

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

**Ocena wpływu wybranych czynników wzrostowych i zapalnych na
rozwój nefropatii oraz zmian naczyniowych u chorych z cukrzycą typu 2.**

Praca doktorska

Przemysław Miarka

Promotor: Prof. dr hab. med. Władysław Sułowicz

Pracę wykonano w Katedrze i Klinice Nefrologii CMUJ

Kierownik Katedry: Prof. dr hab. med. Władysław Sułowicz

Kraków 2009

Pracę tę dedykuje mojej Rodzinie a zwłaszcza mojej córce Kasi

*Składam serdeczne podziękowania
Mojemu Promotorowi Profesorowi dr hab. med. Władysławowi Sułowiczowi
za opiekę naukową oraz nieocenioną pomoc w realizacji niniejszej pracy.*

Spis treści:

WYKAZ SKRÓTÓW.....	7
1. WSTEP.....	9
1.1. Epidemiologia nefropatii cukrzycowej.....	10
1.2. Rozpoznanie i podział nefropatii cukrzycowej.....	11
1.3. Czynniki ryzyka nefropatii cukrzycowej.....	14
1.4. Mechanizm powstawania nefropatii cukrzycowej.....	16
1.5. Zmiany w mikrokrążeniu.....	18
1.6. Zgrubienie błony podstawnej kłębuszka.....	19
1.7. Zmiany makronaczyniowe u chorych z cukrzycą.....	20
1.8. Czynniki wzrostu, cytokiny i inne czynniki regulujące wzrost komórek i odczyn zapalny.....	21
1.9. Cytokiny prozapalne a zmiany w nefropatii cukrzycowej.....	24
1.10. Zmiany naczyniowe oraz metody ich oceny u chorych na cukrzycę typu 2.....	26
2. CELE PRACY.....	29
3. MATERIAŁ I METODY.....	30
3.1. Charakterystyka badanych grup chorych.....	30
3.2. Oznaczenia biochemiczne.....	32
3.3. Wskaźnik masy ciała BMI.....	33
3.4. Pomiar ciśnienia tętniczego krwi.....	33
3.5. Badania obrazowe układu krążenia.....	34
3.5.1. Pomiar szybkości rozchodzenia się fali tętna w aorcie.....	34
3.5.2. Pomiar grubości kompleksu intima-media w badanych grupach.....	35
3.5.3. Badanie mikrokrążenia skórniego.....	36
3.6. Analiza porównawcza badanych grup.....	38

4. WYNIKI.....	39
4.1. Charakterystyka badanych parametrów w grupie chorych z nefropatią cukrzycową.....	39
4.2. Charakterystyka badanych parametrów w grupie kontrolnej.....	48
4.3. Charakterystyka porównawcza grupy chorych z nefropatią cukrzycową i chorych z grupy kontrolnej.....	50
4.4. Charakterystyka grupy chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji..	61
4.5. Korelacje wyników w grupie badanej.....	69
4.5.1. Zależność pomiędzy zmianami zaobserwowanymi w badaniach oceniający funkcję i strukturę naczyń u chorych z nefropatią cukrzycową a wybranymi wynikami badań biochemicznych i antropometrycznych oraz czynnikami zapalnymi i wzrostowymi.....	69
4.5.2. Zależność pomiędzy parametrami progresji niewydolności nerek u chorych z nefropatią cukrzycową a wybranymi wynikami badań biochemicznych i antropometrycznych oraz czynnikami zapalnymi i wzrostowymi.....	77
4.6. Korelacje wyników dla grupy z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji....	81
4.6.1. Zależność pomiędzy badanymi parametrami w badaniach oceniający funkcję i strukturę naczyń u chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji a wybranymi wynikami badań biochemicznych i antropometrycznych oraz czynnikami zapalnymi i wzrostowymi.....	81
4.6.2. Zależność pomiędzy parametrami progresji niewydolności nerek u chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji a wybranymi wynikami badań biochemicznych i antropometrycznych oraz czynnikami zapalnymi i wzrostowymi.....	88
4.7. Analiza regresji wieloczynnikowej dla grupy chorych z nefropatią cukrzycową.....	93
5. DYSKUSJA.....	96
5.1. Markery stanu zapalnego a nefropatia cukrzycowa.....	96

5.2. Czynniki wzrostowe a nefropatia cukrzycowa.....	100
5.3. Markery stanu zapalnego i czynniki wzrostowe a IMT i PWV.....	102
5.4. Parametry oceny mikrokrazenia a nefropatia cukrzycowa.....	103
6. WNIOSKI.....	106
7. PIŚMIENNICTWO.....	107
8. SPIS TABEL.....	115
9. SPIS RYCIN.....	119
10. STRESZCZENIE/ABSTRACT.....	121

Wykaz skrótów:

AGE – zaawansowane produkty glikacji (advanced glycation endproducts)

AUC – pole pod krzywą w badaniu mikrokążenia (area under the curve)

BMI – wskaźnik masy ciała (body mass index)

CSF – czynnik wzrostu koloni komórkowych (colony stimulating factor)

CTGF - czynnik wzrostu tkanki łącznej (connective tissue growth factor)

DAG - diacyloglicerol

DBP – ciśnienie rozkurczowe

GFR - współczynnik przesączania kłębuszkowego (glomerular filtration rate)

hsCRP – wysoko czułe białko C-reaktywne

IL-1 – interleukina 1

IL-6 – interleukina 6

IL-12 – interleukina 12

IMT - grubość kompleksu intima-media (intima-media tickness)

MAPK – kinaza aktywowana mitogenem (mitogen activated protein kinase)

MFb – przepływ w spoczynku (mean skin blood flow in basal conditions)

MF44 – przepływ po ogrzaniu do temperatury 44 stopni (blood flow in 44 degrees Centigrade)

PF – przepływ szczytowy po okluzji (peak flow)

PDGF - czynnik wzrostu pochodzący z płytek (platelet-derived growth factor)

PP – ciśnienie tętna – (puls pressure)

AoPWV – prędkość rozchodzenia się fali tętna w aorcie (Aortic Pulse Wave Velocity).

RAA – układ renina – angiotensyna - aldosteron

RAGE - receptory dla AGE

RAS - system renina-angiotensyna

SBP – ciśnienie skurczowe

sTNF RII rozpuszczalny receptor dla czynnika martwicy nowotworu

TGF β – transformujący czynnik wzrostu (transforming growth factor β)

VEGF - śródbłonkowy czynnik wzrostu (vascular endothelial growth factor)

1. Wstęp

Cukrzyca stanowi jeden z głównych problemów zdrowotnych społeczeństw rozwiniętych cywilizacyjnie. W ostatnich latach obserwuje się znaczny wzrost chorobowości i zachorowalności na cukrzycę typu 2. Ma to związek z jednej strony z przedłużeniem życia chorych z cukrzycą, dzięki wprowadzeniu nowoczesnych schematów postępowania terapeutycznego, a z drugiej strony ze zwiększoną zachorowalnością na cukrzycę typu 2. To drugie zjawisko uwarunkowane jest między innymi niewłaściwym trybem życia, małą aktywnością fizyczną, dodatnim bilansem kalorycznym, otyłością i nadwagą. Niektórzy autorzy wprowadzili określenie „pandemii otyłości i cukrzycy - diabetesy (diabetes i obesity). Skutkiem „pandemii cukrzycy” jest wzrost liczby chorych z cukrzycą i jej przewlekłymi powikłaniami. Liczbę chorych na cukrzycę na świecie w 2000 roku szacowano na 151 milionów i przewidywano jej wzrost w 2010 do około 221 milionów (wzrost chorobowości o 46%) [1]. Natomiast według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) liczba aktualnie chorych na cukrzycę wynosi około 171 milionów, a do 2025 roku wzrośnie do około 300 milionów. W Polsce szacunkowo problem cukrzycy dotknął około 5,6% dorosłej populacji [2], z tego około 10 % to chorzy z cukrzycą typu 1, a 90 % chorzy z cukrzycą typu 2.

Przewlekłe powikłania cukrzycy – w postaci mikroangiopatii i makroangiopatii stanowią główne przyczyny inwalidztwa, niezdolności do pracy oraz upośledzenia jakości życia i zgonów pacjentów z cukrzycą. Ponad 75% pacjentów z cukrzycą umiera z powodu choroby niedokrwiennej serca i chorób układu krążenia. Choroby układu krążenia są obecne w chwili rozpoznania cukrzycy typu 2 u ponad połowy pacjentów. Zmiany miażdżycowe u chorych z cukrzycą występują wcześniej niż populacji ogólnej i są bardziej zaawansowane.

Zapobieganie rozwojowi i progresji przewlekłych powikłań cukrzycy jest jednym z głównych celów terapeutycznych, jaki stawiają sobie diabetolodzy i współpracujący z nimi w

opieki nad chorymi z cukrzycą specjaliści nefrolodzy. Opublikowana w ostatnich latach Deklaracja St. Vincent postawiała sobie za cel zmniejszenie o połowę przewlekłych powikłań cukrzycy [3]. W miarę postępu leczenia cukrzycy, wprowadzenia na rynek farmaceutyczny nowych insulin i sposobów ich podawania, jak na przykład intensywna funkcjonalna insulinoterapia, pompy insulinowe, czy stosowanie doustnych leków przeciwcukrzycowych w postaci schematów leczenia skojarzonego, pod kontrolą ciągłego monitorowania glikemii przez pacjenta pod nadzorem personelu medycznego, znacznie zmniejszyła się liczba powikłań ostrych, takich jak ciężkie postacie ketokwasicy cukrzycowej. Do poprawy jakości opieki nad chorym na cukrzycę przyczyniły się także programy zmierzające do wczesnego wykrywania cukrzycy i poprzez odpowiednie leczenie zapobieganie jej ostrym powikłaniom. Natomiast przewlekłe powikłania cukrzycy, nadal stanowią duży problem kliniczny, stąd bardzo istotne znaczenie ma wykrycie czynników sprzyjających zapoczątkowaniu i progresji zmian w nerkach we wczesnym okresie ich powstawania. Wykrycie wczesnych stadiów nefropatii cukrzycowej daje szansę przy właściwym postępowaniu leczniczym na zwolnienie lub powstrzymanie jej przebiegu a nawet w bardzo wczesnych etapach na cofnięcie zmian.

1.1. Epidemiologia nefropatii cukrzycowej.

Chorzy z cukrzycą stanowią prawie 30% pacjentów poddawanych leczeniu nerkozastępczemu w Europie a w Stanach Zjednoczonych odsetek ten sięga nawet powyżej 50 %. Powikłania ze strony nerek są więc nie tylko znacznym obciążeniem zdrowotnym dla pacjenta z cukrzycą, ale także obciążeniem ekonomicznym społeczeństwa. U chorych na cukrzycę typu 1 ryzyko rozwoju mikroalbuminurii wynosi 20 – 30 % po 20 latach trwania choroby, natomiast u chorych na cukrzycę typu 2 jak wykazało badanie UKPDS ryzyko wystąpienia mikroalbuminurii wynosi 2 % na rok trwania choroby [4]. Ryzyko wystąpienia niewydolności nerek w populacji chorych na cukrzycę jest zamiennie większe niż u osób bez cukrzycy [5]. Rozwinie się ona u około 30 - 40 % chorych z typem 1 cukrzycy [6,7] i około 15 – 20 % chorych z typem 2 cukrzycy, prowadząc do niewydolności nerek [8]. Pacjenci z nefropatią cukrzycową stanowią około 24,7 % wszystkich dializowanych w Polsce [9]. Wczesne rozpoznanie zmian cukrzycowych w nerkach i czynników sprzyjających jej rozwojowi ma istotne znaczenie w zapobieganiu lub odsunięciu w czasie schyłkowej niewydolności nerek i rozpoczęciu leczenia nerkozastępczego.

1.2. Rozpoznanie i podział nefropatii cukrzycowej.

Za standard przy rozpoznawaniu wczesnych stadiów nefropatii cukrzycowej uważa się oznaczenia stopnia wydalania albuminy w dobowej zbiorce moczu lub oznaczenie stosunku albumina/kreatynina. U chorych z cukrzycą typu 1 badanie to wykonujemy zaraz po zakończeniu okresu dojrzewania płciowego lub po 5 latach trwania choroby, natomiast u chorych z cukrzycą typu 2 bezpośrednio po jej rozpoznaniu (pomiar powtarzany jest co rok). Aby rozpoznać nefropatię cukrzycową należy otrzymać dwukrotnie dodatni wyniki z trzech przeprowadzonych oznaczeń co daje podstawę do rozpoznania mikroalbuminurii [Tabela 1].

Tabela 1. Klasyfikacja albuminurii.

	Normoalbuminuria	Mikroalbuminuria	Makroalbuminuria
wydalanie alb. mg/24h	<30	30-300	>300
wydalanie alb. µg/min	<20	20-200	>200
stęż alb. w moczu	<20	20-200	>200
stosunek alb./kreat. (mg/g)	<20m <30k	20-200m 30-300k	>200m >300k
stosunek alb./kreat. (mg/mmol)	<2,5m <3,5k	1,5-25m 3,5-35k	
stosunek alb./kreat. (mg/g)	<30	30-300	>300

Badaniami pomocnymi w rozpoznaniu cukrzycowej choroby nerek mogą być:

- oznaczenie mikroalbuminurii i kreatyniny w moczu,
- oznaczenie kreatyniny i mocznika w surowicy,
- ocena filtracji kłębuszkowej (metody klirensowe, wzór eGFR),
- oznaczenie cystatyny C.

Wykonując pomiar albuminy w moczu należy pamiętać o czynnikach wpływające na jej wydalanie tą drogą, mogących zafałszować wynik badania, do których zaliczymy [8,10]:

- wysiłek fizyczny,
- stany infekcyjne,
- niewyrównane ciśnienie tętnicze,
- klinicznie jawna niewydolność serca,
- okres około operacyjny,
- zaburzenia gospodarki wodno-elektrolitowej.

Do oceny stopnia zaawansowania zmian w nerkach stosuje się powszechnie podział zaproponowany przez Mogensena [Tabela 2]. Ostatnio szczególną uwagę kładzie się na badanie czynników przyczyniających się do zapoczątkowania i progresji zmian w nerkach.

Tabela 2. Klasyfikacja nefropatii cukrzycowej wg Mogensena.

stadium	objawy	cechy charakterystyczne	GFR ml/min	wydalanie albuminy	ciśnienie tętnicze
I	hiperfiltracja i przerost	duże nerki i hiperfiltracja kłębuszków	150		prawidłowe
IIa 2 – 15 lat	utajona nefropatia	prawidłowe wyd. albuminy		prawidłowe	prawidłowe
IIb >15 lat	z obecnymi zmianami morfologicznymi	prawidłowe wyd. albuminy		prawidłowe	nieznacznie podwyższone
IIIa	wczesna nefropatia	podwyższone wyd. albuminy	160	20-70 ug/min	często podwyższone
IIIb	wczesna nefropatia	podwyższone wyd. albuminy	130	70-200 ug/min	często podwyższone
IVa	jawna nefropatia	>200 ug/min	130-70	białkomocz	nadciśnienie
IVb	jawna nefropatia	>200 ug/min	70-30	białkomocz	nadciśnienie
IVc	jawna nefropatia	<200 ug/min	30-10	białkomocz	nadciśnienie
V	mocznica	schyłkowa niewydolność nerek	0-10	spadek białkomoczu	znaczne nadciśnienie

Rozpoznając nefropatię cukrzycową należy pamiętać, że u osób z cukrzycą może rozwinąć się także glomerulopatia niecukrzycowa. W diagnostyce różnicowej należy brać pod uwagę czas trwania choroby, obecność innych powikłań o charakterze mikroangiopatii, charakter białkomoczu, obecność erytrocyturii, progresję zmian, obecność nawrotowych zakażeń dróg moczowych. W przypadkach wątpliwych wskazana jest biopsja nerki, której wynik może mieć to duży wpływ na wybór leczenia zmian w nerkach [Tabela 3].

Tabela 3. Cechy charakterystyczne glomerulopatii cukrzycowej i niecukrzycowej.

<u>Glomerulopatia cukrzycowa</u>	<u>Glomerulopatia niecukrzycowa</u>
- obecna retinopatia i neuropatia - czas trwania >10 lat - białkomocz > 1g/d. i długi czas trwania - nieobecność erytrocyturii u 2/3 chorych - brak depozytów immunologicznych - hialinoza, arterioskleroza, bliznowacenie - obecność guzków Kimmelstiela-Wilsona - długi wywiad nerkowy - wolny spadek GFR	- nieobecność retinopatii i neuropatii - czas trwania <10 lat - białkomocz > 1 g/d. zesp. nerczycowy - erytrocyturia dysmorficzna - depozyty immunologiczne w błonie - arterioskleroza o mniejszym nasileniu - nieobecność guzków Kimmelstiela-Wilsona - krótki wywiad nerkowy

1.3. Czynniki ryzyka nefropatii cukrzycowej.

Rozwój nefropatii cukrzycowej zależy od czasu trwania cukrzycy, wyrównania glikemii, występowania hiperlipidemii, wartości ciśnienia tętniczego krwi i czynników genetycznych. Wyniki ostatnio publikowanych badań wskazują na istotną rolę prognostyczną w rozwoju nefropatii czynników wzrostowych i cytokin prozapalnych. Powyższe czynniki mają związek z progresją zmian, w obrębie błon podstawnych naczyń włosowatych kłębuszka nerkowego w postaci rozplemu i włóknienia zrębu, prowadząc do zaburzeń czynności kłębuszków, oraz ich niedokrwienia i zeszklwienia.

Główną przyczyną powikłań mikronaczyniowych w cukrzycy jest przewlekłe narażenie na wysokie stężenia glukozy, co potwierdzają wyniki badań klinicznych, epidemiologicznych i eksperymentalnych. W badaniach Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) i United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) kluczowymi determinantami uszkodzenia tkanek w cukrzycy były nasilenie hiperglikemii i czas trwania cukrzycy. Wpływ działania obu tych czynników jest addytywny, stąd najczęściej i najbardziej znaczące uszkodzenia występują u osób z długim czasem trwania źle kontrolowanej cukrzycy [11,12,13].

Ponadto istotnymi czynnikami patogenetycznymi dla rozwoju nefropatii cukrzycowej są nadciśnienie tętnicze i zaburzenia lipidowe. Wśród innych czynników zwiększających ryzyko wystąpienia przewlekłych powikłań cukrzycy można wymienić palenie papierosów i spożycie alkoholu. Do nowych czynników, których rola w patogenezie powikłań naczyniowych w cukrzycy nie jest jeszcze w pełni ugruntowana należy podwyższone stężenie homocysteiny w surowicy krwi.

Coraz więcej danych wskazuje, że istotną rolę w rozwoju przewlekłych powikłań u chorych z cukrzycą odgrywają czynniki genetyczne [14], między innymi takie jak:

- geny regulujące syntezę struktur zewnątrzkomórkowych:
 - kolagenu typu IV,
 - siarczanu heparanu (N-sulfotransferazy),
 - glukozaminył-N-deacylazy,
 - dekoryny,
- geny nadciśnienia tętniczego:
 - przeciwtransportu NHE,
 - syntezy angiotensynogenu – M235T,
 - polimorfizmu D genu enzymu konwertazy angiotensyny,

- polimorfizmu H2 genu ANP,
- receptorów angiotensyny AT1 i AT2,
- receptora bradykininy,
- geny wrażliwości na insulinę i niezależnego od insuliny metabolizmu glukozy:
 - syntezy transporterów glukozy w nerkach GLUT1 i GLUT4,
 - allel Ala 12 genu PPAR γ
 - reduktazy aldozy,
 - polimorfizm C1152A genu metabolizmu AGEP,
- inne:
 - receptora IL-1,
 - inhibitora aktywatora plazminogenu,
 - obecności allelu E2 apoproteiny [8].

1.4. Mechanizm powstawania nefropatii cukrzycowej.

Ostatnio ukazało się wiele badań dotyczących patogenezy rozwoju nefropatii cukrzycowej na poziomie komórkowym, jednak jej etiopatogeneza pozostaje w znacznym stopniu nieznana. Mechanizmy patogenetyczne, przyczyniające się do zapoczątkowania i rozwoju nefropatii cukrzycowej to:

- 1) biochemiczne mechanizmy uszkodzenia tkanek przez hiperglikemię,
- 2) hemodynamiczne zmiany zachodzące pod wpływem hiperglikemii,
- 3) nieprawidłowa stymulacja komórek i nadmierna ekspansja macierzy mesangium w wyniku stymulacji przez hiperglikemię czynników wzrostowych.

Głównym czynnikiem powodującym uszkodzenie tkanek u chorych z cukrzycą jest hiperglikemia, czas jej trwania i stopień nasilenia. W warunkach fizjologicznych cykl

przemian glukozy obejmuje szlak glikolizy i pentozy. W warunkach hiperglikemii następuje nasilenie przemian, także torami alternatywnymi (tor poliolowy i heksozaminowy). Glukoza staje się wówczas substratem do nasilonej syntezy DAG (diacyloglicerolu), odpowiedzialnego za wewnątrzkomórkową aktywację kinazy białkowej C, ważnego enzymu szlaku przekazywania sygnałów. Ponadto utrzymująca się hiperglikemia prowadzi do nasilonej glikacji białek i powstania trwałych, pośrednich i końcowych produktów – AGE (advanced glycation endproducts), wiążących się krzyżowo kolejno z innymi białkami. AGE zdolne są do aktywacji wielu komórek poprzez wiązanie się ze swoistymi receptorami na powierzchni monocytów, makrofagów, komórek śródbłonna, a także komórek mezangium. Aktywowane komórki uwalniają cytokiny prozapalne np. (IL-1, IL-6, IL-12, TNF α) oraz czynniki wzrostowe [15].

Tak więc na poziomie komórki hiperglikemia przyczynia się do uszkodzenia tkanek poprzez następujące szlaki biochemiczne: szlak poliolowy, powstawanie zaawansowanych produktów końcowych glikacji (AGEs), szlak kinazy białkowej C i szlak heksozaminowy. Wszystkie te mechanizmy mogą wiązać się z nadprodukcją anionu nadtlenkowego przez mitochondria, które metabolizują nadmiar glukozy [16,17].

Hiperglikemia prowadzi do glikacji istotnych fizjologicznie białek, co może zmieniać ich budowę i prowadzić do upośledzenia funkcji. Zmodyfikowane składniki macierzy pozakomórkowej następnie reagują nieprawidłowo z innymi składnikami i receptorami macierzy (integrynami), co może prowadzić do zakłócenia przekazywania sygnałów pomiędzy macierzą i komórkami oraz dysfunkcję komórek. Natomiast zmodyfikowane białka krążące we krwi mogą wiązać się z receptorami AGE, aktywować je i powodować produkcję cytokin zapalnych i czynników wzrostowych, które mogą powodować patologiczne zmiany w naczyniach. Receptory dla AGE (RAGE) mogą przyczyniać się do wzrostu stresu oksydacyjnego i aktywacji szlaków przekazywania sygnałów, takie jak kinaza białkowa C czy

MAPK (*mitogen activated protein kinase*). W macierzy pozakomórkowej powstawanie AGE zmienia właściwości i funkcje wielu ważnych molekuł, takich jak kolagen, czy laminina [13,18]. Prowadzi to do zaburzeń tworzenia sieciowej struktury kolagenu, a także zmniejsza wiązanie z kolagenem IV i proteoglikanem siarczanem heparanu.

Według Brownlee wyniki ostatnich badań sugerują, że wszystkie cztery biochemiczne mechanizmy patogenetyczne opisane powyżej mogą pochodzić z jednego procesu indukowanego hiperglikemią, a mianowicie nadprodukcji nadtlenu przez mitochondrialny łańcuch transportu elektronów [19]. Nadtlenek, jeden z wolnych rodników tlenowych, może w różny sposób prowadzić do uszkodzenia komórek przez tzw. stres oksydacyjny.

1.5. Zmiany w mikrokrazeniu.

Pod wpływem przewlekłego działania hiperglikemii dochodzi do zmian w mikrokrazeniu, prowadzących do upośledzenia perfuzji, niedokrwienia i dysfunkcji tkanek unaczynionych przez zajęte naczynia. Wydaje się, że główną zmianą patologiczną w mikrokrazeniu jest fizjologiczne przesunięcie w kierunku skurczu naczyń, za czym przemawia upośledzenie funkcji rozkurczowej naczyń i podwyższona aktywność naczynioskurczowa [20]. Podwyższone wewnątrzkomórkowe stężenie glukozy wywiera wpływ na czynniki regulujące napięcie naczyń prowadząc do zmniejszenia biodostępności tlenu azotu (NO), zwiększenia produkcji czynników naczynioskurczowych, takich jak endotelina -1 i angiotensyna II. Ponadto wpływa ono na powstawanie czynników regulujących przepuszczalność naczyń takich jak śródbłonkowy czynnik wzrostu (*vascular endothelial growth factor*, VEGF). Zwiększona przepuszczalność naczyń należy do najwcześniejszych zmian w mikrokrazeniu. Progresywne zwężenie światła mikronaczyń w

kłębuszkach u chorych z cukrzycą przyczynia się do ich niedrożności, utraty podocytów i upośledzenia funkcji nerek.

1.6. Zgrubienie błony podstawnej kłębuszka.

Zgrubienie błony podstawnej jest wynikiem zwiększonej syntezy białek macierzy pozakomórkowej, przede wszystkim kolagenu typu IV i fibronektyny, jak i zmniejszonej ich degradacji. Do mediatorów zwiększających produkcję białek macierzy w kłębuszku należą między innymi angiotensyna II, TGF beta i czynnik wzrostu tkanki łącznej CTGF (connective tissue growth factor). Degradacja białek macierzy jest katalizowana przez metaloproteinazy zawarte w macierzy. Aktywność metaloproteinaz jest obniżona w cukrzycy, w wyniku zmniejszenia produkcji aktywnych postaci enzymu lub też zwiększenia tkankowego inhibitora metaloproteinaz [22,23].

Zmiany w składzie błony podstawnej kłębuszka wiążą się ze zmianą jej przepuszczalności i nagromadzeniem macierzy pozakomórkowej, prowadząc do jego zwłóknienia i zmniejszenia zdolności filtrującej. Do wzrostu przepuszczalności prowadzi prawdopodobnie zwiększone ciśnienie filtracji w kłębuszku, ale także zmieniony ładunek elektryczny błony filtracyjnej. Zwiększenie przepuszczalności kapilar prowadzi do wzrostu wydalania białek o masie cząsteczkowej 44 –150 kDa. Przyczyniają się do tego zmiany hemodynamiczne: zwiększone ciśnienie systemowe i wewnątrzkłębuszkowe. Zgrubienie

błony podstawnej, ekspansja mezangium stanowią dominujące zmiany morfologiczne we wczesnej nefropatii cukrzycowej.

Wyniki badań uzyskanych z biopsatów nerkowych u ludzi wskazują na rolę **uszkodzenia podocytów**, zarówno czynnościowe jak i strukturalne występujące na wczesnych etapach w historii naturalnej nefropatii cukrzycowej. Zmiany biochemiczne i hemodynamiczne w cukrzycy obejmujące hiperglikemię, nieenzymatyczną glikację białek a także stres mechaniczny związany z nadciśnieniem, powodują obniżenie zawartości nefryny, istotnego białka błony szczelinowej, o właściwościach przekaźnika sygnałów przeciw apoptozie. Utrata nefryny prowadzi do zaniku wypustek stopowatych podocytów i zwiększenia białkomoczu. Kluczowym mediatorem supresji nefryny jest angiotensyna II, która aktywuje również szlaki sygnałowe czynników wzrostowych takie jak układy TGF beta i VEGF.

Badanie Durvasula i wsp. wykazało, że podocyty stanowią część lokalnego systemu renina-angiotensyna (RAS) [24]. Przyjmuje się, że podocyty mają przeciwdziałać zależnemu od ciśnienia elastycznemu rozciąganiu się kapilar kłębuszka. Zaburzenie tej funkcji, w przypadku zbyt wysokiego ciśnienia prowadzi do rozszerzenia kapilar, które poprzedza rozwój segmentalnego stwardnienia kłębuszków. Zwiększenie tonusu podocytów w odpowiedzi na wzrost ciśnienia zachodzi poprzez system sygnałów, w którym pośredniczą receptory typu 1 dla angiotensyny II. Blokada angiotensyny II w chorobach nerek może wywierać podwójny efekt: na poziomie arterioli, zmniejszając ciśnienie w kapilarach kłębuszka i działając bezpośrednio na podocyty, powodując w ten sposób: obniżenie tonusu podocyta, zmniejszenie tempa apoptozy i obniżenie przeciekania białek [25].

Apoptoza odgrywa istotną rolę w rozwoju nefropatii, ponieważ utrata komórek może prowadzić do zmniejszenia gęstości podocytów i przyczyniać się do progresji niewydolności nerek. Istnieją dane, że kluczową rolę w tym procesie odgrywa system sygnałów

przekazywany przez TGF. Blokada angiotensyny II zmniejsza białkomocz nie tylko poprzez obniżenie ciśnienia tętniczego, ale także poprzez interferencję z degeneracją białek (takich jak ZO1, czy nefryna), istotnych dla funkcji błony jako bariery.

1.7. Zmiany makronaczyniowe u chorych z cukrzycą.

Pacjenci z cukrzycą charakteryzują się zwiększoną zapadalnością i umieralnością na choroby układu krążenia. Zmiany obejmują naczynia wieńcowe prowadząc do zawałów mięśnia sercowego, naczynia mózgowe, wiążące się z przemijającym niedokrwieniem lub ostrym udarem mózgu, oraz naczynia obwodowe powodujące niedokrwienie kończyn dolnych, chromanie przestankowe oraz zgorzel. Do markerów procesów miażdżycowych w naczyniach należą pomiar grubości intima – media (IMT), pomiar sztywności naczyń tętniczych (PWV), oraz pomiar zmian zachodzących w mikrokrażeniu.

W patogenezie powstawania zmian miażdżycowych w naczyniach należy podkreślić rolę zaburzeń lipidowych, z odkładaniem się lipoprotein LDL w przestrzeni podśródbłonkowej, co powoduje indukcję przewlekłego subklinicznego stanu zapalnego, adhezję i migrację monocytów/makrofagów do przestrzeni podśródbłonkowej, oraz ich rozplem. W konsekwencji te zmiany doprowadzają do powstawania nacieczeń tłuszczowych, a następnie blaszek miażdżycowych, przyczyniających się do zwężenia światła naczynia, a w przypadku pęknięcia blaszki do ostrego incydentu naczyniowego [26]. Inne czynniki biorące udział w rozwoju zmian miażdżycowych to nadciśnienie tętnicze, palenie papierosów, a także czynniki toksyczne, które uszkadzając śródbłonek zapoczątkowują rozwój zmian miażdżycowych.

Ostatnio dużą rolę z rozwoju zmian miażdżycowych przypisuje się przewlekłemu stanowi zapalnemu. Do markerów tego stanu zapalnego, który według niektórych danych ma być wspólnym podłożem dla rozwoju insulinooporności w cukrzycy typu 2 i powikłań o typie

makroangiopatii cukrzycowej należą cytokiny i czynniki wzrostowe, oraz ich receptory, których stężenie w surowicy można oznaczać metodami immunochemicznymi [27,28].

1.8. Czynniki wzrostowe, cytokiny i inne czynniki regulujące wzrost komórek i uczestniczące w reakcji zapalnej.

W ciągu ostatnich kilku lat wiedza na temat przebiegu klinicznego nefropatii cukrzycowej i czynników, które mają wpływ na progresję uszkodzenia nerek znacznie się powiększyła, mimo to czynniki prowadzące do uszkodzenia nerek u osób z przewlekłą hiperglikemią nie są do końca poznane. Wyniki ostatnich badań wykazały, że stan zapalny a w szczególności udział cytokin prozapalnych odgrywa znaczną rolę w rozwoju powikłań mikroangiopatycznych cukrzycy.

Interleukiny są to drobnocząsteczkowe glikoproteiny, które działają zwykle w stężeniu pikomolowym. Wydzielane są przez różne komórki (lokalne i systemowe), na ogół pod wpływem różnych bodźców. Zdolność do produkcji cytokin posiadają między innymi komórki mezangilane, endotelialne, kłębuszkowe i nabłonka cewek nerkowych a także monocyty i makrofagi. Stanowią one bardzo heterogenną grupę cząsteczek, obecnie wyróżnia się wśród nich: chemokiny, interleukiny, interferony oraz hematopoetyny. Spełniają one następującą rolę:

- uczestniczą w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej - indukowanej przez makrofagi, które zetknęły się z czynnikiem zakaźnym,
- regulują procesy dojrzewania, proliferacji i stymulacji aktywności limfocytów - indukowane po rozpoznaniu przez limfocyty T swoistego antygeny,
- regulują przebieg reakcji zapalnej, w której uczestniczą komórki odpowiedzi nieswoistej pobudzone przez limfocyty T po rozpoznaniu swoistego antygeny,

- regulują wzrost i różnicowanie się niedojrzałych leukocytów.

Interleukiny są cytokinami, które umożliwiają komunikację leukocytów ze sobą i pozwalają na wpływ jednych populacji leukocytów na inne i *vice versa*. Aktualnie opisanych jest 35 interleukin. Role najważniejszych z nich przedstawia tabela 4.

Tabela 4. Wybrane interleukiny i ich rola w reakcji zapalnej.

interleukina	komórka wytwarzająca	rola
IL-1	monocyty, makrofagi, limfocyty B, komórki dendrytyczne	inicjuje stan zapalny, pobudza wytwarzanie IL-6, dojrzewanie i proliferację limfocytów B, aktywację komórek NK
IL-6	monocyty, makrofagi, komórki endotelialne i inne	stymuluje różnicowanie limfocytów B, aktywuje limfocyty T, stymuluje produkcję białek ostrej fazy, bierze udział w krwiotworzeniu.
IL-10	monocyty, makrofagi, mastocyty, limfocyty T i B	rola immunosupresyjna, uczestniczy w wygaszaniu odpowiedzi odpornościowej i w immunotolerancji
IL-12	makrofagi, komórki dendrytyczne	inicjuje różnicowanie limfocytów T, aktywuje komórki NK

Cytokiny hematopoetyczne (CSF – colony stimulating factor) są to czynniki wpływające na procesy różnicowania komórek szlaku krwiotworzenia. Zaliczamy do nich:

- G-CSF wpływa na powstawanie kolonii granulocytów - pobudza tworzenie granulocytów w szpiku,
- M-CSF stymuluje powstawanie kolonii makrofagów oraz wpływa na dojrzałe monocyty i makrofagi,
- GM-CSF- powstawanie granulocytów i makrofagów oraz wpływa na limfocyty,
- SCF – (stem cell factor) – wpływa na komórki macierzyste hemopoezy,

- erytropoetyna – pobudza rozwój erytrocytów,
- oraz zaliczane do tej grupy są także IL-3, IL-5, IL-6 [29].

Interferony to białka produkowane przez komórki układu odpornościowego, odpowiedzialne głównie za obronę przeciwko wirusom, pasożytom oraz komórkom nowotworowym. Jest to grupa pięciu cytokin mająca wpływ na hamowanie produkcji większości obcych białek w zainfekowanych komórkach. Interferony typu I (α , β , κ , ω) są wydzielane przez leukocyty i inne komórki zakażone wirusem. Interferon typu II (IFN- γ) - wydzielany przez limfocyty T, NKT i komórki NK po pobudzeniu obecnością antygeny wirusowego. Interferon typu III biorą udział w ścieżce sygnałowej i współdziałają min. z IL-10 [30,31].

Chemokiny (*chemoattractant cytokines*) to niskocząsteczkowe białka, (o masie około 8 a 12 kD zbudowane z 70–100 aminokwasów), których aktywność związana jest z pobudzeniem specyficznych dla nich receptorów błonowych. Aktualnie opisanych zostało około 40 ludzkich chemokin. Efekt wywoływany przez chemokiny związany jest z rodzajem receptora i powoduje aktywowanie szeregów szlaków, wewnątrz-cytoplazmatycznych, które kontrolują zarówno zmiany funkcjonalne jak i morfologiczne odpowiedzialne za migrację komórki, jak również zaangażowane są w kontrolę aktywacji, proliferacji i apoptozy komórki.

Nadrodzina cząsteczek TNF stanowi ponad 20 cząsteczek białkowych o podobnej budowie, nie wszystkie jednak są cytokinami (mogą to być białka błonowe). Najważniejsze z cytokin tej nadrodziny to: TNF czynnik martwicy nowotworów - jedna z najważniejszych cytokin prozapalnych i cytotoksycznych.

pozostałe cytokiny/czynniki wzrostowe - Najważniejszą cytokiną zaliczaną tutaj jest TGF- β , transformujący czynnik wzrostu - hamujący odpowiedź odpornościową.

1.9. Cytokiny prozapalne a zmiany w nefropatii cukrzycowej.

W nerkach pacjentów z nefropatią wykazano wyższą ekspresję czynnika przekształcającego beta **TGF-beta** – (*transforming growth factor beta*) w porównaniu do osób bez nefropatii [32]. TGF-beta reguluje szereg procesów zachodzących w komórce. Istnieją 3 izoformy TGF-beta: TGF-beta 1, TGF-beta 2 i TGF-beta 3, z których najlepiej poznana jest TGF-beta 1. Obserwowano również zwiększoną ekspresję receptora typu II dla TGF-beta, co sugeruje, że nerka cukrzycowa wykazuje nadmierną odpowiedź na TGF-beta1.

TGF beta-1 powoduje odkładanie macierzy mezangium, zgrubienie błony podstawnej kłębuszka i może sprzyjać apoptozie i odwarstwianiu się podocytów. W wyniku tych procesów błona podstawna kłębuszka pozbawiona podocytów przylega do torebki Bowmana i rozpoczyna się proces ich stwardnienia.

Komórki kłębuszka i kanalikula proksymalnego produkują TGF-beta 1 i posiadają receptory typu I i typu II dla TGF-beta. Ekspresja TGF-beta 1 może być indukowana przez nagromadzenie AGE, ale także poprzez bodźce pochodzące spoza nerki, nie do końca poznane, np. leptynę. Wysokie stężenia glukozy indukują ekspresję TGF-beta 1, co sprzyja nefropatii cukrzycowej, ponieważ może powodować przerost i stwardnienie nerek poprzez silną indukcję przerostu i hipertrofii komórek. W odpowiedzi na TGF-beta 1 *in vitro* komórki mesangialne kłębuszka i komórki epitelialne cewek zwiększają syntezę kolagenu, fibronektyny i lamininy. TGF-beta 1 hamuje także syntezę kolagenaz i stymuluje produkcję inhibitorów metaloproteinaz. Leczenie inhibitorami ACE normalizuje ciśnienie kapilarne w kłębuszkach i wiąże się ze zmniejszoną ekspresją TGF-beta 1. U zwierząt doświadczalnych leczenie przeciwciałami neutralizującymi TGF- beta zapobiegało rozwojowi przerostu kłębuszków i ekspansji macierzy mesangium i zmniejszało indukcję przez TGF beta kolagenu typu IV i fibronektyny, a także zmniejszało wzrost stężenia kreatyniny [33].

Czynnik wzrostu pochodzący z płytek **PDGF** (*platelet-derived growth factor*) działa jako czynnik wzrostu dla komórek śródbłona siatkówki poprzez mechanizmy para- i autokrynne.

Wysokie stężenie glukozy wiąże się ze zwiększoną ekspresją PDGF w pericytach i siatkówce zwierząt doświadczalnych i zwiększoną ekspresją receptora beta PDGF.

Czynnik wzrostu tkanki łącznej **CTGF** (*connective tissue growth factor*) pośredniczy w przekazywaniu pewnych efektów czynnika TGF-beta (który także zwiększa jego ekspresję), między innymi na białka macierzy pozakomórkowej, takie jak kolagen typu I i IV oraz fibronektynę. Wykryto go w kłębuszkach pacjentów gdzie indukuje zmiany o charakterze nefropatii cukrzycowej [8,34].

U pacjentów z cukrzycą występuje zwiększenie ekspresji **VEGF i receptorów VEGF** w nerkach, co potwierdzają także badania u zwierząt doświadczalnych z cukrzycą indukowaną streptozotocyną. Leczenie przeciwciałami skierowanymi przeciwko VEGF lub jego receptorom zapobiega rozwojowi zmian cukrzycowych w nerkach u zwierząt doświadczalnych.

VEGF jest zarówno produkowany przez podocyty, jak i działa na nie w sposób autokryny, modulując ich funkcję, łącznie z syntezą składowych błony podstawnej, przyczyniając się do nieprawidłowej stymulacji komórek, które produkują więcej TGF beta-1. Ten czynnik wzrostowy aktywuje GLUT-1, który indukuje zwiększony wewnątrzkomórkowy transport glukozy i wychwyt d-glukozy. TGF beta-1 powoduje, jak wspomniano, zwiększone odkładanie białek macierzy pozakomórkowej (kolagen typu I, IV V i VI; fibronektyna, i laminina) na poziomie kłębuszka i w ten sposób indukuje ekspansję mezangium i zgrubienie błony podstawnej kłębuszka [35].

1.10. Zmiany naczyniowe oraz metody ich oceny u chorych na cukrzycę typu 2.

Powikłania naczyniowe cukrzycy dzielą się na mikroangiopatyczne, obejmujące mikrowaskulaturę, oraz makroangiopatyczne, dotyczące dużych naczyń i prowadzące do

powstawania miażdżycy manifestującej się klinicznie chorobą niedokrwienną serca lub udarem mózgu. Miarą zaawansowania zmian naczyniowych w przebiegu cukrzycy jest wzrost sztywności naczyń u chorych z cukrzycą w porównaniu z osobami bez cukrzycy [36,37,38]. Analizę związku sztywności naczyń tętniczych z zaburzeniami przemiany węglowodanów przedstawiono w badaniu Hoorn Study, w którym stwierdzono wzrost sztywności naczyń tętniczych szyjnych, udowych i ramiennych w populacji osób z cukrzycą typu 2 [37,39]. Wzrost ten autorzy tłumaczyli zmniejszeniem rozszerzalności i średnicy naczyń (t. udowa), wzrostem ciśnienia tętna i grubości intima-media (IMT). Ponadto znamiennej rolę w rozwoju sztywności naczyń u tej grupy chorych miała h

iperglikemia i hiperinsulinomia, które są odpowiedzialne za 30% zmian naczyniowych związanych z upośledzoną tolerancją glukozy i cukrzycą typu 2. Wzrost sztywności naczyń jak wykazano w badaniu Hoorn Study była wprost proporcjonalny do pogorszenia tolerancji węglowodanów, od upośledzonej tolerancji glukozy do pełnoobjawowej cukrzycy. Podobne wyniki, a mianowicie wzrost wskaźników sztywności tętnic takich jak podatność, wskaźnik sztywności (stiffness index, SI), moduł elastyczny, moduł Younga, ze wzrostem poziomu glikemii na czczo, uzyskano w badaniu ARIC Study w którym sztywność naczyń korelowała z glikemią i insulinemią, oraz stężeniem triglicerydów w surowicy krwi [40].

Kolejnym z czynników wpływających na zaburzenia naczyniowe jest działanie insuliny na centralne ciśnienie tętnicze w aorcie. Wywiera ona szybkie działanie polegające na wzroście podatności aorty poprzez opóźnienie i zmniejszenie odbicia fali tętna, natomiast przedłużony wlew insuliny powoduje powolne obniżenie obwodowego oporu naczyniowego, co prowadzi do wzrostu mięśniowego przepływu krwi [41]. W insulinooporności dochodzi do zaburzeń powyższych zjawisk. Wlew insuliny u pacjentów z cukrzycą typu 2 nie powodował spadku wskaźnika augmentacji ani spadku centralnego ciśnienia skurczowego w porównaniu do osób bez cukrzycy [42]. Wydaje się, że upośledzenie tych zjawisk może odpowiadać za

przyspieszony rozwój nadciśnienia tętniczego u chorych z cukrzycą typu 2, które w tej grupie występuje nawet dwukrotnie częściej niż w populacji ogólnej.

W części obserwacji stwierdzono zmniejszenie podatności przede wszystkim tętnic obwodowych u pacjentów z typem 2 cukrzycy [43], natomiast inne doniesienia sugerują, że obecność cukrzycy typu 2 wiąże się przede wszystkim z upośledzoną podatnością tętnic centralnych [44].

Choroby układu krążenia dotyczą kobiet z cukrzycą trzykrotnie częściej niż kobiet bez cukrzycy. Obserwowano również mniejszą podatność naczyń u kobiet z cukrzycą niż u mężczyzn [43]. Sztywność naczyń tętniczych oceniana na podstawie prędkości rozchodzenia się fali tętna wzrastała z wiekiem szybciej u kobiet niż u mężczyzn, u których wzrost ten był podobny jak w populacji osób bez cukrzycy [45]. Sztywność naczyń koreluje ze zmianami miażdżycowymi (IMT, obecność płytek miażdżycowych) a jej pomiar może służyć do wykrywania zagrożenia chorobą niedokrwienną serca i miażdżycą u chorych z cukrzycą typu 2 [46].

Badano także związek sztywności naczyń w odniesieniu do powikłań cukrzycy o typie mikroangiopatii. W badaniu CURES-2, w grupie 600 pacjentów z cukrzycą typu 2, stwierdzono, że wskaźnik augmentacji i grubość intima-media są większe u osób z retinopatią [47].

We wspomnianym już badaniu Meyera wykazano związek obecności neuropatii cukrzycowej, zarówno obwodowej jak centralnej, ze zwiększoną sztywnością naczyń [38].

Wykazano, że mikroalbuminuria, ważny czynnik ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych, istotnie koreluje z prędkością fali tętna i może stanowić niezależny predyktor zwiększonej sztywności tętniczej u chorych z cukrzycą typu 2 [48].

2. CELE PRACY.

Celem pracy była ocena związku pomiędzy wybranymi czynnikami wzrostowymi i zapalnymi a rozwojem zmian w nerkach oraz naczyniach u pacjentów z nefropatią cukrzycową w przebiegu cukrzycy typu 2 w populacji polskiej.

Szczegółowe cele obejmowały:

- ocenę stężenia czynników wzrostowych takich jak TGF β , PDGF, VEGF, cytokiny prozapalne interleukina 6, oraz receptor TNF α oraz białek ostrej fazy fibrynogenu i hsCRP u chorych z nefropatią cukrzycową i bez nefropatii oraz ocenę związku tych parametrów ze stopniem zaawansowania zmian w nerkach w przebiegu cukrzycy,
- ocenę wybranych markerów zmian naczyniowych takich jak PWV i IMT a także zmian w mikrokrażeniu u osób z nefropatią i w grupie kontrolnej.
- ocenę stężenia czynników prozapalnych, wzrostowych oraz markerów zmian naczyniowych w grupie badanej po 36 miesiącach.

3. MATERIAŁ I METODYKA PRACY.

3.1. Charakterystyka badanych grup chorych:

- do badania kwalifikowano chorych z cukrzycą typu 2 rozpoznawaną według kryteriów WHO, u których stwierdzono nefropatię cukrzycową w różnym stopniu zaawansowania według klasyfikacji C.E. Mogensena. Pacjenci ci są objęci kontrolą lekarską w Poradni przy Klinice Nefrologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie.
- U części pacjentów z nefropatią cukrzycową wykonano po 36 miesiącach badanie kontrolne, obejmujące zarówno ocenę parametrów funkcji nerek i stężenia badanych czynników zapalnych oraz ocenę zmian naczyniowych obrazujących stan układu krążenia. (Kontrole wykonano u pacjentów, którzy byli dostępni i wyrazili zgodę na powtórne badanie).
- Grupę kontrolną stanowili pacjenci z cukrzycą typu 2, nie mający powikłań o charakterze nefropatii cukrzycowej, odpowiadający grupie badanej pod względem płci i wieku.

Kryteria wyłączenia obejmowały: aktywne zakażenia, choroby układowe oraz ciężkie choroby przewlekłe (płuc, układu krążenia, wątroby), choroby nowotworowe, leczenie immunosupresyjne, brak współpracy z pacjentem, brak zgody pacjenta.

U wszystkich badanych wykonano następujące badanie kliniczne i biochemiczne:

- podmiotowe i przedmiotowe badanie lekarskie,
- pomiary wzrostu, masy ciała, obwodu pasa i bioder, pomiar ciśnienia tętniczego krwi,

- pomiar HbA1c jako ocena stopnia wyrównania glikemii,
- oznaczenie stężenia w surowicy: mocznika, kreatyniny, kwasu moczowego,
- oznaczenie mikroalbuminurii w moczu dobowym i/lub wskaźnika albumina/kreatynina w moczu,
- oznaczenie klirensu kreatyniny,
- oznaczenie stężenia czynników wzrostu i cytokin prozapalnych w surowicy krwi:
 - TGF β I,
 - PDGF,
 - VEGF,
 - IL 6,
 - TNF α R II
 - hs CRP
 - Fibrynogen

Charakterystykę pacjentów i grupy kontrolnej przedstawiono w tabeli 5

Tabela 5. Charakterystyka badanej grupy chorych.

Grupa 1 – chorzy z nefropatią cukrzycową w momencie rozpoczęcia badania.

Grupa 2 - chorzy z nefropatią po 36 miesiącach obserwacji.

Grupa 3 – chorzy z cukrzycą typu 2 bez powikłań o charakterze mikroangiopatii.

	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3
liczba chorych	48	25	22
kobiety/mężczyźni	22/26	14/11	8/14
wiek (lata)	64,6 $\pm$ 12,3	64,8 $\pm$ 13,2	60,1 $\pm$ 10,3
czas trwania cukrzycy (lata)	13,5 $\pm$ 4,7	14,2 $\pm$ 4,2	10,5 $\pm$ 3,8
insulina/leki doustne	24/24	25	15/7
ACEI/ARB	40/5	22/1	22/1
Statyny	42	23	20

3.2. Oznaczenia biochemiczne.

Oznaczenia biochemiczne wykonano w Zakładzie Diagnostyki Katedry Biochemii Klinicznej CMUJ (Kierownik: Profesor dr hab. Jerzy W. Naskalski).

Oznaczenia wybranych parametrów laboratoryjnych niezbędnych do realizacji założonych w projekcie celów wykonane zostały w tych samych próbkach krwi, które służyły do rutynowej, okresowej kontroli stanu chorych. Krew pobierano do systemów próżniowych firmy Sarstedt i w przypadku badań biochemicznych, po wytworzeniu skrzepu, odwirowywano je przez minimum 10 minut z prędkością 4000 obrotów/min. Uzyskaną surowicę oddzielano od elementów morfotycznych. Standardowe badania biochemiczne oznaczano w dniu pobrania krwi, natomiast surowicę do oznaczeń immunochemicznych, do czasu wykonania wszystkich oznaczeń przechowywano w temperaturze – 70 ° C.

- Stężenia IL-6, TGF β I, VEGF zmierzono za pomocą testów immunoenzymatycznych metodą ELISA (przy użyciu zestawu firmy Diaclone SAS Besancon France) a odczyt przeprowadzono za pomocą czytnika ELx 800 firmy BIO-TEK Instruments Inc.

- Stężenia s TNF RII, PDGF-BB zmierzono za pomocą testów immunoenzymatycznych metodą ELISA (przy użyciu zestawu Quantikine firmy R&D Systems, Mineapolis MN USA) a odczyt przeprowadzony za pomocą czytnika ELx 800 firmy BIO-TEK Instruments Inc.

- Stężenia białka C-reaktywnego (hsCRP) metodą ultraczulą zmierzone zostało przy użyciu techniki immunonefelometrycznej na aparacie Bering II Nephelometer (firma Dade-Behring, Marburg, Germany).

- do oznaczenia stężenia fibrynogenu wykorzystano odczynnik Multifibren U na aparacie Sysmex CA-500 (firma Dade-Behring, Marburg, Germany).

3.3. Wskaźnik masy ciała BMI.

Oceniano wzrost oraz masę ciała, na podstawie których wyliczono wskaźnik masy ciała (BMI) korzystając z wzoru: $BMI = \text{waga (kg)} / \text{wzrost (m)}^2$. Wykonywano także pomiar obwodu talii i bioder.

3.4. Pomiar ciśnienia tętniczego krwi.

Pomiaru ciśnienia tętniczego krwi dokonywano za pomocą sfigmomanometru rtęciowego po pięciominutowym odpoczynku, w trakcie którego uzyskiwano dane do kwestionariusza. Technika pomiaru była zgodna z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego [49].

3.5. Badania obrazowe układu krążenia.

Ponadto wykonano badania obrazowe: pomiar szybkości rozchodzenia się fali tętna w aorcie (AoPWV) oraz pomiar grubości kompleksu intima-media (IMT) i ocenę mikrokrażenia.

Ocenę IMT wykonano w Pracowni Ultrasonografii Kliniki Nefrologii CMUJ (kierownik: Profesor dr hab. Władysław Sułowicz), badanie AoPWV wraz z oceną mikrokrażenia wykonano w I Klinice Chorób Wewnętrznych i Geriatrii CMUJ, (kierownik: Profesor dr hab. Tomasz Grodzicki).

3.5.1. Pomiar szybkości rozchodzenia się fali tętna w aorcie (AoPWV *Aortic Pulse Wave Velocity*).

Pomiar AoPWV (prędkości rozchodzenia się fali tętna) wykonano przy użyciu rejestratora komputerowego i programu do analizy wyników (Complior Colson AS, Paris, France). Jest ono oparte na pomiarze centralnej szybkości fali tętna (wyrażonej w m/s). Wartość ta wyliczana jest na podstawie pomiaru czasu, w jakim fala tętna pokonuje dystans pomiędzy dwoma punktami; czujniki rejestrujące umieszczone są nad prawą tętnicą szyjną i prawą tętnicą udową. Szybkość fali tętna oblicza się jako iloraz odległości pomiędzy czujnikami oraz czasem pomiędzy szczytem fali tętna rejestrowanej nad tętnicą szyjną i nad tętnicą udową. PWV wyznacza się jako wartość średnią, z co najmniej 10 poprawnie wykonanych pojedynczych pomiarów. Badanie prędkości fali tętna ocenia podatność ściany dużych naczyń tętniczych i pozwala na ocenę sztywności tych naczyń. Wartość prędkości zależy od elastycznych i geometrycznych składników ścian tętnic oraz od gęstości krwi.

3.5.2. Pomiar grubości kompleksu intima-media w badanych grupach.

Pomiar grubości kompleksu błony wewnętrznej i środkowej były wykonywane za pomocą ultrasonografu USG marki Acuson XP przy zastosowaniu głowicy linearnej o częstotliwości 8MHz. Pomiary były dokonywane co około 1 cm rozpoczynając 2 cm poniżej opuszek tętnic szyjnych wspólnych z pominięciem obszarów widocznych blaszek miażdżycowych [50]. Ponadto określano ewentualną obecność blaszek miażdżycowych w tętnicy. U każdej badanej osoby dokonywano pomiarów w 12 punktach na prawej i lewej tętnicy szyjnej wspólnej, mierząc odległość pomiędzy pierwszą, wyraźnie odgraniczoną linią (granica światła naczynia - błona wewnętrzna) a drugą jasną linią (granica błona środkowa - przydanka) [51]. Ze względu na możliwy błąd pomiarowy przy uwzględnianiu zarówno ściany bliższej i dalszej, w niniejszej pracy uwzględniano grubość ściany dalszej tętnicy szyjnej wspólnej [52].

Uzyskane obrazy zapisywano cyfrowo a następnie poddawano analizie komputerowej. Na podstawie 12 wykonanych pomiarów u każdego chorego zostały wyznaczone: średnia i maksymalna wartość IMT oraz odchylenie standardowe, przy czym podstawę do dalszych analiz stanowiła średnia wartość IMT. Za normę IMT przyjęto wartości poniżej 0,9 mm; grubość kompleksu większą niż 1,0 mm interpretowano jako nieprawidłową; natomiast wartości od 0,9-1 mm uznano za graniczne i niejednoznaczne interpretacyjnie [53].

3.5.3. Badanie mikrokrazenia skórnego.

Ocena perfuzji naczyń mikrokrazenia została wykonana przy użyciu laserowego przepływomierza dopplerowskiego Periflux 5000 firmy Perimed (Szwecja) z zastosowaniem sondy termostatycznej. Metoda ta jest zalecana przez liczne towarzystwa naukowe (np. European Society of Hypertension) celem oceny funkcji śródbłónka najmniejszych naczyń, szczególnie w warunkach stymulacji bodźcami naczyniorozkurczowymi [54]. Stałość jakości pomiarów i powtarzalność wyników zależy między innymi od odpowiedniej kalibracji sprzętu zgodnie z wymogami producenta. Technika badania wykorzystuje zjawisko Dopplera polegające na zmianie częstotliwości fali elektromagnetycznej po odbiciu od elementów pozostających w ruchu. Źródłem monochromatycznej wiązki światła o długości 780 nm jest laser, która poprzez przyłożoną do badanej powierzchni skóry sondę przenika ją na głębokość od 1-1.5 mm. Wiązka monochromatyczna ulega absorpcji, rozproszeniu lub odbiciu od poruszających się elementów morfotycznych i powraca do układu odbiorczego. Nośnikiem informacji jest zmiana częstotliwości emitowanej fali, czyli tzw. przesunięcie dopplerowskie. Jednostka przepływu jest 1 PU (*perfusion unit*), który jest równy napięciu 10 mV na wyjściu. Otrzymywany sygnał jest wskaźnikiem perfuzji naczyń mikrokrazenia skóry powierzchniowych i jest proporcjonalny do ilości i prędkości przepływu elementów morfotycznych krwi [55,56]. Oprogramowanie Perisoft umożliwia przedstawienie otrzymanego wyniku w postaci krzywej o kształcie sinusoidy na monitorze komputera, oraz analizę wskaźników perfuzji i tworzenie raportów [PeriSoft for Windows Version 2. Extender user manual. Perimed, Stockholm 2002]. Wszystkie otrzymane wskaźniki perfuzji zostały odniesione do wartości tzw. zera biologicznego, czyli z uwzględnieniem sygnału

otrzymanego z tkanek w okresie zatrzymania przepływu krwi w trakcie przejściowego niedokrwienia. W przypadku bodźców o charakterze wazodilatacyjnym, w ocenie wzrostu przepływu każdorazowo uwzględniano wartości wyjściowe, czyli przepływ spoczynkowy.

Badanie wykonano po 10 minutowym odpoczynku w pomieszczeniu o stałej temperaturze. Badanie wykonywano w pozycji leżącej na skórze powierzchni dłoniowej prawego przedramienia w odległości 10 cm od dołu łokciowego. Protokół badania obejmował analizę przepływu spoczynkowego oraz pod wpływem bodźców o działaniu naczyniorozkurczowym (reakcja przekrwienia biernego i reakcja lokalnego ogrzania tkanki). Prowokacje termiczna umożliwiło zastosowanie sondy termostatycznej, która powoduje ogrzanie badanego obszaru tkanki do temperatury 44 st. Celsjusza.

Protokół badania obejmował kolejno:

- trzyminutową analizę przepływu spoczynkowego uzyskując średni przepływ spoczynkowy wyrażony w PU (MFb- *mean flow in basal conditions*), wartości wyznaczano w odniesieniu do poziomu zera biologicznego,
- trzyminutowy okres niedokrwienia wywołany zaciśnięciem mankietu manometru zlokalizowanego na ramieniu do wartości przekraczającej o 50 mmHg ciśnienie skurczowe badanego, ten etap badania umożliwiał wyznaczenie zera biologicznego,
- trzyminutową reakcję przekrwienia biernego, w której analizowano przepływ szczytowy przedstawiony jako procentowy wzrost przepływu (PF%) w odniesieniu do przepływu spoczynkowego (wyjściowego), a także pole pod krzywą reakcji przekrwienia (AUC) wyrażone w PU/s,
- ośmiominutową reakcję termiczną ogrzania tkanki do temperatury 44 st. Celsjusza z użyciem sondy termostatycznej, w przebiegu której oznaczano średni przepływ w temperaturze 44 stopni Celsjusza wyrażony w PU (MF44- *mean flow in temperature of 44*

degrees Centigrade) w okresie prowokacji termicznej, analizy dokonywano uwzględniając poziom zera biologicznego oraz wartość przepływu spoczynkowego.

3.6. Analiza porównawcza badanych grup:

Ocena normalność rozkładu poszczególnych zmiennych badano za pomocą testu Kołmogorowa – Smirnowa z poprawką Lillieforsa. Analiza statystyczna obejmowała porównanie średnich przy użyciu testu t studenta dla parametrów o rozkładzie normalnym, natomiast dla pozostałych przy użyciu testu U Manna-Whitneya. Różnice między grupami określono na podstawie różnic obserwacji a następnie użyto testu t studenta dla par powiązanych oraz testu Wilcoxona. Za istotne statystycznie uznano wyniki, dla których poziom istotności nie przekraczał $p < 0,05$. W analizie statystycznej wykorzystano program Statistica w wersji 8.0.

Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Biotycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego.

4. WYNIKI.

4.1. Charakterystyka badanych parametrów w grupie chorych z nefropatią cukrzycową.

Podmiotem badań była populacja chorych z nefropatią cukrzycową w przebiegu cukrzycy typu 2 oraz grupa chorych bez tego powikłania. Charakterystykę parametrów biochemicznych u tych chorych przedstawiono w tabeli 6. Przedstawiono w niej średnie arytmetyczne z zaznaczeniem odchyłeń standardowych oraz medianę z zaznaczeniem wartości minimalnej i maksymalnej dla parametrów o rozkładzie normalnym.

Parametry biochemiczne podzielono na grupy:

- parametry zapalne i czynniki wzrostowe (fibrynogen, hsCRP IL-6, IL-12, TGF β I, VEGF, sTNF RII, PDGF-BB),
- parametry oceniające funkcje nerek (albuminuria, kreatynina, mocznik, kwas moczowy, eGFR w oparciu o wzór MDRD, potas),
- parametry antropometryczne i metaboliczne oceniające wyrównanie cukrzycy (HbA1c, BMI, lipidogram),
- parametry oceniające gospodarkę wapniowo – fosforanową (Ca, P, iloczyn stężeń Ca x P, fosfataza alkaliczna, PTH).

Tabela 6. Wybrane parametry biochemiczne z krwi obwodowej oraz badań antropometrycznych, służące ocenie badanej grupy chorych z nefropatią cukrzycową.

Parametr	Jednostki	Średnia $\pm$ SD	Mediana	Min - max
BMI	kg/m ²	27,1 $\pm$ 3,8	26,1	20,9 – 37,9
Waga	kg	77,1 $\pm$ 12,8	75,0	51,0 – 117,0
SBP	mmHg	141 $\pm$ 19	140	100 - 180
DBP	mmHg	74 $\pm$ 11	72,5	50 - 95
PP	mmHg	66 $\pm$ 14	65	40 - 110
Cholest. całkow.	mmol/l	5,04 $\pm$ 1,2	5,0	2,99 – 9,02
HDL-chol	mmol/l	1,43 $\pm$ 0,5	1,31	0,65 – 3,03
LDL-chol	mmol/l	2,70 $\pm$ 1,2	2,49	1,07 – 6,35
Triglicerydy	mmol/l	1,95 $\pm$ 1,02	1,67	0,55 – 4,74
Glukoza	mmol/l	7,27 $\pm$ 2,59	6,6	3,0 – 13,0
HbA1c	%	7,06 $\pm$ 1,38	6,8	5,0 – 11,1
GFR	ml/min	44,18 $\pm$ 25,17	35,15	15 - 107
Kreatynina	μ mol/l	170,4 $\pm$ 101,2	155,5	57,3 - 500
Mocznik	mmol/l	12,2 $\pm$ 5,3	11,1	5,3 – 26,0
Kwas moczowy	μ mol/l	380,2 $\pm$ 77,2	374,0	77,2 – 631,0
Albuminuria	mg/doba	1113 $\pm$ 827	925	200 - 3400
Hb	g/dl	12,9 $\pm$ 1,8	12,75	10,0 – 17,3
Fe	μ mol/l	15,8 $\pm$ 6,3	14,1	5,7 – 28,8
Ca	mmol/l	2,32 $\pm$ 0,2	2,33	1,99 – 2,67
P	mmol/l	1,25 $\pm$ 0,23	1,27	0,79 – 1,76
Ca x P	mmol ² /l ²	2,88 $\pm$ 0,46	2,91	1,82 – 3,82
AP	U/l	200 $\pm$ 79	180	94 - 489
PTH	pg/ml	92,23 $\pm$ 64,4	322	32 - 450

Wyniki oznaczeń wybranych parametrów w odniesieniu do zakresu wartości referencyjnych przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Wybrane parametry biochemiczne krwi badanych chorych w odniesieniu do obowiązujących norm referencyjnych.

Badany parametr	Jednostki	Średnia $\pm$ SD	Mediana	Min-Max	Zakres wartości referencyjnych
Cholest.całk.	mmol/l	5,04 $\pm$ 1,2	5,0	2,99 – 9,02	3,20 – 5,20
Triglicerydy	mmol/l	1,95 $\pm$ 1,02	1,67	0,55 – 4,74	0,20 – 2,30
Glukoza	mmol/l	7,27 $\pm$ 2,59	6,6	3,0 – 13,0	3,30 – 5,60
HbA1c	%	7,06 $\pm$ 1,38	6,8	5,0 – 11,1	< 7,0%
Kreatynina	μ mol/l	170,4 $\pm$ 101,2	155,5	57,3 - 500	45,0 – 97,0
Mocznik	mmol/l	12,2 $\pm$ 5,3	11,1	5,3 – 26,0	1,7 – 8,3
Kw.moczowy	μ mol/l	380,2 $\pm$ 77,2	374,0	77,2 – 631,0	202 - 416
Hb	g/dl	12,9 $\pm$ 1,8	12,75	10,0 – 17,3	11 - 17

Badana populacja charakteryzowała się znaczną i w różnym stopniu zaawansowaną niewydolnością nerek, co przejawia się podwyższonym poziomem kreatyniny i mocznika we krwi u tych pacjentów (średnia wartość kreatyniny 170,4 μ mol/l, mocznika 12,2 mmol/l). Wyliczony z obowiązującego 4 parametrowego wzoru MDRD, GFR [57,58] w badanej grupie wynosił średnio 44,18 $\pm$ 25,17 ml/min. Wartościom tym towarzyszyła znaczna dobową albuminuria średnio ponad 1000 mg/dobę. Chorzy ci prezentowali III – V stopień zaawansowania nefropatii cukrzycowej w skali Mogensena. Jednocześnie należy podkreślić że SD a także wartości minimum i maksimum dla parametrów określających zaburzenia gospodarki wapniowo fosforanowej (Ca, P, Ca x P, AP) u części z chorych mogą wiązać z zaawansowanym stanem niewydolności nerek i prawdopodobnie wtórną nadczynnością przytarczyc. Oznaczony poziom iPTH wynosił 92,23 $\pm$ 64,4 pg/ml, a wartość maksymalna wynosiła 450 pg/ml, co może świadczyć iż u części badanych chorych już rozwinęła się wtórna nadczynność przytarczyc. Także wartości minimalne hemoglobiny i hematokrytu (10,0 g/dl i 29,9 %) mogą oznaczać występowanie anemii nerkopochodnej u części badanych chorych z nefropatią cukrzycową (tabela 6).

Grupa ta charakteryzowała się także podwyższonymi wartościami średnimi wagi i wyliczonego BMI oraz dość dużą rozpiętością wartości minimum i maksimum. U większości chorych rozpoznano nadwagę i otyłość: średnie BMI powyżej $27,1 \text{ kg/m}^2$ a maksimum wynosiło $39,7 \text{ kg/m}^2$ (tabela 6). W grupie tej stwierdzono średnie wartości cholesterolu i triglicerydów powyżej zakresu referencyjnego dla zdrowej populacji (odpowiednio $5,04 \pm 1,2 \text{ mmol/l}$ i $1,95 \pm 1,02 \text{ mmol/l}$). Także średnie wartości glukozy i HbA1c przekraczały zakres norm wyrównania cukrzycy według PTD i wynosiły odpowiednio $7,27 \pm 2,59 \text{ mmol/l}$ i $7,06 \pm 1,38 \%$, przy wartościach maksymalnych odpowiednio $13,0 \text{ mmol/l}$ i $11,1 \%$ (tabela 7). Świadczy to o stosunkowo słabym wyrównaniu cukrzycy w badanej grupie chorych i może mieć wpływ na występowanie w tej grupie znacznej albuminurii. Średnie wartości ciśnienia tętniczego w badanej grupie wynosiła $141/74 \text{ mmHg}$ co świadczyło o dość dobrym jego wyrównaniu, jednak co warto zauważyć to że większość chorych otrzymywała leki blokujące konwertazę angiotensyny lub jej receptor (tabela 6).

W grupie kontrolnej – chorych z cukrzycą typu 2 bez powikłań o charakterze mikro- i makroangiopatii z prawidłowymi wartościami parametrów nerkowych - kreatyniny, mocznika i kwasu moczowego, których średnie wynosiły odpowiednio $68,6 \pm 12,7 \text{ }\mu\text{mol/l}$, $6,7 \pm 2,4 \text{ mmol/l}$ i $354, 2 \pm 94,5 \text{ }\mu\text{mol/l}$, GFR wyliczony z obowiązującego wzoru MDRD wynosił $101,0 \pm 23,5 \text{ ml/min/1,73m}^2$ i mieścił się w granicach normy. Grupa ta charakteryzowała się ponadto prawidłowymi wartościami parametrów gospodarki wapniowo- fosforanowej a także prawidłową morfologią. Średnia waga i wartość BMI wynosiły dla grupy badanej $74,8 \pm 8,4 \text{ kg}$ i $25,7 \pm 2,8 \text{ kg/m}^2$, co świadczy o tym iż chorzy ci tylko nieznacznie przekroczyli obowiązujące normy i występowała u nich nieznaczna nadwaga. Także wartości lipidogramu mieściły się lub nieznacznie przekraczały zakres norm. Średnie wartości glukozy na czczo w surowicy i HbA1c wynosiły $6,7 \pm 1,8 \text{ mmol/l}$ i $6,7 \pm 1,2 \%$ i świadczyły o lepszym wyrównaniu cukrzycy w tej grupie chorych. Średnia wartość ciśnienia tętniczego wynosiła

140,5/72,5 mmHg i świadczyła o dość dobrym jego wyrównaniu, jednak i w tej grupie chorzy przyjmowali leki z grupy ACEI i ARB. Wszystkie wartości wraz z zakresem norm referencyjnych dla grupy kontrolnej przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Wybrane parametry biochemiczne krwi w grupie kontrolnej w odniesieniu do obowiązujących norm referencyjnych.

Badany parametr	Jednostki	Średnia $\pm$ SD	Mediana	Min-Max	Zakres wartości referencyjnych
BMI	kg/m ²	25,7 $\pm$ 2,8	25,6	21,7 – 32,4	20 – 25
Waga	kg	74,8 $\pm$ 8,4	76,5	57, 0 – 89,0	
SBP	mmHg	140,5 $\pm$ 9,5	140	120 - 160	<140
DBP	mmHg	72,5 $\pm$ 6	72,5	60 - 80	<70
PP	mmHg	68 $\pm$ 7,6	65	60 - 80	
Cholest. całkow.	mmol/l	4,96 $\pm$ 1,1	4,91	3,11 – 7,39	3,20 – 5,20
HDL-chol	mmol/l	1,26 $\pm$ 0,32	1,21	0,6 – 1,98	0,90 – 3,00
LDL-chol	mmol/l	2,41 $\pm$ 1,01	2,04	0,67 – 4,50	0,20 – 3,40
Triglicerydy	mmol/l	2,07 $\pm$ 0,87	1,84	0,63 - 3,99	0,20 – 2,30
Glukoza	mmol/l	6,70 $\pm$ 1,84	6,3	3,0 – 11,0	3,30 – 5,60

HbA1c	%	6,74 ± 1,18	6,55	5,0 – 8,9	< 7,0%
GFR	ml/min/1,73m ²	101,0 ± 23,4	99,0	50 - 140	>60
Kreatynina	μmol/l	68,6 ± 12,7	66,8	48,1 - 99	45,0 – 97,0
Mocznik	mmol/l	6,66 ± 2,38	6,3	3,6 – 14,0	1,7 – 8,3
kw. moczowy	μmol/l	354,2 ± 94,5	386,0	178 - 508	202 - 416
Hb	g/dl	14,1 ± 1,6	14,3	10,2 - 16,4	11,0 – 17,0
Fe	μmol/l	16,2 ± 5,9	15,5	7,7 - 28	10,6 – 28,3
Ca	mmol/l	2,35 ± 0,12	2,37	2,02 – 2,5	2,02 – 2,61
P	mmol/l	1,0 ± 0,21	1,02	0,51 – 1,3	0,87 – 1,45
Ca x P	mmol ² /l ²	2,35 ± 0,5	2,39	1,23 - 3,13	
AP	U/l	122,6 ± 31,5	122,5	63 - 194	91 - 258

Ponadto w badanej grupie chorych oznaczono panel wybranych markerów zapalnych, który obejmował oznaczenie stężeń fibrynogenu, hsCRP oraz IL-6, TGF β I, VEGF, sTNF RII, PDGF-BB. Wyniki oznaczeń badanych parametrów przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Oznaczone markery zapalne we krwi badanych chorych.

Badany parametr	Jednostki	Średnia ± SD	Mediana	Min-Max
fibrynogen	g/l	4,06 ± 1,49	4,0	1,0 – 7,62
hsCRP	mg/l	3,19 ± 3,02	2,03	0,17 – 11,0
IL-6	pg/ml	3,09 ± 2,52	2,43	0,8 – 14,91
TGF β I	ng/ml	82,01 ± 69,4	68,1	24,0 – 340,0
VEGF	ng/ml	177,2 ± 144,9	161,3	13,5 – 813,1
sTNF RII	pg/ml	4700 ± 2188	4435	1965 - 14940
PDGF-BB	pg/ml	597,3 ± 422,4	510,6	32,7 – 1866,0

Średnie wartości hsCRP oraz fibrynogenu w badanej grupie były wyższe niż wartości referencyjne. Ponadto należy zwrócić uwagę na duże rozpiętości między wartościami minimalnymi i maksymalnymi pozostałych parametrów co może świadczyć o dużym zróżnicowaniu i stopniu zaawansowania stanu zapalnego w obrębie badanej grupy. W przypadku niektórych parametrów średnie oraz wartości maksymalne znacznie przekraczają zakres norm podanych przez producenta odczynników. Wartość sTNF RII wynosiła 4700 ± 2188 pg/ml, natomiast zakres wartości referencyjnych wynosił od 1003 do 3170 pg/ml.

Podobnie w przypadku PDGF-BB wartość średniej znacznie przekraczała maksymalną wartość 129 pg/ml podaną przez producenta jako charakterystyczną dla osób zdrowych. W przypadku pozostałych badanych parametrów nie podano wartości referencyjnych, jedynie minimalne wartości wykrywalności, które zostały znacznie przekroczone w badanej populacji.

Ponadto w badanej grupie chorych wykonano panel badań oceniający funkcję i strukturę naczyń, który obejmował:

- ocenę grubości błony środkowo - wewnętrznej pnia tętnicy szyjnej wspólnej (CCA-IMT),
- pomiar szybkości rozchodzenia się fali tętna w aorcie (AoPWV),
- ocenę mikrokrażenia w naczyniach obwodowych.

Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 10. Analiza wyników badań obrazowych w badanej grupie chorych wykazała duże zróżnicowanie od wartości bliskich prawidłowych do skrajnie nieprawidłowych, o czym świadczą różnice między średnią, medianą, wartościami minimum i maksimum. Średnia prędkość rozchodzenia się fali tętna w aorcie wynosiła 14,1 m/s przekraczając graniczną wartość uznana za prawidłową – 12 m/s. Średnia grubość warstwy intima – media w badanej grupie wynosiła dla lewej tętnicy szyjnej 0,87 mm, natomiast dla prawej 0,86 mm. Średni przepływ spoczynkowy w badanej grupie wynosił $7,7 \pm 5,1$ PU, natomiast w temperaturze 44° C osiągnął wartość $88,5 \pm 46,8$ PU.

Powyższe wartości wskazują na podwyższone ryzyko możliwości wystąpienia epizodów sercowo-naczyniowych w badanej grupie chorych.

Tabela 10. Analiza wyników badań oceniający funkcję i strukturę naczyń w badanej grupie chorych.

Badanie	Jednostki	Średnia $\pm$ SD	Mediana	Min - max
AoPWV	m/s	14,1 $\pm$ 2,9	13,75	9,7 – 24,4
IMT L	mm	0,87 $\pm$ 0,22	0,9	0,4 – 1,3
IMT P	mm	0,86 $\pm$ 0,2	0,9	0,4 – 1,2
MFb	PU	7,7 $\pm$ 5,1	6,2	5,1 – 29,4
PF	PU	27,4 $\pm$ 22,2	21,7	4,2 – 120,3
AUC	PU/s	670,7 $\pm$ 563,7	663,2	563,7 – 2393,6
MF44	PU	88,5 $\pm$ 46,8	80,5	28,1 – 238,4
PP	mmHg	66,5 $\pm$ 14	65	40 - 110

4.2. Charakterystyka badanych parametrów w grupie kontrolnej.

W grupie kontrolnej z cukrzycą typu 2, bez powikłań o charakterze mikroangiopatycznym, oznaczono identyczny panel markerów zapalnych oraz badań

obrazowych. Wyniki przedstawiono w tabeli 11 i tabeli 12. W grupie tej, średnie wartości markerów prozapalnych mieściły się, lub nieznacznie przekraczały wartości referencyjne. Również wyniki badań obrazowych są bliższe wartościom uznanym za prawidłowe niż w grupie badanej.

Tabela 11. Wybrane parametry zapalne w surowicy krwi grupy kontrolnej.

Badany parametr	Jednostki	Średnia $\pm$ SD	Mediana	Min - max
fibrynogen	g/l	3,12 $\pm$ 1,91	2,84	1,8 – 6,2
hsCRP	mg/l	1,46 $\pm$ 1,5	0,79	0,175 – 5,01
IL-6	pg/ml	1,4 $\pm$ 1,03	0,8	0,8 – 4,2
TGF β I	ng/ml	77,79 $\pm$ 84,3	53,5	24 – 422,6
VEGF	ng/ml	159,9 $\pm$ 166,6	121,8	13,5 – 648,2
sTNF RII	pg/ml	3111,8 $\pm$ 2591,7	2207	1457 - 12407
PDGF-BB	pg/ml	440,1 $\pm$ 371,2	379,7	111,5 - 1741

Tabela 12. Średnie określające wybrane parametry badań oceniających funkcję i strukturę naczyń w grupie kontrolnej.

Badany parametr	Jednostki	Średnia $\pm$ SD	Mediana	Min - max
AoPWV	m/s	11,8 $\pm$ 2,1	11,3	8,7 – 16,2
IMT L	mm	0,81 $\pm$ 0,22	0,8	0,5 – 1,4
IMT P	mm	0,77 $\pm$ 0,21	0,7	0,5 – 1,3
MFb	PU	12,1 $\pm$ 7,1	11,4	2,3 – 36,8
PF	PU	30,8 $\pm$ 10,7	30,1	8,6 - 55,5
AUC	PU/s	566,2 $\pm$ 514,4	400,6	28,1 – 2212,2
MF44	PU	94,6 $\pm$ 47,3	85,9	43,4 – 226,4

PP	mmHg	$67,95 \pm 7,6$	65	60 - 80
----	------	-----------------	----	---------

4.3. Charakterystyka porównawcza grupy chorych z nefropatią cukrzycową i chorych z grupy kontrolnej.

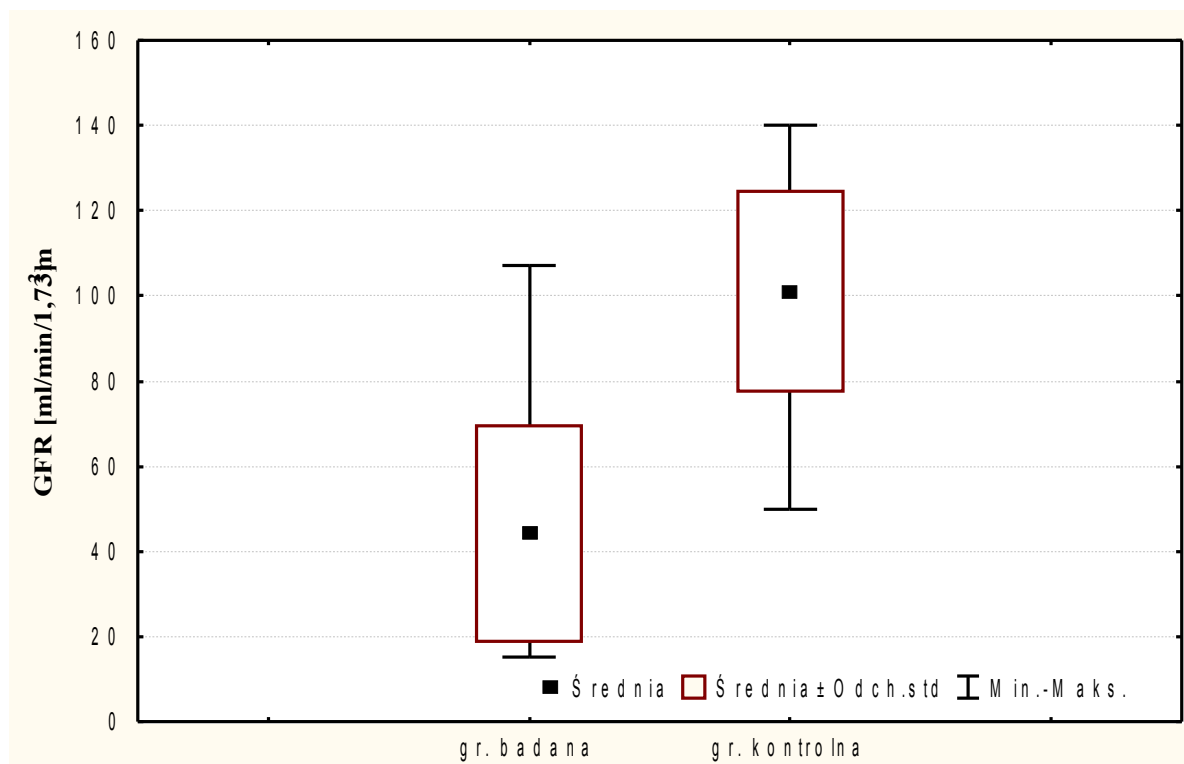
Analiza szczegółowych wartości parametrów określających czynność nerek w badanych grupach chorych przedstawiono w tabeli 13 oraz na rycinie 1.

Tabela 13. Parametry oceniające funkcję nerek – analiza porównawcza pomiędzy grupą chorych z nefropatią cukrzycową (grupa badana) oraz grupą kontrolną chorych z cukrzycą typu 2 bez powikłań.

Badany parametr	Jednostki	Grupa badana Średnia $\pm$ SD	Grupa kontrolna Średnia $\pm$ SD	P
GFR	ml/min/1,73m ²	$44,18 \pm 25,17$	$101,0 \pm 23,4$	<0,001

Kreatynina	$\mu\text{mol/l}$	$170,4 \pm 101,2$	$68,6 \pm 12,7$	$<0,001$
Mocznik	mmol/l	$12,2 \pm 5,3$	$6,66 \pm 2,38$	$<0,001$
Kw. moczowy	$\mu\text{mol/l}$	$380,2 \pm 77,2$	$354,2 \pm 94,5$	NS
K	mmol/l	$4,5 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,4$	NS

Rycina 1. Porównanie wartości GFR w grupie badanej i kontrolnej ($P<0,001$).



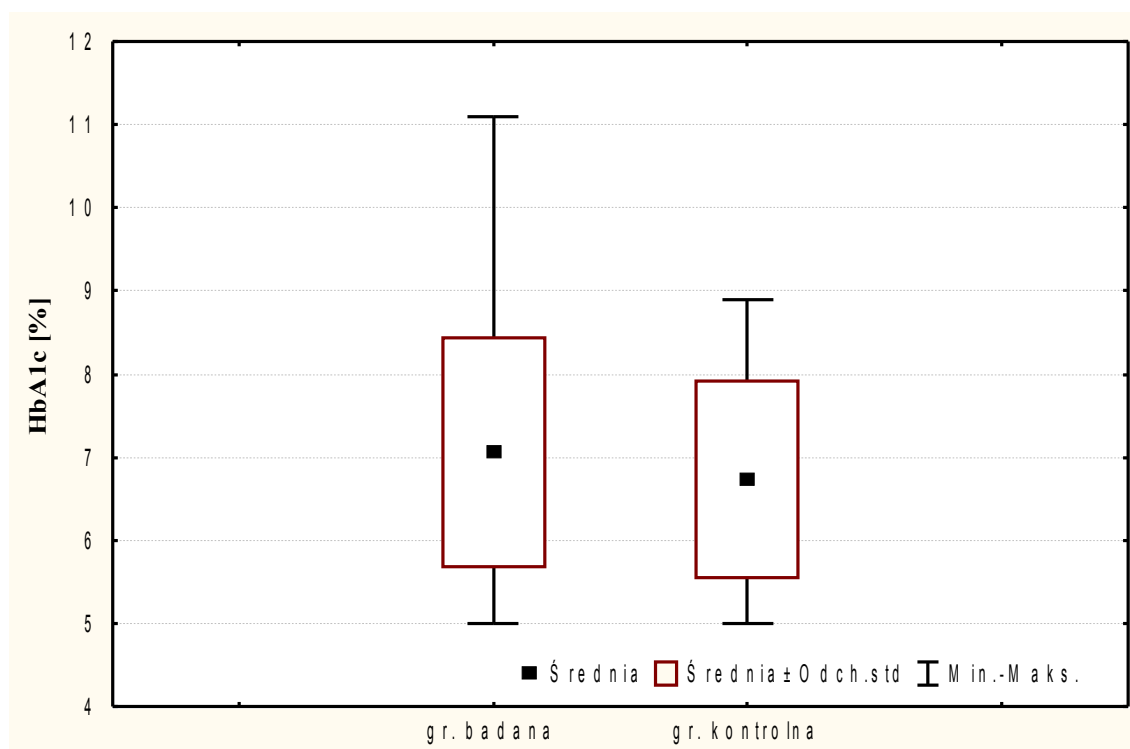
Grupa chorych z nefropatią cukrzycową charakteryzowała się statystycznie istotnie niższymi średnimi wartościami klirensu kreatyniny, natomiast stężenie kreatyniny i mocznika w surowicy było wyższe niż w grupie kontrolnej. Ponadto średnia wartość stężenia kwasu moczowego była wyższa u chorych z nefropatią, niż w grupie chorych bez tego powikłania, jednak nie osiągnęła różnic istotnych statystycznie. W obu grupach średnia wartość potasu w surowicy pozostawała w zakresie normy (tabela 13).

Chorzy w obu grupach nie różnili się istotnie statystycznie sposobem średnimi wartościami wagi i BMI oraz wartościami ciśnienia tętniczego i ciśnienia tętna, mimo względnie wyższych wartości u chorych z nefropatią cukrzycową. Także średnie wartości poszczególnych składników lipidogramu nie różniły się pomiędzy badanymi grupami. Mimo gorszego wyrównania cukrzycy u chorych z nefropatią (średnia powyżej wartości 7,0% zalecanej przez Polskie Towarzystwo Diabetologiczne), nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zakresie wyrównania cukrzycy pomiędzy badanymi grupami. Wyniki przedstawiono w tabeli 14 oraz na rycinie 2.

Tabela 14. Średnie wartości badanych parametrów antropometrycznych oraz wyrównania cukrzycy w grupie chorych z nefropatią cukrzycową (grupa badana) oraz grupie kontrolnej chorych z cukrzycą typu 2 bez powikłań.

Badany parametr	Jednostki	Grupa badana Średnia ± SD	Grupa kontrolna Średnia ± SD	P
BMI	kg/m ²	27,1 ± 3,8	25,7 ± 2,8	NS
Waga	kg	77,1 ± 12,8	74,8 ± 8,4	NS
SBP	mmHg	141 ± 19	140,5 ± 9,5	NS
DBP	mmHg	74 ± 11	72,5 ± 6	NS
PP	mmHg	66 ± 14	68 ± 7,6	NS
Cholest. całkowita	mmol/l	5,04 ± 1,2	4,96 ± 1,1	NS
HDL	mmol/l	1,43 ± 0,5	1,26 ± 0,32	NS
LDL	mmol/l	2,70 ± 1,2	2,41 ± 1,01	NS
Triglicerydy	mmol/l	1,95 ± 1,02	2,07 ± 0,87	NS
Glukoza	mmol/l	7,27 ± 2,59	6,70 ± 1,84	NS
HbA1c	%	7,06 ± 1,38	6,74 ± 1,18	NS

Rycina 2. Porównanie wartości HbA1c w grupie badanej i grupie kontrolnej. (p=NS)



W grupie chorych z nefropatią cukrzycową stwierdzono statystycznie istotnie niższe wartości hemoglobiny, hematokrytu oraz erytrocytów. Wśród 48 chorych objętych badaniem wartość hemoglobiny < 11 g/dl wykazano u 11 osób, natomiast w grupie kontrolnej zaledwie u jednej osoby. Obie grupy natomiast nie różniły się zawartością żelaza w surowicy, które pozostawało w granicach normy. Wyniki przedstawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Parametry oceniające występowanie anemii w obu badanych grupach.

Badany parametr	Jednostki	Grupa badana Średnia ± SD	Grupa kontrolna Średnia ± SD	P
Hb	g/dl	12,9 ± 1,8	14,1 ± 1,6	<0,05
Ht	%	38,1 ± 5,1	41,2 ± 4,6	<0,01
Erytrocyty	10	4,2 ± 0,7	4,7 0±,6	<0,05
Fe	μmol/l	15,8 ± 6,3	16,2 ± 5,9	NS

Tabela 16. Parametry oceniające zaburzenia gospodarki wapniowo – fosforanowej: analiza porównawcza pomiędzy grupą chorych z nefropatią cukrzycową (grupa badana) oraz grupą kontrolną chorych z cukrzycą typu 2 bez powikłań.

Badany parametr	Jednostki	Grupa badana Średnia ± SD	Grupa kontrolna Średnia ± SD	P
Ca	mmol/l	2,32 ± 0,2	2,35 ± 0,12	NS
P	mmol/l	1,25 ± 0,23	1,0 ± 0,21	<0,001
Ca x P	mmol ² /l ²	2,88 ± 0,46	2,35 ± 0,5	<0,001
AP	U/l	200 ± 79	122,6 ± 31,5	<0,001

Chorzy z nefropatią cukrzycową charakteryzowali się większym stężeniem fosforu nieorganicznego oraz fosfatazy alkalicznej w surowicy, a także większym iloczynem Ca x P. Poziom wapnia w surowicy był porównywalny w obu grupach. Zarówno iloczyn Ca x P jak i hiperfosfatemia (maksymalna wartość w badanej grupie wynosiła 1,76 mmol/l, a u 15 osób wynosiła powyżej zalecanych 1,45 mmol/l) odgrywają istotną rolę w powstawaniu zwapnień w naczyniach, oraz powstaniu wtórnej nadczynności przytarczyc. Poziom parathormonu oznaczono tylko w grupie badanej i omówiono powyżej (tabela 6).

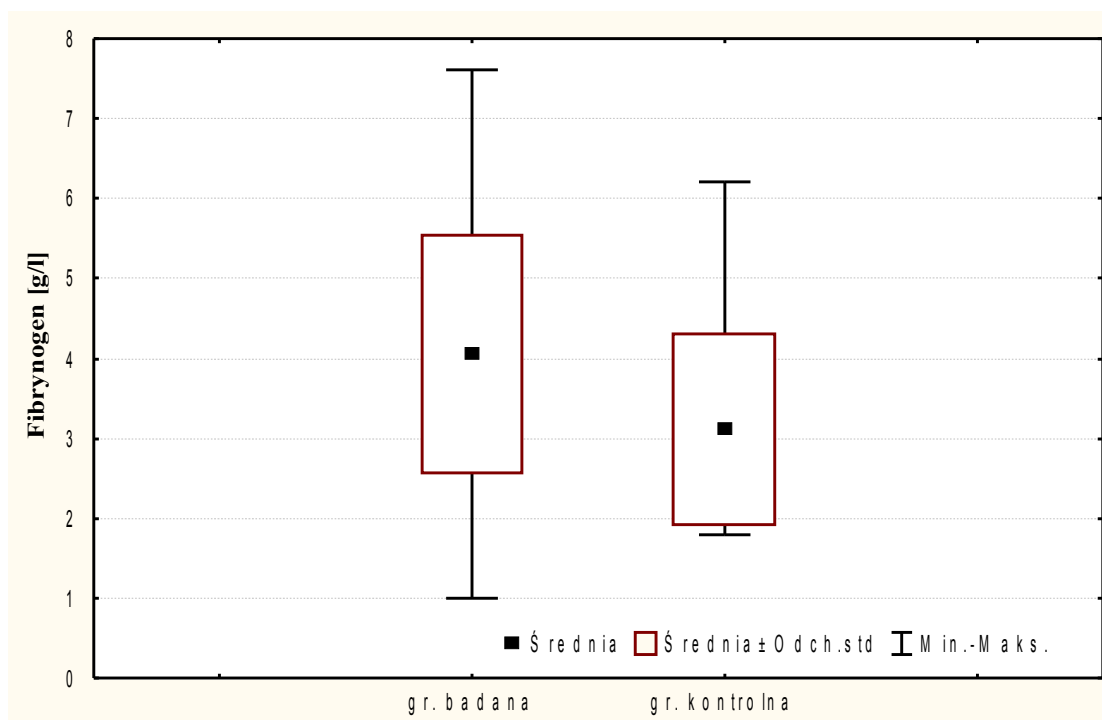
Ponadto u chorych z nefropatią cukrzycową występuje istotnie wyższe stężenie w surowicy fibrynogenu i hsCRP (p<0,01) oraz IL 6 (p<0,001) w porównaniu z grupą kontrolną. Również stężenie sTNF RII – rozpuszczalnego receptora II dla TNF było istotnie wyższe w

grupie osób z nefropatią niż u osób bez tego powikłania ($p < 0,001$). Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w stężeniu czynników wzrostowych. Wyniki przedstawiono w tabeli 17 oraz na rycinach 3, 4, 5, 6.

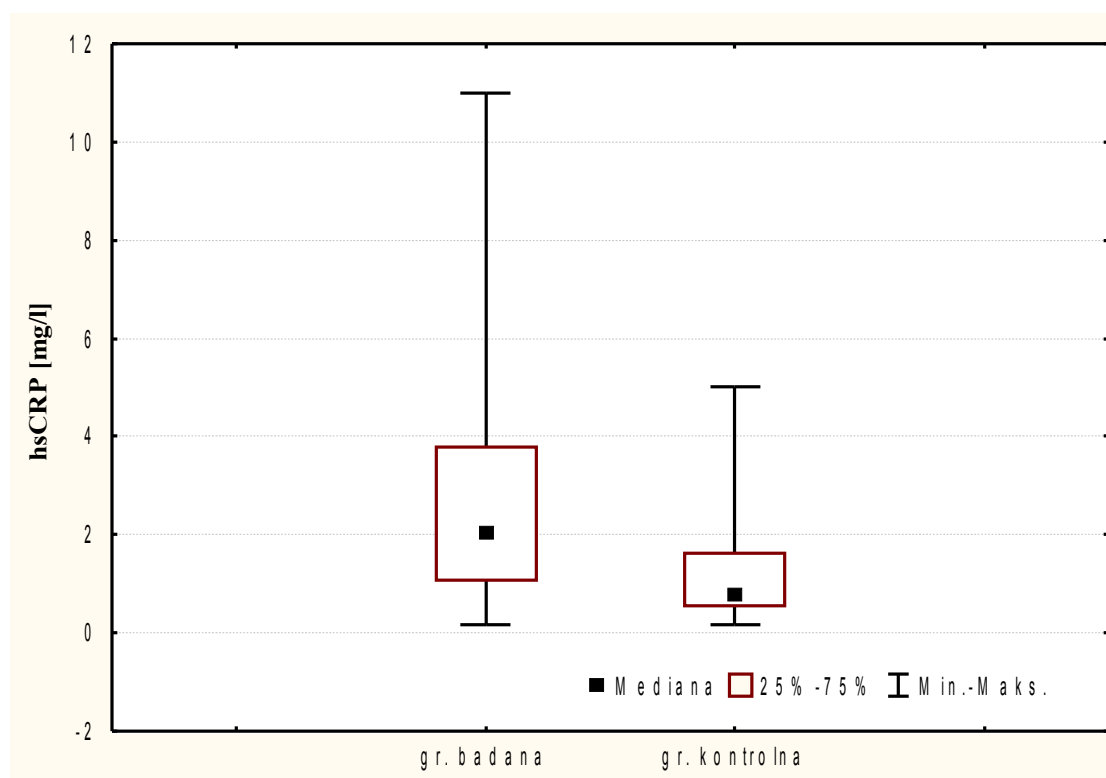
Tabela 17. Parametry stanu zapalnego: analiza porównawcza pomiędzy grupą chorych z nefropatią cukrzycową (grupa badana) oraz grupą kontrolną chorych z cukrzycą typu 2 bez powikłań.

Badany parametr	Jednostki	Grupa badana Średnia $\pm$ SD	Grupa kontrolna Średnia $\pm$ SD	P
fibrynogen	g/l	4,06 $\pm$ 1,49	3,12 $\pm$ 1,91	<0,01
hsCRP	mg/l	3,19 $\pm$ 3,02	1,46 $\pm$ 1,5	<0,01
IL-6	pg/ml	3,09 $\pm$ 2,52	1,4 $\pm$ 1,03	<0,001
TGF β I	ng/ml	82,01 $\pm$ 69,4	77,79 $\pm$ 84,3	NS
VEGF	ng/ml	177,2 $\pm$ 144,9	159,9 $\pm$ 166,6	NS
sTNF RII	pg/ml	4700 $\pm$ 2188	3111,8 $\pm$ 2591,7	<0,001
PDGF-BB	pg/ml	597,3 $\pm$ 422,4	440,1 $\pm$ 371,2	0,09

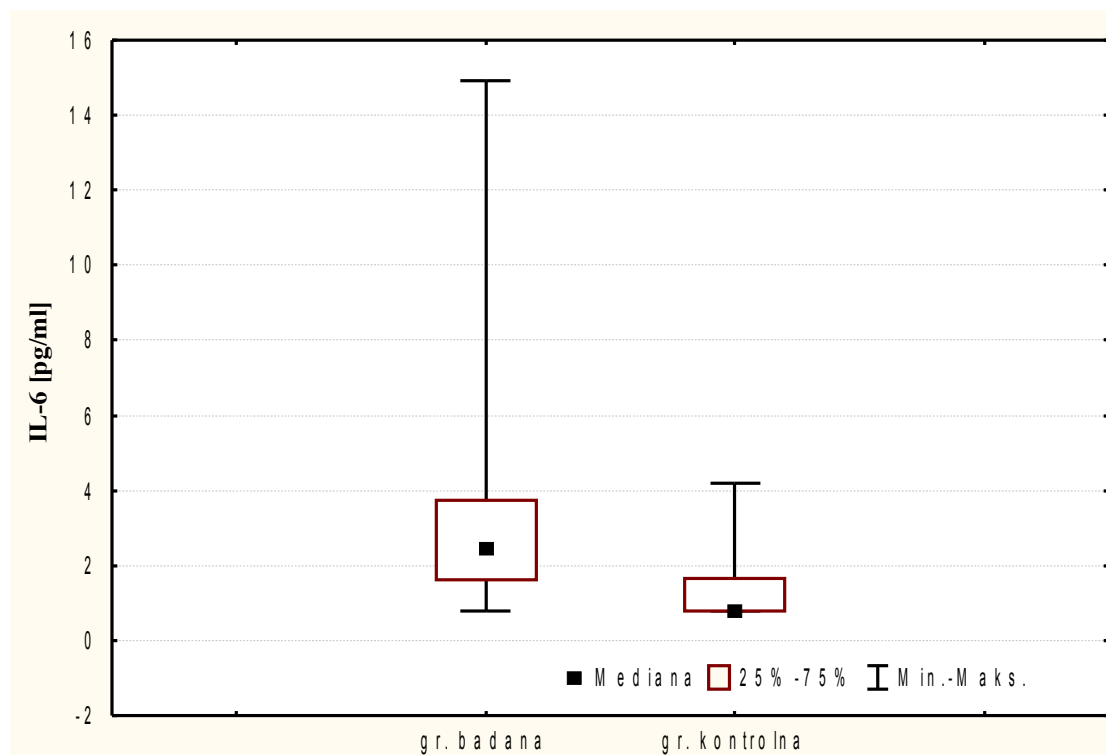
Rycina 3. Porównanie stężenia fibrynogenu w osoczu w badanych grupach ($p < 0,01$).



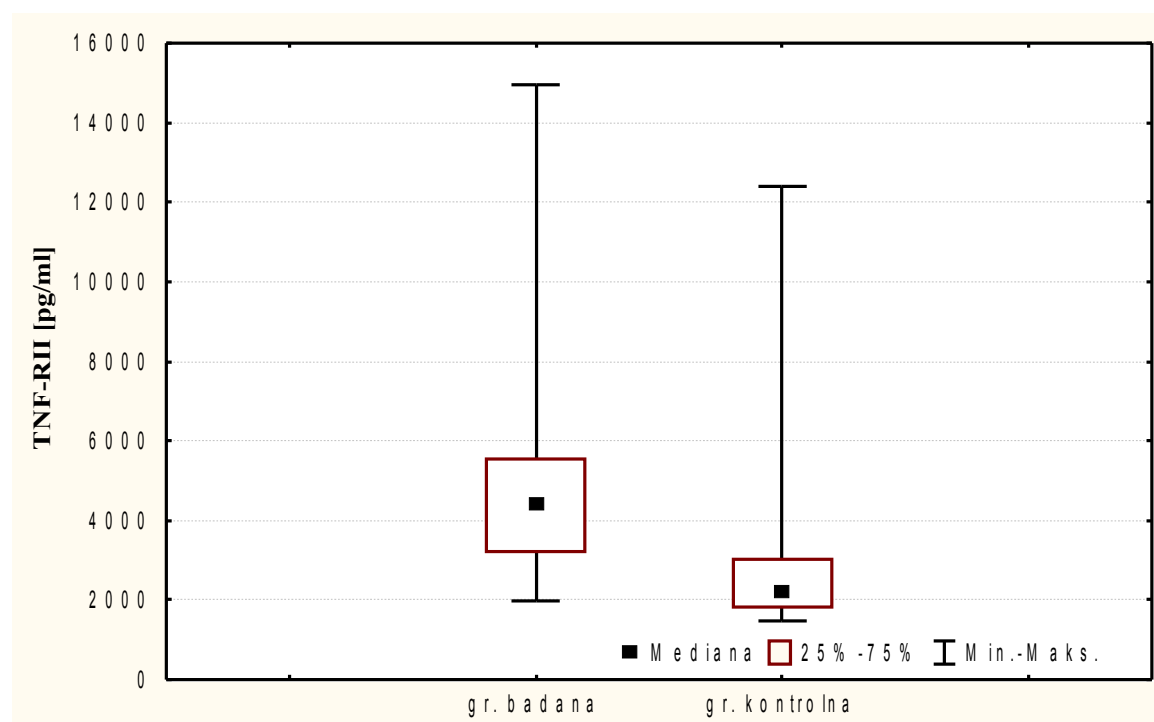
Rycina 4. Porównanie stężenia hsCRP w osoczu w badanych grupach ($p < 0,01$).



Rycina 5. Porównanie stężenia IL - 6 w osoczu w badanych grupach ($p < 0,001$).



Rycina 6. Porównanie stężenia sTNF-RII w osoczu w badanych grupach ($p < 0,001$).

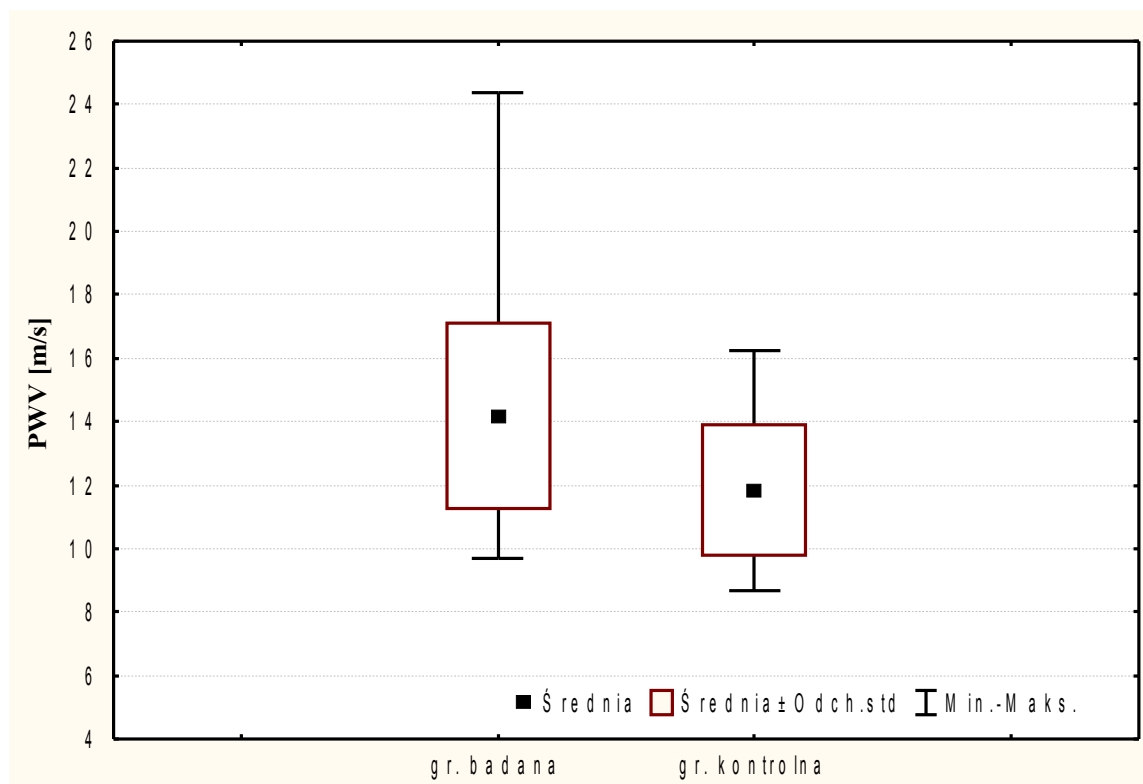


W grupie chorych z nefropatią cukrzycową stwierdzono istotnie statystycznie wyższe wartości prędkości rozchodzenia się fali tętna niż w grupie kontrolnej ($p < 0,01$). Zaobserwowano także trend do występowania wyższej wartości grubości kompleksu intima-media w prawej i lewej tętnicy szyjnej wspólnej w badanej grupie w porównaniu z grupą kontrolną, jednak nie wykazano istotności statystycznej pomiędzy wykonanymi pomiarami. Może to świadczyć o istnieniu większej sztywności naczyń tętniczych w grupie chorych z nefropatią w porównaniu do osób bez tego powikłania. Także w grupie badanej stwierdzono istotnie statystycznie niższe wartości przepływu spoczynkowego ($p < 0,01$) oraz po okluzji ($p = 0,05$) w porównaniu z grupą bez powikłań, co może świadczyć o zaburzeniach mikrokrażenia skórno u osób z nefropatią. Wyniki przedstawiono w tabeli 18 oraz na rycinach 7, 8a, 8b, 9, 10.

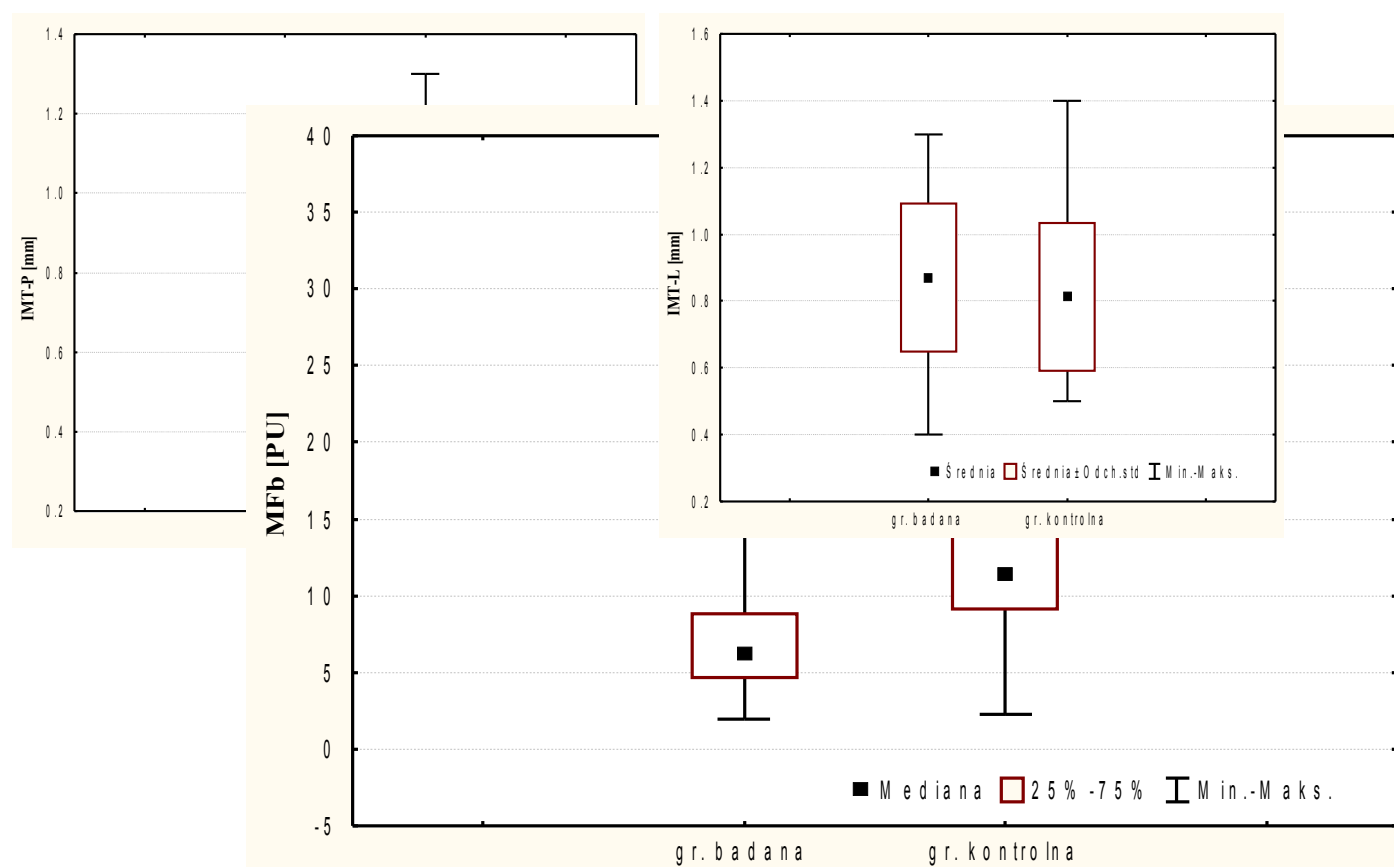
Tabela 18. Wyniki badań oceniających funkcję i strukturę naczyń: analiza porównawcza pomiędzy grupą chorych z nefropatią cukrzycową (grupa badana) oraz grupą kontrolną chorych z cukrzycą typu 2 bez powikłań.

Badany parametr	Jednostki	Grupa badana Średnia $\pm$ SD	Grupa kontrolna Średnia $\pm$ SD	P
AoPWV	m/s	14,1 $\pm$ 2,9	11,8 $\pm$ 2,1	<0,01
IMT L	mm	0,87 $\pm$ 0,22	0,81 $\pm$ 0,22	0,07
IMT P	mm	0,86 $\pm$ 0,2	0,77 $\pm$ 0,21	0,07
MFb	PU	7,7 $\pm$ 5,1	12,1 $\pm$ 7,1	<0,01
PF	PU	27,4 $\pm$ 22,2	30,8 $\pm$ 10,7	0,05
AUC	PU/s	670,7 $\pm$ 563,7	566,2 $\pm$ 514,4	NS
MF44	PU	88,5 $\pm$ 46,8	94,6 $\pm$ 47,3	NS

Rycina 7. Porównanie wartości AoPWV w grupie badanej i kontrolnej ($p < 0,01$).

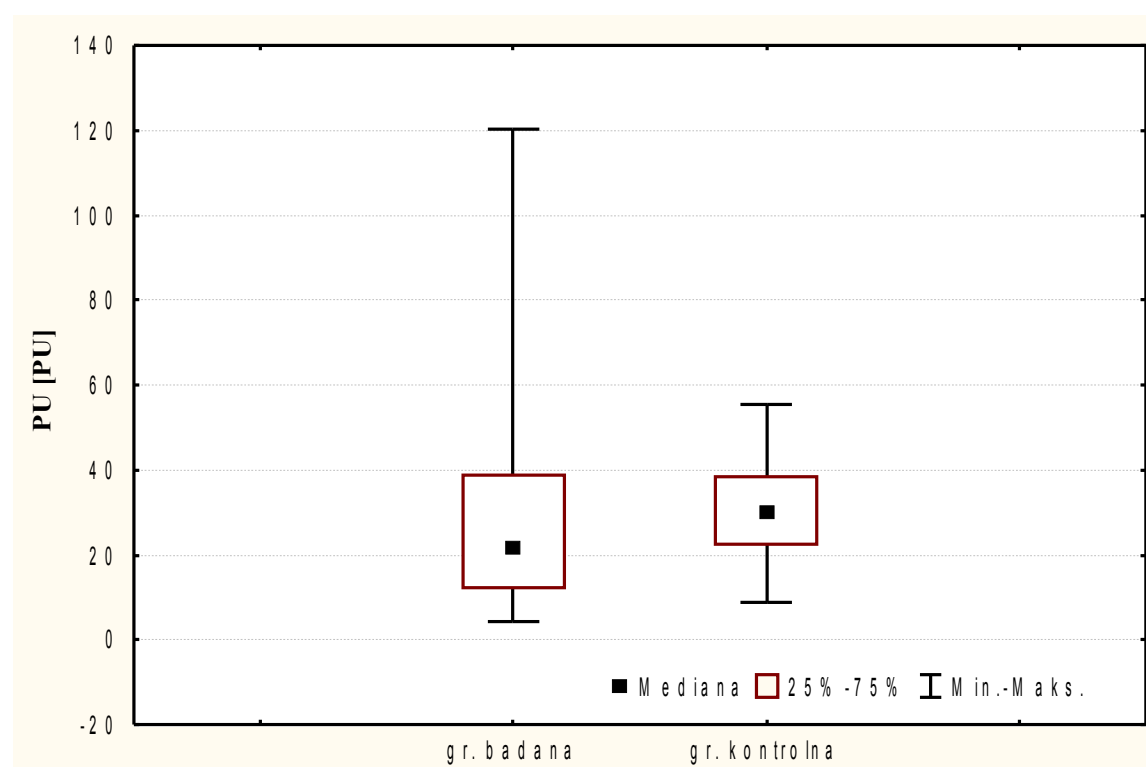


Rycina 8a i b. Porównanie wartości IMT P i L w grupie badanej i kontrolnej ($p=0,07$).



Rycina 9. Porównanie wartości MFb w grupie badanej i kontrolnej ($p<0,01$).

Rycina 10. Porównanie wartości PF w grupie badanej i kontrolnej ($p<0,01$).



4.4. Charakterystyka grupy chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji.

Po 36 miesiącach u części badanych chorych z nefropatią cukrzycową wykonano badanie kontrolne, obejmujące ocenę standardowych parametrów biochemicznych, a także funkcji nerek i stężenia badanych czynników zapalnych oraz ocenę zmian naczyniowych obrazujących stan układu krążenia. Kontrolę przeprowadzono u pacjentów, którzy pozostali pod stałą opieką Poradni i wyrazili zgodę na powtórne badanie. Spośród 48 pacjentów uzyskano informacje o 32 osobach, natomiast przebadano ponownie 25 osób. U 4 osób z początkowej grupy rozpoczęto leczenie nerkozastępcze (chorzy ci zostali wyłączeni z badania), 3 osoby zmarły z przyczyn powikłań sercowo – naczyniowych. Nie udało się przeprowadzić kontroli ani uzyskać informacji o 16 osobach. Charakterystykę grupy badanej po 36 miesiącach przedstawiono w tabeli 19.

Tabela 19. Charakterystyka chorych z nefropatią cukrzycową u których wykonano badania kontrolne po 36 miesiącach. Wybrane parametry antropometryczne i biochemiczne krwi w odniesieniu do obowiązujących norm referencyjnych.

Badany parametr	Jednostki	Średnia $\pm$ SD	Mediana	Min-Max	Zakres wartości referencyjnych
BMI	kg/m ²	26,4 $\pm$ 4,0	25,5	19,9 – 34,4	20 – 25
Waga	kg	75,3 $\pm$ 14,2	72	51 - 108	
SBP	mmHg	139 $\pm$ 18	140	110 - 170	<140
DBP	mmHg	72,5 $\pm$ 10	70	50 - 90	<70
PP	mmHg	66,4 $\pm$ 11,9	65	40 - 90	
Cholest. całk	mmol/l	4,9 $\pm$ 0,9	4,9	3,2 – 6,5	3,20 – 5,20
HDL	mmol/l	1,5 $\pm$ 0,5	1,3	0,8 – 2,9	0,90 – 3,00
LDL	mmol/l	2,4 $\pm$ 0,8	2,2	1,2 – 4,2	0,20 – 3,40
Triglicerydy	mmol/l	1,9 $\pm$ 0,8	1,8	0,9 – 4,2	0,20 – 2,30
Glukoza	mmol/l	6,2 $\pm$ 1,5	5,6	4,2 – 9,3	3,30 – 5,60
HbA1c	%	6,6 $\pm$ 1,0	6,2	5,5 – 8,6	< 7,0%
GFR	ml/min/1,73m ²	40,1 $\pm$ 22,5	31	12 - 96	> 60
Kreatynina	μmol/l	164,0 $\pm$ 56,9	176,3	76 - 342	45,0 – 97,0
Mocznik	mmol/l	13,6 $\pm$ 4,4	14	6 - 25	1,7 – 8,3
kw. moczowy	μmol/l	397,8 $\pm$ 61,3	401	295 - 501	202 - 416
Albuminuria	mg/doba	1080 $\pm$ 725	1000	0 - 2500	0
Hb	g/dl	12,3 $\pm$ 1,4	11,8	10,6 – 15,2	11,0 – 17,0
Fe	μmol/l	14,5 $\pm$ 5,9	12,7	5,7 – 28,8	10,6 – 28,3
Ca	mmol/l	2,2 $\pm$ 0,1	2,2	1,98 – 2,45	2,02 – 2,61
P	mmol/l	1,34 $\pm$ 0,2	1,3	0,73 – 1,76	0,87 – 1,45
Ca x P	mmol ² /l ²	2,97 $\pm$ 0,4	2,95	1,8 – 3,96	
AP	U/l	197,2 $\pm$ 67,5	196	108 - 377	91 - 258

Chorzy z nefropatią cukrzycową którzy pozostali w badaniu po 3 latach obserwacji, charakteryzowali się znacznie podwyższonymi wartościami średnimi kreatyniny i mocznika, zaledwie u 3 chorych wartości parametrów nerkowych pozostały w granicach normy. Średnia wartość eGFR u wszystkich chorych wynosiła 40,1 $\pm$ 22,5 ml/min/1,73m², co świadczyło iż

chorzy ci znajdowali się w III – V stopniu niewydolności nerek. Zaobserwowano także dużą rozpiętość zmierzonej albuminurii, od braku obecności białka w moczu do 2,5 g/dobę.

Parametry gospodarki wapniowo – fosforanowej pozostawały w normie lub nieznacznie przekraczały granice normy. Chorzy ci charakteryzowali się nieznaczną nadwagą (średnia wartość BMI $26,4 \pm 4,0$ kg/m²) oraz w większości prawidłowym lipidogramem. U 2 chorych rozpoznano anemię nerkopochodną (wartość Hgb < 11,0 g/dl) przy prawidłowych wartościach żelaza w surowicy krwi.

W tabeli 20 przedstawiono wartości średnie wybranych parametrów biochemicznych u tych samych chorych wyjściowo oraz po 36 miesiącach.

Tabela 20. Wybrane parametry biochemiczne: analiza różnic w grupie chorych z nefropatią cukrzycową wyjściowo i po 36 miesiącach badania.

Badany parametr	Jednostki	wyjściowo Średnia ± SD	po 36 miesiącach Średnia ± SD	P
BMI	kg/m ²	27,0 ± 4,2	26,4 ± 4,0	<0,01
Waga	kg	76,0 ± 15,4	75,3 ± 14,2	NS

SBP	mmHg	141 ± 16,9	139 ± 18	NS
DBP	mmHg	73 ± 10,9	72,5 ± 10	NS
PP	mmHg	68 ± 13,6	66,4 ± 11,9	NS
Cholest. całkow.	mmol/l	5,0 ± 1,0	4,9 ± 0,9	NS
Triglicerydy	mmol/l	1,9 ± 1,0	1,9 ± 0,8	NS
Glukoza	mmol/l	7,1 ± 2,7	6,2 ± 1,5	<0,01
HbA1c	%	7,2 ± 1,5	6,6 ± 1,0	<0,01
GFR	ml/min	41,6 ± 23,8	40,1 ± 22,5	NS
Kreatynina	μmol/l	157 ± 62	164,0 ± 56,9	NS
Mocznik	mmol/l	12,0 ± 4,7	13,7 ± 4,4	<0,05
kw. moczowy	μmol/l	387,2 ± 78,8	397,8 ± 61,3	NS
Albuminuria	mg/doba	1190 ± 900	1080 ± 725	NS
Hb	g/dl	12,5 ± 1,4	12,3 ± 1,4	NS
Fe	μmol/l	14,5 ± 0,8	14,5 ± 5,9	NS
Ca	mmol/l	2,33 ± 0,1	2,2 ± 0,1	<0,05
P	mmol/l	1,3 ± 0,2	1,43 ± 0,2	<0,05
Ca x P	mmol ² /l ²	2,9 ± 0,5	2,97 ± 0,4	NS
AP	U/l	197 ± 72	197,2 ± 67,5	NS

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między średnimi wartościami albuminurii, kreatyniny, kwasu moczowego pomiędzy badanymi grupami. Jedynie wartość średnia mocznika była nieznacznie wyższa u chorych po 36 miesiącach obserwacji. Także wyliczony klirens kreatyniny nie różnił się w badanych grupach. Nie stwierdzono także istotnych różnic w wartościach lipidogramu, aczkolwiek wartości maksymalne, były niższe po 36 miesiącach obserwacji. Natomiast co warto podkreślić wyrównanie metaboliczne cukrzycy mierzone poziomem glikemii na czczo i HbA1c, było istotnie ($p < 0,01$) lepsze u chorych po 36 miesiącach leczenia. Także wartości ciśnienia tętniczego i ciśnienia tętna nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy grupami.

W tabeli 21 przedstawiono wartości markerów zapalnych w badanej grupie chorych w momencie rozpoczęcia obserwacji i po 36 miesiącach.

Tabela 21. Porównanie wartości markerów zapalnych w badanej grupie chorych.

Badany parametr	Jednostki	wyjściowo Średnia ± SD	po 36 miesiącach Średnia ± SD	P
fibrynogen	g/l	3,9 ± 1,5	3,5 ± 1,3	<0,01
hsCRP	mg/l	3,4 ± 3,3	2,8 ± 2,2	NS
IL-6	pg/ml	3,3 ± 3,2	2,1 ± 1,4	NS
TGF β I	ng/ml	62,5 ± 73	55,5 ± 40,2	NS
VEGF	ng/ml	178,0 ± 180,0	194,0 ± 143,0	NS
sTNF RII	pg/ml	5046 ± 1784	4191 ± 2045	NS
PDGF-BB	pg/ml	455,6 ± 413,8	476,1 ± 658,4	NS

W grupie chorych z nefropatią stężenie fibrynogenu obniżyło się istotnie ($p < 0,01$) po 36 miesiącach obserwacji. Natomiast wartości pozostałych markerów zapalnych nie różniły się istotnie w grupie chorych z nefropatią cukrzycową w momencie rozpoczęcia i po 36 miesiącach obserwacji. Także zakres wartości minimalnych i maksymalnych oraz mediana nie różniły się pomiędzy badanymi grupami.

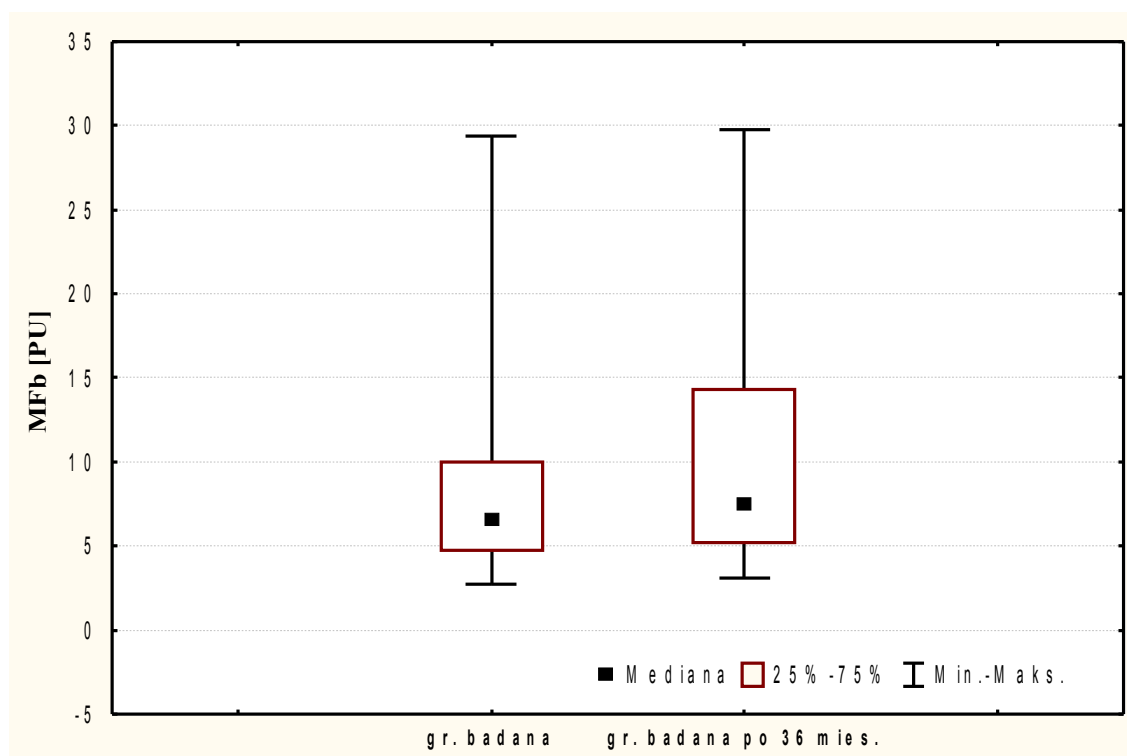
Zaobserwowano natomiast fakt, iż u dwóch pacjentek z wartościami sTNF RII powyżej 10000 pg/ml (odpowiednio 12407 i 14940 pg/ml) rozwinęły się w trakcie obserwacji rak szyjki macicy oraz rak podstawno-komórkowy, przy czym należy podkreślić, że w momencie włączenia do obserwacji obie pacjentki były zdrowe.

W tabeli 22 przedstawiono średnie wartości parametrów badań oceniających funkcję i strukturę naczyń wykonanych po 36 miesiącach obserwacji. Nie zaobserwowano różnic w wartościach opisujących prędkość fali tętna w aorcie oraz grubości kompleksu intima-media w prawej i lewej tętnicy szyjnej wspólnej. Natomiast stwierdzono poprawę wartości dla mikrokrażenia zarówno w warunkach podstawowych ($p < 0,05$), jak i trend do poprawy wartości po okluzji ($p = 0,09$), AUC ($p < 0,05$) oraz w temperaturze 44 stopni ($p = 0,08$). Wyniki przedstawiono na rycinie 11.

Tabela 22. Porównanie wartości parametrów badań oceniających funkcję i strukturę naczyń w badanej grupie chorych.

Badany parametr	Jednostki	wyściowo Średnia $\pm$ SD	po 36 miesiącach Średnia $\pm$ SD	P
AoPWV	m/s	13,3 $\pm$ 1,9	13,5 $\pm$ 2,1	NS
IMT L	mm	0,9 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,2	NS
IMT P	mm	0,9 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,2	NS
MFb	PU	8,8 $\pm$ 6,3	10,5 $\pm$ 8,1	$< 0,05$
PF	PU	31,6 $\pm$ 27,9	33,7 $\pm$ 24,9	$= 0,09$
AUC	PU/s	636,5 $\pm$ 572,5	528,1 $\pm$ 401,5	$< 0,05$
MF44	PU	85,6 $\pm$ 53,5	103,9 $\pm$ 67,1	$= 0,08$

Rycina 11. Porównanie wartości MFb w badanej grupie na początku i po 36 miesiącach obserwacji ($p < 0,05$).



4.5. Korelacje wyników w grupie badanej:

4.5.1. Zależność pomiędzy zmianami zaobserwowanymi w badaniach oceniających funkcję i strukturę naczyń u chorych z nefropatią cukrzycową a wybranymi wynikami badań biochemicznych i antropometrycznych oraz czynnikami zapalnymi i wzrostowymi.

Przyjęto założenie iż zmiany chorobowe przejawiające się w wynikach badań obrazowych są efektem wielu czynników patologicznych mających źródło w stanie wydolności nerek, zaburzeniach metabolicznych, wyrównaniu cukrzycy, zaburzeniach gospodarki wapniowo – fosforanowej oraz obecności stanu zapalnego. Do analizy włączono także wiek oraz BMI. Wyniki przedstawiono w tabelach 23, 24, 25, 26.

Tabela 23. Korelacja wyników parametrów badań oceniających funkcję i strukturę naczyń u chorych z nefropatią cukrzycową z wybranymi wynikami badań biochemicznych i antropometrycznych.

Badany parametr	AoPWV		IMT P		IMT L	
	r	p	r	p	r	p
Parametry antropometryczne						
BMI	0,34	0,01	-	NS	-	NS
wiek	-	NS	-	NS	-	NS
Parametry wydolności nerek						
GFR	-	NS	-	NS	-	NS
mocznik	-	NS	-	NS	-	NS
kreatynina	-	NS	-	NS	-	NS
kwas moczowy	-	NS	-	NS	-	NS
albuminuria	-	NS	0,4	0,005	0,4	0,005
Parametry wyrównania cukrzycy i lipidogram						
glukoza	-	NS	0,33	0,02	-	NS
HbA1c	-	NS	0,31	0,03	0,35	0,01
Cholest. całkow.	-	NS	-	NS	0,31	0,03
HDL	-	NS	-	NS	-	NS
LDL	-	NS	-	NS	-	NS
Triglicerydy	-	NS	-	NS	-	NS
Parametry gospodarki wapniowo – fosforanowej						
Ca	-	NS	-0,34	0,02	-	NS
P	-	NS	0,3	0,02	-	NS
Ca x P	-	NS	-	NS	0,3	0,5
AP	-	NS	-	NS	-	NS

W tabeli 23 przedstawiono związki parametrów stanowiących o sztywności naczyń tętniczych z wybranymi wynikami badań biochemicznych i antropometrycznych. Wykazano istnienie zależności pomiędzy wartością AoPWV oraz średnią wartością BMI w badanej grupie ($r=0,34$; $p<0,01$). Dodatkowo stwierdzono związek pomiędzy wartościami IMT a

parametrami wyrównania cukrzycy: glukozą i HbA1c ($r=0,33$; $p=0,02$ oraz $r=0,3$; $p<0,03$) (Rycina 12 a i 12b), a także stwierdzono istnienie związku ze stężeniem cholesterolu całkowitego ($r=0,31$; $p=0,03$).

Ponadto wykazano iż wzrost albuminurii wiąże się ze wzrost wartości IMT ($r=0,4$ i $p=0,005$). Także parametry gospodarki wapniowo – fosforanowej istotnie wpływały na wartość IMT, wraz z pogłębianiem się zaburzeń mineralnych rosła grubość IMT P i L.

Rycina 12 a i b. Korelacje IMT P i L z HbA1c ($r=0,31$ i $p=0,03$ oraz $r=0,35$ i $p=0,01$)

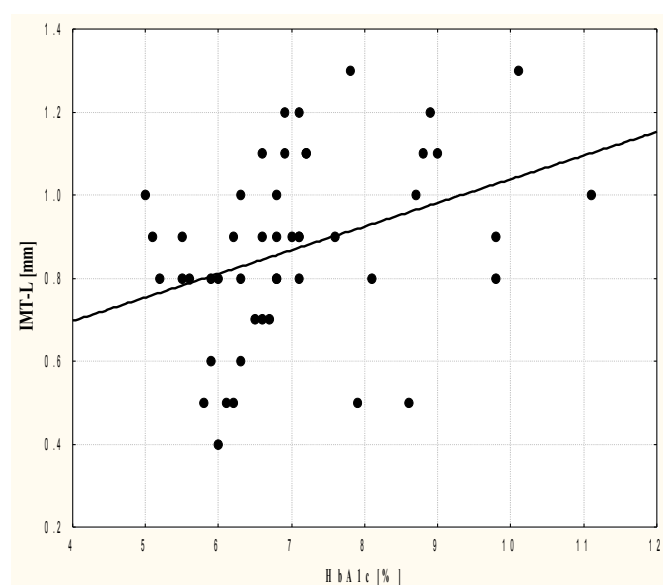
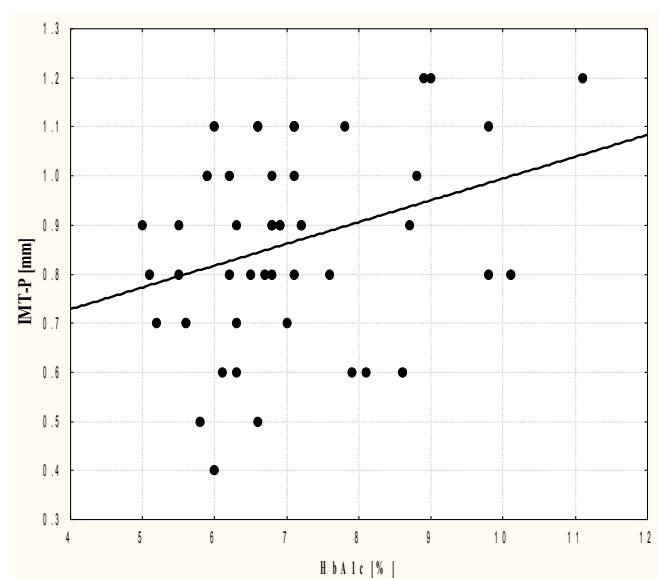


Tabela 24. Korelacja wyników oceny mikrokążenia u chorych z nefropatią cukrzycową z wybranymi wynikami badań biochemicznych i antropometrycznych.

	MFb	PF	AUC	MF44
--	-----	----	-----	------

Badany parametr	r	p	r	p	r	p	r	p
Parametry antropometryczne								
BMI	-	NS	-0,32	0,03	-	NS	-	NS
wiek	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
Parametry wydolności nerek								
GFR	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
mocznik	-	NS	0,6	<0,0001	-	NS	-	NS
kreatynina	-	NS	0,6	<0,0001	-	NS	-	NS
kw. moczowy	0,4	0,06	0,3	0,05	-	NS	0,3	0,02
albuminuria	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
Parametry wyrównania cukrzycy i lipidogram								
glukoza	-	NS	-	NS	-0,3	0,009	-	NS
HbA1c	-	NS	-	NS	-0,04	0,009	-	NS
cholest. całkow.	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
HDL	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
LDL	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
triglicerydy	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
Parametry gospodarki wapniowo - fosforanowej								
Ca	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
P	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
Ca x P	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
AP	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS

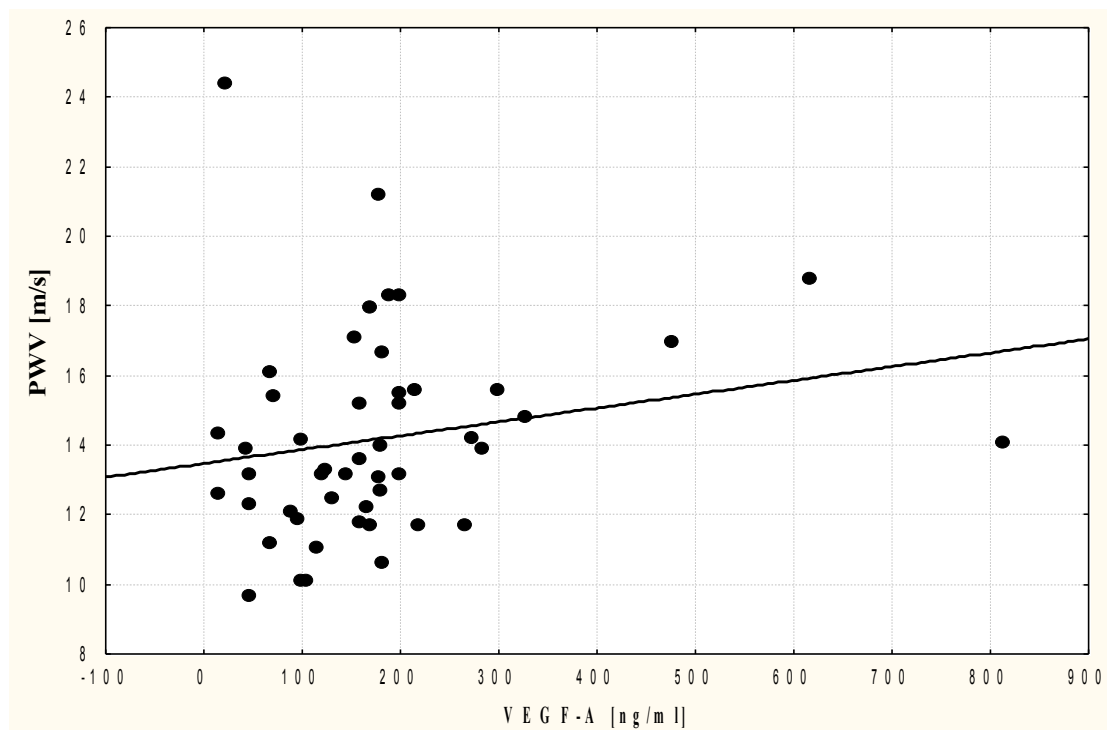
W tabeli 24 przedstawiono istnienie związku pomiędzy parametrami mikrokążeń, przede wszystkim przepływem po okluzji i parametrami wydolności nerek: kreatyniny, mocznika ($r=0,6$; $p<0,0001$). Na uwagę zasługuje fakt istnienia związku wszystkich parametrów mikrokążeń ze stężeniem kwasu moczowego. Ponadto stwierdzono fakt, iż przy spadku wartości BMI rośnie szybkość przepływu po okluzji ($r=-0,32$; $p=0,03$). Nie wykazano istotnego związku stanu gospodarki wapniowo - fosforanowej i mikrokążeń.

Tabela 25. Korelacja wyników parametrów badań oceniających funkcję i strukturę naczyń u chorych z nefropatią cukrzycową z wybranymi czynnikami zapalnymi i wzrostowymi.

Badany parametr	AoPWV		IMT P		IMT L	
	r	p	r	p	r	p
Czynniki zapalne						
fibrynogen	-	NS	-	NS	-	NS
hsCRP	-	NS	-	NS	-	NS
IL-6	-	NS	-	NS	-	NS
sTNF RII	-	NS	-	NS	-	NS
Czynniki wzrostowe						
TGF β I	0,3	0,05	-	NS	-	NS
VEGF	0,3	0,03	-	NS	-	NS
PDGF-BB	0,4	0,009	-	NS	-	NS

W tabeli 25 u chorych z nefropatią cukrzycową wykazano istnienie związku pomiędzy wartością AoPWV a wartościami wszystkich czynników wzrostowych. Nie stwierdzono natomiast związku czynników zapalnych na wartości obrazujące stan naczyń w badanej grupie chorych (tabela 25). Wyniki przedstawiono na rycinach 13, 14, 15.

Rycina 13. Korelacja wartości AoPWV i stężenia VEGF ($r=0,3$; $p=0,03$)



Rycina 14. Korelacja Wartości AoPWV a TGF β I ($r=0,3$; $p=0,05$).

Rycina 15. Korelacja Wartości AoPWV a PDGF BB ($r=0,4$; $p=0,009$).

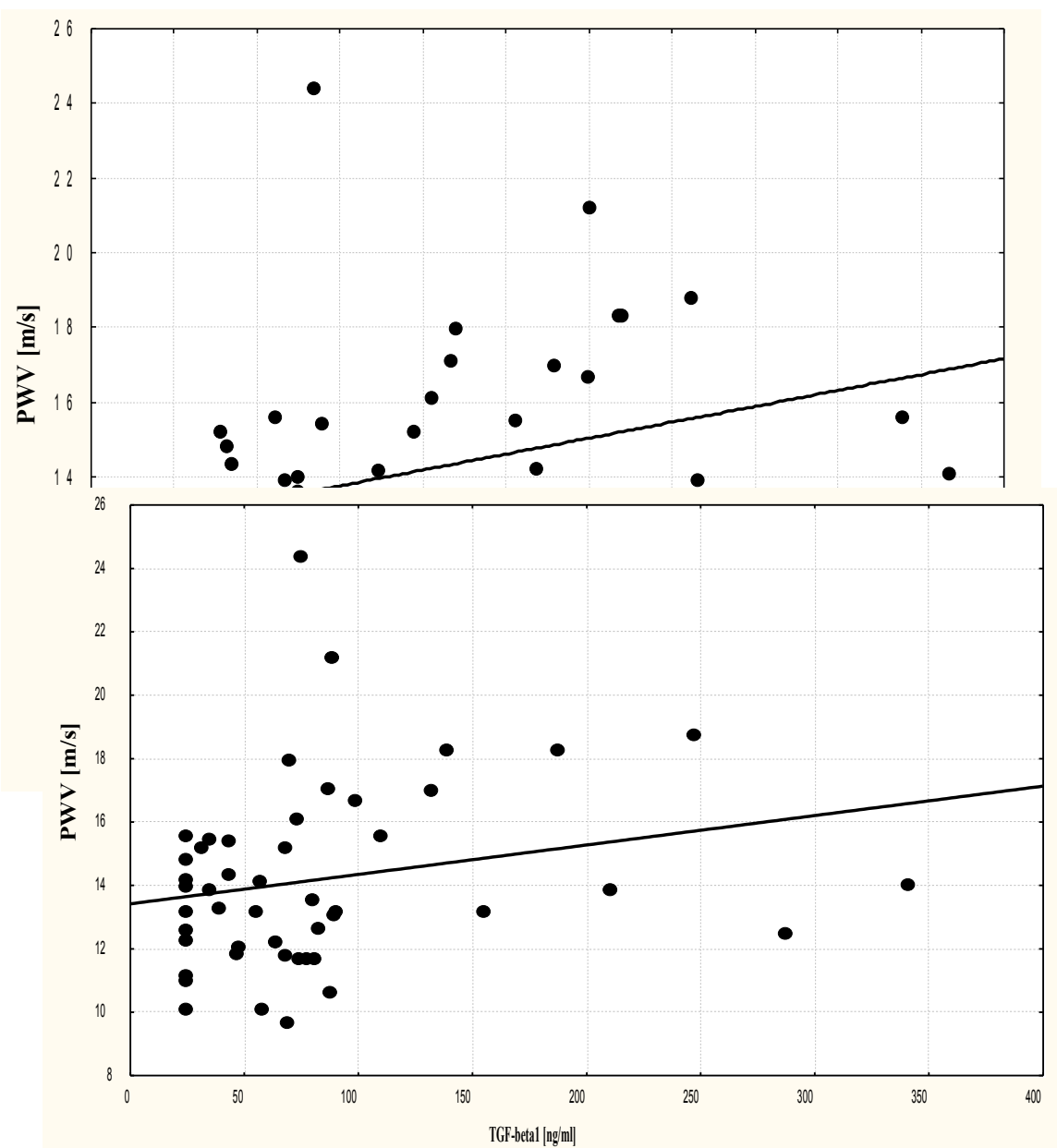


Tabela 26. Korelacja wyników oceny mikrokrazenia u chorych z nefropatią cukrzycową z czynnikami zapalnymi i wzrostowymi.

Badany parametr	MFb		PF		AUC		MF44	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Czynniki zapalne								
fibrynogen	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
hsCRP	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
IL-6	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
sTNF RII	-	NS	0,6	<0,0001	-	NS	-	NS
Czynniki wzrostowe								
TGF β I	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
VEGF	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
PDGF-BB	-0,3	0,01	-0,3	0,03	-	NS	-	NS

Badane czynniki zapalne i wzrostowe za wyjątkiem PDGF-BB ($r=-0,3$; $p=0,01$ i $p=0,03$), nie wykazywały związku z wartościami parametrów mikrokrazenia. Wyniki przedstawiono w tabeli 26.

4.5.2. Zależność pomiędzy parametrami progresji niewydolności nerek u chorych z nefropatią cukrzycową a wybranymi wynikami badań biochemicznych i antropometrycznych oraz czynnikami zapalnymi i wzrostowymi.

W tabelach 27 i 28 przedstawiono związki pomiędzy parametrami progresji niewydolności nerek a wybranymi wynikami badań biochemicznych oraz czynnikami prozapalnymi. Stwierdzono istnienie związku pomiędzy BMI a GFR ($r=0,5$; $p<0,002$). Wykazano także istnienie związku pomiędzy HbA1c a albuminurią ($r=0,4$; $p=0,01$) oraz cholesterolem całkowitym, LDL a albuminurią (odpowiednio $r=0,4$; $p=0,01$ i $r=0,4$; $p=0,002$). Wyniki przedstawiono na rycinach 16, 17, 18. Stwierdzono, iż zwiększenie stężenia takich czynników zapalnych jak IL-6 i sTNF RII wpływa na spadek wartości GFR (odpowiedni $r=-0,3$; $p=0,01$ oraz $r=-0,7$ $p<0,0001$). Wyniki przedstawiono na rycinach 19, 20.

Tabela 27. Korelacja wyników parametrów wydolności nerek u chorych z nefropatią cukrzycową z wybranymi wynikami badań biochemicznych i antropometrycznych.

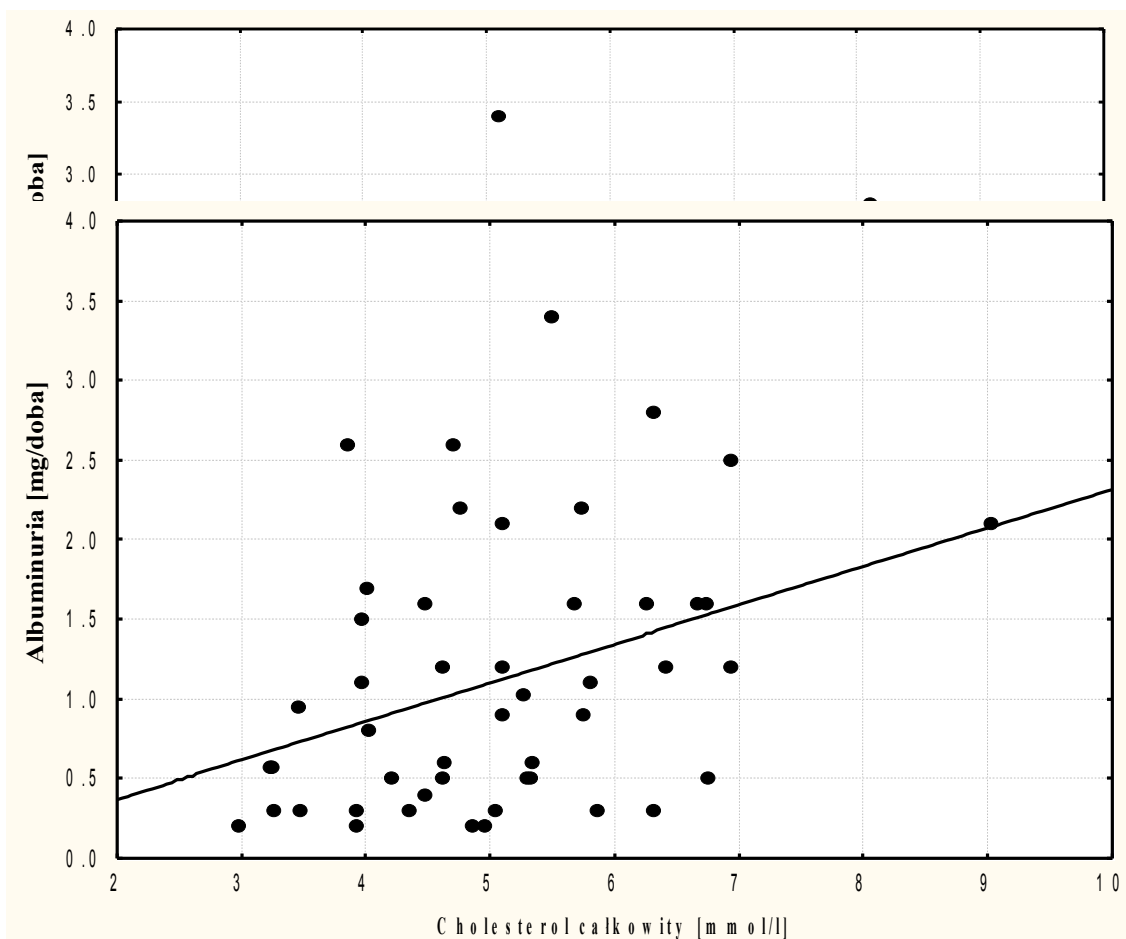
Badany parametr	GFR		albuminuria	
	r	p	r	p
Parametry antropometryczne				
BMI	0,5	0,002	-	NS
wiek	-	NS	-	NS
Parametry wydolności nerek				
kreatynina	-0,9	<0,0000001	-	NS
mocznik	-0,8	<0,0000001	-	NS
kwas moczowy	-	NS	-	NS
Parametry wyrównania cukrzycy i lipidogram				
glukoza	-	NS	-	NS
HbA1c	-	NS	0,4	0,01
cholest.całk.	-	NS	0,4	0,01
HDL	-	NS	-	NS
LDL	-	NS	0,4	0,002
triglicerydy	-	NS	-	NS

Tabela 28. Korelacja wyników parametrów wydolności nerek u chorych z nefropatią cukrzycową z wybranymi czynnikami zapalnymi.

Badany parametr	GFR		albuminuria	
	r	p	r	p
Czynniki zapalne				
fibrynogen	-	NS	-	NS
hsCRP	-	NS	-	NS
IL-6	-0,3	0,01	-	NS
sTNF RII	-0,7	0,000001	-	NS
Czynniki wzrostowe				
TGF β I	-	NS	-	NS

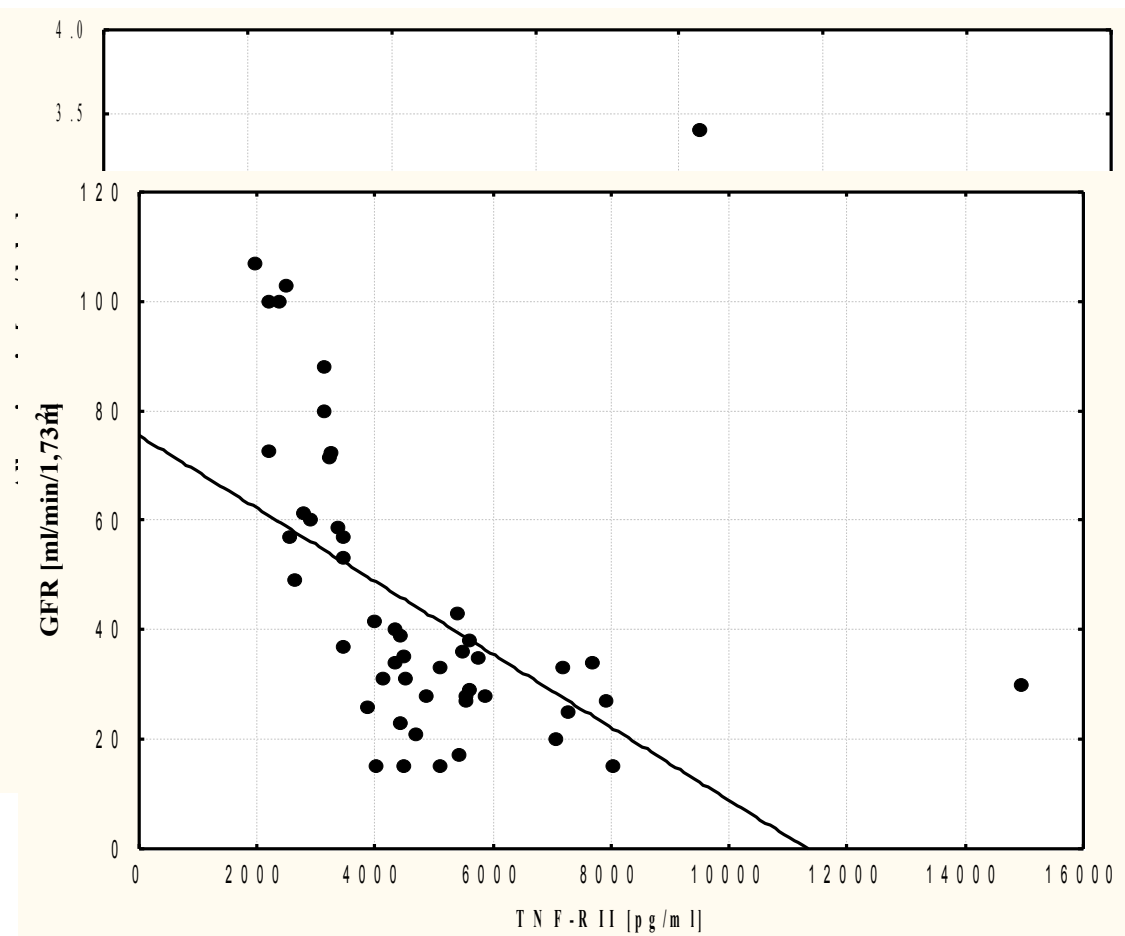
VEGF	-	NS	-	NS
PDGF-BB	-	NS	-	NS

Rycina 16. Korelacja albuminurii i HbA1c u chorych z nefropatią cukrzycową ($r=0,4$; $p=0,01$)



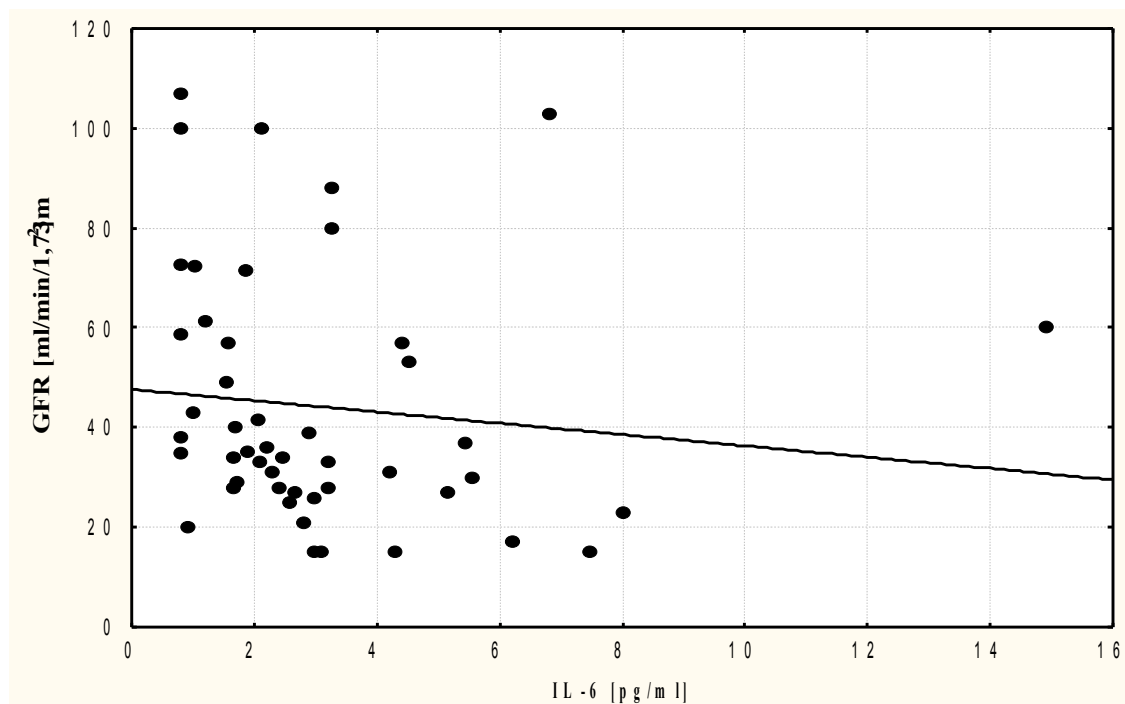
Rycina 17. Korelacja albuminurii i cholesterolu całkowitego w grupie chorych z nefropatią cukrzycową na początku obserwacji ($r=0,4$; $p=0,01$).

Rycina 18. Korelacja albuminurii a LDL w grupie chorych z nefropatią cukrzycową na początku obserwacji ($r=0,4$; $p=0,002$).



Rycina 19. Korelacja GFR a s TNF RII w grupie chorych z nefropatią cukrzycową na początku obserwacji($r=-0,7$; $p=0,000001$).

Rycina 20. Korelacja GFR a IL – 6 w grupie chorych z nefropatią cukrzycową na początku obserwacji ($r=-0,3$; $p=0,01$).



4.6. Korelacje wyników dla grupy z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji.

4.6.1. Zależność pomiędzy badanymi parametrami w badaniach oceniających funkcję i strukturę naczyń u chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji a wybranymi wynikami badań biochemicznych i antropometrycznych oraz czynnikami zapalnymi i wzrostowymi.

Podobnie jak w momencie rozpoczęcia badania zaobserwowano istnienie dodatnich korelacji pomiędzy AoPWV a BMI ($r=0,6$; $p=0,003$) oraz istnienie zależności pomiędzy AoPWV i IMT a HbA1c (odpowiednio $r=0,4$; $p=0,05$ oraz $r=0,4$; $p<0,05$). Także zaobserwowano istotną zależność pomiędzy albuminurią a wartością AoPWV ($r=0,6$; $p=0,009$) oraz albuminuria i IMT P i L ($r=0,5$; $p=0,004$ oraz $r=0,45$; $p=0,02$). Również parametry gospodarki wapniowo – fosforanowej istotnie korelowały z AoPWV i IMT P i L. Stwierdzono także istnienie odwrotnej zależności pomiędzy mikrokrażeniem podstawowym i BMI ($r=-0,5$; $p=0,03$) a także istnienie korelacji przepływem podstawowym i po okluzji a stężeniem kreatyniny i kwasu moczowego (odpowiednio $r=0,4$; $p=0,05$ i $r=0,5$; $p<0,02$). Wyniki przedstawiono w tabeli 29 i 30 oraz na rycinach 21, 22 a i b.

Tabela 29. Korelacja wyników parametrów badań oceniający funkcję i strukturę naczyń u chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji z wybranymi wynikami badań laboratoryjnych i danymi klinicznymi.

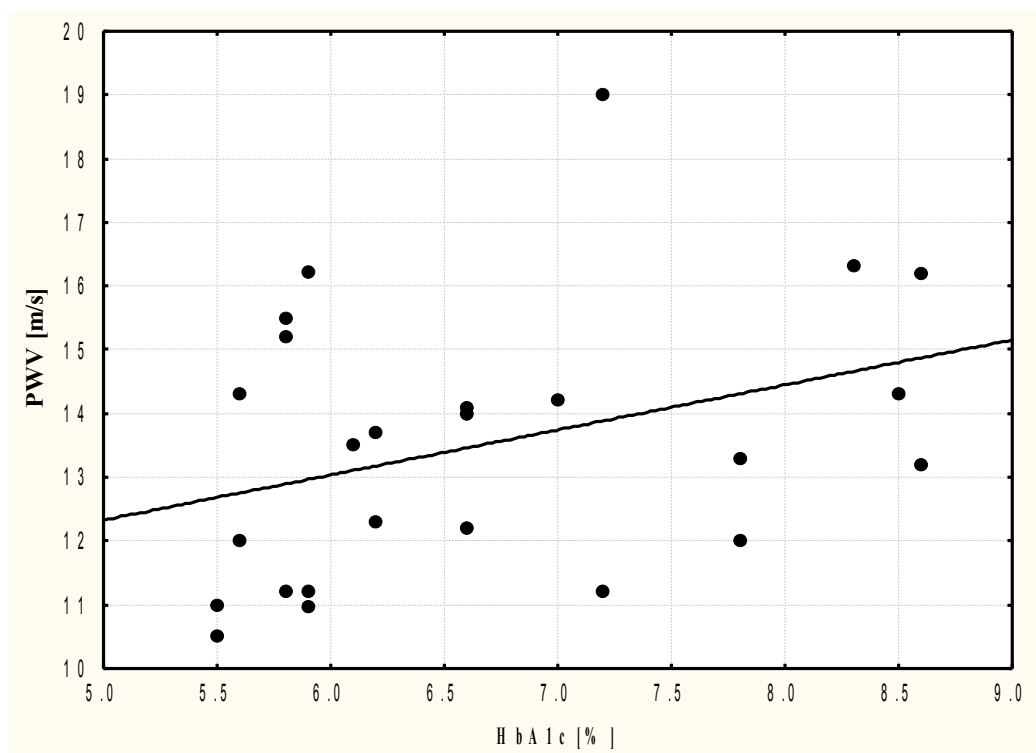
Badany parametr	AoPWV		IMT P		IMT L	
	r	p	r	p	r	p
Parametry antropometryczne						
BMI	0,6	0,003	-	NS	-	NS
wiek	-	NS	-	NS	-	NS
Parametry wydolności nerek						
GFR	-	NS	-	NS	-	NS
mocznik	-	NS	-	NS	-	NS
kreatynina	-	NS	-	NS	-	NS
kwas moczowy	-	NS	-	NS	-	NS
albuminuria	0,6	0,009	0,55	0,004	0,45	0,02
Parametry wyrównania cukrzycy i lipidogram						
glukoza	-	NS	-	NS	-	NS
HbA1c	0,4	0,05	0,4	0,03	0,4	0,05
Cholest. całkow.	-	NS	-	NS	-	NS
HDL	-	NS	-	NS	-	NS
LDL	-	NS	-	NS	-	NS
Triglicerydy	-	NS	-	NS	-	NS
Parametry gospodarki wapniowo - fosforanowej						
Ca	-	NS	-	NS	-	NS
P	-	NS	0,55	0,004	0,5	0,01
Ca x P	-	NS	0,4	0,06	0,4	0,05
AP	0,5	0,02	-	NS	-	NS

Tabela 30. Korelacja wyników mikrokrażenia u chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji z wybranymi wynikami badań laboratoryjnych i danymi klinicznymi.

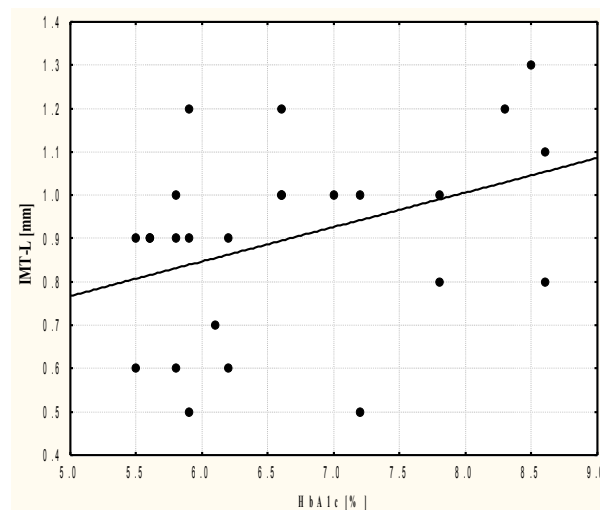
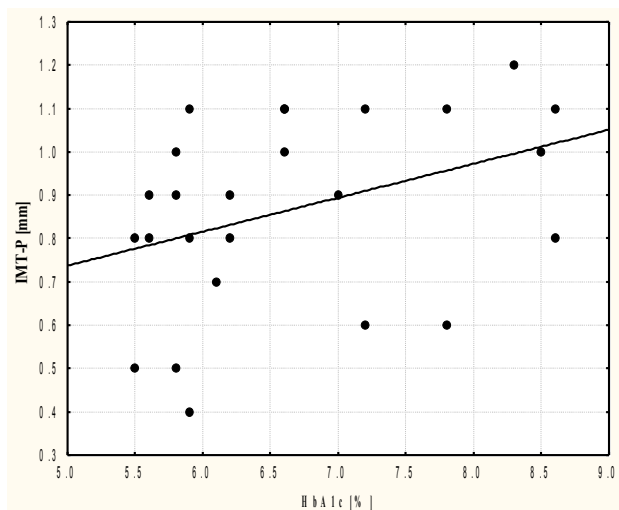
Badany parametr	MFb		PF		AUC		MF44	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Parametry antropometryczne								
BMI	-0,5	0,03	-	NS	-	NS	-	NS
wiek	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
Parametry wydolności nerek								
GFR	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
mocznik	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS

kreatynina	0,4	0,05	0,4	0,05	-	NS	-	NS
kw.moczowy	0,5	0,02	0,5	0,01	-	NS	-	NS
Parametry wyrównania cukrzycy i lipidogram								
glukoza	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
HbA1c	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
cholest.calk.	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
HDL	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
LDL	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
triglicerydy	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
Parametry gospodarki wapniowo - fosforanowej								
Ca	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
P	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
Ca x P	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
AP	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS

Rycina 21. Korelacja wartości AoPWV a HbA1c w grupie chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji ($r=0,4$; $p=0,05$).



Rycina 22a i b. Korelacja wartości IMT P i L a HbA1c w grupie chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji ($r=0,4$; $p=0,03$ i $p=0,05$).



Zaobserwowano także istnienie związku pomiędzy stężeniem IL-6 a IMT P ($r=0,4$ i $p=0,03$), oraz wpływ stężenia fibrynogenu na przepływ po okluzji i w temperaturze 44 stopni Celsjusza. Nie zaobserwowano innych związków pomiędzy czynnikami zapalnymi i wzrostowymi a parametrami badań obrazowych. Wyniki przedstawiono w tabeli 31 i 32.

Tabela 31. Korelacja wyników parametrów badań oceniający funkcję i strukturę naczyń u chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji z wybranymi czynnikami zapalnymi i wzrostowymi.

Badany parametr	AoPWV		IMT P		IMT L	
	r	p	r	p	r	p
Czynniki zapalne						
fibrynogen	-	NS	-	NS	-	NS
hsCRP	-	NS	-	NS	-	NS
IL-6	-	NS	0,4	0,03	-	NS
sTNF RII	-	NS	-	NS	-	NS
Czynniki wzrostowe						

TGF β I	-	NS	-	NS	-	NS
VEGF	-	NS	-	NS	-	NS
PDGF-BB	-	NS	-	NS	-	NS

Tabela 32. Korelacja badanych parametrów mikrokrazenia u chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji ze stężeniem czynników zapalnych i wzrostowych.

Badany parametr	MFb		PF		AUC		MF44	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Czynniki zapalne								
fibrynogen	-	NS	0,5	0,02	-	NS	0,6	0,01
hsCRP	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
IL-6	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
sTNF RII	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
Czynniki wzrostowe								
TGF β I	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
VEGF	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS
PDGF-BB	-	NS	-	NS	-	NS	-	NS

4.6.2. Zależność pomiędzy parametrami progresji niewydolności nerek u chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji a wybranymi wynikami badań biochemicznych i antropometrycznych oraz czynnikami zapalnymi i wzrostowymi.

Zgodnie z oczekiwaniem stwierdzono istnienie istotnej odwrotnej zależności pomiędzy wartością GFR a stężeniem kreatyniny i mocznika w surowicy badanych chorych (odpowiednio $r=-0,8$; $p=0,00001$ oraz $r=-0,7$; $p=0,0002$), także wykazano istnienie zależności pomiędzy wartościami wyrównania cukrzycy i albuminurią, odpowiednio dla stężenia glukozy $r=0,6$ i $p=0,01$, dla HbA1c $r=0,7$ i $p=0,01$. Stwierdzono ponadto wpływ stężenia LDL na wielkość albuminurii, $r=0,6$ i $p=0,02$. Wykazano także związek stężenia hsCRP i sTNF RII i albuminurii (odpowiednio $r=0,5$; $p=0,008$ i $r=0,5$, $p=0,02$) oraz VEGF z wartością GFR ($r=-0,4$; $p=0,03$). Wyniki przedstawiono w tabeli 33 i 34, oraz na rycinach 23, 24, 25, 26.

Tabela 33. Korelacja wyników parametrów wydolności nerek u chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji z wybranymi czynnikami biochemicznymi i wynikami badań antropometrycznych.

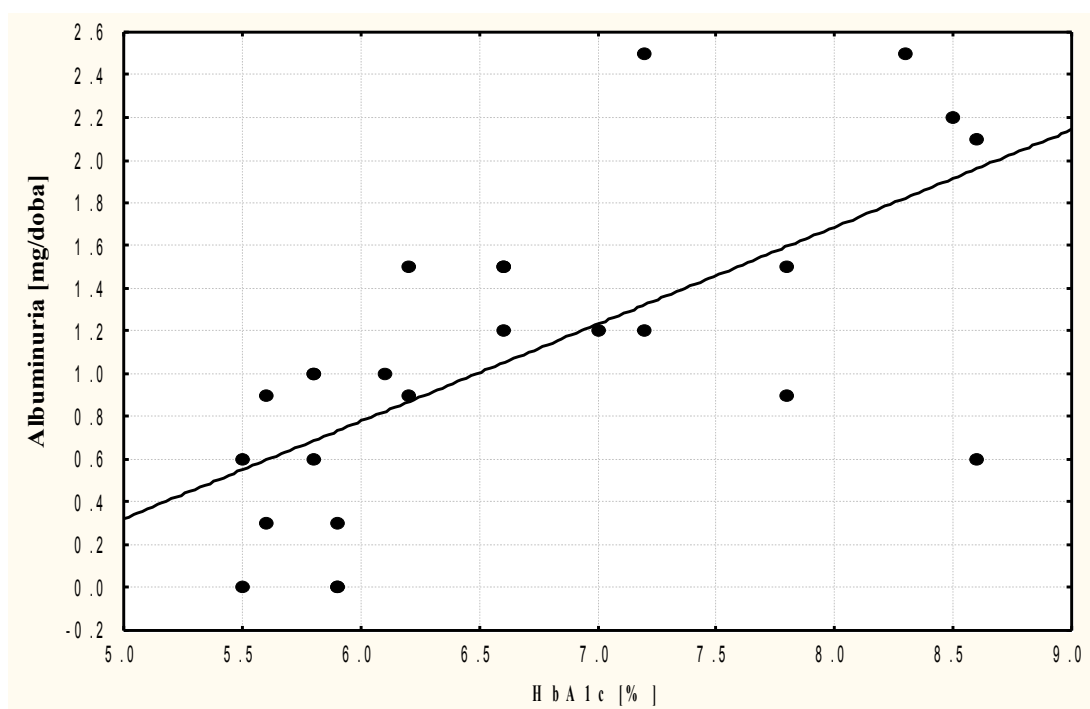
Badany parametr	GFR		albuminuria	
	r	p	r	p
Parametry antropometryczne				
BMI	-	NS	0,4	0,04
wiek	-	NS	-	NS
Parametry wydolności nerek				
kreatynina	-0,8	0,00001	-	NS
mocznik	-0,7	0,0002	-	NS
kwas moczowy	-	NS	-	NS
Parametry wyrównania cukrzycy i lipidogram				
glukoza	-	NS	0,6	0,01
HbA1c	-	NS	0,7	0,01
cholest.całk.	-	NS	-	NS
HDL	-	NS	-	NS
LDL	-	NS	0,6	0,02
triglicerydy	-0,5	0,007	-	NS

Tabela 34. Korelacja wyników parametrów wydolności nerek u chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji z wybranymi czynnikami zapalnymi.

Badany parametr	GFR		albuminuria	
	r	p	r	p
Czynniki zapalne				
fibrynogen	-	NS	-	NS
hsCRP	-	NS	0,5	0,008
IL-6	-	NS	-	NS
sTNF RII	-	NS	0,5	0,02
Czynniki wzrostowe				
TGF β I	-	NS	-	NS

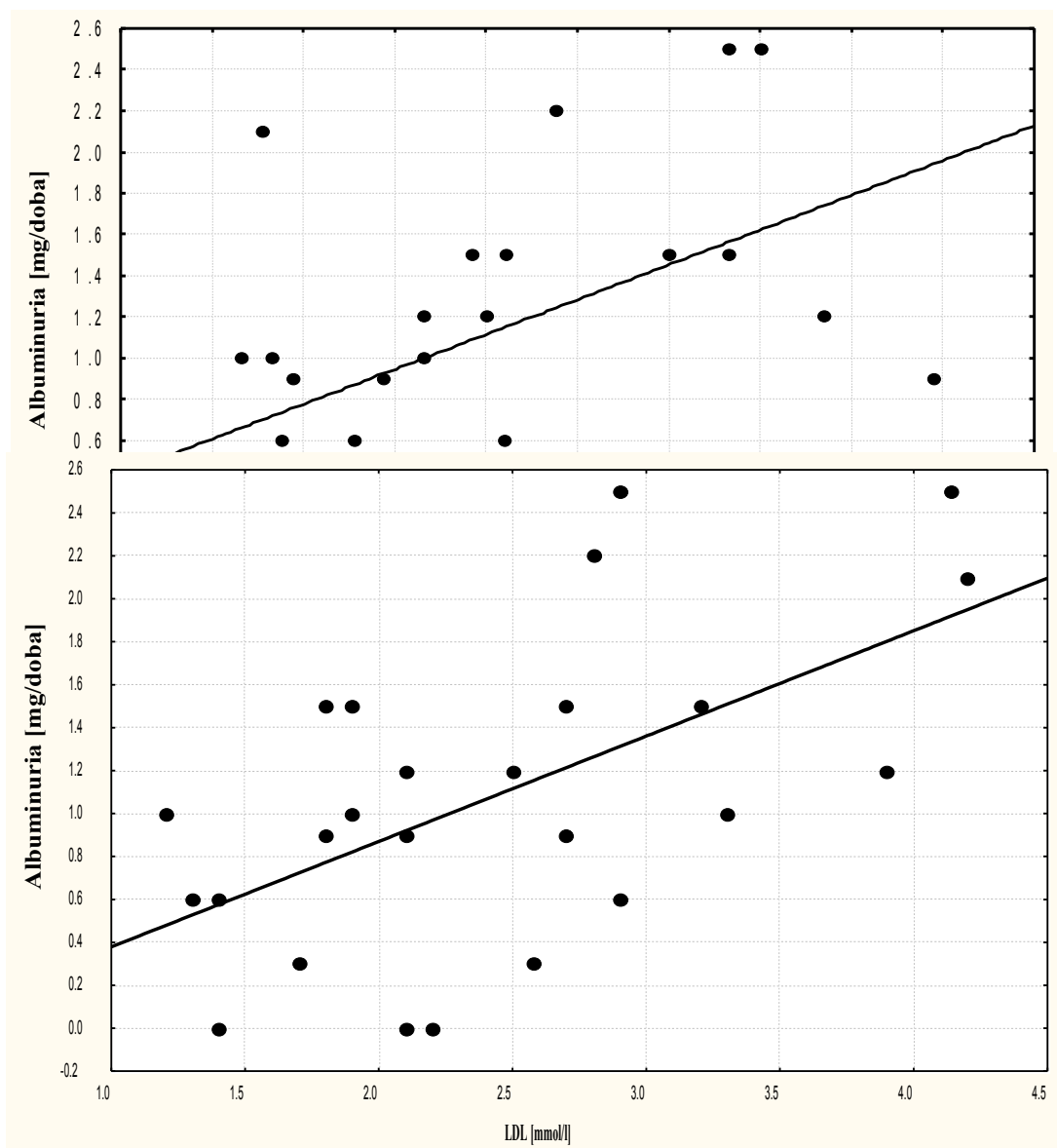
VEGF	-0,4	0,03	-	NS
PDGF-BB	-0,4	0,07	-	NS

Rycina 23. Korelacja wartości albuminurii a HbA1c w grupie chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji ($r=0,7$; $p=0,01$).



Rycina 24. Korelacja wartości albuminurii a stężenia LDL w grupie chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji ($r=0,6$; $p=0,02$).

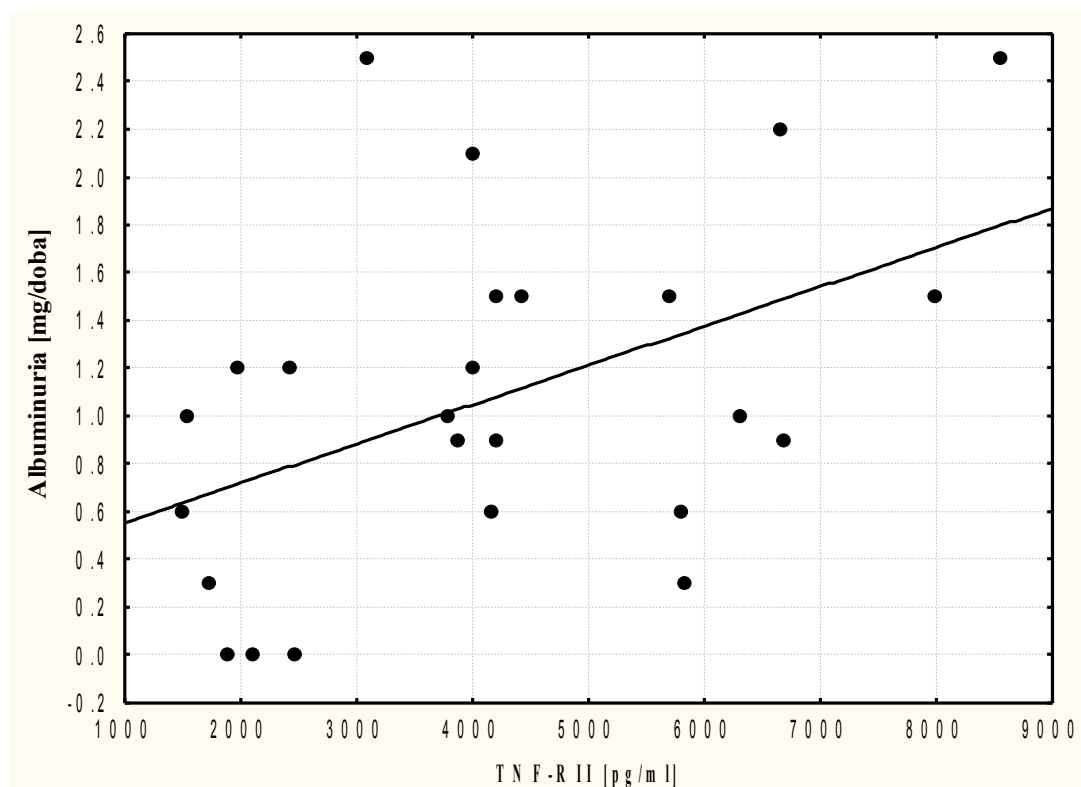
Rycina 25. Korelacja wartości albuminurii a stężenia hsCRP w grupie chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji ($r=0,5$; $p=0,008$).



Rycina 26. Korelacja wartości albuminurii a stężenia sTNF RII w grupie chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji ($r=0,5$; $p=0,02$).

4.7. Analiza regresji wieloczynnikowej dla grupy chorych z nefropatią cukrzycową.

Celem oceny wpływu czynników zapalnych i wzrostowych na progresję niewydolności nerek, a więc zmianę GFR i albuminurii po 36 miesiącach obserwacji, stworzono odpowiednie modele regresji. Jako zmienną zależną wzięto zmianę GFR, a jako zmienne niezależne czynników zapalnych: fibrynogenu, hsCRP, IL-6, sTNF R II. Wykazano granicznie istotny wpływ IL-6 na zmianę GFR ($p<0,05$). Wyniki przedstawiono w tabeli 35. W kolejnym modelu badano zależność zmian GFR i czynników wzrostowych: TGF



β I, VEGF, PDGF-BB. Wykazano istotny wpływ PDGF-BB na zmianę GFR ($p<0,03$). Wyniki przedstawiono w tabeli 36. Nie stwierdzono natomiast wpływu badanych czynników na progresję albuminurii.

Tabela 35. Model 1 - wpływ IL-6 na zmianę GFR po 36 miesiącach obserwacji. (Regresja spełnia wszystkie założenia dla prawidłowości modelu).

N=25	Podsumowanie regresji zmiennej zależnej: delta GFR Skorygowane R ² =0,11 p<0,05 błąd standard. estymacji: 5,8299	
	B	poziom p
w. wolny	4,999485	0,0267
IL-6	-1,637	0,05

$$\Delta \text{ GFR} = 4,99 - 1,6 \times \text{IL-6} \text{ dla } p < 0,05$$

Tabela 36. Model 2 - wpływ PDGF-BB na zmianę GFR po 36 miesiącach obserwacji. (Regresja spełnia wszystkie założenia dla prawidłowości modelu).

N=23	Podsumowanie regresji zmiennej zależnej: delta GFR Skorygowane R ² =0,162 p<0,03 błąd standard. estymacji: 4,77	
	B	poziom p
w. wolny	3,438	0,095
PDGF-BB	-0,013	0,03

$$\Delta \text{ GFR} = 3,43 - 0,01 \times \text{PDGF-BB} \text{ dla } p < 0,03$$

Oceniono ponadto wpływ markerów wyrównania cukrzycy (glukozy, HbA1c), lipidogramu oraz BMI na progresję niewydolności nerek, a więc zmianę GFR i albuminurii po 36 miesiącach obserwacji, stworzono odpowiednie modele regresji. Wykazano istotny wpływ HbA1c na progresję albuminurii ($p < 0,0003$). Nie stwierdzono natomiast wpływu badanych czynników na zmianę GFR. Wyniki przedstawiono w tabeli 37.

Tabela 37. Model 3 - wpływ HbA1c na progresję albuminurii po 36 miesiącach obserwacji. (Regresja spełnia wszystkie założenia dla prawidłowości modelu).

N=25	Podsumowanie regresji zmiennej zależnej: delta albuminurii Skorygowane R ² =0,4113 p<0,0003 błąd standard. estymacji: 0,5559	
	B	poziom p
w. wolny	1,95	0,01
HbA1c	-0,45	0,0003

Δ albuminurii = 1,95- 0,45 x HbA1c dla $p < 0,0003$

Nie stwierdzono natomiast wpływu wybranych czynników zapalnych i wzrostowych na zmianę AoPWV i IMT po 36 miesiącach obserwacji.

5. DYSKUSJA.

Głównym wynikiem tego badania, mającym ważne implikacje praktyczne jest stwierdzenie istotnych związków pomiędzy progresją nefropatii cukrzycowej a czynnikami zapalnymi. Związki te analizowano zarówno w badaniu przekrojowym i odnoszono do grupy osób z cukrzycą i nefropatią, jak i w badaniu prospektywnym. W niniejszej pracy, w analizie regresji wieloczynnikowej stwierdzono, że wartości GFR wiążą się istotnie ze zmianami stężenia IL-6 oraz ze zmianami stężeniem PDGF BB. Zwiększeniu stężenia IL-6 i PDGF BB w surowicy towarzyszyło obniżenie GFR. Natomiast nie stwierdzono istotnego związku pomiędzy badanymi czynnikami a progresją albuminurii.

5.1. Markery stanu zapalnego a nefropatia cukrzycowa.

Uzyskane wyniki wskazują, że grupa pacjentów z nefropatią cukrzycową charakteryzuje się podwyższonym stężeniem markerów stanu zapalnego tj. fibrynogenu,

białka CRP, interleukiny 6 i receptora II TNF alfa w porównaniu do osób z cukrzycą bez tego powikłania. Należy podkreślić, że grupa badana i kontrolna nie różniły się istotnie pod względem wieku, czasu trwania czy stopnia wyrównania cukrzycy. Ponadto wskaźnik masy ciała BMI i stężenie lipidów były podobne w obydwu grupach. Grupa badana była także bardzo starannie scharakteryzowana pod względem badań obrazowych, oraz biochemicznych, łącznie z oceną funkcji nerek, gospodarki wapniowo-fosforanowej i morfologii krwi i wykazywała wszystkie cechy typowe dla nefropatii cukrzycowej.

Uzyskane wyniki przyczyniają się do dyskusji na temat roli „mikrozapalenia” w patogenezie i progresji nefropatii cukrzycowej [59]. Dotychczas przyjmowano, że do uszkodzenia nerek w cukrzycy prowadzą, jak opisano we wstępie zmiany metaboliczne i hemodynamiczne. Coraz więcej danych sugeruje jednak, że cytokiny zapalne produkowane przez naciekające komórki, czy też komórki nerkowe uczestniczą w rozwoju cukrzycowej choroby nerek.

Interleukina 6 jest plejotropową cytokiną, która wykazuje właściwości pro- i antyzapalne i występuje w surowicy ludzi zdrowych w stężeniu < 1 pg/ml. Produkcja interleukiny 6 koreluje zazwyczaj z aktywacją komórek. Interleukina 6 zaliczana jest do kluczowych cytokin prozapalnych. Jest produkowana przez wiele typów komórek, łącznie z komórkami mezangium kłębuszka [60,61]. Cytokiny prozapalne, takie jak IL-1, IL-6 i IL-18, które są produkowane przez naciekające makrofagi, mogą przyczyniać się do progresji uszkodzenia nerek zarówno bezpośrednio jak i pośrednio. Zwiększenie ekspresji tych cytokin obserwowano u pacjentów z cukrzycą [62] a także w cukrzycy eksperymentalnej [63]. Wzrost stężenia cytokin i/lub wzrost ekspresji w tkankach korelował z ciężkością nefropatii cukrzycowej lub ze stopniem wydalania albumin z moczem, zarówno u chorych z typem 1 jak i typem 2 cukrzycy [62,63,64,65].

Rolę IL-6 w patogenezie nefropatii cukrzycowej sugerowało wiele innych badań, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [62,65,66,67], chociaż nie wszyscy autorzy obserwowali związek stężenia

IL-6 w surowicy ze stopniem wydalania albumin z moczem [68,69]. W niniejszej pracy także nie obserwowano związku IL-6 w surowicy ze stopniem wydalania albumin z moczem.

W badanej grupie chorych stężenie interleukiny 6 w surowicy przekraczało 2,2 krotnie jej stężenie w grupie kontrolnej bez nefropatii, a stężenie sTNF RII było 1,5 krotnie wyższe u chorych niż u osób bez nefropatii cukrzycowej. Może to przemawiać za rolą stanu zapalnego w nefropatii cukrzycowej. Potwierdzeniem obserwacji zawartych w tej pracy są wyniki uzyskane przez Nawarro JF i wsp., którzy w niedawno opublikowanym badaniu wykazali, związek pomiędzy aktywacją zapalną komórek jednojądrzastych krwi obwodowej badaną poprzez ekspresję mRNA dla TNF alfa i interleukiny 6 a uszkodzeniem nerek, cechującym się zwiększeniem wydalania albumin z moczem [63].

Bliski związek stężenia IL-6 z funkcją nerek potwierdza istotna korelacja pomiędzy przesączaniem kłębuszkowym a IL-6. Również stężenie sTNF RII bardzo silnie korelowało z wartością GFR. Wyniki te świadczą, że subkliniczny stan zapalny wiąże się z obniżeniem funkcji nerek u pacjentów z cukrzycą typu 2. Jednak badanie wykonane po 36 miesiącach nie wykazało związku pomiędzy IL-6 i sTNF RII a przesączaniem kłębuszkowym. Tym niemniej analiza regresji wielokrotnej z uwzględnieniem innych czynników zapalnych wykazała, że zmiany stężenia IL-6 wiązały się istotnie z obniżeniem GFR. W badanej grupie chorych nie stwierdzono istotnych zmian wartości GFR po 36 miesiącach leczenia, chociaż obserwowano pogorszenie się zaburzeń w zakresie gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz wzrost stężenia mocznika.

Potwierdzeniem roli IL-6 w rozwoju nefropatii cukrzycowej jest obserwacja Ng i wsp., którzy stwierdzili związek haplotypu genu IL-6 z obniżeniem funkcji nerek w nefropatii cukrzycowej [70]. Gen interleukiny 6 znajduje się na chromosomie 7p21, który zawiera locus związany z obniżeniem stopnia przesączania kłębuszkowego w cukrzycy typu 2. Podobne

wyniki potwierdzające związek genu interleukiny 6 z nefropatią cukrzycową obserwowali też inni autorzy [71,72].

We wcześniejszych badaniach wykazano, podobnie jak w tej pracy, że stężenie TNF alfa w surowicy jest podwyższone u pacjentów z cukrzycą i powikłaniami mikronaczyniowymi – nefropatią (mikro- lub makroalbuminurią) [73,74].

W badaniu Nawarro i wsp. stwierdzili w analizie regresji wieloczynnikowej, że ekspresja mRNA czynnika TNF wiąże się ze stężeniem hemoglobiny glikowanej A1c, zawartością TNF alfa w moczu, stopniem wydalania albumin z moczem i białkiem C-reaktywnym. Natomiast ekspresja mRNA dla IL-6 zależała od stopnia wydalania albumin z moczem, białka C-reaktywnego, stężenia IL-6 w surowicy i czasu trwania cukrzycy (time of diabetes) [63]. W niniejszej pracy obserwowano związek pomiędzy stopniem wyrównania glikemii i albuminurią w grupie chorych z nefropatią cukrzycową zarówno w badaniu wyjściowym jak i po 36 miesiącach obserwacji. Ponadto w badanej grupie wartości GFR zależały od BMI i wieku badanych. W obecnym badaniu średnie stężenie hemoglobiny glikowanej i wartości ciśnienia tętniczego krwi wynosiły odpowiednio w grupie badanej 7,1% i 140/70 mmHg i były podobne jak w grupie kontrolnej. Jak widać wartości te nie odbiegały od wartości zalecanych jako cele terapeutyczne przez PTD [3]. Wykazano że niewyrównana cukrzyca i nadciśnienie tętnicze przyczyniają się do aktywacji monocytów krwi obwodowej u pacjentów z cukrzycą typu 1 i 2 [75,76].

W niniejszej pracy obserwowano wzrost stężenia cytokin prozapalnych i markerów stanu zapalnego u chorych z cukrzycą i nefropatią cukrzycową, chociaż markery te były również podwyższone w stosunku do wartości referencyjnych u osób z cukrzycą bez nefropatii, co jest zgodne z obserwacjami innych autorów [73,77,78,79].

Pacjenci z cukrzycą i nefropatią cechowali się także podwyższonym, w porównaniu z grupą osób bez nefropatii, stężeniem białka C-reaktywnego, oznaczanego metodą ultraczułą. Białko

CRP i sTNF RII korelowały bardzo istotnie (CRP $p=0,008$) z albuminurią po 36 miesiącach obserwacji, co stanowi kolejny dowód potwierdzający związku tych markerów z nefropatią. Zarówno w badaniu wyjściowym jak i po 36 miesiącach obserwacji stwierdzono, zgodnie z oczekiwaniem związek pomiędzy wyrównaniem cukrzycy i LDL cholesterolem a stopniem wydalania albumin z moczem. Dalla Vestra i wsp. wykazali u pacjentów z jawną nefropatią w przebiegu cukrzycy typu 2 najwyższe stężenia różnych białek ostrej fazy, łącznie z białkiem CRP, SAA, fibrynogen i interleukiną 6, co znalazło potwierdzenie również w naszych wynikach [80]. Co więcej stężenia IL-6 i SAA były wyższe u pacjentów ze zwiększoną grubości błony podstawnej kłębuszka, kluczową zmianą u pacjentów z cukrzycową chorobą nerek. W badaniu tym autorzy wykazali też związek pomiędzy grubością błony podstawnej i stężeniem IL-6 i fibrynogenu, które były również w tej pracy istotnie wyższe u pacjentów z nefropatią niż bez tego powikłania [80].

5.2. Czynniki wzrostowe a nefropatia cukrzycowa.

Badani pacjenci z nefropatią nie różnili się od pacjentów bez tego powikłania pod względem stężenia czynników wzrostowych; obserwowano jedynie nieco wyższe stężenie PDGF BB, chociaż równica ta nie osiągnęła istotności statystycznej, być może w wyniku stosunkowo małej liczebności porównywanych grup. Również po 36 miesiącach obserwacji nie wykryto różnic w czynnikach wzrostowych w porównaniu do wartości wyjściowych, podobnie jak w zakresie parametrów funkcji nerek. W analizie korelacji jednoczynnikowej stwierdzono jednak ujemne korelacje pomiędzy VEGF a GFR oraz pomiędzy PDGF-BB oraz VEGF i TGF beta 1 a sztywnością tętnic. Ponadto PDGF BB korelował z podstawowym przepływem skórnym. PDGF beta wiąże się ze zmianami strukturalnymi w kłębuszku nerkowym [81]. Wydaje się, że hiperglikemia może indukować wczesną aktywację pętli

PDGF, który z kolei powoduje wzrost ekspresji genu TGF beta 1 i w ten sposób moduluje zarówno proliferację komórek mezangium u ludzi, jak i produkcję macierzy mezangium [82].

VEGF jest kolejnym mediatorem zarówno wczesnych jak i późnych zmian naczyniowych [81], wiążących się z albuminurią, takich jak zgrubienie błony podstawnej, gęstość szczelin błonowych (slit pore density) i ilość nefryny. VEGF jest silnym czynnikiem pełniącym protekcyjną rolę w wielu niecukrzycowych chorobach nerek, głównie poprzez jego zdolność do stymulacji produkcji tlenku azotu w komórkach śródbłónka u pacjentów z chorobą nerek bez cukrzycy. Istnieje hipoteza, że rozprężenie (uncoupling) VEGF i produkcji tlenku azotu może prowadzić do nieprawidłowej angiogenezy i infiltracji makrofagów [83]. Zazwyczaj VEGF jest podwyższony u osób z cukrzycą i coraz więcej danych przemawia za jego rolą w rozwoju podocytopatii i albuminurii. W badanej grupie chorych jednak nie obserwowano związku pomiędzy VEGF i albuminurią, być może z powodu stosunkowo małej liczebności grupy badanej i krótkiego czasu obserwacji [84]. W badaniu obserwowano istotną korelację ujemną pomiędzy VEGF i GFR. Można spekulować, że stymulacja sekrecji VEGF przez podocyty może zwiększać przepuszczalność makromolekuł w kapilarach kłębuszka poprzez wpływ na przepływ krwi a także funkcję komórek śródbłónka kłębuszka a także inne działania autokrynne zmieniające syntezę błony podstawnej kłębuszka przez podocyty [85,86].

U osób z cukrzycą obserwowano wzrost TGF beta 1 w nerkach a także w moczu [87,88]. W naszych badaniach nie obserwowano zmian stężenia TGF beta 1 w surowicy, a w moczu badań nie wykonywano. W cytowanych badaniach zmiany TGF beta 1 zależały od glikemii i stosowania leków blokujących oś renina – angiotensyna –aldosteron [89,90].

Związki pomiędzy TGF beta 1 i VEGF a nefropatią cukrzycową nie są jednoznaczne, stąd też strategie terapeutyczne mające na celu wpływ na te czynniki powinny uwzględniać możliwe niepożądane efekty zahamowania działania przeciwzapalnego TGF beta, czy

upośledzenia prawidłowej angiogenezy przy terapii anty VEGF. Strategia anty VEGF obok upośledzenia angiogenezy może przyczynić się do rozrzedzenia komórek śródbłona kapilar w kłębuszku i w cewkach nerkowych (tubulointerstitium). W świetle uzyskanych wyników być może strategia terapeutyczna ukierunkowana na PDGF BB może być skuteczna w prewencji progresji obniżenia GFR, jednak związek PDGF BB z GFR wymaga dalszych badań prospektywnych obejmujących większe grupy chorych.

5.3. Markery stanu zapalnego i czynniki wzrostowe a IMT i AoPWV.

Typ 2 cukrzycy wiąże się z wysokim ryzykiem powikłań sercowo - naczyniowych, które zwiększa się w przypadku wystąpienia choroby nerek [91,92]. Grubość kompleksu intima- media jest uznawana za marker rozwoju miażdżycy i jej zaawansowania. Jest ona ponadto dobrym predykatorem zdarzeń sercowo-naczyniowych oraz jest coraz częściej wykorzystywana jako wskaźnik odpowiedzi na leczenie [93,94,95]. W licznych publikacjach przytaczane są wyniki badań, w których wykazano silny związek pomiędzy grubością kompleksu IMT tętnicy szyjnej a czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego. W swoim badaniu Millar i wsp. stwierdzili związek pomiędzy IMT a stopniem uwapnienia tętnic wieńcowych i wzrostem ryzyka zdarzeń niepożądanych u chorych z cukrzycą typu 2 i zwiększonym wydalaniem albumin z moczem [96]. Dane z piśmiennictwa wskazują także, że wzrost sztywności naczyń tętniczych wiąże się z ryzykiem wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych. W badaniach na 100 tysięcznej populacji japońskiej, Suzuki i wsp. w czasie 2-letniej obserwacji wykazali, że pomiar prędkości fali tętna jest najlepszym czynnikiem

prognostycznym wystąpienia epizodów sercowo-naczyniowych i mózgowych [97]. Podobne wyniki otrzymali Lehman i wsp, a także Takegoshi, który badał populację chorych z cukrzycą i związku PWV ze wzrostem albuminurii [98,99]. Do tradycyjnych czynników wpływających na wzrost grubości IMT oraz wzrost szybkości fali tętna zaliczymy: płeć męską, wiek, nadwagę, podwyższone ciśnienie tętnicze, palenie papierosów, cukrzycę oraz niewydolność nerek. [93,98,99,100,101]. W niniejszym badaniu w grupie chorych z nefropatią cukrzycową stwierdzono wyższe wartości prędkości fali tętna niż w grupie kontrolnej ($p < 0,01$) oraz trend do występowania wyższej wartości grubości kompleksu intima-media w prawej i lewej tętnicy szyjnej. Tak więc badana grupa cechowała się zarówno większym zaawansowaniem zmian miażdżycowych, jak i nerkowych, którym towarzyszył wzrost stężenia cytokin prozapalnych. Istnieje szereg danych potwierdzających wyniki uzyskane w niniejszej pracy, dotyczące związku prozapalnych cytokin, takich jak TNF alfa i IL-6 z rozwojem zmian miażdżycowych w naczyniach [102]. We wczesnych zmianach miażdżycowych dochodzi do naciekania intymy ściany tętnic przez monocyty i ich aktywacji. Prowadzi to do uwalniania mediatorów zapalenia, łącznie z cytokinami prozapalnymi [103].

W analizie jednoczynnikowej w badanej grupie chorych z nefropatią cukrzycową AoPWV korelowała istotnie z BMI i stężeniem kreatyniny w surowicy krwi. Stwierdzono też istotne korelacje pomiędzy AoPWV a czynnikami wzrostowymi TGF beta 1, VEGF i PDGF BB.

Natomiast grubość kompleksu intima media wiązała się ze stopniem wyrównania cukrzycy i stężeniem cholesterolu całkowitego. Po 36 miesiącach obserwacji zmiana grubości kompleksu intima-media korelowała istotnie ze stężeniem IL-6 w surowicy, co może przemawiać za jej udziałem w rozwoju zmian w dużych naczyniach.

Tak więc wyniki pracy sugerują, że markery stanu zapalnego wiążą się zarówno ze zmianami zachodzącymi w nerkach, jak i z zmianami stanu naczyń.

5.4. Parametry oceny mikrokrazenia a nefropatia cukrzycowa.

Przyjmuje się, że zaburzenia mikrokrazenia leżą u podstaw powikłań mikronaczyniowych w cukrzycy. Zaburzenia mikrokrazenia występują w wielu narządach u pacjentów z cukrzycą. Nefropatia, podobnie jak retinopatia i neuropatia wiążą się z ze zmianami funkcji i morfologii naczyń na poziomie mikrokrazenia. W dostępnym piśmiennictwie brak danych oceniających mikrokrazenie skórne metodą laserową dopplerowską u pacjentów z cukrzycą typu 2. Regulacja przepływu w krążeniu skórnym zależy od czynników metabolicznych, a także zapalnych i toksycznych. Istotną rolę w regulacji przepływu w mikrokrazeniu skórnym odgrywa napięcie układu współczulnego oraz liczne substancje wazo - aktywne [104]. W badanej grupie chorych z nefropatią cukrzycową stwierdzono istotnie niższe parametry stanu mikrokrazenia skórnego, a mianowicie wartość przepływu spoczynkowego MFb ($p<0.01$) i przepływu szczytowego ($p<0.05$) niż w grupie kontrolnej. Ta obserwacja świadczy, że u chorych z dobrze udokumentowaną nefropatią cukrzycową występują także zaburzenia mikrokrazenia skórnego. W dostępnym piśmiennictwie Urban i wsp. badali przepływ skórnym metodą kapilaroskopową u pacjentów z cukrzycą typu 1. Stwierdzili oni, że spoczynkowy przepływ skórnym nie różni się u pacjentów z cukrzycą i neuropatią i bez neuropatii w porównaniu do osób zdrowych, natomiast chorzy z neuropatią autonomiczną mieli istotnie niższy szczytowy kapilarny przepływ krwi [105]. Te dane pozostają w zgodzie z obserwacjami w niniejszej pracy i świadcząc że, obecność powikłań mikronaczyniowych w nerkach wiąże się z zaburzeniami regulacji krążenia skórnego. Ponadto PF korelowało ujemnie z BMI, glikemią i HbA1c, tak więc wyższymi wartościami tych parametrów towarzyszyło zmniejszenie przepływu po okluzji. Spośród badanych markerów stanu zapalnego jedynie sTNF RII, a spośród czynników wzrostowych jedynie PDGF BB wykazywały istotną korelację z PF. Wyniki te wskazują na istotny wpływ

dobrej kontroli glikemii i redukcji masy ciała na przepływ PF. Natomiast parametry funkcji nerek, a przede wszystkim stężenie kwasu moczowego korelowało dodatnio z MFb, PF i MF44 co może świadczyć o miejscowym działaniu tych substancji, jednakże nie znaleziono podobnych obserwacji w dostępnej literaturze.

Mikrozapalenie (subkliniczny stan zapalny) obserwuje się u pacjentów z cukrzycą, a także u osób z chorobami układu krążenia [106,107]. Szereg badań wykazuje wzrost stężenia hsCRP i cytokin pozapalnych, takich jak IL-6, IL-8, IL-18 czy TNF alfa u osób z typem 2 cukrzycy [108,109,110]. Mikroalbuminuria jest czynnikiem prognostycznym chorób układu krążenia i zwiększonego ryzyka chorób nerek u osób z cukrzycą [111]. Pacjenci z nefropatią cukrzycową mają duże ryzyko chorób układu krążenia [112]. Cukrzycowa choroba nerek jest główną przyczyną niewydolności nerek, wymagającej leczenia nerkozastępczego, a główną przyczyną skróconego okresu przeżycia chorych z niewydolnością nerek i chorych dializowanych są incydenty sercowo-naczyniowe. Obok mikroalbuminurii także białko C reaktywne i inne markery stanu zapalnego są związane z chorobami układu krążenia. Obecnie przyjmuje się, jak wspomniano we wstępie, że przewlekły subkliniczny stan zapalny stanowi część zespołu oporności na insulinę i jest mocno związany z cechami zespołu metabolicznego. Tkanka tłuszczowa, jak wiadomo, może syntetyzować i uwalniać cytokiny pozapalne, takie jak TNF alfa, czy IL-1, IL-6, przy czym markery te wiążą się z masą tłuszczową ciała, ale w niniejszej pracy wskaźnik masy ciała był podobny w grupie badanej i kontrolnej. Należy zauważyć, że po 36 miesiącach obserwowano spadek BMI, i poprawę wyrównania cukrzycy oraz niewielki, nieznamienny spadek stężenia cytokin prozapalnych. W świetle powyższych danych wydaje się istotne w prewencji nefropatii cukrzycowej dążenie do ścisłego wyrównania glikemii i normalizacji stężenia lipidów. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdziły istotną rolę IL-6, TNF alfa i PDGF BB w progresji niewydolności nerek i

albuminurii, co może przyczynić się do opracowania nowych strategii prewencji tego groźnego powikłania cukrzycy.

Wskaźnik przesączania kłębuszkowego GFR korelował także z BMI, oprócz oczekiwanej korelacji z wiekiem. Natomiast stopień wydalania albumin z moczem korelował dodatnio z wyrównaniem glikemii, mierzonym odsetkiem hemoglobiny glikowanej, stężeniem cholesterolu całkowitego oraz cholesterolu LDL. Te związki z modyfikowalnymi czynnikami ryzyka – stopniem wyrównania glikemii oraz stężeniem LDL-cholesterolu, obserwowane także po 36 miesiącach leczenia dają możliwość prewencji postępu nefropatii poprzez wpływ na te czynniki.

Badania niniejsze przyczyniają się do lepszego zrozumienia roli zwiększenia markerów stanu zapalnego i przyspieszonego rozwoju miażdżycy naczyń związanej z wystąpieniem nefropatii cukrzycowej u osób z typem 2 cukrzycy.

Mimo tych doniesień potwierdzających związek mikrozapalenia z progresją nefropatii cukrzycowej mechanizm procesu mikrozapalnego i jego rola w progresji uszkodzenia nerek wymaga dalszych badań i wyjaśnienia.

6. WNIOSKI.

1. Grupa chorych z nefropatią cukrzycową w porównaniu z pacjentami bez nefropatii cechuje się niższymi wartościami Hgb, Ht ($p<0,01$) i liczby erytrocytów ($p<0,05$) oraz wyższym stężeniem w surowicy fosforu, iloczynu Ca x P i fosfatazy alkalicznej ($p<0,001$).
2. W grupie tej obserwuje się również istotny wzrost cytokin prozapalnych takich jak: fibrynogen ($p<0,01$), białko C-reaktywne ($p<0,01$), IL-6 ($p<0,001$) i sTNF R II ($p<0,001$).
3. W analizie regresji wieloczynnikowej w grupie chorych z nefropatią, stwierdzono, że wartości eGFR wiążą się istotnie ze zmianami stężenia IL-6 oraz ze zmianami stężeniem PDGF BB. Zwiększeniu stężenia IL-6 i PDGF BB w surowicy towarzyszyło obniżenie eGFR.

4. Odzwierciedleniem zaburzeń krążenia w grupie chorych z nefropatią cukrzycową w stosunku do chorych bez nefropatii, jest wzrost prędkości fali tętna ($p < 0,01$) i spadek przepływu podstawowego MFb ($p < 0,01$).
5. Obserwowany po 36 miesiącach w grupie chorych z nefropatią istotny spadek masy ciała, glukozy, HbA1c ($p < 0,01$) oraz wzrost stężenia mocznika i fosforu a także spadek stężenia wapnia w surowicy ($p < 0,05$) wskazuje na progresję niewydolności nerek.
6. Obserwowana korelacja AoPWV z BMI i stężeniem kreatyniny oraz pomiędzy IMT i glukozą oraz HbA1c w grupie badanych chorych wskazują na zależność postępu zmian naczyniowych od otyłości i stopnia wyrównania cukrzycy.
7. Uzyskane wyniki wskazują, że w grupie chorych z nefropatią cukrzycową, dobraną pod względem wieku, czasu trwania i stopnia wyrównania cukrzycy do grupy osób z cukrzycą bez tego powikłania występuje istotnie wyższe stężenie markerów stanu zapalnego oraz wartości AoPWV i niższy przepływ skórny, co może przemawiać za rolą stanu zapalnego w rozwoju powikłań mikronaczyniowych w cukrzycy.

7. PIŚMIENNICTWO.

1. Zimmet P., Alberti K.G., Shaw J. et al.: Global and societal implications of diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414; 782–787.
2. Janeczko D.: Epidemiologia cukrzycy typu 2. W: *Cukrzyca*, red. J. Sieradzki, Via Medica, Gdańsk 2006; t1: 170-215.
3. Deklaracja Wiślańska Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego i całego środowiska leczącego cukrzycę - Wisła 18 maja 2006 r.
4. Królewski A., Warram J.: The changing natural history of nephropathy in type 1 diabetes. *Am. J. Med.* 1985; 78: 785–794.
5. Perneger T., Brancatti FL., Whelton PK. et al.: End-stage renal disease attributable to diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* 1994; 121: 788-796.
6. Parving H., Mauer M., Ritz E.D.: *Diabetic nephropathy* W: B.M. Brenner Philadelphia 2004 1777-1818.
7. Czekański S.: Nefropatia cukrzycowa. W: *Nefrologia* red. A. Książek, B. Rutkowski Czelej Lublin 2004: 346-371.
8. Grzeszczak W.: Nefropatia cukrzycowa. W: *Cukrzyca* red. J. Sieradzki, Via Medica Gdańsk 2003.

9. Rutkowski B., Lichodziejewska – Niemierko M., Grenda R. i wsp.: Raport o stanie leczenia nerkozastępczego w Polsce-2006. Gdańsk 2008.
10. Ganz M.: Screening for and diagnosis of incipient diabetic nephropathy in diabetes W: C. Hasslacher Diabetic nephropathy, New York 2004: 117-127.
11. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT): The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 1993; 329: 977–986.
12. United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS): Effect of intensive blood glucose control with metformin on complications in overweight patient with type 2 diabetes. Lancet 1998; 352: 854-865.
13. Taguchi T.: The biochemical mechanisms of diabetic tissue damage. W: J.C. Pickup, G. Williams (red). Textbook of diabetes. Blackwelll Publ. Ltd, Oxford 2005.
14. Bowden D.W.: Genetics of kidney disease. Kidney Int. 2003; 83 S8 –S12.
15. Idzior-Waluś B.: Epidemiologia i ogólna patogeneza przewlekłych powikłań cukrzycy; W: Cukrzyca, red. J. Sieradzki, Via Medica Gdańsk 2003.
16. Brownlee M.: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 2001; 414: 813-820.
17. Nishikawa T., Edelstein D., Du XL. et al.: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycemic damage. Nature 2000; 404: 787-790.
18. Sheetz M., King G.L.: Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. JAMA 2000; 97: 12222-12226.
19. Brownlee M.: The pathobiology of diabetic complications, an unifying mechanism. Banting lecture 2004. Diabetes 2005; 54: 1615-1625.
20. Cameron N.E., Eaton S.E., Cotter M.A.: Vascular factors and metabolic interactions in pathogenesis of diabetic neuropathy. Diabetologia 2001; 44: 1973-1988.
22. Wolf G., Chen S., Ziyadeh F.N.: From the periphery of glomerular capillary wall toward the center of disease. Diabetes 2000; 54:1626-1634.
23. Mason R.M, Wahab N.A.: Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. J. Am. Soc. Nephrol. 2003; 4: 358-373.
24. Durvasula R., Petermann A.T., Hiromura K.: Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. Kidney Int. 2004; 65: 30-39.
25. Kriz W.: Podocytes as a target for treatment with ACE inhibitor and/or angiotensin receptors blockers. Kidney Int. 2004; 65: 333-334.
26. Taskinen M.R.: Diabetic dyslipidemia. Atherosclerosis 2002; 3:47-53.

27. Danesh J., Collins R., Appelby P. et al.: Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease. Meta-analyses of prospective studies. *JAMA* 1998; 279: 1477-1486.
28. Danesh J., Whincup P., Walker M. et al.: Low grade inflammation and coronary heart disease prospective studies and meta-analyses. *Brit. Med. J.* 2000; 321: 199-202.
29. Metcalf D.: Hematopoietic cytokines. *Blood* 2008; 111: 485-491.
30. Jouanguy E., Zhang S., Chapiger A. et al.: Human primary immunodeficiencies of type I interferons. *Biochimie* 2007; 89: 878-883.
31. He B.: Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death Differ.* 2006; 13: 393-403.
32. Iwano M.: Quantification of glomerular-beta 1 m-RNA in patients with diabetes mellitus. *Kidney Int.* 1996; 649: 1120-1126.
33. Sharma K., Jin Y., Guo J. et al.: Neutralization of TGF beta by TGF anti-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 1996; 45: 522-530.
34. Riser B.L., Cortes P., DeNichilo M. et al.: Urinary CCN2 (CTGF) as a possible predictor of diabetic nephropathy: preliminary report. *Kidney Int.* 2003; 64: 451-458.
36. Cockcroft J.R., Wilkinson I.B., Evans M. et al.: Pulse pressure predicts cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Hypertens.* 2005; 11: 1463-1467.
37. Henry R.M., Kostense P.J., Spijkerman A.M. et al.: Arterial stiffness increases with deteriorating glucose tolerance status: The Hoorn Study (I). *Circulation* 2003; 107: 2089.
38. Meyer C., Milat F., McGrath B.P. et al.: Vascular dysfunction and autonomic neuropathy in Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2004; 21: 746-751.
39. Increased central artery stiffness in impaired glucose metabolism and type 2 diabetes: The Hoorn Study. *Hypertension* 2004; 43: 176-181.
40. Salomaa V., Riley W., Kark J.D. et al.: NIDDM and fasting glucose and insulin concentrations are associated with arterial stiffness (The Aric Study) *Circulation* 1995; 91: 432-443.
41. Westerbacka J., Wilkinson I., Cockcroft J. et al.: Diminished wave reflection in the aorta. A novel physiological action of insulin on large blood vessels. *Hypertension* 1999; 33: 1118-1122.
42. Tamminen M., Westerbacka J., Vehkaavara S. et al.: Insulin-induced decreases in aortic wave reflection and central systolic pressure are impaired in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25: 2314-2319.

43. Willens H.J., Davis W., Herrington D.W. et al.: Relationship of peripheral arterial compliance and standard cardiovascular risk factors. *Curr. Diab. Rep.* 2003; 3: 230-234.
44. Kimoto E., Shoji T., Shinohara K. et al.: Preferential stiffening of central over peripheral arteries in type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52.
45. De Angelis L., Millaseau S.C., Smith A. et al.: Sex differences in age-related stiffening of the aorta in subjects with type 2 diabetes. *Hypertension* 2004; 44: 67-71.
46. Fukui M., Kitagawa Y., Nakamura N. et al.: Augmentation of central arterial pressure as a marker of atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Diab. Res. Clin. Pract.* 2003; 59: 153-161.
47. Rema M., Mohan V., Deepa R. et al.: Association of carotid intima-media thickness and arterial stiffness with diabetic retinopathy (CURES-2). *Diab. Care* 2004; 27: 8.
48. Smith A., Karalliedde J., De Angelis L., Goldsmith D., Viberti G.: Aortic pulse wave velocity and albuminuria in patients with type 2 diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005; 16: 1069-1075.
49. Zespół do spraw opracowania "zaleceń". Zalecenia Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego <http://www.nadcisnienietetnicze.pl/lekarz/standardy/article/204/chapter_1.html>
50. Pignoli P., Tremoli E., Poli A. et al.: Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation* 1986; 74: 1399-1406.
51. Mukherjee D., Yadav J.S.: Carotid artery intimal-medial thickness: indicator of atherosclerotic burden and response to risk factor modification. *Am Heart J* 2002;144: 753-9.
52. Salonen J.T., Salonen R.: Ultrasound B-mode imaging in observational studies atherosclerotic progression. *Circulation* 1993; 87: 56-65.
53. Mancini J.B., Dahlof B., Diez J. et al.: Surrogate markers for cardiovascular disease: structural markers. *Circulation* 2004; 109: IV22-30.
54. Deanfield J., Donald A., Ferri C. et al.: Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial factors of the European Society of Hypertension. *J. Hypertens.* 2005; 23: 7-17.
55. Bircher A., de Boer E.M., Agner T. et al.: Guidelines for measurement of cutaneous blood flow by laser doppler flowmetry. *Contact Dermatitis* 1993; 28: 1-8.
56. Öberg PÅ.: Laser-doppler flowmetry. *Biom. Engi.* 1990; 18: 125-163.
57. Expressing the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate with standardized serum creatinine values. *Clin. Chem.* 2007; 53: 766-772.

58. Myers G.L., Miller W.G., Coresh J. et al.: Recommendations for improving serum creatinine measurement: A report from the laboratory working group of the National Kidney Disease Education Program. *Clin. Chem.* 2006; 52: 5-18.
59. Maeda S.: Do inflammatory cytokine genes confer susceptibility do diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2008; 74: 413-415.
60. Hirano T., Akira S., Taga T. et al.: Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol. Today* 1990; 11: 443-449.
61. Pfafflin A., Brodbeck K., Heilig C.W. et al.: Increased glucose uptake and metabolism in mesangial cells overexpressing glucose transporter 1 increases interleukin-6 and vascular endothelial growth factor production: role of AP-1 and HIF-1 α . *Cell Physiol. Biochem.* 2006; 18: 199-210.
62. Suzuki D., Miyazaki M., Naka R. et al.: In situ hybridization of interleukin 6 in diabetic nephropathy. *Diabetes* 1995; 44: 1233-1238.
63. Navarro-Gonzalez J.F., Mora Fernandez C.: The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008; 19: 433-442.
64. Saraheimo M., Teppo A.M., Forsblom C. et al.: Diabetic nephropathy is associated with low-grade inflammation in type 1 diabetic patients. *Diabetologia* 2003; 46: 1402-1407.
65. Shikano M., Sobajima H., Yoshikawa H. et al.: Usefulness of highly sensitive urinary and serum IL-6 assay in patients with diabetic nephropathy. *Nephron* 2000; 85: 81-85.
66. Ruef C., Kashgrarian M., Coleman D.L. et al.: Mesangial cell-matrix interactions: effects on mesangial cell growth factor and cytokine secretion. *Am. J. Pathol.* 1992; 141: 429-439.
67. Stephens J.W., Hurel S.J., Acharya J. et al.: An interaction between the interleukin-6 – 174G>C gene variant and urinary protein excretion influences plasma oxidative stress in subject with type 2 diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.* 2004; 3: 2-6.
68. Nakamura A., Shikata K., Hiramatsu M. et al.: Serum interleukin-18 levels are associated with nephropathy and atherosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diab. Care* 2005; 28: 2890-2895.
69. Moriwaki Y., Yamamoto T., Shibutani Y. et al.: Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor- α in serum of patients with type 2 diabetes; relationship with diabetic nephropathy. *Metabolism* 2003; 52: 605-608.
70. Ng D., Nurbaya S., Ye S. et al.: An IL-6 haplotype on human chromosome 7p21 confers risk for impaired renal function in type 2 diabetic patients. *Kidney Int.* 2008; 74: 521-527.

71. Kitamura A., Hasegawa G., Obayashi H.: Interleukin 6 polymorphism in the promotor region and the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabet. Med.* 2002; 19: 1000–1005.
72. Abrahamian H., Endler G., Exner M. et al Association of low grade inflammation with nephropathy in type 2 diabetic patients: role of elevated CRP –levels and 2 different gene-polymorphisms of proinflammatory cytokines. *Exp. Clin. Endocrinol. Diab.* 2007; 115: 38-41.
73. Navarro J.F., Mora C., Macia M. et al.: Inflammatory parameters are independently associated with urinary albumin excretion in type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Kidney. Dis.* 2003; 42: 53-61.
74. Navarro J.F., Mora C, Muros M. et al.: Urinary tumor necrosis factor alfa excretion independently correlates with clinical markers of glomerular and tubulointerstitial injury in type 2 diabetes patient. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006; 21: 3428-3434.
75. Dorffel Y., Latsch C., Stuhmuller B. et al.: Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. *Hypertension* 1999; 34: 113-117.
76. Cipoletta C., Ryan K.E., Hanna E.V. et al.: Activation of peripheral blood CD 14 monocytes occurs in diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 2779-2786.
77. Temelkova – Kurktschiev T., Henkel E. et al.: Subclinical inflammation in newly detected type II diabetes and impaired glucose tolerance. *Diabetologia* 2002; 45: 151-154.
78. Pickup J.C., Chusney G.C., Thomas S.M. et al.: Plasma interleukin 6 tumor necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sci.* 2000; 67: 291-300.
79. Spranger J., Kroke A., Mohling M. et al.: Inflammatory cytokines and the risk of develop type 2 diabetes: results of the prospective population – based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Postsdan study. *Diabetes* 2003; 52: 812-817.
80. Dalla Vestra M., Mussap M., Gallina P. et al.: Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005; 16: S78-82.
81. Ban C., Twigg S.: Fibrosis in diabetes complications: Pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers. *Vasc. Health and Risk Menagm.* 2008; 4: 575-596.
82. Di Paolo S., Gesualdo L., Ranieri E. et al.: High glucose concentration induces the over expression of trans forming growth factor-beta trough the activation of platelet-driven growth factor loop in human mesangial cell. *Am. J. Pathol.* 1996; 149: 2095-2106.
83. Nakagawa T.: Uncoupling of VEGF with NO as mechanism for diabetic nephropathy. *Diab. Res.* 2008; 82: s67-69.

84. Wolf G., Chen S., Ziyadeh E.Y. et al.: From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes in age in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2005; 54: 1626-1634.
85. Iglesias de la Cruz M.C., Ziyadeh M., Isono M. et al.: Effects of high glucose and TGF-beta 1 on the expression of collagen IV and endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney Int.* 2002; 62: 901-913.
86. Chen S., Kasama J.S., Lee J.S. et al.: Podocyte-driven vascular endothelial growth factor mediates the stimulation of alpha3(IV) collagen production by transforming growth factor beta 1 in mouse podocytes. *Diabetes* 2004; 53: 2939-2949.
87. Sharma K., Ziyadeh B., Alzahabi T.A.: Increased renal production of TGF beta 1 in patients with type II diabetes. *Diabetes* 1997; 46: 854-859.
88. Mogyrosi A., Kapoor M., Isono S. et al.: Utility of serum and urinary transforming growth factor – beta levels as markers of diabetic nephropathy. *Nephron* 2000; 86: 234-235.
89. Sharma K., Eltayeb B.O., McGown T. et al.: Captopril induced reduction of serum levels of TGF beta 1 correlates with long term renoprotection in insulin dependent diabetic patients. *Am. J. Kidney Dis.* 1999; 34: 818-823.
90. Agarwal R., Siva S.R., Dunn K. et al.: Add-on angiotensin II receptor blockade lowers urinary TGF beta 1 levels. *Am. J. Kidney Dis.* 2002; 39: 486-492.
91. Mogensen C.E.: Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. *N. Engl. J. Med.* 1984; 310: 356-360.
92. Mattock M.B., Morrish N.J., Viberti G. et al.: Prospective study of microalbuminuria as predictor of mortality in NIDDM. *Diabetes* 1992; 41: 736-741.
93. Czarnecka D., Zabojszcz M.: Przebudowa naczyń a ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych. *Przeg. Lek.* 2002; 59: 15-19.
94. Nishizawa Y., Shoji T., Kawagishi T. et al.: Intima-media thickness of carotid artery predicts cardiovascular mortality in haemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 2003; 41: 76-82.
95. Wang A.Y., Ho S.S., Liu E.K. et al.: Differential associations of traditional and non traditional risk factors with carotid intima media thickening and plaque in peritoneal dialysis patients. *Am. J. Nephrol.* 2007; 5: 458-462.
96. Millar J.A., Lever A.F., Burke V. et al.: Pulse pressure as a risk factor for cardiovascular events in the mild hypertension. *Br. J. Hypertens.* 1999; 17: 1065-1069.
97. Suzuki K.: Use of epidemiological data to predict the occurrence of atherosclerotic disease in urban residents. *Nippon Ronen Igakai Zasshi* 1996; 33: 360-365.

98. Thakegoshi T., Hirai J., Shimada T. et al.: The correlation between pulse wave velocity and diabetic angiopathy. *Nippon Ronen Igakai Zasshi* 1991; 28: 664-670.
99. Lehmann E.D., Hopkins K.D., Rawesh A. et al.: Relation between number of cardiovascular risk factors and noninvasive Doppler ultrasound assessments of aortic compliance. *Hypertension* 1998; 32: 565-561.
100. Kraśniak A., Drożdż M., Pasowicz M. et al.: Factors involved in vascular calcification and atherosclerosis in maintenance haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007; 2: 515-520.
101. Stompór T., Rajzer M., Pasowicz M. et al.: Coronary artery calcification, common carotid artery intima-media thickness and Arctis pulse wave velocity in patients on peritoneal dialysis. *Int. J. Artif. Organs* 2006; 29: 736-741.
102. Tedgui A., Mallat Z.: Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol. Rev.* 2006; 86: 515-581.
103. Linton M.F., Babaev V.R.: A direct role for macrophage LDL receptor in atherosclerotic lesion formation. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 19204-19210.
104. Bonelli R.M., Költringer P.: Autonomic nervous function assessment using thermal reactivity of microcirculation. *Clin. Neurophysiol.* 2000; 111: 1880-1888.
105. Urban M., Peczyńska J., Kowalewski M.: Does autonomic diabetic neuropathy microcirculation reactivity in adolescent with type 1? *Endo. Diab. Chor. Przem. Mat.* 2007; 13: 23-26.
106. Yamashita H., Shimada K., Seki E. et al.: Concentrations of interleukins, interferon and c-reactive protein in stable and unstable angina pectoris. *Am. J. Cardiol.* 2003; 91: 133-136.
107. Esposito K., Nappo F., Marfella R. et al.: Inflammatory cytokine concentrations and acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* 2002; 106: 2067-2072.
108. Pickup J.C., Chusney G.D., Thomas S.M. et al.: Plasma interleukin 6, tumor necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sci.* 2000; 67: 291-300.
109. Zozulińska D., Majchrzak A., Sobieska M. et al.: Serum interleukin 8 level is increased in diabetic patients. *Diabetologia* 1999; 42: 117-118.
110. Esposito K., Nappo F., Giugliano F. et al.: Cytokine milieu tends toward inflammation in type 2 diabetes. *Diab. Care* 2003; 26: 1647.
111. Lane J.T.: Microalbuminuria as a marker of cardiovascular and renal risk in type 2 diabetes mellitus: a temporal perspective. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2004; 28: F442-F450.

112. Mora C., Navarro J.F.: Inflammation and pathogenesis of diabetic nephropathy. Metabolism 2004; 53: 265-266.

8. SPIS TABEL

Tabela 1. Klasyfikacja mikroalbuminurii.

Tabela 2. Klasyfikacja nefropatii cukrzycowej wg. Mogensena.

Tabela 3. Cechy charakterystyczne dla glomerulopatii cukrzycowej i niecukrzycowej.

Tabela 4. Wybrane interleukiny i ich rola w reakcji zapalnej.

Tabela 5. Charakterystyka badanej grupy chorych.

Tabela 6. Charakterystyka wybranych parametrów biochemicznych z krwi obwodowej oraz badań antropometrycznych, służących ocenie badanej grupy chorych z nefropatią cukrzycową.

Tabela 7. Wybrane parametry biochemiczne krwi badanych chorych w odniesieniu do obowiązujących norm referencyjnych.

Tabela 8. Wybrane parametry biochemiczne krwi w grupie kontrolnej w odniesieniu do obowiązujących norm referencyjnych.

Tabela 9. Oznaczone markery zapalne we krwi badanych chorych.

Tabela 10. Analiza wyników badań oceniający funkcję i strukturę naczyń w badanej grupie chorych.

Tabela 11. Wybrane parametry zapalne w surowicy krwi grupy kontrolnej.

Tabela 12. Wybrane średnie określające parametry badań oceniający funkcję i strukturę naczyń w grupie kontrolnej.

Tabela 13. Parametry oceniające funkcję nerek – analiza porównawcza pomiędzy grupą chorych z nefropatią cukrzycową (grupa badana) oraz grupą kontrolną chorych z cukrzycą typu 2 bez powikłań.

Tabela 14. Parametry oceniające parametry antropometryczne, zaburzenia metaboliczne oraz wyrównanie cukrzycy w grupie chorych z nefropatią cukrzycową (grupa badana) oraz grupie kontrolnej chorych z cukrzycą typu 2 bez powikłań.

Tabela 15. Parametry oceniające występowanie anemii w obu badanych grupach.

Tabela 16. Parametry oceniające zaburzenia gospodarki wapniowo – fosforanowej: analiza porównawcza pomiędzy grupą chorych z nefropatią cukrzycową (grupa badana) oraz grupą kontrolną chorych z cukrzycą typu 2 bez powikłań.

Tabela 17. Parametry stanu zapalnego: analiza porównawcza pomiędzy grupą chorych z nefropatią cukrzycową (grupa badana) oraz grupą kontrolną chorych z cukrzycą typu 2 bez powikłań.

Tabela 18. Wyniki badań oceniających funkcję i strukturę naczyń: analiza porównawcza pomiędzy grupą chorych z nefropatią cukrzycową (grupa badana) oraz grupą kontrolną chorych z cukrzycą typu 2 bez powikłań.

Tabela 19. Charakterystyka chorych z nefropatią cukrzycową u których wykonano badania kontrolne po 36 miesiącach. Wybrane parametry antropometryczne i biochemiczne krwi w odniesieniu do obowiązujących norm referencyjnych.

Tabela 20. Wybrane parametry biochemiczne: analiza różnic w grupie chorych z nefropatią cukrzycową wyjściowo i po 36 miesiącach badania.

Tabela 21. Porównanie wartości markerów zapalnych w badanej grupie chorych.

Tabela 22. Porównanie wartości parametrów badań oceniający funkcję i strukturę naczyń w badanej grupie chorych.

Tabela 23. Korelacja wyników parametrów badań oceniających funkcję i strukturę naczyń u chorych z nefropatią cukrzycową z wybranymi wynikami badań biochemicznych i antropometrycznych.

Tabela 24. Korelacja wyników mikrokrażenia u chorych z nefropatią cukrzycową z wybranymi wynikami badań biochemicznych i antropometrycznych.

Tabela 25. Korelacja wyników parametrów badań oceniających funkcję i strukturę naczyń u chorych z nefropatią cukrzycową z wybranymi czynnikami zapalnymi i wzrostowymi.

Tabela 26. Korelacja wyników mikrokrażenia u chorych z nefropatią cukrzycową z czynnikami zapalnymi i wzrostowymi.

Tabela 27. Korelacja wyników parametrów wydolności nerek u chorych z nefropatią cukrzycową z wybranymi wynikami badań biochemicznych i antropometrycznych.

Tabela 28. Korelacja wyników parametrów wydolności nerek u chorych z nefropatią cukrzycową z wybranymi czynnikami zapalnymi.

Tabela 29. Korelacja wyników parametrów badań oceniający funkcję i strukturę naczyń u chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji z wybranymi wynikami badań laboratoryjnych i danymi klinicznymi.

Tabela 30. Korelacja wyników mikrokrażenia u chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji z wybranymi wynikami badań laboratoryjnych i danymi klinicznymi.

Tabela 31. Korelacja wyników parametrów badań oceniający funkcję i strukturę naczyń u

chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji z wybranymi czynnikami zapalnymi i wzrostowymi.

Tabela 32. Korelacja wyników mikrokrażenia u chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji z czynnikami zapalnymi i wzrostowymi.

Tabela 33. Korelacja wyników parametrów wydolności nerek u chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji z wybranymi czynnikami biochemicznymi i wynikami badań antropometrycznych.

Tabela 34. Korelacja wyników parametrów wydolności nerek u chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji z wybranymi czynnikami zapalnymi.

Tabela 35. Model 1 - wpływ IL-6 na zmianę GFR po 36 miesiącach obserwacji. (Regresja spełnia wszystkie założenia dla prawidłowości modelu).

Tabela 36. Model 2 - wpływ PDGF-BB na zmianę GFR po 36 miesiącach obserwacji. (Regresja spełnia wszystkie założenia dla prawidłowości modelu). Tabela 37. Model 3 - wpływ HbA1c na progresję albuminurii po 36 miesiącach obserwacji. (Regresja spełnia wszystkie założenia dla prawidłowości modelu).

9. SPIS RYCIN

Rycina 1. Porównanie wartości GFR w grupie badanej i kontrolnej.

Rycina 2. Porównanie wartości HbA1c w grupie badanej i grupie kontrolnej.

Rycina 3. Porównanie stężenia fibrynogenu w osoczu w badanych grupach.

Rycina 4. Porównanie stężenia hsCRP w osoczu w badanych grupach.

Rycina 5. Porównanie stężenia IL-6 w osoczu w badanych grupach.

Rycina 6. Porównanie stężenia s-TNF RII w osoczu w badanych grupach.

Rycina 7. Porównanie wartości AoPWV w grupie badanej i kontrolnej.

Rycina 8a i b. Porównanie wartości IMT P i L w grupie badanej i kontrolnej.

Rycina 9. Porównanie wartości MFb w grupie badanej i kontrolnej.

Rycina 10. Porównanie wartości PF w grupie badanej i kontrolnej.

Rycina 11. Porównanie wartości MFb w grupie badanej na początku i po 36 miesiącach obserwacji.

Rycina 12 a i b. Korelacje IMT P i L z HbA1c.

Rycina 13. Korelacja wartości AoPWV z i stężenia VEGF.

Rycina 14. Korelacja wartości AoPWV i TGF β 1.

Rycina 15. Korelacja wartości AoPWV i PDGF BB.

Rycina 16. Korelacja albuminurii a HbA1c w grupie chorych z nefropatią cukrzycową.

Rycina 17. Korelacja albuminurii i cholesterolu w grupie chorych z nefropatią cukrzycową na początku obserwacji.

Rycina 18. Korelacja albuminurii i LDL w grupie chorych z nefropatią cukrzycową na początku obserwacji.

Rycina 19. Korelacja GFR a s TNF R II w grupie chorych z nefropatią cukrzycową na początku obserwacji.

Rycina 20. Korelacja GFR a IL-6 w grupie chorych z nefropatią cukrzycową na początku obserwacji.

Rycina 21. Korelacja wartości AoPWV a HbA1c w grupie chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji.

Rycina 22a i b. Korelacja wartości IMT P i L a HbA1c w grupie chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji.

Rycina 23. Korelacja wartości albuminurii a HbA1c w grupie chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji.

Rycina 24. Korelacja wartości albuminurii a stężenia LDL w grupie chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji.

Rycina 25. Korelacja wartości albuminurii a stężenia hsCRP w grupie chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji.

Rycina 26. Korelacja wartości albuminurii a stężenia s TNF RII w grupie chorych z nefropatią cukrzycową po 36 miesiącach obserwacji.

10. STRESZCZENIE.

Wstęp: Cukrzyca typu 2 stanowi poważny, narastający problem zdrowotny oraz ekonomiczny w Polsce i na świecie, szczególnie ze względu na rozwój przewlekłych powikłań. Powikłania naczyniowe cukrzycy dzielimy na mikroangiopatyczne, obejmujące mikrowaskulaturę, oraz makroangiopatyczne, dotyczące dużych naczyń i prowadzące do powstawania miażdżycy manifestującej się klinicznie chorobą niedokrwienną serca lub udarem mózgu.

Ryzyko wystąpienia niewydolności nerek w populacji chorych na cukrzycę jest zamiennie większe niż u osób bez cukrzycy. Cukrzycowa choroba nerek rozwija się u około 30 - 40 % chorych z typem 1 cukrzycy i około 15 – 20 % chorych z typem 2 cukrzycy, prowadząc krańcowym stadium do niewydolności nerek. Aktualnie pacjenci z nefropatią cukrzycową stanowią około 24,7 % wszystkich chorych dializowanych w Polsce. Mechanizmy patogenetyczne przewlekłych powikłań cukrzycy nie są jeszcze do końca poznane. Rozwój nefropatii cukrzycowej zależy od czasu trwania cukrzycy, wyrównania glikemii, obecności hiperlipidemii, wartości ciśnienia tętniczego krwi i czynników genetycznych. Wyniki ostatnio publikowanych badań wskazują na istotną rolę prognostyczną

w powstaniu nefropatii czynników wzrostu i cytokin pozapalnych. Powyższe czynniki wpływają na progresję zmian, w obrębie błon podstawnych naczyń włosowatych kłębuszka nerkowego w postaci rozplemu i włóknienia zrębu, prowadząc do zaburzeń czynności kłębuszków, niedokrwienia i zeszklwienia.

Typ 2 cukrzycy wiąże się także z wysokim ryzykiem wystąpienia powikłań sercowo - naczyniowych, które zwiększa się w przypadku pojawienia się choroby nerek. Miarą zaawansowania zmian naczyniowych w przebiegu cukrzycy jest wzrost sztywności naczyń u chorych z cukrzycą w porównaniu z osobami bez cukrzycy. Termin „sztywność” określa szereg własności ścian tętniczych, takich jak: rozszerzalność, elastyczność, oporność na deformację, zmiany grubości ściany i średnicy naczyń pod wpływem ciśnienia tętniczego. Stwierdzono, że u chorych z cukrzycą sztywnienie naczyń występuje wcześniej niż w populacji ogólnej. Do czynników ryzyka odpowiedzialnych za rozwój tego procesu zalicza się płeć, wiek, otyłość, zaburzenia lipidowe, nadciśnienie, palenie papierosów i stężenie homocysteiny. Podkreśla się również rolę nieswoistego odczynu zapalnego, niedoboru erytropoetyny, hipoalbuminemii, a także zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowej. Dodatkowo czynnikami obciążającymi są czas trwania cukrzycy, zaawansowanie niewydolności nerek i leczenie nerko zastępcze. Do markerów procesów miażdżycowych w naczyniach należą między innymi pomiar grubości intima – media (IMT) oraz pomiar sztywności naczyń tętniczych (PWV).

Przyjmuje się, że zaburzenia funkcji i morfologii naczyń na poziomie mikrokrążenia leżą u podstaw powikłań mikronaczyniowych w cukrzycy. Zaburzenia mikrokrążenia występują w wielu narządach u pacjentów z cukrzycą i skutkują rozwojem nefropatii, retinopatii i neuropatii. Ostatnio uwagę lekarzy zajmujących się cukrzycą skupia mikrokrążenie skórne, którego zaburzenia w tej chorobie były jak dotąd przedmiotem niewielu doniesień. Istotną rolę w regulacji przepływu w mikrokrążeniu skórnym odgrywa

napięcie układu współczulnego oraz liczne substancje wazo – aktywne, postulowana jest także rola nieswoistego procesu zapalnego.

Celem pracy była ocena związku wybranych czynników wzrostowych i zapalnych na rozwój cukrzycowej choroby nerek i zmian naczyniowych u pacjentów z nefropatią cukrzycową w przebiegu cukrzycy typu 2. Szczegółowe cele obejmowały:

A) Ocenę stężenia czynników wzrostowych takich jak TGF β , PDGF, VEGF, oraz cytokin prozapalnych takich jak fibrynogen, hsCRP, interleukina 6, oraz receptor TNF α u chorych z nefropatią cukrzycową i bez nefropatii oraz ocenę związku tych parametrów ze stopniem zaawansowania zmian w nerkach w przebiegu cukrzycy.

B) Ocenę wybranych markerów zmian naczyniowych takich jak PWV i IMT a także zmian w mikrokrażeniu skórnym u osób z nefropatią i w grupie kontrolnej.

C) Ocenę stężenia i związku z postępem zmian w nerkach, IMT i PWV wybranych czynników prozapalnych, wzrostowych w grupie badanej po 36 miesiącach obserwacji.

Material badawczy stanowiło 48 chorych z cukrzycą typu 2 rozpoznawaną według kryteriów WHO, u których stwierdzono wczesne stadia nefropatii cukrzycowej według klasyfikacji C.E. Mogensena. Grupę kontrolną stanowiło 22 pacjentów z cukrzycą typu 2, nie mających powikłań o charakterze cukrzycowej choroby nerek, odpowiadających grupie badanej pod względem płci i wieku. Kryteria wyłączenia obejmowały: aktywne zakażenia, choroby układowe oraz ciężkie choroby przewlekłe (płuc, układu krążenia, wątroby), choroby nowotworowe, leczenie immunosupresyjne, oraz brak współpracy z pacjentem lub brak zgody pacjenta.

Metody: U wszystkich badanych wykonano podmiotowe i przedmiotowe badanie lekarskie, pomiary wzrostu, masy ciała, obwodu pasa i bioder, pomiar ciśnienia tętniczego krwi, pomiar HbA1c jako oceny stopnia wyrównania glikemii, oznaczenie stężenia w surowicy: mocznika, kreatyniny, kwasu moczowego, oznaczenie mikroalbuminurii w moczu

dobowym, wyliczenie klirensu kreatyniny, oraz oznaczenie stężenia czynników wzrostu i cytokin prozapalnych w surowicy krwi takich jak: TGF β I, PDGF, VEGF, IL 6, TNF α R II, oraz hsCRP i fibrynogenu. Ponadto wykonano badania obrazowe: pomiar szybkości rozchodzenia się fali tętna w aorcie (AoPWV) oraz pomiar grubości kompleksu intima-media (IMT) i ocenę mikrokrażenia skórniego. U 25 pacjentów z cukrzycową chorobą nerek wykonano po 36 miesiącach badanie kontrolne, obejmujące ocenę parametrów funkcji nerek, stężenia badanych czynników zapalnych oraz ocenę zmian naczyniowych obrazujących stan układu krążenia. (Kontrole wykonano u pacjentów, którzy wyrazili zgodę na powtórne badanie, oraz nie rozpoczęli leczenia nerkozastępczego).

Wyniki: Przebadano 48 chorych z nefropatią cukrzycową w tym 22 kobiety i 26 mężczyzn, o średniej wieku 64,6 lat oraz 22 osoby z cukrzycą typu 2 stanowiące grupę kontrolną. Grupa chorych z nefropatią cukrzycową charakteryzowała się, zgodnie z oczekiwaniem, statystycznie istotnie niższymi średnimi wartościami klirensu kreatyniny 44 ml/min/1,73m² vs 101 ml/min/1,73m² (p<0,001) natomiast stężenie kreatyniny i mocznika w surowicy było wyższe niż w grupie kontrolnej (odpowiednio 170 μ mol/l vs 68,6 μ mol/l oraz 12,2 mmol/l vs 6,66 mmol/l p<0,001). Średnia wartość HbA1c w grupie chorych z nefropatią wynosiła 7,06% i nie różniła się istotnie od grupy chorych bez powikłań. W grupie chorych z nefropatią stwierdzono statystycznie istotnie niższe wartości hemoglobiny, hematokrytu oraz erytrocytów niż w grupie kontrolnej. Wśród 48 chorych objętych badaniem wartość hemoglobiny < 11 g/dl wykazano u 11 osób, natomiast w grupie kontrolnej zaledwie u jednej osoby. Ponadto u chorych z nefropatią stwierdzono istotnie wyższe stężenie w surowicy fibrynogenu i hsCRP (p<0,01) oraz IL-6 (p<0,001) w porównaniu z grupą kontrolną. Również stężenie sTNF RII – rozpuszczalnego receptora II dla TNF było istotnie wyższe w badanej grupie niż u osób bez tego powikłania (4007 vs 3111 p<0,001). Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w czynnikach wzrostowych. W grupie chorych z nefropatią stwierdzono

wyższe wartości prędkości fali tętna niż w grupie kontrolnej 14,1 m/s vs 11,8 m/s ($p<0,01$). Zaobserwowano także trend ($p=0,07$) do występowania wyższej wartości grubości kompleksu intima-media w tętnicy szyjnej wspólnej w badanej grupie w porównaniu z grupą kontrolną. Może to świadczyć o istnieniu większej sztywności naczyń tętniczych w grupie chorych z cukrzycową chorobą nerek w porównaniu do osób bez tego powikłania. Także w grupie badanej stwierdzono istotnie statystycznie niższe wartości przepływu spoczynkowego ($p<0,01$) oraz po okluzji ($p=0,05$) w porównaniu z grupą bez powikłań, co świadczy o zaburzeniach mikrokrażenia skórniego u osób z nefropatią.

Średnia wartość eGFR u wszystkich chorych po 36 miesiącach obserwacji wynosiła $40,1 \pm 22,5$ ml/min/1,73m², co świadczyło iż chorzy ci znajdowali się w III – V stopniu niewydolności nerek. Zaobserwowano także dużą rozpiętość zmierzonej albuminurii, od braku obecności białka w moczu do 2,5 g/dobę.

Porównując wyniki badanych parametrów po 36 miesiącach obserwacji w grupie badanej nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach lipidogramu, natomiast co warto podkreślić wyrównanie metaboliczne cukrzycy było istotnie lepsze ($p<0,01$); także wartości czynników prozapalnych i wzrostowych nie różniły się istotnie statystycznie. Nie zaobserwowano różnic w wartościach opisujących prędkość fali tętna w aorcie oraz grubości kompleksu intima-media w tętnicy szyjnej wspólnej. Natomiast stwierdzono poprawę wartości parametrów mikrokrażenia zarówno w warunkach podstawowych ($p<0,05$), jak i trend do poprawy wartości po okluzji ($p=0,09$), oraz w temperaturze 44 stopni ($p=0,08$).

U chorych z cukrzycową chorobą nerek stwierdzono istnienie związku pomiędzy BMI a eGFR ($r=0,5$; $p<0,002$). Wykazano także istnienie związku pomiędzy HbA1c a albuminurią ($r=0,4$; $p=0,01$) oraz cholesterolem całkowitym, LDL-cholesterolem a albuminurią (odpowiednio $r=0,4$; $p=0,01$ i $r=0,4$; $p=0,002$). Ponadto stwierdzono, iż wzrost stężenia takich

czynników zapalnych jak IL-6 i sTNF RII ma związek z wartością eGFR (odpowiedni $r=-0,3$; $p=0,01$ oraz $r=-0,7$ $p<0,0001$).

W zakresie ścian naczyń szyjnych wykazano istnienie zależności pomiędzy wartością AoPWV oraz średnią wartością BMI w badanej grupie ($r=0,34$; $p<0,01$). Dodatkowo stwierdzono związek pomiędzy wartościami IMT a parametrami wyrównania cukrzycy: glukozą i HbA1c ($r=0,33$; $p=0,02$ oraz $r=0,3$; $p<0,03$) a także stwierdzono istnienie związku IMT ze wzrostem stężeniem cholesterolu całkowitego ($r=0,31$; $p=0,03$). Ponadto wykazano iż wzrost albuminurii wiąże się ze wzrost wartości IMT ($r=0,4$ i $p=0,005$). Także parametry gospodarki wapniowo – fosforanowej istotnie wpływały na wartość IMT, wraz z pogłębianiem się zaburzeń mineralnych rosła grubość IMT P i L.

Po 36 miesiącach obserwacji przeprowadzono ponownie badanie związków pomiędzy parametrami opisującymi funkcję nerek oraz stan naczyń a czynnikami prozapalnymi i wzrostowymi oraz innymi wybranymi wartościami biochemicznymi. Podobnie jak w momencie rozpoczęcia badania zaobserwowano istnienie korelacji pomiędzy AoPWV a BMI ($r=0,6$; $p=0,003$) oraz istnienie zależności pomiędzy AoPWV i IMT a HbA1c (odpowiednio $r=0,4$; $p=0,06$ oraz $r=0,4$; $p<0,05$). Zaobserwowano także istotną zależność pomiędzy albuminurią a wartością AoPWV ($r=0,6$; $p=0,009$) oraz IMT P i L ($r=0,5$; $p=0,004$ oraz $r=0,45$; $p=0,02$). Również parametry gospodarki wapniowo – fosforanowej istotnie korelowały z PWV i IMT P i L. Stwierdzono także istnienie odwrotnej zależności pomiędzy mikrokreżeniem podstawowym i BMI ($r=-0,5$; $p=0,03$) Wykazano istnienie zależności pomiędzy wartościami wyrównania cukrzycy i albuminurią, dla stężenia glukozy $r=0,6$ i $p=0,01$, dla HbA1c $r=0,7$ i $p=0,01$. Stwierdzono ponadto wpływ stężenia LDL-cholesterolu na wielkość albuminurii, $r=0,6$ i $p=0,02$. Wykazano także wpływ hsCRP i sTNF RII na albuminurię (odpowiednio $r=0,5$; $p=0,008$ i $r=0,5$, $p=0,02$) oraz VEGF na wartość eGFR ($r=-0,4$; $p=0,03$).

Celem oceny wpływu czynników zapalnych i wzrostowych na progresję niewydolności nerek, a więc zmianę eGFR i albuminurii po 36 miesiącach obserwacji, stworzono odpowiednie modele regresji wieloczynnikowej. Jako zmienną zależną wzięto zmianę eGFR, a jako zmienne niezależne stężenie czynników zapalnych: fibrynogenu, hsCRP, IL-6, sTNF R II. Wykazano granicznie istotny wpływ IL-6 na zmianę eGFR ($p<0,05$). W kolejnym modelu badano zależność zmian eGFR i czynników wzrostowych: TGF β I, VEGF, PDGF-BB. Wykazano istotny wpływ PDGF-BB na zmianę eGFR ($p<0,03$). Nie stwierdzono natomiast wpływu badanych czynników na progresję albuminurii.

Podsumowanie wyników: Grupa chorych z nefropatią cukrzycową w porównaniu z pacjentami bez nefropatii cechowała się istotnym wzrostem badanych cytokin prozapalnych takich jak: fibrynogen ($p<0,01$), białko C-reaktywne ($p<0,01$), IL-6 ($p<0,001$) i sTNF R II ($p<0,001$). W analizie regresji wieloczynnikowej zależności zmian eGFR z badanymi czynnikami zapalnymi po 36 miesiącach obserwacji w grupie chorych z nefropatią, stwierdzono, że wartości eGFR wiążą się istotnie ze zmianami stężenia IL-6 oraz ze zmianami stężeniem PDGF BB, a mianowicie zwiększeniu stężenia IL-6 i PDGF BB w surowicy towarzyszyło obniżenie eGFR. Stwierdzenie istotnych związków pomiędzy progresją cukrzycowej choroby nerek a czynnikami zapalnymi ma znaczenie nie tylko z naukowego punktu widzenia, ale także duże implikacje praktyczne.

Również w zakresie zmian w układzie naczyniowym w grupie chorych z nefropatią cukrzycową stwierdzono wzrost prędkości fali tętna ($p<0,01$) i spadek przepływu podstawowego MFb ($p<0,01$) w porównaniu do chorych bez nefropatii. Stwierdzona korelacja AoPWV z BMI i stężeniem kreatyniny oraz IMT ze stopniem wyrównania glikemii w badanej grupie wskazuje na zależność postępu zmian naczyniowych od otyłości i stopnia wyrównania cukrzycy.

Uzyskane wyniki wskazują, istotne udział parametrów stanu zapalnego progresji niewydolności nerek u chorych z nefropatią cukrzycową, co stwarza nowe drogi prewencji rozwoju i progresji nefropatii cukrzycowej.

10. ABSTRACT.

Introduction: Diabetes mellitus type II (DM) is a serious and increasing health and economic problem in Poland and the World that is associated with overall chronic complications. The risk of renal failure in the population of patients with DM is significantly higher than in individuals without DM. DM will develop in about 30 – 40% of patients with type I and in about 15-20% of patients with type II DM leading to renal failure. Presently about 24.7% of all dialyzed patients in Poland have diabetic renal disease.

Mechanisms of chronic complications of DM are still unclear. Development of diabetic renal disease depends on the duration of DM, proper glucose control, presence of hyperlipidemia, arterial blood pressure values and genetic factors. Results of actual published research points at the essential prognostic role of growth factors and pro-inflammatory cytokines in the development of this nephropathy. These factors influence progression of changes pertaining to capillary base membranes of the kidney glomeruli- leading to proliferation and interstitial fibrosis and next to abnormal function, ischemia and sclerosis of the glomeruli.

Type II DM is connected with a high risk of cardiovascular complications, which further increases when renal disease is diagnosed. Diabetic vascular complications are divided into microangiopathy – pertaining to microvasculature; and macroangiopathy- pertaining to large vessels leading to development of atherosclerosis, which manifests itself clinically as ischemic heart disease or cerebral stroke. As vessel changes advance in DM- increased vessel stiffness is more notable than in individuals without DM. The term “stiffness” indicates a number of characteristics of the arterial vessel wall, such as: dilatation, elasticity and resistance to deformation, changes in wall thickness and diameter under the influence of arterial blood pressure. It has been proven that in patients with DM, stiffening of vessels develops much earlier than in the general population. Risk factors responsible for these changes are: sex, age, obesity, lipid disorders, hypertension, smoking, and homocystein levels. The role of non-specific inflammation, erythropoietin insufficiency, hypoalbuminemia, as well as abnormalities in the calcium-phosphate balance are underlined. Additional factors are duration of DM, renal insufficiency advancement and renal replacement therapy. Markers of the atherosclerotic process in vessels include thickness of the intima-media (IMT) and the arterial vessel stiffness measurement (PWV). Abnormalities in microcirculation are the cause of microangiopathic complications in DM. Microcirculation abnormalities appear in many organs of patients with DM. Nephropathy, retinopathy, as well as neuropathy are due to functional and morphological vessel changes at the level of microcirculation. The sympathetic nervous tension plays an essential role in the regulation of skin microcirculation, as well as numerous vaso-active substances; also postulated is the role of non –specific inflammation.

The aim of the research was to evaluate selected growth and inflammatory factors on the development of changes in kidneys and vessels in patients with diabetic renal disease in the course of DM type II in the Polish population. Specific aims were: a.) an evaluation of growth factors such as TGF β , PDGF, VEGF, as well as pro-inflammatory cytokines as

fibrinogen, hsCRP, interleukin 6, and TNF α receptor in patients with diabetic nephropathy and without nephropathy, as well as evaluation of these parameters and their influence on the degree of advancement in kidneys during the course of DM. b.) Evaluation of selected markers of vessel changes such as PWV, IMT and changes in microcirculation in patients with nephropathies and the control group. c.) Evaluation of concentrations of pro-inflammatory substances, growth factors and markers of vessel changes in the studied patient group after 36 months.

Materials: The study group consisted of 48 patients with DM type II diagnosed according to WHO criteria, in whom diabetic renal disease was found in varying stages of advancement graded by the C.E. Morgensen classification. The control group consisted of 22 patients with DM type II not having renal disease (matched according to age and sex). Exclusion criteria included: active infection, systemic disease and serious chronic diseases (including diseases of the lungs, circulation and liver), cancer, immunosuppression therapy, patient non-compliance, and lack of patient's consent..

Methods: All patients had a full history and physical performed. Following measurements were performed: height, weight, waist and hip diameter, arterial blood pressure, HbA1c concentration (as a parameter assessing glucose control), urea, creatinine, uric acid, urine microalbuminuria,, creatinine clearance, as well as measurements of serum growth and pro-inflammatory cytokine concentrations (TGF β I, PDGF, VEGF, IL 6, TNF α R II, hs CRP, fibrinogen). The following visual diagnostic tests were performed: aortic pulse wave velocity (AoPWV), intima-media thickness (IMT), and evaluation of microcirculation. In 25 patients with diabetic renal disease- control renal parameters, concentrations of the studied inflammatory factors, as well as evaluation of vessel changes visualizing circulation status were conducted after 36 months. Control tests were performed in patients that gave written consent and that had not yet had initiated renal replacement therapy.

Results: 48 patients with diabetic renal disease (22 females, 26 males with mean age 64.6 years) and 22 patients (control group) with DM type II were studied. Information was attained from 32 out of 45 patients and 26 patients examined after 36 months. Renal replacement therapy was initiated in 4 patients from the initial study group (these patients were excluded from the study), while 3 patients died due to cardiovascular complications. Control parameters and information was unattainable in 16 patients.

The patient group with diabetic renal disease had significantly lower mean values of creatinine clearance - 44 ml/min/1.73m² vs. 101 ml/min/1.73m² (p<0.001); however creatinine and urea concentrations were higher in the control group (respectively 170 µmol/l vs. 68.6 µmol/l and 12.2 mmol/l vs. 6.66 mmol/l P<0.001). Even though worse glucose control was noted in patients with nephropathy (mean value of HbA1c greater than 7.0%), no statistical significant differences were found between the studied groups. In this group, lower statistical significant values of hemoglobin, hematocrit and erythrocyte number were observed. Among the 48 studied patients – hemoglobin values < 11 g/dl were noted in 11 individuals; while only 1 patient in the control group. In patients with nephropathy, statistically significant higher concentrations of fibrinogen and hsCRP (p<0.01), as well as IL-6 (p<0.001) were observed in comparison to the control group. Concentrations of dissolvable sTNF RII were significantly higher in the studied group than in patients without nephropathy. No statistically significant differences were noted in growth factor values. In the group of patients with nephropathy – statistically significant higher values of AoPWV were found than in the control group [respectively 14.1 m/s vs. 11.8 m/s (p<0.01)]. A trend was observed (p=0.07) in higher values of the intima-media thickness of the right and left common carotid arteries of the studied group in comparison to the control group; however no statistically significant differences between the performed measurements. This fact may indicate existence of increased arterial vessel stiffness in the group of patients with DM renal disease in

comparison to patients without this complication. In the studied group, statistical significant lower value of resting ($p<0.01$) and post occlusion ($p=0.05$) in comparison to the group without complications may point to abnormalities in skin microcirculation in patients with nephropathy.

Patients with nephropathy who remained in the study after years of observation were characterized with significant increased values of creatinine and urea blood values (only 3 patients with normal values were noted). Mean values of eGFR in all patients equaled 40.1 ± 22.5 ml/min/1.73m², which qualified these patients into the range of IIIrd-IVth stage of renal insufficiency. A wide range of albuminuria was noted from 0 to 2.5 g/day.

Comparing values of the tested parameters after a 36-month observation period- no significant differences were noted in the lipidogram. One should also note that diabetic metabolic control was significantly better ($p<0.01$); as well as the fact that inflammatory and growth factors did not differ significantly. No differences were observed in values describing neither AoPWV nor intima-media thickness in the right and left common carotid artery. However, improvement of microcirculation, and basic parameters ($p<0.05$) was noted; as well as a trend of improvement of values after occlusion ($p=0.09$), AUC ($p<0.05$) and at a temperature of 44 degrees ($p=0.08$).

The association between parameters evaluating progression of renal insufficiency in patients with diabetic renal disease and selected biochemical values, anthropometric tests, including also growth and inflammatory factors were studied. A correlation between BMI index and eGFR ($r=0.5$; $p<0.002$) was found. An existing correlation was noted between HbA1c and albuminuria ($r=0.4$; $p=0.01$); as well as between total cholesterol, LDL and albuminuria (respectively $r=0.4$; $p=0.01$ and $r=0.4$; $p=0.002$). Increases of inflammatory factors such as IL-6 and sTNF RII were shown to influence eGFR value (respectively $r=-0.3$; $p=0.01$ and $r=-0.7$, $p<0.0001$). Another correlation was noted between AoPWV value and

mean BMI index in the study group ($r=0.34$; $p<0.01$). Additional correlations resulted between IMT values and parameters of glucose control: with glucose and HbA1c ($r=0.33$; $p=0.02$ and $r=0.3$; $p<0.03$) and with increased cholesterol ($p=0.03$). Higher values of albuminuria caused an increase in values of IMT ($r=0.4$ and $p=0.005$). It was also shown that calcium-phosphate balance had a significant influence on the IMT value (along with exacerbation of mineral abnormalities, thickness of the right and left IMT increased).

After 36 months of observation – tests were repeated that evaluated the association between parameters describing renal function, as well as vessel condition and pro-inflammatory, growth parameters and other selected biochemical values. Similar as in the moment when research was initiated- a correlation between AoPWV and BMI index ($r=0.6$; $p=0.003$), as well as between AoPWV and IMT and HbA1c (respectively: $r=0.4$; $p=0.06$ and $r=0.4$; $p<0.05$) was found to exist. Correlation was also observed between albuminuria and values of AoPWV ($r=0.6$; $p=0.009$) and IMT (right and left) ($r=0.5$; $p=0.004$ and $r=0.45$; $p=0.02$). Parameters of calcium and phosphate balance significantly correlated with PWV and IMT values (right and left). Noted were inverse correlations between basal microcirculation and BMI ($r=-0.5$; $p=0.03$), as well as an association between basal flow/after occlusion and creatinine and uric acid concentrations (respectively: $r=0.4$; $p=0.05$ and $r=0.5$; $p<0.02$). Statistically significant inverse correlation between GFR and creatinine/urea concentrations in blood serum of the examined patients (respectively: $r=-0.8$; $p=0.00001$ and $r=-0.7$; $p=0.0002$); as well as a correlation between glucose control values and albuminuria (for glucose $r=0.6$ and $p=0.01$, for HbA1c $r=0.7$ and $p=0.01$) were noted. It was found that albuminuria was influenced by: LDL concentration $r=0.6$ and $p=0.02$; as well as by hsCRP and sTNF RII (respectively $r=0.5$; $p=0.008$ and $r=0.5$, $p=0.02$) and that VEGF influenced eGFR value ($r=-0.4$; $p=0.03$).

Aim of the evaluation of growth and inflammatory factors on the progression of renal insufficiency (change in eGFR and albuminuria after 36 months of observation) resulted in an appropriate regression model. Change in eGFR was taken as a dependent variable; and inflammatory factors (fibrinogen, hsCRP, IL-6, sTNF R II) as independent variables. Borderline significant influence of IL-6 on the change in eGFR ($p<0.05$) was noted. The following model examined correlation between changes in eGFR and growth factors: TGF β I, VEGF, PDGF-BB. Significant influence of PDGF-BB was shown on the change of eGFR ($p<0.03$). However, no influence was proven of the studied factors on progression of proteinuria.

Conclusions: The main result of the study having pronounced practical implications is the finding of significant correlations between progression of diabetic renal disease and inflammatory factors. These factors were analyzed in a cross-sectional study pertaining to a group of individuals with DM and nephropathy, and later as a prospective study. In this research study – multiple regression analyses proved that eGFR value correlates with significant changes and IL-6 concentration, as well as changes in PDFG BB concentration. Increased concentrations of IL-6 and PDFG BB in blood serum were associated with eGFR decrease. However, no significant correlation was proven between examined factors and progression of albuminuria. The group of patients with diabetic nephropathy in comparison with patients without nephropathy were characterized with lower values of Hb, Hct ($p<0.01$) and erythrocyte number ($p<0.05$), as well as with higher concentrations of serum phosphorus, Ca x P product and alkaline phosphatase ($p<0.001$). Also significant increase of pro-inflammatory cytokines such as: fibrinogen ($p<0.01$), C-reactive protein ($p<0.01$), IL-6 ($p<0.01$) and sTNF R II ($p<0.01$) were observed. A reflection of circulation abnormalities in the group of patients with diabetic nephropathy in comparison to patients without nephropathy is the increase in AoPWV ($p<0.01$) and decrease in basal flow MFb ($p<0.01$).

After 36 months in the group of patients with nephropathy – significant decrease in weight, glucose, HbA1c values ($p<0.01$), as well as increase in urea, phosphorus and decrease in serum calcium concentrations ($p<0.05$) indicates progression of renal insufficiency. Correlation between AoPWV, BMI index and concentrations of serum creatinine as well as between IMT, glucose and HbA1c in the study group of patients points to an association between renal progression and obesity, as well as degree of diabetes control.

The obtained results indicate that the patient group with nephropathy, with similar age, DM duration and degree of diabetes control compared to the group with DM without nephropathy have higher significant concentrations of inflammatory markers, as well as AoPWV and decreased skin perfusion. This may point to the role of inflammatory status in the development of microangiopathy complications in DM.