

## Ocena stężenia wybranych chemokin (CXCL1/GRO $\alpha$ oraz CXCL8/IL8) w surowicy pacjentów z cukrzycą typu 1

### *Serum concentrations of selected chemokines (CXCL1/GRO $\alpha$ and CXCL8/IL8) in patients with type 1 diabetes*

<sup>1</sup>Katarzyna Zorena, <sup>2</sup>Olga Jachimowicz-Duda, <sup>3</sup>Dorota Raczyńska, <sup>3</sup>Krystyna Raczyńska, <sup>4</sup>Małgorzata Myśliwiec

<sup>1</sup>Zakład Endokrynologii Klinicznej i Doświadczalnej, Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej, Gdański Uniwersytet Medyczny; <sup>2</sup>Specjalistyczna Przychodnia Lekarska „Śródmieście”, Poradnia Cukrzycowa w Gdyni; <sup>3</sup>Katedra i Klinika Okulistyki, Gdański Uniwersytet Medyczny; <sup>4</sup>Katedra i Klinika Pediatrii, Diabetologii i Endokrynologii, Gdański Uniwersytet Medyczny

**Adres do korespondencji:** Katarzyna Zorena, Zakład Endokrynologii Klinicznej i Doświadczalnej, Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej GUMed, ul. Powstania Styczniowego 9b, 81-519 Gdynia, tel. 58 3491947/49, e-mail: kzorena@gumed.edu.pl

**Słowa kluczowe:** cukrzyca typu 1, chemokiny CXCL1/GRO $\alpha$  and CXCL8/IL8, cukrzycowa retinopatia  
**Key words:** type 1 diabetes mellitus, CXCL1/GRO $\alpha$  and CXCL8/IL8 chemokines, diabetic retinopathy

#### STRESZCZENIE/ABSTRACT

**Celem pracy** była ocena stężeń wybranych chemokin (CXCL1/GRO $\alpha$ ) oraz interleukiny 8 (CXCL8/IL8) w surowicy pacjentów z cukrzycą typu 1 (T1DM). **Pacjenci i metody.** Badania przeprowadzono w grupie 59 pacjentów z T1DM, których podzielono na trzy grupy. W pierwszej grupie było 23 pacjentów z proliferacyjną retinopatią cukrzycową (PDR), w drugiej grupie – 15 młodocianych pacjentów z T1DM oraz nieproliferacyjną retinopatią cukrzycową (NPDR), w trzeciej grupie – 21 pacjentów z T1DM, lecz bez objawów retinopatii cukrzycowej. U wszystkich pacjentów z T1DM wykonano badania biochemiczne, całodobowy pomiar ciśnienia tętniczego, badania okulistyczne oraz oznaczono stężenia chemokin CXCL1/GRO $\alpha$  oraz CXCL8/IL8 w surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną (ELISA). **Wyniki.** U pacjentów z T1DM oraz PDR wykryto znamienne wyższe stężenie CXCL8/IL8 w surowicy w porównaniu z grupą pacjentów z T1DM oraz NPDR jak też w porównaniu z grupą pacjentów z T1DM, ale bez objawów retinopatii cukrzycowej (226,9 $\pm$ 58,3 vs 142,6 $\pm$ 32,2pg/ml vs 89,3 $\pm$ 15,9). Natomiast nie wykryto różnic znamienne statystycznych porównując stężenia CXCL-1/Gro- $\alpha$  w surowicy w grupie pacjentów z T1DM i PDR z grupą pacjentów z T1DM oraz NPDR, a także w porównaniu z grupą pacjentów z T1DM bez retinopatii cukrzycowej (69 $\pm$ 17 vs 53 $\pm$ 12pg/ml vs 47 $\pm$ 13). Analiza modelu wielokrotnej regresji krokowej wykazała, że czas trwania cukrzycy, HbA1c oraz białko CRP są niezależnymi czynnikami wpływającymi na poziom CXCL8/IL8 u pacjentów z retinopatią cukrzycową. Współczynnik determinacji dla tego modelu określono na poziomie R<sup>2</sup>=26%. Ponadto na podstawie analizy krzywych Receiver Operating Characteristic (ROC) dla surowiczego stężenia CXCL8/IL8 określono próg referencyjny AUC<sub>ROC</sub> na poziomie 218 pg/ml. **Wnioski.** Nasze wyniki badań wskazują na udział w reakcji zapalnej chemokiny CXCL8/IL8, lecz nie CXCL1/GRO- $\alpha$  u pacjentów z T1DM. Sugerujemy, że oprócz badania

białka CRP dodatkowym wskaźnikiem prognostycznym w rozwoju retinopatii cukrzycowej może być chemokina CXCL8/IL8. Potrzebne są dalsze badania, aby dogłębnie wykazać rolę chemokin zapalnych u pacjentów z T1DM. Endokrynol. Ped. 13/2014;1(46):9-16.

The aim of the study was to assess selected growth-related oncogene protein- $\alpha$  (CXCL1/GRO $\alpha$ ) and interleukin 8 (CXCL8/IL8) chemokines in patients with diabetes type 1 (T1DM). **Patients and methods.** The study was performed in a group of 59 patients with T1DM. Patients were divided into three groups. The first group was 23 patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR) second group was 15 juvenile patients with T1DM and non proliferative diabetic retinopathy (NPDR), and 21 patients with diagnosed T1DM but without symptoms of diabetic retinopathy. In all participants we've done biochemical tests, 24-hour BP monitoring and ophthalmological examination. Moreover all patients have had their CXCL1/GRO $\alpha$  and CXCL8/IL8 concentrations measured by the ELISA immunoassay. **Results.** Patients with T1DM and PDR had significantly higher concentration of CXCL8/IL8 in serum compared to the group of patients with T1DM and NPDR as well as compared to the group of patients with T1DM but without symptoms of diabetic retinopathy ( $226.9 \pm 58.3$  vs  $142.6 \pm 32.2$  pg/ml vs  $89.3 \pm 15.9$ ) respectively. Whereas there were no statistically significant differences detected in comparing concentration of CXCL-1/Gro- $\alpha$  in serum in the group of patients with T1DM and PDR with the group of patients with T1DM and NPDR as well as with the group of patients with T1DM but without diabetic retinopathy ( $69 \pm 17$  vs  $53 \pm 12$  pg/ml vs  $47 \pm 13$ ). The follow up study using the model of multiple stepwise regression showed that the duration of diabetes, HbA1c and CRP protein are independent factors affecting the CXCL8/IL8 level in patients with diabetic retinopathy. The coefficient of determination for this model was defined at a level of  $R^2 = 26\%$ . Also, on the basis of the curve analysis Receiver Operating Characteristic (ROC) for serum concentration CXCL8/IL8 specified the reference threshold  $AUC_{ROC}$  at a level of 218 pg/ml. **Conclusion.** The results of our studies showed the contribution of CXCL8/IL8 chemokine to inflammation in patients with diabetic retinopathy. We suggest that the studied CXCL8/IL8 chemokine, besides CRP protein, may be a supplementary diagnostic and prediction method in patients with diabetes. *Pediatr. Endocrinol.* 13/2014;1(46):9-16.

## Wstęp

Głównym problemem pacjentów chorujących na cukrzycę typu 1 (T1DM) jest rozwój przewlekłych powikłań naczyniowych związanych z mikro- oraz makrokrążeniem [1–2]. Przewlekłe powikłania naczyniowe, zarówno nefropatia, retinopatia, jak też neuropatia cukrzycowa, prowadzą do pogorszenia jakości życia jak też są główną przyczyną inwalidztwa tych chorych [3]. Retinopatia cukrzycowa (DR) stała się najczęstszą przyczyną ślepoty czy utraty ostrości wzroku u pacjentów w wieku produkcyjnym i jej występowanie wykazuje na ciągły wzrost [3–4]. Zmiany na dnie oka jawne klinicznie występują również u młodych pacjentów z T1DM [5–6]. W badaniach z Oxford Regional Prospective Study (ORPS) wykazano, że u dzieci i młodzieży z T1DM częstość późnych powikłań naczyniowych była wyższa niż u dorosłych po podobnym czasie trwania cukrzycy oraz z porównywalnymi średnimi poziomami glikemii [6]. Autorzy wykryli, że aż 25% młodocianych rozwija retinopatię cukrzycową już po 5 latach trwania T1DM, zaś a po 10 latach 60% chorych i 80% po 15 latach trwania choroby [6]. Mimo prowadzonych licznych prac badawczych brakuje jednoznacznych poglądów określających przyczyny i częstość występowania retinopatii

u pacjentów chorujących na T1DM [7–8]. Badania ostatnich lat dowodzą, że przyczyną retinopatii cukrzycowej jest długotrwałe podwyższone stężenie glukozy we krwi, niedotlenienie oraz zaburzenie równowagi stężeń czynników angiogennych, doprowadzające do neowaskularyzacji siatkówki [8–9]. Do najlepiej scharakteryzowanych substancji stymulujących angiogenezę należą czynniki wzrostu, w tym naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) oraz interleukina-8 (CXCL8/IL8), białko o właściwościach chemokatycznych [8–10].

Ponad 20 lat temu chemokiny zostały opisane jako mediatory zapalne produkowane w czasie infekcji lub podczas urazu w odpowiedzi na bodźce prozapalne. Jednak w toku dalszych badań odkryto, że chemokiny uczestniczą także w rekrutacji i aktywacji leukocytów zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną i proces gojenia się ran [11]. Chociaż zdolność do wywołania chemotaksji przez chemokiny uważa się za ich główną cechę, to ich fizjologiczna rola jest bardziej skomplikowana. Wykazano, że chemokiny biorą udział w migracji limfocytów podczas hematopoezy, reakcji z antygenami we wtórnych narządach limfatycznych jak też w nadzorze immunologicznym [11–13]. Oprócz roli chemotaktycznej chemokiny uczestniczą także w patogenezie większości chorób, w których do-

chodzi do aktywacji i akumulacji leukocytów w tkankach [14–18]. Zmiany w ekspresji chemokin i ich receptorów stwierdzono w reumatoidalnym zapaleniu stawów, stwardnieniu rozsianym, miażdżycy oraz w T1DM jak też w cukrzycy typu 2 (T2DM) [15–17]. We wcześniejszych naszych badaniach wykazaliśmy podwyższone stężenie białka chemotaktycznego dla monocytów (CCL2/MPC-1), natomiast obniżone białko indukowane przez interferon (CXCL/IP-10) w surowicy krwi u pacjentów z T1DM oraz mikroangiopatią [18]. Obecnie celem pracy była ocena surowicznych stężeń wybranych chemokin zapalnych: CXCL1/GRO $\alpha$  oraz CXCL8/IL8 u chorych z T1DM oraz retinopatią cukrzycową. Uważamy, że identyfikacja oraz wartość graniczna markerów zapalnych może ułatwić prognozowanie rozwoju retinopatii cukrzycowej u pacjentów z T1DM.

## Materiał i metody

Badania przeprowadzono w grupie 59 chorych z T1DM. Badanych pacjentów podzielono na trzy grupy w zależności od stopnia zaawansowania retinopatii cukrzycowej. W pierwszej grupie znalazło

się 23 pacjentów z proliferacyjną retinopatią cukrzycową (PDR) w wieku  $55,0 \pm 4,7$  lat w drugiej grupie było 15 młodocianych pacjentów z T1DM oraz (NPDR) w wieku  $19,0 \pm 3,5$  lat natomiast w trzeciej grupie 21 pacjentów T1DM lecz bez objawów retinopatii cukrzycowej wieku  $16 \pm 3,5$  lat (tab. I). T1DM została rozpoznana na podstawie stanowiska Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego zgodnego z wytycznymi American Diabetes Association [19–20]. Wszyscy pacjenci z T1DM byli leczeni insuliną. Stopień wyrównania metabolicznego cukrzycy oceniono na podstawie stężenia hemoglobiny glikowanej (HbA1c) oznaczonej w surowicy metodą immunoturbidymetryczną przy użyciu Unimate 3 set (Hoffmann-La Roche AG, Basel, Szwajcaria). Poziom wysoko czułego białka C-reaktywnego (hsCRP) oznaczono testem ELISA (hsCRP firmy Dade Behring, USA). U wszystkich pacjentów oceniono dobowe wydalanie albumin w moczu metodą immunoturbidymetryczną przy użyciu testu Tina-quant® (Boehringer Mannheim GmbH, Germany). Badanie dna oka przeprowadzono po podaniu kropli 1% Sol. Tropicaid, soczewką +90 D (firmy Okular Instruments, USA). Oceny przedniego odcinka gałki ocznej dokonano lampą

**Tabela 1.** Charakterystyka kliniczna pacjentów z cukrzycą typu 1  
**Table 1.** Clinical characteristics of patients with type 1 diabetes

Parametry kliniczne	Pacjenci z cukrzycą typu 1 oraz z proliferacyjną retinopatią (PDR)	Pacjenci z cukrzycą typu 1 oraz z nieproliferacyjną retinopatią (NPDR)	Pacjenci z cukrzycą typu 1 oraz bez retinopatii cukrzycowej	Znamiennosc statystyczna
Wiek (lat)	$55,0 \pm 4,7$	$19,0 \pm 3,5$	$16 \pm 3,5$	$P = 0,001 \dagger$ $P = 0,02 \dagger \dagger$
Czas trwania cukrzycy (lat)	$21,3 \pm 6,5$	$11,8 \pm 2,6$	$7,3 \pm 2,3$	$P = 0,001 \dagger$ $P = 0,03 \dagger \dagger$
HbA1c(%)	$9,05 \pm 1,95$	$8,06 \pm 1,62$	$7,53 \pm 1,24$	$P = 0,03 \dagger$ $P = 0,02 \dagger \dagger$
hsCRP (mg/L)	$3,6 \pm 1,8$	$2,4 \pm 1,2$	$1,7 \pm 0,9$	$P = 0,04 \dagger$ $P = 0,009 \dagger \dagger$
Albuminy z dobowej zbiórki moczu (mg/24h)	$44,6 \pm 28,0$	$23,5 \pm 21,2$	$15,8 \pm 10,5$	$P = 0,04 \dagger$ $P = 0,02 \dagger \dagger$
Ciśnienie skurczowe krwi (mm/Hg)	$145 \pm 12$	$120 \pm 10$	$115 \pm 11$	$P = 0,04 \dagger$ $P = 0,03 \dagger \dagger$
Ciśnienie rozkurczowe krwi (mm/Hg)	$95 \pm 12$	$75 \pm 11$	$70 \pm 9$	$P = 0,03 \dagger$ $P = 0,04 \dagger \dagger$

Wyniki przedstawione jako  $\pm$  SD, znamiennosc ( $p < 0,05$ );  $\dagger$  porównanie grupy pacjentów z T1DM oraz PDR z grupą z T1DM oraz NPDR;  $\dagger \dagger$  porównanie grupy pacjentów z T1DM oraz PDR z grupą z T1DM bez retinopatii cukrzycowej

szczelinową (Topcon SL-8Z, Japonia). U pacjentów chorujących na cukrzycę typu 1 dłużej niż 5 lat oraz po uprzednim badaniu dna oka wykonano angiografię fluoresceinową (FL-A) kamerą cyfrową Topcon Imagenet 2000 (Japonia). Analizę obrazu dna badanych oczu przeprowadzono według obowiązującej klasyfikacji [21].

Stężenia chemokin CXCL1/GRO $\alpha$  oraz CXCL8/IL8 w surowicy krwi pacjentów z T1DM oznaczono metodą immunoenzymatyczną ELISA, przy zastosowaniu zestawów Human Quantikine R&D; Minneapolis, MN, USA według instrukcji podanej przez producenta. Wyniki badań chemokin zostały zamieszczone w tabeli II.

Na realizację badań będących przedmiotem pracy uzyskano zgodę pacjentów, rodziców i/lub opiekunów jak też Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym.

#### **Analiza statystyczna**

Obliczenia statystyczne zostały przeprowadzone przy użyciu pakietu statystycznego StatSoft, Inc. (2010). STATISTICA (data analysis software system), version 10.0. www.statsoft.com. Do sprawdzenia, czy zmienne ilościowe pochodziły z populacji o rozkładzie normalnym, posłużono się testem W Shapiro-Wilka. Istotność różnic pomiędzy grupami sprawdzono testem ANOVA lub Kruskala-Wallisa. W celu stwierdzenia powiązania siły oraz kierunku między dwiema zmiennymi zastosowano analizę korelacji Pearsona lub Spearmana. Do analizy wpływu kilku zmiennych niezależnych na zmienną zależną typu mierzalnego posłużono się analizą regresji wielorakiej. We wszystkich obliczeniach za poziom istotności przyjęto  $p < 0,05$ . Do

oceny trafności testu, czyli zdolności do mierzenia danej cechy, wykorzystano dwie miary oceny trafności testu: czułość oraz swoistość. Do wyznaczenia wartości progowej w sytuacji, gdy wyniki testów mierzone są na skali ciągłej zastosowano wykres krzywej ROC (Receiver Operating Curve), gdzie na osi rzędnych podana jest czułość, a na osi odciętych 1 – swoistość [22]. Maksymalne pole powierzchni pod krzywą Area under Curve (AUC) przybierające wartości od 0 do 1 jest parametrem określającym moc dyskryminacyjną testu, a wyniki zaprezentowano jako średnią (95% CI).

## **Wyniki**

### **Kliniczna i biochemiczna charakterystyka badanych grup**

Przebadano 23 pacjentów z proliferacyjną retinopatią cukrzycową (PDR) w wieku  $55,0 \pm 4,7$  lat, 15 młodocianych pacjentów z T1DM oraz NPDR w wieku  $19,0 \pm 3,5$  lat, oraz 21 pacjentów z rozpoznaną T1DM, lecz bez objawów retinopatii cukrzycowej, w wieku  $16 \pm 3,5$  lat. Badani pacjenci z T1DM oraz PDR cechowali się statystycznie znaczącym dłuższym czasem trwania choroby, wyższym poziomem HbA<sub>1c</sub>, CRP, wyższym dobowym wydalaniem albumin w moczu oraz wyższym ciśnieniem skurczowym i rozkurczowym w porównaniu do grupy pacjentów z T1DM oraz NPDR jak też w porównaniu do grupy pacjentów z T1DM, ale bez objawów retinopatii cukrzycowej (Tab I).

### **Surowiczy poziom CXCL8/IL8 oraz CXCL-1/Gro- $\alpha$ u pacjentów z T1DM**

Poziom CXCL8/IL8 w surowicy krwi był statystycznie znacząco wyższy u pacjentów z T1DM

**Tabela II.** Stężenie chemokin w surowicy u pacjentów z cukrzycą typu 1

**Table II.** The concentration of chemokines in the serum of patients with type 1 diabetes

Parametry kliniczne	Pacjenci z cukrzycą typu 1 oraz z proliferacyjną retinopatią (PDR)	Pacjenci z cukrzycą typu 1 oraz z nieproliferacyjną retinopatią (NPDR)	Pacjenci z cukrzycą typu 1 oraz bez retinopatii cukrzycowej	Znamiennność statystyczna
CXCL8 (IL-8) pg/ml	$226,9 \pm 58,3$	$142,6 \pm 32,2$	$89,7 \pm 15,9$	$P = 0,04^\dagger$ $P = 0,02^{\dagger\dagger}$
CXCL1 (GRO $\alpha$ ) pg/ml	$69 \pm 17$	$53 \pm 12$	$47 \pm 13$	$P = NS^\dagger$ $P = NS^{\dagger\dagger}$

Wyniki przedstawione jako  $\pm$  SD, znamienność ( $p < 0,05$ );  $\dagger$  porównanie grupy pacjentów z T1DM oraz PDR z grupą z T1DM oraz NPDR;  $\dagger\dagger$  porównanie grupy pacjentów z T1DM oraz PDR z grupą z T1DM bez retinopatii cukrzycowej



oraz PDR w porównaniu z grupą pacjentów z T1DM oraz NPDR jak też w porównaniu z grupą pacjentów z T1DM, lecz bez cukrzycowej retinopatii (odpowiednio: 226,9 $\pm$ 58,3 vs 142,6 $\pm$ 32,2pg/ml vs 89,3 $\pm$ 15,9). Natomiast nie wykryto różnic statystycznie porównując surowicze stężenie CXCL-1/Gro- $\alpha$  w grupie pacjentów z T1DM oraz PDR z grupą pacjentów z T1DM oraz NPDR jak też w porównaniu z grupą pacjentów z T1DM bez retinopatii cukrzycowej (odpowiednio: 69 $\pm$ 17 vs 53 $\pm$ 12pg/ml vs 47 $\pm$ 13) (tab. II).

#### **Korelacja chemokiny CXCL8/IL8 z badanymi parametrami klinicznymi u pacjentów DR**

Analiza jednoczynnikowa wykazała statystycznie znamienne dodatnią korelację pomiędzy poziomem CXCL8/IL8 a czasem trwania choroby (p=0,009), poziomem HbA<sub>1c</sub> (p=0,04) poziomem białka CRP (p=0,002) oraz poziomem wydalanego albumin z dobowej zbiórki moczu (p=0,003) (tab. III).

#### **Regresja wielokrotna**

W dalszym etapie badań poprzez zastosowanie modelu wielokrotnej regresji krokowej wykazano że czas trwania cukrzycy (B=1480,91 p=0,02), HbA<sub>1c</sub> (B=17,69 p=0,006) oraz białko CRP (B=4,607 p=0,009) są niezależnymi czynnikami wpływającymi na poziom CXCL8/IL8. Współczynnik determinacji dla tego modelu określono na poziomie R<sup>2</sup>=26%.

#### **Wartość graniczna surowiczego stężenia CXCL8/IL8**

W celu określenia wartości granicznych wybranych czynników zapalnych w przewidywaniu ryzyka rozwoju retinopatii pacjentów z T1DM zastosowano analizę ROCAUC. Z badanych czynników zapalnych dla białka CXCL8/IL8 wykazano, że pole pod krzywą AUC<sub>ROC</sub> wynosiło 0,761, a jego wartość populacyjna mieściła się w przedziale 0,635–0,887. Czulość wynosiła 60,9%, a swoistość 87,1%. Wartość graniczna dla surowiczego poziomu CXCL8/IL8 określono na poziomie 218 pg/ml (ryc. 1).

#### **Dyskusja**

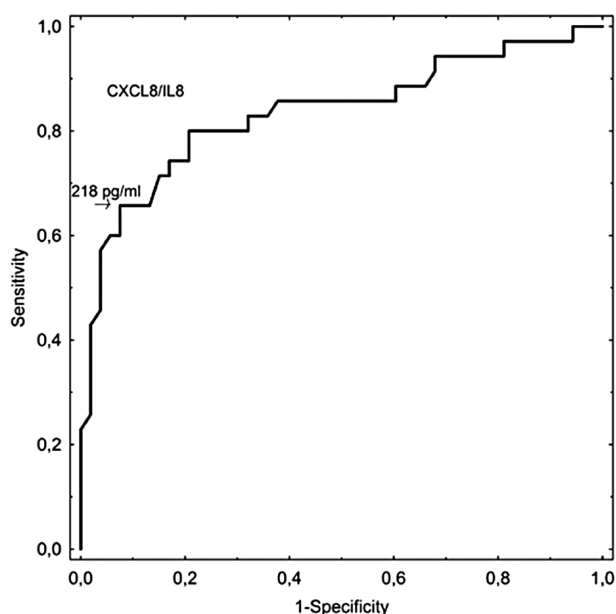
Pomimo znacznego postępu, jaki dokonał się na przestrzeni ostatnich lat w leczeniu cukrzycy typu 1, późne powikłania naczyniowe wciąż stanowią istotny problem kliniczny. W prowadzonych badaniach nad patogenezą retinopatii cukrzycowej autorzy coraz więcej uwagi poświęcają czynnikom zapalnym i angiogennym [8–10]. Obecnie celem naszych badań była ocena surowiczych stężeń wybranych chemokin zapalnych: CXCL1/GRO $\alpha$  oraz CXCL8/IL8 u chorych z T1DM oraz retinopatią cukrzycową. Białka CXCL1/GRO $\alpha$  oraz CXCL8/IL8 należą do grupy chemokin zapalnych. Wykazują ekspresję w tkankach objętych procesem zapalnym, powodując naciekanie i przyleganie komórek pojawiających się w odpowiedzi na stymulację cytokin prozapalnych lub podczas kontaktu z patogenami. Uwalnianie chemokin jest bardzo szybkie i zapo-

**Tabela III.** Korelacje surowiczych stężeń CXCL8/IL8 z parametrami klinicznymi i biochemicznymi u pacjentów z T1DM

**Table III.** Correlation of serum concentrations of CXCL8/IL8 clinical and biochemical parameters in patients with T1DM

	CXCL8/IL8	
	r	p-value
Wiek	0,02	0,352
Czas trwania cukrzycy	0,34	0,009*
Ciśnienie skurczowe krwi	0,28	0,042
Ciśnienie rozkurczowe krwi	0,23	0,101
HbA <sub>1c</sub>	0,36	0,041*
CRP	0,53	0,002*
Albumina z dobowej zbiórki moczu	0,27	0,003*
CXCL1/GRO $\alpha$	0,02	0,456

\*Znamienność statystyczna

Ryc. 1.  $AUC_{ROC}$  dla surowiczych stężeń CXCL8/IL8**Fig. 1.**  $AUC_{ROC}$  for serum concentrations CXCL8/IL8

czątkowane rozpoznaniem epitopów na śródbłonku naczyń krwionośnych i na komórkach zapalnych [11–13]. Chemokiny zapalne przyciągają pierwszą falę komórek efektorowych biorących udział we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej obejmującej monocyty, makrofagi i granulocyty [12]. Po antygenowo specyficznej aktywacji limfocytów przez chemokiny prozapalne i zaktywowane komórki dendrytyczne następuje przyciąganie efektorowych komórek T do ogniska zapalnego. W tym samym czasie rekrutowane są komórki regulatorowe i balans pomiędzy komórkami efektorowymi i regulatorowymi determinuje wynik lokalnego procesu zapalnego [14].

Badaniem objęto grupę 59 pacjentów z T1DM, w tym 26% z T1DM i PDR, 39% z T1DM i NPDR oraz 35% z T1DM bez objawów retinopatii cukrzycowej. U pacjentów z T1DM oraz PDR wykryliśmy znamienne wyższe stężenie białka CXCL8/IL8 w surowicy w porównaniu z grupą pacjentów z T1DM i NPDR jak też w porównaniu z grupą pacjentów z T1DM, ale bez objawów retinopatii cukrzycowej. Dalsza nasza analiza statystyczna wykazała dodatnią istotnie zmienną korelację surowiczych stężeń CXCL8/IL8 z czasem trwania cukrzycy, poziomem HbA1c oraz białkiem C-reaktywnym w grupie pacjentów z T1DM oraz retinopatią proliferacyjną i nieproliferacyjną. Powszechnie wiadomo, że białko C-reaktywne występuje w śladowych ilościach w surowicy osób zdrowych.

Należy ono do białek ostrej fazy i jest syntetyzowane głównie w wątrobie. Aczkolwiek w ostatnich latach wykazano, że źródłem CRP jest nie tylko wątroba, ale również makrofagi [23–24]. Białko CRP jest produkowane w odpowiedzi na działanie interleukiny-6 (IL-6). Na powierzchni śródbłonka nasila ekspresję cząstek adhezyjnych oraz syntezę białka CXCL8/IL8, zmniejsza biodostępność tlenu azotu i bierze udział w aktywacji składowych dopełniacza [24]. Z drugiej strony CXCL8/IL8 indukuje aktywację i migrację monocytów/makrofagów, granulocytów zasadochłonnych, limfocytów CD4 oraz komórek NK. W następstwie ich aktywacji dochodzi do wytwarzania cytokin, czynników wzrostu, czynników transkrypcyjnych, prowadzących m.in. do zwiększenia wydzielania białek ostrej fazy, modulując dalszy przebieg reakcji zapalnej [14, 25–26]. W wielośrodkowych randomizowanych badaniach klinicznych Diabetes Control and Complications Trial (DCCT), obejmujących 29 centrów medycznych USA oraz Kanady, w których przebadano 1441 pacjentów z T1DM w wieku od 13 do 39 lat, autorzy dowiedli, że podwyższony poziom białka CRP u pacjentów z cukrzycą może być związany z większym ryzykiem wystąpienia obrzęku płamki oraz twardych wysięków na dnie oka [7]. Ponadto długotrwała hiperglikemia w przebiegu cukrzycy prowadzi do aktywacji kaskady diacyloglicerol-kinaza C, powodując zmiany strukturalne w obrębie perycytów i ostatecznie stopniowy zanik tych komórek. Zmniejsza się kurczliwość mikrotętniczek siatkówki przy jednoczesnym zwiększeniu liczby komórek śródbłonka. Dochodzi więc do zamknięcia światła drobnych naczyń krwionośnych z wytworzeniem obszarów hipoperfuzji [3,8]. Badacze z ośrodka poznańskiego wykazali, że chemokina CXCL8/IL8 ulega zmianom w zależności od wyrównania metabolicznego u pacjentów zarówno z T1DM, jak i T2DM cukrzycy [17]. Inni badacze wykryli zwiększone stężenie białka CXCL8/IL8 w cieple szklistym pacjentów z objawami retinopatii cukrzycowej [27–28]. W badaniach Koskela et al. (2013) wykazano 6-krotnie wyższe stężenie CXCL8/IL8 w cieple szklistym niż w surowicy u pacjentów z T1DM oraz PDR [28].

W dalszym etapie naszych badań w celu określenia wartości granicznych surowiczych stężeń CXCL8/IL8 dla przewidywania ryzyka rozwoju retinopatii pacjentów z T1DM zastosowano analizę  $ROC_{AUC}$ . Jedną z metod statystycznych wyznaczania wartości granicznych jest analiza krzywych ROC, która zapewnia najwyższą trafność decyzji

[29]. Próg referencyjny dla surowiczego poziomu CXCL8/IL8 określono na poziomie 218 pg/ml. Tak więc w badanej grupie pacjentów z T1DM wartości CXCL8/IL8 powyżej 218 pg/ml mogą wskazywać na prawdopodobieństwo rozwoju retinopatii cukrzycowej u chorych z T1DM.

O ile wyniki chemokiny CXCL8/IL8 zostały dobrze przedstawione w badaniach u dorosłych pacjentów z T1DM jak też T2DM, to tylko nieliczne doniesienia sygnalizują o chemokinie CXCL1/GRO- $\alpha$  [30–32]. W eksperymentalnie wywołanym niedokrwieniu nerki u myszy wykazano wzrost stężenia CXCL1/Gro- $\alpha$  w surowicy i moczu. W tym samym doświadczeniu autorzy zaobserwowali, że z przebadanych 18 wybranych cytokin i chemokin wyższe stężenie CXCL1/Gro- $\alpha$  było wykrywane najszybciej i utrzymywało się najdłużej w niedokrwieniu nerki u myszy. Ponadto stężenie CXCL1/Gro- $\alpha$  w surowicy i w moczu były najwyższe po trzech godzinach po niedotlenieniu, podczas gdy zmiany histologiczne były wyraźne już po godzinie [30]. W kolejnym badaniu wykonanym u zwierząt wykryto ekspresję mRNA białka CXCL-1/ Gro- $\alpha$  w ostrym zapaleniu rogówki u królika. Badacze sugerują, że białko CXCL-1/ Gro- $\alpha$  indukuje tworzenie nowych naczyń rogówki, wskazując na zaangażowanie chemokin w proces zapalny [31]. Interesujące wyniki badań opublikowali badacze japońscy Takahashi K. et al. Autorzy wykryli zna-

miennie wyższy poziom chemokiny CXCL-1/Gro- $\alpha$  u pacjentów z T1DM w porównaniu do grupy chorych z T2DM. Co więcej, u pacjentów z T1DM zaobserwowali wzrost surowiczego stężenia białka CXCL-1/Gro- $\alpha$  wraz ze spadkiem poziomu C-peptydu. Autorzy sugerują, że chemokina CXCL1/Gro- $\alpha$  może być odpowiedzialna za uszkodzenie wysp trzustkowych i być dobrym markerem ryzyka T1DM [32]. Natomiast wyniki naszych badań są odmienne. Nie wykryto różnic znamienne statystycznych porównując surowicze stężenia białka CXCL-1/Gro- $\alpha$  w grupie pacjentów z T1DM oraz PDR z grupą pacjentów z T1DM oraz NPDR jak też w porównaniu z grupą pacjentów z T1DM bez retinopatii cukrzycowej. Nie wykazano też znamienych korelacji pomiędzy dwiema badanymi chemokinami CXCL8/IL8 a CXCL1/ GRO- $\alpha$ . Wyniki naszych badań wskazują na zaangażowanie chemokiny CXCL8/IL8, lecz nie CXCL1/GRO- $\alpha$  w proces zapalny u pacjentów z T1DM. Sugerujemy, że chemokina CXCL8/IL8 oprócz badania białka CRP mogłaby być dodatkowym wskaźnikiem prognostycznym w rozwoju retinopatii cukrzycowej. Jednakże potrzebne są dalsze badania, aby dogłębnie wykazać rolę chemokin zapalnych u pacjentów z T1DM.

**Konflikt interesów:** Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

## PIŚMIENNICTWO/REFERENCES

- [1] Wojtkiewicz S., Wojcik-Sosnowska E., Jasik M. et al.: Assessment of speed distribution of red blood cells in the microvascular network in healthy volunteers and type 1 diabetes using laser Doppler spectra decomposition. *Physiol. Meas.*, 2014;35, 283289.
- [2] Nussbaum C., Cavalcanti Fernandes Heringa A., Mormanova Z. et al.: Early Microvascular Changes with Loss of the Glycocalyx in Children with Type 1 Diabetes. *J. Pediatr.*, 2013 Dec 21: pii: S0022-3476(13)01425-X. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.11.016. [Epub ahead of print]
- [3] Porta M., Bandello F.: Diabetic retinopathy. A clinical update. *Diabetologia*, 2002;45, 1617-1634.
- [4] Boyer D.S., Hopkins J.J., Sorof J., Ehrlich J.S.: Anti-vascular endothelial growth factor therapy for diabetic macular edema. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.*, 2013;4, 151-169.
- [5] Sultan M.B., Starita C., Huang K.: Epidemiology, risk factors and management of paediatric diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.*, 2012;96, 312-317.
- [6] Amin R., Widmer B., Prevost A.T. et al.: Risk of microalbuminuria and progression to macroalbuminuria in a cohort with childhood onset type 1 diabetes: prospective observational study. *BMJ*, 2008;336, 697-701.
- [7] Muni R.H., Kohly R.P., Lee E.Q. et al.: Prospective study of inflammatory biomarkers and risk of diabetic retinopathy in the diabetes control and complications trial. *JAMA Ophthalmol.*, 2013;131, 514-521.
- [8] Zorena K., Raczyńska D., Raczyńska K.: Biomarkers in diabetic retinopathy and the therapeutic implications. *Mediators Inflamm.*, 2013;2013:193604.
- [9] Zhou J., Wang S., Xia X.: Role of intravitreal inflammatory cytokines and angiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr. Eye Res.*, 2012;37, 416-420.
- [10] Semeran K., Pawłowski P., Lisowski Ł. et al.: Plasma levels of IL-17, VEGF, adrenomedullin (ADM) and s-cone pathway dysfunction of the retina in children and adolescents without signs of retinopathy and with varied duration of diabetes. *Mediators Inflamm.*, 2013;2013:274726.

- [11] Oo Y.H., Shetty S., Adams D.H.: The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *Dig. Dis.*, 2010;28, 31-44.
- [12] Ebert L.M., Schaerli P., Moser B.: Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol. Immunol.*, 2005;42, 799-809.
- [13] Commins S.P., Borish L., Steinke J.W.: Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 2010;125, S53-S72.
- [14] Romagnani P., Lasagni L., Annunziato F. et al.: CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol.*, 2004;25, 201-209.
- [15] Weiss N., Deboux C., Chaverot N. et al.: IL8 and CXCL13 are potent chemokines for the recruitment of human neural precursor cells across brain endothelial cells. *J. Neuroimmunol.*, 2010;223, 131-134.
- [16] Losy J., Zaremba J., Skrobański P.: CXCL1 (GRO- $\alpha$ ) chemokine in acute ischaemic stroke patients. *Folia Neuropathol.*, 2005;43, 97-102.
- [17] Zozulińska D., Majchrzak A., Sobieska M. et al.: Serum interleukin-8 level is increased in diabetic patients. *Diabetologia*, 1999;42, 117-118.
- [18] Zorena K., Myśliwiec M., Myśliwska J. et al.: Status chemokin CCL2/MCP-1 oraz CXCL10/IP-10 u dzieci i młodzieży z mikroangiopatią cukrzycową. *Endokrynologia Pediatryczna*, 2010;4, 9-18.
- [19] Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. *Diabetologia Kliniczna*, 2013.
- [20] American Diabetes Association, Diagnosis and Classification of Diabetes. *Diabetes Care*, 2010;33, 62-69.
- [21] Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Classification of diabetic retinopathy from fluorescein angiograms: ETDRS Ophthalmology, 1991;98, 807-822.
- [22] DeLong E.R., DeLong D.M., Clarke-Pearson D.L.: Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: A non-parametric approach. *Biometrics.*, 1988;44, 837-842.
- [23] Blake G.J., Ridker P.M.: Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *J. Intern. Med.*, 2002;252, 283-294.
- [24] Choi H.J., Jeon S.Y., Hong W.K. et al.: Effect of glucose ingestion in plasma markers of inflammation and oxidative stress: analysis of 16 plasma markers from oral glucose tolerance test samples of normal and diabetic patients, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2013;99, 27-31.
- [25] Hernández C., Segura R.M., Fonollosa A. et al.: Interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and IL-10 in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabet. Med.*, 2005;22, 719-722.
- [26] Cheung C.M., Vania M., Ang M. et al.: Comparison of aqueous humor cytokine and chemokine levels in diabetic patients with and without retinopathy. *Mol. Vis.*, 2012;18, 830-837.
- [27] L'Heureux G.P., Bourgoin S., Jean N. et al.: Diverging signal transduction pathways activated by interleukin-8 and related chemokines in human neutrophils: interleukin-8, but not NAP-2 or GRO  $\alpha$ , stimulates phospholipase D activity. *Blood*, 1995;85(2), 522-531.
- [28] Koskela U.E., Kuusisto S.M., Nissinen A.E. et al.: High vitreous concentration of IL-6 and IL-8, but not of adhesion molecules in relation to plasma concentrations in proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res.*, 2013;49(2), 108-114.
- [29] Hanley J.A., McNeil B.J.: The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*, 1982;143, 29-36.
- [30] Molls R.R., Savransky V., Liu M. et al.: Keratinocyte-derived chemokine is an early biomarker of ischemic acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2006;290, 1187-1193.
- [31] Spandau U.H., Toksoy A., Verhaart S. et al.: High expression of chemokines Gro- $\alpha$  (CXCL-1), IL-8 (CXCL-8), and MCP-1 (CCL-2) in inflamed human corneas in vivo. *Arch. Ophthalmol.*, 2003;121, 825-831.
- [32] Takahashi K., Ohara M., Sasai T. et al.: Serum CXCL1 concentrations are elevated in type 1 diabetes mellitus, possibly reflecting activity of anti-islet autoimmune activity. *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, 2011;27, 830-833.