

Krzysztof MASTEJ
Rajmund ADAMIEC

Stężenie sL-selektyny w surowicy krwi oraz ekspresja L-selektyny na powierzchni leukocytów chorych z cukrzycą typu 2

Serum level of sL-selectin and leukocyte surface expression of L-selectin 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:

L-selektyna
leukocyty
cukrzyca typu 2
powikłania naczyniowe

Additional key words:

L-selectin
leukocyte
type 2 diabetes
vascular complications

Celem badania była ocena stężenia sL-selektyny w surowicy krwi oraz ekspresji L-selektyny na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych oraz monocytów krwi obwodowej chorych na cukrzycę typu 2. Materiał i metody. Badania przeprowadzono w grupie 80 chorych na cukrzycę typu 2, w wieku od 40 do 65 lat (średnia $56,40 \pm 5,93$ lat). Chorych na cukrzycę podzielono na trzy grupy: grupa A - mikroangiopatia cukrzycowa, grupa B - makroangiopatia cukrzycowa, grupa C - chorzy bez klinicznie jawnych powikłań naczyniowych. Grupę kontrolną (n=20) stanowili zdrowi ochotnicy odpowiednio dobrani co do wieku i płci badanych grup chorych. Stężenia sL-selektyny oznaczano metodą ELISA, natomiast ekspresję L-selektyny na powierzchni leukocytów mierzono metodą fluorocytometrii przepływowej. Wyniki. U chorych na cukrzycę typu 2 stwierdzono znamienne niższe wartości stężeń sL-selektyny w porównaniu z osobami zdrowymi. Stężenia sL-selektyny nie różniły się pomiędzy badanymi grupami chorych. Ekspresja L-selektyny na powierzchni leukocytów była znamienne niższa w grupie chorych z mikroangiopatią oraz makroangiopatią cukrzycową w porównaniu z chorymi na cukrzycę bez powikłań naczyniowych oraz osobami zdrowymi. Wnioski: 1. Chorych na cukrzycę typu 2 charakteryzuje spadek stężenia sL-selektyny w surowicy krwi. 2. Obecność makro- oraz mikroangiopatii cukrzycowej wiąże się z obniżoną ekspresją L-selektyny na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych oraz monocytów krwi obwodowej.

The aims of the study were assessment of serum level of sL-selectin and leukocyte (neutrophil and monocyte) surface expression of L-selectin in peripheral blood. Subjects and methods. Eighty patients with type 2 diabetes were enrolled in the study. The diabetic patients were divided into three groups: group A - diabetic microangiopathy, group B - diabetic macroangiopathy and group C - patients without vascular complications. The control group included 20 healthy volunteers. Serum level of sL-selectin was determined by immunoenzymatic assay. Flow cytometry was used to analyse surface expression of L-selectin. Results. In patients with type 2 diabetes sL-selectin level was significantly decreased in comparison with control group. Serum level of sL-selectin did not significantly vary between diabetic groups. In patients with diabetic microangiopathy and macroangiopathy leukocyte expression of L-selectin was significantly lower in comparison with the healthy control and patients without vascular complications. Conclusions: Serum level of sL-selectin is decreased in patients with type 2 diabetes. The development of chronic vascular complications, diabetic micro- and macroangiopathy, is accompanied by decrease of leukocyte surface expression of L-selectin.

Wstęp

Granulocyty obojętnochłonne oraz monocyty odgrywają centralną rolę w mechanizmach zapalenia są zaangażowane na wielu szczeblach patogenezы nie tylko cukrzycы ale i rozwoju jej przewlekłych powikłań [1,3-6,9]. W procesie zapalenia wymienione komórki podlegają złożonym interakcjom pomiędzy sobą oraz z komórkami śródbłónka naczyń za pośrednictwem cząste-

czek adhezyjnych oraz uwalnianych substancji (cytokin). Dość dobrze poznany jest udział monocytów oraz makrofagów z punktu widzenia patogenezы miażdżycы. Coraz więcej dowodów wskazuje na bezpośredni udział komórek odpowiedzi zapalnej, w tym monocytów oraz granulocytów obojętnochłonnych, w rozwoju powikłań o typie mikroangiopatii cukrzycowej. Co więcej, wykazano, że w wyniku zahamowania oddzia-

Adres do korespondencji:

Krzysztof Mastej

Katedra i Klinika Angiologii, Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii AM
Wrocław, ul. Borowska 213
Tel.: 071 322-20-00
e-mail: kmastej@interia.pl

ływania granulocytów obojętnochłonnych na ścianę naczyń za pomocą swoistych przeciwciał ulega spowolnieniu proces mikroangiopatii u zwierząt z cukrzycą.

Cząsteczki L-selektyny uczestniczą w zjawisku adhezji leukocytów do śródbłonka naczyń, a także w interakcji pomiędzy leukocytami. W wyniku aktywacji leukocytów cząsteczki L-selektyny ulegają oderwaniu od powierzchni komórki na drodze przemian proteolitycznych i pojawiają się we krwi jako tzw. „rozpuszczalne” (*soluble*) postaci tych białek. W takiej formie cząsteczki adhezyjne mogą dalej pełnić określone funkcje biologiczne [7]. Wskazuje się na przeciwwzpalne właściwości krążących cząsteczek sL-selektyny, z uwagi na wykazaną w pracach doświadczalnych zdolność do hamowania zjawiska adhezji leukocytów [11].

Do tej pory opublikowano wiele badań poświęconych rozpuszczalnemu cząsteczkom adhezyjnym jak: sICAM-1, sVCAM-1, sE-selektyna u chorych na cukrzycę. W przeciwieństwie, zaledwie pojedyncze prace poświęcone były ocenie rozpuszczalnej L-selektyny w surowicy oraz ekspresji L-selektyny na powierzchni leukocytów w cukrzycy.

W prezentowanym badaniu postanowiono przeanalizować oddzielnie chorych z dominującymi w obrazie klinicznym i w badaniach dodatkowych powikłaniami o typie mikroangiopatii oraz makroangiopatii cukrzycowej. Jednocześnie, dla pełnego obrazu, dokonano oddzielnej oceny chorych na cukrzycę typu 2 bez rozwiniętych powikłań naczyniowych choroby.

Materiał i metody

Badaniami objęto 80 chorych na cukrzycę typu 2 (30 kobiet i 50 mężczyzn), w wieku od 40 do 65 lat (średnia 56,40 ± 5,93 lat), z czasem trwania cukrzycy od 5 do 30 lat (średnia 9,07 ± 7,59 lat). Rekrutację do badań przeprowadzono wśród chorych pozostających pod kontrolą przyklinicznej Poradni Diabetologicznej wyodrębniając 3 grupy:

Grupa A (n=30) - pacjenci z mikroangiopatią cukrzycową, 11 kobiet i 19 mężczyzn, w wieku od 40 do 65 roku życia (średnia 57,09 ± 5,96 lat), z czasem trwania cukrzycy od 5 do 30 lat (średnia 11,03 ± 8,50 lat). Do tej grupy kwalifikowano chorych z dominującymi w obrazie klinicznym zaburzeniami mikrokrążenia, przy miernym zaawansowaniu zmian o charakterze makroangiopatii (bez istotnych zaburzeń ukrwienia obwodowego, z ujemnym wywiadem w kierunku choroby niedokrwiennej serca, bez zaburzeń ze strony układu naczyniowo-mózgowego). W grupie tej znaleźli się chorzy z retinopatią cukrzycową (potwierdzoną w badaniu oftalmoskopowym bądź w angiografii fluoresceinowej) oraz nefropatią cukrzycową rozpoznawaną na podstawie mikroalbuminurii lub obecności białkomoczu. Mikroalbuminurię rozpoznawano jeżeli w 2 z 3 badań wykonanych w ciągu 6 miesięcy stwierdzono wzrost wydalania albumin w moczu. Oznaczano wskaźnik albumina/kreatynina z porannej porcji moczu uznając za nieprawidłowe wyniki $\geq 30 \mu\text{g}/\text{mg}$. Z badania wykluczono chorych z podwyższonym stężeniem kreatyniny w surowicy ($>124 \mu\text{mol/l}$). Za wiarygodną uznawano tylko ocenę albuminurii u pacjentów z wyrównaną cukrzycą oraz bez klinicznych wykładników zakażenia układu moczowego. Białkomocz rozpoznawano na podstawie obecności białka w dobowej zbiorce moczu $\geq 0,5 \text{ g}/24\text{godz}$.

Grupa B (n=28) - pacjenci z makroangiopatią cukrzycową, 9 kobiet i 19 mężczyzn, w wieku od 40 do 65 roku życia (średnia 57,76 ± 5,15 lat), z czasem trwania cukrzycy od 5 do 30 lat (średnia 10,25 ± 7,16 lat). Do tej grupy kwalifikowano pacjentów z:

- chorobą niedokrwiennej serca rozpoznaną na pod-

Tabela I
Parametry kliniczne badanych grup.
Clinical characteristics.

	Cukrzyca typu 2			grupa kontrolna	istotność różnic
	mikroangiopatia [grupa A]	makroangiopatia [grupa B]	bez powikłań [grupa C]		
n	30	28	22	20	
kobiety/mężczyźni	11/19	9/19	10/12	9/11	NS
Wiek [lat]	57,09 ± 5,96	57,76 ± 5,15	56,00 ± 6,25	55,40 ± 7,50	NS
czas od rozpoznania cukrzycy [lat]	11,03 ± 8,50	10,25 ± 7,16	5,32 ± 1,7		A vs C; p < 0,05 B vs C; p < 0,05
BMI [kg/m ²]	31,15 ± 3,41	27,96 ± 3,51	31,59 ± 5,73	25,55 ± 1,70	A/B/C vs kontr. p < 0,05 B vs C/A; p < 0,05 A vs C NS
palenie tytoniu [%]	75	60	62	75	NS
nadciśnienie tętnicze [%]	78	73	70	0	NS
ciśnienie skurczowe [mmHg]	142,77 ± 18,69	139,18 ± 13,41	133,70 ± 14,00	118,94 ± 8,09	A/B/C vs kontr.; p < 0,05; A vs C; p < 0,05; B vs A/C; NS
ciśnienie rozkurczowe [mmHg]	81,38 ± 10,56	78,48 ± 6,84	80,70 ± 6,33	77,00 ± 6,31	NS
makroangiopatia		choroba niedokrwienna serca 22% miażdżyca zarostowa 89%			
mikroangiopatia	Retinopatia 65% Mikroalbuminuria 47% Białkomocz 53%				Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe. NS - nieistotne statystycznie

stawie wyniku koronarografii, przebycia zawału mięśnia sercowego lub zabiegu rewaskularyzacji naczyń wieńcowych

- miażdżycą naczyń obwodowych: pacjenci z objawami chromania przestankowego (II okres niewydolności tętnicznej wg Fontaine'a) z potwierdzoną redukcją wskaźnika kostka/ramię < 0,9

Grupa C (n=22) - chorzy bez klinicznie jawnych powikłań naczyniowych, 10 kobiet i 12 mężczyzn, w wieku od 40 do 65 roku życia (średnia 56,00 ± 6,25 lat), z czasem trwania cukrzycy od 5 do 10 lat (średnia 5,32 ± 1,70 lat). Do tej grupy kwalifikowano chorych z ujemnym 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.

W celu uzyskania pewności, że kwalifikacja do grupy badanej dotyczyła wyłącznie chorych na cukrzycę typu 2, wszyscy pacjenci przyjmujący insulinę, stosowali wcześniej przynajmniej przez 6 lat od czasu rozpoznania cukrzycy wyłącznie doustne leki hipoglikemizujące.

Kryteria wykluczające: objawy zakażenia lub stanu zapalnego w ciągu ostatnich 3 miesięcy, przebyły w ciągu ostatnich 6 miesięcy ostry incydent naczyniowy (udar mózgu lub ostry zespół wieńcowy), przyjmowanie glikokortykosteroidów lub niesteroidowych leków przeciwzapalnych (z wyjątkiem kwasu acetylosalicylowego w dawce do 325 mg na dobę), choroba nowotworowa, niewydolność wątroby, nerek, bądź też inna poważna choroba towarzysząca.

Grupę kontrolną (n=20) stanowili zdrowi ochotnicy, 9 kobiet i 11 mężczyzn, w wieku od 40 do 65 roku życia (średnia 55,40 ± 7,50 lat), odpowiednio dobrani co do wieku i płci badanych grup chorych.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Etyki Badań Naukowych Akademii Medycznej we Wrocławiu. Wszystkie osoby uczestniczące w badaniach zostały poinformowane o ich celu oraz wyraziły na ich wykonanie pisemną zgodę.

Badania laboratoryjne

Krew do wszystkich badań pozyskiwano w trakcie jednego pobrania rano, na czczo, z żyły zgięcia łokciowego. Ekspresję L-selektyny na powierzchni leukocytów dokonywano metodą fluorocytometrii przepływowej w ciągu 30 min. od pobrania krwi. Krew przeznaczoną do wykonania oznaczeń metodą immunoenzymatyczną przechowywano w temp. -20°C, nie dłużej niż przez 3 miesiące.

1. Oznaczenie stężeń rozpuszczalnej L-selektyny w surowicy krwi.

Oznaczenia przeprowadzono metodą ELISA za pomocą gotowych zestawów (nr kat. BBE 4B) firmy R & D SYSTEMS Minneapolis, USA. Uzyskane wartości stężeń wyrażano w ng/ml.

2. Ocena ekspresji L-selektyny na powierzchni leukocytów.

Krew w ilości ok. 3 ml pobierano do probówek z heparyną. 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). Monocyty identyfikowano w oparciu o znakowanie komórek na obecność swoistego antygenu CD14 za pomocą przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluoresceiną (anty-CD14/FITC). Ocenę ekspresji CD62L dokonywano metodą cytometrii przepływowej za pomocą cytometryru DAKO Galaxy (Partec GmbH) z użyciem programu do akwizycji/analizy FloMax 2.3D (Partec). Każdorazowo analizie poddawano ponad 20 000 komórek. Do oznaczenia ekspresji CD62L na powierzchni badanych komórek użyto przeciwciał monoklonalnych anty-CD62L/TC. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane rów-

Tabela II
Parametry laboratoryjne badanych grup.
 Laboratory data of diabetic patients and control group.

	Cukrzyca typu 2			grupa kontrolna	istotność różnic
	mikroangiopatia [grupa A]	makroangiopatia [grupa B]	bez powikłań [grupa C]		
n	30	28	22	20	
HbA1c [%]	8,43 ± 2,19	7,81 ± 1,86	8,33 ± 1,71	5,5 ± 0,3	A/B/C vs kontr.; p < 0,05 A vs B/C; NS; B vs C; NS
HOMA IR	1,30 ± 0,91	1,49 ± 0,92	1,55 ± 0,95	0,74 ± 0,15	A/B/C vs kontr.; p < 0,05 A vs B/C; NS B vs C; NS
glukoza - na czczo [mmol/l]	9,41 ± 7,58	11,33 ± 6,70	10,03 ± 8,20	5,06 ± 0,23	A/B/C vs kontr.; p < 0,05 A vs B/C; NS B vs C; NS
cholesterol całkowity [mmol/l]	6,50 ± 3,50	5,30 ± 1,14	5,49 ± 1,22	5,34 ± 0,91	NS
cholesterol LDL [mmol/l]	2,94 ± 1,12	3,00 ± 0,85	2,98 ± 1,05	3,16 ± 0,85	NS
cholesterol HDL [mmol/l]	1,27 ± 0,36	1,28 ± 0,37	1,13 ± 0,32	1,61 ± 0,25	A/B/C vs kontr.; p < 0,05 A vs B/C; NS B vs C; NS
triglicerydy [mmol/l]	2,54 ± 1,29	2,03 ± 1,08	2,86 ± 1,74	1,31 ± 0,40	A/B/C vs kontr.; p < 0,05 A vs B/C; NS B vs C; NS
kwas moczowy [mmol/l]	0,32 ± 0,12	0,27 ± 0,07	0,32 ± 0,90	0,24 ± 0,06	A/C vs kontr.; p < 0,05 B vs A/C/kontr.; NS
kreatynina [μmol/l]	95,47 ± 29,17	88,40 ± 18,56	82,21 ± 16,79	86,63 ± 13,26	NS
leukocyty [10 ³ /mm ³]	7,32 ± 1,24	6,76 ± 1,55	6,64 ± 1,57	5,50 ± 0,54	A vs B; NS; A vs C; p < 0,05 A vs kontr.; p < 0,01 B vs C; NS B vs kontr.; p < 0,01 C vs kontr.; p < 0,01
granulocyty [10 ³ /mm ³]	4,33 ± 1,14	3,69 ± 1,00	3,85 ± 1,02	3,25 ± 0,73	A vs B; p < 0,05 A vs C; NS; A vs kontr.; p < 0,05 B vs C; NS B vs kontr.; NS C vs kontr.; NS
monocyty [10 ³ /mm ³]	14,23 ± 3,12	17,21 ± 2,34	15,44 ± 3,34	16,33 ± 2,93	NS
limfocyty [10 ³ /mm ³]	2,92 ± 0,63	2,81 ± 0,72	2,24 ± 0,54	2,23 ± 0,49	NS
erytrocyty [10 ⁶ /mm ³]	4,81 ± 0,30	4,92 ± 0,34	4,98 ± 0,39	5,01 ± 0,40	NS
hemoglobina [mmol/l]	8,12 ± 0,49	8,00 ± 0,46	8,15 ± 0,54	8,04 ± 0,37	NS
płytki krwi [10 ³ /mm ³]	245,09 ± 68,83	246,76 ± 70,33	264,59 ± 75,39	256,15 ± 32,28	NS

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

nolegle z odpowiednio dobranymi próbkami izotypowymi, z użyciem przeciwciał IgG1/FITC/RPE. W celu zminimalizowania ewentualnych zmian aktywności granulocytów *ex vivo* znakowania komórek dokonywano w pełnej krwi żyłnej. Wyniki wyrażano wartościami odczytanymi ze średniego kanału fluorescencji (MCF - mean channel fluorescence). Wartość MCF dla próbki badanej pomniejszona o wartość równoległe oznaczonej kontroli izotypowej traktowano jako indeks ekspresji CD62L na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych. Przeciwciała anty-CD62L/TC, anty-CD45/RPE, anty-CD14/FITC, IgG1/FITC/RPE, IgG1/TC pochodziły z firmy CALTAG Laboratories.

Do 100 ml pełnej krwi żyłnej pobranej do próbek z heparyną dodawano 5 ml przeciwciał anty-CD45/RPE, 5 ml anty-CD14/FITC, 5 ml anty-CD62L/TC. 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 zlaniu supernatantu próbkę zawieszano w PBS (soli fizjologicznej buforowanej fosforanem) i analizowano w cytofluorymetrze przepływowym.

3. Ocena stężeń interleukiny-6 (IL-6) oraz rozpuszczalnego receptora dla interleukiny-6 (IL-Rs) w surowicy krwi.

Stężenia 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 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 białka C-reaktywnego (CRP) w surowicy krwi.

Stężenia CRP oceniano metodą ELISA przy użyciu 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%.

5. Oznaczenie stężenia leptyny w surowicy krwi.

Oznaczenia przeprowadzono metodą ELISA za pomocą gotowych zestawów (nr kat. EIA-2395) firmy DRG Instruments GmbH, Germany. Wyniki badań wyrażano w ng/ml.

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 zestawem firmy Alcalco 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 użyczo testu rangowego *Wilcoxon*. Obecność współzależności między cechami weryfikowano testem korelacji rangowej *Spearman'a*. Dla wszystkich testów przyjęto poziom istotności $p < 0,05$.

Wyniki

Charakterystyka podstawowych parametrów klinicznych

Wybrane parametry kliniczne, laboratoryjne oraz stosowane programy leczenia badanych osób przedstawiono w tabelach I-II.

Stężenia sL-selektyny w surowicy krwi

U chorych na cukrzycę stwierdzono znamienne niższe wartości stężenia sL-selektyny w porównaniu do osób zdrowych (731,26 ± 133,20 vs 955,91 ± 204,28 ng/ml; $p < 0,05$). Wyodrębnione grupy chorych na cukrzycę nie wykazywały istotnych statystycznie różnic pod względem stężenia sL-selektyny (tabela III).

Ekspresja CD62L na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych oraz monocytów krwi obwodowej

W grupie mikroangiopatią oraz makroangiopatią obserwowano znamienne niższe wartości ekspresji CD62L na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych oraz monocytów w porównaniu do osób zdrowych, a także chorych na cukrzycę bez powikłań naczyniowych. Pomiędzy grupą mikro- oraz makroangiopatii cukrzycowej ekspresja CD62L na powierzchni badanych komórek nie wykazywała istotnych różnic. Nie stwierdzono również różnic w ekspresji CD62L na badanych komórkach pomiędzy grupą bez powikłań naczyniowych a osobami zdrowymi (tabela III).

Stężenia IL-6 i IL-6Rs w surowicy krwi

We wszystkich analizowanych grupach chorych na cukrzycę stwierdzono znamienne wyższe wartości stężenia IL-6 w porów-

Tabela III
Ekspresja CD62L na powierzchni leukocytów oraz stężenia sL-selektyny w surowicy krwi.
 Leukocyte expression of CD62L and serum level of sL-selectin.

	Cukrzyca typu 2			grupa kontrolna
	mikroangiopatia [grupa A]	makroangiopatia [grupa B]	bez powikłań [grupa C]	
n	30	28	22	20
CD62L granulocyty obojętnochłonne [MCF]	22,72 ± 5,71	21,66 ± 8,24	27,36 ± 4,28	27,47 ± 6,17
istotność różnic	A vs B; NS A vs C; p <0,01 A vs kontr.; p <0,01	B vs C; p <0,01 B vs kontr.; p <0,05	C vs kontr.; NS	
CD62L monocyty [MCF]	18,53 ± 6,31	17,32 ± 10,11	22,61 ± 5,02	20,98 ± 8,52
istotność różnic	A vs B; NS A vs C; p <0,01 A vs kontr.; p <0,05	B vs C; p <0,01 B vs kontr.; p <0,05	C vs kontr.; NS	
sL-selektyna [ng/ml]	726,11 ± 116,42	747,26 ± 108,64	719,75 ± 74,76	955,91 ± 204,28
istotność różnic	A vs B; NS A vs C; NS A vs kontr.; p <0,001	B vs C; NS B vs kontr.; p <0,001	C vs kontr.; p <0,001	

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

Tabela IV
Analizowane parametry we krwi badanych grup chorych.
 Laboratory data of diabetic patients and control group.

	Cukrzyca typu 2			grupa kontrolna
	mikroangiopatia [grupa A]	makroangiopatia [grupa B]	bez powikłań [grupa C]	
n	30	28	22	20
IL-6 [pg/ml]	2,54 ± 1,39	2,14 ± 1,71	2,06 ± 1,26	1,14 ± 0,45
istotność różnic	A vs B; NS A vs C; NS A vs kontr.; p < 0,01	B vs C; NS B vs kontr.; p <0,01	C vs kontr.; p <0,01	
IL-6R(s) [ng/ml]	166,40 ± 41,17	155,01 ± 37,14	154,28 ± 38,87	149,82 ± 23,78
istotność różnic	A vs B; NS; A vs C; NS; A vs kontr.; NS	B vs C; NS B vs kontr.; NS	C vs kontr.; NS	
leptyna [ng/ml]	8,41 ± 5,44	8,32 ± 4,27	13,91 ± 4,57	6,51 ± 4,22
istotność różnic	A vs B; NS; A vs C; NS; A vs kontr.; NS	B vs C; NS B vs kontr.; NS	C vs kontr.; p < 0,05	
hsCRP [mg/l]	3,51 ± 3,47	4,37 ± 4,65	4,19 ± 3,7	1,26 ± 1,36
istotność różnic	A vs B; NS; A vs C; NS; A vs kontr.; p < 0,01	B vs C; NS B vs kontr.; p < 0,01	C vs kontr.; p < 0,001	
fibrynogen [g/l]	3,42 ± 0,61	3,32 ± 0,93	3,09 ± 0,76	2,80 ± 0,31
istotność różnic	A vs B; NS A vs C; NS A vs kontr.; p < 0,001	B vs C; NS; B vs kontr.; p <0,05	C vs kontr.; NS	

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

naniu do osób zdrowych (2,26 ± 1,47 vs 1,14 ± 0,45 pg/ml; p <0,05). Pomiedzy poszczególnymi grupami chorych na cukrzycę typu 2 stężenia IL-6 nie wykazywały istotnych statystycznie różnic.

Stwierdzone wartości stężeń rozpuszczonego receptora dla interleukiny-6 (IL-6Rs) nie różniły się istotnie statystycznie pomiedzy badanymi grupami chorych, a także w odniesieniu do osób zdrowych (tabela IV).

Stężenia hsCRP w surowicy krwi

We wszystkich grupach chorych na cukrzycę wykazano znamienne wyższe wartości stężenia hsCRP w porównaniu do osób

zdrowych. Nie stwierdzono istotnych różnic wartości stężeń hsCRP pomiedzy poszczególnymi grupami chorych na cukrzycę (tabela IV).

Stężenia leptyny w surowicy krwi

U chorych na cukrzycę obserwowano wyższe wartości stężenia leptyny w surowicy krwi w porównaniu z grupą kontrolną, ale różnica osiągnęła znamienność statystyczną tylko w grupie chorych bez powikłań naczyniowych (tabela IV).

Korelacje badanych parametrów

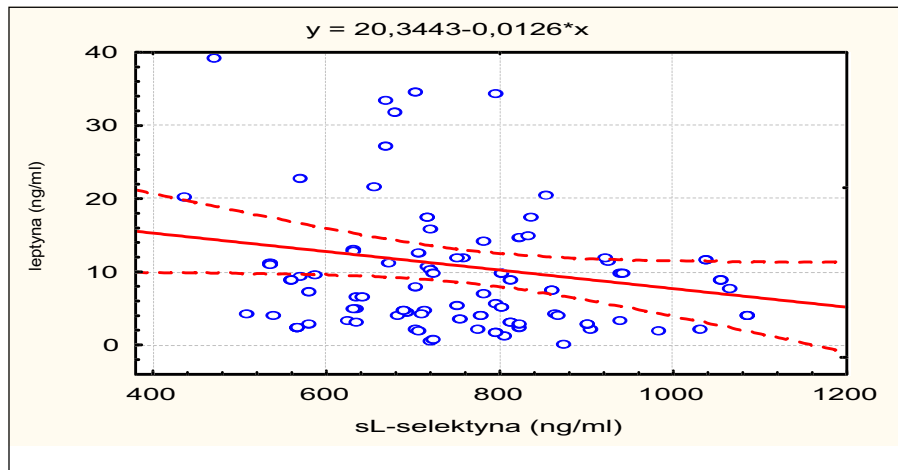
Chorych na cukrzycę charakteryzowała obecność ujemnej korelacji pomiedzy stężeniem sL-selektyny a:

1. stężeniem leptyny (rho= -0,19; p <0,05) (rycina 1);
 2. wartościami wskaźnika masy ciała BMI (rho= -0,43; p <0,001) (rycina 2);
 3. stężeniem IL-6 (rho= -0,20; p <0,05) (rycina 3);
 4. stężeniem hsCRP (rho= -0,23; p <0,05) (rycina 4);
- Pacjentów z makroangiopatią cukrzycową cechowała ujemna korelacja pomiedzy ekspresji CD62L na monocytach a stężeniem fibrynogenu (rho= -0,58; p <0,01) (rycina 5).

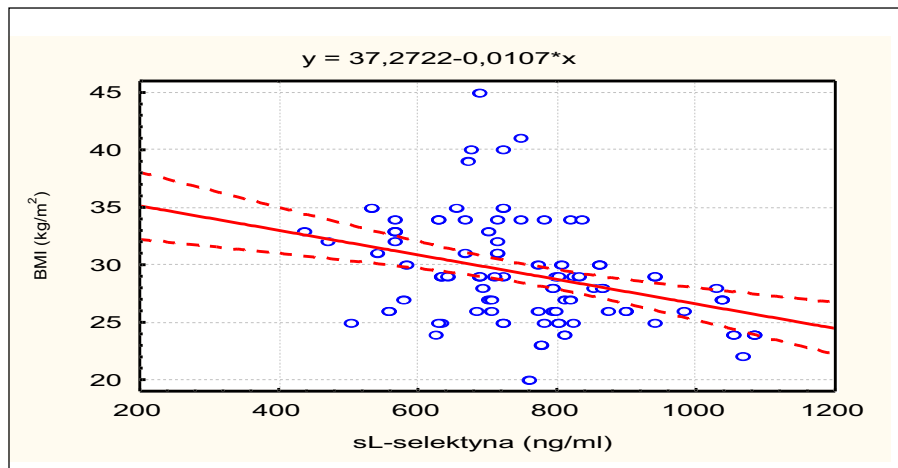
Dyskusja

Chorych na cukrzycę cechowały znamienne niższe wartości stężenia sL-selektyny w porównaniu z osobami zdrowymi. We wszystkich analizowanych grupach chorych stężenia sL-selektyny były porównywalne i znamienne niższe od wartości stwierdzanych w grupie kontrolnej. Przyczyny zmian stężenia sL-selektyny u chorych na cukrzycę pozostają jak do tej pory niewyjaśnione. W badaniach własnych stężenia sL-selektyny u chorych z powikłaniami naczyniowymi cukrzyca nie różniły się znamienne w porównaniu z chorymi wolnymi od tych powikłań. Tak więc jest mało prawdopodobne aby redukcja stężenia sL-selektyny była związana z rozwojem powikłań naczyniowych cukrzyca. Nie stwierdzono również związku pomiedzy stężeniem sL-selektyny w surowicy a ekspresją L-selektyny na powierzchni zarówno granulocytów obojętnochłonnych, jak i monocytów krwi obwodowej. Nie wykazano również związku pomiedzy stężeniem sL-selektyny a parametrami wyrównania metabolicznego choroby. Istniała natomiast słaba ale istotna statystycznie ujemna korelacja pomiedzy stężeniem sL-selektyny a stężeniem interleukiny-6, hsCRP, leptyny oraz wskaźnikiem masy ciała (BMI). Wskazuje to, że redukcja stężenia sL-selektyny może być przynajmniej częściowo odpowiedzią na aktywację zapalenia w cukrzycy oraz mieć związek z zawartością tkanki tłuszczowej. Jest możliwe że aktywacja leukocytów wiąże się z zahamowaniem syntezy L-selektyny, co wykazano wcześniej w przypadku limfocytów [10]. Niewątpliwie mechanizmy odpowiedzialne za redukcję stężenia sL-selektyny w cukrzycy wymagają dalszych badań.

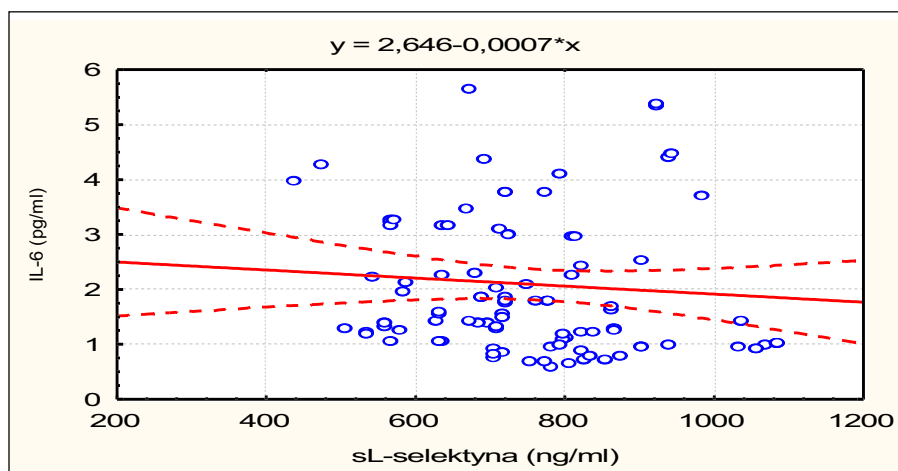
Do tej pory ocena stężenia sL-selektyny w cukrzycy była przedmiotem niewielu badań. Albertini i wsp. [2] wykazali w grupie chorych na cukrzycę typu 2 z miażdżycą naczyń wieńcowych obniżenie stężenia sL-selektyny w odniesieniu do osób zdrowych, co pozostaje w zgodzie z własnymi obserwacjami. Także u pacjentów bez cukrzyca z chorobą niedokrwienną serca potwierdzono redukcję stężenia sL-selektyny [8]. Co więcej, we własnych badaniach zmniejszenie stężenia sL-selektyny dotyczyło nie tylko grupy makroangiopatii, ale również pacjentów z mikroangiopatią oraz chorych bez rozwiniętych powikłań naczyniowych. Należy podkreślić, że własne badania objęły, jak do tej pory, największą grupę chorych na cukrzycę typu 2, u których dokonano oceny stężenia sL-selektyny. Z kolei MacKinnon i wsp. [10] stwierdzili w grupie chorych na cukrzycę (obu typów) powikłaną retinopatią



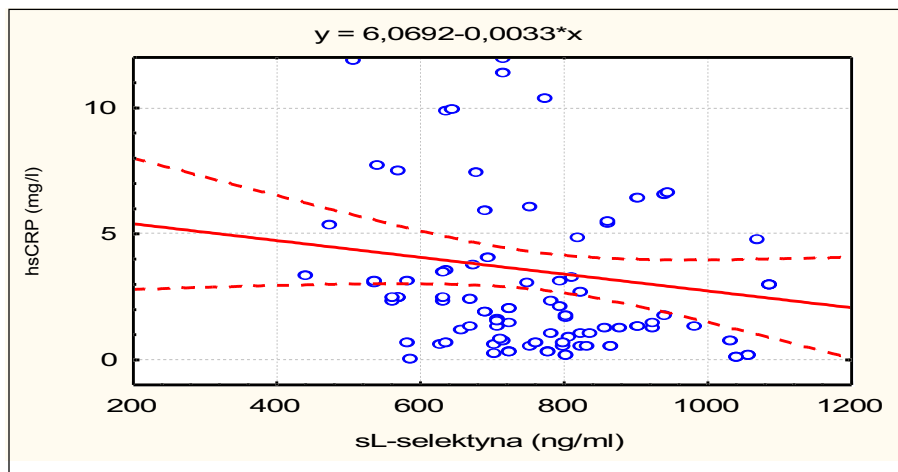
Rycina 1
Korelacja stężeń sL-selektyny i leptyny w surowicy krwi chorych na cukrzycę typu 2.
Correlation between serum level of sL-selectin and leptin in diabetic group.



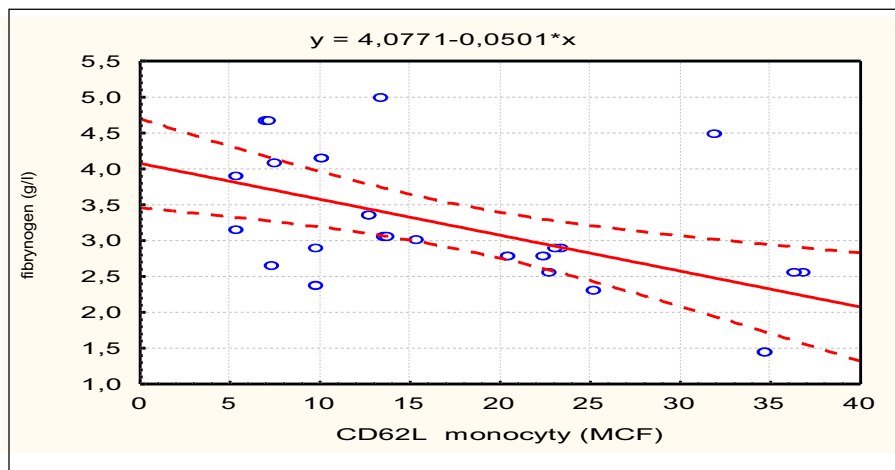
Rycina 2
Korelacja pomiędzy stężeniem sL-selektyny a BMI u chorych na cukrzycę typu 2.
Correlation between sL-selectin and BMI in diabetic group.



Rycina 3
Korelacja stężeń sL-selektyny i interleukiny-6 w surowicy krwi chorych na cukrzycę typu 2.
Correlation between serum level of sL-selectin and IL-6 in diabetic group.



Rycina 4
Korelacja stężeń sL-selektyny i hsCRP w surowicy krwi chorych na cukrzycę typu 2.
Correlation between serum level of sL-selectin and hsCRP in diabetic group.



Rycina 5
Korelacja ekspresji CD62L na monocytach i stężenia fibrynogenu w grupie makroangiopatii.
Correlation between monocyte expression of CD62L and plasma level of fibrinogen.

wzrost stężenia sL-selektyny. Kiedy uwzględniono typ cukrzycy, podwyższone stężenia sL-selektyny odnosiły się jedynie do pacjentów z cukrzycą typu 1. U chorych z cukrzycą typu 2 stężenia sL-selektyny były porównywalne z wartościami stwierdzanymi w grupie osób zdrowych. Jest niewykluczone, że w obu typach cukrzycy odmienne mechanizmy wywierają wpływ na stężenie sL-selektyny, co zadecydowało o uzyskaniu rozbieżnych wyników.

Niezależnie od przyczyny, zmniejszenie stężenia sL-selektyny w cukrzycy typu 2 może mieć istotny wpływ na rozwój przewlekłych powikłań choroby. Z uwagi na hamujący wpływ sL-selektyny na zjawisko adhezji leukocytów do śródbłonna [11], obniżenie stężenia sL-selektyny w cukrzycy może sprzyjać adhezji leukocytów do ściany naczyniowej i w ten sposób przyczynić się do rozwoju zmian naczyniowych.

Ekspresja L-selektyny na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych oraz monocytów krwi obwodowej w grupie chorych z powikłaniami naczyniowymi (makro- i mikroangiopatią) była znacząco niższa w porównaniu z osobami zdrowymi. Redukcja ekspresji L-selektyny na powierzchni leukocytów wydaje się mieć związek z obecnością powikłań naczyniowych. Świadczy o tym znacząco wyższa ekspresja L-selektyny na leukocytach w grupie bez powikłań naczyniowych, a także brak różnic w ekspresji L-selektyny pomiędzy chorymi bez angiopatii cukrzycowej a osobami zdrowymi.

MacKinnon i wsp. [10] w grupie pacjentów z retinopatią, obejmującą chorych na cukrzycę typu 1 i typu 2, stwierdzili zmniej-

szenie ekspresji CD62L (L-selektyny) na powierzchni limfocytów krwi obwodowej w porównaniu z osobami zdrowymi. Jednocześnie wykazali, że limfocyty pochodzące od chorych z retinopatią ulegają wzmożonej adhezji do śródbłonna naczyń w warunkach *in vitro*. Zmniejszenie ekspresji L-selektyny autorzy pracy wiążą ze stanem aktywacji limfocytów i wzrostem adhezji do naczyń siatkówki. Własne obserwacje w grupie chorych z mikroangiopatią są zbieżne z tymi wynikami. Wprawdzie ocena nie dotyczyła limfocytów, to jednak podobnie stwierdzono niższą ekspresję L-selektyny na powierzchni granulocytów oraz monocytów krwi obwodowej. Można sądzić, że obniżona ekspresja L-selektyny na leukocytach u chorych z powikłaniami o typie mikroangiopatii jest skutkiem aktywacji komórek odpowiedzi zapalnej.

Fusman i wsp. [5] wykazali, że leukocyty pochodzące od chorych na cukrzycę charakteryzuje w warunkach *in vitro* wyższy stopień adhezji i agregacji w porównaniu z osobami zdrowymi. Jednocześnie zaobserwowali ujemną korelację pomiędzy ekspresją L-selektyny na powierzchni leukocytów a stopniem adhezji i agregacji. Redukcja ekspresji L-selektyny jest naturalnym zjawiskiem obserwowanym po aktywacji leukocytów. Tak więc obserwowana redukcja ekspresji L-selektyny na leukocytach może być związana z aktywacją mechanizmów zapalnych u badanych chorych. Potwierdzeniem tego faktu jest wykazana w grupie makroangiopatii ujemna korelacja pomiędzy ekspresją L-selektyny na granulocytach i mo-

nocytach a stężeniem fibrynogenu (markrem stanu zapalnego). Nawiązując do wspomnianej wcześniej pracy można ponadto wnioskować, że zmniejszenie ekspresji L-selektyny na leukocytach u chorych z wykładnikami powikłań naczyniowych może odzwierciedlać wzrost adhezji tych komórek do śródbłonna naczyń.

Wnioski

1. Chorych na cukrzycę typu 2 charakteryzuje spadek stężenia sL-selektyny w surowicy krwi.

2. Obecność makro- oraz mikroangiopatii cukrzycowej wiąże się z obniżoną ekspresją L-selektyny na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych oraz monocytów krwi obwodowej.

3. Redukcja stężenia sL-selektyny w surowicy oraz ekspresji na leukocytach w cukrzycy typu 2 wykazuje związek ze wzrostem stężenia markerów zapalenia u tych chorych.

Piśmiennictwo

1. **Adamis A.P.**: Is diabetic retinopathy an inflammatory disease? *Br. J. Ophthalmol.* 2002, 86, 363.
2. **Albertini J.P., Valensi P., Lormeau B. et al.**: Soluble L-selectin level is a marker for coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 1999, 22, 2044.
3. **Barouch F.C., Miyamoto K., Allport J.R.**: Integrin-mediated neutrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000, 41, 1153.
4. **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.
5. **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.
6. **Galkina E., Ley K.**: Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006, 17, 368.
7. **Gołaż J.**: Krążenie limfocytów. *Immunologia*. Jakóbsiak M. (red.) PWN Warszawa 2005, 103.
8. **Haught W.H., Mansour M., Rothlein R. et al.**: Alterations in circulating intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin: further evidence for chronic inflammation in ischemic heart disease. *Am. Heart J.* 1996, 132, 1.
9. **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.
10. **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.
11. **Tu L., Poe J.C., Kadono T. et al.**: A functional role for circulating mouse L-selectin in regulating leukocyte/endothelial cell interactions *in vivo*. *J. Immunol.* 2002, 169, 2034.