

Aleksandra Araszkiewicz, Dorota Zozulińska, Bogna Wierusz-Wysocka

Klinika Chorób Wewnętrznych i Diabetologii Akademii Medycznej w Poznaniu

# Rozwój badań nad patogenezą mikroangiopatii w cukrzycy typu 1

The history of research on the pathogenesis of microangiopathy in type 1 diabetes

## STRESZCZENIE

Mimo znacznego postępu w leczeniu cukrzycy przewlekłe powikłania tego schorzenia nadal stanowią istotny problem kliniczny. Mikroangiopatia obejmuje swoiste dla cukrzycy zmiany w najmniejszych naczyniach, które ujawniają się klinicznie w postaci retinopatii, nefropatii i neuropatii cukrzycowej. W niniejszej pracy opisano rozwój badań nad patogenezą mikroangiopatii w cukrzycy typu 1. Związek między cukrzycą a rozwojem mikroangiopatii u chorych na cukrzycę zauważono już w XIX wieku. Przewlekłe powikłania cukrzycy stały się jednak znaczącym problemem klinicznym i społecznym dopiero po odkryciu insuliny przez Fredericka Bantinga i Charlesa Besta w 1921 roku. W pracy zwrócono uwagę zarówno na obserwacje kliniczne, jak i na równocześnie trwające badania eksperymentalne, dotyczące patogenezы mikroangiopatii.

**Słowa kluczowe:** mikroangiopatia, cukrzyca typu 1, historia badań

## ABSTRACT

In spite of a great progress concerning treatment of diabetes, long-term complications are still an important clinical problem. Microangiopathy refers to

diabetic-specific microvascular alterations, clinically appeared as retinopathy, nephropathy and neuropathy. The aim of this review was to provide the history of research on the pathogenesis of microangiopathy. The development of these complications in diabetic patients was noticed in XIX century. However, late diabetic complications became a clinical and social problem after the discovery of insulin by Frederick Banting and Charles Best in the year 1921. Clinical observations as well as experimental investigations concerning pathogenesis of microangiopathy are presented in our paper.

**Key words:** microangiopathy, type 1 diabetes, history of sciences

Mimo znacznego postępu w leczeniu cukrzycy nadal przewlekłe powikłania tego schorzenia, zarówno o charakterze mikro- jak i makroangiopatii, stanowią istotny problem kliniczny. Mikroangiopatia obejmuje swoiste dla cukrzycy zmiany w obrębie układu naczyń włosowatych oraz w najdrobniejszych tętnicach i żyłach, których średnica nie przekracza 100  $\mu\text{m}$ . Ujawniają się one klinicznie w postaci retinopatii, nefropatii i neuropatii cukrzycowej. Zjawisko rozwoju mikroangiopatii u chorych na cukrzycę zaobserwowano już w XIX wieku. Pierwszy przypadek retinopatii cukrzycowej opisał Eduard von Jaeger w 1855 roku. Dotyczył on 22-letniego pacjenta z 5-letnim wywiadem cukrzycy i został przedstawiony w *Beiträge zur Pathologie des Auges* [1, 2]. W 1879 roku Stephen MacKenzie i Edward Nettleship znaleźli mikroaneuryzmaty w obrazie siatkówki, a w 1888 roku Nettleship zidentyfikował nowotworzenie naczyń na dnie oka [3]. Całościowy obraz retinopatii cukrzycowej po raz pierwszy, w 1890 roku, opisał Juliusz

Adres do korespondencji: Aleksandra Araszkiewicz  
Klinika Chorób Wewnętrznych i Diabetologii  
Akademii Medycznej w Poznaniu  
Szpital im. F. Raszei w Poznaniu  
ul. Mickiewicza 2, 60-834 Poznań  
tel./faks: (0 61) 847 45 79, 0 608 574 382  
e-mail: olaaraszkiewicz@interia.pl  
Diabetologia Praktyczna 2005, tom 6, 4, 182-186  
Copyright © 2005 Via Medica  
Nadesłano: 17.06.2005 Przyjęto do druku: 18.07.2005

Hirschberg, który stwierdził również, że są to zmiany specyficzne dla cukrzycy [4]. W piśmiennictwie z końca XIX wieku można znaleźć kilka opisów przypadków zmian nerkowych odpowiadających nefropatii cukrzycowej [5]. W 1875 roku Armanni zaobserwował charakterystyczną dla cukrzycy wakuolizację nabłonka w cewkach nerkowych. Jednak na związek albuminurii z cukrzycą zwrócił uwagę dopiero Elliot P. Joslin w 1916 roku. Natomiast o objawach neuropatii cukrzycowej jako pierwszy wspomniał Rollo pod koniec XVIII wieku. W 1864 roku Calvi i, 2 lata później, Ogle zaobserwowali związek cukrzycy z zaburzeniami w obrębie układu nerwowego, a w 1884 roku Bouchard stwierdził brak odruchu kolanowego u grupy chorych na cukrzycę. Autorem wyczerpującego opisu polineuropatii cukrzycowej był lekarz z londyńskiego *Guy's Hospital*, Frederick Pavy [6, 7]. Stwierdził on, że istnieje związek między cukrzycą a zaburzeniem funkcji układu nerwowego — zarówno obwodowego — jak i autonomicznego. Ponadto, jako pierwszy opisał zaburzenia potencji u chorych na cukrzycę.

W XIX wieku stwierdzono, że cukrzyca prowadzi do rozwoju odległych powikłań. Jednak przewlekłe powikłania tego schorzenia stały się istotnym problemem klinicznym i społecznym dopiero po odkryciu insuliny przez Fredericka Bantinga i Charlesa Besta w 1921 roku [8]. Insulina jako lek, z jednej strony, wydłużyła życie chorym na cukrzycę typu 1, ale z drugiej — postawiła medycynie wyzwanie w postaci mikro- i makroangiopatii cukrzycowej. Od drugiej połowy XX wieku diabetologia koncentruje swoją uwagę na pierwotnej i wtórnej prewencji przewlekłych powikłań cukrzycy. Stały się one przedmiotem zarówno obserwacji klinicznych, jak i badań eksperymentalnych.

Początkowo tylko niewielka część diabetologów, między innymi Joslin, Lawrence i Pirart, uważała, że rozwój przewlekłych powikłań tej choroby można opóźnić dzięki utrzymywaniu glikemii w granicach wartości fizjologicznych [9]. Jean Pirart w latach 1947–1973 obserwował 4400 chorych na cukrzycę i stwierdził zwiększenie częstości angiopatii wraz z czasem trwania choroby i pogorszeniem samokontroli. Jednak większość lekarzy nie podzielała tego poglądu i preferowała stan umiarkowanej hiperglikemii, która, z jednej strony, niwelowała objawy kliniczne cukrzycy, natomiast z drugiej — zmniejszała ryzyko wystąpienia hipoglikemii. Edward Tolstoi twierdził nawet, że pacjenci powinni zapomnieć o cukrzycy zaraz po porannej iniekcji insuliny [10]. Jeszcze w 1988 roku Rosenstock i Raskin dopatrywali się znaczącego udziału, innych niż metabolicz-

ne, czynników w patogenezie powikłań. U około 25% chorych na cukrzycę typu 1 nie zaobserwowali oni bowiem zależności między stanem wyrównania metabolicznego a pojawieniem się mikroangiopatii cukrzycowej [11]. Dodatkowo, wątpliwości lekarzy pogłębiał fakt braku rzetelnych badań klinicznych z randomizacją oraz wiarygodnych metod oceny długotrwałej kontroli glikemii.

Dopiero zapoczątkowane w latach 80. wieloosrodkowe badania *Stockholm Diabetes Intervention Study* (SDIS) oraz *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) jednoznacznie potwierdziły istnienie związku między kontrolą glikemii a rozwojem i postępem powikłań mikroangiopatycznych cukrzycy [12]. Było to możliwe częściowo dzięki wprowadzeniu pod koniec lat 70. do praktyki klinicznej testów paskowych do pomiarów glikemii oraz opracowaniu metody oznaczania hemoglobiny glikowanej ( $HbA_{1c}$ ) [13]. W badaniu DCCT obserwacją objęto 1441 chorych na cukrzycę typu 1. W badaniu tym po raz pierwszy wprowadzono pojęcie intensywnej insulinoterapii jako metody leczenia umożliwiającej uzyskanie kontroli stężenia glukozy we krwi najbardziej zbliżonego do normoglikemii. W porównaniu z leczeniem konwencjonalnym, leczenie intensywne pozwoliło zmniejszyć ryzyko wystąpienia retinopatii o 76%, nefropatii — o 34% i neuropatii cukrzycowej — o 69% [12].

Kolejnych dowodów na związek między wyrównaniem metabolicznym cukrzycy a pojawieniem się mikroangiopatii dostarczyły badania EURODIAB i *Wisconsin Eye Study*. Celem tych prospektywnych obserwacji była identyfikacja czynników ryzyka rozwoju powikłań naczyniowych schorzenia. W badaniu EURODIAB obserwowano 760 chorych na cukrzycę typu 1 przez okres 7 lat. Rozwój retinopatii zależał od wartości hemoglobiny glikowanej, czasu trwania choroby, wskaźnika talia–biodra oraz stężenia triglicerydów. Natomiast pojawienie się mikroalbuminurii u tych pacjentów wiązało się z wartościami  $HbA_{1c}$  oraz stężeniem triglicerydów i cholesterolu frakcji LDL [14]. Podobnie w badaniu *Wisconsin Eye Study* zaobserwowano istnienie zależności między długotrwałym wyrównaniem metabolicznym cukrzycy określanym za pomocą wartości  $HbA_{1c}$  i ciśnienia tętniczego a rozwojem retinopatii i nefropatii cukrzycowej [15].

Historia badań klinicznych wyraźnie wskazuje na związek rozwoju mikroangiopatii z wyrównaniem metabolicznym cukrzycy. Równocześnie z postępem obserwacji klinicznych trwały również badania eksperymentalne dotyczące patogenezy mikroangiopatii. Początkowo sądzono, że przyczyną powikłań

naczyniowych cukrzycy jest miażdżyca. Pogląd ten zweryfikowano pod wpływem wyników badań Henry Wagenera i Russella Wildera. W 1934 roku opisali oni przypadki pacjentów z krwotokami obserwowanymi w badaniu dna oka, bez innych oznak choroby naczyniowej. Zmiany te wiązali z obecnością cukrzycy [16]. Dwa lata później Paul Kimmelstiel i Clifford Wilson podali charakterystyczny dla cukrzycy, histopatologiczny opis stwardnienia kłębuszków nerkowych [17]. Również Knud Lundbak z Danii oddzielał zmiany typowe dla miażdżycy od angiopatii cukrzycowej [18]. Mimo wielu badań mechanizmy prowadzące do rozwoju powikłań naczyniowych pozostały jednak niejasne jeszcze przez wiele lat.

Duże znaczenie dla zrozumienia procesów prowadzących do rozwoju mikroangiopatii cukrzycowej miały badania dotyczące funkcji komórek śródbłonna naczyń. Na początku lat 80. stwierdzono, że śródbłonek naczyń jest nie tylko selektywną barierą oddzielającą ścianę naczyniową od przepływającej krwi, ale wykazuje on własną aktywność metaboliczną i wydzielniczą. W warunkach fizjologicznych śródbłonek utrzymuje stan równowagi między aktywnością układu krzepnięcia i fibrynolizy a czynnikami regulującymi napięcie ściany naczyniowej [19–22]. W swoich pracach Furchgott i Cohen wykazali, że dysfunkcja śródbłonna może mieć istotne znaczenie w rozwoju angiopatii cukrzycowej. Związek ten potwierdziły podwyższone stężenia we krwi chorych na cukrzycę wskaźników uszkodzenia śródbłonna: czynnika von Willebranda, trombomoduliny, selektyny, endoteliny-1 czy fibronektyny.

W ciągu ostatnich 40 lat udowodniono, że uszkodzające działanie hiperglikemii w komórkach śródbłonna odbywa się przez aktywację kilku szlaków metabolicznych. Głównymi hipotezami wyjaśniającymi związek między wysokim stężeniem glukozy we krwi a rozwojem mikroangiopatii są: teoria polioliowa, heksozaminowa, nieenzymatycznej glikacji białek oraz stres oksydacyjny. Rolę szlaku polioliowego w rozwoju powikłań naczyniowych cukrzycy opisał ponad 30 lat temu Gabbay [23]. Początkowo niekorzystne następstwa związane z nasileniem przemiany glukozy tą drogą wiązano głównie z gromadzeniem się w komórce sorbitolu i wzrostem osmolarności przestrzeni wewnątrzkomórkowej. Obecnie uważa się, że aktywacja toru sorbitolowego prowadzi dodatkowo do obniżenia stosunku NADPH/NADP<sup>+</sup> oraz zwiększenia proporcji wolnego NADH/NAD<sup>+</sup>. Zaburzenia oksydacji NADH do NAD<sup>+</sup>, określane jako „pseudohipoksja hiperglikemiczna”, wiążą się ściśle ze wzrostem produkcji reaktywnych form tlenu [24]. Natomiast zmniejszenie wewnątrz-

komórkowej zawartości NADPH redukuje ich dostępność, między innymi do układu glutationu, stanowiącego jeden z podstawowych systemów antyoksydacyjnych. Nasilenie metabolizmu glukozy szlakiem polioliowym prowadzi również do zwiększonej syntezy diacyloglicerolu (DAG) oraz aktywacji kinazy białkowej C (PKC, *protein kinase C*) [25].

W latach 80. Brownlee opisał proces nieenzymatycznej glikozylacji białek, lipidów i kwasów nukleinowych, zmieniających swoje własności pod wpływem zwiększonych stężeń glukozy we krwi [26]. Ponadto, sugerował on, że przeorganizowanie początkowo odwracalnych połączeń glukozy z białkami prowadzi do powstania zaawansowanych końcowych produktów glikacji (AGE, *advanced glycation end-products*). Brownlee zwrócił uwagę na związek obecności AGE w surowicy i tkankach z rozwojem powikłań naczyniowych cukrzycy. Zwiększone stężenia AGE obserwowano w naczyniach siatkówki oraz kłębuszkach nerkowych u chorych na cukrzycę. Interakcje komórkowe AGE odbywają się za pośrednictwem specyficznych receptorów (RAGE, *advanced glycation end-products receptor*), zlokalizowanych na komórkach śródbłonna i na jednojądrzastych komórkach fagocytujących. Zaawansowane produkty glikacji białek, po połączeniu z receptorem, prowadzą między innymi do zwiększonej produkcji wolnych rodników tlenowych, cytokin, czynników wzrostu, molekuł adhezyjnych oraz do aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego (NFκB, *nuclear factor kappa B*) [27, 28].

Za kolejny istotny mechanizm uczestniczący w uszkodzeniu tkanek, spowodowany hiperglikemią, uważa się aktywację PKC [29, 30]. Zwiększone stężenie tego enzymu powoduje nasiloną ekspresję między innymi: czynników wzrostu, białek błony podstawnej, inhibitora aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1, *plasminogen activator inhibitor type 1*), fibronektyny i endoteliny oraz aktywację czynnika NFκB. Wynikiem tych zmian jest pogrubienie błon podstawnych naczyń, a także zmiany w ich przepuszczalności. Dodatkowo aktywacja NFκB nasila transkrypcję genów zaangażowanych w rozwój reakcji zapalnej i przewlekłych zmian w naczyniach u chorych na cukrzycę [31]. Aktywacja kinazy białkowej C prowadzi również do indukcji kinaz białkowych aktywowanych przez mitogeny (MAPKs, *mitogen-activated protein kinases*). W opublikowanych pod koniec lat 90. badaniach Tomlinson i wsp. sugerują, że uszkodzające działanie podwyższonych wartości glikemii odbywa się między innymi przez aktywację tych kinaz białkowych [32].

W ostatnich latach podkreśla się również rolę stresu oksydacyjnego i odpowiedzi zapalnej w pato-

genezie mikroangiopatii cukrzycowej [33, 34]. Już na początku lat 80. Wolff i wsp. sugerowali, że hiperglikemia może wywoływać stres oksydacyjny [35]. Zaburzenie równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w cukrzycy wydaje się, z jednej strony, następstwem zwiększonej generacji toksycznych pochodnych tlenu (m.in. w wyniku autooksydacji glukozy, nieenzymatycznej glikacji białek i aktywacji szlaku polioloowego), a z drugiej — zmniejszonej sprawności układów antyoksydacyjnych [36, 37]. Nadmiar reaktywnych form tlenu prowadzi wówczas do peroksydacji lipidów, fragmentacji białek, kwasów nukleinowych, inaktywacji niektórych enzymów oraz wzrostu stężenia jonów wapnia w cytoplazmie.

Istotny wkład w zrozumienie patogenezy powikłań naczyniowych cukrzycy wniosły również badania dotyczące procesu zapalnego. Mechanizmy prowadzące do zaburzeń interakcji między elementami morfotycznymi krwi a komórkami śródbłonna u chorych na cukrzycę przypominają uogólnioną odpowiedź zapalną [38, 39]. Sugeruje się, że czynnikiem inicjującym ten proces jest hiperglikemia. Już wcześniej wykazano, że w warunkach podwyższonych wartości glikemii we krwi aktywacji ulegają elementy morfotyczne krwi. W tych warunkach granulocyty obojętnochłonne tracą swoją odkształcalność i zamykają światło naczyń małego kalibru, powodując miejscową hipoksję. Staje się to impulsem do uwalniania z komórek śródbłonna cytokin odpowiedzialnych za nasilone nowotworzenie naczyń i wzrost ich przepuszczalności. Natomiast granulocyty uwalniają toksyczne pochodne tlenu, enzymy proteolityczne i metabolity kwasu arachidonowego, naruszające integralność i strukturę śródbłonna. Powstają w ten sposób warunki do infiltracji ściany naczyniowej makrofagami, limfocytami oraz substancjami humoralnymi pochodzącymi z surowicy krwi. Mechanizmy te mają prawdopodobnie podstawowe znaczenie w zaburzaniu funkcji i struktury śródbłonna, które inicjują proces uszkodzenia ściany naczyniowej.

Zatem, dyskusje dotyczące patogenezy powikłań naczyniowych cukrzycy trwają od wielu lat. Mimo istnienia wielu różnych koncepcji dotyczących tego zagadnienia, nadal ich wspólnym elementem pozostaje przewlekła hiperglikemia. Nie można jednak wykluczyć znaczenia dużych dobowych wahań glikemii we krwi. Być może odkrycie nowych ogniw łączących zaburzenia gospodarki węglowodanowej z rozwojem mikroangiopatii stworzy w przyszłości dalsze możliwości terapeutyczne i pozwoli zmniejszyć ogromny problem kliniczny, jakim są obecnie przewlekłe powikłania cukrzycy.

## PIŚMIENNICTWO

1. Diabetes — Its Medical and Cultural History. Springer-Verlag, Berlin 1989.
2. Fischer F.: The first case of diabetic retinopathy; Eduard von Jaeger, Vienna, 1855. *Wien. Med. Wochenschr.* 1957; 107: 969–972.
3. Nettleship E.: Haemorrhagic retinitis in a patient with diabetes, varicose swellings on a retinal vein in the right eye. *Trans. Ophthalmol. Soc.* 1888; 8: 161.
4. Hirschberg J.: Über diabetische Netzhautentzündung. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1890; 16: 1181.
5. Griesinger W.: Studien über Diabetes. *Arch. Physiol. Heilkd.* 1895; 3: 1–75.
6. Pavy F.W.: Introductory address to the discussion on the clinical aspect of glycosuria. *Lancet* 1885; 1085–1087.
7. Pavy F.W.: On diabetic neuritis. *Lancet* 1904; 2: 17–19.
8. Bliss M.: The Discovery of Insulin. University of Chicago Press, Chicago 1982.
9. Pirart J.: Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4,400 patients observed between 1947 and 1973. *Diab. Metab.* 1977; 3: 97–107, 173–182, 245–256.
10. Tolstoi E.: The objective of modern diabetic care. *Psychosom. Med.* 1948; 10: 291–294.
11. Rosenstock J., Raskin P.: Diabetes and its complications: blood glucose control vs. genetic susceptibility. *Diabet. Metab. Rev.* 1988; 4: 417–435.
12. DCCT Trial Research Group: 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.
13. Flückiger R., Winterhalter K.H.: In vitro synthesis of hemoglobin A<sub>1c</sub>. *FEBS Lett.* 1976; 71: 356–360.
14. Chaturvedi N., Bandinelli S., Mangili R. i wsp.: Microalbuminuria in type 1 diabetes: rates, risk factors and glycemic threshold. *Kidney Int.* 2001; 60: 219–227.
15. Klein R., Klein B., Moss S., Cruickshanks K.: The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy, 17: the 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes. *Ophthalmology* 1998; 105: 1801–1815.
16. Wagener H.F., Dry T.J., Wilder R.M.: Retinitis in diabetes. *N. Engl. J. Med.* 1934; 211: 1131–1137.
17. Kimmelstiel P., Wilson C.: Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. *Am. J. Pathol.* 1936; 12: 83–97.
18. Lundbak K.: Diabetic angiopathy: a specific vascular disease. *Lancet* 1954; 377–379.
19. Furchgott R.F.: Introduction to EDRF research. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1993; 22: S1–S2.
20. Cohen R.A.: Dysfunction of vascular endothelium in diabetes mellitus. *Circulation* 1993; 87: V67–V76.
21. Cohen R.A.: The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 1995; 38: 105–128.
22. Gryglewski R.J., Botting R.M., Vane J.R.: Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension* 1988; 12: 530–548.
23. Gabbay K.H., Merola L.O., Field R.A.: Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science* 1966; 151: 209–210.
24. Williamson J.R., Chang K., Frangos M. i wsp.: Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 1993; 42: 801–813.
25. Greene D.A., Lattimer S.A., Sima A.A.: Sorbitol, phosphoinositides and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N. Engl. J. Med.* 1987; 316: 599–606.
26. Brownlee M., Vlassara H., Cerami A.: Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N. Engl. J. Med.* 1988; 318: 1315–1321.
27. Brownlee M.: Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu. Rev. Med.* 1995; 46: 223–234.

28. Brownlee M.: Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 1992; 15: 1835–1843.
29. Derubertis F.R., Craven P.A.: Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes: mechanism and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes* 1994; 43: 1–8.
30. Williams B., Schrier R.W.: Characterization of glucose-induced in situ protein kinase C activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 1992; 41: 1464–1472.
31. Mohamed A.K., Bierhaus A., Schiekofer S., Tritschler H., Ziegler R., Nawroth P.P.: The role of oxidative stress and NF-kappaB activation in late diabetic complications. *Biofactors* 1999; 10: 157–167.
32. Tomlinson D.R.: Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complications. *Diabetologia* 1999; 42: 1271–1281.
33. Ceriello A., Falletti E., Bartolotti N. i wsp.: Increased circulating intracellular adhesion molecule-1 levels in type II diabetic patients. Possible role of metabolic control and oxidative stress. *Metabolism* 1996; 45: 498–501.
34. Baynes J.W., Thorpe S.R.: Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1–9.
35. Wolff S.P.: The potential role of oxidative stress in diabetes and its complications. W: *Diabetes complications: scientific and clinical aspects*. Wyd. M.J.C. Crabe, Churchill Livingstone, Edinburgh-London-Melbourne-New York 1981; 160–186.
36. Giugliano D., Ceriello A.: Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19: 257–267.
37. Sinclair A.J.: Free radical mechanisms and vascular complications of diabetes mellitus. *Diabetic Rev.* 1993; 2: 7–10.
38. Wierusz-Wysocka B., Wysocki H., Siekierka H. i wsp.: Evidence of polymorphonuclear neutrophils (PMN) activation in patients with diabetes mellitus. *J. Leuk. Biol.* 1987; 42: 519–524.
39. Delamaire M., Maugeudre D., Moreno M. i wsp.: Impaired leukocytes functions in diabetic patients. *Diabet. Med.* 1997; 14: 29–34.