

Diabetes Mellituslu Hastalarda Nötrofil Fagositoz Fonksiyonu, Nötrofil Enerji Metabolizması Ve Kan Şekeri Değişimi

Sinan BOYNUEĞRI¹, Armağan TUĞRUL²

ÖZET:

Amaç: Diabetes mellituslarda infeksiyonların daha ağır seyretmesinin nedenlerinden birisi olarak özellikle lökosit fagositozundaki bozulma düşünülmektedir. Bozulmuş fagositoz, intrinseksik defekte ve enerji metabolizmasındaki değişikliklere bağlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem: Biz de çalışmamızda 30-65 yaşlarındaki 27 NIDDM'lu hastadan ve 34-59 yaşlarındaki 17 kontrol olgusundan alınan venöz kanlardan elde edilen lökositlerin fagositoz fonksiyonlarını, fagositozun ortam şeker değeri değişikliklerini ve zamana karşı değişimlerini inceledik.

Bulgular: NIDDM'lu hastalarda glisemi derecesi artışı ile fagositik indeksin azaldığını saptadık. İzole lökositler kullandığımız için bunun diabetiklerin lökositlerindeki defekte bağlı olabileceğini düşündük.

Tartışma: Hasta ve kontrol grubunda deneklerden izole edilen lökositlerde süreye bağlı olarak fagositozun artışı, ancak bunun kontrol grubundaki değerlere ulaşamadığını saptadık. Farklılığın diabetik lökositlerdeki enerji metabolizması değişiklikleri ile hücre içi kalsiyum iyon seviyesi değişikliğine bağlı olabileceğini düşündük.

Anahtar Sözcükler: Diabetes mellitus, lökosit fagositozu, hiperglisemi.

SUMMARY:

PHAGOCYTIC FUNCTION AND ENERGY METABOLISM OF NEUTROPHILS' AND ALTERATIONS OF BLOOD GLYCOSE LEVEL IN DIABETIC PATIENTS

Purpose: It is considered that the reason of serious development of infections in patients of diabetes mellitus as the disturbance in phagocytosis. The impaired phagocytosis is dedicated to intrinsic defect and alterations in energy metabolism.

Material and Method: We evaluated the venous blood taken from 27 NIDDM patients whose ages were between 30 and 65, and 17 control healthy persons whose age range was 34-59. In these evaluations we investigated the phagocytosis functions of leucocytes, the value of medium blood glucose, and their alterations throughout the time.

Results: We established the decrease of phagocytosis index as a result of increase in the level of glycemia. Because we had used isolated leucocytes, we considered that this could be related to the intrinsic defect in leucocytes of diabetics.

Conclusion: We determined the increases of phagocytosis in isolated leucocytes of patients and control groups, in respect of time, but this increase could not reach to the values in control group. We considered this difference as a result of alterations of energy metabolism in leucocytes and level of calcium ion in intracellular.

Keywords: Diabetes mellitus, phagocytosis of leucocytes, hyperglycemia.

GİRİŞ ve AMAÇ:

Diabetes mellituslu hastalarda infeksiyon insidensinin sağlıklı kişilerden daha fazla olduğu ve diabetli şahıslarda infeksiyonların komplikasyonlara ve ölümlere daha sık neden olduğu bilinir (1). Diabetes mellitusta infeksiyonlar daha şiddetli seyreder.

Polimorf nüveli lökositler bakteriyel infeksiyonlara karşı olan vücut direncinde ilk basamağı oluştururlar. Etken mikroorganizmalara doğru hareketlenerek

çevrelerinde birikir, yutma ve öldürme ile etkisiz hale getirirler (2). Diabetik hastalarda vücut direncinde rol oynayan nötrofillerin kemotaksisinde, vasküler endotele yapışmasında, fagositozunda, hücre içi öldürmede, serum opsoninlerinde ve hücresel immünenin çeşitli basamaklarında bozukluklar olduğu öne sürülmekte ve birbiri ile çelişen sonuçlar bildirilmektedir (1-6). Çalışmalar uzun süreli kan şekeri değerleri yanısıra, kısa süreli kan şekeri değişiklikleri ile

¹ Uzm.Dr.Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D.

² Doç.Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D.

nötrofil fonksiyonları arasındaki ilişkileri ve diabetiklerin nötrofillerindeki enerji metabolizması değişiklikleri ve moleküler düzeydeki diğer değişiklikleri araştırmaya yönelmiştir.

Biz de kısa süreli kan şekeri değerlerini ve bu süre içindeki diabetik nötrofillerin fagositoz fonksiyonunu, ortamda şeker değişikliklerinin fagitoza yansımalarını araştırmayı amaçladık. Bulgularımızı nötrofil enerji metabolizması ve fagitoz yönünden açıklamaya çalıştık.

MATERİYEL VE METOD:

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi İç Hastalıkları AD Endokrinoloji BD Diabetes Mellitus polikliniğinde sürekli takip edilen, en az 3 sene önce klinik ve laboratuar olarak diabet tanısı konmuş, yaş ortalamaları 49.4 ± 7.2 yıl (30-65 yaş) olan NIDDM'lu 27 hasta ve yaş ortalamaları 44.6 ± 9.4 yıl (34-59 yaş) olan 17 sağlıklı kontrol ile yapıldı.

Hastaların lökosit fonksiyonlarını etkileyebilecek diğer hastalıkların olmamasına, ilaç kullanımının özellikle kalsiyum kanal blokerlerinin kullanılmamasına, hastaların insülin kullanmıyormasına özen gösterildi. Üre, kreatinin düzeyleri normal, infeksiyonu ve hematolojik hastalığı olmayan Tip II diabetes mellituslular vaka olarak kabul edildi.

Kontrol grubu yaş ortalamaları hasta grubuna uygun sağlıklı gönüllü kişilerden seçildi.

Hasta ve kontrol grubundaki olguların 24 saatlik normal diyet ile beslendikten ve 12 saatlik açlık döneminden sonra venöz kanları alındı. Bir ve iki saat sonunda nötrofiller ayrıldı ve fagitoz yaptırılarak fagositik indeks tayini fakültemiz hematoloji laboratuvarında yapıldı. Fagositik tayini için modifiye Miller-Nilson metodу kullanıldı (7).

Lökositlerin elde edilmesi:

Deney günü hastalardan ve kontrollerden 12 saatlik açlıktan sonra heparinize edilmiş 10cc.lik plastik enjektöre 7cc. kuru kan alındı, üzerine 3.5cc 70.000 mol ağırlığında dekstran (Makrodeks) çekildi, oda sıcaklığında 45-60dak. bekletildi. Eritrositler dibe çöktü ve üstte açık sarı renkte lökositten zengin plasma ve dekstran karışımı kaldı. Lökosit içeren üst bölümde 2ml materyel alındı. Lökositleri yıkamak ve dekstranı uzaklaştırmak amacıyla üzerine 2ml PBS çözeltisi (fosfat buffer salin) konuldu, karıştırdı.

1000 devir/dk. da 10 dak. santrifüj edildi. Altta kalan lökosit çökeleği 2 kez daha aynı şekilde PBS ile yıkandı ve içindeki eritrositler osmotik şok ile elimine edildiler. Lökosit çökeleği 1ml PBS ilavesi ile lökosit süspansiyonu haline getirildi.

Fagositoz ve fagositik indeks tayini:

Küçük silikonlu veya plastik tüpler spora iki sıra halinde hazırlandı. Fagitoz ortamında opsonizasyon için her deneyde aynı sağlıklı kişinin açlık venöz kanından elde edilen serum kullanıldı. 9ml serum fizyolojik üzerine sağlam serumundan 1ml ilave edildi ve karışımından 0.1ml numaralı tüplere kondu. Fagosite edilecek partikül olarak mikrobiyoloji laboratuvarımızdan sağlanan ısı ile öldürülmiş Candida albicans'ın $1 \times 10^{10}/\text{ml}$ 'lik süspansiyonundan her tüp için 0.1cc kullanıldı. Üzerine önceden hazırlanmış olan lökosit süspansiyonundan 0.2ml kondu. Elle karıştırılarak 37 santigrad derecelik etüvde $\frac{1}{2}$ saat bekletildikten sonra 500 devirde 5 dak. santrifüj edildi. Üst kısmı döküldü. Kalan kısma bir damla pastör pipeti ile serum fizyolojik konup karıştırdı.

Karışımından 2ayı lama 1er damla damlatıldı. Birinci lam üzerindeki damlaya %1'lik eozin yeşilinden damlatıldı. Üzerine lamel kapatılarak 30 dak. bekletildi. İlk mikroskopunda immersiyonla 100 nötrofil sayılarak kırmızı renge boyanan ölü nötrofiller saptanarak canlılık oranları tespit edildi. Hazırlanan ikinci lam yayilarak May-Grünwald ve Giemsa ile boyandı. İlk mikroskopunda immersiyonla 200 adet nötrofilin kaç adet Candida albicans yuttuğu saptandı. % fagositik indeks hesabı için bulunan sayı 2'ye bölündü ve canlılık oranına göre düzeltme yapıldı. 1 saat sonra kalan lökosit süspansiyonlarından aynı işlem ile ikinci fagositik indeks tayini yapıldı.

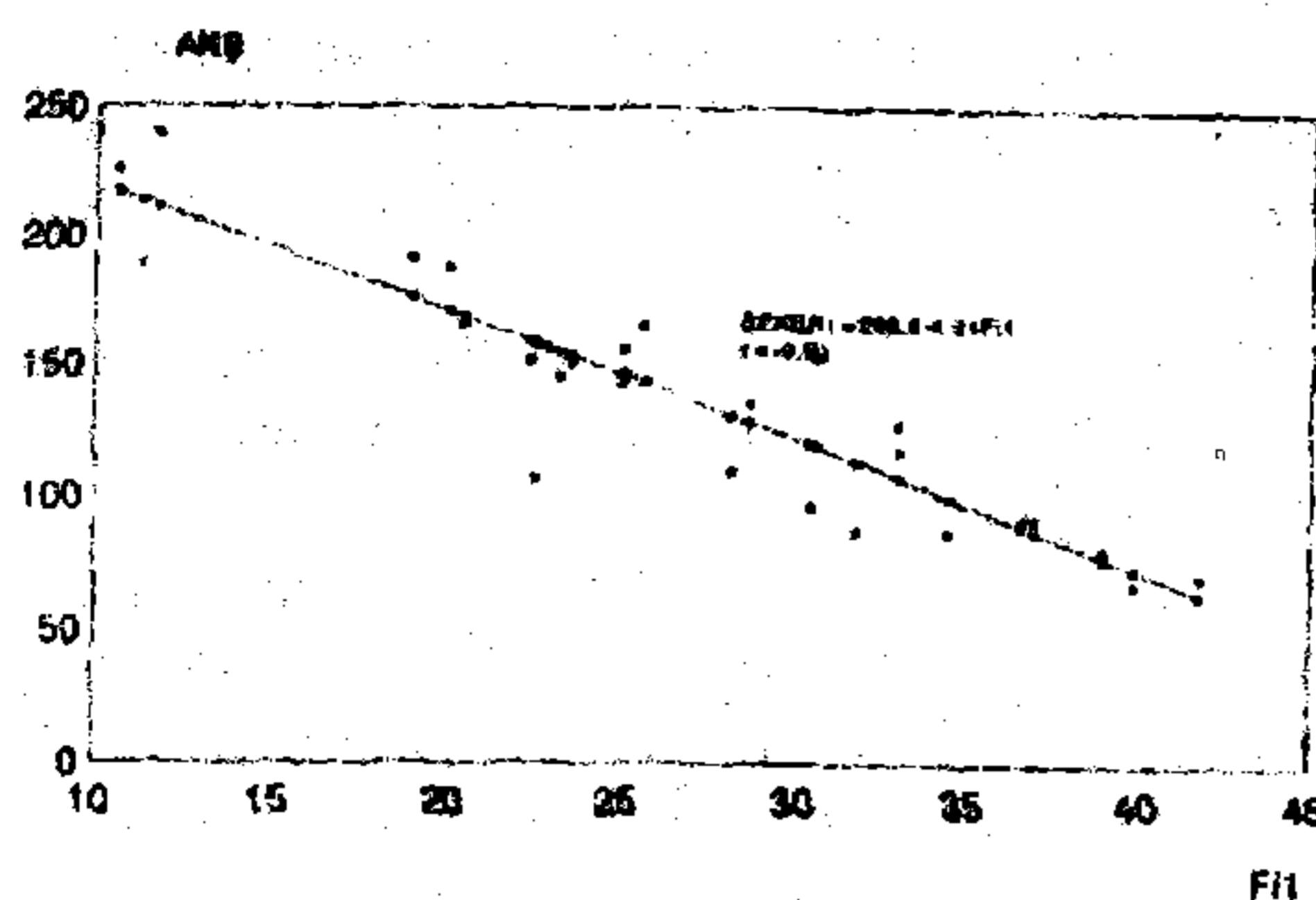
İşlemlere başlanmadan ve deksrtran karışımının çöktürülmesi sonucu elde edilen nötrofil süspansiyonu ortamının 1. ve 2. saat sonundaki ortam şeker değerleri tayin edildi.

Elde edilen sonuçlar Mann-Whitney U ve Wilcoxon Matched Pairs ile karşılaştırıldı. $p < 0.05$ anlamlı olarak değerlendirildi. Hasta ve kontrol grubunda zaman ile fagositik indeks arasında regresyon analizi yapılarak grafikleri çizildi.

BULGULAR:

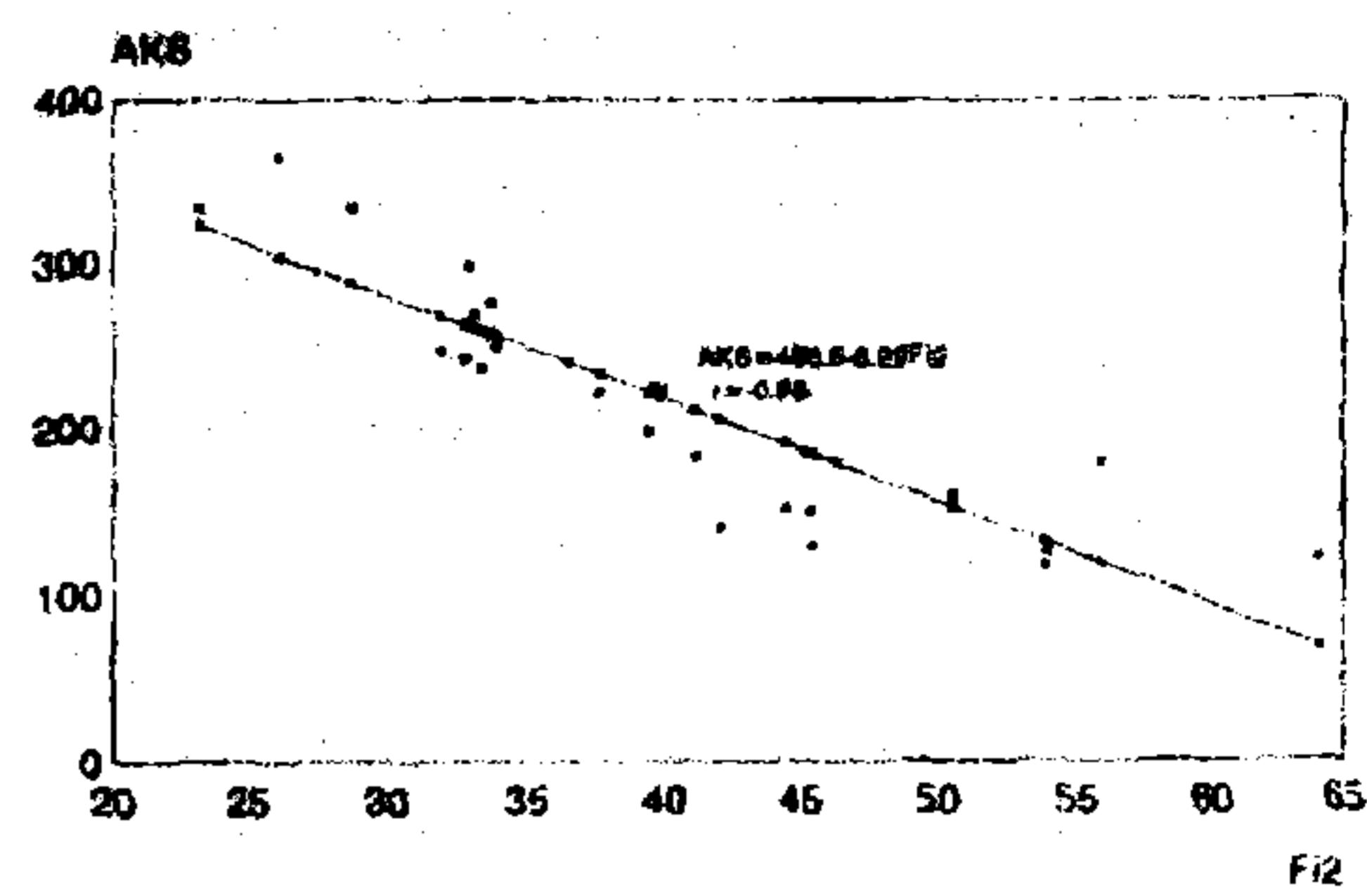
Vaka ve kontrol grubu arasında AKŞ, 1.saat ve 2.saat ortam şeker ortalaması değerleri arasında istatistiksel olarak çok anlamlı fark bulundu ($p < 0.001$, Tablo I).

DIABETES MELLİTUSLU HASTALARDA NÖTROFİL FAGOSİT FONKSİYONU



Grafik 1: AKŞ ile fagositik indeks 1 (Fi1) ilişkisi

Vaka ve kontrol grubu AKŞ değerleri ile 1.saat ortam şeker değerleri arasında anlamlı fark vardı ($p<0.05$). Bu fark deneyin yapılışı



Grafik 2: AKŞ ile fagositik indeks 2 (Fi2) ilişkisi

sırada venöz kanlara karıştırılan dekstran çözeltisi katılıarak oluşturuldu. Vaka ve kontrol grubu 1.saat ile 2.saat ortam şeker değerleri arasında anlamlı fark yoktu ($p>0.05$, Tablo 1).

Tablo I: Diabet ve kontrol grubunun zaman içindeki kan şekeri değerleri ve lökosit sayımları

	Diabet Grubu N=27	Kontrol Grubu N=17	Anlamlılık (P)	Anlamlılık (P)
AKŞ mg/dl	215 ± 69	87 ± 6	< 0.001	
1.sa. KŞ. mg/dl	137 ± 46	56 ± 6	< 0.001	< 0.05
2.sa. KŞ. mg/dl	133 ± 44	56 ± 7	< 0.001	> 0.05
Lökosit sayısı	6648 ± 1252 /mm ³	7024 ± 1013 /mm ³	> 0.050	

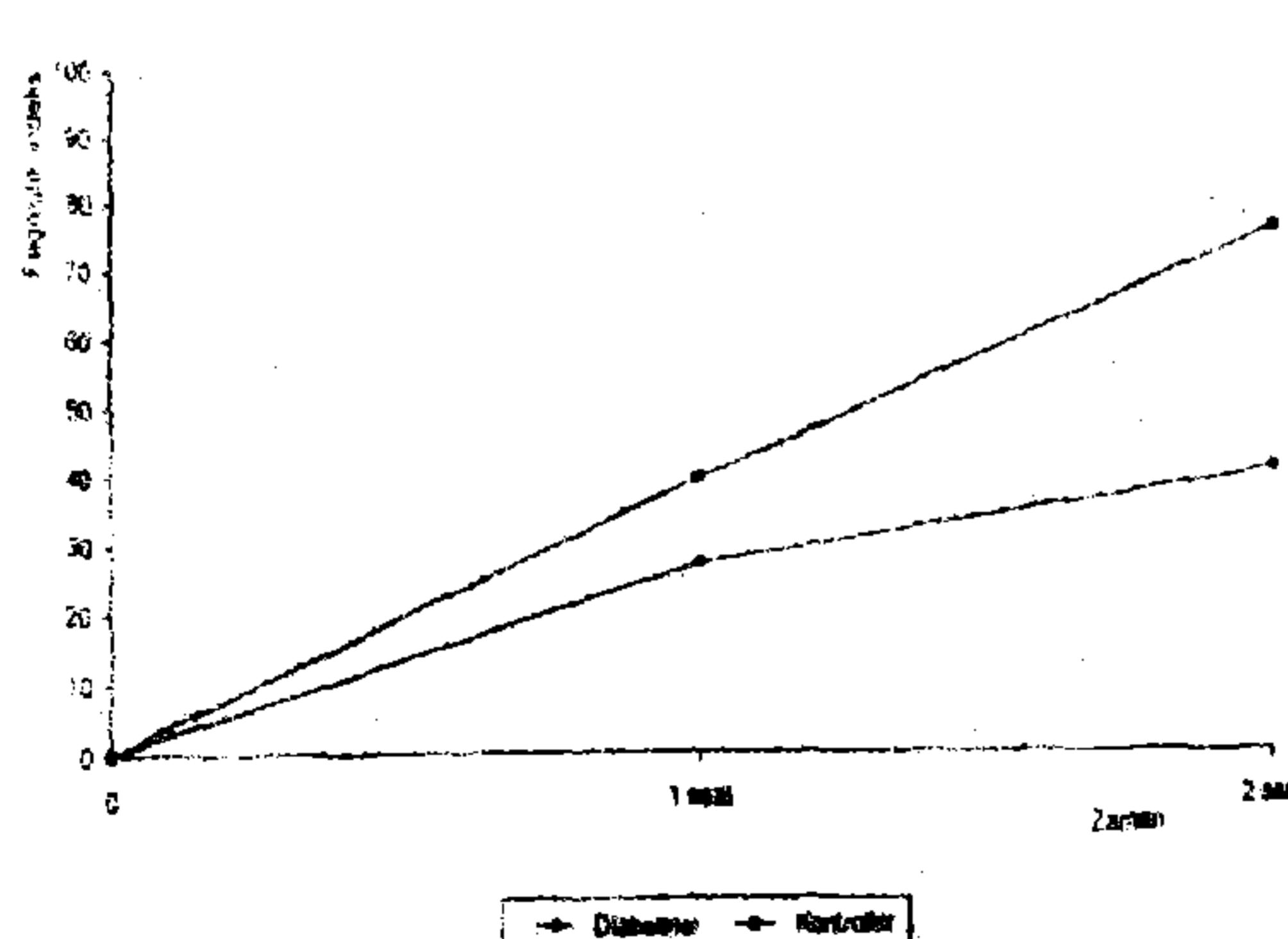
Vaka grubunun AKŞ değerleri ile fagositik indeks 1(Fi1) ve 2 (Fi2) değerleri arasında çok anlamlı negatif korelasyon saptandı ($p<0.001$, Grafik 1 ve Grafik 2). Oysa kontrol grubunda aynı değerler arasında korelasyon bulunamadı ($p>0.05$). Hem vaka grubunda, hem de kontrol grubunda fagositik indeks 1 ve 2

değerleri arasında çok anlamlı farklılık saptandı ($p<0.001$, Tablo II). Vaka ve kontrol gruplarının fagositik indeks 1 ve 2 değerleri birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0.001$, Tablo II)

Tablo II: Diabet ve kontrol grubunun saatlikfagositik indeks değerleri

	Diabet grubu n=27	Kontrol grubu n=17	Anlamlılık (p)
Fagositik İndeks /1 Saat	27 ± 9	39 ± 5	< 0.001
Fagositik İndeks /2 Saat	40 ± 10	73 ± 8	< 0.001
Anlamlılık p	< 0.001	< 0.001	

Vaka ve kontrol gruplarının her birinin saatte göre fagositik indeks değerlerinin değişimi (artış şeklinde)ile, vaka ve kontrol gruplarının saatlik olarak birbirlerine göre fagositik indeks farklılıklarları (artışlar) Grafik 3' te gösterildi.



Grafik 3: Diabet ve kontrol grubunun fagositik indeks ile zamanın ilişkisi.

TARTIŞMA:

Diabetes mellitusluların infeksiyonlara sağlıklı kişilerden daha yatkın olduğu ya da infeksiyonların daha şiddetli ve komplikasyonlu seyir izlediği bilinmektedir. Infeksiyonlara olan eğilimin çeşitli nedenleri arasında lökosit fagositoz (yutma) kusuru önemli bir yer tutmaktadır (8,9).

Yutma olayı metabolik enerji gerektiren bir olaydır. Yapılan deneylerde 1.17 mikron çapında bir adet lateks partikülün nötrofil içine taşınabilmesi için 2×10 mol ATPnin gerekli olduğu gösterilmiştir (2). Nötrofiller kuru ağırlıklarının %18'i kadar glikojen taşımakta olup, glikojen fagositoz fonksiyonunun devamı için enerji deposu görevini yapar (2).

Çalışmamızda vaka ve kontrol grubunun lökosit değerleri arasında istatistiksel anlamlı farklılık olmadığını gördük ($p>0.05$, Tablo I). Bu sonuç diabetlilerde sayısal değişikliğin değil fonksiyonel bozukluğun önemli olduğunu düşündürmektedir.

Vaka ve kontrol grubunda AKŞ ile 1. saat ortam şeker değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p<0.05$, Tablo I). Şeker değerindeki bu düşmeler ortama dekstran gibi şeker değeri olmayan çözelti karıştırılması nedeniyle oluşturulan seyrelmeye bağlı idi.

Vaka ve kontrol grubunda ayrı ayrı 1. ve 2. saat ortam şekerleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$, Tablo I). Bu sonuç ortam şekerinin 2 saat sonunda lökositler tarafından kullanılmadığını gösteriyordu.

Fagositoz enerji gerektiren bir olay olup, bu özellikle yutma safhası için büyük öneme sahiptir. Nötrofillerde fagositoz sırasında glikojenin enerji kaynağı olarak kullanıldığı geçektir ve glikojen depoları ilk 30 dakikada yarıya inmektedir. Fagositoz sırasında ayrıca ekstrasellüler ortamda glikoz da enerji sağlamak için kullanılmaktadır (5,10).

Çalışmamızda 1. ve 2. saatler sonundaki ortam şeker değerleri arasında ne vaka ne de kontrol grubunda anlamlı değişiklikler olmamıştır. Bu da 2 saat sonunda ekstrasellüler ortamdan henüz glikoz kullanımının olmadığını, muhtemelen glikojen depolarının kullanıldığını göstermektedir. Nitekim bir çalışmada ekstrasellüler ortamdan glikoz alımını değerlendirebilmek için deneye 4 saat devam edilmesi gereği, 1 saatlik süre sonunda ortamda glikoz miktarının fazla değişmediği, izole nötrofillerin bir saatlik süre sonunda glikojen depolarının %80'ini harcadığı bildirilmiştir (5).

AKŞ ile fagositik indeks 1 ve fagositik indeks 2 değerleri arasında vaka grubunda çok anlamlı negatif korelasyon saptandı ($p<0.001$, Tablo II, Grafik 1 ve 2). Yani kan şekeri düşunce fagositik indeks artıyor ya da kan şekeri artınca fagositik indeks azalıyor idi. Çalışmamızda izole lökositler kullanıldı

ve 1/10 oranında seyreltilmiş aynı sağlam serum ortamında fagositoz meydana getirildiği için, lökosit fagositozundaki kontrol grubuna göre olan azalmanın tip II diabetes mellituslu hastaların lökositlerindeki intrensek defekte bağlı olabileceği düşünüldü.

Yapılan çalışmalar arasında lökosit fagositoz kusuru saptananlar (11) yanında, saptanmayanlar da (12) vardır. Hiperglisemi ile hücre içine girişi artan kalsiyum, mitokondriyal oksidasyonu inhibe eder. Böylece granülositlerin ATP içeriği düşer. Buna bağlı olarak Ca-ATPaz ve Na-K-ATPaz enzim aktiviteleri düşüyor olabilir (13,14). Ayrıca hipergliseminin lökosit fagositozunu azalttığını bildiren (2,3) çalışmalar da çalışmamızı desteklemektedir. Yapılan bir çalışmada diabetlilerde lökosit fagositozu düşük bulunmuş ve bunun normal serumu ile tamamen düzeltmediği saptanarak olay lökosit içi intrensek defekte bağlanmıştır (5). Bizim çalışmamız da lökositoz kusurunu intrensek defekte bağlayan bir kısım literatür ile uyumludur (2,5,9).

Intrensek defektin önemli nedenlerinden biri aktin ve miyozin gibi lökosit fagositozunda rol alan proteinlerin nonenzimatik glikolizasyonudur (8,9,15). Nonenzimatik glikozillenmeyi gösteren HbA1c, teknik nedenler ile bakılamadığı için bu konuda yorum yapamıyoruz.

Normal kişilerde yapılan çalışmada süre ile fagositik indeks arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (5). Diabetli vakalarda yapılan çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiştir. 20. ve 30. dakikalarda kontrollere oranla fagositik indeks önemli oranda düşük iken, 60 ve 120. dakikalarda indeksin yükseldiği, ancak kontrollerin seviyesine çıkmadığı esbit edilmiştir (2). Bizim de süreye bağlı fagositik indeksin artması, ancak kontrollerin seviyesine çıkamaması sonucu literatür ile uyumludur (Grafik 3).

Sonuç olarak; Diabetlilerde kan şekeri yüksekliklerinin lökosit fagositozunu olumsuz etkilediğini, hücre içi kalsiyum artışı ile glikojenin yeterli kullanılamaması ve ortam glikozunu da yeterince kullanılamaması sonucunda fagositozun bozulduğunu, ancak geç dönemde glikojenini bitirdikten sonra az da olsa ortam şekeri kullanarak ve ortam şekeri azalmasının sonucunda lökosit fagositozunu artıtabileceğini, ancak hiçbir zaman normal sınırlara ulaşamayacağını düşünüyoruz. Lökosit fonksiyonlarının iyileşmesi, infeksiyonlara eğilimin azaltılması için çok iyi kan şekeri

ayarlaması yapılması gerekliliğini bir kez daha yinelemek istiyoruz.

KAYNAKLAR:

1. Sentochnik DE, Eliopoulos GM: "Infection and Diabetes" Joslin's Diabetes Mellitus. Ed. Kahn c, Ronald W, Gordon C. Boston Massachusetts. Joslin Harvard Medical. 1994, p 867-888.
2. Nolan CM, Beaty HN, Bagdade JD: Further characterization of the impaired bactericidal function of granulocytes in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes* 1978; 27: 889-894.
3. Bagdade JD, Root KR, Bulger RJ: Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes* 1974; 23: 9-15..
4. Dziatkowiak H, Kowalska M, Denys A: Phagocytic and bactericidal activity of granulocytes in diabetic children. *Diabetes* 1982; 31: 1041-1043..
5. Vural Ö, Bayram A, Bakan E: Diabetes mellituslu hastalarda nötrofil fagositozu ve fagositoz sırasında nötrofillerin glukoz kullanımı. *Atatürk Üniversitesi Tıp Fak. Tıp Bülteni* 1985; 17(1): 101-118..
6. Rayfield EJ, Ault MJ, Keusch GT, Brothers MJ, Nechemias C, Smith H: Infection and diabetes: The case for glucose control. *The American Journal of Medicine* 1982; 72: 439-450..
7. Miller ME: *Journal of Pediatrics* 74: 255, 1969.
8. Winkelstein JA, Robert HD: Phagocytosis; The normal process and its clinically significant abnormalities. *Pediatric Clinics of North America* 1974; 21: 551-569.
9. Önal G: Diabetes mellituslu hastalarda nötrofil fagositoz fonksiyonu ve HbA1c, serum çinko ve insülin düzeylerinin nötrofil fagositozuna etkileri. Yayınlannamış Uzmanlık tezi, Edirne, 1990.
10. Esemann V: The metabolism of glucose in normal and diabetic polymorphonuclear leukocytes and during phagocytosis. *Diabetologia* 1968; 4: 188-194..
11. Bybee JD, Rogers DE: The phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes obtained from patients with diabetes mellitus. *The Journal of Laboratory and clinical Medicine*. 1964;64: 1-13..
12. Brownlee M, Vlassarah, Cerami A: Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Annals of Internal Medicine* 1984 101: 527-537..
13. Alexiewicz JM, Kumar D, Smogorzewski M, Klin M, Massry SG: Polymorphonuclear leukocytes in NIDDM: Abnormalities in metabolism and function. *Annals of Internal Medicine* 1995 123: 919-924..
14. Goetz MB, Proctor RA: Normalization of intracellular calcium: A sweet solution to neutrophil dysfunction in diabetes? *Annals of Internal Medicine* 1995 123: 952-953..
15. Jovanovic J, Peterson CM: The clinical utility of glycosylated hemoglobin. *The American Journal of Medicine* 1981; 70: 331-338..