

Krzysztof MASTEJ
Rajmund ADAMIEC

Ekspresja cząsteczki adhezyjnej CD11b na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych u chorych na cukrzycę typu 2

Neutrophil surface expression of adhesion molecule CD11b in patients with type 2 diabetes

Katedra i Klinika Angiologii, Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii Akademii Medycznej we Wrocławiu
Kierownik: Prof. dr hab. *Rajmund Adamiec*

Dodatkowe słowa kluczowe:
cukrzyca typu 2
granulocyty obojętnochłonne
CD11b

Additional key words:
type 2 diabetes
neutrophils
CD11b

Cel: 1. Ocena ekspresji cząsteczki adhezyjnej CD11b na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych krwi obwodowej chorych na cukrzycę typu 2 bez klinicznych wykładników powikłań naczyniowych. 2. Analiza stężeń w surowicy krwi rozpuszczalnych molekuł adhezyjnych: E-selektyny (sE-selektyna), cząsteczki adhezji międzykomórkowej (sICAM-1), cząsteczki adhezji komórkowej naczyń (sVACM-1) oraz czynnika von Willebranda (vWF). 3. Ocena ogólnoustrojowych markerów zapalenia: interleukiny-6 (IL-6), rozpuszczalnej formy receptora dla IL-6 (IL-6Rs), hsCRP (high sensitivity C-Reactive Protein), fibrynogenu oraz leptyny. **Materiał i Metody:** Badaniami objęto 22 chorych na cukrzycę typu 2 (10 kobiet i 12 mężczyzn) w wieku od 40 do 65 lat, z czasem trwania cukrzycy średnio $5,32 \pm 1,70$ lat. Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych ochotników odpowiednio dobranych co do wieku i płci grupy badanej. Ocenę ekspresji cząsteczki CD11b na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych dokonano metodą fluorocytometrii przepływowej. Stężenia badanych parametrów we krwi oznaczano metodą immunoenzymatyczną. **Wyniki:** W badanej grupie chorych nie stwierdzono znamienych różnic w ekspresji CD11b na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych w porównaniu do osób zdrowych. Chorych charakteryzowały znamienne wyższe w porównaniu z grupą kontrolną wartości stężeń sE-selektyny, hsCRP, IL-6 oraz leptyny. Stężenia sICAM-1, sVCAM-1, IL-6Rs, fibrynogenu oraz vWF w badanej grupie nie różniły się w odniesieniu do osób zdrowych. W grupie chorych stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy ekspresją CD11b a stężeniem leptyny, hsCRP, fibrynogenu, wskaźnikiem insulinooporności HOMA IR oraz BMI. **Wnioski:** Cukrzyca typu 2 bez klinicznych wykładników powikłań naczyniowych nie towarzyszy wzrost ekspresji CD11b na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych. U badanych chorych stopień aktywacji granulocy-

Aims: 1. Assessment of cell surface expression of adhesion molecule CD11b on peripheral blood neutrophils in patients with type 2 diabetes without vascular complications. 2. Analysis of serum levels of soluble adhesion molecules: E-selectin (sE-selectin), soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 (sICAM-1), soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (sVCAM-1) and von Willebrand Factor (vWF). 3. Evaluation of systemic inflammatory markers: Interleukin-6 (IL-6), soluble Interleukin-6 Receptor (IL-6Rs), high sensitivity C-Reactive Protein (hsCRP), fibrinogen and leptin. **Methods:** 22 patients with type 2 diabetes were enrolled in the study (10-female, 12-male), aged from 40 to 65 yrs, diabetes duration mean $5,32 \pm 1,70$ yrs. The control group included 20 healthy volunteers. Flow cytometry was used to analyse neutrophil expression of CD11b. Both inflammatory markers and soluble adhesion molecules were determined by immunoenzymatic assay. **Results:** Neutrophil surface CD11b expression did not vary between groups. Significantly higher concentrations of sE-selectin, hsCRP, leptin and IL-6 were found in diabetic patients in comparison with the control group. sICAM-1, sVCAM-1, fibrinogen, vWF and IL-6Rs concentrations did not significantly vary between groups. In the diabetic group – a positive correlation was established between neutrophil CD11b expression and hsCRP, HOMA IR, BMI, leptin and fibrinogen. **Conclusions:** Type 2 diabetes without vascular complications is not accompanied by increase in CD11b expression on peripheral blood neutrophils. The degree of neutrophil activation is correlated with an increase in leptin serum levels. Obtained results confirm mutual connections between obesity, type 2 diabetes and chronic inflammatory process.

Adres do korespondencji:
Krzysztof Mastej
Katedra i Klinika Angiologii, Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii
Wrocław, ul. Poniałowskiego 2
Tel. 71 322-84-34
e-mail: kmastej@interia.pl

tów obojętnochłonnych koresponduje ze wzrostem stężenia leptyny, co odzwierciedla wzajemne powiązanie pomiędzy otyłością, cukrzycą typu 2 i przewlekłym procesem zapalnym.

Zgodnie ze współczesnym poglądem przewlekły, przebiegający subklinicznie proces zapalny stanowi ważne ogniwo patogenezy cukrzycy typu 2 [3]. Leukocyty odgrywają centralną rolę w mechanizmach zapalenia i są zaangażowane na wielu szczeblach rozwoju samej cukrzycy, a także jej przewlekłych powikłań. Aktywacja zapalenia będąca skutkiem aktywności endokrynej tkanki tłuszczowej jest jednym z patomechanizmów prowadzących do insulinooporności, głównego czynnika odpowiedzialnego za rozwój zaburzeń metabolicznych, charakterystycznych dla cukrzycy typu 2 [17]. Proces zapalny towarzyszy również rozwojowi powikłań naczyniowych cukrzycy, zarówno o charakterze mikro-, jak i makroangiopatii. Coraz więcej dowodów wskazuje, iż kluczową rolę w tym procesie spełniają leukocyty [1,2,6,11,12,15,16,18,20,21,23,24]. Aktywacja leukocytów w cukrzycy poprzez wzrost ekspresji cząsteczek adhezyjnych prowadzi do nasilenia adhezji tych komórek do ściany naczyniowej. Ponadto stymulacja leukocytów skutkuje wzrostem produkcji szerokiego wachlarza czynników o potencjalnym działaniu cytotoksycznym (wolne rodniki, TNF- α), uszkadzającym błonę podstawną naczyń (wolne rodniki, metaloproteinazy), aktywującym odpowiedź zapalną ściany naczyniowej (IL-1, TNF- α , IFN- γ , pochodne kwasu arachidonowego), czy pobudzającym proliferację fibroblastów i procesy włóknienia (TGF- β , FGF-2, PDGF). Wzrost adhezji naczyniowej leukocytów i produkcji wymienionych czynników w cukrzycy może prowadzić do przyspieszonego rozwoju zmian miażdżycowych, a także przyczynić się do uszkodzenia drobnych naczyń, procesu charakterystycznego dla mikroangiopatii cukrzycowej.

Cząsteczki adhezyjne należące do rodziny β 2-integryn występują na powierzchni różnych leukocytów i uczestniczą w adhezji tych komórek do ściany naczyniowej, wiążąc zlokalizowaną na śródbłonku cząsteczkę ICAM-1 [13]. Aktywacja leukocytów prowadzi do wzrostu ekspresji β 2-integryny, co umożliwia wytworzenie trwałego kontaktu pomiędzy leukocytami a ścianą naczynia. Z tego też względu uważa się, iż stopień ekspresji β 2-integryny odzwierciedla stan aktywacji leukocytów.

Istnieją badania wskazujące na wzrost ekspresji β 2-integryny na leukocytach u chorych na cukrzycę [10,14]. Nie ustalono jednak jakie czynniki w cukrzycy wpływają na stopień ekspresji β 2-integryny na powierzchni leukocytów. Nie wykazano bowiem związku pomiędzy parametrami wyrównania metabolicznego cukrzycy (glikemia, HbA1c) a ekspresją β 2-integryny. Należy również dodać, że nie wszyscy autorzy potwierdzili wzrost ekspresji β 2-integryny na leukocytach u chorych z cukrzycą [5,8]. Na uzyskane wyniki może mieć bowiem wpływ typ cukrzycy, czas jej trwania, obecność powikłań naczyniowych, a także stopień wyrównania metabolicznego.

W świetle powyższych danych podjęto próbę oceny zaangażowania granulocytów obojętnochłonnych w proces zapalny u chorych na cukrzycę typu 2 bez klinicznych wykładników powikłań naczyniowych choroby. Aktywację badanych komórek, wyrażoną ekspresją cząsteczki adhezyjnej MAC-1 (CD11b/CD18) – należącej do podrodziny β 2-integryn – analizowano w kontekście wybranych wykładników aktywacji i dysfunkcji śródbłonka naczyń, ogólnoustrojowych markerów aktywacji zapalenia, a także parametrów metabolicznych oraz klinicznych choroby.

Cel badania stanowiły:

1. Ocena ekspresji cząsteczki adhezyjnej CD11b (podjednostki MAC-1) na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych krwi obwodowej.

2. Analiza wykładników aktywacji / dysfunkcji śródbłonka naczyń w oparciu o pomiary w surowicy krwi rozpuszczalnych molekuł adhezyjnych: E-selektyny (sE-selektyna), cząsteczki adhezji międzykomórkowej (sICAM-1), cząsteczki adhezji komórkowej naczyń (sVACM-1) oraz czynnika *von Willebranda* (vWF).

3. Oznaczenie we krwi chorych markerów aktywacji zapalenia: stężenia interleukiny-6 (IL-6), rozpuszczalnej formy receptora dla IL-6 (IL-6Rs), hsCRP (*high sensitivity C-Reactive Protein*), leptyny oraz fibrynogeny.

Materiał

Badania przeprowadzono w grupie 22 chorych na cukrzycę typu 2 (10 kobiet i 12 mężczyzn) w wieku od 40 do 65 roku życia (średnia $56,00 \pm 6,25$ lat), z czasem trwania cukrzycy od 5 do 10 lat (średnia $5,32 \pm 1,70$ lat). Rekrutacja do badań przeprowadzono wśród chorych hospitalizowani w Ośrodku, bądź pozostających pod kontrolą przyklinikowej Poradni Diabetologicznej.

Do tej grupy kwalifikowano chorych z negatywnym wywiadem w kierunku choroby niedokrwiennej serca, z prawidłowym zapisem spoczynkowego EKG, bez objawów choroby naczyń obwodowych, z prawidłowym wskaźnikiem kostka/ramię ($>1,0$), prawidłowym obrazem tętnic szyjnych w badaniu USG *duplex-doppler*, wydalaniem albumin w moczu mieszczącym się w granicach normy, a także prawidłowym wynikiem badania dna oka.

Cukrzycę rozpoznawano zgodnie z aktualnymi wytycznymi Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego [25].

Z badań wykluczono osoby, u których w ciągu ostatnich 3 miesięcy wystąpiły objawy zakażenia lub stanu zapalnego. Wykluczono również chorych przyjmujących glikokortykosteroidy lub niesteroidowe leki przeciwzapalne (z wyjątkiem kwasu acetylosalicylowego w dawce do 325 mg na dobę), a także osoby z rozpoznaną chorobą nowotworową, niewydolnością wątroby, nerek, bądź też inną poważną chorobą towarzyszącą.

Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych ochotników (9 kobiet i 11 mężczyzn), w wieku od 40 do 65 roku życia (średnia $55,40 \pm 7,50$ lat), odpowiednio dobranych co do wieku i płci grupy badanej.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Etyki Badań Naukowych Akademii Medycznej we Wrocławiu.

Metody badań

Badania laboratoryjne

Krew do wszystkich badań pozyskiwano w trakcie jednego pobrania rano, na czczo, z żyły zgięcia łokciowego.

1. Ocena ekspresji CD11b na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych

Krew w ilości ok. 3 ml pobierano do próbek z heparyną. Próbkę krwi poddawano właściwemu badaniu w podobnym czasie 30 min. od pobrania. Granulocyty obojętnochłonne identyfikowano na podstawie analizy light and size scatter oraz znakowania komórek na obecność wspólnego dla leukocytów antygenu CD45 przy użyciu przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fikoerytryną (anty-CD45/RPE). Ocena ekspresji cząsteczki CD11b dokonywano metodą cytometrii przepływowej za pomocą cytofluorometru DAKO Galaxy (Partec GmbH) z użyciem programu do akwizycji/analizy FloMax 2.3D (Partec). Każdorazowo analizie poddawano ponad 20 000 komórek. Do oznaczenia ekspresji cząsteczki adhezyjnej CD11b na powierzchni badanych komórek użyto skoniugowanych z fluoresceiną przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko antygenowi CD11b (anty-CD11b/FITC). Jako kontrole izotypowe posłużyły przeciwciała IgG1/FITC/RPE. Przeciwciała anty-CD11b/FITC, anty-CD45/RPE, IgG1/FITC/RPE pochodziły z firmy CALTAG Laboratories.

Do 100 ml krwi żyłnej pobranej do próbek z heparyną dodawano 5 ml przeciwciał anty-CD45/RPE, 5 ml anty-CD11b/FITC. Krew inkubowano w ciemności przez 15 min. w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie dodawano 100 ml lizatu i inkubowano krew w podobnych warunkach przez kolejne 10 min. Po inkubacji rozcieńczano krew 1 ml wody destylowanej, a następnie poddawano ją wirowaniu przez 10 min. przy 1000xg. Po zlanii supernatantu próbkę zawieszano w PBS (sol fizjologicznej buforowanej fosforanem) i analizowano w cytofluorometrze przepływowym. Wyniki wyrażano wartościami odczytanymi ze średniego kanału fluorescencji (MCF – *mean channel fluorescence*), traktując te wartości jako indeks ekspresji cząsteczki adhezyjnej CD11b na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane równolegle z odpowiednio dobranymi próbkami izotypowymi.

2. Ocena stężeń w surowicy krwi rozpuszczalnych cząsteczek adhezyjnych

Stężenia sE-selektyny oznaczano metodą ELISA za pomocą zestawów firmy R & D SYSTEMS Minneapolis, USA (nr kat. BBE 2B); czułość testu 0,1 ng/ml; zmienność wewnątrz- i międzyseryjna odpowiednio 4,8% i 5,7%. Stężenia sICAM-1 oznaczano metodą ELISA zestawem firmy Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria (nr kat. BMS201); czułość testu 3,3 ng/ml; zmienność wewnątrz- i międzyseryjna odpowiednio 4,1% i 7,66%. Stężenia sVACM-1 oznaczano metodą ELISA zestawem firmy Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria (nr kat. BMS232CE) czułość testu 0,59 ng/ml; zmienność wewnątrz- i międzyseryjna odpowiednio 3,1% i 5,2%.

3. Ocena stężeń interleukiny-6 oraz rozpuszczalnego receptora dla interleukiny-6 w surowicy krwi

Stężenia interleukiny-6 (IL-6) oznaczano metodą ELISA za pomocą zestawów firmy Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria (nr kat. BMS213/2CE); czułość testu 0,92 pg/ml; zmienność wewnątrz- i międzyseryjna odpowiednio 3,4% i 5,2%. Stężenia rozpuszczalnego receptora dla interleukiny-6 (IL-6Rs) oznaczano metodą ELISA za pomocą zestawów firmy Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria (nr kat. BMS214) czułość testu 0,01 ng/ml; zmienność wewnątrz- i międzyseryjna odpowiednio 1,7% i 2,2%.

4. Ocena stężeń leptyny w surowicy krwi

Oznaczenia przeprowadzono metodą ELISA za pomocą zestawów firmy DRG Instruments GmbH, Germany (nr kat. EIA-2395); zmienność wewnątrz- i międzyseryjna odpowiednio 4,6% i 6,6%.

5. Ocena stężeń białka C-reaktywnego (CRP) w surowicy krwi

Stężenia CRP oceniano metodą ELISA przy użyciu

Tabela I
Parametry kliniczne badanych grup.
 Clinical characteristics.

	cukrzyca typu 2	grupa kontrolna	istotność różnic
n	22	20	
kobiety/mężczyźni	10/12	9/11	NS
wiek (lat)	56,00 ± 6,25	55,40 ± 7,50	NS
czas od rozpoznania cukrzycy (lat)	5,32 ± 1,7		
BMI (kg/m ²)	31,59 ± 5,73	25,55 ± 1,70	p< 0,05
palenie tytoniu (%)	62	75	NS
nadciśnienie tętnicze (%)	70		
ciśnienie skurczowe (mmHg)	133,70± 14,00	118,94 ± 8,09	p< 0,05
ciśnienie rozkurczowe (mmHg)	80,70 ± 6,33	77,00 ± 6,31	NS

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe. NS - nieistotne statystycznie

Tabela II
Wybrane parametry laboratoryjne badanych grup.
 Laboratory data of type 2 diabetic patients and control subjects.

	cukrzyca typu 2	grupa kontrolna	Istotność różnic
n	22	20	
Leukocyty (10 ⁹ /mm ³)	6,64 ± 1,24	5,50 ± 0,54	p< 0,01
Granulocyty (10 ⁹ /mm ³)	3,85 ± 1,02	3,25 ± 0,73	NS
Monocyty (10 ⁹ /mm ³)	15,44 ± 3,34	16,33 ± 2,93	NS
Limfocyty (10 ⁹ /mm ³)	2,24 ± 0,54	2,23 ± 0,49	NS
Erytrocyty (10 ⁶ /mm ³)	4,98 ± 0,39	5,01 ± 0,40	NS
Hemoglobina (mmol/l)	8,15 ± 0,54	8,04 ± 0,37	NS
Płytki krwi (10 ³ /mm ³)	264,59 ± 75,39	256,15 ± 32,28	NS
HbA1c (%)	8,33 ± 1,71	5,5 ± 0,3	p< 0,05
Glukoza - na czczo (mmol/l)	10,03 ± 8,20	5,06 ± 0,23	p< 0,05
Glukoza - 2 godziny po posiłku (mmol/l)	13,17 ± 2,87	5,56 ± 0,11	p< 0,05
Insulina na czczo (mU/l)	10,76 ± 7,08	6,63 ± 1,88	p<0,05
Cholesterol całkowity (mmol/l)	5,49 ± 1,22	5,34 ± 0,91	NS
Cholesterol LDL (mmol/l)	2,98 ± 1,74	3,16 ± 0,85	NS
Cholesterol HDL (mmol/l)	1,13 ± 0,32	1,61 ± 0,25	p< 0,05
Triglicerydy (mmol/l)	2,86 ± 1,74	1,31 ± 0,40	p< 0,05
Kwas moczowy (mmol/l)	0,32 ± 0,90	0,24 ± 0,06	p< 0,05
Kreatynina (μmol/l)	82,21 ± 16,79	86,63 ± 13,26	NS
Mocznik (mmol/l)	5,77 ± 2,26	5,01 ± 0,71	NS

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe. NS – nieistotne statystycznie

wysokoczułego testu firmy DRG International, Inc., USA (nr kat. EIA-3954); czułość testu 0,1 mg/l; zmienność wewnątrz- i międzyseryjna odpowiednio 2,3-7,5% i 2,5-4,1%.

6. Ocena stężeń czynnika von Willebranda w osoczu krwi

Czynnik von Willebranda (vWF) oznaczano metodą ELISA przy użyciu zestawów Asserachrom vWF firmy Diagnostica Stago; czułość testu 2%; zmienność wewnątrz- i międzyseryjna odpowiednio 5,8-6,3% i 3,0-7,2%.

Pozostałe oznaczenia laboratoryjne wykonano rutynowymi metodami stosowanymi w laboratorium Akademickiego Szpitala Klinicznego. Morfologię krwi obwodowej oznaczano metodą automatyczną przy użyciu 16-parametrowego analizatora hematologicznego ABX MICROS 60 OT, ABX Diagnostics-Francia. W skład przeprowadzonych badań biochemicznych wchodziły oznaczenia stężeń: glukozy (metodą enzymatyczną zesta-

wem firmy Analco Medical Trade), insuliny (metodą *Microparticle Enzyme Immunoassay* zestawem firmy AB-BOTT), HbA1c (metodą immunoturbidymetryczną zestawem UNIMATE HBA1C firmy Roche), gospodarki lipidowej (metodą enzymatyczną zestawami Liquick firmy Cormay), kreatyniny, mocznika, kwasu moczowego, fibrynogenu (aparatem Behring Coagulation Timer). Na podstawie uzyskanych wartości stężeń insuliny oraz glukozy na czczo obliczono wskaźnik insulinooporności HOMA IR (HOMA Calculator v2.2 -<http://www.dtu.ox.ac.uk>).

Analiza statystyczna wyników

Wyniki wyrażono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD). W celu oceny różnic rozkładu analizowanych cech w grupach użyto testu rangowego *Wilcoxon*. Obecność współzależności między cechami weryfikowano testem korelacji rangowej *Spearman'a*. Dla wszystkich testów przyjęto poziom istotności p< 0,05.

Wyniki

1. Charakterystyka podstawowych parametrów klinicznych

Wybrane parametry kliniczne, laboratoryjne oraz stosowane programy leczenia przedstawiono w tabelach I-III. Chorych na cukrzycę w porównaniu z grupą kontrolną charakteryzowały wyższe wartości wskaźnika masy ciała BMI, skurczowego ciśnienia tętniczego, stężenia glukozy, triglicerydów, kwasu moczowego, hemoglobiny A1c oraz niższe wartości stężenia cholesterolu HDL w surowicy krwi. W grupie chorych na cukrzycę obserwowano również znamienne wyższą leukocytozę w porównaniu z osobami zdrowymi.

2. Ekspresja CD11b na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych

W badanej grupie chorych nie stwierdzono znamienych różnic w ekspresji CD11b na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych w porównaniu z osobami zdrowymi (tabela IV).

3. Stężenia rozpuszczalnych cząsteczek adhezyjnych oraz vWF

Grupę chorych charakteryzowały znamienne wyższe w porównaniu z grupą kontrolną wartości stężeń sE-selektyny (p< 0,05) w surowicy krwi. Stężenia sICAM-1, sVCAM-1 oraz vWF nie różniły się pomiędzy grupami (tabela V).

4. Stężenia markerów aktywacji zapalenia

U chorych na cukrzycę stwierdzono znamienne wyższe w porównaniu z grupą kontrolną wartości stężenia hsCRP (p<0,001), IL-6 (p<0,01) oraz leptyny (p<0,05) w surowicy krwi. Stężenia IL-6Rs i fibrynogenu nie różniły się pomiędzy grupami (tabela V).

5. Korelacje badanych parametrów

W grupie chorych na cukrzycę stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy ekspresją CD11b a stężeniem hsCRP (rho=0,60, p<0,001), wskaźnikiem insulinooporności HOMA IR (rho=0,74, p<0,01), BMI (rho=0,47, p<0,05), stężeniem leptyny (rho=0,51, p<0,05) oraz fibrynogenu (rho=0,58, p<0,01).

U chorych na cukrzycę wzrost stężenia sE-selektyny korelował dodatnio ze stężeniem insuliny (rho=0,54, p<0,05) oraz wskaźnikiem insulinooporności HOMA IR (rho=0,64, p<0,01). Stężenia leptyny w surowicy krwi chorych korelowały z BMI (rho=0,73, p<0,001), stężeniem insuliny (rho=0,88, p<0,01), fibrynogenu (rho=0,52, p<0,01), hsCRP (rho=0,55, p<0,01) oraz ze wskaźnikiem insulinooporności HOMA IR (rho=0,84, p<0,001).

Omówienie

U chorych na cukrzycę typu 2 bez klinicznych wykładników angiopatii cukrzycowej ekspresja cząsteczki adhezyjnej CD11b nie różniła się w porównaniu z osobami zdrowymi. *Caimi* i wsp. [4] badając grupę pacjentów z cukrzycą typu 2 bez zmian miażdżycowych nie stwierdzili różnic w ekspresji CD11b na granulocytach w porównaniu z osobami zdrowymi. Wyniki te są zgodne z własnymi obserwacjami. Odmienne wyniki uzyskali *Oostrom* i wsp. [19] wykazując u chorych na cukrzycę typu 2 bez zmian miażdżycowych wzrost ekspresji CD11b na granulocytach i monocytach krwi

Tabela III

Leki przyjmowane przez chorych biorących udział w badaniu.

The drug treatment of type 2 diabetic patients.

leki hipoglikemizujące	
insulina	10/22 (45%)
Pochodne sulfonilomocznika	15/22 (68%)
metformina	17/22 (72%)
tiazolidynediony	2/22 (9%)
Inhibitory α -glikozydazy	5/22 (22%)
leki hipolipemizujące	
fibraty	4/22 (18%)
statyny	7/22 (31%)
leki antyagregacyjne	
Kwas acetylosalicylowy	10/22 (45%)
leki hipotensyjne	
beta-blokery	10/22 (45%)
inhibitory kanałów wapniowych	4/22 (18%)
inhibitory konwertazy	12/22 (54%)
diuretyki	7/22 (31%)

Tabela IV

Ekspresja CD11b na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych badanych grup.

Expression of CD11b on the surface of peripheral blood neutrophils of type 2 diabetic patients and control subjects.

	cukrzyca typu 2	grupa kontrolna	istotność różnic
n	22	20	
CD11b granulocyty obojętnochłonne (MCF)	3,88 ± 1,34	3,34 ± 0,96	NS

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe

Tabela V

Parametry laboratoryjne badanych grup.

Laboratory data of type 2 diabetic patients and control subjects.

	cukrzyca typu 2	grupa kontrolna	istotność różnic
n	22	20	
sE-selektyna (ng/ml)	43,53 ± 19,77	35,35 ± 17,17	p<0,05
sICAM-1 (ng/ml)	359,86 ± 80,03	351,84 ± 84,19	NS
sVCAM-1 (ng/ml)	710,83 ± 199,86	686,54 ± 138,69	NS
VWF (% stand.)	120,30 ± 33,58	104,11 ± 21,32	NS
IL-6 (pg/ml)	2,06 ± 1,26	1,14 ± 0,45	p<0,01
IL-6R(s) (ng/ml)	154,28 ± 38,87	149,82 ± 23,78	NS
Leptyna (ng/ml)	13,91 ± 4,57	6,51 ± 4,22	p<0,05
HsCRP (mg/l)	4,19 ± 3,70	1,26 ± 1,36	p<0,001
Fibrynogen (g/l)	3,09 ± 0,76	2,80 ± 0,31	NS

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe. NS - nieistotne statysty

obwodowej. Istniały jednak pewne różnice pomiędzy analizowanymi grupami chorych w obu badaniach. W badaniu *Oostrom'a* wzięli udział chorzy starsi, bardziej otyli, z wyższymi wartościami ciśnienia tętniczego, większym stężeniem triglicerydów oraz cholesterolu całkowitego. Wszystkie wymienione czynniki mogły wpłynąć na wzrost ekspresji CD11b na granulocytach i monocytach w cytowanym badaniu. W obu badaniach chorzy charakteryzowali się dobrą kontrolą glikemii, niskimi wartościami HbA_{1c} oraz pozostawali wyłącznie na leczeniu doustnymi preparatami hipoglikemizującymi.

Tak więc stopień ekspresji CD11b na leukocytach u chorych z dobrze kontrolowaną cukrzycą bez wykładników powikłań naczyniowych może być zależny od obecności dodatkowych czynników.

W badanej grupie chorych istniała dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją CD11b na granulocytach obojętnochłonnych a wskaźnikiem masy ciała (BMI) oraz stopniem insulinooporności (HOMA IR). Nie wykazano natomiast związku pomiędzy ekspresją CD11b a wykładnikami wyrównania metabolicznego cukrzycy – stężeniem glukozy, HbA_{1c}. Podobnie w innych badaniach

nie stwierdzono wyraźnej zależności między aktywacją leukocytów a kontrolą cukrzycy, natomiast istniała korelacja z parametrami zależnymi od masy ciała [10]. Obecność związku pomiędzy ekspresją CD11b a wskaźnikiem masy ciała sugeruje, że czynniki regulujące odpowiedź zapalną w cukrzycy mogą pochodzić z tkanki tłuszczowej. Istnieje przekonanie, że otyłość, cukrzyca typu 2, a także rozwój powikłań naczyniowych są związane z przewlekłym, przebiegającym subklinicznie procesem zapalnym, którego mediatorami są uwalniane z tkanki tłuszczowej adipocytokiny – TNF- α , IL-6, leptyna [3]. We własnych badaniach w grupie chorych wykazano wzrost stężenia we krwi wykładników stanu zapalnego – IL-6, hsCRP oraz leptyny. Ponadto stwierdzono obecność dodatniej korelacji pomiędzy ekspresją CD11b na granulocytach a stężeniem hsCRP, fibrynogenu oraz leptyny. Nie obserwowano natomiast związku ekspresji CD11b na leukocytach ze stężeniem IL-6 oraz IL-6Rs we krwi chorych. Wykazano również silną, dodatnią korelację pomiędzy stężeniem leptyny a wskaźnikiem masy ciała (BMI), stężeniem insuliny na czczo, stopniem insulinooporności (HOMA IR), a także ogólnoustrojowymi wykładnikami aktywacji zapalenia – stężeniem hsCRP oraz fibrynogenu. Wskazuje to na związek stężenia leptyny w surowicy krwi zarówno z zawartością tkanki tłuszczowej i wynikającym z tego stanem wrażliwości na insulinę, jak i z aktywacją odpowiedzi zapalnej. W kilku badaniach donoszono o wzroście stężenia leptyny u chorych na cukrzycę typu 2, wskazując na możliwość udziału tego czynnika w procesie rozwoju angiopatii cukrzycowej [3,7,9]. We własnych badaniach po raz pierwszy wykazano zależność pomiędzy stężeniem leptyny a ekspresją CD11b na powierzchni granulocytów krwi obwodowej chorych na cukrzycę typu 2.

Chorych na cukrzycę charakteryzował znamieny wzrost stężenia sE-selektyny. Nie wykazano z kolei istotnych różnic w odniesieniu do sICAM-1, sVCAM-1 oraz vWF. W badanej grupie chorych stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy stężeniem sE-selektyny a stężeniem insuliny oraz wskaźnikiem insulinooporności (HOMA IR). Stwierdzony w tych przypadkach wzrost stężenia sE-selektyny mógł być w dużej mierze wynikiem zaburzeń metabolicznych oraz nasilonego stanu insulinooporności. Stwierdzona korelacja stężenia sE-selektyny ze stopniem insulinooporności może być wynikiem istnienia związku pomiędzy opornością na insulinę a dysfunkcją śródbłonna naczyń w cukrzycy.

Podobne wyniki uzyskali również autorzy innych badań. Ryysy i wsp. [22] w grupie chorych na cukrzycę typu 2 bez powikłań naczyniowych wykazali wzrost stężenia sE-selektyny, w przeciwieństwie do sVCAM-1, którego stężenie nie różniło się w porównaniu z osobami zdrowymi. Autorzy dowiedli również, że wzrost stężenia sE-selektyny jest związany ze słabą kontrolą metaboliczną cukrzycy i ulega obniżeniu w wyniku intensyfikacji leczenia przy użyciu insuliny. W badaniu tym wykazano także związek pomiędzy stężeniem sE-selektyny a HbA_{1c}. W warunkach *in vitro* hiperglikie-

mia powoduje wzrost ekspresji w śródbłonku E-selektyny, ICAM-1 oraz VCAM-1 [21]. Wydaje się jednak, że w warunkach *in vivo* bardziej czułym wskaźnikiem aktywacji śródbłonka pod wpływem hiperglikemii jest stężenie sE-selektyny, a nie sICAM-1 czy sVCAM-1.

Podsumowując otyłości oraz stan insulinooporności predysponują do wzrostu syntezy leptyny, czynnika wpływającego na aktywację mechanizmów zapalenia. U chorych na cukrzycę typu 2 bez klinicznych wykładników powikłań naczyniowych stopień aktywacji granulocytów obojętnochłonnych koresponduje ze wzrostem stężenia leptyny, co odzwierciedla wzajemne powiązania pomiędzy otyłością, cukrzycą typu 2 i przewlekłym procesem zapalnym.

Piśmiennictwo

1. **Adamis A.P.**: Is diabetic retinopathy an inflammatory disease? *Br. J. Ophthalmol.* 2002, 86, 363.
2. **Barouch F.C., Miyamoto K., Allport J.R.**: Integrin-mediated neutrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000, 41, 1153.
3. **Bullo M., Garcia-Lorda P., Megias I., Salas-Salvado J.**: Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes. Res.* 2003, 11, 525.
4. **Caimi G., Montana M., Citarrella R. et al.**: Polymorphonuclear leukocyte integrin profile in diabetes mellitus. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2002, 27, 83.
5. **Caimi G., Montana M., Ferrara F. et al.**: Polymorphonuclear leukocyte integrin pattern, at baseline and after activation, in type 2 diabetic subjects with macrovascular complications. *Acta Diabetol.* 2003, 40, 14.
6. **Chow F.Y., Nikolic Paterson D.J., Atkins R.C., Tesch G.H.**: Macrophages in streptozotocin-induced diabetic nephropathy: potential role in renal fibrosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2004, 19, 2987.
7. **Chung F.M., Tsai J.C., Chang D.M. et al.**: Peripheral total and differential leukocyte count in diabetic nephropathy: the relationship of plasma leptin to leukocytosis. *Diabetes Care* 2005, 28, 1710.
8. **Danielsson P., Truedsson L., Eriksson K-F., Norgren L.**: Inflammatory markers and IL-6 polymorphism in peripheral arterial disease with and without diabetes mellitus. *Vasc. Med.* 2005, 10, 191.
9. **Er H., Doganay S., Ozerol E., Yurekli M.**: Adrenomedullin and leptin levels in diabetic retinopathy and retinal diseases. *Ophthalmologica* 2005, 219, 107.
10. **Fogelstrand L., Hulthe J., Hulten L.M. et al.**: Monocytic expression of CD14 and CD18, circulating adhesion molecules and inflammatory markers in women with diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetologia* 2004, 47, 1948.
11. **Fusman R., Rotstein R., Zeltser D. et al.**: The state of leukocyte adhesiveness/aggregation in the peripheral blood of patients with type 2 diabetes and ischemic vascular disease. *Acta Diabetol.* 2001, 38, 43.
12. **Galkina E., Ley K.**: Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006, 17, 368.
13. **Gołąb J.**: Krażenie limfocytów. w: *Immunologia*. Jakóbsiak M. (red.) PWN Warszawa 2005, 103.
14. **Grykiel K., Zozulińska D., Kostrzewa A. et al.**: Ocena ekspresji receptorów powierzchniowych na granulocytach obojętnochłonnych u chorych na cukrzycę typu 1. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2001, 5, 377.
15. **Heinzelmann M., Mercer-Jones M.A., Passmore J.C.**: Neutrophils and renal failure. *Am. J. Kidney. Dis.* 1999, 34, 384.
16. **Joussen A.M., Poulaki V., Le M.L. et al.**: A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J.* 2004, 18, 1450.
17. **Kinalska I., Telejko B., Kinalski M.**: Otyłość a cukrzyca. [W:] *Cukrzyca red.* Sieracki J. Via Medica Gdańsk 2006.
18. **MacKinnon J.R., Knott R.M., Forrester J.V.**: Altered L-selectin expression in lymphocytes and increased adhesion to endothelium in patients with diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.* 2004, 88, 1137.
19. **Oostrom A.J., Wijk J.P., Sijmonsma T.P. et al.**: Increased expression of activation markers on monocytes and neutrophils in type 2 diabetes. *Neth. J. Med.* 2004, 62, 320.
20. **Rao K.M., Hatchell D.L., Cohen H.J.**: Alterations in stimulus-induced integrin expression in peripheral blood neutrophils of patients with diabetic retinopathy. *Am. J. Med. Sci.* 1997, 313, 131.
21. **Ruberg F.L., Loscalzo J.**: Inflammation and atherothrombosis. [W:] *Molecular mechanisms of atherosclerosis*. Loscalzo J. (editor) Taylor&Francis 2004, 45.
22. **Ryysy L., Yki-Jarvinen H.**: Improvement of glycemic control by 1 year of insulin therapy leads to a sustained decrease in sE-selectin concentrations in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001, 24, 549.
23. **Sassy-Prigent C., Heudes D., Mandet C. et al.**: Early glomerular macrophage recruitment in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 2000, 49, 466.
24. **Wierusz-Wysocka B., Zozulińska D., Wysocki H.**: Odczyn zapalny w patogenezie mikro- i makroangiopatii cukrzycowej. *Diabetologia* 2002, 1, 56.
25. **Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2005.** Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. *Diabetologia Doświadczalna i Kliniczna* 2004, 4, Sup.E