

Lek. med. Grażyna Adamcewicz

Podyplomowe Niestacjonarne Studium Metodologii Badań Naukowych

Czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α), monocytarny chemotaktyczny czynnik białkowy 1 (MCP-1), czynnik stymulujący wzrost czerniaka α (GRO- α), metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (MMP-9) w surowicy chorych z polineuropatiami cukrzycową i alkoholową

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. Grażyna Michałowska-Wender

**Praca wykonana w Pracowni Neurogenetyki Klinicznej Katedry Neurologii
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

Poznań 2011

**Praca przedstawiona Radzie Wydziału Lekarskiego I
Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
celem uzyskania stopnia doktora nauk medycznych**

**Wyrażam szczególne podziękowania Pani dr hab. Grażynie
Michałowskiej-Wender za wszechstronną pomoc, zaangażowanie,
cenne wskazówki i rady przy opracowywaniu niniejszej pracy.**

SPIS TREŚCI

1.	WSTĘP	7
1.1.	Epidemiologia neuropatii cukrzycowej	7
1.2.	Obraz kliniczny neuropatii cukrzycowej.....	7
1.3.	Badania diagnostyczne w neuropatii cukrzycowej.....	9
1.3.1.	Badania elektrofizjologiczne.....	9
1.3.2.	Badania histopatologiczne	10
1.4.	Epidemiologia neuropatii w przebiegu zespołu zależności alkoholowej.....	10
1.5.	Obraz kliniczny neuropatii alkoholowej.....	10
1.6.	Badania diagnostyczne w neuropatii alkoholowej.....	12
1.6.1.	Badania elektrofizjologiczne.....	12
1.6.2.	Badania histopatologiczne	14
1.7.	Badania immunologiczne w polineuropatii cukrzycowej i alkoholowej.....	14
2.	CEL PRACY	17
3.	MATERIAŁ I METODY	18
3.1.	Materiał.....	18
3.1.1.	Grupy badane	18
3.1.2.	Grupa kontrolna	19
3.2.	Metody	19
3.2.1.	Przygotowanie krwi do badań.....	19
3.2.2.	Oznaczanie stężenia TNF- α w surowicy krwi.....	20
3.2.3.	Oznaczanie stężenia MCP-1 w surowicy krwi.....	21
3.2.4.	Oznaczanie stężenia GRO- α w surowicy krwi.....	22
3.2.5.	Oznaczanie stężenia MMP-9 w surowicy krwi.....	23
3.2.6.	Oznaczanie aktywności transketolazy wg Bayoumi R.A.& Rosalki S.B. ...	24
3.2.6.1.	Oznaczanie hemoglobiny	26
3.3.	Statystyczna ocena wyników	27
4.	WYNIKI	28
5.	OMÓWIENIE	33
6.	WNIOSKI.....	39
7.	PIŚMIENNICTWO	40
8.	STRESZCZENIE.....	48
9.	SUMMARY	50

SPIS SKRÓTÓW UŻYTYCH W PRACY

- AGE /advanced glycation endproducts/ – końcowe produkty zaawansowanej glikacji
- ALDH2 /aldehyde dehydrogenase/ – dehydrogenaza aldehydowa
- BBB /blood brain barrier/ – bariera krew–mózg
- CD14 – receptor powierzchniowy makrofagów
- Da – Dalton jednostka masy atomowej
- ELISA /enzyme-linked immunosorbent assay/ – immunoenzymatyczna metoda ilościowego oznaczania cząsteczek w płynach ustrojowych
- EMG /electromyography/ – elektromiografia
- ENG /electroneurography/ – elektroneurografia
- G-B – zespół Guillain–Barrea
- [GDH](#) /glutamate dehydrogenase/ – [dehydrogenaza glutaminianowa](#)
- GRO- α /CXCL1; growth-related oncogene-alpha/ – związany ze wzrostem onkogen alfa; czynnik stymulujący wzrost czerniaka alfa
- IgG – immunoglobulina G
- IL-8 /interleukin 8/ – interleukina 8
- LPS – liposacharyd
- MCP-1 /CCL2; monocyte chemoattractant protein 1/ – monocytarny chemotaktyczny czynnik białkowy 1; białko chemotaktyczne dla monocytów
- MMP-9 /matrix metalloproteinase 9/ – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9
- NADH /nicotinamide adenine dinucleotide/ – dinukleotyd nikotynamidoadeninowy
- NAP-2 /neutrophil activating peptide 2/ – peptyd pobudzający neutrofile 2
- NF κ B /nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells/ – jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B
- NGF /nerve growth factor/ – czynnik wzrostu nerwów
- NTKZ /normalized transketolase activity ratio/ – znormalizowana aktywność transketolazy w erytrocytach
- OBWUN – obwodowy układ nerwowy
- OUN – ośrodkowy układ nerwowy
- p.m.rdz. – płyn mózgowo–rdzeniowy
- RANTES /CCL5; regulated on activation normal T-cell expressed and secreted/ – [chemokina](#) β syntetyzowana przez prawidłowe [limfocyty T](#)

RAGE /receptor advanced glycation endproducts/ – receptor produktów zaawansowanej glikacji

RL /residual latency/ – wskaźnik opóźnienia

RZS – reumatoidalne zapalenie stawów

SLA – stwardnienie boczne zanikowe

SR – stwardnienie rozsiane

TIM /triosephosphate isomerase/ – izomeraza fosfotriozowa

TK – transketolaza

TNF- α /tumor necrosis factor alpha/ – czynnik martwicy nowotworów alfa

TPI /triose phosphate isomerase deficiency/ – niedobór izomerazy fosfotriozowej

TPP /thiamine pyrophosphate/ – pirofosforan tiaminy

1. WSTĘP

Neuropatie obwodowe – termin ten oznacza zespół chorobowy powstały w wyniku zmian w nerwach obwodowych pod wpływem różnorodnych czynników etiologicznych. Do najczęstszych postaci neuropatii metabolicznych w populacji polskiej należą neuropatie cukrzycowa i alkoholowa [48, 71].

1.1. Epidemiologia neuropatii cukrzycowej

Neuropatia cukrzycowa jest opisowym terminem choroby manifestującej się klinicznie lub podklinicznie, występującej w przebiegu cukrzycy. Obok nefropatii i retinopatii należy ona do przewlekłych powikłań cukrzycy [68]. W Polsce ok. 1,5% populacji cierpi na cukrzycę co stanowi 500 tys. do 600 tys. osób. Przeważającą większość stanowią ludzie powyżej 60 roku życia. Literaturowe dane dotyczące częstości występowania neuropatii u chorych z cukrzycą różnią się znacznie od siebie. Powodem tego jest stosowanie odmiennych metod badania, kryteriów diagnostycznych oraz występowanie bezobjawowego stadium choroby. Według różnych autorów podawane są wartości wahające się od poniżej 10% do powyżej 90% [84]. W Wielkiej Brytanii wykazano niższy niż w Polsce procent pacjentów z neuropatią u chorych z cukrzycą. Ponadto przedstawiono korelację wzrostu liczby neuropatii z wiekiem chorego oraz czasem trwania cukrzycy. W kluczowym badaniu przeprowadzonym na 4400 chorych na cukrzycę Pirart stwierdził, że w momencie rozpoznania cukrzycy objawy neuropatii rozpoznano u 7,5% chorych i zwiększały się do 25% po 25 latach obserwacji. Nowsze badanie populacyjne wykazało obecność neuropatii u 54% chorych na cukrzycę typu I i u 45% chorych na cukrzycę typu II [51]. Ogólnie uznaje się, że rozpowszechnienie neuropatii wynosi 10% w momencie rozpoznania cukrzycy i wzrasta do ponad 50% u pacjentów z cukrzycą rozpoznaną od ponad 5 lat [10].

1.2. Obraz kliniczny neuropatii cukrzycowej

Powikłania neurologiczne występują z równą częstością w cukrzycy typu I i II, a także różnych typach cukrzycy wtórnej. Objawy neuropatii wynikają z zajęcia somatycznego i autonomicznego obwodowego układu nerwowego [11].

Najpoważniejszym powikłaniem neuropatii włókien somatycznych jest stopa

cukrzycowa [77, 82]. Neuropatia cukrzycowa obejmuje kilka zespołów klinicznych od utajonych do jawnych klinicznie w zależności od typu zajętych włókien nerwowych. Na konferencji w San Antonio w roku 1988 przyjęto następujący podział zaburzeń neurologicznych w cukrzycy, który jest nadal aktualny [84].

1. neuropatia utajona, rozpoznawana na podstawie nieprawidłowości w badaniach elektrodiagnostycznych
2. neuropatia uogólniona objawowa z symetrycznym zajęciem nerwów czuciowych i ruchowych w dystalnych częściach kończyn oraz układu autonomicznego
3. neuropatie z ucisku

Na podstawie przebiegu klinicznego wyróżnia się dwie postaci neuropatii:

- stopniowo postępującą wraz z czasem trwania cukrzycy
- całkowicie ustępującą

Do pierwszej z nich należą neuropatia czuciowa i autonomiczna, do drugiej radikulopatia, ostre neuropatie bólowe i mononeuropatia [84].

Najczęstszą postacią neuropatii cukrzycowej jest dystalna symetryczna polineuropatia /20–30%/ wg Nokleby i wsp. [10, 12]. Może ona mieć postać czuciową i ruchową oraz obejmować cienkie i/lub grube włókna nerwowe. Dysfunkcja drobnych włókien nerwowych występuje wcześniej i często przebiega bez objawów przedmiotowych i elektrofizjologicznych cech uszkodzenia nerwów [85]. W obrazie klinicznym dominują dolegliwości i objawy czuciowe, obecne są również zaburzenia funkcji autonomicznych i objawy ruchowe. Wyróżnia się dwie postaci: bezbólową z parestezjami, towarzyszącą niedoczulicą i z zaburzeniami czucia układającymi się charakterystycznie w postaci skarpetek i rękawiczek. W drugiej postaci bólowej dominują parestezje i ból, głównie w nocy, zmniejszający się po wstaniu i podczas chodzenia. W badaniu neurologicznym w obu postaciach neuropatii stwierdza się osłabienie czucia dotyku, wibracji i ułożenia, osłabienie lub brak odruchów głębokich początkowo w kończynach dolnych a potem także w górnych. Zdecydowanie później występują zaburzenia ruchowe w postaci osłabienia i zaniku mięśni w dystalnych odcinkach kończyn. Stwierdza się również objawy ze strony układu pokarmowego, moczowo–płciowego i sercowo–naczyniowego.

1.3. Badania diagnostyczne w neuropatii cukrzycowej

Na konferencji w San Antonio w 1988 r. oraz konferencji American Academy of Neurology w 1992 r. ustalono założenia dotyczące klasyfikacji neuropatii cukrzycowej na podstawie oceny jednego parametru z każdej z następujących kategorii: objawy podmiotowe, badanie neurologiczne, ilościowe badanie czucia, badanie przewodnictwa nerwowego, badanie czynności układu autonomicznego [88]. W ustaleniu rozpoznania pomocne są poza wywiadem i badaniem neurologicznym metody instrumentalne [63, 64].

1.3.1. Badania elektrofizjologiczne

Badania elektrodiagnostyczne mają znaczenie w ustalaniu zajętych włókien nerwowych oraz charakteru procesu. Badanie parametrów przewodzenia nerwowego może jednoznacznie wskazywać na aksonalny bądź demielinizacyjny charakter zaburzeń [34, 43]. Obraz kliniczny neuropatii zależy od rodzaju zajętych włókien nerwowych. Rutynowe badania elektrofizjologiczne pozwalają określić czynność dużych włókien. Najczulszym wskaźnikiem zmian podklinicznych w neuropatii cukrzycowej jest zwolnienie przewodzenia w nerwach czuciowych i ruchowych. Jednak kliniczne nasilenie neuropatii wiąże się z obniżeniem amplitudy odpowiedzi czuciowych i ruchowych będącym konsekwencją ubytku aksonów spowodowanego przez zmiany w drobnych naczyniach endoneurium. Badania eksperymentalne wskazują, że przyczyną zmian prędkości przewodzenia w nerwach obwodowych mogą być zaburzenia gry naczyniowej [43]. Elektroneurografia (ENG) ocenia przede wszystkim czynność włókien mielinowych o dużej średnicy, w przypadkach zajęcia włókien cienkich nawet przy ewidentnych objawach klinicznych, parametry elektrofizjologiczne mogą pozostać niezmiennione. Zmiany w przewodzeniu spowodowane są niedotlenieniem na tle hiperglikemii, zaburzeniami funkcji kanałów jonowych i wyrażają się nieprawidłowościami w powstawaniu i przewodzeniu potencjałów czynnościowych. W neuropatii cukrzycowej jako pierwsze uszkodzeniu ulegają włókna czuciowe przy czym dominującą nieprawidłowością jest ubytek aksonów objawiający się w badaniu elektrofizjologicznym obniżoną amplitudą potencjału (lub brakiem możliwości jego rejestracji) przy prawidłowej lub nieznacznie zwolnionej szybkości przewodzenia. Następnie zmiany typu aksonalnego występują

we włóknach ruchowych. W elektromiografii (EMG) obserwuje się obraz uszkodzenia neurogennego głównie w mięśniach odsiebnych. Standardowe badania elektrofizjologiczne nie pozwalają na wykrycie zaburzeń czynności drobnych włókien nerwowych. Istnieje konieczność oceny parametrów pobudliwości czuciowej, nerwowonaczyniowej i autonomicznej [84]. Stosując rutynowe badanie przewodzenia zwykle nie udaje się wczesne wykrycie neuropatii. Niektórzy autorzy wskazują na użyteczność dodatkowych parametrów elektrofizjologicznych takich jak: RL–residual latency, TLI–terminal latency index, MFR–modified F ratio, które odzwierciedlają dystalne zwolnienie przewodzenia [5].

1.3.2. Badania histopatologiczne

Badanie histologiczne nerwów obwodowych w cukrzycy wykazuje zmiany we włóknach nerwowych – aksonopatię oraz uszkodzenie osłonki mielinowej. Aksonopatia występuje częściej w cienkich włóknach bezmielinowych. Na przekroju nerwu stwierdza się zmniejszenie liczby i rozmiarów aksonów oraz wzrost gęstości organelli aksoplazmatycznych. Demielinizacja może obejmować włókna grube oraz cienkie. Stwierdza się obrzęk komórek Schwanna, obecność struktur cebulowatych. W przypadku neuropatii cukrzycowej z objawami autonomicznymi badanie histologiczne wykazuje ubytek zarówno włókien zmielinizowanych jak i bezmielinowych [71].

1.4. Epidemiologia neuropatii w przebiegu zespołu zależności alkoholowej.

Neuropatia alkoholowa jest jedną z najczęstszych form polineuropatii, drugą co do częstości po polineuropatii cukrzycowej. Jej rozpowszechnienie waha się od 12,5% do 48,6% u pacjentów z zespołem zależności alkoholowej, w zależności od zastosowanych kryteriów diagnostycznych i badanej populacji [40].

1.5. Obraz kliniczny neuropatii alkoholowej

Obraz kliniczny neuropatii alkoholowej bez niedoboru tiaminy uznany jest za charakterystyczny dla czystej postaci neuropatii alkoholowej i obejmuje wolno postępujące objawy czuciowe. Dominującą cechą patologiczną jest ubytek aksonów

cienkich włókien.

W neuropatii alkoholowej z towarzyszącym niedoborem tiaminy obraz kliniczno–patologiczny wykazuje dużą zmienność. Neuropatia alkoholowa charakteryzuje się występowaniem symetrycznej polineuropatii czuciowej lub ruchowej z przewagą w kończynach dolnych. Ma to związek ze wzorcem aksonopatii dystalnej typu „dying back” – charakteryzujących się występowaniem początkowych zmian w najbardziej obwodowej części włókna i szerzącej się w kierunku proksymalnym [60]. W obrazie klinicznym można wyróżnić:

1. postać przedkliniczną bez dolegliwości, wykrywaną w badaniu neurologicznym

- wyszczuplone mięśnie kończyn dolnych
- osłabienie lub brak odruchów skokowych
- brak odruchów podeszwowych
- niestałe zaburzenia czucia bólu i dotyku na stopach i podudziach
- zwolnienie szybkości przewodzenia czuciowego i ruchowego w badaniu elektrofizjologicznym

2. postać objawową

- objawy czuciowe – parestezje, osłabienie i ból kończyn dolnych, następnie kończyn górnych, mogą być asymetryczne. U 25% pacjentów występuje postać bólowa (ang. burning feelings, burning feet, painful extremities)
- objawy ruchowe
 - a/ opadanie stóp i rąk
 - b/ przykurcze szybko narastające w stawach łokciowych i kolanowych
 - c/ bolesność mięśni na dotyk
 - d/ w kończynach górnych zachowane a nawet wygórowane odruchy głębokie (w postaci z dominującym bólem)
- objawy autonomiczne
 - a/ spadki ciśnienia tętniczego (zajęcie włókien współczulnych przykręgowych)
 - b/ nadmierna potliwość rąk i stóp
- nerwy czaszkowe zaoszczędzone
 - a/ zaburzenia mowy – głos ochrypły –zajęty nerw błędny
- inne objawy
 - a/ skórne: sucha, szara, przebarwienia na twarzy, czole, acne vulgaris

- b/ pogrubienie i przerost skóry nosa
- c/ niedokrwistość (zaburzenia wchłaniania kwasu foliowego, krwawienie z przewodu pokarmowego)
- d/ uszkodzenie wątroby
 - 50% – stłuszczenie, powiększenie, nieprawidłowe wyniki testów wątrobowych
 - 15% – encefalopatia wątrobowa

1.6. Badania diagnostyczne w neuropatii alkoholowej

Rozpoznanie neuropatii alkoholowej ustala się na podstawie kryteriów Behse Buchtala:

- wykluczenie niedożywienia jako jedyne go powodu neuropatii
- stwierdzenie utraty wagi ciała
- marskość wątroby
- ustalenie poziomu witaminy B

W przeciwieństwie do neuropatii cukrzycowej objawy autonomiczne są mniej wyrażone. Stwierdza się też zajęcie nerwów współczulnych i częściej przywspółczulnych [60]. Zachodzi pytanie, czy dysfunkcja autonomiczna stanowi kolejny objaw zajęcia cienkich włókien, czy wynika z zaburzeń ośrodkowych.

1.6.1. Badania elektrofizjologiczne

Do potwierdzenia klinicznego rozpoznania neuropatii używa się badań elektrofizjologicznych mięśni i nerwów [9, 63, 64]. Pozwalają one na obiektywną ocenę rozległości uszkodzenia mięśni i nerwów, ustalenie poziomu uszkodzenia obwodowego układu nerwowego (OBWUN), dostarczają orientacyjnych danych o charakterze zmian histologicznych, jako badania powtarzalne stanowią wskaźnik prognostyczny z oceną dynamiki procesu. Badanie EMG wykazuje cechy odnerwienia mięśni, proces reinerwacji, różnicuje uszkodzenie ostre i przewlekłe. W ostrym uszkodzeniu aksonu występuje patologiczna czynność spoczynkowa pod postacią fibrylacji i dodatnich fal ostrych. W uszkodzeniu przewlekłym obserwuje się neurogeną przebudowę jednostek ruchowych, której wyrazem są zesynchronizowane potencjały wielofazowe. Powyższe zmiany szczególnie wyraźnie występują w neuropatii aksonalnej. Podstawowe

znaczenie w diagnostyce neuropatii przypada badaniu ENG, podczas którego oceniana jest szybkość przewodzenia nerwowego, latencja końcowa, amplituda potencjału odpowiedzi oraz parametry pozwalające ocenić proksymalny odcinek nerwu tj. fala F, odruch H, potencjały somatosensoryczne. W uszkodzeniu aksonalnym charakterystyczne jest obniżenie amplitudy potencjału jako wyraz ubytku włókien, przy prawidłowej latencji końcowej oraz nieznacznie zwolnionej lub prawidłowej szybkości przewodzenia – zachowana część grubych włókien szybkoprzewodzących lub uszkodzenie wybiórczo dotyczy włókien cienkich wolnoprzewodzących. W uszkodzeniu demielinizacyjnym występuje wyraźne zwolnienie szybkości przewodzenia – nawet do kilku m/s, wydłużenie latencji końcowej, a spotykane obniżenie amplitudy potencjału wynika z dyspersji czasowej impulsu [48].

W neuropatii alkoholowej badanie elektrofizjologiczne wykazuje cechy uszkodzenia cienkich włókien ruchowych i grubych skórnych włókien czuciowych. Wczesne objawy wyrażają się obniżeniem amplitudy odpowiedzi czuciowych i ruchowych, szybkość przewodzenia jest prawidłowa lub nieznacznie zwolniona. Dalsze zwolnienie szybkości przewodzenia występuje w miarę zmniejszania się amplitudy odpowiedzi i jest oznaką wtórnego do aksonalnego uszkodzenia demielinizacyjnego [9, 60].

W elektromiografii stwierdza się cechy uszkodzenia o charakterze neurogennym. Zmiany w badaniu EMG i ENG są bardziej nasilone w kończynach dolnych. Pierwotny typ uszkodzenia w neuropatii alkoholowej nie jest do końca wyjaśniony. Wczesne zmiany w ENG z dominującym obniżeniem amplitudy potencjałów odpowiedzi czuciowych i ruchowych sugerują uszkodzenie pierwotnie aksonalne [3, 39].

Duża wartość badań elektrofizjologicznych ogranicza przydatność diagnostyczną biopsji nerwów [17, 45]. W większości neuropatii zmiany mają charakter nieswoisty i niecharakterystyczny. Polegają one na odcinkowej demielinizacji i zwyrodnieniu aksonalnym. Postacie mieszane są wynikiem wtórnej demielinizacji do pierwotnego zwyrodnienia aksonalnego lub mogą stanowić pierwotny proces demielinizacyjny z postępującym uszkodzeniem aksonu.

Zarówno neuropatia cukrzycowa jak i alkoholowa są morfologicznie heterogenne z różnym stopniem uszkodzenia aksonu lub mieliny. Patogeneza tych zmian jest złożona i nie jest jasne dlaczego u niektórych pacjentów uszkodzenie jest ograniczone do zwyrodnienia aksonalnego podczas gdy u innych rozwija się neuropatia

demielinizacyjna.

1.6.2. Badania histopatologiczne

Badanie histologiczne nerwów obwodowych w neuropatii alkoholowej wykazuje aksonalne zwyrodnienie włókien nerwowych, a w zaawansowanych przypadkach korzeni przednich i tylnych, nasilone w dystalnych odcinkach nerwów z towarzyszącą demielinizacją. W komórkach ruchowych rogów przednich obecna jest reakcja aksonalna.

1.7. Badania immunologiczne w polineuropatii cukrzycowej i alkoholowej

Wśród dużej grupy chemokin na uwagę zasługuje nadrodzina cząsteczek TNF. Czynniki martwicy nowotworów alfa (TNF- α) jest najważniejszą cytokiną prozapalną i cytotoksyczną [26, 36]. Jest ona jedną z głównych cytokin wykazujących bardzo wszechstronny wpływ na układ odpornościowy poprzez aktywację, różnicowanie i proliferację szeregu komórek (limfocyty B, T, fibroblasty) oraz produkcję białek ostrej fazy. Cechuje się licznymi właściwościami przeciwnowotworowymi. TNF może brać udział w patomechanizmie wstrząsu septycznego, odrzucaniu przeszczepów oraz chorób autoimmunizacyjnych. TNF występuje w organizmie w dwóch postaciach, jako prekursor – białko transbłonowe oraz forma rozpuszczalna odpowiedzialna za większość funkcji biologicznych. Forma przezbłonowa jest aktywna w procesach apoptozy, proliferacji komórek, aktywacji limfocytów B, zapaleniach. Źródłem TNF- α są komórki żerne (makrofagi, monocyty), a bodźcem do wytwarzania jest liposacharyd (LPS) ścian komórki. LPS związany jest poprzez powierzchniowy receptor CD14, który następnie tworzy kompleks z receptorem TLR4. Zidentyfikowano dwa typy receptorów TNF: TNFR1 o masie cząsteczkowej 55 oraz TNFR2 o masie cząsteczkowej 75 kDa różniące się stopniem glikozydacji oraz powinowactwem do TNF przez co mogą przekazywać komórce odmienne sygnały.

Monocytny chemotaktyczny czynnik białkowy 1 (MCP-1) należy do rodziny chemotaktycznych cytokin uwalnianych z leukocytów do miejsc zmienionych procesem zapalnym [26, 36, 52]. MCP-1 jest wydzielany przez leukocyty, fibroblasty, komórki nabłonka, komórki mięśni gładkich, chondrocyty, melanocyty. Jest jedną z kluczowych prozapalnych molekuł, których ekspresja narasta w wyniku pobudzenia przez receptor

produktów zaawansowanej glikacji (RAGE). Feng i wsp. omówili zagadnienie ekspresji MCP-1 i RAGE na komórkach śródbłonna u chorych na cukrzycę i osób zdrowych. Poprzez RAGE produkty glikacji zwiększają ekspresję MCP-1, czego konsekwencją jest napływ monocytów do ściany naczynia, przekształcenie w komórki piankowe i tworzenie blaszki miażdżycowej. Uzyskane dane świadczą o zwiększonej aktywacji (poprzez RAGE) czynników zapalnych pod wpływem hiperglikemii w ścianie naczyń chorych na cukrzycę typu II.

Czynnik stymulujący wzrost czerniaka alfa (GRO- α) pobudza wzrost melanocytów. Należy do chemokin klasy alfa inaczej określanej CXCL1 tzn. mającej interwencyjny aminokwas pomiędzy pierwszymi dwiema z czterech cystein w łańcuchu aminokwasów [26, 36, 53]. Generalnie chemokiny tej klasy preferencyjnie przyciągają i aktywują krwinki białe obojętnochłonne, podczas gdy klasy beta są chemotaktyczne dla monocytów i komórek T. Badania wskazują na rolę GRO- α w stymulacji wzrostu linii komórkowej czerniaka oraz udział w ostrych reakcjach zapalnych. L'Heureux i wsp. zwrócili uwagę na to, że jakkolwiek GRO- α i interleukina 8 (IL-8) są zbliżone do podobnych ale nieidentycznych receptorów, to mechanizm rządzący ich transdukcją sygnału jest bardzo podobny. Interesująca kwestia dotycząca biologicznej aktywności GRO- α była podkreślana przez Wang i wsp.. Autorzy wykazali w eksperymentalnych badaniach, że aktywacja receptorów 1 i 2 proteinaz, wpływa na uwalnianie GRO- α z astrocytów szczura chroniąc komórki nerwowe przed apoptozą.

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) są rodziną zależnych od cynku endoproteinaz kluczowych dla utrzymania stałości mikrośrodowiska zewnątrzkomórkowego. ProMMP-9 są wydzielane przez monocyty, makrofagi, fibroblasty, chondrocyty, komórki śródbłonna oraz różnorodne komórki guzowe. MMP-9 jest związana z zapaleniem, przebudową tkankową, gojeniem ran, mobilizacją czynników wzrostu ograniczonych macierzą oraz obróbką cytokin. Jej ekspresja koreluje z rozrostem tkanki łącznej (desmoplasia), który towarzyszy rakowi trzustki, przerzutami do węzłów chłonnych w przypadku raka piersi. Może być podwyższona w ślinie pacjentów z chorobami dziąseł i przyzębia. MMP-9 odgrywa rolę w procesach patologicznych w ośrodkowym (OUN) i OBWUN poprzez udział w uszkodzeniu bariery krew-mózg (BBB), zwiększa napływ limfocytów do OUN oraz bierze udział w uszkodzeniu osłonek mielinowych [69]. MMP-9 jest podniesiony w surowicy u pacjentów ze stwardnieniem bocznym zanikowym (SLA), jak i w reumatoidalnym zapaleniu stawów (RZS) [20]. Również poziomy MMP-9 w płynie

mózgowo–rdzeniowym (p.m.rdz.) i surowicy reprezentują potencjalne markery zastępcze aktywności chorobowej wskazując na trwające zapalenie u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (SR) [23]. Wcześniej wspomniani autorzy wskazują, że aktywne MMP–9 w surowicy może wywodzić się nie tylko z uszkodzonych mięśni czy nerwów, ale także z krążących krwinek krwi. MMP–9 zdaje się przyczyniać do dysfunkcji nerwu obwodowego w demielinizacyjnym zespole Guillain–Barre’a (GB) [75]. Te wyniki badań są zgodne z przedstawionymi przez Kieseiera i wsp., którzy wykazali wzrost MMP–9 w nerwie kulszowym w eksperymentalnym autoimmunizacyjnym zapaleniu nerwu u szczurów Lewis oraz w zespole GB, a także w polineuropatii przewlekłej zapalnej demielinizacyjnej.

2. CEL PRACY

Celem pracy było określenie zaangażowania układu immunologicznego w patomechanizmy towarzyszące polineuropatii cukrzycowej i w przebiegu zespołu zależności alkoholowej poprzez:

1. Ocenę udziału czynników uczestniczących w odpowiedzi immunologicznej na podstawie oznaczenia w surowicy krwi chorych stężeń cząsteczek ważnych dla reakcji immunologicznych:

a/ czynnika martwicy guza – alfa (TNF- α)

b/ monocytarnego chemotaktycznego czynnika białkowego-1 (MCP-1)

c/ czynnika stymulującego wzrost czerniaka – α (GRO- α)

d/ metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej – 9 (MMP-9)

2. Analizę neurofizjologicznych wykładników uszkodzenia aksonalnego lub demielinizacyjnego ze względu na morfologiczną heterogenność powyższych polineuropatii z różnym stopniem uszkodzenia mieliny lub aksonu.

3. Oznaczenie aktywności transketolazy erytrocytów, enzymu o aktywności związanej z tiaminą, której niedobór prowadzi do rozwoju polineuropatii.

Dlatego też oznaczanie cytokin uzupełniono o ocenę:

a/ podstawowej aktywności transketolazy w erytrocytach

b/ znormalizowanej aktywności transketolazy w erytrocytach oraz

c/ stopnia pobudzenia transketolazy pirofosforanem tiaminy

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał

3.1.1. Grupy badane

Badanie populacji chorych z polineuropatią obejmowało 29 osób z II typem cukrzycy oraz 33 osoby z wywiadem w zakresie zespołu zależności alkoholowej. Pacjenci hospitalizowani byli na oddziale neurologii oraz oddziale detoksykacji alkoholowej i odwykowym Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego dla Nerwowo i Psychicznie Chorych w Ciborzu. Grupa polineuropatii cukrzycowej składała się z 8 kobiet i 21 mężczyzn. Średni wiek w tej grupie to 48.3 lat \pm 17.6 (zakres od 20 do 70 lat). Grupa alkoholowej polineuropatii obejmowała 10 kobiet i 23 mężczyzn. Średni wiek w tej grupie to 54.5 lat \pm 14.7 (zakres od 28 do 61 lat). Długość trwania zespołu zależności alkoholowej ustalono na podstawie wywiadu na 16 lat. Dokładne wyliczenie czasu trwania alkoholizmu nie było możliwe.

Grupa z polineuropatią cukrzycową została podzielona w zależności od przebiegu klinicznego na dwie podgrupy: jedną – z krótszym czasem trwania choroby (od 2 do 8 lat) i drugą – z objawami klinicznymi polineuropatii trwającymi dłużej niż 9 lat. W pierwszej grupie znalazło się 13 pacjentów, a w drugiej 16.

Grupę z polineuropatią alkoholową podzielono na dwie podgrupy: jedną – z czasem trwania objawów krótszym niż 9 lat i drugą – z przebiegiem klinicznym dłuższym niż 10 lat. Do podgrupy z czasem poniżej 9 lat zaliczono 7 pacjentów, u pozostałych 26 (jak wynikało z wywiadu) czas trwania zespołu zależności alkoholowej był dłuższy.

Dla oceny stopnia zaawansowania objawów polineuropatii zastosowano skalę Katzenwadel'a i wsp. [31]. Opiera się ona na półilościowej ocenie funkcji motorycznych, czuciowych, objawów bólowych, koordynacji ruchów i ocenie odruchów głębokich. Brak zaburzeń punktowano na 0, najgłębsze na 10.

Na podstawie powyższej oceny w grupie chorych z polineuropatią cukrzycową 10 pacjentów wykazało 4 stopień w skali, 6 chorych zaliczono do 5 stopnia, 5 pacjentów wykazało 3 stopień, zaledwie 3 pacjentów zaliczono do 2 stopnia oraz 3 wykazało od 6 do 9, a tylko 2 chorych wykazało 1 stopień uszkodzenia układu nerwowego.

W oparciu o skalę Katzenwadel'a i wsp. stwierdzono następujące zaawansowanie neuropatii alkoholowej: 4 stopień u 10 pacjentów, 2 stopień u 10 chorych, u 5 stopień 5, u 3 stopień 3, u 2 stopień 1, 6 stopień u 1 pacjenta i 7 stopień u 2 chorych.

W obrazie klinicznym polineuropatii cukrzycowej i alkoholowej dominowały objawy ruchowe (opadanie stóp i rąk), parestezje, osłabienie czucia powierzchniowego oraz ból w kończynach dolnych, rzadziej górnych.

Stopień uszkodzenia aksonu, mieliny lub obu określony był przy użyciu metod elektrofizjologicznych (elektromiografii i szybkości przewodzenia).

Badania elektrofizjologiczne wykonane w naszej pracowni wykazały w grupie pacjentów z polineuropatią cukrzycową w większości przypadków uszkodzenie aksonalno-demielinizacyjne. Podobny wynik uzyskano w grupie pacjentów z polineuropatią alkoholową. Badania elektrofizjologiczne wykazywały w obu polineuropatiach cechy uszkodzenia cienkich włókien ruchowych i grubych skórnych włókien czuciowych. Wczesne objawy wyrażały się obniżeniem amplitudy odpowiedzi czuciowych i ruchowych, przy prawidłowej lub minimalnie obniżonej szybkości przewodzenia. Dalsze zwolnienie szybkości przewodzenia występowało w miarę zmniejszania się amplitudy odpowiedzi i było oznaką wtórnego do aksonalnego uszkodzenia demielinizacyjnego.

3.1.2. Grupa kontrolna

Grupa kontrolna składała się z 20 osób bez cech organicznego uszkodzenia układu nerwowego, średni wiek w tej grupie to 49,1 lat \pm 16,8 (zakres od 23 do 78 lat).

Badanie odbyło się za zgodą Lokalnej Komisji Bioetycznej /KB nr 520/08/.

3.2. Metody

3.2.1. Przygotowanie krwi do badań

Próbki krwi żyłnej (5 ml) pobierano do jałowych probówek szklanych, pozostawiono na 30 minut w temperaturze pokojowej celem krzepnięcia, a następnie poddawano 10 minutowemu wirowaniu. Otrzymane surowice rozporcjowano do 1,5 ml probówek typu Eppendorf i zamrożono w temperaturze -80°C.

Oznaczanie stężeń badanych cząsteczek w surowicy przeprowadzono przy

użyciu immunoenzymatycznej metody ELISA z wykorzystaniem zestawów firmy R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) odnośnie TNF- α , MCP-1, GRO- α i MMP-9.

3.2.2. Oznaczanie stężenia TNF- α w surowicy krwi

Etap I. Do zagłębień płytki standardowo opłaszczonej przeciwciałami dodawano po 50 μ l rozcieżczalnika. Poprzez seryjne rozcieńczenia rekombinowanych ludzkich TNF- α , utworzono szeregi próbek standardowych stężeń badanych cząsteczek, które razem z próbkami surowicy grupy badanej i kontrolnej (200 μ l – przy oznaczaniu stężeń TNF- α) dodawano do zagłębień płytki laboratoryjnej opłaszczonej mysimi przeciwciałami przeciwko badanej cząsteczce. Doprowadzono do związania badanej cząsteczki w próbkach z tymi przeciwciałami. Dodawane do zagłębień płytki próbki surowicy badanej i kontrolnej przeznaczone do oznaczania stężeń TNF- α nie były rozcieńczane.

Etap II. Po 2-godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej płytkę płukano 4-krotnie buforem płuczającym. Następnie dodawano po 200 μ l przeciwciał przeciwko badanym cząsteczkom sprzężonym z peroksydazą chrzanową, które podczas ponownej 2-godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej wiązały się na zasadzie "sandwicza" z badanymi cząsteczkami związanymi z przeciwciałami obecnymi w I etapie. Po zakończonej inkubacji płytkę płukano 4-krotnie buforem płuczającym.

Etap III. Do zagłębień płytki dodawano zmieszane ze sobą równe objętości tetrametylbenzydyny i nadtlenu wodoru, jako roztworu substratu (TNF- α 200 μ l), 30 minut inkubowano w temperaturze pokojowej, chroniąc płytkę przed światłem. Reakcję enzymatyczną zatrzymano przez dodanie do zagłębień płytki 50 μ l roztworu kwasu siarkowego.

Etap IV. Przy użyciu spektrofotometru Multiscan MS firmy LabSystem (Finlandia) dokonano pomiaru gęstości optycznej produktu reakcji obecnego w zagłębieniach płytki i pozostającego w proporcji do ilości badanej cząsteczki w próbce. Absorbancję odczytywano przy długości fali 450 nm z subtrakcją dla długości fali 540 nm w ciągu 30 minut. Wartości odczytów otrzymanych przy długości fali 540 nm odejmowano od wartości odczytów uzyskanych przy długości fali 450 nm. Wszystkie badania w próbkach surowicy grupy badanej, kontrolnej jak i w próbkach standardowych zostały przeprowadzone dwukrotnie. Wartości stężeń TNF- α obliczono w oparciu o krzywe standardowe.

3.2.3. Oznaczanie stężenia MCP-1 w surowicy krwi

Etap I. Do zagłębień płytki standardowo opłaszczonej przeciwciałami dodawano po 50 μ l rozcieńczalnika. Poprzez seryjne rozcieńczenia rekombinowanych ludzkich MCP-1, utworzono szeregi próbek standardowych stężeń badanych cząsteczek, które razem z próbkami surowicy grupy badanej i kontrolnej (200 μ l – przy oznaczaniu stężeń MCP-1) dodawano do zagłębień płytki laboratoryjnej opłaszczonej mysimi przeciwciałami przeciwko badanej cząsteczce. Doprowadzono do związania badanej cząsteczki w próbkach z tymi przeciwciałami. Dodawane do zagłębień płytki próbki surowicy badanej i kontrolnej przeznaczone do oznaczania stężeń MCP-1 były rozcieńczane w stosunku 1:1.

Etap II. Po 2-godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej płytkę płukano 3-krotnie buforem płuczającym. Następnie dodawano po 200 μ l przeciwciał przeciwko badanym cząsteczkom sprzężonym z peroksydazą chrzanową, które podczas ponownej 2-godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej wiązały się na zasadzie "sandwicza" z badanymi cząsteczkami związanymi z przeciwciałami obecnymi w I etapie. Po zakończonej inkubacji płytkę płukano 3-krotnie buforem płuczającym.

Etap III. Do zagłębień płytki dodawano zmieszane ze sobą równe objętości tetrametylbenzydyny i nadtlenu wodoru, jako roztworu substratu (MCP-1 200 μ l), 30 minut inkubowano w temperaturze pokojowej, chroniąc płytkę przed światłem. Reakcję enzymatyczną zatrzymano przez dodanie do zagłębień płytki 50 μ l roztworu kwasu siarkowego.

Etap IV. Przy użyciu spektrofotometru Multiscan MS firmy LabSystem (Finlandia) dokonano pomiaru gęstości optycznej produktu reakcji obecnego w zagłębieniach płytki i pozostającego w proporcji do ilości badanej cząsteczki w próbce. Absorbancję odczytywano przy długości fali 450 nm z subtrakcją dla długości fali 540 nm w ciągu 30 minut. Wartości odczytów otrzymanych przy długości fali 540 nm odejmowano od wartości odczytów uzyskanych przy długości fali 450 nm. Wszystkie badania w próbkach surowicy grupy badanej, kontrolnej jak i w próbkach standardowych zostały przeprowadzone dwukrotnie. Wartości stężeń MCP-1 obliczono w oparciu o krzywe standardowe.

3.2.4. Oznaczanie stężenia GRO- α w surowicy krwi

Etap I. Do zagłębień płytki standardowo opłaszczonej przeciwciałami dodawano po 50 μ l rozcieńczalnika. Poprzez seryjne rozcieńczenia rekombinowanych ludzkich GRO- α , utworzono szeregi próbek standardowych stężeń badanych cząsteczek, które razem z próbkami surowicy grupy badanej i kontrolnej (200 μ l – przy oznaczaniu stężeń GRO- α) dodawano do zagłębień płytki laboratoryjnej opłaszczonej mysimi przeciwciałami przeciwko badanej cząsteczce. Doprowadzono do związania badanej cząsteczki w próbkach z tymi przeciwciałami. Dodawane do zagłębień płytki próbki surowicy badanej i kontrolnej przeznaczone do oznaczania stężeń GRO- α nie były rozcieńczane.

Etap II. Po 2-godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej płytkę płukano 3-krotnie buforem płuczającym. Następnie dodawano po 200 μ l przeciwciał przeciwko badanym cząsteczkom sprzężonym z peroksydazą chrzanową, które podczas ponownej 2-godzinnej inkubacji w temperaturze 2–8°C wiązały się na zasadzie "sandwicza" z badanymi cząsteczkami związanymi z przeciwciałami obecnymi w I etapie. Po zakończonej inkubacji płytkę płukano 3-krotnie buforem płuczającym.

Etap III. Do zagłębień płytki dodawano zmieszane ze sobą równe objętości tetrametylbenzydyny i nadtlenu wodoru, jako roztworu substratu (GRO- α 100 μ l), 20 minut inkubowano w temperaturze pokojowej, chroniąc płytkę przed światłem. Reakcję enzymatyczną zatrzymano przez dodanie do zagłębień płytki 50 μ l roztworu kwasu siarkowego.

Etap IV. Przy użyciu spektrofotometru Multiscan MS firmy LabSystem (Finlandia) dokonano pomiaru gęstości optycznej produktu reakcji obecnego w zagłębieniach płytki i pozostającego w proporcji do ilości badanej cząsteczki w próbce. Absorbancję odczytywano przy długości fali 450 nm z subtrakcją dla długości fali 540 nm w ciągu 30 minut. Wartości odczytów otrzymanych przy długości fali 540 nm odejmowano od wartości odczytów uzyskanych przy długości fali 450 nm. Wszystkie badania w próbkach surowicy grupy badanej, kontrolnej jak i w próbkach standardowych zostały przeprowadzone dwukrotnie. Wartości stężeń GRO- α obliczono w oparciu o krzywe standardowe.

3.2.5. Oznaczanie stężenia MMP-9 w surowicy krwi

Etap I. Do zagłębień płytki standardowo opłaszczonej przeciwciałami dodawano po 100 μ l rozcieńczalnika. Poprzez seryjne rozcieńczenia rekombinowanych ludzkich MMP-9, utworzono szeregi próbek standardowych stężeń badanych cząsteczek, które razem z próbkami surowicy grupy badanej i kontrolnej (100 μ l – przy oznaczaniu stężeń MMP-9) dodawano do zagłębień płytki laboratoryjnej opłaszczonej mysimi przeciwciałami przeciwko badanej cząsteczce. Doprowadzono do związania badanej cząsteczki w próbkach z tymi przeciwciałami. Dodawane do zagłębień płytki próbki surowicy badanej i kontrolnej przeznaczone do oznaczania stężeń MMP-9 były rozcieńczane w stosunku 1:100.

Etap II. Po 2-godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej (odbywającej się na wytrząsarce o nachyleniu 0,12°, przy obrotach 500 rpm) płytkę płukano 4-krotnie buforem płuczającym. Następnie dodawano po 200 μ l przeciwciał przeciwko badanym cząsteczkom sprzężonym z peroksydazą chrzanową, które podczas godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej wiązały się na zasadzie "sandwicza" z badanymi cząsteczkami związаныmi z przeciwciałami obecnymi w I etapie. Po zakończonej inkubacji płytkę płukano 4-krotnie buforem płuczającym.

Etap III. Do zagłębień płytki dodawano zmieszane ze sobą równe objętości tetrametylbenzydyny i nadtlenu wodoru, jako roztworu substratu (MMP-9 200 μ l), 30 minut inkubowano w temperaturze pokojowej, chroniąc płytkę przed światłem. Reakcję enzymatyczną zatrzymano przez dodanie do zagłębień płytki 50 μ l roztworu kwasu siarkowego.

Etap IV. Przy użyciu spektrofotometru Multiscan MS firmy LabSystem (Finlandia) dokonano pomiaru gęstości optycznej produktu reakcji obecnego w zagłębieniach płytki i pozostającego w proporcji do ilości badanej cząsteczki w próbce. Absorbancję odczytywano przy długości fali 450 nm z subtrakcją dla długości fali 540 nm w ciągu 30 minut. Wartości odczytów otrzymanych przy długości fali 540 nm odejmowano od wartości odczytów uzyskanych przy długości fali 450 nm. Wszystkie badania w próbkach surowicy grupy badanej, kontrolnej jak i w próbkach standardowych zostały przeprowadzone dwukrotnie. Wartości stężeń MMP-9 obliczono w oparciu o krzywe standardowe.

3.2.6. Oznaczanie aktywności transketolazy wg Bayoumi R.A. & Rosalki S.B.

Etap I. Krew heparynizowaną wirowano 5 min. przy obrotach 3000 rpm (wirówka MPW). Odpipetowano osocze i przemyto 3-krotnie erytrocyty 0,9% NaCl wirując jw. Dodano 0.5 ml roztworu wodnego Triton X-100 (0,2 g/l) do 0,5 ml erytrocytów. Całość wytrząsano przez 10 min. Następnie wirowano 5 min. przy obrotach 10 000 rpm (wirówka Eppendorf). Pobrano hemolizat i rozcieńczono w stosunku 1:10 0,9% NaCl.

Etap II. Inkubowano 2,4 ml 15 mM ribose 5-phosphate disodium salt w buforze Tris HCl przez 5 min. w temperaturze 37°C. Dodano 50 µl rozcieńzonego hemolizatu. Dodano 10 µl zawiesiny GDH/TIM, 50 µl NADH oraz 100 µl TPP. Całość wymieszano i inkubowano w 37°C przez 10 min. Absorbancję mierzono przy długości fali 340 nm w 1 i 15 minucie.

Jednocześnie prowadzono analizę jw. bez użycia TPP jako prób ślepych.

$$\frac{\Delta 5}{15} \times \frac{2.61 \times 1000}{6.22 \times 0.05} \times \frac{10}{\text{Hb [g/l]}} \quad [\text{U/g Hb}]$$

$$\frac{\Delta 5}{15} \times 8392.3 \times \frac{10}{\text{Hb [g/l]}} \quad [\text{U/g Hb}]$$

Odczynniki użyte do oznaczenia aktywności transketolazy:

- 0,1 M Tris-HCl pH 7,6
- 15 mM rybozo-5-fosforan soli disodowej w buforze Tris-HCl
- 10 mM pirofosforan tiaminy (TPP) w buforze Tris-HCl
- 10 mM dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (NADH)

w buforze Tris-HCl

– 73 000 U/l dehydrogenaza glutaminianowa (GDH)

w 2,4 M siarczanie amonu

– 1 800 000 U/l izomeraza fosfotriozyowa (TIM lub TPI)

w 2,4 M siarczanie amonu

TK – aktywność transketolazy w erytrocytach

[U/g Hb] – jednostki na gram hemoglobiny

NTKZ – ang. normalized transketolase activity ratio – znormalizowana aktywność transketolazy w erytrocytach

$$\text{NTKZ} = \frac{\text{TK}}{[0,6066 - (0,002045 \times \text{wiek})]} \quad [\text{U/g Hb}]$$

% aktywacji TPP – stopień pobudzenia transketolazy difosforanem tiaminy

$$\% \text{ aktywacji TPP} = \frac{\text{Aktywność TK po dodaniu TPP}}{\text{Aktywność TK bez TPP}} \times 100\% \quad [\%]$$

Norma: 0 – 15%

% aktywacji TPP > 15% wskazuje na niedobór witaminy B₁

3.2.6.1. Oznaczanie hemoglobiny

Do wykonania badania użyto odczynnika firmy Aqua-Med.

Etap I. Odczynnik do oznaczania hemoglobiny i wzorzec doprowadzono do temperatury pokojowej. Odpitetowano do probówki testowej 5 ml odczynnika do oznaczania hemoglobiny i dodano 20 μ l hemolizatu. Wymieszano starannie i pozostawiono na 10 min. w temperaturze pokojowej. Ponownie delikatnie wymieszano i zmierzono absorbancję mieszaniny reakcyjnej i wzorca wobec odczynnika do oznaczania hemoglobiny w 540 nm. Barwa jest trwała 2 godziny.

Etap II. Odczytano absorbancję przy długości fali 540 nm i dokonano obliczeń wg wzoru:

$$\text{Hb [g/dl]} = \frac{A_{\text{próbki w 540 nm}} \times 16\,114,5}{11\,000} \times 10^{-1} \times \frac{5,02}{0,02}$$

$A_{\text{próbki w 540 nm}}$ – absorbancja próbki w 540 nm

16 114,5 – masa cząsteczkowa hemoglobiny (dla jednego monomeru)

11 000 – molowy współczynnik absorbcyjności cyjanometemoglobiny
(absorbancja 1 mol/l)

$5,02/0,02 = 251$ – współczynnik rozcieńczenia

10^{-1} – przeliczenie z l na dl

$$\text{Hb [g/dl]} = A_{\text{próbki w 540 nm}} \times 36,8$$

Zestaw zawierał odczynnik do oznaczania hemoglobiny oraz wzorzec hemoglobiny (cyjanomethemoglobiny).

Skład odczynnika do oznaczania hemoglobiny:

– cyjanożelazian potasowy	200 mg/l
– cyjanek potasowy	50 mg/l
– dwuwodorofosforan potasowy	140 mg/l
– detergent	

3.3. Statystyczna ocena wyników

Obliczenia statystyczne wykonano w programie GraphPad Prism version 5.00 [GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com]. Jako miar położenia używano wartości średniej oraz mediany, zaś jako miar rozproszenia – odchylenia standardowego oraz wartości minimalnej i maksymalnej. Wartości zmiennych pomiędzy grupami porównywano stosując odpowiednie testy nieparametryczne, czyli test Manna–Whitney’a oraz test rang Kruskala–Wallisa z testem post–hoc Dunna. Do określenia zależności pomiędzy poszczególnymi zmiennymi zastosowano współczynnik korelacji liniowej Spearmana.

Wszystkie wykazane różnice i wyznaczone współczynniki korelacji przyjęto za statystycznie istotne przy poziomie istotności $p \leq 0,05$.

Analizy statystycznej aktywności transketolazy erytrocytów dokonano przy użyciu licencjonowanej wersji oprogramowania MedCalc 11.5.1.0. Normalność rozkładów zmiennych badano testem D’Agostino–Pearsona. Zmienne o rozkładzie normalnym przedstawiano jako średnią \pm SD, a zmienne o rozkładzie istotnie odbiegającym od rozkładu normalnego jako medianę i zakres międzykwartylowy.

Zmienne niezależne o rozkładzie normalnym porównywano testem t–Studenta. Zmienne niezależne o rozkładzie nie–gaussowskim porównywano testem Manna–Whitney’a.

Obliczenia statystyczne opracowano w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

4. WYNIKI

Stężenie TNF- α w surowicy obu typów polineuropatii nie różni się istotnie statystycznie od stwierdzonej w materiale kontrolnym. U chorych z postacią demielinizacyjną polineuropatii alkoholowej i cukrzycowej stężenie MCP-1 w surowicy było wyższe /choć nieistotnie/ niż w grupie kontrolnej. Stężenie w surowicy GRO- α było wyższe (ale nieistotnie statystycznie) w obu postaciach polineuropatii alkoholowej. Stężenie GRO- α było wyższe u chorych w podgrupie postaci demielinizacyjnej polineuropatii cukrzycowej w odniesieniu do poziomu stwierdzonego w surowicy grupy kontrolnej. Szczegółowe wyniki są przedstawione w tabeli od I do IV.

U chorych z polineuropatią cukrzycową niezależnie od typu uszkodzenia obserwowanego w badaniu neurofizjologicznym i czasu trwania choroby nie obserwowano różnic stężeń TNF- α , MCP-1 i GRO- α w porównaniu z grupą kontrolną (tabela I i II). Natomiast u osób z polineuropatią alkoholową ze zmianami o charakterze aksonalno-demielinizacyjnym w badaniu neurofizjologicznym stwierdzono zwiększenie ($p < 0.05$) stężenia GRO- α w porównaniu z grupą kontrolną (tabela IV). Stężenia TNF- α i MCP-1 nie różniły się pomiędzy tą grupą chorych a grupą kontrolną (tabela III i IV).

Z kolei stężenia MMP-9 były znacznie podwyższone ($p < 0.05$) u osób z polineuropatią alkoholową w porównaniu do chorych z polineuropatią cukrzycową (tabela V). Nie wykazywały one różnic pomiędzy badanymi podgrupami chorych z polineuropatią cukrzycową i alkoholową porównywanych z grupą kontrolną (tabela I i III).

Tabela I. Stężenie cytokin w surowicy chorych z polineuropatią cukrzycową w pg/ml

	Kontrola n-20	Polineuropatia cukrzycowa					
		Ogółem n-27	Typ			Czas trwania	
			Demielinizacyjna n-6	Aksonalna n-3	Aksonalno- demielinizacyjna n-18	2-8 lat n-12	≥ 9 lat n-15
TNF-α	10,1 (0,0-71,9)	7,1 (0,0-104,3) NS	10,8 (0,0-29,9)	0,0 (0,0-18,2) NS	6,8 (0,0-104,3)	9,9 (0,0-54,2) NS	6,5 (0,0-104,3)
MMP-9	3,30 (1,42-10,05)	2,88 (1,26-7,23) NS	2,22 (1,58-4,83)	2,56 (1,41-2,88) NS	3,12 (1,26-7,23)	2,89 (1,41-7,23) NS	2,74 (1,26-6,71)

Tabela II. Stężenie cytokin w surowicy chorych z polineuropatią cukrzycową w pg/ml

	Kontrola n-20	Polineuropatia cukrzycowa					
		Ogółem n-29	Typ			Czas trwania	
			Demielinizacyjna n-6	Aksonalna n-4	Aksonalno- demielinizacyjna n-19	2-8 lat n-13	≥ 9 lat n-16
MCP-1	19,1 (0,0-30,3)	14,6 (0,0-48,2) NS	31,6 (0,0-44,2)	7,3 (0,0-26,0) NS	11,6 (0,0-48,2)	11,6 (0,0-48,2)	14,6 (0,0-47,2) NS
GRO-α	47,9 (18,7-116,9)	57,4 (27,5-138,9) NS	74,2 (57,4-138,9)	46,4 (27,5-123,2) NS	56,0 (29,1-91,5)	56,7 (29,1-123,2)	62,3 (27,5-138,9) NS

Tabela III. Stężenie cytokin w surowicy chorych z polineuropatią alkoholową w pg/ml

	Kontrola n-20	Polineuropatia alkoholowa				
		Ogółem n-31	Typ		Czas trwania	
			Demielinizacyjna n-11	Aksonalno- demielinizacyjna n-20	< 9 lat n-7	≥ 10 lat n-24
TNF-α	10,1 (0,0-71,9)	12,2 (0,0-85,5) NS	3,1 (0,0-65,5)	20,9 (0,0-85,5)	7,5 (0,0-33,0)	13,0 (0,0-85,5) NS
MMP-9	3,30 (1,42-10,05)	4,38 (1,34-14,96) NS	3,25 (1,34-8,92)	4,49 (1,66-14,96)	4,38 (2,53-8,92)	4,42 (1,34-14,96) NS

Tabela IV. Stężenie cytokin w surowicy chorych z polineuropatią alkoholową w pg/ml

	Kontrola n-20	Polineuropatia alkoholowa				
		Ogółem n-33	Typ		Czas trwania	
			Demielinizacyjna n-11	Aksonalno- Demielinizacyjna n-22	< 9 lat n-7	≥ 10 lat n-26
MCP-1	19,1 (0,0-30,3)	22,8 (0,0-118,5) NS	24,5 (0,0-118,5) NS	19,9 (0,0-110,7)	17,0 (0,0-118,5) NS	23,7 (0,0-110,7)
GRO-α	47,9 (18,7-116,9)	79,9 (4,7-252,5) NS	57,4 (4,7-179,4) NS	83,0 (22,8-252,5) p<0.05	83,6 (22,8-214,6) NS	70,7 (4,7-252,5)

Tabela V. Stężenie MMP-9 w surowicy chorych z polineuropatią cukrzycową w porównaniu z alkoholową w pg/ml

Grupa kontrolna n-20	Polineuropatia cukrzycowa n-27	Polineuropatia alkoholowa n-31
3,30 (1,42-10,05)	2,88 (1,26-7,23)	4,38 (1,34-14,96)
p < 0,05		

Tabela VI. Aktywność transketolazy w erytrocytach u chorych z polineuropatią cukrzycową i chorych z polineuropatią alkoholową

	Grupa kontrolna n-20	Polineuropatia cukrzycowa n-29	Polineuropatia alkoholowa n-31
TK [U/g Hb]	1,0050±0,3963	0,6424±0,3423*	0,8526±0,4835 ⁺
NTKZ [U / g Hb]	1,9631±0,7416	1,3324±0,6987	1,6476±0,9359
% aktywacji TPP	0,0 0,0-0,0	0,0 0,0- 25,275	0,0 0,0- 14,150

* – **P = 0,0013**

+ – *P = 0,0584*

Podstawowa aktywność transketolazy /TK/ w erytrocytach, była znacznie obniżona u chorych z polineuropatią cukrzycową a w przebiegu polineuropatii alkoholowej wykazano jedynie trend ku jej zmniejszeniu (tabela VI). Natomiast nie wykazano różnic wskaźnika znormalizowanej aktywności transketolazy w erytrocytach ani stopnia pobudzenia aktywności transketolazy pirofosforanem tiaminy w badanych grupach chorych (tabela VI).

5. OMÓWIENIE

Neuropatie cukrzycowa i alkoholowa należą do najczęstszych rodzajów neuropatii w krajach rozwiniętych [48, 71]. Cechuje je złożona patogeneza. Dotyczy to zwłaszcza neuropatii cukrzycowej, w której oprócz dwóch podstawowych hipotez: metabolicznej i naczyniowej zwraca się uwagę w patogenezie na rolę stresu oksydacyjnego, czynników immunologicznych oraz genetycznych [8, 22, 57, 88]. Nie wiadomo, czy wszystkie rodzaje neuropatii mają wspólny mechanizm patogenetyczny, czy też są one odmienne w różnych zespołach klinicznych [84]. Większość autorów wskazuje na zależność pomiędzy nasileniem objawów neuropatii a czasem trwania cukrzycy i wiekiem pacjenta [7,70]. Jako istotny czynnik ryzyka neuropatii wymienia się niedostateczną kontrolę cukrzycy (hiperglikemia, hipoglikemia), angiopatię cukrzycową, działania toksyczne – palenie tytoniu, narkotyki, nadużywanie alkoholu, zatrucia przemysłowe, a także obecność zaburzeń metabolicznych wywołanych niewydolnością wątroby czy nerek, nadciśnienie tętnicze, zaburzenia przemiany lipidowej [9, 37].

Punktem kluczowym w rozwoju neuropatii jest hiperglikemia oraz wpływ niedoboru insuliny [27, 33, 54, 68, 78, 79]. Hipoteza metaboliczna zakłada, że zaburzenia przemiany wywołane przez hiperglikemię bezpośrednio uszkadzają nerwy. W hipotezie naczyniowej hiperglikemia powoduje zmiany metaboliczne, które uszkadzają ściany naczyń zaopatrujących nerwy (vasa nervorum). Zaburzenia metaboliczne powodują symetryczną dosiebną polineuropatię głównie u ludzi młodych we wczesnym okresie choroby. Natomiast czynniki naczyniowe są przyczyną mononeuropatii obwodowych i czaszkowych w późniejszym wieku. Wysoki poziom glikemii powoduje zwiększenie aktywności procesu redukcji glukozy przez enzymy szlaku polioloowego z towarzyszącym wzrostem zawartości sorbitolu w endoneurium i fruktozy przy jednoczesnym spadku zawartości mioinozytolu w komórkach nerwowych [9, 17, 76, 80]. Ponadto stwierdzono zaburzenia syntezy białek w neurocytach z następowymi zmianami w przewodzeniu aksonalnym włókien nerwowych. Gromadzenie końcowych toksycznych produktów przemiany szlaku polioloowego oraz zaburzenia aktywności błonowej Na, K ATP-azy powodują nieprawidłową depolaryzację błony komórkowej nerwów, zaburzenia transportu aksonalnego, wytwarzanie późnych produktów glikacji oraz upośledzenie procesów

w złączach synaptycznych [14, 42, 88]. Zmiany w naczyniach prowadzące do uszkodzenia nerwów są wynikiem uszkodzenia ściany naczyniowej [28]. Zaburzenia metaboliczne w endotelium spowodowane hiperglikemią poprzez uruchomienie alternatywnej drogi metabolizmu, glikozylacji białek błonowych, peroksydacji lipidów prowadzą do zaburzeń w interakcji błona komórkowa–płytki krwi (pierwotna dysfunkcja hemostatyczna). Spadek zdolności fibrynolitycznych z powodu niedostatecznej produkcji tkankowego aktywatora plazminogenu w śródbłonku doprowadza do mikrozakrzepów naczyniowych w vasa nervorum [29]. Zwężenie światła naczyń, dysfunkcja erytrocytów w postaci zmniejszonej zdolności wiązania i oddawania tlenu pogłębia hipoksję. Tak więc kolejnym czynnikiem uszkadzającym nerwy w cukrzycy w starszym wieku jest niedotlenienie [25]. W ostatnich latach wysunięto kolejne hipotezy rozwoju neuropatii m.in. wytwarzanie wolnych rodników na drodze autooksydacji glukozy. Uszkodzenie komórki nerwowej może powodować aktywację kinazy białkowej C jak również glikacji białek strukturalnych neurocytów i osłonki mielinowej z wytworzeniem końcowych produktów zaawansowanej glikacji – AGE (Advanced Glycation Endproducts,) [59]. Wolne rodniki uszkadzają błony komórkowe poprzez peroksydację lipidów, natomiast glikacja białek mielinę powoduje odcinkową demielinizację. W patogenezie neuropatii cukrzycowej zwrócono uwagę na obniżenie poziomu czynników neurotroficznych nerwów m.in. czynnika wzrostu nerwów (NGF) w początkowym stadium neuropatii [4, 9, 68]. Nie bez znaczenia dla rozwoju neuropatii są czynniki genetyczne i immunologiczne [15, 55]. Uszkodzenie bariery krew–nerw prowadzi do gromadzenia się immunoglobulin, głównie klasy IgG i IgM oraz albumin w nerwach obwodowych. Oprócz hiperglikemii znaczenie mają także niedostatki insuliny i peptydu C, które są odpowiedzialne za zaburzenia czynników neurotroficznych w następstwie skutkując polineuropatią [78,79]. Zwraca się także uwagę na możliwe zaangażowanie mechanizmu apoptozy. Te sprawcze czynniki zdają się odgrywać decydującą rolę w rozwoju niewydolności mikrokrążenia, neurodegeneracji i reakcjach układu autoimmunologicznego we włóknach nerwowych [73]. Niektórzy autorzy podkreślają decydującą rolę czynników naczyniowych wtórnych do zaburzeń metabolicznych. Teza ta jest poparta wynikami badań przeprowadzonych na materiale z biopsji, który wykazał strukturalne zmiany w nerwach w postaci widocznego zagęszczenia błony podstawnej, zwyrodnienia perycytu i wzrostu komórek śródbłonka. Wszystko to ostatecznie prowadzi do redukcji perfuzji i do wewnątrznerwowego niedotlenienia [13]. Następnym, choć nie do końca

kontrowersyjnym poglądem była teza Halsbecka i wsp., który zaprezentowali dowody na to, że aktywacja drogi receptora wiążącego późne produkty glikacji (RAGE) może być co najmniej jednym z pierwszych kroków w mechanizmie polineuropatii poprzedzającym przewlekłą hiperglikemię [30]. W hiperglikemii dochodzi do dysregulacji kontroli cytokin. Brak sukcesów w zapobieganiu neuropatii nawet przy ustąpieniu hiperglikemii sugeruje współdziałanie czynników wywołujących metaboliczne i enzymatyczne zmiany prowadzące do zaburzeń struktury i funkcji komórek Schwanna i aksonów [81]. Papanas i wsp. na podstawie badań molekularnych wykazali wysoką częstość D allela w porównaniu z pacjentami bez neuropatii. D allel rzutuje na wysoką częstość występowania neuropatii w cukrzycy typu II [62]. Sharifi i wsp. podkreśla rolę hiperglikemii w apoptozie wskazując, że śmierć komórek możliwa jest drogą wysokiej ekspresji białek BAX–proapoptotycznych [74]. Hoeldke i wsp. badali korelację pomiędzy poziomem przeciwciał dekarboksylazy kwasu glutaminowego, C–peptydu i kontrolą glikemii w neuropatii u pacjentów z cukrzycą typu I [32]. Lawlor i wsp. przy użyciu przeciwciał antiL–periaxin wykazali ich wpływ na wywołanie deficytu przewodzenia w nerwach czuciowych [46]. Matsuda i wsp. ustalili, że wzrost poziomu glukozy oraz czas trwania choroby stanowią kluczowe czynniki rozwoju neuropatii cukrzycowej, ale funkcja nerwów może być modulowana przez poziom osoczowych cytokin jak TNF– α i ten efekt może być znaczący zwłaszcza w nerwach czuciowych [56]. Abel–Aziz i wsp. zwrócili uwagę na rolę homocysteiny jako niezależnego czynnika ryzyka dla naczyniowego uszkodzenia mikrokrążenia i możliwy związek między homocysteiną i TNF– α jako dwóch synergistycznych czynników ryzyka dla apoptozy beta–komórek w typie I cukrzycy. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano znacząco podwyższone stężenie homocysteiny u wszystkich pacjentów z cukrzycą i powikłaniami naczyniowymi w porównaniu z grupą kontrolną. Co więcej, stężenie homocysteiny wykazało dodatnią korelację ze stopniem mikroalbuminurii [1]. Stężenie TNF– α było podwyższone u wszystkich pacjentów z cukrzycą w porównaniu z grupą kontrolną. Inni autorzy wskazują na toksyczny wpływ homocysteiny na komórki śródbłonna. Niewielka hiperhomocysteinemia i mikroalbuminuria powodują wzrost ryzyka schorzeń naczyniowych u pacjentów z cukrzycą [89]. Homocysteina związana jest z dominowaniem neuropatii w cukrzycy typu II. Gonzales–Clemente i wsp. stwierdzili, że neuropatia cukrzycowa jest związana z aktywacją TNF– α u pacjentów z cukrzycą typu I wykazując wzrost aktywności TNF– α u pacjentów z cukrzycą typu I i neuropatią

niezależnie od kontroli glikemii i czynników sercowo–naczyniowych związanych z opornością na insulinę [27]. Chilton i wsp. wykazali pojawienie się w osoczu pacjentów z cukrzycą receptora p75N wskazując na jego przydatność jako wczesnego wykładnika neuronalnej dysfunkcji [16].

Patogeneza neuropatii alkoholowej wydaje się być mniej złożona niż cukrzycowej. Mechanizm leżący u podstaw degeneracji aksonalnej nie został w pełni poznany. Istnieją dowody wskazujące na bezpośredni neurotoksyczny wpływ nadużywania alkoholu i pośredni przez metaboliczne i egzotoksyczne zmiany w narządach mięszzowych zwłaszcza w wątrobie [6, 44, 86]. Niektórzy autorzy wskazują jako przyczynę neuropatii alkoholowej niedobory żywieniowe zwłaszcza tiaminy [40, 41, 65]. Na podstawie badań przeprowadzonych wśród Japończyków wykazano, że neurotoksyczność spowodowana gromadzeniem się aldehydu octowego może być również przyczyną neuropatii alkoholowej. Genetyczne predyspozycje dotyczące różnic w aktywności dehydrogenazy aldehydowej (ALDH2) warunkują różne objawy kliniczne i patologiczne neuropatii w różnych grupach etnicznych [9]. Mechanizm bezpośredniego działania toksycznego alkoholu nie jest całkowicie jasny. Na podstawie badań *in vitro* i *in vivo* na materiale szczurów, wysunięto hipotezę wpływu alkoholu na transport aksonalny i właściwości cytoszkieletu. Zaburzenia ekspresji białka neuronalnego 22, które wchodzi w interakcję z mikrofilamentami i mikrotubulami macierzy może mieć udział w patogenezie neuropatii alkoholowej [40]. Planchon i wsp. wykazali znaczący wzrost poziomu IgA w surowicy u pacjentów z potwierdzoną elektrofizjologicznie polineuropatią w porównaniu z grupą chorych z zespołem zależności alkoholowej bez polineuropatii [67].

W obu zbadanych typach polineuropatii rodzi się pytanie, które wciąż pozostaje nierozwiązane, dlaczego w przypadkach tych chorób tylko niektóre aksony wykazują typowe oznaki polineuropatii, podczas gdy inne ulegają zmianom demielinizacyjnym [83]. Wiąże się z tym pytanie dotyczące wpływu czynników immunologicznych. Skundric i Lisak podkreślają kliniczne aspekty tego problemu kładąc nacisk na brak sukcesów w zapobieganiu polineuropatii nawet po normalizacji wcześniej osłabionego metabolizmu glukozy. Obserwacje te sugerują zaangażowanie czynników immunologicznych, które raz aktywowane mogą działać pomimo korzystnych efektów leczenia hiperglikemii [81]. Satoh i wsp. twierdzą, że w warunkach przewlekłej hiperglikemii produkcja i ekspresja TNF- α jest zwiększona w naczyniach i/lub tkance nerwowej. Prowadzi to do wzmożonej przepuszczalności w zakresie mikrokrążenia

i w następstwie do wzmożonego krzepnięcia, skutkując rozwinięciem polineuropatii [72]. Większość autorów wskazuje na podwyższone stężenie TNF- α w neuropatii cukrzycowej. Przeprowadzone przez nas badania nie potwierdzają tych wniosków. W naszym materiale stężenie TNF- α w surowicy krwi w obu badanych typach polineuropatii nie różniło się od wyników w grupie kontrolnej. W przypadku MCP-1 wykazano trend wzrostu jej stężenia w surowicy u pacjentów z neuropatią alkoholową. Wyniki te nie mogą sugerować decydującego znaczenia MCP-1 na rozwój polineuropatii. W dalszych badaniach największe zmiany stwierdzono w stężeniu GRO- α . Stężenie tej cytokiny było wyższe w całej grupie osób z zespołem zależności alkoholowej z wykładnikami zmian aksonalno-demielinizacyjnych obserwowanych w badaniach elektrofizjologicznych. W literaturze jest niewiele danych dotyczących roli GRO- α w pierwotnych i wtórnych procesach zapalnych. GRO- α , peptyd aktywujący krwinkę białą obojętnochłonną (NAP-2) oraz IL-8 są silnymi czynnikami chemotaktycznymi dla ludzkich krwinek białych obojętnochłonnych. GRO- α onkogen biorący udział w niektórych procesach zapalnych przyczynia się do wzrostu guzów, przerzutów, przenikania leukocytów. Przedstawione wyniki sugerują, że GRO- α może przyczyniać się do rozwoju alkoholowej polineuropatii [6,7,10,20]. Zwraca również uwagę nieobecność izolowanych zmian aksonalnych w badaniach neurofizjologicznych chorych z polineuropatią alkoholową. Obserwacja ta wskazywać może na złożoność i długotrwałość rozwoju polineuropatii w badanej grupie chorych.

Oprócz badanych czynników zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną podjęto również analizę MMP-9, która odgrywa ważną rolę w procesach patologicznych układu nerwowego. W badaniach własnych stężenie MMP-9 w surowicy pacjentów obu typów polineuropatii nie różniło się istotnie od stężenia uzyskanego w grupie kontrolnej. Jednakże u chorych z polineuropatią alkoholową stwierdzono znaczny wzrost stężenia MMP-9 w porównaniu z chorymi z cukrzycą. Wydaje się być uzasadnione zwrócenie uwagi na to, że duże stężenie MMP-9 może być związane z mechanizmem uszkodzeń nerwowych w tym typie polineuropatii. Natomiast obserwowane w polineuropatii cukrzycowej prawidłowe stężenie MMP-9 nie stwarza możliwości połączenia wpływu tego enzymu proteolitycznego z patomechanizmem polineuropatii cukrzycowej [47]. Kwestia zaangażowania MMP-9 w proces uszkodzania tkanki nerwowej w hodowlach tkankowych i modelach *in vivo* ciągle jest rozpatrywana w badaniach klinicznych [21, 35, 49, 90, 91, 92]. Najbardziej interesujące wydaje się być pod tym względem przypuszczenie, że aksonalne ostre uszkodzenie w

przebiegu stwardnienia rozsianego (SR) może wiązać się ze wzrostem stężenia MMP-9 w rdzeniu kręgowym [91]. Niektóre wyniki doświadczalne wskazują na wpływ minocykliny na obniżenie aktywności MMP-9 [49]. Zostało to wykorzystane w próbie klinicznej w SR w celu zmniejszenia degeneracyjnego uszkodzenia mózgu [58]. Czysto hipotetyczna pozostaje jednak możliwość użycia minocykliny dla poprawy stanu klinicznego w polineuropatii alkoholowej.

W metabolizmie nerwów obwodowych ważną rolę odgrywa szereg witamin, ze szczególnym znaczeniem tiaminy, która jest kofaktorem reakcji katalizowanej przez transketolazę enzym o kluczowym znaczeniu. Transketolaza związana jest z cyklem pentozowym procesów energetycznych oraz dla wytwarzania rybozy istotnej dla syntezy kwasów nukleinowych. Obniżenie ekspresji lub aktywności enzymu występuje w wielu chorobach, w których stwierdza się nieprawidłowość metabolizmu tiaminy jak u chorych z przewlekłym alkoholizmem, zwłaszcza w zespole Wernicke'go – Korsakowa [2, 19]. Stan przemiany tiaminy ma istotne znaczenie dla nieprawidłowości stwierdzanych w badaniach neurofizjologicznych w przebiegu zespołu zależności alkoholowej, stąd też oczekiwać można zmniejszenia aktywności transketolazy w tych przypadkach. Zaskakującym było wykazane w niniejszym badaniu znaczne zmniejszenie podstawowej aktywności transketolazy u chorych z polineuropatią cukrzycową, przy braku jej różnic w przebiegu polineuropatii alkoholowej w porównaniu do grupy kontrolnej. Dane te wskazują na możliwość posttranslacyjnych zmian aktywności transketolazy w przebiegu cukrzycy.

Hipotezę tą wspiera obserwowany brak wpływu wieku na aktywność enzymu wykazany poprzez nieobecność różnic znormalizowanej aktywności transketolazy w erytrocytach pomiędzy badanymi podgrupami chorych. Ponadto nie stwierdzenie istotnego pobudzenia aktywności transketolazy przez pirofosforan tiaminy wyklucza obecność niedoborów witaminy B1 u badanych chorych z polineuropatią cukrzycową i alkoholową, co jednocześnie uniezależnia obserwowane odchylenia aktywności enzymu od jej deficytów. Natomiast dalszych badań wymagają mechanizmy posttranslacyjnej modyfikacji transketolazy w przebiegu cukrzycy.

Podsumowując, w przebiegu polineuropatii alkoholowej dochodzi do pobudzenia czynnika stymulującego wzrostu czerniaka- α (GRO- α) i aktywacji metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej-9 (MMP-9). Natomiast polineuropatii cukrzycowej towarzyszy znaczne zmniejszenie aktywności transketolazy.

6. WNIOSKI

1. W przebiegu polineuropatii alkoholowej dochodzi do pobudzenia układu immunologicznego, w które zaangażowany jest przede wszystkim czynnik stymulujący wzrost czerniaka- α (GRO- α).
2. Aktywowana odpowiedź immunologiczna u chorych z polineuropatią alkoholową ma bardziej inwazyjny charakter niż w przypadkach polineuropatii cukrzycowej, na co wskazuje stymulacja metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej-9 (MMP-9).
3. Złożoność obserwowanych patomechanizmów odzwierciedlają w badanych grupach chorych z polineuropatią cukrzycową i alkoholową przeważające odchylenia neurofizjologiczne o charakterze mieszanych zaburzeń aksonalno-demielinizacyjnych.
4. Obserwowane u chorych z polineuropatią cukrzycową obniżenie podstawowej aktywności transketolazy wynikać może z jej posttranslacyjnej modyfikacji, ponieważ nie wykazano w żadnej z badanych grup cech niedoboru tiaminy, ani wpływu wieku na aktywność enzymu.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Abdel-Aziz M.T., Fouad H.H., Mohsen G.A., Mansour M., Abdel-Ghaffar S. TNF alfa and homocysteine levels in type 1 diabetes mellitus. *East Mediterr Health J.* 2001 Jul-Sep; 7(4-5):679-688
2. Alexander-Kaufman K., Harper C. Transketolase: Observations in alcohol-related brain damage research. [Int J Biochem Cell Biol.](#) 2009 Apr;41(4):717-20
3. Ammendola A, Gemini D, Iannaccone S, Argenzio F, Ciccone G, Ammendola E, Serio L, Ugolini G, Bravaccio F. Gender and peripheral neuropathy in chronic alcoholism: a clinical-electroneurographic study. *Alcohol Alcohol.* 2000 Jul-Aug; 35(4):368-371
4. Apfel S.C., Schwartz S., Adornato B.T. et al. Efficacy and safety of recombinant human nerve growth factor in patients with diabetic polyneuropathy: a randomized controlled trial. *JAMA* 2000 Nov 1; 284(17):2215-2221
5. Bae J.S., Kim B.J. Subclinical diabetic neuropathy with normal conventional electrophysiological study. *J Neurol.* 2007 Jan; 254(1):53-59
6. Behse F., Buchthal F. Alcoholic neuropathy: clinical, electrophysiological, and biopsy findings. *Ann Neurol* 1977 Aug; 2(2):95-110
7. Bhadada S.K., Sahay R.K., Jyotsna V.P., Agrawal J.K. Diabetic Neuropathy: Current Concepts. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine* 2001 Oct-Dec; 2(4):305-318
8. Bhakar A.L., Roux P.P., Lachance C., Kryl D., Seidler C., Barker P.A. The p75 neurotrophin receptor (p75NTR) alters tumor necrosis factor-mediated NF-kappaB activity under physiological conditions, but direct p75NTR-mediated NF-kappaB activation requires cell stress. *J Biol Chem.* 1999 Jul 23; 274(30):21443-21449
9. Bogucki A., Sławek J. Neuropatie nabyte BNP :1-15, 55-68, 116-120
10. Boulton A.J., Vinik A.I., Arezzo J.C. et al. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2005 Apr; 28(4):956-962
11. Boulton A.J. Ból neuropatyczny u chorych na cukrzycę. *Medycyna po Dyplomie wydanie polskie po redakcją prof. dr. hab. med. Adama Stępnia, Zeszyt Edukacyjny Wrzesień Nr 10(26) 2009*

12. Bril V. Status of current clinical trials in diabetic polyneuropathy. *Can J Neurol Sci* 2001 Aug; 28(3):191–198
13. Cameron N.E., Eaton S.E., Cotter M.A., Tesfaye S. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 2001 Nov; 44(11):1973–1988
14. Cameron N.E., Gibson T.M., Nangle M.R. et al. Inhibitors of advanced glycation end product formation and neurovascular dysfunction in experimental diabetes. *Ann NY Acad Sci.* 2005 Jun; 1043:784–792
15. Cameron N.E., Cotter M.A. The neurocytokine, interleukin–6, correct nerve dysfunction in experimental diabetes. *Exp Neurol*, 2007 Sep; 207(1):23–29
16. Chilton L., Middlemos A., Gardiner N., Tomlinson D.R. The p75 neurotrophin receptor appears in plasma in diabetic rats—characterisation of a potential early test for neuropathy. *Diabetologia* 2004 Nov; 47(11):1924–1930
17. Chudzik W., Kaczorowska B., Przybyła M., Chudzik B., Gałka M. Neuropatia cukrzycowa. *Pol Merk Lek.* 2007, XXII;127:66–69
18. Conti G., Stoll G., Scarpini E., Baron P.L., Bianchi R., Livraghi S., Scarlato G. p75 neurotrophin receptor induction and macrophage infiltration in peripheral nerve during experimental diabetic neuropathy: possible relevance on regeneration. *Exp Neurol.* 1997 Jul; 146(1):206–211
19. D'Amour M.L., Bruneau J., Butterworth R.F. Abnormalities of peripheral nerve conduction in relation to thiamine status in alcoholic patients. *Can J Neurol Sci.* 1991 May; 18(2): 126–128
20. Demestre M., Parkin–Smith G., Petzold A., Pollen A.H. The pro and the active form of matrix metalloproteinase–9 is increased in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2005 Feb; 159(1–2):146–154
21. Derosa G., D'Angelo A., Tinelli C. et al. Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects. *Diabetes Metab* 2007 Apr; 33(2):129–134
22. Esposito K., Napp F., Marfella R. et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* 2002 Oct 15; 106(16):2067–2072
23. Fainardi E., Castellazzi M., Bellini T., Manfrinato M.C., Baldi E., Casetta I., Paolino E. et al. Cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal production of

- active matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as markers of disease activity in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2006 Jun; 12(3):294-301
24. Feng L., Matsumoto C., Schwarz A., Schmidt A.M., Stern D.M., Pile-Spellman J. Chronic vascular inflammation patients with type2 diabetes: endothelial biopsy and RT-PCR analysis. *Diabetes Care* 2005 Feb; 28(2):379-384
 25. Fisher M.A., Langbein W.E., Collins E.G., Williams K., Corzine L. Physiological improvement with moderate exercise in type II diabetic neuropathy. *Electromyogr Clin Neurophysiol.* 2007 Jan-Febr; 47(1):23-28
 26. Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T. *Immunologia. Wyd. Naukowe PWN* 2009; str. 108-153
 27. Gonzales-Clemente J.M., Mauricio D., Richard C., Broch M., Caixas A., Megia A., Gimenez-Palop O., Simon I., Martinez-Riquelme A., Gimenez-Perez G., Vendrell J. Diabetic neuropathy is associated with activation of the TNF-alpha system in subjects with type 1 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005 Nov; 63(5):525-529
 28. Gryglewski R.J. Znaczenia śródbłonna dla farmakoterapii angiopatii cukrzycowych. *Przegląd Kardiologiczny* 2007; 2(2):69-73
 29. Hafer-Macko C.E., Ivey F.M., Sorkin J.D., Macko R.F. Microvascular tissue plasminogen activator is reduced in diabetic neuropathy. *Neurology* 2007 Jul 17; 69(3):268-274
 30. Haslbeck K.M., Schleicher E., Bierhaus A., Nawroth P., Haslbeck M., Neundorfer B., Heuss D. The AGE/RAGE/NF-kB pathway may contribute to the pathogenesis of polyneuropathy in impaired glucose tolerance (IGT). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2005 May; 113(5):288-291
 31. Haupt E., Ledermann H., Kopcke W. Benfotiamine in the treatment of diabetic polyneuropathy – a three – week randomized, controlled pilot study (BEDIP Study). *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2005; 2 (43):71-77
 32. Hoeldtke R.D., Hampe C.S., Bekris L.M., Hobbs G., Bryner K.D., Lernmark A. DCCT Research Group. Antibodies to GAD65 and peripheral nerve function in the DCCT. *J Neuroimmunol.* 2007 Apr; 185(1-2):182-189
 33. Horowitz S.H. Recent clinical advances in diabetic polyneuropathy. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2006 Oct; 19(5):573-578
 34. Hughes R.A. Peripheral neuropathy. *BMJ* 2002 Feb 23; 324(7335):466-469

35. Jann S., Bramerio M.A., Beretta S., Koch S., Defanti C.A., Toyka K.V., Sommer C. Diagnostic value of sural nerve matrix metalloproteinase-9 in diabetic patients with CIDP. *Neurology* 2003 Dec9; 61(11):1607-1610
36. Jędrzejczak W, Podolak-Dawidziak M Cytokiny – zastosowanie kliniczne. Wyd. Volumed Wrocław 1997, wydanie I; str. 5-51, 187-195
37. Karnafel W. Benfotiamina a cukrzyca. *Wydawnictwo OFTAL* 2009; str. 33-37, 41-45
38. Kieseier B.C., Clements J.M., Pischel H.B., Wells G.M., Miller K., Gearing A.J., Hartung H.P. Matrix metalloproteinases MMP-9 and MMP-7 are expressed in experimental autoimmune neuritis and the Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 1998 Apr; 43(4):427-434
39. Kimura J. *Electrodiagnosis in Diseases of Nerve and Muscle: Principles and Practice*. New York: Oxford University Press; 2001, 3rd edition; str. 654-655
40. Koike H, Sobue G. Alcoholic neuropathy. *Curr Opin Neurol*. 2006 Oct; 19(5):481-486
41. Kozubski W. Zaburzenia w obrębie układu nerwowego związane ze spożywaniem alkoholu. *Przewodnik Lekarza* 2002; 5(5):17-26
42. Krakowiecki A, Jasik M, Rosiński G, Stawicki S, Karnafel W. Ocena leczenia kwasem liponowym u chorych z obwodową polineuropatią cukrzycową. *Diabetologia Doświadczalna i Kliniczna* 2004; 4(6):413-417
43. Krarup C. Badania elektrofizjologiczne w neuropatii: najnowsze poglądy. *Curr Opin Neurol* 2003; 2(1):3-8
44. Kucera P., Balaz M., Varsik P., Kurca E. Pathogenesis of alcoholic neuropathy. *Bratisl Lek Listy* 2002; 103(1):26-29
45. Lauria G, Lombardi R. Skin biopsy: a new tool for diagnosing peripheral neuropathy. *BMJ* 2007 Jun 2; 334(7604):1159-1162
46. Lawlor M.W., Richards M.P., De Vries G.H., Fisher M.A., Stubbs E.B. Antibodies to L-periaxin in sera of patients with peripheral neuropathy produce experimental sensory nerve conduction deficits. *J Neurochem*. 2002 Nov; 83(3):592-600
47. Lee S.W., Song K.E., Shin D.S. et al. Alterations in peripheral blood levels of TIMP-1, MMP-2 and MMP-9 in patients with type-2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 69(2):175-179

48. Lehmann–Horn F.A. Ludolph. red. Ryszard Podemski. Neurologia. Diagnostyka i leczenie. Wyd. Medyczne Urban&Partner 2001 wydanie I; str. 393
49. Leppert D., Hughes P., Huber S., Erne B., Grygar C., Said G., Miller K.M. et al. Matrix proteinase upregulation in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and nonsystematic vasculitic neuropathy. Neurology 1999 Jul; 13; 53:62–70
50. L’Heureux G.P., Bourgoin S., Jean N., McColl S.R., Naccache P.H. Diverging signal transduction pathways activated by interleukin–8 and related chemokines in human neutrophils: interleukin–8, but not NAP–2 or GRO alfa, stimulates phospholipase D activity. Blood 1995 Jan 15; 85(2):522–531
51. Little A.A., Edwards J.L., Feldman E.L. [Diabetic neuropathies](#). Pract Neurol 2007 Apr; 7(2):82–92
52. Losy J., Zaremba J. Monocyte chemoattractant protein–1 is increased in the cerebrospinal fluid of patients with ischemic stroke. Stroke 2001 Nov; 32(11):2695–2696
53. Losy J., Zaremba J., Skrobański P. CXCL1 (GRO–alfa) chemokine in acute ischaemic stroke patients. Folia Neuropathol 2005; 43(2):97–102
54. Low P.A., Suarez G.A. Diabetic neuropathies. Baillieres Clin Neurol 1995 Nov; 4(3):401–425
55. Matà S., Betki E., Masotti G., Pinto F., Lolli F. Motor nerve damage is associated with antiganglioside antibodies in diabetes. J Peripher Nerv Syst. 2004 Sep; 9(3):138–143
56. Matsuda M., Kawasaki F., Inoue H., Kanda Y., Hamada K., Harada Y., Saito M., Eto M., Matsuki M., Kaku K. Possible contribution of adipocytokines on diabetic neuropathy. Diabetes Res Clin Pract. 2004 Dec; 66 suppl.1: S121–123
57. Matteucci E., Giampietro O. Oxidative stress in families of type 1 diabetic patients. Diabetes Care 2000 Aug; 23(8):1182–1186
58. Metz LM, Zhang Y, Yeung M et al. Minocycline reduces gadolinium–enhancing magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. Ann Neurol 2004; 55(5):756
59. Misur I., Zarković K., Barada A., Batelja L., Milicević Z., Turk Z. Advanced glycation endproducts in peripheral nerve in type 2 diabetes with neuropathy. Acta Diabetol. 2004 Dec; 41(4):158–166
60. Neundörfer B. Alcohol polyneuropathy. Fortschr Neurol Psychiatr 2001 Aug; 69(8):341–345

61. Nøkleby K., Berg T.J. Diabetic neuropathy – a clinical review. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2005 Jun; 125(12):1646–1649
62. Papanas N., Papatheodorou K., Papazoglou D., Kotsiou S., Christakidis D., Maltezos E. An insertion/deletion polymorphism in the alpha2B adrenoceptor gene is associated with peripheral neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2007 May; 115(5):327–330
63. Perkins B.A., Ngo M., Bril V. Symmetry of nerve conduction studies in different stages of diabetic polyneuropathy. *Muscle Nerve* 2002 Feb; 25(2):212–217
64. Perkins B.A., Bril V. Diabetic neuropathy: a review emphasizing diagnostic methods. *Clin Neurophysiol.* 2003 Jul; 114(7):1167–1175
65. Peters T.J., Kotowicz J., Nyka W., Kozubski W., Kuznetsov V, Vanderbist F., de Niet S., Marcereuil D., Coffiner M. Treatment of alcoholic polyneuropathy with vitamin B complex: a randomised controlled trial. *Alcohol Alcohol* 2006 Nov–Dec; 41(6):636–642
66. Pirart J. Diabetes mellitus and its degenerative complications a prospective study of 4400 diabetic patients observed between 1947–1973. *Diabetes Care.* 1978;1:168–88
67. Planchon B., Mussini J.M., De Faucal P., Delaroche O., Grolleau J.Y. Increased serum IgA levels in alcoholic polyneuropathy. Pathogenetic discussion. *Ann Med Interne (Paris)* 1985; 136(3):233–235
68. Rajewski P, Rajewski P. *Przegląd Kardiologiczny* 2007; 2,4:267–272
69. Renaud S., Erne B., Fuhr P., Said G., Lacroix C., Steck A.J., Leppert D. Matrix metalloproteinases–9 and –2 in secondary vasculitic neuropathies. *Acta Neuropathol* 2003 Jan; 105(1):37–42
70. Resnick H.E., Stansberry K.B., Harris T.B. et al. Diabetes, peripheral neuropathy, and old age disability. *Muscle nerve* 2002 Jan; 25(1):43–50
71. Said G. Diabetic neuropathy – a review. *Nat Clin Pract Neurol*, 2007 Jun; 3(6):331–340
72. Satoh J., Yagihashi S., Toyota T. The possible role of tumor necrosis factor–alpha in diabetic polyneuropathy. *Exp Diabetes Res* 2003 Apr–Jun; 4(2):65–71
73. Schmeichel A.M., Schmelzer J.D. Low P.A. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 2003 Jan; 52(1):165–171

74. Sharifi A.M., Mousavi S.H., Farhadi M., Larijani B. Study of high glucose-induced apoptosis in PC 12 cells: role of bax protein. *J Pharmacol Sci.* 2007 Jul; 104(3):258–262
75. Sharshar T., Durand M.C., Lefaucheur J.P., Lofaso F., Raphaël J.C., Gherardi R.K., Créange A. MMP-9 correlates with electrophysiologic abnormalities in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 2002 Nov 26; 59(10):1649–1651
76. Siemionow M., Demir Y. Diabetic neuropathy: pathogenesis and treatment. *J Reconstr Microsurg* 2004 Apr; 20(3):241–252
77. Sieradzki J., Koblik T. Zespół stopy cukrzycowej. *Wyd. Via Medica* 2008; 14–39
78. Sima A.A. New insights into the metabolic and molecular basis for diabetic neuropathy. *Cell Mol Life Sci* 2003 Nov; 60(11):2445–2464
79. Sima A.A. Pathological mechanisms involved in diabetic neuropathy: can we slow the process? *Curr Opin Investig Drugs* 2006 Apr; 7(4):324–337
80. Simons Z., Feldman E.L. Update on diabetic neuropathy. *Curr Opin Neurol* 2002 Oct; 15(5):595–603
81. Skundric D.S., Lisak R.P. Role of neuropoietic cytokines in development and progression of diabetic polyneuropathy; from glucose metabolism to neurodegeneration. *Exp Diabetes Res* 2003 Oct–Dec; 4(4):303–312
82. Thornalley P.J., Kempler P. Complications of diabetes mellitus: pathophysiology and pathogenetically – based treatment options. *International Expert Workshop, September 2008 (1–7), 36–43, Rome, Italy, Wörwag Pharma GmbH&Co.KG.*
83. Valls-Canals J., Povedano M., Montero J., Pradas J. Diabetic polyneuropathy. Axonal or demyelinating? *Electromyogr Clin Neurophysiol* 2002 Jan–Feb; 42(1):3–6
84. Vinik A., Park T.S., Stansbery K.B., Pittenger G.J. Neuropatie cukrzycowe. *Diabetologia*, 2000; 43:957–973
85. Vinik A.I., Ullal J., Parson H.K., Casellini C.M. Diabetic neuropathies: clinical manifestations and current treatment options. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006 May; 2(5):269–281
86. Vittadini G., Buonocore M., Colli G., Terzi M., Fonte R., Biscaldi G. Alcoholic polyneuropathy: a clinical and epidemiological study *Alkohol Alkohol* 2001 Sep–Oct; 36(5):393–400
87. Wang Y., Schmeichel A.M., Iida H., Schmelzer J.D., Low P.A. Enhanced inflammatory response via activation of NF- κ B in acute experimental

diabetic neuropathy subjected to ischemia–reperfusion injury. *J Neurol Sci.* 2006 Aug 15; 247(1):47–52

88. Witek P., Sieradzki J. Wpływ leczenia benfotiaminą na dolegliwości bólowe w polineuropatii cukrzycowej. *Diabetologia Praktyczna* 2003; 4:273–277
89. Wotherspoon F., Laight D.W., Browne D.L., Turner C., Meeking D.R., Allard S.E., Munday L.J., Shaw K.M., Cummings M.H. Plasma homocysteine, oxidative stress and endothelial function in patients with Type 1 diabetes mellitus and microalbuminuria. *Diabet Med.* 2006 Dec; 23(12):1350–1356
90. Yong V.W., Power C., Forsyth P., Edwards D.R. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2001 Jul; 2(7):502–511
91. Yong V.W. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 2005 Dec; 6(12):931–944
92. Yong V.W., Giuliani F., Xue M., Bar–Or A., Metz L.M. Experimental models of neuroprotection relevant to multiple sclerosis. *Neurology* 2007 May 29; 68(22suppl.3):32–37; discussion 43–54

8. STRESZCZENIE

Polineuropatia cukrzycowa i alkoholowa należą do najczęstszych polineuropatii metabolicznych w populacji polskiej, są morfologicznie heterogenne z różnorodnym uszkodzeniem mieliny lub aksonu. Ich patogenezą jest złożona i wymaga szerszego wyjaśnienia dlatego u niektórych pacjentów uszkodzenie dotyczy aksonu i powstaje obraz neuropatii aksonalnej, podczas gdy u innych zmiany obejmują mielinę dając demielinizacyjną formę neuropatii. Wydaje się tu być prawdopodobny udział czynników immunologicznych.

Dla wyjaśnienia tych zagadnień podjęto próbę wykazania roli niektórych cytokin w patomechanizmie neuropatii cukrzycowej i alkoholowej. Określono stężenie TNF- α , MCP-1, GRO- α i MMP-9.

Dla oceny roli tiaminy w badanych procesach oznaczono aktywność transketolazy erytrocytów, znormalizowaną aktywność transketolazy oraz stopień pobudzenia transketolazy dwufosforanem tiaminy.

Badaniem objęto 29 chorych z II typem cukrzycy oraz 33 chorych nadużywających alkoholu. Grupa kontrolna składała się z 20 osób.

Oceny stężenia cytokin TNF- α , MCP-1, GRO- α i MMP-9 w surowicy krwi dokonano przy pomocy immunoenzymatycznej metody ELISA z wykorzystaniem zestawów R&D Systems. Oznaczenie aktywności transketolazy wykonano metodą Bayoumi R.A. i Rozalki S.B. Dla statystycznej oceny różnic pomiędzy grupami polineuropatycznymi i grupą kontrolną użyto nieparametrycznego testu Manna-Whitney'a.

Oceniany materiał podzielono z uwzględnieniem czasu trwania choroby oraz zmian elektrofizjologicznych. Dla oceny stopnia zaawansowania objawów polineuropatii zastosowano skalę Katzenwadel. Stopień uszkodzenia aksonu, mieliny lub obu określony był przy użyciu metod elektrofizjologicznych (EMG, ENG).

Wykazano znaczące różnice w udziale badanych cytokin w patomechanizmie cukrzycowej i alkoholowej polineuropatii. Stężenie TNF- α w surowicy krwi w obu typach polineuropatii nie różniło się od stężenia w grupie kontrolnej. Stężenie MCP-1 było nieistotnie wyższe u chorych z polineuropatią alkoholową, nie wykazało również istotnych różnic pomiędzy postacią demielinizacyjną i aksonalną polineuropatii cukrzycowej. Stężenie GRO- α było wyższe u pacjentów z polineuropatią alkoholową

w porównaniu z materiałem kontrolnym oraz było wyższe u pacjentów z demielinizacyjną formą polineuropatii cukrzycowej. Stężenie MMP-9 w surowicy pacjentów w obu typach polineuropatii nie różniło się od obserwowanej w materiale kontrolnym. Przy porównaniu obu typów polineuropatii wyższe wartości MMP-9 w polineuropatii alkoholowej osiągnęły poziom statystycznego znaczenia. Na podstawie uzyskanych danych należy przyjąć, że MMP-9 może stanowić jeden z czynników patomechanizmu polineuropatii alkoholowej oraz demielinizacyjnej formy polineuropatii cukrzycowej.

Aktywność transketolazy w erytrocytach, wyrażona w jednostkach na gram hemoglobiny była obniżona tak w polineuropatii cukrzycowej jak i alkoholowej, z tym, że w większym stopniu w polineuropatii cukrzycowej. Dane te świadczą wyraźnie o znaczeniu nieprawidłowości transketolazy w mechanizmie polineuropatii tak cukrzycowej jak i alkoholowej.

9. SUMMARY

In Polish population, diabetic and alcohol-induced polyneuropathy belong to the most frequent metabolic polyneuropathies. They are morphologically heterogeneous, with variable extent of damage to myelin or axons. Their pathogenesis is complex and it remains to be clarified why in some patients the damage involves axons, resulting in the pattern of axonal neuropathy, while in other patients myelin is affected, resulting in a demyelinating form of neuropathy. In the pathogenesis, involvement of immunological factors seems probable.

In order to clarify the issue, an attempt was made to demonstrate role of certain cytokines in pathomechanisms of diabetic and alcohol-induced polyneuropathy. Concentrations of TNF- α , MCP-1, GRO- α and MMP-9 were examined.

In order to evaluate role of thiamine in studied processes, erythrocyte transketolase activity, standardised activity of transketolase and the thiamine pyrophosphate effect were estimated.

The material included 29 patients with type II diabetes mellitus and 33 patients with alcohol abuse. The control group consisted of 20 persons.

Concentrations of TNF- α , MCP-1, GRO- α and MMP-9 cytokines in serum were established using the immunoenzymatic ELISA technique, employing the commercial R&D Systems kits. Transketolase activity was determined using the technique of Bayoumi and Rozalki. Significance of differences between polyneuropathic groups and the control group was tested using the non-parametric test of Mann-Whitney.

The studied material was subdivided taking into account duration of the disease and of electrophysiological lesions. Advancement of polyneuropathy signs/symptoms was quantitated using the scale of Katzenwadel. The extent of damage to axons, myelin or both was determined using electrophysiological methods (EMG, ENG).

Significant differences were disclosed in involvement of studied cytokines in pathomechanisms of diabetic and alcohol-induced polyneuropathy. In either group of polyneuropathy serum concentration of TNF- α did not differ from that in the control group. Concentration of MCP-1 was insignificantly higher in patients with alcohol-induced polyneuropathy and it failed to differ significantly between demyelinating and axonal forms of diabetic polyneuropathy. Concentration of GRO- α

was higher on patients with alcohol-induced polyneuropathy, as compared to the control group, and it was higher in patients with the demyelinating form of diabetic polyneuropathy. In either form of polyneuropathy, serum MMP-9 level did not differ from that noted in the controls. Upon comparison of the two types of polyneuropathy, the higher levels of MMP-9 in alcohol-induced polyneuropathy reached the threshold of significance. In view of the data, MMP-9 may be assumed to represent one of the factors involved in pathomechanisms of alcohol-induced polyneuropathy and of the demyelinating form in diabetic polyneuropathy.

Activity of transketolase in erythrocytes, expressed in units per gram haemoglobin, was found to be lowered both in diabetic and in alcohol-induced polyneuropathy but it was lowered to a greater extent in diabetic polyneuropathy. The data clearly point to a significance of transketolase abnormalities in mechanisms of both diabetic and alcohol-induced polyneuropathy.