

Η κινητικότητα των περιφερικών μονοπυρήνων (ΠΜ) ασθενών με ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη τύπου I (IDDM I) και η in vitro επίδραση του ασκορβικού οξέος (Α.Ο.)*

Περίληψη

Π. Μπούρα
Ν. Παπαζογλου
Α. Παπαδοπούλου
Χ. Μανές
Ι. Μαγούλα
Γ. Τσάπας
Ι. Κοντογιάννης
Γ. Σκαρμαγκάς

Μελετήσαμε τη χημειοκίνηση και τη χημειοταξία των περιφερικών μονοπυρήνων (ΠΜ) 10 ασθενών με ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη (IDDM) και αριθμού φυσιολογικών ατόμων. Παράλληλα προσδιορίσαμε τα επίπεδα του ασκορβικού οξέος (Α.Ο.) στο πλάσμα και τα μονοπύρηνια ασθενών και μαρτύρων. Μετά χορήγηση Α.Ο. 1 g/μέρα για 15 συνεχείς ημέρες επανεκτιμήσαμε όλες τις παραμέτρους. Για τον έλεγχο της κινητικότητας των Π.Μ. χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένος θάλαμος Boyden, ενώ τα επίπεδα του Α.Ο. μετρήθηκαν φασματοσκοπικά. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν: α) τα επίπεδα Α.Ο. πλάσματος στους ασθενείς ήταν παρόμοια με εκείνα των μαρτύρων και η χορήγηση Α.Ο. δεν τα μετέβαλε, β) οι ασθενείς είχαν σημαντικά ελαττωμένα επίπεδα Α.Ο. ενδοκυτταρίως (Π.Μ.) που βελτιώθηκαν μετά τη φόρτιση με Α.Ο. γ) η κινητικότητα των Π.Μ. δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές σε σχέση με εκείνη των μαρτύρων, η δε χορήγηση Α.Ο. δεν την μετέβαλε. Συμπεραίνεται ότι η χορήγηση Α.Ο. αυξάνει τα ενδοκυττάρια επίπεδά του στους ασθενείς με IDDM, χωρίς να επιδρά στη φυσιολογική κινητικότητα των Π.Μ., που φαίνεται ότι δεν διαταράσσεται πρωτοπαθώς στην νόσο.

Η έρευνα των τελευταίων χρόνων έδειξε ότι καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη του IDDM παίζει το ανοσολογικό σύστημα. Παράλληλα, έχουν περιγραφεί μειονεκτήματα της λειτουργίας των πολυμορφοπυρήνων^{1,2,3}, όπως της χημειοταξίας, της φαγοκυτταρικής και αντιμικροβιακής τους δράσης.

Όσον αφορά την λειτουργία του συστήματος μονοπυρήνων-μακροφάγων, αυτό δεν έχει μελετηθεί σε έκταση από όσο γνωρίζουμε. Αναφέρεται ελάττωση του ολικού αριθμού των μονοπυρήνων στη νόσο, ελάττωση της ικανότητας των Π.Μ. να φαγοκυτταρώσουν την *Candida Albicans*⁴ ενώ αντίθετα η φαγοκυττάρωση άλλων σωματιδίων βρέθηκε φυσιολογική⁵.

Από την άλλη πλευρά, οι παρατεταμένες ή υποτροπιάζουσες λοιμώξεις τις οποίες συχνά εμφανίζουν οι ασθενείς με δια-

Από την Β' Παθολογική Κλινική του ΑΠΘ, και την Παθολογική Κλινική Α' Γενικού Κρατικού Νοσοκομείου Άγιος Πάβλος

* Ανακοινώθηκε στο Α' Πανελλήνιο Διαβητολογικό Συνέδριο, Αθήνα, Μάρτιος 1989.

βήτη και η διευκρίνηση της αιτιοπαθογένειάς τους, παραμένουν θέματα ανοιχτά για συζήτηση. Μελέτες προς την κατεύθυνση αυτή θα μπορούσαν να αποβούν χρήσιμες στην αντιμετώπιση τέτοιων διαβητικών επιπλοκών.

Ο ρόλος του ασκορβικού οξέος (Α.Ο.) στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων και το γεγονός ότι επηρεάζει παραμέτρους της ανοσολογικής απόκρισης, έχει ήδη περιγραφεί⁶.

Ιn vitro μελέτες έδειξαν ότι το Α.Ο. διεγείρει τη βλαστογένεση των λεμφοκυττάρων και βελτιώνει την κινητικότητα των πολυμορφοκυττάρων⁷. Επίσης έχειδειχθεί ότι αυξάνει την τυχαία και κατευθυνόμενη μετανάστευση των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων in vitro⁸. Ωστόσο δεν υπάρχουν μελέτες που να αφορούν τη διερεύνηση της κινητικότητας των περιφερικών μονοκυττάρων στον IDDM σε σχέση με τα επίπεδα του ασκορβικού οξέος και την in vivo επίδρασή του στους ασθενείς αυτούς. Για το λόγο αυτό αποφασίσαμε να μελετήσουμε την τυχαία και κατευθυνόμενη κινητικότητα των Π.Μ. και τα επίπεδα του Α.Ο. στο πλάσμα και στα μονοκύτταρα ασθενών με IDDM, πριν και μετά την per os χορήγηση Α.Ο.

Υλικό και Μέθοδοι

Μελετήθηκαν 10 ασθενείς με IDDM (5 άνδρες και 5 γυναίκες) ηλικίας 14-19 χρόνων (\bar{x} = 18 ±), που είχαν επιλεγεί σύμφωνα με την ισχύουσα ταξινόμηση⁹.

Η μέση διάρκεια της νόσου ήταν 18,5 μήνες. Οι 9 ασθενείς λάμβαναν θεραπεία υποκατάστασης με ινσουλίνη και ένας ρυθμιζόταν μόνο με διαίτα. Λεπτομέρειες φαίνονται στον πίνακα 1.

Οι ασθενείς είχαν ελεύθερο ιστορικό από επιπλοκές της νόσου, άλλες νόσους και δεν έπαιρναν φάρμακα που επηρεάζουν τη λειτουργία των Π.Μ. Είκοσι υγιείς εθελοντές αντίστοιχης ηλικίας και φύλου χρησίμευσαν για μάρτυρες.

Και στις δύο ομάδες χορηγήθηκε 1 g × 1 Α.Ο. την ημέρα για 15 συνεχείς ημέρες.

Απομόγωση μονοκυττάρων: Πραγματοποιήθηκε με τη συλλογή 20 ml ηπαρινισμένου αίματος και επιστίβαξη σε lymphoprep (Flow Laboratories), φυγοκέντρηση σε 400 g × 30 min, συλλογή του στρώματος των μονοκυττάρων και πύση σε Medium 199 (Flow Laboratories) δύο φορές × 10 min. Μετά, τα κύτταρα αραιωνόταν σε αναλογία 1 × 10⁷ μονοκύτταρα ανά ml καλλιερητικού υλικού (διάλυμα Gey's όπως περιγράφεται αλλού¹⁰).

Πίνακας 1

Ασθενείς	Επίπεδα γλυκόζης αίματος		Θεραπεία
	Πριν	Μετά	
1	300 mg%	38 μονάδες (2 δόσεις)	
2	85 mg%	19 μονάδες (2 δόσεις)	
3	160 mg%	22 μονάδες (2 δόσεις)	
4	165 mg%	24 μονάδες (2 δόσεις)	
5	175 mg%	22 μονάδες (2 δόσεις)	
6	95 mg%	35 μονάδες (2 δόσεις)	
7	300 mg%	44 μονάδες (2 δόσεις)	
8	160 mg%	40 μονάδες (2 δόσεις)	
9	260 mg%	40 μονάδες (2 δόσεις)	
10	135 mg%	διαίτα	

Τυχαία και κατευθυνόμενη μετανάστευση: Η τυχαία μετανάστευση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια τροποποιημένου θαλάμου Boyden κατά τη μέθοδο του Wilkinson¹⁰, με τη χρήση φίλτρων μεμβράνης διαμετρήματος πόρου 8 μm (Sartorius). Περιληπτικά, μετά επώαση στους 37° C επί 2 ώρες, απομονώνονταν τα φίλτρα, γινόταν μονιμοποίηση με μεθανόλη και χρώση με αιματοξυλίνη. Η χημειοταξία υπολογιζόταν σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφει ο Wilkinson παρουσία καζεΐνης (Merck) και η τυχαία μετανάστευση σύμφωνα με την ίδια τεχνική, αλλά παρουσία μόνο διαλύματος Gey's (pH 7.4). Στην εκτίμησή των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του μετώπου (leading front method) όπως περιγράφεται από τους συγγραφείς¹⁰.

Επίπεδα ασκορβικού οξέος: Το ασκορβικό οξύ του πλάσματος υπολογίστηκε με τη βοήθεια της κλασσικής μεθόδου των Roe και Kuether όπως περιγράφεται από τον Natelson¹¹.

Το ασκορβικό οξύ των μονοκυττάρων μελετήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Denson και Bowers¹².

Τα ευρήματα της μελέτης αναλύθηκαν στατιστικά με τη βοήθεια του paired t test (έλεγχος της επίδρασης του Α.Ο. στις παραμέτρους που μελετήθηκαν) και με τη βοήθεια του Student's test για τη σύγκριση των τιμών μεταξύ ομάδος ασθενών και μαρτύρων.

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα φαίνονται στους πίνακες 2 και 3. Όπως προκύπτει από αυτά τόσο η τυχαία, όσο και η κατευθυνόμενη μετανάστευση των

Πίνακας 2. Τυχαία και κατευθυνόμενη μετανάστευση των περιφερικών μονοπυρήνων σε φυσιολογικά άτομα και ασθενείς με IDDM πριν (α) και μετά (β) την *per os* χορήγηση ασκορβικού οξέος

	Τυχαία μετανάστευση	Κατευθυνόμενη μετανάστευση
Φυσιολογικά άτομα	14,00 ± 5,66	25,90 ± 9,33
	p > 0,05	p > 0,05
Ασθενείς (α)	20,50 ± 5,77	20,84 ± 5,16
	p > 0,1	p > 0,1
Ασθενείς (β)	22,08 ± 7,25	22,48 ± 8,54

Πίνακας 3. Επίπεδα ασκορβικού οξέος στο πλάσμα και στα μονοπύρρηνα φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με IDDM πριν (α) και μετά (β) την χορήγηση *per os* ασκορβικού οξέος

Ομάδες μελέτης	Επίπεδα ΑΟ πλάσματος	Επίπεδα ΑΟ μονοπυρήνων
Φυσιολογικά άτομα	0,93 ± 0,24	19,97 ± 6,49
	p > 0,05	p < 0,01
Ασθενείς (α)	1,25 ± 0,41	9,1 ± 4,65*
	p > 0,05	p < 0,05
Ασθενείς (β)	2,80 ± 2,38	16,47 ± 8,72*

Π.Μ. των ασθενών, δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά από εκείνες των μαρτύρων ($p > 0,05$ και $p > 0,1$ αντίστοιχα). Επίσης τα επίπεδα του Α.Ο. του πλάσματος βρέθηκαν παρόμοια προς εκείνα των υγιών μαρτύρων ($p > 0,05$). Αντίθετα τα επίπεδα του Α.Ο. των Π.Μ. διαπιστώθηκαν σημαντικά ελαττωμένα σε σύγκριση προς τους μάρτυρες ($p < 0,01$). Η *per os* χορήγηση του Α.Ο. δεν μετέβαλε σημαντικά τα επίπεδα του Α.Ο. στο πλάσμα ($p > 0,1$), αύξησε όμως σημαντικά τα ενδοκυττάρια επίπεδα του στα Π.Μ. ($p \leq 0,05$), ώστε να μην προκύπτει σημαντική διαφορά από εκείνα των φυσιολογικών ατόμων ($p > 0,05$).

Όσον αφορά την επίδραση της χορήγησης του Α.Ο. στην τυχαία και κατευθυνόμενη μετανάστευση των Π.Μ., δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές μεταβολές πριν και μετά τη φόρτιση όπως έδειξε η σύγκριση των αποτελεσμάτων ($p > 0,05$).

Συζήτηση

Το σύστημα των περιφερικών μονοπυρήνων στον IDDM δεν έχει μελετηθεί ικανοποιητικά, όσον αφορά το ρόλο του στη 2η γραμμή άμυνας (1η γραμμή: ανατομικοί φραγμοί κλπ.) του οργανισμού έναντι των λοιμώξεων.

Ο λόγος που επιλέχθηκαν κατά το δυνατό νεώτεροι ασθενείς με πρόσφατο ιστορικό της νόσου, ήταν για να μελετήσουμε την κινητικότητα των Π.Μ. στον IDDM, προτού εμφανισθούν δευτερογενείς επιπλοκές της νόσου που θα επηρεάζουν δυνητικά τη λειτουργία των μονοπυρήνων. Παράλληλα, ο ρόλος του Α.Ο. στην τυχαία και κατευθυνόμενη μετανάστευση των Π.Μ. σε ασθενείς με IDDM δεν είναι γνωστός. In vivo μελέτες έχουν δείξει ότι η υπεργλυκαιμία ευνοεί την ένδεια του Α.Ο. στα μονοπύρρηνα^{13,14}.

Στους ασθενείς που μελετήσαμε διαπιστώσαμε ένα εκσεσημασμένο έλλειμμα Α.Ο. στα περιφερικά μονοπύρρηνα, παρά τα επαρκή του επίπεδα στο πλάσμα, η οποία όμως δεν επηρεάζει την τυχαία και κατευθυνόμενη μετανάστευσή τους.

Αντίθετα, τα φυσιολογικά άτομα που ελέγξαμε, με αντίστοιχα επίπεδα Α.Ο. πλάσματος είχαν επαρκή ενδοκυττάρια επίπεδα Α.Ο. στα Π.Μ. του ύψους των 19,97 mg% κατά μέσο όρο. Το γεγονός ότι στους ασθενείς μετά τη φόρτιση με Α.Ο. αποκαταστάθηκε η ενδοκυττάρια επάρκεια σε πρακτικώς φυσιολογικά επίπεδα υποδηλώνει ότι στους ασθενείς αυτούς υπάρχει ένα ταχύτερο «turn over» του ασκορβικού οξέος που οδηγεί σε ενδοκυττάριο έλλειμμα. Η άποψη αυτή υποστηρίχθηκε εξ άλλου και από τους Chen και συν.¹⁴ και το εύρημα αποδόθηκε στην υπεργλυκαιμία η οποία προκαλεί πιθανώς ανταγωνιστική αναστολή της ενδοκυττάριας μεταφοράς του Α.Ο. προς την γλυκόζη. Ισχύει δηλαδή πιθανώς ένας κοινός μηχανισμός μεταφοράς για τις δύο ουσίες^{14,15}.

Σύμφωνα με τις προτεινόμενες ερμηνείες, η αποκατάσταση της ενδοκυττάριας επάρκειας Α.Ο. επιτυγχάνεται με δυνητικά υψηλότερα επίπεδα του στο πλάσμα.

Η έλλειψη στατιστικά σημαντικών μεταβο-

λών τόσο στην τυχαία όσο και στην κατευθυνόμενη μετανάστευση των Π.Μ. υπονοεί ότι η λειτουργικότητά τους δεν επηρεάζεται τουλάχιστον πρωτοπαθώς στον IDDM. Η παρατήρηση ότι η αύξηση μετά από φόρτιση των ενδοκυττάρων επιπέδων Α.Ο. δεν επέδρασε στη κινητικότητα των μονοκυρήνων οφείλεται ίσως στο ότι η λειτουργικότητά τους ήταν ήδη φυσιολογική πριν από τη φόρτιση. Η μικρή μη σημαντική ελάττωση της χημειοταξίας των Π.Μ. που παρατηρήθηκε στους ασθενείς με IDDM θα μπορούσε ίσως να αποδοθεί στα κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα τα οποία αποκλείουν τους Fc υποδοχείς των μονοκυρήνων αναστέλλοντας έτσι την πόλωσή τους προς την κατεύθυνση του ερεθίσματος¹⁸. Παράλληλα η υπερωσμωτική κατάσταση, στην οποία βρίσκονται τα περιφερικά μονοκύρηνα των ασθενών αυτών, ίσως ερμηνεύει την ελαφρά αύξηση της χημειοκίνησής τους (κύτταρα ενεργοποιημένα μεταβολικά) που παρατηρήθηκε στους ασθενείς μας. In vitro παρατηρήσεις ενισχύουν την άποψη αυτή⁹.

Τελικά, επειδή η βιολογική σημασία των χαμηλών ιστικών επιπέδων ασκορβικού οξέος στο σακχαρώδη διαβήτη δεν είναι διευκρινισμένη, δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο να επηρεάζουν τα μακροχρονίως χαμηλά επίπεδα Α.Ο. στα μονοκύρηνα των ασθενών με IDDM άλλες φάσεις της φαγοκυτταρικής λειτουργίας (π.χ. ενσωμάτωση, ενδοκυττάρια μικροβιοκτονία) οι οποίες δεν ερευνηθήκαν στην παρούσα μελέτη, αλλά θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθούν.

Abstract

Boura P, Papazoglou N, Papadopoulou A, Manes C, Magoula I, Tsapas G, Kontogiannis G, Skaragas G. Peripheral monocyte locomotion in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) type I patients; the in vivo effect of ascorbic acid. Hellen Diabetol Chron, 1989; 1: 55-59.

Peripheral monocyte random and directed migration were studied in 10 patients suffering from IDDM and in a group of normal subjects. Ascorbic acid plasma and monocyte levels were also determined in both patients and controls. After the oral administration of ascorbic acid at a dose of 1 g/d x 15 consecutive days, the above mentioned parameters were re-examined. A modified Boyden chamber was used for the measurement of monocyte locomotion. Ascorbic acid

levels were measured phasmatoscopically. We obtained the following results: 1) ascorbic acid plasma levels did not differ from those found in controls. Ascorbate administration did not change its levels. 2) ascorbic acid monocyte levels were found significantly lower in the group of patients compared to control group. Ascorbate administration caused a significant improvement on it. 3) peripheral monocyte locomotion did not differ from that found in normals and ascorbate administration did not alter it. We conclude that ascorbic acid per os administration causes an increase in the intracellular ascorbate levels in the patients group, without influencing normal monocyte random and directed migration. It appears that monocytelocomotive function is not affected at least primarily in the disease.

Βιβλιογραφία

1. Valerius NH, Eff C, Karle H, et al. Neutrophil and lymphocyte function in patients with diabetes mellitus. Acta Med. Scand, 1982; 211(6): 463-7.
2. Rayfield EJ, Ault MJ, Keusch GT, Brothers MJ, Nechemias C, Smith H. Infection and diabetes: the case of glycose control. Am. J. Med., 1982; 72(3): 439-50.
3. Kjesem U, Hilsted J, Madsbad S, et al. Polymorphonuclear leukocyte dysfunction during short term metabolic changes from normo- to hyperglycemia in type I (insuline dependent) diabetic patients. Infection, 1988; 16(4): 215-221.
4. Geisler C, Almdal T, Bennedsen J, Rhodes JM, Kolendorf K. Monocyte functions in diabetes mellitus. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand, 1982; 90(1): 33-7.
5. Μπούρα Π, Ραπτοπούλου-Γιγή Μ, Ορφανού-Κουμμερκερίδου Ε. Λειτουργική ικανότητα των περιφερικών πολυμορφοκυρήνων και μονοκυρήνων στον μη-ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη. Γαληνός, 1986; 28(5): 810-816.
6. Levine M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. New Engl. J. Med. 1986; 314(4): 892-902.
7. Anderson R. Ascorbic acid and immune functions. In: Counsell N, Horning DJ, eds. Vitamin C. ascorbic acid. London: Applied Science Publishers 1981; 249-272.
8. Goetz EJ, Wasserman SI, Gigli I, Austen KF. Enhancement of random migration and chemotactic response of human leukocytes by ascorbic acid. J. Clin. Invest. 1974; 53: 813-818.
9. Μανές Χ, Παπάζογλου Ν. Ταξινόμηση σακχαρώδη διαβήτη. Ανασκόπηση. Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά, 1988; 1: 1-8.
10. Wilkinson PC. Neutrophil leukocyte function tests. In: Thompson RA, ed. Techniques in Clinical Immunology. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1977; 201-

- 214.
11. *Natelson S.* Microtechniques of clinical chemistry. Thomas CC, 2nd ed. Springfield III, 1961; 121-
 12. *Denson KW, Bowers EF.* The determination of ascorbic acid in white blood cells. *Clin. Science*, 1961; 21: 157-159.
 13. *Mooradian AD, Morley JE.* Micronutrient status in diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* 1987; 45: 877-95.
 14. *Chen MS, Hutchinson ML, Pecoraro RE et al.* Hyperglycemia-induced intracellular depletion of ascorbic acid in human mononuclear leukocytes. *Diabetes*, 1983; 32: 1078-81.
 15. *Bigley R, Wirth M, Layman M, Riddle M, Stankova L.* Interaction between Glycose and dehydroascorbate transport in human neutrophils and fibroblasts. *Diabetes*, 1983; 32: 545-48.
 16. *Abrass CK.* Evaluation of the presence of circulating immune complexes and their relation to glomerular IgG deposits in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin. Exp. Immunol.*, 1984; 57: 17-21.
 17. *Abrass CK, Heber D, Lieberman J.* Circulating immune complexes in patients with diabetes mellitus. *Clin. Exp. Immunol* 1983; 52: 164-71.
 18. *Haston WS, Wilkinson PC.* Locomotion and chemotaxis of leukocytes: gradient perception and locomotor capacity. *Current Opinion Immunol.*, 1988; 1: 5-9.
 19. *Kitahara M, Eyre HJ, Lynch RE, Rallison ML, Hill HR.* Metabolic activity of diabetic monocytes. *Diabetes*, 1980; 29: 251-4.

Πρόσθετοι όροι
Διαβήτης
Μονοπύρρηνα
Ασκορβικό οξύ
Χημειοκίνηση
Χημειοταξία

Key words
Diabetes
Mononuclear
Ascorbic acid
Chemokinesis
Chemiotaxis
