

(79)

Rola molekuł adhezyjnych w rozwoju proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej

The role of cellular adhesion molecule in the development of proliferative diabetic retinopathy

Joanna Adamiec, Jolanta Oficjalska-Mtyńczak

Z Katedry i Kliniki Okulistyki Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Maria Hanna Niżankowska

Summary: Development of proliferative diabetic retinopathy's pathogenesis is still unknown. Last years publications seems to show immuno-inflammatory base of structural and functional retinal vessels endothelial cells's changes. Chronical retinal ischemia leads to development of pathological vessels and formation of fibrovascular tissue at the vitreoretinale interface. One of the important cause of the damage is leukocytes activation and adhesion to vascular endothelium, that is mediated by the specific adhesion molecules. Increase of soluble cellular adhesion molecules (CAMs) in serum, vitreous, epiretinal membranes of patients with PVR seems to confirm its role in the pathogenesis of this process. This publication attempts to estimate the CAM's role in progression of PDR.

Słowa kluczowe: proliferacyjna retinopatia cukrzycowa, śródkomórkowa cząsteczka adhezyjna-1, cząsteczka adhezji komórkowej naczyń, angiogeneza, leukocyty.

Key words: proliferative diabetic retinopathy, intercellular adhesion molecule, vascular cell adhesion molecule, angiogenesis, leucocyte.

Retinopatia proliferacyjna jest jednym z najpoważniejszych powikłań cukrzycy zarówno typu 1., jak i typu 2. Do jej rozwoju w sposób szczególny predysponuje postać zależna od długotrwałej insulinoterapii. Nieustabilizowane farmakologicznie stężenie glukozy w surowicy krwi znacząco przyspiesza w obu typach choroby rozwój zaburzeń metabolicznych charakterystycznych dla cukrzycy. Proliferacyjna retinopatia cukrzycowa (proliferative diabetic retinopathy – PDR) jest konsekwencją przewlekłego niedotlenienia siatkówki, wynikającego ze zmian strukturalnych i funkcjonalnych śródbłonna naczyń gałki ocznej. Następstwem tego procesu jest nowotwórstwo naczyniowe na powierzchni tarczy nerwu wzrokowego, wzdłuż łuków naczyniowych, a także formowanie błon włókno-naczyniowych w przestrzeni witreoretinalnej (1).

Głębokie niedotlenienie siatkówki pozostaje bezpośrednim następstwem obecności mikrozakrzepów zamykających światło kapilarów. Chociaż przyczyn złożonych mechanizmów odpowiedzialnych za ten proces upatruje się w zależnych od hiperglikemii zaburzeniach krzepnięcia krwi, a także w utracie właściwości przeciwzakrzepowych śródbłonna naczyń włosowatych, to w istocie patogenezę tych ciężkich następstw cukrzycy pozostaje nadal niewyjaśniona.

Obecnie zwraca się baczna uwagę na udział procesu immunologiczno-zapalnego w rozwoju PDR. Jednym z jego elementów pozostaje aktywacja leukocytów i ich adhezja do powierzchni śródbłonna, z wybitnym współudziałem specyficznych molekuł adhezyjnych (cellular adhesion molecule – CAM). Molekuły adhezyjne to

powierzchniowe receptory komórkowe biorące udział w adhezji międzykomórkowej lub pośredniczące w interakcjach pomiędzy określonymi komórkami a macierzą pozakomórkową. Przyleganie krążących leukocytów, a także płytek krwi do śródbłonna odbywa się z ich znaczącym udziałem (11). Obecnie poznano 6 rodzin tych cząsteczek: integryny, selektyny, nadrodzina immunoglobulin, kadheryny, proteoglikany i mucyny. W patomechanizmie zmian naczyniowych zasadniczą rolę odgrywają trzy pierwsze rodzaje molekuł adhezyjnych. Integryny są elementami obecnymi na powierzchni wszystkich leukocytów w formie nieaktywnej. Antygeny, cytokiny, czynniki chemotaktyczne pozostają cząsteczkami indukującymi ich przejście w postać aktywną. W takiej formie pośredniczą w interakcjach pomiędzy komórkami a białkami macierzy pozakomórkowej (kolagen, fibronektyna, lamina). Wykazują również zdolność wiązania się z innymi ligandami – w tym z czynnikiem von Willebranda oraz cząsteczkami adhezyjnymi z nadrodziny immunoglobulin – głównie ICAM, VCAM. Te ostatnie są odpowiedzialne głównie za inicjację procesu zapalno-immunologicznego, za adhezję leukocytów do śródbłonna naczyń, a także za migrację leukocytów poprzez błonę podstawną do otaczających tkanek. Dowodem na aktywację leukocytów i/ lub komórek śródbłonna może być obserwowany w niektórych stanach chorobowych wzrost stężenia „rozpuszczalnych” postaci molekuł adhezyjnych w surowicy krwi.

Niewątpliwie w patomechanizmie zmian naczyniowych znamienych dla retinopatii cukrzycowej znaczącą rolę odgrywają

selektywny: występująca na śródbłonku selektyna E, znajdująca się na powierzchni płytek krwi selektyna P, a także zidentyfikowana na leukocytach selektyna L. W wyniku ich działania zmniejszeniu ulega prędkość płynących z prądem krwi leukocytów i płytek. Efektem końcowym wzajemnych oddziaływań jest trwała adhezja tych komórek do powierzchni śródbłonka. Dodatkowo nasilają one proces destrukcji śródbłonka, co umożliwia przechodzenie zaktywowanych leukocytów w głąb ściany naczyniowej. Podwyższone stężenie rozpuszczalnych form cząsteczek adhezyjnych (CAMs) w surowicy stwierdza się w wielu ogólnoustrojowych zaburzeniach, takich jak: choroby tkanki łącznej, HIV, choroby nowotworowe, miażdżyca, cukrzyca i dyslipidemia (1,10).

Głównymi przedstawicielami nadrodziny immunoglobulin są: **śródkomórkowa cząsteczka adhezyjna (ICAM)** oraz **cząsteczka adhezji komórkowej naczyń (VCAM)**. Rozpuszczalna postać ICAM-1 występuje w wyższych stężeniach również u pacjentów z ogólnoustrojowymi procesami zapalnymi związanymi z chorobami gałki ocznej, takimi jak: zapalenie błony naczyniowej, sarkoidoza, choroba Gravesa (2). W toku przeprowadzonych badań wykazano, że ICAM-1 jest istotnym, wczesnym markerem aktywacji procesu immunologicznego. Uszkodzenie ciągłości śródbłonka, umożliwiające swobodne przemieszczanie się krwinek białych w głąb ściany naczyń inicjuje odpowiedź immunologiczną i zapalną, co prowadzi do dalszego jej uszkodzenia. Odpowiedzią na zmiany utlenowania siatkówki jest rozwój jej patologicznego unaczynienia (8,11).

Proces neowaskularyzacji indukowany jest bezpośrednio aktywacją i uwalnianiem substancji wazoproliferacyjnych – FGF (fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), a także leukocytarnych cytokin, takich jak: TGF-alfa, IL-8. W tym procesie widoczna jest również wzmożona synteza komponentów pozakomórkowych, niezbędnych do zakotwiczenia migrujących komórek śródbłonka. Dalsze zaburzenia wynikają z aktywacji i proliferacji komórek śródbłonka naczyń siatkówki (5).

Istnieje szereg doniesień potwierdzających wzrost stężenia w surowicy krwi rozpuszczalnych form (soluble) molekuł adhezyjnych u pacjentów z retinopatią cukrzycową. Wyniki badań przeprowadzonych przez zespół pod kierownictwem K. Matsumoty potwierdzają poczynione już wcześniej obserwacje. Retencja CAM, a w szczególności sVCAM-1 i/ lub sE-selektywny może nie tylko indukować aktywację komórek śródbłonka, ale także pobudzać procesy angiogenezy u tych chorych. Powyższe właściwości wykazano zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Ustalono, że VCAM-1 oraz E-selektywna indukują angiogenezę w rogówce szczurów, a także chemotaksję leukocytów do *endothelium* ludzkiego. Olson i wsp. (11) przeprowadzili badania, których celem było określenie stężenia sICAM-1, sVCAM-1 oraz sE-selektywny u pacjentów z retinopatią cukrzycową. U chorych na cukrzycę typu 1. stwierdzili zdecydowany wzrost stężenia sVCAM-1, a także sE-selektywny, które korelowały ze stężeniem HbA1c w surowicy tych pacjentów. Zastosowanie przeciwciał przeciwko VCAM-1 oraz przeciwko E-selektywny wyraźnie hamowało przyrost stężenia tych molekuł w surowicy krwi. Poczynione obserwacje potwierdzają wyniki badań Hernandeza i wsp. (4) u pacjentów z cukrzycą typu 2. W badaniach tych wykazano istotny wzrost stężenia sE-selektywny w surowicy krwi. Z kolei stężenie sVCAM-1 było wyższe w przypadku współistniejącej z chorobą podstawową mikroalbuminurii. Autorzy podkreślają fakt wyraźnego wzrostu stężenia sE-selektywny w retinopatii przedproliferacyjnej, a także typowej dla retinopatii proliferacyjnej retencji sVCAM-1.

Podwyższone stężenia sE-selektywny w surowicy pozostają wynikiem wzmożonej aktywacji komórek *endothelium*, podczas gdy intensyfikacja syntezy VCAM-1 i ICAM-1 występuje dodatkowo na powierzchni innych niż śródbłonek komórek: nabłonka, makrofagów, populacji limfocytów CD4 i komórek dendrytycznych. Należy również zauważyć, że podwyższony poziom sE-selektywny nie tylko wynika z aktywacji komórek śródbłonka, ale także odzwierciedla stopień ich uszkodzenia.

Znacznie podwyższone stężenia ICAM-1 w surowicy krwi wykazano u pacjentów z chorobami o charakterze zapalnym, takimi jak: sarkoidoza, zapalenie błony naczyniowej HLA-B27-ujemne i w przypadku cukrzycy wymagającej leczenia insuliną. Także poziomy ICAM-1 okazały się podwyższone w cieple szklistym zarówno w cukrzycy, jak i w innych procesach przebiegających z zaburzeniami witreoretinalnymi (1). Za prawdopodobną przyczynę tak znacznego wzrostu stężenia tej molekuły adhezyjnej w cieple szklistym przyjęto intensyfikację lokalnej jej syntezy oraz przerwanie bariery krew – siatkówka. W PDR, podobnie jak w innych zaburzeniach, np. w pourazowym bądź też idiopatycznym PVR (proliferative vitreoretinopathy), stwierdza się bardzo wysokie stężenia białka w cieple szklistym.

U pacjentów z PDR i pourazowym PVR znacząca część puli białkowej ciała szklistego przypada na cICAM-1. Odpowiedzialne za wzmożoną, miejscową syntezę tej molekuły w cieple szklistym wydają się makrofagi infiltrujące tę strukturę anatomiczną gałki ocznej przede wszystkim u chorych z PDR, a także z pourazowym PVR.

Zbliżone wyniki badań uzyskał również zespół prof. Limba (8). Autorzy wykazali nie tylko znacznie podwyższone stężenia ICAM-1, VCAM-1 oraz E-selektywny w cieple szklistym osób z PDR w porównaniu z próbkami pobranymi ze zwłok, ale równocześnie stwierdzili, że w przypadku gałek ocznych ze zrostami trakcyjnymi siatkówki oraz obecnym lub nieobecnym krwotokiem do komory ciała szklistego występują znacznie wyższe stężenia sICAM-1, sE-selektywny w porównaniu z próbkami ciała szklistego pobranego z gałek ocznych, w których wystąpił jedynie wylew doszkliskowy. Taki wynik sugeruje udział komponentu zapalnego w patomechanizmie powstawania proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej. Obserwowane zaburzenia nie wykazywały jakiegokolwiek zależności od czasu trwania cukrzycy. W precyzyjnie zaplanowanym programie badań uwzględniono również ocenę zmian stężeń sVCAM-1 w zależności od współistniejących z PDR powikłań ocznych. Ustalono, że porównywalnie wysokie wartości stężeń sVCAM-1 w cieple szklistym występują zarówno u chorych ze współistniejącymi zmianami trakcyjnymi siatkówki, jak i u chorych z krwotokiem doszkliskowym. Uzyskane dane zdają się przemawiać za mechanizmem jej miejscowej syntezy w siatkówce. Lokalna retencja sVCAM-1 wydaje się niezależna od zmian jej stężenia w krążeniu układowym.

Przytoczone wyniki badań skłoniły wiele zespołów do dalszego poszukiwania mechanizmów powstawania zaburzeń witreoretinalnych u pacjentów z retinopatią proliferacyjną oraz do wyjaśnienia roli, jaką odgrywają w tym procesie molekuły adhezyjne. Analizie poddano, oprócz próbek ciała szklistego, także wyizolowane podczas zabiegu witrektomii błony witreoretinalne (24). Podobnie jak we wcześniejszych badaniach zaobserwowano zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* wzmożoną ekspresję ICAM-1 i VCAM-1 na powierzchni proliferujących komórek śródbłonka kapilarów błon u chorych z PDR. Należy zaznaczyć, że cząsteczka ICAM-1 jest obecna u ludzi zdrowych na powierzchni komórek barwnikowych siatkówki. W patologii gałki ocznej jej obecność z kolei wykazano w pozakomórkowej

macierzy proliferacji witreoretinalnych. Powyższe obserwacje sugerują, że ICAM-1 jest wydzielany miejscowo, zarówno z udziałem komórek śródbłonka naczyniowego i komórek nabłonka barwnikowego, jak i zaktywowanych leukocytów infiltrujących siatkówkę.

Obecnie panuje przekonanie, że w procesie stymulacji syntezy i uwalniania cząsteczek adhezyjnych w warunkach procesu zapalnego główną rolę spełniają cytokiny, w tym głównie: TNF-beta (tumor necrosis factor-beta), IL-1 (interleukina-1) oraz INF-gamma (interferon-gamma) (24). Znamienną rolę wydaje się również odgrywać TNF-alfa (tumor necrosis factor-alfa). Obecność tej cząsteczki zaobserwowano w cieple szklistym, substancji pozakomórkowej, a także w naczyniach błon proliferacyjnych w przebiegu PDR (7,8).

W przebiegu cukrzycowej retinopatii proliferacyjnej patologiczna sieć naczyń rozwija się na powierzchni witreoretinalnej, co skutkuje powstaniem błon nasiatkówkowych (4). W opisywanych proliferacjach naczyniowo-włóknistych stwierdza się obecność makrofagów i mastocytów. Migracja leukocytów do miejsca toczącego się procesu zapalnego wymaga ich przylegania do powierzchni komórek. Niezbędne w tym procesie molekuły adhezyjne są obecne na proliferujących komórkach śródbłonka nowo powstających naczyń, a także na powierzchni komórek infiltrujących proliferację naczyniowo-włókniste. Nierzadko ich obecność można również wykazać w macierzy pozakomórkowej. Stopień ekspresji VCAM-1 i ICAM-1 w opisywanych błonach proliferacyjnych jest zbliżony. Analizie stężeń wymienionych molekuł adhezyjnych w proliferacjach naczyniowo-włóknistych w przebiegu PDR, a także zależnościom pomiędzy ich stężeniem a występującymi powikłaniami ocznymi, stopniem zaawansowania zmian proliferacyjnych oraz prawdopodobieństwem nawrotu procesu aktywnej neowaskularyzacji wiele uwagi poświęcili Barile i wsp. (1). Wykazali oni istotny wzrost stężenia rozpuszczalnych form ICAM-1 i VCAM-1 w próbkach ciała szklatego pobranego podczas zabiegu witrektomii u pacjentów z PDR i PVR w porównaniu z próbkami uzyskanymi od pacjentów operowanych z powodu macular pucker. Jednocześnie ustalili stałą, podstawowy poziom VCAM-1 w prawidłowym cieple szklistym. Obecność cząsteczek adhezyjnych w komorze ciała szklatego wykazana przez zespół Barile'a dostarcza kolejnych dowodów na udział zapalnego komponentu w patomechanizmie retinopatii proliferacyjnej. Autorzy ponadto stwierdzili istotną statystycznie zależność pomiędzy wzrostem stężenia ICAM-1 i VCAM-1 a prawdopodobieństwem wystąpienia nawrotu aktywnego procesu neowaskularyzacyjnego u pacjentów poddanych zabiegowi witrektomii w przebiegu PDR. Zwrócili także uwagę na to, że wykonywany po raz pierwszy zabieg witrektomii łączy się ze wzrostem stężenia omawianych cząsteczek w komorze ciała szklatego (1). Autorzy sugerują, że sam zabieg operacyjny może być elementem indukującym wewnątrzgałkowy proces zapalny.

Zjawisko wiązania analizowanych molekuł adhezyjnych ze swoistymi ligandami na powierzchni leukocytów, czyli interakcje ICAM-1/LFA-1 i VCAM-1/VLA-4, prowadzi do aktywacji nie tylko komórek śródbłonka, ale również stymuluje wzajemne oddziaływania międzykomórkowe (1). Ten proces jest szczególnie charakterystyczny dla układu ICAM-1/LFA-1. Interakcje pomiędzy jego składowymi stanowią sygnał do aktywacji i proliferacji nieaktywnych T-komórek, które warunkują interakcje pomiędzy komórkami prezentującymi antygen a limfocytami. Niezwykle istotne jest to, że sVCAM-1, sE-selektyna, a także inne czynniki, takie jak: FGF oraz VEGF, wykazują zdolność pobudzania angiogenezy. Stymulujący angiogenezę efekt

działania VCAM-1 następuje za pośrednictwem VLA-4, co sugeruje, że molekuły adhezyjne poprzez związanie się ze swoistymi ligandami na powierzchni komórek najczęściej są źródłem zróżnicowanej patologii komórkowej. Dodatkowo rozpuszczalne postaci VCAM-1 i E-selektyny mogą inicjować migrację komórek *endothelium in vivo*. W przebiegu PDR obecność ICAM-1 stwierdza się w błonach proliferacyjnych, na powierzchni limfocytów, fibroblastów, komórek barwnikowych, fagocytykujących makrofagów, a także na powierzchni komórek śródbłonka unaczynionych błon. Nierzadko analizowana cząsteczka obecna jest również w macierzy pozakomórkowej opisywanych proliferacji (11). W przypadku VCAM-1 wielu autorów podkreśla fakt jej zmiennej lokalizacji w błonach proliferacyjnych – u części chorych opisywana jest tylko na powierzchni komórek śródbłonka naczyń, a u niektórych ma lokalizację zbliżoną do ICAM-1 (8).

Rola czynnika VEGF w rozwoju zmian charakterystycznych dla proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej jest bezsporna. Proces ten odbywa się również poprzez pobudzenie ekspresji cząsteczek ICAM-1 w siatkówce. W opinii Lu i wsp. (9) nie ma natomiast wpływu na zmianę lokalnych stężeń VCAM-1, E-selektyny i P-selektyny.

W podsumowaniu należy podkreślić, że udokumentowany udział molekuł adhezyjnych w patomechanizmie proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej zdaje się potwierdzać zapalno-immunologiczny charakter tego procesu. Doświadczalne zastosowanie przeciwciał anti-CAMs wyraźnie hamuje proces rozwoju zmian proliferacyjnych. Poznanie mechanizmów aktywacji i migracji leukocytów, a także kaskady procesów prowadzących do powstania PDR najprawdopodobniej umożliwi skuteczne wyłączenie molekuł adhezyjnych z patogenetycznego ciągu zaburzeń metabolicznych cukrzycy.

PIŚMIENNICTWO:

1. Barile G. R., Chang S., Park L., Reppucci V. S., Schiff W. M., Schmidt A. M.: *Soluble cellular adhesion molecules in proliferative vitreoretinopathy and proliferative diabetic retinopathy*. Current Eye Research, 1999, 19, 3219-3227.
2. De Bellis A., Di Martino S., Fiordelisi F. et al.: *Soluble intercellular adhesion molecule-1 concentrations in Graves' disease patients followed up for development of ophthalmopathy*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1998, 83, 1222-1225.
3. Hackman A., Abe Y., Insull W. et al.: *Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia*. Circulation, 1996, 93, 1334-1338.
4. Hernandez C., Burgos R., Canton A., Garcia-Arumi J., Segura R. M., Simo R.: *Vitreous levels of vascular cell adhesion molecule and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy: a case-control study*. Diabetes Care, 2001, 24 (3), 516-521.
5. 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*. American Journal of Pathology, 2002, 160 (2), 501-509.
6. Kock A. E., Hallran M. M., Haskell C. J., Shah M. R., Polverini P. J.: *Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and*

- vascular cell adhesion molecule-1*. Nature, 1995, 376, 517-519.
7. Limb G. A., Chignell A. H., Green W., LeRoy F., Dumonde D. C.: *Distribution of TNF-alfa and its reactive vascular adhesion molecules in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy*. British Journal of Ophthalmology, 1996, 80, 168-173.
 8. Limb G. A., Hickmann-Casey J., Hollifield R. D., Chignell A. H.: *Vascular adhesion molecules in vitreous from eyes with proliferative diabetic retinopathy*. IOVS, 1999, 40, 102453-102457.
 9. Lu M., Perez V. L., Ma N., Miyamoto K., Peng H-B., Liao J. K., Adamis A. P.: *VEGF increases retinal vascular ICAM-1 expression in vivo*. IOVS, 1999, 40, 81808-81812.
 10. Matsumoto K., Sera Y., Ueki Y., Inukai G., Niiro E., Miyake S.: *Comparison of serum concentrations of soluble adhesion molecules in diabetic microangiopathy and macroangiopathy*. Diabetic Medicine, 2002, 19 (10), 822-826.
 11. Olson J. A., Whitelaw C. M., McHardy K. C., Pearson D. W. M., Forrester J. V.: *Soluble leucocyte adhesion molecules in diabetic retinopathy stimulate retinal capillary endothelial cell migration*. Diabetologia, 2002, 40, 1166-1171.
- Praca wpłynęła do Redakcji 3.11.2003 r. (355).
Zakwalifikowano do druku 15.01.2005 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
lek. med. Joanna Adamiec
Katedra i Klinika Okulistyki AM we Wrocławiu
ul. Chałubińskiego 2a
50-368 Wrocław