

Hubungan antara Kendali Glikemik pada Pasien Diabetes Melitus Tipe 2 dengan Aktivitas Sel *Natural Killer*

Correlation between Glycemic Control in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with Natural Killer Cell Activity

Dian Ristanti¹, Gatot Soegiarto², Hermina Novida³

¹Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, RSUD Dr. Soetomo, Surabaya

²Divisi Alergi & Imunologi Klinis, Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, RSUD Dr. Soetomo, Surabaya

³Divisi Endokrin Metabolik, Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, RSUD Dr. Soetomo, Surabaya

Korespondensi:

Gatot Soegiarto, Divisi Alergi & Imunologi Klinis, Departemen Ilmu Penyakit Dalam RSUD Dr. Soetomo – Fakultas Kedokteran Unair, Jl. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo no. 6-8, Surabaya, 60286. Email: gatotsby@yahoo.com

ABSTRAK

Pendahuluan. Sebagian besar penelitian terdahulu mendapatkan penurunan fungsi sel imunitas alami pada pasien diabetes melitus tipe 2 (DMT2) seperti sel neutrofil dan monosit-makrofag. Fungsi sel *natural killer* (NK) dan hubungannya dengan tingkat kendali glikemik belum banyak diteliti. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi aktivitas sel NK pada pasien DMT2 dan hubungannya dengan tingkat kendali glikemik.

Metode. Pasien DMT2 yang berobat di instalasi rawat jalan RSUD Dr. Soetomo Surabaya pada bulan Juli-Agustus 2018 dan memenuhi kriteria inklusi-eksklusi dilibatkan dalam penelitian ini. Kadar HbA1c diperiksa sesuai prosedur standar. Aktivitas sel NK diukur menggunakan *flowcytometer* dan dihitung berdasarkan persentase sel NK yang teraktivasi dari total jumlah sel NK. Selanjutnya, dilakukan uji korelasi untuk kedua variabel.

Hasil. Dari 38 subjek penelitian yang diikutsertakan secara konsekutif didapatkan 15 laki-laki dan 23 perempuan, dengan rerata usia 52 tahun (simpang baku [SB] 6 tahun). Subjek penelitian rutin menggunakan terapi OAD (36,8%), insulin (44,7%), atau terapi kombinasi OAD-Insulin (18,4%). Median kadar HbA1c adalah 7,8% (rentang: 5,5-13%). Median aktivitas sel NK adalah sebesar 7,08% (rentang: 21,55-2,95%). Dengan uji Spearman tidak didapatkan hubungan bermakna antara kadar HbA1c dengan aktivitas sel NK ($r=0,292$ dengan nilai $p=0,075$).

Simpulan. Tingkat kendali glikemik pada pasien DMT2 tidak terbukti memengaruhi aktivitas sel NK. Perlu dilakukan eksplorasi lebih lanjut apakah pada pasien DMT2 terdapat perubahan sel NK yang berkontribusi pada penurunan fungsi imunitas alami.

Kata Kunci: Aktivitas sel *natural killer*, Diabetes melitus tipe 2, Disfungsi imunitas alami, HbA1c

ABSTRACT

Introduction. Most of the previous studies showed decreased polymorphonuclear cells and monocytes/macrophages in type 2 diabetes mellitus (T2DM). Natural killer (NK) cell functions were rarely studied in T2DM. This study aimed to evaluate NK cell activity and determine its correlation with glycemic control in T2DM patients.

Methods. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients who regularly visit the diabetes outpatient clinic of Dr. Soetomo General Hospital during July – August 2018 and fulfill the inclusion-exclusion criteria were recruited to the study. The HbA1c level was measured according to the standard procedure. The NK cell activity was measured using flow cytometry and expressed as the percentage of activated NK cells from total NK cell numbers. Correlation between the two variables was determined.

Results. There were 38 subjects eligible for this study, consisted of 15 males and 23 females, with mean of age 52 (standard deviation [SD] 6) years. The subjects routinely received OAD (36.8%), insulin (44.7%), or OAD-Insulin combination therapy (18.4%). Median HbA1c was 7.8% (range: 5.5 – 13%). Median NK cell activity was 7.08% (range: 2.95 – 21.55%). Using a Spearman test, there was no significant correlation between HbA1c levels and NK cell activity ($r=0.292$; $p=0.075$).

Conclusions. The glycemic control in T2DM did not significantly influence NK cell activity. Further exploration and research should be done to determine whether there were changes in NK cells that contribute to innate immune dysfunction in T2DM patients.

Keywords: HbA1c, Innate immune dysfunction, Natural killer cell activity, Type 2 Diabetes Mellitus

PENDAHULUAN

Diabetes melitus tipe 2 (DMT2) merupakan kelainan metabolik yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa dan resistensi insulin.^{1,2} Pasien DMT2 umumnya lebih rentan terhadap infeksi, terutama yang kendali glikemiknya buruk.³⁻⁵ Hal tersebut dapat disebabkan oleh penurunan fungsi imun pada DMT2.

Beberapa penelitian yang mengevaluasi fungsi imun pada pasien DMT2 mendapatkan adanya gangguan imunitas alami maupun imunitas adaptif. Beberapa gangguan tersebut antara lain berupa penurunan sekresi sitokin interleukin 1 (IL-1) dan IL-6 oleh sel neutrofil maupun monosit, penurunan mobilisasi, kemotaksis dan fagositosis oleh sel-sel fagosit, penurunan respons sel T, dan gangguan imunitas humoral.⁶⁻¹⁰

Fungsi sel *natural killer* (NK) dan hubungannya dengan tingkat kendali glikemik belum banyak diteliti.^{11,12} Sel NK sangat penting peranannya dalam melawan infeksi virus dan mengendalikan pertumbuhan kanker. Sementara itu, pasien DMT2 dengan kontrol glikemik buruk mempunyai risiko lebih tinggi untuk mengalami infeksi virus dan kanker.^{13,14} Mengingat belum ada data tentang fungsi sel NK pada pasien DMT2 di Indonesia, penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi aktivitas sel NK dan hubungannya dengan tingkat kendali glikemik pada pasien DMT2.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian analitik dengan desain potong lintang. Kriteria inklusi meliputi: perempuan dan laki-laki berusia 30-60 tahun, terdiagnosis DMT2 menurut kriteria Perkumpulan Endokrinologi Indonesia (PERKENI)¹ 2015, berobat teratur di Poliklinik Diabetes dan Endokrin RSUD Dr. Soetomo Surabaya, dan bersedia menandatangani lembar *informed consent*. Kriteria eksklusi meliputi: pasien dengan kelainan autoimun, sedang mengalami infeksi simptomatik, menderita penyakit keganasan, sedang hamil atau mengalami abortus berulang, sedang menggunakan obat immunosupresan atau mendapat suplemen *zinc*, pasien dengan obesitas, dan perokok aktif. Dari rekam medis dicatat data tentang demografi subjek, durasi menyandang DMT2, jenis terapi yang diperoleh, serta jenis komplikasi yang sudah dialami. Berdasarkan rumus perhitungan besar sampel penelitian korelasi, didapatkan besar sampel minimal adalah 37,81 yang dibulatkan menjadi 38 orang.

Tingkat kendali glikemik dinyatakan sebagai kadar HbA1c yang diukur dengan metode imunoaglutinasi menggunakan alat DCA Vantage™ dan reagens DCA Vantage HgbA1C (Siemens Medical Solutions Diagnostics,

Tarrytown, NY). Hasil pengukuran tingkat kendali glikemik dinyatakan dalam satuan persen (%). Identifikasi dan pengukuran sel NK dalam darah tepi dilakukan dengan *flow cytometry* dengan alat BD FACSCalibur™ dari BD Biosciences (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) berdasarkan ekspresi molekul permukaan CD3⁺CD16⁺CD56⁺. Aktivitas sel NK dinyatakan sebagai persentase sel NK yang mengekspresikan penanda (*marker*) aktivasi yaitu CD56⁺CD69⁺. Aktivitas sel NK dihitung sebagai jumlah sel NK yang mengekspresikan CD56⁺CD69⁺ dibagi jumlah total *event* sel NK (baik yang mengekspresikan CD56⁺CD69⁺ maupun CD56⁺CD69⁻) dikalikan 100%. Antibodi yang digunakan untuk analisis sel NK meliputi: anti CD3 terkonjugasi *fluorescein isothiocyanate* (FITC), anti CD16⁺CD56⁺ terkonjugasi *phycoerythrin* (PE), anti CD45 terkonjugasi *peridinin chlorophyll protein* (PerCP) [BD Tritest™ CD3/CD16+CD56/CD45 *catalog* no. 34211 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)]; dilanjutkan dengan antibodi anti-CD56 terkonjugasi *fluorescein isothiocyanate* (FITC), anti-CD69 terkonjugasi *phycoerythrin* (PE), dan anti-CD45 terkonjugasi *peridinin chlorophyll protein* (PerCP) [BD FastImmune™ CD56/CD69/CD45 *catalog* no. 340417 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)]. Semua pemeriksaan dilakukan di laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo dengan menggunakan alat yang sudah dikalibrasi.

Normalitas distribusi data diperiksa dengan uji Saphiro Wilk. Uji statistik Spearman digunakan untuk menentukan korelasi antarkedua variabel yang berdistribusi tidak normal. Data dianalisis menggunakan program SPSS for Windows versi 23.0. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Soetomo Surabaya dengan nomor 0270/KEPK/V/2018.

HASIL

Sejak Juli hingga Agustus 2018, didapatkan sebanyak 38 subjek terpilih yang sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Subjek terdiri dari 15 laki-laki (39,5%) dan 23 perempuan (60,5%). Karakteristik umum subjek penelitian dapat dilihat pada Tabel 1. Median durasi mengidap DMT2 adalah 5 tahun (rentang: 1-18 tahun). Sebagian besar subjek mendapatkan terapi insulin (44,7%), disusul dengan terapi *oral antidiabetic* (OAD) (36,8%). Sebagian besar subjek (57,9%) belum mengalami komplikasi nefropati, retinopati, maupun kardiovaskular.

Tabel 1. Karakteristik umum subjek penelitian

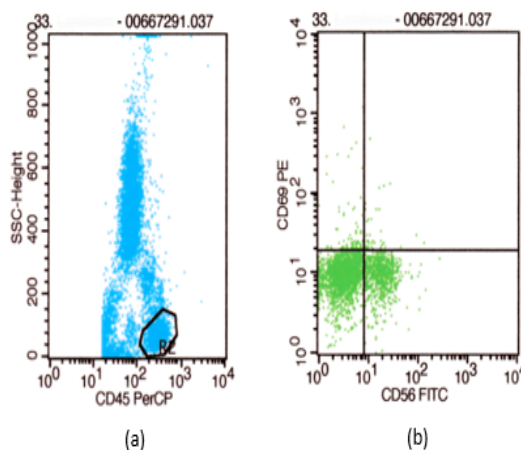
Karakteristik	N=38
Umur (tahun), median (rentang)	54 (41 - 60)
Jenis kelamin perempuan, n (%)	23 (60,5)
Durasi mengidap DMT2 (tahun), median (rentang)	5 (1 - 18)
Indeks massa tubuh (IMT) (kg/m ²), median (rentang)	23,21 (19,72- 25,39)
Terapi, n (%)	
OAD	14 (36,8)
Insulin	17 (44,7)
Kombinasi OAD-insulin	7 (18,4)
Komplikasi, n (%)	
Tanpa komplikasi	22 (57,9)
Nefropati diabetik	7 (18,4)
Retinopati diabetik	4 (10,5)
Kardiovaskular	5 (13,2)

DMT2: diabetes melitus tipe 2; OAD: oral antidiabetic

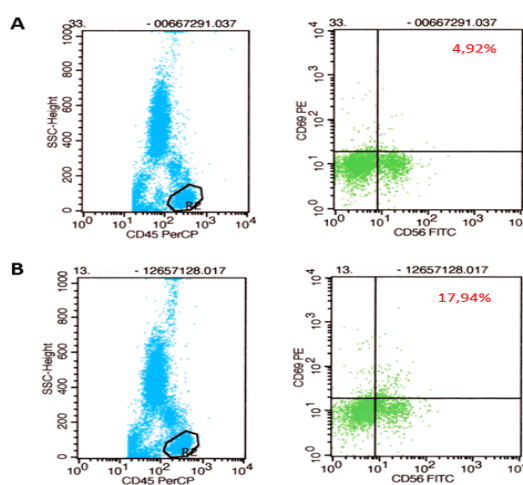
Hasil pemeriksaan HbA1c menunjukkan distribusi data yang tidak normal. Median kadar HbA1c adalah 7,8% (rentang: 5,5-13,0%). Untuk menentukan persentase sel NK teraktivasi, pertama dilakukan *gating* pada grafik dot plot (*scattergram*) CD45 vs. *side scatter* (SSC) (Gambar 1 (a)). Populasi limfosit, termasuk sel NK berada pada *cluster* CD45 *bright* dan SSC *low*. Selanjutnya, pada grafik dot plot (*scattergram*) CD56 vs. CD69 dilakukan pemisahan antara populasi sel CD56⁻ dan CD56⁺ dengan garis vertikal, dan pemisahan antara populasi sel CD69⁻ dan CD69⁺ dengan garis horizontal. Dengan demikian, populasi sel NK teraktivasi (CD56⁺CD69⁺) berada pada kuadran kanan atas (Gambar 1 (b)).

Persentase sel NK teraktivasi dihitung berdasarkan jumlah sel *event* yang mengekspresikan CD56⁺CD69⁺ (kuadran kanan atas) dibagi dengan jumlah *event* sel NK total, yaitu sel yang mengekspresikan CD56⁺CD69⁺ (kuadran kanan atas) maupun CD56⁺CD69⁻ (kuadran kanan bawah) (Gambar 1 (b)) kemudian dikalikan 100%. Persentase sel NK teraktivasi menunjukkan distribusi data yang tidak normal. Median sel NK teraktivasi adalah 7,08% (rentang: 2,95-21,55%). Gambar 2A menunjukkan representasi subjek dengan aktivitas sel NK yang rendah, sedangkan Gambar 2B merupakan representasi subjek dengan aktivitas sel NK yang tinggi.

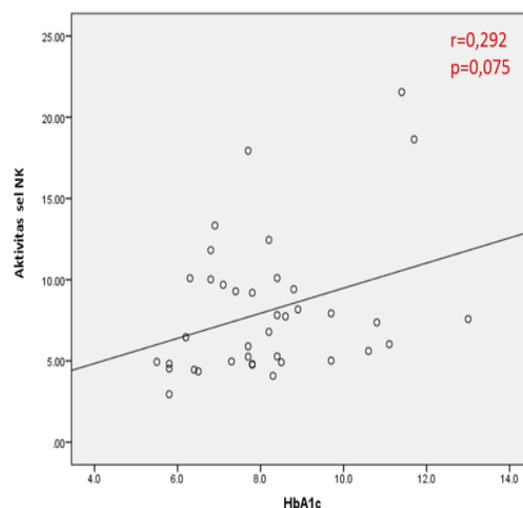
Uji korelasi Spearman antara kadar HbA1c dengan persentase sel NK teraktivasi menghasilkan nilai $r=0,292$ ($p=0,075$) (Gambar 3).



Gambar 1. Grafik dot plot untuk penentuan aktivitas sel NK



Gambar 2. Persentase sel NK teraktivasi pada pasien DMT2



Gambar 3. Korelasi antara kadar HbA1c dengan persentase sel NK teraktivasi

DISKUSI

Sepengetahuan penulis, penelitian ini merupakan yang pertama di Indonesia yang mengevaluasi aktivitas sel NK pada pasien DMT2 dan korelasinya dengan tingkat kendali glikemik. Berbeda dengan perkiraan sebelumnya, kendali glikemik ternyata tidak berkorelasi dengan tingkat aktivitas sel NK (Gambar 3). Tingkat kendali glikemik pada penelitian ini ditentukan berdasarkan kadar HbA1c yang diukur dengan metode inhibisi aglutinasi lateks (*inhibition of latex agglutination*), sedangkan aktivitas sel NK dinyatakan sebagai persentase sel NK aktif yang diukur dengan teknik *flow cytometry*.

Pengukuran HbA1c merupakan hal yang sangat penting dalam tata laksana DM. Metode inhibisi aglutinasi lateks dikerjakan menggunakan alat DCA Vantage™ dan reagen DCA Vantage HgbA1C (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY).¹⁵ Metode ini merupakan pemeriksaan HbA1c *point-of-care* yang dapat mengeluarkan hasil pemeriksaan dengan cepat sehingga menguntungkan untuk dipakai di poliklinik maupun bangsal rumah sakit. Selain itu, dalam beberapa penelitian komparasi telah dibuktikan bahwa metode ini setara dengan pemeriksaan HbA1c berbasis laboratorium yang menggunakan metode standar *ion exchange high-performance liquid chromatography* (HPLC). Selain memiliki akurasi dan presisi yang dapat diterima, hasil pemeriksaan dengan alat DCA Vantage™ dan reagen DCA Vantage HgbA1C juga telah memenuhi standar sertifikasi National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP).¹⁵⁻¹⁷

Pengukuran aktivitas sel NK dapat dilakukan dengan beberapa metode. Metode konvensional yang dikembangkan pada tahun 1960-an adalah ⁵¹Chromium release assay (CRA). Metode ini mengharuskan peneliti menggunakan sel target yang dilabel dengan radioisotop ⁵¹Cr untuk menghitung jumlah radioisotop yang dikeluarkan oleh sel target yang dilisis oleh sel NK.¹⁸ Dengan adanya teknik *flow cytometry*, kemudian dikembangkan metode alternatif yang lebih sederhana tanpa menggunakan sel target, antara lain pengukuran ekspresi *lysosome-associated membrane protein-1* (LAMP-1), ekspresi NKG₂D dan NK_{p46}, peningkatan ekspresi CD56, atau pengukuran ekspresi CD69.^{11,18-20} Pada penelitian kami dilakukan pengukuran aktivitas sel NK dengan mengukur ekspresi CD69 dan CD56. Metode ini dipilih karena lebih sederhana, lebih murah, tanpa melibatkan proses stimulasi sel NK dengan K562 *cell line*, dan telah dibuktikan memiliki kesetaraan dengan metode standar CRA ($r=0,765$; nilai $p < 0,001$).²⁰

Sel NK (CD3⁺CD56⁺ NK) merupakan sel imun yang

penting untuk melawan infeksi virus dan mengendalikan pertumbuhan sel kanker.^{21,22} Telah diketahui bahwa CD69 merupakan salah satu penanda (*marker*) spesifik paling awal untuk mengidentifikasi aktivasi sel NK.²³ Sel NK yang teraktivasi akan melepaskan sitokin-sitokin yang mengaktifkan sel NK lainnya dan sel-sel imunitas seluler lainnya secara umum. Peningkatan ekspresi CD69 berasosiasi dengan peningkatan sitotoksitas sel NK dan lisis sel target.²⁴ Beberapa peneliti memilih CD69 sebagai penanda aktivasi sel NK karena molekul tersebut dianggap merupakan penanda awal dan akurat.

Masih belum banyak penelitian tentang aktivitas sel NK pada pasien DMT2.^{11,25} Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa aktivitas sel NK pada DMT2 menurun,^{11,25} namun masih sangat jarang penelitian yang mengaitkannya dengan tingkat kendali glikemik pasien. Penelitian Berrou, dkk.¹¹ mengukur ekspresi NKG₂D dan NK_{p46} sebagai penanda aktivasi sel NK dan mendapatkan bahwa pasien DMT2 mengalami penurunan aktivitas sel NK yang berkorelasi negatif dengan kadar HbA1c. Beberapa mekanisme yang diduga dapat menjelaskan temuan tersebut antara lain yaitu pengaruh hiperglikemia terhadap ekspresi transporter glukosa (GLUT1, GLUT3, dan GLUT4).²⁶

Glukosa merupakan sumber energi penting untuk metabolisme dan aktivitas sel, termasuk sel-sel imun tubuh seperti leukosit dan sel NK. Gangguan ekspresi transporter glukosa akan menyebabkan sel-sel imun, termasuk sel NK kekurangan energi dan tidak dapat berfungsi sebagaimana mestinya.²⁶ Selain itu, hiperglikemia pada pasien DMT2 dapat menyebabkan stres pada retikulum endoplasmik yang selanjutnya dapat menyebabkan penurunan ekspresi reseptor aktivasi sel NK seperti NKG₂D.¹¹ Dengan demikian, kendali glikemik yang buruk pada pasien DM dapat menyebabkan gangguan aktivitas sel NK, yang dapat menjelaskan adanya peningkatan kerentanan pasien DM terhadap infeksi virus dan kanker.

Penelitian Berrou, dkk.¹¹ bertolak belakang dengan penelitian Guo, dkk.²⁷ yang justru mendapatkan peningkatan aktivitas sel NK pada pasien DMT2. Guo, dkk.²⁷ meneliti aktivitas sel NK dengan mengukur ekspresi NKG₂D dan *lysosome-associated membrane protein-1* (LAMP-1) atau CD107a pada pasien DMT2 dan membandingkannya dengan individu sehat sebagai kontrol. Aktivitas sel NK pada DMT2 secara bermakna lebih tinggi dibandingkan kontrol. Selain itu, persentase sel NK teraktivasi yang mengekspresikan NKG₂D berkorelasi positif dengan indeks massa tubuh (IMT).²⁷ Rerata IMT pada penelitian mereka adalah 30,54 kg/m² (obesitas) dan baru saja terdiagnosis sebagai DMT2. Mungkin karena itulah mereka menduga

bahwa peningkatan aktivitas sel NK tersebut terlibat dalam patogenesis DMT2 pada subjek penelitian.²⁷

Pada penelitian kami, median persentase sel NK yang teraktivasi adalah 7,08% (rentang: 2,95-21,55%) dan tidak kami bandingkan dengan kontrol individu sehat. Belum ada data tentang aktivitas sel NK pada populasi sehat di Indonesia. Penelitian Sato, dkk.²⁰ di Jepang yang menggunakan metode dan reagen yang sama dengan penelitian kami mendapatkan bahwa rerata sel NK teraktivasi pada kelompok individu sehat adalah sebesar 11,0% (simpang baku [SB] 0,9%).²⁰ Jika hasil penelitian Sato, dkk.²⁰ tersebut dianggap dapat diekstrapolasi pada populasi sehat di Indonesia, maka pasien DMT2 pada penelitian kami jelas mengalami penurunan aktivitas sel NK, senada dengan temuan Berrou, dkk.¹¹

Berbeda dengan penelitian Berrou, dkk.¹¹, pada penelitian kami tidak terbukti adanya korelasi antara kadar HbA1c dengan aktivitas sel NK ($r=0,292$; $p=0,075$). Hal tersebut mungkin disebabkan oleh perbedaan metode pengukuran aktivitas sel NK pada kedua penelitian. Selain itu, pada penelitian Berrou, dkk.¹¹ ada sekitar separuh dari subjek penelitian yang pernah mengalami infeksi berat hingga membutuhkan perawatan rumah sakit dalam kurun waktu lima tahun sebelumnya. Semua subjek penelitian mereka mengalami komplikasi diabetik, antara lain penurunan laju filtrasi glomerulus (~ 70 ml/min/1,73 m²).¹¹ Sebaliknya, pada penelitian kami sebagian besar pasien (57,9%) belum mengalami komplikasi dan hanya 7 orang (18,4%) yang mengalami nefropati diabetik. Mungkin dengan semakin lama atau semakin parahnya penyakit DMT2 yang dialami subjek penelitian kami, akan didapatkan kesimpulan yang sama dengan Berrou, dkk.¹¹

SIMPULAN

Sebagai kesimpulan, penelitian kami mengindikasikan adanya penurunan aktivitas sel NK pada pasien DMT2 yang dapat menjelaskan kerentanan pasien DMT2 terhadap infeksi virus dan kanker. Aktivitas sel NK tidak berhubungan dengan tingkat kendali glikemik pasien. Hubungan antara tingkat kendali glikemik dengan aktivitas sel NK sangat mungkin juga dipengaruhi oleh kondisi klinis pasien seperti tingkat kegemukan (IMT) dan adanya komplikasi-komplikasi akibat diabetes yang dialami pasien. Masih diperlukan penelitian lebih lanjut dengan melibatkan jumlah pasien DMT2 yang lebih banyak dan melibatkan multisenter untuk mengevaluasi penurunan fungsi imunitas alami pada pasien DMT2.

DAFTAR PUSTAKA

1. Perkumpulan Endokrinologi Indonesia (PERKENI). Konsensus

pengelolaan dan pencegahan diabetes melitus tipe 2 di Indonesia. Jakarta: Pengurus Besar Perkumpulan Endokrinologi Indonesia; 2015.

- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes—2017 abridged for primary care providers. *Clin Diabetes*. 2017;35(1):5–26.
- Mor A, Dekkers OM, Nielsen JS, Beck-Nielsen H, Sørensen HT, Thomsen RW. Impact of glycemic control on risk of infections in patients with type 2 diabetes: a population-based cohort study. *Am J Epidemiol*. 2017;186(2):227–36.
- Critchley JA, Carey IM, Harris T, DeWilde S, Hosking FJ, Cook DG. Glycemic control and risk of infections among people with type 1 or type 2 diabetes in a large primary care cohort study. *Diabetes Care*. 2018;41(10):2127–35.
- McGovern AP, Hine J, de Lusignan S. Infection risk in elderly people with reduced glycaemic control. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;4(4):303–4.
- Flyvbjerg A. Diabetic angiopathy, the complement system and the tumor necrosis factor superfamily. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6(2):94–101.
- Geerlings SE, Brouwer EC, Van Kessel KC, Gaastra W, Stolk RP, Hoepelman AI. Cytokine secretion is impaired in women with diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest*. 2000;30(11):995–1001.
- Price CL, Hassi HO, English NR, Blakemore AI, Stagg AJ, Knight SC. Methylglyoxal modulates immune responses: relevance to diabetes. *J Cell Mol Med*. 2010;14(6B):1806–15.
- Marhoffer W, Stein M, Maeser E, Federlin K. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care*. 1992;15(2):256–60.
- Casqueiro J, Casqueiro J, Alves C. Infections in patients with diabetes mellitus: a review of pathogenesis. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012;16(Suppl1):S27–36.
- Berrou J, Fougeray S, Venot M, Chardiny V, Gautier J-F, Dulphy N, et al. Natural killer cell function, an important target for infection and tumor protection, is impaired in type 2 diabetes. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e62418.
- Fidan I, Yüksel S, Kalkanci A, Imir T, Kustimur S. Evaluation of the natural killer cytotoxicity and the levels of cytokines in rats with type I diabetes mellitus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(8):883–7.
- Hillson R. Viruses and diabetes. *Practical Diabetes*. 2016;33(6):190–3.
- de Beer JC, Liebenberg L. Does cancer risk increase with HbA1c, independent of diabetes? *Br J Cancer*. 2014;110(9):2361–8.
- Szymezak J, Leroy N, Lavalard, Gillery P. Evaluation of the DCA Vantage analyzer for HbA1c assay. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(8):1195–8.
- Lenters-Westra E, Slingerland RJ. Six of eight hemoglobin A1c point-of-care instruments do not meet the general accepted analytical performance criteria. *Clin Chem*. 2010;56(1):44–52.
- Health Quality Ontario. Point-of-care hemoglobin A1c testing: an evidence-based analysis. *Ont Health Technol Assess Ser*. 2014;14(8):1–30.
- Nishimura Y, Kumagai-Takei N, Lee S, Matsuzaki H, Yoshitome K, Otsuki T. A new method to determine Natural Killer cell activity without target cells. In: Mourad Aribi, editor. *Natural killer cells*. London: IntechOpen; 2017. p.161–72.
- Dons'koi BV, Chernyshov VP, Osypchuk DV. Measurement of NK activity in whole blood by the CD69 up-regulation after co-incubation with K562, comparison with NK cytotoxicity assays and CD107a degranulation assay. *J Immunol Methods*. 2011;372(1–2):187–95.
- Sato N, Kikuchi S, Sato K. Quantifying the stress induced by distress in patients with lumbar disc herniation in terms of natural killer cell activity measurements: chromium release assay versus multiparameter flow cytometric assay. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2002;27(19):2095–100.
- Brandstadter JD, Yang Y. Natural killer cell responses to viral infection. *J Innate Immun*. 2011;3(3):274–9.
- Sharma P, Kumar P, Sharma R. Natural killer cells - their role in tumour immunosurveillance. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(8):BE01–5.
- Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Pena J, Solana R. CD69 is a

stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology*. 1999;97(1):159-65.

24. Fogel LA, Sun MM, Geurs TL, Carayannopoulos LN, French AR. Markers of nonselective and specific NK cell activation. *J Immunol*. 2013;190(12):6269–76.
25. Menart-Houtermans B, Rütter R, Nowotny B, Rosenbauer J, Koliaki C, Kahl S, et al. Leukocyte profiles differ between type 1 and type 2 diabetes and are associated with metabolic phenotypes: results from the German Diabetes Study (GDS). *Diabetes Care*. 2014;37(8):2326-33.
26. Piatkiewicz P, Czech A, Tatoń J. Glucose transport in human peripheral blood lymphocytes influenced by type 2 diabetes mellitus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007;55(2):119-26.
27. Guo H, Xu B, Gao L, Sun X, Qu X, Li X, et al. High frequency of activated natural killer and natural killer T-cells in patients with new onset of type 2 diabetes mellitus. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012;237(5):556-62.