

Marzena Dworacka

Katedra i Zakład Farmakologii Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Ekspresja inhibitora apoptozy sFas a ostra hiperglikemia w cukrzycy typu 2

Apoptosis inhibitor sFas expression and acute hyperglycemia in type 2 diabetes

STRESZCZENIE

WSTĘP. Nasilenie apoptozy indukowane za pośrednictwem układu receptora błonowego Fas i jego liganda FasL jest jednym z czynników sprawczych powikłań o typie makroangiopatii. Częsteczką rozpuszczalnego receptora Fas (sFas, *soluble Fas*) spełnia rolę czynnika antyapoptotycznego. U chorych na cukrzycę nasilenie apoptozy zachodzące w obrębie blaszki miażdżycowej jest w znacznym stopniu uwarunkowane stopniem wyrównania metabolicznego cukrzycy. Wyniki badań epidemiologicznych przeprowadzonych w ciągu ostatnich lat jednoznacznie wykazały, że w rozwoju choroby niedokrwiennej serca (powikłania o charakterze makroangiopatii) wiodącą rolę odgrywa poposiłkowa, a więc ostra, hiperglikemia. Celem przeprowadzonych badań było wyjaśnienie, czy stopień wyrównania metabolicznego cukrzycy, a zwłaszcza epizody ostrej hiperglikemii determinują ekspresję inhibitora apoptozy sFas. **MATERIAŁ I METODY.** W badaniu wzięto udział 29 chorych na cukrzycę typu 2 z towarzyszącą chorobą niedokrwinną serca, 10 pacjentów z chorobą niedokrwinną serca oraz 10 zdrowych ochotników. Pod uwagę wzięto stężenie sFas w surowicy w powiązaniu ze standardowo stosowanymi parametrami kontroli metabolicznej cukrzycy (glikemią na czczo, HbA_{1c}, stężeniami cholesterolu całkowitego,

frakcji HDL i LDL oraz triglicerydów w surowicy). Wyznacznikiem ostrej hiperglikemii było stężenie 1,5-anhydro-D-glucitolu w osoczu.

WYNIKI. Wykazano, że stężenie sFas w grupie chorych na cukrzycę typu 2 jest wyższe niż w grupie pacjentów z chorobą niedokrwinną serca oraz u osób zdrowych. Stężenie sFas w surowicy chorych na cukrzycę typu 2 wykazywało związek wyłącznie ze stężeniem 1,5-anhydro-D-glucitolu w osoczu.

WNIOSKI. Epizody ostrej hiperglikemii, w przeciwieństwie do hiperglikemii przewlekłej, wpływają na zmniejszenie ekspresji czynnika antyapoptotycznego sFas w u chorych na cukrzycę typu 2.

Słowa kluczowe: cukrzyca typu 2, apoptoza, ostra hiperglikemia, sFas

ABSTRACT

INTRODUCTION. Apoptosis occurring via Fas/FasL interaction is one from the reasons of macroangiopathy. The soluble receptor Fas (sFas) is thought to be an inhibitor of apoptosis. In type 2 diabetic patients apoptosis is determined by the level of metabolic compensation. The epidemiological studies from last few years revealed that postprandial, so acute, hyperglycemia plays the dominant role in coronary heart disease development. We aimed to evaluate if metabolic control and acute hyperglycemic episodes especially, can influence sFas serum level.

MATERIAL AND METHODS. The total of 49 persons were examined, including 29 type 2 diabetic patients with concomitant coronary heart disease, 10 patients with coronary heart disease only and 10 healthy persons. The plasma level of 1.5-anhydro-D-glucitol was estimated as the marker of acute hyperglycemia. The serum sFas levels were measured together

Adres do korespondencji: Marzena Dworacka
Katedra i Zakład Farmakologii Akademii Medycznej
im. Karola Marcinkowskiego
ul. Rokietnicka 5a, 60-806 Poznań
tel. (0 61) 658 43 94; faks (0 61) 658 44 87
e-mail: mdworac@am.poznan.pl

Diabetologia Praktyczna 2004, tom 5, 6, 311-316
Copyright © 2004 Via Medica

Nadesłano: 5.11.2004 Przyjęto do druku: 6.12.2004

with routine metabolic parameters (fasting glycaemia, HbA_{1c}, total cholesterol and HDL, and LDL cholesterol fractions levels, triglyceride serum concentration).

RESULTS. The sFas serum level was significantly higher in patients with diabetes type 2 than in patients with coronary heart disease only and higher than sFas level in controls. The sFas serum concentration in type 2 diabetic patients was correlated only with 1.5-anhydro-D-glucitol concentration.

CONCLUSION. The short-term hyperglycemic episodes, in opposition to chronic hyperglycemia, are related to lower expression of antiapoptotic factor sFas.

Key words: diabetes type 2, apoptosis, acute hyperglycemia, sFas

Wstęp

Wyniki badań z ostatnich lat wykazały, że ostra hiperglikemia stanowi jeden z najważniejszych czynników determinujących rozwój przewlekłych powikłań o typie makroangiopatii u chorych na cukrzycę typu 2 [1–3]. Wśród wielu innych czynników bezpośrednio przyczyniających się do rozwoju powikłań makroangiopatycznych istotną rolę odgrywa stan ostrej hiperglikemii, która, najczęściej obserwowana jako hiperglikemia poposiłkowa, stymuluje rozwój miażdżycy, między innymi nasilając apoptozę w obrębie kardiomiocytów, komórek śródbłonna i fibroblastów [4]. Stwierdzono również, że makrofagi naciekające blaszkę miażdżycową wywołują apoptozę w komórkach mięśni gładkich naczyń, co może powodować pęknięcie blaszki miażdżycowej i zaostrenie przebiegu choroby niedokrwiennej serca, stanowiącej najczęstszą kliniczną postać makroangiopatii u chorych na cukrzycę typu 2 [5]. Indukcja apoptozy, zależna od hiperglikemii, zachodzi przede wszystkim na drodze interakcji między białkami powierzchniowymi Fas i FasL (*Fas-ligand*). Fas (APO-1/CD95) to białko występujące na powierzchni większości komórek, natomiast cząstki jego ligandu są obecne przede wszystkim w błonie komórkowej aktywowanych limfocytów T i komórek dendrytycznych. Rozpuszczalny receptor sFas jest produktem alternatywnego sklejanego genu dla Fas, cząstką, która może wiązać FasL i zapobiegać interakcji między nim a receptorem błonowym Fas, co powoduje, że sFas określa się mianem czynnika antyapoptotycznego [6, 7]. Nie wyjaśniono do końca pochodzenia sFas. Prawdopodobnie cząstki te stanowią efekt złuszczenia receptorów Fas z błon komórkowych w momen-

cie uszkodzenia komórki [8]. Mogą być także syntetyzowane wewnątrzkomórkowo i wydzielane do krwi pod wpływem różnych czynników [9]. Podwyższone stężenia sFas zaobserwowano dotychczas w surowicy dializowanych pacjentów z chorobą niedokrwinną serca [10] i u chorych z miażdżycą zrostową kończyn dolnych [11]. Wysokie stężenia sFas stwierdzono u chorych na cukrzycę z neuropatią oraz z nefropatią cukrzycową [12, 13].

Biorąc pod uwagę potencjalny wpływ hiperglikemii, a zwłaszcza jej krótkotrwałych epizodów, na rozwój przewlekłych powikłań cukrzycy, w tym choroby niedokrwiennej serca, zaplanowano zbadanie ekspresji sFas w surowicy u chorych na cukrzycę typu 2 i starano się określić, czy istnieje jakakolwiek zależność między stężeniem sFas w surowicy a parametrami kontroli metabolicznej cukrzycy.

Materiał i metody

Do badania zakwalifikowano 29 osób chorych na cukrzycę typu 2 z towarzyszącą chorobą niedokrwinną serca (czas trwania klinicznie jawnej cukrzycy $7,1 \pm 7,0$ lat), 10 osób z chorobą niedokrwinną serca (stabilna dusznica bolesna) oraz 10 zdrowych ochotników.

Chorobę niedokrwinną serca rozpoznano na podstawie o zaleceń *American College of Cardiology/American Heart Association (ACC/AHA)* [14], natomiast cukrzycę typu 2 — zgodnie ze stanowiskiem Europejskiej Grupy Postępowania w Cukrzycy (*EDPG, European Diabetes Policy Group*) [15]. W leczeniu choroby niedokrwiennej serca stosowano następujące grupy leków: azotany, molsidominę, leki β -adrenolityczne, antagonistów wapnia, inhibitory konwertazy angiotensyny II, trimetazydynę i kwas acetylosalicylowy. Chorych na cukrzycę typu 2 leczono pochodnymi sulfonilomocznika (12 osób) lub insuliną (10 osób).

Z badań wykluczono osoby z ostrymi lub przewlekłymi stanami zapalnymi, z niewydolnością nerek lub wątroby. Badani byli pacjentami poradni lekarza rodzinnego w Poznaniu. Dane dotyczące wywiadu zaczerpnięto z ich kart choroby. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę lokalnej komisji etycznej.

U każdego chorego oznaczono: glikemię na czczo metodą enzymatyczną opartą na reakcji katalizowanej przez oksydazę glukozy; stężenie hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}) we krwi za pomocą testu *Abbott Imx Glycated Hemoglobin*, wykorzystującego reakcję powinowactwa wiązania boranowego; stężenia cholesterolu całkowitego, frakcji LDL i HDL; stężenie triglicerydów w surowicy oznaczono metodami enzymatycznymi. Do oceny ostrej hiper-

glikemii zastosowano pomiar stężenia 1,5-anhydro-D-glucitolu (1,5-AG) w osoczu. Związek 1,5-AG — polioliol (dezoksyglukoza), występujący w surowicy ludzkiej, charakteryzuje się stabilnym metabolizmem [16]. Podstawowym czynnikiem wpływającym na zmniejszenie stężenia 1,5-AG w osoczu jest hiperglikemia. Nawet jej krótkotrwały epizod wywołujący przekroczenie progu nerkowego dla glukozy powoduje gwałtowne wydalanie 1,5-AG z moczem [16, 17]. Ze względu na to, że stężenie HbA_{1c} nie odzwierciedla krótkotrwałych epizodów hiperglikemii [18], ocena stężenia 1,5-AG w osoczu stanowi niezbędne uzupełnienie panelu badań wymaganych do optymalizacji leczenia cukrzycy [17, 19, 20]. Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że obniżenie stężenia 1,5-AG w osoczu to czuły wskaźnik ostrej, krótkotrwałej hiperglikemii, w tym — hiperglikemii poposiłkowej występującej w ciągu 1–2 dni przed badaniem [19, 21].

Metodyka oznaczania stężenia 1,5-AG [22, 23]

Wstępna obróbka osocza polegała na usuwaniu z niego glukozy i innych monosacharydów za pomocą chromatografii jonowymiennej. Podstawą metody enzymatycznej oznaczania stężenia 1,5-AG w osoczu jest reakcja katalizowana przez oksydazę pyranozy (pyranaza: tlen 2-oksydoreduktaza PROD). W wyniku reakcji oksydacyjno-redukcyjnej grupa hydroksylowa w pozycji 2. cząsteczki 1,5-AG jest utleniana przez tlen cząsteczkowy przy udziale PROD. W celu ilościowego oznaczenia powstałego w wyniku tej reakcji nadtlenu wodoru przeprowadza się reakcję z udziałem peroksydazy chrzanowej (HRP, *horseradish peroxidase*), w której rolę donora wodoru pełni kwas 2,2-azino-bis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy) (ABTS). Pomiaru absorbancji ABTS w postaci utlenionej dokonuje się na spektrofotometrze przy długości fali 420 nm wobec ślepej próby [22, 23].

Wartości referencyjne 1,5-AG oznaczanego metodą enzymatyczną w osoczu wynoszą 13,8–31,8 mg/l. Współczynnik powtarzalności kształtuje się na poziomie 4,9% [23].

Metodyka oznaczania stężenia sFas (sAPO/CD₉₅) w surowicy

Stężenie sFas w surowicy oceniano metodą immunoenzymatyczną (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) w 2 powtórzeniach za pomocą zestawu firmy BenderMedSystems.

Płytkę opłaszczano monoklonalnym przeciwciałem skierowanym przeciwko sFas. Do dołków mikro-płytki dodawano standardowe rozcieńczenia badanego antygeny (sFas) lub badaną surowicę. Następ-

nie nakładano roztwór zawierający przeciwciało sprzężone z biotyną, skierowane przeciwko sFas związanemu z przeciwciałem opłaszczającym płytkę. Następnie dodawano streptawidynę sprzężoną z HRP, a w dalszej kolejności w celu uzyskania reakcji barwnej, dodawano tetrametylobenzydynę (TMB, *tetramethylbenzidine*), która jest substratem dla HRP. Absorbancję odczytywano przy długości fali 450 nm.

Czułość tej metody wynosi 200 pg/ml, natomiast współczynnik powtarzalności — 4,5%.

Statystyczne opracowanie wyników

Normalność rozkładu danych sprawdzano za pomocą testu Kołmogorowa-Smirnowa z poprawką Lilleforce'a oraz testu Shapiro-Wilka. Wyniki badań przedstawiono jako średnią \pm SD i/lub medianę z podaniem zakresu wartości (25–75%). Hipotezy statystyczne sprawdzano z użyciem testów: ANOVA *rang* Kruskalla-Wallis, mediany, a także U Manna-Whitneya. Związki między cechami badano za pomocą analizy regresji liniowej. Za znamienne statystycznie przyjęto wartości $p \leq 0,05$. Obliczeń statystycznych dokonano z zastosowaniem programu Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.).

Wyniki

W tabeli 1 przedstawiono charakterystykę kliniczno-biochemiczną badanych grup, w których chorzy byli w podobnym wieku i nie różnili się pod względem większości parametrów gospodarki lipidowej. W porównaniu z pozostałymi grupami glikemia na czczo oraz stężenia HbA_{1c}, 1,5-AG i cholesterolu frakcji LDL u chorych na cukrzycę były wyższe.

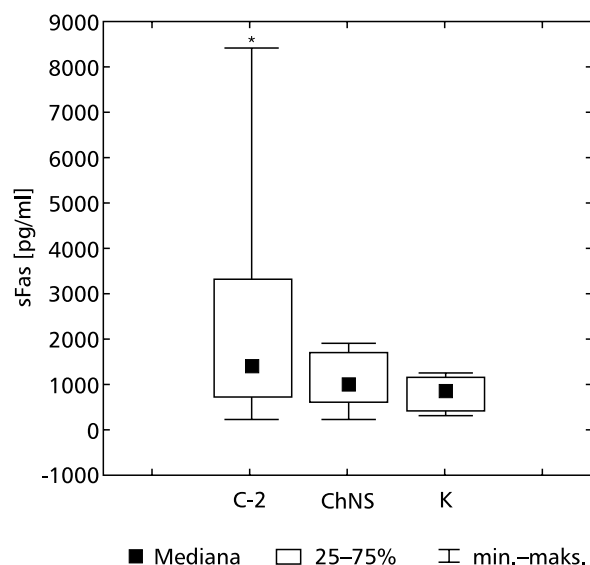
Na podstawie analizy przeprowadzonej z użyciem testu *rang* Kruskalla-Wallis wykazano znaczne zróżnicowanie stężeń sFas między badanymi grupami ($p < 0,00001$). Szczegółowa analiza za pomocą testu U Manna-Whitneya pozwoliła stwierdzić, że stężenie sFas w grupie chorych na cukrzycę było znacznie wyższe niż w grupie kontrolnej (ryc. 1). W grupie chorych na cukrzycę stwierdzono także największe zróżnicowanie stężeń sFas między poszczególnymi pacjentami (mediana — 1182 pg/ml, zakres 25–75%: 612–3328 pg/ml vs. pacjenci z chorobą niedokrwinną serca: mediana — 876 pg/ml, 25–75%: 622–1560 pg/ml i grupa kontrolna: mediana — 677 pg/ml, 25–75%: 369–1101 pg/ml).

Nie stwierdzono natomiast żadnych istotnych korelacji między stężeniem sFas u chorych na cukrzycę typu 2 a wartościami parametrów kontroli metabolicznej cukrzycy (glikemia na czczo, HbA_{1c}, stężenia: cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji HDL i LDL, triglicerydów) z wyjątkiem związku ob-

Tabela 1. Charakterystyka kliniczno-biochemiczna badanych grup

	Chorzy na cukrzycę typu 2 (n = 29)	Pacjenci z chorobą niedokrwienną serca (n = 10)	Grupa kontrolna (n = 10)
Wiek (lata)	58,7 ± 8,5	59,4 ± 7,6	58,9 ± 9,1
BMI [kg/m ²]	30,2 ± 1,2	29,9 ± 3,1	29,7 ± 2,6
Glikemia na czczo [mg/dl/mmol/l]	146,8 ± 59,0*	94,9 ± 13,0	98,2 ± 8,1
Stężenie HbA _{1c} (%)	6,5 ± 2,1*	5,9 ± 0,3	5,5 ± 0,4
1,5-AG [mg/l]	14,4 ± 5,7*	17,0 ± 1,0	19,9 ± 1,2
Stężenie cholesterolu całkowitego [mg/dl/mmol/l]	203,7 ± 61,8	191,4 ± 53,4	190,1 ± 34,7
Stężenie cholesterolu frakcji HDL [mg/dl/mmol/l]	54,8 ± 14,3	58,2 ± 14,0	56,7 ± 12,0
Stężenie cholesterolu frakcji LDL [mg/dl/mmol/l]	137,6 ± 63,7*	108,4 ± 43,9	110,1 ± 34,8
Stężenie triglicerydów [mg/dl/mmol/l]	167,0 ± 76,0	121,4 ± 38,8	137,9 ± 55,0

*Różnica znamienne statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec pozostałych grup; BMI (*body mass index*) — wskaźnik masy ciała

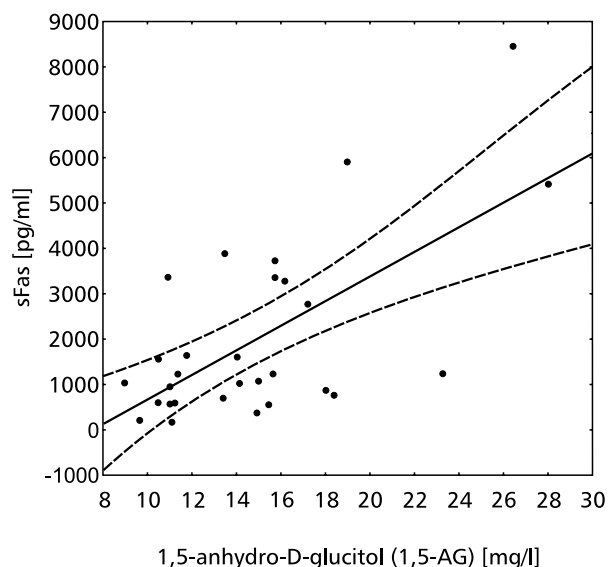


Rycina 1. Porównanie stężeń sFas w surowicy między badanymi grupami; C-2 — cukrzyca typu 2; ChNS — choroba niedokrwienna serca; K — grupa kontrolna; *różnica znamienne statystycznie dla $p \leq 0,05$ wobec grupy kontrolnej

serwowanego między stężeniem sFas a stężeniem 1,5-AG w osoczu ($r = 0,65$) (ryc. 2).

Dyskusja

Aktualnie obowiązująca koncepcja rozwoju miażdżycy uwzględnia, oprócz wpływu czynników wzrostu, zaburzeń gospodarki lipidowej i węglowodanowej, stresu oksydacyjnego, prozapalnych cyto-



Rycina 2. Korelacja między stężeniem 1,5-anhydro-D-glucitolu (1,5-AG) w osoczu a stężeniem sFas w surowicy u chorych na cukrzycę typu 2, $r = 0,65$. Zależność spełnia równanie: $y = (-1991) + 270,36x$

kin, również rolę, jaką w tym procesie odgrywa zaburzenie regulacji apoptozy [9]. W kontroli apoptozy komórek śródbłonna i mięśni gładkich ściany tętnic znaczący udział ma interakcja zachodząca między błonowym receptorem Fas (APO-1/CD₉₅) a jego ligandem FasL, zapoczątkowująca szereg procesów wewnątrzkomórkowych prowadzących do śmierci komórki [24]. Cząsteczki Fas i FasL wchodzą w skład błony komór-

kowej prawidłowych komórek śródbłonka, natomiast komórki mięśni gładkich ściany naczyń w swych błonach komórkowych zawierają wyłącznie cząsteczki Fas [25]. Indukcja apoptozy w komórkach mięśni gładkich zachodzi pod wpływem łączenia się Fas z FasL znajdującym się na powierzchni aktywowanych limfocytów lub makrofagów lub na skutek interakcji z FasL komórek śródbłonka. Nadmierne pobudzenie apoptozy komórek mięśniówki gładkiej ściany naczyń może prowadzić do destabilizacji blaszki miażdżycowej i progresji choroby niedokrwiennej serca [5].

Cząsteczki sFas wykazują powinowactwo do błonowego FasL różnych typów komórek i, wiążąc się z nim, uniemożliwiają interakcję między FasL a błonowym sFas. Dlatego uważa się, że cząstki sAPO-1/sFas krążące we krwi spełniają rolę inhibitora apoptozy [7]. Prawdopodobnie wysokie stężenia sFas decydują o zdolności ustroju do hamowania rozwoju miażdżycy. Wysokie stężenia sFas w surowicy chorych na cukrzycę typu 2 w porównaniu do innych badanych grup, w tym pacjentów wyłącznie z chorobą niedokrwinną serca, sugerują, że element ten stanowi czynnik obronny wytwarzany przez ustrój jako odpowiedź na wzmożoną apoptozę.

W świetle ostatnich badań nie ma wątpliwości co do twierdzenia, że czynnikiem sprawczym apoptozy komórek różnych typów u chorych na cukrzycę typu 2 jest hiperglikemia [4, 26]. Wyniki badań własnych wykazały, że istnieje związek między zdolnością hamowania apoptozy a stopniem kontroli cukrzycy. Stwierdzono, że decydujący wpływ na stężenie sFas w surowicy mają wyłącznie krótkotrwałe epizody hiperglikemii, mimo że glikemia na czczo czy też przewlekła hiperglikemia objawiająca się zwiększeniem stężenia HbA_{1c} u chorych na cukrzycę typu 2 nie determinują stężenia sFas. Obserwacja ta jest zbieżna z wynikami badań epidemiologicznych, które wskazały na ostrą (poposiłkową) hiperglikemię jako nadrzędny czynnik powodujący rozwój choroby niedokrwiennej serca u chorych na cukrzycę typu 2 i u osób z upośledzoną tolerancją glukozy [1–3]. Można więc sądzić, że skuteczna kontrola ostrej hiperglikemii, rozumiana jako utrzymanie wysokich stężeń 1,5-AG, jest niezbędna do prawidłowej regulacji apoptozy w komórkach układu sercowo-naczyniowego.

Przeprowadzone badania nie pozwalają na wysunięcie ostatecznych wniosków dotyczących relacji między stężeniem sFas w surowicy a poszczególnymi parametrami gospodarki lipidowej. Wprawdzie nie stwierdzono zależności między sFas a badanymi wskaźnikami, jednak w grupie chorych na cukrzycę typu 2 stężenia cholesterolu frakcji LDL były znacznie wyższe niż w pozostałych grupach. Niewy-

kluczone, że przeprowadzenie badań na liczniejszej grupie chorych pozwoliłoby jednoznacznie wyjaśnić ten problem, zwłaszcza w świetle danych dotyczących znaczenia utlenowanych i glikowanych cząstek LDL dla indukcji apoptozy [27, 28].

Podsumowując, można stwierdzić, że jednym z czynników istotnie wpływających na regulację apoptozy u chorych na cukrzycę typu 2 są epizody ostrej hiperglikemii, natomiast nasilenie przewlekłej hiperglikemii nie wiąże się bezpośrednio z ekspresją czynnika antyapoptotycznego sFas.

PIŚMIENNICTWO

1. The DECODE Study Group on behalf of the European Diabetes Epidemiology Group: Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. *Arch. Intern. Med.* 2001; 161: 397–405.
2. Balkau B., Shipley M., Jarrett R.J. i wsp.: High blood glucose concentration is a risk factor for mortality in middle-aged non-diabetic men. 20-year follow-up in the Whitehall Study, the Paris Prospective Study, and the Helsinki Policemen Study. *Diabetes Care* 1998; 21: 331–333.
3. Balkau B., Bertrain S., Ducimetiere P., Eschwege E.: Is there a glycemic threshold for mortality risk? *Diabetes Care* 1999; 22: 696–699.
4. Frustaci A., Kajstura J., Chimenti C. i wsp.: Myocardial cell death in human diabetes. *Circ. Res.* 2000; 87: 1123–1132.
5. Boyle J.J., Bowyer D.E., Weissberg P.L., Bennett M.R.: Human blood-derived macrophages induce apoptosis in human plaque-derived vascular smooth muscle cells by fas-ligand/Fas interactions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 9: 1402–1407.
6. Jakóbsiak M.: Immunologia, PWA, Warszawa 2000.
7. Chen J., Zhou T.: Protection from Fas-mediated apoptosis by soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994; 263: 1169–1178.
8. Ohtsuka T., Hamada M., Sasaki O., Suzuki M., Hara Y., Honda T.: Clinical implication of circulating soluble Fas and FasL in patients with acute myocardial infarction. *Cor. Art. Dis.* 1999; 10: 221–225.
9. Geng Y.J., Libby P.: Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 17: 1370–1380.
10. Troyanov S., Hebert M.J., Masse M., Vigneault N., Sirois I., Madore F.: Soluble Fas: a novel predictor of atherosclerosis in dialysis patients. *Am. J. Kid. Dis.* 2003; 5: 1043–1051.
11. Masse M., Hebert M.J., Troyanov S., Vigneault N., Sirois I., Madore F.: Soluble Fas is a marker of peripheral arterial occlusive disease in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002; 17: 485–491.
12. Guillot R., Bringuier A., Porokhov B., Guillaesau P.J., Feldmann G.: Increased serum levels of soluble Fas (sFas) in serum from diabetic patients with neuropathy. *Diabetes Metab.* 2001; 3: 315–321.
13. Murata I., Takemura G., Asano K. i wsp.: Apoptotic cell loss following cell proliferation in renal glomeruli of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats, a model of human type 2 diabetes. *Am. J. Nephrol.* 2002; 5–6: 587–595.
14. American College of Cardiology and American Heart Association. Postępowanie w przewlekłej stabilnej dławicy piersiowej. Aktualne (2002) stanowisko ACC/AHA. *Med. Prakt.* 2003; 11: 22–44.
15. European Diabetes Policy Group 1998–1999. Podręcznik postępowania w cukrzycy typu 2. *Med. Prakt.* 1999; supl. (104): 5.

16. Yamanouchi T., Tachibana Y., Akanuma H. i wsp.: Origin and disposal of 1,5-anhydroglucitol, a major polyol in the human body. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: E268–E273.
17. Yamanouchi T., Minoda S., Yabuuchi M. i wsp.: Plasma 1,5-anhydro-D-glucitol as a new clinical marker of glycemic control in NIDDM patients. *Diabetes* 1989; 38: 723–729.
18. Landenson J.H., Kwok-Ming C., Kilzer P.: Glycated hemoglobin and diabetes in case and overview of the subject. *Clin. Chem.* 1985; 6: 1060–1067.
19. Winiarska H., Dworacka M., Kuczyński S., Szczawińska K., Wierusz-Wysocka B.: Przydatność oznaczeń 1,5-anhydro-D-glucitolu w osoczu chorych na cukrzycę typu 2. *Diabet. Pol.* 1999; 3: 157–164.
20. Buse J.B., Freeman J.L.R., Edelman S.V., Jovanovic L., McGill J.B.: Serum 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark™): A short-term glycemic marker. *Diabetes Technol. Ther.* 2003; 5: 355–363.
21. Dworacka M., Winiarska H., Szymańska M., Kuczyński S., Szczawińska K., Wierusz-Wysocka B.: 1,5-Anhydro-D-glucitol: a novel marker of glucose excursions. *Int. J. Clin. Pract.* 2002; supl. 19: 40–44.
22. Yabuuchi M., Masuda M., Katoh K., Nakamura T., Akanaka H.: Simple enzymatic method for determining 1,5-anhydro-D-glucitol for diagnosis of diabetes mellitus. *Clin. Chem.* 1984; 35: 2039–2043.
23. Dworacka M., Szczawińska K., Winiarska H., Kuczyński S.: Przydatność oznaczeń 1,5-anhydro-D-glucitolu w osoczu chorych na cukrzycę typu 2. *Diagn. Lab.* 1997; 33: 269–276.
24. Cai W., Devaux B., Schaper W., Schmidt U.: The role of Fas/APO-1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1997; 131: 177–186.
25. Geng Y.J., Henderson L.E., Levesque E.B., Muszynski M., Libby P.: Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17: 2200–2208.
26. Mandrup-Poulsen T.: Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 8: 1433–1440.
27. Salvayre R., Auge N., Benoist H., Negre-Salvayre A.: Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; 2–3: 213–221.
28. Artwohl M., Graier W.F., Roden M.: Diabetic LDL triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Diabetes* 2003; 5: 1240–1247.