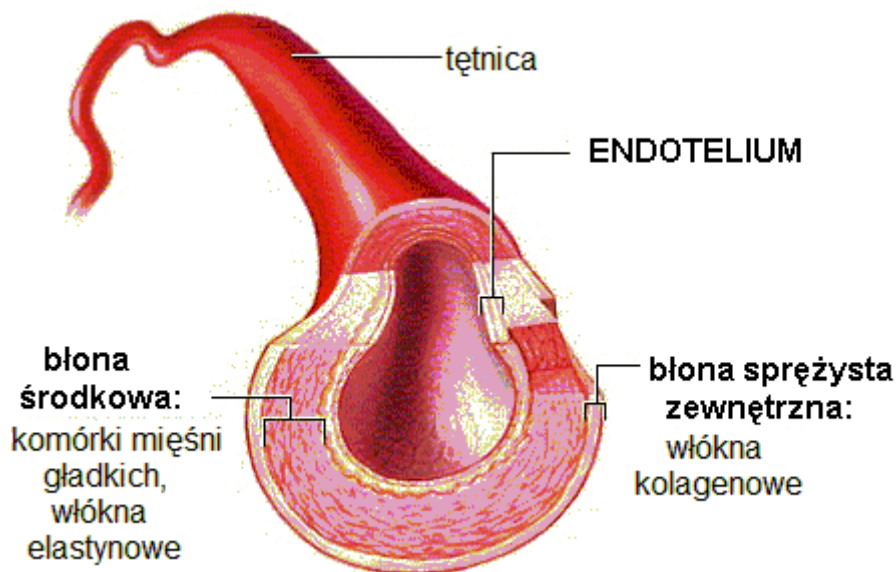
Otyłość brzuszna z towarzyszącymi zaburzeniami metabolicznymi stanowi istotną przyczynę chorób układu sercowo-naczyniowego (CVD) oraz cukrzycy typu 2 (DMt2). Około 20-25% populacji powyżej 40 roku życia w Europie i USA spełnia kryteria diagnostyczne zespołu metabolicznego [1,2], który 2-krotnie zwiększa ryzyko wystąpienia (CVD) i aż 5-krotnie – ryzyko rozwoju DMt2 [3]. Szacuje się, iż około 2 mln ludzi w Polsce choruje na cukrzycę typu 2.

Nieprawidłowa glikemia na czczo (IFG) i upośledzona tolerancja glukozy (IGT) poprzedzają rozwój pełnoobjawowej DMt2. Hiperglikemia występująca u pacjentów w wyżej wymienionych stanach jest niezależnym czynnikiem ryzyka rozwoju miażdżycy. Podwyższone stężenie glukozy we krwi nie w pełni tłumaczy zwiększoną zapadalność i zachorowalność na choroby układu sercowo-naczyniowego i wciąż poszukuje się nowych wskaźników prognostycznych. Wśród tak zwanych nietradycyjnych czynników ryzyka CVD najczęściej wymienia się markery reakcji zapalnej. Procesowi zapalnemu przypisuje się jedną z głównych ról w rozwoju i progresji miażdżycy.

Rozwój blaszki miażdżycowej na jej wczesnych etapach inicjowany jest działaniem cząstek adhezyjnych między innymi selektyn. W przyszłości ocena ich stężenia, obecnie stosowana na potrzeby badań naukowych, może pozwolić na wcześniejsze diagnozowanie pacjentów zagrożonych rozwojem miażdżycy, a w konsekwencji skuteczną prewencję późnych jej powikłań i terapię.

Dotychczasowe doniesienia skupiają się na roli, jaką cząsteczki adhezyjne między innymi selektyny, odgrywają w progresji miażdżycy u pacjentów z rozpoznanymi CVD. Nadal brak badań oceniających stężenie śródbłonkowej selektyny (selektyny E) u pacjentów otyłych na wczesnych etapach rozwoju zaburzeń metabolizmu glukozy czy we wczesnych etapach leczenia cukrzycy typu 2.

2.2 Fizjologiczna rola śródbłonna naczyniowego



Ryc. 1 Budowa naczynia krwionośnego – tętnicy [60].

Komórki śródbłonna naczyń stanowią wewnętrzną warstwę wyściełającą naczynia krwionośne i limfatyczne. Tworzą one barierę między krwią a pozostałymi warstwami ściany naczyniowej oraz sito filtracyjne w naczyniach włosowatych. Fizjologicznie liczba komórek śródbłonna występująca w dorosłym organizmie wynosi około 1×10^{12} , jego masa 1-2 kg, a powierzchnia 700-2000 m² [29], dlatego też należy go traktować jako integralny narząd. Śródbłonek syntetyzuje i uwalnia wiele substancji o różnym działaniu biologicznym. Komórki śródbłonna odgrywają także jedną z głównych ról w regulacji wazomotoryki, hemostazy i angiogenezy oraz procesów zapalnych i immunologicznych [30].

Śródbłonek jest zbudowany z pojedynczej warstwy komórek nabłonka jednowarstwowego płaskiego. Fizjologicznie ściana naczynia jest bardzo szczelną i trudną do pokonania barierą dla komórek występujących we krwi. Szczelność tę zapewniają połączenia międzykomórkowe z udziałem kadheryny 5 (CD 144 – jeden z markerów śródbłonna) i MAKAM -1 (CD 146) oraz połączenia ściśle. Leukocyty mają możliwość przejścia przez śródbłonek jedynie w wyspecjalizowanych naczyniach, które są wysłane tak zwanym

wysokim śródbłonkiem. HEV wyściela żyłki pozawłosowate narządów nielimfatycznych mogą tu migrować wszystkie rodzaje leukocytów oraz naczynia obwodowe narządów limfatycznych (węzły chłonne, migdałki, kępki Peyera), w których krew mogą opuszczać tylko limfocyty. Główną rolę w tym procesie pełni adresyna MAdCAM, występująca wybiórczo na komórkach śródbłonka naczyń HEV i żyłek pozawłosowatych [30,31].

Od strony światła naczynia komórki śródbłonka pokrywa warstwa glikokaliksu zbudowanego głównie z glikozoaminoglikanów z dominacją siarczanu heparanu. Glikokaliks, dzięki obecności grup siarczanowych, nadaje ścianie naczynia ujemny ładunek elektrostatyczny, który powoduje odpychanie cząsteczek, między innymi albumin a także ujemnie naładowanych struktur błon komórkowych składników morfotycznych krwi.

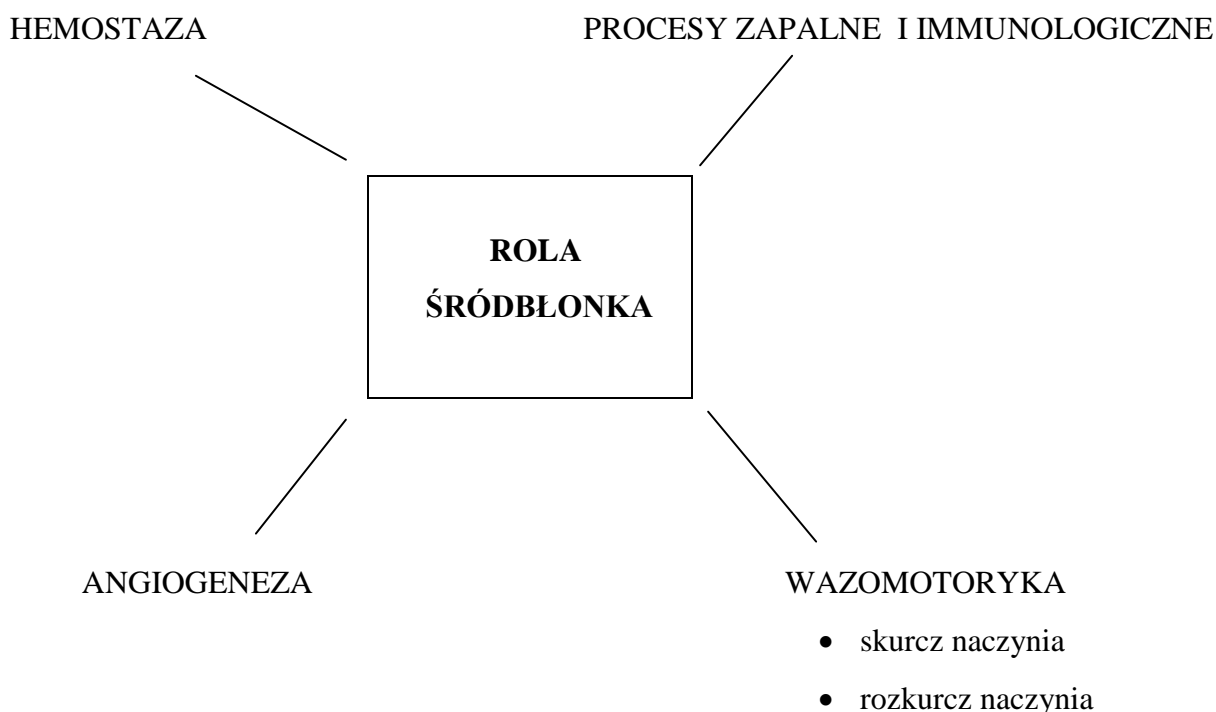
Wspomniany wyżej glikokaliks uczestniczy również w transporcie przezbłonowym, odpowiada za procesy immunologiczne oraz tworzenie zespołów komórkowych. Glikoproteiny powierzchniowe, tworzą osłonę przed rodnikami tlenowymi. Są one również kofaktorem w reakcjach wiązania i uczynniania czynników osoczowych krzepnięcia oraz czynników krzepnięcia wytwarzanych przez same komórki śródbłonka. Glikoproteiny aktywują między innymi antytrombinę III, II kofaktor heparyny, inhibitor zewnątrzpochodnego układu krzepnięcia, lipazę lipoproteinową i czynnik płytkowy 4 [30].

Część podstawno-boczna komórek śródbłonka jest miejscem występowania konstytutywnych receptorów integrynowych wiążących śródbłonek ze składnikami błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej, przede wszystkim z włóknami kolagenowymi, jak również z glikozoaminoglikanami, elastyną, fibronektyną, witronektyną, trombospondyną czy lamininą. Zapewnia to mocne przytwierdzenie śródbłonka do podłoża oraz wiązanie takich substancji, jak czynnik von Willebranda czy fibrynogen w podśródbłonku. Na powierzchni luminalnej i bocznej śródbłonka znajdują się zarówno konstytutywne, jak i indukowane cząsteczki adhezyjne : zawierające fragment lektyny – **selektyna E** i selektyna P oraz adresyny immunoglobulinopodobne: ICAM-1, ICAM-2, PECAM-1, (CD31) oraz VCAM-1. Struktury te są odpowiedzialne, między innymi, za oddziaływanie międzykomórkowe zarówno homo- jak i heterotypowe, toczenie się, aktywację, adhezję i diapedezę neutrofilii w procesach zapalnych [30].

Charakterystyczną cechą komórek śródbłonka jest obecność w cytoplazmie licznych pęcherzyków pinocytotycznych oraz białek transportowych, co świadczy o dużej aktywności metabolicznej komórek śródbłonka. W cytoplazmie znajdują się również ciała Weibel-Palade'a, zawierające multimery czynnika von Willebranda, stanowiące największe źródło tej

glikoproteiny w organizmie. Ciałka Weibel-Palade'a zawierają poza tym selektynę P, uwalnianą na powierzchnię po stymulacji śródbłonna [58].

Wśród składników błony komórek endotelium, warunkujących jej aktywność biologiczną, należy wymienić enzym konwertujący – egzoptydazę katalizującą przemianę angiotensyny I w angiotensynę II, odpowiadającą także za degradację bradykininy oraz lipazę lipoproteinową, endonukleazy, antygeny HLA klasy I i II, czynnik tkankowy i inhibitory zewnątrzpochodnego toru aktywacji krzepnięcia [30].



Śródbłonek jest źródłem wielu substancji wpływających na skurcz i rozkurcz naczyń, procesy hemostazy oraz waskulo- i angiogenezę. Jedną z najsilniejszych substancji wpływających na rozkurcz naczyń jest NO [32] powstający z L-argininy przez hydroksylację atomu azotu w grupie guanidynowej argininy z udziałem NOS. Tlenek azotu oprócz działania relaksującego na mięśniówkę gładką wpływa również na hamowanie agregacji i adhezji płytek do śródbłonna oraz działa antyproliferacyjnie na komórki mięśni gładkich [30]. Tlenek azotu ma również działanie antyoksydacyjne – ogranicza utlenianie LDL.

Kolejnym związkiem produkowanym przez komórki śródbłonna i działającym wazodylatacyjnie jest PGI₂. Wydzielana jest ona w odpowiedzi na stymulację przez siły ścierania, niedotlenienie, działanie acetylocholiny czy serotoniny. Główną funkcją fizjologiczną PGI₂ oprócz powodowania rozkurczu naczyń jest antyagregujący wpływ na

płytki krwi oraz relaksacja mięśniówki oskrzeli, zwiększanie przepływu nerkowego, utrzymanie drożności przewodu tętniczego Bothala i prawidłowego przepływu krwi przez łożysko. Z innych czynników rozszerzających naczynia i produkowanych przez śródbłonek, należy wymienić śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący oraz fosfoproteinę stymulującą wazodylatację.

Uwalnianie wyżej wymienionych substancji (EDHF, NO, PGI₂, VASP) odbywa się pod wpływem pobudzenia przez bradykininę jej błonowego receptora B₂ [33].

Oprócz czynników powodujących rozkurcz naczynia śródbłonek produkuje również substancje powodujące ich skurcz. Należą do nich TXA₂, ET-1, angiotensyna II, czynnik aktywujący płytki oraz leukotrieny. TXA₂ jest syntetyzowany zarówno w płytkach jak i śródbłonku. Działanie TXA₂ jest przeciwstawne do działania PGI₂ - silnie agreguje płytki, kurczy naczynia i pobudza rozplem mięśniówki. Jego działanie polega również na zwiększaniu wydzielania cząsteczek adhezyjnych na powierzchni śródbłonka i leukocytów. TXA₂ pobudza migrację komórek przez śródbłonek do otaczających tkanek.

W procesie hemostazy śródbłonek również odgrywa znaczącą rolę. W fizjologicznych warunkach polega ona na zapewnieniu niekrzepliwości krwi, nietrombogenności powierzchni naczynia, a po uszkodzeniu lub przerwaniu śródbłonka na ograniczaniu skrzepliny do miejsca trombogenicznego.

Oprócz wyżej wymienionych funkcji śródbłonek bierze również udział w procesie angiogenezy, czyli tworzenia nowych naczyń krwionośnych z istniejących struktur oraz waskulogenezy, czyli powstawania naczyń w okresie zarodkowym. Oba te procesy są niezbędne w rozwoju zarodkowym, reprodukcji, gojeniu ran, a także w powstawaniu naczyń w licznych procesach chorobowych takich jak miażdżyca czy nowotwory [30].

2.3 Otyłość w praktyce klinicznej.

Choroby serca i układu krążenia są jedną z głównych przyczyn zgonów w rozwiniętych społeczeństwach, a nadwaga i otyłość są dodatkowym czynnikiem ryzyka. Zgodnie wytycznymi IDF z 2005 roku głównym kryterium stanowiącym podstawę rozpoznania zespołu metabolicznego jest otyłość centralna definiowana jako obwód pasa ≥ 94 cm u Europejczyków i ≥ 80 cm u Europejki. Oprócz otyłości, do postawienia rozpoznania zespołu metabolicznego, powinny być spełnione dwa z poniżej wymienionych kryteriów: zwiększone stężenie trójglicerydów > 150 mg/dl lub leczenie tego zaburzenia, zmniejszone stężenie HDL cholesterolu < 40 mg/dl u mężczyzn i < 50 mg/dl u kobiet lub leczenie tego zaburzenia,

podwyższone wartości ciśnienia tętniczego: skurczowe ≥ 130 mmHg lub rozkurczowe ≥ 85 mmHg lub leczenie uprzednio rozpoznanego nadciśnienia tętniczego oraz zaburzenia glikemii – zwiększone stężenie glukozy na czczo ≥ 100 mg/dl bądź uprzednio rozpoznana cukrzyca typu 2.

Mimo wielu zagrożeń jakie niesie ze sobą otyłość, jest ona wciąż jeszcze bagatelizowana przez pacjentów i postrzegana tylko jako problem kosmetyczny. W Europie co trzecia osoba ma BMI > 25 kg/m². Z danych epidemiologicznych dotyczących Polski uzyskanych w badaniu POL-MONICA w 2001, BMI > 25 kg/m² wykazano u 72% mężczyzn oraz 60% kobiet w wieku 20-74 lata. Począwszy od BMI > 25 kg/m² obserwuje się wzrost umieralności, a od BMI > 30 kg/m² odsetek umieralności wzrasta istotnie. U osób otyłych z chorobami naczyniowymi stwierdzony odsetek umieralności jest większy nawet o 50-100% w porównaniu do osób o normalnej wadze [42].

Otyłość zwiększa również ryzyko udaru mózgu niezależnie od ciśnienia krwi. Liczne badania dowodzą, że otyłość sprzyja także występowaniu nie tylko cukrzycy typu 2, ale również zwyrodnieniom stawów, chorobom pęcherzyka żółciowego i zachorowaniom na raka, u mężczyzn na rak jelita grubego oraz prostaty natomiast u kobiet raka trzonu macicy, gruczołu piersiowego, jajnika oraz dróg żółciowych. Przypuszcza się, że istnieje zależność pomiędzy otyłością a zaburzeniami psychicznymi i depresją [43].

Otyłością określamy stan patologicznego zwiększenia ilości tkanki tłuszczowej, prowadzący do upośledzenia czynności organizmu człowieka. Do dokładnego oznaczenia zawartości tłuszczu w organizmie stosuje się metody bioimpedancji elektrycznej, podwójnej absorpcjometrii, tomografii komputerowej i rezonansu magnetycznego. W codziennej praktyce, a także w badaniach epidemiologicznych i klinicznych powszechnie stosuje się proste metody antropometryczne. Najczęściej wylicza się wskaźnik masy ciała (BMI), który pośrednio ocenia całkowitą zawartość tkanki tłuszczowej w ustroju, wskaźnik WHR, oceniający rozmieszczenie tkanki tłuszczowej lub wykorzystuje się pomiar obwodu w talii, na podstawie którego rozpoznaje się otyłość brzuszną [44].

Obecnie dla oceny otyłości brzusznej jako czynnika ryzyka chorób układu sercowo - naczyniowego coraz częściej za wystarczający uważa się pomiar obwodu talii. Wykazano, że im jest on większy tym, większa jest zawartość tkanki tłuszczowej w jamie brzusznej. Stwierdzono również dodatnią korelację między obwodem w talii, a stężeniem insuliny na czczo, insulinoopornością oraz częstością występowania incydentów sercowo-naczyniowych i cukrzycy. Charakter dystrybucji tkanki tłuszczowej w organizmie, bardziej niż sam fakt posiadania nadwagi czy otyłości, jest odpowiedzialny za ryzyko chorób układu

sercowo-naczyniowego, jak również za występowanie upośledzonej tolerancji glukozy czy dyslipidemii.

2.4 Hiperglikemia a rozwój miażdżycy

Hiperglikemia jest czynnikiem ryzyka miażdżycy, w której patogenezie proces zapalny odgrywa kluczową rolę [34]. Wiele danych literaturowych wskazuje na to, że proces zapalny pełni kluczową rolę w powstawaniu miażdżycy i jej powikłań, a także w rozwoju insulinooporności i cukrzycy sugerując jednocześnie, że mogłby to być element łączący wymienione jednostki chorobowe [34,35,36].

Do rozwoju miażdżycy u pacjentów z cukrzycą w największym stopniu przyczynia się kilka głównych zaburzeń metabolicznych: hiperglikemia, hiperinsulinemia i insulinooporność, dyslipidemia i stan prozakrzepowy [37]. Wymienione wyżej zaburzenia mają wpływ na proces aterogenezy poprzez działanie na komórki śródbłonna, mięśniówki gładkiej tętnic oraz płytki krwi. Proces aterogenezy odbywa się między innymi przez nasilenie reakcji zapalnej w miejscu powstawania blaszki miażdżycowej. Jedną z hipotez tłumaczy wzrost wydzielania cytokin prozapalnych w tym IL-1, IL-6 oraz TNF pod wpływem czynników takich jak oxLDL, końcowe produkty zaawansowanej glikacji (AGE) czy przewlekłej infekcji [38]. Cytokiny prozapalne mają wpływ na niemal każdy etap powstania zmiany miażdżycowej, począwszy od zwiększania adhezji monocytów do ściany naczynia a kończąc na zwiększaniu ryzyka pęknięcia blaszki miażdżycowej.

Rolę hiperglikemii w indukcji stanu zapalnego wyjaśnia się w oparciu o kilka mechanizmów. Jeden z nich tłumaczy udział hiperglikemii w zmniejszeniu syntezy NO poprzez hamowanie aktywacji syntezy NOS i zwiększenie syntezy reaktywnych form tlenu, szczególnie anionu nadadtlenkowego w komórkach śródbłonna i mięśniach gładkich [39]. Natomiast hiperglikemia w procesie glikacji białek, szlaku polioliowego oraz stresu oksydacyjnego powoduje aktywację kinazy białkowej C, która bierze udział w zwiększaniu syntezy czynników transkrypcyjnych między innymi czynnika NF- κ -B. Jego aktywacja wiąże się z regulacją ponad 160 genów biorących udział w reakcji zapalnej, odpowiedzi immunologicznej, w zjawisku apoptozy oraz proliferacji komórek. Czynnikiem NF- κ B kontroluje transkrypcję genów prozapalnych cytokin, chemokin, cząstek adhezyjnych, między innymi selektyny E i białek ostrej fazy [40,41] [Tabl. 1].

WPLYW NF- κ B NA TRANSKRYPCJĘ GENÓW DLA
POSZCZEGÓLNYCH SUBSTANCJI:

Enzymy	fosfolipaza A ₂ , 5-lipooksygenaza, 12-lipooksygenaza, COX ₂
Białka chemotaktyczne	MCP-1
Cząstki adhezyjne	selektyna P, selektyna E, ICAM-1, VCAM-1
Czynniki stymulujące	M-CSF, CSF
Metaloproteinazy	MMP-9
Molekuły biorące udział w przeistaczaniu się makrofagów w komórki piankowe	SR-A, CD34, ABCA-1
Cytokiny	TNF, Il-1 β , Il-6, Il-10, Il-12, IFN- γ ,
Czynniki antyapoptyczne	Bcl-2

Tabl. 2.0 Wpływ NF- κ B na transkrypcję genów dla poszczególnych substancji

2.5 Etapy procesu aterogennego

Miażdżycy jest powolnym procesem, którego pierwsze objawy obserwuje się po wielu latach trwania.

Morfologicznie wykładnikiem miażdżycy jest uszkodzenie, zarówno strukturalne jak i czynnościowe śródbłonna naczyniowego. Endothelium może być uszkodzone przez wiele czynników takich jak: podwyższony poziom katecholamin powodowany przez stres, nikotynę, infekcję wirusową, cukrzycę, nadciśnienie tętnicze czy kompleksy immunologiczne, występujące w chorobach reumatycznych. Szczególną rolę w rozwoju miażdżycy przypisuje się procesom zapalnym oraz zaburzeniom metabolizmu lipoprotein [1, 2].

W rozwoju procesów aterogennych wyróżnia się zwykle kilka etapów, do których należą [3]:

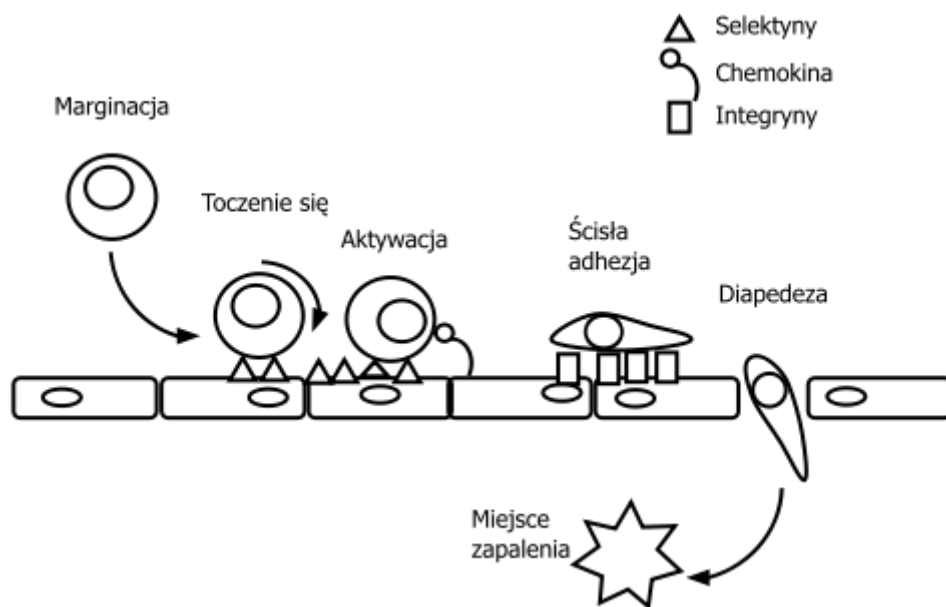
- dysfunkcja komórek śródbłónka
- przenikanie LDL do przestrzeni podśródbłónkowej i ich modyfikacja.
- migracja monocytów do warstwy podśródbłónkowej, przekształcanie się ich w komórki piankowe oraz rozpad tych komórek
- trombogeneza oraz uwalnianie z tych trombocytów czynników wzrostu i substancji chemotaktycznych
- migracja miocytów z warstwy środkowej naczynia do warstwy wewnętrznej, z następowym ich rozplemem;
- tworzenie się tkanki łącznej międzykomórkowej

Proces powstawania zmian miażdżycowych rozpoczyna się w endotelium, które zaczyna produkować molekuly adhezyjne VCAM-1, dzięki którym monocyty i limfocyty T są przyłączane do powierzchni śródbłónka. Migracja leukocytów przez endotelium odbywa się dzięki cytokinie MCP-1. Monocyty w przestrzeni błony wewnętrznej naczynia wychwytyją zmodyfikowane cząsteczki lipoprotein, ulegają przekształceniu w komórki piankowe, po czym zaczynają wytwarzać cytokiny i metaloproteiny macierzy. MMP przypisuje się dużą rolę w pęknięciu blaszki miażdżycowej, zakrzepicy przyściennej i wystąpieniu ostrych zespołów wieńcowych [4].

2.6 Etapy reakcji zapalnej

Każda reakcja zapalna przebiega w następujących etapach:

- marginacja – zależną jedynie od fizycznych właściwości krwi;
- toczenie się - proces, w którym biorą udział selektyny
- aktywacja, w której główną rolę odgrywają cytokiny, a szczególnie duża ich grupa zwana chemokinami
- ścisła adhezja, zależna głównie od integryn
- diapedeza, czyli proces przechodzenia leukocyty przez barierę śródbłónka, a dalej przez tkanki do miejsca występowania danego antygeny [28].



Ryc.2 Etapy reakcji zapalnej [45].

Marginacja

Marginacja to proces polegający na wypchnięciu leukocytów z głównego strumienia krwi w kierunku ściany naczynia krwionośnego. Przebiega on w żyłkach pozakapilarnych – naczyniach znajdujących się tuż za siecią naczyń włosowatych. Ważnym jest fakt, że ścianę wewnątrz naczyń stanowią jedynie komórki śródbłonna, w których brak warstwy mięśniowej, co ułatwia leukocytom przechodzenie do tkanek [28].

Toczenie się

Zjawisko toczenia się (ang. rolling) jest następstwem marginacji. Leukocyty, stykając się z komórkami śródbłonna, napotyka tam na selektyny. Na powierzchni leukocytów występują odpowiednie receptory za pomocą, których komórki te wiążą się z selektynami. Efektem tego wiązania jest chwilowe zaczepienie się komórki o śródbłonek, jednak napór osocza oraz innych komórek powoduje, że połączenie to jest zrywane, a sama komórka lekko obraca się, wiążąc się przez swe receptory z leżącymi dalej selektynami- powtarzanie wyżej wymienionego procesu sprawia, że leukocyt zaczyna się toczyć po śródbłonce. Zjawisko toczenia się leukocytów jest istotne, gdyż umożliwia ich aktywację. Jeżeli jednak leukocyt nie będzie posiadał receptorów dla określonych selektyn, nie wystąpi toczenie się, i co za tym idzie, nie zajdą też dalsze etapy zapalenia. Znanych jest kilka selektyn (selektyna P, selektyna

E oraz selektyna L). W zależności od rodzaju selektyny oraz rodzaju leukocyty może już na tym etapie dojść do wstępnej selekcji określonych grup komórek odpornościowych [28].

Aktywacja

Podczas toczenia się leukocyt łączy się nie tylko z selektynami, lecz za pomocą innych receptorów "bada" powierzchnię śródbłonna. Jeżeli napotka określone substancje, nazywane chemokinami, dojdzie do jego aktywacji, jeśli nie – odłączy się od śródbłonna i wróci do głównego strumienia krwi. Najważniejszą rolę w procesie aktywacji odgrywiają chemokiny. Znanych jest obecnie ponad 40 rodzajów cytokin oraz kilkanaście ich receptorów. Tak jak w wypadku selektyn, leukocyt musi posiadać receptory dla chemokin występujących na śródbłonna. Jest to prawdopodobnie najważniejszy etap w selekcji leukocytów w procesie zapalnym, gdyż poszczególne subpopulacje leukocytów charakteryzują się bardzo różnym składem tych receptorów. Z kolei to, jakie chemokiny znajdują się na powierzchni śródbłonna, zależy w znacznej mierze od charakteru antygeny, który wywołał reakcję zapalną. Na etapie aktywacji zostaje więc wybrany mechanizm, za pomocą, którego zostanie usunięty patogen. Ma to duże znaczenie, gdyż inne mechanizmy uczestniczą w usuwaniu infekcji wirusowej i inne w zwalczaniu infekcji bakteryjnej [28].

Ścisła adhezja

W wyniku aktywacji dochodzi do zmian cytoszkieletu leukocyty, czego efektem jest gwałtowna zmiana kształtu komórki – z kulistego leukocyt staje się płaski i zaczyna mocno przylegać do śródbłonna. W ten sposób nie jest już narażony na silny prąd krwi i przestaje się toczyć. Etap ten mający nazwę ścisłej adhezji, jest możliwy dzięki pojawieniu się na powierzchni śródbłonna integryn i ich połączeniu się z receptorami powierzchni leukocytów. Także tutaj dochodzi do selekcji komórek układu odpornościowego. Leukocyty zaczynają wypuszczać nibynóżki, co pozwala na ich pełzanie po śródbłonna. W efekcie docierają miejsc, gdzie między komórkami śródbłonna występują przerwy, zapoczątkowuje to proces diapedezy [28].

Diapedeza

Polega na przechodzeniu leukocytów przez barierę śródbłonna oraz przemieszczaniu się przez tkankę do miejsca, w którym występuje patogen. Podczas diapedezy aktywowany

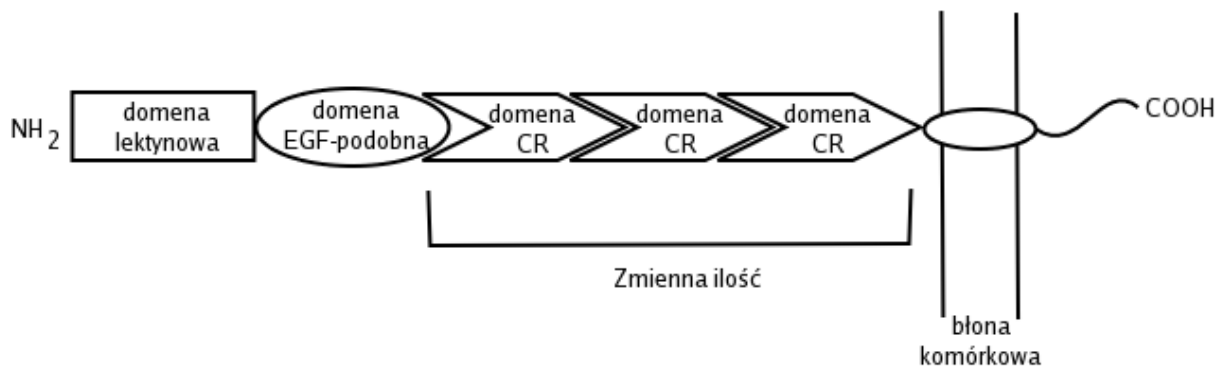
leukocyt rozpoczyna wydzielanie szeregu enzymów, które trawią tkankę i torują mu drogę. Istotną rolę w poruszaniu się odgrywają chemokiny wydzielane między innymi przez uszkodzone tkanki lub przez komórki pobudzone mediatorami z innych uszkodzonych komórek. Chemokiny i inne cytokiny wydzielane w obecności patogenu, rozprzestrzeniają się w otaczających tkankach, a ich stężenie maleje wraz z odległością od miejsca występowania patogenu. Drogę do zagrożonego miejsca wyznacza leukocytom rosnące stężenie chemokin co określamy jako chemotaksję dodatnią. Po dotarciu do celu, zaktywowane uprzednio leukocyty rozpoczynają sprawować swoje funkcje obronne [28].

2.7 Selektyny

Selektyny są białkami, które biorą udział w reakcji zapalnej i wykazują charakterystyczną budowę. Znajdują się one na powierzchni leukocytów, aktywowanych płytek krwi oraz komórek śródbłonna, gdzie są zakotwiczone – tak, jak większość białek błonowych – końcem N na zewnątrz. Wyróżnia się 3 rodzaje selektyn: selektyna L występująca na powierzchni leukocytów, selektyna P, która znajduje się w ziarnistościach alfa płytek krwi i w ciałkach Weibela-Pallade'a komórek śródbłonna oraz selektyna E występująca na aktywowanym przez cytokiny prozapalne śródbłonu [28].

W skład każdej cząsteczki wchodzi następujące domeny (licząc od NH₂-końca) [Ryc.2]:

- domena lektynowa homologiczna z lektynami zależnymi od wapnia,
- domena EGF-podobna, wykazująca podobieństwo do naskórkowego czynnika wzrostu,
- domeny homologiczne z białkami regulującymi dopełniacz (CR), występujące w zmiennej liczbie 2-9 (zależnie od selektyny),
- fragment transmembranowy, przechodzący przez błonę komórkową i kotwiczący w niej całą cząsteczkę,
- fragment wewnątrzkomórkowy, stosunkowo krótki



Ryc. 3 Schemat budowy selektyn [46].

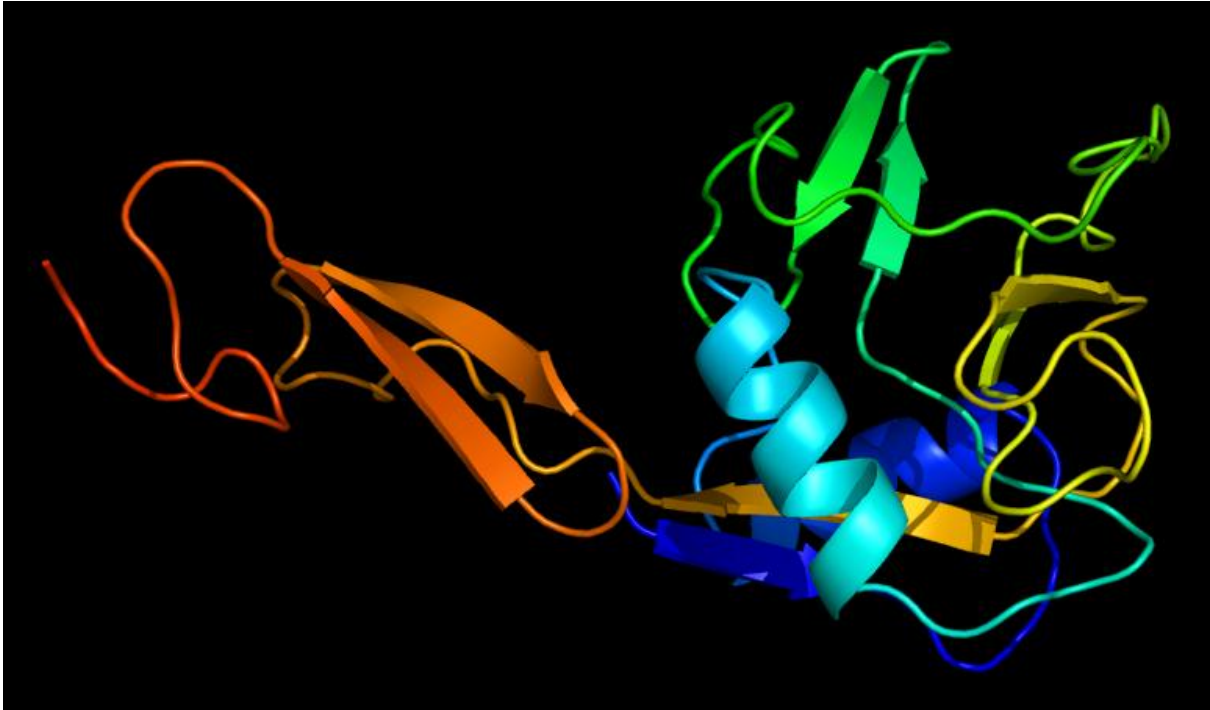
Selektyny różnią się między sobą głównie liczbą domen CR, chociaż różnice występują także w przypadku pozostałych domen. Wyróżnia się 3 rodzaje selektyn: selektyna L występująca na powierzchni leukocytów, selektyna P, która znajduje się w ziarnistościach alfa płytek krwi i w ciałkach Weibela-Pallade'a komórek śródbłonka oraz selektyna E występująca na aktywowanym przez cytokiny prozapalne śródbłonku [28].

- Selektyna L (CD62L), zwana inaczej leukocytarną. Składa się z dwóch domen CR i jest najmniejszą cząsteczką tego typu (masa cząsteczkowa 74-100 kDa). Występuje ona na powierzchni monocytów, granulocytów oraz wielu limfocytów. Selektyna L występuje jednak głównie na powierzchni niewielkich żył o wysokim śródbłonku, charakterystycznych dla unaczynienia węzłów chłonnych, dlatego pełni ważną rolę w rekrutacji leukocytów do tych narządów. Wykazano jej ważną rolę w ściąganiu neutrofilów do ognisk zapalnych. Podczas zapalenia selektyna L współdziała z selektyną P, a brak jednej z nich nie wpływa znacząco na proces toczenia się. Jednak, gdy brakuje obu selektyn, toczenie się nie zachodzi w ogóle [28].

- Selektyna P (CD62P), płytkowa, o masie cząsteczkowej 140 kDa, zawiera aż 9 domen CR, więc jest największą z selektyn. Białko to występuje w ziarnistościach α płytek krwi oraz w ciałkach Weibela-Pallade'a endoteliocytów – dzięki temu już w kilka sekund po stymulacji komórki dochodzi do pojawienia się CD62P na jej powierzchni, bowiem tyle czasu jest potrzebne na wyprodukowanie tego białka. Przesunięcie selektyny P z ziarnistości do błony komórkowej następuje pod wpływem takich czynników jak trombina czy histamina. Także cytokiny prozapalne (IL-1) mogą indukować jej ekspresję. Rola CD62L polega głównie na jej

udziale we wczesnych etapach toczenia się. Wykazano, że selektyna P jest zdolna do samodzielnego zapoczątkowywania toczenia się leukocytów podczas zapalenia i może kompensować brak selektyny E. Równocześnie jednak selektyna E może z dużym powodzeniem zastępować selektynę P [28].

2.8 Selektyna E



Ryc. 4 Selektyna E [47].

Selektyna E (CD 62E) ma pośrednią masę cząsteczkową (115 kDa) między selektyną P i L, co jest wynikiem obecności 6 domen CR. Selektyna E jest cząsteczką adhezyjną, mediuje adhezję neutrofilii, monocytów i komórek T pamięci do aktywowanych cytokinami endoteliocytów, rozpoznając sialylowane grupy karboksylowe, mające powinowactwo do rodzin Lewis X i Lewis A [5]. Ekspresja selektyny E pojawia się na zmienionych zapalnie komórkach śródbłonna jako odpowiedź na działanie cytokin prozapalnych [6]. Udowodniono, że jej funkcja polegająca na mediowaniu toczenia się leukocytów jest mniej istotną niż analogiczna funkcja selektyny P [7,8]. Myszy z niedoborem selektyny E wykazują tylko niewielki defekt toczenia się leukocytów [7]. Główną funkcją selektyny E jest jej udział w przejściu leukocytów z etapu toczenia się do ścisłej adhezji po aktywacji komórki. U myszy z niedoborem selektyny E obserwuje się zmniejszoną liczbę leukocytów, które uległy adhezji

w odpowiedzi na czynnik chemotaktyczny lub stymulację cytokinową [9,10]. Defekt ten może być związany z o wiele większymi prędkościami toczenia się obserwowanymi w przypadku braku selektyny E. Ona może bowiem spowalniać ruch komórek toczących się po śródbłonku. Gdy prędkość tego ruchu jest zbyt duża, komórka mimo aktywacji może w ogóle nie mieć szans na zmianę kształtu i przyłgnięcie do śródbłonka nim dojdzie do miejsca procesu zapalnego, w którym zanikają selektyny, integryny i chemokiny. Brak genów dla selektyny P i selektyny E doprowadza do sytuacji, charakteryzującej się całkowitym brakiem napływu leukocytów do płynu mózgowo-rdzeniowego, zwiększoną produkcją leukocytów oraz całkowitym brakiem toczenia się. W normalnych warunkach selektyna E występuje w mikronaczyniach skórnych, a w procesach zapalnych skóry wspomaga rekrutację specyficznych dla niej limfocytów T. Selektyna E uczestniczy w o wiele wolniejszym toczeniu się niż selektyna P. W zależności od stopnia ekspresji selektyny E prędkości toczenia się wynoszą mniej niż 5 $\mu\text{m/s}$ [7,16] do około 15 $\mu\text{m/s}$ [9]. Szybkość toczenia się mediowanego przez selektynę E jest w znacznym stopniu niezależna od sił ścierających „*shear rate*” ściany naczynia.

Selektyny wiążą się z różnymi pod względem chemicznym odmianami białek, wśród których najczęściej spotyka się mucyny. Selektyna E posiada 2 ligandy: PSGL-1 i ESL-1, które występują na powierzchni limfocytów podczas przewlekłego procesu zapalnego oraz na limfocytach zasiedlających skórę [17].

W modelu zapalnym miażdżycy selektyna E jest uważana za ważny czynnik tworzenia blaszki miażdżycowej. Jej ekspresję obserwuje się na zmienionym miażdżycowo śródbłonku, w szczególności, gdy stwierdzana jest obecność podśródbłonkowych nacieków leukocytarnych [18].

LRP, białko o masie 420 kDa, należy do nadrodziny receptorów LDL. Funkcjonuje jako multiligandowy receptor endocytarny, biorący udział w endocytozie szeregu cząsteczek, w tym t-PA, urokinazy i PAI-1 [19-20]. Rozpuszczalne ligandy ulegają przy pomocy LRP endocytozie, są następnie szybko wychwytywane przez lizosomy, gdzie zachodzi ich rozkład, natomiast uwolniony od nich LRP wędruje z powrotem do błony komórkowej [21]. Wykazano ostatnio, że łączenie LRP z pewnymi ligandami ma związek ze zmianą kurczliwości ściany naczyń [22] oraz wpływa na przepuszczalność bariery krew – mózg [23]. LRP jest również receptorem dla czynnika płytkowego 4, chemokiny o aterogennych właściwościach wydzielanej przez aktywowane płytki krwi. Przyłączenie tego ligandu do LRP indukuje na komórkach śródbłonka, poprzez aktywację jądrowego czynnika NF κB , syntezę mRNA selektyny E, co daje efekt ostateczny w zwiększonej jej ekspresji na

powierzchni endotelium [24]. Komórki śródbłonna pod wpływem aktywowanych płytek syntetyzują także MCP-1 co promuje rekrutację i adhezję monocytów do ściany naczynia w warunkach wysokich sił ścierania [25,26]. Aktywacja płytek powoduje również, że uwalniana z nich $IL-1\beta$ aktywuje komórki śródbłonna, zwiększając ich adhezyjność w stosunku do neutrofilii [27].

3. ZAŁOŻENIE I CEL BADAŃ

Rozwój blaszki miażdżycowej na jej wczesnych etapach inicjowany jest działaniem prozapalnych cząstek adhezyjnych między innymi selektyny E. Celem badań była weryfikacja poniższych trzech hipotez badawczych:

1. Czy stężenie śródbłonkowej selektyny we krwi jest niezależnym markerem ryzyka rozwoju miażdżycy?
2. Czy stężenie śródbłonkowej selektyny rośnie wraz z nadmierną masą ciała i stopniem zaburzenia metabolizmu glukozy (IGT, cukrzyca typu 2)?
3. Czy leczenie osób z nadmierną masą ciała i cukrzycą typu 2 pochodną biguanidu – metforminą zmniejsza stężenie śródbłonkowej selektyny?

4.1. MATERIAŁ I METODY

Tabl. 4.1 Klasyfikacja zaburzeń glikemii zaproponowana przez Polskie Towarzystwo Diabetologiczne (PTD)

Oznaczenie	Stężenie glukozy w osoczu	Interpretacja
Glikemia przygodna - oznaczona w próbce krwi chorego pobranej o dowolnej porze dnia, niezależnie od pory ostatnio spożytego posiłku	≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l)	Rozpoznanie cukrzycy jeżeli u chorego występują typowe objawy choroby (wzmoczone pragnienie, wielomocz, osłabienie, spadek masy ciała)
Glikemia na czczo – oznaczona w próbce krwi pobranej 8-14 godzin od ostatniego posiłku	<100 mg/dl ($<5,6$ mmol/l) 100-125 mg/dl (5,6-6,9 mmol/l) ≥ 126 mg/dl ($\geq 7,0$ mmol/l)	Prawidłowa glikemia na czczo Nieprawidłowa glikemia na czczo (IFG) Cukrzyca
Glikemia w 120 min. doustnego testu obciążenia glukozą (OGTT)	< 140 mg/dl (7,8 mmol/l) 140-199 mg/dl (7,8-11,0 mmol/l) ≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l)	Prawidłowa tolerancja glukozy (NGT) Nieprawidłowa tolerancja glukozy (IGT) Cukrzyca

4.2 METODYKA BADAŃ

Badaniami objęto grupę 108 osób. W obrębie badanej populacji wyróżniono pięć grup:

- GRUPA 0 - kontrolna - osoby z prawidłową masą ciała oraz prawidłową tolerancją glukozy (n=22)
- GRUPA 1 - osoby z nadmierną masą ciała z prawidłową tolerancją glukozy(n=20)
- GRUPA 2 - osoby z nadmierną masą ciała oraz z upośledzoną tolerancją glukozy (IGT) (n=22)
- GRUPA 3 - osoby z nadmierną masą ciała i rozpoznaną cukrzycą typu 2 (n=21)
- GRUPA 4 - osoby z nadmierną masą ciała i cukrzycą leczenia pochodną biguanidu – metforminą.(n=23), średni czas trwania cukrzycy 4 lata

Pacjentów przebadano klinicznie i biochemicznie. W grupie pacjentów z rozpoznaną cukrzycą typu 2 na podstawie wywiadu lekarskiego wykluczono osoby ze schorzeniami ostrymi (zawał serca, udar mózgu) i przewlekłymi (na przykład nowotwory). Do badań nie zakwalifikowano pacjentów z przewlekłymi powikłaniami cukrzycy. Przyjęcie powyższych kryteriów pozwoliło uzyskać optymalną jednorodność badanej grupy. We wszystkich badanych grupach, oprócz grupy kontrolnej, na podstawie BMI oraz obwodu talii (wskaźnik WHR) rozpoznano nadmierną masę ciała ($BMI > 25 \text{ kg/m}^2$). U wszystkich pacjentów oznaczone były również następujące parametry ciśnienie tętnicze, hemoglobina glikowana (HbA1C), glikemia na czczo, profil lipidowy, insulina oraz wskaźnik insulinooporności. Rozpoznanie normoglikemii, upośledzonej tolerancji glukozy oraz cukrzycy typu 2 postawiono wykonując test doustnego obciążenia glukozą.

4.2.1 WSPÓŁCZYNNIK MASY CIAŁA (BMI)

Oznaczany na podstawie pomiaru wzrostu oraz masy ciała

$$\text{WSPÓŁCZYNNIK} \quad \frac{\text{MASA}}{\text{(WZROST}^2\text{)}} \quad \frac{\text{kg}}{\text{(m)}^2}$$

BMI

4.2.2. TEST DOUSTNEGO OBCIĄŻENIA GLUKOZĄ (OGTT)

U wszystkich osób badanych krew pobierano w pozycji siedzącej na czczo oraz po 120 minutach od obciążeniu glukozą z żyły okolicy zgięcia łokciowego do zestawów Monovette firmy Sarstedt.

Pierwsze pobranie krwi – wykonano na czczo (0 minuta testu OGTT), do dwóch probówko-strzykawk:

- 1- na skrzep,
- 2- zawierającej EDTA

Po pierwszym pobraniu badanym osobom podano do wypicia w ciągu 5 minut, 75 g glukozy rozpuszczonej w 300 ml wody (porcje przygotowano w Aptece Akademickiej UM).

Następnie wykonano drugie pobranie krwi w 120 minucie po spożyciu glukozy do jednej probówko-strzykawki na skrzep.

Z pierwszego pobrania, po skrzepnięciu, krew odwirowano, a następnie część surowicy w odpowiednich porcjach natychmiast zamrożono w temperaturze -20°C dla oznaczenia stężenia insuliny.

W świeżej surowicy oznaczono: stężenie glukozy, stężenie składników lipidowych lipoprotein: cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji HDL, triglicerydów. We krwi pełnej pobranej na EDTA oznaczono stężenie hemoglobiny glikowanej (HbA1c).

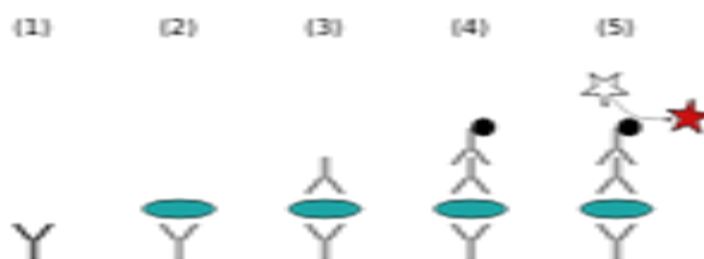
Pozostałą część surowicy zamrożono w temperaturze -20°C dla oznaczenia selektyny E.

Z drugiego pobrania, po skrzepnięciu krew odwirowano i w surowicy natychmiast oznaczono stężenie glukozy.

4.2.3 OZNACZANIE STĘŻENIA SELEKTYNY E W SUROWICY

Selektynę E oznaczono testem ELISA (R&D System, USA). Pomiary przeprowadzono na czytniku mikroplątki BioTek Elx800 (BioTek Instruments, Inc., USA) z detekcją w świetle widzialnym o długości fali 450 nm. Immunoenzymatyczny test specyficzny dla sE-selektyny

(ang. *soluble endothelial selectin*) nazywany jest również testem podwójnego wiązania ELISA. Przeciwciała monoklonalne specyficzne dla sE-selektyny zostały naniesione na płytkę. Surowice próbne oraz surowica badana zostały następnie naniesione, za pomocą pipety w odpowiednie miejsca i sE-selektyna była wiązana przez przeciwciała. Po przemyciu i usunięciu niezwiązanych substancji dodawane było przeciwciało monoklonalne. Po kolejnym przemyciu celem usunięcia niezwiązanych przeciwciał, dodawano substrat dla enzymu związanego z przeciwciałem. W wyniku reakcji enzymatycznej zmianie uległ kolor dodanego substratu. Mierzona była absorbancja produktu reakcji enzymatycznej.



Ryc.5 Zasada wykonania testu ELISA [61].

- (1) Przeciwciało monoklonalne
- (2) Reakcja przeciwciała monoklonalnego z antygenem
- (3) Reakcja z przeciwciałem wykrywającym
- (4) Reakcja z przeciwciała wykrywającego z przeciwciałem wyznakowanym enzymem
- (5) Dodawanie substratu, który jest konwertowany do wykrywalnej formy przez enzym na przeciwciałach drugorzędowych (wyznakowanych enzymem)

Czułość metody wynosiła 0,009 ng/ml, współczynniki zmienności oceniono na 3,0—5,3 % (międzyseryjny – *inter - assay CV*) 5,4–6,0% (wewnątrzseryjny – *intra-assay CV*-5,4-6,0%).

4.2.4 OZNACZANIE LIPIDÓW

4.2.4.A METODA OZNACZANIA STĘŻENIA CHOLESTEROLU CAŁKOWITEGO W SUROWICY KRWI (T-CH)

Manualnie, metodą enzymatyczną (z esterazą cholesterolową / oksydazą cholesterolową), wykorzystując zestaw odczynników firmy bioMerieux, na spektrofotometrze SPECORD 40

4.2.4.B OZNACZANIE STĘŻENIA CHOLESTEROLU FRAKCJI HDL W SUROWICY KRWI (HDL)

Frację HDL uzyskiwano w badanym materiale po wytrąceniu chylomikronów, lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL) oraz lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) kwasem fosforowolframowym w obecności jonów magnezowych. Po odwirowaniu w supernatancie zawierającym lipoproteiny HDL oznaczono stężenie cholesterolu metodą podaną w podpunkcie 4.2.4.A (patrz oznaczenie stężenia cholesterolu całkowitego), wykorzystując zestaw odczynników firmy bioMerieux, na spektrofotometrze SPECORD 40.

4.2.4.C OBLICZANIE STĘŻENIA CHOLESTEROLU FRAKCJI LDL W SUROWICY KRWI (LDL)

Stężenie cholesterolu we frakcji LDL wyliczono przy pomocy wzoru Friedewalda:

$$\text{LDL-CH} = (\text{TC} - \text{HDL-CH}) - \text{TG}/5 \text{ (mg/dl)}$$

4.2.4.D OZNACZANIE STĘŻENIA TRIGLICERYDÓW W SUROWICY KRWI (TAG)

Oznaczenie wykonano manualnie, metodą enzymatyczną, wykorzystując zestaw odczynników firmy bioMerieux, na spektrofotometrze SECORD 40.

Kontrolę jakości w/w wykonywanych oznaczeń przeprowadzono przy użyciu surowic: RANDOX Assayed Human Multi Sera Level 1 (prawidłowa) i RANDOX Assayed Human Multi Sera Level 2 (patologiczna).

4.2.4.E WYLICZANIE STĘŻENIA CHOLESTEROLU NIE-HDL

Stężenie cholesterolu nie-HDL wyliczono ze wzoru:

$$(T-CH) - (HDL-CH) \text{ (mg/dl)}$$

4.2.5 OZNACZANIE STĘŻENIA HEMOGLOBINY GLIKOWANEJ HbA_{1c} WE KRWI PEŁNEJ

Oznaczenie HbA_{1c} wykonano w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej i Mikrobiologicznej, ul. Juraszów 7/19 w Szpitalu Wojewódzkim w Poznaniu (kierownik: dr med. Włodzimierz Pawłowski) metodą HPLC odczynnikami firmy Bio-Rad na aparacie D-10 firmy Bio-Rad, w pełnej krwi pobranej na EDTA. Czulość metody wynosi 0,05 %. Oceniono współczynniki zmienności (CV): międzyseryjnej (*inter-assay CV*) 1,81 - 2,35 % i wewnątrzseryjnej (*intra-assay CV*) 1,65 -2,66 % .

4.2.6 METODA OZNACZANIE STĘŻENIA INSULINY W SUROWICY KRWI

Stężenie insuliny w surowicy krwi oznaczano metodą immunoenzymatyczną (ELISA) z zastosowaniem zestawu INS-EASIA kit firmy Biosource przy użyciu czytnika mikroplątek Sunrise Tecan. Zakres wartości referencyjnych dla zastosowanej metody oznaczania stężenia insuliny w surowicy na czczo wynosi 5-19 mU/l. Czulość metody wynosi 0,15 mU/l. Oceniono współczynniki zmienności: międzyseryjnej (*inter-assay CV*) 3,0-5,3 % i wewnątrzseryjnej (*intra-assay CV*) 4,5–9,5%.

4.2.7 WSKAŹNIKI INSULINOOPORNOŚCI

Wskaźnik IR obliczono ze wzoru:

$$IR = \frac{\text{stężenie insuliny na czczo [mU/l]}}{\text{stężenie glukozy na czczo G 0' [mg/dl]}}$$

Wskaźnik HOMA-IR obliczono ze wzoru:

$$\text{HOMA} = \frac{\text{stężenie insuliny na czczo [mU/l]} \times \text{stężenie glukozy na czczo G 0' [mmol/l]}}{22,5}$$

4.2.8 POMIAR CIŚNIENIA TĘTNICZEGO

Pomiar ciśnienia tętniczego (RR) przeprowadzany był przy użyciu nieinwazyjnego miernika ciśnienia krwi – sfigmomanometru sprężynowego

4.3 Analiza statystyczna wyników

Uzyskane w badaniach wyniki analizowano przy użyciu programu komputerowego STATISTICA 10 dla systemu operacyjnego Windows 8.

Zgodność rozkładu badanych cech z rozkładem normalnym oceniano testem Shapiro-Wilka. W analizie statystycznej zastosowano testy nieparametryczne: dla oceny różnic między pięcioma grupami - test Kruskala-Wallisa, a następnie test Dunna; dla oceny różnic między dwoma grupami, kobiet i mężczyzn, w grupach od 0 do 4 – test Mann-Whitney'a. Różnice uznawano za istotne statystycznie, jeżeli $p < 0,05$.

Korelacje oceniono testem nieparametrycznym, uwzględniając współczynnik korelacji „R” istotny przy $p < 0,05$. Korelacje selektywne E i innych oznaczanych parametrów poddano analizie regresji wielorakiej, przedstawiając współczynnik β i R^2 istotne przy $p < 0,05$.

5. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

5.1 Charakterystyka szczegółowa badanych grup

Szczegółowa charakterystyka kliniczna i laboratoryjna badanych osób w grupach 0-4 została przedstawiona w tabeli 5.1.1.

Tab. 5.1.1 Charakterystyka badanych grup. Dane przedstawiono jako medianę oraz górny i dolny kwartył (w nawiasie).

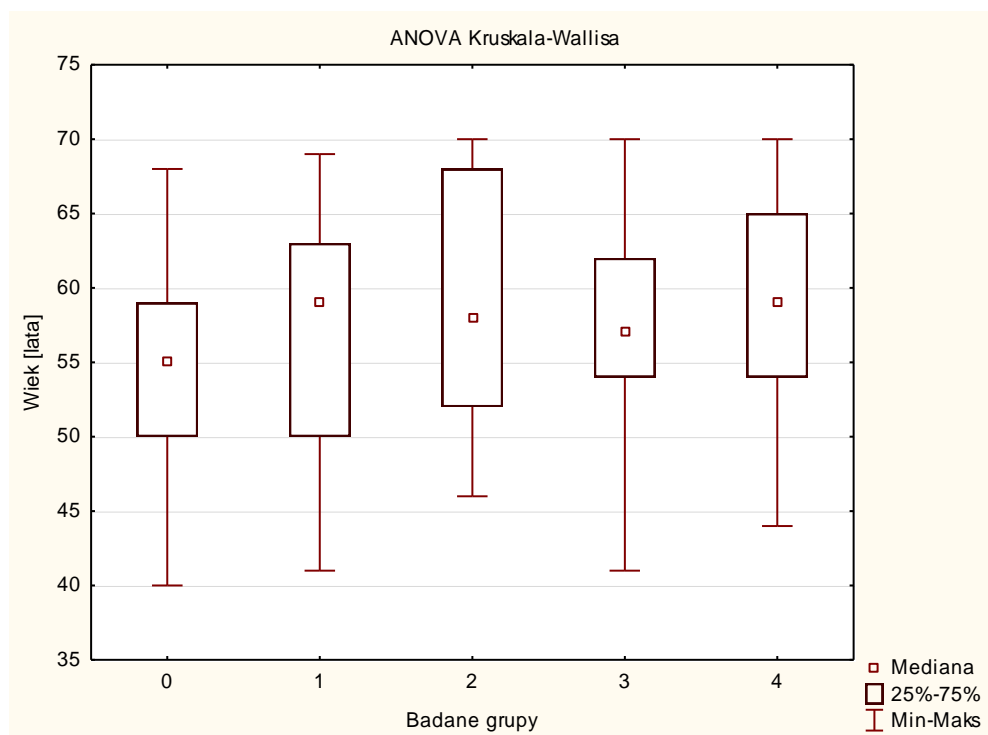
Oznaczany Parametr	Grupa 0 n=22	Grupa 1 n=20	Grupa 2 n=22	Grupa 3 n=21	Grupa 4 n=23
WIEK [lata]	55,0 (50,0-59,0)	59,0 (50,0-63,0)	58,0 (52,0-68,0)	57,0 (54,0-62,0)	59,0 (54,0-65,0)
BMI [kg/m ²]	23,3 (22,4-24,1)	33,2 (30,9-37,5)	35,1 (29,2-39,1)	34,2 (30,4-37,2)	31,4 (27,7 -33,1)
OBWÓD TALII [cm]	82,0 (75,0-90,0)	104,0 (100,0- 109,0)	109,0 (95,0-115,0)	111,0 (98,0-117,0)	109,0 (101,0-114,0)
SBP [mmHg]	120,0 (115,0-125,0)	140,0 (130,0-150,0)	140,0 (135,0- 150,0)	140,0 (130,0-160,0)	140,0 (130,0-150,0)
DBP [mmHg]	78,0 (70,0-80,0)	81,5 (80,0-90,0)	80,0 (75,0-85,0)	90,0 (80,0-90,0)	83,5 (80,0-90,0)
HbA1C [%]	5,3 (5,2-5,4)	5,5 (5,4-5,7)	6,1 (5,9-6,4)	6,8 (6,5-6,9)	6,6 (6,2-7,1)
GLIKEMIA W 0' OGTT [mg/dl]	84,2 (78,6-88,8)	97,1 (90,7-100,3)	110,3 (104,1-119,1)	121,0 (116,5- 125,0)	123,0 (114,0-130,0)
GLIKEMIA W 120' OGTT [mg/dl]	88,5 (84,5-96,4)	110,0 (98,6-125,1)	163,0 (149,0-170,0)	223,0 (208,5-244,0)	--
INSULINA 0' [mU/l]	7,6 (7,2-8,5)	21,7 (19,7-29,3)	26,2 (19,8-36,3)	35,2 (20,0 -42,9)	54,6 (45,2-74,6)
IR	0,10 (0,09-0,10)	0,25 (0,21-0,31)	0,24 (0,20-0,38)	0,31 (0,17-0,35)	0,44 (0,35 -0,67)
HOMA-IR	1,6 (1,4-1,9)	5,3 (4,3-6,9)	7,5 (4,7-10,0)	10,7 (5,6-13,3)	17,2 (14,3-23,6)
T-C [mg/dl]	172,3 (150,0-193,7)	216,0 (172,0- 237,0)	201,0 (186,0- 236,7)	214,8 (194,9-247,0)	208,0 (181,0 -246,0)
TAG [mg/dl]	82,9 (70,0-93,0)	140,4 (114,8-172,4)	127,0 (88,4 -193,9)	207,9 (188,6- 309,6)	141,0 (115,0-217,0)
HDL-C [mg/dl]	59,1 (54,9- 67,2)	49,5 (43,1-52,8)	58,6 (48,3-65,7)	46,0 (38,0-57,6)	45,0 (39,0-55,0)
LDL-C [mg/dl]	91,7 (72,6- 113,3)	125,8 (94,1- 155,6)	118,6 (102,3- 145,8)	129,3 (97,2- 146,1)	127,8 (111,6- 163,6)
Nie-HDL-C [mg/dl]	107,7 (86,6-133,5)	157,3 (133,6-181,4)	151,6 (122,2- 177,0)	162,8 (139,1- 204,0)	174,0 (137,0-185,0)
E - SELEKTYNA [ng/ml]	15,6 (8,2-20,2)	23,3 (8,5-34,5)	43,4 (32,8-52,6)	43,5 (36,3-51,7)	26,6 (18,7-32,7)

Osoby w grupie kontrolnej charakteryzowały prawidłowe wartości obwodu talii, BMI, ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego oraz prawidłowe parametry gospodarki węglowodanowo-lipidowej [Tab. 5.1.1].

Na poniższych wykresach i tabelach przedstawiono szczegółową charakterystykę porównawczą badanych grup.

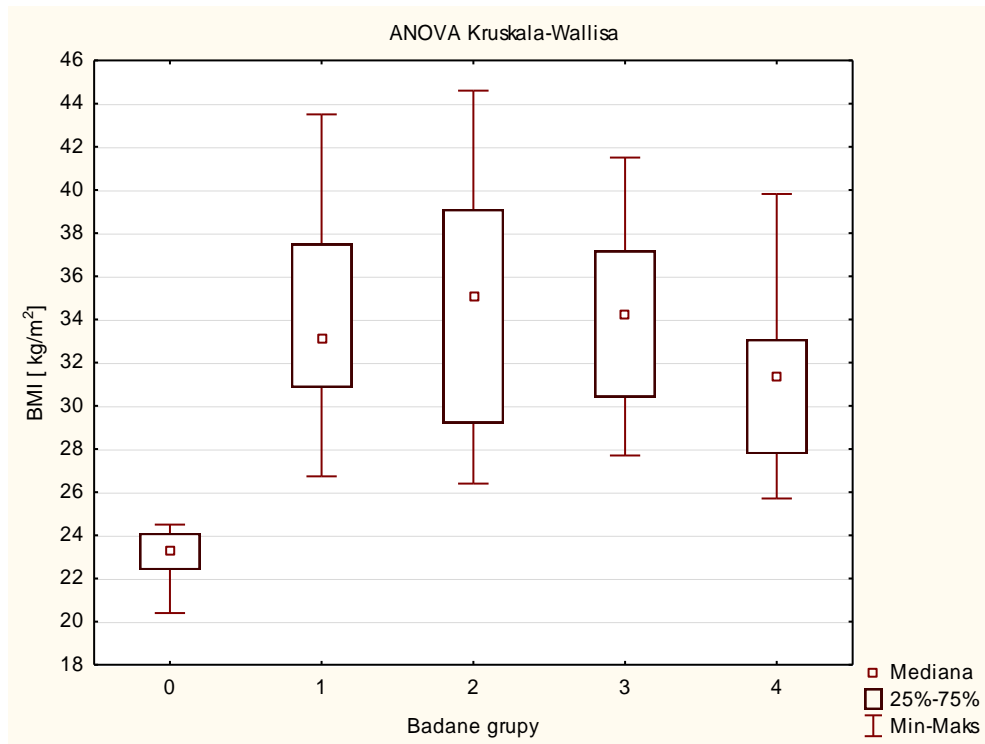
Badane grupy 0-4 nie różniły się istotnie statystycznie wiekiem [Wykres 5.1.1].

Wykres 5.1.1 Porównanie badanych grup pod względem wieku – brak różnic między grupami 0-4.

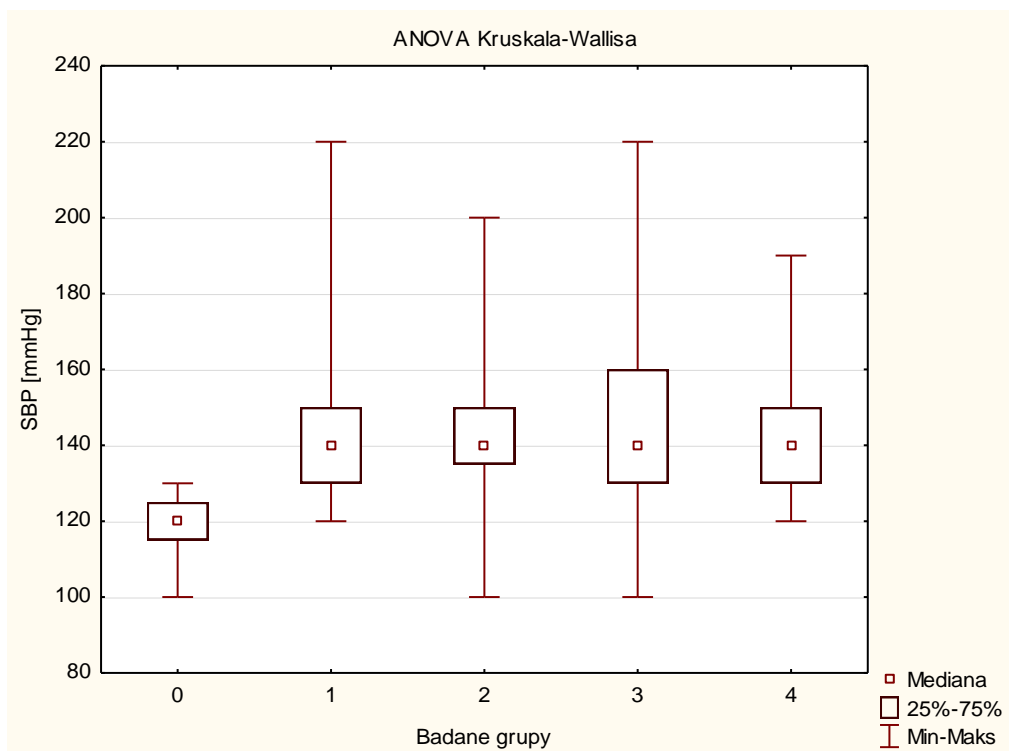


Osoby z nadmierną masą ciała ($BMI > 25 \text{ kg/m}^2$) wyszczególnione w grupach 1-4 nie różniły się między sobą pod względem wieku, BMI, ciśnienia skurczowego i rozkurczowego, cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji LDL oraz nie-HDL [Wykresy 5.1.2 - 5.1.7].

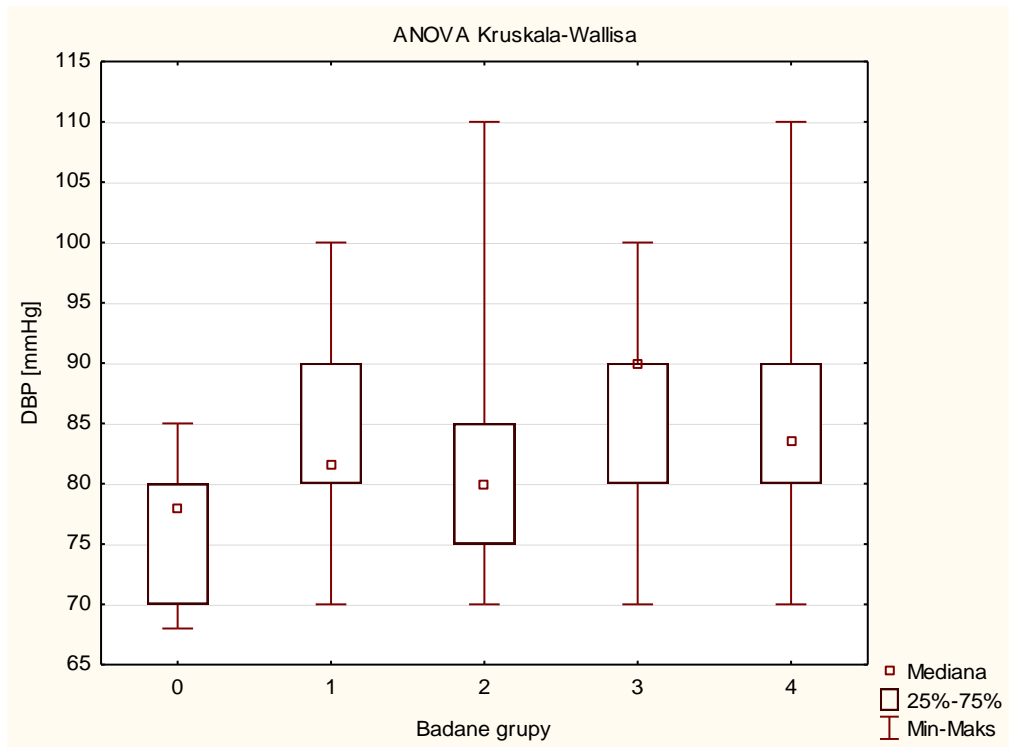
Wykres 5.1.2 Porównanie badanych grup pod względem BMI – brak różnic między grupami 1-4



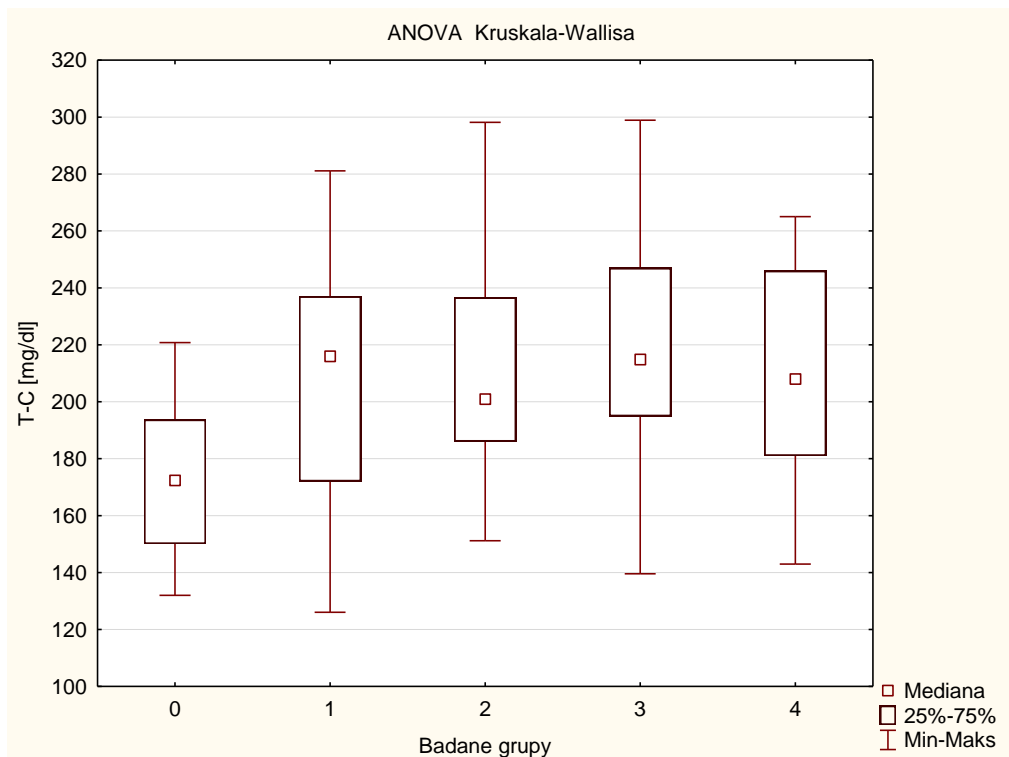
Wykres 5.1.3 Porównanie badanych grup pod względem ciśnienia skurczowego, SBP- brak różnic między grupami 1-4



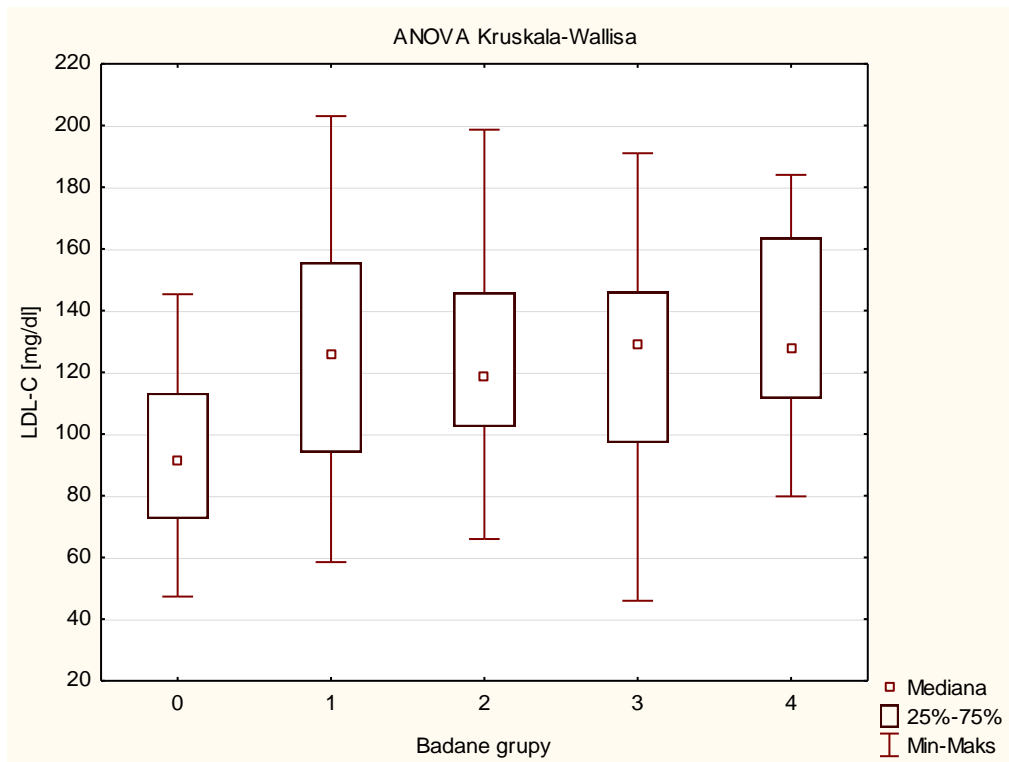
Wykres 5.1.4 Porównanie badanych grup pod względem ciśnienia rozkurczowego, DBP - brak różnic między grupami 1-4.



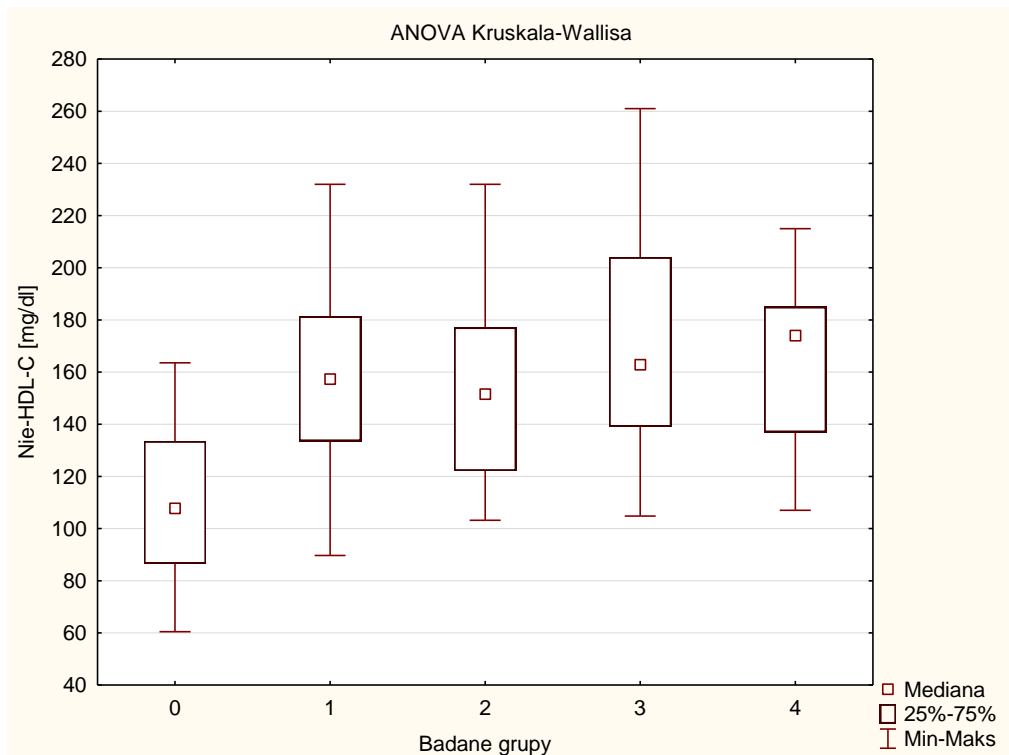
Wykres 5.1.5 Porównanie badanych grup pod względem stężenia cholesterolu całkowitego na czczo – brak różnic między grupami 1-4.



Wykres 5.1.6 Porównanie badanych grup pod względem stężenia cholesterolu frakcji LDL na czczo – brak różnic istotnych statystycznie między grupami 1-4.

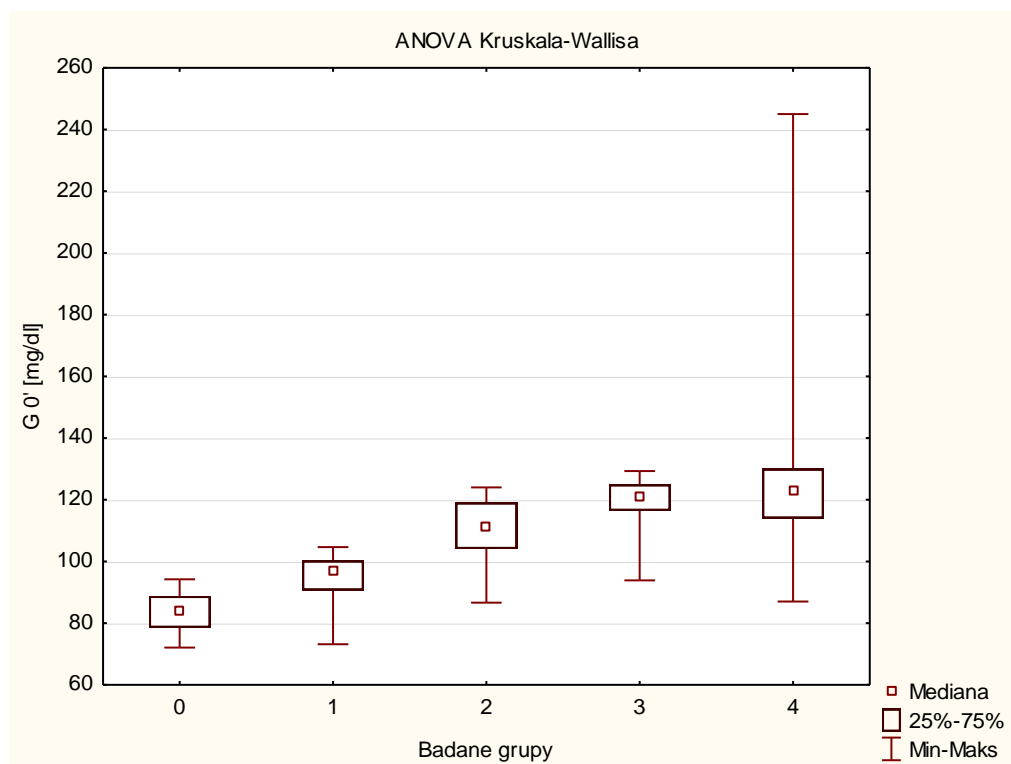


Wykres 5.1.7 Porównanie badanych grup pod względem stężenia cholesterolu nie-HDL na czczo – brak różnic między grupami 1-4.



Wykonana analiza wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami 0-4 w stężeniach glukozy na czczo. Stężenia glukozy na czczo stopniowo wzrastały w grupach od 0-4. Najwyższe stężenia obserwowano u pacjentów z cukrzycą typu 2 leczonych pochodną biguanidu. Grupa 4 miała porównywalne stężenia glukozy na czczo z grupą 3.

Wykres 5.1.8 Porównanie badanych grup pod względem glikemii na czczo testem Kruskal-Wallisa



Tab. 5.1.2 Analiza *post hoc* różnic między badanymi grupami glikemii na czczo – test Dunna.

Wartości p podano w tabelach. Różnice uznano za istotne statystycznie gdy $p < 0,05$.

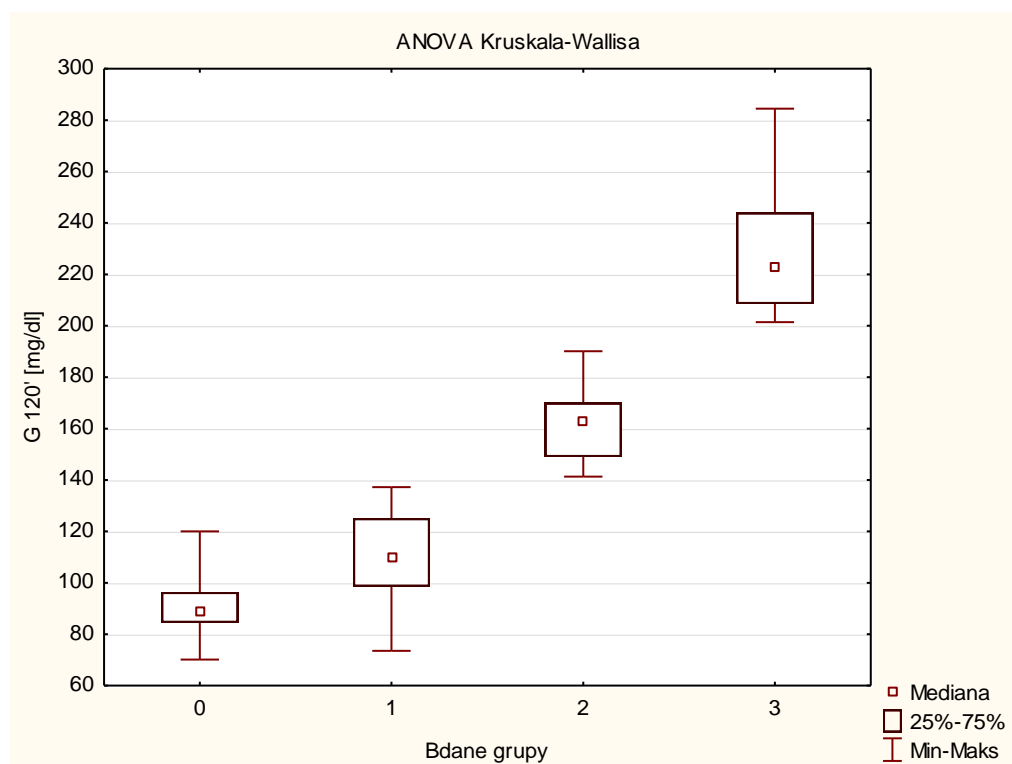
G 0' – grupy 0-4

Test Kruskala-Wallisa $p = 0,0000$;

Analiza *post hoc* testem Dunna $p < 0,05$.

Badana Grupa	0	1	2	3	4
0		0,4284	0,0000	0,0000	0,0000
1	0,4284		0,0460	0,0001	0,0000
2	0,0000	0,0460		0,8090	0,3630
3	0,0000	0,0001	0,8090		1,0000
4	0,0000	0,0000	0,3630	1,0000	

Wykres 5.1.9 Porównanie badanych grup pod względem glikemii w 120 minucie OGTT.



Tab. 5.1.3 Analiza *post hoc* różnic między badanymi grupami pod względem glikemii w 120 minucie testu doustnego obciążenia glukozą – test Dunna. Wartości p podano w tabelach.

Różnice uznano za istotne statystycznie gdy $p < 0,05$.

G 0' – grupy 0-4

G 120' – grupy 0-3

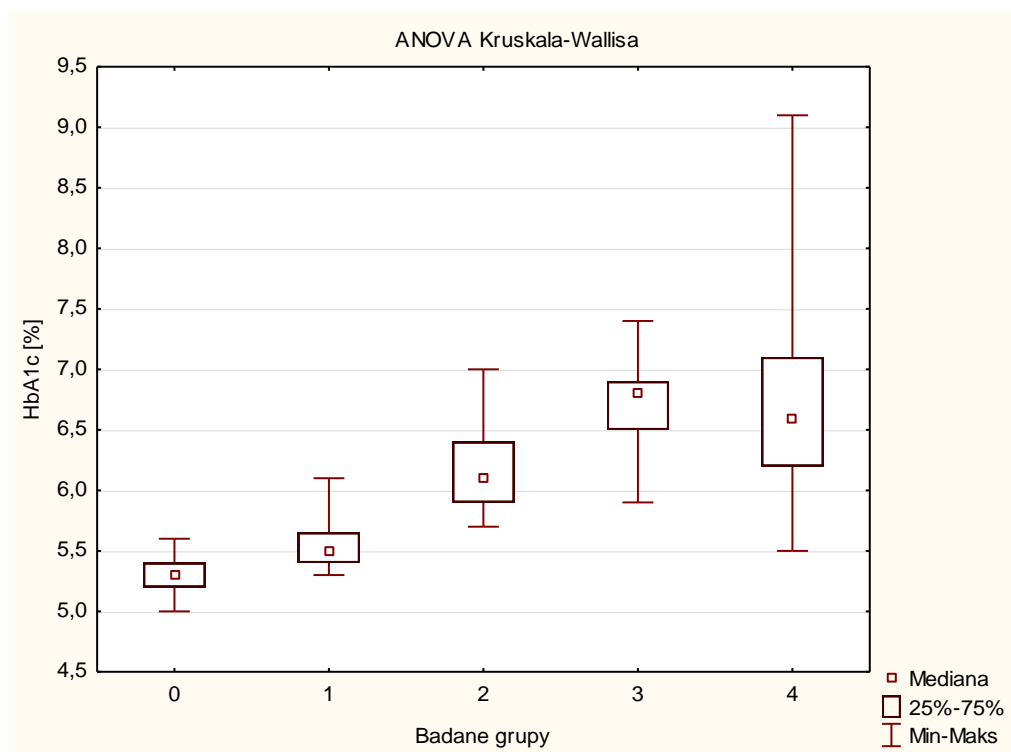
Test Kruskala-Wallisa $p = 0,0000$;

Analiza *post hoc* testem Dunna $p =$:

GRUPA	0	1	2	3
0		0,4407	0,0000	0,0000
1	0,4407		0,0067	0,0000
2	0,0000	0,0067		0,0258
3	0,0000	0,0000	0,0258	

Przeprowadzona analiza wykazała istotne różnice w stężeniach glukozy w 2 h testu doustnego obciążenia glukozą. Stężenia glukozy są najwyższe w grupie 3 – grupie osób ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 2.

Wykres 5.1.10 Porównanie badanych grup pod względem stężenia glikowanej hemoglobiny HbA1c.



Tab. 5.1.4 Analiza *post hoc* różnic między badanymi grupami pod względem HbA1C – test Dunna. Wartości *p* podano w tabelach. Różnice uznano za istotne statystycznie gdy $p < 0,05$.

HbA1c – Grupy 0-4

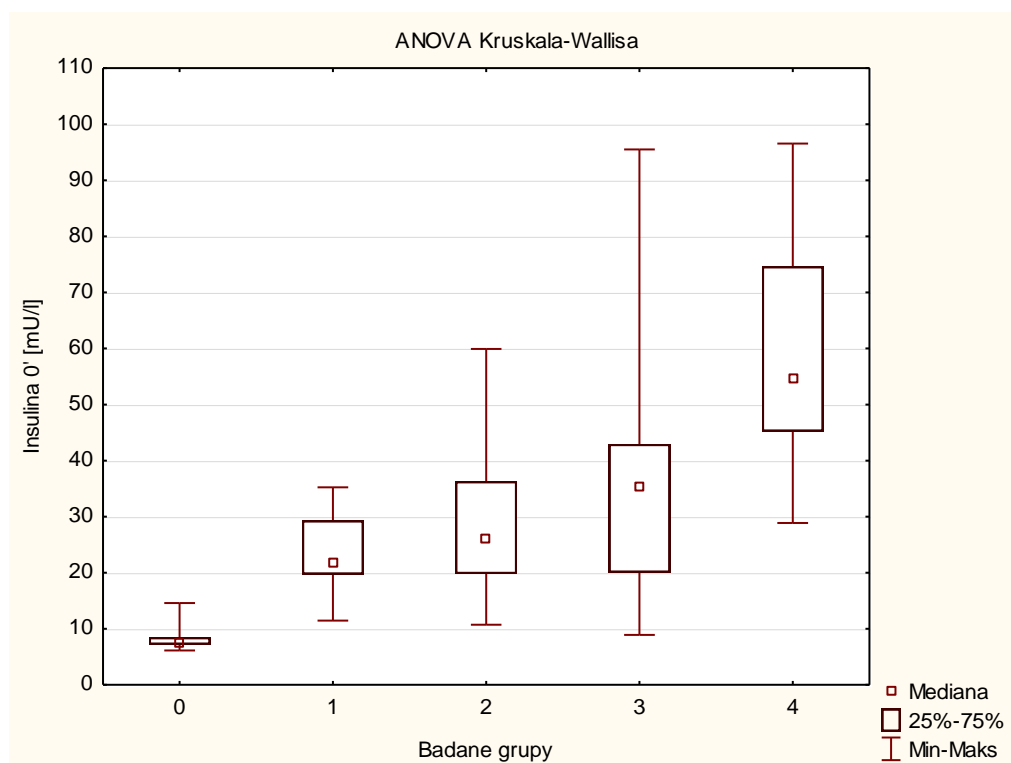
test Kruskala-Wallis: $p = 0,0000$

analiza *post hoc* testem Dunna $p =$:

GRUPA	0	1	2	3	4
0		1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1	1,0000		0,0147	0,0000	0,0000
2	0,0000	0,0147		0,1295	0,8991
3	0,0000	0,0000	0,1295		1,0000
4	0,0000	0,0000	0,8991	1,0000	

Wykonana analiza wykazała istotne statystycznie różnice w stężeniach HbA1C pomiędzy badanymi grupami. Najwyższy odsetek HbA1c obserwowano u pacjentów z cukrzycą typu 2 rozpoznaną „de novo” oraz cukrzycą typu 2 leczoną pochodnymi biguanidu.

Wykres 5.1.11 Porównanie badanych grup pod względem stężenia insuliny na czczo.



Tab. 5.1.5 Analiza *post hoc* różnic między badanymi grupami pod względem insuliny na czczo (0') – test Dunna. Wartości p podano w tabelach. Różnice uznano za istotne statystycznie gdy $p < 0,05$.

Insulina 0' grupy 0-4

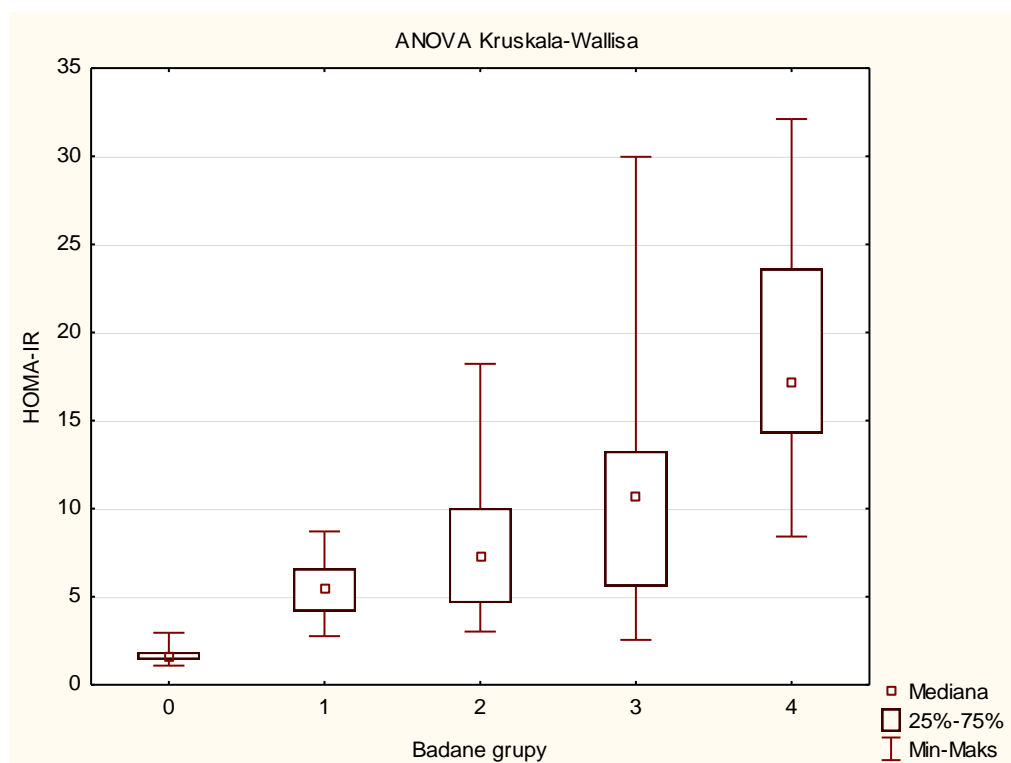
Test Kruskala-Wallis: $p = 0,0000$

Analiza *post hoc* testem Dunna $p =$

GRUPA	0	1	2	3	4
0		0,001866	0,000012	0,000001	0,000000
1	0,001866		1,000000	1,000000	0,000117
2	0,000012	1,000000		1,000000	0,005495
3	0,000001	1,000000	1,000000		0,047456
4	0,000000	0,000117	0,005495	0,047456	

Badane grupy różniły się między sobą istotnie statystycznie stężeniami insuliny. Najwyższe stężenia insuliny prezentowały osoby w grupie 3 i 4. Stężenia insuliny wzrastają od grupy 0 do grupy 4.

Wykres 5.1.12 Porównanie badanych grup pod względem wskaźnika HOMA-IR.



Tab. 5.1.6 Analiza *post hoc* różnic między badanymi grupami pod względem HOMA- IR test Dunna. Wartości p podano w tabelach. Różnice uznano za istotne statystycznie gdy $p < 0,05$.

HOMA-IR grupy 0-4:

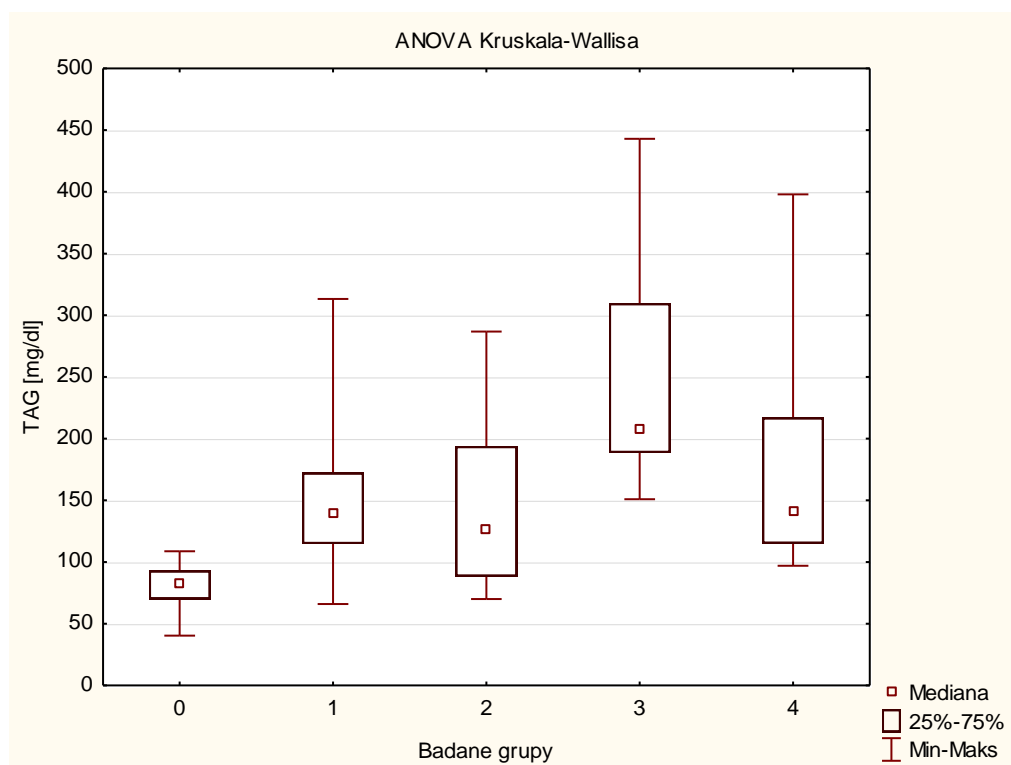
Test Kruskala-Wallis: $p = 0,0000$

Analiza *post hoc* testem Dunna $p =$

GRUPA	0	1	2	3	4
0		0,007357	0,000009	0,000000	0,000000
1	0,007357		1,000000	0,283148	0,000015
2	0,000009	1,000000		1,000000	0,005350
3	0,000000	0,283148	1,000000		0,090671
4	0,000000	0,000015	0,005350	0,090671	

W badanych grupach (0-4) obserwowano wzrost wskaźnika insulinooporności HOMA-IR, przy czym najwyższy wskaźnik zarejestrowano w grupie 4

Wykres 5.1.13 Porównanie badanych grup pod względem stężenia triacylogliceroli na czczo.



Tab. 5.1.7 Analiza *post hoc* różnic między badanymi grupami pod względem TAG test Dunna. Wartości p podano w tabelach. Różnice uznano za istotne statystycznie gdy $p < 0,05$.

TAG – grupy 0-4:

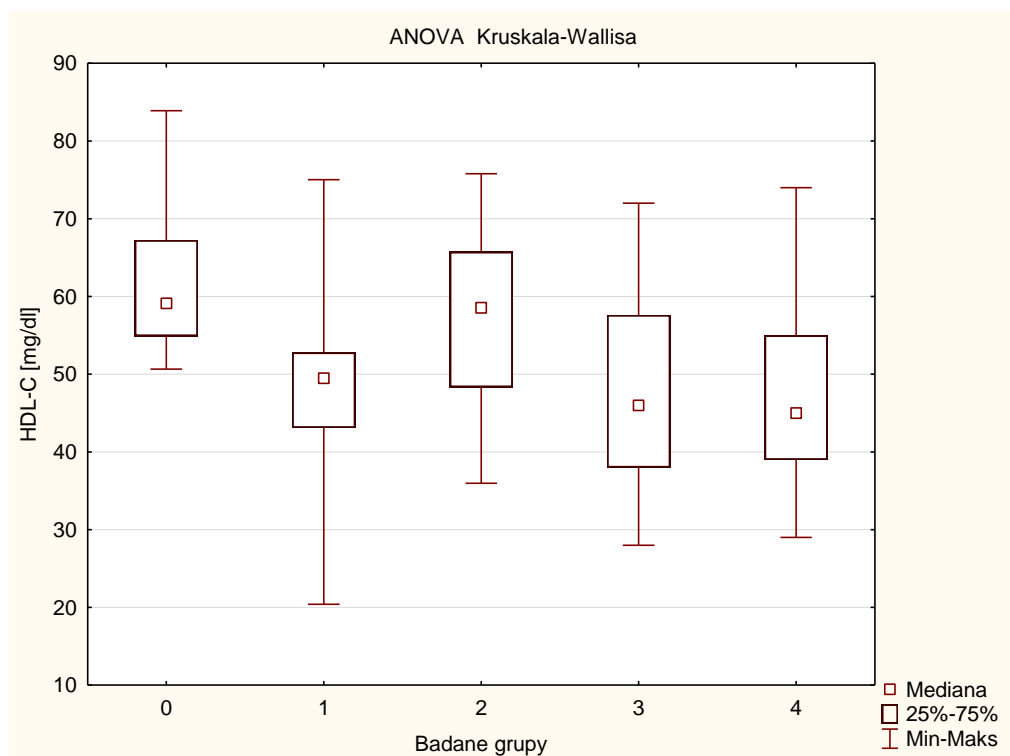
Test Kruskala-Wallis $p = 0,0000$;

Analiza *post hoc* testem Dunna $p =$:

GRUPA	0	1	2	3	4
0		0,0010	0,0068	0,0000	0,0000
1	0,0010		1,0000	0,0199	1,0000
2	0,0068	1,0000		0,0018	1,0000
3	0,0000	0,0199	0,001766		0,210149
4	0,00000	1,00000	1,000000	0,21014	

Badane grupy różniły się statystycznie między sobą stężeniami TAG. Najwyższe stężenia TAG prezentowały osoby z „de novo” rozpoznaną cukrzycą typu 2.

Wykres 5.1.14 Porównanie badanych grup pod względem stężenia cholesterolu frakcji HDL na czczo.



Tab. 5.1.8 Analiza *post hoc* różnic między badanymi grupami pod względem HDL test Dunna. Wartości p podano w tabelach. Różnice uznano za istotne statystycznie gdy $p < 0,05$.

HDL - grupy 0-4:

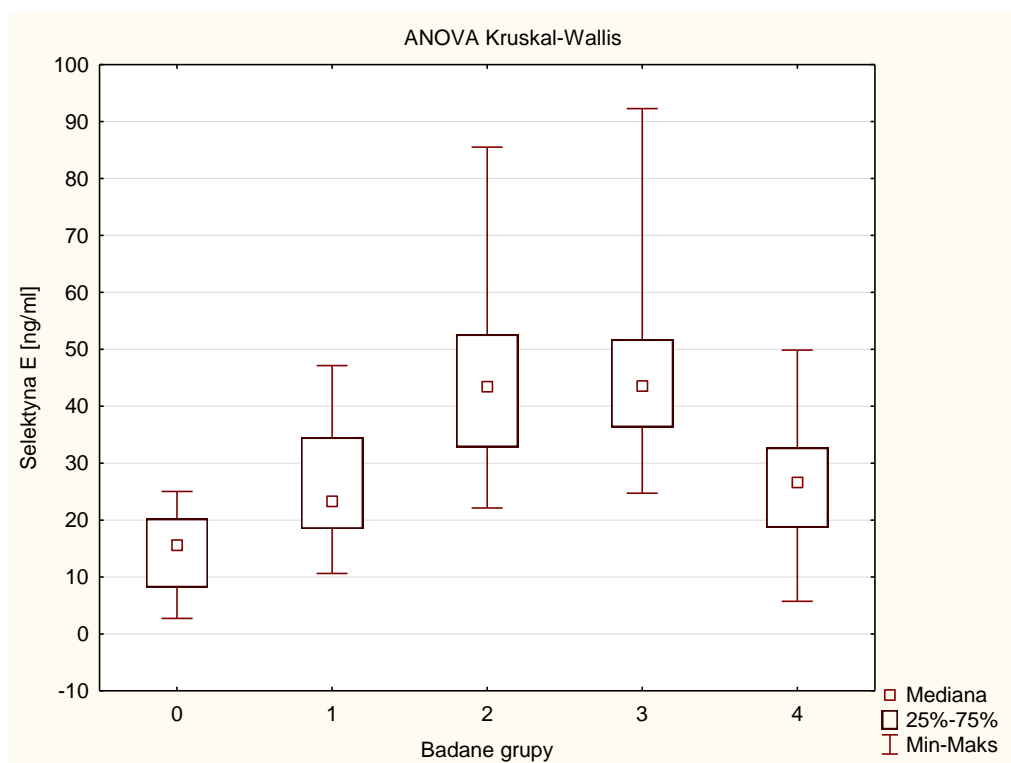
Test Kruskala-Wallis $p = ,0000$

Analiza *post hoc* testem Dunna $p =$:

GRUPA	0	1	2	3	4
0		0,003836	1,000000	0,001488	0,000212
1	0,00383		0,223001	1,000000	1,000000
2	1,00000	0,223001		0,120353	0,032813
3	0,00148	1,000000	0,120353		1,000000
4	0,00021	1,000000	0,032813	1,000000	

Grupy różniły się istotnie statystycznie między sobą stężeniami HDL-CHL. Najwyższe stężenia HDL-CH prezentowała grupa 0 (grupa kontrolna)

Wykres 5.1.15 . Porównanie badanych grup pod względem stężenia selektyny E w osoczu.



Tab. 5.1.9 Analiza *post hoc* różnic między badanymi grupami pod względem selektyny E test Dunna. Wartości p podano w tabelach. Różnice uznano za istotne statystycznie gdy $p < 0,05$.

Selektyna E Grupy 0-4:

Test Kruskala-Wallisa: $p = 0,0000$;

analiza *post hoc* testem Dunna $p =$:

GRUPA	0	1	2	3	4
0		0,060713	0,000000	0,000000	0,117188
1	0,06071		0,005331	0,001725	1,000000
2	0,00000	0,005331		1,000000	0,000921
3	0,00000	0,001725	1,000000		0,000259
4	0,11718	1,000000	0,000921	0,000259	

Analiza porównawcza badanych grup pokazała narastanie stężenia selektyny E w grupach 0-1-2/3 natomiast stężenie selektyny E u osób w grupie 4 (pacjenci z nieprawidłową masą ciała oraz cukrzycą typu 2 leczeni metforminą) było zbliżone do wartości u pacjentów grupy 1 (osoby z nieprawidłową masą ciała, bez zaburzeń glikemii). Podział osób z nadmierną masą ciała w zależności od wyniku OGTT na prawidłową tolerancję glukozy (grupa 1), nieprawidłową tolerancję glukozy (grupa 2), cukrzycę typu 2 (grupa 3) ujawnił wyższe stężenia selektyny E w grupach 2 i 3 w porównaniu z grupą 1. Podobne stężenia obserwuje się w grupie z nieprawidłową tolerancją glukozy i cukrzycą typu 2 „de novo”. (osoby z rozpoznaniem cukrzycy „de novo” nie byli dotychczas leczeni z tego powodu). Pacjenci leczeni metforminą prezentowali niższe stężenia selektyny E niż osoby z cukrzycą typu 2 rozpoznaną de novo. Obserwowane stężenia selektyny E w grupie 4 są porównywalne ze stężeniami obserwowanymi w grupie 1, jak również nie różniły się statystycznie od stężeń stwierdzonych w grupie 0. W grupie 4 u części pacjentów stężenia selektyny E miały podobne wartości do stężeń w grupie 0, mimo, że mediana selektyny E w grupie 4 była wyższa niż w grupie 0.

Charakterystyka porównawcza w badanych grupach z uwzględnieniem płci została przedstawiona w tabelach 5.1.10-5.1.14

Tab. 5.1.10 Charakterystyka kliniczno-biochemiczna pacjentów grupy porównawczej z uwzględnieniem płci. Test U Mann-Whitney'a. Dane przedstawiono jako medianę, górny i dolny kwartył.

		Kobiety n=10	Mężczyźni n=12	p
Wiek	lata	55,5 (50,0-59,0)	54,5 (50,5-58,0)	
BMI	kg/m ²	23,3 (21,4-23,9)	23,2 (22,5-24,2)	
Talia	cm	75,0 (72,0-80,0)	88,0 (83,5-91,0)	0,0005
SBP	mmHg	120,0 (115,0-123,0)	120,0(117,0-125,0)	
DBP	mmHg	77,5 (70,0-80,0)	78,0 (70,0-80,0)	
HbA1c	%	5,3 (5,2-5,4)	5,3 (5,2-5,6)	
G 0'	mg/dl	82,6 (78,6-88,5)	84,2 (77,4-88,9)	
G 120'	mg/dl	86,4 (84,8-89,7)	88,0 (85,6-94,4)	
Insulina 0'	mIU/l	7,8 (7,4-8,5)	7,5 (6,9-8,5)	
IR		0,09 (0,09-0,1)	0,09 (0,09-0,1)	
HOMA-IR		1,6 (1,5-1,9)	1,6 (1,4-1,9)	
T-C	mg/dl	173(145,0-188)	171,8 (150,4-193,9)	
TAG	mg/dl	79,8 (58,8-88,6)	92,1 (70,0-95,2)	
HDL-C	mg/dl	65,9 (59,5-71,5)	56,8 (53,9-60,9)	0,0122
LDL-C	mg/dl	85,0 (68,5-107,6)	93,5 (77,9-123,2)	
nieHDL-C	mg/dl	101,0 (83,6-125,3)	110,4 (96,5-140,5)	
Selektyna E	ng/ml	18,7 (11,2-20,9)	14,2 (6,9-19,8)	

Istotnie statystycznie różnice między kobietami i mężczyznami w badanej grupie 0 dotyczyły talii oraz HDL-C p<0,05.

Tab. 5.1.11 Charakterystyka kliniczno-biochemiczna pacjentów grupy 1 z uwzględnieniem płci. Test U Mann-Whitney'a. Dane przedstawiono jako medianę, górny i dolny kwartył.

		Kobiety n=10	Mężczyźni n=10	p
Wiek	lata	60,5 (56,0-64,0)	55,5 (48,0-61,0)	
BMI	kg/m ²	36,8 (31,4-39,4)	32,0 (30,3 -33,4)	
Talia	cm	104,5 (98,0-108,0)	104,0 (100,0-110,0)	
SBP	mmHg	145,0 (130,0-150,0)	135,0 (130,0-140,0)	
DBP	mmHg	80,0 (80,0-90,0)	84,0 (80,0-90,0)	
HbA1c	%	5,5 (5,4-5,7)	5,5 (5,4-5,6)	
G 0'	mg/dl	94,9 (90,5-100,5)	97,8 (92,1-99,6)	
G 120'	mg/dl	106,9 (96,0-133,1)	112,3 (100,7-119,8)	
Insulina 0'		29,3 (19,3-33,7)	21,1 (20,1-25,9)	
IR		0,31 (0,2-0,4)	0,2 (0,2-0,3)	
HOMA-IR		6,8 (4,8-7,7)	4,9 (4,2-5,9)	
T-C	mg/dl	182,8 (164-228)	227,4 (208,0-247,9)	
TAG	mg/dl	126,3 (81,8-146,5)	152,2 (124,6-243,9)	
HDL-C	mg/dl	51,7 (44,9-53,0)	46,8 (41,0-50,0)	
LDL-C	mg/dl	113,2 (93,2-139,8)	143,5 (107,1-169,2)	
nieHDL-C	mg/dl	135,4 (119,1-153,0)	176,3 (158,0-194,1)	0,0452
Selektyna E	ng/l	25,7 (16,5-35,1)	22,6 (20,5-32,8)	

Istotnie statystycznie różnice między kobietami i mężczyznami w badanej grupie 1 dotyczyły HDL-C $p < 0,05$.

Tab. 5.1.12 Charakterystyka kliniczno-biochemiczna pacjentów grupy 2 z uwzględnieniem płci. Test U Mann-Whitney'a. Dane przedstawiono jako medianę, górny i dolny kwartył.

		Kobiety n=12	Mężczyźni n=10	p
Wiek	lata	63,5 (52,5-68,0)	57,5 (52,0-58,0)	
BMI	kg/m ²	33,0 (29,1-36,2)	38,6 (30,9-41,0)	
Talia	cm	98,5 (89,0-106,5)	119,0 (113,0-126,0)	0,0015
SBP	mmHg	140,0 (127,5-152,5)	140,0 (135,0-150,0)	
DBP	mmHg	77,5 (70,0-87,5)	80,0 (80,0-85,0)	
HbA1c	%	6,2 (5,9-6,4)	6,1 (5,9-6,4)	
G 0'	mg/dl	116,2 (110,6-120,9)	104,6 (100,2- 109,0)	0,0161
G 120'	mg/dl	163,0(146,5-170,0)	161,5 (146,0-169,6)	
Ins 0'		26,2 (18,6-43,7)	29,1 (19,8-36,3)	
IR		0,29(0,2-0,4)	0,3 (0,2-0,4)	
HOMA-IR		7,2 (4,9-13,0)	7,8 (4,7-8,9)	
T-C	mg/dl	208,5 (182,5-238,4)	201,0 (191,0-236,7)	
TAG	mg/dl	136,6 (84,6-212,2)	119,0 (88,4-183,3)	
HDL-C	mg/dl	63,9 (49,0-65,9)	56,8 (43,3-65,7)	
LDL-C	mg/dl	115,6 (101,2-143,9)	118,6 (108,0-156,6)	
nieHDL-C	mg/dl	156,7 (119,5-176,1)	143,8 (133,8-177,1)	
Selektyna E	ng/l	38,0 (30,3-45,6)	50,4 (39,2 -53,7)	

Istotnie statystycznie różnice między płciami w badanej grupie 2 dotyczyły tali oraz glikemii w 0'.

Tab. 5.1.13 Charakterystyka kliniczno-biochemiczna pacjentów grupy 3 z uwzględnieniem płci. Test U Mann-Whitney'a. Dane przedstawiono jako medianę, górny i dolny kwartył.

		Kobiety n=9	Mężczyźni n=12	p
Wiek	lata	55,0 (54,0-61,0)	57,0 (53,0-64,5)	
BMI	kg/m ²	33,2 (30,4-35,4)	35,5 (31,4-40,0)	
Talia	cm	98,0 (94,0-116,0)	111,5 (101,0-141,0)	
SBP	mmHg	140,0 (125,0-160,0)	142,5 (135,0-170,0)	
DBP	mmHg	85,0 (80,0-90,0)	90,0 (80,0-90,0)	
HbA1c	%	6,6 (6,5-6,9)	6,9 (6,5-7,1)	
G 0'	mg/dl	116,5 (111,0-121,0)	123,4 (119,2-125,1)	
G 120'	mg/dl	243,0 (214,6-247,0)	213,3 (207,4-240,1)	
Ins 0'		42,2 (20,5-64,6)	34,5 (19,8-39,7)	
IR		0,35 (0,17-0,54)	0,3 (0,2-0,3)	
HOMA-IR	mg/dl	12,6 (4,8-19,0)	10,5 (5,9-12,0)	
T-C	mg/dl	223,5 (197,0-247,0)	210,9 (193,1-246,9)	
TAG	mg/dl	195,0 (166,0-207,9)	246,9 (197,9-339,4)	
HDL-C	mg/dl	56,5 (42,3-58,4)	43,8 (36,0-53,8)	
LDL-C	mg/dl	129,3 (110,6-150,4)	123,8 (95,2-143,4)	
nieHDL-C	mg/dl	162,8 (153,0-189,4)	163,8 (136,3-211,7)	
Selektyna E	ng/l	42,2 (36,2-44,8)	49,5 (36,7-70,7)	

Badana grupa nie różniła się istotnie statystycznie między płciami.

Tab. 5.1.14 Charakterystyka kliniczno-biochemiczna pacjentów grupy 4 z uwzględnieniem płci. Test U Mann-Whitney'a. Dane przedstawiono jako medianę, górny i dolny kwartył.

		Kobiety n=8	Mężczyźni n=15	P
Wiek	lata	61,0 (55,0-64,5)	58,0 (53,0-65,0)	
BMI	kg/m ²	32,3 (28,0-34,4)	31,3 (27,8-33,1)	
Talia	cm	110,0 (98,5-112,5)	109,0 (101,0-116,0)	
SBP	mmHg	130,0 (125,0-140,0)	150,0 (140,0-151,0)	0,0275
DBP	mmHg	85,0 (70,0-90,0)	82,0 (80,0-90,0)	
HbA1c	%	6,4 (6,3-7,1)	6,7 (6,0-7,1)	
G 0'	mg/dl	123,5 (116,0-140,0)	123,0 (113,0-130,0)	
G 120'	mg/dl			
Ins		62,2 (46,3-83,1)	54,6 (40,8-68,5)	
IR		0,48 (0,36-0,71)	0,44 (0,34-0,58)	
HOMA-IR		20,4 (15,8-29,8)	17,2 (12,7-23,6)	
T-C	mg/dl	207,5 (200,5-255,5)	210,0 (179,0-237,0)	
TAG	mg/dl	139,5 (116,0-245,5)	149,0 (115,0-217,0)	
HDL-C	mg/dl	55,5 (39,5-59,0)	44,0 (39,0-49,0)	
LDL-C	mg/dl	127,1 (114,3-151,7)	133,6 (99,2-164,4)	
nieHDL-C	mg/dl	173,5 (147,5-187,5)	177,0 (136,0-185,0)	
Selektyna E	ng/l	20,1 (12,5-27,5)	27,5 (18,8-34,3)	

W grupie 4 mężczyźni prezentowali wyższe ciśnienie tętnicze skurczowe krwi (SBP) w porównaniu z kobietami.

5.2 Ocena współzależności stężeń selektyny E i wybranych parametrów

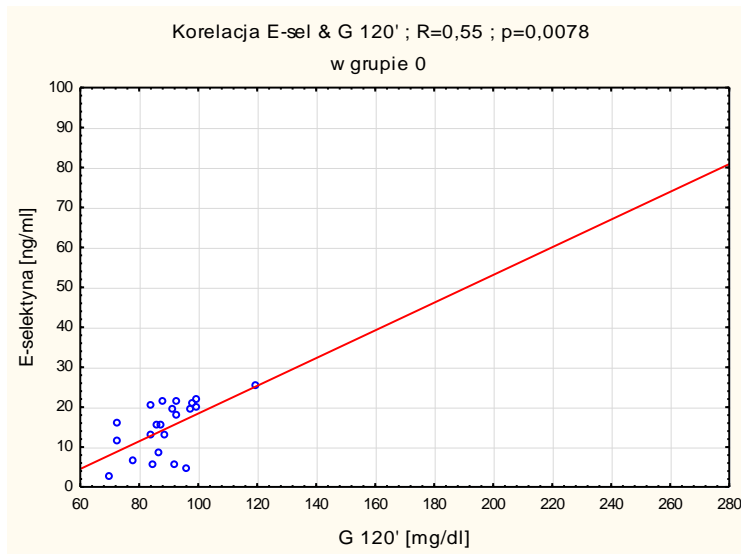
Analizując zależność selektyny E od innych parametrów obserwuje się [Tab. 5.2], że wzrost stężenia selektyny E ma najsilniejszy związek z glikemią w 120 minucie testu doustnego obciążenia glukozą. Korelacja ta była obserwowana w grupach 0-3 a najsilniejszą zależność obserwowano w grupie pacjentów z nadmierną masą ciała ($BMI > 25 \text{ kg/m}^2$) i prawidłową tolerancją glukozy ($R^2=0,76$) [Tabl. 5.2]. Dodatnią korelację obserwuje się również między selektyną E a stężeniem HDL oraz między selektyną E a HbA1c. Graficzne przedstawienie poszczególnych zależności znajduje się na wykresach od 5.2.1.A do 5.2.3.C.

Tab. 5.2 Korelacje stężenia selektyny E z pozostałymi parametrami, w badanych grupach 0-4. Zależności opisano współczynnikiem Spearmana (R) przy $p < 0,05$; analiza regresji wielorakiej wyrażona za pomocą R^2 i β przy $p < 0,05$; **ns**- nieistotne statystycznie; **(--)** - nie analizowano.

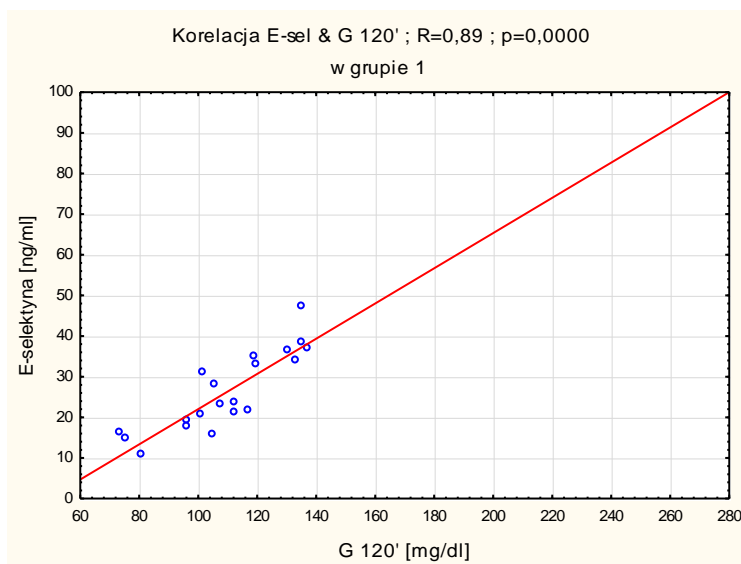
Korelacje Spearmana:					
	Grupa 0 n=22	Grupa 1 n=20	Grupa 2 n=22	Grupa 3 n=21	Grupa 4 n=23
E-sel & wiek	ns	Ns	ns	ns	ns
E-sel & BMI	ns	Ns	ns	R=0,43 ; p=0,049	ns
E-sel & talia	ns	Ns	ns	ns	ns
E-sel & SBP	ns	Ns	ns	ns	ns
E-sel & DBP	ns	Ns	ns	ns	ns
E-sel & G 0'	ns	R=0,77 ; p=0,0001	ns	ns	ns
E-sel & G 120'	R=0,55 ; p=0,0078	R=0,89 ; p=0,0000	R=0,64 ; p=0,0012	ns	--
E-sel & HbA1c	ns	R=0,76 ; p=0,0001	R=0,49 ; p=0,0194	R=0,67 ; p=0,0008	ns
E-sel & Ins	ns	ns	ns	ns	ns
E-sel & IR	ns	ns	ns	ns	ns
E-sel & HOMA-IR	ns	ns	ns	ns	ns
E-sel & T-C	ns	ns	ns	ns	ns
E-sel & TAG	ns	ns	ns	ns	ns
E-sel & HDL-C	R=0,63 ; p=0,0018	ns	ns	ns	ns
E-sel & LDL-C	ns	ns	ns	ns	ns
E-sel & nieHDL-C	ns	ns	ns	ns	ns
Analiza regresji wielorakiej:					
Parametry korelujące z selektyną E niezależnie od pozostałych	$R^2=0,54$ G 120' : $\beta=0,55$; p=0,0021 HDL : $\beta=0,47$; p=0,0071	$R^2=0,76$ G 120' : $\beta=0,67$; p=0,0000	$R^2=0,66$ G 120' : $\beta=0,57$; p=0,0013 HbA1c : $\beta=0,36$; p=0,0277	$R^2=0,62$ HbA1c : $\beta=0,81$; p=0,0002	

5.2.1 Korelacja stężenia selektyny E z glikemią w 120 minucie OGTT.

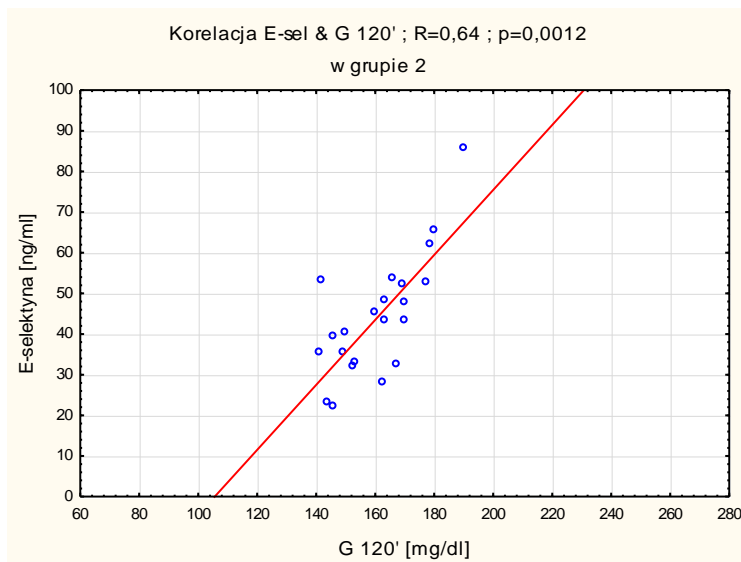
Wykres.5.2.1.A Korelacja selektyny E w grupie 0.



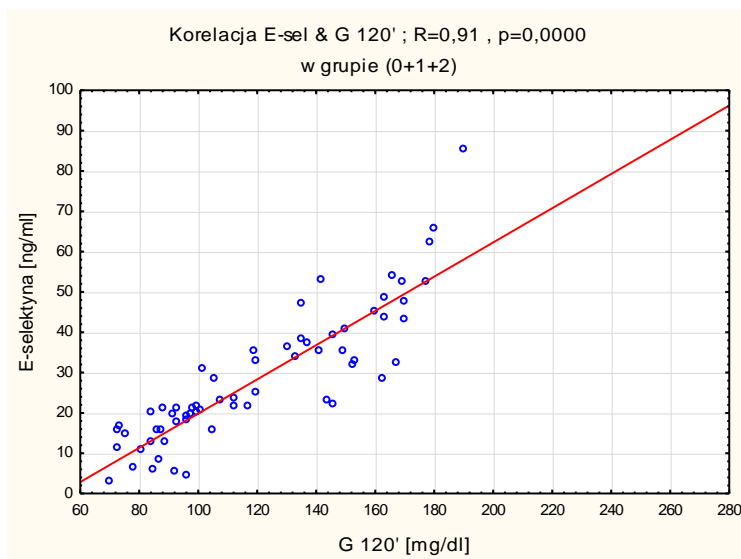
Wykres.5.2.1.B Korelacja selektyny E w grupie 1.



Wykres 5.2.1.C Korelacja selektyny E w grupie 2.



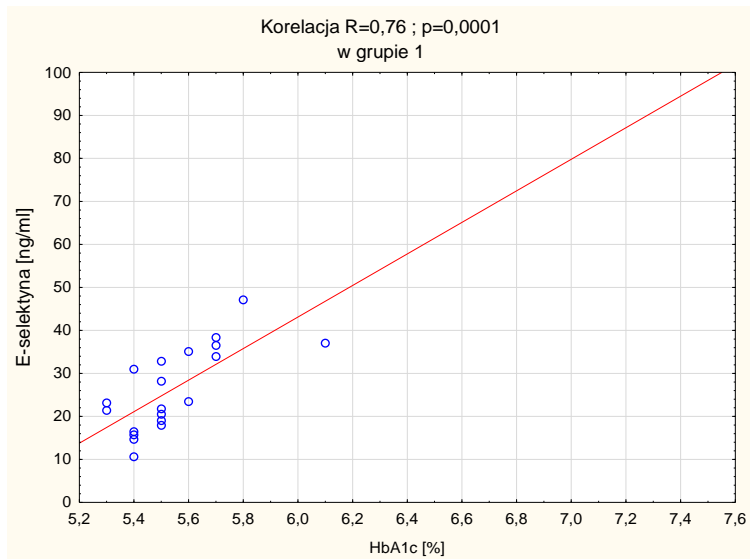
Wykres 5.2.1.D Korelacja selektyny E w grupie (0+1+2) to znaczy u osób bez cukrzycy typu 2 z prawidłową i nadmierną masą ciała.



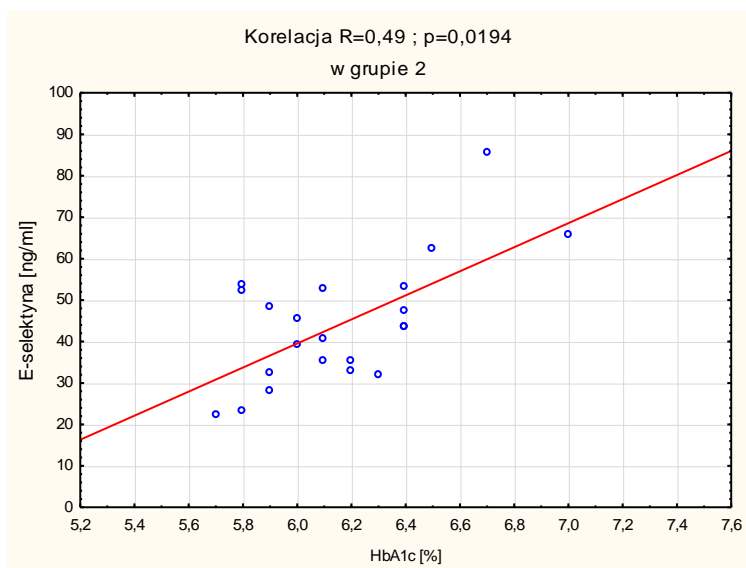
Stężenie selektyny E pozytywnie korelowało z glikemią w 120' testu doustnego obciążenia glukozą w wyżej wymienionych grupach.

5.2.2 Korelacja stężenia selektyny E z HbA1c.

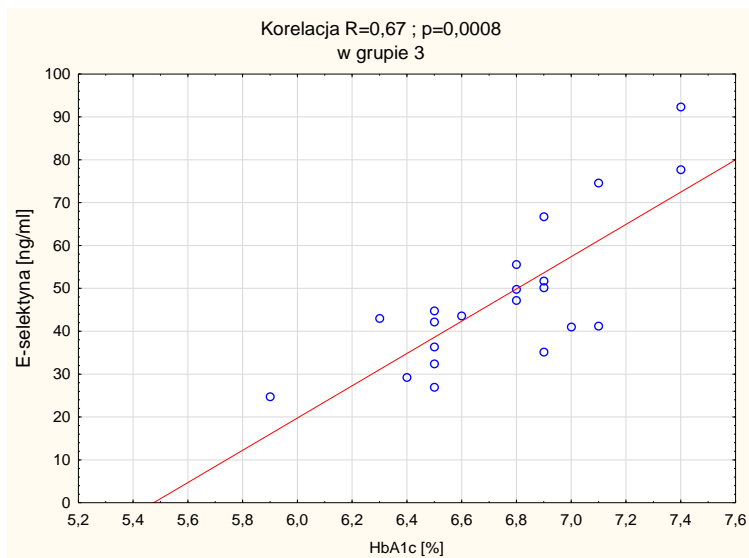
Wykres 5.2.2.A Korelacja selektyny E w grupie 1.



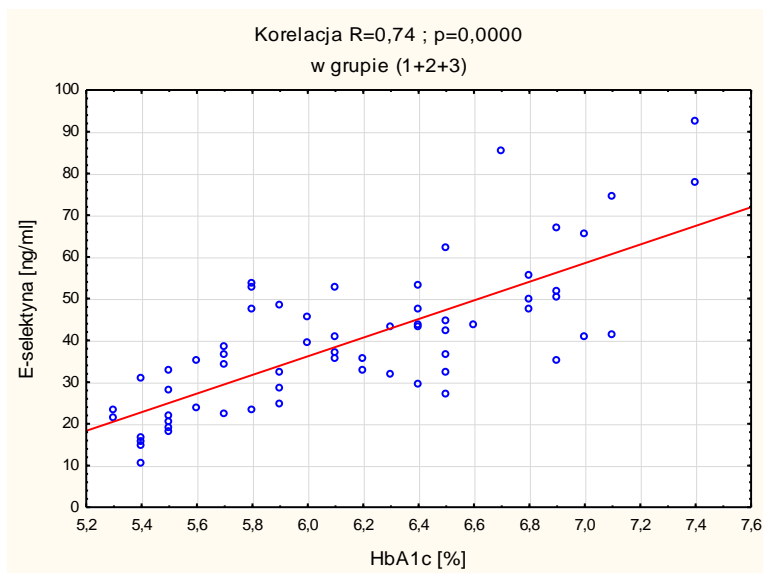
Wykres 5.2.2.B Korelacja selektyny E w grupie 2.



Wykres 5.2.2.C Korelacja selektyny E w grupie 3.



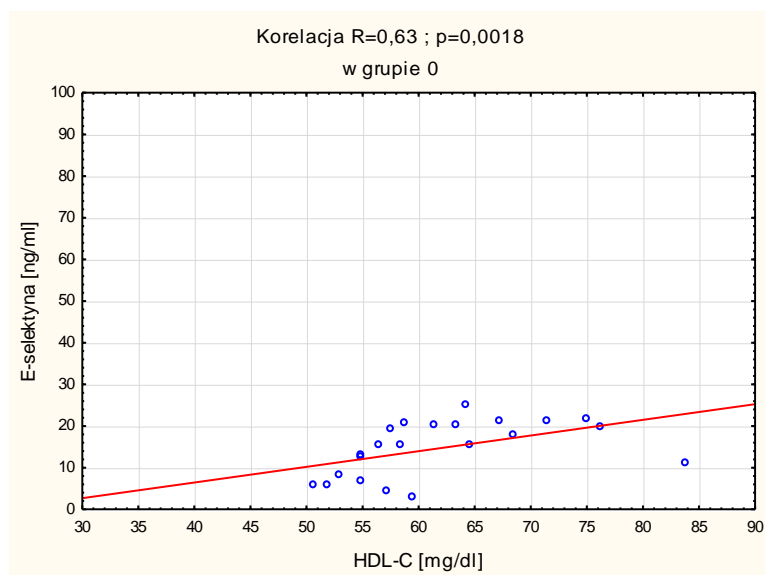
Wykres 5.2.2.D Korelacja selektyny E w grupie (1+2+3), to znaczy u osób z nadmierną masą ciała, prezentujących zarówno prawidłową tolerancją glukozy jak i dysglikemię (IGT i DMt2 ‘de novo’) bez leczenia hipoglikemizującego.



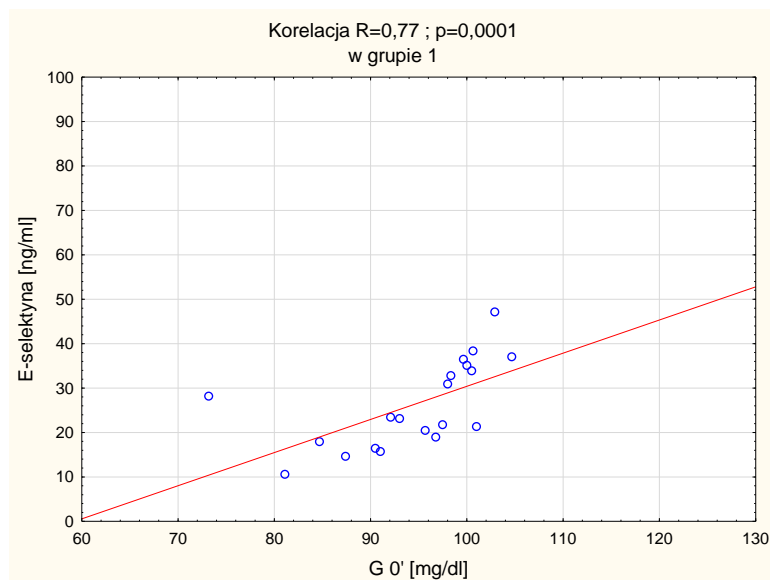
Stężenia selektyny E pozytywnie korelowały z HbA1c w wyżej wymienionych grupach osób.

5.2.3 Znaczące korelacje stężenia selektyny E w poszczególnych grupach.

Wykres 5.2.3.A Korelacja selektyny E z HDL-C w grupie 0.

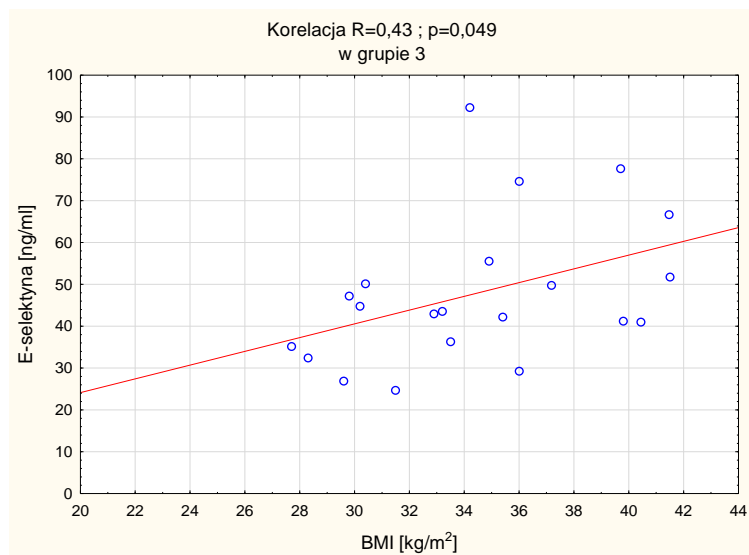


Wykres 5.2.3.B Korelacja selektyny E z glikemią na czczo w grupie 1.



Stężenie selektyny E pozytywnie korelowało z glikemią w 0' minucie testu doustnego obciążenia glukozą w grupie osób z nadmierną masą ciała i prawidłową tolerancją glukozy.

Wykres 5.2.3.C Korelacja selektyny E z BMI w grupie 3.



Stężenie selektyny E pozytywnie korelowało z BMI u osób z nadmierną masą ciała i świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 2.

6. DYSKUSJA

W niniejszej pracy przeanalizowano stężenia selektyny E w grupach pacjentów w zależności od zaburzeń glikemii oraz po zastosowanym leczeniu pochodną biguanidu. Przeprowadzono również analizę stężenia selektyny E w zależności od glikemii na czczo, glikemii w 120 minucie testu doustnego obciążenia glukozą, stężenia HDL-CH, HbA1C oraz BMI.

Zaburzenia tolerancji glukozy są czynnikiem ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 co w konsekwencji u dużej grupy pacjentów prowadzi do wcześniejszego i szybszego rozwoju miażdżycy, a następnie chorób układu sercowo-naczyniowego [55]. W teorii zapalnej rozwoju miażdżycy uważa się cząstki adhezyjne – selektyny za cząstki pełniące jedną z kluczowych ról. Biorą one udział w procesie toczenia się leukocytów po śródbłonku. W niniejszej pracy oceniano stężenie jednej z cząstek adhezyjnych – selektynę E, odpowiedzialną za spowolnienie procesu toczenia się leukocytów po śródbłonku. Spowolnienie tego procesu umożliwi kolejne etapy powstawania blaszki miażdżycowej.

W wielu prowadzonych obecnie badaniach ocenia się stężenia cząsteczek adhezyjnych świadczących o uszkodzeniu śródbłonka i rozwoju procesu miażdżycowego. Uważa się, że wzrost sICAM-1 i sVCAM-1 jest najprawdopodobniej związany z hiperglikemią natomiast wzrost stężeń selektyny E u pacjentów z cukrzycą typu 2 jest związany zarówno z hiperglikemią, hiperinsulinemią i insulinoopornością [57]. W wielu dotychczasowych publikacjach podkreśla się związek insulinooporności oraz nieprawidłowej tolerancji glukozy ze wzrostem biomarkerów zapalenia oraz markerów uszkodzenia śródbłonka. Przykładem mogą być badania Matsumoto i współpracowników, którzy wykazali, że tylko pacjenci z hiperinsulinemią i IGT mieli znacząco wyższe podstawowe stężenia selektyny E (ale nie innych cząstek adhezyjnych takich jak sICAM-1 i sVCAM-1) w porównaniu z pacjentami z normalnym metabolizmem glukozy i IGT ale niskim stężeniem insuliny [50]. Przykładem mogą być tu również badania prowadzone u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym oraz nieprawidłową tolerancją glukozy. U tych chorych obserwowano wyższe stężenia cząstek adhezyjnych między innymi selektyny E, ICAM-1, VCAM-1 w porównaniu z pacjentami z nadciśnieniem tętniczym i normalną tolerancją glukozy [56].

Z przeprowadzonych w powyższej pracy badań możemy wysunąć podobne wnioski – pacjenci z nadmierną masą ciała i normalną tolerancją glukozy mają istotnie statystycznie

niższe stężenia selektyny E w porównaniu z pacjentami z nieprawidłową masą ciała i IGT lub cukrzycą typu 2 *de novo* [Wykres 5.1.15]. Wzrost ten świadczy o stopniowym uszkodzeniu śródbłonka i zależy od stopnia zaburzeń glikemii.

Zależnością zwracającą szczególną uwagę jest fakt istotnego statystycznie spadku stężenia selektyny E u pacjentów z cukrzycą typu 2 pobierających pochodną biguanidu. Działanie metforminy to działanie antyhiperglikemiczne – metformina obniża głównie poposiłkowe stężenia glikemii poprzez hamowanie glukoneogenezy, zwiększanie wychwyty glukozy przez komórki insulinozależne oraz zmniejszenie jelitowego wchłaniania glukozy. Wdaje się prawdopodobnym, że obniżenie stężenia selektyny E jako jednego wykładników procesu zapalnego, wynika nie tylko z obniżenia stężenia glukozy, w szczególności poposiłkowej, ale również może być spowodowany innym mechanizmem. Tę teorię zasugerowano już w 1998 roku w badaniu UKPDS.

Niewiele jest dostępnych badań oceniających wpływ metforminy na czynność śródbłonka poprzez ocenę selektyn w szczególności selektyny E.

W dostępnych badaniach oceniano nasilenie procesu zapalnego między innymi oceniając selektynę E u pacjentów leczonych metforminą. Do tego podstawowego leczenia metforminą u pacjentów z cukrzycą typu 2 zastosowano leczenie glibenklamidem oraz repaglinidem. W tym badaniu, prowadzonym przez Stephens JW. i współ. [48] po zastosowanym leczeniu (podaniu glibenklamidu lub repaglinidu) nie obserwowano wpływu tych leków na stężenia selektyny E. To może potwierdzać naszą hipotezę, że metformina wpływa na rozwój procesu zapalnego nie tylko poprzez obniżenie stężenia glukozy.

W badaniu przeprowadzonym przez SØrena i współ. oceniano m.in. stężenie selektyny E u pacjentów z cukrzycą typu 2 bez otyłości leczonych metforminą lub repaglinidem. Pacjenci otrzymujący metforminę mieli znacząco niższe stężenia selektyny E w porównaniu z pacjentami leczonymi repaglinidem [49]. To badanie również może sugerować dodatkowe mechanizmy hamowania procesu zapalnego przy stosowaniu metforminy.

W innych dostępnych badaniach De Jager i współ. [50] porównywali leczenie insuliną i metforminą, oznaczając między innymi selektynę E. W badaniu tym również wykazano korzystny wpływ leczenia metforminą w porównaniu z samą insuliną, na funkcję śródbłonka. W badaniu wykonanym w 2001 roku przez Ryysy L. i współpracowników [51], gdzie oceniano stężenie selektyny E w grupach pacjentów leczonych z powodu cukrzycy typu 2 insuliną – NPH łącznie z glibenklamidem lub metforminą, obserwowano spadek

stężenia selektyny E w surowicy, jednakże bez znamiennych różnic w stężeniu selektyny E pomiędzy grupami [51].

W przeprowadzonych badaniach analizowano również stężenie selektyny E w zależności od stężenia glukozy na czczo. Jedynie u pacjentów z BMI >25 kg/m² bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej korelowały istotnie ze stężeniem badanej selektyny. W pozostałych grupach nie obserwowano tej zależności. Dostępne publikacje nie do końca potwierdzają te obserwacje. W badaniu przeprowadzonym przez Carrizo [54] u dzieci z cukrzycą typu 1 obserwowano dodatnią korelację glikemii na czczo ze stężeniami selektyny E. Możliwe, że na stężenie selektyny ma wpływ czas trwania, wyrównanie metaboliczne cukrzycy oraz typ cukrzycy.

Przeprowadzone były również badania oceniające stężenie między innymi selektyny E u pacjentów z zespołem metabolicznym. W badaniu przeprowadzonym przez Tröseid stężenie selektyny E dodatnio korelowało z glikemią na czczo. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że do tego badania zakwalifikowani zostali pacjenci z zespołem metabolicznym bez i z zaburzeniami glikemii [59].

W przeprowadzonym badaniu wykazano dodatnią korelację między glikemią w 120 minucie testu doustnego obciążenia glukozą a stężeniem selektyny E. Współzależność ta dotyczyła grup 0,1,2 a była najbardziej widoczna w grupie pacjentów z nadmierną masą ciała i prawidłową tolerancją glukozy. Może to potwierdzać fakt, że już u pacjentów ze zwiększoną masą ciała i bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej obserwuje się wzrost czynników biorących udział w procesie zapalnym. Dodatkowo stężenie selektyny E bardziej korelowało ze stężeniami glikemii w 120 minucie OGTT niż ze stężeniami glukozy na czczo. Może to potwierdzać po raz kolejny związek glikemii poposiłkowej z rozwojem procesu zapalnego a następnie miażdżycowego. Tą zależność również potwierdzono w badaniach prowadzonych przez innych autorów, między innymi do podobnych wniosków doszedł Derosa, który oceniał dysfunkcję śródbłonna mierząc między innymi stężenie selektyny E w czasie wykonywania testu doustnego obciążenia glukozą w surowicy osób zdrowych oraz mierząc stężenia selektyny E w surowicy pacjentów z cukrzycą typu 2 leczonych lekami doustnymi. W badaniu tym, podczas wykonywania testu doustnego obciążenia glukozą mierzono stężenia selektyny E w 0',30',60',90',120',150' i 180'. Najwyższe stężenia selektyny E obserwowano w 120 minucie testu. Stężenia selektyny E u pacjentów z cukrzycą typu 2 były znacząco wyższe w porównaniu ze stężeniami u osób zdrowych, w każdym punkcie pomiarowym testu [52]. W prezentowanej przeze mnie pracy oceniałam stężenie selektyny E na czczo oraz glikemię w 0' i 120' testu OGTT, wykazałam związek selektyny E z glikemią w 120 minucie

testu OGTT. Związek ten wyraźnie jest widoczny w grupach 0,1,2 i znajduje potwierdzenie w korelacji selektyny E z HbA1c w grupach 1, 2 i 3. W pracy można traktować HbA1c, parametr odzwierciedlający średnie stężenia glikemii w ciągu ostatnich 2-3 miesięcy, jako zamiennik/uzupełnienie siedmiu punktów glikemii w teście wykonanym przez Derosa [52].

Stwierdzona korelacja selektyny E z HbA1c była najsilniejsza w grupie pacjentów z nieprawidłową masą ciała i bez zaburzeń glikemii. To może sugerować, że zaburzenia glikemii, jeszcze nie zdiagnozowane i występujące u osób z nieprawidłową masą ciała, mogą przyczyniać się do rozwoju procesu miażdżycowego. Związek między selektyną E oraz HbA1c oceniano również w innych pracach, na przykład Carrizo i wsp. oceniali stężenie selektyny E oraz HbA1c u pacjentów z cukrzycą typu 1 i wykazali pozytywną korelację między selektyną E a HbA1c. W cytowanej pracy oceniano również korelację między selektyną E a glikemią na czczo. Uzyskane wyniki jednoznacznie wykazują, że stężenia HbA1c o wiele lepiej korelują z selektyną E niż stężenia glukozy na czczo [54].

W powyższej pracy poddano ocenie stężenia selektyny E w zależności od zaburzeń glikemii. Nie oceniano natomiast stopnia rozwoju procesu miażdżycowego na przykład poprzez ocenę grubości blaszki miażdżycowej, dlatego też nie można jednoznacznie stwierdzić, że selektyna E jest niezależnym czynnikiem ryzyka rozwoju miażdżycy.

Z powyższych danych wynika, że u pacjentów z zaburzeniami glikemii obserwuje się znaczące zwiększenie stężenia selektyny E w surowicy. Wzrost ten świadczy o stopniowym uszkodzeniu śródbłonna i zależy od stopnia zaburzeń glikemii. U pacjentów leczonych metforminą obserwujemy istotny statystycznie spadek stężenia selektyny E. Potwierdza to po raz kolejny znaczenie tego leku w leczeniu cukrzycy typu 2 oraz prewencji chorób sercowo-naczyniowych. Może to dowodzić, że zastosowanie leku już u pacjentów otyłych z dysglikemią przedcukrzycową lub prawidłową tolerancją glukozy, może spowodować zahamowanie bądź spowolnienie rozwoju procesu miażdżycowego.

7. WNIOSKI

1. Selektyna E nie jest niezależnym markerem ryzyka rozwoju miażdżycy.
2. U osób z nadmierną masą ciała, stężenie selektyny E zależy od zaburzeń glikemii – wzrasta wraz ze wzrostem glikemii.
3. Stosowanie metforminy u pacjentów z cukrzycą typu 2 sprzyja uzyskaniu/utrzymaniu stężeń selektyny E w zakresie stężeń obserwowanych w grupie osób z prawidłową tolerancją glukozy.

8. STRESZCZENIE

Otyłość brzuszna z towarzyszącymi zaburzeniami metabolicznymi stanowi istotną przyczynę chorób układu sercowo-naczyniowego (ChSN) oraz cukrzycy typu 2 (DMt2). 20-25% populacji powyżej 40 r.ż. w Europie i USA może spełniać kryteria diagnostyczne zespołu metabolicznego [1,2], co 2-krotnie zwiększa ryzyko wystąpienia ChSN i aż 5-krotnie - ryzyko rozwoju DMt2 [3]. Śmiertelność z powodu zawału serca u pacjentów z wieloletnią cukrzycą typu 2 jest nawet 4-krotnie większa w porównaniu z chorymi bez cukrzycy, szybsze wykrycie zaburzeń glikemii i zastosowanie leczenia poprawia odległe rokowanie. W Polsce ok. 2 mln ludzi choruje na cukrzycę typu 2. Nieprawidłowa glikemia na czczo i upośledzona tolerancja glukozy poprzedzają rozwój pełnoobjawowej DMt2. Im szybciej pacjent z cukrzycą i zaburzeniami glikemii otrzyma leczenie, prowadzące do wyrównania metabolicznego, tym wolniej rozwijają się przewlekłe powikłania cukrzycowe. Duże nadzieje wiąże się z poznaniem patomechanizmów wczesnych etapów rozwoju blaszki miażdżycowej, inicjowanych działaniem cząstek adhezyjnych między innymi selektyn. Biorąc pod uwagę powyższe dane celem pracy było zanalizowanie stężenia selektyny E, jednej z najistotniejszych cząstek adhezyjnych w patogenezie procesu zapalnego u pacjentów z zaburzeniami glikemii.

Do realizacji powyższego celu przyjęto następujące hipotezy badawcze:

Czy stężenie śródbłonkowej selektyny jest niezależnym markerem ryzyka rozwoju miażdżycy?

Czy stężenie śródbłonkowej selektyny rośnie wraz z nadmierną masą ciała i stopniem zaburzeń glikemii?

Czy leczenie osób z nadmierną masą ciała i cukrzycą typu 2 pochodną biguanidu – metforminą zmniejsza stężenie śródbłonkowej selektyny?

MATERIAŁ I METODY

Badania obejmowały 5 grup pacjentów : grupa 0 – pacjenci z normalną masą ciała ($BMI < 25 \text{ kg/m}^2$) i normoglikemią, grupa 1 - pacjenci z nadmierną masą ciała ($BMI > 25 \text{ kg/m}^2$) i normoglikemią, grupa 2 - pacjenci z nadmierną masą ciała nieprawidłową tolerancją glukozy, grupa 3 pacjenci z nadmierną masą ciała oraz cukrzycą typu 2 („de novo”) oraz grupa 4 - pacjenci z nadmierną masą ciała i cukrzycą typu 2 leczonych metforminą.

W grupach oceniano stężenie selektyny E metodą ELISA. W powyższych grupach oceniano BMI, ciśnienie tętnicze, wykonywano test OGTT, HbA1C, profil lipidowy, oznaczano insulinę oraz wskaźnik insulinooporności HOMA.

WYNIKI

W badanych grupach (0-3) obserwowano stopniowy wzrost stężenia selektyny E. W grupie pacjentów leczonych pochodną biguanidu – metforminą obserwowano istotny statystycznie spadek stężenia selektyny E.

Analizowano również korelacje selektyny E z poszczególnymi parametrami. Stężenia selektyny E istotnie dodatnio korelowały z BMI, glikemią na czczo, glikemią w 120 minucie testu doustnego obciążenia glukozą oraz HbA1C w poszczególnych grupach.

WNIOSKI

1. Selektyna E nie jest niezależnym markerem ryzyka rozwoju miażdżycy.
2. U osób z nadmierną masą ciała, stężenie selektyny E zależy od zaburzeń glikemii – wzrasta wraz ze wzrostem glikemii.
3. Stosowanie metforminy u pacjentów z cukrzycą typu 2 sprzyja uzyskaniu/utrzymaniu stężeń selektyny E w zakresie stężeń obserwowanych w grupie osób z prawidłową tolerancją glukozy.

9. SUMMARY

Central obesity and metabolic syndrome is the most important cause of cardiovascular disease and diabetes mellitus type 2. In Europe and US 20-25% population over 40 presents symptoms of metabolic syndrome. Symptoms of metabolic syndrome increased 2- folds of ischemic heart disease and 5-folds risk of diabetes mellitus type2.

In Poland 2 million people present symptoms of diabetes mellitus. IFG and IGT are states which lead to diabetes mellitus type 2. The faster we diagnose these states and we give the hypoglycemic treatment the slower long term complications will develop. The great hope we bound with pathomechanism of the early states of atherosclerosis development. In this article we assess concentrations of E-selectin in obesity patients with glucose intolerance, diabetes mellitus type 2 and diabetes mellitus type 2 treated with metformin. We found that people with glucose disorder have significant higher concentrations of E-selectin than healthy people and people treated with metformin.

10. WYKAZ TABEL, RYCIN I WYKRESÓW

RYCINY

Ryc. 1 Budowa naczynia krwionośnego - tętnicy

Ryc. 2 Etapy reakcji zapalnej

Ryc. 3 Schemat budowy selektyn

Ryc. 4 Selektyna E

Ryc. 5 Zasada wykonania testu ELISA

TABELE

Tab. 2.0 Wpływ NF- κ B na transkrypcję genów dla poszczególnych substancji

Tab. 4.1 Klasyfikacja zaburzeń glikemii zaproponowana przez PTD

Tab. 5.1.1 Charakterystyka ogólna badanych grup. Dane przedstawiono jako medianę, górny i dolny kwartył

Tab. 5.1.2 Analiza *post hoc* różnic między badanymi grupami glikemii na czczo

Tab. 5.1.3 Analiza *post hoc* różnic między badanymi grupami pod względem glikemii w 120 minucie testu doustnego obciążenia glukozą.

Tab. 5.1.4 Analiza *post hoc* różnic między badanymi grupami pod względem HbA1C.

Tab. 5.1.5 Analiza *post hoc* różnic między badanymi grupami pod względem insuliny na czczo (0')

Tab. 5.1.6 Analiza *post hoc* różnic między badanymi grupami pod względem HOMA- IR

Tab. 5.1.7 Analiza *post hoc* różnic między badanymi grupami pod względem TAG.

Tab. 5.1.8 Analiza *post hoc* różnic między badanymi grupami pod względem HDL

Tab. 5.1.9 Analiza *post hoc* różnic między badanymi grupami pod względem selektyny E

Tab. 5.1.10 Charakterystyka kliniczno-biochemiczna pacjentów grupy porównawczej z uwzględnieniem płci.

Tab. 5.1.11 Charakterystyka kliniczno-biochemiczna pacjentów grupy 1 z uwzględnieniem płci.

Tab. 5.1.12 Charakterystyka kliniczno-biochemiczna pacjentów grupy 2 z uwzględnieniem płci.

Tab. 5.1.13 Charakterystyka kliniczno-biochemiczna pacjentów grupy 3 z uwzględnieniem płci.

Tab. 5.1.14 Charakterystyka kliniczno-biochemiczna pacjentów grupy 4 z uwzględnieniem płci.

Tab. 5.2 Korelacje stężenia selektyny E z pozostałymi parametrami, w badanych grupach 0-4.

WYKRESY

Wykres 5.1.1 Porównanie badanych grup pod względem wieku.

Wykres 5.1.2 Porównanie badanych grup pod względem BMI.

Wykres 5.1.3 Porównanie badanych grup pod względem ciśnienia skurczowego.

Wykres 5.1.4 Porównanie badanych grup pod względem ciśnienia rozkurczowego.

Wykres 5.1.5 Porównanie badanych grup pod względem stężenia cholesterolu całkowitego na czczo.

Wykres 5.1.6 Porównanie badanych grup pod względem stężenia cholesterolu frakcji LDL na czczo.

Wykres 5.1.7 Porównanie badanych grup pod względem stężenia cholesterolu nie-HDL na czczo.

Wykres 5.1.8 Porównanie badanych grup pod względem glikemii na czczo.

Wykres 5.1.9 Porównanie badanych grup pod względem glikemii w 120 minucie OGTT.

Wykres 5.1.10 Porównanie badanych grup pod względem stężenia glikowanej hemoglobiny HbA1c.

Wykres 5.1.11 Porównanie badanych grup pod względem stężenia insuliny na czczo.

Wykres.5.1.12 Porównanie badanych grup pod względem wskaźnika HOMA-IR.

Wykres 5.1.13 Porównanie badanych grup pod względem stężenia triacylogliceroli na czczo.

Wykres 5.1.14 Porównanie badanych grup pod względem stężenia cholesterolu frakcji HDL na czczo.

Wykres 5.1.15 . Porównanie badanych grup pod względem stężenia selektyny E w osoczu.

Wykres 5.2.1.A Korelacja selektyny E w grupie 0.

Wykres 5.2.1.B Korelacja selektyny E w grupie 1.

Wykres 5.2.1.C Korelacja selektyny E w grupie 2.

Wykres 5.2.1.D Korelacja selektyny E w grupie (0+1+2) to znaczy u osób bez cukrzycy z prawidłową i nadmierną masą ciała.

Wykres 5.2.2.A Korelacja selektyny E w grupie 1.

Wykres 5.2.2.B Korelacja selektyny E w grupie 2.

Wykres 5.2.2.C Korelacja selektyny E w grupie 3.

Wykres 5.2.2.D Korelacja selektyny E w grupie (1+2+3), to znaczy u osób z nadmierną masą ciała, prezentujących zarówno prawidłową tolerancją glukozy jak i dysglikemię (IGT i DMt2 'de novo') bez leczenia hipoglikemizującego.

Wykres 5.2.3.A Korelacja selektyny E z HDL-C w grupie 0.

Wykres 5.2.3.B Korelacja selektyny E z glikemią na czczo w grupie 1.

Wykres 5.2.3.C Korelacja selektyny E z BMI w grupie 3.

11. PIŚMIENNICTWO

1. Grodstein F, Manson JE, Stanpfer MJ. *Hormone therapy and coronary heart disease: the role of time since menopause and age at hormone initiation*. J Women Health 2006;15: p. 35-44
2. Łopaciuk S. Zakrzepy i zatory. PZWL, Warszawa 2002.
3. Mijatovic V, van der Mooren MJ, Stehouwer CDA, et al. *Postmenopausal hormone replacement, risk estimators for coronary artery disease and cardiovascular protection*. Gynecol Endocrinol 1999; 13: p. 130-44.
4. Libby P. *Inflammation in atherogenesis*. Nature 2002; 420: 868-74.
5. Kogan TP, Revelle BM, Tapp S, et al. A single amino acid residue can determine the ligand specificity of E-selectin. J Biol Chem 1995; 270: p.14047-55.
6. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA Jr, et al. *Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins*. Science 1989; 243: p. 1160-5.
7. Kunkel EJ, Ley K. *Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo*. Circ Res 1996; 79: p. 1196-204.
8. Hickey MJ, Kanwar S, McCafferty DM, et al. *Varying roles of E-selectin and P-selectin in different microvascular beds in response to antigen*. J Immunol 1999; 162: p. 1137-43.
9. Ley K, Allietta M, Bullard DC, et al. *Importance of E-selectin for firm leukocyte adhesion in vivo*. Circ Res 1998; 83: p. 287-94.
10. Milstone DS, Fukumura D, Padgett RC, et al. *Mice lacking E-selectin show normal numbers of rolling leukocytes but reduced leukocyte stable arrest*

on cytokine-activated microvascular endothelium. *Microcirculation* 1998; 5: p. 153-71.

15. Picker LJ, Warnock RA, Burns AR, et al. *The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140*. *Cell* 1991; 66: p. 921-33.

16. Jung U, Ramos CL, Bullard DC, et al. *Gene-targeted mice reveal importance of L-selectin-dependent rolling for neutrophil adhesion*. *Am J Physiol* 1998; 274: p. 1785-91.

17. Lenter M, Levinovitz A, Isenmann S, et al. *Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P-selectin on myeloid cells*. *J Cell Biol* 1994; 125: p. 471-81.

18. Van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, et al. *Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions*. *Am J Pathol* 1992; 141: p. 1427-33.

19. Herz J, Strickland DK. *LRP: A multifunctional scavenger and signaling receptor*. *J Clin Invest* 2001; 108: p. 779-84.

20. Nykjaer A, Kjoller L, Cohen RL, et al. *Regions involved in binding of urokinase-type 1 inhibitor complex and pro-urokinase to the endocytic alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor related protein. Evidence that the urokinase receptor protects against binding to the endocytic receptor*. *J Biol Chem* 1994; 269: p. 25668-76.

21. Li H, Kuo A, Kochan J, et al. *Endocytosis of urokinase-plasminogen activator inhibitor type 1 complexes bound to a chimeric transmembrane urokinase receptor*. *J Biol Chem* 1994; 269: p. 8153-8.

22. Nassar T, Akkawi S, Shina A, et al. *In vitro and in vivo effects of tPA and PAI-1 on blood vessel tone*. *Blood* 2004; 103: p. 897-902.

23. Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, et al. *Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein*. J Clin Invest 2003; 112: p. 1533-40.
24. Yu G, Rux AH, Ma P, et al. *Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF- κ B-dependent manner*. Blood 2005; 105: p. 3545-51.
25. Holvoet P, Collen D. *Thrombosis and atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol 1997; 8: 320-8.
26. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, et al. *Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells*. Circulation 1998; 98: p. 1164-71.
27. Lindermann S, Tolley ND, Nixon DA, et al. *Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 β synthesis*. J Cell Biol 2001; 154: p. 485-90.
28. Stachowiak G, Stetkiewicz T, Połać I, Sobczuk A, Jędrzejczyk S, Pertyński T. *Rola E-selektyny w procesach zapalnych i aterogennych – wpływ terapii hormonalnej okresu menopauzy* Przegląd Menopauzalny 2006; 3: p. 153-158
29. Cryer A. *Scale and diversity of interaction at the vascular endothelium*. Biochemical Interactions of the Endothelium Elsevier, Amsterdam, 1983, p.1-3.
30. Wnuczko K, Szczepański M. *Śródbłonek – charakterystyka i funkcje* Pol. Merk. Lek., 2007, XXIII, 133, p. 60
31. Oshima T, Pavlick K.P, Laroux F.S. i wsp. *Regulation and distribution of MAdCAM-1 in endothelial cells in vitro*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 281, p. 1096-C1105

32. Furchgott R F, Zawadzki J V. *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980, 288, p. 373-376.
33. Busse R, Edwards G, Feletou M i wsp. *EDHF: bringing the concepts together*. Trends Pharmacol. Sci., 2002, 23, p. 374-380.
34. Theuma P, Fonseca VA. Inflammation and emerging risk factors in diabetes mellitus and atherosclerosis. Curr Diab Rep 2003; 3: 248-254.
35. Fernandez-Real JM, Ricart W. *Insulin resistance and inflammation in an evolutionary perspective: the contribution of cytokine genotype/phenotype to thriftiness*. Diabetologia 1999; 42: p. 1367-1374.
36. Prokopczuk P, Wawrusiewicz –Kurylonek N, Dobrzycki S, Kinalska I. *Znaczenie procesu zapalnego w powstawaniu powikłań sercowo-naczyniowych w cukrzycy*. Przegląd Kardiometaboliczny, 2006; 1: p. 61-66
37. Herlitz J, Karlson BW, Lindqvist J, et al. *Rate and mode of death during five years of follow-up among patients with acute chest pain with and without history of diabetes mellitus*. Diabet Med, 1998;15: p. 308-314.
38. Rodrigues B, Cam MC, McNeill JH. *Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy*. Mol Cell Biochem, 1998; 180: p. 53-57.
39. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, et al. *Endothelial dysfunction in diabetes*. Br J Pharmacol 2000; 130: p. 963-974.
40. Kern PA, Ranganathan S, Li C, et al. *Adipose tissue tumournecrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001; 280: p. E745-E751.
41. Nilsson J, Jovinge S, Niemann A, et al. *Relation between plasma tumor necrosis factor-alfa and insulin sensivity in elderly men with non insulin dependent diabetes mellitus*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998; 18: p. 1199-1202.

42. Calle E, Thun MJ, Petrelli JM, I in. *Body- mass index and mortality in prospective cohort of US adults* N Engl J Med, 1999;341: p. 1097-1105
43. Must A, Spadano J, Coakley E H et al. *The disease burden associated with overweight and obesity*. JAMA, 1999; 282, p. 1523–1529.
44. WHO Export Comitee. *Physical Status: the use and interpretation of antropometry; report of WHO Expert Committee*. Geneva: World Health Organization; 1995. WHO Technical Report Series . 312–340.
45. Jakub Gołąb, Marek Gołą, Witold Lasek Tomasz: *Immunologia*. Warszawa: PWN, 2007, s. 192 .
46. Schemat budowy selektyn (wg Graves BJ, Crowther RL, Chandran C, Rumberger JM, Li S, Huang KS, Presky DH, Familletti PC, Wolitzky BA, Burns DK *Insight into E-selectin /ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EGF domains*. Nature, 1994; 367 (6463): p. 532-8.
47. European Bioinformatics Institute Home Pag. *Protein Data Bank Europe. Crystal Structure of E-selectin/EGF domains complexed with SLEX-* www.ebi.ac.uk
48. Stephens JW, Bodvarsdottir TB, Wareham K, Prior SL, Bracken RM, Lowe GD, Rumley A, Dunseath G, Luzio S, Deacon CF, Holst JJ, Bain SC. *Effects of short-term therapy with glibenclamide and repaglinide on incretin hormones and oxidative damage associated with postprandial hyperglycaemia in people with type 2 diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract. 2011 Nov; 94(2): p. 199-206. Epub 2011 Aug 10.
49. Søren S, Lund Lise Tarnow, Coen DA Stehouwer Casper G Schalkwijk, Tom Teerlink, Jørgen Gram, Kaj Winther, Merete Frandsen, Ulla M Smidt, Oluf Pedersen, Hans-Henrik Parving and Allan A Vaag *Impact of metformin versus repaglinide on non-glycaemic caldiovascular risk markers related to inflammatory and endothelial dysfunction in non-obese patients with type 2 diabetes*. European Journal of Endocrinology, 2008; 158: p. 631-641

50. De Jager J, Kooy A, Lehert P, Bets D, Wulffelé MG, Teerlink T, Scheffer PG, Schalkwijk CG, Donker AJ, Stehouwer CD. *Effects of short-term treatment with metformin on markers of endothelial function and inflammatory activity in type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled trial.* J Intern Med. 2005 Jan;257(1): p.100-9
51. Ryysy L, Yki-Järvinen H. *Improvement of glycaemic control by 1 year of insulin therapy leads to a sustained decrease in sE-selectin concentrations in type 2 diabetes.* Diabetes Care. 2001 Mar; 24(3): p. 549-54
52. G. Derosa , A. D' Angelo, S.A. T. Salvadeo , I. Ferrari, E. Fogari, A. Garvina, R. Mereu, I. Palumbo, P. Maffioli, S. Randazzo, A.F. G. Cicero *Oral glucose tolerance test effects on endothelial inflammation markers In healthy subjects and diabetic patients.* Horm Met. Res 2010; 42: p. 8-13
53. Matsumoto K, Sera Y, Abe Y, Tominaga T, Horikami K, Hirao K, Ueki Y, Miyake S, *High serum concentrations of soluble E-selectin correlate with obesity but not fat distribution in patients with type 2 diabetes mellitus.* Metabolism, 2002 Jul;51 (7):932-4
54. Carrizo Tdel R, Prado MM, Velarde MS, Diaz El, Bazan MC, Abregu AV *Soluble E-selectin in children and adolescents with type 1 diabetes.* Medicina (B Aires), 2008; 68(3): p. 193-7
55. Tanabe N, Saito K, Yamada Y, Takasawa T, Seki N, Suzuki H, *Risk assessment by post-challenge plasma glucose, insulin response ratio, and other indices of insulin resistance and/or secretion for predicting the development of type 2 diabetes.* Intern Med. 2009;48: p. 401-409
56. Bartnik M, Norhammar A, Ryden L. *Hyperglycaemia and cardiovascular disease.* J Intern Med. 2007;262: p. 145-156

57. Bluher M, Unger R, Rassoul F, Richter V, Paschke R, *Relation between glycemic control, hyperinsulinemia and plasma concentrations of soluble adhesion molecules in patients with impaired glucose tolerance or Type II diabetes*. Diabetologia, 2002; 45: p. 210-216
58. Romani D W, Rondaj M G, van Mourik J A, Weibel-Palade *Bodies: unique secretory organelles within endothelial cells*. Ned Tijdschr Geneeskd, 2004, 148, p. 1572-1577.
59. Trøseid M, Lappegård KT, Mollnes TE, Arnesen H, Seljeflot I. *Changes in serum levels of E-selectin correlate to improved glycaemic control and reduced obesity in subjects with the metabolic syndrome*. Scand J Clin Lab Invest. 2005;65(4): p. 283-90.
60. Middleton *et al.* 2002, zmodyfikowane przez Ewa Wybieralska
61. J. M. Vinocur, 2006, *A sandwich ELISA*