

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Edyta Sacha

**POZIOM VEGF, bFGF I PEDF WE KRWI PACJENTÓW Z
RETINOPATIA W PRZEBIEGU CUKRZYCY TYPU 2**

Praca doktorska

Promotor: Prof. Dr hab. med. Aldona Dembińska-Kieć

Pracę wykonano w Katedrze Biochemii Klinicznej CMUJ
Kierownik jednostki: Prof. Dr hab. med. Aldona Dembińska-Kieć

Kraków, 2009 r.

*Składam serdeczne podziękowania
pani Profesor Aldonie Dembińskiej-Kieć,
promotorowi niniejszej pracy, za życzliwe wsparcie
i wszechstronną, bezcenną pomoc
okazaną w toku jej realizacji.*

*Serdecznie dziękuję pani dr med. Jolancie Dubiel
za umożliwienie pracy nad doktoratem
i za życzliwe wskazówki w trakcie moich badań*

Spis treści	Str.
1. Wstęp	1
1.1. Patofizjologia retinopatii cukrzycowej	3
1.2. Rola czynników regulujących angiogenezę w rozwoju retinopatii cukrzycowej	5
1.2.1. Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF)	5
1.2.2. Łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF)	6
1.2.3. Insulino-podobny czynnik wzrostu (IGF-I)	6
1.2.4. Wątrobowy czynnik wzrostu (HGF)	7
1.2.5. Naczyniopochodny śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF)	7
1.2.6. Czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego (PEDF)	8
2. Cele pracy	11
3. Materiał i metody	12
3.1. Materiał	12
3.1.1. Opis badanych grup chorych	12
3.1.2. Podział pacjentów na grupy	13
3.2. Metody	13
3.2.A. Badania okulistyczne	13
3.2.A.1. Badanie ostrości wzroku do bliży i do dali	13
3.2.A.2. Pomiar ciśnienia śródgałkowego	14
3.2.A.3. Badanie przedniego odcinka gałki ocznej	14
3.2.A.4. Badanie dna oka	15
3.2.A.5. Angiografia fluorescencyjna	15
3.2.B. Badania biochemiczne	17
3.2.B.1. Badania stężeń czynników wpływających na angiogenezę	17
3.2.B.2. Podstawowe badania biochemiczne	19
3.2.C. Metody statystyczne	20
4. Wyniki badań	22
4.1. Charakterystyka badanych grup	22
4.2. Wyniki badań laboratoryjnych	30
5. Dyskusja	49
6. Podsumowanie wyników	61
7. Wnioski	62
8. Streszczenie	63
9. Spis tabel	67
10. Spis rycin	68
11. Aneks	69
12. Piśmiennictwo	71

Wykaz skrótów

aFGF	(ang. <i>acid fibroblast growth factor</i>) kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów
AGEs	(ang. <i>advanced glycation end-products</i>) końcowe produkty glikozylacji
AMD	(ang. <i>age-related macular degeneration</i>) zwyrodnienie plamki związane z wiekiem
bFGF	(ang. <i>basic fibroblast growth factor</i>) zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
BMI	(ang. <i>body mass index</i>) wskaźnik masy ciała
EGF	(ang. <i>epidermal growth factor</i>) nabłonkowy czynnik wzrostu
HbA1c	hemoglobina glikowana
HGF	(ang. <i>hepatocyte growth factor</i>) wątrobowy czynnik wzrostu
IGF-1	(ang. <i>insulin-like growth factor</i>) insulinopodobny czynnik wzrostu
IIP -10	(ang. <i>interferon inducible protein</i>) białko indukowane przez interferon
IL-1, 6, 8, 12	Interleukina 1,6,8,12
IFN α	Interferon alfa
IRMA	(ang. <i>intraretinal microvascular abnormalities</i>) anastomozy tętniczo-żylne siatkówki
MMP	(ang. <i>matrix metalloproteases</i>) metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej
PAI-1	(ang. <i>plasminogen activator inhibitor</i>) Inhibitor aktywatora plazminogenu
PDGF	płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. <i>platelet derived growth factor</i>)
PEDF	(ang. <i>pigment epithelial derived factor</i>) czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego
PF-4	(ang. <i>platelet factor 4</i>) czynnik płytkowy 4
PIGF	(ang. <i>placental growth factor</i>) łożyskowy czynnik wzrostu
PKC	(ang. <i>protein kinase C</i>) Kinaza białkowa C
TGF-α / β	(ang. <i>transforming growth factor α / β</i>) transformujący czynnik wzrostu α / β
TIMP-1,-2,-3,-4	(ang. <i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>) tkankowe inhibitory metaloproteinaz
TNF-α	(ang. <i>tumor necrosis factor α</i> czynnik martwicy nowotworów)
VEGF	(ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>) naczyniowopochodny śródbłonkowy czynnik wzrostu

1. Wstęp

Cukrzyca jest chorobą cywilizacyjną, przebiegającą z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej, którym często towarzyszą inne nieprawidłowości jak podwyższone stężenie lipidów we krwi, nadciśnienie tętnicze oraz zaburzenia przepływu krwi, które w skojarzeniu wiodą do powstawania zmian patologicznych w wielu narządach, m.in. w obrębie narządu wzroku (83). W związku z obserwowaną zwiększającą się częstością zachorowań na cukrzycę wzrasta także liczba jej powikłań (85). Ponadto wprowadzenie leków przeciwcukrzycowych w tym insuliny spowodowało znaczne wydłużenie życia chorych na cukrzycę i tym samym wzrost częstości późnych powikłań naczyniowych. Uważa się, że powikłania cukrzycy ze zmianami w dnie oka stanowią aktualnie główną przyczynę ślepoty ludzi w wieku 20-65 r.ż., a ryzyko ciężkiej utraty widzenia u chorych na cukrzycę jest 25-30 krotnie większe niż u osób zdrowych w podobnym wieku (83, 73). Przyczyną znacznego pogorszenia ostrości wzroku u chorych na cukrzycę jest retinopatia, obecna u 5% chorych na cukrzycę typu 2 już w chwili rozpoznania, a po trzech latach trwania choroby występująca u blisko 23% pacjentów, z czego u 2% w postaci proliferacyjnej (83). Retinopatia cukrzycowa występuje częściej w cukrzycy insulinozależnej (40%) niż w cukrzycy insulinoniezależnej (20%) (35), jednak ze względu na częstsze występowanie w populacji cukrzycy typu 2 to właśnie w tym typie obserwuje się częściej przypadki retinopatii cukrzycowej (23).

Do najważniejszych czynników ryzyka powstawania retinopatii cukrzycowej zalicza się: rodzaj cukrzycy i czas jej trwania, złe wyrównanie metaboliczne, nadciśnienie tętnicze i hiperlipidemię (85). Retinopatia cukrzycowa rzadko rozwija się w ciągu pierwszych 5 lat trwania choroby i przed okresem dojrzewania (35). Intensywna i prawidłowa kontrola glikemii nie chroni wprawdzie przed wystąpieniem retinopatii cukrzycowej, ale opóźnia jej wystąpienie o kilka lat (35). Ryzyko wystąpienia retinopatii u osób poddanych intensywnemu leczeniu wyrównującemu **glikemię** zmniejsza się o ok. 54% według badań przeprowadzonych przez DCCT (23), obniżenie stężenia hemoglobiny glikowanej **HbA1c** o 1% w monitorowaniu choroby także skutkuje istotną redukcją ryzyka rozwoju mikroangiopatii (85). Nadciśnienie tętnicze zwiększa ryzyko rozwoju obrzęku plamki u wszystkich chorych (38). Stwierdzono, że ścisła kontrola **ciśnienia tętniczego** krwi i

utrzymanie go na poziomie poniżej 130/80 mmHg zmniejsza ryzyko rozwoju retinopatii cukrzycowej o 34% (23). **Hiperlipidemia** także odgrywa rolę w powstawaniu retinopatii – istnieją przypuszczenia, że podwyższone stężenie lipidów surowicy krwi może zwiększać ryzyko rozwoju obrzęku plamki (23, 38). Pozostałe czynniki zwiększające ryzyko wystąpienia i szybkiej progresji retinopatii w przebiegu cukrzycy to **palenie tytoniu, otyłość / podwyższony wskaźnik masy ciała** (BMI ang. *body mass index*), podwyższone stężenie **mocznika i kreatyniny** w surowicy krwi, **obniżone stężenie insuliny i peptydu C w surowicy, ciąża, występowanie neuropatii i nefropatii, niedokrwistość, zaburzenia w układzie krzepnięcia krwi** (zwiększona aktywność płytek krwi i hiperfibrynogenemia) oraz stres (38, 85). Retinopatia cukrzycowa jest mikroangiopatią dotyczącą tętniczek przedwłosowatych, włosniczek i drobnych naczyń żylnych, która charakteryzuje się zamknięciem drobnych naczyń i zwiększeniem przepuszczalności ich ścian. Powstanie zmian cukrzycowych w postaci obrzęku lub twardych wysięków w plamce określa się mianem makulopatii cukrzycowej, która powoduje obniżenie ostrości wzroku i jest najczęstszą przyczyną utraty widzenia u chorych na cukrzycę (83).

Angiogeneza jest niezwykle ważnym procesem fizjologicznym zachodzącym zarówno podczas embriogenezy jak i po jej zakończeniu. Waskulogeneza to formowanie naczyń krwionośnych z komórek prekursorowych zachodzące podczas życia embrionalnego. Po zakończeniu embriogenezy dochodzi do nowotworzenia naczyń krwionośnych z dotychczas istniejących w procesie neowaskularyzacji. Oba zjawiska mają bardzo istotne znaczenie dla rozwoju organizmu, dzięki nim możliwa jest m.in. owulacja, menstruacja oraz procesy gojenia ran (włącznie np. z procesami naprawczymi w tkance mięśnia sercowego po jej niedokrwieniu). Neowaskularyzacja może mieć także negatywne konsekwencje dla funkcjonowania organizmu. Patologiczna angiogeneza towarzyszy wielu schorzeniom powodując zaburzenia funkcji lub uszkodzenie narządów nią dotkniętych. W przebiegu chorób nowotworowych neowaskularyzacja przyczynia się istotnie do niekontrolowanego wzrostu guzów. Inne schorzenia przebiegające z nasiloną patologiczną angiogenezą to np. łuszczyca, reumatoidalne zapalenie stawów oraz cała grupa chorób narządu wzroku do których należą: cukrzycowa retinopatia proliferacyjna, retinopatia wcześniaków, zwyrodnienie

plamki związane z wiekiem (AMD ang: *age-related macular degeneration*) oraz retinopatia związana z niedokrwistością sierpowatokrwinkową lub zakrzepem żyły środkowej siatkówki. Nasilona angiogeneza towarzyszy także niektórym stanom zapalnym. (4,12, 24, 30, 40, 41).

1.1. Patofizjologia retinopatii cukrzycowej

Istotną rolę w powstawaniu retinopatii cukrzycowej odgrywa przewlekła hiperglikemia, hiperlipidemia i nadciśnienie. (14, 42, 43, 81). Mechanizm wpływu wysokiej glikemii na uszkodzenia komórek siatkówki i jej naczyń nie jest do końca poznany. Proponuje się kilka możliwości takiego oddziaływania. Należą do nich między innymi: akumulacja sorbitolu, synteza końcowych produktów glikozylacji (AGEs) , stres oksydacyjny oraz aktywacja kinazy białkowej C (PKC) (42, 43, 81). W przebiegu retinopatii cukrzycowej dochodzi do zaburzeń przepływu krwi w mikrokrażeniu, zwiększenia przepuszczalności naczyń, okluzji i braku perfuzji kapilar dna oka (16).

Charakterystyczną cechą retinopatii są zmiany strukturalne w obrębie komórek (zwiększenie liczby i objętości ich struktur cytoplazmatycznych), rozluźnienie połączeń międzykomórkowych, degradacja błony podstawnej, a w konsekwencji powstawanie szczelin pomiędzy komórkami oraz następowa ich migracja i proliferacja. W przebiegu tych procesów powstają nowe naczynia krwionośne, które dojrzewając ulegają rekanalizacji (61). Uszkodzenie komórek śródbłonna, odpowiedzialnych za utrzymanie bariery krew-siatkówka powoduje wzrost przepuszczalności ściany naczyń i odkładanie macierzy zewnątrzkomórkowej m.in. w obrębie plamki. (5, 46, 69). Przerwanie błony podstawnej i aktywacja metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) doprowadza do aktywacji komórek śródbłonna. Jednocześnie do miejsca uszkodzenia migrują leukocyty i makrofagi wydzielające cytokiny, białka podścieliska, substancje proangiogenne i enzymy proteolityczne jak w przebiegu reakcji zapalnej, co doprowadza do dalszej degradacji okolicznych tkanek (16). W wyniku tych procesów powstają nowe naczynia krwionośne. Kluczową rolę w regulacji perfuzji kapilar odgrywają perycyty. Ich uszkodzenie w przebiegu cukrzycy

wiedzie do zaburzeń hemodynamicznych krążenia siatkówkowego (16), a ich utrata we wczesnym stadium retinopatii cukrzycowej (6, 59, 68) koreluje z tworzeniem mikrotętniaków (18, 46, 68). W przebiegu retinopatii cukrzycowej dochodzi do pogrubienia błony podstawnej i akumulacji macierzy zewnątrzkomórkowej, co dodatkowo zaburza hemodynamikę przepływów siatkówkowych (17, 45, 82). Leukostaza jest kolejnym czynnikiem odgrywającym rolę w patogenezie retinopatii cukrzycowej. Znaczenie dla jej powstawania ma duża objętość leukocytów, ich zdolność adhezji do komórek śródbłónka naczyniowego, możliwość uwalniania licznych enzymów proteolitycznych zawartych w cytoplazmie oraz wytwarzania toksycznych wolnych rodników tlenowych (49). Zauważono, że leukocyty chorych na cukrzycę są w większości komórkami zaktywowanymi, o mniejszej „elastyczności”. Sprzyja to leukostazie w obrębie naczyń siatkówki, która doprowadza do uszkodzenia komórek śródbłónka, zaburzeń perfuzji, pobudzenia angiogenezy i zwiększenia przepuszczalności naczyń. Komórkami krwi zaangażowanymi w powyższe procesy są także erytrocyty i płytki krwi. Zaburzenia krwinek czerwonych (jak np. w niedokrwistości sierpowatokrwinkowej) powodują upośledzenie transportu tlenu i miejscowe niedokrwienie. Płytki krwi mogą być natomiast odpowiedzialne za zwiększenie lepkości krwi i stymulację agregacji (35, 38). Podsumowując zatem przyczyną zamknięcia drobnych naczyń w przebiegu retinopatii cukrzycowej są zmiany w ścianie naczyń siatkówki polegające na zwyrodnieniu i martwicy perycytów, pogrubieniu błony podstawnej, uszkodzeniu i proliferacji komórek śródbłónka oraz uszkadzający wpływ komórek krwi. Zamknięcie światła naczyń powoduje niedokrwienie, a w konsekwencji niedotlenienie siatkówki, która w porównaniu z innymi tkankami wykazuje relatywnie duże zapotrzebowanie na tlen w przeliczeniu na jeden gram tkanki. Deficyt tlenowy powoduje indukcję angiogenezy i powstawanie naczyń włosowatych o nieprawidłowej budowie i funkcji (35). Ponadto w miejscach braku perfuzji dochodzi do powstania anastomoz tętniczo-żylnych (IRMA ang. *intraretinal microvascular abnormalities*) oraz do neowaskularyzacji. Nowe naczynia powstają w wyniku proliferacji komórek śródbłónka naczyń (24) Uważa się, że do zaistnienia zjawiska neowaskularyzacji konieczny jest brak perfuzji na obszarze większym niż jeden kwadrat siatkówki (35, 38).

Jak dotąd nie ustalono głównego czynnika odpowiedzialnego za stymulację nowotworzenia naczyń występującego w proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej. W warunkach zdrowia komórki śródbłonka naczyniowego oka pozostają mitotycznie nieaktywne, a angiogeneza pozostaje pod precyzyjną kontrolą czynników stymulujących i hamujących ten proces, z którymi pozostaje w równowadze. Jako przyczynę powstawania retinopatii wielokrotnie opisywano zaburzenie równowagi pomiędzy aktywatorami i inhibitorami angiogenezy (9, 19, 60). Niedotlenienie tkanek doprowadza do pobudzenia aktywności mitotycznej komórek śródbłonka oraz przesuwania równowagę na korzyść działania czynników stymulujących angiogenezę (57, 73).

1.2. Rola czynników regulujących angiogenezę w rozwoju retinopatii cukrzycowej.

W wielu pracach udokumentowano zwiększenie stężenia czynników stymulujących angiogenezę w cieple szklistym oczu z proliferacyjną retinopatią cukrzycową pod wpływem hipoksji (28, 31, 37, 39, 47, 52, 71, 78). Do głównych czynników tych zalicza się naczyniowopochodny śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) (3, 9, 27) zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) (31), łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF) (59), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-I) (20), wątrobowy czynnik wzrostu (HGF) (37), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF) (64), interleukinę 8 (IL-8) (22), angiogenną (59) oraz wiele pomniejszych jak np. angiotenzyna, tromboksan.

1.2.1. Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) odgrywa istotną rolę w procesach proliferacji i różnicowania w organizmie rozwijającego się płodu oraz u osób dorosłych (82). Przypisuje mu się istotną rolę w procesie organogenezy, w tym i powstawania gałki ocznej (79, 84). bFGF jest silnym mitogenem dla wielu typów komórek, a zwiększoną ekspresję genu tej cytokiny obserwowano w przebiegu transformacji nowotworowej i progresji nowotworów (11). bFGF wydzielany jest w

dużych ilościach z komórek siatkówki pod wpływem miejscowego, ogniskowego urazu. To zjawisko uważane jest przez wielu za wyraz reakcji obronnej mającej na celu ochronę fotoreceptorów przed nadmierną ich stymulacją (13). Istotny wzrost poziomu bFGF obserwowano także po urazie rogówki (7). Sugeruje się parakrynnie oddziaływanie bFGF zawartego w cieple szklistym na komórki gałki ocznej (81), a brak bFGF wywołuje nasiloną apoptozę w komórkach włókien soczewki (82). Wyniki badań *in vitro* nad apoptozą komórek soczewki wskazują, że obecność bFGF blokuje apoptozę raczej poprzez aktywację jej inhibitorów aniżeli przez zablokowanie jej aktywatorów (82). Duża ekspresja zarówno bFGF jak i VEGF w komórkach nabłonka barwnikowego siatkówki umiejscowionego pomiędzy siatkówką a błoną naczyniową ma odgrywać kluczową rolę w powstawaniu patologicznych zmian siatkówki w przebiegu cukrzycy i innych schorzeń z nasilonym nowotworzeniem naczyń (52).

1.2.2 Łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF) jest niedawno wykrytym czynnikiem stymulującym nowotworzenie naczyń (38). Nie stwierdzono jego obecności w cieple szklistym zdrowych oczu ani w komórkach zdrowej siatkówki. Nie występuje także w komórkach siatkówki u chorych na cukrzycę, u których przeprowadzono fotokoagulację laserową zmian cukrzycowych oraz u chorych na cukrzycę, u których nie stwierdzono cech proliferacji naczyniowej. Jego podwyższony poziom obserwowano natomiast w gałkach ocznych, w których toczył się zaawansowany proces nowotworzenia naczyń siatkówki (39)

1.2.3. Wyniki badań klinicznych i eksperymentalnych nad wpływem **insulino-podobnego czynnika wzrostu (IGF-I)** na angiogenezę są kontrowersyjne. W badaniach przeprowadzonych u pacjentów z proliferacyjną retinopatią cukrzycową stwierdzono kilkakrotnie wyższe stężenia VEGF oraz statystycznie istotnie wyższe stężenie IGF-I w płynie ciała szklistego w porównaniu z grupą kontrolną. Nie obserwowano natomiast różnic w stężeniu obu czynników w surowicy krwi w obu grupach (67). Biologia kompleksu IGF-I/IGFBP jest bardzo skomplikowana, co sprawia że bardzo trudno jest określić ostatecznie aktywność IGF-I na podstawie pomiarów stężeń jedynie wolnej formy IGF-I (28) .

1.2.4. Wątrobowy czynnik wzrostu (HGF) jest czynnikiem pochodzącym z tkanki mezenchymalnej regulującym wzrost i migrację wielu typów komórek. Aktywność mitogenna tego czynnika wzrostu dla komórek śródbłonka jest większa niż takich czynników jak bFGF, VEGF, interleukina 1 (IL-1) czy interleukina 6 (IL-6) i silnie stymuluje angiogenezę (51, 53). Za kluczowy etap w nowotworzeniu naczyń w przebiegu retinopatii proliferacyjnej uważa się migrację komórek śródbłonka do przestrzeni macierzy okołonaczyniowej i rozpoczęcie ich proliferacji. HGF umożliwia rozproszenie komórek śródbłonka w macierzy kolagenowej. Z tego powodu HGF uważany jest za czynnik odgrywający istotną rolę w początkowych etapach angiogenezy (53).

Lista tych czynników ciągle się wydłuża (Tab 1.1.) jednak wyniki intensywnie prowadzonych badań wskazują na kluczową rolę **naczyniopochodnego śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF)** oraz naturalnego inhibitora angiogenezy – czynnika wzrostu pochodzącego z nabłonka barwnikowego (PEDF) jako głównych modulatorów rozwoju proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej (9, 73).

1.2.5. VEGF jest silnym aktywatorem nowotworzenia naczyń i czynnikiem zwiększającym ich przepuszczalność (10). VEGF jest mitogenem głównie dla komórek śródbłonka naczyniowego, ale i innych komórek nie zróżnicowanych. Zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* jego wytwarzanie jest regulowane miejscowym wysyceniem tkanek tlenem. Zwiększenie ekspresji genu VEGF, zwiększenie syntezy tej cytokiny, podobnie jak jej receptorów obserwowano w różnych typach komórek gałki ocznej badanych w warunkach hipoksji (3, 9, 27, 29). Receptory dla VEGF charakteryzujące się wysokim powinowactwem do tej cytokiny wykryto w błonach komórkowych komórek śródbłonka naczyniowego i komórek barwnikowych siatkówki (29, 63). Ich ekspresja podobnie jak samego VEGF wzrasta pod wpływem niskiego tkankowego stężenia tlenu (77). Wysokie stężenie VEGF stwierdzono m.in. w ciele szklistym u pacjentów z retinopatią w przebiegu nadciśnienia (2, 3), a także w modelach doświadczalnych schorzeń gałki ocznej przebiegających z lokalną hipoksją i nowotworzeniem naczyń. W badaniach

immunohistochemicznych siatkówki, wykazano, że ekspresja VEGF nie występuje w siatkówkach oczu zdrowych, pojawia się natomiast u chorych na cukrzycę i to proporcjonalnie do stopnia zaawansowania zmian naczyniowych (10, 21, 76). VEGF odgrywa swoją istotną rolę nie tylko w chwili inicjacji neowaskularyzacji, ale pozostaje aktywny przez cały okres angiogenezy doprowadzającej do powstania nowych naczyń. Najmniejszą generację tej cytokiny stwierdzono u pacjentów chorych na cukrzycę bez retinopatii (9).

1.2.6. Jednym z najsilniejszych czynników hamujących procesy neowaskularyzacji jest **czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego (ang *pigment epithelial derived factor* - PEDF)**. PEDF został wyosobniony po raz pierwszy z medium hodowli ludzkich komórek barwnikowych siatkówki jako czynnik pobudzający różnicowanie w kierunku neuronów hodowanych komórek retinoblastomy Y79 (80). W oczach ludzkich PEDF obecny jest także i wydzielany przez komórki fotoreceptorów oraz przez komórki wewnętrznych warstw siatkówki (36). PEDF jest także czynnikiem neurotropowym dla komórek ziarnistych mózgu, hamuje wzrost mikrogleju i młodych fibroblastów (41). PEDF wykazuje pewną strukturalną homologię z rodziną inhibitorów proteaz serynowych (tzw. serpin) i inhibitorami kaskady czynników krzepnięcia lecz nie wykazuje ich aktywności (63). W badaniach *in vitro* PEDF w sposób zależny od stężenia hamuje migrację komórek śródbłonka ze średnią skuteczną dawką (ED₅₀) 0,4 nM (która jest większa dla innych inhibitorów angiogenezy takich jak: angiostatyna, trombospondyna-1 i endostatyna), co umiejscawia go w gronie najsilniejszych inhibitorów neowaskularyzacji (19). PEDF blokuje migrację komórek śródbłonka indukowaną większością aktywatorów angiogenezy: VEGF, PDGF (płytkopochodnego czynnika wzrostu ang. *platelet derived growth factor*), interleukiną – 8 (IL-8), aFGF (kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *acid fibroblast growth factor*), bFGF (zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów ang. *basic fibroblast growth factor*) i kwasem lizofosfatydylowym. Pod wpływem PEDF dochodzi także do indukcji apoptozy aktywnie dzielących się komórek śródbłonka (19).

Aktywność anty-angiogenna PEDF jest wyrażona wybiórczo przeciwko nowotworzeniu naczyń. PEDF nie wpływa na dojrzałe, istniejące już naczynia. Tym niemniej w badaniach na myszach dowiedziono, że istnieje możliwość regresji

zmian powstałych w przebiegu nowotworzenia naczyń siatkówki po transfekcji (wprowadzeniu wektora wirusowego) genu PEDF do siatkówki lub po podaniu egzogennej białka PEDF do ciała szklistego (50).

Wykazano także iż PEDF obecny jest u ludzi w surowicy krwi w stężeniu ok.100nM (5µg/ml). Jest to stężenie dwukrotnie przekraczające koncentrację mogącą zahamować patologiczny rozrost naczyń w obrębie oka (62). Badania nad antyangiogennymi właściwościami PEDF wykazały, że wywiera on regulacyjny wpływ na powstawanie naczyń w siatkówce poprzez zahamowanie angiogenezy. PEDF może zatem wywierać wpływ zarówno na procesy neurotropowe jak i na nowotworzenie naczyń co istotnie zwiększa rolę przypisywaną temu białku w fizjologii gałki ocznej (41, 62).

Do innych czynników (słabiej niż PEDF) hamujących angiogenezę należy np. PF-4 (czynnik płytkowy 4 ang. *platelet factor 4*), który blokuje wiązanie czynników stymulujących angiogenezę z komórkami śródbłonna, trombospondyna należąca do glikoprotein macierzy zewnątrzkomórkowej wykazująca w badaniach *in vitro* zdolność hamowania wydłużania powstających naczyń (34), **IFN α (interferon alfa)**, którego kodujące DNA zawiera fragmenty będące sekwencjami antysensownymi dla mRNA bFGF, **TIMP (tkankowe inhibitory metaloproteinaz)** (ang. *tissue inhibitors of metalloproteinases*) blokujące interakcje pomiędzy komórkami śródbłonna a macierzą zewnątrzkomórkową (70).

Uważa się aktualnie, że zapoczątkowanie i progresja procesu angiogenezy wywołana jest funkcjonalną przewagą działania czynników stymulujących neowaskularyzację (głównie VEGF) nad aktywnością jej inhibitorów (kluczową rolę przypisuje się PEDF). W literaturze można znaleźć wiele opisów badań omawiających wzajemne relacje obu tych czynników w badanych tkankach oka i korelacji ich koncentracji z tendencją do neowaskularyzacji i występowania powikłań będących jej konsekwencją (3, 8, 9, 33, 44, 57, 73). Wyniki te potwierdzają koncepcję podkreślającą rolę zwiększenia stężenia VEGF i obniżenia PEDF w progresji neowaskularyzacji towarzyszącej np. retinopatii cukrzycowej. Dane te tworzą też podstawę do próby wykorzystania pomiaru tych stężeń jako wskaźników diagnostycznych oraz prognostycznych dla rozwoju retinopatii w przebiegu cukrzycy. Zaznaczyć należy jednak, że opisane wyniki uzyskano na podstawie badania stężeń VEGF i PEDF w materiale biologicznym uzyskanym po, lub w

trakcie okulistycznych zabiegów operacyjnych albo drogą innych zabiegów inwazyjnych na narządzie wzroku. Istnieje wciąż niewiele danych dokumentujących zmiany poziomu tych dwóch kluczowych dla regulacji procesu angiogenezy czynników we krwi pacjentów np. w przebiegu retinopatii cukrzycowej i omawiających korelację tych zmian z danymi klinicznymi dotyczącymi progresji lub ustępowania nowotworzenia naczyń oczu u pacjentów dotkniętych tą patologią.

2. Cele pracy:

1. Stwierdzenie możliwej korelacji pomiędzy stężeniami głównych czynników stymulujących oraz hamujących angiogenezę we krwi obwodowej a stanem klinicznego zaawansowania choroby u chorych na cukrzycę w różnym stopniu zaawansowania choroby
2. Porównanie tych wyników z wynikami uzyskanymi w grupie zdrowych ochotników
3. Próba określenia czy analiza wzajemnych relacji stężeń czynników pro- i antyangiogennych może służyć jako wskaźnik diagnostyczny lub prognostyczny dla rozwoju neowaskularyzacji.

3. Materiał i metody:

3.1. Materiał

Badania prowadzono wg protokołu zatwierdzonego przez Komisję Bioetyczną CMUJ zgodnie z zasadami dobrej praktyki klinicznej (GCP). Przed przystąpieniem do badań pacjenci wyrażali pisemną zgodę na wzięcie w nich udziału.

Badaniem objęto 52 osoby, (26.kobiet i 26 mężczyzn) 37 spośród nich stanowili chorzy na cukrzycę typu 2 pozostający w opiece Oddziału Okulistycznego Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im L. Rydygiera w Krakowie. Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych osób – ochotników dobranych pod względem płci i wieku.

3.1.1. Opis badanych grup chorych

Badania wykonano w czterech grupach osób w wieku pomiędzy 40 a 60 rokiem życia, z różnym stopniem zaawansowania choroby, a zwłaszcza zmian cukrzycowych w dnie oka, oraz w grupie kontrolnej dobranej pod względem płci i wieku. Ze względu na insulinooporność szczególną uwagę zwrócono na wartość indeksu masy ciała (BMI), który wg przyjętych zasad kwalifikacji nie przekraczał 30 kg/m². Pacjentów z rozpoznaniem lub wywiadem wskazującym na obecność zaawansowanej choroby niedokrwiennej serca lub kończyn wykluczono z badania. Ponieważ u większości pacjentów stwierdzano nadciśnienie tętnicze do badania kwalifikowano również pacjentów z nadciśnieniem rozpoznanym nie dalej jak przed pięcioma laty. Byli to chorzy otrzymujący standardowe leczenie (dieta, diuretyki, inhibitory konwertazy AI), o wartościach ciśnienia tętniczego niższych niż 130/80 mmHg - spełniających kryteria wyrównania ciśnienia w cukrzycy (zalecenia Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego za European Diabetes Policy Group). Mimo doniesień opisujących hamujący wpływ inhibitorów enzymu konwertującego na syntezę i wydzielanie czynników angiogennych takich jak naczyniowopochodny śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) czy zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) (14,30) pacjentów z nadciśnieniem otrzymujących inhibitory ACE lub/i diuretyki kwalifikowano do odpowiednich podgrup. Do grupy IV (cukrzyca typu 2

przebiegającej z retinopatią) do badania zakwalifikowano chorych leczonych insuliną (wg obowiązujących wskazań terapeutycznych), lecz nie dłużej niż 10 lat..

3.1.2. Podział pacjentów na grupy:

1. **GRUPA I** : Do grupy pierwszej (Grupa kontrolna) zakwalifikowano 15 osób (6 K i 9 M) **zdrowych** dobranych pod względem wieku i płci do grup badanych, o BMI mniejszym niż 30 kg/m², stężeniu glikowanej hemoglobiny (**HbAc1**) nie przekraczającym 6,5%
2. **GRUPA II** : Do grupy II **zakwalifikowano 12 pacjentów** (7 K i 5 M) z rozpoznaną **de novo cukrzycą typu 2**, współczynnika BMI mniejszym niż 30 kg/m², bez zmian w dnie oka, stężeniem hemoglobiny glikowanej (**HbAc1**) nie przekraczającym **8,0%**.
3. **GRUPA III**: Do grupy III zakwalifikowano 15 pacjentów (9 K i 6 M) z rozpoznaną **cukrzycą typu 2 trwającą od 5 do 10 lat**, bez retinopatii cukrzycowej, współczynnika BMI mniejszym niż 30 kg/m², stężeniem hemoglobiny glikowanej (**HbAc1**) nie przekraczającym w przebiegu terapii **8,0%**.
4. **GRUPA IV**: Do grupy IV zakwalifikowano 10 pacjentów (4.K i 6 M) z **retinopatią w przebiegu cukrzycy typu 2**, czasem trwania cukrzycy **od 5 do 10 lat**, współczynnikiem BMI mniejszym niż 30 kg/m², stężeniem hemoglobiny glikowanej (**HbAc1**) nie przekraczającym w przebiegu terapii **9,0%**.

3.2. Metody:

3.2.A. Badania okulistyczne

Po zebraniu wywiadu chorobowego ze zwróceniem szczególnej uwagi na wywiad rodzinny wykonano następujące badania:

3.2.A.1. Badanie ostrości wzroku do bliży i do dali

Badanie przeprowadzano dla każdego oka osobno, po starannym zasłonięciu oka niebadanego przesłonką umieszczoną w próbnej ramce okularowej. Do oceny ostrości wzroku do dali z odległości 5 metrów wykorzystywano tablice Snellena, a wynik podawano zgodnie z regułą Snellena w postaci ułamka dziesiętnego. Do

oceny ostrości wzroku do bliży wykorzystywano standaryzowany tekst z tablic Snellena do bliży. Badanie polegało na czytaniu każdym okiem osobno powyższego tekstu z odległości 30 cm. Wyniki wyrażano zgodnie z regułą Snellena.

3.2.A. 2. Pomiar ciśnienia śródgałkowego

Ciśnienie wewnątrzgałkowe obu oczu badano wstępnie palpacyjnie, następnie tonometrycznie przy pomocy tonometru aplanacyjnego (Zeiss, Niemcy). Wyniki przedstawiono jako wypadkowa średniej z trzech pomiarów wykonywanych podczas jednej wizyty w mmHg.

3.2.A. 3. Badanie przedniego odcinka gałki ocznej

Badanie prowadzono w świetle lampy szczelinowej ogniskując światło kolejno na przedniej powierzchni rogówki, na głębszych jej warstwach, tylnej powierzchni rogówki, na cieczy wodnistej komory przedniej oka, na powierzchni tęczówki, przedniej i tylnej powierzchni soczewki oraz na przedniej powierzchni ciała szklanego.

Podczas badania fizykalnego oceniano następujące elementy: lśnienie rogówki, gładkość powierzchni rogówki, przejrzystość rogówki, prawidłową wypukłość rogówki, wykonywano także badanie czucia rogówkowego dotykając rogówki końcem wacika we wszystkich kwadrantach. Badając komorę przednią oceniano jej głębokość w oświetleniu bocznym, przejrzystość cieczy wodnistej, wykonywano także gonioskopię w celu oceny kąta rogówkowo-tęczówkowego. Oceniano barwę tęczówki, położenie i kształt źrenicy, a także jej reakcje: na światło i zwężenia podczas konwergencji i akomodacji. Badanie soczewki prowadzono w lampie szczelinowej po podaniu środka rozszerzającego źrenicę (1% tropicamid) po uprzednim wykluczeniu obecności wąskiego kąta przesączenia przy pomocy gonioskopii. Przednią część ciała szklanego badano przy pomocy lampy szczelinowej.

3.2.A. 4. Badanie dna oka

Wziernikowanie dna oka wykonywano metodą pośrednią przy pomocy soczewki Volka.

3.2.A. 5. Angiografia fluorescencyjna

Po dożylnym podaniu badanemu 10% roztworu soli sodowej fluoresceiny i wypełnieniu przez nią naczyń układu tętniczego, włosniczkowego i żylnego siatkówki wykonywano seryjne zdjęcia dna oka przy pomocy kamery do badania dna oka (Topcorn, Japonia). W badaniu tym zwracano szczególną uwagę na obszary braku przepływu, zmiany o patologicznym unaczynieniu, nieprawidłowości naczyniowe (mikro i makro naczyniaki) i nowotworzenie naczyń.

Zmiany w dnie oka przedstawiono zgodnie z międzynarodową klasyfikacją ciężkości zmian retinopatii cukrzycowej w stworzonej na potrzeby badania skali punktowej.

Tabela 1. Międzynarodowa klasyfikacja ciężkości zmian retinopatii cukrzycowej (wg. American Academy of Ophthalmology. 10.2002)

Stadium zaawansowania choroby	Wynik badania oftalmoskopowego przy poszerzonej źrenicy	Punkty
Brak retinopatii	Brak zmian	0
Łagodna nieproliferacyjna retinopatia cukrzycowa	Obecne tylko mikrotętniaki	1-2
Umiarkowana nieproliferacyjna retinopatia cukrzycowa	Więcej zmian niż tylko mikrotętniaki, lecz bez cech ciężkiej nieproliferacyjnej retinopatii cukrzycowej	3-4
Ciężka nieproliferacyjna retinopatia cukrzycowa	Stwierdzenie którejkolwiek ze zmian: • więcej niż 20 ognisk krwotocznych we wszystkich 4 kwadrantach • "serdelkowate" przewężenia żył przynajmniej w 2 kwadrantach • nasilone nieprawidłowości mikrokrażenia w 1 kwadrancie • brak cech retinopatii proliferacyjnej	5-6
Proliferacyjna retinopatia cukrzycowa	Stwierdzenie jednej i więcej zmian: • Nowotworzenie naczyń • Ogniska krwotoczne przedsiatkówkowe lub w obrębie ciała szklanego a. wczesna faza: obecne nieliczne pętle nowo utworzonych naczyń wzdłuż arkad naczyń skroniowych lub na tarczy nerwu wzrokowego. b. faza aktywna: cechuje się rozległą neowaskularyzacją na tarczy nerwu wzrokowego lub w siatkówce obwodowej, która łączy się z mnogimi krwotokami, licznymi nieprawidłowościami naczyniowymi, obszarami braku perfuzji oraz z zaburzeniami szerokości naczyń żylnych c. postać ciężka: obecne zmiany jak w fazie aktywnej oraz proliferacje szkliskowo-siatkówkowe i trakcyjne odwarstwienie siatkówki	7-8 9-10 11-12

3.2.B. Badania biochemiczne:

Badania wykonano we współpracy z Zakładem Biochemii Klinicznej Katedry Biochemii Klinicznej CMUJ w Krakowie. Powtarzalność wyników badań i błąd między oznaczeniami oraz między używanymi testami był mniejszy niż 5-7%.

3.2.B.1. Badania stężeń czynników wpływających na angiogenezę.

3.2.B.1.a). Czynn timer wzrostu pochodzący z nabłnka barwnikowego (ang *pigment epithelial derived factor* ; PEDF)

Stężenie PEDF oznaczano w surowicy krwi. Pobraną krew po wykrzepianiu (ok.30 min w temp pokojowej) wirowano przez 15 min przy obrotach 1000xg. Po odwirowaniu surowicę przechowywano w temp. -70 st. C do chwili rozpoczęcia analizy. Oznaczenia wykonywano metodą immunoenzymatyczną przy użyciu zestawów o wysokiej czułości firmy Bio Products MD., wykonując oznaczenia w duplikacie i sporządzając do każdej serii oznaczeń krzywą standardową.. Zasada oznaczenia polegała na wykorzystaniu dwóch przeciwciał: pierwszego poliklonalnego przeciwciała specyficznego dla PEDF opłaszczzonego na mikropłytkce i drugiego poliklonalnego przeciwciała znakowanego biotyną. Po utworzeniu kompleksu antygen-przeciwciało-drugie przeciwciało nadmiar (frakcję niezwiązaną) usuwano drogą kilkukrotnego przemywania, a następnie wywoływano reakcję barwną przy użyciu streptawidyny sprzężonej z peroksydazą. Reakcję enzymatyczną zatrzymywano przez dodanie 1 N kwasu solnego. Natężenie barwy wprost proporcjonalne do badanego stężenia PEDF porównywano z krzywą standardową na czytniku mikropłytek firmy Lab-Systems przy długości fali 450 nm zgodnie ze wskazówkami producenta. Wyniki przedstawiono w ng/ml .

3.2.B.1. b). Naczyniowopochodny śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF).

Stężenie VEGF oznaczano w surowicy krwi. Pobraną krew po wykrzepianiu (ok.30 min w temp. pokojowej) wirowano przez 15 min przy 1000xg. Po odwirowaniu surowicę przechowywano w temp. -70 st. C do chwili rozpoczęcia analizy. Oznaczenia wykonywano metodą immunoenzymatyczną przy użyciu zestawów o wysokiej czułości firmy Bio Products MD., wykonując

oznaczenia w duplikacie i sporządzając do każdej serii oznaczeń krzywą standardową. Zasada oznaczenia polegała na wykorzystaniu dwóch przeciwciał: pierwszego poliklonalnego przeciwciała specyficznego dla VEGF opłaszczanego na mikropłytkę i drugiego poliklonalnego przeciwciała znakowanego peroksydazą chrzanową. Po utworzeniu kompleksu antygen-przeciwciała nadmiar przeciwciał usuwano drogą kilkukrotnego przemywania, a następnie wywoływano reakcję barwną przy użyciu tetrametylobenzydyny w obecności nadtlenu wodoru. Reakcję enzymatyczną zatrzymywano przez dodanie 2 N kwasu siarkowego. Natężenie barwy wprost proporcjonalne do badanego stężenia VEGF mierzono wspólnie z krzywą standardową na czytniku mikropłytek firmy Lab-Systems przy długości fali 450 nm.

Czułość użytej metody wynosi 5 pg/ml, a precyzja wyrażona jako współczynnik zmienności (cv%) wynosi ok.5% w obrębie oznaczenia i ok.7% między oznaczeniami.

3.2.B.1. c). Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *basic fibroblast growth factor*.; bFGF)

Stężenie bFGF oznaczano w osoczu cytrynianowym otrzymywanym z krwi żyłnej (1 część 0,11mol/l cytrynianu sodu i 9 części krwi). Cytrynianową krew wirowano przez 15 min przy obrotach 1000xg. Po odwirowaniu zamrożone osocze przechowywano w temp. -70 st. C do chwili rozpoczęcia analizy. Oznaczenia wykonywano metodą immunoenzymatyczną przy użyciu zestawów o wysokiej czułości firmy R&D systems, wykonując oznaczenia w duplikacie i sporządzając do każdej serii oznaczeń krzywą standardową. Zasada oznaczenia polegała na wykorzystaniu dwóch przeciwciał: pierwszego poliklonalnego przeciwciała specyficznego dla bFGF opłaszczanego na mikropłytkę i drugiego poliklonalnego przeciwciała znakowanego fosfatazą alkaliczną. Po utworzeniu kompleksu antygen-przeciwciała nadmiar przeciwciał usuwano drogą kilkukrotnego przemywania. Następnie dodawano NADPH jako substratu kofaktora dla pomiaru aktywności fosfatazy alkalicznej. Ze względu na modyfikację metody (wysoka czułość) reakcję barwną wywoływano przy pomocy enzymatycznego odczynnika wzmacniającego wg wskazówek producenta zestawu. Reakcję enzymatyczną zatrzymywano przez dodanie 2 N kwasu siarkowego. Natężenie barwy wprost proporcjonalne do badanego

stężenia bFGF mierzono wspólnie z krzywą standardową na czytniku mikroplitek firmy Lab-Systems (Australia) przy długości fali 490 nm.

Czułość użytej metody wynosi 0,20 pg/ml, a precyzja wyrażona jako współczynnik zmienności (cv%) wynosi ok.10% w obrębie oznaczenia i ok.14% między oznaczeniami.

3.2.B.1. d). Oznaczanie poziomu Insuliny

Stężenie insuliny oznaczano w surowicy krwi pobranej na czczo. Pobraną krew po wykrzepianiu (ok.30 min) wirowano przez 15 min przy obrotach 1000xg. Po odwirowaniu surowicę przechowywano w temp. -70 st. C do chwili rozpoczęcia analizy. Oznaczenia wykonywano metodą immunoradiometryczną (*IRMA-immunoradiometric assay*) używając zestawów odczynnikowych firmy BioSource (USA), wykonując każde oznaczenie w duplikacie i sporządzając dla każdej serii oznaczeń krzywą standardową. Użyty test wykorzystuje próbki opłaszczone specyficznym dla insuliny monoklonalnym przeciwciałem (brak reakcji krzyżowych z proinsulinami) oraz drugie monoklinalne przeciwciało znakowane J¹²⁵. Po kilkukrotnym przepłukaniu (oddzielenie frakcji związanej od nie związanej) radioaktywność próbki odzwierciedlała stężenie badanego antygenu. Radioaktywność badanych próbek mierzono na liczniku gamma firmy Packard (USA) z równolegle wykonywaną krzywą standardową.

Czułość użytego testu wynosi 1 µU/ml, a precyzja wyrażona jako współczynnik zmienności (cv%) wynosi ok.2% w obrębie oznaczenia i ok.6% między oznaczeniami.

3.2.B.2. Podstawowe badania biochemiczne

U wszystkich pacjentów wykonano standardowymi metodami badanie moczu, morfologii, badania enzymatyczne wątroby, glikemię na czczo, lipidogram.

Ponadto u wszystkich chorych wykonano badanie hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}) metodą immunoturbimetryczną (analizator Cobas Integra 400 plus, Roche Diagnostics) Jako wartość referencyjną zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego przyjęto wartość ≤ 6.5%

3.2.C. Metody statystyczne

W analizie statystycznej zastosowano testy nieparametryczne dla porównania wyników badań w analizowanych grupach:

Test Kruskal-Wallisa (ANOVA) dla porównania ze sobą wszystkich czterech badanych grup. W przypadku stwierdzenia tym testem występowania różnic statystycznie znamiennych pomiędzy porównywanymi grupami przeprowadzono test wielokrotnych porównań wszystkich możliwych par grup testem Manna-Whitneya.

Współzależność pomiędzy badanymi parametrami przeprowadzono analizując współczynniki korelacji:

- korelacji rang Spearmana w przypadkach, gdy jedna zmienna miała charakter rangowy
- korelacji liniowej Pearsona, gdy obie korelowane zmienne miały charakter ilościowy.

Przeprowadzono również analizę wielowymiarową tworząc modele kanoniczne przedstawiające współzależności pomiędzy dwoma rozłącznymi zbiorami zmiennych.

Jako statystycznie znamienne przyjęto te wyniki testów, dla których poziom istotności był mniejszy lub równy 0,05 czyli we wnioskowaniu dopuszczono 5% błąd I rodzaju.

Uzyskane wyniki przedstawiono w formie tabel zawierających parametry rozkładu:

$\bar{x}$ - średnia arytmetyczna

SD – odchylenie standardowe

Min – wartość najmniejsza

Me – mediana wartość środkowa

Max – wartość największa

Dla wyników nieistotnych statystycznie przyjęto oznaczenie NS (Nieistotne Statystycznie)

Statystyczną istotność prezentowano podając wprost poziom p lub poprzez oznaczenie:

* $p \leq 0,05$

** $p \leq 0,01$

*** - $p \leq 0,001$

Uzyskane wyniki prezentowano również za pomocą wykresów. W pracy wykorzystano wykresy punktowe dla zobrazowania współzależności pomiędzy dwiema zmiennymi oraz wykresy słupkowe oparte na wartościach średnich z „wąsami” obrazującymi odchylenie standardowe (przedział $x \pm SD$).

4. Wyniki badań

Materiał badawczy stanowiło 52 pacjentów: 37 badanych chorowało na cukrzycę zaś 15 stanowiło grupę kontrolną – były to osoby zdrowe.

Pacjentów podzielono na cztery grupy:

Grupa I – grupa kontrolna (n=15)

Grupa II – chorzy na cukrzycę niedawno rozpoznaną (do 0,5 roku wstecz) bez retinopatii (n=12)

Grupa III – chorzy na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat bez retinopatii (n=15)

Grupa IV – chorzy na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat z retinopatią. (n=10)

4.1. Charakterystyka badanych grup

W tabeli 2. przedstawiono charakterystykę badanych grup pod względem płci, wieku i BMI

Tab. 2. Charakterystyka badanych grup pod względem płci, wieku i BMI

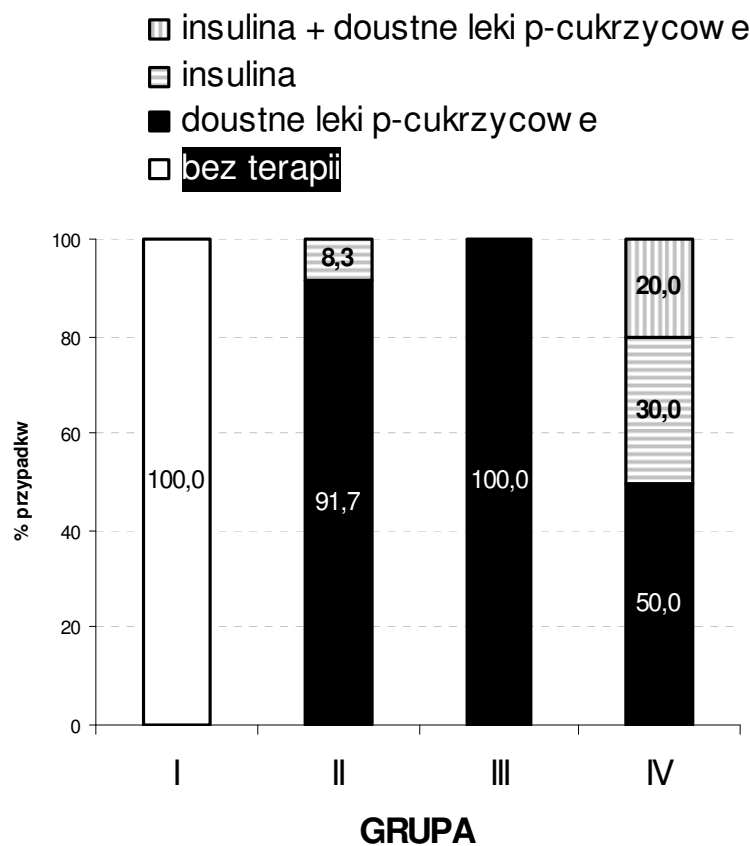
Grupa	Płeć		Wiek		BMI	
	Kobiety n, [%]	Mężczyźni n, [%]				
			(średnia) Lata	+/-SD	Średnia	+/-SD
I (n=15)	6 (40)	9 (60)	54,9	3,7	23,5	2,2
II (n=12)	7 (58,3)	5 (41,7)	55,6	3,4	26,8**	2,5
III (n=15)	9 (60)	6 (40)	52,0	5,3	25,7***	3,3
IV (n=10)	4 (40)	6 (60)	55,1	4,3	27,1*/****	2,8

Odnotowano znamienne statystycznie różnice w BMI pomiędzy grupą kontrolną (I) a pozostałymi grupami badanych chorych na cukrzycę (grupy II-IV) $p < 0,008^*$ (grupa I vs II – $p < 0,032^{**}$, grupa I vs III – $p < 0,006^{***}$, grupa I vs IV – $p < 0,005^{****}$). Nie odnotowano takich różnic pomiędzy grupami chorych na cukrzycę w różnym stopniu zaawansowania.

U chorych na cukrzycę w leczeniu poza postępowaniem dietetycznym stosowano doustne leki przeciwcukrzycowe, insulinę oraz kombinację doustnych leków przeciwcukrzycowych i insuliny. W grupie II (n=12) doustne leki przeciwcukrzycowe stosowano u 11 pacjentów, u jednego insulinę, w III (n=

15) wszyscy pacjenci otrzymywali doustne leki przeciwcukrzycowe, w grupie IV (n=10) u 5 pacjentów stosowano doustne leki przeciwcukrzycowe, u 3 insulinoterapię, a u 2 leczenie skojarzone (Ryc.1.)

Ryc.1 Leczenie przeciwcukrzycowe stosowane w poszczególnych grupach badanych



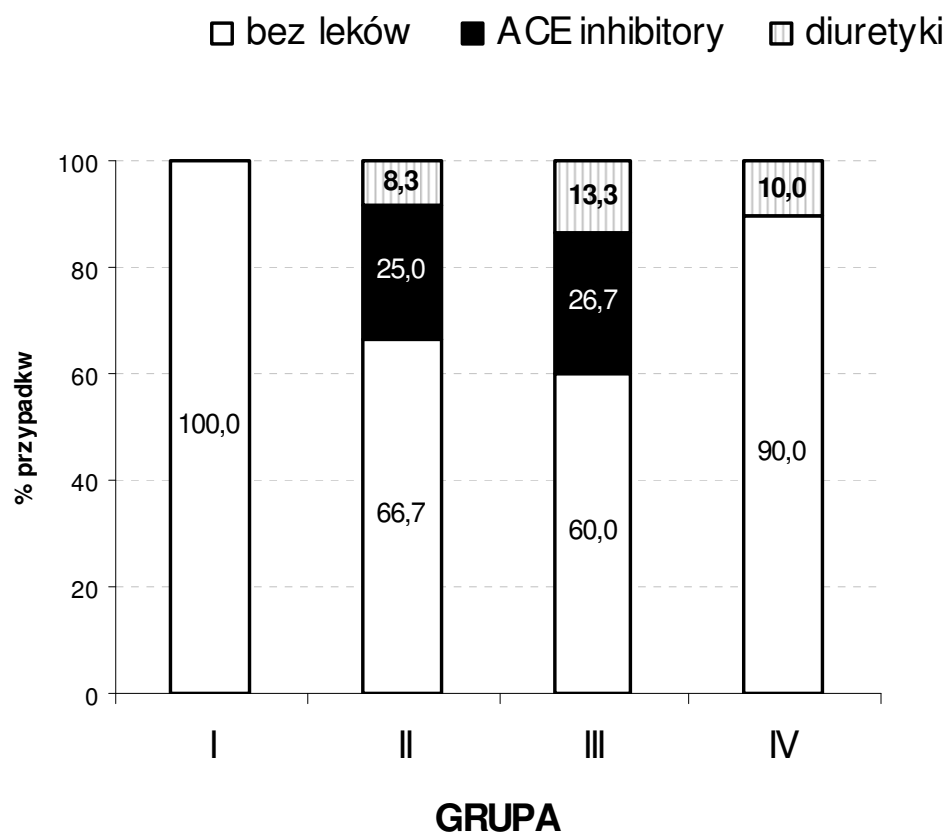
Tab 3. Wartości ciśnienia tętniczego (skurczowego i rozkurczowego),
znamienności statystyczne w badanych grupach.

Grupa	n	RR skurczowe					Kruskal-Wallis ANOVA	n	RR rozkurczowe					Kruskal-Wallis ANOVA
		Mean	SD	min	Me	max			Mean	SD	min	Me	max	
I	15	117,9	5,0	110	120	125	P<0,05	15	73,9	4,5	70	72,5	80	p<0,003
II	12	122,5	5,0	110	125	130		12	80,0	4,3	70	80,0	85	
III	15	120,3	6,7	105	120	130		15	79,7	4,4	70	80,0	90	
IV	10	123,5	5,3	115	125	130		10	78,5	2,4	75	80,0	80	

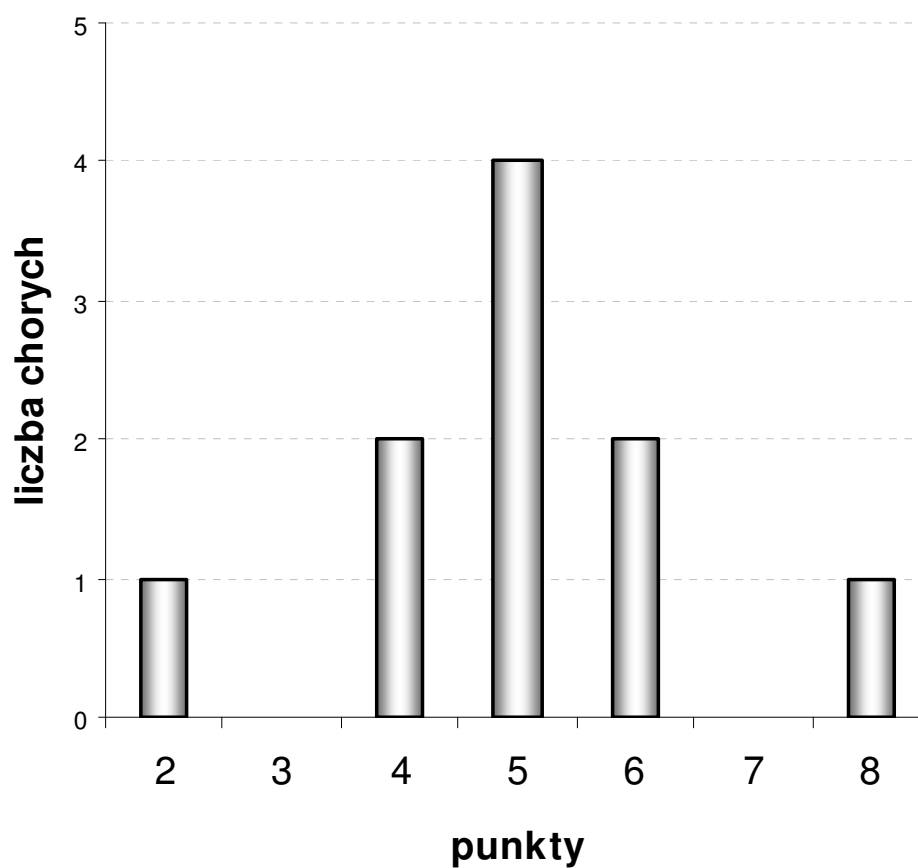
Różnice w wartości ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego pomiędzy grupą kontrolną (I) a chorymi na cukrzycę (grupy II-IV) były istotne statystycznie ($p<0,05$ i $p<0,003$). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w wartościach ciśnienia skurczowego rozkurczowego pomiędzy grupami chorych na cukrzycę (II-IV).

U chorych na nadciśnienie tętnicze stosowano takie grupy leków hipotensyjnych jak : inhibitory konwertazy A1 (ACE-inhibitory) i diuretyki. W grupie II (n=12) na nadciśnienie chorowało 5 osób. U jednej stosowano diuretyki, u pozostałych 4 ACE inhibitory. W grupie III na nadciśnienie chorowało 6 osób. U 2 osób stosowano diuretyki, u pozostałych 4 ACE inhibitory. W grupie IV na nadciśnienie chorowała 1 osoba. Stosowano u niej diuretyki.

Ryc. 2. Stosowana terapia przeciw nadciśnieniu tętniczemu w badanych grupach.



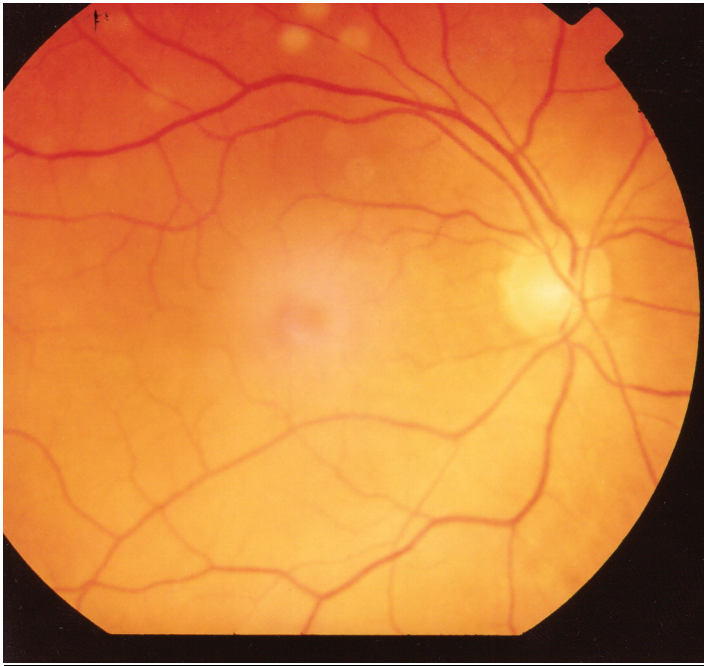
Ryc. 3. Ocena zmian w siatkówce w skali punktowej w grupie IV - chorych na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat z retinopatią. (n=10). Przedstawiono liczbę pacjentów, którzy uzyskali wynik 2, 4, 5, 6 i 8 punktów w ocenianej skali.



Tab. 4. Ocena zmian w siatkówce w skali punktowej w grupie IV – u chorych na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat z retinopatią. (n=10).

Punkty	2	3	4	5	6	7	8
Liczba chorych (n)	1	0	2	4	2	0	1

Ryc.4. Prawidłowy obraz dna oka.



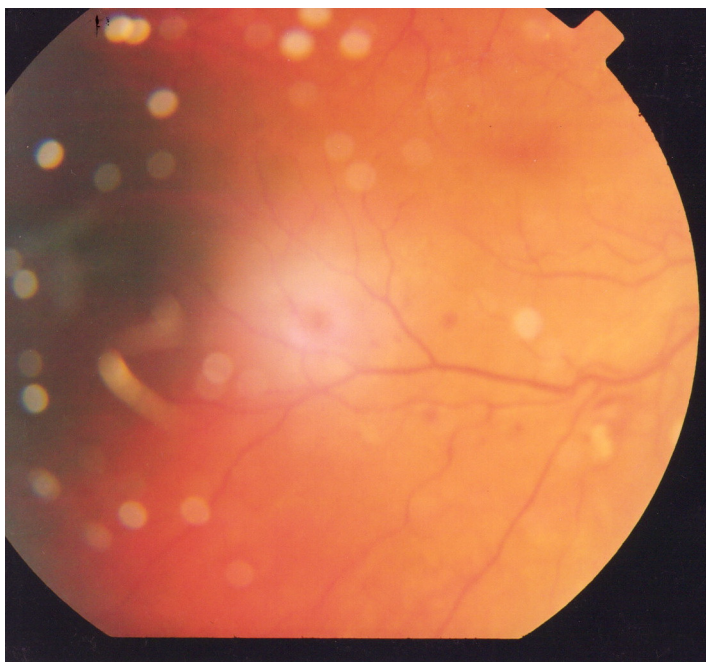
Ryc 5 Obraz dna oka z mikrotetniakami w łagodnej nieproliferacyjnej retinopatii cukrzycowej



Ryc 6. Obraz dna oka w umiarkowanej nieproliferacyjnej retinopatii cukrzycowej



Ryc 7. Obraz dna oka w ciężkiej nieproliferacyjnej retinopatii cukrzycowej



Ryc 8. Obraz dna oka w ze zmianami w proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej



4.2. Wyniki badań laboratoryjnych

4.2.1. Wyniki badania morfologii krwi obwodowej.

Nie stwierdzono istotnych różnic w wynikach badań morfologicznych krwi obwodowej pomiędzy badanymi grupami. Jedynym istotniejszym odchyleniem od normy był wzrost odsetka neutrofilów obojętnochłonnych, który występował u 70% chorych z retinopatią (grupa IV). W pozostałych grupach wzrost ten nie dotyczył tak znacznego odsetka pacjentów. (Tab. 23 Aneksu)

4.2.2. Wyniki badań parametrów biochemicznych opisujących cukrzycę

Tab.5 Charakterystyka parametrów biochemicznych opisujących cukrzycę w badanych grupach chorych.

Rodzaj badania	GRUPA							
	I (n=15)		II (n=12)		III (n=15)		IV (n=10)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
HbA1c	3,95	1,47	4,06	1,55	4,16	1,66	6,22	1,89
Glikemia na czczo	5,24	0,42	6,71	1,56	7,11	1,21	8,02	3,05
Stężenie insuliny na czczo	7,06	2,38	9,29	2,89	10,37	6,27	10,57	5,45
Cholesterol całkowity	4,86	0,31	4,88	1,83	5,39	1,31	5,61	0,98
Triglicerydy	1,38	0,61	1,85	1,35	1,42	0,75	1,60	0,54
HDL	1,46	0,42	1,18	0,42	1,26	0,32	1,52	0,49
LDL	2,98	0,45	2,64	0,94	3,51	1,04	3,48	0,83

Odnotowano znamienne statystycznie różnice w stężeniu glukozy pomiędzy grupą 1 a chorymi na cukrzycę ($p<0,001$). Stężenie endogennej insuliny nie różniło się istotnie pomiędzy badanymi grupami, jednak stwierdzono jego dodatnią korelację z długością trwania cukrzycy (wyrażoną przynależnością do poszczególnych grup), a także zaawansowaniem zmian w dnie oka w obrębie grupy chorych z retinopatią. Stężenie cholesterolu całkowitego w surowicy krwi było znamienne statystycznie wyższe w grupie IV w porównaniu z grupą I ($p<0,018$) i z grupą II ($p<0,05$), a stężenie frakcji LDL cholesterolu całkowitego było znamienne statystycznie wyższe w grupie IV w porównaniu z grupą I ($p<0,05$) i grupą II ($p<0,038$), a także w grupie III w porównaniu z grupą II

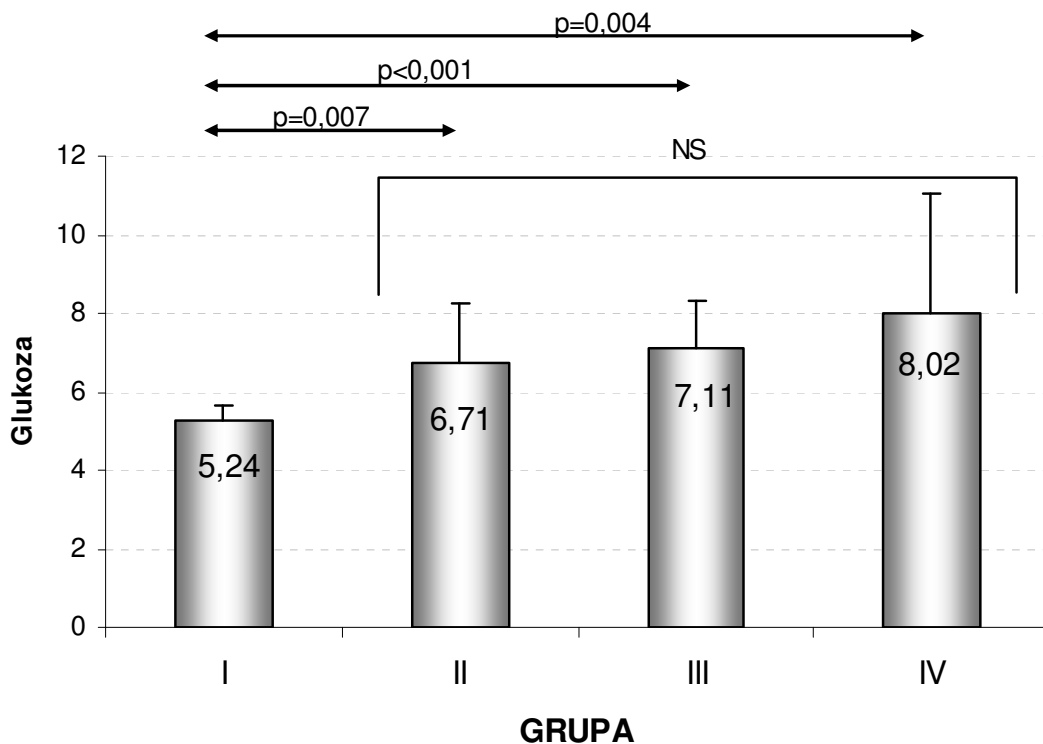
($p < 0,034$). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu endogennej insuliny na czczo, triglicerydów i frakcji HDL cholesterolu, w surowicy krwi pomiędzy grupą o kontrolną a chorymi na cukrzycę, ani pomiędzy poszczególnymi grupami chorych na cukrzycę.

Stężenie glukozy różniło się statystycznie istotnie pomiędzy grupą I a chorymi na cukrzycę $p < 0,001$ (grupy II, III i IV), natomiast stężenie glukozy pomiędzy poszczególnymi grupami chorych na cukrzycę nie różniło się istotnie (Tab.6, Ryc.9).

Tab.6. Stężenie glukozy w surowicy krwi w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)

grupa	n	GLUKOZA					Kruskal-Wallis ANOVA
		Średnia	SD	Min	Me	max	
I	15	5,24	0,42	4,24	5,40	5,60	I vs II, I vs III, I vs IV $p < 0,001$
II	11	6,71	1,56	4,90	6,70	9,42	
III	14	7,11	1,21	5,10	7,26	9,63	
IV	10	8,02	3,05	4,35	7,10	14,51	

Ryc.9. Stężenie glukozy w surowicy krwi w badanych grupach

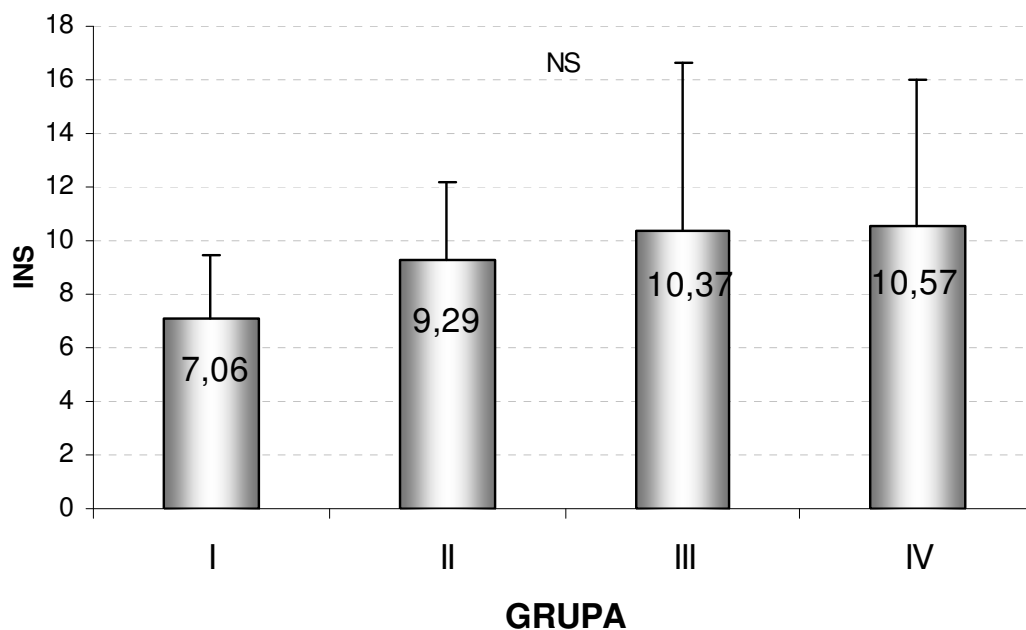


Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu endogennej insuliny na czczo pomiędzy badanymi grupami (Tab.7, Ryc.10).

Tab.7. Stężenie endogennej insuliny w surowicy krwi w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)

grupa	n	INS					Kruskal-Wallis ANOVA
		Średnia	SD	min	Me	max	
I	15	7,06	2,38	3,5	7,3	11,3	NS
II	12	9,29	2,89	4,8	9,3	14,1	
III	15	10,37	6,27	3,5	8,3	22,7	
IV	10	10,57	5,45	4,8	8,9	21,2	

Ryc.10. Stężenie endogennej insuliny w surowicy krwi w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)

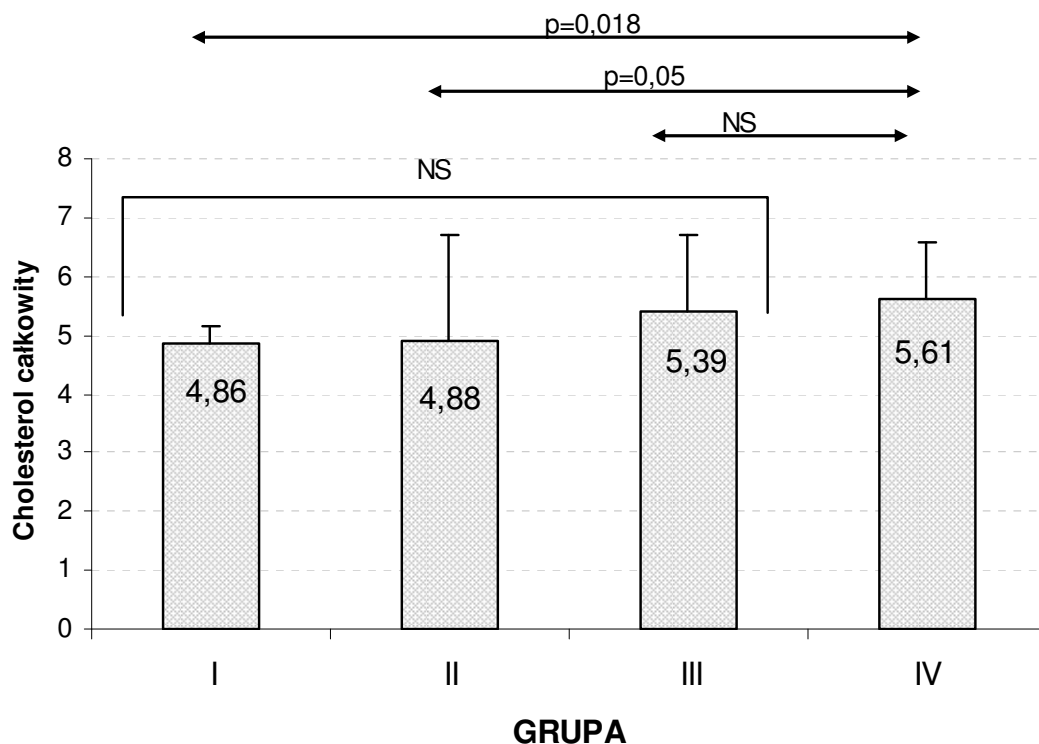


Stężenie cholesterolu całkowitego w surowicy krwi było znamienne statystycznie wyższe w grupie IV w porównaniu z grupą I ($p < 0,018$) i z grupą II ($p < 0,05$) (Tab.8, Ryc.11).

Tab.8. Stężenie cholesterolu całkowitego w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)

Grupa	n	cholesterol całkowity					Kruskal-Wallis ANOVA
		Średnia	SD	Min	Me	max	
I	15	4,86	0,31	4,43	4,73	5,20	IV vs I: $p < 0,018$ IV vs II $p < 0,05$
II	12	4,88	1,83	2,73	4,58	10,00	
III	15	5,39	1,31	3,33	5,20	9,23	
IV	10	5,61	0,98	4,35	5,33	7,55	

Ryc.11. Stężenie cholesterolu całkowitego w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)

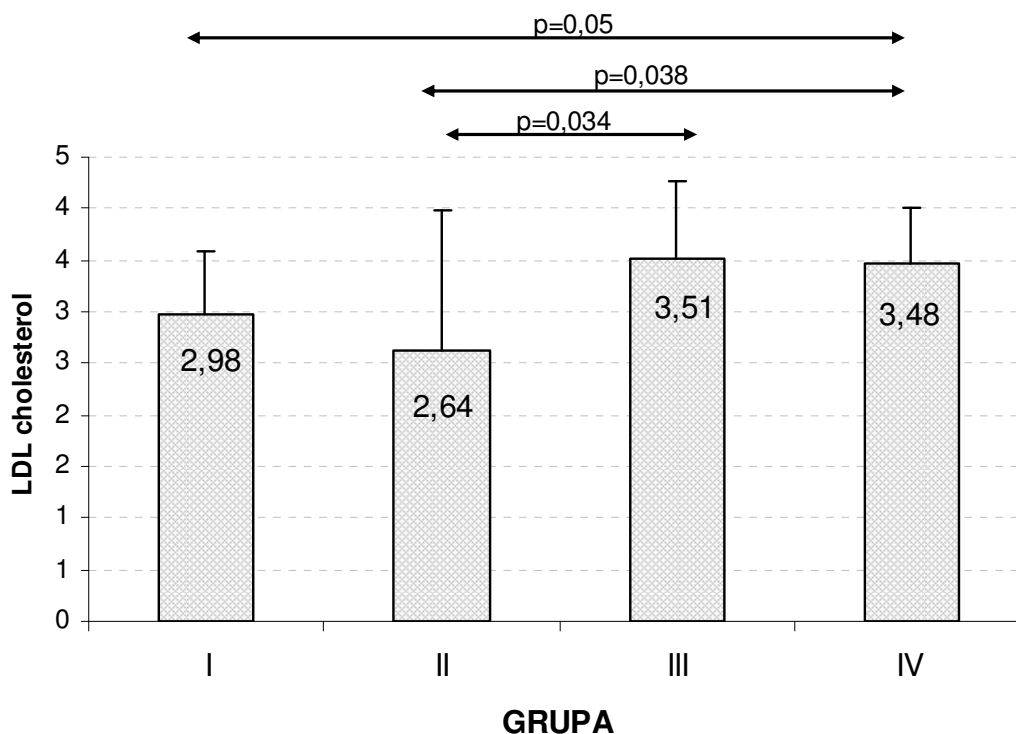


Stężenie frakcji LDL cholesterolu całkowitego w surowicy krwi było znamienne statystycznie wyższe w grupie IV w porównaniu z grupą I ($p < 0,05$) i grupą II ($p < 0,038$), a także w grupie III w porównaniu z grupą II ($p < 0,034$) (Tab. 9, Ryc.12).

Tab.9. Stężenie frakcji LDL cholesterolu w surowicy krwi w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)

Grupa	n	LDL					Kruskal-Wallis ANOVA IV vs I: $p < 0,05$ IV vs II: $p < 0,038$, II vs II: $p < 0,034$
		Średnia	SD	min	Me	max	
I	15	2,98	0,45	1,98	3,06	3,40	
II	12	2,64	0,94	1,39	2,36	4,70	
III	15	3,51	1,04	1,98	3,30	6,08	
IV	10	3,48	0,83	2,08	3,36	5,06	

Ryc.12. Stężenie frakcji LDL cholesterolu w surowicy krwi w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)

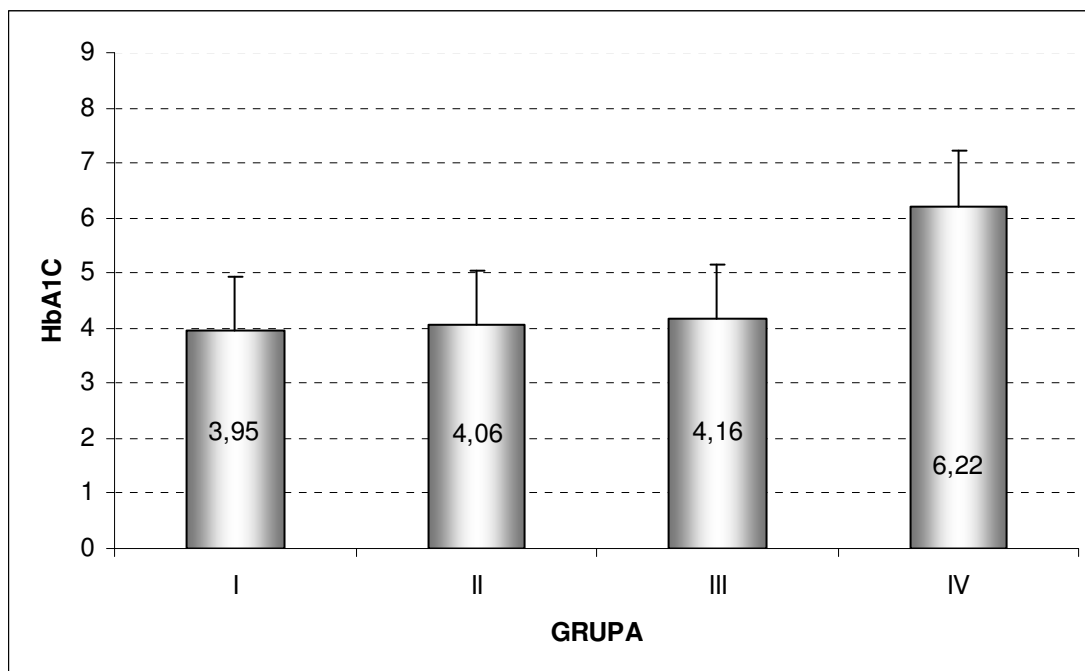


Stężenie hemoglobiny glikowanej było znamienne statystycznie wyższe w grupie IV (chorych na cukrzycę z retinopatią) w porównaniu z grupą I (kontrolną) ($p<0,011$), z grupą II (chorzy na cukrzycę *de novo*) ($p<0,017$) i III (cukrzyca bez retinopatii) ($p<0,014$) Tab.10, Ryc.13).

Tab.10. Stężenie hemoglobiny glikowanej (HbA1c) w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)

Grupa	n	HG					Kruskal-Wallis ANOVA
		Średnia	SD	Min	Me	Max	
I	15	3,95	1,47	2,16	3,70	6,00	IV vs I: $p<0,011$
II	12	4,06	1,55	2,06	3,59	7,50	IV vs II: $p<0,017$
III	15	4,16	1,66	2,06	3,82	7,94	IV vs III: $p<0,014$
IV	10	6,22	1,89	2,95	6,50	9,00	

Ryc. 13. Stężenie hemoglobiny glikowanej (HbA1c) w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)



4.2.3. Wyniki badań innych parametrów biochemicznych w badanych grupach.

Odnotowano istotną statystycznie różnicę w stężeniu AIAT w surowicy krwi pomiędzy grupą kontrolną (I) a grupą chorych na cukrzycę rozpoznaną *de novo* (II) ($p=0,044$) oraz grupą kontrolną (I) a grupą chorych na cukrzycę z retinopatią (IV) ($p=0,011$) (Tab. 11).

Tab. 11. Wyniki badania stężenia AIAT w badanych grupach.

Rodzaj badania	GRUPA							
	I (n=15)		II (n=12)		III (n=15)		IV (n=10)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
AIAT	24,4	11,1	29,8	15,1	34,5	21,4	32,7	16,2

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu AspAT, bilirubiny całkowitej, białka całkowitego, alfa1, alfa2, beta i gamma globulin w surowicy krwi pomiędzy grupą kontrolną a chorymi na cukrzycę, ani pomiędzy poszczególnymi grupami chorych na cukrzycę (Tabele załączono w aneksie pracy).

4.2.4. Wyniki analizy stężeń badanych cytokin o działaniu modyfikującym angiogenezę

W toku pracy obserwowano większe stężenia działającej silnie proangiogennie cytokiny VEGF u chorych na cukrzycę trwającą ponad 5 lat przebiegającą z zaawansowanymi zmianami w dnie oka o typie retinopatii cukrzycowej (grupa IV) niż w pozostałych badanych grupach. Różnica stężeń VEGF nie osiągnęła znamienności statystycznej prawdopodobnie ze względu na duży rozrzut wyników i małe liczebności badanych grup. Mimo to wykazano istotne statystycznie korelacje pomiędzy stężeniem VEGF a parametrami opisującymi cukrzycę (wartość glikemii na czczo, stężenie cholesterolu całkowitego, frakcji LDL cholesterolu i stężenie glikowanej hemoglobiny), ponadto stężenie VEGF korelowało dodatnio z długością trwania cukrzycy (wyrażoną przynależnością chorych do różnych grup) oraz z zaawansowaniem

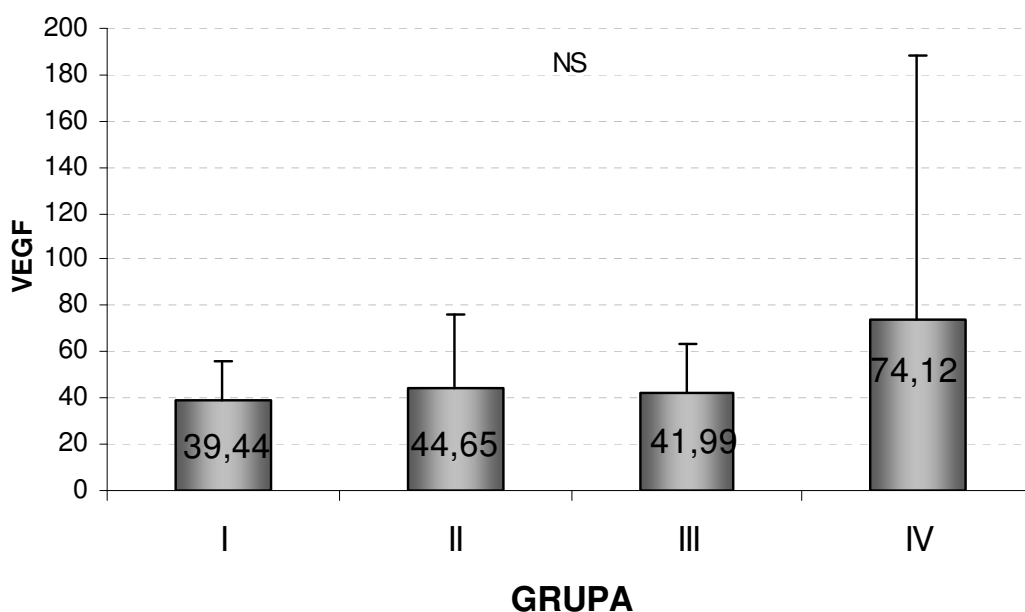
zmian w dnie oka u chorych z retinopatią cukrzycową. Stężenia cytokiny PEDF działającej hamująco na procesy angiogenezy nie różniły się istotnie pomiędzy badanymi grupami chorych na cukrzycę, a także w porównaniu z grupą kontrolną. Wykazano natomiast ujemną korelację stężenia PEDF z długością trwania cukrzycy i stopniem zaawansowania retinopatii. Zaobserwowano także tendencję do zmniejszającego się w miarę długości trwania cukrzycy i zaawansowania retinopatii stężenia bFGF – innej cytokiny, która pełni rolę silnego stymulatora angiogenezy. Stwierdzono ujemną korelację stężenia bFGF z długością trwania cukrzycy i zaawansowaniem zmian w dnie oka. Stężenia dwóch proangiogennych cytokin VEGF i bFGF wykazywały dodatnią korelację liniową u osób zdrowych (grupa kontrolna), która nie występowała u chorych na cukrzycę. Ponadto stosunek stężeń VEGF/bFGF był istotnie statystycznie wyższy u chorych na cukrzycę z retinopatią (grupa IV) w porównaniu z grupą chorych na cukrzycę rozpoznaną niedawno (grupa II), a także w grupach II i IV rozpatrywanych razem w porównaniu z grupą chorych na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat bez retinopatii (grupa III). W przeprowadzonej analizie modeli kanonicznych stwierdzono, że spośród badanych cytokin PEDF posiada największy wpływ na wartości stężeń wybranych parametrów charakteryzujących zaburzenia gospodarki węglowodanowej i lipidowej u osób zdrowych - HbA_{1c}, endogennej insuliny (współzależność wprost proporcjonalna) i cholesterolu całkowitego (zależność odwrotnie proporcjonalna). W analizie drugiego modelu kanonicznego stwierdzono największy wpływ VEGF na wybrane parametry świadczące o stopniu zaawansowania cukrzycy i miażdżycy u chorych na cukrzycę - HbA_{1c}, endogenna insulina, cholesterol całkowity i przynależność do grupy chorych z długotrwałą cukrzycą i retinopatią (współzależność wprost proporcjonalna). Podobny, lecz mniejszy wpływ na powyższe parametry wykazywał PEDF, natomiast w przypadku bFGF współzależność była odwrotnie proporcjonalna.

Stwierdzono nieznamiennej statystycznie (ze względu na duży rozrzut wyników) tendencję do większego stężenia VEGF w surowicy krwi osób z zaawansowanymi zmianami o typie retinopatii cukrzycowej w dnie oczu (grupa IV) (Tab.12, Ryc.14).

Tab. 12. Stężenie VEGF w surowicy krwi w badanych grupach. Średnia $\pm$ SD.

Grupa	n	VEGF					Kruskal-Wallis ANOVA
		Mean	SD	min	Me	max	
I	15	39,44	16,21	22,00	37,39	80,64	NS
II	12	44,65	31,09	14,01	35,38	107,32	
III	15	41,99	21,88	14,01	38,06	78,60	
IV	10	74,12	113,81	12,68	39,07	394,89	

Ryc.14. Stężenie VEGF w surowicy krwi w badanych grupach

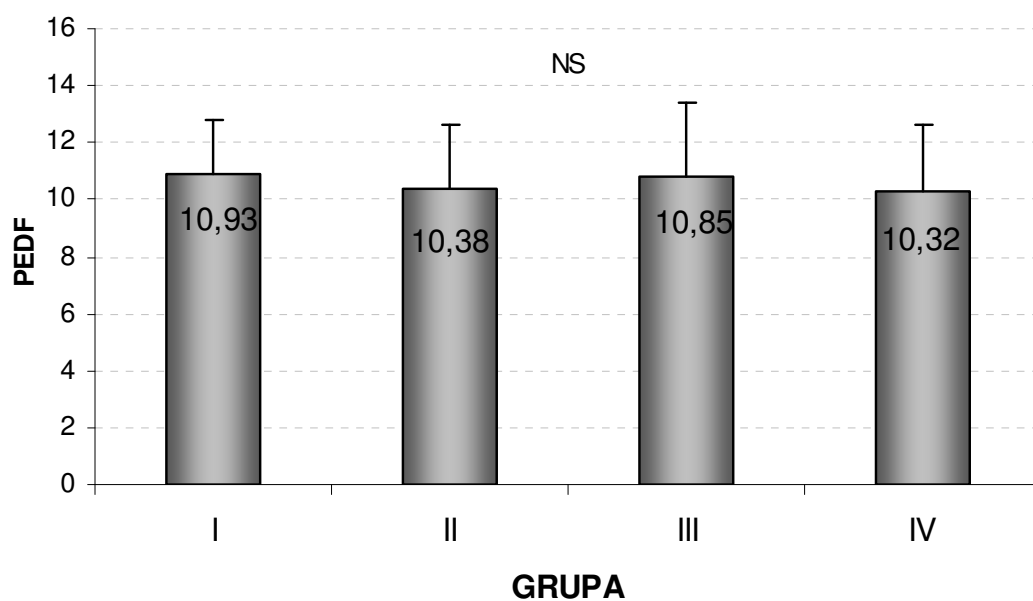


Nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu PEDF pomiędzy badanymi grupami (Tab.13, Ryc.15).

Tab.13. Stężenie PEDF w surowicy krwi w badanych grupach. Średnia $\pm$ SD.

Grupa	n	PEDF					Kruskal-Wallis ANOVA
		Średnia	SD	min	Me	Max	
I	15	10,93	1,83	8,08	10,62	14,49	NS
II	12	10,38	2,23	5,95	10,25	14,26	
III	15	10,85	2,57	6,08	11,15	14,83	
IV	10	10,32	2,31	7,36	9,93	15,34	

Ryc 15. Stężenie PEDF w surowicy krwi w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)

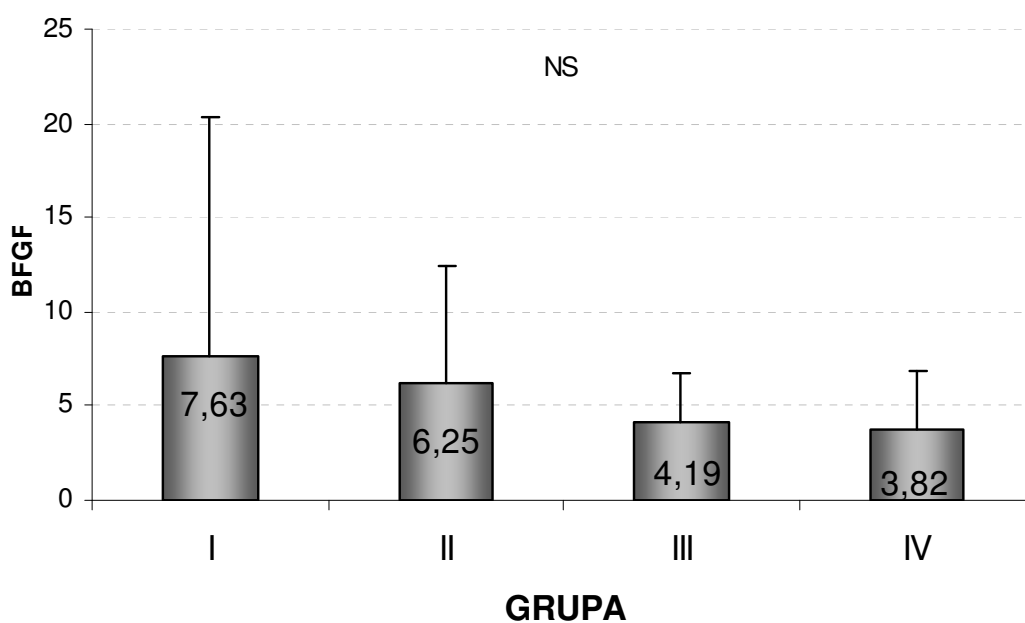


Stwierdzono nieznamienną statystycznie różnicę i obniżenie stężenia bFGF w surowicy krwi pacjentów z zaawansowanymi zmianami cukrzycowymi na dnie oczu (grupa IV) (Tab.14, Ryc.16).

Tab. 14. Stężenie bFGF w surowicy krwi w badanych grupach

Grupa	N	BFGF					Kruskal-Wallis ANOVA
		Mean	SD	min	Me	max	
I	15	7,63	12,76	0,68	3,27	50,76	NS
II	12	6,25	6,17	1,07	4,19	20,03	
III	15	4,19	2,59	0,81	4,00	9,33	
IV	10	3,82	3,09	0,86	2,78	8,59	

Ryc. 16. Stężenie bFGF w surowicy krwi w badanych grupach



Tab.15. Korelacja pomiędzy stężeniami cytokin wpływających na angiogenezę a zaawansowaniem cukrzycy wyrażonym przynależnością do grupy i oceną siatkówki w skali punktowej (dotyczy grupy IV)

	współczynnik korelacji rang Spearmana			
	PEDF	VEGF	BFGF	INS
Zaawansowanie (grupa)	-0,051	0,044	-0,008	0,212
Ocena siatkówki w punktach	-0,130	0,049	-0,074	0,097

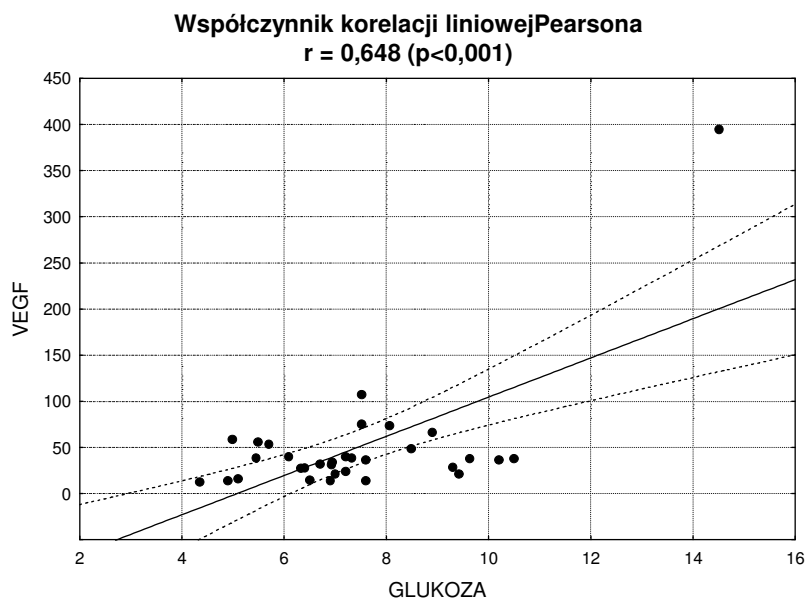
Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy stężeniem VEGF i endogennej insuliny na czczo w surowicy krwi a stopniem zaawansowania cukrzycy wyrażonym przynależnością do badanej grupy od grupy o najmniej zaawansowanej chorobie (chorzy na cukrzycę rozpoznaną *de novo* - grupa II) do największego nasilenia zmian (chorzy na cukrzycę z retinopatią - grupa IV) oraz stadium zaawansowania retinopatii w grupie IV wyrażonym w skali punktowej. Stężenie VEGF było najmniejsze w grupie kontrolnej (I). Stężenia PEDF i bFGF korelowały ujemnie z powyższymi parametrami klinicznymi.

Stwierdzono dodatnie, istotne statystycznie korelacje pomiędzy stężeniem VEGF a parametrami opisującymi cukrzycę (Tab.16) - wartość glikemii na czczo (Ryc.12.), stężenie cholesterolu całkowitego (Ryc.13.), frakcji LDL cholesterolu (Ryc.14.) i stężenie glikowanej hemoglobiny (Ryc.15.).

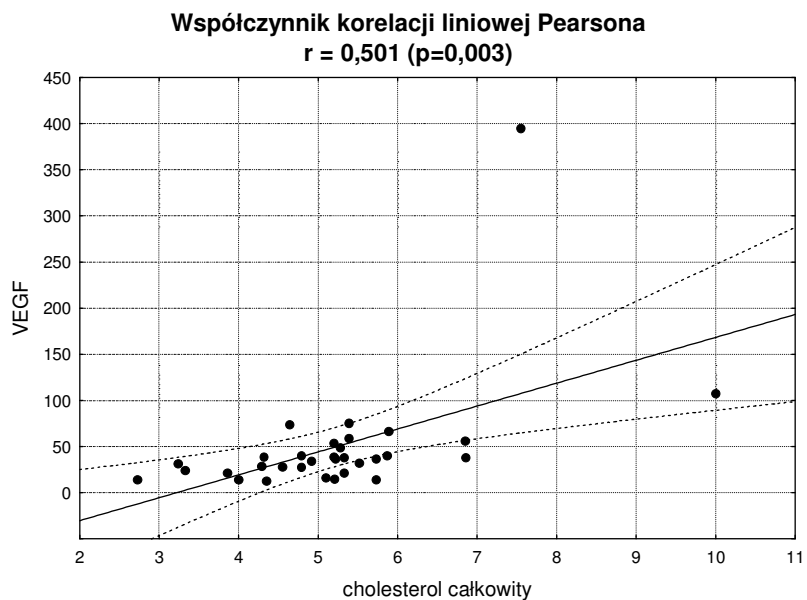
Tab.16. Korelacja pomiędzy stężeniami cytokin angiogennych a wybranymi parametrami laboratoryjnymi i klinicznymi w badanych grupach.

	współczynnik korelacji liniowej Pearsona			
	PEDF	VEGF	BFGF	INS
WIEK	0,238	-0,015	0,191	0,067
BMI	0,099	0,068	-0,057	0,3763*
CZAS_DM	-0,026	0,280	0,000	0,064
CZAS_HP	0,158	-0,084	-0,032	-0,061
Glukoza	0,170	0,648***	0,073	0,001
Aspat	-0,024	0,159	-0,193	0,143
Alat	-0,003	0,121	-0,278	0,373*
Bilirub	-0,265	-0,301	-0,099	-0,105
Cholest	0,035	0,501**	-0,064	0,136
Triglicerydy	0,147	0,237	-0,177	0,130
HDL	-0,096	0,064	0,073	0,356*
LDL	0,038	0,509**	0,039	0,180
HbA1c	0,153	0,457**	-0,138	-0,190

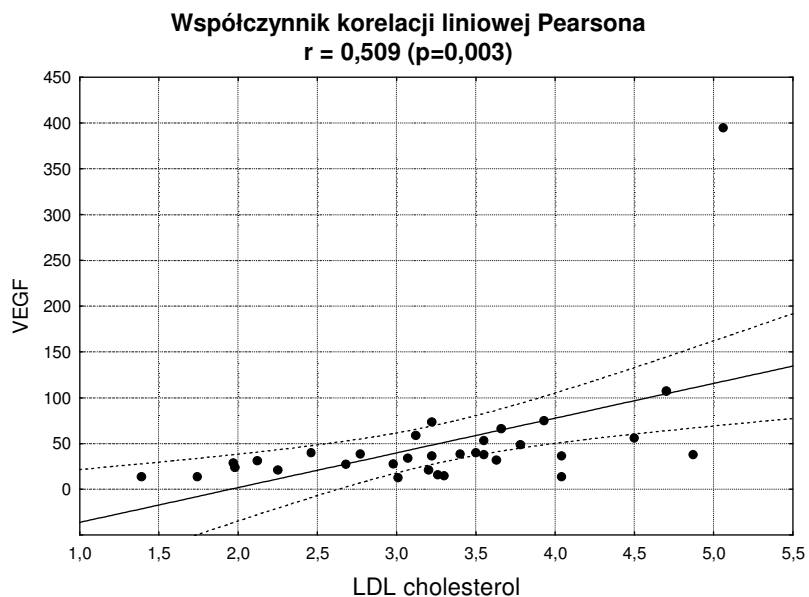
Ryc 17. Korelacja liniowa pomiędzy stężeniem VEGF a wartością glikemii na czczo



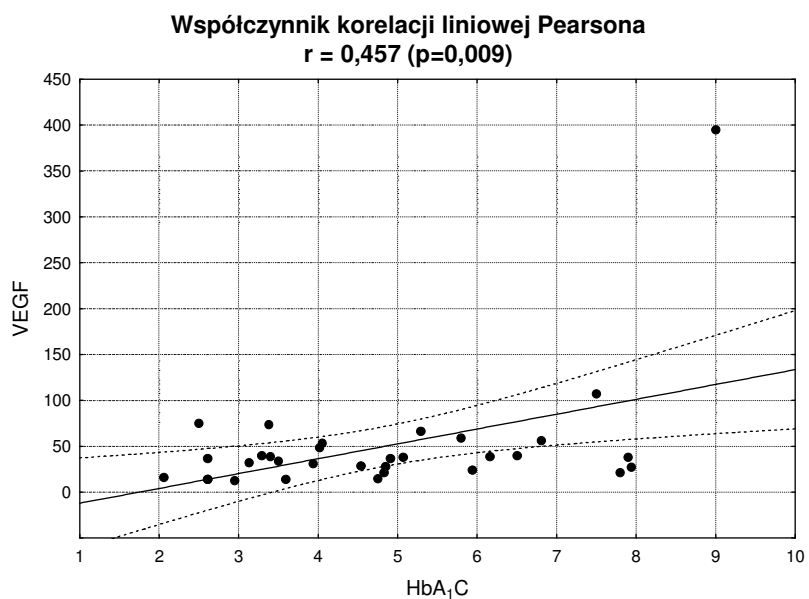
Ryc 18. Korelacja liniowa pomiędzy stężeniem VEGF a stężeniem cholesterolu całkowitego



Ryc. 19 Korelacja liniowa pomiędzy stężeniem VEGF a stężeniem frakcji LDL cholesterolu.



Ryc 20. Korelacja liniowa pomiędzy stężeniem VEGF a stężeniem glikowanej hemoglobiny (HbA1c)

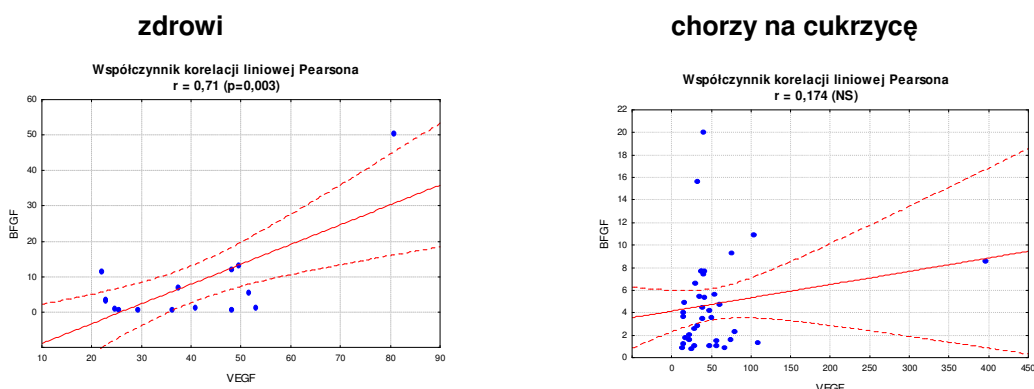


Przeprowadzona analiza wykazała statystycznie istotną korelację liniową pomiędzy VEGF i bFGF u osób zdrowych. Korelacja taka nie występuje w grupie chorych na cukrzycę niezależnie od jej stanu zaawansowania (Tab.17, Ryc.21).

Tab.17. Korelacja liniowa pomiędzy stężeniami cytokin angiogennych w grupie kontrolnej i u pacjentów chorych na cukrzycę

Korelacja		DM	zdrowi
VEGF z bFGF	n	38	15
	wsp. r	0,17	0,71
	p	0,302	0,003

Ryc. 21 Korelacje liniowe pomiędzy VEGF i bFGF u ludzi zdrowych i grupie chorych na cukrzycę



Analiza stężeń VEGF i bFGF przeprowadzona w grupach pacjentów z nadciśnieniem tętniczym otrzymujących lub nie inhibitory konwertazy A1 nie wykazała istotnych statystycznie różnic.

Stwierdzono istotnie statystycznie wyższy stosunek stężeń VEGF/bFGF w grupie chorych na cukrzycę z retinopatią (grupa IV) w porównaniu z grupą chorych na cukrzycę rozpoznaną niedawno (grupa II) (*p=0,049). Powyższy stosunek był istotnie wyższy także w grupach II i IV rozpatrywanych razem w porównaniu z grupą chorych na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat bez retinopatii (grupa III) (**p=0,05). Stosunek stężeń VEGF/PEDF nie różnił się istotnie statystycznie pomiędzy badanymi grupami (Tab.18, Tab.19, Tab.20).

Tab.18. Porównanie stosunku stężeń cytokin wpływających na angiogenezę w badanych grupach chorych.

Grupy chorych	parametr	Cutt_off	+ve	-ve	ROC area	95% CI	OR	95%CI	p
II, III i IV vs I	VEGF/BFGF	≤14,74	0,771	0,412	Brak zdolności dyskryminacyjnej				
	VEGF/PEDF	≥3,212	0,781	0,40	0,548	0,381-0,714	2,38	0,586-9,678	0,161
IV vs I	VEGF/BFGF	≥10,41	0,533	0,8	0,587	0,353-0,820	4,571	0,570-55,046	0,096
	VEGF/PEDF	≥3,34	0,5	0,727	0,58	0,328-0,832	2,333	0,326-19,361	0,250
III vs I	VEGF/BFGF	≤13,25	0,556	0,778	Brak zdolności dyskryminacyjnej				
	VEGF/PEDF	>3,212	0,533	0,667	0,544	0,313-0,776	2,286	0,375-14,956	0,516
II vs I	VEGF/BFGF	≤13,596	0,579	0,636	Brak zdolności dyskryminacyjnej				
	VEGF/PEDF	>3,238	0,588	0,615	0,529	0,310-0,748	2,857	0,490-18,01	0,270
IV + II vs I	VEGF/BFGF	≤14,74	0,58	0,467	Brak zdolności dyskryminacyjnej				
	VEGF/PEDF	≥3,238	0,708	0,5	0,549	0,213-0,734	2,429	0,537-11,048	0,183
IV + II vs III	VEGF/BFGF	≥4,76	0,742	0,667	0,573	0,357-0,789	5,75	0,641-71,079	0,050**
	VEGF/PEDF	≥3,45	0,75	0,412	0,533	0,328-0,738	0,7	0,175-2,715	0,295
II vs III	VEGF/BFGF	≤9,49	0,643	0,538	Brak zdolności dyskryminacyjnej				
	VEGF/PEDF	≤1,455	0,75	0,478	Brak zdolności dyskryminacyjnej				
IV vs III	VEGF/BFGF	≥14,74	0,714	0,667	0,65	0,409-0,891	5,0	0,522-65,329	0,095
	VEGF/PEDF	≥3,344	0,538	0,667	0,558	0,303-0,813	2,8	0,346-25273	0,343
IV vs II	VEGF/BFGF	≥10,41	0,571	0,818	0,66	0,432-0,888	6,0	0,738-71,888	0,049*
	VEGF/PEDF	≥1,425	0,435	1,0	0,553	0,312-0,795	3,889	0,125-niesk.	0,229

Tab. 19. Stosunek stężeń VEGF/bFGF w badanych grupach chorych.

	N	VEGF/bFGF				
		Mean	SD	min	Me	Max
Grupa I	15	20,808	19,657	1,589	9,182	59,432
Grupa II	12	16,736	22,745	1,934	10,386	80,090
Grupa III	15	16,189	16,011	2,976	9,045	52,551
Grupa IV	10	23,636	21,448	4,787	12,890	70,617

Tab.20. Stosunek stężeń VEGF/PEDF w badanych grupach chorych.

	n	VEGF/PEDF				
		Mean	SD	min	Me	Max
Grupa I	15	3,710	1,587	1,656	3,204	6,503
Grupa II	12	4,376	2,988	0,982	3,307	10,929
Grupa III	15	4,236	2,842	0,945	3,699	12,145
Grupa IV	10	6,719	8,874	1,425	3,832	31,390

Grupa I –grupa kontrolna (n=15)

Grupa II – chorzy na cukrzycę niedawno rozpoznaną (do 0,5 roku wstecz) bez retinopatii (n=12)

Grupa III – chorzy na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat bez retinopatii (n=15)

Grupa IV – chorzy na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat z retinopatią. (n=10)

3.5 Modele kanoniczne

Analizę przeprowadzono w całym materiale (n=53)

Podjęto próbę utworzenia modeli kanonicznych w których zbiór lewy jest trzelementowy i zawiera poszczególne parametry cytokin wpływających na angiogenezę, a zbiór prawy zawiera wybrane czynniki mogące mieć znaczenie dla rozwoju retinopatii cukrzycowej i prawdopodobnie wpływać na wydzielanie tych cytokin. W obrębie zbiorów lewy i prawy parametry uszeregowane są malejąco według wartości bezwzględnej ładunku kanonicznego.

Model 1 opisuje współzależność pomiędzy stężeniami cytokin VEGF, bFGF i PEDF a wybranymi parametrami świadczącymi o stopniu zaburzeń gospodarki węglowodanowej i lipidowej u osób zdrowych.

R kanoniczne = 0,787 p=0,05

zbiór lewy całkowita redundancja 27,9%		zbiór prawy całkowita redundancja 19,2%	
Cytokina	ładunek kanoniczny	Czynnik	ładunek kanoniczny
PEDF	0,907	HbA _{1c}	1,026
BFGF	0,233	INS	0,147
VEGF	0,138	CHOL	-0,078

HbA_{1c} – hemoglobina glikowana, INS – insulina endogenna, CH – cholesterol całkowity

Wysokie R kanoniczne i statystycznie znamienne wskazuje na istnienie silnego związku pomiędzy parametrami cytokin a elementami opisującymi zaawansowanie zaburzeń gospodarki węglowodanowej i lipidowej.

Zbiór lewy wyjaśnia zmienność zbioru prawego w 27,9% przypadków, zaś zbiór prawy wyjaśnia zmienność zbioru lewego w 19,2%.

W powyższym modelu największy wpływ na elementy zbioru prawego posiada PEDF.

Współzależność między parametrami HbA_{1c} i INS a elementami zbioru lewego jest wprost proporcjonalna, natomiast między CHOL a elementami tego zbioru odwrotnie proporcjonalna.

Model 2 opisuje współzależność pomiędzy stężeniami cytokin VEGF, BFGF i PEDF a wybranymi parametrami świadczącymi o stopniu zaawansowania cukrzycy i miażdżycy u chorych na cukrzycę.

R kanoniczne = 0,634 p= 0,05

zbiór lewy całkowita redundancja 34,5%		zbiór prawy całkowita redundancja 17,2%	
Cytokina	ładunek kanoniczny	czynnik	ładunek kanoniczny
VEGF	0,871	HbA _{1c}	0,677
BFGF	- 0,526	INS	0,404
PEDF	0,319	CHOL	0,339
		Grupa IV	0,087

HbA_{1c} – hemoglobina glikowana, INS – insulina endogenna, CHOL – cholesterol całkowity, Grupa IV – grupa chorych na cukrzycę w różnym stopniu zaawansowania retinopatii.

Wysokie kanoniczne R i znamienne statystycznie wskazuje na istnienie silnego związku pomiędzy parametrami cytokin a elementami opisującymi stopień zaawansowania cukrzycy i miażdżycy. Zbiór lewy wyjaśnia zmienność zbioru prawego w 34,5% przypadków, zaś zbiór prawy wyjaśnia zmienność zbioru lewego w 17,2%.

W powyższym modelu największy wpływ na elementy zbioru prawego posiada VEGF. Współzależność między parametrami VEGF i PEDF a elementami zbioru prawego jest wprost proporcjonalna, natomiast między BFGF a elementami tego zbioru odwrotnie proporcjonalna.

Zgodnie z ogólnie znanymi obserwacjami i stanem wiedzy stwierdzono dodatnie, istotne statystycznie korelacje pomiędzy stężeniem endogennej insuliny na czczo a wartością BMI oraz stężeniem AIAT.

5. Dyskusja

W niniejszej pracy wykazano że:

1. Stężenie VEGF we krwi chorych na cukrzycę z objawami retinopatii było znamienne statystycznie większe niż w grupie osób zdrowych i u chorych na cukrzycę bez retinopatii i korelowało ze stężeniem HbA1c.

2. Stężenia PEDF i bFGF korelowały ujemnie ze stężeniem endogennej insuliny na czczo, z długością trwania i zaawansowaniem cukrzycy oraz stopniem nasilenia retinopatii u chorych z cukrzycą trwającą ponad 5 lat.

3. Stężenia dwóch proangiogennych cytokin VEGF i bFGF wykazywały dodatnią korelację liniową u osób zdrowych. Korelacja ta przestawała występować u chorych na cukrzycę.

4. Wartość stosunku stężeń VEGF/bFGF u osób z zaawansowaną cukrzycą powikłaną zmianami naczyniowymi była istotnie większa niż w pozostałych grupach badanych, co sugeruje rozważenie wyodrębnienia tego parametru jako wskaźnika ryzyka rozwoju retinopatii u chorych na cukrzycę.

5. Stężenia PEDF nie różniły się istotnie pomiędzy poszczególnymi grupami chorych.

5.1 U podłoża retinopatii cukrzycowej leży aktywacja angiogenezy przebiegającej z patologicznym nowotworzeniem naczyń w obrębie narządu wzroku i uszkodzenia tkanek gałki ocznej będące jego wynikiem.

W przedstawionej pracy wykazano że w proces patologicznego nowotworzenia naczyń w oku u chorych na cukrzycę zaangażowane są cytokiny posiadające zdolność pobudzania lub hamowania neoangiogenezy, a pomiar stężeń tych cytokin w surowicy krwi dostarcza dodatkowych informacji pozwalających na uzyskanie dokładniejszego wglądu w mechanizmy rozwoju retinopatii cukrzycowej.

Angiogeneza jest wieloetapowym procesem, w przebiegu którego komórki śródbłonna naczyń charakteryzujące się w spoczynku nieznacznym potencjałem proliferacyjnym ulegają indukcji zaburzając równowagę czynników stymulujących i hamujących. Pobudzenie neowaskularyzacji zarówno fizjologicznej jak i patologicznej jest wynikiem przewagi stymulatorów nad inhibitorami (12, 10, 24, 27, 41, 57). Czynniki wzrostowe i cytokiny regulujące mechanizmy angiogenezy opisane we wstępie (Tab.1 i 2.) wydzielane są parakrynnie przez komórki sąsiednich tkanek (komórki tkanki łącznej, leukocyty, makrofagi) (55) i uruchamiają kolejne etapy nowotworzenia naczyń. Kluczową rolę w regulacji neowaskularyzacji siatkówki pełni VEGF będąc najsilniejszym aktywatorem nowotworzenia naczyń i czynnikiem zwiększającym ich przepuszczalność, indukującym syntezę metaloproteinaz i chemotaksję leukocytów (1, 10, 15, 21).

Szereg prowadzonych dotychczas badań wykazało że ekspresja VEGF pojawia się w różnych typach komórek gałki ocznej (m.in. siatkówki) u chorych na cukrzycę, a wysokiemu stężeniu VEGF osiąganemu w tych komórkach przypisuje się istotny wpływ na powstawanie zmian naczyniowych (10, 21, 76). W przebiegu

hipoksji towarzyszącej cukrzycy obserwowano także wzrost liczby receptorów dla VEGF na komórkach gałki ocznej. (29, 63, 77). Istotne zwiększenie stężenia VEGF w surowicy krwi stwierdzono u młodych dorosłych z cukrzycą i powikłaniami o charakterze mikroangiopatii.

Stężenie VEGF we krwi chorych na cukrzycę z objawami retinopatii było w naszych badaniach znamienne statystycznie większe niż w grupie osób zdrowych i u chorych na cukrzycę ale bez retinopatii i korelowało ze stężeniem HbA1c. Analiza wielowariantowa wykazała, że wzrost stężenia VEGF był u tych chorych odrębnym czynnikiem ryzyka rozwoju retinopatii co jest zgodne z wynikami badań innych autorów (15). W niniejszej pracy stwierdzono nieznamienny (prawdopodobnie ze względu na małą liczebność) wzrost stężenia VEGF w surowicy krwi osób z zaawansowanymi zmianami w дне oczu o typie retinopatii cukrzycowej (grupa IV) w porównaniu z pozostałymi grupami chorych. Za istotnością tego zjawiska może pośrednio przemawiać stwierdzenie dodatnich, istotnych statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem VEGF a parametrami metabolicznymi opisującymi cukrzycę (wartość glikemii na czczo, stężenie cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL cholesterolu i stężenie glikowanej hemoglobiny). Odnotowanie w badanej grupie pacjentów korelacji pomiędzy stężeniem VEGF i stężeniem glikowanej hemoglobiny pozostaje w zgodzie z pracą Chiarelli i wsp. (2000) gdzie wartość średnia stężenia HbA1c korelowała ze stężeniem VEGF ze znamiennością statystyczną. Poprawa kontroli cukrzycy i obniżenie stężenia HbA1c wiązały się ze znacznym spadkiem stężenia VEGF w surowicy krwi (15). W grupie pacjentów analizowanych w przedstawionej rozprawie stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy stężeniem VEGF i endogenną insuliną na czczo w surowicy krwi, a także ze stopniem zaawansowania cukrzycy wyrażonym przynależnością do badanej grupy od

najmniej zaawansowanej choroby (grupa I) do największego nasilenia zmian (grupa IV). Powyższą korelację stwierdzono także pomiędzy stężeniem VEGF a stadiem zaawansowania retinopatii w grupie IV wyrażonym w skali punktowej.

Stężenia PEDF i bFGF korelowały natomiast ujemnie z powyższymi parametrami klinicznymi.

Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) jest obok VEGF silnym aktywatorem angiogenezy (13, 52, 81, 82). Jego duża ekspresja w komórkach nabłonka barwnikowego siatkówki ma w przebiegu cukrzycy wraz z VEGF odgrywać kluczową rolę w powstawaniu patologicznych zmian naczyniowych w jej obrębie (52). W niniejszej pracy odnotowano niewielkie obniżenie stężenia bFGF w surowicy krwi osób z zaawansowanymi zmianami cukrzycowymi na dnie oczu (grupa IV) w porównaniu z pozostałymi chorymi. Różnice były jednak nieznamiennie statystycznie. Jednocześnie; przeprowadzona analiza wykazała statystycznie istotną korelację liniową pomiędzy stężeniami obu głównych aktywatorów angiogenezy (VEGF i bFGF) u osób zdrowych. Korelacji takiej nie stwierdzono natomiast w grupie chorych na cukrzycę i to niezależnie od jej stanu zaawansowania. Powyższe wyniki wskazują na istnienie nie poznanych jeszcze mechanizmów regulacyjnych, które u osób zdrowych w warunkach fizjologii decydują o współdziałaniu obu czynników proangiogennych. U chorych na cukrzycę dochodzi najprawdopodobniej do zaburzeń w funkcjonowaniu powyższych mechanizmów i upośledzenia opisanej regulacji, co doprowadza do przejęcia głównej roli w stymulacji angiogenezy przez VEGF. W związku z powyższą obserwacją zdecydowano o przeprowadzeniu analizy wartości stosunku stężeń głównych badanych aktywatorów angiogenezy (VEGF/bFGF) w badanych grupach. Stwierdzono istotnie statystycznie większy stosunek stężeń VEGF/bFGF w grupie

chorych na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat z retinopatią (grupa IV) w porównaniu z chorymi na cukrzycę niedawno rozpoznaną (do 0,5 roku wstecz) bez retinopatii (grupa II) oraz w grupach IV i II rozpatrywanych razem w porównaniu z grupą chorych na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat bez retinopatii (grupa III). Natomiast nie stwierdzono istotnej różnicy wartości tego stosunku pomiędzy grupą IV a grupą kontrolną (I). Brak takiej różnicy wynika prawdopodobnie z faktu, że w grupie kontrolnej u osób zdrowych proces regulacji stężeń VEGF i bFGF przebiega prawidłowo.

Znamiennie wyższe wartości stosunku stężeń VEGF/bFGF u osób z zaawansowaną cukrzycą powikłaną zmianami naczyniowymi sugerują rozważenie wyodrębnienia tego parametru jako wskaźnika ryzyka rozwoju retinopatii u chorych na cukrzycę.

Zwiększonemu stężeniu tkankowemu VEGF i bFGF jako głównych aktywatorów angiogenezy przypisuje się kluczową rolę w powstawaniu retinopatii cukrzycowej (27, 52, 57, 82). Nie są to jednak jedyne czynniki będące odpowiedzialne za jej rozwój. O tym, że wpływ na regulację procesu neowaskularyzacji posiadają także inne substancje może świadczyć przykładowo obserwowane zjawisko wzrostu stężenia VEGF we krwi, któremu nie towarzyszy powstanie retinopatii. Wykazano bowiem iż może dojść do zmniejszenia zaawansowania retinopatii bez ewidentnych zmian w sekrecji i stężeniu VEGF, którego poziom we krwi może być związany z innym niż cukrzyca procesem; niedokrwinnym lub zapalnym (58, 71). Opisano również różnorodny wpływ leków zapobiegających zwiększeniu stężenia VEGF na przebieg retinopatii (25). Ponadto metody leczenia retinopatii niedokrwiennej z użyciem czynników modyfikujących oddziaływanie VEGF badane na modelach zwierzęcych jak przeciwciała czy blokery

jego receptorów nie doprowadzały do całkowitego zahamowania patologicznej proliferacji naczyń siatkówki (65). Powyższe spostrzeżenia udowodniły zaangażowanie dodatkowych czynników modyfikujących proces patologicznej angiogenezy dna oka w cukrzycy, np. substancji będących inhibitorami tego procesu (30, 27, 25). W kolejnych eksperymentach wykazano że aktywacja nowotworzenia naczyń może być wywołana nie tylko lokalnym wzrostem stężenia cytokin indukujących angiogenezę, ale również spadkiem stężenia endogennych inhibitorów angiogenezy (19). Najsilniejszym poznany inhibitorem angiogenezy dna oka jest czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego (PEDF). Wykazano że PEDF obecny jest u ludzi w surowicy krwi w stężeniu ok.100nM (5µg/ml). Jest to stężenie dwukrotnie przekraczające koncentrację mogącą zahamować patologiczny rozrost naczyń w obrębie oka (62). Badania nad antyangiogennymi właściwościami PEDF wykazały, że wywiera on regulacyjny wpływ na powstawanie naczyń w siatkówce. PEDF może wywierać wpływ zarówno na procesy neurotropowe jak i na nowotworzenie naczyń co istotnie zwiększa rolę przypisywaną temu białku w fizjologii gałki ocznej (41, 62).

W badanym w toku niniejszej pracy materiale nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu PEDF pomiędzy poszczególnymi grupami chorych i w porównaniu z grupą kontrolną. Pozostaje to w zgodności z kilkoma innymi badaniami prowadzonymi na modelach in vitro i in vivo, w których nie wykazano zależności między miejscowym stężeniem PEDF w obrębie siatkówki i błony naczyniowej a stopniem zaawansowania patologicznych zmian naczyniowych (19, 27). Może być to wyrazem zaburzenia regulacji i supresji syntezy oraz sekrecji i szybkiej degradacji tej cytokiny jaka ma miejsce u chorych na cukrzycę, u których mimo wzrostu stężeń cytokin proangiogennych nie dochodzi równolegle do zwiększenia

aktywności głównego inhibitora angiogenezy. Tak więc może dochodzić do „pryzwolenia” na rozwój patologicznej angiogenezy (27, 33, 40, 50) .

W piśmiennictwie uwagę zwracają badania dotyczące możliwości zwiększenia ekspresji mRNA dla PEDF w hodowlach ludzkich komórek nabłonka barwnikowego i siatkówkach zwierząt laboratoryjnych pod wpływem fotokoagulacji laserowej, która jest metodą często wykorzystywaną w leczeniu retinopatii cukrzycowej. (19, 27, 72). Z uwagi na hamujący efekt antyangiogeny PEDF może on stać się w przyszłości użytecznym lekiem w terapii nowotworzenia naczyń w narządzie wzroku. Naturalne inhibitory, do których należy PEDF powodują bowiem zablokowanie angiogenezy zapoczątkowanej przez którykolwiek z jej aktywatorów (50).

5.2 Wpływ czynników charakteryzujących zaburzenia metaboliczne na stopień zaawansowania zmian cukrzycowych w dnie oka.

Otrzymane w toku niniejszej pracy wyniki są zgodne z obserwacjami innych autorów i aktualnym stanem wiedzy dotyczącej patogenezy cukrzycy, czynników ryzyka i elementów wpływających na jej rozwój oraz powstawanie powikłań narządowych.

Podwyższenie wskaźnika masy ciała występuje często u chorych na cukrzycę i jest istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju angiopatii w przebiegu tej choroby (zalecenia). W toku przeprowadzonych badań odnotowano znamienne statystycznie różnice w BMI pomiędzy grupą kontrolną (I) a pozostałymi grupami badanych chorych na cukrzycę. Wskaźnik masy ciała nie różnił się wprawdzie istotnie wśród chorych na cukrzycę, ale jego wartość była

największa u pacjentów z rozwiniętymi zmianami o charakterze retinopatii. Powyższe wyniki pozostają w zgodzie z innymi podkreślającymi rolę otyłości w patogenezie cukrzycy, także jako czynnika ryzyka powstawania powikłań o charakterze mikroangiopatii (24, 38, 83).

Nadciśnienie tętnicze jest zidentyfikowanym czynnikiem ryzyka rozwoju retinopatii cukrzycowej (24, 83). W badanej grupie pacjentów stwierdzono znamienne statystycznie różnice w wartościach ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego pomiędzy grupą kontrolną (I) a chorymi na cukrzycę (grupy II-IV). Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w zakresie ciśnienia tętniczego w obrębie grup chorych na cukrzycę, co może wiązać się z faktem iż część z nich była poddana terapii hipotensyjnej.

Kluczowym zjawiskiem dla rozwoju powikłań narządowych cukrzycy, w tym dla rozwoju angiogenezy jest hiperglikemia (24). W badanych grupach chorych stężenie glukozy różniło się statystycznie istotnie pomiędzy grupą kontrolną a chorymi na cukrzycę (grupy II-IV). Wynikiem przewlekłej hiperglikemii jest aktywacja procesu glikozylacji białek (42, 60). Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy zjawisko to odgrywa istotną rolę w progresji cukrzycy i stymulacji angiogenezy (24, 16). Stężenie glikowanej hemoglobiny (HbA1c) służy jako wskaźnik wyrównania cukrzycy, jest także kolejnym uznanym czynnikiem rokowniczym rozwoju retinopatii (42). W badanym materiale znalazło to potwierdzenie w postaci odnotowania znamienne statystycznie wyższego stężenia HbA1c w grupie chorych na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat z retinopatią (grupa IV) w porównaniu z grupą kontrolną (grupa I) ($p < 0,011$), z grupą chorych na cukrzycę niedawno rozpoznaną (do 0,5 roku wstecz) bez retinopatii (grupa II) ($p < 0,017$) i grupą chorych na cukrzycę

zaawansowaną, trwającą 5-10 lat bez retinopatii (grupa III) ($p < 0,014$). Nieenzymatyczna glikozylacja białek i nagromadzenie końcowych jej produktów (AGEs) stymuluje angiogenezę m.in. poprzez zwiększenie adhezji leukocytów do komórek śródbłonna (49).

Wzrost odsetka neutrofilów obojętnochłonnych występował u 70% chorych na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat z retinopatią. Zjawisko to może świadczyć o aktywacji układu immunologicznego i odpowiedzi układu krwiotwórczego na przewlekły proces zapalny towarzyszący zaawansowanej cukrzycy przebiegającej z retinopatią. Jest to zgodne z aktualnymi poglądami podkreślającymi udział leukocytów w patogenezie zmian wiodących do stymulacji angiogenezy w mechanizmie wywoływania miejscowej leukostazy, migracji granulocytów do miejsca uszkodzenia naczynia i ich aktywacji polegającej na uwalnianiu przez nie mediatorów reakcji zapalnej, co doprowadza do dalszego uszkodzenia tkanek i nasilenia neowaskulogenezy (49, 60, 61).

Hiperlipidemie i obserwowane w ich przebiegu zaburzenia typu indukcji odpowiedzi immunologiczno – zapalnej także nasilają procesy angiogenezy (16, 35). Są one często obserwowanym zjawiskiem u chorych na cukrzycę. W badanym materiale odnotowano znamienne statystycznie wyższe stężenie cholesterolu całkowitego w surowicy krwi chorych na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat z retinopatią w porównaniu z grupą kontrolną i z grupą chorych na cukrzycę niedawno rozpoznaną (do 0,5 roku wstecz) bez retinopatii, podobnie stężenie frakcji LDL cholesterolu całkowitego w surowicy krwi było znamienne statystycznie wyższe w grupie chorych na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat z retinopatią w porównaniu z grupą kontrolną

i grupą chorych na cukrzycę niedawno rozpoznaną (do 0,5 roku wstecz) bez retinopatii, a także w grupie chorych na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat bez retinopatii w porównaniu z grupą chorych na cukrzycę niedawno rozpoznaną bez retinopatii. Jako wyraz uszkodzenia funkcjonalnego komórki wątrobowej u badanych chorych z cukrzycą w porównaniu z grupą kontrolną odnotowano istotną statystycznie różnicę w stężeniu AIAT w surowicy krwi pomiędzy grupą kontrolną a grupą chorych na cukrzycę niedawno rozpoznaną bez retinopatii oraz grupą kontrolną a chorymi na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat z retinopatią. Znany jest związek hepatotoksyczności i rozwoju zespołu metabolicznego oraz cukrzycy typu 2 określanego objawem niekontrolowanego stłuszczenia wątroby (non- alcoholic fatty liver disease - NAFLD) (1) Zgodnie z powyższymi obserwacjami w badanym materiale stwierdzono dodatnie, istotne statystycznie korelacje pomiędzy stężeniem endogennej insuliny na czczo a wartością BMI oraz stężeniem AIAT

W badanych grupach chorych odnotowano występowanie typowych dla cukrzycy zaburzeń klinicznych i metabolicznych, które charakteryzują jej przebieg i potwierdzają rolę ugruntowanych czynników ryzyka w rozwoju powikłań naczyniowych tej choroby w miarę czasu jej trwania. Jednak nie stwierdzono istotnych statystycznie specyficznych różnic w zakresie rutynowo kontrolowanych parametrów opisujących zaburzenia charakterystyczne dla tej choroby pomiędzy analizowanymi grupami chorych na cukrzycę (poza stężeniem HbA1c, cholesterolu całkowitego i frakcji LDL) a stopniem zaawansowania zmian w dnie oka, a co za tym idzie nie wykazano możliwości określenia na tej podstawie ryzyka rozwoju powikłań tego typu jak retinopatia. Podkreśla to rolę badania innych czynników

stwarzających możliwość prognozowania przebiegu choroby i ryzyka rozwoju zmian naczyniowych w przebiegu cukrzycy w narządzie wzroku.

5.3. Analiza modeli kanonicznych

Argumentów potwierdzających wzajemny wpływ zmian stężeń cytokin stymulujących i hamujących procesy neoangiogenezy na parametry opisujące stadium cukrzycy będących czynnikami ryzyka angiopatii dostarczają także wyniki przeprowadzonej w niniejszym opracowaniu analizy kanonicznej. W pierwszym z analizowanych modeli kanonicznych stwierdzono, że największy istotny statystycznie wzajemny wpływ na stężenie HbA₁C i insuliny endogennej na czczo (obserwowano wprost proporcjonalną zależność) oraz na stężenie całkowitego cholesterolu (zależność odwrotnie proporcjonalna) mają zmiany stężenia PEDF. Podobny wpływ odnotowano także dla bFGF i VEGF. Stężenie HbA₁C było znacząco statystycznie większe u pacjentów z retinopatią (gr IV).

W analizie drugiego modelu kanonicznego, w którym umieszczono jako parametr grupę IV (chorzy z różnym nasileniem retinopatii) stwierdzono że największy (istotny statystycznie) wzajemny wpływ w poszczególnych grupach pacjentów na stężenia HbA₁C, insuliny endogennej na czczo, stężenie całkowitego cholesterolu oraz na wystąpienie zmian o charakterze retinopatii (obserwowano wprost proporcjonalną zależność) mają zmiany stężenia VEGF i PEDF. Istotny statystycznie wpływ na powyższe parametry odnotowano także dla bFGF. Zależność ta była odwrotnie proporcjonalna.

Odwrotnie proporcjonalna zależność pomiędzy badanymi parametrami metabolicznymi a zmianami stężenia bFGF stwierdzona w powyższej analizie kanonicznej potwierdza hipotezę o znaczeniu zaburzeń regulacji wydzielania tej

cytokiny u chorych na cukrzycę. Wydzielanie bFGF pozostaje u osób zdrowych w funkcjonalnym sprzężeniu z wydzielaniem VEGF, a spada u chorych na cukrzycę przez co dochodzi do utraty powyżej opisanej regulacji, a odwrotnie proporcjonalna zależność zmian jej stężeń od wystąpienia zmian o charakterze retinopatii wykazana w modelu kanonicznym wskazuje na prawdopodobnie mniejszą rolę tej cytokiny w nasilaniu procesu neoangiogenezy (81, 79).

Reasumując, powyższe wyniki potwierdzają istnienie związku pomiędzy stopniem zaawansowania cukrzycy wyrażonym między innymi wzrostem koncentracji HbA_{1c} oraz wystąpieniem retinopatii, a wydzielaniem wpływających na angiogenezę cytokin mierzonym poprzez określenie ich stężenia we krwi. Nasuwa się wobec powyższego wniosek iż zmiany stężeń cytokin angiogennych zarówno nasilających jak i hamujących neowaskularyzację mają związek z parametrami charakteryzującymi stopień zaawansowania cukrzycy i są przez nie indukowane (73, 74, 78). Wobec tego pomiar stężenia cytokin angiogennych może być ważną i wartościową metodą pozwalającą być może na prognozowanie wystąpienia retinopatii w przebiegu tego schorzenia. Wykonywanie tego typu oznaczeń może mieć także implikacje lecznicze, co omówiono powyżej. Potwierdzenie użyteczności oznaczania we krwi stężeń cytokin wpływających na angiogenezę jako stosunkowo mało inwazyjnej metody diagnostycznej dla prognozowania wystąpienia poważnych powikłań naczyniowych jest atrakcyjnym zadaniem badawczym i z pewnością wymaga dalszych badań prowadzonych na większych grupach pacjentów.

6. Podsumowanie wyników

W niniejszej pracy stwierdzono że:

- 1) obserwowano znamienne statystycznie wyższe stężenie VEGF we krwi chorych na cukrzycę z objawami retinopatii w porównaniu z chorymi na cukrzycę bez retinopatii. Wzrost stężenia VEGF w surowicy krwi zidentyfikowano jako odrębny czynnik ryzyka rozwoju retinopatii.
- 2) odnotowano dodatnie istotne statystycznie korelacje pomiędzy stężeniem VEGF a parametrami metabolicznymi opisującymi cukrzycę (wartość glikemii na czczo, stężenie cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL cholesterolu, stężenie glikowanej hemoglobiny i endogennej insuliny) oraz między stężeniem VEGF a stadium zaawansowania retinopatii.
- 3) stwierdzono istotnie statystycznie większy stosunek stężeń VEGF/bFGF w grupie chorych na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat z retinopatią (grupa IV) w porównaniu z pozostałymi chorymi na cukrzycę.
- 4) nie wykryto istotnych różnic w stężeniu PEDF u chorych na cukrzycę w porównaniu z grupą kontrolną oraz pomiędzy poszczególnymi grupami chorych
- 5) stwierdzono znamienno statystycznie wpływ stężeń VEGF, bFGF i PEDF na stężenie HbA₁C, insuliny endogennej na czczo i cholesterolu całkowitego.
- 6) w grupie chorych na długotrwałą cukrzycę z retinopatią obserwowano wzajemny istotny statystycznie wpływ stężenia VEGF bFGF i PEDF oraz stężenia HbA₁C, insuliny endogennej na czczo, stężenia całkowitego cholesterolu i zmian o charakterze retinopatii.

7. Wnioski

Na tej podstawie można wyciągnąć następujące wnioski:

- 1) u chorych na cukrzycę dochodzi do zaburzeń w funkcjonowaniu mechanizmów regulujących angiogenezę wyrażających się upośledzeniem współdziałania cytokin bFGF, VEGF oraz PEDF co doprowadza do przejęcia głównej roli w stymulacji angiogenezy przez VEGF
- 2) VEGF odgrywa kluczową rolę w procesie neoangiogenezy prowadzącym u chorych na cukrzycę do powstania retinopatii. Wzrost jego stężenia w surowicy krwi może zostać uznany za odrębny czynnik ryzyka rozwoju retinopatii.
- 3) podwyższona wartość stosunku stężeń VEGF/bFGF w surowicy krwi chorych na cukrzycę także może być uznana za czynnik ryzyka rozwoju retinopatii.
- 4) możliwe jest wykorzystanie badań stężeń czynników stymulujących lub hamujących angiogenezę w surowicy krwi chorych na cukrzycę w określaniu ryzyka rozwoju u nich retinopatii.
- 5) rutynowo kontrolowane parametry biochemiczne charakteryzujące przebieg cukrzycy u chorych nie określają ryzyka rozwoju i progresji retinopatii.

8. Streszczenie

Powikłania okulistyczne cukrzycy są główną przyczyną ślepoty u ludzi w wieku 20-65 r.ż. Przyczyną znacznego pogorszenia ostrości wzroku u chorych na cukrzycę jest retinopatia. Cukrzycowa retinopatia proliferacyjna jest wyrazem patologicznej neowaskularyzacji w rozwoju której rolę odgrywają dobrze poznane czynniki jak hiperglikemia, hiperlipidemia i nadciśnienie, ale również niedawno zidentyfikowana równowaga pomiędzy cytokinami będącymi aktywatorami i inhibitorami angiogenezy. W celu znalezienia korelacji pomiędzy stężeniami we krwi obwodowej głównych czynników odgrywających rolę w regulacji procesu angiogenezy, a stanem zaawansowania klinicznego cukrzycy i występowaniem oraz stopniem nasilenia zmian naczyniowych w narządzie wzroku przebadano grupę 52 osób z czego 37 chorych na cukrzycę i 15 zdrowych osób stanowiących grupę kontrolną dobraną pod względem płci i wieku (grupa I). Chorych na cukrzycę podzielono na grupę chorych na cukrzycę niedawno rozpoznaną (do 0,5 roku wstecz) bez retinopatii (n=12) (grupa II), grupę chorych na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat bez retinopatii (n=15) (grupa III), grupę chorych na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat z retinopatią. (n=10) (grupa IV). U wszystkich wykonano badania okulistyczne (badanie ostrości wzroku, ciśnienia śródgałkowego, badanie przedniego odcinka oka, badanie dna oka z wykonaniem kolorowych fotografii i angiografię fluorescencyjną) pozwalające na ocenę zmian naczyniowych w narządzie wzroku oraz badania kliniczne i laboratoryjne obejmujące parametry charakteryzujące zaburzenia w przebiegu cukrzycy z lub bez towarzyszącego nadciśnienia tętniczego i zmian charakterystycznych dla rozwoju miażdżycy. W toku przeprowadzonych badań oceniono większość parametrów o uznanej wartości jako czynniki ryzyka rozwoju retinopatii

cukrzycowej. W surowicy krwi zbadano także stężenie wybranych cytokin odgrywających według aktualnego stanu wiedzy najważniejszą rolę w stymulacji lub hamowaniu neoangiogenezy (VEGF, bFGF, PEDF) i dokonano próby oceny wzajemnych relacji stężeń powyższych czynników i stopnia zaawansowania zmian w dnie oka w badanych grupach chorych. U chorych na cukrzycę obserwowano typowe dla tego schorzenia zaburzenia metaboliczne i kliniczne, które charakteryzują jej przebieg. Nie wykryto istotnych statystycznie różnic w zakresie rutynowo kontrolowanych parametrów biochemicznych pomiędzy analizowanymi grupami chorych na cukrzycę oraz wśród chorych z różnym zaawansowaniem zmian w dnie oka co potwierdza brak możliwości prognozowania i określania na tej podstawie ryzyka rozwoju i progresji retinopatii. U chorych na cukrzycę obserwowano natomiast zaburzenia regulacji angiogenezy pod postacią upośledzenia współdziałania cytokin bFGF, VEGF oraz PEDF wiodące do przejęcia głównej roli w kontroli aktywacji angiogenezy przez VEGF. Jako wyniki oryginalne odnotowano dodatnie istotne statystycznie korelacje pomiędzy stężeniem VEGF a parametrami metabolicznymi opisującymi cukrzycę. Zwiększone stężenie VEGF w surowicy krwi chorych na cukrzycę stanowiło w badanej grupie odrębny czynnik ryzyka rozwoju retinopatii. Stwierdzono istotnie statystycznie większy stosunek stężeń VEGF/bFGF w grupie chorych na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat z retinopatią (grupa IV) w porównaniu z pozostałymi chorymi, co może stać się czynnikiem ryzyka rozwoju retinopatii proliferacyjnej. Uzyskane w toku niniejszej pracy wyniki wskazują na możliwość wykorzystania badań stężeń czynników stymulujących lub hamujących angiogenezę w surowicy krwi chorych na cukrzycę w określaniu ryzyka rozwoju u nich retinopatii.

Summary

Ocular complications of diabetes are leading causes of vision loss in people aged between 20-65. Diabetic retinopathy causes significant deterioration of visual acuity. The key role in the pathological neoangiogenesis resulting in proliferative diabetic retinopathy is played by well established risk factors as hyperglycemia, hyperlipidemia, systemic hypertension and recently recognized as a risk factor the balance between stimulators and inhibitors of angiogenesis. In order to find the correlation between the blood levels of dominant angiogenesis regulators and clinical stage of diabetes and pathological blood vessel outgrowth that gives rise to retinopathy one hundred four eyes of 52 subjects including 37 patients suffering from diabetes mellitus and 15 healthy volunteers matched according to sex and age (control group - I) were studied. Diabetic patients were divided into three groups. Group II – patients with DM of up to 0,5 year duration, without retinopathy (n=12), group III – patients with DM of 5 -10 years duration without retinopathy (n=15), group IV - patients with DM of 5 -10 years duration with retinopathy (n=10). Ophthalmologic examination including assessment of visual acuity, intraocular pressure measurement, anterior chamber and eye fund opthalmoscopy with colour fundus photography and fluorescein angiography was performed in all subjects to detect and evaluate the abnormal blood vessel outgrowth within the eye bulbs. Clinical and laboratory parameters to characterize the stage of diabetes in patients with or without systemic hypertension and atherosclerosis were studied. The blood levels of cytokines – the main stimulators and inhibitors of angiogenesis (VEGF, bFGF, PEDF) were studied. The interrelationship between these cytokines blood concentration and the stage of vascular abnormalities in the eye fund was evaluated in all subjects. In diabetic patients the typical metabolic and clinical

abnormalities were observed. There were no statistically important differences in routinely controlled biochemical parameters between the three groups of patients with diabetes and between patients suffering from DM with different stage of vascular abnormalities within the eye fund. Those parameters have no prognostic value for the risk determination of retinopathy development. The disturbances of angiogenesis regulation (the lack of co-operation of bFGF, VEGF and PEDF) were seen in diabetic patients. They have led to VEGF predominance as a factor playing the major role in stimulation of pathological angiogenesis. A statistically significant positive correlations between VEGF blood concentration and typical for DM metabolic abnormal parameters were found. Increased VEGF blood concentration in patients with DM could be considered as a distinct risk factor for development of diabetic retinopathy. Statistically significant Increased ratio of VEGF/bFGF blood concentration in patients with long lasting DM (5-10 years of duration) when compared with other patients with DM could be in the future recognized as a additional risk factor for development of proliferative diabetic retinopathy (PDR). The obtained results suggest that the evaluation of blood concentration of stimulators and inhibitors of angiogenesis could be useful in risk assessment of retinopathy development in patients suffering from diabetes mellitus.

9. Spis tabel

Tab.	Tytuł	Str.
1	Międzynarodowa klasyfikacja ciężkości zmian retinopatii cukrzycowej (wg. American Academy of Ophthalmology. 10.2002)	16
2	Charakterystyka badanych grup pod względem płci, wieku i BMI	22
3	Wartości ciśnienia tętniczego (skurczowego i rozkurczowego), znamienności statystyczne w badanych grupach	24
4	Ocena zmian w siatkówce w skali punktowej w grupie IV - chorych na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat z retinopatią. (n=10)	26
5	Charakterystyka parametrów biochemicznych opisujących cukrzycę w badanych grupach chorych.	30
6	Stężenie glukozy w surowicy krwi w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)	31
7	Stężenie endogennej insuliny w surowicy krwi w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)	32
8	Stężenie cholesterolu całkowitego w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)	33
9	Stężenie frakcji LDL cholesterolu w surowicy krwi w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)	34
10	Stężenie hemoglobiny glikowanej (HbA1c) w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)	35
11	Wyniki badania stężenia AIAT w badanych grupach.	36
12	Stężenie VEGF w surowicy krwi w badanych grupach. Średnia $\pm$ SD	38
13	Stężenie PEDF w surowicy krwi w badanych grupach. Średnia $\pm$ SD	39
14	Stężenie bFGF w surowicy krwi w badanych grupach	40
15	Korelacja pomiędzy stężeniami cytokin wpływających na angiogenezę a zaawansowaniem cukrzycy wyrażonym przynależnością do grupy i oceną siatkówki w skali punktowej (dotyczy grupy IV)	41
16	Korelacja pomiędzy stężeniami cytokin angiogennych a wybranymi parametrami laboratoryjnymi i klinicznymi w badanych grupach	41
17	Korelacja liniowa pomiędzy stężeniami cytokin angiogennych w grupie kontrolnej i u pacjentów chorych na cukrzycę	44
18	Porównanie stosunku stężeń cytokin wpływających na angiogenezę w badanych grupach chorych	45
19	Stosunek stężeń VEGF/bFGF w badanych grupach chorych	46
20	Stosunek stężeń VEGF/PEDF w badanych grupach chorych	46
21	Wyniki morfologii krwi obwodowej w badanych grupach	69
22	Wyniki innych wybranych badań laboratoryjnych w badanych grupach	70
23	Wyniki badania proteinogramu w badanych grupach	70

10. Spis rycin

Ryc.	Tytuł	Str.
1	Leczenie przeciwcukrzycowe stosowane w poszczególnych grupach badanych	23
2	Stosowana terapia przeciw nadciśnieniu tętniczemu w badanych grupach	25
3	Ocena zmian w siatkówce w skali punktowej w grupie IV - chorych na cukrzycę zaawansowaną, trwającą 5-10 lat z retinopatią. (n=10). Przedstawiono liczbę pacjentów, którzy uzyskali wynik 2, 4, 5, 6 i 8 punktów w ocenianej skali	26
4	<u>Prawidłowy obraz dna oka</u>	27
5	Obraz dna oka z mikrotetniakami w łagodnej nieproliferacyjnej retinopatii cukrzycowej	27
6	Obraz dna oka w umiarkowanej nieproliferacyjnej retinopatii cukrzycowej	28
7	Obraz dna oka w ciężkiej nieproliferacyjnej retinopatii cukrzycowej	28
8	Obraz dna oka w ze zmianami w proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej	29
9	Stężenie glukozy w surowicy krwi w badanych grupach	31
10	Stężenie endogennej insuliny w surowicy krwi w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)	32
11	Stężenie cholesterolu całkowitego w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)	33
12	Stężenie frakcji LDL cholesterolu w surowicy krwi w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)	34
13	Stężenie hemoglobiny glikowanej (HbA1c) w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)	35
14	Stężenie VEGF w surowicy krwi w badanych grupach	38
15	Stężenie PEDF w surowicy krwi w badanych grupach (Kruskal-Wallis ANOVA by ranks)	39
16	Stężenie bFGF w surowicy krwi w badanych grupach	40
17	Korelacja liniowa pomiędzy stężeniem VEGF a wartością glikemii na czczo	42
18	Korelacja liniowa pomiędzy stężeniem VEGF a stężeniem cholesterolu całkowitego	42
19	Korelacja liniowa pomiędzy stężeniem VEGF a stężeniem frakcji LDL cholesterolu	43
20	Korelacja liniowa pomiędzy stężeniem VEGF a stężeniem glikowanej hemoglobiny (HbA1c)	43
21	Korelacje liniowe pomiędzy VEGF i bFGF u ludzi zdrowych i grupie chorych na cukrzycę	44

11. ANEKS

Tab.21. Wyniki morfologii krwi obwodowej w badanych grupach

Rodzaj badania	wynik	GRUPA							
		I		II		III		IV	
		n	%	n	%	n	%	n	%
WBC	norma	14	93,3	12	100,0	13	86,7	10	100,0
	< normy	1	6,7	0	0,0	1	6,7	0	0,0
	>normy	0	0,0	0	0,0	1	6,7	0	0,0
RBC	norma	15	100,0	10	83,3	15	100,0	10	100,0
	>normy	0	0,0	2	16,7	0	0,0	0	0,0
HGB	norma	15	100,0	11	91,7	15	100,0	10	100,0
	>normy	0	0,0	1	8,3	0	0,0	0	0,0
HCT	norma	15	100,0	11	91,7	15	100,0	10	100,0
	>normy	0	0,0	1	8,3	0	0,0	0	0,0
PLT	norma	15	100,0	12	100,0	15	100,0	10	100,0
	>normy	0	0	0	0	0	0	0	0
Neutrofile	norma	3	20,0	3	25,0	4	26,7	2	20,0
	< normy	4	26,7	3	25,0	3	30,0	1	10,0
	>normy	8	53,3	6	50,0	8	53,3	7	70,0
Monocyty	norma	6	40,0	3	25,0	7	46,7	5	50,0
	< normy	9	60,0	8	66,7	8	53,3	5	50,0
	>normy	0	0,0	1	8,3	0	0,0	0	0,0
Eozynofile	norma	5	33,3	5	41,7	6	40,0	2	20,0
	< normy	1	6,7	1	8,3	1	6,7	3	30,0
	>normy	9	60,0	6	50,0	8	53,3	5	50,0
Bazofile	norma	13	86,7	12	100,0	14	93,3	9	90,0
	< normy	2	13,3	0	0,0	1	6,7	1	10,0

Nie stwierdzono istotnych różnic w wynikach badań morfologicznych krwi obwodowej pomiędzy badanymi grupami.

Tab. 22. Wyniki innych wybranych badań laboratoryjnych w badanych grupach

Rodzaj badania	GRUPA							
	I (n=15)		II (n=12)		III (n=15)		IV (n=10)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
AspAT	24,5	7,4	30,4	21,0	37,9	46,3	28,8	9,9
Bilirubina	13,9	2,4	14,7	2,6	15,1	3,2	14,6	6,6

Tab. 23. Wyniki badania proteinogramu w badanych grupach

Rodzaj badania	wynik	GRUPA							
		I		II		III		IV	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Białko całkowite	norma	15	100,0	11	91,7	15	100,0	6	60,0
	< normy	0	0,0	0	0,0	0	0,0	4	40,0
	>normy	0	0,0	1	8,3	0	0,0	0	0,0
alfa 1 globuliny	norma	4	26,7	9	75,0	5	33,3	6	60,0
	>normy	11	73,3	3	25,0	10	66,7	4	40,0
alfa 2 globuliny	norma	10	66,7	8	66,7	13	86,7	10	100,0
	< normy	0	0,0	2	16,7	0	0,0	0	0,0
	>normy	5	33,3	2	16,7	2	13,3	0	0,0
beta globuliny	norma	14	93,3	10	83,3	11	73,3	9	90,0
	< normy	1	6,7	2	16,7	4	26,7	1	10,0
gamma globuliny	norma	14	93,3	10	83,3	14	93,3	10	100,0
	>normy	1	6,7	2	16,7	1	6,7	0	0,0

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu AspAT, bilirubiny całkowitej, białka całkowitego, alfa1, alfa2, beta i gamma globulin w surowicy krwi pomiędzy grupą o kontrolną a chorymi na cukrzycę, ani pomiędzy poszczególnymi grupami chorych na cukrzycę

12. Piśmiennictwo

1. Adams L.A., Angulo P., Lindor K.D. Nonalcoholic fatty liver disease. *Can. Med. Assoc. J.* 2005;172:899-905
2. Adamis A.P., Miller J.W., Bernal M.T., i wsp. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 1994;15:445-50
3. Aiello L.P., Avery R.L., Arrigg P.G., i wsp. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med.* 1994; 1:1480-7
4. Algvere P., Seregard S. Age-related maculopathy: pathogenic features and new treatment modalities. *Acta Ophthalmol. Scand.* 2002;80:136-143.
5. Antonelli-Orlidge A., Smith S.R., D'Amore P.A.: Influence of pericytes on capillary endothelial cell growth. *Am Rev Respir Dis.* 1989;140:1129-1133
6. Ansari N.H., Zhang W., Fulep E. i wsp. Prevention of pericyte loss by trolox in diabetic rat retina. *J Toxicol Environ Health.* 1998;54:467-471
7. Benelli U., Bocci G., Danesi R. i wsp. The heparan sulfate sulphate inhibits rat corneal angiogenesis and in vitro neovascularization. *Exp Eye Res.* 1998; 67:133-142.
8. Boehm B.O., Lang G., Feldmann B. i wsp. Proliferative diabetic retinopathy is associated with a low level of the natural ocular anti-angiogenic agent pigment epithelium-derived factor (PEDF) in aqueous humor. A pilot Study. *Horm. Metab. Res.* 2003;35:382-386.
9. Boulton M., Foreman D., Williams G. i wsp. VEGF localisation in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol.* 1998;82:561-568.
10. Boyd S.R., Zachary I., Chakravarthy U. i wsp. Correlation of increased Vascular Endothelial Growth Factor With Neovascularization and Permeability in Ischaemic Central Vein Occlusion. *Arch Ophthalmol.* 2002;120:1644-1650
11. Burchill S.A., Westwood G. Mechanism of basic fibroblast growth factor-induced cell death. *Apoptosis* 2002;7:5-12.
12. Campochoaro P.A. Retinal and choroidal neovascularization. *J. Cell. Physiol.* 2002;184:301-310.
13. Cao W., Li F., Steinberg RH. i wsp. Development of normal and injury-induced gene expression of aFGF, bFGF, CNTF, BDNF, GFAP and IGF-I in the rat retina. *Exp. Eye Res.* 2001;72:591-604.
14. Chew E.Y., Klein M.L., Ferris F.L. i wsp. ETDRS Research Group: association of elevated serum lipid levels with retinal hard exudate in diabetic retinopathy: Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) Report No 22. *Arch Ophthalmol.* 1996;114:1079-1083
15. Chiarelli F., Spagnoli A., Basciani F., i wsp. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in children, adolescents and young adults with type 1 diabetes

mellitus: relation to glycemic control and microvascular complications. *Diabetic Medicine*, 2000;17:650-656.

16. Ciulla T.A., Amador A.G., Zinman B. Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema. Pathophysiology, screening, and novel therapies. *Diabetes Care* 2003;26:2653-2658
17. Ciulla T.A., Harris A., Latkany P., i wsp. Ocular perfusion abnormalities in diabetes. *Acta Ophthalmol Scand.* 2002;80:468
18. Cogan D.G., Toussaint D., Kubawara T. Retinal vascular patterns, IV: diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 1961;66:366-371
19. Dawson D.W., Volpert O.V., Gillis P. i wsp. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;9:245-248.
20. Dills D.G., Moss SE., Klein R i wsp. Is insulinlike growth factor associated with diabetic retinopathy? *Diabetes* 1991; 40: 1725-1730
21. Dorey C.K., Aouididi S., Reynaud X. i wsp. Correlation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor with extraretinal neovascularization in the rat. *Arch Ophthalmol.* 1996;114:1210-1217.
22. Elner S.G., Strieter R., Bian Z.M., i wsp. Interferon-induced protein 10 and interleukin 8. C-X-C chemokines present in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 1998;116:1597-1601
23. Fong D.S., Ferris F.L. Postępowanie praktyczne w retinopatii cukrzycowej. *Focal Points* 2003;3:1-10.
24. Frank R.N. Diabetic retinopathy. *N. Engl. J. Med.* 2004;350: 48-58.
25. Frank R.N., Amin R., Kennedy A. i wsp. An aldose reductase inhibitor and aminoguanidine prevent vascular endothelial growth factor expression in rats with long-term galactosemia. *Arch Ophthalmol.* 1997;115:1036-1047.
26. Funatsu H., Yamashita H., Ikeda T. i wsp. Relation of diabetic macular edema to cytokines and posterior vitreous detachment. *Am J Ophthalmol.* 2003;135:321-327.
27. Gao G., Li Y., Zhang D. i wsp. Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization. *FEBS Lett.* 2001;2:270-276.
28. Grant M., King LG. IGF-1 and blood vessels, implications for microvascular nad macrovascular disease. *Diabetes Reviews* 1995;3:113-125.
29. Guerrin M., Moukadiri H., Chollet P. i wsp. Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. *J Cell Physiol.* 1995;164:385-394.
30. Haberman A.B. The potential of Angiogenesis - Related Therapeutics. Decision Resources, Inc. Spectrum Therapy Markets and emerging technologies 1996;98:1-20.
31. Hanneken A., de Juan E., Lurry A., i wsp. Altered distribution of basic fibroblast growth factor in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 1991;109:1005-1010
32. Hogeboom van Buggenum I.M., Polak B.C., Reichert-Thoen J.W. i wsp. Angiotensin converting enzyme inhibiting therapy is associated with lower

vitreous vascular endothelial factor concentrations inpatients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2002;2:203-209

33. Holekamp N.M., Bouck N., Volpert O. Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Am.J. Ophthalmol.* 2002;134: 220-227.
34. Iruela-Arispe M. Bornstein P., Sage H. i wsp. Thrombospondin exerts an antiangiogenic effect on chord formation by endothelial cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991;88:5026-5030.
35. Kański J.J., Milewski A.A. Choroby Plamki. Choroby naczyniowe siatkówki 71-97. Wydawnictwo Medyczne Górnicki, Wrocław 2003
36. Karakousis P.C., John S.K., Behling K.C. i wsp. Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues. *Mol Vis.* 2001;30:154-163.
37. Katsura Y., Okano T., Noritake M., i wsp. Hepatocyte growth factor in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy and other retinal disorders. *Diabetes Care* 1998;21:1759-1765
38. Kęcik T., Mencil-Bednarek I., Kęcik D. Etiopatogeneza retinopatii cukrzycowej. *Okulistyka* 1999; 2:3-9
39. Khaliq A., Foreman D., Ahmed A., i wsp. Increased expression of placenta growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Lab Invest.* 1998;78:109-114
40. Kim S.Y., Mocanu C., Mcleod D.S. i wsp. Expression of pigment epithelium –derived growth factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in sickle cell retina and choroids. *Exp. Eye Res.* 2003;77:433-445.
41. King G.L., Suzuma K. Pigment epithelium-derived factor a key coordinator of retinal neuronal and vascular functions. *N Engl J Med.* 2000;342:349-351.
42. Klein R., Klein B.E., Moss S.E., i wsp. Glycosylated hemoglobin predicts the incidence and progression of diabetic retinopathy. *JAMA* 1998;260:2864-2869.
43. Klein R., Klein B.E.K., Moss S.E., i wsp. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy, XVII: the 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type I diabetes. *Ophthalmology* 1998;105:1801-1807
44. Kliffen M., Sharma H.S., Mooy C.M. i wsp. Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *Br. J. Ophthalmol.* 1997;81:154-162.
45. Koya D., King G.L.: Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998;47:859-866
46. Kubawara T., Cogan D.G. Retinal vascular patterns, VI: mural cells of the retinal capillaries. *Arch Ophthalmol.* 1986;69:492-497.
47. Mandl-Weber S., Cohen C.D., Haslinger B. i wsp. Vascular endothelial growth factor production and regulation in human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.* 2002;61:570-578.

48. Mechoulam H., Pierce EA. Retinopathy of prematurity. Molecular pathology and therapeutic strategy. *Am.J.Pharmacogenomics* 2003;3:261-277.
49. Miyamoto K., Ogura Y.: Pathogenetic potential of leukocytes in diabetic retinopathy. *Semin Ophthalmol.* 1999;14:233-238
50. Mori K., Gehlbach P., Ando A. i wsp. Regression of ocular neovascularization in response to increased expression of pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:2428-2434.
51. Moss S.E., Klein R., Klein B.E. i wsp. The 14-year incidence of visual loss in a diabetic population. *Ophthalmology* 1998;105:998-1004
52. Nagineni C.N., Samuel W., Nagineni S. i wsp. Transforming growth factor-beta induces expression of vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells: involvement of mitogen-activated protein kinases. *J Cell. Physiol.* 2003;197:453-462.
53. Nakamura Y., Morishita R., Nakamura S., i wsp. A vascular modulator, hepatocyte growth factor, is associated with systolic pressure. *Hypertension* 1996; 28:409-414
54. Nakamura Y., Morishita R., Higaki J., i wsp. Hepatocyte growth factor is a novel member of the endothelium-specific growth factors: additive stimulatory effect of hepatocyte growth factor with basic fibroblast growth factor but not with vascular endothelial growth factor. *J Hypertens.* 1996;14:1067-1072.
55. Nowak J.Z., Michorowska A. Neowaskularyzacja w tkankach oka: mechanizmy i rola czynników pro- i antyangiogennych . *Klinika Oczna* 2004;106:90-97.
56. Ogata N., Tombran-Tink J., Jo N. i wsp. Upregulation of pigment epithelium-derived factor after laser photocoagulation. *Am J Ophthalmol.* 2001;132:427-429.
57. Ogata N., Nikshikawa M., Nishimura T. i wsp. Inverse levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor on the vitreous of eyes with rhegmatogenous retinal detachment and proliferative vitreoretinopathy. *Am.J. ophthalmol.* 2002;133:851-852.
58. Okamoto N., Tobe T., Hackett S.F. i wsp. Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal neovascularization. *Am J Pathol.* 1997;151:281-291.
59. Ozaki H., Hayashi H., Oshima K. i wsp. Angiogenin levels in the vitreous from patients with proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmol.Res* 1996;28:356-360
60. Paget C., Lecomte M., Ruggiero D., i wsp. Modification of enzymatic antioxidants in retinal microvascular cells by glucose or advanced glycation end products. *Free Radic Biol Med* 1998;25:121-125
61. Paweletz N., Knierim M. Tumor related angiogenesis. *Crit. Rev. Oncol-Hemat.* 1989; 197-242,

62. Petersen S.V., Valnickova Z., Enghild J.J. i wsp. A physiologically relevant concentration of Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) in human blood. Purification and Characterization. *Biochem J.* 2003;374:199-206.
63. Quinn T.P., Peters K.G., De Vries C. i wsp. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;15:7533-7537.
64. Riordan-Eva P. Eye. Retinopathy in Current Medical Diagnosis and Treatment. 42nd ed. Tierney L.M., McPhee S.J., Papadakis M.A., Eds. New York, Lange Medical Books/ McGraw-Hill, 2003: 146-156
65. Robinson G.S., Pierce E.A., Rook S.L. i wsp. Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;14:4851-4856
66. Sawicki W. Histologia, PZWL, 1997
67. Shiba T., Yamamoto T., Seki U., i wsp. Screening and follow-up of diabetic retinopathy using a new mosaic 9-field fundus Photography system. *Diabetes Res Clin Pract.* 2002;55:49-56
68. Singer D.E., Nathan D.M., Fogel H.A., i wsp. Screening for diabetic retinopathy. *Ann Intern Med.* 1992;116:660-665
69. Sims D.E. The pericyte: a review. *Tissue Cell* 1986;18:153-159
70. Skopiński P. Angiogeneza – stymulATORY i inhibitory w retinopatii cukrzycowej. *Nowa Medycyna* 1997;19:43-46.
71. Smith L.E., Kopchick J.J., Chen W. i wsp. Essential role of growth hormone in ischemia - induced retinal neovascularization. *Science.* 1997;13:1706-1709
72. Speiser P., Gittelsohn A.M., Patz A. Studies on diabetic retinopathy, III: influence of diabetes on intramural pericytes. *Arch Ophthalmol.* 1968;80:332-336
73. Spranger J., Osterhoff M., Reimann M. i wsp. Loss of the antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease. *Diabetes.* 2001;50:2641-2645.
74. Stellmach V., Crawford S.E., Zhou W. i wsp. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;27:2593-2597.
75. Stompor T., Zdzienicka A., Motyka M. i wsp. Selected growth factors in peritoneal dialysis: their relationship to markers of inflammation, dialysis adequacy, residual renal function, and peritoneal membrane transport. *Perit Dial Int.* 2002;22:670-676.
76. Stone J., Chan-Ling T., Pe'er J. i wsp. Roles of vascular endothelial growth factor and astrocyte degeneration in the genesis of retinopathy of prematurity. : *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37:290-299.
77. Tang L., Both K., Taylor R. ACE inhibition and fibroblast growth factor in cultured human vascular smooth muscle. *Vasc Med.* 1999;4:129-134.

78. Thieme H., Aiello L.P., Takagi H. i wsp. Comparative analysis of vascular endothelial growth factor receptors on retinal and aortic vascular endothelial cells. *Diabetes*. 1995;44:98-103.
79. Tomanek R.J., Sandra A., Zheng W. i wsp. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor differentially modulate early postnatal coronary angiogenesis. *Circ Res* 2001;88:1135–1141
80. Tombran-Tink J., Chader G.G., Johnson L.V. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res*. 1991;53:411-414.
81. Tripathi R.C., Borisuth N.S., Li J. i wsp. Quantitative characterization of high- and low-affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on trabecular cells of the eye. *Exp Eye Res*, 1997;64:335-341.
82. Wang Y., He H., Zigler J.S. i wsp. BFGF supresses serum–deprivation-induced apoptosis in human lens epithelial cell line. *Exp Cell Res*. 1999;249: 123-130.
83. Wilczyński M., Borucka A. Powikłania okulistyczne cukrzycy. *Okulistyka*, 2008; 3:3-29.
84. Yanagawa T., Matsuo T., Matsuo N. Aqueous vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor decrease during regression of rabbit pupillary membrane. *Jpn J Ophthalmol*. 1988; 42:157-161.
85. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2005. Zasady leczenia retinopatii cukrzycowej. *Diabetologia Praktyczna* 2004. Supl. D 23