

Dorota Zozulińska, Bogna Wierusz-Wysocka

Klinika Chorób Wewnętrznych i Diabetologii, Wydziału Nauk o Zdrowiu Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Rola granulocytów obojętnochłonnych w patogenezie przewlekłych powikłań cukrzycy

The role of polymorphonuclear neutrophils in the pathogenesis of late diabetic complications

„Przedstawiony zespół zaburzeń komórkowych i humoralnych rozwijających się w obrębie układu krążenia u chorych na cukrzycę przypomina do złudzenia zmiany obserwowane w typowym ognisku zapalnym. Wysunięta koncepcja udziału granulocytów obojętnochłonnych w patogenezie zmian naczyniowych towarzyszących cukrzycy podkreśla udział tych komórek nie tylko w mechanizmach obronnych ustroju. Wydaje się, że wyjątkowy dynamizm, a także charakterystyczne własności czynnościowe granulocytów obojętnochłonnych pozwalają na dopatrywanie się w tych komórkach znaczącego czynnika patogennego”.

B. Wierusz-Wysocka, Praca habilitacyjna, 1985 r.

STRESZCZENIE

Mimo znacznego postępu, jaki dokonał się w ostatnich latach w zakresie leczenia cukrzycy, nadal istotnym problemem klinicznym są jej przewlekłe powikłania. Wśród mechanizmów wyjaśniających przebieg zdarzeń prowadzących do rozwoju mikro- i makroangiopatii cukrzycowej istotną rolę przypisuje się procesowi zapalnemu i granulocytom obojętnochłonnym (PMN, *polymorphonuclear neutrophils*). W pracy omówiono miejsce PMN w patomechanizmie przewlekłych powikłań cukrzycy.

Adres do korespondencji: Dr hab. med. Dorota Zozulińska
Klinika Chorób Wewnętrznych i Diabetologii
Szpital im. Fr. Raszei
60-834 Poznań, ul. Mickiewicza 2
tel./faks (0 61) 847 45 79
e-mail: zozula@box43.pl

Diabetologia Praktyczna 2004, tom 5, 3, 139-142
Copyright © 2004 Via Medica
Nadesłano: 20.05.2004 Przyjęto do druku: 7.06.2004
Praca wygłoszona na II Karpackiej Konferencji Diabetologicznej
w Zakopanem, 20-23.05.2004 r.

Słowa kluczowe: granulocyty obojętnochłonne, cukrzyca, mikroangiopatia, makroangiopatia

ABSTRACT

Late diabetic complications still remain a crucial clinical problem in spite of impressive progress in the treatment of diabetes. It is suggested that inflammatory process and polymorphonuclear neutrophils (PMN) play an important role in the development of diabetic micro- and macroangiopathy. In this paper we discussed the relevance of PMN in the pathology of late diabetic complications.

Key words: polymorphonuclear neutrophils, diabetes mellitus, microangiopathy, macroangiopathy

W ostatnich latach procesowi zapalnemu przypisuje się coraz większe znaczenie w patogenezie przewlekłych powikłań cukrzycy. Pierwszą i ciągle aktualną definicję zapalenia zawdzięczamy rzymskie-

mu lekarzowi Celsusowi, który określił jego istotę, opisując cztery charakteryzujące go objawy: *rubor* (zaczerwienienie), *tumor* (obrzemienie), *dolor* (ból) i *calor* (ocieplenie). Opis ten został poszerzony przez Galena, który uzupełnił go o cechę zaburzenia funkcji dotkniętego zapaleniem narządu (*functio laesa*). Reakcja zapalna może mieć charakter fazy ostrej i przewlekłej. Jej zadaniem jest lokalizacja, a następnie wyeliminowanie patogenu oraz przywrócenie fizjologicznych funkcji tkanek i narządów. Odpowiedź immunologiczną organizmu dzieli się na nieswoistą (wrodzoną) i swoistą (nabytą). Wśród komórkowych mechanizmów odporności nieswoistej kluczową rolę odgrywają granulocyty obojętnochłonne (PMN, *polymorphonuclear neutrophils*) [1]. Stanowią one pierwszą linię obrony w stosunku do obcych dla organizmu czynników. Cechują się znaczną dynamiką i wrażliwością oraz krótką żywotnością. Są to duże komórki o średnicy 10–20 μm , które stanowią 60–70% puli krążących leukocytów. Komórki te regulują miejscową odpowiedź immunologiczną. W stanie spoczynku granulocyty krążą we krwi kilka godzin, gotowe do przejścia w stan pobudzenia. Jeżeli to nie nastąpi, ulegają one programowanej śmierci, czyli apoptozie. Część PMN opuszcza jednak układ krążenia i po kilku dniach ulega destrukcji w tkankach lub na powierzchni błon śluzowych [2]. W odpowiedzi na bodziec stymulujący granulocyty obojętnochłonne zmieniają swoje własności reologiczne, przystosowując się do ukierunkowanego ruchu (chemotaksja) oraz interakcji z innymi komórkami. W wyniku pobudzenia komórki przywierają do śródbłonna (adhezja) oraz wzajemnie do siebie (agregacja) [3]. Zasadniczą rolę w inicjowaniu destrukcji ściany naczyniowej prawdopodobnie odgrywają zaburzenia wzajemnego oddziaływania granulocytów obojętnochłonnych z komórkami śródbłonna, monocytami oraz płytkami krwi. Uwalniane wówczas mediatory reakcji zapalnej, między innymi: czynnik nekrotyzujący guza (TNF- α , *tumor necrosis factor- α*), interleukina 1 (IL-1), interleukina 8 (IL-8), czynnik aktywujący płytki krwi (PAF, *platelet activating factor*), leukotrien B₄ (LTB₄) lub składowe dopełniacza, modulują dalszy przebieg reakcji zapalnej [4, 5]. Stan pełnej aktywacji granulocytów obojętnochłonnych jest poprzedzony fazą preaktywacji. Krążące we krwi preaktywowane komórki „uzbrajają się” w receptory powierzchniowe, nieekspozowane w stanie spoczynku. Zjawisku temu towarzyszą zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu oraz częściowa degranulacja ziarnistości komórek. Preaktywowane granulocyty obojętnochłonne charakteryzują się większą wrażliwością na działanie kolejnych czynników stymulujących, czyli ulegają pełnemu pobudzeniu pod wpływem znacznie słabszych bodźców [6].

Czynnikami determinującymi przyleganie komórek do śródbłonna oraz wzajemne przyleganie komórek do siebie są cząsteczki adhezyjne. Specyficzne dla granulocytów obojętnochłonnych są należące do grupy integryn molekuly powierzchniowe CD11b/CD18. W adhezji PMN do śródbłonna, oprócz integryn, istotną rolę odgrywają również selektyny, a wśród nich selektyna E (*endothelial*), selektyna P (*platelet*) i ekspozowana na powierzchni leukocytów selektyna L (*leukocyte*). W interakcji granulocytów z komórkami śródbłonna biorą udział komplementarne dla molekuł leukocytarnych cząsteczki adhezyjne zlokalizowane na śródbłonnku. Ligandami dla CD11 są ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) i ICAM-2, a dla selektyny L — śródbłonkowe selektyny E i P [7, 8].

Pobudzone PMN nabywają zdolność przechodzenia przez śródbłonek (diapedeza), prawdopodobnie dzięki uwalnianiu z ziarnistości PMN proteaz trawiących białka błony podstawnej. W zjawisku diapedezy istotną rolę odgrywają również receptory powierzchniowe granulocytów obojętnochłonnych dla białek macierzy zewnątrzkomórkowej (lamininy, fibronektyny) [9]. Aktywacja PMN wiąże się także ze wzrostem produkcji wysoce reaktywnych form tlenu, takich jak: aniony nadadtlenkowe (O₂⁻), nadtlenek wodoru (H₂O₂), rodnik hydroksylowy (OH \cdot), oraz uwalnianiem białek enzymatycznych z ziarnistości lizosomalnych, między innymi mieloperoksydazy, elastazy, katepsyn, proteinazy, lizozymu. Ponadto, pobudzone granulocyty obojętnochłonne uwalniają pozakomórkowo metabolity kwasu arachidonowego oraz liczne cytokiny. Substancje te są odpowiedzialne za rozpoczęcie, a następnie modulowanie procesu zapalnego toczącego się w obrębie ściany naczynia i jego otoczenia [10, 11].

Hiperglikemia a aktywacja granulocytów obojętnochłonnych

Sugeruje się, że hiperglikemia może być przyczyną aktywacji PMN u chorych na cukrzycę. W warunkach utrzymujących się ponadfizjologicznych stężeń glukozy we krwi dochodzi do nasilenia wewnątrzkomórkowych przemian glukozy torem polioliowym oraz heksozomonofosforanowym, co prowadzi pośrednio do wzrostu syntezy diacyloglicerolu (DAG) i w konsekwencji — aktywacji kluczowego enzymu szlaku przekazywania sygnałów, jakim jest kinaza białkowa C (PKC, *protein kinase C*) [12, 13]. Przyczyną stymulacji PMN w warunkach hiperglikemii może być także zwiększona w osoczu ilość substancji aktywujących komórki poprzez mechanizm receptorowy, a mianowicie IL-1, IL-8, TNF- α , PAF, fibronektyny, czynnika von Willebranda oraz glikowanych białek [11, 14].

Cukrzyca a funkcje granulocytów obojętnochłonnych

W warunkach fizjologicznych krążące we krwi PMN znajdują się w stanie spoczynku. Natomiast u chorych na cukrzycę stwierdzono wykładniki aktywacji krążących PMN i równocześnie ich słabszą odpowiedź na bodźce stymulujące [15–17].

U chorych na cukrzycę wskazuje na to między innymi zwiększona ekspresja receptorów CD11b/CD18 na powierzchni krążących PMN. O aktywacji PMN świadczą także podwyższone stężenia rozpuszczalnych cząstek adhezyjnych w osoczu. Przyjmuje się bowiem, że wzrost stężenia rozpuszczalnej selektyny L w osoczu, obecnej na PMN, może być wykładnikiem stymulacji tych komórek. Pojawia się ona w osoczu w następstwie złuszczenia z powierzchni komórek pod wpływem TNF- α lub IL-1 [18]. U chorych na cukrzycę wyrazem aktywacji krążących PMN jest także, obserwowany przez wielu autorów, wzrost produkcji O₂⁻ i H₂O₂ [16–19]. Za wewnątrznaczyniową aktywacją krążących PMN mogą przemawiać również stwierdzane u chorych na cukrzycę podwyższone stężenia we krwi IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α [20, 21]. Cytokiny te, z jednej strony, stanowią silny bodziec stymulujący PMN, z drugiej natomiast — są uwalniane w następstwie aktywacji PMN.

W warunkach fizjologicznych stan aktywacji PMN poprzedza ich wędrówkę w kierunku czynników chemotaktycznych. Jednak u chorych na cukrzycę notowano osłabioną aktywność chemotaktyczną PMN [19], a także zdolność bakteriobójczą PMN [15]. Sugeruje się, że przewlekła preaktywacja wywołana przede wszystkim hiperglikemią prowadzi do osłabienia wrażliwości komórek na działanie kolejnych czynników stymulujących. Konsekwencją kliniczną opisanych zaburzeń funkcji PMN u chorych na cukrzycę są, z jednej strony, przewlekłe powikłania schorzenia, a z drugiej — większa skłonność do infekcji, chorób przyzębia lub gorsze gojenie się ran.

Granulocyty obojętnochłonne a przewlekłe powikłania cukrzycy

W badaniach eksperymentalnych na modelach mózgow i serc zwierzęcych zaobserwowano, że czasowa okluzja tętnicy i następcza reperfuzja nie dają pełnego powrotu krążenia w niedokrwionym obszarze [22, 23]. Zjawisko to powszechnie określa się jako *no-reflow*. W tej patologii istotną rolę odgrywa czopowanie naczyń mikrokrążenia przez granulocyty obojętnochłonne, których średnica jest równa lub większa od przekroju naczyń mikrokrążenia. Niedokrwienie/reperfuzja oraz hipoksja są silnymi bodźcami, prowadzącymi do aktywacji granulocytów obo-

jętnochłonnych. Pobudzone PMN wykazują zmniejszoną odkształcalność, nasiloną zdolność do przywierania i agregacji. Ponadto, uwalniane z PMN reaktywne pochodne tlenu i enzymy proteolityczne zaburzają funkcję i strukturę śródbłonna naczyniowego [24]. Zarówno hiperglikemia, jak i hipoglikemia prowadzą do wzrostu stosunku NADH/NAD⁺, wywołując tak zwaną metaboliczną hipoksję. Może ona prowadzić do zjawiska *no-reflow* oraz nasilenia angiogenezy [25].

Sugeruje się, że u chorych na cukrzycę aktywacja PMN odgrywa istotną rolę w rozwoju i progresji zarówno mikro-, jak i makroangiopatii cukrzycowej [24, 26]. Wykazano bowiem, że PMN biorą udział w zaburzeniach przepływu krwi i niedotlenieniu siatkówki, prowadząc do uszkodzenia bariery krew-siatkówka, utraty pericytów, apoptozy i nekrozy komórek nerwowych oraz angiogenezy. W nerkach aktywacja PMN przyczynia się do zwiększenia przepuszczalności naczyń, ekspansji *mezangium*, miejscowej aktywacji układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA, *renin-angiotensin-aldosterone*) oraz angiogenezy. Podobne zjawiska zachodzące w ścianie dużych i średnich tętnic biorą istotny udział w rozwoju miażdżycy. Granulocyty obojętnochłonne przyczyniają się do zainicjowania miażdżycy, jej progresji oraz przebudowy ściany naczyniowej. Nowotworzenie naczyń w obrębie blaszki miażdżycowej oraz podsyćanie miejscowej reakcji zapalnej prowadzą do jej niestabilności i w konsekwencji do ostrego niedokrwienia. Aktywowane w tych warunkach PMN mogą się stać głównym czynnikiem sprawczym poszerzenia strefy martwicy, pogorszenia parametrów hemodynamicznych, zaburzeń rytmu i zwiększonej umieralności okołozawałowej.

Podsumowanie

Rozważając mechanizmy odpowiedzialne za rozwój przewlekłych powikłań cukrzycy w kontekście reakcji zapalnej i stresu oksydacyjnego, należy zwrócić uwagę na dynamiczną pulę granulocytów obojętnochłonnych. Szersze poznanie udziału PMN w rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy być może w przyszłości przyniesie korzyści kliniczne.

PIŚMIENNICTWO

1. Tchórzewski H.: Rola neutrofilów w procesach zapalnych. W: Tchórzewski H. red. Zapalenie, patofizjologia i klinika. Med. Press, Warszawa 1998; 13–38.
2. Roitt I., Brostoff J., Male D.: Migracja komórek i zapalenie. W: Żeromski J. red. Immunologia, Wydawnictwo Medyczne, Słowiński Verlag, Brema 1996; 14.1–14.9.
3. Carlos T.M., Harlan J.M.: Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068–2101.
4. Ley O.: Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc. Res.* 1966; 32: 733–742.

5. Pober J.S., Cotran R.S.: Cytokines and Endothelial Cell Biology. *Physiol. Rev.* 1990; 70: 427–451.
6. Arnould T., Michiels C., Remade J.: Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia: involvement of PAF, CD18/CD11b and ICAM-1. *Am. J. Physiol.* 1993; 264 C: 1102–1110.
7. Patarroyo M., Makgoba M.W.: Leucocyte adhesion to cells in immune and inflammatory responses. *Lancet* 1989; 11: 1139–1141.
8. Libby P.: Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868–874.
9. Hoffman M., Arnon B., Baruch R., Kaplan E., Benjamin M.: Leukocytes and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2004; 172: 1–6.
10. Baynes J.W.: Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405–441.
11. Zeman K.: Rola neutrofilów w procesach zapalnych. W: Tchórzewski H. red. Zapalenie, patofizjologia i klinika. Med. Press, Warszawa 1998; 76–99.
12. Kreisberg J.I.: Hyperglycemia and microangiopathy; Direct regulation by glucose of microvascular cells. *Lab. Invest.* 1992; 67: 416–421.
13. Brownlee M.: Glycation and diabetic complication. *Diabetes Care* 1994; 43: 836–841.
14. Nguyen P., Broussas M., Hezard N., Cornillet P., Potron G.: Modulators of leukocytic functions. *J. Mal. Vasc.* 1998; 23: 119–124.
15. Wierusz-Wysocka B., Wysocki H., Siekierka H., Wykrętowicz A., Szczepanik A., Klimas R.: Evidence of polymorphonuclear neutrophils (PMN) activation in patients with diabetes mellitus. *J. Leuk. Biol.* 1987; 42: 519–524.
16. Wierusz-Wysocka B., Wykrętowicz A., Byks H., Sadurska K., Wysocki H.: Polymorphonuclear neutrophils adherence, superoxide anion production (O_2^-) and HbA1 level in diabetic patients. *Diab. Res. Clin. Pract.* 1993; 2: 109–114.
17. Zozulińska D., Wierusz-Wysocka B., Wysocki H., Majchrzak A., Wykrętowicz A.: The influence of IDDM duration on superoxide anions and hydrogen peroxide production by Polymorphonuclear Neutrophils. *Diab. Res. Clin. Pract.* 1996; 33: 139–144.
18. Grykiel K., Zozulińska D., Kostrzewa A., Wiktorowicz K., Wierusz-Wysocka B.: Ocena ekspresji receptorów powierzchniowych granulocytów obojętnochłonnych u chorych na cukrzycę typu 1. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2001; 5: 377–381.
19. Delamaire M., Maugeudre D., Moreno M., Le Goff M.C., Allanic H., Genetet B.: Impaired leukocytes functions in diabetic patients. *Diabet. Med.* 1997; 14: 29–34.
20. Zozulińska D., Majchrzak A., Sobieska M., Wiktorowicz K., Wierusz-Wysocka B.: Serum interleukin-8 is increased in diabetic patients. *Diabetologia* 1999; 42: 117–118.
21. Cassatella M.A.: The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Today* 1995; 16: 21–26.
22. Rezkalla S.H., Kloner R.A.: No-reflow phenomenon. *Circulation* 2002; 105: 656–662.
23. Eeckhout E., Kern M.J.: The coronary no-reflow phenomenon: a review of mechanisms and therapies. *Eur. Heart J.* 2001; 22: 729–739.
24. Schmid-Schönbein G.W.: The damaging potential of leukocyte activation in the microcirculation. *Angiology* 1993; 44: 45–56.
25. Giugliano D., Ceriello A.: Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19: 257–267.
26. Tsujikawa A., Kiryu J., Nonaka A. i wsp.: Leukocyte-endothelial cell interactions in diabetic retina after transient retinal ischaemia. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 2000; 279: R980–R989.