

Daniel Kotschy, Maria Kotschy, Paweł Socha, Justyna Kwapisz, Natalia Żuk, Joanna Dubis, Maciej Karczewski, Wojciech Witkiewicz

Projekt WroVasc — Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny, Ośrodek Badawczo-Rozwojowy we Wrocławiu

Śródbłonkowe czynniki hemostazy w cukrzycy typu 2 i bez cukrzycy u pacjentów z zaawansowaną miażdżycą tętnic kończyn dolnych

Endothelial hemostatic markers in type 2 diabetes and without diabetes in patients with advanced peripheral arterial disease

STRESZCZENIE

Wstęp. Cukrzyca typu 2 (DM2) jest ważnym czynnikiem ryzyka w miażdżycy tętnic kończyn dolnych (PAD). Zaburzenia metaboliczne w DM2, jak insulinooporność i hiperglikemia, powodują zwiększoną syntezę reaktywnych tlenowych rodników, które, wywołując proces zapalny i dysfunkcję śródbłonka, prowadzą do aterosklerozy. Uszkodzona ściana naczyniowa uwalnia do krwi śródbłonkowe markery hemostazy. Celem badań było oznaczenie śródbłonkowych markerów hemostazy: czynnika tkankowego (TF), jego inhibitora (TFPI), trombomoduliny (TM), czynnika von Willebranda (vWF), tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) i inhibitora aktywatorów plazminogenu typu 1 (PAI-1) we krwi chorych z DM2 i bez DM2 u pacjentów z zaawansowaną PAD.

Materiał i metody. Śródbłonkowe markery hemostazy oznaczono w osoczu krwi 91 pacjentów z zaawansowaną PAD i DM2, w tym 37 kobiet i 54 mężczyzn w wieku $65,2 \pm 9,0$ lat. Grupę kontrolną stanowiło 59 pacjentów

z zaawansowaną PAD, ale bez DM2. Obie grupy były w podobnym przedziale wieku i płci, z podobnymi czynnikami ryzyka i w większości współistniejącymi chorobami. Jedynie u pacjentów z DM2 częściej występowała dyslipidemia ($p < 0,022$). Krew pobierano rano na czczo do 3,2% cytrynianu sodu w proporcji 9:1. Śródbłonkowe markery hemostazy oznaczono metodami immunoenzymatycznymi ELISA przy zastosowaniu komercyjnych zestawów firmy American Diagnostica.

Wyniki. Stężenia śródbłonkowych markerów: TF, TFPI, TM, vWF, t-PA i PAI-1 w osoczu pacjentów z PAD i DM2 były podobne jak u pacjentów z PAD, ale bez DM2. Natomiast pacjenci z PAD i DM2 oraz z PAD bez DM2 mieli stężenia TF i vWF istotnie statystycznie wyższe (odpowiednio $p < 0,05$ i $p < 0,0001$), a TM niższe ($p < 0,001$) w porównaniu z grupą referencyjną osób zdrowych. Za różnice były odpowiedzialne: starszy wiek, PAD i proces rewaskularyzacji. Stężenia TFPI, t-PA i PAI-1 były natomiast prawie jednakowe w trzech grupach: z DM2, bez DM2 i w grupie referencyjnej. **Wniosek.** Współistniejąca DM2 z PAD nie zwiększała uwalniania śródbłonkowych markerów hemostazy, co może potwierdzać pogląd o wspólnej etiologii DM2 i PAD polegającej na tak zwanej dysfunkcji śródbłonka naczyń. (Diabet. Klin. 2014; 3, 6: 238–245)

Słowa kluczowe: śródbłonkowe markery hemostazy, cukrzyca, obwodowa miażdżycą tętnic

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Maria Kotschy
Wojewódzki Szpital Specjalistyczny, Ośrodek Badawczo-Rozwojowy
ul. H.M. Kamińskiego 73a, 51-124 Wrocław
Tel.: +48 (71) 32 70 135, 608 450 922, faks: +48 (71) 32 54 101
e-mail: kwapisz@wssk.wroc.pl
Diabetologia Kliniczna 2014, tom 3, 6, 238–245
Copyright © 2014 Via Medica
Nadesłano: 26.09.2014 Przyjęto do druku: 05.12.2014

ABSTRACT

Background. Type 2 diabetes (DM2) plays an important role as a risk factor for peripheral arterial disease (PAD). Metabolic abnormalities in DM2, as insulin resistance and hyperglycemia cause overproduction of reactive oxygen species, which via inflammation and endothelial dysfunction lead to atherothrombosis. The injured arterial wall releases hemostatic endothelial markers. The aim of the study was to determine: tissue factor (TF), tissue factor pathway inhibitor (TFPI), thrombomodulin (TM), von Willebrand factor (vWF), tissue plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activators inhibitor type 1 (PAI-1) in type 2 diabetes and without diabetes in patients with advanced PAD. **Material and methods.** Endothelial markers were examined in 91 patients with PAD and DM2; 37 women and 54 men — aged 65.2 ± 9.0 years. Control group consisted of 59 PAD patients without DM2. Both groups of patients were in similar compartments of sex and age with similar risk factors and coexisting diseases. Only in patients with DM2 more frequently appeared dyslipidemia ($p < 0.022$). Blood was collected in the morning to 3.2% sodium citrate in proportion 9:1. Endothelial hemostatic markers were determined with enzyme immunoassay ELISA using commercial tests of American Diagnostica.

Results. The levels of endothelial markers: TF, TFPI, TM, vWF, t-PA and PAI-1 in patients with PAD and DM2 were similar compared to patients without DM2. But patients with DM2 had the concentration of TF and vWF significantly higher ($p < 0.005$, $p < 0.0001$) and TM lower ($p < 0.001$) in comparison with reference group of healthy patients. But levels of TFPI, t-PA and PAI-1 were almost equal in all three groups of patients with DM2, without DM2 and of healthy persons.

Conclusion. DM2 coexisting in PAD patients did not change the release of endothelial hemostatic markers from arterial wall. This confirms the view of “endothelial dysfunction” as common etiology of both diseases PAD and DM2. (Diabet. Klin. 2014; 3, 6: 238–245)

Key words: endothelial hemostatic markers, diabetes, peripheral arterial disease

Wstęp

Na całym świecie liczba chorych na cukrzycę typu 2 ogromnie wzrasta, głównie z powodu zwiększającej się otyłości, podatności genetycznej, urbanizacji i starzenia się społeczeństw. Cukrzyca typu 2, mimo że jest jedną z częstszych chorób, przez wiele lat pozostaje nierozpoznana i najczęściej zostaje odkryta przypadkowo podczas badania krwi lub moczu. U większości

pacjentów zostaje rozpoznana w stanie zaawansowanym z powikłaniami naczyniowymi. Cukrzycowa makroangiopatia jest reprezentowana przez miażdżycę tętnic, a mikroangiopatia występuje w wielu narządach, jednak przede wszystkim jako retinopatia i nefropatia prowadzące do ślepoty i niewydolności nerek [1]. Cukrzycowe zmiany naczyniowe spowodowane są insulinoopornością i przedłużoną ekspozycją na hiperglikemię wraz z innymi czynnikami ryzyka, takimi jak nadciśnienie tętnicze, dyslipidemia, pewna podatność genetyczna, miażdżycza tętnic i nikotynizm [1, 2]. Powikłania hiperglikemii w cukrzycy typu 2 wyprzedzają przez wiele lat insulinooporność występującą w licznych narządach, włączając mięśnie szkieletowe, wątrobę, serce i tkankę tłuszczową [3]. Otyłość odgrywa ważną rolę w patogenezie cukrzycy typu 2. Jest kompleksowym schorzeniem prowadzącym do zaburzeń metabolizmu lipidów, osi hormonalnej, stresu oksydacyjnego, systemowego zapalenia i ektopowej redystrybucji tłuszczu. Tkanka tłuszczowa jest również aktywnym źródłem mediatorów zapalenia i wolnych kwasów tłuszczowych [1, 4, 5]. U otyłych pacjentów z cukrzycą typu 2 odnotowuje się zwiększone stężenia markerów zapalenia [6, 7]. Zwiększony stres oksydacyjny szybko inaktywuje tlenek azotu (NO) i zwiększa aktywację endoteliny 1 (ET-1) [8]. Wewnątrzkomórkowa oksydacja przechowywanych wolnych kwasów tłuszczowych generuje wolne rodniki tlenowe, prowadząc do zapalenia naczyń [3]. Dysfunkcja endotelium nie tylko zmniejsza uwalnianie NO i prostacykliny (PGI-2), lecz zwiększa także syntezę substancji zwężających naczynia, na przykład tromboksanu A₂, endoteliny i prostanoidów [3, 4]. U chorych na cukrzycę przewlekłą insulinooporność i hiperglikemia nasilają proces krzepnięcia krwi oraz zwiększają agregację płytek, prowadząc do stanu prozakrzepowego i powikłań zakrzepowo-zatorowych [4]. Cukrzyca indukuje także w ścianie tętnic wzrost stężenia i uwalnianie do krwi czynnika tkankowego (TF, *tissue factor*), który aktywuje protrombinę do trombiny przekształcającej fibrynogen w fibrynę. Organizacja fibryny jest nasilana przez wysokie stężenie inhibitora aktywatorów plazminogenu typu 1 (PAI-1, *plasminogen activators inhibitor type 1*) i zmniejszony poziom tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA, *tissue plasminogen activator*). Natomiast w płytkach krwi dochodzi do zwiększenia zawartości Ca²⁺, aktywacji przez trombinę, jak również do interakcji z czynnikiem von Willebranda (vWF, *von Willebrand factor*) poprzez glikoproteinowy receptor IIb/IIIa. Prowadzi to do zmian kształtu płytek, uwalniania z nich ziarnistości i wzmożonej agregacji. Uszkodzenie i dysfunkcja śródbłonka powodują pęknięcie błony podstawnej śródbłonka, co prowadzi do ekspozycji kolagenu, vWF i dalszej

aktywacji płytek krwi. Dysfunkcję śródbłonna uważa się obecnie za wspólny mechanizm w etiologii cukrzycy typu 2 i chorób sercowo-naczyniowych o etiologii miażdżycowej. Dysfunkcja komórek śródbłonna i mięśni gładkich naczyń powoduje uwalnianie do krwi wielu białkowych czynników uznawanych za markery ich uszkodzenia [4, 8, 9].

Celem badań przeprowadzonych przez autorów niniejszej pracy była ocena stężeń 6 śródbłonkowych czynników hemostazy: TF, inhibitora drogi krzepnięcia aktywowanej przez TF (TFPI, *tissue factor pathway inhibitor*), trombomoduliny (TM, *thrombomodulin*), vWF, t-PA oraz PAI-1 pacjentów z miażdżycą tętnic kończyn dolnych (PAD, *peripheral arterial disease*) z cukrzycą typu 2 i bez cukrzycy, a także w grupie referencyjnej osób zdrowych.

Material i metody

Badaniem objęto 91 pacjentów z cukrzycą typu 2 i zaawansowaną PAD, w tym 37 kobiet i 54 mężczyzn w wieku $65,2 \pm 9,0$ lat, oraz 59 pacjentów z PAD, ale bez cukrzycy w wieku $66,2 \pm 10,7$ roku, stanowiących grupę kontrolną. Pacjenci obu grup mieli zaawansowaną PAD i byli badani w okresie do 18 miesięcy po przeprowadzonej skutecznej obwodowej, wewnątrznacyniowej rewaskularyzacji — angioplastyce (PTA, *peripheral transluminal angioplasty*) i/lub implantacji stentów (do 3 miesięcy — 77 pacjentów, powyżej 3 do 6 miesięcy — 30 pacjentów i powyżej 6 do 18 miesięcy — 43 pacjentów). Chorzy byli obserwowani przez okres 12 miesięcy pod kątem występowania restenoz w rewaskularyzowanych naczyniach. U wszystkich pacjentów z PAD przeprowadzono dokładny wywiad, badanie przedmiotowe oraz badania laboratoryjne, biochemiczne i obrazu krwi. Ukrwienie kończyn dolnych oceniono na podstawie wskaźnika kostka–ramię (ABI, *ankle brachial index*) i badania ultrasonograficznego (USG *duplex Doppler*). Czynniki ryzyka i choroby towarzyszące oraz wpływ niektórych zabiegów u pacjentów z cukrzycą i PAD oraz bez cukrzycy (PAD) przedstawiono w tabelach 1 i 2.

Ponieważ producenci testów nie podają obecnie norm laboratoryjnych dla badanych czynników hemostazy, utworzono także grupę referencyjną składającą się z 53 zdrowych osób (44 mężczyzn i 9 kobiet w wieku 20–56 lat), które zostały przebadane w stacji krwiodawstwa przed pierwszym oddaniem krwi. Zasadniczą jednak grupę kontrolną stanowili pacjenci z PAD bez cukrzycy. Krew pobierano pacjentom i osobom zdrowym rano na czczo do 3,2% cytrynianu sodu w proporcji 9:1. Krew wirowano 15 minut z prędkością 2500 g. Odwirowane osocze dzielono po 0,2 ml do próbek Eppendorfa i zamrażano w temperaturze -80°C do czasu przeprowadzenia badań. Śródbłonkowe

czynniki hemostazy w osoczu pacjentów z cukrzycą i bez cukrzycy oraz w grupie referencyjnej oznaczono metodą immunoenzymatyczną (ELISA) przy użyciu komercyjnych zestawów firmy American Diagnostica:

- TF — Imubind TF ELISA Kit. Test wykrywa TF oraz kompleksy TF/VIIa. W teście stosuje się monoklonalne przeciwciała myszy przeciwko ludzkiemu TF;
- TFPI — Imubind TFPI Total ELISA Kit. W teście użyto poliklonalnych przeciwciał królika przeciwko ludzkiemu TFPI, który wykrywa pełnołańcuchową i zredukowaną formę inhibitora;
- TM — Imubind Thrombomodulin ELISA Kit. Metoda kanapkowa z zastosowaniem monoklonalnych przeciwciał rozpoznających fragmenty naskórkowego czynnika wzrostu 1 i 2 (EGF1, EGF2, *endothelial growth factor*) łańcucha TM. Następnie końską peroksydazą koniugowano z monoklonalnymi przeciwciałami rozpoznającymi dalsze fragmenty EGF5 i EGF6 łańcucha TM;
- vWF — Imubind vWF ELISA Kit. Kanapkowy test ELISA z użyciem poliklonalnych przeciwciał gęsi jako głównego przeciwciała;
- t-PA — Imubind t-PA ELISA Kit. W teście użyto poliklonalnych przeciwciał gęsi przeciwko ludzkiemu t-PA;
- PAI-1 — Imubind PAI-1 ELISA Kit. W teście użyto monoklonalnych przeciwciał myszy anty PAI-1 i enzymu peroksydazy.

Analiza statystyczna

Wyniki analizy statystycznej zostały przedstawione w tabelach w postaci procentowej (tab. 1, 2), w wartościach średnich (M) i odchylen standardowych (SD) oraz w medianach (Me) i w przedziale kwartylowym (Q1–Q3) (tab. 3, 4). Normalność rozkładu zmiennych zweryfikowano przy pomocy testu D’Agostino-Pearsona. Istotność różnic pomiędzy dwoma ilościowymi zmiennymi została zbadana przy pomocy nieparametrycznego testu Manna-Whitneya (w przypadku braku normalności) lub testu t-Studenta (przy rozkładzie normalnym). Liniową zależność pomiędzy zmiennymi ilościowymi oceniono za pomocą współczynnika korelacji Spearmana (rs). Wszystkie testy zostały wykonane na poziomie istotności $p < 0,05$. Analiza zmienności ilościowych została przeprowadzona przy pomocy nieparametrycznego testu Manna-Whitney, na przykład porównanie cukrzyca/bez cukrzycy, a w przypadku cukrzyca/brak cukrzycy/grupa referencyjna — testem Kruskala-Wallis. Analizy jakościowej dokonano przy pomocy testu chi kwadrat lub doskonałego testu Fischera.

Analiza statystyczna została wykonana przy pomocy pakietu statystycznego R w wersji dla Windows (The R Foundation for Statistical Computing Vienna,

Tabela 1. Dane demograficzne pacjentów z cukrzycą typu 2 (PAD + DM2) i bez cukrzycy w miażdżycy tętnic kończyn dolnych (PAD)

	PAD + DM2 n = 91		PAD n = 59		p	
	n	%	n	%		
Mężczyźni	54	59,3	37	62,7	0,809	
Kobiety	37	40,7	22	33,3		
Wiek (lata)	65,2 ± 9,0		66,2 ± 10,7		0,610	
BMI > 25 kg/m ²	72	79,1	39	67,1	0,271	
Nadciśnienie tętnicze	78	85,7	46	77,9	0,564	
Dyslipidemia	63	69,3	29	49,1	0,022	
ChNS + zawał	59	64,9	39	67,1	0,932	
Udar mózgu	9	9,1	8	13,5	0,614	
Palacze tytoniu	dawniej	76	85,4	46	77,9	0,834
	obecnie	19	22,9	18	30,5	0,1768

BMI (*body mass index*) — wskaźnik masy ciała; ChNS — choroba niedokrwienna serca; DM2 (*diabetes mellitus type 2*) — cukrzyca typu 2; p — istotność statystyczna; PAD (*peripheral arterial disease*) — miażdżycy tętnic kończyn dolnych

Tabela 2. Zmiany naczyniowe u pacjentów z cukrzycą typu 2 (PAD + DM2) i bez cukrzycy z miażdżycą tętnic kończyn dolnych (PAD)

	PAD + DM2 n = 91		PAD n = 59		p
	n	%	n	%	
Retinopatia	14	15,4	–	–	0,004
Nefropatia	15	16,3	4	6,8	0,155
Małe owrzodzenie stopy	11	12	7	11,8	0,795
PTA	8	9,8	5	8,4	0,912*
Implantacja stentów	28	30,7	20	34,0	
PTA i implantacja stentów	55	60,4	33	55,9	
Restenozy	21	23,1	17	28,8	0,53

*Test Kruskala-Wallis; DM2 (*diabetes mellitus type 2*) — cukrzyca typu 2; n — liczba; p — istotność statystyczna; PAD (*peripheral arterial disease*) — miażdżycy tętnic kończyn dolnych; PTA (*peripheral transluminal angioplasty*) — obwodowa wewnątrznacyniowa angioplastyka

Austria) oraz MedCalc dla Windows (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

Na przeprowadzenie badań wyraziła zgodę Komisja Bioetyczna przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym Nr KB/2/2008, zaś pacjenci wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniach.

Wyniki

U pacjentów z cukrzycą typu 2 i bez cukrzycy z PAD nie stwierdzono istotnych różnic wśród czynników ryzyka i w większości towarzyszących chorób, poza istotnie większą liczbą chorych z dyslipidemią w grupie z cukrzycą (p < 0,022) (tab. 1).

U chorych na cukrzycę typu 2 w porównaniu z chorymi bez cukrzycy z PAD częściej występowała retinopatia i niewydolność nerek, natomiast w obu grupach pacjentów podobna była liczba niewielkich owrzodzeń stóp (z białkiem C-reaktywnym < 10 mg/l) (tab. 2). Nie stwier-

dzono również istotnych preferencji w zastosowaniu różnych metod wewnątrznacyniowej rewaskularyzacji niedokrwiionych kończyn dolnych (PTA, stentowanie oraz PTA ze stentowaniem) u chorych z cukrzycą i bez cukrzycy. W okresie 12-miesięcznej obserwacji od cukrzycy nie zależała także liczba powstałych restenoz.

U pacjentów z PAD i cukrzycą typu 2 w porównaniu z chorymi z PAD bez cukrzycy istotnie wyższe były stężenia porannej glikemii i hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}, *glycated hemoglobin*) (p < 0,0001). Wskaźniki gospodarki lipidowej były natomiast prawie identyczne w obu badanych grupach pacjentów (tab. 3).

Wśród 6 badanych śródbłonkowych markerów hemostazy nie stwierdzono istotnych różnic między grupą pacjentów z cukrzycą typu 2 a chorymi bez cukrzycy z PAD. Jedynie stężenia TF, vWF i TM w obu grupach chorych różniły się istotnie od wyników grupy referencyjnej osób zdrowych (tab. 4).

Tabela 3. Stężenie glukozy, HbA_{1c} i frakcje lipidów u pacjentów z cukrzycą typu 2 (PAD + DM2) i bez cukrzycy z miażdżycą tętnic kończyn dolnych (PAD)

Badane parametry	PAD + DM2	PAD	p
	n = 91 M ± SD Zakres	n = 59 M ± SD Zakres	
Glikemia na czczo [mg/dl]	127,3 ± 52,3 55,0–330,0	91,3 ± 8,4 71,8–121,0	0,0001
HbA _{1c} (%)	7,0 ± 1,7 6,1–11,4	5,8 ± 0,4 4,4–6,0	0,0001
Cholesterol całkowity [mg/dl]	175,9 ± 34,3 84,0–275,0	177,0 ± 31,5 105,0–268,0	0,64
Cholesterol frakcji LDL [mg/dl]	97,8 ± 35,4 35,0–207,0	97,3 ± 30,5 47,4–190	0,95
Cholesterol frakcji HDL [mg/dl]	45,3 ± 14,5 24,0–119,0	46,3 ± 12,8 19,0–97,0	0,40
TG [mg/dl]	157,8 ± 106,5 51,0–793,0	138,1 ± 83,2 35,0–575,0	0,12

DM2 (*diabetes mellitus type 2*) — cukrzyca typu 2; HbA_{1c} (*glycated hemoglobin*) — hemoglobina glikowana; HDL (*high-density lipoprotein*) — lipoproteiny wysokiej gęstości; LDL (*low-density lipoprotein*) — lipoproteiny niskiej gęstości; M — średnia; p — istotność statystyczna; PAD (*peripheral arterial disease*) — miażdżycza tętnic kończyn dolnych; SD (*standard deviation*) — odchylenie standardowe; TG — triglicerydy

Tabela 4. Śródbłonkowe czynniki hemostazy u pacjentów z cukrzycą typu 2 (PAD + DM2) i bez cukrzycy z miażdżycą tętnic kończyn dolnych (PAD)

Badane czynniki	PAD + DM2	PAD	Grupa referencyjna	p
	M ± SD n = 91	M ± SD n = 59	M ± SD n = 53	
TF [pg/ml]	203 ± 137	179 ± 85	144 ± 71	0,05
TFPI [ng/ml]	59 ± 30	56 ± 26	58 ± 30	0,546
TM [ng/ml]	2,83 ± 1,40	2,96 ± 1,45	4,17 ± 1,89	0,0001
vWF [U/ml]	2,006 ± 0,798	2,224 ± 0,736	0,907 ± 0,332	0,0001
t-PA [ng/ml]	7,9 ± 4,3	10,1 ± 22,0 Me = 6,5 Q1 = 5,0 Q3 = 8,6	6,6 ± 2,6	0,318
PAI-1 [ng/ml]	34 ± 18	33 ± 17	33 ± 13	0,802

DM2 (*diabetes mellitus type 2*) — cukrzyca typu 2; M — średnia; Me — mediana; p — istotność statystyczna; PAD (*peripheral arterial disease*) — miażdżycza tętnic kończyn dolnych; PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor type 1*) — inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1; Q1–Q3 — przedział kwartylowy; SD (*standard deviation*) — odchylenie standardowe; TF (*tissue factor*) — czynnik tkankowy; TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) — inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez czynnik tkankowy; TM (*thrombomodulin*) — trombomodulina; t-PA (*tissue plasminogen activator*) — tkankowy aktywator plazminogenu; vWF (*von Willebrand factor*) — czynnik von Willebranda

Analizowano także stężenie śródbłonkowych czynników hemostazy w 3 grupach — w zależności od czasu rewaskularyzacji tętnic kończyn dolnych do momentu pobrania krwi do badań (do 3 miesięcy — 77 pacjentów, powyżej 3 do 6 miesięcy — 30 pacjentów i powyżej 6 do 18 miesięcy — 43 pacjentów). W badanych 3 grupach stężenia TFPI, t-PA, PAI-1 były podobne i nie różniły istotnie, natomiast stężenie vWF było we wszystkich grupach istotnie podwyższone w porównaniu z grupą referencyjną. Porównując grupę po niedawnej

rewaskularyzacji (do 3 miesięcy po zabiegu) do grupy po dawno przeprowadzonym zabiegu (powyżej 6 do 18 miesięcy po zabiegu), autorzy stwierdzili, iż stężenie TF było wyraźnie wyższe w tej ostatniej grupie o około 18% ($p < 0,02$), a TM niższe o około 20% ($p < 0,012$).

Dyskusja

W związku z przyjętym obecnie poglądem o dysfunkcji śródbłonka naczyń we wspólnej etiologii cukrzycy typu 2 i chorób sercowo-naczyniowych, autorzy

niniejszej pracy chcieli się przekonać, czy długotrwała cukrzyca współistniejąca z zaawansowaną PAD wpływa na zwiększone wydzielanie śródbłonkowych markerów hemostazy.

Wśród 150 pacjentów z zaawansowaną PAD po wewnątrznaczyniowej rewaskularyzacji u 91 osób rozpoznano cukrzycę typu 2, trwającą około $13,8 \pm 5,4$ roku po rozpoznaniu. Pacjenci z cukrzycą byli leczeni przede wszystkim preparatami metforminy (52 osoby), wyłącznie insulinę podawano 13 osobom, a leczenie skojarzone — 26 osobom. Pozostali chorzy z PAD, ale bez cukrzycy w liczbie 59 pacjentów stali się grupą kontrolną dla porównania z osobami chorymi na cukrzycę.

Z porównania pacjentów z cukrzycą i bez cukrzycy wynika, że w obu grupach występowały podobne czynniki ryzyka i choroby towarzyszące, tylko wśród pacjentów z cukrzycą istotnie większa była liczba chorych z dyslipidemią ($p < 0,02$). Cała grupa pacjentów z PAD zarówno z cukrzycą, jak i bez cukrzycy była leczona preparatami kwasu acetylosalicylowego (75–150 mg) i innymi lekami antyagregacyjnymi. Ponadto pacjenci byli leczeni intensywnie lekami sercowo-naczyniowymi, hipotensyjnymi, statynami i lekami moczopędnymi. Jak wynika z tabeli 2, u chorych na cukrzycę częściej występowały retinopatia i nefropatia. Cukrzyca nie miała natomiast istotnego wpływu na owrzodzenia stóp i wybór zastosowanej metody wewnątrznaczyniowej rewaskularyzacji. W piśmiennictwie spotyka się niewiele opisów pacjentów z tak zaawansowaną miażdżycą tętnic. Obserwacje takie są raczej przeprowadzane u osób z mniej zaawansowaną miażdżycą, najczęściej u pacjentów z objawami chromania przestankowego [10, 11]. Cukrzyca typu 2 stanowi duże ryzyko wystąpienia incydentów wieńcowych i zgonów z powodu chorób sercowo-naczyniowych w porównaniu z pacjentami bez cukrzycy [10]. Zjawisko to wyjaśnia się dysregulacją komórek śródbłonka i czynników biorących udział w procesie krzepnięcia i aktywacji płytek krwi [12, 13]. Zarówno insulinooporność, jak i hiperglikemia uczestniczą w patogenezie stanu prozakrzepowego [10]. Badane przez autorów niniejszej pracy czynniki śródbłonkowe hemostazy zostały uznane za markery uszkodzenia śródbłonka [14]. Producenci testów nie podają obecnie zakresu norm dla wymienionych czynników hemostazy, ale zalecają tworzenie własnych grup porównawczych, dlatego w przedstawionym badaniu przeprowadzono również pomiary w grupie osób zdrowych. Jednym z pierwszych ważnych badanych i opisanych przez autorów tej pracy markerów był TF niezbędny w procesie hemostazy [15–18]. W procesie krzepnięcia uwalniany TF prowadzi do generacji trombiny i przekształcenia fibrynogenu w fibrynę. W niniejszych badaniach stężenia

TF u pacjentów z cukrzycą były podobne jak u chorych bez cukrzycy, jednak istotnie wyższe w porównaniu z grupą referencyjną osób zdrowych ($p < 0,05$). Nie można jednak w pełni wykluczyć niewielkiej zależności TF od wieku ($r_s = 0,175$, $p < 0,035$). Boden i Rao [16] wykazali wpływ hiperglikemii i hiperinsulinemii na wydzielanie TF. Cukrzyca typu 2 prowadzi także do zwiększonej aktywności prokoagulacyjnej TF i generacji trombiny. Podobnie zapalenie indukuje ekspresję TF w naczyniowym śródbłonku chorych na cukrzycę, prowadząc do aterotrombozy [15]. Inhibitor drogi krzepnięcia aktywowanej przez TF krąży w ludzkim osoczu w kompleksach z lipoproteinami w cząsteczkach o różnej wielkości. Hamuje TF, kompleks TF/VIII a czynnik Xa (ok. 10% TFPI zawierają płytki krwi). Heparyna wzmacnia jego hamowanie [11, 18–20]. Nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach TFPI u analizowanych pacjentów z cukrzycą, bez cukrzycy oraz w grupie referencyjnej osób zdrowych, co potwierdza brak wpływu wieku na stężenie TFPI w cukrzycy. Radziwon i wsp. [11] opisali bardzo wysokie stężenia TFPI u nieoperowanych pacjentów z PAD i chromaniem przestankowym. Trombomodulina jest komórkowym receptorem dla trombiny, hamując jej wielostronne działanie.

U badanych w niniejszej pracy pacjentów z cukrzycą i bez cukrzycy z zaawansowaną PAD poziomy TM były prawie identyczne, jednak istotnie niższe w porównaniu z grupą referencyjną ($p < 0,0001$). Leurs i wsp. [19] obserwowali podwyższone stężenie TFPI i TM u starszych nieoperowanych pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi i współistniejącą cukrzycą typu 2. Niższe stężenia TM w PAD w porównaniu z grupą osób zdrowych mogły być spowodowane jej zużyciem w procesie hamowania przerostu błony wewnętrznej po uszkodzeniu ściany tętnicy przez wewnątrznaczyniową rewaskularyzację. Li i wsp. [21] wykazali, że rekombinowana ludzka TM hamuje proliferację komórek mięśni gładkich *in vitro* i *in vivo* u królików.

Według dawniej przyjętych norm laboratoryjnych stężenia TM u przedstawionych pacjentów mieściły się w granicach normy. Stężenie TM może być również obniżone przez czynnik martwiczy guza (TNF, *tumor necrosis factor*), interleukinę 1 (IL-1) i endotoksyny [21]. Opisywani pacjenci z cukrzycą i bez cukrzycy mieli podobne, ale podwyższone wobec grupy osób zdrowych stężenia vWF. Przedstawione obserwacje o podwyższonych poziomach vWF wyrażanych w jednostkach (U) u pacjentów z miażdżycą tętnic kończyn dolnych zgadzają się z piśmiennictwem, chociaż często są oznaczane w procentach (np. Paulińska i wsp. [22]). Tsakiris i wsp. [23] obserwowali pewien trend do podwyższania się stężenia vWF u pacjentów, u których następnie występowały restenozy. Stężenie t-PA badane

przez autorów niniejszej pracy w cukrzycy nie różniło się istotnie w porównaniu z pacjentami bez cukrzycy oraz grupą osób zdrowych. Tkankowy aktywator plazminogenu słabo, ale istotnie statystycznie korelował z wiekiem pacjentów ($r_s = 0,200$, $p < 0,016$). Lemkes i wsp. [24] wykazali, że insulinooporność zwiększa stężenie PAI-1 i fibrynogenu, a obniża poziom t-PA. Najwyższe stężenie PAI-1 obserwowano u pacjentów z niewyrównaną cukrzycą. Takich pacjentów wśród przedstawionych w niniejszej pracy chorych nie było. Leczenie lekami obniżającymi glikemię, takimi jak np. metformina, która znacznie obniża PAI-1 [24], w tej badanej grupie chorych z cukrzycą nie miało wpływu na ten parametr. Nie stwierdzano również istotnych różnic w stężeniach PAI-1 u pacjentów z cukrzycą, bez cukrzycy i w grupie osób zdrowych, co jest sprzeczne z niektórymi doniesieniami o podwyższonych poziomach PAI-1 w miażdżycy i cukrzycy z poprzednich lat (np. Radziwon i wsp. [11]).

Na podstawie wciąż prowadzonych badań wydaje się, że stres oksydacyjny odgrywa ważną rolę w rozwoju powikłań mikro- i makroangiopatii cukrzycowej [1, 4]. Nagromadzenie wolnych rodników w układzie naczyniowym chorych na cukrzycę jest odpowiedzialne za aktywację nieprawidłowych szlaków biochemicznych, zmiany profilu ekspresji mikroRNA. Częsteczki te są nowo zdefiniowaną klasą małych, niekodowanych mikrocząsteczek (MPs, *microparticles*) zawierających TF. Uwalniane MPs i powstanie epigenetycznych zmian przyczyniają się do zapalenia naczyń i generacji reaktywnych tlenowych rodników [4, 10, 25, 26].

Zgodnie z przedstawionymi wynikami autorzy stwierdzili wyraźny wzrost stężenia czynnika tkankowego wraz ze spadkiem poziomu TM w analizowanych grupach w zależności od czasu po przeprowadzonym zabiegu rewaskularyzacji. Jednak należy podkreślić, iż badane stężenia TF i TM były w granicach szerokich norm laboratoryjnych. Stężenia czynników TFPI, t-PA i PAI-1 były natomiast podobne, statystycznie nieistotne, przy porównaniu grup o różnym czasie od przebytego zabiegu. Obserwowane zmiany w zakresie stężenia TF i TM mogą być wyrazem toczącego się nadal procesu aterosklerozy.

Wnioski

Z przeprowadzonych badań wynika, że długotrwała cukrzyca typu 2 u pacjentów z bardzo zaawansowaną miażdżycą tętnic kończyn dolnych nie zwiększała uwalniania śródbłonkowych markerów hemostazy. Podwyższone stężenia TF i vWF są związane z uszkodzeniem ściany naczyniowej przez toczący się proces miażdżycowy i ewentualnie wewnątrznaczyniową rewaskularyzację, a nie przez współistniejącą cukrzycę.

Prawdopodobnie dysfunkcja śródbłonka i zwiększone uwalnianie czynników śródbłonkowych zachodzi we wczesnych okresach insulinooporności, hiperglikemii i hiperinsulinemii. Prawdopodobny wpływ na uzyskane wyniki może mieć także zastosowane różnorodne, intensywne leczenie, szczególnie przeciwcukrzycowe [27, 28], a także statynami [29].

Oświadczenie

Publikacja jest częścią projektu „WroVasc — Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej” współfinansowanego przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego „Innowacyjna Gospodarka” na lata 2007–2013, realizowanego w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu, Ośrodku Badawczo-Rozwojowym.

PIŚMIENNICTWO

1. Wild S., Rogalic G., Green A., Sicree R., King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27: 1047–1053.
2. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26 (supl. 1): 55–520.
3. Creager M.A., Lüscher T.F., Cosentino F., Beckman J.A. Diabetes and vascular disease: Pathophysiology, clinical consequences and medical therapy. Part I. *Circulation* 2003; 108: 1527–1532.
4. Paneni F., Beckman J.A., Creager M.A., Cosentino F. Diabetes and vascular disease: Pathophysiology, clinical consequences and medical therapy. *Eur. Heart J.* 2013; 34: 2436–2443.
5. Shulman G.L. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2000; 106: 171–176.
6. Cavalli-Weder C., Babians-Brunner A. i wsp. Effects of gevokizumab on glycemia and inflammatory markers in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2012; 35: 1654–1662.
7. Kotschy D., Kotschy M., Masłowski L. i wsp. Inflammatory markers in peripheral arterial disease in patients after endovascular revascularization with new restenosis. *Acta Angiol.* 2014; 20: 47–59.
8. Cardillo C., Campia U., Bryant M.D., Panza J.A. Increased activity of endogenous endothelin in patients with type II diabetes mellitus. *Circulation* 2002; 106: 1783–1787.
9. Hink U., Li H., Molinou H. i wsp. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ. Res.* 2001; 88: E14–E22.
10. Beckman J.A., Paneni F., Cosentino F., Creager M.A. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences and medical therapy. Part II. *Eur. Heart J.* 2013; 34: 2445–2452.
11. Radziwon P., Bielawiec M., Kłoczko J., Giedrojć J., Mazgajska K., Galar M. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in patients with occlusive arterial disease in consideration with risk factors and conservative treatment in the disease. *Acta Angiol.* 2001; 7: 43–45.
12. Grant P.J. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J. Intern. Med.* 2007; 262: 157–172.
13. Vazzana N., Ranalli P., Cuccurullo C., Davi G. Diabetes mellitus and thrombosis. *Thromb. Res.* 2012; 129: 371–377.
14. Meigs J.B., Donnell Ch.J., Tofler G.H. i wsp. Hemostatic markers of endothelial dysfunction and risk of incident type 2 diabetes. *Diabetes* 2006; 55: 530–537.
15. Vaidyula V.R., Rao A.K., Mozzol M., Homko C., Cheung P., Boden G. Effects of hyperglycemia and hyperinsulinemia on circulating tissue factor procoagulant activity and platelet CD 40 ligand. *Diabetes* 2006; 55: 202–208.
16. Boden G., Rao A.K. Effects of hyperglycemia and higher insulinemia on the tissue factor pathway of blood coagulation. *Curr. Diab. Rep.* 2007; 7: 223–227.

17. Steffel J., Lüscher T.F., Tanner F.C. Tissue factor in cardiovascular diseases. *Circulation* 2006; 113: 722–731.
18. Kotschy M., Kotschy D., Witkiewicz W. Rola czynnika tkankowego i jego inhibitora w procesie krzepnięcia krwi oraz w powikłaniach zakrzepowych. *Kardiol. Pol.* 2010; 10: 1158–1162.
19. Leurs P.B., Stolk R.P., Hamulyak K., van Oerle R., Grobbee D.F., Wolffenbuttel B.H. Tissue factor pathway inhibitor and other endothelium dependent hemostatic factors in elderly individuals with normal or impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25: 1340–1345.
20. Lwaleed B.A., Bass P.S. Tissue factor pathway inhibitor structure biology and involvement in disease. *J. Path.* 2006; 208: 327–339.
21. Li J.M., Singh M.J., Itani M. i wsp. Recombinant human thrombomodulin inhibits arterial neointimal hyperplasia after balloon injury. *J. Vasc. Surg.* 2004; 39: 1074–1083.
22. Paulińska P., Spiel A., Jilma B. Role of von Willebrand factor in vascular disease. *Hämostaseologie* 2009; 29: 32–38.
23. Tsakiris D.A., Tschöpl M., Jäger K., Haefeli W.F., Wolf F., Marbet G.A. Circulating cell adhesion molecules and endothelial markers before and after transluminal angioplasty in peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis* 1999; 142: 193–200.
24. Lemkes B.A., Hermanides J., Devries J.H., Hollerman T., Meijers J.C., Hoekstra J.B. Hyperglycemia a prothrombotic factor? *Thromb. Haemost.* 2010; 8: 1663–1669.
25. Naudi A., Jove M., Ayala V. i wsp. Cellular dysfunction in diabetes as maladaptive response to mitochondrial oxidative stress. *Exp. Diabetes Res.* 2012; 2012: 696215.
26. Inguchi T., Li P., Umera F. i wsp. High glucose and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000; 49: 1939–1945.
27. Mather K.J., Verma S., Andreson T.J. Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Kardiol.* 2001; 37: 1344–1350.
28. Pistrosch F., Passauer J., Fischer S., Fucker K., Hanefeld M., Gross P. In type 2 diabetes rosiglitazone therapy for insulin resistance ameliorates endothelial dysfunction in independent of glucose control. *Diabetes Care* 2004; 27: 484–490.
29. Keech A., Colquhoun O., Best J. i wsp. Secondary prevention of cardiovascular events with long-term pravastatin in patients with diabetes or impaired fasting glucose; results from the LIPID trial. *Diabetes Care* 2003; 26: 2713–2721.