



Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Anna Wesołowska

**Modulacja angiogenezy u chorych na cukrzycę typu 2
leczonych statynami**

Rozprawa doktorska

Promotor:

dr hab. n. med. Marzena Dworacka

Poznań 2012

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

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

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

*Pani Prof. dr hab. n. farm. Teresie Bobkiewicz-Kozłowskiej
Kierownikowi Katedry i Zakładu Farmakologii
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
składam serdeczne podziękowania
za umożliwienie wykonania niniejszej pracy
oraz za zainteresowanie jej przebiegiem.*

*Dziękuję również
Panu Prof. UM dr hab. n. med. Grzegorzowi Dworackiemu
Kierownikowi Katedry i Zakładu Immunologii Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
za umożliwienie wykonania badań
i cenną pomoc w trakcie ich realizacji.*

*Szanownej Pani
dr hab. n. med. Marzenie Dworackiej,
składam serdeczne podziękowania
za opiekę promotorską,
zaangażowanie i cenne merytoryczne wskazówki
oraz za życzliwość i wyrozumiałość w trakcie pisania niniejszej pracy.*

Słowa kluczowe: angiogeneza, cukrzyca typu 2, statyny, czynniki angiogenne

Spis treści

I. Część teoretyczna	10
I.1. Wprowadzenie	10
I.2. Angiogeneza	12
I.2.1. Definicja i znaczenie.....	12
I.2.2. Przebieg procesu angiogenezy.....	13
I.2.3. Regulacja procesu angiogenezy.....	16
I.2.4. Charakterystyka wybranych czynników proangiogennych.....	19
I.2.4.1. Czynn timer wzrostu śródbłnka naczyń (VEGF)	19
I.2.4.2. Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF)	23
I.2.4.3. Białko chemotaktyczne dla monocytów (MCP-1).....	27
I.2.4.4. Angiogenina (ANG).....	29
I.2.5. Charakterystyka wybranych czynników antyangiogennych	31
I.2.5.1. Interleukina 10.....	31
I.2.5.2. Interleukina 12.....	33
I.2.6. Znaczenie angiogenezy w patogenezie cukrzycy typu 2 i jej powikłań....	35
I.3. Statyny	40
I.3.1. Kontekst historyczny i klasyfikacja statyn	40
I.3.2. Budowa chemiczna statyn	42
I.3.3. Własności farmakokinetyczne statyn	45
I.3.4. Działania niepożądane statyn	46
I.3.5. Mechanizm działania statyn	48
I.3.6. Działanie hipolipemizujące statyn i główne wskazania do ich stosowania	51
I.3.7. Działania plejotropowe statyn	52
I.3.7.1. Działanie plejotropowe statyn a schorzenia układu sercowo-naczyniowego.....	53
I.3.7.2. Korzyści wynikające ze stosowania statyn w profilaktyce i leczeniu zaburzeń kardiologicznych.....	56
I.3.8. Stosowanie statyn w cukrzycy typu 2.....	57
II. Cel pracy	60
III. Część doświadczalna	61
III.1. Materiały i metodyka badań.....	61

III.1.1. Badane grupy chorych	61
III.1.2. Metodyka badań	65
III.1.2.1. Oznaczanie stężenia 1,5-anhydro-D-glucitolu w osoczu	66
III.1.2.2. Oznaczanie stężenia adiponektyny w surowicy krwi	69
III.1.2.3. Oznaczanie stężenia rezystyny w surowicy krwi	72
III.1.2.4. Oznaczanie stężenia peptydu C w surowicy krwi	74
III.1.2.5. Oznaczanie stężeń wybranych czynników pro- i antyangiogennych w surowicy krwi	76
III.1.2.6. Badanie czynności wydzielniczej mononuklearów krwi obwodowej w warunkach <i>in vitro</i>	80
III.1.3. Przebieg badania	83
III.1.4. Metody statystycznego opracowania wyników	84
IV. Wyniki	85
IV.1. Charakterystyka badanych grup – etap I	85
IV.2. Porównanie stężenia wybranych czynników proangiogennych pomiędzy badanymi grupami – etap I	92
IV.3. Porównanie stężenia wybranych czynników antyangiogennych pomiędzy badanymi grupami – etap I	96
IV.4. Porównanie stężenia wybranych czynników modyfikujących angiogenezę pomiędzy badanymi grupami z uwzględnieniem leczenia statynami i wpływu parametrów antropometryczno-epidemiologicznych oraz czynników związanych z przebiegiem cukrzycy – etap I	99
IV.5. Badanie związku pomiędzy parametrami antropometryczno-epidemiologicznymi, wykładnikami wyrównania metabolicznego oraz czynnikami związanymi z przebiegiem cukrzycy a stężeniem czynników angiogennych w surowicy krwi u chorych na cukrzycę typu 2 – etap I	115
IV.6. Badanie wzajemnych relacji pomiędzy wybranymi czynnikami pro- i antyangiogennymi w surowicy krwi – etap I	128
IV.7. Badanie sekrecji wybranych czynników pro- i antyangiogennych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej – etap II	130
IV.7.1. Porównanie sekrecji wybranych czynników angiogennych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej pochodzące od chorych	

z różnych grup terapeutyczno-klinicznych w warunkach podstawowych (analiza wariancji ANOVA) – etap II	130
IV.7.2. Porównanie sekrecji wybranych czynników angiogennych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej pochodzące od chorych z różnych grup terapeutyczno-klinicznych hodowane w obecności wysokich stężeń glukozy (analiza wariancji ANOVA) – etap II	134
IV.7.3. Badanie sekrecji wybranych czynników angiogennych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej w obecności wysokich stężeń glukozy w podłożu (test t-Studenta) – etap II	138
IV.7.4. Badanie sekrecji wybranych czynników angiogennych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej w obecności wysokich stężeń insuliny w podłożu (analiza wariancji ANOVA) – etap II	141
V. Omówienie wyników i dyskusja	142
VI. Wnioski	158
VII. Streszczenie	159
VIII. Summary	164
Wykaz skrótów	168
Wykaz tabel	169
Wykaz rycin	171
Piśmiennictwo	176

I. Część teoretyczna

I.1. Wprowadzenie

Cukrzyca typu 2 (ct2) uznawana jest obecnie za chorobę o charakterze epidemicznym. Istotny problem współczesnej kardiadiabetologii stanowi nie tylko sama choroba, ale przede wszystkim jej przewlekłe powikłania. U podłoża tych powikłań leży toczący się w naczyniach krwionośnych proces miażdżycowy. Głównym klinicznym przejawem miażdżycy u osób chorujących na cukrzycę typu 2 jest choroba niedokrwienna serca. Stanowi ona najczęstszą przyczynę zwiększonej chorobowości i śmiertelności u tych chorych. Cukrzyca stanowi samodzielny, niezależny czynnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Dodatkowo u osób chorujących na cukrzycę zwykle mamy do czynienia ze współwystępowaniem innych czynników ryzyka, wśród których należy wymienić nadciśnienie tętnicze, otyłość, a także niezwykle istotne zaburzenia gospodarki lipidowej [1, 2]. W przypadku pacjentów cierpiących na cukrzycę szczególną rolę odgrywa dyslipidemia aterogenna, charakteryzująca się hipertriglicerydemią, niskim poziomem frakcji cholesterolu HDL (*High Density Lipoprotein*) oraz obecnością tzw. małych, gęstych LDL (*sdLDL – small, dense Low Density Lipoprotein*) [3].

Ze względu na aterogenne podłoże powikłań cukrzycy, stanowiących obecnie tak istotny problem, można stwierdzić, iż dogłębne poznanie czynników zarówno uczestniczących w powstawaniu, jak i modulujących przebieg aterogenezy, może mieć ogromne znaczenie nie tylko poznawcze, ale także praktyczne.

Jednym z istotnych, ale jak dotąd niewystarczająco poznanych czynników, powodujących prawdopodobnie znaczne pogorszenie przebiegu miażdżycy, szczególnie u pacjentów z cukrzycą, jest proces naczyniotworzenia. Angiogeneza, a zwłaszcza zaburzenie równowagi pomiędzy czynnikami pro- i antyangiogennymi na korzyść tych pierwszych, stanowi jedną z głównych przyczyn wpływających na pogorszenie przebiegu choroby niedokrwiennej serca. Zaburzenia angiogenezy z pewnością mogą się przyczyniać do przyspieszenia konwersji zaawansowanego, lecz stabilnego dotąd, ogniska miażdżycy w niestabilną blaszkę miażdżycową. Z drugiej strony jednak,

osłabienie angiogenezy związane może być z brakiem krążenia obocznego w tkankach w przebiegu niedokrwienia [4, 5].

Rezultaty nielicznych wciąż badań poświęconych temu zagadnieniu wskazują, iż wiele leków stosowanych powszechnie w terapii osób chorujących na cukrzycę typu 2 może wywierać modulujący wpływ na proces angiogenezy. Do leków tych należą: metformina, inhibitory konwertazy angiotensyny II, a także, jak sugerują najnowsze badania, inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo koenzymu A (**HMG-CoA** – *3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A*), czyli statyny [6, 7]. Jak dotąd nie wyjaśniono jednak czy i ewentualnie jaki wpływ, mają zaburzenia metaboliczne charakterystyczne dla przebiegu cukrzycy, takie jak przewlekła i ostra hiperglikemia, zaburzenia insulinemii i insulinooporność obwodowa, na potencjalne efekty pro- lub antyangiogenne wywierane przez te leki.

Szczególne zainteresowanie wzbudza odmienny wpływ różnych dawek leków należących do grupy statyn na przebieg procesu angiogenezy. Badania interwencyjne, przeprowadzone na populacji ogólnej, wykazały niezwykle korzystny wpływ wysokich dawek statyn na ryzyko sercowo-naczyniowe. Nadal jednak nie jest jednoznaczne, jakie efekty wywierają niskie dawki tych leków. Sugeruje się antyangiogenne działanie wysokich dawek statyn i proangiogenne efekty stosowania dawek niskich. Obserwacje te poczyniono jednak jak dotąd w większości w oparciu o badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* oraz z wykorzystaniem modeli zwierzęcych, a nieliczne na razie badania kliniczne nie dotyczyły osób chorujących na cukrzycę typu 2 [7-9].

Co więcej, statyny charakteryzują się dobrym profilem bezpieczeństwa i są, na ogół, dobrze tolerowane, wówczas, gdy stosuje się je w niskich i średnich dawkach. Podawanie wysokich dawek statyn wymaga wzmożonej ostrożności w ich stosowaniu, głównie ze względu na poważne działania niepożądane ze strony układu mięśniowego i wątroby [10, 11].

I.2. Angiogeneza

I.2.1. Definicja i znaczenie

Po raz pierwszy termin „angiogeneza” został użyty w 1776 roku przez brytyjskiego chirurga Johna Huntera, do opisu naczyń krwionośnych obserwowanych w rogu renifera [12].

Angiogeneza, inaczej neowaskularyzacja, oznacza proces nowotworzenia naczyń włosowatych z dotychczas istniejących naczyń krwionośnych. Złożony patomechanizm tego procesu nie został jak dotąd w pełni wyjaśniony. Zjawisko to ma istotne znaczenie zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych [13, 14].

Fizjologicznie proces angiogenezy zachodzi w czasie rozwoju płodowego, a także w okresie pozapłodowym. Chociaż niewątpliwie angiogeneza ma bardzo duże znaczenia w organogenezie, jednakże w okresie embrionalnym naczynia krwionośne powstają głównie na drodze waskulogenezy, czyli *de novo*, na skutek różnicowania i proliferacji komórek śródbłonna z komórek macierzystych zwanych angioblastami [15, 16]. Proces angiogenezy ma zdecydowanie większe znaczenie w okresie pozapłodowym, gdzie w znacznie mniejszym stopniu dochodzi do waskulogenezy. Najbardziej istotna fizjologiczna rola angiogenezy związana jest z cyklem rozrodczym kobiet, w trakcie którego dochodzi do znacznego rozrostu i redukcji sieci naczyń w błonie podśluzówkowej macicy. Proces naczyniotworzenia jest istotny dla prawidłowej regeneracji śluzówki macicy, rozwoju pęcherzyków i ciała żółtego w jajniku, implantacji zarodka w macicy oraz tworzenia łożyska. Neowaskularyzacja ma także istotne znaczenie podczas naturalnego gojenia się ran, inicjując procesy naprawcze i uczestnicząc w tworzeniu ziarniny oraz ograniczając obszar martwicy [12, 14]. Proces ten stanowi także niezbędną podstawę prawidłowego dojrzewania kości i wzrostu włosów [17].

Niefizjologiczna angiogeneza odgrywa kluczową rolę w patogenezie wielu schorzeń o charakterze przewlekłym, szczególnie istotną w procesach nowotworowych, w których przyczynia się ona do wzrostu guzów pierwotnych, a także zwiększa ryzyko przerzutów [12, 13].

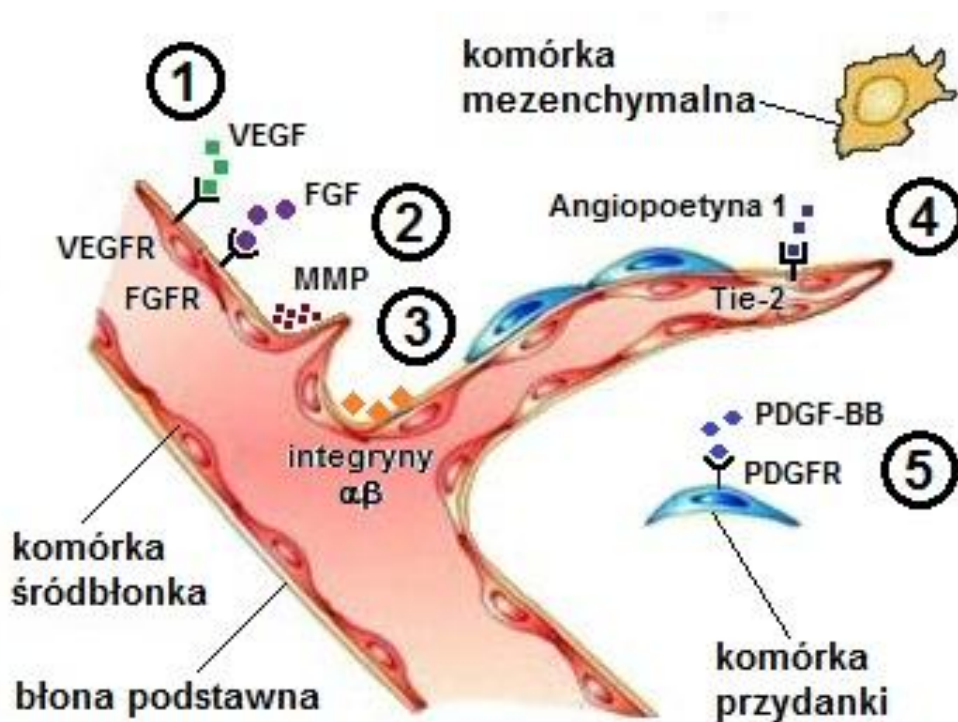
Nie można również zapomnieć o istotnym znaczeniu angiogenezy w patogenezie endometriozy. Nasiloną neowaskularyzację obserwuje się także w przebiegu wielu schorzeń o podłożu zapalnym. Wśród nich należy przede wszystkim wymienić: astmę, reumatoidalne zapalenie stawów, łuszczycę, a także chorobę Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego [12, 13].

Angiogeneza stanowi główną reakcję naczyniową na niedotlenienie lub niedokrwienie tkanek, między innymi w chorobie niedokrwiennej serca oraz udarze niedokrwinnym mózgu i miażdżycy obwodowych naczyń krwionośnych. Jej przejawem jest wówczas tworzenie krążenia obocznego obszarze niedokrwienia [18].

Wiadomo również, że neowaskularyzacja jest związana z rozwojem tkanki tłuszczowej, a zatem odgrywa pewną rolę w powstawaniu otyłości [18].

I.2.2. Przebieg procesu angiogenezy

Angiogeneza jest wieloetapowym procesem o niezwykle złożonym charakterze. Przebieg angiogenezy, z uwzględnieniem kolejnych etapów jej kaskady, przedstawiono na rycinie 1.



Ryc. 1. Kaskada angiogenezy [19] – w modyfikacji własnej

Etap ①

Sygnałem zapoczątkującym kaskadę neowaskularyzacji jest zwiotczenie ściany naczynia krwionośnego, najczęściej pod wpływem tlenu azotu [14, 18]. Dochodzi do pobudzenia komórek śródbłonna oraz do zmian morfologicznych, powodujących zmniejszenie ich przylegania i zwiększenie wrażliwości na mitogeny. Na tym etapie istotną rolę odgrywają bezpośrednio działające czynniki proangiogenne: czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (**VEGF** – *Vascular Endothelial Growth Factor*) i zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (**bFGF** – *basic Fibroblast Growth Factor*), które wiążą się z odpowiednimi receptorami (VEGFR i FGFR) [19, 20]. Funkcje i znaczenie tych czynników omówiono szczegółowo w kolejnych podrozdziałach.

Etap ②

W drugim etapie dochodzi do degradacji błony podstawnej oraz macierzy pozakomórkowej, stanowiących barierę dla migracji komórek śródbłonna, przez enzymy proteolityczne zwane metaloproteinazami (MMPs – *Matrix Metallproteinases*) [18, 21]. Główną rolę odgrywają proteazy przyłączone do błony komórkowej, gdyż w ten sposób ograniczana jest nadmierna destrukcja macierzy. W konsekwencji rozkładu białek macierzy pozakomórkowej powstają substancje odgrywające istotną rolę w regulacji procesu angiogenezy, takie jak angiostatyna i endostatyna [16].

Etap ③

Degradacja błony podstawnej i macierzy pozakomórkowej umożliwia w kolejnej fazie angiogenezy migrację i adhezję komórek śródbłonna. Proces ten rozpoczyna uaktywnienie plazminogenu i jego przekształcenie w plazminę, która z kolei rozkłada między innymi fibronektynę i lamininę. Ponadto plazmina mobilizuje z macierzy pozakomórkowej bFGF, wywierający bezpośrednie działanie proangiogenne [18].

Etap ④

Proliferacja komórek śródbłonna, zapoczątkowuje tworzenie trójwymiarowej, rurkowej struktury nowego naczynia. Proces ten jest możliwy między innymi dzięki aktywności białek przezbłonowych zwanych integrzynami $\alpha\beta$. Białka te odpowiadają za przenoszenie sygnałów z przestrzeni pozakomórkowej do wnętrza komórki. Dzięki temu wpływają one na różnicowanie, proliferację, migrację oraz przeżycie komórek

śródbłonna [22]. Integryny pośredniczą w procesie przylegania komórek do składników macierzy pozakomórkowej, takich jak: fibrynogen, laminina, kolagen, witronektyna lub czynnik von Willebranda. Istnieją dwa szlaki przebiegu angiogenezy indukowane przez różne czynniki i zachodzące przy udziale różnych $\alpha\beta$ integryn. Pierwszy z nich, indukowany przez bFGF i czynnik martwicy guza alfa (TNF α – *Tumor Necrosis Factor α*), zachodzi przy udziale integryny $\alpha_v\beta_3$. Natomiast drugi, indukowany przez VEGF i przekształcający czynnik wzrostu β (TGF- β – *Transforming Growth Factor- β*), przebiega z udziałem integryny $\alpha_v\beta_5$. Czynność i struktura komórek śródbłonna może być także modyfikowana przez składniki macierzy pozakomórkowej. Najważniejszą z tych substancji jest trombospondyna, pełniąca, zależnie od jej postaci, dwojaką funkcję. Rozpuszczalna forma tego białka – hamuje, natomiast forma związana przez macierz – pobudza proliferację komórek śródbłonna. Innym białkiem macierzy pozakomórkowej jest laminina, która pobudza wydzielanie enzymów proteolitycznych, nasila proliferację komórek śródbłonna oraz wpływa na działanie innych składników macierzy pozakomórkowej [18].

Etap ⑤

Kolejny etap angiogenezy stanowi dojrzewanie komórek śródbłonna oraz stabilizacja nowopowstałego naczynia w efekcie powstania błony podstawnej [16]. Następuje tu różnicowanie komórek prekursorowych w komórki przydanki i komórki mięśni gładkich. W indukowaniu niezbędnych zmian zachodzących w miofibroblastach i komórkach przydanki uczestniczy TGF- β oraz kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów (aFGF – *acid Fibroblast Growth Factor*), zwany również FGF-1 [18]. Ostatecznie nowe naczynie zostaje otoczone przez komórki przydanki, a w przypadku dużych naczyń także dodatkową warstwą mięśni gładkich. Rekrutacja komórek przydanki zachodzi pod wpływem płytkowego czynnika wzrostu (PDGF – *Platelet-derived Growth Factor*), uwalnianego przez komórki śródbłonna i wiążącego się z odpowiednimi receptorami PDGFR. W końcowym etapie angiogenezy następuje łączenie się komórek śródbłonna z otaczającymi je komórkami mezenchymalnymi, dzięki obecności angiopoetyn i receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej (Tie 1 i Tie 2), co w konsekwencji prowadzi do powstania stabilnej struktury nowego naczynia [18].

I.2.3. Regulacja procesu angiogenezy

Proces tworzenia nowych kapilar podlega ścisłej kontroli. Każdy etap kaskady neowaskularyzacji może być odpowiednio stymulowany, ale również ograniczany. Czynniki modulujące przebieg angiogenezy możemy podzielić na:

- mechaniczne – wzrost przepływu krwi przez tkanki [23],
- chemiczne – hipoksja i stan zapalny [23, 24],
- molekularne – czynniki proangiogenne i antyangiogenne [14, 23].

Zwiększenie przepływu krwi przez tkanki pobudzające proces angiogenezy w sposób mechaniczny obserwujemy podczas wysiłku fizycznego, jako efekt stosowania niektórych leków lub w przebiegu różnych chorób, np. nadczynności tarczycy [23].

Głównymi czynnikami chemicznymi przyczyniającymi się do zapoczątkowania kaskady angiogenezy są hipoksja i proces zapalny. Mechanizm angiogenezy wywoływanej hipoksją jest związany z aktywacją tzw. czynnika indukowanego niedotlenieniem (HIF-1 α – *Hypoxia-Inducible Factor-1 α*), odgrywającego istotną rolę w komórkowej odpowiedzi na niedobór tlenu. Czynnikiem ten przyczynia się do nasilenia ekspresji bezpośredniego stymulatora angiogenezy, jakim jest VEGF. Przebieg neowaskularyzacji jest także stymulowany przez proces zapalny toczący się w niedotlenionej tkance. Nagromadzenie się komórek zapalnych, czyli monocytów/makrofagów i płytek krwi, w miejscu objętym zapaleniem, przyczynia się do lokalnej sekrecji wielu czynników angiogennych, takich jak cytokiny (interleukina 2, TNF- α), czynniki wzrostu (VEGF, bFGF) i enzymy (MMPs). Dodatkowo wydzielany przez makrofagi peptyd PR39 (*macrophage-derived peptyd*) hamuje degradację HIF-1 α , prowadząc do wzrostu ekspresji VEGF [23, 24].

Istotną rolę w przebiegu procesu angiogenezy odgrywają czynniki molekularne o charakterze proangiogennym i antyangiogennym. Istnienie tych substancji odkryto w latach 70-tych XX wieku, obserwując mitogeny wpływ pewnych czynników nowotworowych na komórki śródbłonna naczyń [23]. W prawidłowo funkcjonującym organizmie równowaga pomiędzy tymi czynnikami jest przesunięta na korzyść czynników hamujących neowaskularyzację, gdyż u osób zdrowych angiogeneza zachodzi bardzo rzadko [14, 23].

Do zapoczątkowania kaskady angiogenezy niezbędna jest lokalna zmiana równowagi pomiędzy czynnikami stymulującymi i hamującymi ten proces. Następuje zwiększenie ekspresji czynników proangiogennych i/lub obniżenie ekspresji czynników antyangiogennych [16].

Czynniki stymulujące proces angiogenezy klasyfikuje się na działające bezpośrednio i pośrednio.

Do czynników bezpośrednio pobudzających proces angiogenezy należą:

- naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu
(**VEGF** – *Vascular Endothelial Growth Factor*),
- zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
(**bFGF** – *basic Fibroblast Growth Factor*),
- kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów
(**aFGF** – *acid Fibroblast Growth Factor*),
- czynnik wzrostu hepatocytów
(**HGF** – *Hepatocyte Growth Factor*) [13, 16, 25].

Działanie tych czynników jest niezbędne do zapoczątkowania kaskady angiogenezy. Wykazują one bezpośredni wpływ na komórki śródbłonka naczyń. Rola tych substancji polega między innymi na zwiększeniu przepuszczalności naczyń, pobudzeniu komórek śródbłonka do proliferacji, a także na aktywacji enzymów proteolitycznych i nasileniu migracji komórek. Czynniki te wpływają również na późniejsze etapy angiogenezy, regulując różnicowanie i dojrzewanie komórek oraz wpływając na utrzymanie prawidłowej struktury nowych naczyń [25].

Do pośrednich stymulatorów angiogenezy należą między innymi:

- białko chemotaktyczne monocytów
(**MCP-1** – *Monocyte Chemotactic Protein-1*),
- angiogenina
(**ANG** – *Angiogenin*),
- angiopoetyna 1 i 2,
- interleukiny
(**Il-6, Il-8** – *Interleukin-6, -8*),

- płytkopochodny czynnik wzrostu
(PDGF – *Platelet-derived Growth Factor*),
- transformujący czynnik wzrostu
(TGF- β – *Transforming Growth Factor- β*),
- prostaglandyny
(PGE1 – *Prostaglandin E1*, PGE2 – *Prostaglandin E2*),
- insulinopodobny czynnik wzrostu
(IGF-1 – *Insulin-like Growth Factor-1*),
- heparyna,
i inne [13, 25].

Działanie tych substancji polega głównie na stymulowaniu komórek do syntezy i sekrecji licznych cytokin i czynników wzrostu, w tym bezpośrednich stymulatorów angiogenezy. Czynniki te mogą wprawdzie wpływać w pewnym stopniu bezpośrednio na komórki śródbłonna, jednak ich działanie nie jest wystarczające do zapoczątkowania kaskady neowaskularyzacji. Substancje te stanowią więc mediatory angiogenezy indukowanej przez czynniki pośrednie i wpływają głównie na dalsze etapy tego procesu [25].

Z kolei wśród najważniejszych czynników antyangiogennych należy wymienić następujące substancje:

- interleukiny (**II-10**, **II-12**, **II-18** – *Interleukin-10*, *-12*, *-18*),
- interferony (IFN- α , - β , - γ – *Interferon- α* , *- β* , *- γ*),
- angiostatynę,
- endostatynę,
- trombospondynę (TSP-1 – *Thrombospondin-1*),
- troponinę,
- czynnik martwicy nowotworów (TNF α – *Tumor Necrosis Factor α*),
- inhibitory enzymów proteolitycznych,
- inhibitory integryn,
i inne [13, 25]

I.2.4. Charakterystyka wybranych czynników proangiogennych

I.2.4.1. Czynniki wzrostu śródbłonna naczyń

(VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*)

Jednym z najważniejszych i dotychczas najlepiej poznanych stymulatorów angiogenezy jest czynnik wzrostu śródbłonna naczyń. Czynniki te zostały **odkryty** w 1983 roku przez Dvoraka, jako białko wykazujące silne właściwości mitogenne w stosunku do komórek śródbłonna, stąd początkowo nazywany był również waskulotropiną [17, 26]. W tym samym roku Senger i współpracownicy odkryli czynnik zwiększający przepuszczalność naczyń (VPE – *Vascular Permeability Factor*) [17, 27]. Ta pierwotna nazwa związana była z główną funkcją odkrytego białka, wywierającego 50 000 razy silniejszy wpływ na zwiększenie przepuszczalności naczyń w porównaniu do histaminy [28, 29]. Sklonowanie w 1989 roku VEGF [30] oraz VPE [31] wykazało, że obie te cząsteczki reprezentują ten sam czynnik, dla którego od tej pory przyjęto wspólne oznaczenie VEGF [17].

Rodzina białek VEGF obejmuje 6 czynników: VEGF-A, -B, -C, -D oraz łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF – *Placenta Growth Factor*) i wirusowy homolog VEGF – VEGF-E [16, 17, 26, 27]. Poszczególne czynniki są produktami ekspresji różnych genów i wykazują pewne różnice w zakresie budowy i funkcji [17]. Pod względem **budowy** są to glikozylowane białka o strukturze homodimerów i masie 46÷48 kDa [29]. Wspólnym elementem strukturalnym wszystkich czynników rodziny VEGF jest fragment zawierający sekwencję cysteiny, odpowiedzialny za tworzenie mostków siarczkowych i dimerów [17].

Dotychczas najlepiej poznanym białkiem, uznawanym za prototyp rodziny VEGF, jest **VEGF-A** [32]. Czynniki te występują w postaci kilku izoform, różniących się ilością aminokwasów, wynoszącą odpowiednio: 121, 138, 145, 148, 162, 162_b, 165, 183, 189 i 206 [14, 17, 20, 26, 29]. Gen dla VEGF-A jest zlokalizowany na chromosomie 6p21.3 [26]. Różnice w budowie poszczególnych postaci VEGF-A wynikają z odmiennej obróbki posttranslacyjnej tych białek i przyczyniają się do pewnych różnic w zakresie rozpuszczalności, zdolności łączenia z heparyną, biodostępności, powinowactwa do receptora, aktywności mitogennej [16, 33]. Dla przykładu, VEGF₁₂₁

jest białkiem o charakterze kwaśnym, charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością i ze względu na brak zdolności wiązania z heparyną występuje w postaci wolnej w płynie pozakomórkowym. Długie izoformy VEGF₁₈₉ i VEGF₂₀₆ mają charakter silnie zasadowy i wykazują duże powinowactwo do zewnątrzkomórkowych proteoglikanów zawierających heparynę, dlatego występują głównie w nieaktywnej postaci związanej z powierzchnią komórki i macierzą pozakomórkową. Natomiast VEGF₁₄₅ i VEGF₁₆₅ wykazują właściwości pośrednie [26, 33-35]. Wszystkie izoformy VEGF-A posiadają sekwencję lipidową umożliwiającą ich sekrecję do przestrzeni pozakomórkowej [29]. W wyniku proteolitycznego odszczepiania, zachodzącego przy udziale plazminy lub urokinazy, uwalniany jest aktywny, rozpuszczalny fragment VEGF₁₁₀, wspólny dla wszystkich izoform VEGF [35]. VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₃ i VEGF-A₁₈₉ występują w większości tkanek. VEGF-A₁₄₅ wyizolowano z niektórych linii komórek nowotworowych oraz z narządów rozrodczych kobiety, VEGF-A₁₄₈ z kłębuszków nerkowych, VEGF-A₁₆₂ z ludzkich komórek raka jajnika, natomiast VEGF-A₂₀₆ z ludzkiej wątroby płodowej [26].

VEGF-A jest **produkowany** przez liczne komórki, między innymi komórki śródbłonna i komórki mięśni gładkich naczyń, makrofagi, fibroblasty [17, 26], a także przez limfocyty T i inne komórki układu odpornościowego [26, 29] oraz przez komórki nerek, keratocyty, astrocyty i osteoblasty [16, 29]. Komórki nowotworowe posiadają także zdolność syntezy VEGF [16, 26, 29]. Miejscem **magazynowania i transportowania** VEGF we krwi są leukocyty i płytki krwi [26, 29, 36].

Synteza VEGF nasila się znacznie pod wpływem niedotlenienia [17, 18, 34]. Najważniejszym czynnikiem, zwiększającym transkrypcję genu dla VEGF w warunkach niedotlenienia, jest HIF-1 α [26, 37, 38], który oddziałuje na HRE (*Hypoxia Response Element*), znajdujący się w obrębie promotora VEGF [17, 38]. Dodatkowym czynnikiem stymulującym wytwarzanie VEGF pośrednio, poprzez nasilenie syntezy HIF-1 α , jest enzym hemoksygenaza-1 (HO-1), syntetyzowany w większych ilościach w warunkach niedotlenienia, zwłaszcza w ośrodkowym układzie nerwowym [17, 37, 38]. Dotychczas przeprowadzone badania wykazały, że VEGF może być uznany za czuły wskaźnik niedotlenienia tkankowego zarówno u pacjentów z niedokrwieniem kończyn dolnych, jak i u osób z niedokrwieniem mięśnia sercowego [16].

Wykazano również, że do zwiększenia stężenia VEGF mogą się przyczynić czynniki związane z patogenezą cukrzycy, takie jak: hiperglikemia, insulina, insulinopodobny czynnik wzrostu-1 oraz końcowe produkty glikacji [39]. Wśród innych czynników istotnie stymulujących syntezę VEGF możemy wymienić: cytokiny (np. Il-1 β , TNF- α), czynniki wzrostu (np. bFGF, PDGF, TGF- β), hormony, reaktywne formy tlenu, chelatory żelaza [17] onkogeny [33] oraz tlenek azotu [37]. Z kolei inne cytokiny, np. Il-10 i Il-13 mogą hamować sekrecję VEGF [34].

Działanie VEGF na komórki zachodzi poprzez swoiste **receptory** VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*): VEGFR-1 (Flt-1 – *Fms-like tyrosine kinase 1*) i VEGFR-2 (KDR – *Kinase Domain Region*), znajdujące się między innymi na komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych [34, 40] oraz VEGFR-3 (Flt-4 – *Fms-like tyrosine kinase 4*) obecne na komórkach śródbłonna limfatycznego [16, 17, 29]. VEGFR stanowią białka przezbłonowe zawierające domeny kinazy tyrozynowej. Receptory te wykazują zdolność autofosforylacji po aktywacji i przyłączeniu liganda [14, 17, 34]. Efektem jest aktywacja wielu złożonych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych [17]. Wykazano, że poszczególne izoformy VEGF różnią się powinowactwem do różnych typów VEGFR. Rolę koreceptora VEGFR modyfikującego funkcję VEGF odgrywają białka zwane neurolipinami: NRP-1 i NRP-2 łączące się z ligandem dla tego receptora [16, 17]. Głównie znaczenie dla stymulacji angiogenezy ma NRP-1 zwiększająca wiązanie VEGF₁₆₅ do VEGFR-2 [34]. Z kolei NRP-2 odgrywa rolę w procesie limfogenezy, zwiększając wiązanie VEGF-C do VEGFR-3 [17, 41].

VEGF odgrywa istotną rolę już w okresie życia płodowego stymulując i regulując rozwój układu naczyniowego (aorty, innych tętnic, naczyń żylnych i limfatycznych) [16], układu kostnego [42] oraz modyfikując rozwój licznych narządów (wątroby, trzustki, nerek) w trakcie embriogenezy [34]. Przede wszystkim jednak VEGF stanowi główną cytokinę zarówno zapoczątkowującą kaskadę angiogenezy, jak i uczestniczącą w dalszych etapach tego procesu w życiu pozapłodowym w warunkach fizjologicznych i w przebiegu różnych schorzeń [20, 34].

Aktywność proangiogenna VEGF związana jest głównie z działaniem za pośrednictwem VEGFR-2. Aktywacja tego receptora prowadzi do różnicowania

komórek progenitorowych endotelium (EPC – *Endothelial Progenitor Cells*) w kierunku komórek śródbłonka. Aktywacja komórek mezodermalnych stymuluje ich różnicowanie w kierunku linii śródbłonkowej i komórek mięśni gładkich. Działanie na receptor VEGFR-2 zlokalizowany na powierzchni komórek śródbłonka wyzwała ich proliferację [17]. VEGF jest istotnym chemoatraktantem, zarówno dla komórek progenitorowych śródbłonka, jak i dla dojrzałych komórek endotelium [16]. Istotnym efektem działania VEGF jest stymulacja produkcji tlenu azotu przez pobudzone śródbłonek naczyniowy, co prowadzi do wzrostu przepuszczalności i poszerzenia naczyń krwionośnych [14, 18, 28, 29]. Wzrost przepuszczalności naczyń jest także związany z nasileniem napływu jonów Ca^{2+} do komórek śródbłonka pod wpływem VEGF [20, 43].

Zwiększona przepuszczalność jest skutkiem bezpośredniego działania VEGF na komórki śródbłonka [44], co prowadzi do fosforylacji przezbłonowych białek zwanych kadherynami, tworzących połączenia międzykomórkowe, określane jako strefy przylegania (*adherent junctions*). Efektem jest rozluźnienie tych połączeń, umożliwiające migrację komórek do otaczających tkanek, w początkowych stadiach angiogenezy [39, 45]. Ponadto VEGF pobudza enzymy proteolityczne MMPs rozkładające błonę podstawną i macierz pozakomórkową w celu umożliwienia migracji komórek śródbłonka [18, 29]. VEGF stanowi również silny mitogen dla komórek śródbłonka, a także nasila ekspresję receptorów istotnych dla powstawania nacieków komórkowych i przebudowy naczyń krwionośnych [18]. Tak więc VEGF reguluje zarówno podziały komórek śródbłonka, jak i ich różnicowanie i dojrzewanie, wpływając tym samym na formowanie struktur nowych naczyń [16]. Dodatkowo VEGF stymuluje syntezę kolagenu typu I i III zapewniając utrzymanie prawidłowej struktury nowych naczyń [29].

Czynnik ten wykazuje również zdolność **ochrony** komórek śródbłonka **przed apoptozą** [16]. Stanowi bowiem aktywator szlaków antyapoptotycznych w komórkach śródbłonka, oddziałując na białka z rodziny bcl-2 i A1 w komórkach śródbłonkowych [20].

Wykazano ponadto, że VEGF odgrywa bezpośrednią **rolę w procesie nowotworzenia** pobudzając proliferację komórek nowotworowych na drodze

autokrynej i parakrynej, stymulując tym samym postęp choroby nowotworowej i powstawanie przerzutów [33].

Jak już wspomniano, VEGF **wpływa** również **na proces limfogenezy**, modulując w ten sposób procesy odpornościowe organizmu [41]. Działanie to wynika z hamowania przez VEGF limfopoezy linii B-komórkowej, a w konsekwencji syntezy przeciwciał. Ponadto VEGF hamuje dojrzewanie komórek dendrytycznych, czyli komórek prezentujących antygen, niezbędnych do prawidłowego przebiegu procesów odpornościowych [29, 41, 46].

Dotychczasowe badania wykazały również, że VEGF może odgrywać **rolę neurotroficzną i neuroprotekcijną**, zarówno w ośrodkowym, jak i w obwodowym układzie nerwowym [47]. VEGF reguluje wzrost naczyń w układzie nerwowym, a także wpływa bezpośrednio na różne typy komórek nerwowych, stymulując ich wzrost, proliferację i migrację, oraz zwiększając przeżywalność komórek nerwowych w niesprzyjających dla nich warunkach [47-50].

I.2.4.2. Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów

(bFGF – *basic Fibroblast Growth Factor*; FGF-2 – *Fibroblast Growth Factor-2*)

W latach 80-tych po raz pierwszy **zidentyfikowano**, oczyszczono i zsekwencjonowano dwa główne białka należące do rodziny czynników wzrostu fibroblastów: kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów (aFGF– *acid Fibroblast Growth Factor*; FGF-1 – *Fibroblast Growth Factor-1*) oraz zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) [51-53]. Dotychczas zidentyfikowano aż 25 różnych izoform FGF [54], jednak poza bFGF i w mniejszym stopniu aFGF, nie mają one istotnego znaczenia w procesie angiogenezy [14].

Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów stanowi, obok VEGF, jeden z najlepiej poznanych i najsilniejszych stymulatorów neowaskularyzacji [25]. Oba czynniki mogą działać synergistycznie, niezależnie od siebie, stymulując angiogenezę w sposób bezpośredni [25, 39]. Dodatkowo bFGF może stymulować angiogenezę pośrednio, nasilając ekspresję VEGF i aktywując jego działanie na receptor dla VEGF [14, 52]. Wykazano, że bFGF zwiększa produkcję VEGF poprzez wzrost syntezy PGE2 w komórkach śródbłonna pod wpływem cyklooksygenazy-2, co w konsekwencji

prowadzi do nasilenia proliferacji tych komórek i progresji angiogenezy [14]. Istotna różnica pomiędzy VEGF a bFGF polega na tym, że czynnik ten, w przeciwieństwie do VEGF, nie odgrywa znaczącej roli w przebiegu angiogenezy płodowej [25]. Główna rola bFGF, w przeciwieństwie do aFGF, jest związana z przebudową naczyń w przebiegu procesów naprawy tkanek [14, 39].

Pod względem **budowy** bFGF jest monomerycznym białkiem składającym się z 155÷267 aminokwasów [29]. Istnieje kilka izoform bFGF o masie cząsteczkowej 18÷24 kDa, spełniających różne funkcje [29]. Cząsteczka 18 kDa wiąże się z komórkami śródbłonna pobudzając receptor dla bFGF, co prowadzi do zwiększenia ich mobilności i nasilenia proliferacji. Z kolei cząsteczki o masie 22÷24 kDa ulegają translokacji do jąder komórek śródbłonna i powodują pobudzenie transkrypcji rDNA wpływając dzięki temu na proliferację tych komórek [52, 53]. Gen dla bFGF jest zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 4 [29]. Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów występuje głównie w formie związanej z macierzą pozakomórkową lub powierzchnią komórek oraz w postaci krążących kompleksów z różnymi czynnikami wykazującymi zdolność wiązania bFGF. Zmiana stężeń poszczególnych elementów wiążących bFGF w zależności od warunków fizjologiczno-patologicznych przyczynia się do zmiany dostępności i aktywności bFGF [52].

Cytokina bFGF jest **produkowana** przez różne komórki, w tym komórki śródbłonna naczyń, komórki mięśni gładkich, fibroblasty, makrofagi [29], a także przez astrocyty i komórki nabłonka barwnikowego siatkówki [39]. Również komórki nowotworowe wykazują zdolność syntezy bFGF [29, 39]. Miejscem **magazynowania** bFGF jest jądro komórkowe [29]. Ponieważ bFGF nie posiada sekwencji sekrecyjnej, nie może być wydzielany do środowiska, dlatego pozostaje związany z powierzchnią komórek i macierzą pozakomórkową [52, 53]. Mechanizm uwalniania bFGF do przestrzeni pozakomórkowej nie został jak dotąd w pełni wyjaśniony [29, 53]. Do uwolnienia bFGF z substancji pozakomórkowej dochodzi prawdopodobnie pod wpływem enzymów degradujących, czyli proteaz i metaloproteinaz. Zatem pewne ilości bFGF występują w postaci wolnej i odgrywają istotną rolę w modulacji procesu naczyniotworzenia [39].

Działanie proangiogenne bFGF polega na stymulowaniu proliferacji i migracji komórek śródbłonka [29], produkcji proteaz, chemotaksji (w stosunku do fibroblastów, komórek śródbłonka i mięśni gładkich) i stymulowaniu tworzenia struktur tubularnych przez komórki śródbłonka [14, 25, 39].

Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów realizuje swoją aktywność biologiczną za pośrednictwem różnych typów **receptorów** zlokalizowanych na powierzchni komórek śródbłonka naczyń [52]. Wśród nich należy wymienić przede wszystkim przezłonowe receptory kinazy tyrozynowej (FGFR-1 do FGFR-4) [52, 53]. Najistotniejsze dla procesu angiogenezy są dwie odmiany receptora: FGFR-1 i FGFR-2 [25], obecne na komórkach śródbłonka [52], a także na komórkach nowotworowych [29]. W konsekwencji fosforylacji receptorów dochodzi do aktywacji różnych szlaków sygnałowych, w tym szlaku kinazy białkowej aktywowanej przez mitogeny (MAPK – *Mitogen Activated Protein Kinase*) oraz kinazy białkowej C (PKC – *Protein Kinase-C*) [52, 53]. Efektem aktywacji FGFR jest między innymi nasilenie proliferacji i migracji komórek śródbłonka [52].

Działanie proangiogenne bFGF jest zależne także od wiązania się tego czynnika z heparyną, stanowiącą ważny czynnik hemostazy [25] oraz od jego wiązania z cząsteczkami heparynopodobnymi takimi jak proteoglikan – siarczan heparanu (HSPGs – *Heparan-Sulfate Proteoglycans*) [52, 53]. Cząsteczki HSPGs obecne są na powierzchni komórek śródbłonka (i wielu innych typów komórek), jako receptory błonowe, a także jako składniki macierzy pozakomórkowej występują w postaci wolnych cząsteczek. Przyłączenie bFGF do odpowiedniej formy HSPG reguluje dostępność i aktywność tego czynnika [52]. Wykazano również, że aktywność biologiczna bFGF może być związana z tworzeniem trójskładnikowych kompleksów HSPGs/bFGF/FGFR [52, 53]. Ponadto bFGF nie tylko wiąże się z HSPGs, ale także reguluje ich syntezę [52].

Wiadomo również, że bFGF reguluje ekspresję różnych białek adhezyjnych, w tym integryn (głównie $\alpha_v\beta_3$) [14, 52] oraz kadheryn [52], odpowiedzialnych za oddziaływanie między komórkami w trakcie dojrzewania nowopowstałego naczynia. Ponadto bFGF, wpływając na syntezę fibronektyny i kolagenu, odgrywa istotną rolę w utrzymaniu prawidłowej budowy nowopowstałego naczynia [14, 29].

Wykazano także, że czynnik ten posiada zdolność nasilania produkcji proteaz, w tym aktywatora plazminogenu (uPA – *urokinase-type Plasminogen Activator*) i metaloproteinaz. Czynnik bFGF moduluje także ekspresję receptora plazminogenu na powierzchni komórek śródbłonka ułatwiając aktywność proteolityczną. Ponadto bFGF indukuje ekspresję inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1 – *Plasminogen Activator Inhibitor-1*) utrzymując równowagę proteolityczną [52].

Dodatkowo bFGF posiada zdolność przyłączania się do fibrynogenu i fibryny. Fibryna odgrywa podwójną rolę w procesie angiogenezy. Z jednej strony, w sposób bierny zapobiega utracie krwi i zapewnia odpowiednie środowisko dla gojenia się ran i remodelingu. Z drugiej zaś strony, działa czynnie w wyniku interakcji z komórkami krwi i ścianami naczyń. Połączenie się bFGF z fibrynogenem i fibryną nasila proliferację i zwiększa aktywność proangiogenną komórek śródbłonka naczyń [52, 55].

Ponadto wykazano, że bFGF posiada zdolność tworzenia połączeń z trombospondyną, co jest dowodem na wzajemną interakcję czynników proangiogennych i antyangiogennych prowadzącą do zmiany ich biodostępności i aktywności [39, 52, 56]. Wiele innych czynników wykazuje zdolność wiązania bFGF i tym samym zdolność hamowania jego proangiogennej aktywności. Wymienić tu należy fibstatynę lub białko wiążące bFGF (FGF-BP – *FGF-Binding Protein*) [52]. Czynnikami wiążącymi bFGF są także gangliozydy, które w fizjologicznych warunkach są związane między innymi z błoną komórkową komórek śródbłonka. Połączenie bFGF z gangliozydami zapobiega wiązaniu się tego czynnika z FGFR i HSPGs hamując w ten sposób działanie bFGF [52]. Ponadto aktywność bFGF jest modulowana przez liczne cytokiny np. płytkowy czynnik wzrostu-BB (PDGF-BB – *Platelet-Derived Growth Factor-BB*) i chemokiny np. czynnik płytkowy-4 (PF-4 – *Platelet Factor-4*) [52].

Stwierdzono również, że bFGF, podobnie jak VEGF, a także PDGF, wykazuje **właściwości neurotroficzne** i może pobudzać wzrost komórek układu nerwowego [47].

I.2.4.3. Białko chemotaktyczne dla monocytów

(MCP-1 – Monocyte Chemotactic Protein-1)

Białko chemotaktyczne monocytów jest glikoproteina o masie 14 kD, **zbudowaną** z 76 aminokwasów [57]. MCP-1 należy do rodziny chemokin, do podrodziny CC [58] i oznaczane jest również symbolem CCL2 [59]. Białko to jest kodowane przez pojedynczy gen [58]. Omawiana chemokina jest **produkowana** przez komórki śródbłonna, komórki mięśni gładkich naczyń i makrofagi [60]. Do zwiększenia ekspresji MCP-1 przyczyniają się takie czynniki jak stres oksydacyjny, obecność utlenianych cząsteczek lipidów i czynniki transkrypcyjne (np. NF- κ B – *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*; AP-1 – *Activator Protein-1*) [60]. MCP-1 jest wydzielane w dużych ilościach w początkowym stadium procesu gojenia się ran, a także w przebiegu wielu chorób o podłożu zapalnym, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów oraz miażdżycy naczyń krwionośnych [58]. Zwiększoną ekspresję genu kodującego MCP-1 stwierdzono we wczesnych stadiach czerniaka, w przebiegu raka piersi, jajnika oraz w ogniskach przerzutowych [58].

MCP-1 posiada aktywność chemotaktyczną, prozapalną i proangiogenną, przy czym wszystkie te efekty biologiczne są ze sobą ściśle powiązane [61].

Białko to wykazuje **aktywność chemotaktyczną** w stosunku do monocytów, limfocytów T, granulocytów zasadochłonnych i komórek NK (*Natural Killers*) [58]. Uważa się, że MCP-1 indukuje również chemotaksję komórek śródbłonna naczyń [58].

MCP-1 odgrywa kluczową rolę w inicjacji i progresji **procesu zapalnego** [60, 62]. Efektem jego chemotaktycznej aktywności jest migracja monocytów ze światła naczyń do śródbłonna, ich przekształcanie się w makrofagi, a następnie tworzenie komórek piankowatych na skutek pochłaniania utlenionych cząsteczek LDL oraz dalszy ich udział w formowaniu pasm tłuszczowych i powstawaniu blaszki miażdżycowej [61]. Tak więc, MCP-1 przyczynia się do inicjacji i progresji miażdżycy, a także do destabilizacji blaszki miażdżycowej oraz nasilenia zmian zakrzepowych, zwiększając tym samym ryzyko incydentów sercowo-naczyniowych [60].

Wykazano, że chemokina ta prezentuje również wyraźną **aktywność proangiogenną** [58, 62]. Pośredni wpływ MCP-1 na proces angiogenezy jest związany z odpowiedzią zapalną i wynika z chemotaktycznej aktywności tego białka w stosunku

do monocytów, prowadzącej do ich akumulacji i uwalniania przez nie licznych cytokin i czynników wzrostu [16, 58]. Bezpośredni wpływ na proces neowaskularyzacji jest wynikiem oddziaływania MCP-1 na komórki śródbłónka oraz mięśni gładkich naczyń, za pośrednictwem swoistego **receptora** CCR2 [58, 62]. Ekspresja receptora CCR2 na powierzchni komórek śródbłónka została wprawdzie potwierdzona [58], ale molekularne mechanizmy działania proangiogenego pozostają jeszcze niewyjaśnione [59]. Przeprowadzone w ostatnich latach badania wykazały, że przyłączenie się MCP-1 do CCR2 prowadzi do syntezy białka MCP-1-Inducted Protein (*MCP-1-Inducted Protein* – białko indukowane MCP-1) odpowiedzialnego za dalsze efekty aktywności biologicznej MCP-1 [61, 63].

Ponadto wykazano, że MCP-1 wpływa na udział komórek endotelium w tworzeniu struktur nowych naczyń, a istotną rolę w tym procesie odgrywiają metaloproteinazy [61], zwłaszcza typu MT1-MMP (*Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase*) [59]. MCP-1 w istotny sposób zwiększa ekspresję, kumulację, aktywność i funkcję wspomnianych metaloproteinaz w komórkach śródbłónka [59]. Wpływając na aktywność metaloproteinaz, MCP-1 indukuje polimeryzację aktyny i wpływa na szlaki sygnałowe przyczyniając się do aktywacji kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K – *Phosphatidylinositol 3-Kinase*) i małych białek GTPazowych – RhoA [59, 62].

MCP-1 zwiększa ekspresję genu kodującego HIF-1 α , który z kolei, poprzez aktywację MAPK, indukuje ekspresję VEGF, a szczególnie VEGF-A₁₆₅ – głównej izoformy indukującej angiogenezę [61, 62]. W ten sposób MCP-1 przyczynia się do nasilenia efektów VEGF, między innymi do zwiększenia przepuszczalności naczyń.

Wydaje się także, że MCP-1 jest mediatorem angiogenezy indukowanej przez TGF- β . Nasila rekrutację i migrację komórek mięśni gładkich i komórek mezenchymalnych w kierunku komórek endotelium wpływając w ten sposób na stabilizację i dojrzewanie nowopowstałego naczynia krwionośnego [64].

I.2.4.4. Angiogenina (ANG – Angiogenin)

Innym pośrednio działającym czynnikiem wzrostu naczyń, odgrywającym kluczową rolę we wczesnym etapie angiogenezy, jest angiogenina (RNaza 5). Jest to białko o masie około 14 kDa, **zbudowane** z pojedynczego łańcucha 123 aminokwasów [25, 65, 66]. Angiogenina należy do rodziny rybonukleaz [67], a jej sekwencja jest w 33% identyczna z i w 65% homologiczna do trzustkowej rybonukleazy A (RNazy A) [65]. Gen kodujący angiogeninę zlokalizowany jest na chromosomie 14q11 [68].

Angiogenina po raz pierwszy została **wyizolowana** z gruczołka jelita grubego [67, 68]. Głównym miejscem **syntezy** tego białka w warunkach fizjologicznych jest wątroba [69]. Ponadto angiogenina produkowana jest przez fibroblasty, monocyty i nabłonek jelita grubego [25]. Fakt, że obecność mRNA angiogeniny stwierdza się w komórkach zdrowych [67] i w komórkach nowotworowych [68] może świadczyć o istotnej roli tego czynnika, zarówno w angiogenezie fizjologicznej, jak i zachodzącej w warunkach patologicznych. Poziom angiogeniny w surowicy osób podlega ścisłej regulacji [67]. Podwyższone stężenia angiogeniny stwierdzono w różnych typach nowotworów [70], a także w przebiegu endometriozy, chorobach zapalnych jelit, reumatoidalnym zapaleniu stawów oraz miażdżycy naczyń obwodowych [68], przewlekłej niewydolności serca [71] i ostrych zespołach wieńcowych [65]. Doniesienia dotyczące poziomu angiogeniny u chorych na cukrzycę są rozbieżne. Stwierdzono między innymi, że poziom angiogeniny w surowicy jest obniżony u osób z cukrzycą typu 2 [72], przy czym jest niższy w przypadku dłuższej trwającej i/lub źle kontrolowanej choroby, w porównaniu do osób z dobrze kontrolowaną cukrzycą [73]. Z kolei u młodych osób chorujących na cukrzycę typu 1 stwierdzono podwyższony poziom angiogeniny w surowicy wykazujący związek z nasileniem powikłań mikroangiopatycznych. Jednocześnie zauważono, że długoterminowa kontrola glikemii przyczynia się do redukcji poziomu angiogeniny u badanych pacjentów [74].

Wykazano, że obecność angiogeniny jest niezbędna do **pobudzania angiogenezy** indukowanej przez inne czynniki proangiogenne, takie jak bFGF i VEGF [65, 75]. Angiogenina wykazuje słabą (blisko $10^5 \div 10^6$ słabszą w porównaniu do RNazy A),

aczkolwiek kluczową dla działania proangiogennej, aktywność enzymatyczną, typową dla rodziny rybonukleaz [65, 68].

Angiogenina **łączy się** z komórkami śródbłonna i mięśni gładkich naczyń za pośrednictwem 42-kDa białka [76] zwanego aktyną [65, 68, 77]. Powstały kompleks angiogenina-aktyna prowadzi do aktywacji kilku kaskad proteaz, między innymi proteazy serynowej plazminy i szczególnie istotnych dla przebiegu angiogenezy metaloproteinaz [25, 67]. Aktywacja tych enzymów proteolitycznych umożliwia degradację błony podstawnej naczynia [67]. Dodatkowo część powstałych kompleksów angiogenina-aktyna dysocjuje z powierzchni komórki, nasilając konwersję plazminy do plazminogenu, katalizowaną przez tkankowy aktywator plazminogenu (tPA – *tissue-type Plasminogen Activator*) [68]. Angiogenina przyczynia się do degradacji błony podstawnej, a także macierzy pozakomórkowej, umożliwiając migrację komórek śródbłonna do tkanek okołonaczyniowych [68]. Ponadto aktywuje komórki śródbłonna [69] oraz mięśni gładkich naczyń [68], nasilając ich proliferację oraz stymulując tworzenie struktury nowego naczynia [68]. Ponadto wykazano, że angiogenina stanowi molekułę adhezyjną dla komórek śródbłonna i fibroblastów [78]. Ze względu na takie działanie, angiogenina jest obecnie uznawana za nowy czynnik ryzyka miażdżycy [69].

Wykazano, że angiogenina wiąże się dodatkowo ze zlokalizowanym na powierzchni komórek śródbłonna białkiem o masie 170-kDa. Połączenie angiogeniny z tym receptorem skutkuje natychmiastową endocytozą i aktywacją różnych szlaków przekazywania sygnałów [65, 68].

Sugeruje się, że oba typy receptorów zlokalizowanych na powierzchni śródbłonna (aktyna i białko 170-kDa), ulegają ekspresji w innych warunkach i wpływają na rolę angiogeniny na różnych etapach angiogenezy [68].

Kolejny mechanizm działania proangiogennej angiogeniny, jest związany z jej translokacją do jąder komórkowych komórek śródbłonna i mięśni gładkich naczyń [65, 79], czego skutkiem jest nasilenie transkrypcji rybosomalnego RNA [68, 80].

Najnowsze badania wykazały także, że angiogenina nasila syntezę tlenu azotu, odgrywającego kluczową rolę w zapoczątkowaniu kaskady angiogenezy, stymulując aktywność śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS – *endothelial Nitric Oxide Synthase*),

a mechanizm tego działania jest związany z obecnością angiogeniny w jądrze komórkowym i jest niezależny od aktywności enzymatycznej typowej dla rybonukleaz [81].

Ponadto angiogenina hamuje degranulację neutrofilii i wykazuje **działanie immunosupresyjne** [69]. Wyniki przeprowadzonych do tej pory badań sugerują, że angiogenina wykazuje również **aktywność neuroprotekcijną** w ośrodkowym układzie nerwowym, a zaburzenie tej funkcji może mieć związek z progresją stwardnienia zanikowego bocznego (ALS – *amyotrophic lateral sclerosis*) [68]. Sugeruje się także potencjalnie neuroprotekcyjne działanie angiogeniny w terapii choroby Parkinsona [82]. Ostatnio odkryto również, że angiogenina wykazuje pewną **aktywność przeciw** bakteryjnym i grzybiczym **patogenom** [65].

I.2.5. Charakterystyka wybranych czynników antyangiogennych

I.2.5.1. Interleukina 10

Interleukina 10 jest cytokiną o bardzo szerokim spektrum działania. Stanowi jeden z głównych czynników o działaniu przeciwzapalnym [25, 83] i antyaterogennym [84-86], a według dotychczasowych badań wykazuje również istotną aktywność antyangiogenną [25, 83]. Wszystkie te działania są ze sobą ściśle powiązane.

Interleukina-10 występuje w postaci homodimeru złożonego z dwóch łańcuchów polipeptydowych i pod względem **budowy** przypomina IFN- γ [87].

Cytokina ta jest **produkowana** głównie przez aktywowane makrofagi i limfocyty pomocnicze Th2. Jej źródłem są również limfocyty regulatorowe Treg, monocyty oraz limfocyty B [25, 83].

Zasadnicza **rola** Il-10 polega na osłabieniu odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego oraz hamowaniu odpowiedzi zapalnej. Il-10 realizuje swoją aktywność biologiczną dzięki interakcji ze swoistym **receptorem** Il-10R, znajdującym się na powierzchni limfocytów T, limfocytów B, monocytów, makrofagów oraz komórek NK. W budowie receptora Il-10R wyróżnia się dwie podjednostki: α (Il-10R α , Il-10R1) i β (Il-10R β , Il-10R2). Dominującą rolę w transdukcji sygnału pełni Il-10R α [87].

Wielokierunkowe **działanie przeciwzapalne** Il-10 polega przede wszystkim na hamowaniu wydzielania cytokin prozapalnych Il-1, Il-2, Il-3, Il-6, Il-8, Il-12, TNF α ,

limfotoksyny, $\text{INF-}\gamma$ oraz czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów-makrofagów przez limfocyty Th1 [88]. Ponadto Il-10 zmniejsza zdolność prezentowania antygeny przez komórki prezentujące antygen (APC – *Antygen Presenting Cell*), czyli komórki dendrytyczne i makrofagi, przyczyniając się do przesunięcia różnicowania się linii limfocytarnej w kierunku odpowiedzi typu Th2 [89]. Zmniejsza także sekrecję $\text{INF-}\gamma$ i $\text{TNF-}\alpha$ przez komórki NK [88]. Il-10 nasila syntezę mediatorów przeciwzapalnych, takich jak rozpuszczalne receptory dla $\text{TNF-}\alpha$ i antagoniści receptora dla Il-1 [87]. Dodatkowo Il-10 posiada zdolność dezaktywacji makrofagów [83].

Il-10 wykazuje **działanie antyaterogenne** wpływając na regulację ekspresji wielu cząsteczek odgrywających istotną rolę w progresji miażdżycy w naczyniach krwionośnych. Efekt protekcyjny Il-10 jest związany ze zmniejszeniem aktywności czynnika $\text{NF-}\kappa\text{B}$ i hamowaniem szlaku sygnałowego zależnego od tego czynnika. Jest to skutkiem hamującego działania Il-10 na aktywność kinazy I κ B odpowiedzialnej za fosforylację białek inhibitorowych I κ B, niezbędnych do translokacji czynnika $\text{NF-}\kappa\text{B}$ z cytoplazmy do jądra komórkowego i jego aktywacji [88]. Dzięki temu Il-10 bierze udział w regulacji ekspresji cząstek prozapalnych oraz molekuł adhezyjnych i chemotaktycznych. Ponadto Il-10 wpływa bezpośrednio na ścianę naczyń, hamując proliferację komórek mięśni gładkich w początkowym etapie powstawania zmian miażdżycowych [85]. Dodatkowo cytokina ta hamuje syntezę rodników tlenowych, zmniejszając produkcję tlenku azotu [88, 90], a także zmniejsza ekspresję MHC II [88]. Il-10 hamuje syntezę metaloproteinaz odpowiedzialnych za destabilizację blaszki miażdżycowej [86, 88].

Przeprowadzone dotychczas badania poświęcone Il-10 wykazały jej istotną **rolę w regulacji procesu angiogenezy** [25]. Il-10 może bezpośrednio modulować niektóre szlaki komórkowe odgrywające istotną rolę w regulacji angiogenezy [83]. Działanie antyangiogenne Il-10 związane jest przede wszystkim z hamowaniem syntezy VEGF, głównego i bezpośredniego stymulatora angiogenezy [83]. Il-10 zmniejsza szczególnie sekrecję dwóch głównych izoform VEGF-A: VEGF_{165} i VEGF_{189} [88]. Jak wspomniano, Il-10 wykazuje zdolność dezaktywacji makrofagów, co skutkuje zmniejszeniem syntezy czynników proangiogennych, takich jak bFGF i $\text{TNF}\alpha$ [83, 88]

oraz Il-1 β , Il-6 i Il-8 [88]. Cytokina ta może także hamować cyklooksyzgenazę-2 (COX-2 – *Cyclooxygenase-2*), która również odgrywa rolę w przebiegu procesu angiogenezy [83]. Ponadto antyangiogenna aktywność Il-10 może mieć także związek z hamowaniem syntezy MMPs i/lub stymulacją tkankowych inhibitorów metaloproteinaz. Prowadzi to do zahamowania początkowej fazy angiogenezy związanej z degradacją błony podstawnej oraz macierzy pozakomórkowej, co umożliwia migrację komórek śródbłonna [25, 83, 86, 88]. Jak wspomniano, Il-10 hamuje aktywację komórek mięśni gładkich naczyń, która ma kluczowe znaczenie dla powstawania nowych naczyń. Działanie to jest efektem inaktywacji NF- κ B [85].

Stwierdzono, że przez swoje antyangiogenne działanie Il-10 może się przyczyniać między innymi do zahamowania wzrostu guza nowotworowego [25].

I.2.5.2. Interleukina 12

Interleukina-12 jest cytokiną odgrywającą kluczową rolę w regulowaniu odpowiedzi immunologicznej [91]. Wykazuje ona potwierdzone działanie prozapalne i proaterogenne [92, 93]. Udowodniono także, że może wpływać modyfikująco na proces angiogenezy [25].

Il-12 należy do rodziny strukturalnie zbliżonych, ale różniących się aktywnością biologiczną cytokin, do której zaliczane są również Il-23 i Il-27 [92, 94, ;95], a także odkryta niedawno Il-35 [96]. Pod względem **budowy** Il-12 jest heterodimerem złożonym z dwóch kowalencyjnie połączonych podjednostek: p35 i p40 [94, 96-98], przy czym p40 może występować w formie homodimeru o właściwościach antagonistycznych w stosunku do Il-12 [99]. Jedynie podjednostka p35 jest unikalna dla Il-12, podczas gdy podjednostka p40 jest wspólnym elementem struktury Il-12 i Il-23 [94, 100].

Il-12 jest **produkowana** przede wszystkim przez APC, czyli komórki dendrytyczne i makrofagi, już na wczesnych etapach odpowiedzi immunologicznej [94, 97, 98, 100]. Cytokina ta jest także wytwarzana przez keratynocyty, granulocyty i komórki tuczne [93]. **Aktywacja** produkcji Il-12 przez APC może przebiegać na drodze niezależnej od komórek T (w przebiegu której stymulatorami są komórki

zainfekowane przez patogeny, np. grzyby, bakterie) lub na drodze zależnej od komórek T (związanej z interakcją cząsteczki CD40 z ligandem na APC) [101, 102].

Il-12 realizuje swoją aktywność biologiczną dzięki oddziaływaniu ze swoistym **receptorem** Il-12R, zbudowanym z dwóch podjednostek β_1 i β_2 [94, 100] i zlokalizowanym na powierzchni komórek NK i limfocytów T [97]. Obie podjednostki są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania tej cytokiny, przy czym tylko podjednostka Il-12R β_2 jest unikalna dla aktywności Il-12, podczas gdy podjednostka Il-12R β_1 wchodzi także w skład receptora dla Il-23 [100].

Interleukina-12 uczestniczy w **regulowaniu odpowiedzi immunologicznej**, stymulując różnicowanie komórek Th0 w kierunku Th1 [92, 95, 97] z jednoczesnym zahamowaniem odpowiedzi typu Th2 [102, 103]. W ten sposób, poprzez środowisko odpowiednich cytokin, stwarza warunki do **rozwoju procesu zapalnego i formowania się blaszki miażdżycowej** [103]. Omawiana cytokina nasila proliferację, aktywację i zwiększa cytotoksyczność limfocytów T i komórek NK [93, 94, 96]. Ponadto stymuluje wydzielanie IFN- γ [91, 96, 98] i TNF- α . przez te komórki, nasilając reakcje zapalną i osłabiając mechanizmy naprawcze [93].

W 1995 roku po raz pierwszy zasugerowano potencjalnie **antyangiogenne działanie** Il-12, na podstawie obserwacji zahamowania neowaskularyzacji indukowanej przez bFGF pod wpływem tej cytokiny w modelu zwierzęcym [104].

Silna antyangiogenna aktywność Il-12 polega między innymi na nasilaniu ekspresji i sekrecji IFN- γ i IP-10 (*Interferon- γ -inducible Protein* – białko indukowane interferonem- γ), wykazujących działanie antyangiogenne [91, 95, 97, 104]. Ponadto wykazano, że Il-12 jest mediatorem antyangiogennej aktywności angiostatyny, stanowiącej jeden z głównych czynników hamujących proces neowaskularyzacji [100]. Mechanizm antyangiogennego działania angiostatyny jest związany nie tyle z bezpośrednim działaniem na naczynia, co z jej aktywnością immunomodulacyjną [100]. Angiostatyna stymuluje syntezę Il-12 w makrofagach [100]. Ponadto w badaniach przeprowadzonych na modelach zwierzęcych wykazano, że zablokowanie funkcji Il-12 (zarówno poprzez zablokowanie jej sekrecji, jak i możliwości odpowiedzi na tę interleukinę), całkowicie uniemożliwia realizację antyangiogennej aktywności angiostatyny [100]. Wiadomo również, że Il-12 powoduje zmniejszenie ekspresji

ważnych czynników proangiogennych, stanowiących mitogeny dla komórek śródbłonna, między innymi VEGF [105] i bFGF [97]. Co więcej, Il-12 oddziałuje bezpośrednio na integryny $\alpha_v\beta_3$, odpowiedzialne za przenoszenie sygnałów z przestrzeni pozakomórkowej do wnętrza komórki. Dzięki temu hamuje przebieg kluczowych etapów angiogenezy, takich jak różnicowanie, proliferacja i migracja komórek śródbłonna, a także zmniejsza przeżycie tych komórek [91]. Opisano także hamujący wpływ Il-12 na ekspresję MMPs, odpowiedzialnych w początkowej fazie angiogenezy za degradację błony podstawnej oraz macierzy pozakomórkowej, stanowiących barierę dla migracji komórek śródbłonna [98].

Udowodniono także, iż Il-12 przyczynia się do **zahamowania wzrostu guza nowotworowego** [25, 104]. Ponadto zaobserwowano zmniejszenie unaczynienia tkanek po implantacji fibroblastów produkujących Il-12 [97].

I.2.6. Znaczenie angiogenezy w patogenezie cukrzycy typu 2 i jej powikłań

Zaburzenia angiogenezy w przebiegu cukrzycy typu 2 mogą mieć istotny wpływ na pogorszenie stanu zdrowia pacjentów. Proces nowotworzenia naczyń krwionośnych odgrywa ważną rolę w powstawaniu późnych powikłań tego schorzenia [4]. Istotnym czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój tych powikłań jest zarówno degradacja już istniejących, jak i zaburzenia tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Zmiany te dotyczą zarówno najmniejszych naczyń krwionośnych, jak i tych dużych [23].

Przejawem tego działania jest między innymi:

- upośledzenie gojenia się ran,
- rozwój retinopatii, nefropatii i neuropatii cukrzycowej,
- rozwój kardiomiopatii cukrzycowej,

a przede wszystkim

- rozwój i pogorszenie przebiegu miażdżycy u tych pacjentów [106].

Mechanizm zaburzeń angiogenezy u osób cierpiących na cukrzycę typu 2 nie został jak dotąd w pełni wyjaśniony. Wykazano, że zarówno u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2, jak i u pacjentów z miażdżycą obserwuje się zmiany stężenia czynników proangiogennych we krwi, zwykle ich wzrost. Przy czym efekt wywierany przez te czynniki proangiogenne u osób chorujących na cukrzycę typu 2

może być różny. Przyczyną odmiennego działania czynników stymulujących angiogenezę u cukrzyków jest z pewnością współwystępowanie dodatkowych bodźców związanych z patogenezą cukrzycy [23].

Zaburzenia towarzyszące cukrzycy takie jak hiperglikemia, hipoksja, czy stres oksydacyjny prowadzą do zwiększenia ekspresji genu dla VEGF, który wpływa bezpośrednio na komórki śródbłonka naczyń, powoduje zwiększenie ich przepuszczalności i indukuje proliferację.

Wydaje się, że najistotniejszym czynnikiem modyfikującym stężenia i aktywność czynników proangiogennych u cukrzyków jest hiperglikemia [107]. Wykazano, że wysoki poziom glukozy przyczynia się do uszkodzenia komórek śródbłonka, odgrywających kluczową rolę w procesie angiogenezy [23, 108]. Stwierdzono, że w przebiegu cukrzycy typu 2 dochodzi do upośledzenia uwalniania komórek progenitorowych śródbłonka ze szpiku kostnego i zaburzenia funkcji tych komórek. Zaobserwowano, że zmniejszenie liczby krążących komórek progenitorowych jest proporcjonalne do poziomu hemoglobiny glikowanej [106].

W przypadku krótkotrwałej stymulacji bodźcem, czyli w sytuacji wystąpienia ostrej hiperglikemii, możemy zaobserwować u pacjentów zahamowanie angiogenezy, rozumianej jako arteriogeneza, czyli proces powstawania lub remodelingu dużych naczyń krwionośnych. Z kolei w przypadku długotrwałej stymulacji, czyli przewlekłej hiperglikemii, obserwujemy u pacjentów nasilenie angiogenezy, ale tym razem rozumianej jako tworzenie kapilar w ścianach naczyń tętniczych [5].

W pierwszym omawianym przypadku, czyli na skutek zmniejszenia arteriogenezy, dochodzi do zahamowania wytwarzania naczyń obocznych w odpowiedzi na niedokrwienie, na przykład w obrębie krążenia wieńcowego lub w obrębie kończyn dolnych.

Z kolei w drugim przypadku, nasilenie angiogenezy w ścianach tętnic na skutek przewlekłej hiperglikemii, może prowadzić we wczesnej fazie miażdżycy do zmniejszenia lub zwiększenia migracji komórek zapalnych do ściany naczynia, czego konsekwencją może być nasilenie bądź remisja miażdżycy. Natomiast w późnej fazie procesu miażdżycowego nasilenie angiogenezy, skutkujące wrastaniem naczyń w blaszkę miażdżycową, może prowadzić do jej destabilizacji, a w konsekwencji

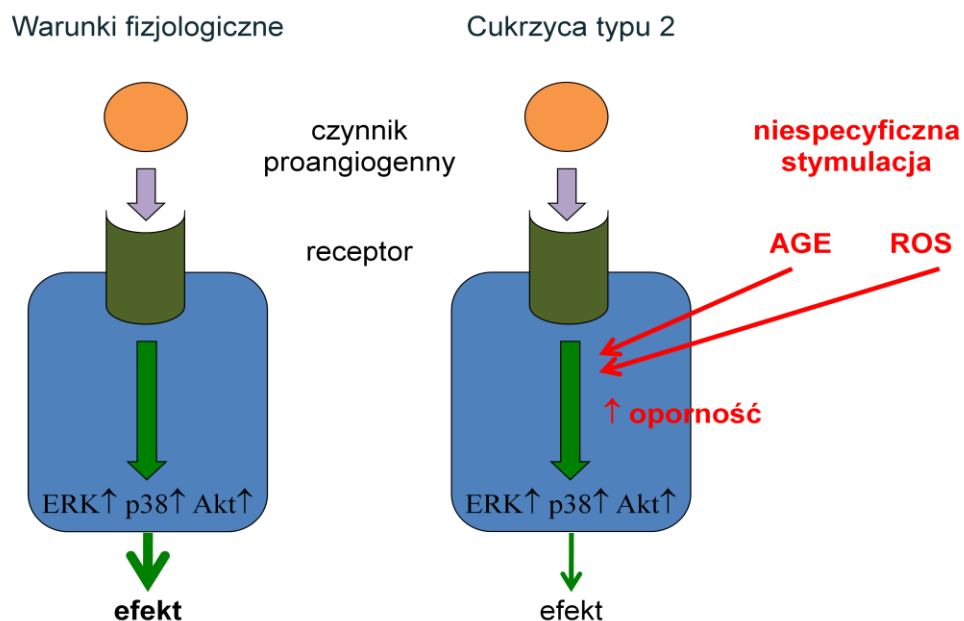
do zwiększenia ryzyka choroby niedokrwiennej serca, incydentów sercowo-naczyniowych, czy udaru. Wzmoczona angiogeneza w obrębie blaszki miażdżycowej stanowi jedną z kluczowych przyczyn niezwykle niekorzystnego przebiegu procesu miażdżycowego u chorych na cukrzycę. Może ona powodować nasilenie migracji leukocytów, erytrocytów i płytek do ściany naczynia, co związane jest ze znaczną progresją miażdżycy. Ponadto może zwiększać nasilenie miejscowego procesu zapalnego toczącego się w obrębie naczynia. Na skutek angiogenezy dochodzi do przyspieszenia tworzenia się nekrotycznego jądra lipidowego, a także do zmniejszenia funkcji ochronnej tzw. czapeczki włóknistej. Wzmożenie procesów angiogenezy w ścianie zmienionego miażdżycowo naczynia oznacza także ryzyko krwawienia do blaszki miażdżycowej. W konsekwencji tych zaburzeń naczyniotworzenie obejmujące blaszkę miażdżycową może być bezpośrednią przyczyną jej pęknięcia i w następstwie powodem zamknięcia naczynia [109].

Czynniki proangiogenne realizują swe funkcje za pośrednictwem odpowiednich receptorów, zlokalizowanych między innymi na powierzchni komórek śródbłonna. Efekty stymulacji receptorów przez czynniki proangiogenne w warunkach fizjologicznych i w przebiegu cukrzycy mogą być odmienne.

W warunkach fizjologicznych czynnik proangiogeny łącząc się z odpowiednim receptorem wywołuje odpowiedź w postaci aktywacji szlaku angiogenezy.

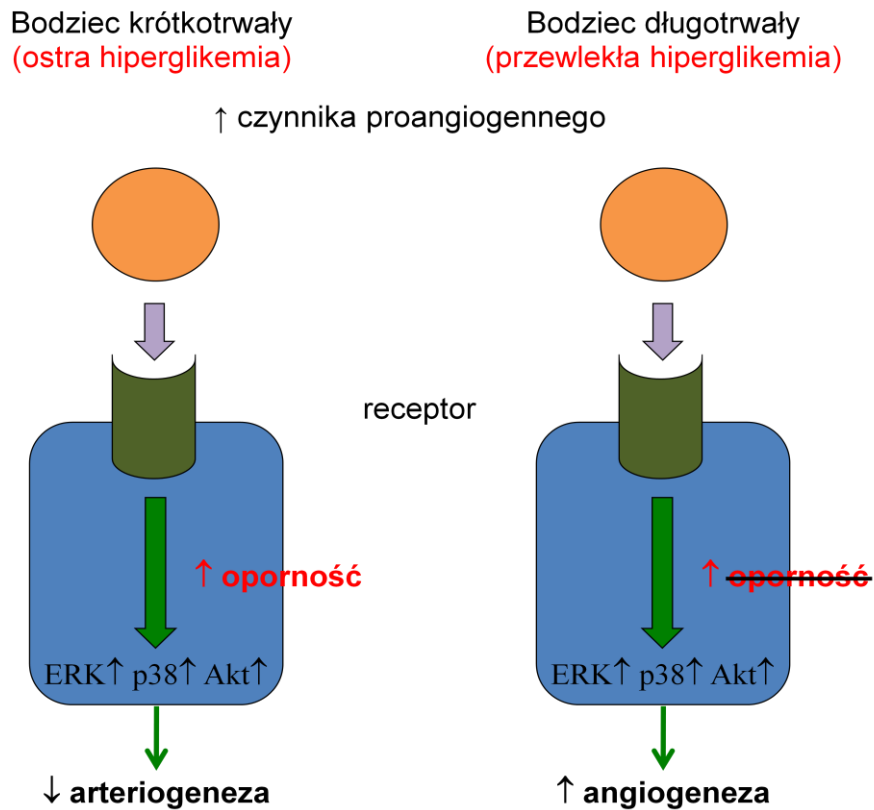
Natomiast u osób chorujących na cukrzycę typu 2 pojawiają się dodatkowe bodźce charakterystyczne dla przebiegu tej choroby. Należy tu wymienić między innymi obecność zaawansowanych produktów końcowych glikacji białek (AEG – *Advanced Glycation End Products*), czy wolnych rodników (ROS – *Reactive Oxygen Species*) [4, 5, 23, 106]. Czynniki te modyfikują w sposób ciągły szlak angiogenezy na poziomie postreceptorowym. Efektem tej niespecyficznego stymulacji, mimo wzrostu stężenia czynników proangiogennych, jest wzrost oporności na ich działanie. W konsekwencji u chorych na cukrzycę typu 2 nawet zwiększone stężenie czynników proangiogennych może wywoływać efekty mniejsze niż w warunkach fizjologicznych. Skutkiem tych zmian jest przede wszystkim zmniejszenie aktywacji Akt-1 (serynowo-treoninowa kinaza białkowa) i eNOS, które są głównymi efektorami szlaków sygnałowych VEGF [5, 106, 110] (Ryc. 2).

Warto podkreślić, że w omawianym procesie u chorych na cukrzycę typu 2 występuje pozorna sprzeczność dotycząca modulacji angiogenezy. Polega ona na tym, że krótkotrwale działający bodziec, jakim jest ostra hiperglikemia, nie jest wystarczająco silny by przełamać oporność na działanie czynników proangiogennych. W konsekwencji dochodzi więc do zahamowania angiogenezy-arteriogenezy. Natomiast w przypadku długotrwałego działania bodźca, czyli na skutek przewlekłej hiperglikemii, następuje przełamanie oporności i nasilenie angiogenezy w ścianach naczyń [5, 106] (Ryc.3).



AGE – zaawansowane produkty końcowe glikacji (*Advanced Glycation End products*);
 ROS – reaktywne formy tlenu (*Reactive Oxygen Species*); ERK – kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo (*Extracellular Signal-Regulated Kinases*); p38 – białko p38 (*protein38*);
 Akt – serynowo-treoninowa kinaza białkowa

Ryc. 2. Odmienny przebieg angiogenezy w warunkach fizjologicznych i w przebiegu cukrzycy typu 2 [5 w modyfikacji własnej]



ERK – kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo (*Extracellular Signal-Regulated Kinases*);
 p38 – białko p38 (*protein38*); Akt – serynowo-treoninowa kinaza białkowa

Ryc. 3. Modyfikacja procesu angiogenezy pod wpływem bodźców towarzyszących przebiegowi cukrzycy typu 2 [5 w modyfikacji własnej]

I.3. Statyny

Inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo koenzymu A (**HMG-CoA** – *3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A*), zwane statynami, stanowią obecnie podstawową i jak dotąd jedną z najbardziej skutecznych oraz najlepiej tolerowanych grup leków stosowanych w celu leczenia zaburzeń lipidowych. Jednocześnie leki z tej grupy należą do najbardziej popularnych i najczęściej stosowanych na całym świecie. Szacuje się, że obecnie ponad 100 mln osób na całym świecie przyjmuje statyny [111]. Aktualnie w Polsce dopuszczono do obrotu 6 substancji należących do grupy statyn. Są to atorwastatyna, fluwastatyna, lowastatyna, prawastatyna, rosuwastatyna i simwastatyna [112]. W lecznictwie światowym, głównie w Japonii, od 2003 roku dostępna jest również pitawastatyna [113]. Jedną z najnowszych substancji z tej grupy jest glenwastatyna (HR780) zsyntetyzowana przez naukowców z niemieckiej firmy Aventis Pharma Ltd. [114-116]. Korzyści wynikające ze stosowania statyn są tak wyraźne, że mimo pewnych zastrzeżeń, w 2004 roku w Wielkiej Brytanii, simwastatyna jako pierwsza substancja z tej grupy została dopuszczona do sprzedaży bez recepty lekarskiej (OTC – *Over-The-Counter*) [2, 117].

I.3.1. Kontekst historyczny i klasyfikacja statyn

Pionierami badań, które doprowadziły do przełomu w leczeniu zaburzeń gospodarki lipidowej, byli japońscy naukowcy Akira Endo i Masao Kuroda [118]. Zapoczątkowane przez nich w 1971 roku badania, poświęcone początkowo analizowaniu zdolności niektórych mikroorganizmów do hamowania syntezy steroli i izoprenoidów, doprowadziły do odkrycia nowej grupy leków zwanych statynami [119]. W trakcie wieloletnich prac przebadano ponad 6000 szczepów bakteryjnych, poszukując nowej substancji, skutecznej w leczeniu zaburzeń lipidowych. Pierwszym kluczowym momentem prowadzonych doświadczeń było wyizolowanie z *Pythium ultimum* antybiotyku cytryniny, będącego słabym i nieodwracalnym inhibitorem biosyntezy cholesterolu [119]. W 1973 roku dalsze badania prowadzone przez Endo et al. zaowocowały wyodrębnieniem z pleśni *Penicillium citrinicum* związku oznaczonego jako ML-236B [118-120]. W 1976 Michael Brown i Joseph Goldstein wyekstrahowali identyczną substancję z *Penicillium brevicompactum*, nazywając ją

kompaktną. Substancja ta, znana obecnie jako mewastatyna, była pierwszym odwracalnym inhibitorem syntezy cholesterolu, działającym znacznie silniej od cytryniany [121]. Analiza budowy tej substancji pozwoliła zauważyć strukturalne podobieństwo do HMG-CoA [2, 118, 120]. Z kolei badania prowadzone przez Browna i Goldsteina przyczyniły się do sprecyzowania mechanizmu jej działania, polegającego na hamowaniu reduktazy HMG-CoA [121]. Rozpoczęte w 1978 roku, przez doktora Akira Yamamoto, badania kliniczne z udziałem mewastatyny, zostały przerwane 2 lata później, ze względu na onkogenne działanie dużych dawek mewastatyny, stwierdzone w długoterminowym badaniu toksyczności u psów [118, 120, 122]. Dalsze badania doprowadziły do otrzymania innych substancji o podobnym działaniu, lecz znacznie mniejszej toksyczności, które wkrótce zostały wprowadzone na rynek farmaceutyczny.

Klasyfikacja inhibitorów reduktazy HMG-CoA, oparta na sposobie ich otrzymywania wyróżnia trzy generacje.

Statyny I generacji to substancje naturalne. Pierwszą statyną zatwierdzoną w 1987 roku przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA – *US Food and Drug Administration*) do stosowania u ludzi była lowastatyna (Lipobay[®], Merck). Jest to związek naturalnego pochodzenia, który został wyizolowany w 1979 roku przez Alfreda Alberta i wsp. z firmy Merck z kultur *Aspergillus terreus*, (jako mewalonina) [123-125] oraz przez Akire Endo i wsp. z *Monascus ruber* (jako monakoliną K) [118-120].

Statyny II generacji to związki półsyntetyczne. Do tej generacji zaliczane są: prawastatyna i simwasatyna, obecnie otrzymywane poprzez chemiczną modyfikację naturalnych produktów [120, 126]. Prawastatyna (nazwa robocza CS-514), została w 1986 roku wyizolowana przez Hurayama i wsp., jako aktywny metabolit mewastatyny, z bakterii *Nocardia autotrophica*, obecnych w moczu psów. W 1991 roku substancja ta została zatwierdzona przez FDA do stosowania klinicznego (Mevalotin[®], Sankyo Pharma Inc.), a w 2006 roku w Stanach Zjednoczonych wprowadzono pierwszy lek generyczny (Pravachol[®], Bristol-Myers Squibb). Simavastatyna (MK-733), wyizolowana jako syntetyczna pochodna produktów fermentacji *Aspergillus terreus*, została zatwierdzona przez FDA w 1991 roku (Zocor[®], Merck). [2, 126].

Statyny III generacji to związki syntetyczne. Pierwszą całkowicie syntetyczną statyną była fluwastatyna (Lescol[®], Norvatis) wprowadzona do lecznictwa w 1993 roku, a kolejną atorwastatyna (Lipitor[®], Pfizer), zatwierdzona w 1996 roku. Ceriawastatyna (Baycol[®], Lipobay[®], Bayer) zarejestrowana w 1997 roku, została wycofana 4 lata później, z powodu doniesień o śmiertelnych przypadkach rabdomiolizy. W 2003 roku wprowadzono dwie kolejne substancje z tej grupy, czyli rosuwastatynę (Crestor[®], AstraZeneca) oraz niezarejestrowaną jeszcze w Polsce pitawastatynę [2, 10, 127].

Poszukiwanie nowych substancji z grupy inhibitorów reduktazy HMG-CoA jest przedmiotem badań wielu ośrodków naukowych na świecie, w których systematycznie przeprowadza się syntezę nowych związków, poszukując substancji o najkorzystniejszych właściwościach farmakokinetycznych, najlepszym profilu bezpieczeństwa i najszerszych zastosowaniach terapeutycznych. Wyniki prowadzonych aktualnie badań są obiecujące i najprawdopodobniej wkrótce przyczynią się do wprowadzenia nowych substancji z grupy statyn do praktyki klinicznej.

I.3.2. Budowa chemiczna statyn

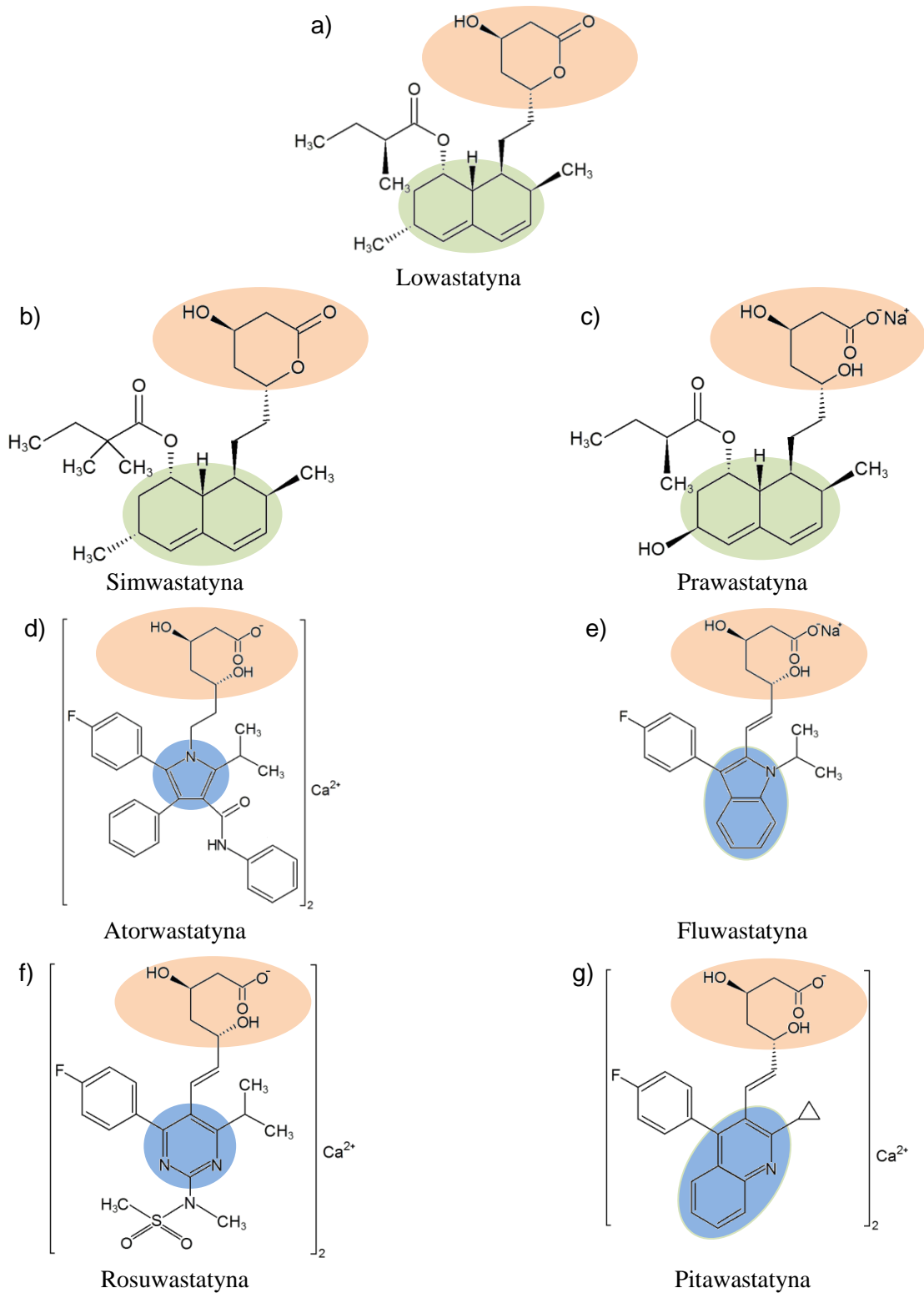
Mimo znacznych różnic w budowie chemicznej wszystkie statyny posiadają pewne wspólne elementy strukturalne odpowiedzialne za ich mechanizm działania. Cząsteczki statyn posiadają dwa zasadnicze fragmenty: ugrupowanie hydroksykwasowe, strukturalnie podobne do HMG-CoA oraz związany z nim kowalencyjnie centralny pierścień hydrofobowy z podstawnikami bocznymi. Oba te fragmenty uczestniczą w interakcji z enzymem. Wzory strukturalne poszczególnych statyn przedstawiono na rycinie 4.

Uwzględniając różnice w budowie chemicznej powszechnie wyróżnia się dwa typy statyn [128].

Statyny typu I to naturalna lowastatyna oraz półsyntetyczne simwastatyna i prawastatyna, które posiadają w swej strukturze centralny pierścień heksahydronaftalenowy, połączony z dwoma głównymi łańcuchami bocznymi [128]. Pierwszym łańcuchem jest ugrupowanie butyrylowe, czyli: ester metylowy kwasu masłowego – w przypadku lowastatyny i prawastatyny lub ester dimetylowy kwasu masłowego – w cząsteczce simwastatyny. W drugim łańcuchu bocznym występuje

kwasy hydroksylowe, tworzący sześcioczłonowy analog związku pośredniego w reakcji zachodzącej przy udziale HMG-CoA. Lowastatyna i simwastatyna są prolekami, występującymi w postaci laktonów, przekształcanych w wątrobie do aktywnych kwasów. Prawastatyna występuje w aktywnej postaci kwasowej, z otwartym pierścieniem [126].

Statyny typu II to związki syntetyczne, czyli atorwastatyna, fluwastatyna, rosuwastatyna oraz pitawastatyna, (a także wycofana ceriwastatyna). Pieścień centralny tych związków stanowi aktywne ugrupowanie heteroaromatyczne, podstawione ugrupowaniem izopropylowym. Kolejne podstawniki to: reszta fluorofenyłowa, umożliwiająca dodatkową interakcję z enzymem oraz łańcuch heptanokarboksylowy, strukturalnie podobny do produktu pośredniego HMG-CoA [128]. Ponadto atorwastatyna i rosuwastatyna tworzą wiązania wodorowe z aktywnym centrum enzymu. Rosuwastatyna ma także zdolność tworzenia dodatkowego wiązania z udziałem elektroujemnej grupy sulfonowej obecnej w jej cząsteczce [128]. Statyny syntetyczne stosowane są w postaci aktywnej z otwartym pierścieniem: fluwastatyna – jako sól sodowa oraz atorwastatyna, rosuwastatyna i pitawastatyna – jako sole wapniowe [126].



■ ugrupowanie hydroksykwasowe; ■ pierścień heksahydronaftalenowy; ■ pierścień heteroaromatyczny.

Ryc. 4. Budowa statyn:

a) naturalne; b), c) półsyntetyczne; d), e), f), g) syntetyczne;
 a), b), c) typ I; d), e), f), g) typ II [126 w modyfikacji własnej]

I.3.3. Własności farmakokinetyczne statyn

Poszczególne substancje należące do inhibitorów reduktazy HMG-CoA różnią się między sobą pod względem właściwości farmakokinetycznych.

Po podaniu doustnym wszystkie statyny **wchłaniają się** w jelitach dobrze (w granicach 30÷85% podanych dawek) i szybko (maksymalne stężenia w osoczu osiągane są po 1÷4 godzinach). Podawanie leku razem z pokarmem wpływa modyfikująco na absorpcję statyn, zwiększając biodostępność lowastatyny, natomiast obniżając ją w przypadku atorwastatyny, fluwastatyny i prawastatyny [2]. Większość statyn jest wchłaniana w postaci aktywnych farmakologicznie β -hydroksykwasów. Jedynie lowastatyna i simwastatyna podawane są w formie proleków i wymagają endogennej aktywacji w wątrobie. Nieaktywne formy laktonowe obu statyn są hydrolizowane przy udziale nieswoistych karboksyesteraz do aktywnych hydroksykwasów [2, 126, 129].

Dystrybucja poszczególnych statyn jest zróżnicowana. Większość statyn wiąże się w znacznym stopniu (>95%) z białkami osocza. Wyjątkiem jest prawastatyna wiążąca się z białkami osocza tylko w ok. 50% [2, 129, 130]. Statyny o charakterze lipofilowym łatwo dyfundują przez błony komórkowe, uzyskując szeroki dostęp do różnych tkanek, co może prowadzić do ogólnoustrojowych działań niepożądanych. Z kolei silnie hydrofilowa prawastatyna, a także względnie hydrofilowa rosuwastatyna są transportowane do wnętrza hepatocytów przy udziale aktywnego systemu przekaźnikowego [10, 117, 125]. Charakter hydrofilowy statyn ogranicza ich dystrybucję, sprzyjając większej hepato selektywności [10, 130, 131]. Może to mieć istotny wpływ na ograniczenie działań niepożądanych tych leków, na przykład ze strony mięśni lub ośrodkowego układu nerwowego [2]. Z drugiej jednak strony konsekwencją może być zmniejszenie niezwykle korzystnego działania statyn w obrębie ściany naczyń krwionośnych [132].

Wszystkie statyny podlegają znacznemu efektowi pierwszego przejścia przez wątrobę (FPE – *first pass effect*), na skutek czego biodostępność systemowa statyn i ich metabolitów jest niska i waha się w granicach 5÷30% [129]. Większość statyn ulega **metabolizmowi** w siateczce śródplazmatycznej wątroby przy udziale cytochromu P450. Lowastatyna, simwastatyna i atorwastatyna są metabolizowane przez izoformę CYP3A4.

Za metabolizm fluwastatyny odpowiada izoforma CYP2C9, a także w mniejszym stopniu CYP3A4 i CYP2C8 [132, 133]. Rosuwastatyna (podobnie jak niedostępna w Polsce pitawastatyna) tylko w nieznacznym stopniu jest metabolizowana przy udziale cytochromu P450 [127]. Wyjątek stanowi prawastatyna ulegająca enzymatycznej biotransformacji w cytozolu hepatocytów [2, 117, 129, 134]. Na skutek wątrobowych przemian większości statyn powstają aktywne metabolity. Wyjątek stanowi fluwastatyna i prawastatyna [2, 129, 134]. Różnice w zakresie metabolizmu mogą mieć istotne znaczenie z punktu widzenia możliwych interakcji międzylekowych, szczególnie, że statyny zwykle stosowane są w politerapii. Problem ten dotyczy zwłaszcza jednoczesnego stosowania statyn metabolizowanych przez izoformę CYP3A4 z inhibitorami enzymatycznymi, co prowadzi do wzrostu biodostępności, a także zwiększenia ryzyka działań niepożądanych statyn [11, 135-137].

Biologiczny okres półtrwania większości statyn wynosi zaledwie $0,5 \div 4$ godzin, stąd zalecenie by leki te przyjmować wieczorem, uwzględniając fizjologiczne nasilenie syntezy endogenego cholesterolu w nocy [2, 130]. Jedynie w przypadku atorwastatyny ($15 \div 30$ h) i rosuwastatyny (19 h) biologiczny okres półtrwania jest dłuższy [2, 129]. Czas trwania efektu farmakodynamicznego statyn wynosi średnio 24 godziny i nie zależy od $t_{0,5}$. Maksymalny efekt działania hipolipemicznego statyn obserwuje się po około $4 \div 6$ tygodniach stosowania.

Statyny **wydalane** są głównie z żółcią, dlatego u pacjentów z niewydolnością wątroby znacznie wzrasta ryzyko kumulacji i wystąpienia działań niepożądanych. Wydalanie leku przez nerki z moczem zachodzi tylko w niewielkim stopniu, jednak zaburzenia funkcji nerek mogą wymagać redukcji dawki niektórych statyn [2].

I.3.4. Działania niepożądane statyn

Statyny zaliczane są do substancji leczniczych o dobrym profilu bezpieczeństwa [10]. Działania niepożądane wynikające ze stosowania tych leków najczęściej mają charakter łagodny i przemijający. Występują zazwyczaj u pacjentów leczonych przewlekłe, wysokimi dawkami statyn [11, 138]. Wykazano, że z nieznanymi przyczyn, pacjenci nietolerujący jednej ze statyn mogą dobrze reagować na inne substancje z tej grupy. Dlatego w przypadku stwierdzenia łagodnych działań niepożądanych, zalecana jest

w pierwszej kolejności zmiana leku, a dopiero w przypadku wyraźnej konieczności zaprzestanie terapii z użyciem statyn, na skutek pojawienia się klinicznie groźnych działań niepożądanych [111].

U pacjentów przyjmujących statyny przejściowo mogą występować zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego, zwykle ustępujące po czasowym obniżeniu dawki leku. Najczęściej zgłaszane przez pacjentów dolegliwości żołądkowo-jelitowe to: bóle brzuch, zaparcia, wzdęcia, biegunki, mdłości i dyspepsja [11, 111]. Jeszcze rzadziej pojawiają się takie działania niepożądane jak: bóle głowy, zmęczenie, zaburzenia snu, zaburzenia apetytu, zespoły pozapiramidowe i depresyjne, zaburzenia pamięci, neuropatia, skórne reakcje alergiczne, impotencja u mężczyzn, a także bóle stawowe i tendinopatie [2, 11, 111, 135].

Do najpoważniejszych działań niepożądanych, związanych ze stosowaniem statyn należą hepatotoksyczność oraz miotoksyczność.

Upośledzenie czynności wątroby, przejawiające się głównie zwiększeniem aktywności enzymów wątrobowych, jest najczęściej raportowanym działaniem niepożądanim na skutek stosowania statyn [2]. Zaburzenia takie występują u 1÷3% pacjentów, zwykle na początku terapii, są zależne od stosowanej dawki leku i przeważnie wracają do normy po krótkotrwałym przerwaniu terapii [135]. W przypadku utrzymującego się wzrostu aktywności aminotransferaz, przekraczającego normę trzykrotnie, zaleca się odstawienie leku. Ciężka hepatotoksyczność występuje rzadko [2, 11, 111, 126].

Głównym, klinicznie istotnym i potencjalnie zagrażającym życiu działaniem niepożądanim inhibitorów reduktazy HMG-CoA jest miotoksyczność. Sugeruje się, że jej przyczyną mogą być zmiany struktury i funkcji błon komórkowych na skutek wewnątrzkomórkowego zahamowania syntezy cholesterolu, a także zaburzenia mitochondrialne na skutek upośledzenia syntezy ubichinonu [2, 11, 126, 139]. Częstość występowania przypadków miotoksyczności i charakter objawów zależą od rodzaju i dawki stosowanej statyny. Najczęściej u pacjentów występuje łagodny, czasami nawet bezobjawowy, wzrost aktywności fosfokinazy kreatyninowej (CPK). Ewentualne objawy towarzyszące to ból, kurcze i osłabienie siły mięśni. Dolegliwości ze strony mięśni mogą również występować bez widocznych zaburzeń biochemicznych.

Najpoważniejszą konsekwencją miopatii jest rozpad mięśni prążkowanych, czyli rabdomioliza. Jej objawy to silne bóle mięśni i ponad 10-krotne przekroczenie górnej granicy normy stężenia CPK w surowicy [2, 11, 111, 133, 140]. Dodatkowym symptomem jest ciemne zabarwienie moczu spowodowane obecnością mioglobiny. Pojawiająca się niewydolność nerek i zaburzenia rytmu serca stanowią potencjalne zagrożenie życia pacjenta. Częstość występowania śmiertelnych przypadków rabdomiolizy nie przekracza jednego zdarzenia na milion pacjentów przyjmujących statyny [135]. W przypadku wystąpienia u pacjenta przyjmującego statynę takich objawów jak bóle lub osłabienie siły mięśni, objawy grypopodobne, zmęczenie, ogólne złe samopoczucie, konieczne jest szybkie oznaczenie aktywności CPK. W przypadku stwierdzenia podwyższonego stężenia CPK, dwukrotnie przekraczającego górną granicę normy, konieczne jest odstawienie leku, zapewniające zwykle całkowite ustąpienie objawów. Ryzyko wystąpienia wywołanych przez statyny działań niepożądanych ze strony mięśni wzrasta zwłaszcza w przypadku jednoczesnego stosowania fibratów, kwasu nikotynowego, digoksyny lub leków stanowiących inhibitory odpowiednich lizoform cytochromu P450, zwłaszcza CYP3A4 [11, 111, 126, 136].

Ze względu na ryzyko poważnych działań niepożądanych inhibitory reduktazy HMG-CoA nie powinny być stosowane u osób, u których stwierdzono nadwrażliwość na lek, hipercholesterolemię rodzinną homozygotyczną (z wyjątkiem atorwastatyny), aktywną chorobę wątroby, podwyższoną aktywność aminotransferaz w surowicy lub zaburzenia wydzielania żółci.

Stosowanie statyn jest także przeciwwskazane w trakcie ciąży (kategoria X, wg klasyfikacji FDA leków stosowanych w ciąży), w okresie karmienia oraz u kobiet w wieku rozrodczym, niestosujących antykoncepcji, a także u dzieci [2, 126].

I.3.5. Mechanizm działania statyn

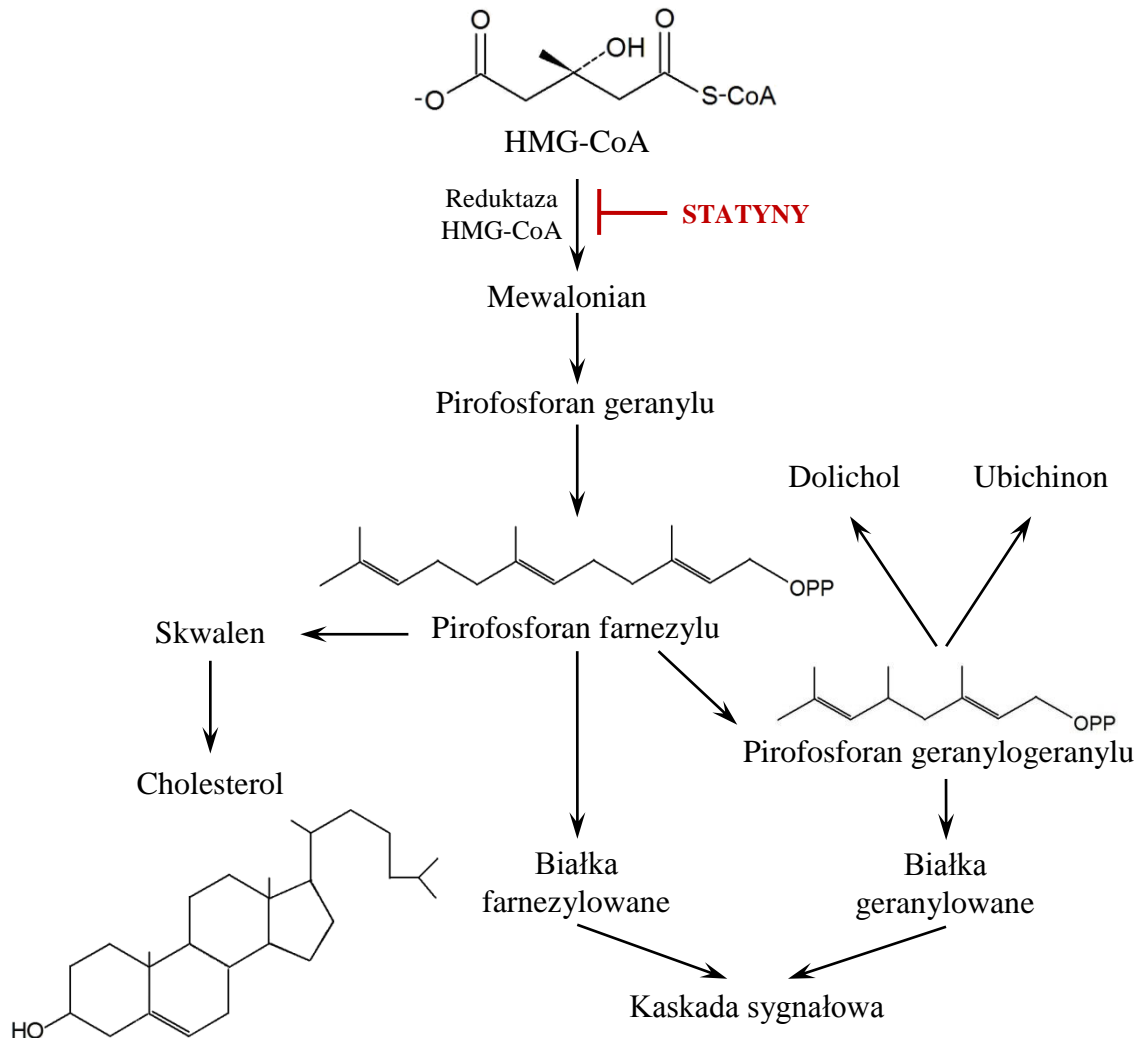
Mechanizm działania statyn polega na specyficznym, kompetycyjnym i odwracalnym hamowaniu aktywności reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A (*HMG-coenzyme A reductase*), enzymu uczestniczącego w biosyntezie cholesterolu w organizmie człowieka (Ryc.5). Statyny, dzięki strukturalnemu podobieństwu do naturalnych substratów, blokują przekształcanie HMG-CoA

do mewalonianu, hamując jeden z kluczowych etapów biosyntezy cholesterolu. Reakcja katalizowana przez reduktazę HMG-CoA zachodzi na wczesnym etapie biosyntezy cholesterolu i jest reakcją ograniczającą szybkość tej syntezy [111, 125, 126].

Główne działanie statyn polega na zmniejszeniu endogennej syntezy cholesterolu. W odpowiedzi na zahamowanie wytwarzania cholesterolu w hepatocytach, na drodze enzymatycznej dochodzi do uwolnienia z siateczki śródplazmatycznej białka SREBPs (*Sterol Regulatory Elements-Binding Proteins*). Na skutek wiązania się tego białka z elementem regulatorowym wrażliwym na sterol (SRE – *Sterol Regulatory Element*), znajdującym się w obrębie promotora kilku genów, dochodzi do nasilenia ekspresji różnych genów uczestniczących w metabolizmie cholesterolu, w tym genu kodującego receptor dla LDL (*Low Density Lipoprotein*) [2]. Jednocześnie następuje zmniejszenie degradacji receptorów dla LDL. W efekcie dochodzi do znacznego zwiększenia ilości tych receptorów na powierzchni hepatocytów, co umożliwia większy wychwyty i szybsze usuwanie LDL z krwi, prowadząc w konsekwencji do obniżenia stężenia tej frakcji cholesterolu we krwi [2, 125]. Ponadto statyny mogą redukować stężenie LDL także nasilając usuwanie prekursorów LDL, czyli VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) i IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*), bogatych w apoE, ponieważ receptory LDL rozpoznają zarówno apoB-100, jak i apoE [126, 141]. Obniżenie stężenia LDL przez statyny może mieć także związek z redukcją wątrobowej produkcji VLDL, która jest zależna od zmniejszenia stężenia cholesterolu, będącego niezbędnym składnikiem VLDL [126, 141].

Wpływ statyn na zwiększenie stężenia frakcji HDL cholesterolu nie jest do końca jasny, ale wynika prawdopodobnie z redukującego wpływu tych leków na stężenie triglicerydów. Modyfikacja z udziałem SREBPs, genów kodujących białka enzymatyczne uczestniczące w syntezie i hydrolizie kwasów tłuszczowych i TG, prowadzi do obniżenia syntezy TG, a tym samym do zaburzenia równowagi pomiędzy TG i HDL. Efektem tego jest uruchomienie mechanizmu regulacji zwrotnej i w konsekwencji wzrost stężenia HDL w osoczu [2]. Istotną rolę w modulacji parametrów lipidowych przez statyny odgrywa także układ jednojądrowych receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów (PPARs – *Peroxisome Proliferator Activated Receptors*), uczestniczących w regulacji ekspresji genów wpływających na przemiany lipidów [2].

Należy zauważyć, że statyny, blokując powstawanie mewalonianu, przyczyniają się nie tylko do zahamowania syntezy cholesterolu, ale także do obniżenia stężenia metabolitów pośrednich tego szlaku. Główne znaczenie z punktu widzenia działań pozalipidowych statyn, ma tutaj ograniczenie syntezy niesteroidowych pochodnych mewalonianu, tzw. izoprenoidów. Najważniejszymi pochodnymi z tej grupy są pirofosforany: farnezyli (FPP – *Farnesyl Pyrophosphate*) i geranylogeranyli (GGP – *Geranylgeranyl Pyrophosphate*). Izoprenoidy odgrywają istotną rolę w posttranslacyjnej obróbce wielu białek. Proces prenylacji białek, nadający im właściwości hydrofobowe, jest niezbędny dla prawidłowego przebiegu wielu procesów regulujących funkcje fizjologiczne komórek, takich jak procesy sygnalizacji wewnątrz- i międzykomórkowej, transport błonowy, różnicowanie i regulacja wzrostu komórek oraz apoptoza komórek [2, 111, 142, 143]. Zahamowanie izoprenylacji białek prowadzi do akumulacji ich nieaktywnych form w cytoplazmie komórek [125]. Najistotniejszymi białkami GTP-azowymi, podlegającymi farnezylicacji są białka z rodziny Ras, uczestniczące w różnicowaniu i proliferacji komórek. Z kolei podlegające geranylogeranylicacji białka rodziny Rho, mają znaczenie głównie w procesie replikacji komórek i tworzeniu cytoszkieletu [111, 125, 143]. Hamujący wpływ statyn na prenylację różnych białek, istotnych dla prawidłowego funkcjonowania całego organizmu, może wyjaśniać pozalipidowe efekty działania leków z tej grupy, określane mianem działań plejotropowych [142].



Ryc. 5. Wpływ statyn na szlak syntezy cholesterolu [125 w modyfikacji własnej]

I.3.6. Działanie hipolipemizujące statyn i główne wskazania do ich stosowania

Inhibitory reduktazy HMG-CoA wywierają zróżnicowany wpływ na profil lipidowy pacjentów. Głównym efektem działania statyn o znaczeniu klinicznym jest obniżenie stężenia frakcji LDL cholesterolu we krwi. Działanie to jest zależne od rodzaju statyny i stosowanej dawki [2, 144]. Należy również zwrócić uwagę na fakt, że stosowanie tych samych dawek u różnych pacjentów może dawać różne efekty, ze względu na istotny wpływ genomu [2]. Statyny istotnie obniżają stężenie szczególnie aterogenicznej frakcji małych, gęstych cząsteczek LDL (sdLDL – *small dense LDL*) [2]. Udowodniono, że statyny warto stosować niezależnie od wyjściowego stężenia frakcji LDL cholesterolu w surowicy [145]. Oprócz skutecznego obniżenia stężenia LDL,

statyny obniżają poziom cholesterolu całkowitego, umiarkowanie zwiększają stężenia HDL, a także obniżają stężenie TG proporcjonalnie do ich stężenia wyjściowego [2, 126].

Na podstawie dotychczasowych badań wykazano, że stosowanie statyn wpływa korzystnie na parametry lipidowe osocza, dając następujące efekty:

- obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego o 15÷45%,
- obniżenie stężenia frakcji LDL cholesterolu o 15÷60%,
- obniżenie stężenia triglicerydów o 10÷45%,
- podwyższenie poziomu HDL o 10÷30% [2, 126, 144].

Główne wskazania kliniczne do stosowania inhibitorów reduktazy HMG-CoA są związane z ich wpływem na profil lipidowy i obejmują: pierwotną hipercholesterolemię, hiperlipidemię mieszaną, hipercholesterolemię wtórną (dyslipidemię pozawałową i poudarową) oraz niestabilną chorobę wieńcową. Statyny 3-ciej generacji mogą być stosowane w hipertriglicydemii. Ponadto statyny są skuteczne w leczeniu wtórnych zaburzeń lipidowych u chorych na cukrzycę, z zespołem nerczycowym oraz po przeszczepach narządów [2].

I.3.7. Działania plejotropowe statyn

Inhibitory reduktazy HMG-CoA, oprócz wpływu na profil lipidowy, wykazują cały szereg pozytywnych efektów, niezwiązanych z obniżeniem poziomu cholesterolu, określanych jako działania plejotropowe [125]. Mechanizm pozalipidowego działania statyn nie został do końca wyjaśniony. Jak wspomniano wcześniej, wielokierunkowe działania tych leków mogą być związane z hamującym wpływem na szlak przemian mewalonianu, prowadzącym do zahamowania biosyntezy izoprenoidów i w konsekwencji do zahamowania sieci sygnałów, w której uczestniczą małe białka wiążące GTP, takie jak Rho i Ras. Hamowanie prenylacji tych białek wpływa na procesy wzrostu, dojrzewania, proliferacji i apoptozy komórek, a także na komunikację komórkową [2]. Ponieważ statyny wpływają w ten sposób na funkcjonowanie różnych komórek, stąd plejotropowe działania statyn odnoszą się do wielu układów [111, 125, 143, 146]. Na podstawie przeprowadzonych do tej pory badań klinicznych sugeruje się, że działania plejotropowe statyn mogą nie być tzw. „efektem klasy”. Zaobserwowano, że poszczególne efekty działania statyn,

niezwiązane z redukcją stężenia cholesterolu, występują tylko po zastosowaniu niektórych leków z tej grupy. Stwierdzono silniejsze działanie statyn lipofilnych na białka Rho, w porównaniu do substancji z tej grupy o bardziej hydrofilnych właściwościach. Sugeruje się również, że czynnikiem potencjalnie wpływającym na siłę działania plejotropowego statyn może być ich dawka [2].

I.3.7.1. Działanie plejotropowe statyn a schorzenia układu sercowo-naczyniowego

Jak dotąd największe znaczenie mają te działania plejotropowe statyn, które odnoszą się do prewencji i leczenia zaburzeń sercowo-naczyniowych.

Możemy tu wymienić:

- hamowanie tworzenia i stabilizację blaszek miażdżycowych,
- poprawę funkcji śródbłonna naczyniowego i działanie wazodylatacyjne,
- korzystne działanie na komórki mięśni gładkich naczyń,
- modulację odpowiedzi zapalnej,
- działanie antyoksydacyjne,
- pozytywny wpływ na układ hemostazy [111, 125, 142, 143, 146-148].

Hamowanie tworzenia i stabilizacja blaszek miażdżycowych

Stosowanie inhibitorów reduktazy HMG-CoA może mieć istotne znaczenie w profilaktyce i leczeniu zmian miażdżycowych. Statyny wpływają na wczesne etapy powstawania nowych blaszek miażdżycowych zmniejszając oksydację frakcji LDL cholesterolu oraz hamując pochłanianie zmodyfikowanych cząstek LDL przez makrofagi i ich przekształcanie w komórki piankowate [2, 148]. Leki te zmniejszają także adhezję monocytów do komórek śródbłonna w warunkach hipercholesterolemii oraz napływ makrofagów do błony wewnętrznej [2]. Ponadto działają stabilizująco na już istniejące blaszki miażdżycowe. Efekt ten jest związany ze zmniejszeniem ilości lipidów w strukturze blaszki, na korzyść kolagenu [125, 148]. Leki te mogą również, w sposób niezależny od działania hipolipemizującego, hamować wydzielanie przez makrofagi metaloproteinazy 9, odpowiedzialnej za rozkład macierzy zewnątrzkomórkowej i osłabienie błon włóknistych blaszek miażdżycowych [111, 125; 148].

Poprawa funkcji śródbłonka naczyniowego i działanie wazodylatacyjne

Inhibitory reduktazy HMG-CoA wpływają korzystnie na funkcje komórek śródbłonka naczyń, między innymi dzięki modyfikacji parametrów lipidowych w kierunku wartości prawidłowych [125]. Wykazano jednakże, że statyny wpływają korzystnie na poprawę funkcji śródbłonka również w sposób niezależny od ich działania hipolipemizującego. Leki te stymulują ekspresję eNOS, poprzez hamowanie geranylacji Rho i szlaku sygnałowego z udziałem tego białka oraz działając stabilizująco na mRNA kodujący eNOS [111, 125, 143, 147]. Co więcej, zaobserwowano, że działanie to utrzymuje się w warunkach hipoksji i w obecności utlenowanych cząsteczek LDL [125]. Zwiększenie śródbłonkowej syntezy NO prowadzi do nasilenia efektu wazodilatacyjnego, przyczyniając się do zahamowania aterogenezy [111, 125]. Wykazano również, że statyny znacznie osłabiają adhezję leukocytów do komórek śródbłonka. Działanie to polega na obniżeniu stężenia rozpuszczalnej selektyny-P, czyli substancji odpowiedzialnej za wstępną adhezję przepływających leukocytów, a także na hamowaniu ekspresji cząsteczek adhezyjnych (ICAM-1 – *Intracellular Adhesion Molekule-1*) na komórkach śródbłonka, co wpływa na dalsze osłabienie wiązania się leukocytów ze śródbłonkiem [111, 125, 142, 146]. Ponadto statyny, prawdopodobnie wpływając na prenylację białka Rho, hamują ekspresję mRNA dla pre-pro-endoteliny-1 oraz zmniejszają ilość receptorów dla endoteliny-1 i angiotensyny II, wykazujących silne działanie naczynioskurczowe [143, 148, 149]. Leki z tej grupy zmniejszają reaktywność ściany naczyń na działanie angiotensyny II i noradrenaliny [2]. Wyniki przeprowadzonych do tej pory badań wykazały również, że statyny przyczyniają się do zwiększenia ilości komórek macierzystych śródbłonka, tzw. komórek progenitorowych we krwi obwodowej oraz do spowolnienia starzenia się tych komórek, co wpływa korzystnie na proces neowaskularyzacji niedokrwionych tkanek [125, 146].

Korzystny wpływ na komórki mięśni gładkich naczyń

Inhibitory reduktazy HMG-CoA wykazują złożone działanie na komórki mięśni gładkich naczyń, przy czym efekt ten dotyczy statyn o właściwościach lipofilowych. Substancje te hamują migrację i proliferację komórek mięśni gładkich, a także pobudzają ich apoptozę, poprzez hamowanie funkcji białek GTP-azowych Rho i Ras [2, 125].

Wpływają przez to modulując na liczbę komórek w ścianach tętnic, co przyczynia się do znacznego zahamowania procesu miażdżycowego [142, 150].

Działanie przeciwzapalne

W dotychczasowych badaniach wykazano, że inhibitory reduktazy HMG-CoA obniżają stężenia markerów procesów zapalnych, zwłaszcza białka C-reaktywnego (CRP – *C-Reactive Protein*) [125, 142, 146, 147]. Statyny zmniejszają także wytwarzanie cytokin prozapalnych, takich jak Il-6 i Il-1 [2, 111, 125, 146]. Ponadto hamują ekspresję genu cyklooksygenazy-2, zmniejszając w konsekwencji produkcję prozapalnych prostaglandyn. Statyny wpływają także modulując na odpowiedź limfocytów T. Zmniejszają aktywność limfocytów Th1, jednocześnie pobudzając czynność Th2, co prowadzi do zwiększenia sekrecji cytokin przeciwzapalnych, kosztem cytokin prozapalnych [146]. Statyny wpływają także na główny układ zgodności tkankowej (MHC-II – *Major Histocompatibility Complex class II*), czyli zespół białek, odpowiedzialnych za prezentację antygenów limfocytom T [111, 125, 142].

Działanie antyoksydacyjne

Omawiane substancje lecznicze zmniejszają podatność lipoprotein na oksydację. Hamują zwłaszcza utlenianie cząsteczek LDL, ograniczając wychwyt lipoprotein zawierających cholesterol przez makrofagi, na wstępnym etapie rozwoju zmian miażdżycowych [126]. Leki te zmniejszają także uszkodzenia spowodowane działaniem wolnych rodników [125, 148]. Statyny zmniejszają wytwarzanie anionu nadtlenkowego pod wpływem oksydazy NADPH, zarówno wpływając bezpośrednio na ten enzym, jak i hamując prenylację białek GTP-azowych [148].

Korzystny wpływ na układ hemostazy

Inhibitory reduktazy HMG-CoA wywierają istotny wpływ na układ hemostazy [111]. Statyny lipofilne hamują proces krzepnięcia zmniejszając wytwarzanie czynnika tkankowego, inicjującego zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia krwi w makrofagach, a także ograniczając powstawanie i aktywność trombiny [2]. Leki te zmniejszają stężenia lub aktywność osoczowych czynników krzepnięcia: czynnika VII, VIII, X, czynnika vonWillebranda oraz fibrynogenu [2, 142]. Jednocześnie statyny stymulują proces fibrynolizy, pobudzając wydzielanie tkankowego aktywatora plazminogenu

i zmniejszając sekrecję inhibitora aktywatora plazminogenu [143, 147]. Statyny wywierają także działanie antyagregacyjne. Poprzez wpływ na gospodarkę lipidową, zmieniają płynność błony komórkowej płytek krwi. Dodatkowo zmniejszają wytwarzanie tromboksanu A₂ oraz hamują proagregacyjne działanie takich substancji jak: ADP, fibrynogen i kolagen [125, 148].

I.3.7.2. Korzyści wynikające ze stosowania statyn w profilaktyce i leczeniu zaburzeń kardiologicznych

Przeprowadzone do tej pory duże badania kliniczne dotyczące statyn wykazały jednoznacznie niezwykle istotną rolę tych leków zarówno w pierwotnej, jak i wtórnej profilaktyce zaburzeń sercowo-naczyniowych [151-153] oraz niedokrwienego udaru mózgu [151, 154], a także w przypadku zmian miażdżycowych dotyczących naczyń obwodowych [153].

Do najważniejszych korzyści wynikających ze stosowania statyn należą:

- zmniejszenie umieralności ogólnej [145, 152, 155-158],
- redukcja częstości zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych, w tym z powodu choroby wieńcowej, zawału i innych powikłań [145, 152, 156, 158-161],
- spadek liczby zawałów serca niezakończonych zgonem [152, 155-157, 159-161],
- zmniejszenie liczby przypadków poważnych zdarzeń sercowo-naczyniowych [155-157], w tym:
 - ✓ zastoinowej niewydolności serca [155],
 - ✓ niestabilnej choroby wieńcowej [155],
 - ✓ poważnych powikłań choroby wieńcowej [145, 161],
- ograniczenie częstości konieczności wykonywania procedur inwazyjnych w celu rewaskularyzacji [145, 152, 155, 157, 161],
- zmniejszenie liczby przypadków zatrzymania akcji serca z koniecznością prowadzenia akcji resuscytacyjnej [159],
- spadek liczby przypadków nawracającego niedokrwienia mięśnia sercowego wymagającego hospitalizacji [159],
- zmniejszenie częstości poważnych powikłań kardiologicznych w grupie chorych po angioplastyce wieńcowej [162],

- ograniczenie liczby poważnych zdarzeń naczyniowo-mózgowych – udarów niedokrwiennych [145, 152, 155-157, 161],
- zahamowanie postępu miażdżycy naczyń obwodowych [163, 164].
Ponadto wykazano, że korzyści te nie są zależne od takich czynników jak:
 - wiek pacjenta [145, 157],
 - płeć [145, 155, 157],
 - palenie papierosów [145, 161, 165],
 - występowanie schorzeń towarzyszących, takich jak:
 - ✓ nadciśnienie tętnicze [145, 155],
 - ✓ cukrzyca [145, 155, 157, 161, 162, 165],
 - ✓ otyłość [161],
 - przyjmowanie następujących leków [145]:
 - ✓ kwas acetylosalicylowy,
 - ✓ leki β -adrenolityczne,
 - ✓ inhibitory konwertazy angiotensyny,
 - ✓ witaminy antyoksydacyjne.

I.3.8. Stosowanie statyn w cukrzycy typu 2

Na podstawie aktualnych wytycznych Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (PTD) [166] uznanej się, że celem leczenia cukrzycy jest nie tylko uzyskanie wartości docelowych w zakresie glikemii, ciśnienia tętniczego i masy ciała, ale także w zakresie gospodarki lipidowej.

Zaburzenia lipidowe w przebiegu cukrzycy typu 2 mają specyficzny charakter i określane są mianem „dyslipidemii aterogennej”. Ten rodzaj zaburzeń gospodarki lipidowej charakteryzuje się wysokim stężeniem triglicerydów, niskim poziomem frakcji HDL cholesterolu oraz nasiloną glikacją frakcji LDL cholesterolu i powstaniem małych gęstych cząsteczek LDL (sdLDL – *small dense* LDL). Ten specyficzny zespół zaburzeń lipidowych związany jest z zaburzeniami obserwowanymi w przebiegu cukrzycy, w tym zarówno z hiperinsulinemią, jak i z insulinoopornością. Jednocześnie u pacjentów chorujących na cukrzycę zwykle dochodzi jedynie do umiarkowanego podwyższenia stężenia cholesterolu całkowitego i jego frakcji LDL [3]. Te specyficzne

zmiany, a zwłaszcza obecność sdLDL, wpływają istotnie na progresję procesu aterogenezy i formowanie się blaszki miażdżycowej. Dodatkowo u osób chorujących na cukrzycę dochodzi do kumulacji innych czynników ryzyka [2].

Zgodnie z rekomendacjami Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego [166] u osób chorujących na cukrzycę należy kontrolować wszystkie zaburzenia lipidowe, jednak głównym celem jest osiągnięcie docelowego stężenia cholesterolu LDL.

Według aktualnych zaleceń PTD [166] u osób chorujących na cukrzycę należy dążyć do uzyskania wartości:

- stężenia cholesterolu frakcji LDL < 100 mg/dl
(LDL-C < 70 mg/dl chorych na cukrzycę i chorobę niedokrwienną serca),
- stężenia cholesterolu całkowitego < 175 mg/dl,
- stężenia cholesterolu frakcji HDL > 40 mg/dl u mężczyzn, > 50 mg/dl u kobiet,
- stężenia cholesterolu nie-HDL < 130 mg/dl,
- stężenia triglicerydów < 150 mg/dl.

Na podstawie najnowszych wytycznych PTD [166] można stwierdzić, iż właśnie statyny są lekami hipolipemizującymi pierwszego wyboru u osób z cukrzycą. Leczenie statynami należy rozpocząć u chorych na cukrzycę ze współistniejącymi schorzeniami układu sercowo-naczyniowego, niezależnie od wartości lipidogramu, a także u chorych na cukrzycę w wieku > 40 lat, bez współistniejących schorzeń sercowo-naczyniowych, u których występuje co najmniej jeden czynnik ryzyka sercowo-naczyniowego.

Dotychczasowe badania kliniczne, przeprowadzone wyłącznie u chorych na cukrzycę typu 2 [167] lub z udziałem tych chorych w określonych podgrupach [145, 161, 168, 169], potwierdzają zasadność i skuteczność stosowania statyn u chorych na cukrzycę.

Wyniki tych badań wykazały, że u osób chorych na cukrzycę otrzymujących statyny w porównaniu z osobami bez cukrzycy zaobserwowano zmniejszenie ryzyka:

- zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych [170],
- poważnych incydentów sercowo-naczyniowych [170, 167, 161, 168, , 145, 169],
- konieczności rewaskularyzacji wieńcowej [170],
- udaru mózgu [170].

Ponadto wykazano, że zmniejszenie ryzyka tych incydentów u chorych na cukrzycę jest niezależne od takich czynników jak [170]:

- obecność choroby naczyń obwodowych, choroby wieńcowej, nadciśnienia tętniczego,
- wartości ciśnienia tętniczego,
- typ cukrzycy,
- wiek,
- płeć,
- BMI,
- palenie tytoniu,
- czynność nerek (GFR – wskaźnik przesączania kłębuszkowego),
- wyjściowe stężenie cholesterolu całkowitego, HDL, LDL, TG, stosunek LDL/HDL.

Zatem wyniki przeprowadzonych do tej pory badań klinicznych uzasadniają stosowanie inhibitorów reduktazy HMG-CoA u wszystkich pacjentów chorujących na cukrzycę, niezależnie od ewentualnego współistnienia choroby sercowo-naczyniowej, jak również od wyjściowego stężenia cholesterolu LDL.

Jakkolwiek, z uwagi na wyniki wspomnianych badań rekomendowane jest podawanie przede wszystkim wysokich dawek statyn, w praktyce klinicznej stosuje się te leki bardzo często w niskich dawkach, czyli odpowiednio 20 mg/dobę dla atorwastatyny i 10÷40 mg/dobę dla simwastatyny. Dawki takie zapewniają stężenia nanomolarne leku w surowicy krwi i w większości przypadków pozwalają osiągnąć docelowe wartości parametrów lipidowych. Wysokie dawki statyn, czyli odpowiednio 40 mg/dobę dla simwastatyny i 80 mg/dobę dla atorwastatyny, zapewniające stężenia mikromolarne leku w surowicy, w praktyce stosowane są rzadziej, głównie z uwagi na uzasadnione obawy przed wystąpieniem podczas wieloletniego ich przyjmowania poważnych działań niepożądanych, zwłaszcza ze strony układu mięśniowego i wątroby [7, 8].

II. Cel pracy

Chorzy na cukrzycę typu 2 stanowią grupę szczególnie wysokiego ryzyka rozwoju epizodów sercowo-naczyniowych. U podłoża choroby niedokrwiennej serca, stanowiącej główną przyczynę zwiększonej chorobowości i śmiertelności wśród pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2, leży proces miażdżycowy, w patogenezie którego znaczącą rolę odgrywa angiogeneza. Dlatego też możliwość modulacji tego procesu za pomocą farmakoterapii wydaje się być zagadnieniem godnym szczególnej uwagi. Statyny stanowią grupę leków o znakomicie udokumentowanym działaniu przeciwhiperlipidemicznym i licznych działaniach pozalipidowych, które mają istotne znaczenie dla przebiegu miażdżycy. Rola tych leków w procesie angiogenezy, zwłaszcza zachodzącej w warunkach zaburzeń metabolicznych towarzyszących cukrzycy, nie została dotąd dostatecznie dobrze poznana. Niejasny zwłaszcza pozostaje wpływ, często stosowanych w praktyce, niskich dawek statyn na kierunek zmian procesu neowaskularyzacji.

Podjęto zatem próbę wyjaśnienia związku pomiędzy stosowaniem statyn w niskich dawkach a profilem regulatorów angiogenezy u chorych na cukrzycę typu 2.

Szczegółowe cele badawcze stanowiły:

1. ocena i porównanie stężeń wybranych czynników proangiogennych (angiogeniny, bFGF, MCP-1, VEGF) i antyangiogennych (II-10, II-12) w surowicy pomiędzy grupami:
 - chorych na cukrzycę typu 2 leczonych simwastatyną lub atorwastatyną w niskich dawkach,
 - chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami,
 - oraz osób bez cukrzycy nieleczonych statynami;
2. zbadanie znaczenia czynników antropometryczno-epidemiologicznych oraz czynników związanych z przebiegiem klinicznym i leczeniem cukrzycy typu 2 (czynność wydzielnicza komórek β , insulinooporność, wyrównanie metaboliczne) dla kształtowania się profilu wybranych regulatorów angiogenezy;
3. zbadanie wpływu stosowania statyn w niskich dawkach na sekrecję wybranych regulatorów angiogenezy przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej.

III. Część doświadczalna

III.1. Materiały i metodyka badań

III.1.1. Badane grupy chorych

Badania przeprowadzono dwuetapowo.

W I etapie badaniu poddano łącznie 131 osób, w tym:

- 1) 53 chorych na cukrzycę typu 2 w wieku 41÷80 lat (średnia wieku 60,1±8,6 lat), leczonych co najmniej od 3 miesięcy statynami:
atorwastatyną 20 mg/dobę lub simwastatyną 10÷40 mg/dobę,
w preparatach: Atoris[®], Sortis[®], Tulip[®] lub Simvasteryl[®] 10, 20, Apo-Simva[®] 20, Simvacard[®] 20, 40, Simvachol[®], Simvacor[®], SimvaHEXAL[®] 20, Vasilip[®], Zocor[®] 20,
- 2) 53 chorych na cukrzycę typu 2 w wieku 37÷80 lat (średnia wieku 63,3±8,9 lat), nieleczonych statynami,
- 3) 25 osób bez zaburzeń w zakresie gospodarki węglowodanowej w wieku 37÷78 lat (średnia wieku 57,2±12,3 lat), nieprzyjmujących statyn.

II etap obejmował grupę 12 osób, które zakwalifikowano do następujących grup terapeutyczno-klinicznych:

- 1) chorzy na cukrzycę typu 2 leczeni statynami,
- 2) chorzy na cukrzycę typu 2 nieleczeni statynami,
- 3) osoby bez cukrzycy z zaburzeniami gospodarki lipidowej leczone statynami,
- 4) osoby bez cukrzycy i dyslipidemii nieprzyjmujące żadnych leków.

Leczenie statynami prowadzono ze względu na dyslipidemię i/lub ryzyko sercowo-naczyniowe według zaleceń Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego [166, 171, 172]. Przyczyną niestosowania statyn w grupie 2 obejmującej chorych na cukrzycę była zwykle ich nietolerancja i związany z tym brak zgody chorych na leczenie farmakologiczne dyslipidemii. Natomiast przyczyna nieleczenia statynami części chorych do momentu przeprowadzenia badania, pomimo braku przeciwwskazań, nie została wyjaśniona.

Badane osoby były w latach 2008÷2012 pacjentami jednego z następujących ośrodków leczenia otwartego:

- Poradni Diabetologicznej Poznańskiego Ośrodka Specjalistycznego Usług Medycznych,
- Poradni Lekarza Rodzinnego w Rokietnicy,
- Poradni Zaburzeń Metabolicznych Szpitala Klinicznego im. Przemienienia Pańskiego przy Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Zaburzeń Metabolicznych i Nadciśnienia Tętniczego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Cukrzycę typu 2 rozpoznawano w oparciu o aktualne standardy i zalecenia Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego [166, 171, 172].

Osoby z grupy 1 chorowały na cukrzycę typu 2 od 0,5 roku do 25 lat. Średni czas trwania klinicznie jawnej choroby w tej grupie wynosił $7,2 \pm 7,5$ lat. Pacjenci należący do grupy 2 chorowali na cukrzycę typu 2 od 3 miesięcy do 33 lat, a średni czas trwania klinicznie jawnej cukrzycy wynosił u nich $6,9 \pm 7,4$ lat.

Grupę osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej stanowili pacjenci wymienionych ośrodków medycznych poddawani rutynowym badaniom kontrolnym, u których wykluczono dysglikemię i dyslipidemię znacznego stopnia.

Dane dotyczące historii choroby poszczególnych osób uzyskano na podstawie kart pacjentów, dzienniczków zawierających wyniki samokontroli glikemii i ciśnienia tętniczego, przeprowadzonych ankiet i bezpośrednich wywiadów. U każdego pacjenta przeprowadzone zostało badanie przedmiotowe.

Farmakoterapia cukrzycy typu 2 w obu grupach chorych polegała na stosowaniu metforminy (500÷2550 mg/dobę), u części chorych w skojarzeniu z insulinoterapią (u 8 osób z grupy leczonych statynami, u 13 osób z grupy nieleczonych statynami). Chorzy otrzymywali mieszanki insulinowe lub analogowe, insuliny krótkodziałające i o pośrednim czasie działania lub analogi długodziałające w dawce 12÷46 jednostek w jednym lub w dwóch wstrzyknięciach na dobę.

W leczeniu cukrzycy stosowano następujące preparaty:

- metforminy: Formetic[®], Glucophage[®] 500, 850, 1000, Glucophage[®] XR, Metformax[®] 500, 850, Siofor[®] 500, 850, 1000,
- insuliny: Gensulin[®] N, R, 30, Humalog[®] 50, Humalog Mix[®] 50, Humulin[®], Insulatard[®], Lantus[®], Mixtard[®] 30, 50, Novo Mix[®] 30, Novo Rapid[®].

Ze względu na schorzenia towarzyszące, takie jak: choroba niedokrwienna serca (17 osób) i/lub nadciśnienie tętnicze (72 osoby) i/lub dna moczanowa (1 osoba) i/lub łagodny przerost stercza (4 osoby), badane osoby przyjmowały leki z następujących grup:

- antagonistów wapnia,
- glikozydów nasercowych,
- nitratów,
- diuretyków tiazydopodobnych (indapamid),
- selektywnych β -blokerów.

Chorzy na ct2 otrzymywali dodatkowo jeden lub kilka leków z następujących grup:

- inhibitorów konwertazy angiotensyny,
- antagonistów receptora angiotensyny,
- kwas acetylosalicylowy w dawkach antyagregacyjnych.

Stosowane leki włączono nie później niż 3 miesiące przed podjęciem badań.

Badani bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej nie wymagali leczenia farmakologicznego, czyli nie przyjmowali żadnych leków ani suplementów diety, a leczenie schorzeń towarzyszących (nadciśnienia tętniczego) w tej grupie prowadzono metodami nefarmakologicznymi.

U osób z cukrzycą typu 2 stwierdzono występowanie powikłań cukrzycy o charakterze:

- makroangiopatii pod postacią:
 - ✓ choroby niedokrwiennej serca u 21 osób,
 - ✓ przebytego udaru mózgu u 5 osób,
- mikroangiopatii pod postacią:
 - ✓ retinopatii prostej u 3 osób,
 - ✓ nefropatii u 2 osób,
- neuropatii obwodowego układu nerwowego u 5 osób.

Z badań wykluczono osoby z następującymi stanami klinicznymi i schorzeniami towarzyszącymi:

- niewydolnością nerek,
- niewydolnością wątroby,
- niewydolnością serca,
- zaburzeniami funkcji tarczycy,
- niedokrwistością,
- chorobą nowotworową,
- chorobą infekcyjną,
- ostrymi i przewlekłymi chorobami zapalnymi i autoimmunologicznymi.

Pacjenci bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej spełniali wszystkie kryteria wykluczenia stosowane wobec chorych na cukrzycę. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (nr: 870/09, 1241/08, 105/2010).

Wszystkie osoby uczestniczące w badaniach zostały poinformowane o ich celu i wyraziły na nie pisemną zgodę.

III.1.2. Metodyka badań

U wszystkich badanych pacjentów oznaczono:

1. glikemię na czczo w osoczu krwi żyłnej
 - metodą enzymatyczną z zastosowaniem reakcji katalizowanej przez oksydazę glukozy,
2. stężenie hemoglobiny glikowanej HbA_{1c} we krwi pełnej
 - metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), stosując testy VariantTM Hemoglobin A_{1c}, BIO-RAD,
3. stężenie cholesterolu całkowitego, jego frakcji HDL i LDL oraz stężenie triglicerydów w surowicy krwi
 - metodą enzymatyczną z zastosowaniem testów komercyjnych Biosystem, opartych na reakcjach katalizowanych przez:
 - ✓ esterazę cholesterolową (stężenie cholesterolu całkowitego, HDL, LDL),
 - ✓ oksydazę glicerofosforanu (stężenie triglicerydów),
4. stężenie 1,5-anhydro-D-glucitolu (1,5-AG) w osoczu
 - metodą enzymatyczną wg Yabuuchi [173] w modyfikacji Dworackiej i wsp. [174],
5. stężenie adiponektyny w surowicy
 - metodą immunoenzymatyczną z zastosowaniem testów komercyjnych Human Total Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA Kit firmy R&D Systems,
6. stężenie rezystyny w surowicy
 - metodą immunoenzymatyczną z zastosowaniem testów komercyjnych Human Resistin Quantikine ELISA Kit firmy R&D Systems,
7. stężenie peptydu C w surowicy na czczo
 - metodą immunoenzymatyczną z zastosowaniem testów komercyjnych C-pep-EASIA DIASource Immuno Assays.

U wszystkich badanych pacjentów zbadano stężenia wybranych czynników: proangiogennych: angiogeniny, bFGF, MCP-1, VEGF i antyangiogennych: Il-10, Il-12 metodą cytofluorymetrii przepływowej z zastosowanie komercyjnych testów macierzy kulkowych: Angiogenin, bFGF, MCP-1, VEGF, Il-10, Il-12 Flex Set, firmy Becton Dickinson Biosciences.

Wykonano również izolację i hodowlę komórek jednojądrzastych krwi obwodowej, oraz stymulację ich czynności za pomocą glukozy i/lub insuliny w warunkach *in vitro*. Następnie zbadano stężenia czynników proangiogennych (MCP-1, bFGF, VEGF) oraz antyangiogennych (Il-10, Il-12) w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych metodą cytofluorymetrii przepływowej.

III.1.2.1. Oznaczanie stężenia 1,5-anhydro-D-glucitolu w osoczu

Znaczenie oznaczania stężenia 1,5-anhydro-D-glucitolu w ocenie stopnia wyrównania metabolicznego pacjenta chorującego na c2 jest zasadnicze, gdyż stanowi on czuły, retrospektywny wskaźnik krótkotrwałej, ostrej hiperglikemii, w tym szczególnie hiperglikemii poposiłkowej, zatwierdzony przez Food and Drug Administration (FDA) w 2003 roku [175-177]. Ocena stężenia 1,5-AG w osoczu stanowi cenne źródło informacji na temat stopnia metabolicznego wyrównania cukrzycy zwłaszcza w przypadku pacjentów, u których nie stosuje się ciągłego monitorowania profilu dobowego glikemii [178, 179].

Pod względem chemicznym 1,5-AG jest 1-deoksyglukozą. Obecność tej substancji stwierdzono w większości ludzkich tkanek, a także w osoczu i płynie mózgowo-rdzeniowym. Głównym źródłem 1,5-AG dla człowieka jest pokarm, szczególnie zaś takie produkty jak soja, a w mniejszych ilościach także ryż, chleb, czy mięso wołowe. Tylko nieznaczne ilości są wytwarzane endogennie z glikogenu, głównie w wątrobie. Dostarczany z pokarmem 1,5-AG ulega wchłanianiu w jelicie i nie bierze istotnego udziału w przemianach wewnątrzustrojowych [180]. Oznacza to, że w ciągu doby ilość dostarczonego z pokarmem i wyprodukowanego endogennie 1,5-AG jest równoważona jego ilością wydalaną przez nerki [181].

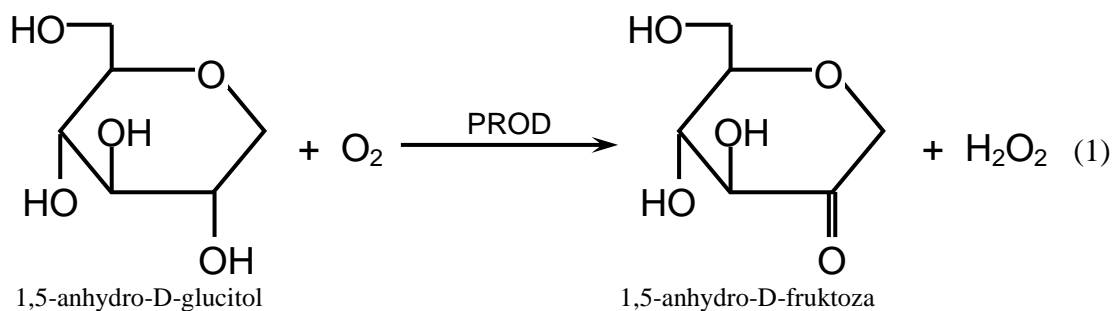
1,5-AG ulega całkowitemu przesączeniu przez kłębuszki nerkowe, a następnie reabsorbcji w cewkach kanalików proksymalnych [180]. Wchłanianie zwrotne 1,5-AG zachodzi przy udziale mechanizmu transportowego dla glukozy, z udziałem sodozależnego systemu przenośników. Obie substancje, ze względu na strukturalne podobieństwo, współzawodniczą o miejsca wiążące w nabłonku kanalików nerkowych [182]. Przekroczenie progu nerkowego dla glukozy (160÷190 mg/dl), związane ściśle z epizodami hiperglikemii i jej pojawienie się w moczu wiąże się z wysyceniem tych

miejsce, co prowadzi do zahamowania resorpcji zwrotnej anhydroglucitolu. Powoduje to gwałtowny wzrost wydalania nerkowego i obniżenie stężenia 1,5-AG w osoczu. Zmiana stężenia 1,5-AG wskazuje na zaburzenia w zakresie gospodarki węglowodanowej w ciągu 48 godzin poprzedzających badanie (krótkotrwałe epizody hiperglikemii) lub jest wskaźnikiem hiperglikemii występującej w ciągu ostatnich 5 tygodni (wielokrotne epizody lub hiperglikemia przewlekła) [180, 183]. Wskaźnik ten wykazuje większą czułość w stosunku do szybkich i krótkotrwałych wzrostów glikemii w porównaniu do innych stosowanych do tej pory retrospektywnych markerów hiperglikemii, takich jak stężenie HbA_{1c}, czy fruktozaminy [178].

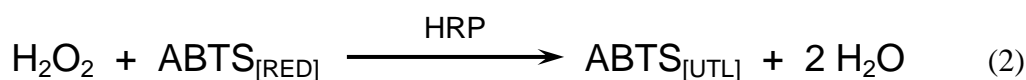
Wartości referencyjne stężenia 1,5-anhydro-D-glucitolu w osoczu mieszczą się w granicach 13,8÷31,8 [174]. Do oznaczania stężenia 1,5-AG w osoczu zastosowano metodę enzymatyczną [179].

Zasada metody

Zasada metody enzymatycznej oznaczania stężenia 1,5-AG w osoczu opiera się na przeprowadzeniu reakcji oksydacyjno-redukcyjnej katalizowanej przez oksydazę piranozową (PROD – *Pyranose Oxidase*). W wyniku tej reakcji następuje utlenienie grupy hydroksylowej w pozycji 2 cząsteczki 1,5-AG przez tlen cząsteczkowy przy udziale PROD, co prowadzi do powstania 1,5-anhydro-D-fruktozy.



Dodatkowym produktem reakcji (1) jest nadtlenek wodoru, który oznacza się ilościowo, przeprowadzając reakcję barwną z udziałem peroksydazy chrzanowej (HRP – *Horse Radish Peroxidase*).



Donorem wodoru w reakcji (2) jest kwas 2,2'-azino-bis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy), czyli ABTS.

Przebieg oznaczenia**➤ Wstępna obróbka osocza**

W celu usunięcia z osocza glukozy i innych monosacharydów wykorzystano metodę chromatografii jonowymiennej. Przygotowano mikrokolumny o średnicy 9 mm, wypełnione dwiema warstwami żywicy jonowymiennej oddzielonymi krążkiem bibuły. Dolną warstwę stanowił kationit (250 μl), a górną anionit (850 μl). Żywicę przykrywano krążkiem bibuły. Gotowe kolumny przemywano wodą destylowaną.

➤ Przygotowanie krzywej wzorcowej

Do czterech oznaczonych próbek wprowadzano kolejno 100 μl roztworów 1,5-AG o znanych stężeniach, wynoszących odpowiednio 10, 20, 25, 50 mg/l, przygotowanych przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego o stężeniu wyjściowym 50 mg/l. Następnie do każdej próbki dodawano $4 \times 500 \mu\text{l}$ wody destylowanej. Zawartość każdej próbki dokładnie mieszano.

➤ Przygotowanie mieszaniny enzymów

Bezpośrednio przed oznaczeniem do opisanej próbki wprowadzano kolejno: 200 μl PROD, 270 μl buforu fosforanowego, 50 μl ABTS i 10 μl HRP. Całość dokładnie mieszano. Przygotowana mieszanina wystarczała na 10 oznaczeń.

➤ Przygotowywanie surowicy

W celu odbiałczenia badanej surowicy do każdej z próbek (400 μl) dodawano 30 μl kwasu trichlorooctowego (TCA – *Trichloroacetic Acid*) i odwirowywano ($t = 1 \text{ h}$, $n = 6000 \text{ min}^{-1}$).

➤ Zbieranie eluatu

Pobierano 100 μl klarownego supernatantu i наносono na mikrokolumnę, zbierając eluat do próbki. Następnie kolumnę przemywano wodą destylowaną ($4 \times 500 \mu\text{l}$), zbierając resztę eluatu. Uzyskaną próbkę dokładnie mieszano.

➤ Nanoszenie próbek na mikroplótkę

Do kolejnych dołków przygotowanej mikroplótki наносono: 250 μl wody destylowanej (próba ślepa), 200 μl roztworów wzorcowych o wzrastających stężeniach (krzywa wzorcowa) oraz 200 μl poszczególnych próbek badanych

w dwóch powtórzeniach (analiza właściwa). Następnie do każdego dołka, z wyjątkiem próby ślepej, dodawano 50 μ l mieszaniny enzymów, przygotowanej bezpośrednio przed oznaczeniem.

➤ **Inkubacja**

Mikropłytkę zabezpieczoną folią samoprzylepną inkubowano w wytrząsarce Eppendorf ($T = 37^{\circ}\text{C}$, $t = 1 \text{ h}$, $n = 300 \text{ min}^{-1}$).

➤ **Pomiar absorbancji**

Po zakończeniu inkubacji odczytywano absorbancję ABTS w postaci utlenionej, wobec próby ślepej, przy długości fali $\lambda = 420 \text{ nm}$ za pomocą czytnika Sunrise Tecan Basic.

III.1.2.2. Oznaczanie stężenia adiponektyny w surowicy krwi

Adiponektyna jest uznawana za jeden z istotnych czynników charakteryzujących insulinooporność obwodową u osób chorujących na cukrzycę typu 2. Należy do grupy adipokin, czyli związków bioaktywnych wydzielanych przez tkankę tłuszczową odgrywających rolę w patogenezie cukrzycy i miażdżycy, przy czym jej niskie stężenia korelują ze zwiększonym ryzykiem rozwoju tych schorzeń. Substancja ta posiada zdolność uwrażliwiania tkanek obwodowych na działanie insuliny [184-186].

Zasada metody

W celu oznaczenia stężenia adiponektyny w surowicy zastosowano komercyjny test immunoenzymatyczny Human Total Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA Kit firmy R&D Systems, który pozwala oznaczyć łącznie wszystkie krążące w surowicy krwi frakcje adiponektyny. Do przeprowadzenia oznaczenia wykorzystywano 96-dołkowe płytki mikrotitracyjne. Zasada metody opiera się na utworzeniu złożonych kompleksów zawierających:

- specyficzne monoklonalne przeciwciała pierwotne (opłaszczające dołki płytki, skierowane przeciwko ludzkiej cząsteczce adiponektyny),
- adiponektynę (znajdującą się w surowicy),
- przeciwciała wtórne, znakowane HRP.

Następnie wykonywany jest pomiar absorbancji barwnego produktu reakcji, której wartości są proporcjonalne do stężenia adiponektyny w badanych próbkach (Ryc.6).

Przebieg oznaczenia**➤ Utworzenie kompleksu: swoiste przeciwciało pierwotne – adiponektyna**

Do kolejnych dołków mikro płytki, opłaszczonych przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko ludzkiej cząsteczce adiponektyny, наносono w dwóch powtórzeniach po 50 µl roztworów wzorcowych (o stężeniach: 3,9; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 ng/ml) lub badanych surowic rozcieńczonych wcześniej w stosunku 1:100. Płytkę inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie dołki płytki czterokrotnie płukano buforem.

➤ Przyłączenie przeciwciała wtórnego znakowanego HRP

Do każdego dołka dodawano 200 µl roztworu zawierającego przeciwciała wtórne skierowane przeciwko ludzkiej adiponektynie, znakowane HRP. Płytkę inkubowano przez 2 godzinny w temperaturze pokojowej. Następnie czterokrotnie płukano roztworem buforu, dla usunięcia niezwiązanych przeciwciał.

➤ Utworzenie barwnego produktu reakcji enzymatycznej

Dodawano 200 µl roztworu tetrametylobenzydyny (TMB), będącej substratem dla HRP. Płytki inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Następnie dodawano 50 µl 2 N roztworu kwasu siarkowego w celu zatrzymania reakcji.

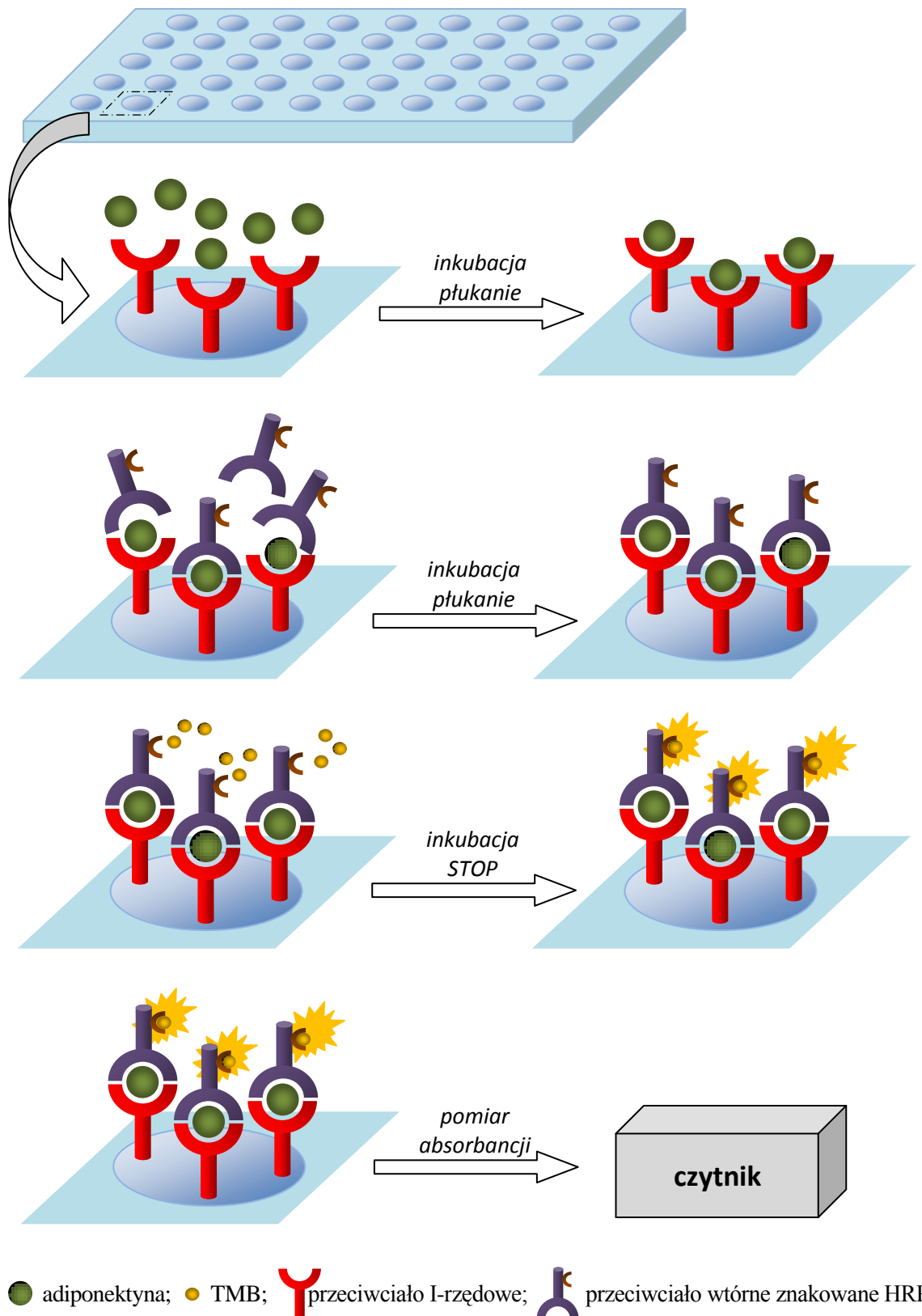
➤ Pomiar absorbancji

Wykonywano pomiar absorbancji za pomocą czytnika Sunrise Tecan Basic przy $\lambda = 450$ nm. Stężenia adiponektyny odczytywano na podstawie krzywej wzorcowej.

Charakterystyka testu

- Zakres referencyjny dla osób zdrowych 5÷30 µg/ml
- Czulość 0,246 ng/ml
- Współczynnik powtarzalności międzyseryjnej (*Intra-assay*) 2,5%÷4,7%
- Współczynnik powtarzalności wewnątrzseryjnej (*Inter-assay*) 5,8%÷6,9%

Dla opisaney metody nie stwierdzono występowania reakcji krzyżowych (zgodnie z charakterystyką producenta testu).



Ryc. 6. Uproszczony schemat oznaczania adiponektyny metodą immunoenzymatyczną ELISA

III.1.2.3. Oznaczanie stężenia rezystyny w surowicy krwi

Rezystyna stanowi obecnie jeden z wykładników insulinooporności obwodowej u osób chorujących na cukrzycę typu 2. Ten poznany niedawno produkt tkanki tłuszczowej odgrywa istotną rolę w patomechanizmie otyłości i insulinooporności, przyczyniając się tym samym do zwiększenia ryzyka zachorowania na cukrzycę typu 2 [186]. Dokładny mechanizm działania rezystyny nie został dotychczas w pełni wyjaśniony. Wykazano, że hormon ten posiada potencjał prozapalny i proaterogeny oraz bierze udział w metabolizmie glukozy i hamowaniu przekazywania sygnału do receptora insulinowego, a także indukuje stan zapalny tkanki tłuszczowej białej. Konsekwencją takiej aktywności rezystyny jest rozwój insulinooporności tkanek obwodowych [187]. Rezystyna w sposób bezpośredni przyczynia się do rozwoju dysfunkcji śródbłonka naczyń, indukując wzmożoną syntezę nadtlenu [188]. Wykazano również, że poprzez wpływ na proliferację i migrację komórek śródbłonka rezystyna sprzyja angiogenezie [189, 190].

Zasada metody

Do oznaczenia stężenia rezystyny w surowicy użyto komercyjnych testów Human Resistin Quantikine ELISA Kit firmy R&D Systems. Analizę wykonywano na 96-dołkowej płytce mikrotitracyjnej.

Zasada metody, analogicznie do przedstawionego na rycinie 6 oznaczenia adiponektyny, opiera się na wytworzeniu złożonych kompleksów zawierających:

- specyficzne monoklonalne przeciwciała pierwotne (opłaszczające dołki płytki, skierowane przeciwko ludzkiej rezystynie),
- rezystynę (znajdującą się w badanej surowicy),
- przeciwciała wtórne, znakowane HRP.

Stężenie rezystyny w badanych próbkach określone jest na podstawie pomiaru absorbancji barwnego produktu reakcji enzymatycznej.

Przebieg oznaczenia**➤ Utworzenie kompleksu: swoiste przeciwciało pierwotne – rezystyna**

Do każdego dołka mikropłytki wprowadzono 100 µl rozpuszczalnika RD1-19. Do kolejnych dołków nanoszono w dwóch powtórzeniach po 100 µl roztworów wzorcowych (o stężeniach: 0,16; 0,31; 0,62; 1,25; 2,50; 5,00 i 10,00 ng/ml), próbek kontrolnych lub badanych surowic, uprzednio rozcieńczonych w stosunku 1:4. Płytkę inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, po czym czterokrotnie płukano roztworem buforu.

➤ Przyłączenie przeciwciała wtórnego znakowanego HRP

Następnie dodawano 200 µl roztworu zawierającego przeciwciała wtórne skierowane przeciwko ludzkiej rezystynie sprzężone z HRP. Próbkę inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Czterokrotnie płukano roztworem buforu, dla usunięcia niezwiązanych przeciwciał.

➤ Utworzenie barwnego produktu reakcji enzymatycznej

Dodawano 200 µl roztworu chromogenu dla HRP, czyli tetrametylobenzydyny. Inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Następnie dodawano 50 µl 2 N roztworu kwasu siarkowego w celu zatrzymania reakcji enzymatycznej prowadzącej do powstania barwnego produktu.

➤ Pomiar absorbancji

Wykonywano pomiar absorbancji za pomocą czytnika Sunrise Tecan Basic przy $\lambda = 450$ nm. Na podstawie krzywej wzorcowej dokonywano analizy ilościowej.

Charakterystyka testu

- Zakres referencyjny dla osób zdrowych 5÷20 ng/ml
- Czułość 0,026 ng/ml
- Współczynnik powtarzalności międzyseryjnej (*Intra-assay*) 3,8%÷5,3%
- Współczynnik powtarzalności wewnątrzseryjnej (*Inter-assay*) 7,8%÷9,2%

Dla opisaney metody nie stwierdzono występowania reakcji krzyżowych (zgodnie z charakterystyką producenta testu).

III.1.2.4. Oznaczanie stężenia peptydu C w surowicy krwi

Peptyd C stanowi istotny wykładnik czynności wydzielniczej komórek β wysp trzustki. Jest to 31-aminokwasowy fragment wchodzący w skład proinsuliny, będącej prekursorem insuliny. Insulina i peptyd C wydzielane są w równomolowych ilościach. Jednakże ze względu na dłuższy czas półtrwania stężenie peptydu C jest wyższe od stężenia insuliny. Badanie stężenia peptydu C umożliwia ocenę sekrecji insuliny przez komórki β wysp trzustki [186, 191].

Zasada metody

W celu oznaczenia stężenia peptydu C w surowicy zastosowano komercyjne testy immunoenzymatyczne C-pep-EASIA DIAsource. Do przeprowadzenia oznaczenia wykorzystywano 96-dółkowe płytki mikrotitracyjne.

Zasada metody, analogicznie do przedstawionego na rycinie 6 oznaczenia adiponektyny, opiera się na wytworzeniu złożonych kompleksów zawierających:

- specyficzne monoklonalne przeciwciała pierwotne (opłaszczające dołki płytki, skierowane przeciwko ludzkiemu peptydowi C),
- peptyd C (znajdujący się w surowicy),
- przeciwciała wtórne, znakowane HRP.

Następnie wykonywany jest pomiar absorbancji barwnego produktu reakcji, której wartości są proporcjonalne do stężeń peptydu C w badanych próbkach.

Przebieg oznaczenia

➤ Utworzenie kompleksu: swoiste przeciwciało pierwotne – peptyd C

Do kolejnych dołków mikropłytki, opłaszczonych przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko ludzkiemu peptydowi C, наносono w dwóch powtórzeniach po 100 μ l roztworów wzorcowych (o stężeniach: 0,05; 0,13; 0,48; 1,60 i 4,90 pmol/L), próbek kontrolnych lub badanych surowic.

➤ Przyłączenie przeciwciała wtórnego znakowanego HRP

Następnie dodawano 50 μ l roztworu zawierającego przeciwciała wtórne skierowane przeciwko peptydowi C, znakowane HRP. Płytkę inkubowano przez 2 godziny

w temperaturze pokojowej, w wytrząsarce poziomej (700rpm±100rpm). Następnie trzykrotnie płukano roztworem buforu, dla usunięcia niezwiązanych przeciwciał.

➤ **Utworzenie barwnego produktu reakcji enzymatycznej**

Dodawano 100 µl roztworu tetrametylobenzydyny, będącej chromogenem dla HRP. Inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej, w wytrząsarce poziomej (700 rpm±100 rpm), bez dostępu światła. Dodawano 100 µl 1 N roztworu kwasu solnego w celu zatrzymania reakcji enzymatycznej prowadzącej do powstania barwnego produktu.

➤ **Pomiar absorbancji**

Wykonywano pomiar absorbancji za pomocą czytnika Sunrise Tecan Basic przy $\lambda = 450$ nm. Stężenia peptydu C odczytywano na podstawie krzywej wzorcowej.

Charakterystyka testu

- | | |
|---|---------------------------------------|
| • Zakres referencyjny dla osób zdrowych | 0,28÷2,00 pmol/ml
(0,85÷6,04ng/ml) |
| • Czulość | 0,01 pmol/ml
(0,03ng/ml) |
| • Współczynnik powtarzalności międzyseryjnej (<i>Intra-assay</i>) | 5,8%÷8,4% |
| • Współczynnik powtarzalności wewnątrzseryjnej (<i>Inter-assay</i>) | 7,2 %÷9,2% |

Dla opisanej metody nie stwierdzono występowania reakcji krzyżowych (zgodnie z charakterystyką producenta testu).

III.1.2.5. Oznaczanie stężeń wybranych czynników pro- i antyangiogennych w surowicy krwi

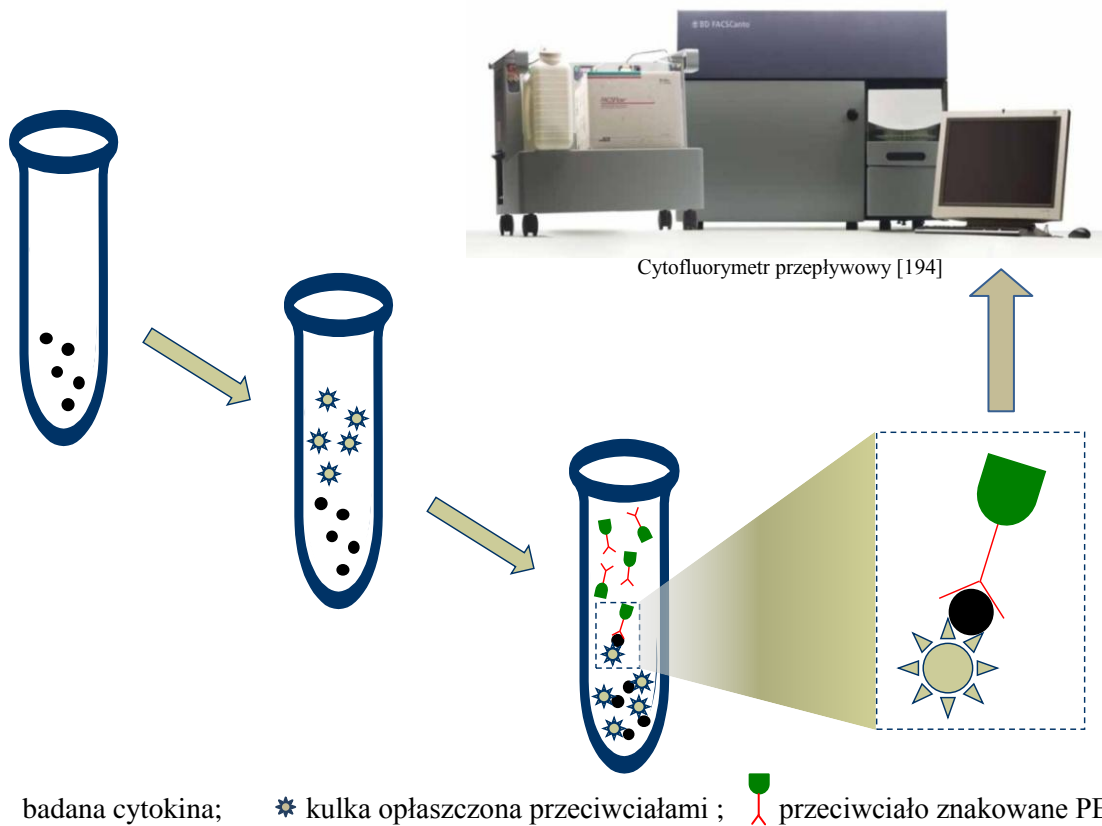
Główną część badań doświadczalnych niniejszej pracy stanowiło oznaczanie stężeń wybranych czynników pro- (angiogenina, bFGF, MCP-1, VEGF) i antyangiogennych (Il-10, Il-12). Podstawą analizy ilościowej była metoda cytofluorymetrii przepływowej z wykorzystaniem komercyjnych testów macierzy kulkowych (The BDTM Cytometric Bead Array Human Soluble Protein Flex Sets):

- Human Angiogenin Flex Set,
- Human bFGF Flex Set,
- Human MCP-1 Flex Set,
- Human VEGF Flex Set,
- Human Il-10 Flex Set,
- Human Il-12 Flex Set,
- Human Soluble Protein Master Buffer Kits.

Zastosowana metoda umożliwiała jednoczesną analizę stężeń kilku cytokin w jednej próbówce [192, 193]. Doświadczenia przeprowadzono za pomocą cytofluorymetru przepływowego firmy Becton Dickinson.

Zasada metody

Zasada analizy ilościowej polega na wprowadzeniu do próbek zawierających odpowiednio rozcieńczoną surowicę, roztworów zawierających specjalne kulki opłaszczone przeciwciałami, tzw. *Capture Beads*. Przeciwciała te skierowane są przeciwko badanym czynnikom pro- lub antyangiogennym. Następnie do każdej próbki dodaje się roztwór kolejnych przeciwciał sprzężonych z barwnikiem fluorescencyjnym fikoerytryną (PE). Przeciwciała te są specyficzne dla innych epitopów badanych molekuł. W trakcie inkubacji powstają złożone kompleksy typu *sandwich*, zawierające kulki opłaszczone przeciwciałami, badane czynniki pro- lub antyangiogenne i sprzężone z nimi w innym miejscu przeciwciała znakowane PE. Następnie wykonywany jest pomiar fluorescencji barwnika wchodzącego w skład powstałego kompleksu. Intensywność fluorescencji jest wprost proporcjonalna do stężenia badanych czynników. Schemat przebiegu oznaczenia pokazano na rycinie 7.



- badana cytokina; * kulka opłaszczona przeciwciałami ;  przeciwciało znakowane PE

Ryc. 7. Uproszczony schemat oznaczania czynników pro- i antyangiogennych

Przebieg oznaczenia

➤ Przygotowywanie roztworów wzorcowych

Przygotowywano mieszaninę standardów (*Top Standard*), rozpuszczając zliofilizowane czynniki badane (*Lyophilized Standard*), dostępne w zestawach w postaci kulek, w 4 ml rozpuszczalnika (*Assay Diluent*). Ilość badanych jednorazowo czynników odpowiadała ilości użytych kulek. Roztwór inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie wykonano serię rozcieńczeń: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, wykorzystując rozpuszczalnik (*Assay Diluent*).

Jako kontrolę negatywną (0 pg/ml) wykorzystano wspomniany rozpuszczalnik.

➤ Przygotowywanie próbek badanych surowic

W kolejnym etapie przygotowywano po 50 µl roztworów badanych surowic, rozcieńczonych w stosunku 1:0,25 za pomocą rozpuszczalnika (*Assay Diluent*).

➤ **Przygotowywanie mieszaniny kulek opłaszczonych przeciwciałami skierowanymi przeciwko oznaczanym czynnikom (*Capture Beads*)**

Przygotowywano mieszaninę kulek opłaszczonych przeciwciałami skierowanymi przeciwko każdemu z badanych czynników (*Mixed Capture Beads*), w ilości uwzględniającej liczbę analizowanych jednocześnie czynników oraz liczbę badanych próbek surowic. Następnie dodawano 0,5 ml roztworu buforowego (*Wash Buffer*) i odwirowywano ($t = 5 \text{ min}$, $\text{RCF (Relative Centrifugal Force)} = 200 \times g$). Po usunięciu supernatantu za pomocą pipety, pozostałe w próbówce kulki opłaszczone przeciwciałami rozpuszczano w odpowiednim rozpuszczalniku (*Capture Bead Diluent for Serum/Plasma*), do objętości 50 μl /1 próbkę. Zawartość próbki dokładnie mieszano (*Vortex*) i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej.

➤ **Przygotowywanie roztworu odczynników do wykrywania badanych molekuł**

Przygotowywano roztwór zawierający odpowiednią objętość odczynników wykrywających (*Mixed PE Detection Reagents*) i rozpuszczalnika (obliczoną uprzednio na podstawie ilości analizowanych jednocześnie czynników oraz ilości badanych próbek surowic). Odczynniki wykrywające zawierały przeciwciała specyficzne dla innych miejsc wiązania badanych czynników, sprzężone z barwnikiem fluorescencyjnym – fikoerytryną (PE). Gotowy roztwór (*Diluted PE Detection Reagent*) przechowywano do momentu użycia w temperaturze 4°C, bez dostępu światła.

➤ **Wykonywanie analizy**

Oznaczenie przeprowadzano w próbkach cytofluorymetrycznych. Do każdej próbki wprowadzano 50 μl odpowiednio rozcieńczonej surowicy. Następnie dodawano 50 μl roztworu zawierającego kulki opłaszczone przeciwciałami skierowanymi przeciwko oznaczanym czynnikom (*Mixed Capture Beads*). Każda populacja opłaszczonych kulek charakteryzowała się ściśle określoną pozycją na wykresie macierzowych kanałów fluorescencji FL3 i FL4, co umożliwiało ich odróżnianie. Próbkę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie do każdej próbki dodawano 50 μl roztworu odczynników wykrywających, zawierającego przeciwciała sprzężone z fikoerytryną (*Diluted PE Detection Reagent*). Próbkę inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej,

bez dostępu światła. W trakcie inkubacji powstawały wspomniane już złożone kompleksy typu *Sandwich*. Po wypłukaniu buforem niezwiązanych przeciwciał wykonywano pomiar fluorescencji barwnika sprzężonego z przeciwciałem. Fluorescencja przeciwciał wyznakowanych fikoerytryną była wprost proporcjonalna do stężenia badanych cytokin. Identyczną procedurę stosowano w przypadku roztworów wzorcowych, co pozwalało uzyskiwać krzywe wzorcowe, na podstawie których obliczano stężenia badanych molekuł w poszczególnych próbach. Uzyskane wartości stężeń kolejnych punktów krzywej wzorcowej wynosiły odpowiednio: 10, 20, 40, 80, 156, 321,5 625, 1250 i 2500 pg/ml.

Po wykonaniu pomiaru w cytoflorymetrze przepływowym uzyskiwano wykresy przedstawiające ilości badanych cytokin. Następnie uzyskane dane analizowano za pomocą programu FCAP Array™ Software BD w celu uzyskania wartości stężeń badanych cytokin.

Charakterystyka testu

	VEGF	bFGF	MCP-1	Angiogenina	Il-10	Il-12
• Czulość metody	4,5pg/ml	3,4pg/ml	1,3pg/ml	4,6pg/ml	0,13pg/ml	0,6pg/ml
• Współczynnik powtarzalności wewnątrzserijnej	5%÷9%	3%÷8%	7%÷9%	4%÷8%	6%÷11%	2%÷4%
• Współczynnik powtarzalności zewnątrzserijnej	6%÷11%	3%÷4%	3%÷4%	1%÷3%	2%÷6%	2%÷5%
• Pozycja alfanumeryczna	B8	C5	D8	C4	B7	E5

III.1.2.6. Badanie czynności wydzielniczej mononuklearów krwi obwodowej w warunkach *in vitro*

Badania *in vitro*, wykonane w ramach niniejszej pracy, polegały na przeprowadzeniu testów stymulacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMCs – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) pochodzących od badanych pacjentów, hodowane w warunkach podstawowych oraz w warunkach naśladujących hiperglikemię i hiperinsulinemię.

Zasada metody

Zasada metody polega na przeprowadzeniu izolacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w warunkach *in vitro*. Po 72-godzinnej hodowli PBMCs w odpowiednich warunkach: na podstawowym podłożu hodowlanym oraz na podłożu z dodatkiem glukozy lub insuliny, przeprowadza się ocenę ich czynności wydzielniczej metodą cytofluorymetrii przepływowej z zastosowaniem komercyjnych testów macierzy kulkowych. Schemat przebiegu oznaczenia pokazano na rycinie 8.

Przebieg oznaczenia

➤ Izolacja komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej

Izolację PBMCs z krwi obwodowej pacjentów przeprowadzano w warunkach sterylnych, w boksie, w łoży z nawiewem laminarnym. Krew obwodową, pobraną do próbek zawierających EDTA, rozcieńczano izotonicznym roztworem soli fizjologicznej zbuforowanym fosforanami o pH = 6,9 (PBS – *Phosphate Buffered Saline*) w stosunku 1:1. Czas od pobrania krwi do jej rozcieńczania nie przekraczał 1 godziny, w tym czasie krew przechowywano w temperaturze 2÷8°C. Rozcieńczoną krew nawarstwiano, unikając zmieszania warstw, na odczynniku *Ficoll-Paque*, umieszczonym w próbce wirówkowej, utrzymywanej pod kątem 45°. Zawartość próbki wirowano w temperaturze pokojowej ($t = 20 \text{ min}$, $n = 1500\div 2000 \text{ min}^{-1}$). W wyniku wirowania uzyskiwano mieszaninę składającą się z następujących warstw:

- ✓ erytrocyty i granulocyty na dnie próbki,
- ✓ *Ficoll-Paque*,
- ✓ limfocyty, monocyty na granicy warstw,
- ✓ osocze na powierzchni.

Po usunięciu górnej warstwy osocza, komórki jednojądrzaste zebrane na granicy warstw w postaci kożucha, przenoszono do innej probówki za pomocą sterylnej pipety. Następnie komórki dwukrotnie płukano roztworem PBS i wirowano ($t = 10 \text{ min}$, $n = 1500 \text{ min}^{-1}$). Po usunięciu PBS komórki zawieszano w podłożu hodowlanym RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*). Żywotność komórek sprawdzano za pomocą testu z użyciem błękitu tryptanu. Do oceny gęstości zawiesiny stosowano komorę hematocytarną Thoma. Zawiesiny rozcieńczano za pomocą RPMI-1640 do końcowego stężenia komórek rzędu $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$.

➤ **Hodowle komórkowe**

Hodowle prowadzono na sterylnych 96-dołkowych płytkach hodowlanych w inkubatorze w atmosferze 5% CO₂ ($t = 72 \text{ h}$, $T = 37^\circ\text{C}$). Do dołków wprowadzono zawiesiny komórek. Następnie do wybranych dołków dodawano roztwór glukozy o stężeniu końcowym 400 mg/dl lub roztwór insuliny (Gensulin R) o stężeniu końcowym 10 µg/ml oraz fitohemaglutyninę (PHA – *Phytohemagglutinin*) jako czynnik mitogenny, o stężeniu końcowym 2,5 µg/ml. Łączna objętość odczynników w każdym dołku wynosiła 250 µl. Jako próby kontrolne stosowano 250 µl podłoża hodowlanego oraz zawiesinę komórek z PHA bez dodatku glukozy. Końcowy skład zawartości dołków przygotowywanych dla poszczególnych próbek był następujący:

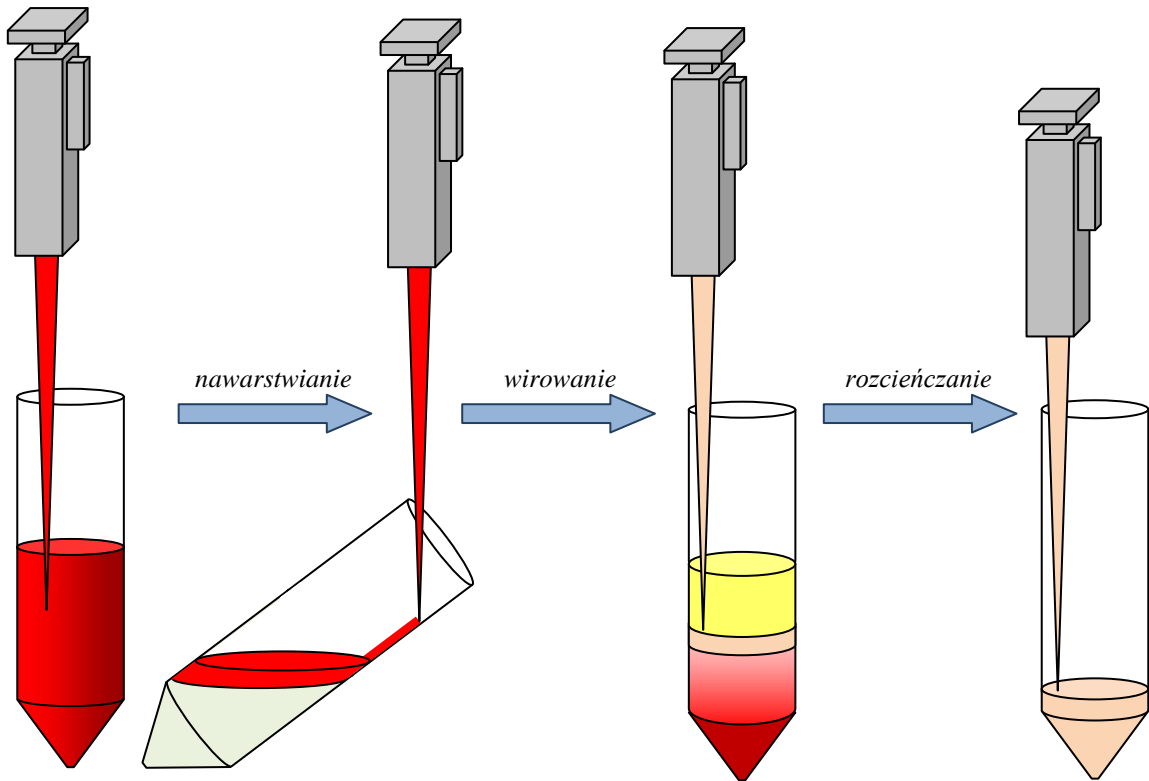
- ✓ 200 µl zawiesiny komórek + 10 µl PHA + 40 µl roztworu glukozy,
- ✓ 200 µl zawiesiny komórek + 10 µl PHA + 40 µl roztworu insuliny,
- ✓ 240 µl zawiesiny komórek + 10 µl PHA,
- ✓ 250 µl podłoża RPMI.

Po zakończeniu hodowli próbki odwirowywano ($t = 10 \text{ min}$, $n = 4000 \text{ min}^{-1}$). Nadsącz przechowywano do dalszych oznaczeń.

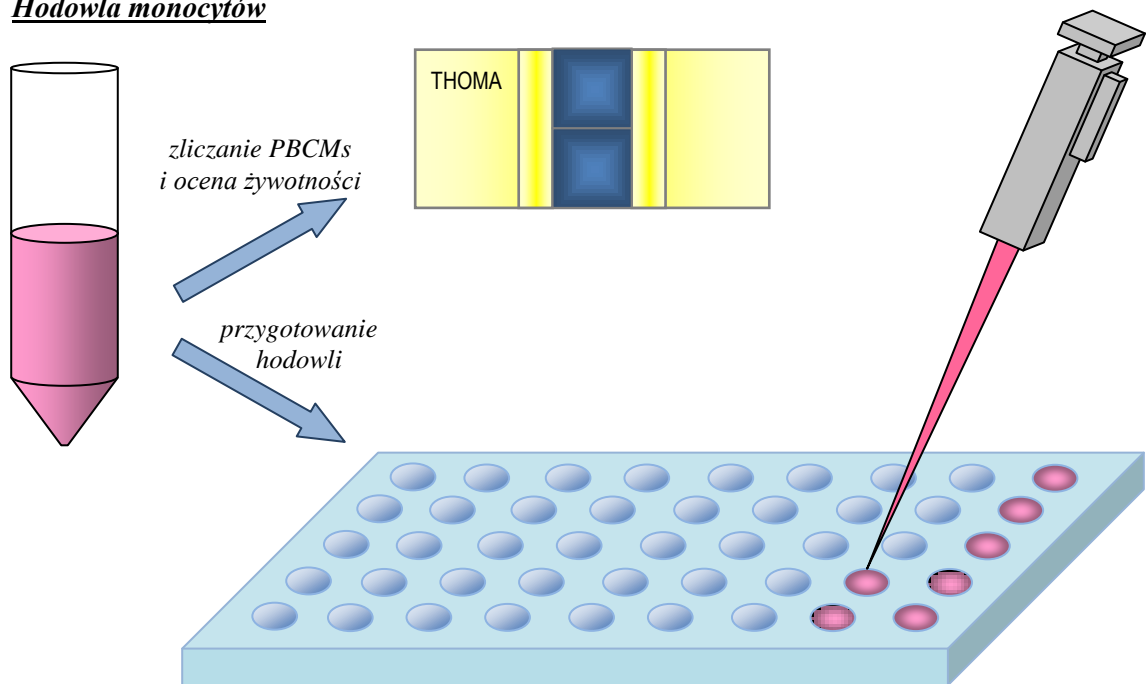
➤ **Ocena czynności sekrecyjnej PBMCs**

Do oceny stężeń wybranych czynników pro- i antyangiogennych w nadsączach stosowano metodę cytofluorymetrii przepływową z zastosowaniem komercyjnych testów macierzy kulkowych. Ocenę przeprowadzano analogicznie do opisanych wcześniej oznaczeń wykonywanych na próbkach surowicy.

Izolacja monocytów



Hodowla monocytów



■ krew ■ ficol ■ osocze ■ PBCMs ■ PBCMs zawieszona w RPMI ■ błękit trypanu

Ryc. 8. Uproszczony schemat izolacji i hodowli monocytów

III.1.3. Przebieg badania

Pierwszy etap obejmował pomiar stężenia czynników angiogennych w surowicy:

- chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami,
- chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami,
- osób bez cukrzycy nieotrzymujących leków.

Drugi etap polegał na zbadaniu sekrecji wybranych czynników angiogennych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej pochodzące od 12 osób, które zakwalifikowano do następujących grup terapeutyczno-klinicznych:

- chorzy na cukrzycę typu 2 leczeni statynami,
- chorzy na cukrzycę typu 2 nieleczeni statynami,
- osoby bez cukrzycy z zaburzeniami gospodarki lipidowej leczone statynami,
- osoby bez cukrzycy i dyslipidemii nieprzyjmujące żadnych leków.

W wymienionych grupach terapeutyczno-klinicznych zbadano czynność wydzielniczą komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w zakresie sekrecji czynników angiogennych w różnych warunkach środowiska:

- ✓ na standardowym podłożu (RPMI) (u wszystkich badanych),
- ✓ na standardowym podłożu w obecności wysokich stężeń glukozy (u wszystkich badanych)
- ✓ na standardowym podłożu w obecności wysokich stężeń insuliny (u osób bez cukrzycy i dyslipidemii)

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

Oznaczenia wykonywane były w Katedrze i Zakładzie Farmakologii (stężenie 1,5-AG, adiponektyny, rezystyny i peptydu C w osoczu) oraz w Katedrze i Zakładzie Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (stężenie czynników angiogennych w surowicy). Badania parametrów wyrównania metabolicznego (HbA_{1c}, glikemia na czczo, profil lipidowy) oraz dodatkowe badania laboratoryjne (badania biochemiczne i morfologia krwi obwodowej) wykonano *ex tempore* w laboratorium „Diagnostyka” Poznańskiego Ośrodka Specjalistycznego Usług Medycznych, w laboratorium „Medic-Lab” w Szamotułach lub w Dziale Diagnostyki Laboratoryjnej SPSK1 w Poznaniu.

III.1.4. Metody statystycznego opracowania wyników

Do przeprowadzenia obliczeń statystycznych zastosowano program komputerowy firmy StatSoft, Inc. STATISTICA version 10,0 (nr licencji JLVP201C994912AR-J).

Normalność rozkładu danych zbadano testem Shapiro-Wilka.

Wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej z podaniem wartości odchylenia standardowego i mediany.

Hipotezy statystyczne sprawdzono odpowiednimi testami w zależności od rozkładu danych. Dla zmiennych o rozkładzie normalnym stosowano analizę wariancji ANOVA (porównanie 3 grup) lub test t-Studenta (porównanie 2 grup). Dla zmiennych o rozkładzie danych różniącym się od normalnego stosowano test ANOVA rang Kruskala-Wallisa (porównanie 3 grup) lub test U-Manna-Whitneya (porównanie 2 grup).

Zanalizowano zależności pomiędzy zmiennymi obliczając współczynnik korelacji rang Spearmana.

Dla wykluczenia wpływu czynników towarzyszących, które mogłyby oddziaływać na występowanie różnic w zakresie wartości zmiennej zależnej (badanego czynnika pro- lub antyangiogenego) pomiędzy grupami, zastosowano analizę kowariancji (ANCOVA).

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

IV. Wyniki

IV.1. Charakterystyka badanych grup – etap I

Badaniu poddano łącznie 131 osób zakwalifikowanych do trzech grup. Pacjenci chorujący na cukrzycę typu 2 zostali podzieleni na dwie grupy w zależności od sposobu leczenia. Grupę 1 stanowiły osoby przyjmujące statyny (53 osoby), natomiast grupę 2 – pacjenci nieleczeni statynami (53 osoby). Grupę 3 stanowiły osoby bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej (25 osób).

Porównania parametrów i czynników **we wszystkich badanych grupach** na tym etapie analizy statystycznej dokonano z zastosowaniem analizy wariancji ANOVA lub analizy wariancji ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

W tabeli 1 przedstawiono charakterystykę badanych grup **pod względem epidemiologiczno-antropometrycznym**. Pacjenci należący do poszczególnych grup nie różnili się istotnie pod względem wieku. Charakteryzowali się też zbliżoną masą ciała, przy czym u większości z nich występowała nadwaga lub otyłość ($BMI > 25$). U pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2, zarówno leczonych statynami, jak i nieprzyjmujących leków z tej grupy, odnotowano istotnie większy obwód talii w stosunku do osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Natomiast wskaźnik WHR, świadczący o typie otyłości, był istotnie wyższy jedynie w grupie osób przyjmujących statyny w porównaniu z osobami bez cukrzycy. U wszystkich pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 odnotowano istotnie wyższe wartości ciśnienia tętniczego skurczowego w porównaniu z osobami bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Natomiast wartości ciśnienia rozkurczowego były istotnie wyższe jedynie u chorych na cukrzycę nieleczonych statynami w stosunku do osób bez cukrzycy.

W zakresie gospodarki węglowodanowej, uwzględniając wszystkie badane grupy, zaobserwowano, zgodnie z oczekiwaniami, istotne statystycznie różnice dotyczące parametrów wyrównania metabolicznego przedstawione w tabeli 2. Zarówno glikemia na czczo, jak i stężenie HbA_{1c} były znamienne wyższe w obu grupach obejmujących chorych na cukrzycę w porównaniu z osobami bez zaburzeń gospodarki

węglowodanowej. Nie stwierdzono natomiast różnic w odniesieniu do poziomów 1,5-AG w poszczególnych grupach.

W zakresie parametrów wyrównania gospodarki lipidowej stwierdzono wyraźnie niższe stężenie cholesterolu całkowitego oraz jego frakcji LDL w grupie pacjentów chorych na cukrzycę typu 2 przyjmujących statyny, w porównaniu z osobami nieleczonymi statynami. W tej ostatniej grupie stężenie frakcji LDL cholesterolu było istotnie wyższe także w stosunku do osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami w zakresie stężenia frakcji HDL cholesterolu i TG (Tab. 3).

Różnice w zakresie **parametrów obrazujących przebieg i zaawansowanie cukrzycy** przedstawiono w tabeli 4. Ze względu na to, że część chorych na cukrzycę typu 2 otrzymywała metforminę w skojarzeniu z insuliną zrezygnowano z zastosowania współczynnika $HOMA_{IR}$ (*Homeostasis Model Assessment*) dla oceny insulinooporności obwodowej, na rzecz oceny stężenia adiponektyny i rezystyny w surowicy, czyli adipokin ściśle związanych z nasileniem insulinooporności obwodowej [184, 187].

Zaobserwowano istotnie niższe stężenie adiponektyny u osób chorych na cukrzycę nieprzyjmujących statyn w porównaniu z osobami bez cukrzycy. Jednocześnie w obu grupach chorych na cukrzycę typu 2 stężenie adiponektyny nie różniło się istotnie. Z kolei stężenie rezystyny okazało się znamienne niższe u pacjentów z cukrzycą typu 2 przyjmujących statyny w stosunku do chorych nieleczonych statynami, a zbliżone do obserwowanego u osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej.

Stężenie peptydu C w surowicy na czczo, stanowiące wykładnik czynności wewnątrzwydzielniczej komórek β wysp trzustki, mieściło się w środkowej części zakresu referencyjnego dla osób zdrowych w grupie bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej i było istotnie niższe w tej grupie w porównaniu z wszystkimi grupami chorych na cukrzycę.

Analogiczną do wyżej opisanej analizę statystyczną przeprowadzono uwzględniając **wyłącznie grupy pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2** (test t-Studenta lub test Manna-Whitneya). Uzyskane dane i wyniki analiz zestawiono w tabelach 5÷8.

W wyniku porównania tych dwóch grup **pod względem parametrów epidemiologiczno-antropometrycznych** stwierdzono, iż osoby należące do grupy leczonej statynami były młodsze od pozostałych pacjentów z cukrzycą. Czas trwania klinicznie jawnej cukrzycy u osób przyjmujących statyny i u nieotrzymujących leków z tej grupy był zbliżony. Nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy grupami chorych na cukrzycę w zakresie parametrów informujących o stopniu i rodzaju otyłości, ani też znamienych różnic w odniesieniu do wartości ciśnienia tętniczego, zarówno skurczowego, jak i rozkurczowego (Tab. 5).

Wyniki porównania wyłącznie chorych na cukrzycę typu 2 **w zakresie parametrów gospodarki węglowodanowej i lipidowej** (Tab. 6, 7), a także w odniesieniu do **stężenia adiponektyny, rezystyny i peptydu C** w surowicy (Tab. 8), potwierdziły różnice zaobserwowane podczas porównywania trzech badanych grup łącznie.

Tab. 1. Porównanie parametrów epidemiologiczno-antropometrycznych w badanych grupach

Parametr	Cukrzyca typu 2 + statyna	Cukrzyca typu 2 bez statyny	Bez cukrzycy
	1	2	3
	n=53 K24/M29	n=53 K35/M18	n=25 K11/M14
Wiek (lata)	60,1±8,6 59,0	63,3±8,9 65,0	57,2±12,3 54,0
BMI (kg/m²)	31,7±5,7 31,3	31,3±4,7 31,1	30,1±6,7 29,8
Obwód talii (cm)	106,6±11,3 * 105,0	102,6±11,8 * 104,0	91,9±12,0 88,0
WHR	1,0±0,1 * 1,0	0,9±0,1 0,9	0,9±0,1 0,9
Ciśnienie skurczowe (mmHg)	143,6±17,0 * 140,0	142,7±15,3 * 140,0	131,7±18,2 130,0
Ciśnienie rozkurczowe (mmHg)	84,8±9,6 85,0	86,6±11,4 * 90,0	78,2±12,0 75,0

* – różnica znamienista statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3
Wyniki przedstawiono jako $\bar{x} \pm SD$ z podaniem mediany.

Tab. 2. Porównanie wykładników wyrównania metabolicznego w zakresie gospodarki węglowodanowej w badanych grupach

Parametr	Cukrzyca typu 2 + statyna	Cukrzyca typu 2 bez statyny	Bez cukrzycy
	1	2	3
	n=53 K24/M29	n=53 K35/M18	n=25 K11/M14
Glikemia na czczo (mg/dl)	140,4±38,5 * 132,0	129,1±24,4 * 127,0	90,4±7,5 92,0
HbA_{1c} (%)	7,1±1,4 * 6,7	6,9±1,1 * 6,9	5,6±0,5 5,6
1,5-AG (mg/l)	15,4±6,0 16,6	15,1±5,8 14,0	18,7±3,8 16,9

* – różnica znamienista statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3
Wyniki przedstawiono jako $\bar{x} \pm SD$ z podaniem mediany.

Tab. 3. Porównanie parametrów wyrównania metabolicznego w zakresie gospodarki lipidowej w badanych grupach

Parametr	Cukrzyca typu 2 + statyna	Cukrzyca typu 2 bez statyny	Bez cukrzycy
	1	2	3
	n=53 K24/M29	n=53 K35/M18	n=25 K11/M14
Cholesterol całkowity (mg/dl)	188,6±43,5 ▲ 184,0	209,5±45,5 203,0	207,5±41,3 197,0
LDL (mg/dl)	106,3±38,2 ▲ 99,8	125,5±35,4 ★ 124,0	100,1±41,2 100,0
HDL (mg/dl)	52,3±13,7 48,0	51,6±14,3 52,0	65,5±30,2 54,0
TG (mg/dl)	166,0±68,9 150,0	178,0±106,6 149,0	147,1±110,9 88,4

★ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3

▲ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2

Wyniki przedstawiono jako $\bar{x} \pm SD$ z podaniem mediany.

Tab. 4. Porównanie parametrów charakteryzujących czynność wydzielniczą komórek β wysp trzustki i insulinooporność obwodową w badanych grupach

Parametr	Cukrzyca typu 2 + statyna	Cukrzyca typu 2 bez statyny	Bez cukrzycy
	1	2	3
	n=53 K24/M29	n=53 K35/M18	n=25 K11/M14
Adiponektyna ($\mu\text{g/ml}$)	9,0±5,6 10,3	7,2±4,1 ★ 5,9	11,8±4,3 11,6
Rezystyna (ng/ml)	9,8±6,4 ▲ 7,9	14,8±7,9 14,8	10,9±6,7 9,2
Peptyd C (ng/ml)	2,3±2,1 ★ 0,9	2,7±1,5 ★ 2,4	1,5±0,3 1,5

★ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3

▲ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2

Wyniki przedstawiono jako $\bar{x} \pm SD$ z podaniem mediany.

Tab. 5. Porównanie parametrów epidemiologiczno-antropometrycznych u chorych na cukrzycę typu 2

Parametr	Cukrzyca typu 2 + statyna	Cukrzyca typu 2 bez statyny
	1	2
	n=53 K24/M29	n=53 K35/M18
Wiek (lata)	60,1±8,6 ▲ 59,0	63,3±8,9 65,0
Czas trwania ct2 (lata)	7,2±7,5 4,0	6,9±7,4 4,5
BMI (kg/m ²)	31,7±5,7 31,3	31,3±4,7 31,1
Obwód talii (cm)	106,6±11,3 105,0	102,6±11,8 104,0
WHR	1,0±0,1 1,0	0,9±0,1 0,9
Ciśnienie skurczowe (mmHg)	143,6±17,0 140,0	142,7±15,3 140,0
Ciśnienie rozkurczowe (mmHg)	84,8±9,6 85,0	86,6±11,4 90,0

▲ – różnica znamienista statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2
Wyniki przedstawiono jako $\bar{x} \pm SD$ z podaniem mediany.

Tab. 6. Porównanie wykładników wyrównania metabolicznego w zakresie gospodarki węglowodanowej u chorych na cukrzycę typu 2

Parametr	Cukrzyca typu 2 + statyna	Cukrzyca typu 2 bez statyny
	1	2
	n=53 K24/M29	n=53 K35/M18
Glikemia na czczo (mg/dl)	140,4±38,5 132,0	129,1±24,4 127,0
HbA _{1c} (%)	7,1±1,4 6,7	6,9±1,1 6,9
1,5-AG (mg/l)	15,4±6,0 16,6	15,1±5,8 14,0

Wyniki przedstawiono jako $\bar{x} \pm SD$ z podaniem mediany.

Tab. 7. Porównanie parametrów wyrównania metabolicznego w zakresie gospodarki lipidowej u chorych na cukrzycę typu 2

Parametr	Cukrzyca typu 2 + statyna	Cukrzyca typu 2 bez statyny
	1	2
	n=53 K24/M29	n=53 K35/M18
Cholesterol całkowity (mg/dl)	188,6±43,5 ▲ 184,0	209,5±45,5 203,0
LDL (mg/dl)	106,3±38,2 ▲ 99,8	125,5±35,4 124,0
HDL (mg/dl)	52,3±13,7 48,0	51,6±14,3 52,0
TG (mg/dl)	166,0±68,9 150,0	178,0±106,6 149,0

▲ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2
Wyniki przedstawiono jako $\bar{x} \pm SD$ z podaniem mediany.

Tab. 8. Porównanie parametrów charakteryzujących czynność wydzielniczą komórek β wysp trzustki i insulinooporność obwodową u chorych na cukrzycę typu 2

Parametr	Cukrzyca typu 2 + statyna	Cukrzyca typu 2 bez statyny
	1	2
	n=53 K24/M29	n=53 K35/M18
Adiponektyna ($\mu\text{g/ml}$)	9,0±5,6 10,3	7,2±4,1 5,9
Rezystyna (ng/ml)	9,8±6,4 ▲ 7,9	14,8±7,9 14,8
Peptyd C (ng/ml)	2,3±2,1 0,9	2,7±1,5 2,4

▲ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2
Wyniki przedstawiono jako $\bar{x} \pm SD$ z podaniem mediany.

IV.2. Porównanie stężenia wybranych czynników proangiogennych pomiędzy badanymi grupami – etap I

Obejmując analizą wszystkie grupy pacjentów porównano stężenia badanych czynników proangiogennych w surowicy krwi z zastosowaniem analizy wariancji ANOVA lub ANOVA rang Kruskala-Wallisa (Tab. 9, Ryc. 9÷12).

Wykazano, że stężenia **VEGF** i **bFGF** w surowicy krwi były istotnie niższe w grupie chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami w porównaniu z osobami cierpiącymi na cukrzycę nieleczonymi statynami, a przyjmowały wartości podobne do zaobserwowanych wśród osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej (Tab. 9, Ryc. 9÷10).

Stwierdzono także, że stężenie **angiogeniny** w surowicy krwi było zbliżone u osób chorujących na cukrzycę leczonych statynami oraz u osób bez cukrzycy. Natomiast w grupie chorych na cukrzycę nieleczonych statynami stężenie angiogeniny było istotnie wyższe w porównaniu z grupą bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej (Tab. 9, Ryc. 11).

Zaobserwowano również, że u chorych na cukrzycę, zarówno leczonych statynami, jak i nieotrzymujących leków z tej grupy, **stężenie MCP-1** w surowicy krwi było znamienne wyższe w porównaniu z osobami bez cukrzycy. Jednocześnie stężenie MCP-1 było istotnie niższe u chorych na cukrzycę leczonych statynami w porównaniu z chorymi na cukrzycę nieleczonymi statynami (Tab. 9, Ryc. 12).

Poddając analizie **wyłącznie pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2** z zastosowaniem testu Manna-Whithey'a zaobserwowano, że stężenia **wszystkich badanych czynników proangiogennych** w surowicy krwi były znamienne niższe u osób przyjmujących statyny w porównaniu z osobami nieleczonymi tymi lekami (Tab. 10).

Tab. 9. Porównanie stężenia badanych czynników proangiogennych w poszczególnych grupach

Parametr	Cukrzyca typu 2 + statyna	Cukrzyca typu 2 bez statyny	Bez cukrzycy
	1	2	3
	n=53 K24/M29	n=53 K35/M18	n=25 K11/M14
VEGF (pg/dl)	57,0±60,7 ▲ 34,6	91,7±88,4 ♦ 70,5	27,0±20,5 23,7
bFGF (pg/dl)	1,5±1,0 ▲ 1,3	3,2±2,2 ♦ 2,3	1,1±0,4 1,2
Angiogenina (pg/dl)	389,2±135,3 401,0	455,8±162,5 ★ 470,0	358,1±150,6 383,2
MCP-1 (pg/dl)	205,8±135,2 ♦ 166,7	298,4±226,8 ★ 209,3	118,3±21,6 110,8

♦ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup

▲ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2

★ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3

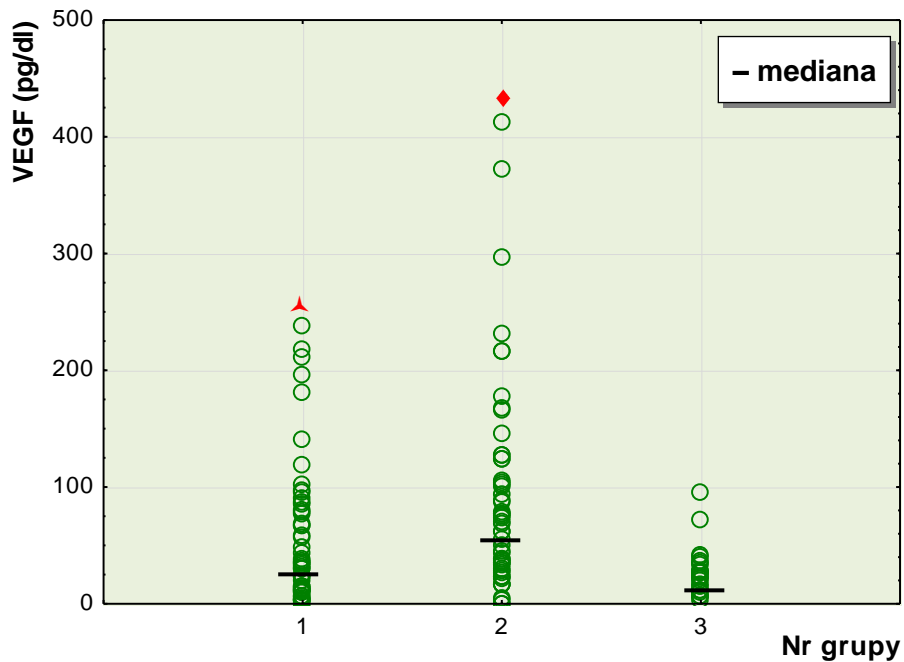
Wyniki przedstawiono jako $\bar{x} \pm SD$ z podaniem mediany.

Tab. 10. Porównanie stężenia badanych czynników proangiogennych u chorych na cukrzycę

Parametr	Cukrzyca typu 2 + statyna	Cukrzyca typu 2 bez statyny
	1	2
	n=53 K24/M29	n=53 K35/M18
VEGF (pg/dl)	57,0±60,7 ▲ 34,6	91,7±88,4 70,5
bFGF (pg/dl)	1,5±1,0 ▲ 1,3	3,2±2,2 2,3
Angiogenina (pg/dl)	389,2±135,3 ▲ 401,0	455,8±162,5 470,0
MCP-1 (pg/dl)	205,8±135,2 ▲ 166,7	298,4±226,8 209,3

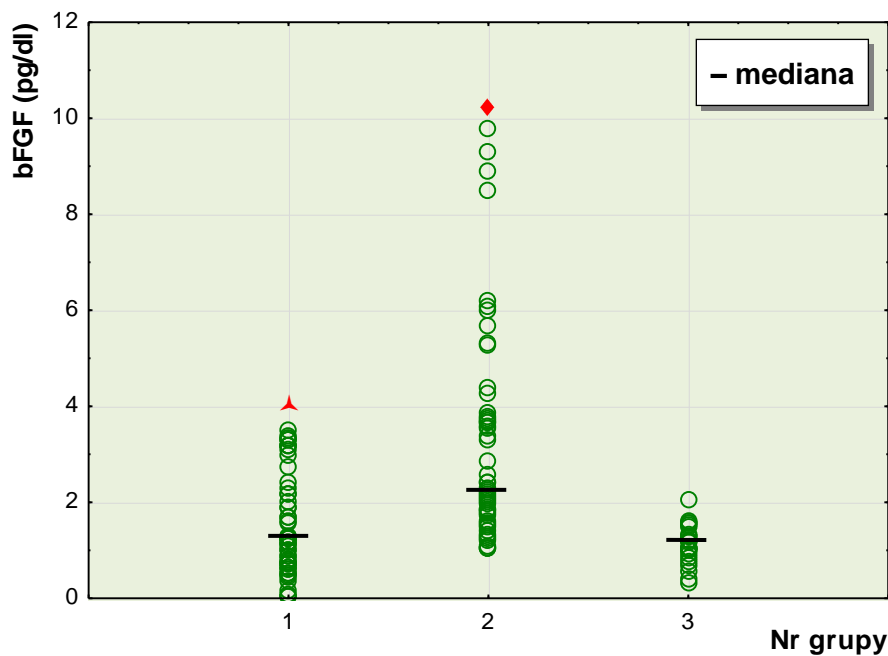
▲ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2

Wyniki przedstawiono jako $\bar{x} \pm SD$ z podaniem mediany.



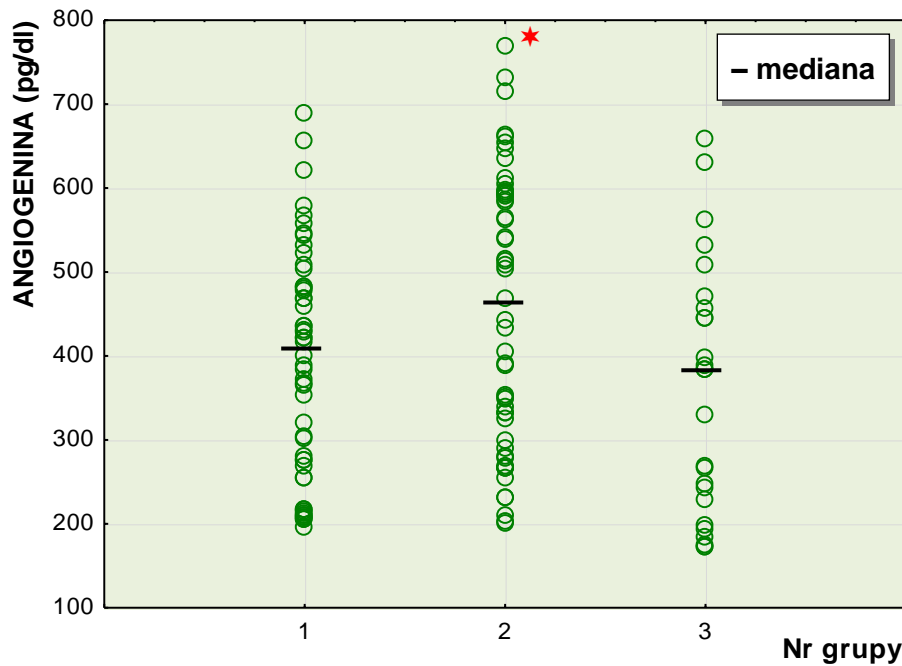
- ◆ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup
 - ▲ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2
- 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez cukrzycy

Ryc. 9. Porównanie stężenia **VEGF** w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami



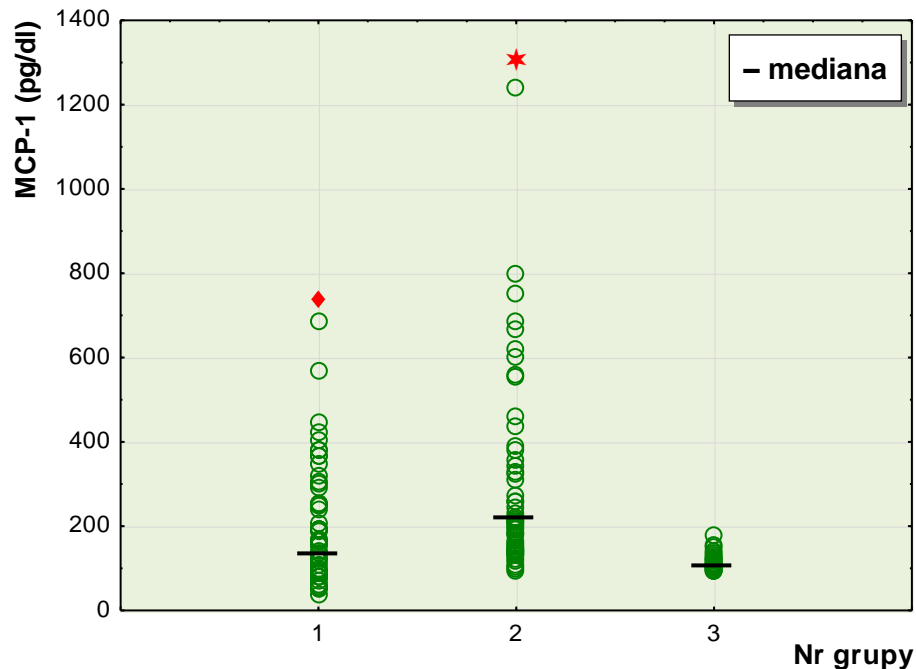
- ◆ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup
 - ▲ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2
- 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez cukrzycy

Ryc. 10. Porównanie stężenia **bFGF** w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami



★ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3
 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez cukrzycy

Ryc. 11. Porównanie stężenia angiogeniny w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami



◆ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup
 ★ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3
 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez cukrzycy

Ryc. 12. Porównanie stężenia MCP-1 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami

IV.3. Porównanie stężenia wybranych czynników antyangiogennych pomiędzy badanymi grupami – etap I

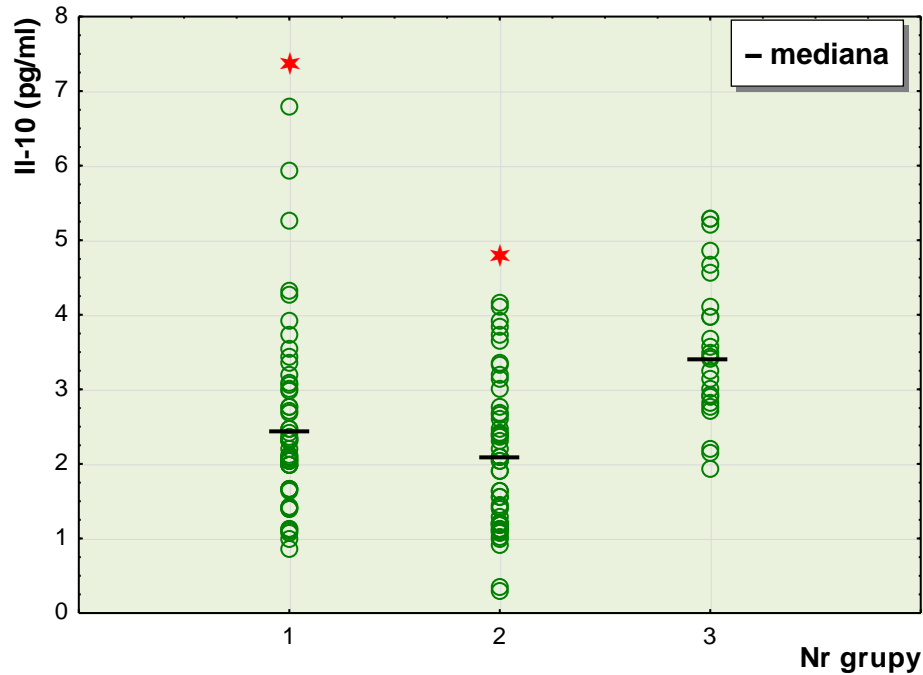
Obejmując analizą wszystkie badane grupy porównano stężenia badanych czynników antyangiogennych w surowicy krwi z zastosowaniem testu ANOVA rang Kruskala-Wallisa.

Stwierdzono, że stężenie **II-10** w surowicy było znamienne niższe w obu grupach pacjentów chorujących na cukrzycę w porównaniu z osobami bez cukrzycy (Tab. 11, Ryc. 13). Z kolei stężenie **II-12** było istotnie wyższe w obu grupach chorych na cukrzycę w stosunku do osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej (Tab. 11, Ryc. 14). Nie stwierdzono natomiast znamienych statystycznie różnic w zakresie stężeń czynników antyangiogennych w surowicy krwi pomiędzy obiema grupami chorych na cukrzycę, wówczas, gdy analizowano wszystkie grupy łącznie (Tab. 11).

Tab. 11. Porównanie stężenia badanych czynników antyangiogennych w poszczególnych grupach

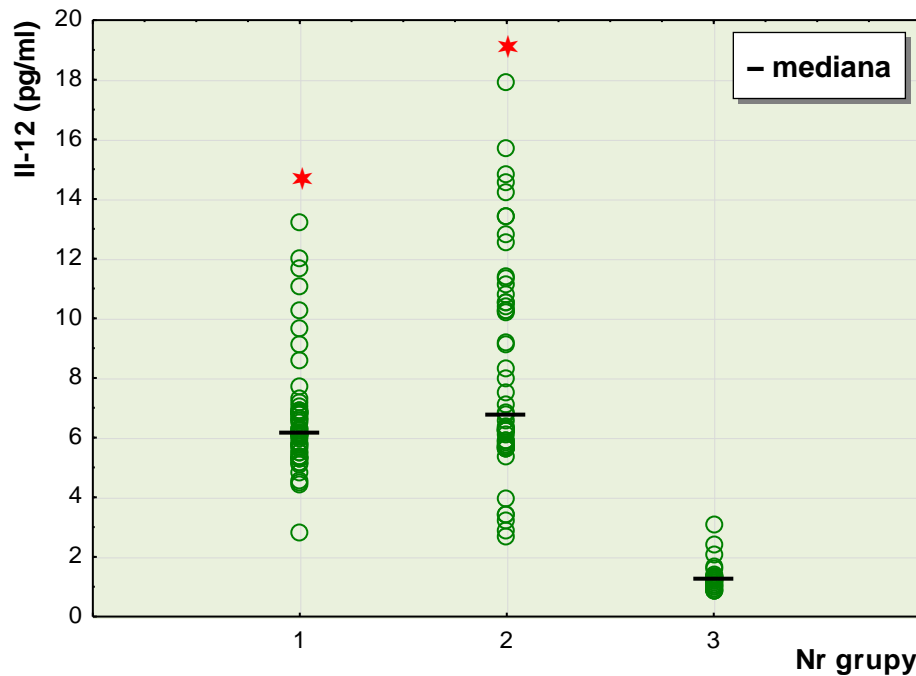
Parametr	Cukrzyca typu 2 + statyna	Cukrzyca typu 2 bez statyny	Bez cukrzycy
	1	2	3
	n=53 K24/M29	n=53 K35/M18	n=25 K11/M14
II-10 (pg/ml)	2,5±1,2* 2,3	2,0±1,0* 2,0	3,6±1,0 3,4
II-12 (pg/ml)	6,7±2,0* 6,2	8,3±3,6* 6,8	1,4±0,5 1,3

* – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3
Wyniki przedstawiono jako $\bar{x} \pm SD$ z podaniem mediany.



★ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3
 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez cukrzycy

Ryc. 13. Porównanie stężenia IL-10 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami



★ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3
 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – zdrowi

Ryc. 14. Porównanie stężenia IL-12 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami

Poddając analizie, z zastosowaniem testu Manna-Whitneya, **wyłącznie pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2** stwierdzono, że stężenie **II-12** było istotnie niższe u osób przyjmujących statyny. Nie wykazano znamiennej różnicy w zakresie stężenia **II-10** w surowicy pomiędzy grupami chorych na cukrzycę różniących się pod względem przyjmowania statyn (Tab. 12).

Tab. 12. Porównanie stężenia badanych czynników antyangiogennych u chorych na cukrzycę

Parametr	Cukrzyca typu 2 + statyna	Cukrzyca typu 2 bez statyny
	1	2
	n=53 K24/M29	n=53 K35/M18
II-10 (pg/ml)	2,5±1,2 2,3	2,0±1,0 2,0
II-12 (pg/ml)	6,7±2,0 ▲ 6,2	8,3±3,6 6,8

▲ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2
Wyniki przedstawiono jako $\bar{x} \pm SD$ z podaniem mediany.

IV.4. Porównanie stężenia wybranych czynników modyfikujących angiogenezę pomiędzy badanymi grupami z uwzględnieniem leczenia statynami i wpływu parametrów antropometryczno-epidemiologicznych oraz czynników związanych z przebiegiem cukrzycy – etap I

Kolejny etap analizy statystycznej zdeterminowany został niezbędnym dla właściwej interpretacji uzyskanych wyników założeniem, że stężenia czynników pro- i antyangiogennych w surowicy krwi mogą być uwarunkowane nie tylko stosowaniem statyn, ale także parametrami antropometryczno-epidemiologicznymi oraz czynnikami związanymi z przebiegiem cukrzycy, różniącymi się niejednokrotnie pomiędzy poszczególnymi grupami. W związku z tym przeprowadzono porównanie stosując analizę kowariancji, której zadaniem było wyeliminowanie wpływu wspomnianych parametrów na poziomy czynników angiogennych w badanych grupach.

Zastosowano kolejno cztery modele tej analizy statystycznej. W każdym z tych modeli zmienną zależną stanowił jeden z czynników pro- lub antyangiogennych. Natomiast zmiennymi niezależnymi (towarzyszącymi) były wspomniane parametry potencjalnie modyfikujące poziomy czynników angiogennych:

- w modelu 1 – parametry antropometryczno-epidemiologiczne (wiek, BMI, obwód talii, WHR, ciśnienie skurczowe i rozkurczowe),
- w modelu 2 – parametry związane z wyrównaniem gospodarki węglowodanowej (HbA_{1c}, 1,5-AG, glikemia na czczo),
- w modelu 3 – parametry związane z wyrównaniem gospodarki lipidowej (stężenie cholesterolu całkowitego, LDL, HDL, TG),
- w modelu 4 – czynniki związane z przebiegiem cukrzycy typu 2 (stężenie adiponektyny, rezystyny, peptydu C).

Łączne zestawienie wyników analizy kowariancji z uwzględnieniem wszystkich badanych grup przedstawiono w tabelach 13 i 14.

Wykazano, że leczenie statynami było czynnikiem modyfikującym stężenia **VEGF** w surowicy, niezależnie od wartości parametrów antropometryczno-epidemiologicznych oraz wykładników wyrównania metabolicznego (modele 1÷3). Dla każdego z wyżej wymienionych modeli analizy kowariancji zaobserwowano,

że w grupie chorych na cukrzycę leczonych statynami stężenia VEGF w surowicy były znacząco niższe w porównaniu z chorymi na cukrzycę nieleczonymi lekami z tej grupy oraz zbliżone do obserwowanych u osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej (Ryc. 15÷17).

Jednocześnie zastosowanie modelu 4, w którym zmienne towarzyszące stanowiły adipocytokiny i stężenie peptydu C, ujawniło, że na kształtowanie się wartości VEGF w surowicy fakt stosowania statyn u badanych wywierał znamienny wpływ, jednakże w mniejszym stopniu, aniżeli wartości wykładnika czynności wewnętrzwydzielniczej komórek β wysp trzustki oraz stężenie rezystyny w surowicy, czyli parametr charakteryzujący insuliooporność obwodową (Tab. 13).

Niezależnie od zastosowanego modelu analizy kowariancji, stężenie **bFGF** w surowicy krwi było zdeterminowane stosowaniem statyn i przyjmowało wartości niższe wśród chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami w porównaniu z chorymi nieotrzymującymi statyn. W tej ostatniej grupie, w przeciwieństwie do grupy leczonej statynami, stężenie bFGF w surowicy było wyższe w porównaniu do osób bez cukrzycy (Tab. 13, Ryc. 18÷21).

Wykazano także, iż na różnice stężeń bFGF pomiędzy badanymi grupami dominujący wpływ ma wprawdzie stosowanie statyn, ale do zmian stężenia bFGF w surowicy przyczynić się mogą także różnice w zakresie obwodu talii, wskaźnika WHR oraz stężenia TG w surowicy (Tab. 13).

W odniesieniu do stężenia **angiogeniny** w surowicy zaobserwowano istotne różnice pomiędzy badanymi grupami, stosując modele 1, 2 i 4 (Tab. 13, Ryc. 22, 23). Stężenie angiogeniny w grupie chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami nie różniło się od stężenia tego białka w surowicy osób bez cukrzycy, natomiast wśród chorych na cukrzycę nieleczonych statynami stężenie angiogeniny było istotnie wyższe w porównaniu z osobami bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej (modele 1 i 4) (Tab. 13, Ryc. 22). Zastosowanie modelu kowariancji eliminującego wpływ parametrów wyrównania metabolicznego w zakresie gospodarki węglowodanowej na kształtowanie się poziomu angiogeniny w poszczególnych grupach pozwoliło zauważyć, że stężenie angiogeniny jest istotnie niższe w grupie chorych na cukrzycę leczonych statynami w porównaniu z chorymi nieotrzymującymi statyn (model 2)

(Tab. 13, Ryc. 23). Niemniej znacznie bardziej istotne wydaje się oddziaływanie współlistniejących stężeń 1,5-AG w osoczu (model 2) (Tab. 13) oraz peptydu C w surowicy na czczo (model 4) (Tab. 13) na różnice stężeń angiogeniny pomiędzy badanymi grupami.

Analiza kowariancji potwierdziła także obecność różnic w zakresie stężenia **MCP-1** pomiędzy badanymi grupami, wskazując na znaczenie stosowania statyn w tym zakresie (modele 1-3) (Tab. 13, Ryc. 24÷26). Wykazano, że stężenie MCP-1 w surowicy chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami jest zbliżone do stężeń obserwowanych u osób bez cukrzycy i zmiennie niższe w porównaniu z chorymi na cukrzycę nieleczonymi statynami. W tej ostatniej grupie stężenia MCP-1 w surowicy były jednocześnie wyższe niż stężenia w grupie osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej.

Model 4 analizy kowariancji uwypuklił znaczenie stężenia peptydu C w surowicy dla kształtowania się różnic poziomów MCP-1 pomiędzy badanymi grupami (Tab. 13). Wykazano także, iż czynnikami modyfikującymi stężenia MCP-1 w surowicy w badanych grupach, oddziałującymi z nieco mniejszą siłą niż farmakoterapia z zastosowaniem statyn, były wskaźnik BMI i obwód talii oraz stężenie HbA_{1c} i 1,5-AG (Tab. 13).

Analiza kowariancji, w której zmienną zależną było stężenie **II-10** w surowicy wykazała istnienie różnic między badanymi grupami (Tab 14, Ryc. 27÷30). Stwierdzono, że stężenie II-10 w surowicy chorych na cukrzycę typu 2, niezależnie od stosowania statyn, było niższe aniżeli u osób bez cukrzycy. Nie wykazano jednocześnie istotnych różnic pomiędzy chorymi na cukrzycę typu 2 leczonymi i nieleczonymi statynami.

Analiza ta ujawniła jednocześnie, że różnice międzygrupowe w zakresie stężeń II-10 w surowicy uwarunkowane były także stężeniem HDL i adiponektyny (model 3 i 4) (Tab. 14).

Biorąc pod uwagę stężenie **II-12** w surowicy stwierdzono, że istniały różnice pomiędzy wszystkimi badanymi grupami (Tab. 14, Ryc. 31÷34). Niezależnie od zastosowanego modelu kowariancji w grupie chorych na cukrzycę leczonych statynami stężenie II-12 w surowicy było wyższe niż u osób bez cukrzycy i jednocześnie niższe

w porównaniu z chorymi na cukrzycę nieleczonymi statynami. Jednocześnie stężenie Il-12 w surowicy chorych na cukrzycę nieleczonych statynami było znamienne wyższe niż u osób bez zaburzeń węglowodanowych.

Na występowanie wspomnianych różnic w stężeniu Il-12 wpływ wywarło także stężenie 1,5-AG w osoczu oraz stężenie rezystyny w surowicy (model 2 i 4) (Tab. 14).

Tab. 13. Wyniki analizy kowariancji obejmującej wszystkie badane grupy, w której czynniki proangiogenne stanowią zmienne zależne

	Zmienna towarzysząca	Zmienna zależna							
		VEGF		bFGF		Angiogenina		MCP-1	
		F	p	F	p	F	p	F	p
Model 1	Wiek	0,0	NS	0,8	NS	0,8	NS	0,0	NS
	BMI	0,8	NS	1,5	NS	0,6	NS	5,6	0,02*
	Obwód talii	2,1	NS	4,8	0,03*	0,0	NS	5,7	0,02*
	WHR	0,0	NS	6,0	0,01*	0,0	NS	1,3	NS
	Ciśnienie skurcz.	1,2	NS	0,0	NS	0,1	NS	0,4	NS
	Ciśnienie rozkurcz.	0,1	NS	0,3	NS	2,3	NS	0,0	NS
	Sposób leczenia	5,4	0,005*	20,1	0,0001*	3,1	0,05*	6,1	0,003*
Model 2	HbA _{1c}	3,7	NS	0,0	NS	3,1	NS	7,5	0,01*
	1,5-AG	0,8	NS	0,5	NS	16,5	0,0001*	5,2	0,02*
	Glikemia na czczo	0,6	NS	0,5	NS	0,2	NS	2,4	NS
	Sposób leczenia	8,3	0,0004*	19,8	0,0001*	3,7	0,03*	9,4	0,0001*
Model 3	Chol. całkow.	0,6	NS	0,0	NS	2,0	NS	1,7	NS
	LDL	1,4	NS	0,0	NS	2,2	NS	2,0	NS
	HDL	0,3	NS	0,6	NS	0,0	NS	1,2	NS
	TG	2,5	NS	4,1	0,04*	0,3	NS	0,1	NS
	Sposób leczenia	4,3	0,01*	18,8	0,0001*	2,5	NS	6,5	0,002*
Model 4	Adiponektyna	0,6	NS	0,04	NS	0,2	NS	2,3	NS
	Rezystatyna	10,2	0,002*	0,2	NS	0,0	NS	3,5	NS
	Peptyd C	25,1	0,0001*	0,5	NS	8,4	0,0034*	28,1	0,0001*
	Sposób leczenia	1,2	NS	16,0	0,0001*	1,6	NS	2,0	NS

* – wartość znamionna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$;

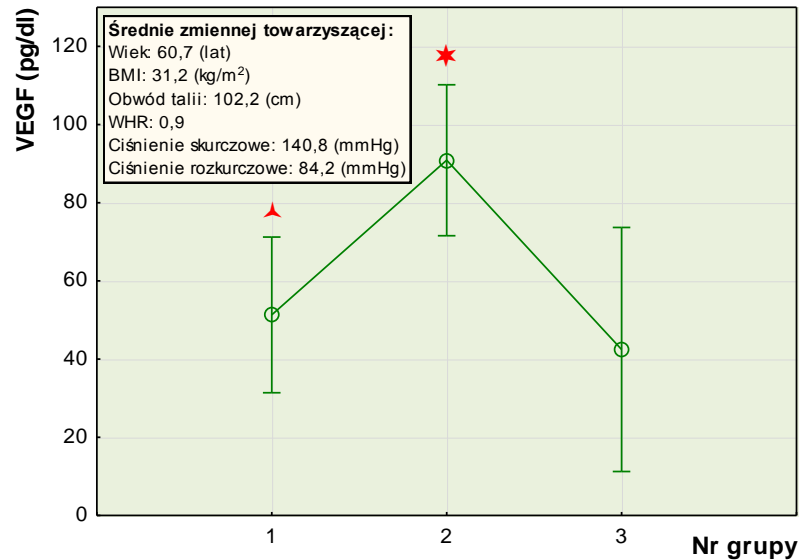
NS – wartość współczynnika p nieznamionna statystycznie

Tab. 14. Wyniki analizy kowariancji obejmującej wszystkie badane grupy, w której czynniki antyangiogenne stanowią zmienne zależne

	Zmienna towarzysząca	Zmienna zależna			
		II-10		II-12	
		F	p	F	p
Model 1	Wiek	0,6	NS	0,1	NS
	BMI	2,5	NS	0,0	NS
	Obwód talii	0,6	NS	0,3	NS
	WHR	0,0	NS	0,4	NS
	Ciśnienie skurczowe	0,4	NS	0,1	NS
	Ciśnienie rozkurczowe	0,4	NS	0,5	NS
	Sposób leczenia	13,1	0,0001*	44,5	0,0001*
Model 2	HbA _{1c}	1,2	NS	2,2	NS
	1,5-AG	0,1	NS	4,0	0,05*
	Glikemia na czczo	1,9	NS	0,3	NS
	Sposób leczenia	14,5	0,0001*	51,8	0,0001*
Model 3	Cholesterol całkowity	0,4	NS	0,4	NS
	LDL	0,3	NS	0,6	NS
	HDL	4,6	0,03*	0,7	NS
	TG	0,2	NS	0,4	NS
	Sposób leczenia	11,0	0,0001*	42,7	0,0001*
Model 4	Adiponektyna	7,9	0,006*	1,7	NS
	Rezystyna	0,8	NS	31,7	0,0001*
	Peptyd C	0,1	NS	0,3	NS
	Sposób leczenia	11,2	0,0001*	58,3	0,0001*

* – wartość znamionna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$;

NS – wartość współczynnika p nieznamionna statystycznie



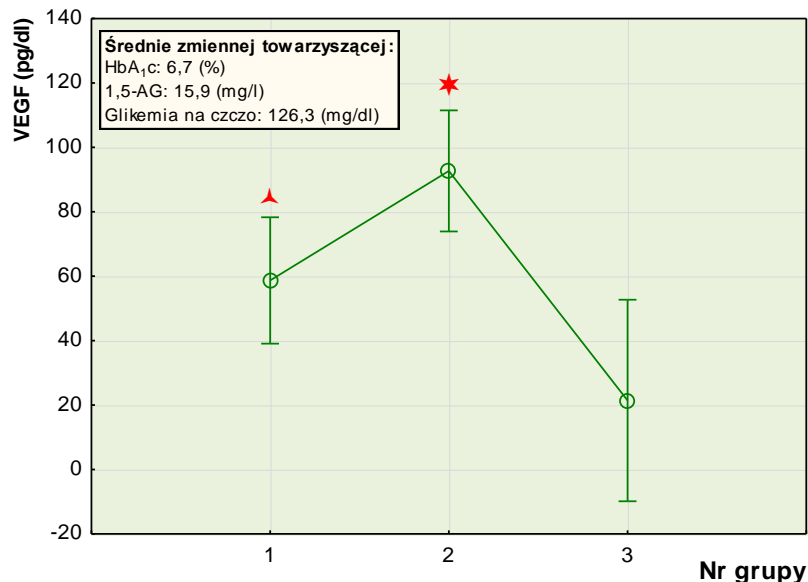
Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

▲ – różnica znamienista statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2

★ – różnica znamienista statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3

1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

Ryc. 15. Porównanie stężenia VEGF w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 1)



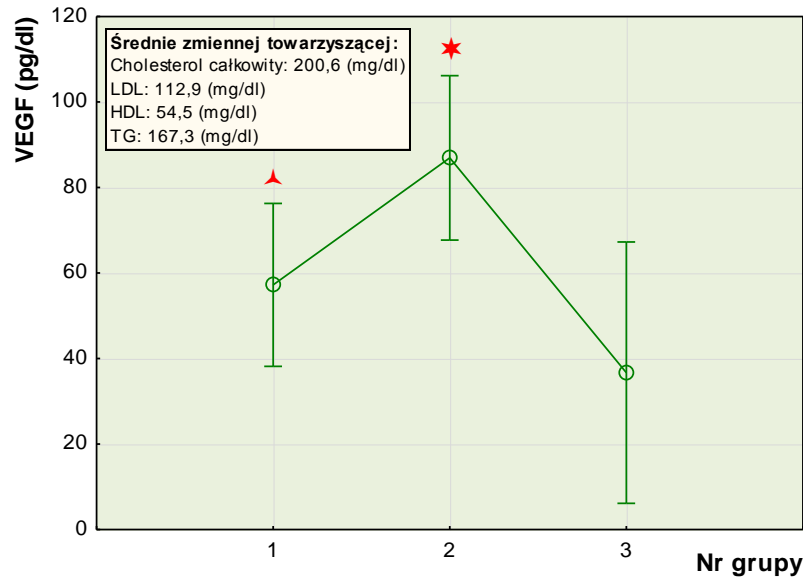
Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

▲ – różnica znamienista statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2

★ – różnica znamienista statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3

1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

Ryc. 16. Porównanie stężenia VEGF w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 2)



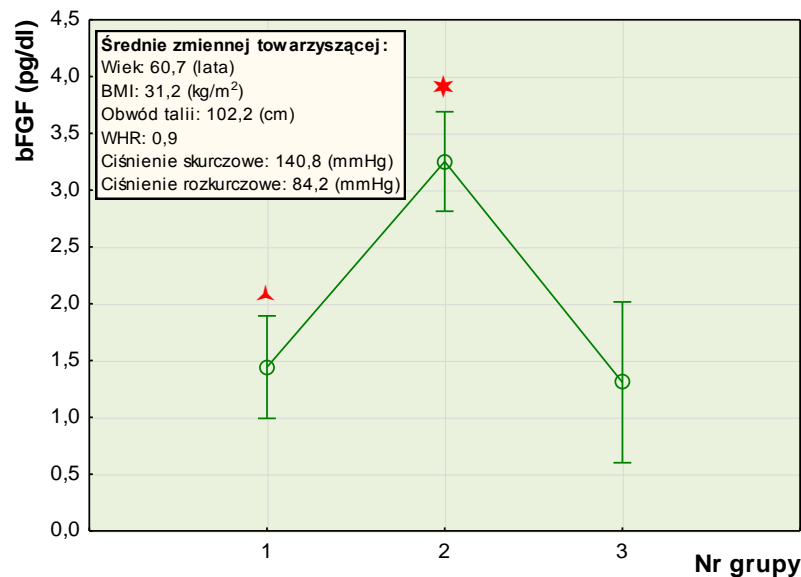
Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

▲ – różnica znamiennej statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2

★ – różnica znamiennej statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3

1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

Ryc. 17. Porównanie stężenia VEGF w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 3)



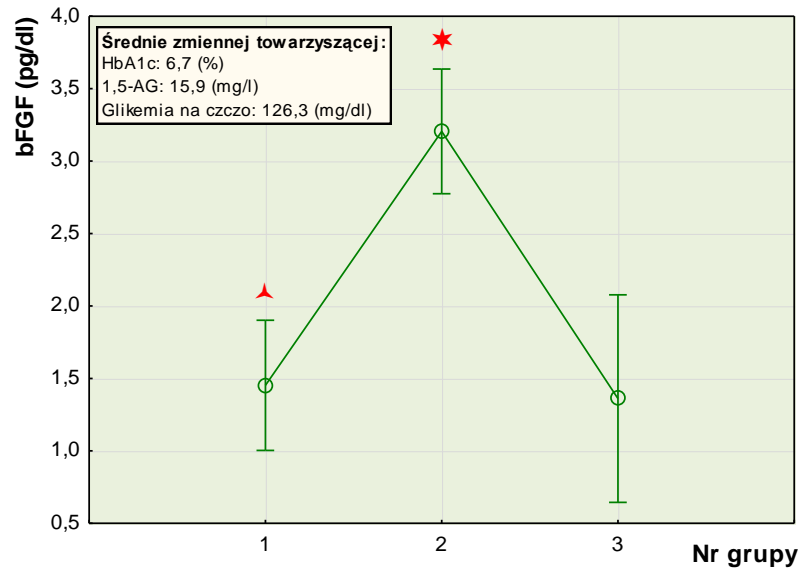
Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

▲ – różnica znamiennej statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2

★ – różnica znamiennej statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3

1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

Ryc. 18. Porównanie stężenia bFGF w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 1)



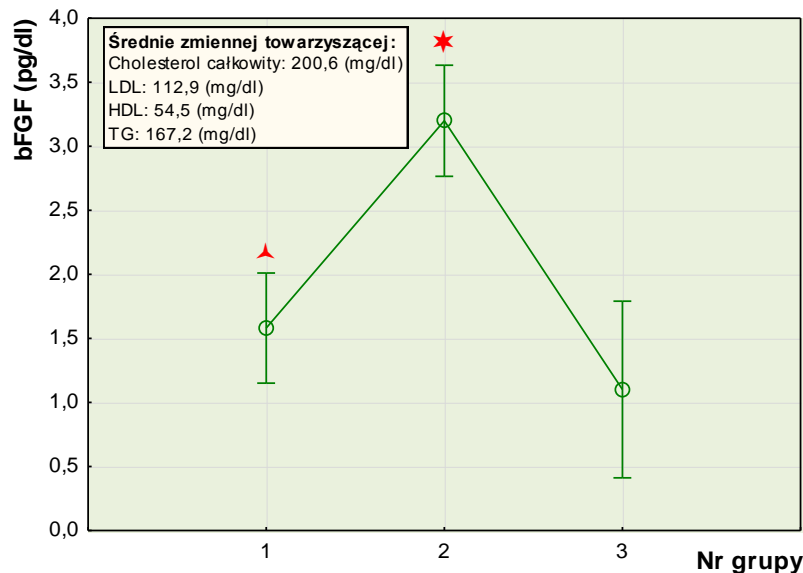
Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

▲ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2

★ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3

1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

Ryc. 19. Porównanie stężenia bFGF w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 2)



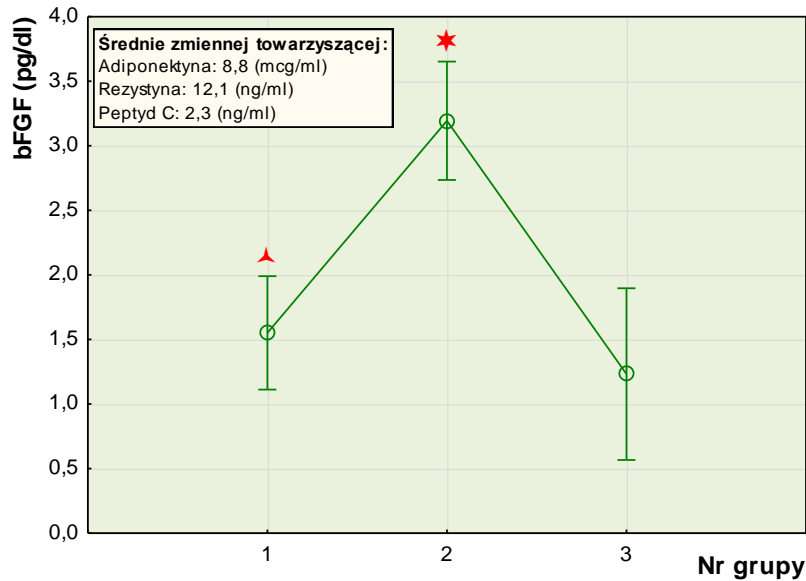
Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

▲ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2

★ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3

1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

Ryc. 20. Porównanie stężenia bFGF w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 3)



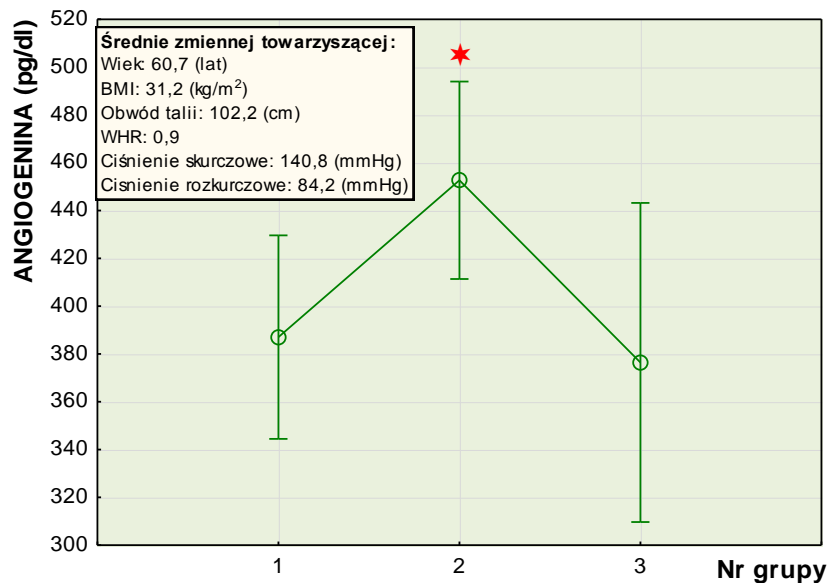
Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

▲ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2

★ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3

1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

Ryc. 21. Porównanie stężenia bFGF w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 4)

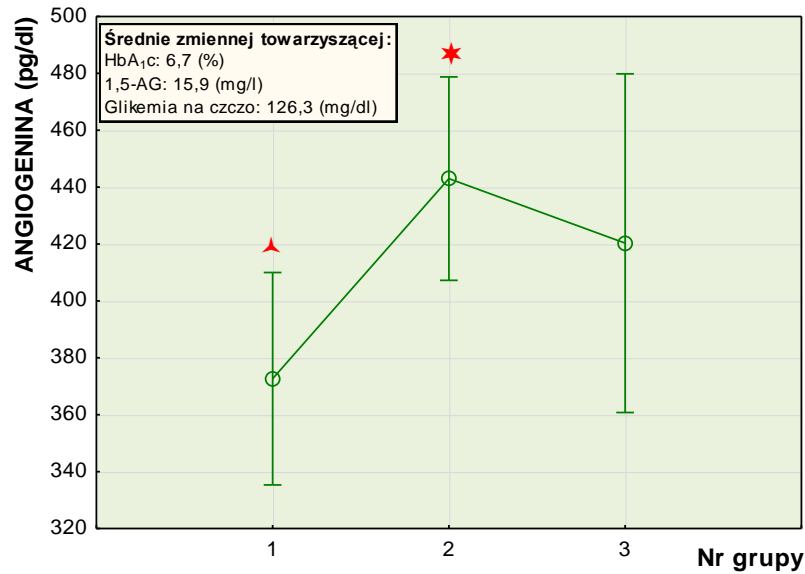


Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

★ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3

1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

Ryc. 22. Porównanie stężenia angiogeniny w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 1)



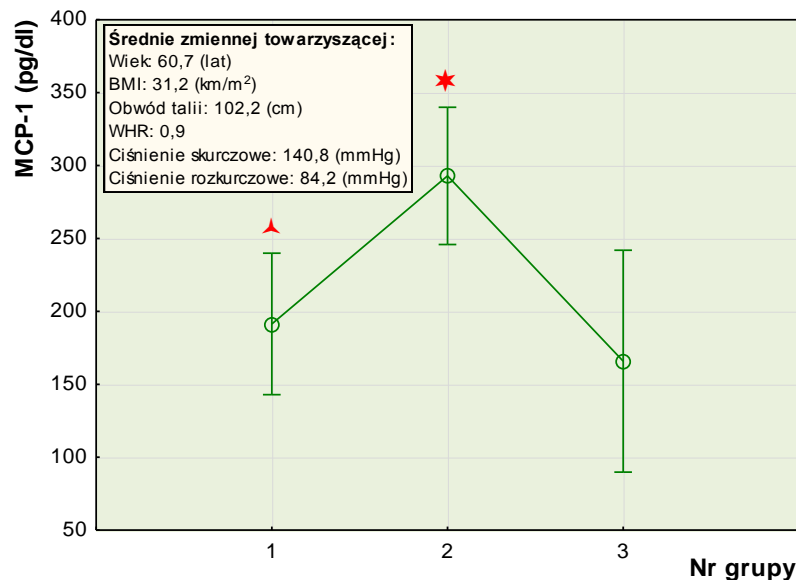
Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

▲ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2

★ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3

1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

Ryc. 23. Porównanie stężenia angiogeniny w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 2)



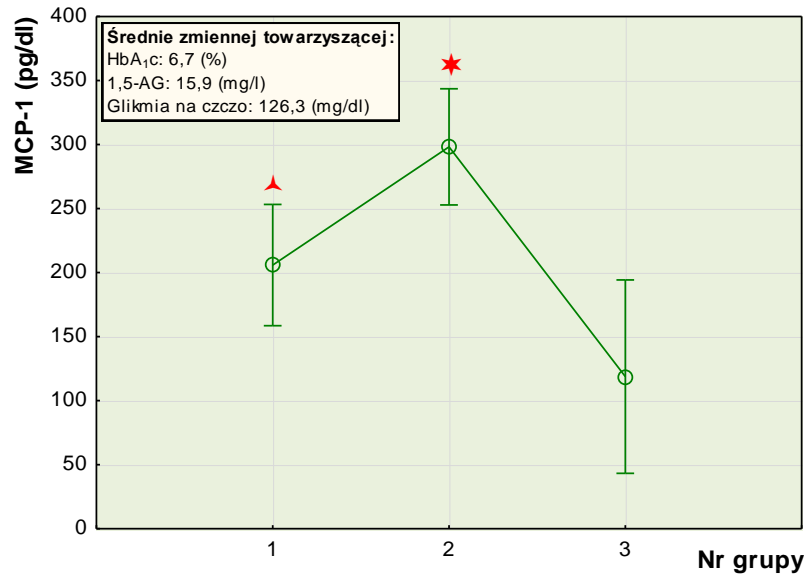
Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

▲ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2

★ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3

1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

Ryc. 24. Porównanie stężenia MCP-1 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 1)



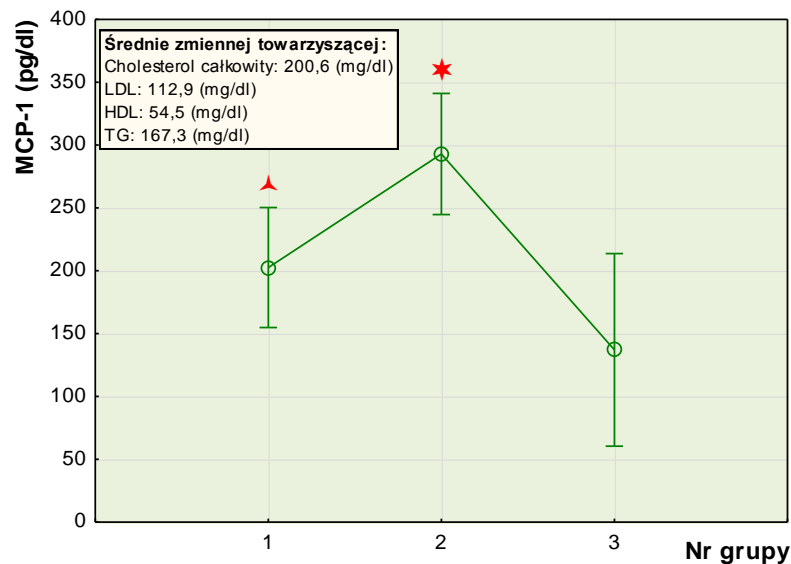
Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

▲ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2

★ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3

1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

Ryc. 25. Porównanie stężenia MCP-1 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 2)



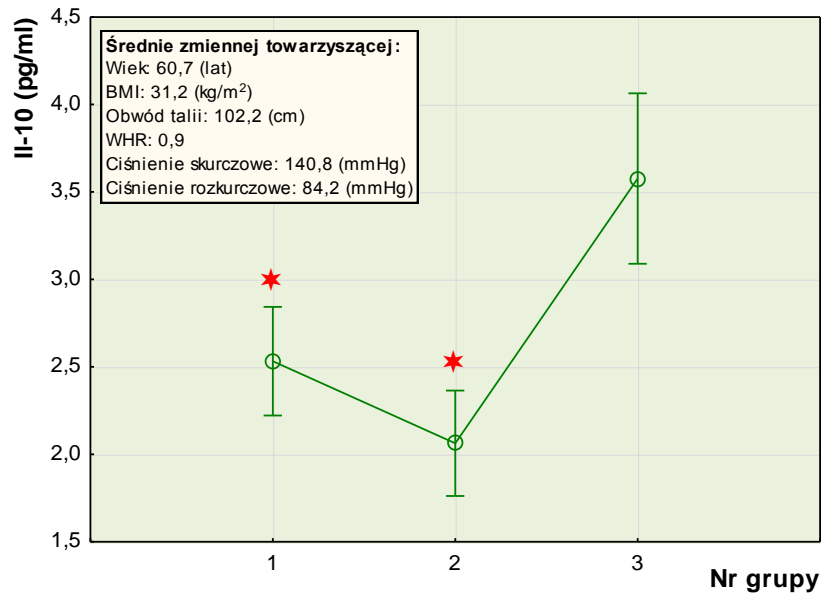
Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

▲ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 2

★ – różnica znamienna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3

1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

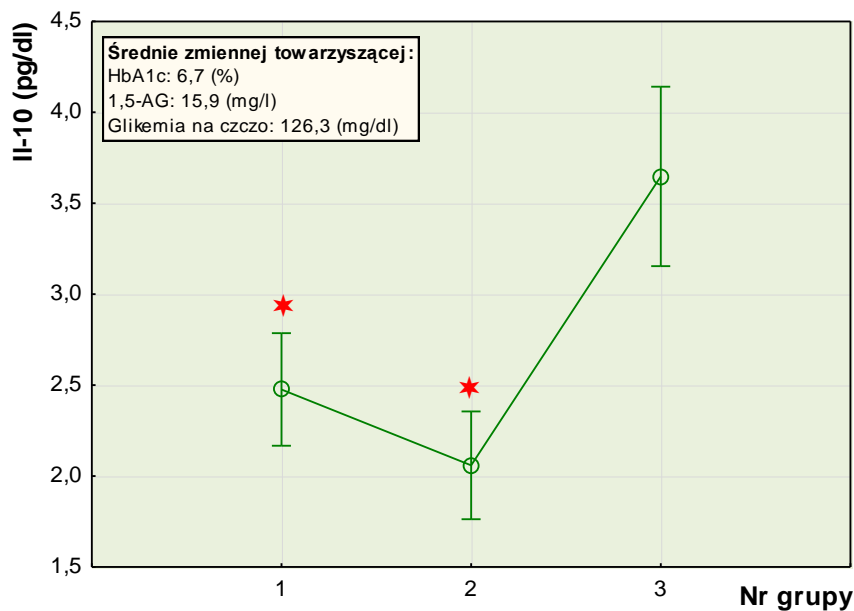
Ryc. 26. Porównanie stężenia MCP-1 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 3)



Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

★ – różnica znamienne statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3
 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

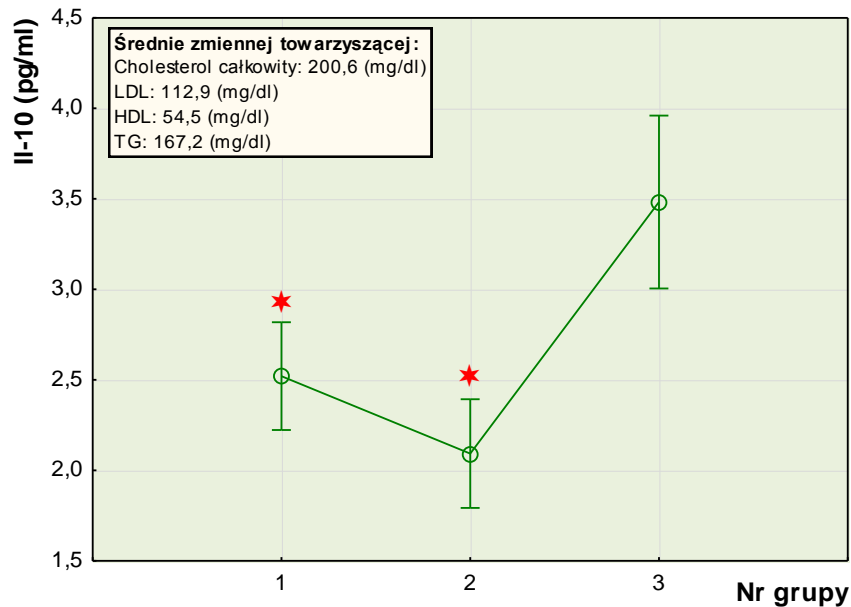
Ryc. 27. Porównanie stężenia Il-10 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 1)



Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

★ – różnica znamienne statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3
 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

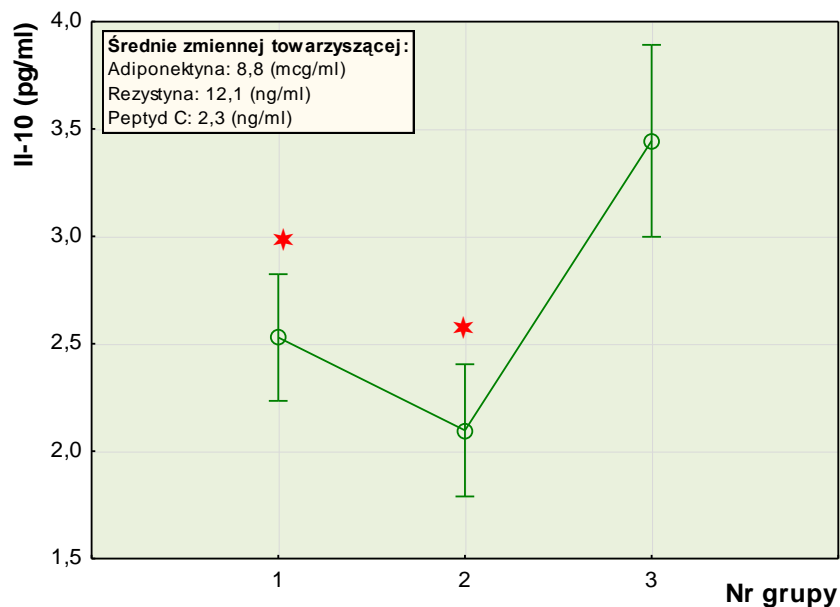
Ryc. 28. Porównanie stężenia Il-10 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 2)



Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

★ – różnica znamienne statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3
1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

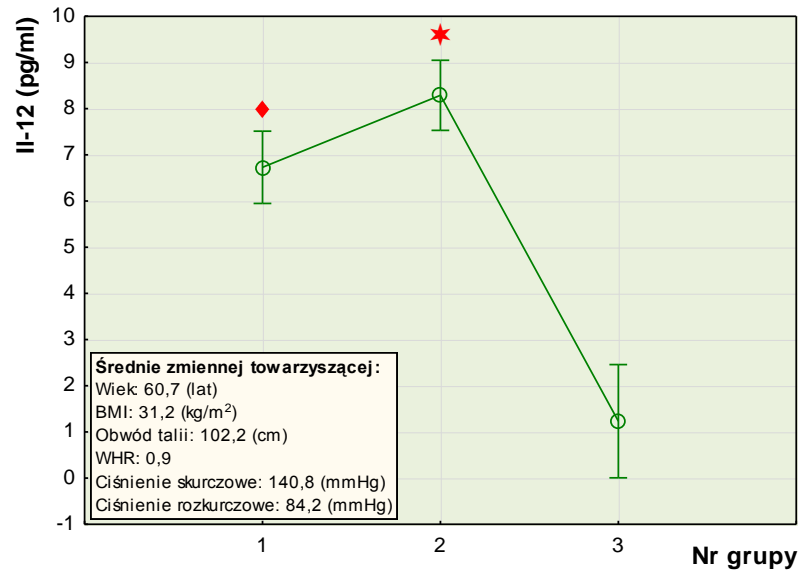
Ryc. 29. Porównanie stężenia IL-10 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 3)



Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

★ – różnica znamienne statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3
1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

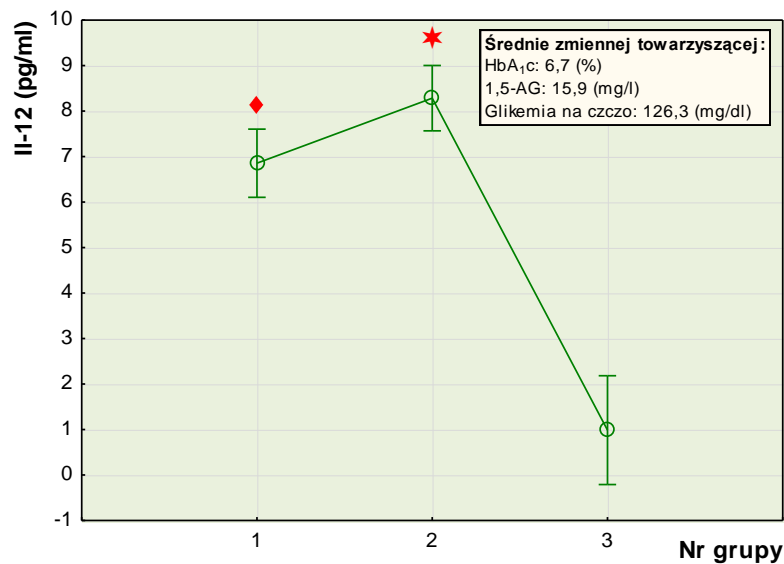
Ryc. 30. Porównanie stężenia IL-10 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 4)



Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

- ♦ – różnica znamienne statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup
 - ★ – różnica znamienne statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3
- 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

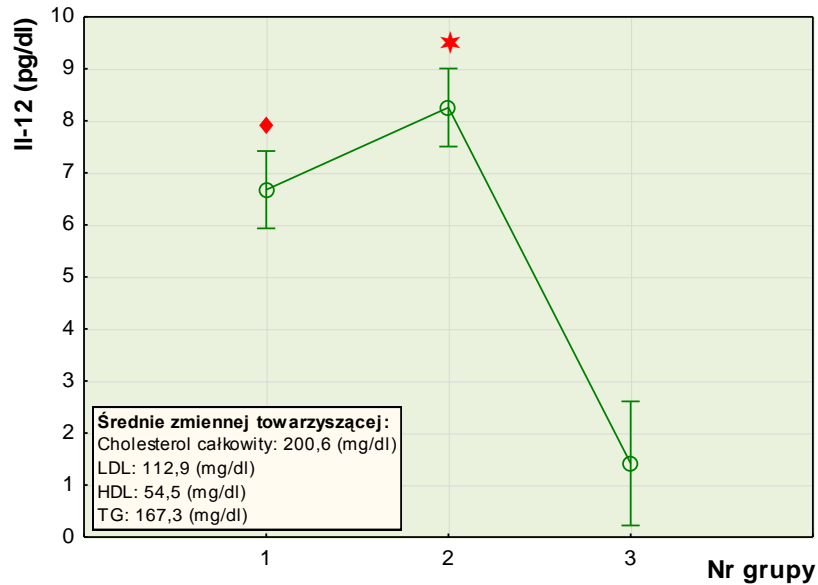
Ryc. 31. Porównanie stężenia IL-12 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 1)



Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

- ♦ – różnica znamienne statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup
 - ★ – różnica znamienne statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3
- 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

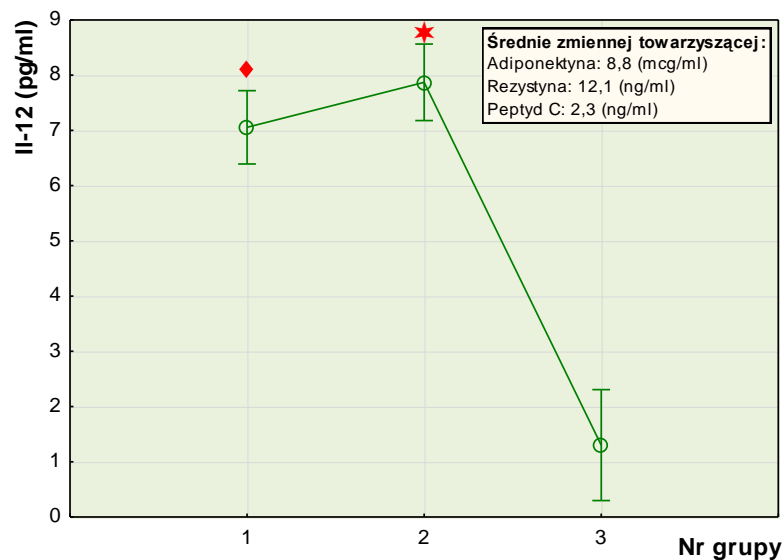
Ryc. 32. Porównanie stężenia IL-12 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 2)



Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

- ♦ – różnica znamienne statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup
 - ★ – różnica znamienne statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3
- 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

Ryc. 33. Porównanie stężenia IL-12 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 3)



Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności.

- ♦ – różnica znamienne statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup
 - ★ – różnica znamienne statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3
- 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami; 3 – bez ct2

Ryc. 34. Porównanie stężenia IL-12 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 4)

IV.5. Badanie związku pomiędzy parametrami antropometryczno-epidemiologicznymi, wykładnikami wyrównania metabolicznego oraz czynnikami związanymi z przebiegiem cukrzycy a stężeniem czynników angiogennych w surowicy krwi u chorych na cukrzycę typu 2 – etap I

Celem następnego etapu pracy było sprawdzenie, czy istnieją zależności pomiędzy parametrami antropometryczno-epidemiologicznymi, wykładnikami wyrównania metabolicznego oraz czynnikami związanymi z przebiegiem cukrzycy a stężeniem czynników pro- i antyangiogennych w surowicy krwi u chorych na cukrzycę typu 2. Obliczono zatem odpowiednie współczynniki korelacji rang Spearmana, niezależnie w obu grupach chorych na cukrzycę, tj. leczonych i nieleczonych statynami.

Wyniki analizy obejmującej **grupę pacjentów z cukrzycą typu 2 leczonych statynami** przedstawiono w tabeli 15. Wybrane korelacje pomiędzy badanymi zmiennymi przedstawiono na rycinach 35÷45.

Badanie związku pomiędzy **parametrami epidemiologiczno-antropometrycznymi** a stężeniem czynników pro- i antyangiogennych wykazało dodatnią korelację pomiędzy czasem trwania klinicznie jawnej cukrzycy a stężeniem VEGF ($r = 0,33$) (Ryc. 35) i stężeniem angiogeniny ($r = 0,35$) w surowicy krwi (Ryc. 36). Stwierdzono także, iż wzrost wskaźnika BMI był związany ze zwiększeniem stężenia angiogeniny ($r = 0,33$).

Analiza zależności pomiędzy nasileniem zaburzeń w zakresie **gospodarki węglowodanowej** a poziomem czynników pro- i antyangiogennych wykazała, iż stężenie 1,5-AG korelowało ujemnie ze stężeniem bFGF [$r = (-0,30)$] (Ryc. 37), podczas gdy wzrost stężenia angiogeniny był związany z podwyższeniem poziomu HbA_{1c} ($r = 0,32$) (Ryc. 38), wzrostem glikemii na czczo ($r = 0,41$) oraz z obniżeniem stężenia 1,5-AG [$r = (-0,53)$] (Tab. 15).

W zakresie parametrów charakteryzujących profil **gospodarki lipidowej** stwierdzono występowanie dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem VEGF a stężeniem cholesterolu LDL ($r = 0,34$) (Ryc. 39).

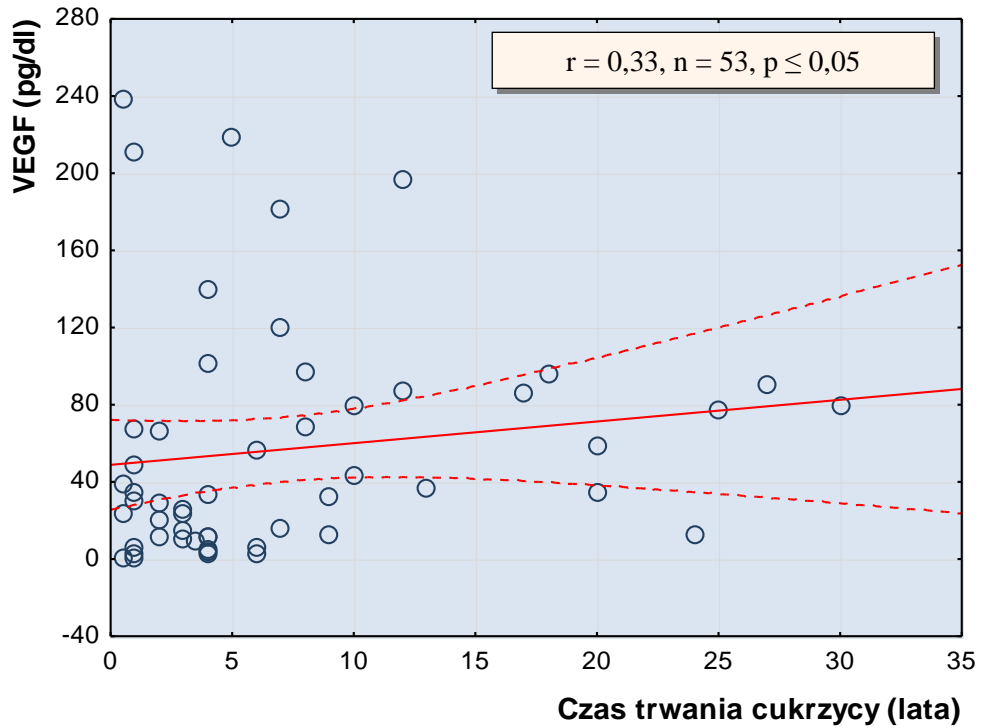
Zbadano również związek pomiędzy nasileniem **insulinooporności obwodowej** wyrażonej poprzez stężenie adiponektyny i rezystyny w surowicy a stężeniami

czynników pro- i antyangiogennych. Stężenia VEGF oraz MCP-1 były skorelowane ujemnie ze stężeniem adiponektyny [$r = (-0,40)$ i $r = (-0,56)$] (Ryc. 40 i 41). Jednocześnie stężenia VEGF i Il-12 były dodatnio skorelowane ze stężeniem rezystyny ($r = 0,51$ i $r = 0,33$) (Ryc. 42 i 43). Wykazano także pozytywną zależność pomiędzy stężeniem peptydu C w surowicy na czczo a stężeniem czynników proangiogennych: VEGF i MCP-1 ($r = 0,33$ i $r = 0,53$) (Ryc. 44 i 45).

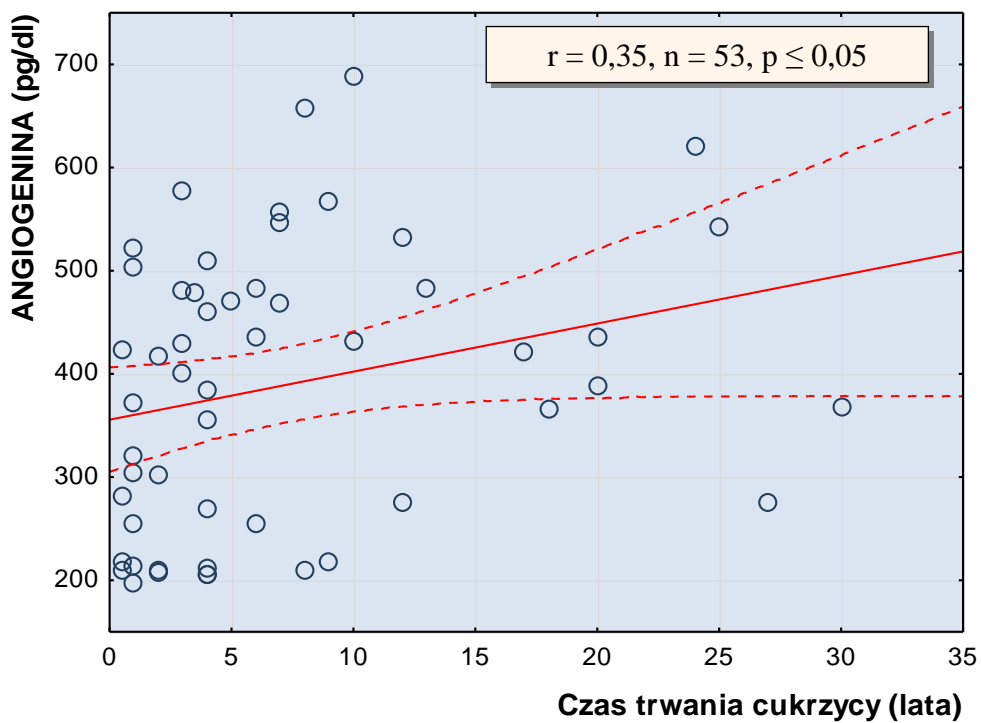
Tab. 15. Przegląd wartości współczynników korelacji w grupie chorych na ct2 leczonych statynami

Zmienna niezależna	Zmienna zależna					
	VEGF (pg/dl)	bFGF (pg/dl)	Angiogenina (pg/dl)	MCP-1 (pg/dl)	Il-10 (pg/ml)	Il-12 (pg/ml)
Wiek (lata)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Czas trwania ct2 (lata)	0,33	NS	0,35	NS	NS	NS
BMI (kg/m ²)	NS	NS	0,33	NS	NS	NS
Obwód talii (cm)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
WHR	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ciśnienie skurczowe (mmHg)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ciśnienie rozkurczowe (mmHg)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
HbA _{1c} (%)	NS	NS	0,32	NS	NS	NS
1,5-AG (mg/l)	NS	-0,30	-0,53	NS	NS	NS
Glikemia na czczo (mg/dl)	NS	NS	0,41	NS	NS	NS
Cholesterol całkowity (mg/dl)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LDL (mg/dl)	0,34	NS	NS	NS	NS	NS
HDL (mg/dl)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TG (mg/dl)	NS	NS	NS	-0,33	NS	NS
Adiponektyna (µg/ml)	-0,40	NS	NS	-0,56	NS	NS
Rezystyna (ng/ml)	0,51	NS	NS	NS	NS	0,33
Peptyd C (ng/ml)	0,33	NS	NS	0,53	NS	NS

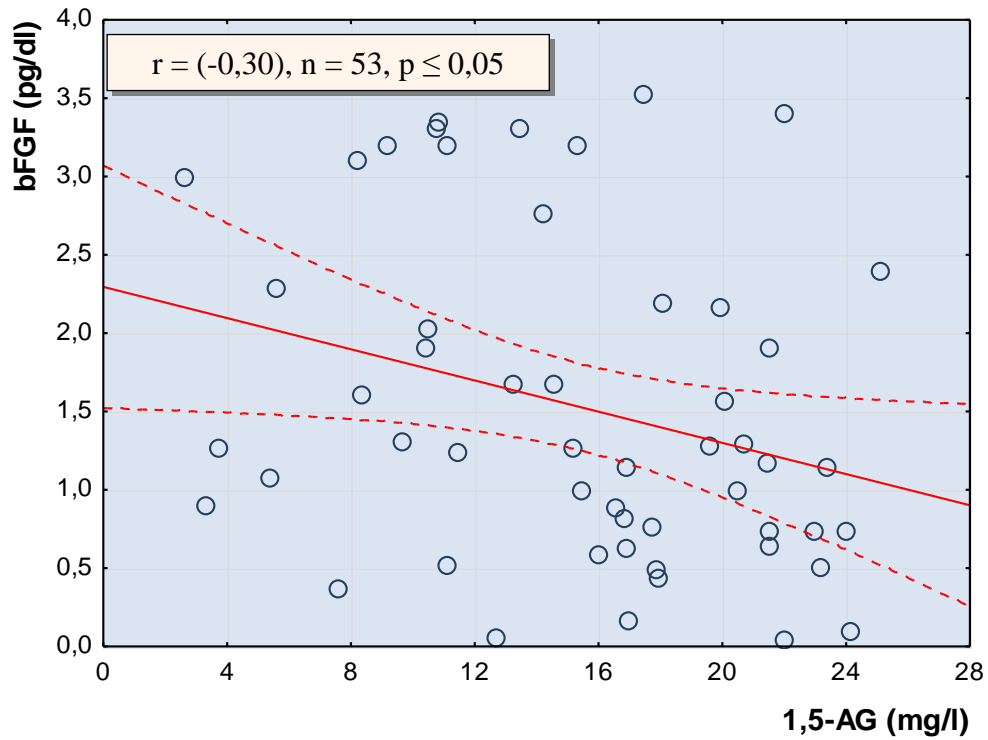
NS – wartość współczynnika korelacji r niezamienna statystycznie



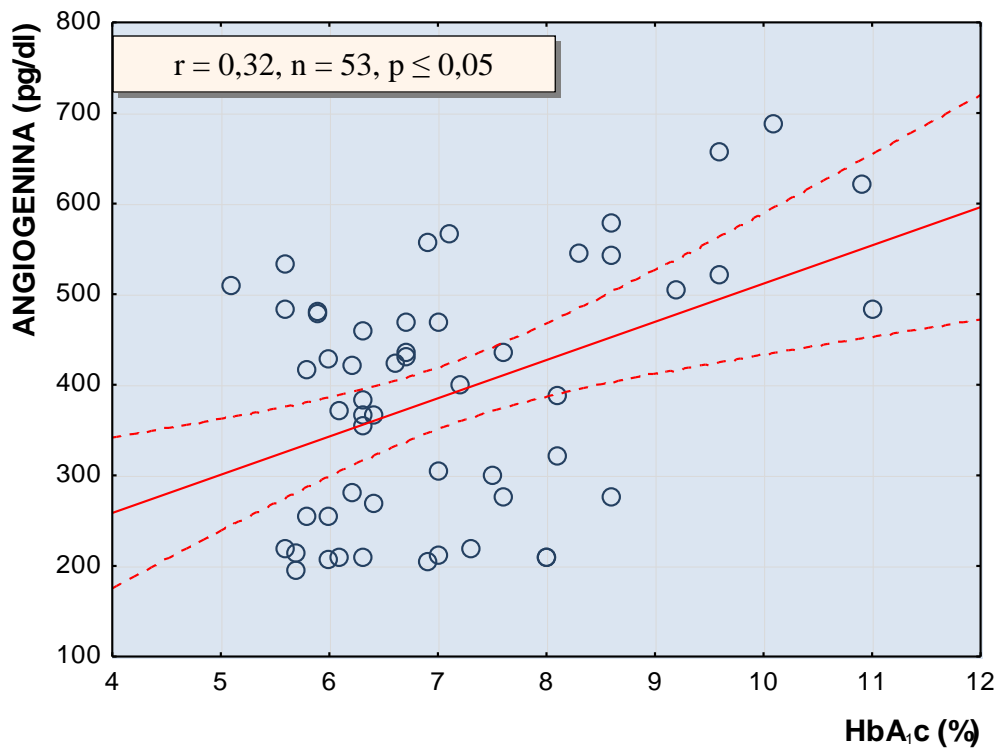
Ryc. 35. Związek pomiędzy czasem trwania cukrzycy a stężeniem VEGF u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami



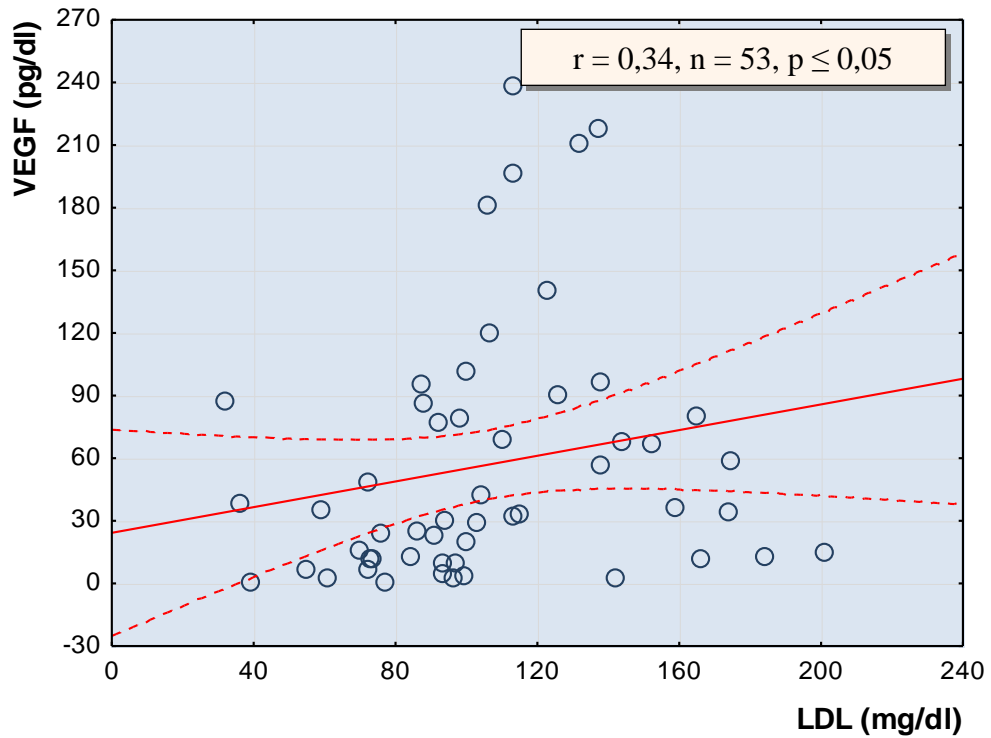
Ryc. 36. Związek pomiędzy czasem trwania cukrzycy a stężeniem angiogeniny u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami



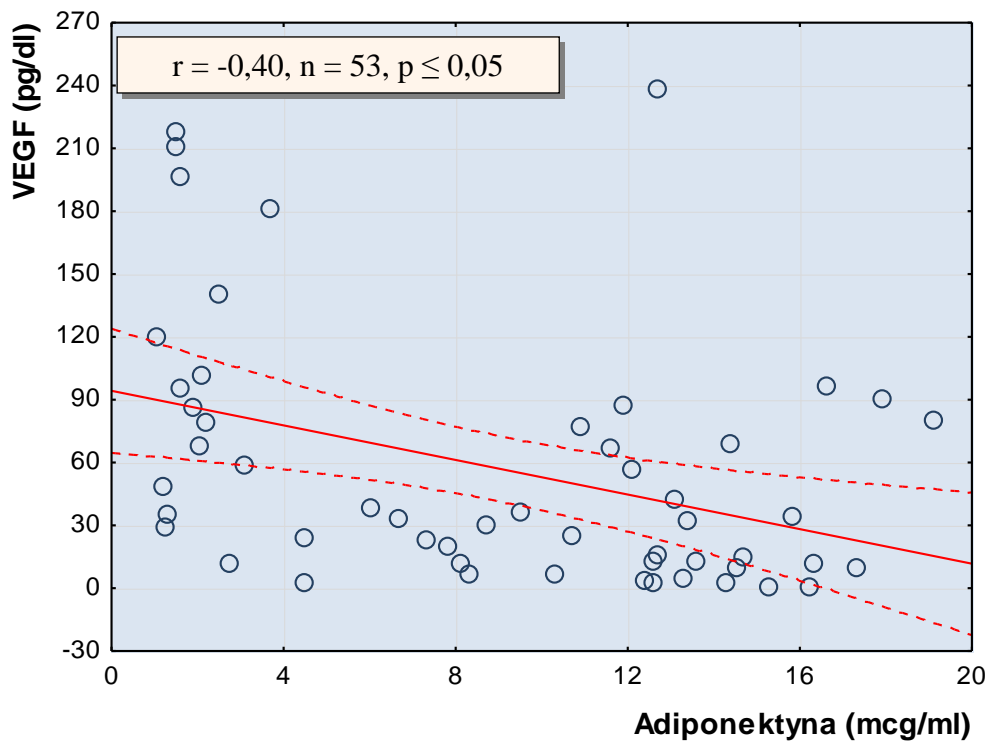
Ryc. 37. Związek pomiędzy stężeniem 1,5-AG a stężeniem bFGF u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami



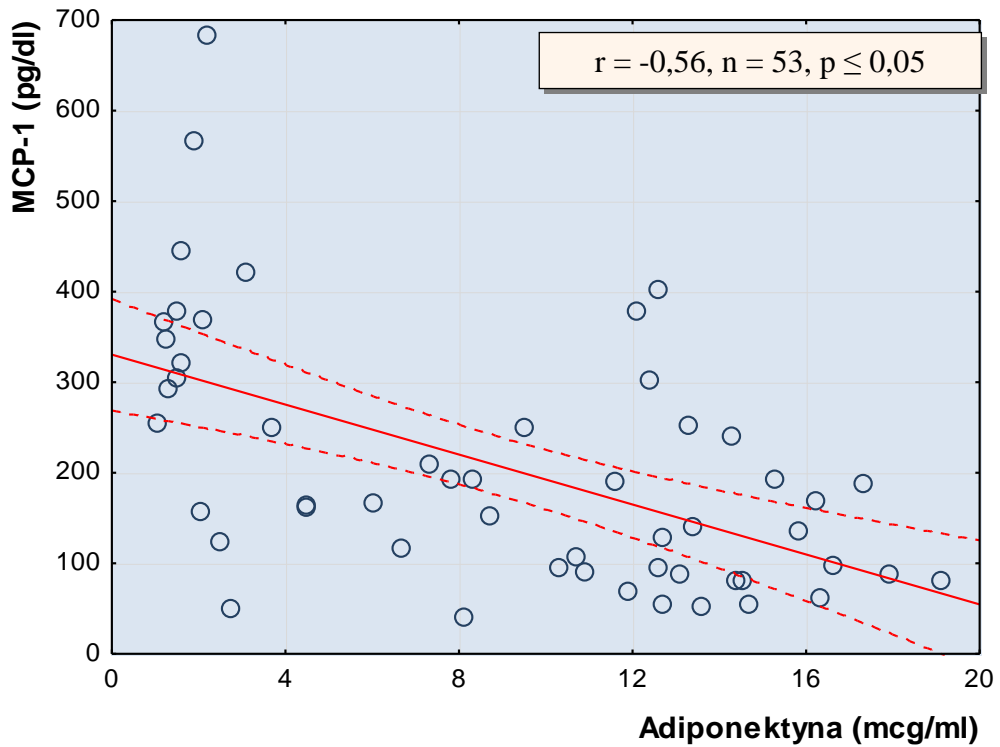
Ryc. 38. Związek pomiędzy stężeniem HbA_{1c} a stężeniem angiogeniny u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami



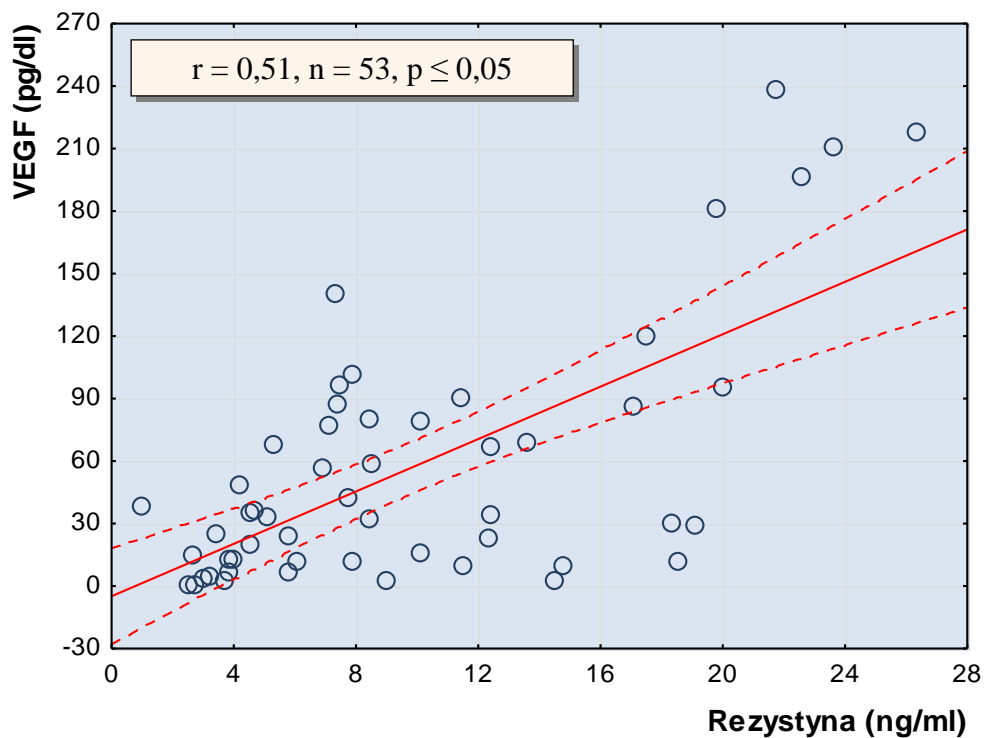
Ryc. 39. Związek pomiędzy stężeniem LDL a stężeniem VEGF u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami



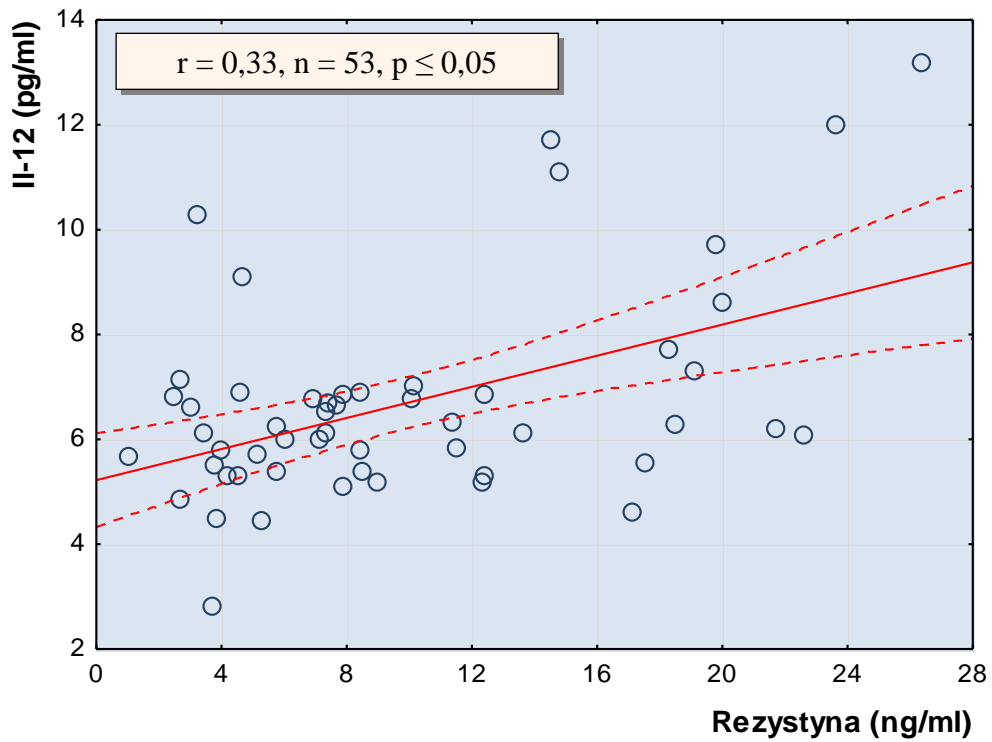
Ryc. 40. Związek pomiędzy stężeniem adiponektyny a stężeniem VEGF u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami



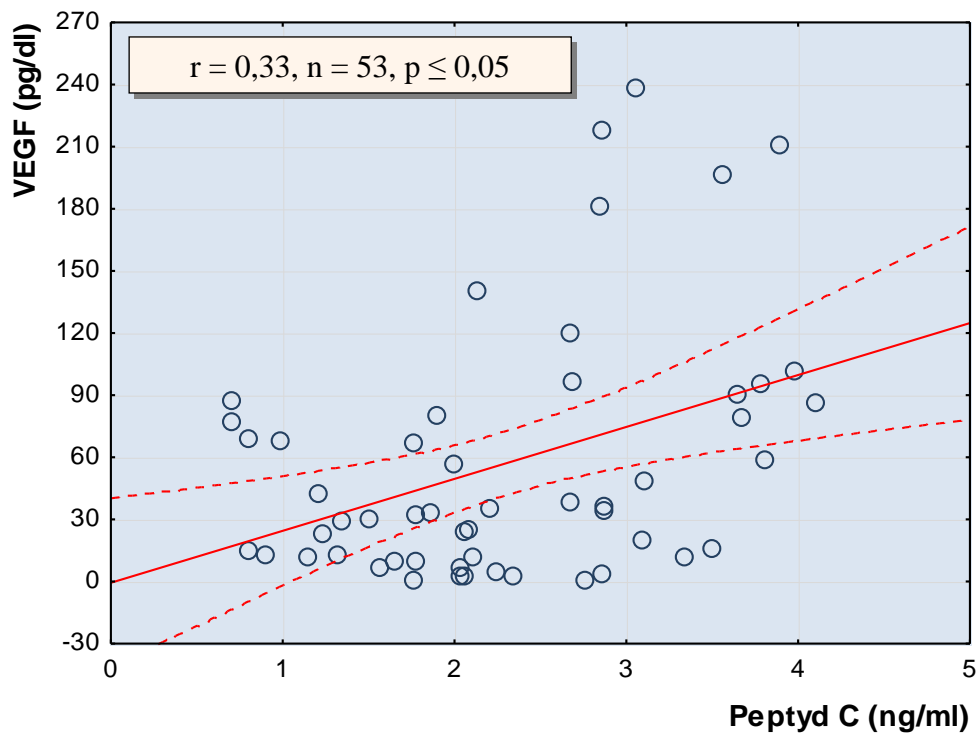
Ryc. 41. Związek pomiędzy stężeniem adiponektyny a stężeniem MCP-1 u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami



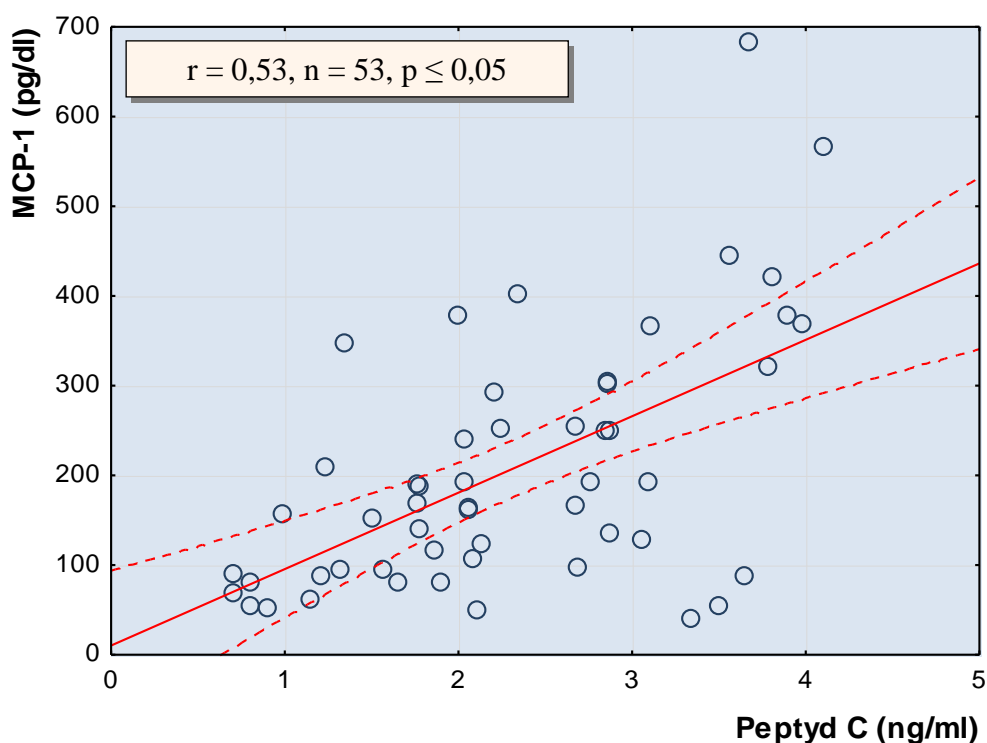
Ryc. 42. Związek pomiędzy stężeniem rezystyny a stężeniem VEGF u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami



Ryc. 43. Związek pomiędzy stężeniem rezystyny a stężeniem Il-12 u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami



Ryc. 44. Związek pomiędzy stężeniem peptydu C a stężeniem VEGF u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami



Ryc. 45. Związek pomiędzy stężeniem peptydu C a stężeniem MCP-1 u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami

Wyniki analizy korelacji w **grupie chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami** zestawiono w tabeli 16, a wybrane zależności przedstawiono na rycinach 46÷49.

Na podstawie badania wpływu **parametrów epidemiologiczno-antropometrycznych** na stężenia czynników pro- i antyangiogennych w grupie osób chorych na cukrzycę nieleczonych statynami wykazano dodatnie korelacje pomiędzy stężeniem angiogeniny w surowicy a obwodem talii ($r = 0,37$) i wskaźnikiem WHR ($r = 0,34$) (Tab. 16)

Analiza zależności pomiędzy wykładnikami **gospodarki węglowodanowej** a poziomem czynników pro- i antyangiogennych wskazała na istnienie dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem angiogeniny w surowicy a poziomem HbA_{1c} ($r = 0,37$) (Ryc. 46) oraz ujemnej korelacji pomiędzy stężeniem angiogeniny w surowicy a stężeniem 1,5-AG [$r = (-0,54)$] (Ryc. 47).

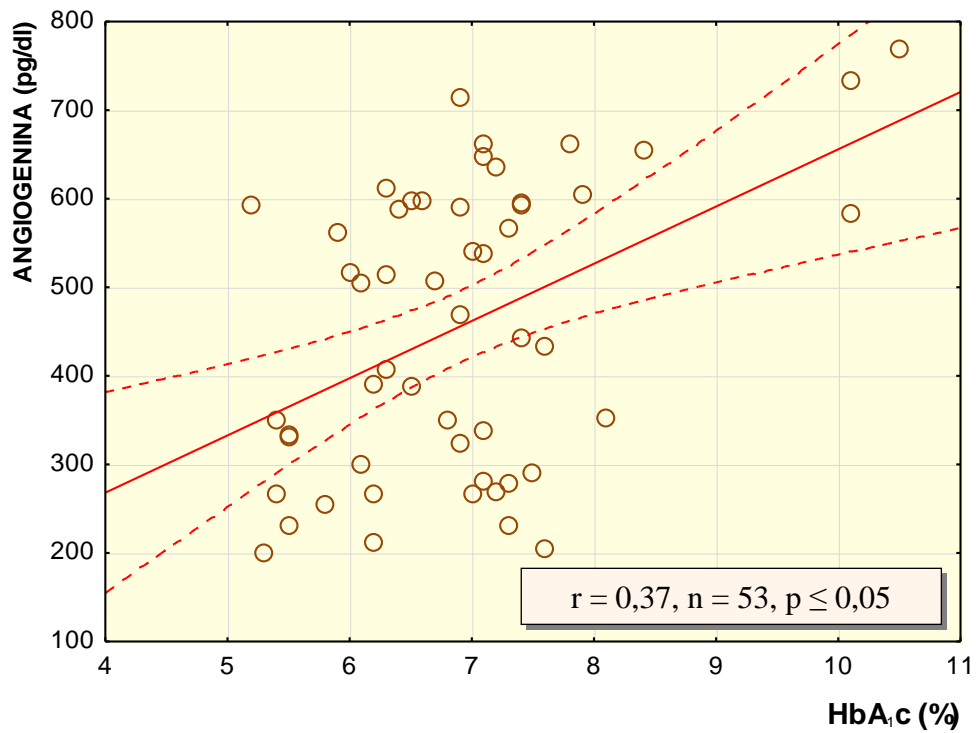
W odniesieniu do parametrów **gospodarki lipidowej** stwierdzono ujemną korelację pomiędzy stężeniem cholesterolu HDL a stężeniem angiogeniny w surowicy [$r = (-0,36)$] (Ryc. 48). Z kolei stężenie bFGF korelowało dodatnio z poziomem TG ($r = 0,31$) (Tab. 16).

Spośród parametrów charakteryzujących **insulinooporność obwodową** stężenie adiponektyny wykazywało związek ze stężeniem Il-10 ($r = 0,46$) (Ryc. 49), natomiast stężenie rezystyny – ze stężeniem VEGF ($r = 0,41$) i Il-12 ($r = 0,39$) (Tab. 16). Stężenia VEGF, angiogeniny oraz MCP-1 korelowały dodatnio ze stężeniem peptydu C – wykładnika **czynności komórek β wysp trzustki** ($r = 0,50$; $r = 0,46$; $r = 0,42$) (Tab. 16).

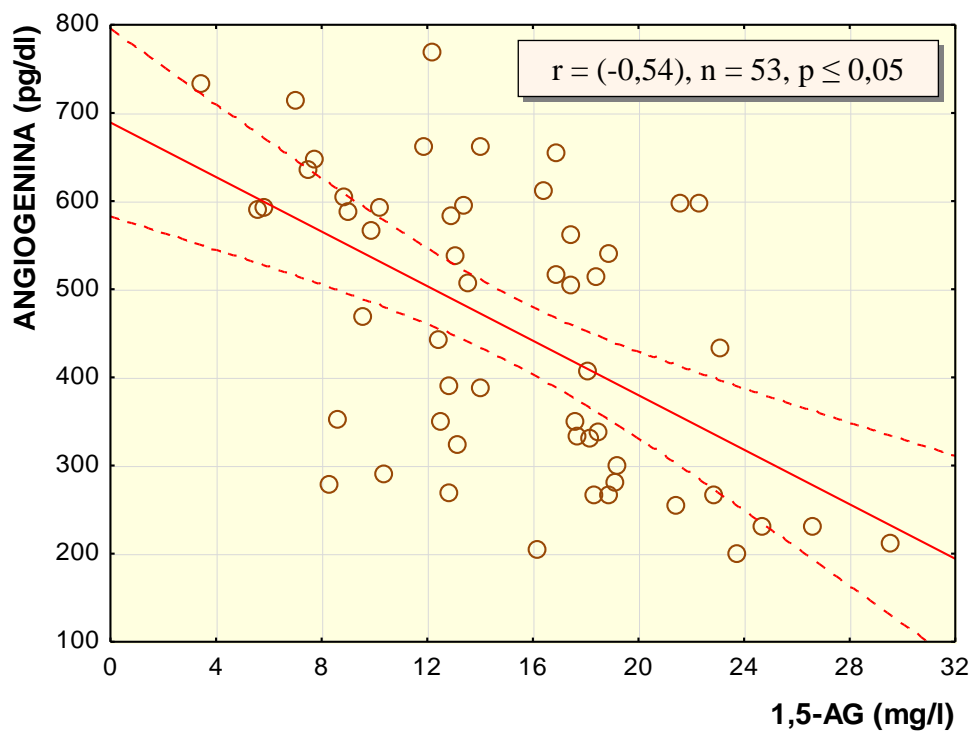
Tab.16. Przegląd wartości współczynników korelacji w grupie chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami

Zmienna niezależna	Zmienna zależna					
	VEGF (pg/dl)	bFGF (pg/dl)	Angiogenina (pg/dl)	MCP-1 (pg/dl)	Il-10 (pg/ml)	Il-12 (pg/ml)
Wiek (lata)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Czas trwania ct2 (lata)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BMI (kg/m ²)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Obwód talii (cm)	NS	NS	0,37	NS	NS	NS
WHR	NS	NS	0,34	NS	NS	NS
Ciśnienie skurczowe (mmHg)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ciśnienie rozkurczowe (mmHg)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
HbA _{1c} (%)	NS	NS	0,37	NS	NS	NS
1,5-AG (mg/l)	NS	NS	-0,54	NS	NS	NS
Glikemia na czczo (mg/dl)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cholesterol całkowity (mg/dl)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LDL (mg/dl)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
HDL (mg/dl)	NS	NS	-0,36	NS	NS	NS
TG (mg/dl)	NS	0,31	NS	NS	NS	NS
Adiponektyna (µg/ml)	NS	NS	NS	NS	0,46	NS
Rezystyna (ng/ml)	0,41	NS	NS	NS	NS	0,39
Peptyd C (ng/ml)	0,50	NS	0,46	0,42	NS	NS

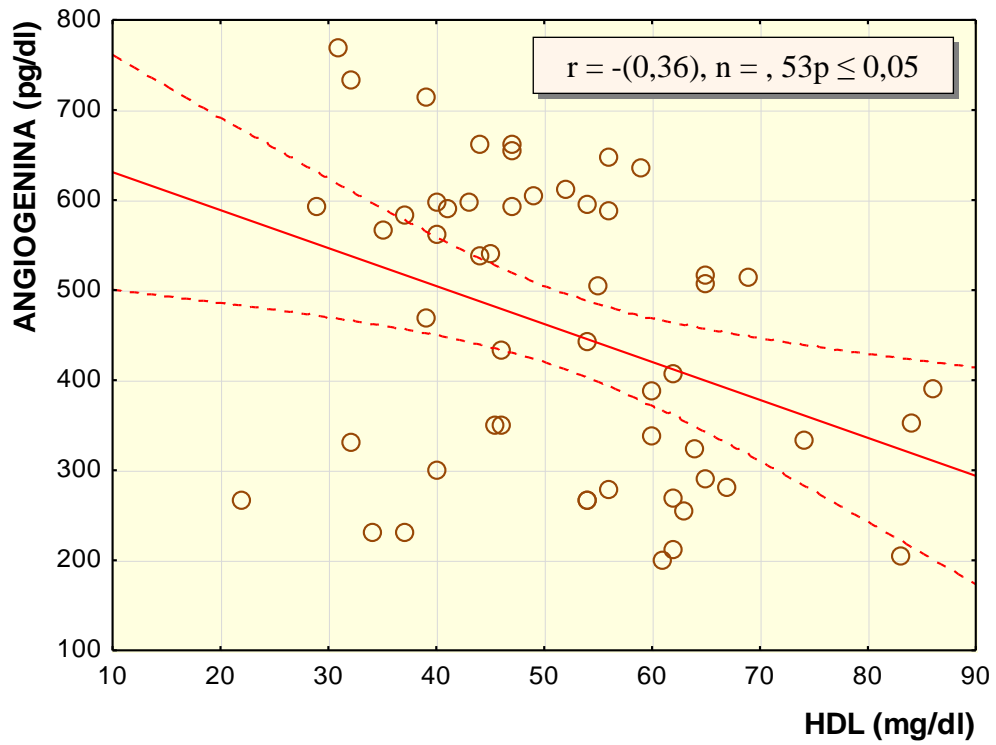
NS – wartość współczynnika korelacji r niezamienna statystycznie



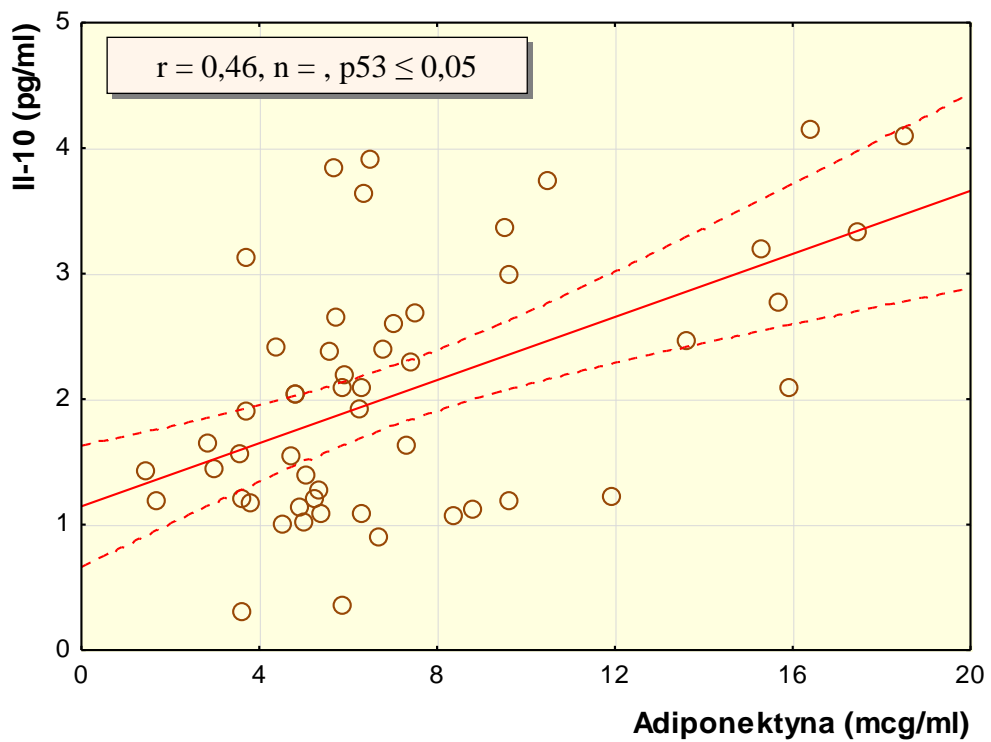
Ryc. 46. Związek pomiędzy stężeniem HbA_{1c} a stężeniem angiogeniny u chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami



Ryc. 47. Związek pomiędzy stężeniem 1,5-AG a stężeniem angiogeniny u chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami



Ryc. 48. Związek pomiędzy stężeniem HDL a stężeniem angiogeniny u chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami



Ryc. 49. Związek pomiędzy stężeniem adiponektyny a stężeniem II-12 u chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami

IV.6. Badanie wzajemnych relacji pomiędzy wybranymi czynnikami pro- i antyangiogennymi w surowicy krwi – etap I

Zbadano wzajemne zależności pomiędzy badanymi czynnikami, zarówno pro-, jak i antyangiogennymi, kolejno w obu grupach chorych na cukrzycę, wyznaczając współczynniki korelacji rang Spearmana.

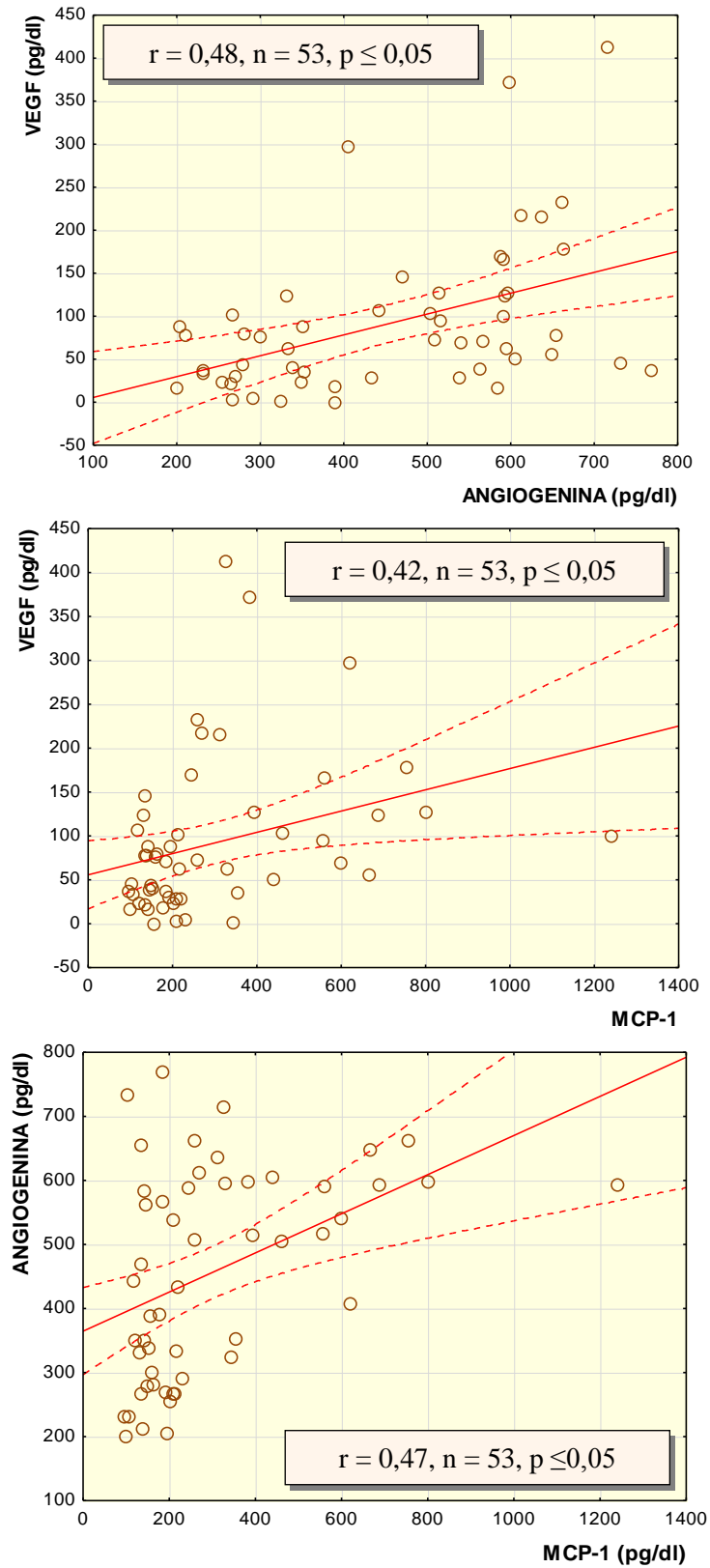
Nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji pomiędzy czynnikami angiogennymi w grupie chorych na cukrzycę typu 2 przyjmujących statyny.

Wartości współczynników korelacji w grupie chorych na cukrzycę typu 2 **nieleczonych statynami** zestawiono w tabeli 17. W grupie chorych na cukrzycę typu 2 nieprzyjmujących statyn zaobserwowano, że wyższym stężeniom VEGF w surowicy towarzyszą wyższe poziomy angiogeniny ($r = 0,48$), a także MCP-1 ($r = 0,42$). W tej samej grupie stężenia angiogeniny i MCP-1 w surowicy były skorelowane dodatnio ($r = 0,47$) (Ryc. 50).

Tab. 17. Przegląd wartości współczynników korelacji pomiędzy czynnikami pro- i antyangiogennymi w grupie chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami

Zmienna niezależna	Zmienna zależna					
	VEGF (pg/dl)	bFGF (pg/dl)	Angiogenina (pg/dl)	MCP-1 (pg/dl)	IL-10 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)
VEGF (pg/dl)	–	NS	0,48	0,42	NS	NS
bFGF (pg/dl)	NS	–	NS	NS	NS	NS
Angiogenina (pg/dl)	0,48	NS	–	0,47	NS	NS
MCP-1 (pg/dl)	0,42	NS	0,47	–	NS	NS
IL-10 (pg/ml)	NS	NS	NS	NS	–	NS
IL-12 (pg/ml)	NS	NS	NS	NS	NS	–

NS – wartość współczynnika korelacji r niezamienna statystycznie



Ryc. 50. Wzajemne związki pomiędzy wybranymi czynnikami proangiogennymi w surowicy krwi u chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami

IV.7. Badanie sekrecji wybranych czynników pro- i antyangiogennych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej – etap II

W kolejnym etapie badań oceniono stężenia wybranych czynników proangiogennych (VEGF, bFGF, MCP-1) i antyangiogennych (II-10, II-12) w nadsącu pochodzącym z 72-godzinnej hodowli komórek jednojądrzastych wyizolowanych z krwi obwodowej. Porównano sekrecję wybranych czynników angiogennych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej pochodzące od chorych na cukrzycę typu 2 leczonych i nieleczonych statynami, od osób bez cukrzycy z dyslipidemią leczonych statynami oraz osób bez cukrzycy i dyslipidemii nieprzyjmujących statyn.

W wymienionych grupach terapeutyczno-klinicznych zbadano czynność wydzielniczą komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w zakresie sekrecji czynników angiogennych na standardowym podłożu (u wszystkich badanych), na standardowym podłożu w obecności wysokich stężeń glukozy (u wszystkich badanych) oraz na standardowym podłożu w obecności wysokich stężeń insuliny (u osób bez cukrzycy i dyslipidemii). Zbadano także stężenie czynników angiogennych w kontroli negatywnej, którą stanowiły próbki zawierające wyłącznie podłoże hodowlane.

Na podstawie analizy statystycznej (ANOVA), obejmującej poza próbkami pochodzącymi od zbadanych grup także poziomy cytokin obserwowane w kontroli negatywnej, stwierdzono, że stężenie wszystkich badanych cytokin w próbkach zawierających materiał biologiczny było istotnie wyższe w porównaniu z ich stężeniem w kontroli ujemnej.

IV.7.1. Porównanie sekrecji wybranych czynników angiogennych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej pochodzące od chorych z różnych grup terapeutyczno-klinicznych w warunkach podstawowych

(analiza wariancji ANOVA) – etap II

U osób chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami, zaobserwowano największe nasilenie sekrecji **VEGF** przez komórki jednojądrzaste wyizolowane z krwi obwodowej i hodowane w warunkach podstawowych. Nieco niższe stężenie VEGF wykazano w nadsącu pochodzącym od chorych na cukrzycę leczonych statynami.

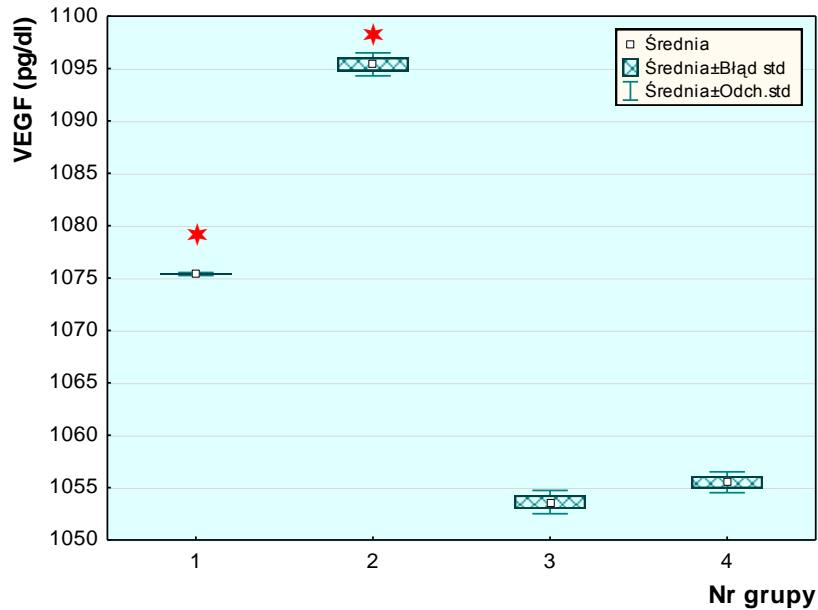
Było ono jednakże wyższe w porównaniu z grupami osób bez cukrzycy. Nie stwierdzono natomiast znamiennej różnicy w stężeniu VEGF w nadsączu pomiędzy grupami osób bez cukrzycy (Ryc. 51).

Zauważono, że sekrecja **bFGF** przez komórki jednojądrzaste wyizolowane z krwi obwodowej i hodowane w warunkach podstawowych była największa u osób chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami w stosunku do wszystkich pozostałych grup (Ryc. 52).

Porównanie stężenia **MCP-1** przyniosło podobne obserwacje jak w przypadku stężenia VEGF, przy czym stwierdzono dodatkowo istotną statystycznie różnicę pomiędzy grupą osób bez cukrzycy i dyslipidemii nieotrzymujących statyn a grupą pacjentów bez cukrzycy z zaburzeniami lipidowymi przyjmujących statyny. Stężenie MCP-1 było znamienne niższe u osób bez cukrzycy nieotrzymujących żadnych leków w porównaniu z pacjentami bez cukrzycy leczonymi statynami (Ryc. 53).

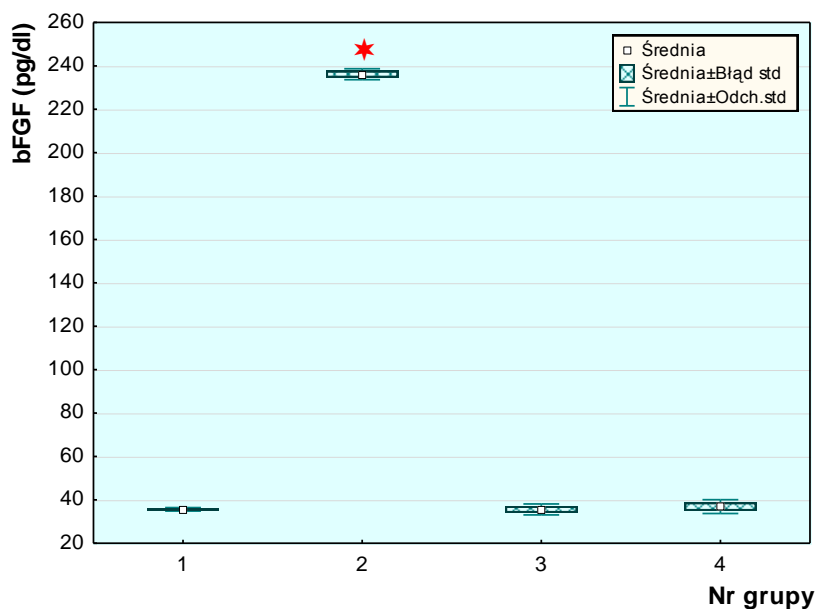
Wykazano, że sekrecja **II-10** przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej w warunkach podstawowych była wyższa u pacjentów bez cukrzycy i dyslipidemii nieotrzymujących statyn w odniesieniu do wszystkich pozostałych grup. Najniższe stężenia II-10 odnotowano w nadsączu pochodzącym od pacjentów chorujących na cukrzycę nieleczonych statynami. Również pomiędzy grupą chorych na cukrzycę leczonych statynami oraz chorych bez cukrzycy z dyslipidemią leczonych statynami stwierdzono znamienne statystycznie różnicę sekrecji II-10, przy czym stężenie tej cytokiny było wyższe u osób z cukrzycą (Ryc. 54).

W odniesieniu do stężenia **II-12** w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych w warunkach podstawowych zauważono także różnice pomiędzy wszystkimi grupami. W tym przypadku najwyższą sekrecję II-12 zaobserwowano w odniesieniu do komórek jednojądrzastych krwi obwodowej pochodzących od pacjentów chorych na cukrzycę i nieleczonych statynami, a najniższą – u osób bez cukrzycy i dyslipidemii nieotrzymujących leków. Jednocześnie komórki jednojądrzaste izolowane z krwi pacjentów chorych na cukrzycę leczonych statynami wykazywały większą sekrecję II-12 w porównaniu z komórkami pochodzącymi od osób bez cukrzycy otrzymujących statyny (Ryc. 55).



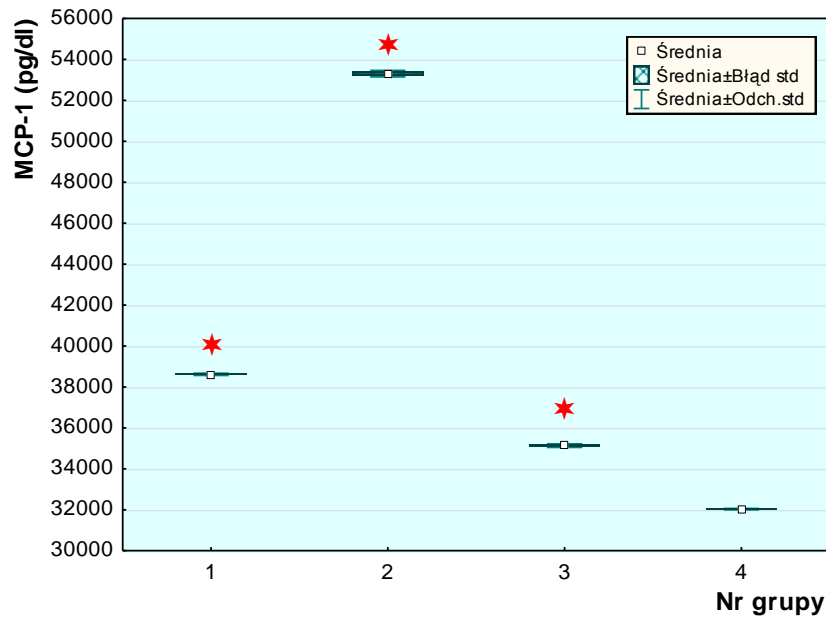
- * – różnica znamiennej statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup
 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami;
 3 – pacjenci bez ct2 leczeni statynami; 4 – pacjenci bez ct2 nieleczeni statynami

Ryc. 51. Porównanie stężenia **VEGF** w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na **standardowym podłożu** pomiędzy wszystkimi grupami



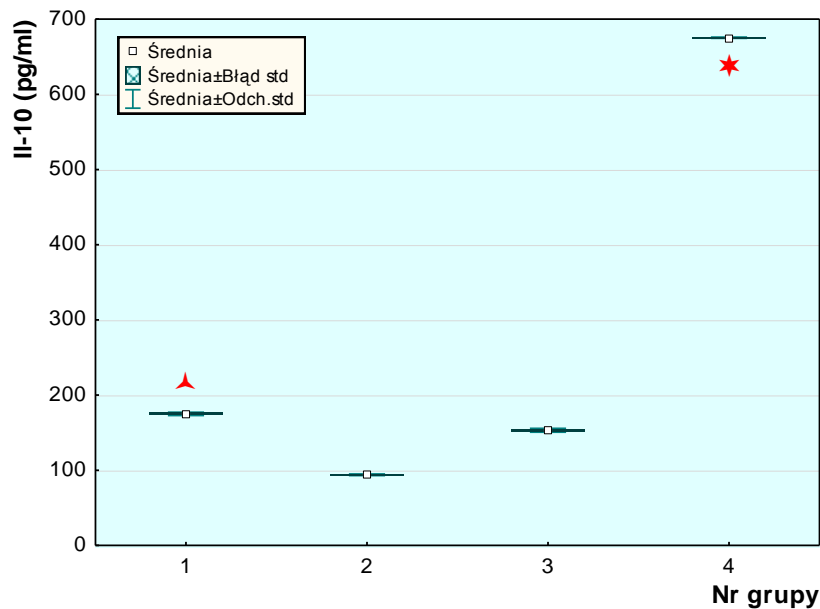
- * – różnica znamiennej statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup
 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami;
 3 – pacjenci bez ct2 leczeni statynami; 4 – pacjenci bez ct2 nieleczeni statynami

Ryc. 52. Porównanie stężenia **bFGF** w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na **standardowym podłożu** pomiędzy wszystkimi grupami



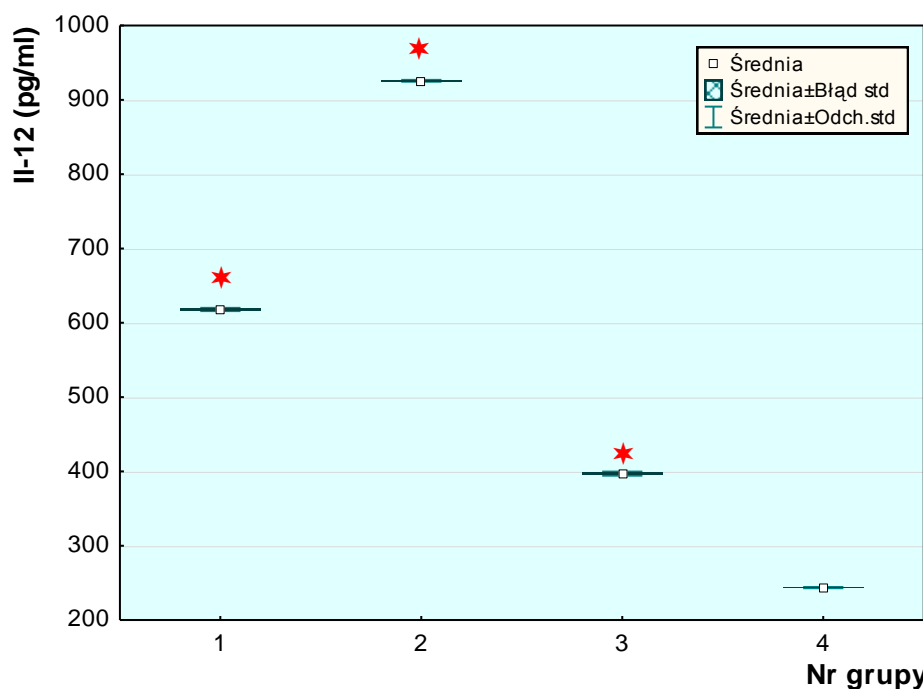
- ★ – różnica znamionna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup
 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami;
 3 – pacjenci bez ct2 leczeni statynami; 4 – pacjenci bez ct2 nieleczeni statynami

Ryc. 53. Porównanie stężenia **MCP-1** w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na **standardowym podłożu** pomiędzy wszystkimi grupami



- ★ – różnica znamionna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup
 ▲ - różnica znamionna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec grupy 3
 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami;
 3 – pacjenci bez ct2 leczeni statynami; 4 – pacjenci bez ct2 nieleczeni statynami

Ryc. 54. Porównanie stężenia **IL-10** w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na **standardowym podłożu** pomiędzy wszystkimi grupami



- ★ – różnica znamiennej statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup
 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami;
 3 – pacjenci bez ct2 leczeni statynami; 4 – pacjenci bez ct2 nieleczeni statynami

Ryc. 55. Porównanie stężenia **II-12** w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na **standardowym podłożu** pomiędzy wszystkimi grupami

IV.7.2. Porównanie sekrecji wybranych czynników angiogennych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej pochodzące od chorych z różnych grup terapeutyczno-klinicznych hodowane w obecności wysokich stężeń glukozy (analiza wariancji ANOVA) – etap II

Stwierdzono, że sekrecja **VEGF** była znamiennej wyższa w przypadku komórek hodowanych w środowisku zawierającym znaczne stężenie glukozy wyizolowanych z krwi pacjentów chorych na cukrzycę nieleczonych statynami w porównaniu z pozostałymi grupami. Najniższą sekrecję tego czynnika odnotowano w przypadku osób bez cukrzycy i dyslipidemii nieotrzymujących leków i pacjentów bez cukrzycy z zaburzeniami gospodarki lipidowej przyjmujących statyny, przy czym pomiędzy tymi grupami nie stwierdzono znamiennej statystycznie różnic (Ryc. 56).

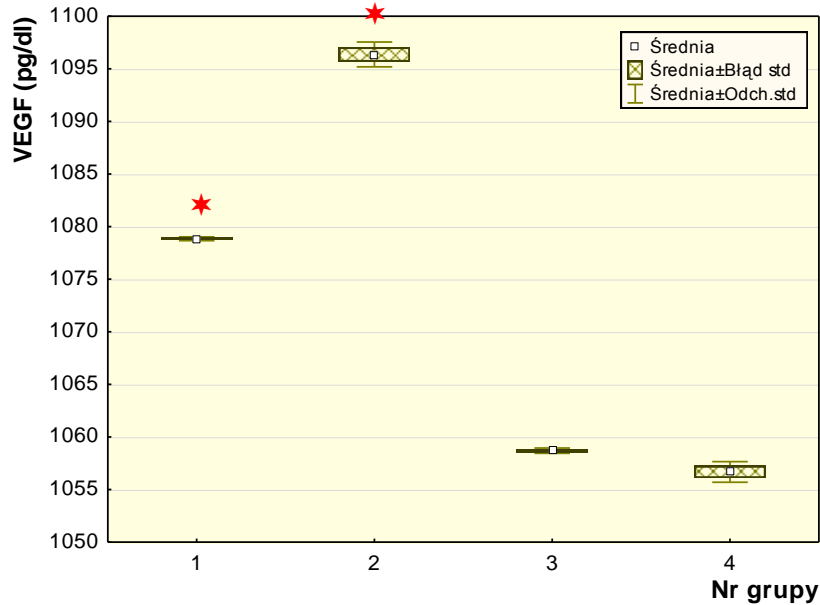
Zauważono, że sekrecja **bFGF** przez komórki jednojądrzaste hodowane w tych warunkach była znamiennej wyższa w przypadku komórek wyizolowanych z krwi

obwodowej osób chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami w porównaniu z pozostałymi grupami (Ryc. 57).

Zaobserwowano, że komórki jednojądrzaste w obecności glukozy, wyizolowane z krwi chorych na cukrzycę nieleczonych statynami posiadały istotnie większą zdolność sekrecji **MCP-1** w porównaniu z pozostałymi grupami. Najmniejsze, i znamienne niższe w stosunku do pozostałych grup, stężenia MCP-1 odnotowano w nadsączu z hodowli komórek pochodzących od osób bez cukrzycy i dyslipidemii nieleczonych statynami. Jednocześnie stężenia MCP-1 w nadsączu z hodowli komórek krwi chorych na cukrzycę przyjmujących statyny oraz u chorych bez cukrzycy z zaburzeniami lipidowymi leczonych statynami różniły się znamienne między sobą, przy czym wyższe wartości obserwowano u osób bez cukrzycy (Ryc. 58).

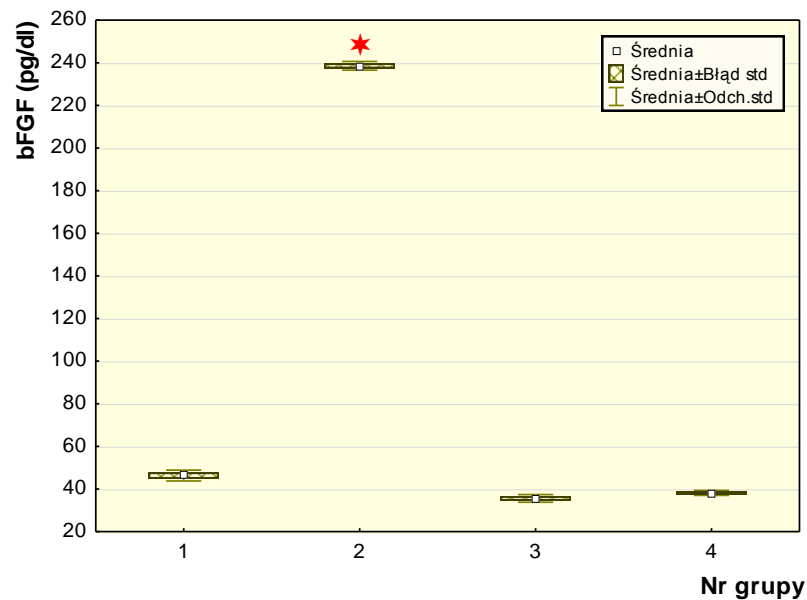
W przypadku **II-10** odnotowano znamienne większą zdolność sekrecji tej cytokiny przez komórki pochodzące od osób bez cukrzycy nieleczonych statynami w porównaniu z pozostałymi grupami. Najmniejszą zdolność sekrecji II-10 stwierdzono w przypadku komórek pochodzących z krwi osób chorych na cukrzycę nieleczonych statynami w porównaniu z pozostałymi grupami. Ponadto komórki wyizolowane z krwi pacjentów chorych na cukrzycę leczonych statynami wykazywały większą zdolność sekrecji II-10 w stosunku do komórek wyizolowanych od osób bez cukrzycy z dyslipidemią leczonych statynami (Ryc. 59).

Zaobserwowano także znamienne różnice w zakresie wydzielania **II-12** przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej pochodzące od chorych z różnych grup terapeutyczno-klinicznych hodowane w środowisku o wysokim stężeniu glukozy. W porównaniu z pozostałymi grupami najwyższą sekrecję tej interleukiny odnotowano w przypadku komórek wyizolowanych od osób chorych na cukrzycę nieleczonych statynami, a najniższą – u osób bez cukrzycy i dyslipidemii nieotrzymujących leków. Stężenie II-12 różniło się też istotnie w nadsączach pochodzących z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej osób chorych na cukrzycę leczonych statynami i osób bez cukrzycy z zaburzeniami gospodarki lipidowej przyjmujących statyny, przy czym było ono wyższe w przypadku chorych na cukrzycę (Ryc. 60).



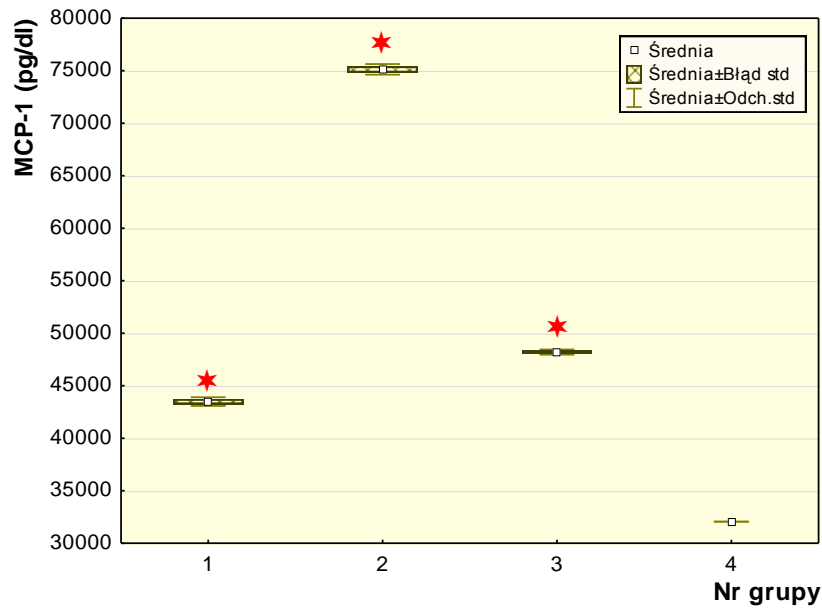
- * – różnica znamienista statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup
 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami;
 3 – pacjenci bez ct2 leczeni statynami; 4 – pacjenci bez ct2 nieleczeni statynami

Ryc. 56. Porównanie stężenia **VEGF** w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na **podłożu z dodatkiem glukozy** pomiędzy wszystkimi grupami



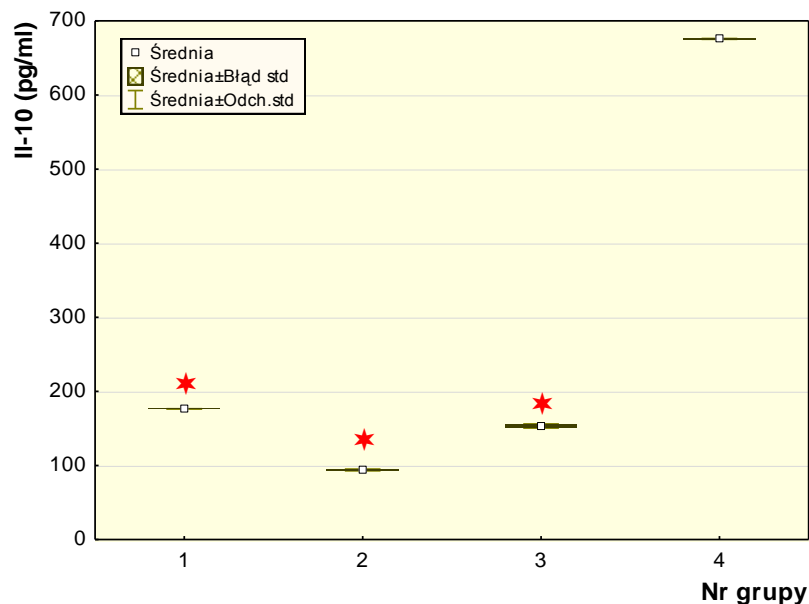
- * – różnica znamienista statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup
 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami;
 3 – pacjenci bez ct2 leczeni statynami; 4 – pacjenci bez ct2 nieleczeni statynami

Ryc. 57. Porównanie stężenia **bFGF** w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na **podłożu z dodatkiem glukozy** pomiędzy wszystkimi grupami



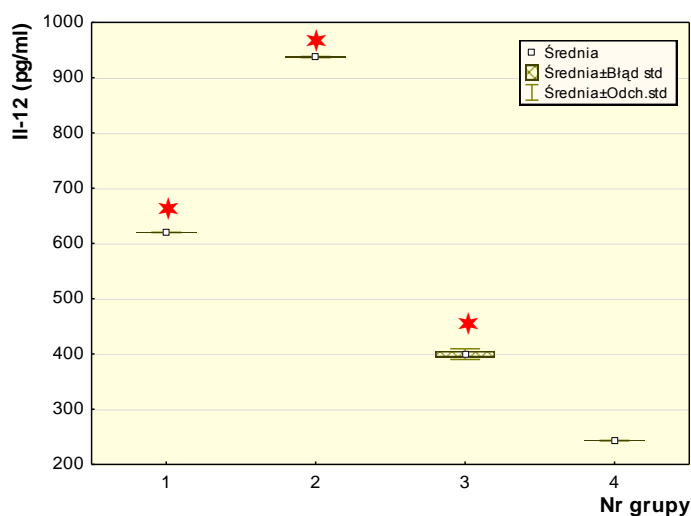
- * – różnica znamiennej statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup
 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami;
 3 – pacjenci bez ct2 leczeni statynami; 4 – pacjenci bez ct2 nieleczeni statynami

Ryc. 58. Porównanie stężenia **MCP-1** w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na **podłożu z dodatkiem glukozy** pomiędzy wszystkimi grupami



- * – różnica znamiennej statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup
 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami;
 3 – pacjenci bez ct2 leczeni statynami; 4 – pacjenci bez ct2 nieleczeni statynami

Ryc. 59. Porównanie stężenia **IL-10** w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na **podłożu z dodatkiem glukozy** pomiędzy wszystkimi grupami



- ★ – różnica znamiennej statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup
 1 – chorzy na ct2 leczeni statynami; 2 – chorzy na ct2 nieleczeni statynami;
 3 – pacjenci bez ct2 leczeni statynami; 4 – pacjenci bez ct2 nieleczeni statynami

Ryc. 60. Porównanie stężenia **II-12** w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na **podłożu z dodatkiem glukozy** pomiędzy wszystkimi grupami

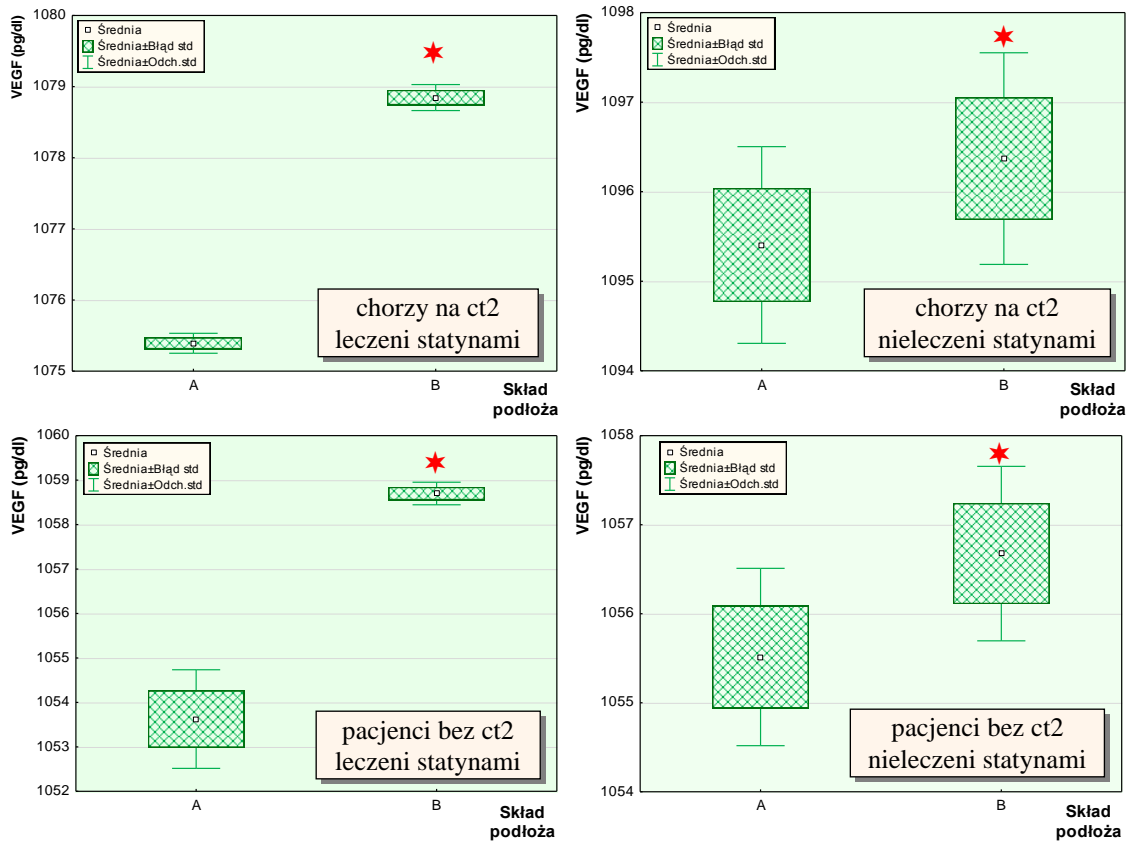
IV.7.3. Badanie sekrecji wybranych czynników angiogennych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej w obecności wysokich stężeń glukozy w podłożu (test t-Studenta) – etap II

Zaobserwowano, że obecność glukozy w podłożu użytym do hodowli komórkowej stymuluje sekrecję **VEGF** przez komórki jednojądrzaste pochodzące od osób bez cukrzycy i dyslipidemii nieotrzymujących statyn, od osób bez cukrzycy z zaburzeniami lipidowymi leczonych statynami oraz od chorych na cukrzycę typu 2 niezależnie od leczenia statynami (Ryc. 61).

Stwierdzono, że obecność glukozy w podłożu hodowlanym stymuluje również sekrecję **bFGF** (Ryc. 62) i **MCP-1** (Ryc. 63) przez komórki jednojądrzaste, jednak tylko w grupie chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami.

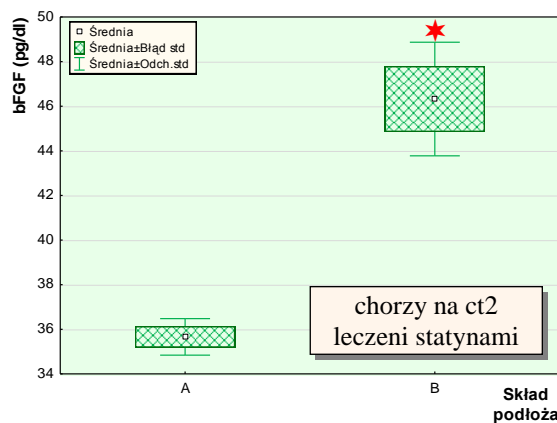
Podobny efekt wywierały wysokie stężenia glukozy w środowisku w odniesieniu do sekrecji **II-12** przez komórki pochodzące od chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami (Ryc. 64).

W pozostałych badanych grupach nie zaobserwowano wpływu wysokich stężeń glukozy w podłożu na sekrecję badanych czynników angiogennych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej.



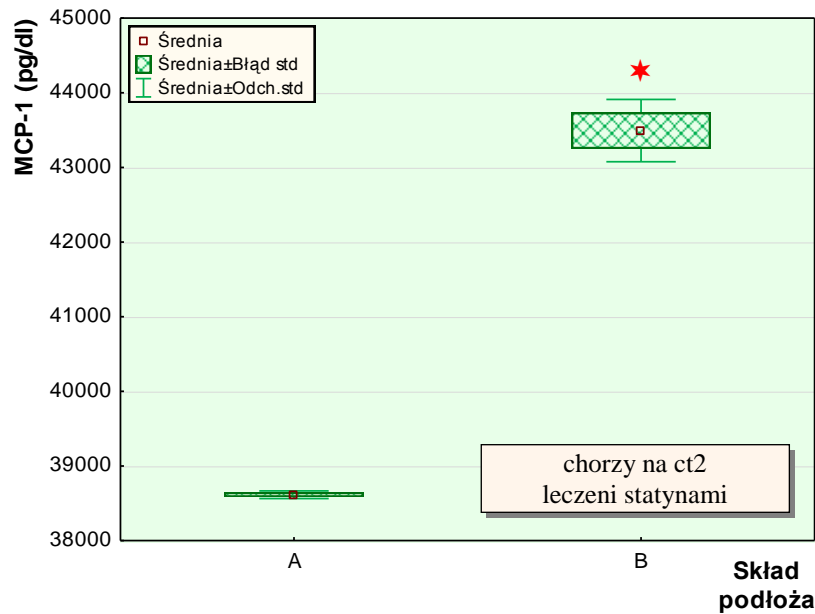
★ – różnica znamienne statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec hodowli komórek jednojądrzastych na standardowym podłożu (RPMI)
 A – RPMI; B – RPMI + glukoza

Ryc. 61. Stężenie **VEGF** w nadsącu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w zależności od obecności **glukozy** w podłożu w poszczególnych grupach



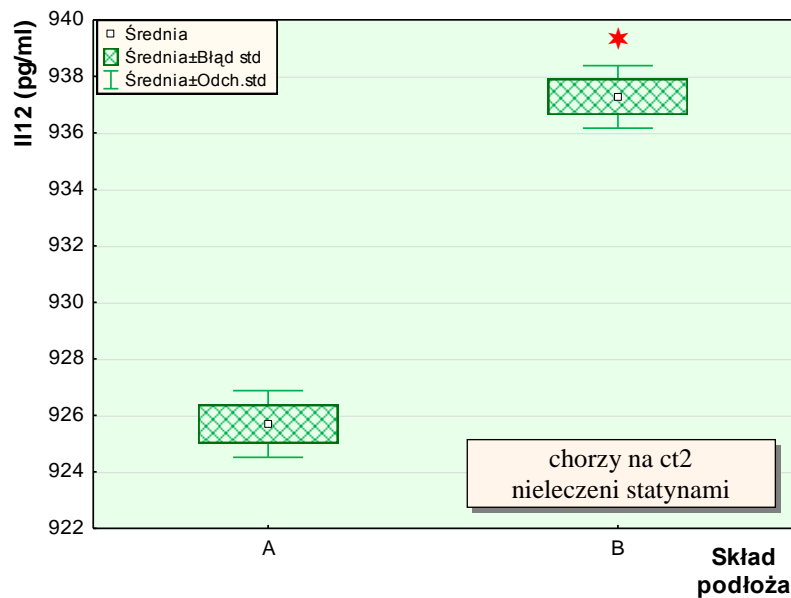
★ – różnica znamienne statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec hodowli komórek jednojądrzastych na standardowym podłożu (RPMI)
 A – RPMI; B – RPMI + glukoza

Ryc. 62. Stężenie **bFGF** w nadsącu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w zależności od obecności **glukozy** w podłożu w grupie **chorych na ct2 przyjmujących statyny**



* – różnica znamiennej statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec hodowli komórek jednojądrzastych na standardowym podłożu (RPMI)
A – RPMI; B – RPMI + glukoza

Ryc. 63. Stężenie **MCP-1** w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w zależności od obecności **glukozy** w podłożu w grupie **chorych na cukrzycę przyjmujących statyny**

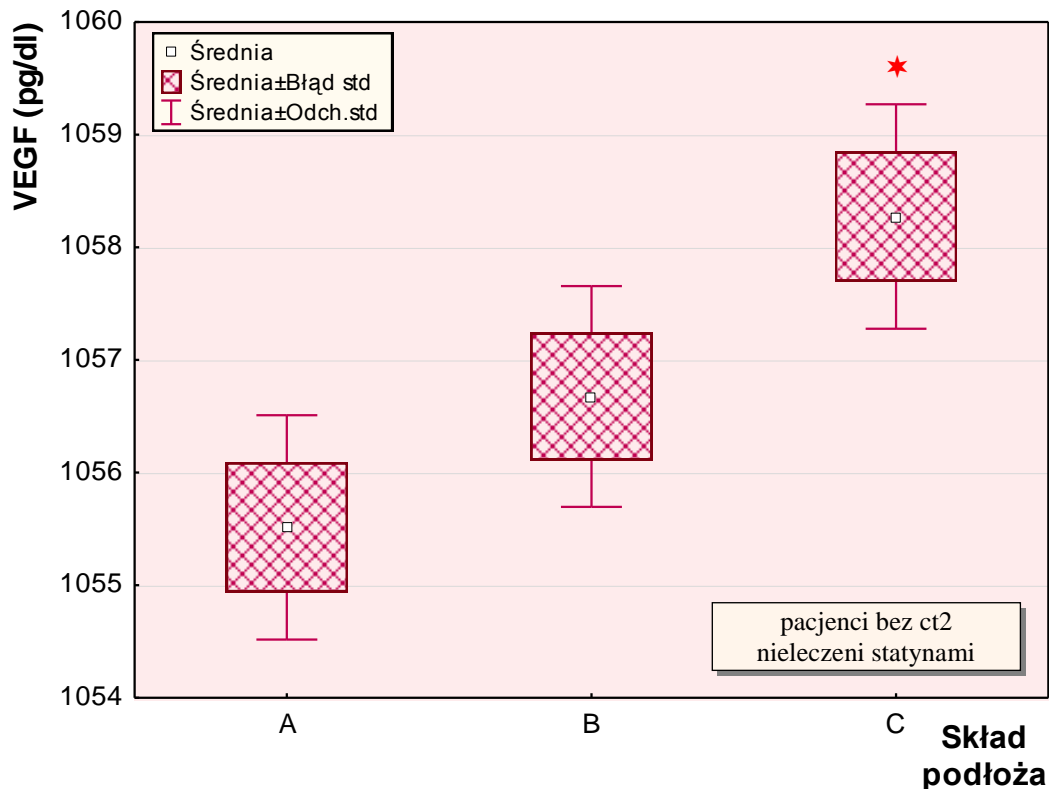


* – różnica znamiennej statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec hodowli komórek jednojądrzastych na standardowym podłożu (RPMI)
A – RPMI; B – RPMI + glukoza

Ryc. 64. Stężenie **II-12** w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w zależności od obecności **glukozy** w podłożu w grupie **chorych na cukrzycę nieprzyjmujących statyn**

IV.7.4. Badanie sekrecji wybranych czynników angiogennych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej w obecności wysokich stężeń insuliny w podłożu (analiza wariancji ANOVA) – etap II

Wykazano, że wysokie stężenia insuliny w podłożu nasilają wyłącznie sekrecję **VEGF** przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej pochodzące od osób bez cukrzycy i dyslipidemii nieotrzymujących statyn. Jednocześnie wytwarzanie VEGF pod wpływem wysokich stężeń insuliny w środowisku było bardziej nasilone aniżeli sekrecja tego czynnika obserwowana pod wpływem wysokich stężeń glukozy (Ryc. 65).



★ – różnica znamionna statystycznie dla poziomu istotności $p \leq 0,05$ wobec hodowli komórek jednojądrzastych na standardowym podłożu (RPMI)
A – RPMI; B – RPMI + glukoza; C – RPMI + insulina

Ryc. 65. Stężenie **VEGF** w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w zależności od obecności **insuliny** w podłożu w grupie **pacjentów bez cukrzycy nieprzyjmujących statyn**

V. Omówienie wyników i dyskusja

We współczesnym piśmiennictwie coraz większym zainteresowaniem cieszy się **zagadnienie wpływu angiogenezy na progresję procesu miażdżycowego** [195, 196]. Rola neowaskularyzacji zachodzącej w obrębie ścian naczyń krwionośnych nie jest bowiem jednoznaczna. Sugeruje się, że w warunkach fizjologicznych proces ten sprzyja odbudowie naczyń, a także pomaga zwalczyć stan zapalny, prowadząc do regresji zmian miażdżycowych [196]. Natomiast w warunkach patologicznych nasilenie angiogenezy w obrębie ścian naczyń może przyspieszać postęp zmian miażdżycowych, promując migrację makrofagów, przyczyniając się do pogrubienia ścian naczyń, a także nasilając stan niedotlenienia i martwicy [196]. Co więcej, wraz ze wzrostem ilości nowych cienkościennych naczyń krwionośnych, wzrasta ryzyko ich pęknięcia i krwotoku wewnątrz płytki miażdżycowej, co może prowadzić do poważnych powikłań [196, 197]. W przeciwieństwie do neowaskularyzacji blaszki miażdżycowej kompensacyjna arteriogeneza stanowi proces fizjologiczny indukowany niedokrwieniem. Proces ten wiedzie do wytworzenia dojrzałych struktur naczyniowych poprzez wzrost i powiększenie wcześniej istniejących naczyń tętnicznych, a jego celem jest zapewnienie krążenia obocznego w strefie niedokrwienia [195].

Wszystkie wspomniane wyżej aspekty angiogenezy mają szczególne znaczenie dla przebiegu miażdżycy i jej klinicznych przejawów u chorych na cukrzycę. **Wyjaśnienie, jak kształtują się stężenia czynników modulujących angiogenezę u chorych na cukrzycę typu 2** może być istotne zarówno w sensie poznawczym, jak i praktycznym. Powszechnie wiadomo, że u pacjentów tych główną przyczyną zgonów i przewlekłego inwalidztwa są powikłania rozwijające się na podłożu makroangiopatii, będącej procesem tożsamym z miażdżycą w sensie anatomopatologicznym [1]. Biorąc pod uwagę wspomniane powiązania angiogenezy z miażdżycą, można przypuszczać, że dokładne wyjaśnienie złożonego patomechanizmu tych procesów może mieć ogromne znaczenie dla zapobiegania groźnym powikłaniom cukrzycy typu 2.

Przeprowadzone dotychczas badania poświęcone tej tematyce dotyczyły w większości populacji ogólnej. Jedyne nieliczne odnosiły się do populacji osób

chorujących na cukrzycę typu 2 [106, 107]. Na podstawie dotychczasowych obserwacji można stwierdzić, że u osób chorujących na cukrzycę angiogeneza zachodząca w obrębie blaszki miażdżycowej jest bardziej nasilona niż u osób bez cukrzycy, a jej zaawansowanie jest w dużym stopniu zależne od kontroli glikemii [197, 198]. Wyniki badań własnych potwierdzają te obserwacje.

Coraz większym zainteresowaniem badaczy cieszy się również **zagadnienie modulacji angiogenezy pod wpływem stosowanej farmakoterapii**. Zwrócono uwagę na potencjalny wpływ leków z grupy **inhibitorów reduktazy HMG-CoA**, czyli statyn, na proces naczyniotworzenia. Jednakże rola statyn w modulacji procesu angiogenezy, przebiegającej w warunkach specyficznych zaburzeń metabolicznych charakterystycznych dla cukrzycy, nie została dotąd jednoznacznie wyjaśniona [199]. Zarówno mechanizm, jak i kierunek oddziaływania tych leków na proces naczyniotworzenia budzi nadal wątpliwości [6, 7, 200, 201].

Powszechnie wiadomo, że leki z grupy statyn wykazują wiele działań pozalipidowych, określanych jako działania plejotropowe. Wymienić tutaj można między innymi korzystny wpływ na funkcjonowanie śródbłonka naczyniowego oraz działanie przeciwzapalne, antyoksydacyjne, przeciwzakrzepowe i immunomodulujące [143, 146, 202].

Złożony mechanizm oddziaływania inhibitorów reduktazy HMG-CoA na proces angiogenezy jest prawdopodobnie związany głównie z działaniami plejotropowymi statyn, wynikającymi z hamowania syntezy izoprenoidów. Efekty tych działań obejmują zmiany funkcjonowania i regulacji apoptozy komórek endotelium [7, 8] oraz zwiększenie liczby komórek progenitorowych śródbłonka naczyń, które odgrywają istotną rolę w procesie angiogenezy, uczestnicząc bezpośrednio w tworzeniu nowych naczyń i będąc źródłem czynników proangiogennych [9].

Niemniej interesujące i jednocześnie nie wyjaśnione zagadnienie stanowi przeciwstawne, to znaczy pro- lub antyangiogenne, oddziaływanie odpowiednio niskich i wysokich dawek statyn na przebieg angiogenezy [7, 8]. Wyniki dostępnych badań, przeprowadzonych głównie na modelach zwierzęcych, są rozbieżne. Autorzy wskazują zarówno na aktywność antyangiogenną statyn, przejawiającą się redukcją ekspresji

czynników proangiogennych, głównie VEGF [203, 204], jak i na ich proangiogenne działanie [205].

Zważywszy, że ze względu na lepszą tolerancję, mniejsze ryzyko wystąpienia działań niepożądanych oraz ze względów socjalno-ekonomicznych w praktyce klinicznej stosowane są częściej niskie dawki statyn zamiast rekomendowanych powszechnie dawek wysokich, problem ten zasługuje na szczególną uwagę.

Badania własne miały zatem na celu próbę wyjaśnienia, czy i w jaki sposób niskie dawki statyn, stosowane zwykle w praktyce klinicznej, mogą wpływać na stężenia wybranych czynników zarówno pro- jak i antyangiogennych w surowicy krwi osób chorych na cukrzycę typu 2 oraz w jaki sposób czynniki charakterystyczne dla przebiegu tej choroby mogą modyfikować wpływ omawianych leków na przebieg procesu naczyniotworzenia. Wszyscy badani pacjenci otrzymujący statyny leczenia byli **atorwastatyną** lub **simwastatyną** w dawkach odpowiednio 20 mg/dobę lub 10÷40 mg/dobę, które klasyfikowane są przez autorów zajmujących się tą problematyką jako dawki niskie czyli generujące wyłącznie nanomolarne stężenia leku w surowicy krwi [7, 8].

W przebiegu badań własnych zaobserwowano, że u chorych na cukrzycę typu 2, którzy nie byli leczeni statynami stężenie badanych regulatorów angiogenezy w surowicy było wyższe w porównaniu z ich stężeniem w surowicy pacjentów z obu pozostałych grup. Jednocześnie wykazano, że stosowanie statyn w niskich dawkach u chorych na cukrzycę typu 2 powoduje istotne zmiany profilu czynników modulujących przebieg angiogenezy, a mianowicie obniżenie stężenia wszystkich badanych **czynników proangiogennych** w surowicy krwi, zarówno tych bezpośrednio stymulujących proces angiogenezy (VEGF, bFGF), jak i tych działających w sposób pośredni (MCP-1, angiogenina). Stężenia te były niższe w porównaniu z tymi obserwowanymi u pacjentów cierpiących na cukrzycę nieotrzymujących statyn, co szczególnie wyraźnie uwidoczniła przeprowadzona testem Manna-Whitneya analiza statystyczna dotycząca wyłącznie tych dwu grup, a przede wszystkim analiza kowariancji, która stanowi narzędzie statystyczne pozwalające na porównanie grup z wykluczeniem wpływu czynników towarzyszących, którymi w przypadku badanych grup były parametry odzwierciedlające wyrównanie metaboliczne cukrzycy, nasilenie

insulinooporności obwodowej, zaburzenia czynności wydzielniczej komórek β wysp trzustki oraz podstawowe parametry antropometryczno-epidemiologiczne. Zatem można przypuszczać, że **u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami w niskich dawkach** kierunek modulacji angiogenezy na poziomie jej najbardziej znaczących regulatorów może świadczyć o **antyangiogenym działaniu omawianych leków stosowanych w takich dawkach**.

Wyniki te są nieco zaskakujące, biorąc pod uwagę rezultaty przeprowadzonych wcześniej badań innych autorów, które jak wspomniano wykazały, że niskie dawki statyn wykazują raczej działanie proangiogenne, przyczyniając się do nasilenia migracji komórek śródbłonna naczyń i formowania nowych naczyń krwionośnych [7, 8]. Zdaniem tych autorów [7, 8] jedynie stosowanie wysokich dawek statyn wiąże się z ich aktywnością antyangiogeną.

Istotną przyczyną wspomnianej rozbieżności wyników badań własnych z wynikami uzyskanymi przez innych autorów może być fakt, że wcześniejsze badania nie dotyczyły pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2, co więcej zostały przeprowadzone wyłącznie na zwierzęcym modelu miażdżycy oraz z zastosowaniem hodowli komórkowych [7, 8]. Można zatem sądzić, że warunki obecne *in vivo*, a nade wszystko **czynniki ściśle związane z patogenezą i przebiegiem cukrzycy typu 2**, takie jak przewlekła i ostra hiperglikemia, insulinooporność obwodowa, czy zaburzenia sekrecji komórek β , mogą modyfikować zarówno przebieg angiogenezy, jak i wpływać na kierunek działania statyn. Na taką interpretację uzyskanych wyników pozwala analiza rezultatów wcześniejszych badań dotyczących zmian stężenia niektórych regulatorów angiogenezy właśnie u chorych na cukrzycę lub w warunkach *in vitro* odpowiadającym przebiegowi cukrzycy [110, 206, 207]. Autorzy wspomnianych badań [110, 206, 207] zaobserwowali podwyższone stężenia niektórych czynników proangiogennych u chorych na cukrzycę typu 2, a także wskazali na prawdopodobny mechanizm tego zjawiska i jego związek z przewlekłą hiperglikemią.

Nandy et al. [206] wykazali wzrost stężenia **VEGF** u osób chorujących na cukrzycę typu 2, zwłaszcza u pacjentów, u których stwierdzono obecność powikłań cukrzycowych. Podobne obserwacje poczynili Mahdy [208] i Wong [209].

Z kolei Hamed wraz z zespołem [210] wykazał, że u osób chorujących na cukrzycę typu 2 stężenia **bFGF** były wyższe w porównaniu z obserwowanymi u osób zdrowych, przy czym różnice te zaznaczały się szczególnie u pacjentów z niedostateczną kontrolą glikemii i u chorych z powikłaniami mikronaczyniowymi.

Podobnie, badania Panutsopulos'a [211] ujawniły, że zwiększoną sekrecją VEGF i bFGF charakteryzowały się także monocyty pochodzące od osób ze stabilną chorobą niedokrwienną serca, a efekt ten potęgowany był przez współistnienie cukrzycy.

W przeprowadzonych wcześniej badaniach wyższe stężenia **MCP-1**, kolejnego pośredniego czynnika proangiogenego, wykazano między innymi u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 [212], a także u osób cierpiących na chorobę niedokrwienną serca, szczególnie zaś u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym [213].

W dotychczas przeprowadzonych badaniach obserwowano również wzrost stężenia **angiogeniny** u osób cierpiących na przewlekłą niewydolność serca, przy czym efekt ten był również nasilony u osób z towarzyszącą cukrzycą [71]. Wzrost stężenia angiogeniny odnotowano także u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym [214], co więcej podwyższenie stężenia tej cytokiny uznano za czynnik prognostyczny tego powikłania. Należy jednakże odnotować, że rezultaty jednego z badań, dotyczącego osób chorujących na cukrzycę, wskazywały na redukcję stężenia angiogeniny u tych chorych [73].

Jak dotąd opublikowano znacznie mniej wyników badań dotyczących oddziaływania statyn na angiogenezę w przebiegu miażdżycy u chorych na cukrzycę typu 2, w tym na zmiany stężeń regulatorów angiogenezy w surowicy.

Na przykład związane ze stosowaniem statyn obniżenie sekrecji, bądź zmniejszenie stężenia **MCP-1** w surowicy krwi obserwowano wprawdzie we wcześniejszych badaniach, ale nie dotyczyły one pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2 [215, 216]. Taki wpływ statyn na stężenie MCP-1 został potwierdzony u chorych na cukrzycę tylko w badaniach Wä gner et al. [216].

Nieco szerzej opisuje się oddziaływanie statyn prowadzące do obniżenia **VEGF** u chorych na cukrzycę, niemniej badania te dotyczą przede wszystkim chorych z retinopatią cukrzycową [217-219]. Wyniki nielicznych badań opisujących wpływ

statyn na stężenie VEGF w surowicy chorych na cukrzycę w aspekcie schorzeń sercowo-naczyniowych wykazały redukcję poziomu tego regulatora pod wpływem atorwastatyny [199]. Nie można jednak poczynić na tej podstawie bezpośrednich porównań z wynikami badań własnych z uwagi na to, że chorzy w badaniach Jaumdally et al. [199] leczeni byli wyłącznie wysokimi dawkami atorwastatyny (80 mg/24h).

Brak jest natomiast w piśmiennictwie istotnych danych dotyczących wpływu statyn na stężenie innych badanych proangiogennych regulatorów angiogenezy takich jak **bFGF** i **angiogenina** u chorych na cukrzycę typu 2.

Istnieją jednak dowody na antyangiogenne oddziaływanie statyn u chorych na cukrzycę w obrębie blaszki miażdżycowej. Wykazano, bowiem że stosowanie statyn prowadzi do zahamowania progresji blaszki miażdżycowej i jest to ściśle związane z bezpośrednim antyangiogennym efektem działania statyn u chorych na cukrzycę [220].

Rezultaty badań własnych pozwalają na sformułowanie tezy, że **działanie statyn może być w sposób istotny modyfikowane przez zaburzenia związane z przebiegiem cukrzycy typu 2.**

Analiza kowariancji potwierdziła istotną **rolę zaburzeń związanych z patomechanizmem cukrzycy w kształtowaniu się różnic stężeń czynników proangiogennych** pomiędzy chorymi na cukrzycę typu 2 leczonymi statynami i nieotrzymującymi leków z tej grupy.

Wykazano bowiem, że stosowanie statyn jest wprawdzie głównym czynnikiem modyfikującym stężenia obu bezpośrednich stymulatorów angiogenezy (VEGF i bFGF) w surowicy chorych na cukrzycę, jednak w przypadku **VEGF**, znamienny wpływ na kształtowanie się różnic pomiędzy wspomnianymi grupami badanych wywierało także stężenie peptydu C – wykładnika czynności wewnętrzwydzielniczej komórek β wysp trzustki oraz stężenie rezystyny w surowicy, odzwierciedlające nasilenie insulinooporności tkanek obwodowych. Stężenie **bFGF** u chorych na cukrzycę poza oddziaływaniem statyn warunkowały także parametry ściśle związane z nasileniem obwodowej insulinooporności, takie jak obwód talii, wskaźnik WHR i wysokie stężenia triglicerydów w surowicy.

Na wysunięcie podobnych wniosków pozwala także analiza korelacji rang Spearmana. Stwierdzono, że wzrost stężenia **VEGF** jest związany z podwyższeniem stężenia peptydu C, cholesterolu frakcji LDL, stężenia rezystyny, a także z obniżeniem stężenia adiponektyny w surowicy krwi. Wykazano także ujemną korelację pomiędzy **bFGF** a wykładnikiem ostrej hiperglikemii – stężeniem 1,5-AG w osoczu.

Podobnie, w przypadku pośrednich stymulatorów angiogenezy, czyli **angiogeniny** i **MCP-1**, analiza kowariancji pozwoliła na stwierdzenie, że czynniki związane z przebiegiem cukrzycy mają istotny wpływ na stężenie tych regulatorów angiogenezy w surowicy. Ostra i przewlekła hiperglikemia oraz czynność wewnątrzwydzielnicza komórek β wysp trzustki były nawet silniejszymi od statyn czynnikami modyfikującymi stężenie MCP-1 w surowicy chorych na cukrzycę typu 2. Na kształtowanie się stężenia MCP-1 w surowicy chorych na cukrzycę typu 2 poza statynami wpływ miały także czynniki związane z insulinoopornością obwodową – współczynnik masy ciała oraz obwód talii. W odniesieniu do stężenia angiogeniny w surowicy stwierdzono, że jej stężenie u chorych na cukrzycę typu 2 związane jest wprawdzie istotnie ze stosowaniem statyn, ale dominujący wpływ na poziom angiogeniny w surowicy ma nasilenie ostrej i przewlekłej hiperglikemii oraz zaburzenia czynności wydzielniczej komórek β wysp trzustki.

Wyniki wspomnianych obserwacji nie pozostawiają złudzeń co do możliwości jednoczynnikowego oddziaływania na proces angiogenezy u chorych na cukrzycę. Mimo niezaprzecznego antyangiogenego oddziaływania statyn stosowanych w niskich dawkach wobec proangiogennych regulatorów angiogenezy u chorych na cukrzycę typu 2, nie sposób pominąć wpływu czynników związanych z przebiegiem tej choroby, a zwłaszcza zaburzeń w zakresie gospodarki węglowodanowej, czynności wydzielniczej komórek β wysp trzustki oraz nasilenia obwodowej insulinooporności.

Z drugiej strony szczególnego uwypuklenia wymagają te wyniki badań własnych, które jednoznacznie wskazują na możliwość uzyskania u chorych na cukrzycę w efekcie stosowania statyn stężeń proangiogennych regulatorów angiogenezy porównywalnych z występującymi u osób bez zaburzeń metabolicznych nie przyjmujących żadnych leków.

Mechanizm odpowiedzialny za zmiany stężeń czynników proangiogennych w przebiegu cukrzycy nie został jak dotąd w pełni wyjaśniony. W wyniku przeprowadzonych wcześniej badań Tchaikovsky et al. [110] wykazali, że u osób chorujących na cukrzycę typu 2 odpowiedź na działanie czynników proangiogennych na poziomie receptorowym i postreceptorowym jest osłabiona w porównaniu z osobami zdrowymi. Jest to spowodowane zmniejszeniem wrażliwości tych receptorów wywołanym oddziaływaniem czynników typowych dla przebiegu cukrzycy, takich jak reaktywne formy tlenu i produkty późnej glikacji białek, powstające w warunkach ostrej i przewlekłej hiperglikemii. Konsekwencją zmniejszonej wrażliwości receptorów jest kompensacyjny wzrost sekrecji czynników proangiogennych, zwłaszcza VEGF.

Jak sugerują Cubbon et al. [221] mechanizm oporności odpowiednich receptorów na działanie czynników proangiogennych może być związany z mechanizmem insulinooporności. W obu przypadkach dochodzi do zaburzeń przekazywania sygnałów za pośrednictwem szlaku z udziałem kinaz PI3/Akt i MAPK. Należy więc przypuszczać, że u osób z nasiloną insulinoopornością, może dochodzić do zwiększonej oporności na czynniki proangiogenne, a w konsekwencji do zwiększonej kompensacyjnej syntezy tych czynników.

Opisany mechanizm stanowić może wyjaśnienie wyników uzyskanych w ramach badań własnych. Na podstawie analizy współczynników korelacji rang Spearmana wykazano bowiem, że w obu grupach obejmujących chorych na cukrzycę typu 2, niezależnie od stosowania statyn, nasilenie insulinooporności obwodowej wyrażone zwiększonym stężeniem rezystyny i/lub zmniejszonym stężeniem adiponektyny, determinuje wzrost stężenia niektórych czynników proangiogennych, tj. VEGF i MCP-1.

Wyniki badań Waltenbergera [5] sugerują, że wpływ hiperglikemii związanej z przebiegiem cukrzycy typu 2 ma także związek z niespecyficzną aktywacją wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych związanych z receptorem dla VEGF przez indukowane hiperglikemią ROS i AGE. Ekspozycja na hiperglikemię prowadzi wtórnie do osłabienia przekaźnictwa sygnału wewnątrzkomórkowego powstającego wskutek pobudzenia receptora dla VEGF, w konsekwencji do oporności na VEGF i kompensacyjnego wzrostu jego stężenia we krwi. Zjawisko to opisano wprawdzie

tylko w odniesieniu do VEGF, ale jest bardzo prawdopodobne, że odgrywa ono także istotną rolę w kształtowaniu się stężeń pozostałych badanych czynników proangiogennych.

Wyniki badań i ich interpretacja przedstawione przez Waltenbergera [5] pozwalają przypuszczać, że dwukierunkowe – pro- lub antyangiogenne działanie statyn, opisywane wcześniej przez innych autorów, ma swoje źródło u chorych na cukrzycę w charakterze (przewlekła lub ostra hiperglikemia) i stopniu **nasilenia poszczególnych zaburzeń metabolicznych**. Waltenberger [9] podkreśla, że ostra i krótkotrwała hiperglikemia prowadzi tylko do wzrostu oporności na VEGF, podczas gdy długotrwała stymulacja szlaków sygnałnych towarzysząca przewlekłej hiperglikemii powoduje wprawdzie także oporność komórki docelowej na działanie VEGF, ale może być też źródłem znaczącego kompensacyjnego wzrostu stężenia tego czynnika w surowicy, co w konsekwencji prowadzi do przynajmniej częściowego przełamania oporności.

Potwierdziły to pośrednio i w odniesieniu do angiogeniny oraz bFGF wyniki badań własnych. Zaobserwowano (korelacja rang Spearmana oraz ANCOVA), że hiperglikemia na czczo, a także nasilenie przewlekłej oraz ostrej hiperglikemii stanowią czynniki związane ze wzrostem stężenia angiogeniny i bFGF w surowicy.

Wyniki badań własnych przeprowadzonych w warunkach *in vitro*, których celem była ocena sekrecji regulatorów angiogenezy przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej w warunkach podstawowych oraz w środowisku z wysokim stężeniem glukozy, potwierdziły, że cukrzyca, a zwłaszcza ekstremalnie wysokie stężenie glukozy w środowisku, nasilają sekrecję wielu czynników proangiogennych przez te komórki. W badaniach własnych wykazano także, że w warunkach *in vitro* obecność **glukozy** w podłożu hodowlanym stymuluje bezwarunkowo sekrecję **VEGF**, co zostało zaobserwowane we wszystkich grupach terapeutyczno-klinicznych, niezależnie od współistnienia cukrzycy, dyslipidemii oraz sposobu leczenia. Wyniki te pozostają w zgodzie z rezultatami innych badań, sugerującymi, że hiperglikemia jest istotnym czynnikiem indukującym wzrost stężenia tego czynnika proangiogenego [206, 208].

Warto wspomnieć, że Ho et al. [222] wykazali, iż wysokie stężenia glukozy przyczyniają się do wzrostu ekspresji genu VEGF, co może stanowić kolejne potwierdzenie i wyjaśnienie wyników badań własnych. Jednocześnie wyżej

wzmiankowane badania [222] zwróciły uwagę na fakt, że stosowanie simwastatyny w sposób istotny zmniejsza ekspresję mRNA dla VEGF, uprzednio nasiloną pod wpływem glukozy. W badaniach własnych wykazano, że sekrecja VEGF przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej jest najwyższa w przypadku komórek pochodzących od osób chorych na cukrzycę typu 2 nieotrzymujących statyn, podczas gdy stosowanie leków z tej grupy powoduje jej istotne obniżenie, zarówno w przypadku hodowli prowadzonej w warunkach podstawowych, jak i w obecności wysokich stężeń glukozy.

Stwierdzono również, że obecność glukozy w podłożu stymuluje sekrecję **bFGF** i **MCP-1** przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej, jednak efekt ten dotyczył wyłącznie osób chorych na cukrzycę typu 2 otrzymujących statyny. Obserwacje te pozostają w zgodzie z wynikami badań innych autorów, którzy zanotowali wyższe stężenia MCP-1 u osób chorujących na cukrzycę [212]. Z drugiej strony wyniki badań własnych odnoszące się do sekrecji bFGF i MCP-1 przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej stanowią uzupełnienie dla wyników obserwacji poczynionych w warunkach *in vivo* i stanowią kolejne potwierdzenie dla równoległego i tylko częściowo wzajemnie powiązanego wpływu statyn oraz czynników związanych z przebiegiem cukrzycy na stężenie regulatorów angiogenezy w surowicy krwi chorych na cukrzycę typu 2.

Ciekawe wyniki dotyczące modyfikacji angiogenezy w przebiegu cukrzycy przyniosły badania Facchiano et al. [223]. Doświadczenia przeprowadzone na modelu zwierzęcym dotyczyły modulacji angiogennej aktywności bFGF w warunkach naśladujących przebieg cukrzycy. Wykazały one, iż stężenia glukozy odpowiadające warunkom hiperglikemii powodują nieenzymatyczną glikację bFGF i w konsekwencji powstanie produktu o znacznie mniejszej aktywności mitogennej i chemotaktycznej, a tym samym – proangiogennej. Badania te potwierdziły powstawanie i obecność glikowanej formy bFGF zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Sugeruje to zatem również potencjalny istotny wpływ cukrzycy, a zwłaszcza stopnia kontroli glikemii na przebieg angiogenezy u osób cierpiących na to schorzenie.

W przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy badaniach wykazano, że nie tylko zaburzenia metaboliczne w zakresie gospodarki węglowodanowej, ale także w zakresie **gospodarki lipidowej** wykazywały pewien związek ze stężeniem

niektórych czynników proangiogennych u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami. Zaobserwowano bowiem, że wzrost stężenia LDL u tych pacjentów korelował dodatnio ze wzrostem stężenia VEGF. Również u osób chorujących na cukrzycę nieotrzymujących statyn zaburzenia metaboliczne w zakresie gospodarki lipidowej wpływały na stężenia czynników proangiogennych, przy czym u tych pacjentów wzrost stężenia bFGF był związany ze wzrostem stężenia TG w surowicy, a niższe stężenia angiogeniny obserwowano u chorych z wyższymi stężeniami HDL.

Mając na uwadze fakt, że ostra, a szczególnie poposiłkowa hiperglikemia oraz hiperlipidemia, są uznawane powszechnie za istotne czynniki ryzyka zaburzeń sercowo-naczyniowych [224, 225], można uznać, że wyniki przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy badań przyczyniają się istotnie do głębszego wyjaśnienia prawdopodobnego patomechanizmu tych groźnych zaburzeń.

Warto także zwrócić uwagę na zaobserwowany u pacjentów chorujących na cukrzycę związek pomiędzy wzrostem stężenia niektórych czynników proangiogennych w surowicy a zwiększeniem stężenia peptydu C. Najbardziej oczywiste wnioski wypływające z tych badań wskazują na fakt, iż charakterystyczna, zwłaszcza dla początkowej fazy cukrzycy typu 2, hipersekrecja komórek β stanowiąca przynajmniej w części odbicie nasilenia insulinooporności obwodowej stanowi pośredni stymulator angiogenezy. Niewykluczone również, iż hiperinsulinemia, na którą wskazują wysokie stężenia peptydu C w surowicy, jako hormonu działającego na szlaku sygnałnym aktywowanym przez kinazę MAPK, stanowi *per se* czynnik stymulujący ekspresję genów dla regulatorów angiogenezy. Potwierdzenia takiej interpretacji powyższych wyników dostarczył II etap badań własnych. Wykazano bowiem, że wysokie stężenia insuliny w środowisku są znakomitym stymulatorem sekrecji VEGF przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej u osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej, a efekt oddziaływania insuliny w tej materii znacznie przewyższa efekt działania wysokich stężeń glukozy.

Jednocześnie jednak należy spojrzeć na peptyd C, traktowany zasadniczo jako marker sekrecji insuliny przez komórki β , jako na biologicznie czynną substancję. Badania ostatnich kilku lat wykazały, że peptyd C odgrywa istotną rolę w progresji zmian miażdżycowych zachodzących w naczyniach krwionośnych u osób cierpiących

na cukrzycę typu 2. Peptyd C nasila migrację monocytów i limfocytów, wykazuje aktywność mitogenną w stosunku do tych komórek, podobną do aktywności MCP-1, przyspiesza różnicowanie monocytów/makrofagów w komórki piankowe, a także stymuluje proliferację komórek mięśni gładkich naczyń [191, 226-229]. Proaterogenna aktywność peptydu C prowadząca do progresji miażdżycy i niekorzystny wpływ angiogenezy na przebieg tego procesu dość dobrze wyjaśniają dodatnią korelację pomiędzy stężeniem peptydu C i czynników proangiogennych u osób chorych na cukrzycę typu 2.

Wpływ statyn na sekrecję i stężenia **czynników antyangiogennych** takich jak **II-10 i II-12**, zwłaszcza u osób chorujących na cukrzycę typu 2, również nie został jak dotąd wyjaśniony, a liczba badań poświęconych temu zagadnieniu jest jeszcze mniejsza niż w przypadku czynników proangiogennych [7, 230].

Wiadomo, że obie cytokiny II-10 i II-12 odgrywają istotną rolę ograniczającą nasilenie angiogenezy [83, 95, 100]. Do tej pory nie przeprowadzono jednak znaczących badań oceniających zmiany stężeń tych czynników pod wpływem stosowania statyn w niskich dawkach u chorych na cukrzycę typu 2 lub w warunkach naśladujących zmiany patofizjologiczne związane z przebiegiem tej choroby. Porównując w ramach badań własnych stężenia badanych cytokin antyangiogennych wykazano, że współistnienie cukrzycy jest związane z wyższymi poziomami II-12 oraz z obniżeniem stężenia II-10 w porównaniu z osobami bez zaburzeń metabolicznych. Obserwacje te stanowią tylko potwierdzenie wcześniej opublikowanych wyników innych badań [231].

Należy ponadto wspomnieć stymulujący wpływ wysokich stężeń glukozy w podłożu hodowlanym na sekrecję **II-12** przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej w grupie chorych na cukrzycę typu 2. Wyniki te wydają się potwierdzać wcześniejszy stan wiedzy na ten temat. Wiadomo bowiem powszechnie, że zarówno patomechanizm cukrzycy typu 2, jak i miażdżycy związany jest z występowaniem procesu zapalnego w obrębie naczyń krwionośnych. Mając na uwadze prozapalne właściwości II-12 [103, 232] wyniki badań własnych wydają się w pełni wiarygodne.

Leki z grupy statyn wykazują działanie hamujące wytwarzania niektórych cytokin, między innymi Il-12, związane prawdopodobnie z hamowaniem sekrecji izoprenoidów [2]. Wiadomo również, że stosowanie statyn osłabia odpowiedź limfocytów Th1, powodując jednocześnie przesunięcie odpowiedzi komórkowej w kierunku Th2, czemu towarzyszy między innymi wzrost sekrecji Il-10, uznawanej za cytokinę o działaniu przeciwmiażdżycowym [233]. Niektórzy badacze uważają, iż leczenie atorwastatyną wpływa na zwiększenie stężenia Il-10 w surowicy krwi, choć podkreślają jednocześnie, że skutek ten jest zależny od dawki leku [234].

Wyniki przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy badań pozostają częściowo w zgodzie z wynikami innych autorów. Wykazano bowiem, że u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami stężenie Il-12 w surowicy było wyraźnie niższe w porównaniu z chorymi nieprzyjmującymi leków z tej grupy oraz stwierdzono, że wydzielanie Il-12 przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej jest ograniczone u osób przyjmujących statyny. Jednak rozczarowanie budzi brak wyraźnego wpływu statyn na sekrecję Il-10 i na jej stężenie w surowicy u osób chorujących na cukrzycę typu 2. Biorąc pod uwagę dobrze poznany wcześniej przeciwzapalny efekt działania Il-10 [87, 88], można przypuszczać, że niskie dawki statyn nie wywierają za pośrednictwem Il-10 ani działania przeciwzapalnego, ani antyangiogenne.

W przypadku stężeń Il-12 w surowicy stwierdzono, że są one w dużej mierze uwarunkowane także nasileniem insulinooporności obwodowej, wówczas, gdy ta ostatnia wyrażona jest za pomocą stężeń rezystyny w surowicy. Jednocześnie analiza kowariancji pozwoliła stwierdzić, że różnice między chorymi na cukrzycę a osobami bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej w zakresie stężeń Il-10 uwarunkowane są nasileniem insulinooporności wyrażonej stężeniem adiponektyny. Zatem także w przypadku antyangiogennych regulatorów angiogenezy nasilenie insulinooporności odgrywa znaczącą rolę dla kształtowania się ich stężeń w surowicy.

Brak różnic w zakresie wydzielania Il-10 przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej pomiędzy chorymi na cukrzycę typu 2 leczonymi i nieleczonymi statynami oraz zmniejszenie sekrecji Il-12 u pacjentów chorujących na cukrzycę przyjmujących statyny, pozwala twierdzić, iż ewentualna aktywność antyangiogenna

statyn jest tylko w niewielkim stopniu związana z nasileniem sekrecji inhibitorów angiogenezy przez tę populację komórek.

Do tej pory nie ustalono jednoznacznie, jakie jest **praktyczne znaczenie wpływu statyn na proces angiogenezy**. Potencjalne antyangiogenne działanie statyn może być niezwykle korzystne, zwłaszcza dla pacjentów chorujących na cukrzycę typu 2. Neowaskularyzacja w obrębie blaszki miażdżycowej może bowiem prowadzić do konwersji zaawansowanego, lecz stabilnego dotąd ogniska miażdżycowego w ognisko niestabilne i w konsekwencji do pęknięcia blaszki miażdżycowej [235-237]. Tak więc ograniczenie angiogenezy w obrębie ściany zmienionego miażdżycowo naczynia krwionośnego powinno wiązać się ze zmniejszeniem ryzyka poważnych powikłań cukrzycy o charakterze epizodów sercowo-naczyniowych [24, 238]. Jak jednak wcześniej wspomniano, niektórzy badacze sugerują, że działanie takie dotyczy wyłącznie wysokich dawek statyn [7, 8, 239]. W praktyce klinicznej takie dawki stosowane są dość rzadko, głównie z obawy przed poważnymi działaniami niepożądanymi tych leków, szczególnie ze strony układu mięśniowego i wątroby, a także ze względów socjalno-ekonomicznych. Wobec tego ujawnione w badaniach własnych prawdopodobne antyangiogenne działanie niskich dawek statyn stanowi może informację ułatwiającą prowadzenie skutecznej terapii.

Z drugiej strony potencjalne proangiogenne działanie statyn, polegające na stymulowaniu wzrostu istniejących naczyń krwionośnych, a więc na tworzeniu tzw. krążenia obocznego, może stanowić istotny mechanizm obronny przed niedokrwieniem i niedotlenieniem tkanek [106]. Wyniki niektórych przeprowadzonych dotychczas badań [7, 8] wskazują, że działanie takie dotyczy jedynie niskich dawek statyn, stosowanych powszechnie w praktyce klinicznej.

Warto zauważyć, że wyniki niektórych badań epidemiologicznych wskazały na korzystny wpływ statyn stosowanych w niskich dawkach na ryzyko zaburzeń sercowo-naczyniowych [152, 167, 240]. Nie stwierdzono jednak, czy efekt ten może mieć związek z ich aktywnością antyangiogenną. Jednakże uwzględniając potencjalną, niekorzystną dla rozwoju tych zaburzeń, rolę angiogenezy zachodzącej w obrębie ścian

naczyń krwionośnych zmienionych miażdżycowo [196], należałoby oczekiwać raczej antyangiogenne, niż proangiogenne działania tych leków.

Pojawia się jednak pytanie, czy prawdopodobne, z uwagi między innymi na wyniki badań własnych, antyangiogenne działanie niskich dawek statyn może się odnosić tylko do pewnej części układu krwionośnego, przyczyniając się do zahamowania angiogenezy w obrębie blaszki miażdżycowej, a nie ograniczając jednocześnie tworzenia krążenia obocznego? Odpowiedź na tak sformułowane pytanie nie może być jednoznaczna. Wyjaśnienie tego zagadnienia może stanowić obserwacja wskazująca na zróżnicowanie wrażliwości poszczególnych tkanek na działanie regulatorów angiogenezy w obecności i pod wpływem statyn [241]. Wprawdzie badania własne obejmowały ocenę bezpośredniego wpływu statyn w stosunku do tylko jednej i niezbyt homogennej populacji komórkowej, którą stanowią mononukleary krwi obwodowej, ale porównanie wyników badań uzyskanych *in vitro* i *in vivo* wskazuje jednoznacznie, że całkowity wpływ statyn na modulację angiogenezy za pośrednictwem zmian stężenia jej regulatorów, nie jest uwarunkowany wyłącznie zmianami sekrecji tych czynników przez komórki jednojądrzaste pod wpływem statyn. Podczas, gdy w surowicy chorych cukrzycę typu 2 leczonych statynami obserwowano obniżenie stężeń większości badanych czynników proangiogennych do poziomu obserwowanego u osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej, to sekrecja tychże czynników przez komórki jednojądrzaste u osób z cukrzycą leczonych statynami uległa wprawdzie zmniejszeniu w stosunku do chorych nieleczonych statynami, ale nie osiągnęła wartości charakterystycznych dla osób zdrowych. Przy okazji należy raz jeszcze podkreślić znaczenie modyfikacji ostatecznego efektu działania statyn przez czynniki związane z przebiegiem cukrzycy. Odwołując się po raz kolejny do badań sekrecji czynników pro- i antyangiogennych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej stwierdzić można, że dla sekrecji większości tych czynników w obecności statyn znaczenie ma współwystępowanie cukrzycy, natomiast współistnienie wyłącznie dyslipidemii nie zmienia ostatecznego efektu działania tych leków.

Należałoby również rozważyć, czy postulowane antyangiogenne działanie statyn stosowanych w niskich dawkach nie wywiera niekorzystnego wpływu na układ krążenia badanych osób chorych na cukrzycę prowadząc do zahamowania wytwarzania krążenia

obocznego w niedokrwionych tkankach, a zatem do zahamowania arteriogenezy. Biorąc pod uwagę znaczący wpływ hipoksji jako induktora arteriogenezy [205], można przypuszczać, że wspomniany wyżej efekt nie powinien pojawiać się w badanej grupie. Wśród poddanych badaniu chorych na cukrzycę typu 2 nie występowała bowiem klinicznie istotna hipoksja, a ci spośród nich, którzy cierpieli na chorobę niedokrwioną serca byli to chorzy z jej stabilnym przebiegiem.

Dlatego też należy przypuszczać, że w badanej grupie działanie statyn obniżające stężenie kilku proangiogennych regulatorów angiogenezy oraz jednego z czynników antyangiogennych wywiera raczej korzystny wpływ na progresję miażdżycy u tych chorych.

Podsumowując można zaryzykować twierdzenie, że wyniki przeprowadzonych badań mogą być punktem wyjścia dla kolejnych analiz, których celem byłoby wskazanie nowego miejsca statyn w prewencji i leczeniu powikłań cukrzycowych o charakterze makroangiopatii.

VI. Wnioski

1. Stosowanie statyn w niskich dawkach u chorych na cukrzycę typu 2 jest związane ze zmianą profilu regulatorów angiogenezy w surowicy, polegającą przede wszystkim na zmniejszeniu ekspresji niektórych czynników proangiogennych (VEGF, bFGF, MCP-1, angiogeniny) oraz jednego z czynników antyangiogennych (Il-12).
2. Leczenie statynami w niskich dawkach chorych na cukrzycę typu 2 pozwala na uzyskanie ekspresji wielu regulatorów angiogenezy (VEGF, bFGF, MCP-1, angiogeniny, Il-12) w surowicy na poziomie obserwowanym u osób bez cukrzycy i jest to częściowo związane z zmniejszeniem sekrecji tych czynników przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej.
3. Zaburzenie wyrównania metabolicznego, wzrost insulinooporności obwodowej i hipersekrecja komórek β w różnym stopniu mogą nasilać ekspresję zarówno badanych czynników proangiogennych, jak i antyangiogennych w surowicy chorych na cukrzycę typu 2.
4. U chorych na cukrzycę typu 2, niezależnie od stosowania statyn, wytwarzanie niektórych czynników proangiogennych (VEGF, MCP-1) i antyangiogennych (Il-12) przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej jest wzmożone w porównaniu z osobami bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej.
5. Stosowanie statyn u chorych na cukrzycę typu 2 prowadzi do zmniejszenia sekrecji niektórych czynników proangiogennych (VEGF, bFGF, MCP-1) i antyangiogennych (Il-12) przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej hodowane w warunkach podstawowych, jak i w środowisku zawierającym wysokie stężenia glukozy.
6. Wysokie stężenie insuliny w środowisku stanowi bodziec pobudzający wytwarzanie wyłącznie VEGF przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej u osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej.

Wniosek końcowy:

Niskie dawki statyn stosowane w terapii chorych na cukrzycę typu 2 mogą wywierać pewien wpływ antyangiogeny, który wzmagany jest poprzez prawidłową kontrolę cukrzycy, zmniejszenie insulinooporności obwodowej oraz ograniczenie nadmiernej sekrecji komórek β wysp trzustki.

VII. Streszczenie

Ryzyko rozwoju epizodów sercowo-naczyniowych wśród chorych na cukrzycę typu 2 jest szczególnie wysokie. Główną przyczynę zwiększonej chorobowości i śmiertelności tych pacjentów stanowi choroba niedokrwienna serca. U podłoża tej choroby leży proces miażdżycowy, w którego patogenezie istotną, lecz nie do końca wyjaśnioną rolę odgrywa angiogeneza. Możliwość modulacji procesu angiogenezy za pomocą farmakoterapii wydaje się być zagadnieniem godnym szczególnej uwagi. Inhibitory reduktazy HMG-CoA, czyli statyny, są grupą leków o doskonale udokumentowanym działaniu przeciwhiperlipidemicznym i licznych działaniach pozalipidowych, mających istotne znaczenie dla przebiegu miażdżycy. Rola statyn w procesie angiogenezy, zwłaszcza zachodzącej w warunkach specyficznych zaburzeń metabolicznych towarzyszących cukrzycy, nie została jak dotąd dostatecznie wyjaśniona. Szczególnie niejasny pozostaje wpływ niskich dawek statyn, powszechnie stosowanych w praktyce klinicznej, na kształtowanie się stężeń regulatorów angiogenezy i związany z tym sposób modulacji angiogenezy.

Podstawowym celem pracy była próba wyjaśnienia związku pomiędzy stosowaniem statyn w niskich dawkach a profilem regulatorów angiogenezy u chorych na cukrzycę typu 2.

Przeprowadzone badania miały na celu ocenę i porównanie stężeń wybranych czynników proangiogennych (angiogeniny, bFGF, MCP-1, VEGF) i antyangiogennych (Il-10, Il-12) w surowicy pomiędzy grupami chorych na cukrzycę typu 2 leczonych simwastatyną lub atorwastatyną w niskich dawkach, chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami oraz osób bez cukrzycy nieotrzymujących statyn.

Istotnym celem zaplanowanych badań było także określenie wpływu czynników antropometryczno-epidemiologicznych oraz czynników związanych z przebiegiem klinicznym i leczeniem cukrzycy typu 2 (hiperinsulinemii, insulinooporności obwodowej, wyrównania metabolicznego) dla kształtowania się profilu wybranych regulatorów angiogenezy.

Przeprowadzone badania miały także na celu zbadanie wpływu stosowania statyn w niskich dawkach na sekrecję wybranych regulatorów angiogenezy przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej.

W I etapie pracy badaniu poddano łącznie 131 osób, w tym 53 chorych na cukrzycę typu 2 leczonych co najmniej od 3 miesięcy statynami w niskich dawkach (atorwastatyną 20 mg/dobę lub simwastatyną 10÷40 mg/dobę), 53 chorych na cukrzycę typu 2 nieotrzymujących statyn oraz 25 osób bez zaburzeń w zakresie gospodarki węglowodanowej nieotrzymujących statyn.

W II etapie badań wzięło udział ogółem 12 osób w tym: 4 osoby chore na cukrzycę typu 2 leczone statynami i 4 osoby chore na cukrzycę typu 2 nieotrzymujące statyn oraz 4 osoby bez cukrzycy z zaburzeniami gospodarki lipidowej leczone statynami i 4 osoby bez cukrzycy i dyslipidemii nieprzyjmujące żadnych leków.

U wszystkich badanych pacjentów oznaczono: metodami standardowymi – glikemię na czczo w osoczu krwi żyłnej, stężenie HbA_{1c} we krwi pełnej, stężenie cholesterolu całkowitego, frakcji HDL i LDL oraz TG w surowicy krwi, metodą enzymatyczną – stężenie 1,5-AG w osoczu, metodami immunoenzymatycznymi – stężenie adiponektyny, rezystyny w surowicy oraz peptydu C w surowicy na czczo.

U chorych włączonych do badań na ich I etapie zbadano stężenia czynników proangiogennych: angiogeniny, bFGF, MCP-1, VEGF i czynników antyangiogennych: Il-10, Il-12 w surowicy – metodą cytofluorymetrii przepływowej z zastosowaniem komercyjnych testów macierzy kulkowych.

W etapie II wykonano izolację i 72-godziną hodowlę komórek jednojądrzastych krwi obwodowej oraz przeprowadzono stymulację ich czynności wydzielniczej za pomocą wysokich stężeń glukozy i/lub insuliny w warunkach *in vitro*. Następnie zbadano metodą cytofluorymetrii przepływowej stężenia niektórych czynników proangiogennych (MCP-1, bFGF, VEGF) oraz antyangiogennych (Il-10, Il-12) w nadsączu pochodzącym z hodowli tych komórek.

Porównując stężenia badanych czynników proangiogennych pomiędzy wszystkimi badanymi grupami wykazano, że stężenia VEGF i bFGF w surowicy krwi były niższe w grupie chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami w porównaniu z osobami cierpiącymi na cukrzycę nieleczonymi statynami, i przyjmowały wartości podobne do zaobserwowanych wśród osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Stężenie angiogeniny w surowicy krwi było zbliżone u chorych na cukrzycę leczonych statynami oraz u osób bez cukrzycy. Natomiast

w grupie chorych na cukrzycę nieleczonych statynami stężenie to było istotnie wyższe wyłącznie w porównaniu do osób bez cukrzycy. Stężenie MCP-1 było istotnie niższe u chorych na cukrzycę leczonych statynami w porównaniu z chorymi na cukrzycę nieleczonymi statynami, jednocześnie w obu tych grupach stężenie tego czynnika było wyższe niż u osób bez cukrzycy. Natomiast nie wykazano różnic uwarunkowanych stosowaniem statyn w zakresie stężeń Il-10 i Il-12 w surowicy pomiędzy grupami chorych na cukrzycę.

Porównanie obejmujące wyłącznie pacjentów chorych na cukrzycę typu 2 z zastosowaniem testu Manna-Whitheya, a nade wszystko zastosowanie analizy kowariancji wykazało, że stężenia wszystkich badanych czynników proangiogennych w surowicy krwi były znamienne niższe u chorych na cukrzycę typu 2 przyjmujących statyny w porównaniu z chorymi nieotrzymującymi tych leków.

Wykazano ponadto, że czynnikami wpływającymi na międzygrupowe różnice stężenia VEGF w stopniu większym niż stosowanie statyn były stężenia peptydu C, czyli wykładnika czynności wewnętrzwydzielniczej komórek β wysp trzustki oraz rezystyny, charakteryzującej insuliooporność obwodową. Zauważono, iż na różnice stężeń bFGF pomiędzy badanymi grupami dominujący wpływ ma wprowadzenie stosowanie statyn, ale do zmian stężenia tego czynnika w surowicy przyczynić się mogą także różnice w zakresie obwodu talii, wskaźnika WHR oraz stężenia TG w surowicy. W odniesieniu do różnic stężenia angiogeniny pomiędzy badanymi grupami stwierdzono, że znacznie nawet bardziej istotne niż stosowanie statyn wydaje się oddziaływanie współistniejących stężeń 1,5-AG w osoczu oraz peptydu C w surowicy na czczo. Analiza kowariancji uwypukliła znaczenie stężenia peptydu C w surowicy dla kształtowania się różnic poziomów MCP-1 pomiędzy badanymi grupami. Dodatkowo czynnikami modyfikującymi stężenia MCP-1 w surowicy oddziałującymi z nieco mniejszą siłą niż stosowanie statyn, były wskaźnik BMI i obwód talii oraz stężenie HbA_{1c} i 1,5-AG. Wykazano też, że różnice międzygrupowe w zakresie stężeń Il-10 w surowicy uwarunkowane były stężeniem HDL i adiponektyny w surowicy, a w zakresie Il-12 – stężeniem 1,5-AG w osoczu oraz stężeniem rezystyny w surowicy.

Obliczenie współczynników korelacji rang Spearmana pozwoliło ustalić, jakie zależności istnieją pomiędzy ocenianymi parametrami związanymi z przebiegiem cukrzycy a stężeniem regulatorów angiogenezy w surowicy. Analiza obejmująca grupę chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami wykazała dodatnie korelacje pomiędzy czasem trwania klinicznie jawnej cukrzycy a stężeniem VEGF i stężeniem angiogeniny w surowicy krwi oraz pomiędzy wskaźnikiem BMI a stężeniem angiogeniny. Zaobserwowano także ujemną korelację pomiędzy stężeniem 1,5-AG a stężeniem bFGF. Stężenie angiogeniny było skorelowane dodatnio z poziomem HbA_{1c} i glikemii na czczo oraz ujemnie ze stężeniem 1,5-AG. Stwierdzono również występowanie dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem VEGF a stężeniem cholesterolu LDL. Stężenia VEGF oraz MCP-1 były skorelowane ujemnie ze stężeniem adiponektyny. Jednocześnie stężenia VEGF i Il-12 korelowały dodatnio ze stężeniem rezystyny. Wykazano także pozytywną zależność pomiędzy stężeniem peptydu C w surowicy na czczo a stężeniem czynników proangiogennych: VEGF i MCP-1.

W II etapie badań stwierdzono największe nasilenie sekrecji VEGF, bFGF i MCP-1, a także Il-12 przez komórki jednojądrzaste wyizolowane z krwi obwodowej pochodzące od chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami, zarówno w przypadku hodowli prowadzonej w warunkach podstawowych, jak i w obecności wysokich stężeń glukozy w podłożu. Natomiast sekrecja Il-10 była wyższa u pacjentów bez cukrzycy i dyslipidemii nieotrzymujących statyn w odniesieniu do wszystkich pozostałych grup charakteryzujących się porównywalnym natężeniem sekrecji Il-10.

Stwierdzono, że obecność wysokich stężeń glukozy w podłożu stymuluje sekrecję VEGF, bFGF, MCP-1 i Il-12 przede wszystkim przez komórki jednojądrzaste pochodzące od chorych na cukrzycę typu 2, natomiast wysokie stężenia insuliny w podłożu nasilają wyłącznie sekrecję VEGF przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej pochodzące od osób bez zaburzeń metabolicznych.

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

1. Stosowanie statyn w niskich dawkach u chorych na cukrzycę typu 2 jest związane ze zmianą profilu regulatorów angiogenezy w surowicy, polegającą przede wszystkim na zmniejszeniu ekspresji niektórych czynników

- proangiogennych (VEGF, bFGF, MCP-1, angiogeniny) oraz jednego z czynników antyangiogennych (Il-12).
2. Leczenie statynami w niskich dawkach chorych na cukrzycę typu 2 pozwala na uzyskanie ekspresji wielu regulatorów angiogenezy (VEGF, bFGF, MCP-1, angiogeniny, Il-12) w surowicy na poziomie obserwowanym u osób bez cukrzycy i jest to częściowo związane z zmniejszeniem sekrecji tych czynników przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej.
 3. Zaburzenie wyrównania metabolicznego, wzrost insulinooporności obwodowej i hipersekrecja komórek β w różnym stopniu mogą nasilać ekspresję zarówno badanych czynników proangiogennych, jak i antyangiogennych w surowicy chorych na cukrzycę typu 2.
 4. U chorych na cukrzycę typu 2, niezależnie od stosowania statyn, wytwarzanie niektórych czynników proangiogennych (VEGF, MCP-1) i antyangiogennych (Il-12) przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej jest wzmożone w porównaniu z osobami bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej.
 5. Stosowanie statyn u chorych na cukrzycę typu 2 prowadzi do zmniejszenia sekrecji niektórych czynników proangiogennych (VEGF, bFGF, MCP-1) i antyangiogennych (Il-12) przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej hodowane w warunkach podstawowych, jak i w środowisku zawierającym wysokie stężenia glukozy.
 6. Wysokie stężenie insuliny w środowisku stanowi bodziec pobudzający wytwarzanie wyłącznie VEGF przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej u osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej.

Wniosek końcowy:

Niskie dawki statyn stosowane w terapii chorych na cukrzycę typu 2 mogą wywierać pewien wpływ antyangiogeny, który wzmagany jest poprzez prawidłową kontrolę cukrzycy, zmniejszenie insulinooporności obwodowej oraz ograniczenie nadmiernej sekrecji komórek β wysp trzustki.

VIII. Summary

Modulation of angiogenesis in type 2 diabetic patients treated with statins.

Cardiovascular risk is particularly high among patients with type 2 diabetes mellitus. The major cause of increased mortality and morbidity among these patients is coronary artery disease closely related to atherosclerosis. Dysregulation of angiogenesis plays an important, but still unclear, role in atherosclerosis development and progression. The pharmacotherapeutic ability to influence and modify angiogenesis seems to be especially interesting. Statins – hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors exert well-documented lipid-lowering-dependent and lipid-non-dependent effects, which are both important for the progress of atherosclerosis. The meaning of statins in the process of angiogenesis, particularly in relation to diabetes-induced metabolic factors, is not ultimately elucidated. The effect of statins in low doses, which are commonly accepted and used in clinical practice, modifying angiogenesis regulators concentration in serum remains still unclear.

The main goal of this study was to elucidate the relationship between low doses of statins and angiogenesis regulators profile in type 2 diabetic patients.

The present examination was designed to estimate the serum concentrations of the pro-angiogenic (angiogenin, MCP-1, bFGF, VEGF) and anti-angiogenic factors (Il-10, Il-12) in patients with type 2 diabetes treated with statins (atorvastatin or simvastatin) in low doses and to compare this group to type statin-free 2 diabetic patients and to statin-free non-diabetic group.

The important aim of this study was to evaluate the potential influence of anthropometric and epidemiologic factors as well as those related to the course and treatment of diabetes (insulin resistance, pancreatic β cells function and metabolic compensation) on the serum profile of angiogenesis regulators.

The aim of this work was also to examine the effect of low doses of statins on the secretion of angiogenesis mediators by peripheral blood mononuclear cells.

At the stage I of the study the total of 131 patients were examined, including: 53 type 2 diabetic patients treated at least 3 months with low doses of statins (atorvastatin or simvastatin), 53 statin-free patients with type 2 diabetes and 25 statin-free non-diabetic patients.

At the stage II, the subject of studies were 12 patients, comprising: 4 type 2 diabetic patients treated with statins, 4 statin-free patients with type 2 diabetes, 4 non-diabetic patients with hyperlipidemia treated with statins, and drug-free 4 persons without metabolic deteriorations.

In every patient **measurements** were made of: fasting plasma glucose level, glycated hemoglobin A_{1c} concentration in blood, lipid profile – using routine laboratory methods, 1,5-AG plasma level – by enzymatic method, fasting serum C-peptide level, adiponectin and resistin serum concentrations – by immunoenzymatic methods.

At stage I of the experiment measurements of pro-angiogenic (angiogenin, MCP-1, bFGF, VEGF) and anti-angiogenic (Il-10, Il-12) factors concentrations in serum were taken simultaneously using flow cytometry based on the BDTM Cytometric Bead Array.

At stage II of the study the isolation and 72-hour culture of peripheral blood mononuclear cells with or without glucose or insulin in culture medium were also carried out. The concentration of pro- (MCP-1, bFGF, VEGF) and anti-angiogenic (Il-10, Il-12) factors in the culture supernatants were detected using flow cytometry.

Comparing the concentrations of examined pro-angiogenic factors among all of the examined groups, it was found that VEGF and bFGF levels in the serum of patients with type 2 diabetes treated with statins were significantly lower comparing to statin-free diabetic patients and their levels were similar to observed among patients without carbohydrate deteriorations. Angiogenin concentration in serum was similar in diabetic patients treated with statins and in non-diabetic patients. However in statin-free diabetic patients angiogenin concentration was higher when compared to non-diabetic patients. The MCP-1 serum level was significantly lower in statin-treated type 2 diabetic subjects in comparison to statin-free diabetic patients and in both these groups this factor serum concentration was higher than in non-diabetic patients. There were no differences in Il-10 and Il-12 levels in serum between statin-treated and statin-free diabetic patients.

Comparing exclusively patients with type 2 diabetes (Mann-Whitney test) and using above all analysis of covariance it was shown that the serum concentrations of all examined proangiogenic factors were significantly lower in patients treated with statins comparing to statin-free subjects.

Moreover, it was shown that statin-dependent differences in VEGF serum levels among examined groups were even more modified by C peptide serum level – marker of β -cells dysfunction and by resistin concentration – indicator of insulin resistance.

The differences in bFGF concentration were first of all modified by statins use, but also by waist circumference, WHR and TG serum level. Although treatment with statins determined the differences in angiogenin concentration among groups, more significant modifiers were 1,5-AG concentration in plasma and C peptide serum level. Analysis of covariance highlighted meaning of the C peptide serum concentration for the differences in MCP-1 level among examined groups. Additional factors that modified those differences, having less important influence than statin use, were BMI, waist circumference, as well as HbA_{1c} and 1,5-AG concentrations. It was also demonstrated that differences in serum Il-10 concentration among examined groups were determined by HDL and adiponectin concentrations, while differences in Il-12 – by 1,5-AG and resistin levels.

Correlations between examined parameters were verified by Spearman rank test. In statin-treated type 2 diabetic subjects significant positive correlation was found between diabetes duration and VEGF as well as angiogenin concentration. Angiogenin concentration was also correlated positively with BMI. Negative correlation was observed between 1,5-AG and bFGF concentrations. Concentration of angiogenin correlated positively with HbA_{1c} and fasting glucose and negatively with 1,5-AG concentration. There was also positive correlation between VEGF concentration and LDL. Both, VEGF and MCP-1 were correlated negatively with adiponectin concentration. Simultaneously VEGF as well as Il-12 correlated positively with resistin serum level. Positive correlations were found between C-peptide and angiogenic factors – VEGF and MCP-1.

Considering *in vitro* study results, it was observed the highest level secretion of VEGF, bFGF, MCP-1 and Il-12 by peripheral blood mononuclear cells in statin-free type 2 diabetic patients comparing to other groups, both at basic conditions and at the presence of high glucose concentration in culture medium. The secretion of Il-10 was higher in statin-free patients without carbohydrate and lipid deteriorations when compared to other groups.

It was found that high glucose concentration in culture medium stimulated VEGF, bFGF, MCP-1 and Il-12 secretion by peripheral blood mononuclear cells mostly those isolated from diabetic patients. However, high concentrations of insulin increased exclusively VEGF secretion by peripheral blood mononuclear cells in the group of patients without metabolic disorders.

Conclusions:

1. The management of type 2 diabetic patients with statins in low doses is associated with changes in angiogenesis regulators serum profile consisting in reduce expression of some proangiogenic factors (VEGF, bFGF, MCP-1, angiogenin) and one of antiangiogenic factor (Il-12).
2. The treatment of patients with type 2 diabetes with statins in low doses allows to achieve many angiogenesis regulators (VEGF, bFGF, MCP-1, angiogenin, Il-12) expression in the serum similar to observed in non-diabetic patients and this effect is in a part only the result of peripheral blood mononuclear cells reduced secretion.
3. Metabolic decompensation, increased insulin resistance and hypersecretion of β cells could with various intensity increase pro- and antiangiogenic factors expression in serum of type 2 diabetic patients.
4. In patients with type 2 diabetes, both statin-treated and statin-free, the secretion of some proangiogenic (VEGF, MCP-1) and antiangiogenic factors (Il-12) by peripheral blood mononuclear cells is increased comparing to individuals without carbohydrate deteriorations.
5. Treatment with statins of patients with type 2 diabetes could reduce the secretion of some proangiogenic (VEGF, bFGF, MCP-1) and antiangiogenic factors (Il-12) by peripheral blood mononuclear cells cultured at basic conditions as well as in medium mimicking hyperglycemia.
6. The high concentration of insulin in the culture medium environment stimulates only VEGF secretion by peripheral blood mononuclear cells in patients without carbohydrate deteriorations.

The final conclusion:

Low doses of statins used in the therapy of patients with type 2 diabetes could exert to some extent antiangiogenic effect which is intensified by the adequate diabetes control, reduced insulin resistance and correction of β cells hypersecretion.

Wykaz skrótów

- 1,5-AG – 1,5-anhydro-D-glucitol (*1,5-anhydro-D-glucitol*)
- ABTS – kwas 2,2'-azino-bis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)
(*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic) acid*)
- aFGF – kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów (*acid Fibroblast Growth Factor*)
- ANG – angiogenina (*Angiogenin*)
- bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (*basic Fibroblast Growth Factor*)
- BMI – wskaźnik masy ciała (*Body Mass Index*)
- ct2 – cukrzyca typu 2
- FGFR – receptor dla czynnika wzrostu fibroblastów (*Fibroblast Growth Factor Receptor*)
- HbA_{1c} – hemoglobina glikowana A_{1c} (*Glycated Hemoglobin A_{1c}*)
- HDL – lipoproteina o wysokiej gęstości (*High Density Lipoprotein*)
- HMG-CoA – 3-hydrokso-3-metyloglutarylo-koenzym A (*3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A*)
- HRP – peroksydaza chrzanowa (*Horse Radish Peroxidase*)
- IL – interleukina (*Interleukin*)
- MCP-1 – białko chemotaktyczne monocytów (*Monocyte Chemotactic Protein-1*)
- PBMCs – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)
- PHA – fitohemaglutynina (*Phytohemagglutinin*)
- PROD – oksydaza piranozowa (*Pyranose Oxidase*)
- RPMI – podłoże do hodowli komórek w warunkach in vitro (*Roswell Park Memorial Institute medium*)
- sdLDL – mała gęsta lipoproteina o małej gęstości (*small dense Low Density Lipoprotein*)
- TG – triglicerydy (*Triglyceride*)
- VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (*Vascular Endothelial Growth Factor*)
- VEGFR – receptor dla czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (*Vascular endothelial growth factor receptor*)
- WHR – stosunek obwodu talii do bioder (*Waist to Hip Ratio*)

Wykaz tabel

Tab. 1. Porównanie parametrów epidemiologiczno-antropometrycznych w badanych grupach.....	88
Tab. 2. Porównanie wykładników wyrównania metabolicznego w zakresie gospodarki węglowodanowej w badanych grupach.....	88
Tab. 3. Porównanie parametrów wyrównania metabolicznego w zakresie gospodarki lipidowej w badanych grupach.....	89
Tab. 4. Porównanie parametrów charakteryzujących czynność wydzielniczą komórek β wysp trzustki i insulinooporność obwodową w badanych grupach.....	89
Tab. 5. Porównanie parametrów epidemiologiczno-antropometrycznych u chorych na cukrzycę typu 2.....	90
Tab. 6. Porównanie wykładników wyrównania metabolicznego w zakresie gospodarki węglowodanowej u chorych na cukrzycę typu 2.....	90
Tab. 7. Porównanie parametrów wyrównania metabolicznego w zakresie gospodarki lipidowej u chorych na cukrzycę typu 2.....	91
Tab. 8. Porównanie parametrów charakteryzujących czynność wydzielniczą komórek β wysp trzustki i insulinooporność obwodową u chorych na cukrzycę typu 2.....	91
Tab. 9. Porównanie stężenia badanych czynników proangiogennych w poszczególnych grupach	93
Tab. 10. Porównanie stężenia badanych czynników proangiogennych u chorych na cukrzycę	93
Tab. 11. Porównanie stężenia badanych czynników antyangiogennych w poszczególnych grupach	96
Tab. 12. Porównanie stężenia badanych czynników antyangiogennych u chorych na cukrzycę	98
Tab. 13. Wyniki analizy kowariancji obejmującej wszystkie badane grupy, w której czynniki proangiogenne stanowią zmienne zależne.....	103
Tab. 14. Wyniki analizy kowariancji obejmującej wszystkie badane grupy, w której czynniki antyangiogenne stanowią zmienne zależne	104

169

Tab. 15. Przegląd wartości współczynników korelacji w grupie chorych na ct2 leczonych statynami.....	117
Tab. 16. Przegląd wartości współczynników korelacji w grupie chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami	125
Tab. 17. Przegląd wartości współczynników korelacji pomiędzy czynnikami pro- i antyangiogennymi w grupie chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami.....	128

Wykaz rycin

Ryc. 1. Kaskada angiogenezy	13
Ryc. 2. Odmienny przebieg angiogenezy w warunkach fizjologicznych i w przebiegu cukrzycy typu 2.....	38
Ryc. 3. Modyfikacja procesu angiogenezy pod wpływem bodźców towarzyszących przebiegowi cukrzycy typu 2	39
Ryc. 4. Budowa statyn.....	44
Ryc. 5. Wpływ statyn na szlak syntezy cholesterolu.....	51
Ryc. 6. Uproszczony schemat oznaczania adiponektyny metodą immunoenzymatyczną ELISA.....	71
Ryc. 7. Uproszczony schemat oznaczania czynników pro- i antyangiogennych	77
Ryc. 8. Uproszczony schemat izolacji i hodowli monocytów.....	82
Ryc. 9. Porównanie stężenia VEGF w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami	94
Ryc. 10. Porównanie stężenia bFGF w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami	94
Ryc. 11. Porównanie stężenia angiogeniny w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami.....	95
Ryc. 12. Porównanie stężenia MCP-1 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami	95
Ryc. 13. Porównanie stężenia Il-10 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami	97
Ryc. 14. Porównanie stężenia Il-12 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami	97
Ryc. 15. Porównanie stężenia VEGF w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 1).....	105
Ryc. 16. Porównanie stężenia VEGF w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 2).....	105
Ryc. 17. Porównanie stężenia VEGF w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 3).....	106
Ryc. 18. Porównanie stężenia bFGF w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 1).....	106
Ryc. 19. Porównanie stężenia bFGF w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 2).....	107
Ryc. 20. Porównanie stężenia bFGF w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 3).....	107
	171

Ryc. 21. Porównanie stężenia bFGF w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 4)	108
Ryc. 22. Porównanie stężenia angiogeniny w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 1).....	108
Ryc. 23. Porównanie stężenia angiogeniny w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 2).....	109
Ryc. 24. Porównanie stężenia MCP-1 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 1)	109
Ryc. 25. Porównanie stężenia MCP-1 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 2)	110
Ryc. 26. Porównanie stężenia MCP-1 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 3)	110
Ryc. 27. Porównanie stężenia Il-10 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 1)	111
Ryc. 28. Porównanie stężenia Il-10 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 2)	111
Ryc. 29. Porównanie stężenia Il-10 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 3)	112
Ryc. 30. Porównanie stężenia Il-10 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 4)	112
Ryc. 31. Porównanie stężenia Il-12 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 1)	113
Ryc. 32. Porównanie stężenia Il-12 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 2)	113
Ryc. 33. Porównanie stężenia Il-12 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 3)	114
Ryc. 34. Porównanie stężenia Il-12 w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami z zastosowaniem analizy kowariancji (model 4)	114
Ryc. 35. Związek pomiędzy czasem trwania cukrzycy a stężeniem VEGF u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami	118

Ryc. 36. Związek pomiędzy czasem trwania cukrzycy a stężeniem angiogeniny u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami	118
Ryc. 37. Związek pomiędzy stężeniem 1,5-AG a stężeniem bFGF u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami	119
Ryc. 38. Związek pomiędzy stężeniem HbA _{1c} a stężeniem angiogeniny u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami	119
Ryc. 39. Związek pomiędzy stężeniem LDL a stężeniem VEGF u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami	120
Ryc. 40. Związek pomiędzy stężeniem adiponektyny a stężeniem VEGF u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami	120
Ryc. 41. Związek pomiędzy stężeniem adiponektyny a stężeniem MCP-1 u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami	121
Ryc. 42. Związek pomiędzy stężeniem rezystyny a stężeniem VEGF u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami	121
Ryc. 43. Związek pomiędzy stężeniem rezystyny a stężeniem Il-12 u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami	122
Ryc. 44. Związek pomiędzy stężeniem peptydu C a stężeniem VEGF u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami	122
Ryc. 45. Związek pomiędzy stężeniem peptydu C a stężeniem MCP-1 u chorych na cukrzycę typu 2 leczonych statynami	123
Ryc. 46. Związek pomiędzy stężeniem HbA _{1c} a stężeniem angiogeniny u chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami	126
Ryc. 47. Związek pomiędzy stężeniem 1,5-AG a stężeniem angiogeniny u chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami	126
Ryc. 48. Związek pomiędzy stężeniem HDL a stężeniem angiogeniny u chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami	127
Ryc. 49. Związek pomiędzy stężeniem adiponektyny a stężeniem Il-12 u chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami	127
Ryc. 50. Wzajemne związki pomiędzy wybranymi czynnikami proangiogennymi w surowicy krwi u chorych na cukrzycę typu 2 nieleczonych statynami ...	129

Ryc. 51. Porównanie stężenia VEGF w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na standardowym podłożu pomiędzy wszystkimi grupami	132
Ryc. 52. Porównanie stężenia bFGF w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na standardowym podłożu pomiędzy wszystkimi grupami	132
Ryc. 53. Porównanie stężenia MCP-1 w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na standardowym podłożu pomiędzy wszystkimi grupami	133
Ryc. 54. Porównanie stężenia Il-10 w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na standardowym podłożu pomiędzy wszystkimi grupami	133
Ryc. 55. Porównanie stężenia Il-12 w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na standardowym podłożu pomiędzy wszystkimi grupami	134
Ryc. 56. Porównanie stężenia VEGF w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na podłożu z dodatkiem glukozy pomiędzy wszystkimi grupami	136
Ryc. 57. Porównanie stężenia bFGF w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na podłożu z dodatkiem glukozy pomiędzy wszystkimi grupami	136
Ryc. 58. Porównanie stężenia MCP-1 w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na podłożu z dodatkiem glukozy pomiędzy wszystkimi grupami	137
Ryc. 59. Porównanie stężenia Il-10 w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na podłożu z dodatkiem glukozy pomiędzy wszystkimi grupami	137
Ryc. 60. Porównanie stężenia Il-12 w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej hodowanych na podłożu z dodatkiem glukozy pomiędzy wszystkimi grupami	138

Ryc. 61. Stężenie VEGF w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w zależności od obecności glukozy w podłożu w poszczególnych grupach	139
Ryc. 62. Stężenie bFGF w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w zależności od obecności glukozy w podłożu w grupie chorych na ct2 przyjmujących statyny	139
Ryc. 63. Stężenie MCP-1 w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w zależności od obecności glukozy w podłożu w grupie chorych na cukrzycę przyjmujących statyny	140
Ryc. 64. Stężenie Il-12 w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w zależności od obecności glukozy w podłożu w grupie chorych na cukrzycę nieprzyjmujących statyn	140
Ryc. 65. Stężenie VEGF w nadsączu z hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w zależności od obecności insuliny w podłożu w grupie pacjentów bez cukrzycy nieprzyjmujących statyn	141

Piśmiennictwo

- [1] Sieradzki J.: *Cukrzyca*. Wydawnictwo Via Medica, Gdańsk 2006.
- [2] Banach M., Filipiak K., Opolski G.: *Aktualny stan wiedzy na temat statyn*. Wydawnictwo Medyczne Termedia, Poznań 2008.
- [3] Włoch-Kopeć D., Bała M., Jaeschke R.: *Skuteczność leczenia statynami u chorych na cukrzycę – meta analiza*. *Medycyna Praktyczna* 2008;5:82-87.
- [4] Ruszkowska B., Koprowska E., Roś D., Pater A., Odrowąż-Sypniewska G.: *The role of VEGF in type 2 diabetes*. *Medical and Biological Sciences* 2010;24(1):13-17.
- [5] Waltenberger J.: *VEGF resistance as molecular basis to explain the angiogenesis paradox in diabetes mellitus*. *Biochem Soc Trans.* 2009;37:1167-1170.
- [6] Hu Z., Zhang F., Yang Z., Yang N., Zhang D., Zhang J., Cao K.: *Combination of simvastatin administration and EPC transplantation enhances angiogenesis and protects against apoptosis for hindlimb ischemia*. *J Biomed Sci.* 2008;15:509–517.
- [7] Urbich C., Dernbach E., Zeiher A.M., Dimmeler S.: *Double-edged role of statins in angiogenesis signalling*. *Circ Res.* 2002;90:737-744.
- [8] Weis M., Heeschen C., Glassford A.J., Cooke J.P.: *Statins have biphasic effects on angiogenesis*. *Circulation* 2002;105:739-745.
- [9] Yamashita T., Abe K.: *Mechanisms of endogenous endothelial repair in stroke*. *Curr Pharm Des.* 2012; [Epub ahead of print].
- [10] Schachter M.: *Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update*. *Fundam Clin Pharmacol.* 2005;19(1):117-125.
- [11] Golomb B.A., Evans M.A.: *Statin Adverse Effects: A review of the Literature and Evidence for a Mitochondrial Mechanism*. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2008;8(6):373-418.
- [12] Wiśniewski T., Makarewicz R., Ziółkowska E., Rystok D., Zekannowska E.: *Angiogeneza nowotworowa – mechanizmy, czynniki regulujące, leki*. *Onkologia Info.* 2009;VI(5):172-178.
- [13] Mizia-Malarz A., Sobol G., Woś H.: *Angiogeneza w przewlekłych schorzeniach zapalnych i nowotworowych*. *Pol. Merk. Lek.* 2008;XXIV(141):185-189.

- [14] Distler J.W., Hirth A., Kurowska-Stolarska M., Gay R.E., Gay S., Distler O.: *Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis*. Q J Nucl Med. 2003;47:149-161.
- [15] Risau W., Flamme I.: *Vasculogenesis*. Ann Rev Cell Dev Biol. 1995;11:73-91.
- [16] Skóra J., Biegus J., Pupka A., Barć P., Sikora J., Szyber P.: *Molekularne podstawy angiogenezy*. Postepy Hig Med. Dosw. 2006;60:410-415.
- [17] Namiecińska M., Marciniak K., Nowak J.Z.: *VEGF jako czynnik angiogeny, neurotroficzny I neuroprotekcyny*. Postepy Hig Med. Dosw. 2005;59:573-583.
- [18] Zielonka T.M.: *Angiogeneza – Część I. Mechanizm powstawania nowych naczyń krwionośnych*. Alergia Astma Immunologia 2003;8(4):169-174.
- [19] Klagsbrun M., Moses M.A.: *Molecular angiogenesis*. Chem Biol. 1999;6(8):217-224.
- [20] Ferrara N.: *Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis*. Am J Physiol Cell Physiol. 2001;280:C1358-1366.
- [21] Hiraoka N., Allen E., Apel I., Gyetko M.R., Weiss S.J.: *Matrix metalloproteinase regulate neovascularization by acting as pericellular fibrynolysis*. Cell 1998;95:365-377.
- [22] Howe A., Alpin A.E., Alaharie S.K., Juliano R.L.: *Integrin signaling and cell growth control*. Curr Opin Cell Biol. 1998; 10:220-231.
- [23] Siebert J., Reiwer-Gostomska M.: *Rola czynników wzrostu w powstawaniu powikłań cukrzycy*. Kardiologia Pol. 2009;67:62-64.
- [24] Simons M.: *Angiogenesis: Where do we stand now?* Circulation. 2005;111:1556-1566.
- [25] Zielonka T.M.: *Angiogeneza. Część II. Czynniki modulujące proces powstawania naczyń krwionośnych*. Alergia Astma Immunologia 2004;9(1):25-31.
- [26] Gruchlik A., Chodurek E., Domal-Kwiatkowska D., Dzierżewicz Z.: *VEGF-A celem antyangiogennej terapii przeciwnowotworowej*. Postępy biologii komórki 2007;34(3):557-580.
- [27] Ferrara N.: *Vascular endothelial growth factor*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29:789-791.
- [28] Murohara T., Horowitz J.R., Silver M., Tsurumi Y., Chen D., Sullivan A., Isner J.M.: *Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor Enhances Vascular Permeability Via Nitric Oxide and Prostacyclin*. Circulation 1998;97:99-107.

- [29] Mizia-Malarz A., Sobol G., Woś H.: *Czynniki proangiogenne: naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) i zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) – charakterystyka i funkcje*. Przegląd lekarski 2008;65(7-8):353-357.
- [30] Leung D.W., Cachianes G., Kuang W.J., Kim S.H., Goeddel D.V., Ferrara N.: *Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen*. Science 1989; 246:1306-1309.
- [31] Keck P.J., Hauser S.D., Krivi G., Sanzo K., Warren T., Feder J., Connolly D.T.: *Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF*. Science 1989;246:1309-1312.
- [32] Ferrara N.: *Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications*. Semin Oncol. 2002;29(6, 16):10-14.
- [33] Wierzbowska A., Wrzesień-Kruś A., Robak T.: *Angiogeneza i jej znaczenie w biologii ostrej białaczki szpikowej*. Acta Haemat. Pol. 2002;33:5-17.
- [34] Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z.: *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. FASEB J. 1999;13:9-22.
- [35] Keyt B.A., Berleau L.T., Nguyen H.V., Chen H., Heinsohn H., Vandlen R., Ferrara N.: *The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency*. J Biol Chem. 1996;29,271(13):7788-7795.
- [36] Werther K., Christensen I.J., Nielsen H.J.: *Determination of vascular endothelial growth factor (VEGF) in circulating blood: significance of VEGF in various leukocytes and platelets*. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 2002;62(5):343-350.
- [37] Kimura H., Esumi H.: *Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis*. Acta Biochim. Pol. 2003;50:49-59.
- [38] Zagórska A., Dulak J.: *HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxic sensing*. Acta Biochim Pol. 2004;51:563-585.
- [39] Wilczyński M.: *Czynniki angiogenne w patogenezie neowaskularyzacji w retinopatii cukrzycowej*. Diabetologia Polska 2005;12(2):286-297.
- [40] Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J.: *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med. 2003;9(6):669-679.
- [41] Jussila L., Alitalo K.: *Vascular growth factors and lymphangiogenesis*. Physiol Rev. 2002;82:673-700.

- [42] Zelzer E., Mamluk R., Ferrara N., Johnson R.S., Schipani E., Olsen B.R.: *VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development*. Development 2003;131:2161-2171.
- [43] Bates D.O., Curry F.E.: *Vascular endothelial growth factor increases microvascular permeability via a Ca(2⁺)-dependent pathway*. Am J Physiol. 1997;273(2):H687-694.
- [44] Hippenstiel S., Krüll M., Ikemann A., Risau W., Clauss M., Suttorp N.: *VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 1998;274:L678-L684.
- [45] Esser S., Lampugnani G., Corada M., Dejana E., Risau W.: *Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells*. Journal of Cell Science 1998;111:1853-1865.
- [46] Salven P., Orpana A, Joensuu H.: *Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor*. Clin Cancer Res. 1999; 5(3):487-491.
- [47] Sondell M., Lundborg G., Kanje M.: *Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system*. J. Neurosci. 1999;19:5731-5740.
- [48] Brockington A., Lewis C., Wharton S., Shaw P.J.: *Vascular endothelial growth factor and the nervous system*. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2004;30:427-446.
- [49] Storkebaum E., Carmelit P.: *VEGF: a critical player in neurodegeneration*. J Clin Invest. 2004;113:14-18.
- [50] Góra-Kupilas K., Joško J.: *The neuroprotective function of vascular endothelial growth factor (VEGF)*. Folia Neuropathol. 2005;43(1):31-39.
- [51] Rusnati M., Presta M.: *Fibroblast growth factors/fibroblast growth factor receptors as targets for the development of anti-angiogenesis strategies*. Curr Pharm Des. 2007;13(20):2025-2044.
- [52] Presta M., Dell'Era P., Mitola S., Moroni E., Ronca R., Rusnati M.: *Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis*. Cytokine and Growth Factor Reviews 2005;16:159-178.
- [53] Powers C.J., McLeskey S.W., Wellstein A.: *Fibroblast growth factors, their receptors and signaling*. Endocr Relat Cancer. 2000;7:165-197.

- [54] Chen G.J., Forough R.: *Fibroblast growth factors, fibroblast growth factor receptors, diseases, and drugs*. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov. 2006;1(2):211-224.
- [55] Sahni A., Khorana A.A., Baggs R.B., Peng H., Francis C.W.: *FGF-2 binding to fibrin(ogen) is required for augmented angiogenesis*. Blood 2006;1,107(1):126-131.
- [56] Margosio B., Rusnati M., Bonezzi K., Cordes B.A., Annis D.S., Giavazzi R., Presta M., Ribatti D., Mosher D.F., Taraboletti G.: *Fibroblast growth factor-2 binding to the thrombospondin-1 type III repeats, a novel antiangiogenic domain*. Int J Biochem Cell Biol. 2008;40(4):700-709.
- [57] Nishiyama K., Ogawa H., Yasue H., Soejima H., Misumi K., Tkazoe K., Yoshimura M., Kugiyama K., Tsuji I., Kumeda K.: *Simultaneous elevation of the levels of circulating monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor in acute coronary syndrome*. Jpn Circ J. 1998;62:710-712.
- [58] Salcedo R., Ponce M.L., Young H.A., Wasserman K., Ward J.M., Kleinman H.K., Oppenheim J.J., Murphy W.J.: *Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression*. Blood 2000;96(1):34-40.
- [59] Gálvez B.G., Genís L., Matías-Román S., Oblander A., Tryggvason K., Apte S.S., Arroyo A.G.: *Membrane type 1-matrix metalloproteinase is regulated by chemokines Monocyte-Chemoattractant Protein-1/CCL2 and Interleukin-8/CXCL8 in endothelial cells during angiogenesis*. The Journal of Biological Chemistry 2005;280 (2):1929-1298.
- [60] Egashira K.: *Molecular mechanisms mediating inflammation I vascular disease: Special reference to monocyte chemoattractant protein-1*. Hypertension 2003; 41:834-841.
- [61] Niu J., Kolattukudy P.E.: *Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications*. Clin Sci. 2009;117:105-109.
- [62] Hong K.H., Ryu J., Han K.H.: *Monocyte chemoattractant protein 1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A*. Blood 2005; 105(4):1405-1407.

- [63] Niu J., Azfer A., Zhelyabovska O., Fatma S., Kolattukudy P.E.: *Monocyte Chemotactic Protein (MCP)-1 promotes angiogenesis via a novel transcription factor, MCP-1-induced protein (MCPIP)*. J Biol Chem. 2008;283(21):14542-14551.
- [64] Ma J., Wang Q., Fei T., Han J.J., Chen Y.: *MCP-1 mediates TGF- β -induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration*. Blood 2007;109:987-994.
- [65] Tello-Montoliu A., Patel J.V., Lip G.Y.H.: *Angiogenin: review of the pathophysiology and potential clinical applications*. J Thromb Haemost. 2006;4:1864-1874.
- [66] Riordan J.F., Vallee B.L.: *Human angiogenin, an organogenic protein*. Br J Cancer 1988;57:587-590.
- [67] Siebert J., Reiwer-Gostomska M.: *Angiogenina – nowy kierunek badań w chorobie niedokrwiennej serca?* Kardiol Pol. 2006;64:899-900.
- [68] Gao X., Xu Z.: *Mechanisms of action of angiogenin*. Acta Biochim Biophys Sin. 2008;40,7:619-624.
- [69] Szcześniak P., Michalak Ł., Durasik A., Orszulak-Michalak D.: *Angiogenina i nowe markery wielonaczyniowej choroby wieńcowej*. Biofarmacja 2009;65,2:83-87.
- [70] Pavlov N., Badet J.: *Angiogenin: involvement in angiogenesis and tumor growth*. Bull Cancer 2001;88(8):725-732.
- [71] Patel J.V., Sosin M., Gunarathne A., Hussain I., Davis R.C., Hughes E.A., Lip G.Y.: *Elevated angiogenin levels in chronic heart failure*. Ann Med. 2008;40(6):474-479.
- [72] Siebert J., Reiwer-Gostomska M., Babińska Z., Myśliwska J., Myśliwski A., Skopińska-Różewska E., Sommer E., Skopiński P.: *Low serum angiogenin concentrations in patients with type 2 diabetes*. Diabetes Care 2007;30,12:3086-3087.
- [73] Siebert J., Reiwer-Gostomska M., Myśliwska J., Marek N., Raczyńska K., Glasner L.: *Glycemic control influences serum angiogenin concentrations in patients with type 2 diabetes*. Diabetes Care 2010;33,8:1829-1830.
- [74] Chiarelli F., Pomilio M., Mohn A., Tumini S., Verrotti A. Mezzetti A., Cipollone F., Wasniewska M, Morgese G, Spagnoli A.: *Serum angiogenin concentrations in young patients with diabetes mellitus*. Eur J Clin Invest. 2002;32:110-114.
- [75] Kishimoto K., Liu S., Tsuju T., Olson K.A., Hu G.: *Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis*. Oncogene 2005;24:445-456.

- [76] Hu G., Chang S., Riordan J., Vallee B.L.: *An angiogenin-binding protein from endothelial cells*. Proc Nat. Acad Sc. USA. 1991;88:2227-2231.
- [77] Hu G., Strydom D.J., Fett J.W., Riordan J.F., Vallee B.L.: *Actin is a binding protein for angiogenin*. Proc Nat. Acad Sci USA 1993;90:1217-1221.
- [78] Sonci F.: *Angiogenin supports endothelial and fibroblast cell adhesion*. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:2232-2236.
- [79] Moroiianu J., Riordan J.F.: *Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its angiogenic activity*. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:1677-1681.
- [80] Xu Z.P., Tsuji T., Riordan J.F., Hu G.F.: *The nuclear function of angiogenin in endothelial cells is related to rRNA production*. Biochem Biophys Res Commun. 2002;7,294(2):287-292.
- [81] Trouillon R., Kang D.K., Chang S.I., O'Hare D.: *Angiogenin induces nitric oxide release independently from its RNase activity*. Chem Commun (Camb). 2011;28,47(12):3421-3423.
- [82] Steidinger T.U., Standaert D.G., Yacoubian T.A.: *A neuroprotective role for angiogenin in models of Parkinson's disease*. J Neurochem. 2011;116(3):334-341.
- [83] Silvestre J.S., Mallat Z., Duriez M., Tamarat R., Bureau M.F., Scherman D., Duverger N., Branellec D., Tedgui A., Levy B.I.: *Antiangiogenic Effect of Interleukin-10 in Ischemia-Induced Angogenesis in Mice Hindlimb*. Circ Res. 2000;87:448-452.
- [84] Choi K.M., Ryu O.H., Lee K.W., Kim H.Y., Seo J.A., Kim S.G., Kim N.H., Choi D.S., Baik S.H.: *Serum adiponectin, interleukin-10 levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome*. Diabetes Res Clin Pract. 2007;75(2):235-40.
- [85] Mazighi M., Pelle A., Gonzalez W., Mtairag El M., Philippe M., Hénin D., Michel J-B., Feldman L.J.: *IL-10 inhibits vascular smooth muscle cell activation in vitro and in vivo*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004;287:H866-H871.
- [86] Holven K.B., Halvorsen B., Bjerkeli V., Damas J.K., Retterstøl K., Morkrid L., Ose L., Aukrust P., Nenseter M.S.: *Impaired inhibitory effect of interleukin-10 on the balance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in mononuclear cells from hyperhomocysteinemic subjects*. Stroke. 2006;37:1731-1736.

- [87] Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O'Garra A.: *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.
- [88] Huang S., Xie K., Bucana C.D., Ullrich S.E., Bar-Eli M.: *Interleukin 10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells: potential inhibition of angiogenesis*. *Clin Cancer Res*. 1996;2:1969-1979.
- [89] Mocellin S., Panelli M.C., Wang E., Nagorsen D., Marincola F.M.: *The dual role of IL-10*. *Trends Immunol*. 2003;24(1):36-43.
- [90] Gunneth C.A., Heistad D.D., Faraci F.M.: *Interleukin-10 protects nitric oxide-dependent relaxation during diabetes. Role of superoxide*. *Diabetes*. 2002;51:1931-1937.
- [91] Dickerson E.B., Akhtar N., Steinberg H., Wang Z.Y., Lindstrom M.J., Padilla M.L., Auerbach R., Helfand S.C.: *Enhancement of the antiangiogenic activity of interleukin-12 by peptide targeted delivery of the cytokine to $\alpha_v\beta_3$ integrin*. *Mol Cancer Res*. 2004;2(12):663-673.
- [92] Alber G., Al-Robaiy S., Kleinschek M., Knauer J., Krumbholz P., Richter J., Schoeneberger S., Schuetze N., Schulz S., Toepfer K., Voigtländer R., Lehmann J., Mueller U.: *Induction of immunity and inflammation by interleukin-12 family members*. *Ernst Schering Res Found Workshop*. 2006;(56):107-127.
- [93] Zorena K., Myśliwska J., Myśliwiec M., Balcerska A., Lipowski P., Raczyńska K.: *Interleukina 12 jako mediator antyangiogeny u dzieci z cukrzycą typu 1*. *Endokrynologia, Diabetologia i Choroby Przemiany Materii Wieku Rozwojowego*. 2007;13(1):27-31.
- [94] Airoidi I., Carlo E.D., Cocco C., Taverniti G., D'Antuono T., Ognio E., Watanabe M., Ribatti D., Pistoia V.: *Endogenous IL-12 triggers an anti-angiogenic program in melanoma cells*. *PNAS*. 2007;104(10):3996-4001.
- [95] Engel M.A., Neurath M.F.: *Anticancer properties of the IL-12 family--focus on colorectal cancer*. *Curr Med Chem*. 2010;17(29):3303-3308.
- [96] Gee K., Guzzo C., Che Mat N.F., Ma W., Kumar A.: *The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders*. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009;8(1):40-52.
- [97] Duda D.G., Sunamura M., Lozonschi L., Kodama T., Egawa S., Matsumoto G., Shimamura H., Shibuya K., Takeda K., Matsuno S.: *Direct in vitro evidence*

- and in vivo analysis of the antiangiogenic effects of interleukin-12. Cancer Res.* 2000;60:1111-1116.
- [98] Mitola S., Strasly M., Prato M., Ghia P., Bussolino F.: *IL-12 regulates an endothelial cell-lymphocyte network: Effect on metalloproteinase-9 production.* J Immunol. 2003;171:3725-3733.
- [99] Goodridge H.S., Harnett W., Liew F.Y., Harnett M.M.: *Differential regulation of interleukin-12 p40 and p35 induction via Erk mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent mechanisms and the implications for bioactive IL-12 and IL-23 responses.* Immunology 2003;109(3):415-425.
- [100] Albini A., Brigati C., Ventura A., Lorusso G., Pinter M., Morini M., Mancino A., Sica A., Noonan D.M.: *Angiostatin anti-angiogenesis requires IL-12: the innate immune system as a key target.* J Transl Med. 2009;7:5-12.
- [101] Skovbjerg S., Martner A., Hynsjö L., Hesle C., Olsen I., Dewhirst F.E., Tham W., Wold A.E.: *Gram-positive and gram-negative bacteria induce different patterns of cytokine production in human mononuclear cells irrespective of taxonomic relatedness.* J Interferon Cytokine Res. 2010;30(1):23-32.
- [102] Kang B.Y., Kim E., Kim T.S.: *Regulatory mechanisms and their therapeutic implications of interleukin-12 production in immune cells.* Cell Signal. 2005;17(6):665-673.
- [103] Jawień J.: *New insights into immunological aspects of atherosclerosis.* Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej 2008;118(3):127-130.
- [104] Voest E.E., Kenyon B.M., O'Reilly M.S., Truitt G., D'Amato R.J., Folkman J.: *Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12.* J Natl Cancer Inst. 1995; 87(8):581-586.
- [105] Wu W.K., Llewellyn O.P., Bates D.O., Nicholson L.B., Dick A.D.: *IL-10 regulation of macrophage VEGF production is dependent on macrophage polarisation and hypoxia.* Immunobiology 2010;215(9-10):796-803.
- [106] Simons M.: *Angiogenesis, arteriogenesis, and diabetes: paradigm reassessed?* J Am Coll Cardiol. 2005;46(5):835-837.
- [107] Benjamin L.E.: *Glucose, VEGF-A, ang diabetic complications.* Am J Pathol. 2001;158(4):1181-1184.

- [108] Abaci A., Oguzhan A., Kahraman S., Eryol N.K., Unal S., Arinç H., Ergin A.: *Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels.* Circulation 1999;99:2239-2242.
- [109] Sluimer J.C., Daemen M.J.: *Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis.* J Pathol. 2009;218:7-29.
- [110] Tchaikovski V, Olieslagers S, Böhmer FD, Waltenberger J.: *Diabetes mellitus activates signal transduction pathways resulting in vascular endothelial growth factor resistance of human monocytes.* Circulation 2009;119(2):150-159.
- [111] Holmquist G.N.: *Statins: Indications and Uses, Safety and Modes of Action.* Nova Science Publishers, Inc., New York 2009.
- [112] www.mz.gov.pl: *Urzędowy Wykaz Produktów Leczniczych Dopuszczonych do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej.* Część 1A. 31 marca 2011.
- [113] Masana L.: *Pitavastatin – from clinical trials to clinical practice.* Atheroscler. 2010;11(3):15-22.
- [114] Cattaneo D., Baldelli S., Merlini S., Zenoni S., Perico N., Remuzzi G.: *Therapeutic use of HMG-CoA reductase inhibitors: current practice and future perspectives.* Expert Opinion on Therapeutic Patents 2004;14(11):1553-1566.
- [115] Sobotta L., Kachlicki P., Marczak L., Kryjewski M., Mielcrek J.: *Photochemical activity of glenvastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor.* Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 2011;224:1-7.
- [116] Wajima T., Makita S., Oshima K.: *Direct vascular effects of HR780, a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor.* Clin Exp Pharmacol Physiol. 2003;30(12):958-62.
- [117] Neuvonen P.J., Backman J.T., Niemi M.: *Pharmacokinetic comparison of the potential over-the-counter statins simvastatin, lovastatin, fluvastatin and pravastatin.* Clin Pharmacokinet. 2008;47(7):463-474.
- [118] Endo A.: *The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors.* J Lipid Res. 1992;33(11):1569-82.
- [119] Steinberg D.: *An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: The discovery of the statins and the end of the controversy.* J Lipid Res. 2006; 47:1339-1351.

- [120] Endo A.: *A historical perspective on the discovery of statins*. Proc. Jpn. Acad. 2010;B86:484-493.
- [121] Brown M.S., Faust J.R., Goldstein J.L., Kaneko I., Endo A.: *Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-236B), a competitive inhibitor of the reductase*. J Biol Chem. 1978;253(4):1121-1128.
- [122] Yamamoto A., Sudo H., Endo A.: *Therapeutic effects of ML-236B in primary hypercholesterolemia*. Atherosclerosis 1980;35(3):259-266.
- [123] Alberts A.W., Chen J., Kuron G., Hunt V., Huff J., Hoffman C., Rothrock J., Lopez M., Joshua H., Harris E., Patchett A., Monaghan R., Currie S., Stapley E., Albers-Schonberg G., Hensens O., Hirshfield J., Hoogsteen K., Liesch J., Springer J.: *Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent*. Proc Natl Acad Sci USA 1980;77(7):3957-3961.
- [124] Bizukojć M., Ledakowicz S.: *Biosynteza lowastatyny przez Aspergillus terreu*. Biotechnologia-monografie 2005;2(2):55-67.
- [125] Liao J.K., Laufs U.: *Pleiotropic effects of statins*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2005;45:89-118.
- [126] Brunton L.L., Lazo J.S., Parker K.L.: *Farmakologia Goodmana & Gilmana*. Wydawnictwo CZELEJ, Lublin 2007.
- [127] Bolego C., Poli A., Cignarella A., Catapano A.L., Paoletti R.: *Novel statins: pharmacological and clinical results*. Cardiovasc Drugs Ther. 2002;16(3):251-257.
- [128] Istvan E.: *Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view*. Atheroscler Suppl. 2003;4(1):3-8.
- [129] García M.J., Reinoso R.F., Sánchez N.A., Prous J.R.: *Clinical pharmacokinetics of statins*. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2003;25(6):457-481.
- [130] Lennernäs H., Fager G.: *Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences*. Clin Pharmacokinet. 1997;32(5):403-425.

- [131] Hamelin B.A., Turgeon J.: *Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors*. Trends Pharmacol Sci. 1998;19(1):26-37.
- [132] Corsini A., Bellosta S., Baetta R., Fumagalli R., Paoletti R., Bernini F.: *New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins*. Pharmacol Ther. 1999;84(3):413-428.
- [133] Langford N.J., Kendall M.J.: *Rhabdomyolysis with HMG CoA reductase inhibitors: a class effect?* J Clin Pharm Ther. 2001;26(6):391-395.
- [134] Williams D., Feely J.: *Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors*. Clin Pharmacokinet. 2002;41(5):343-370.
- [135] Bellosta S., Paoletti R., Corsini A.: *Safety of statins: focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions*. Circulation 2004;15;109(23 Suppl 1):III50-57.
- [136] Law M., Rudnicka A.R.: *Statin safety: a systematic review*. Am J Cardiol. 2006; 97(8A):52C-60C.
- [137] Bottorff MB.: *Statin safety and drug interactions: clinical implications*. Am J Cardiol. 2006;97(8A):27C-31C.
- [138] Rosenson R.S.: *Current overview of statin-induced myopathy*. Am J Med. 2004; 116(6):408-416.
- [139] Vaughan C.J., Gotto A.M.: *Update on statins: 2003*. Circulation. 2004; 17;110(7):886-892.
- [140] Thompson P.D., Clarkson P., Karas R.H.: *Statin-associated myopathy*. JAMA. 2003;289:1681-1690.
- [141] Aquila-Salinas R., Barrett H., Schonfeld G.: *Metabolic modes of action of statins in hyperlipoproteinemias*. Atherosclerosis 1998;141:203-207.
- [142] Galus R., Zandecki Ł., Józwiak J., Włodarski K.: *Pozalipidowe działanie statyn*. Pol Mark Lek. 2008;XXIV,144:545-548.
- [143] Wang Ch-Y., Liu P-Y., Liao J.K.: *Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results*. Trends Mol Med. 2008;14(1):37-44.
- [144] Bogdański P., Pupek-Musialik D.: *Statyny – standard terapii XXI wieku. Jak wybrać optymalną dawkę*. Forum Zaburzeń Metabolicznych 2010;1(3):131–140.

- [145] Heart Protection Study (HPS) Collaborative Group: *MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20536 high-risk individuals: a randomized placebo-controlled trial*. Lancet 2002;360:7-22.
- [146] Ray K.K., Cannon C.P.: *The potential relevance of the multiple lipid-independent (pleiotropic) effects of statins in the management of acute coronary syndromes*. JACC. 2005;46(8):1425-1433.
- [147] Wolfrum S., Jensen K.S., Liao J.K.: *Endothelium-Dependent Effects of Statins*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23:729-736.
- [148] Davignon J.: *The cardioprotective effects of statins*. Curr Atheroscl Rep. 2004;6:27-35.
- [149] Tousoulis D., Charakida M., Stefanadi E., Siasos G., Latsios G., Stefanadis C.: *Statins in heart failure. Beyond the lipid lowering effect*. Int J Cardiol. 2007;115,2:144-150.
- [150] Corsini A., Pazzucconi F., Arnaboldi L., Pfister P., Fumagalli R., Paoletti R., Sirtori C.R.: *Direct effects of statins on the vascular wall*. J Cardiovasc Pharmacol. 1998;31:773-778.
- [151] Ferrara D.E., Pierangeli S.S.: *Diverse effects of statins on endothelial cells*. Thromb Haemost. 2005;93:186-188.
- [152] Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. *Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)*. Lancet 1994;344(19):1383-1389.
- [153] LaRosa J.C.: *New and emerging data from clinical trials of statins*. Curr Atheroscl Rep. 2004;6:12-19.
- [154] Crouse J.R., Byington R.P., Furberg C.D.: *HMG-CoA reductase inhibitor therapy and stroke risk reduction: an analysis of clinical trials data*. Atherosclerosis 1998;138(1):11-24.
- [155] Athyros V.G., Papageorgiou A.A., Mercouris B.R., et al.: *Treatment with atorvastatin to the national cholesterol educational program goal versus usual care in secondary coronary heart disease prevention. The GREek Atorvastatin and Coronary-heart-disease-Evaluation (GREACE) Study*. Curr Med Res Opin. 2002;18:220-228.
- [156] Mills E.J., Rachlis B., Wu P., Devereaux P.J., Arora P., Perri D.: *Primary prevention of cardiovascular mortality and events with statins treatment:*

- a network metaanalysis involving more than 65 000 patients. Journal of the American College of Cardiology. 2008;52:1769-1781.*
- [157] Brugts J.J., Yetgin T., Hoeks S.E., Gotto A.M., Shepherd J., Westendorp R.G., de Craen A.J., Knopp R.H., Nakamura H., Ridker P., van Domburg R., Deckers J.W.: *The Benefits of statins in people without established cardiovascular disease but with cardiovascular risk factors: meta-analysis of randomized controlled trials. BMJ. 2009;338: b2376.*
- [158] *West of Scotland coronary prevention study: implications for clinical practice. European Heart Journal 1996;17:163-164.*
- [159] Schwartz G.G., Oliver M.F., Ezekowitz M.D., et al.: *Rationale and design of the Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) study that evaluates atorvastatin in unstable angina pectoris and in non-Q-wave acute myocardial infarction. Am J Cardiol, 1998;81:578-581.*
- [160] Shepherd J., Blauw G.J., Murphy M.B., et al., on behalf of the PROSPER Study Group: *Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomized controlled trial. Lancet 2002;360:1623-1630.*
- [161] Sever P.S., Dahlof B., Poulter N.R., et al., for the ASCOT investigators: *Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentration, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomized controlled trial. Lancet 2003;361:1149-1158.*
- [162] Serruys P.W., de Feyter P., Macaya C., et al., for the Lescol Intervention Prevention Study (LIPS) Investigators: *Fluvastatin for prevention of cardiac events following successful first percutaneous coronary intervention. A randomized controlled trial. JAMA 2002;287:3215-3222.*
- [163] Laws P.E., Spark J.I., Cowled P.A., Fitridge R.A.: *The role of statins in vascular disease. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2004;27:6-16.*
- [164] Libby P., Aikawa M.: *Mechanisms of plaque stabilization with statins. Am J Cardiol. 2003;91(4A):4B-8B.*
- [165] Holdaas H., Fellstrom B., Jardine A.G., et al., on behalf of the Assessment of LEscol in Renal Transplantation (ALERT) Study Investigators: *Effect of*

- fluvastatin on cardiac outcomes in renal transplant recipients: a multicentre, randomized, placebo-controlled trial. Lancet 2003;61:2024-2031.*
- [166] PTD: *Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę, 2011. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. Diabetologia Praktyczna 2011;12(A):A1-A46.*
- [167] Colhoun H.M., Betteridge D.J., Durrington P.N., Hitman G.A., Neil H.A., Livingstone S.J., Thomason M.J., Mackness M.I., Charlton-Menys V., Fuller J.H.; CARDS investigators.: *Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Care (CARDS): multicentre randomized placebo-controlled trial. Lancet 2004;364:685-696.*
- [168] Shepherd J., Kalstelein J.J.P., Bittner V., Deewania P., Breazna A., Dobson S., Wilson D.J., Zuckerman A., Wegner N.K.: *Intensive Lipid lowering With Atorvastatin in Patients With Coronary Heart Disease and Chronic Kidney Disease. The TNT (Treating to New Targets) Study. J Am Coll Cardiol. 2008;51(15):1448-1454.*
- [169] ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group: *Major outcomes in moderately hypercholesterolemic, hypertensive patients randomized to pravastatin vs usual care: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT-LLT). JAMA 2002; 18;288(23):2998-3007.*
- [170] Kearney PM, Blackwell L, Collins R, Keech A, Simes J, Baigent C, Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators: *Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. Lancet 2008;371(9607):117-25.*
- [171] PTD: *Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę, 2009. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. Diabetologia Doświadczalna i kliniczna 2009;9(A):A1-A42.*
- [172] PTD: *Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę, 2010. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. Diabetologia Praktyczna 2011;11(A):A1-A47.*
- [173] Yamanouchi T., Minoda S., Yabuuchi M.: *Plasma 1,5-anhydro-D-glucitol as a New clinical marker of glycaemic control In NIDDM patients. Diabetes. 1989;38:723-729.*

- [174] Dworacka M., Winiarska H., Kuczyński S. i wsp. *Zastosowanie metody enzymatycznej dla oznaczania stężenia 1,5-anhydro-D-glucitolu w osoczu*. *Diagn Lab*. 1997;33:269-276
- [175] Buse J.B., Freeman J.L.R., Edelman S.V., Jovanovic L., McGill J.B.: *Serum 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark™): a short-term glycemic marker*. *Diabetes Technol. Ther*. 2003;5:355–363.
- [176] Sun J., Dou J.T., Wang X.L., Yang G.Q., Lü Z.H., Zheng H., Ma F.L., Lu J.M., Mu Y.M.: *Correlation between 1,5-anhydroglucitol and glycemic excursions in type 2 diabetic patients*. *Chin Med J*. 2011;124(22):3641-5.
- [177] Kim M.J., Jung H.S., Hwang-Bo Y., Cho S.W., Jang H.C., Kim S.Y., Park K.S.: *Evaluation of 1,5-anhydroglucitol as a marker for glycemic variability in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Acta Diabetol*. 2011;18 [Epub ahead of print].
- [178] Dworacka M., Winiarska H., Szymańska M., Kuczyński S., Szczawińska K., Wierusz-Wysocka B.: *1,5-Anhydro-D-glucitol: a novel marker of glucose excursions*. *Int J Clin Pract*. 2002;Suppl.129:40-44.
- [179] Dworacka M., Winiarska H.: *The application of plasma 1,5-anhydro-D-glucitol (1,5-AG) for monitoring type 2 diabetic patients*. *Dis Markers*. 2005;21:127-132.
- [180] Dworacka M.: *Nowy cel terapeutyczny – poposiłkowa hiperglikemia*. *Diabetologia Doświadczalna i Kliniczna* 2004;4,6:407-412.
- [181] Yamanouchi T., Tachibana Y., Akanuma H., Minoda H., Shinohara T., Moromizato H., Miyashita H., Akaoka I.: *Origin and disposal of 1,5-anhydroglucitol, a major polyol In the human body*. *Am J Physiol*. 1992;263:E268-E273.
- [182] Umeda F., Yamauchi T., Ishii H., Nakashima N., Hisatomi A., Nawata H.: *Serum 1,5-Anhydro-D-Glucitol and Glycemic Control in Patients with Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*. *Yohoku J Exp Med*. 1991;163:93-100.
- [183] Dworacka M.: *Udział ostrej (poposiłkowej) hiperglikemii w rozwoju i przebiegu choroby niedokrwiennej serca u chorych na cukrzycę typu 2*. *Kardiadiabetologia, Terapia* 2007;3:1-11.
- [184] Fu Y., Luo N., Klein R., Garvey W.T.: *Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation*. *J Lipid Res*. 2005;46:1369-1379.

- [185] Simońska E., Gumprecht J., Skubala A., Zychma M., Żywiec J., Grzeszczak W.: *Adiponektyna – znaczenie w patogenezie cukrzycy typu 2*. Diabetologia Doświadczalna i kliniczna 2004; 4,4:249-254.
- [186] Borowska M.: *Wybrane nieklasyczne czynniki proaterogenne u chorych na cukrzycę typu 2 w aspekcie stosowanej farmakoterapii*. Rozprawa doktorska, UMP 2012.
- [187] Banerjee R., Rangwala S.M., Shapiro J.S., Rich A.S., Rhoades B., Qi Y., Wang J., Rajala M.W., Poci A., Scherer P.E., Stepan C.M., Ahima R.S., Obici S., Rossetti L., Lazar M.A.: *Regulation of Fasted Blood Glucose by Resistin*. Science. 2004; 303:1195-1198.
- [188] Kougiass P., Chai H., Lin P.H., Lumsden A.B., Yao Q., Chen C.: *Adipocyte-derived cytokine resistin causes endothelial dysfunction of porcine coronary arteries*. J Vasc Surg. 2005;41(4):691-698.
- [189] Mu H., Ohashi R., Yan S., Chai H., Yang H., Lin P., Yao Q., Chen C.: *Adipokine resistin promotes in vitro angiogenesis of human endothelial cells*. Cardiovasc Res. 2006;70(1):146-57.
- [190] Jamaluddin M.S., Weakley S.M., Yao Q., Chen C.: *Resistin: functional roles and therapeutic consideration for cardiovascular disease*. Br J Pharmacol. 2012;165:622-632.
- [191] Usarek M, Bryła J.: *Pleiotropowe działanie pro insulinowego peptydu C*. Postepy Hig Med. Dosw. 2012;66:135-145.
- [192] Maier R., Weger M, Haller-Schober E-M., El-Shabrawi Y., Wedrich A., Theisel A., Barth A., Hass A.: *Multiplex bead analysis of vitreous and serum concentrations of inflammatory and proangiogenic factors in diabetic patients*. Mol Vis. 2008; 14:637-643.
- [193] Morgan E., Varro R., Sepulveda H., Ember J.A., Apgar J., Wilson J., Lowe L., Chen R., Shivraj L., Agadir A., Campos R., Ernst D., Gaur A.: *Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology*. Clin Immunol. 2004;110(3):252-66.
- [194] <http://www.bdsciences.com>
- [195] Chen C-H, Walterscheid J.P.: *Plaque Angiogenesis Versus Compensatory Arteriogenesis in Atherosclerosis*. Circ. Res. 2006;99:787-789.

- [196] Moreno P.R., Purushothaman M., Purushothaman K.R.: *Plaque neovascularization: defense mechanisms, betrayal, or war in progress*. Ann N Y Acad Sci. 2012; 1254:7-17.
- [197] Michel J.-B., Virmani R., Arbustini E., Pasterkamp G.: *Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability*. European Heart Journal 2011;32:1977-1985.
- [198] Hayden M.R., Tyagi S.C.: *Vasa vasorum in plaque angiogenesis, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atherosclerosis: a malignant transformation*. Cardiovasc Diabetol. 2004;3:1-16
- [199] Jaumdally R.J., Goon P.K., Varma C., Blann A.D., Lip G.Y.: *Effects of atorvastatin on circulating CD34+/CD133+/CD45- progenitor cells and indices of angiogenesis (vascular endothelial growth factor and the angio-poietins 1 and 2) in atherosclerotic vascular disease and diabetes mellitus*. J Intern Med. 2010;267(4):385-93.
- [200] Nishimoto-Hazuku A., Hirase T., Ide N., Ikeda Y., Node K.: *Simvastatin stimulates vascular endothelial growth factor production by hypoxia-inducible factor-1 α upregulation in endothelial cells*. J Cardiovasc Pharmacol, 2008;51:267-73.
- [201] Skaletz-Rorowski A., Walsh K.: *Statin therapy and angiogenesis*. Curr Opin Lipidol. 2003;14(6):599-603.
- [202] Takemoto M., Liao J.K.: *Pleiotropic Effects of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001;21:1712-1719.
- [203] Zhi Z., Haibing C., Hong W., Bilian K., Bingqing Z., Qian L., Peiyu L., Li S., Qing G., Xun X.: *Improvement of retinal vascular injury in diabetic rats by statins is associated with the inhibition of mitochondrial reactive oxygen species pathway mediated by peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α* . Diabetes. 2010;59:2315-2325.
- [204] Park H.J., Kong D., Iruela-Arispe L., Begley U., Tang D., Galper J.B.: *3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, inhibitors interfere with angiogenesis by inhibiting the geranylgeranylation of RhoA*. Circ Res. 2002;91:143-150.
- [205] El-Azab M.F., Hazem R.M., Moustafa Y.M.: *Role of simvastatin and/or anti-oxidant vitamins in therapeutic angiogenesis in experimental diabetic hindlimb ischemia: effects on capillary density, angiogenesis markers, and oxidative stress*. Eur J Pharmacol. 2012;13 [Epub ahead of print].

- [206] Nandy D., Mukhopadhyay D., Basu A.: *Both vascular endothelial growth factor and soluble Flt-1 are increased in type 2 diabetes but not in impaired fasting glucose*. J Investig Med. 2010;58(6):804-6.
- [207] Zimering M.B., Anderson R.J., Ge L., Moritz T.E.; Investigators for the VADT.: *Increased plasma basic fibroblast growth factor is associated with coronary heart disease in adult type 2 diabetes mellitus*. Metabolism. 2011;60(2):284-91.
- [208] Mahdy R.A., Nada W.M., Hadhoud K.M., El-Tarhony S.A.: *The role of vascular endothelial growth factor in the progression of diabetic vascular complications*. Eye (Lond). 2010;24(10):1576-84.
- [209] Wong B.W., Wong D., Luo H., McManus B.M.: *Vascular endothelial growth factor-D is overexpressed in human cardiac allograft vasculopathy and diabetic atherosclerosis and induces endothelial permeability to low-density lipoprotein in vitro*. J Heart Lung Transplant. 2011;30:955-962.
- [210] Hamed E.A., Zakary M.M., Abdelal R.M., Abdel-Moneim E.M.: *Vasculopathy in type 2 diabetes mellitus: role of specific angiogenic modulators*. J Physiol Biochem. 2011;67(3):339-349.
- [211] Panutsopoulos D., Zafiropoulos A., Krambovitis E., Kochiadakis G.E., Igoumenidis N.E., Spandidos D.A.: *Peripheral monocytes from diabetic patients with coronary artery disease display increased bFGF and VEGF mRNA expression*. Journal of Translational Medicine, 2003; 1:6.
- [212] Bláha V., Andrýs C., Smahelová A., Knížek J., Hyspler R., Solichová D., Bláha M., Zadák Z.: *Effect of atorvastatin on soluble CD14, CD40 Ligand, sE- and sP-selectins and MCP-1 in patients with type 2 diabetes mellitus: relationship to cholesterol turnover*. Pharmacol Res. 2006;54(6):421-8.
- [213] Aukrust P, Berge RK, Ueland T, Aaser E, Damås JK, Wikeby L, Brunsvig A, Müller F, Forfang K, Froland SS, Gullestad L.: *Interaction between chemokines and oxidative stress: possible pathogenic role in acute coronary syndromes*. J Am Coll Cardiol. 2001;37(2):485-91.
- [214] Tello-Montoliu A., Marin F., Patel J., Roldán V., Mainar L., Vicente V., Sogorb F., Lip G.Y.H.: *Plasma angiogenin levels in acute coronary syndroms: implications for prognosis*. European Heart Journal, 2007; 28:3006-3011.

- [215] Montecucco F., Burger F., Pelli G., Poku NK., Berlier C., Steffens S., Mach F.: *Statins inhibit C-reactive protein-induced chemokine secretion, ICAM-1 up-regulation and chemotaxis in adherent human monocytes*. *Rheumatology*. 2009;48:233–242.
- [216] Blanco-Colio L.M., Martín-Ventura J.L., de Teresa E., Farsang C., Gaw A., Gensini G., Leiter L.A., Langer A., Martineau P., Egado J.; ACTFAST investigators: *Elevated ICAM-1 and MCP-1 plasma levels in subjects at high cardiovascular risk are diminished by atorvastatin treatment*. *Atorvastatin on Inflammatory Markers study: a substudy of Achieve Cholesterol Targets Fast with Atorvastatin Stratified Titration*. *Am Heart J*. 2007;153(5):881-8.
- [217] Medina R.J., O'Neill C.L., Devine A.B., Gardiner T.A., Stitt A.W.: *The pleiotropic effects of simvastatin on retinal microvascular endothelium has important implications for ischaemic retinopathies*. *PLoS One*. 2008;9;3(7):e2584.
- [218] Zheng Z., Chen H., Wang H., Ke B., Zheng B., Li Q., Li P., Su L., Gu Q., Xu X.: *Improvement of retinal vascular injury in diabetic rats by statins is associated with the inhibition of mitochondrial reactive oxygen species pathway mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha*. *Diabetes*. 2010;59(9):2315-25.
- [219] Lee S.G., Kim J.L., Lee H.K., Ryu G.W., Hur D.Y., Yun I.H., Yang J.W., Kim H.W.: *Simvastatin suppresses expression of angiogenic factors in the retinas of rats with streptozotocin-induced diabetes*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011; 249(3):389-97.
- [220] Koutouzis M., Nomikos A., Nikolidakis S., Tzavara V., Andrikopoulos V., Nikolaou N., Barbatis C., Kyriakides Z.S.: *Statin treated patients have reduced intraplaque angiogenesis in carotid endarterectomy specimens*. *Atherosclerosis*. 2007;192(2):457-63.
- [221] Cubbon R.M., Ali N., Sengupta A., Kearney M.T.: *Insulin- and growth factor-resistance impairs vascular regeneration in diabetes mellitus*. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012;10:271-284.
- [222] Ho C., Hsu Y.C., Tseng C.C., Wang F.S., Lin C.L., Wang J.Y.: *Simvastatin alleviates diabetes-induced VEGF-mediated nephropathy via the modulation of Ras signaling pathway*. *Ren Fail*. 2008;30(5):557-565.

- [223] Facchiano F., D'Arcangelo D., Russo K., Fognalio V., Mennella C., Ragone R., Zambruno G., Carbone V., Ribatti D., Peschel C., Capogrosi M.C., Facchiano A.: *Glycated fibroblast growth factor-2 is quickly produced in vitro upon low-millimolar glucose treatment and detected in vivo in diabetic mice*. Mol Endocrinol. 2006;20(11):2806-2818.
- [224] *European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice*. Eur Heart J. 2007;28: 2375-2414.
- [225] Node K., Inoue T.: *Postprandial hyperglycemia as an etiological factor in vascular failure*. Cardiovasc Diabetol. 2009;29;8:23.
- [226] Walcher D., Marx N.: *C-peptide in the Vessel Wall*. Rev Diabet Stud. 2009; 6:180-186.
- [227] Marx N., Walcher D.: *C-peptide and atherogenesis: C-peptide as a mediator of lesion development in patients with type 2 diabetes mellitus?* Experimental Diabetes Research 2008; Article ID 385108.
- [228] Kim S.-T., Kim B.-J., Lim D.-M., Song I.-G., Jung J.-H., Lee K.-W., Park K.-Y., Cho Y.-Z., Lee D.-H., Koh G.-P.: *Basal C-peptide levels as a surrogate marker of subclinical atherosclerosis in type 2 diabetic patients*. Diabetes Metab J. 2011;35:41-49
- [229] Vasic D., Walcher D.: *Proinflammatory effects of C-peptide in different tissues*. International Journal of Inflammation. 2012;Article ID 932725
- [230] Doyle B., Caplice N.: *Plaque neovascularisation and antiangiogenic therapy for atherosclerosis*. Journal of American College of Cardiology 2007;49:2073-2080.
- [231] Wegner M., Dworacka M., Winiarska H.: *Interleukina 12-kolejne ogniwo łączące cukrzycę typu 2 z miażdżycą*. Diabetologia Praktyczna 2007;8:425-430.
- [232] Kriegel M.A., Tretter T., Blank N., Schiller M., Galber C., Winkler S., Kalden J.R., Lorenz H.M.: *Interleukin-4 supports interleukin-12-induced proliferation and interferon- γ secretion in human activated lymphoblasts and T helper type 1 cells*. Immunology. 2006;119:43-53.

- [233] Kłuciński P., Gayane M.: *Rola odpowiedzi immunologicznej Th1 I Th2 w rozwoju miażdżycy*. Polski Przegląd Kardiologiczny 2006;8:119-123.
- [234] Hernández C., Francisco G., Ciudin A., Chacón P., Montoro B., Llaverias G., Blanco-Vaca F., Simó R.L.: *Effect of atorvastatin on lipoprotein (a) and interleukin-10: a randomized placebo-controlled trial*. Diabetes Metab. 2011;124-30.
- [235] Bellosta S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A.: *Non-lipid-related effects of statins*. Ann Med. 2000;32:164-76.
- [236] Groszek E., Grundy S.M.: *The possible role of the arterial microcirculation in the pathogenesis of atherosclerosis*. J Chronic Dis. 1980;33:679-84.
- [237] Park H.J., Zhang Y., Georgescu S.P., Johnson K.L., Kong D., Galper J.B.: *Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis*. Stem Cell Rev. 2006;2(2):93-102.
- [238] Isner J.M., Asahara T.: *Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization*. J Clin Invest. 1999;103:1231-36.
- [239] Jaumdally R.J., Lip G.Y., Varma C., Blann A.D.: *Impact of high-dose atorvastatin on endothelial, platelet, and angiogenic indices: effect of ethnicity, cardiovascular disease, and diabetes*. Angiology. 2011;62(7):571-578.
- [240] de Lemos JA, Blazing MA, Wiviott SD, et al, for the A to Z Investigators. *Early intensive vs a delayed conservative simvastatin strategy in patients with acute coronary syndromes. Phase Z of the A to Z trial*. JAMA 2004;292:1307-1316.
- [241] Frick M., Dulak J., Cisowski J., Józkowicz A., Zwick R., Alber H., Dichtl W., Schwarzacher S.P., Pachinger O., Weidinger F.: *Statins differentially regulate vascular endothelial growth factor synthesis in endothelial and vascular smooth muscle cells*. Atherosclerosis. 2003;170(2):229-36.