

(69)

Rola naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonka (VEGF) w patogenezie retinopatii cukrzycowej

The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in pathogenesis of diabetic retinopathy

Beata Urban¹, Jadwiga Peczyńska²

¹Z Kliniki Okulistyki Dziecięcej Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Alina Bakunowicz-Łazarczyk

²Z II Kliniki Chorób Dzieci Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Mirosława Urban

Summary: The authors present the role of VEGF in microaneurysm formation, blood-retinal barrier breakdown, development of capillary nonperfusion and retinal neovascularization in pathogenesis of diabetic retinopathy. Inhibitors of VEGF in treatment of diabetic retinopathy are presented.

Słowa kluczowe: naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonka (VEGF), retinopatia cukrzycowa, nowotwórstwo naczyniowe, inhibitory VEGF

Key words: vascular endothelial growth factor (VEGF), diabetic retinopathy, neovascularization, VEGF inhibitors.

Właściwości VEGF

W rozwoju i progresji retinopatii cukrzycowej istotną rolę odgrywają czynniki wzrostowe. Spośród nich największe zainteresowanie budzi naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonka (VEGF – vascular endothelial growth factor), określane również jako czynnik przepuszczalności naczyń (VPF – vascular permeability factor), który został odkryty w 1983 roku (1). Czynnikiem VEGF należy do rodziny cytokin wzrostowych pochodzących z płytek i jest homodimeryczną glikoproteiną, a jego gen jest zlokalizowany w prążku 21.3 chromosomu 6 (13). Ta cytokina występuje w 6 różnych formach dimerycznych, różniących się liczbą aminokwasów. Powstają one poprzez tzw. alternatywne składanie genu (splicing), czyli proces towarzyszący tworzeniu dojrzałego mRNA (1). Izoforny, mając podobną aktywność biologiczną, różnią się biodostępnością i punktami uchwytu swego działania (16). Najczęściej spotykane są dwie odmiany VEGF: 121 (VEGF-A) i 165 (VEGF-B), które są rozpuszczalnymi białkami, podczas gdy VEGF 189 (VEGF-C) i 206 (VEGF-D) są związane na powierzchni komórek z proteoglikanami, zawierającymi heparynę (1,13). Najmniej poznane są izoforny VEGF 145 i VEGF 183. Czynnikiem VEGF jest produkowany przez liczne komórki, ale wpływa przede wszystkim na komórki śródbłonka, bo to właśnie na nich są zlokalizowane jego receptory. Występują one w siatkówce, kłębuszkach nerkowych, aortcie, mięśniu sercowym, płucach, mózgu (1,13). Receptory VEGF, określane jako VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) i VEGFR-3 (Flt-4), są receptorami zależnymi od kinazy tyrozynowej (RTK – receptor tyrosine kinase), a ich stymulacja prowadzi do wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} w cytozolu komórek śródbłonka, aktywacji fosfolipazy C (PLC) i fosforylacji białek (1). Dla komórek *endothelium* najważniejsza jest fosforylacja PLC β , która przekształca fosforan inozytolu w diacyloglicerol (DAG), powodując aktywację i translokację białkowej kinazy C (PKC), która wywołuje

dalsze zmiany w tych komórkach (1). Czynnikiem wzrostowym VEGF różni się od innych czynników wzrostu tym, że jest on specyficznym mitogenem komórek śródbłonka i ma zdolność zwiększania przepuszczalności naczyń krwionośnych 50 000 razy silniej od histaminy (13). Jest on również induktorem angiogenezy *in vivo* (17). Ta cytokina wpływa bowiem na angiogenezę w czasie embriogenezy, jest również głównym regulatorem angiogenezy fizjologicznej (13). Czynnikiem VEGF jest także kluczowym mediatorem angiogenezy nowotworowej (1,17). Udowodniono również rolę tego czynnika wzrostowego w powstawaniu podsiatkówkowej neowaskularyzacji w przebiegu starczego zwyrodnienia plamki (17). Działanie czynnika VEGF jest wielokierunkowe i obejmuje: zwiększenie produkcji tkankowej kolagenazy; chemotaksję dla makrofagów, komórek śródbłonka i monocytów; pobudzenie produkcji aktywatorów plazminogenu i produkcji inhibitora aktywatora plazminogenu w komórkach śródbłonka; wzrost uwalniania czynnika von Willebranda przez *endothelium*, a także adhezję płytek do komórek śródbłonka poprzez aktywację czynnika tkankowego (tissue factor – TF) (1,13). Jak się okazuje, bardzo wiele związków zwiększa ekspresję genu VEGF i w rezultacie powoduje wzrost produkcji tego czynnika. Najważniejszym bodźcem do produkcji tej cytokiny wzrostowej jest niedotlenienie (16). Dochodzi wówczas do wzrostu transkrypcji genu VEGF poprzez aktywację tzw. czynnika transkrypcji HIF-1 (hypoxia inducible factor 1), a także do regulacji procesu translacji i stabilizacji VEGF mRNA. Kolejnymi induktorami syntezy VEGF są hiperglikemia, a także aktywacja białkowej kinazy C (3,16).

Znaczenie VEGF

w rozwoju retinopatii cukrzycowej

Rola naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonka w patogenezie retinopatii cukrzycowej została stwierdzona po raz pierwszy

w 1994 roku, kiedy wykryto zwiększony poziom tego czynnika w ciele szklistym u pacjentów z proliferacyjną retinopatią cukrzycową (3). Od tej pory jego wpływ na rozwój i progresję retinopatii cukrzycowej jest tematem licznych badań przede wszystkim ze względu na jego potencjalną aktywność naczyniotwórczą. U osób zdrowych czynnik VEGF nie występuje w narządzie wzroku lub są obecne jego śladowe ilości (głównie VEGF 165) w komórkach śródbłonna naczyń siatkówki i naczyńówki, w nabłonku barwnikowym oraz w leukocytach wewnątrznaczyniowych siatkówki i naczyńówki (9). Natomiast w oku pacjenta chorującego na cukrzycę stwierdza się znacznie większe stężenie tej cytokiny, dotyczy to również osób bez retinopatii cukrzycowej (2). W siatkówce zwiększone ilości czynnika VEGF występują wówczas w komórkach śródbłonna, ścianach naczyń siatkówkowych i w przestrzeniach okołonaczyniowych, a także w komórkach zwojowych, warstwie jądrowej wewnętrznej i komórkach Müllera. W obrębie naczyńówki duże ilości czynnika VEGF w przebiegu cukrzycy są obecne w obrębie śródbłonna choriokapilarów, śródbłonna nowotwórstwa naczyniowego i migrujących komórek nabłonka barwnikowego. U pacjentów z cukrzycą ta cytokina jest również obecna w wewnątrzgałkowym odcinku nerwu II, w ciele szklistym i cieczy wodnistej (2,9,16). Bodźcem do produkcji czynnika VEGF w narządzie wzroku pacjenta z cukrzycą jest przede wszystkim niedotlenienie, występujące na obszarach siatkówki pozbawionych perfuzji. Dochodzi wówczas do wytwarzania czynnika VEGF przez liczne komórki oka, takie jak komórki śródbłonna, perycyty, komórki Müllera, komórki nabłonka barwnikowego siatkówki i komórki zwojowe (1,16). Wzrost produkcji tej cytokiny wzrostowej w przebiegu cukrzycy jest wywołany również przez hiperglikemię i jej następstwo – końcowe zaawansowane produkty glikacji białek (AGE) (16). Powodują one zwiększenie ekspresji VEGF mRNA w komórkach śródbłonna naczyńówki (co prowadzi do ich proliferacji), w perycytach siatkówkowych (co wywołuje ich apoptozę) oraz w komórkach *endothelium* naczyń siatkówki poprzez wywołanie stresu oksydacyjnego i aktywację PKC (16). Podobne działanie mają angiotensyna II, interleukina 6 i insulina (4,11,14).

O tym, jaki jest potencjalny wpływ VEGF na siatkówkę w przebiegu cukrzycy, świadczą najlepiej badania Tolentino i wsp., którzy wywołali doświadczalną retinopatię doszkliskowym podaniem tego czynnika wzrostowego (15). Zaobserwowali oni w angiografii fluoresceinowej takie zmiany jak: tworzenie mikroaneuryzmatów; obliteracje drobnych naczyń widoczne jako obszary braku perfuzji; rozszerzenie i krętość naczyń (głównie po stronie żyłnej); przecieki barwnika; zmniejszenie strefy beznaczyniowej dołeczka i proliferacje naczyniowe, które są typowe dla retinopatii cukrzycowej. Stwierdzane przez nich anomalie w badaniach histopatologicznych, takie jak krwotoki śródsiatkówkowe, obrzęk siatkówki, ogniska proliferujących komórek *endothelium* i proliferacje przedsiatkówkowe, były również charakterystyczne dla zmian występujących w przebiegu cukrzycy (15). Inne zaburzenia spowodowane wewnątrzgałkowymi iniekcjami czynnika VEGF to wzrost siatkówkowego przepływu krwi i nowotwórstwo naczyniowe (1).

Czynnik VEGF powoduje oddzielanie perycytów od błony podstawnej i ich utratę, co ma kluczowe znaczenie w rozwoju mikroaneuryzmatów (6,15). Zważywszy że perycyty mogą hamować proliferację komórek śródbłonna, spadek ich liczby może dodatkowo potęgować mitogenne działanie tej cytokiny na komórki *endothelium* (5). Jego rola w tworzeniu mikroaneuryzmatów polega również na rozszerzaniu naczyń krwionośnych poprzez wzrost

poziomu tlenu azotu i syntazy NO w siatkówce (6). Mikroaneuryzmaty nie tworzą się w tętniczkach i tętnicach, gdyż mięśniówka tych naczyń utrudnia biologiczną dostępność VEGF, poza tym komórki mięśniówki gładkiej obecne w tego typu naczyniach mogą hamować proliferację komórek śródbłonna wywołaną VEGF poprzez produkcję TGF- β (15).

Rola czynnika VEGF w zamykaniu drobnych naczyń w przebiegu retinopatii cukrzycowej polega na: 1) wywoływaniu przerostu komórek śródbłonna, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia, a później zamykania światła naczynia włosowatego; 2) indukowaniu produkcji czynnika tkankowego i czynnika von Willebranda, co sprzyja tworzeniu wewnątrznaczyniowych skrzepów, zamykających światło naczynia (5,6). 3) Kolosalne znaczenie w zamykaniu drobnych naczyń w przebiegu cukrzycy ma fakt, że VEGF powoduje zwiększenie ekspresji cząstki adhezyjnej ICAM-1 na komórkach śródbłonna, co w rezultacie powoduje adhezję aktywnych granulocytów i monocytów do *endothelium* i zatykanie światła kapilarów (6). Następuje wówczas gromadzenie leukocytów w kapilarach na skutek zwiększonej ich adhezji do *endothelium*, co sprzyja wtórnemu uwalnianiu przez nie czynnika VEGF (5). Konsekwencjami cukrzycowej adhezji leukocytów są wzmożona przepuszczalność naczyń, uszkodzenie komórek śródbłonna i ich apoptoza oraz brak perfuzji w naczyniach, co w rezultacie powoduje pogłębianie niedotlenienia w obrębie siatkówki.

Kolejny objaw retinopatii cukrzycowej to załamanie bariery krew – siatkówka. Udział czynnika VEGF w powstawaniu tej patologii jest bardzo istotny i polega przede wszystkim na zwiększeniu przepuszczalności śródbłonna naczyń poprzez zmianę układu międzyśródbłonkowych białek łączących, takich jak VE-kaderina czy białka obwódki desmosomalnej, np. okludyna (3). Do wystąpienia tej anomalii przyczyniają się również wspomniana wcześniej zwiększona adhezja leukocytów oraz utrata perycytów, powodująca zmniejszenie szczelności ściany naczyń. Zwiększenie przepuszczalności naczyń po wpływie czynnika VEGF dotyczy w pierwszej kolejności żyłek siatkówkowych i naczyń włosowatych (17). Badania Funatsu i wsp. wykazały, że u osób z cukrzycowym obrzękiem płamki w załamaniu bariery krew – siatkówka i/ lub krew – ciecz wodnista uczestniczy czynnik VEGF łącznie z interleukiną 6, a poziom IL-6 w osoczu może być wręcz wskaźnikiem zapowiadającym wystąpienie tego groźnego powikłania (4). Intensywna insulino-terapia może powodować zaostrzenie retinopatii cukrzycowej – dzieje się tak na skutek przejściowego pogorszenia załamania bariery krew – siatkówka poprzez zwiększenie poziomu czynnika VEGF i VEGF mRNA pod wpływem insuliny (11).

Najważniejszy w patogenezie retinopatii cukrzycowej jest wpływ czynnika VEGF na angiogenezę, czyli tworzenie nowych niedojrzałych naczyń krwionośnych na bazie istniejących już struktur (17). Czynnikiem inicjującym nowotwórstwo naczyniowe w tej jednostce chorobowej jest przewlekłe niedotlenienie siatkówki (1,2). Dochodzi wówczas do zwiększenia produkcji tego czynnika wzrostowego. Poza tym połączenie czynnika VEGF i innych cytokin z receptorami na powierzchni komórek *endothelium* indukuje tzw. przełączenie tych komórek na angiogeny fenotyp. Pod wpływem VEGF następują sekrecja kolagenazy i w efekcie trawienie i degradacja błony podstawnej, co umożliwia migrację i proliferację komórek *endothelium* (13). Z kolei wzrost przepuszczalności naczyń po wpływie czynnika VEGF sprzyja zewnątrznaczyniowemu odkładaniu się fibryny, stanowiącej szkielet, po którym poruszają się migrujące komórki śródbłonna. W dalszym

etapie następuje wytwarzanie tzw. kielków naczyniowych. Proces angiogenezy kończy odtworzenie błony podstawnej i napełnienie perycytów. Neowaskularyzacja w przebiegu retinopatii cukrzycowej pojawia się w obrębie siatkówki i tęczówki. Pochodzi ona głównie z żyłek i żył, czemu sprzyja cienkość ściany tych naczyń i w związku z tym łatwiejszy dostęp VEGF do receptorów, a także mniej komórek przydanki, które mogłyby utrudniać migrację proliferujących komórek śródbłonna (15).

Zastosowanie inhibitorów VEGF w terapii retinopatii cukrzycowej

Groźne następstwa zwiększonej produkcji VEGF w narządzie wzroku w przebiegu cukrzycy skłaniają badaczy do prób zastosowania inhibitorów tego czynnika wzrostowego w terapii retinopatii cukrzycowej (8). Nie jest wykluczone, że taka terapia mogłaby zapobiec powstawaniu cukrzycowego obrzęku siatkówki i rozwojowi nowotworstwa naczyniowego. Należy zdawać sobie jednak sprawę z potencjalnych niebezpieczeństw takiej kuracji. Przy podaniu do szklistki istnieje możliwość takich powikłań, jak odwarstwienie siatkówki czy infekcja bakteryjna, z kolei przy podaniu ogólnym możliwe jest uszkodzenie naczyń, prowadzące do krwotoków i powikłań zakrzepowo-zatorowych, czy wręcz zaburzenie naczyniowej integralności (8). Poza tym celowana supresja receptorów VEGF może prowadzić do uszkodzenia trzustki (8). Obecnie w badaniach klinicznych jest wiele substancji hamujących czynnik VEGF. Największe nadzieje wiąże się z monoklonalnymi przeciwciałami anty-VEGF i inhibitorami receptorów kinazy tyrozynowej (3,8). Czynione są próby ogólnego stosowania inhibitora PKC o nazwie LY333531, obniżającego poziom VEGF, w retinopatii proliferacyjnej i cukrzycowym obrzęku plamki (1). Kolejny preparat – Bucillamina, która hamuje produkcję czynnika VEGF i ekspresję VEGF mRNA – jest stosowany z powodzeniem w retinopatii doświadczalnej u zwierząt (7). W innych badaniach na modelu zwierzęcym stwierdzono, że blokada receptorów typu 1. angiotensyny II powoduje wyraźne zmniejszenie neowaskularyzacji siatkówkowej (14). Z kolei stosowanie inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę (np. enalaprilu) powoduje obniżenie poziomu czynnika VEGF w cieple szklistym pacjentów z retinopatią cukrzycową proliferacyjną i może mieć działanie ochronne na siatkówkę w cukrzycy, głównie poprzez zmniejszenie przepuszczalności drobnych naczyń (14). Zastosowanie endogennych inhibitorów angiogenezy również mogłoby wpłynąć na zmniejszenie wewnątrzgałkowego stężenia tej cytokiny wzrostowej. Na przykład endostatyna hamuje migrację i proliferację komórek śródbłonna, a jej ekspresja koreluje z ekspresją VEGF (10). Podobne działanie ma angiostatyna (12). Korzystne działanie terapeutyczne laserokoagulacji siatkówki polega m. in. na wywołaniu produkcji angiostatyny z plazminogenu obecnego w siatkówce, co w rezultacie prowadzi do spadku zawartości czynnika VEGF w cieple szklistym nawet o 75% (1,12). Każdy rok przynosi nowe odkrycia. Być może już wkrótce zwiększą one możliwości zwalczania retinopatii cukrzycowej, która wciąż pozostaje główną przyczyną ślepoty w krajach wysoko rozwiniętych.

PIŚMIENNICTWO: 1. Aiello L. P., Wong J. S.: *Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications*. *Kidney International*, 2000, 58 (Suppl. 77), S-113-S-119. 2. Boulton M., Foreman D., Williams G., McLeod D.: *VEGF localisation in diabetic*

retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.*, 1998, 82, 561-568. 3. Cai J., Boulton M.: *The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions*. *Eye*, 2002, 16, 242-260. 4. Funatsu H., Yamashita H., Noma H., Mimura T., Yamashita T., Hori S.: *Increased levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in the aqueous humor of diabetics with macular edema*. *Am. J. Ophthalmol.*, 2002, 133 (1), 70-77. 5. Hofman P., van Blijswijk B. C., Gaillard P. J., Vrensen G. F., Schlingemann R. O.: *Endothelial cell hypertrophy induced by vascular endothelial growth factor in the retina*. *Arch. Ophthalmol.* 2001, 119, 861-866. 6. Jousseaume A. M., Poulaki V., Qin W., Kirchhof B., Mitsiades N., Wiegand S. J., Rudge J., Yancopoulos G. D., Adamis A. P.: *Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion in vivo*. *Am. J. Pathol.*, 2002, 160 (2), 501-509. 7. Koyama S., Takagi H., Otani A., Oh H., Nishimura K., Honda Y.: *Inhibitory mechanism of vascular endothelial growth factor (VEGF) by bucillamine*. *Br. J. Pharmacol.*, 2002, 137 (6), 901-909. 8. Lu M., Adamis A. P.: *Vascular endothelial growth factor gene regulation and action in diabetic retinopathy*. *Ophthalmol. Clin. North Am.*, 2002, 15 (1), 69-79. 9. Luttjohann G. A., McLeod D. S., Merges C., Diggs A., Plouet J.: *Localization of Vascular endothelial growth factor in human retina and choroid*. *Arch. Ophthalmol.*, 1996, 114, 971-977. 10. Noma H., Funatsu H., Yamashita H., Kitano S., Mishima H. K., Hori S.: *Regulation of angiogenesis in diabetic retinopathy*. *Arch. Ophthalmol.*, 2002, 120, 1075-1080. 11. Poulaki V., Qin W., Jousseaume A. M., Hurlbut P., Wiegand S. J., Rudge J., Yancopoulos G. D., Adamis A. P.: *Acute intensive insulin therapy exacerbates diabetic blood-retinal barrier breakdown via hypoxia-inducible factor-1 alpha and VEGF*. *J. Clin. Invest.*, 2002, 109 (6), 805-815. 12. Spranger J., Hammes H. P., Preissner K. T., Schatz H., Pfeiffer A. F.: *Release of the angiogenesis inhibitor angiostatin in patients with proliferative diabetic retinopathy: association with retinal photocoagulation*. *Diabetologia*, 2000, 43 (11), 1404-1407. 13. Stephan C. C., Brock T. A.: *Vascular endothelial growth factor, a multifunctional polypeptide*. *P. R. Health Sci. J.*, 1996, 15 (3), 169-178. 14. Strain W. D., Chaturvedi N.: *The renin-angiotensin-aldosterone system and the eye in diabetes*. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst.*, 2002, 3 (4), 243-246. 15. Tolentino M. J., McLeod D. S., Taomoto M., Otsuji T., Adamis A. P., Luttjohann G. A.: *Pathologic features of vascular endothelial growth factor-induced retinopathy in the nonhuman primate*. *Am. J. Ophthalmol.*, 2002, 133 (3), 378-385. 16. Treins C., Giorgetti-Peraldi S., Murdaca J., Van Obberghen E.: *Regulation of vascular endothelial growth factor expression by advanced glycation end products*. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276 (47), 43836-43841. 17. Witmer A. N., Vrensen G. F., Van Noorden C. J., Schlingemann R. O.: *Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease*. *Prog. Retin. Eye Res.*, 2003, 22 (1), 1-29.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):

dr med. Beata Urban
Klinika Okulistyki Dziecięcej Akademii Medycznej
w Białymstoku
Samodzielny Publiczny Dziecięcy Szpital Kliniczny
ul. Waszyngtona 17
15-274 Białystok
tel. (fax): 085-7450-858
e-mail: urbanbea@amb.edu.pl