



REDAKTOR DZIAŁU  
prof. dr hab. n. med.  
Stefan Chłopicki  
Kierownik Zakładu  
Farmakologii  
Doświadczalnej  
Katedry Farmakologii  
Collegium Medicum  
UJ, Kraków

Od redakcji

Znana jest kluczowa rola zaburzeń czynności śródbłonna w rozwoju powikłań naczyniowych cukrzycy, w szczególności w rozwoju nefropatii cukrzycowej. Nieznane były jednak dokładnie mechanizmy, które są za to odpowiedzialne. Przedstawiony poniżej artykuł Gilberta i Marsdena, przedrukowany z *New England Journal of Medicine*, stanowi komentarz do przełomowej pracy Isermanna i wsp., opublikowanej w *Nature Medicine* [1], która udowodniła, że wytwarzanie aktywnego białka C (APC) poprzez aktywność śródbłonkowej trombomoduliny (TM) utrzymuje integralność śródbłonna i podocytów kapilar kłębuszkowych. W tej pracy wykazano również, że cukrzyca, zmniejszając ekspresję śródbłonkowej TM, upośledza endogenne naczynioprotekcyjne mechanizmy wywoływane przez APC. Co najciekawsze, cytoprotekcyjne, przeciwzapalne i przeciwapoptotyczne działania APC są zależne od receptora śródbłonkowego EPCR i niezależne od znanych od wielu lat przeciwwązkopowych własności APC.

Po raz pierwszy, zwrócono uwagę na naczynioochronne mechanizmy działania APC, gdy okazało się, że terapia za pomocą aktywnego białka C (APC) przeciwdziała rozwojowi dysfunkcji mikrokrążenia i endotoksycznemu uszkodzeniu płuc i innych narządów oraz zmniejsza śmiertelność wstrząsu septycznego [3]. Choć wstrząs septyczny jest związany z groźnymi zaburzeniami procesów krzepnięcia i fibrynolizy, to wydaje się, że skuteczność terapeutyczna APC w ARDS w przebiegu wstrząsu septycznego związana jest z mechanizmami przeciwzapalnymi i naczynioprotekcyjnymi APC zależnymi od śródbłonkowego receptora EPCR, a nie jest związana z przeciwwązkopowym działaniem APC [2]. Tym samym śródbłonkowa trombomodulina i uruchamiane przez śródbłonkowy receptor EPCR i receptor PAR-1 mechanizmy działania APC stanowią nowy i obiecujący cel dla farmakoterapii śródbłonna w dysfunkcji mikrokrążenia, w szczególności mikrokrążenia płuc w przebiegu posocznicy i mikrokrążenia nerek w przebiegu cukrzycy. Istnieją co najmniej dwa sposoby farmakologicznej korekcji upośledzenia aktywności układu TM-APC-EPCR: suplementacja egzogennej APC, najlepiej analogiem APC pozbawionym działania przeciwwązkopowego [2] lub stymulacja endogennej aktywności układu TM-APC-EPCR przez stosowanie leków, które zwiększają aktywność lub ekspresję TM w śródbłonnku. Zdumiewające, że statyny, działające nefroprotekcją [4], zwiększają ekspresję TM [5]. Farmakologia śródbłonna jest więc skuteczną metodą nefroprotekcji i zyskała nowy ważny mechanizm, który stanowi istotny punkt odniesienia dla dalszych badań i poszukiwań nowych sposobów leczenia nefropatii. Gorąco polecam lekturę inspirującego artykułu Gilberta i Marsdena, przełomowej oryginalnej pracy Isermanna i wsp. oraz doskonałych dwóch komentarzy, które napisali: dr hab. Tomasz Stompór oraz profesor dr hab. Anetta Undas.

Stefan Chłopicki

## Piśmiennictwo

1. Isermann B, Vinnikov IA, Madhusudhan T, et al.: Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. *Nat Med* 2007, 13: 1349-1358.
2. Kerschen EJ, Fernandez JA, Cooley BC, et al.: Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C. *J Exp Med* 2007, 204: 2439-2448.
3. O'Brien LA, Gupta A, Grinnell BW: Activated protein C and sepsis. *Front Biosci* 2006, 11: 676-698.
4. Romyne KL, Athappan G, Saab G, et al.: HMG CoA reductase inhibitors and renoprotection: the weight of the evidence. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2007, 1: 49-59.
5. Sen-Banerjee S, Mir S, Lin Z, et al.: Kruppel-like factor 2 as a novel mediator of statin effects in endothelial cells. *Circulation* 2005, 112: 720-726.



# Aktywowane białko C a nefropatia cukrzycowa

Richard E. Gilbert, MD, Philip A. Marsden, MD

## Adres:

The Keenan Research Centre of the Li Ka Shing Knowledge Institute i the Divisions of Endocrinology and Nephrology, St. Michael's Hospital i the University of Toronto – obie instytucje w Toronto

N Engl J Med 2008; 358:1628-1630

**S**tudenci medycyny są nauczani, że dysfunkcja śródbłonna ma związek z patofizjologią cukrzycowej choroby małych naczyń, szczególnie zaś uszkodzeniami kłębuszkowymi, charakterystycznymi dla nefropatii cukrzycowej. Za tymi znanymi stwierdzeniami kryje się jednak niedostatek wiedzy o biologii molekularnej ludzkich kłębuszków w cukrzycy typu 1 lub 2. Które geny są aktywowane w kłębuszkowych komórkach śródbłonna u osób od wielu lat chorujących na cukrzycę? Które geny są nieprawidłowo hamowane? Liczba niewiadomych jest ogromna. Na szczęście ostatnio opublikowane badanie Isermanna i wsp. [1] uzupełnia, przynajmniej w niewielkiej części, wiedzę.

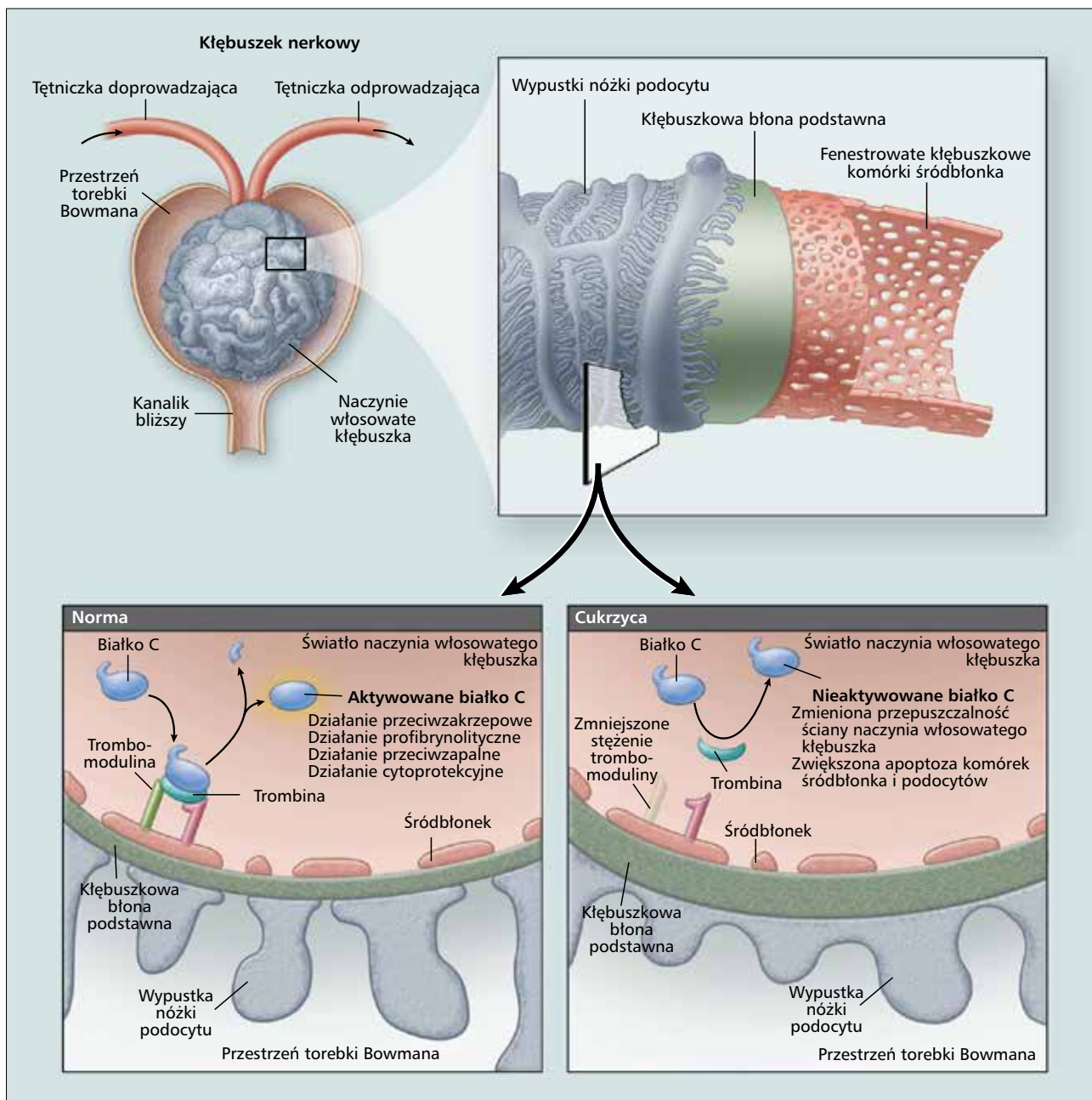
Ze względu na unikalne usytuowanie pomiędzy dwoma rodzajami tętniczek kłębuszkowe komórki śródbłonna są wystawione na bardzo wysokie ciśnienia hydrauliczne, szczególnie jeśli porównujemy je z komórkami śródbłonna typowego łożyska kapilarnego. Duże siły ścinania ze strony przepływającej krwi, wysoki współczynnik ultrafiltracji oraz wysokie ciśnienie parcjalne tlenu w świetle tętniczek również oddziałują niekorzystnie na to łożysko naczyniowe. Działanie tych czynników stresowych może być nasilane przez wiele charakterystycznych dla cukrzycy zmian, takich jak przeniesienie systemowego nadciśnienia do kłębuszka i zwiększona produkcja szkodliwych dla ściany naczynia substancji – angiotensyny II, reaktywnych form tlenu i azotu oraz zaawansowanych produktów końcowych glikacji (advanced glycation end products).

Kłębuszkowa komórka śródbłonna nie jest jednak pozbawiona sojuszników. Na przykład czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF), produkowany konstytutywnie i w nadmiarze przez podocyty, w jakiś sposób przechodzi przez błonę podstawną kłębuszka i chroni komórki śródbłonna przed apoptozą. Upośledzenie tych mechanizmów ochronnych może mieć znaczenie w cukrzycy; rozpuszczalny receptor typu 1 dla VEGF (zwany także rozpuszczalną kinazą tyrozynową fms podobną typu 1) obserwowane u chorych w stanie przedrzucawkowym [2].

Aktywowane białko C także chroni kłębuszkową komórkę śródbłonna przed apoptozą. Białko C jest aktywowane przez wiązanie się trombiny (produktu kaskady krzepnięcia) do jej receptora – trombomoduliny – na powierzchni kłębuszkowej komórki śródbłonna (rycina). Ponieważ kompleks ten katalizuje aktywację białka C, jego aktywacja odgrywa kluczową rolę w oddziaływaniach pomiędzy śródbłonkiem a składnikami krwi. Aktywowane białko C wykazuje silne działanie przeciwzakrzepowe oraz właściwości cytoprotekcyjne, fibrynolityczne i przeciwzapalne. Omawiane badanie Isermanna i wsp. sugeruje, że nefropatia cukrzycowa jest związana ze zmniejszoną produkcją kłębuszkową oraz upośledzonym działaniem aktywowanego białka C.

Podanie rekombinowanego aktywowanego białka C zmniejsza śmiertelność wśród dorosłych z ostrą posocznica [3]; jego zastosowanie farmakologiczne prawdopodobnie kompensuje czynnościowy niedobór endogennego, aktywowanego białka C. Biorąc pod uwagę działanie przeciwzakrzepowe aktywowanego białka C nie jest zaskoczeniem, że jego podanie wiąże się z ryzykiem krwawienia. Zaskakujące dla wielu badaczy było jednak stwierdzenie kluczowej roli, jaką odgrywa to białko w mikronaczyniach u chorych z posocznica.

Isermann i wsp. donoszą, że trombomodulina ulega silnej ekspresji w kłębuszkach nerkowych u dzikich myszy, jednak ekspresja stężenia mRNA i samego białka trombomoduliny – a co za tym idzie produkcja aktywowanego białka C – są przewlekłe obniżone w kłębuszkach myszy z cukrzycą indukowaną streptozotocyną. Ten obraz przypomina naczynia krwionośne w ostrej posocznicy. U myszy modyfikowanych genetycznie Isermann i wsp. poddali szczegółowej analizie szlaki, z którymi związane jest aktywowane białko C i które odnoszą się do nefropatii cukrzycowej. Badali oni myszy z cukrzycą, u których zależna od trombomoduliny aktywacja białka C była upośledzona. Po upływie 26 tygodni u tych myszy stwierdzono istotnie większą proteinurię oraz nagromadzenie



**RYCINA** Kłębuszek nerkowy w nefropatii cukrzycowej

Białko C jest aktywowane przez wiązanie się trombiny (produktu kaskady krzepnięcia) do jej receptora – trombomoduliny – na powierzchni kłębuszkowej komórki śródbłonka. Przesącz krwi jest produkowany przez ścianę naczynia włosowatego kłębuszka, zbudowanej z komórek śródbłonka, błony podstawnej oraz kłębuszkowych komórek nabłonkowych (lub podocytów). Trombomodulina tworzy kompleks o wysokim powinowactwie z trombiną – produktem kaskady krzepnięcia. Ten kompleks katalizuje przemianę białka C do jego katalitycznie aktywnej formy o silnym działaniu przeciwkrzepliwym, profibrynolitycznym, przeciwzapalnym i cytoprotekcyjnym. W nefropatii cukrzycowej produkcja aktywowanego białka C w kłębuszku jest zaburzona, częściowo z powodu wywołanego przez hiperglikemię zmniejszenia ekspresji trombomoduliny. Zmniejszona aktywność czynnościowa aktywowanego białka C zwiększa przepuszczalność ściany naczynia włosowatego kłębuszka i nasila apoptozę kłębuszkowych komórek śródbłonka i podocytów. Zaburzenia aktywności białka C mogą zatem przyczyniać się do rozwoju nefropatii cukrzycowej.

kłębuszkowej macierzy pozakomórkowej niż u myszy z grupy kontrolnej. Natomiast objawy strukturalne i czynnościowe nefropatii cukrzycowej nie rozwinęły się u myszy transgenicznnych z cukrzycą i zmienioną, sprawnie działającą formą białka C. Ponadto ich kłębuszkowe komórki śródbłonka i podocyty podlegały mniejszej apoptozie niż u myszy z upośledzoną aktywacją białka C.

Można było przewidzieć, że zmniejszona produkcja aktywowanego białka C w kłębuszkach zwierząt z cukrzycą nasili miejscowe odkładanie się trombiny i fibryny. Odkładanie się fibryny w mikronaczyjniach kłębuszka z kolei powoduje zapalenie i krzepnięcie. Isermann i wsp. zaobserwowali, że leczenie heparyną drobnocząsteczkową (enoksaparyną) nasilało nefropatię cukrzycową w ba-

danych przez nich modelach zwierzęcych. Jest to zaskakująca obserwacja, biorąc pod uwagę, że oczekiwano po heparynie zmniejszenia miejscowej produkcji trombiny. Te wyniki sugerują, że właściwości przeciwzakrzepowe aktywowanego białka C nie są kluczowe dla jego ochronnego działania na kłębuszek nerkowy. W tym świetle ważne znaczenie ma możliwość syntezy rekombinowanego aktywowanego białka C o cytoprotekcyjnych właściwościach, lecz niewielkiej aktywności przeciwzakrzepowej (poniżej 10% aktywności przeciwzakrzepowej nierekombinowanego białka C), które było skuteczne w mysich modelach posocznicy [4].

Na ile działanie aktywowanego białka C w mysim modelu opisanym przez Isermanna i wsp. mogłoby mieć odniesienie do ludzi, pozostaje sprawą otwartą. Pomimo to badanie zachęca do zweryfikowania obecnego pojmowania patofizjologii nefropatii cukrzycowej. U ludzi z cukrzycą rozrost mezangium i utrata filtrującej powierzchni kapilar ściśle koreluje ze zmniejszeniem przesączania kłębuszkowego, co pozwala przypuszczać, że postępujący rozrost mezangium uciska kapilary kłębuszkowe. Wyniki badań Isermanna i wsp. wskazują na inny scenariusz: utrata kłębuszkowych komórek śródbłonna – częściowo spowodowana przez zmniejszone stężenie aktywowanego

białka C, inicjuje uszkodzenie kapilar kłębuszka, a rozrost mezangium jest odpowiedzią na to uszkodzenie. Ponadto apoptoza może także powodować utratę kłębuszkowych komórek śródbłonna, prowadząc do nasilenia białkomoczu u chorych z nefropatią cukrzycową.

Dr Gilbert zgłasza otrzymywanie grantów od firmy Eli Lilly. Nie zgłoszono żadnych innych potencjalnych konfliktów interesów związanych z tym artykułem.

From The New England Journal of Medicine 2008; 358: 1628-1630. Translated and reprinted in its entirety with permission of the Massachusetts Medical Society. Copyright © 2008, 2009 Massachusetts Medical Society. All Rights Reserved.

## Piśmiennictwo

1. Isermann B, Vinnikov IA, Madhusudhan T, et al. Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. *Nat Med* 2007; 13: 1349-1358.
2. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004; 350: 672-683.
3. Bernard GR, Vincent J-L, Laterre P-F, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; 344: 699-709.
4. Kerschen EJ, Fernandez JA, Cooley BC, et al. Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C. *J Exp Med* 2007; 204: 2439-2448.



## Komentarz

dr hab. n. med. Tomasz Stompór  
Katedra i Klinika Nefrologii Collegium Medicum  
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

### NIEDOBÓR BIAŁKA C – KLUCZOWY MECHANIZM PATOFIZJOLOGICZNY ROZWOJU NEFROPATII CUKRZYCOWEJ?

Jako klinicysta doceniający doniosłość badań podstawowych oraz czerpiący z nich inspiracje w codziennej pracy z ogromnym entuzjazmem przeczytałem publikację Gilberta i Marsdena, jak również oryginalną pracę Isermanna z *Nature Medicine*, do której odnoszą się wymienieni autorzy [1]. Opisany w niej, niezwykle starannie i elegancko przeprowadzony eksperyment pozwolił na bardzo jednoznaczne potwierdzenie roli aktywowanego białka C (APC) w ochronie kłębuszków nerkowych w wywołanej eksperymentalnie cukrzycy przed rozwojem zmian typowych dla nefropatii cukrzycowej (DN) oraz na wyjaśnienie mechanizmów tego procesu. Praca wykazała, że APC chroni kłębuszki nerkowe przed uszkodzeniem niezależnie od wpływu na

proces krzepnięcia i działania przeciwzapalnego; korzystne działanie APC przejawia się natomiast przede wszystkim poprzez zahamowanie mitochondrialnego szlaku apoptozy w komórkach decydujących o strukturalnej i czynnościowej integralności kłębuszka nerkowego, a mianowicie w komórkach nabłonka trzewnego (podocytach) i w śródbłonnku. APC zmniejsza też nasilenie stresu oksydacyjnego w modelu DN.

Poglądy na temat roli poszczególnych struktur błony filtracyjnej ulegały ewolucji – na różnych etapach decydującą rolę w selektywnej przepuszczalności przypisywano komórkom śródbłonna, błonie podstawnej kłębuszka nerkowego lub podocytom. Obecnie poglądy na temat rozwoju białkomoczu i patogenezy wielu chorób kłębuszkowych, zwłaszcza tzw. nieproliferacyjnych (do których należy właśnie nefropatia cukrzycowa) można określić jako podocytocentryczne. Wiąże się to z dokładnym określeniem struktury i roli wielu białek błony szczelinowej (struktury łączącej sąsiadujące wypustki stopowate) oraz



cytoszkieletu podocyty. Zidentyfikowanie przyczyn wrodzonych postaci zespołu nerczycowego (np. zespołu nerczycowego typu fińskiego wywołanego mutacjami genu dla nefryny lub steroidoopornego zespołu nerczycowego wywołanego mutacjami genu dla podocyny) ujawniły kluczową rolę tych białek i samej błony szczelinowej w zapobieganiu proteinurii. Następnie opisano mutacje genów dla wielu innych białek podocyty, odpowiedzialne za rozwój kłębuszkowych chorób nerek (najczęściej opornych na standardową terapię); stworzono także wiele modeli zwierzęcych, w których doprowadzając do selektywnej inaktywacji określonych genów białek podocyty (knock-out) lub blokowania ich produktów, wywoływano kłębuszkowe choroby nerek przebiegające z białkomoczem [2,3]. Nieprawidłowości struktury lub czynności tych białek niemal zawsze prowadzą do wystąpienia najbardziej typowego zaburzenia morfologicznego spotykanego u osób z białkomoczem, jakim jest stopień wypustek stopowatych podocytów.

W nieproliferacyjnych chorobach kłębuszków nerkowych (m.in. w nefropatii cukrzycowej, nefropatii błoniastej i ogniskowym/segmentalnym stwardnieniu kłębuszków) dochodzi do ubytku podocytów (podocytopenii), a jednym z najważniejszych mechanizmów utraty tych komórek jest właśnie ich nasilona apoptoza (rzadziej do podocytopenii dochodzi poprzez utratę kontaktu z błoną podstawną kłębuszka nerkowego – wówczas żywe podocyty przedostają się do przestrzeni moczowej Bowmana i mogą być nawet zidentyfikowane w osadzie moczu). Wśród czynników inicjujących ten proces wymienia się m.in.: angiotensynę II, TGF (transformujący czynnik wzrostu), wolne rodniki tlenowe, hiperglikemię, bFGF (zasadowy fibroblastyczny czynnik wzrostu), składowe dopełniacza (zwłaszcza kompleks lityczny C5b-9), a także niedobór VEGF (czynnik wzrostu śródbłonna naczyń), HGF (czynnik wzrostu hepatocytów) czy IGF-1 (insulinopodobny czynnik wzrostu). Za bardzo istotny mechanizm utraty podocytów, a także nadmiernej aktywacji komórek mezangialnych (ze zmożoną syntezą macierzy mezangialnej i rozwojem zmian określanymi w cukrzycy jako stwardnienie guzkowe) uważa się utratę autoregulacji mikrokrążenia nerkowego. Nadmiernie rozszerzona w cukrzycy tętniczka doprowadzająca pozwala na przeniesienie się systemowego ciśnienia tętniczego na kłębuszek i sprawia, że jego struktury poruszają się wraz ze skurczowo-rozkurczowymi fazami ciśnienia tętniczego (co praktycznie nie występuje w nerce zdrowej). Takie rytmiczne pulsowanie i tzw. rozciąganie podocytów stanowi bodziec mechaniczny uruchamiający w komórce proces apoptozy [2,4-7].

Wyniki komentowanej pracy wpisują się w podocytocentryczne rozumienie patogenezy DN: prawidłowa czynność śródbłonna, przejawiająca się m.in. aktywacją białka C jest niezbędnym warunkiem ochrony podocyty przed uszkodzeniem. Obie populacje komórek

wspierają się zresztą bardzo solidarnie, ponieważ podstawowym źródłem VEGF, czynnika warunkującego prawidłową czynność śródbłonna i utrzymującego charakterystyczne dla śródbłonna nerkowego fenestracje jest właśnie podocyt [8].

Aktywowane białko C jest czynnikiem, który może wykazywać działanie nefroprotektoryjne na wielu drogach. Obok wspomnianych powyżej mechanizmów APC ma jeszcze kilka innych interesujących właściwości, potencjalnie bardzo korzystnych z punktu widzenia nefroprotekcji w DN. Komórki mezangialne i makrofagi mają na swojej powierzchni receptory dla zmodyfikowanych oksydacyjnie cząsteczek LDL, a ich pobudzenie prowadzi do wzmożonej syntezy macierzy mezangialnej oraz aktywacji procesu zapalnego w obrębie kłębuszka. W modelu laboratoryjnym cukrzycy indukowanej streptozotocyną receptor zmiatający chroni przed rozwojem nefropatii [9]. Komórki mezangialne, a także śródbłonek kłębuszkowy i makrofagi infiltrujące kłębuszek mają także na swojej powierzchni receptory dla nieenzymatycznych produktów glikacji (RAGE), a stopień uszkodzenia nerek w cukrzycy jest proporcjonalny do ich ekspresji oraz ekspozycji na RAGE [10,11]. Jak wykazano w badaniach doświadczalnych, APC ma zdolność hamowania procesu peroksydacji lipidów oraz powstawania produktów nieenzymatycznej glikacji białek, co może mieć istotne znaczenie w nefroprotekcji w cukrzycy [12].

Autorzy omawianej tu pracy stwierdzili, że nefroprotektoryjne działanie APC w nefropatii cukrzycowej nie dokonuje się poprzez modyfikację procesów krzepnięcia i fibrylizacji oraz ingerencję w proces zapalny. Nie wyklucza to jednak, że APC może w innych niż nefropatia cukrzycowa chorobach nerek działać nefroprotektoryjnie w takich właśnie mechanizmach. Mam tu na myśli choroby przebiegające z o wiele bardziej nasilonym stanem zapalnym i/lub aktywacją krzepnięcia w obrębie mikrokrążenia kłębuszkowego, niż ma to miejsce w DN, np. nefropatię toczniową, zapalenia małych naczyń z przeciwciałami klasy ANCA czy zespół hemolityczno-mocznicowy. APC ma silne właściwości cytoprotektoryjne również w stosunku do innych komórek, głównie poprzez działanie przeciwzapalne. Stwierdzono na przykład, że w eksperymentalnym przeszczepieniu komórek wysp trzustkowych podawanie APC działało ochronnie na te komórki m.in. poprzez zmniejszanie wewnątrzwartrobowej ekspresji mRNA dla TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor) i IL-1 $\beta$  oraz obniżenie stężeń selektyny E, selektyny P i sICAM (soluble intercellular adhesion molecule) w osoczu. Przekładało się to na poprawę przeżycia przeszczepionych komórek, lepsze wydzielanie przez nie insuliny oraz lepszą kontrolę glikemii u zwierząt leczonych APC [13].

W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć dane na temat zależności pomiędzy stężeniem APC a stopniem zaawansowania zmian narządowych u chorych na cukrzycę. W jednej z takich prac stwierdzono, że u cho-

rych na cukrzycę typu 2 zachodzi istotna statystycznie, odwrotna korelacja pomiędzy stężeniem APC i grubością kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnicy szyjnej wspólnej (wykładnikiem zmian o typie makroangiopatii), stopniem zaawansowania retinopatii cukrzycowej oraz – co szczególnie istotne z punktu widzenia niniejszego artykułu – nasileniem albuminurii [14]. W przeciwieństwie do badań nad posocznicą, w których niskie wyjściowe stężenie APC oraz brak jego normalizacji pod wpływem leczenia są wyznacznikami złego rokowania, w przypadku cukrzycy lub chorób układu sercowo-naczyniowego, według mojej wiedzy, nie wykazano do tej pory takich zależności ze stężeniem APC.

Pobocznym, choć ciekawym i zaskakującym wątkiem niniejszego artykułu jest stwierdzenie, że podawanie heparyny w opisanym modelu cukrzycy nasilało stopień uszkodzenia kłębuszka. Dla celów dydaktycznych warto jednak nadmienić, że zarówno heparyna niefrakcjonowana, jak i heparyny drobnocząsteczkowe i sulodeksyd wykazywały w dotychczas prowadzonych badaniach eksperymentalnych i klinicznych korzystny wpływ nefroprotekcyny w DN i chorobach kłębuszków nerkowych o innym podłożu.

Podsumowanie niniejszego komentarza będzie miało jednak wydźwięk pesymistyczny. Ostatnie dekady w nefrologii to nieskończona liczba niezwykle efektywnych zwierzęcych modeli doświadczalnych chorób kłębuszkowych. Pozwalają one na wyjaśnienie nowych mechanizmów patofizjologicznych uszkodzenia nerek. Ten bezprecedensowy postęp w badaniach podstawowych nie przekłada się na terapię: w leczeniu kłębuszkowych chorób nerek nadal jest tylko kilka tradycyjnych leków, a rzeczywistym przełomem w tym obszarze jest wprowadzenie do standardu terapeutycznego leków hamujących układ renina-angiotensyna-aldosteron. APC nie stanie się w mojej opinii nowym lekiem na DN, mimo tak jednoznacznie udowodnionego działania nefroprotekcynowego. Do wniosku takiego prowadzi jedno z pierwszych zdań z omówienia artykułu Isermanna i wsp.: „wzmrożona apoptoza komórek kłębuszkowych charakteryzuje wyłącznie wczesne, a nie bardziej zaawansowane stadia nefropatii cukrzycowej u ludzi” [1]. W posocznicy ze stosowania APC korzystają wyłącznie najczęściej chorzy (ocenia się, że korzyść z leczenia tym lekiem odnosi 1 na 10-20 chorych z posocznicą) – lek warto zatem stosować wyłącznie u osób spełniających określone kryteria ciężkości choroby [15]. W cukrzycy hamowanie apoptozy za pomocą APC musiałoby obejmować wszystkich chorych lub prawie wszystkich we wczesnych stadiach choroby. Nigdy nie będzie zapewne możliwe, na podstawie wskaźników klinicznych, biochemicznych czy genetycznych, wytypowanie z ogromnej populacji chorych na cukrzycę tych osób, u których zastosowanie tego drogiego, mało dostępnego i niepozbawionego działań niepożądanych leku mogłoby przynieść oczekiwaną poprawę. Zastosowanie go w póź-

nych stadiach DN (to jest wtedy, kiedy staje się ona klinicznie jawna) najprawdopodobniej nie przyniesie już rezultatów. Innymi słowy, lek z oczywistych przyczyn nie może być stosowany w prewencji pierwotnej DN, a w prewencji wtórnej będzie już najprawdopodobniej nieskuteczny. Ponadto APC nie ingeruje w cały szereg innych mechanizmów uszkodzających nerki w cukrzycy.

Jedyne doświadczenie z klinicznym zastosowaniem APC (drotrekoginu alfa) w chorobach nerek na większą skalę pochodzi z badań nad posocznicą. Co ciekawe, lek ten był skuteczny, zmniejszając śmiertelność wśród najczęściej chorych, ale nie wpływał korzystnie na poprawę czynności nerek; jest to tym bardziej godne podkreślenia, że dominującym mechanizmem komórkowym uszkodzenia nerek w posocznicy jest apoptoza komórek nabłonka cewek proksymalnych [15].

Dla celów praktycznych z omawianej publikacji warto jednak wyciągnąć bardzo ważną lekcję: oto zyskujemy kolejny dowód na rzecz stosowania leków, które mogą poprawić lub przywrócić zaburzoną w cukrzycy czynność śródbłonka. A zatem największa nadzieja w dobrze sprawdzonych strategiach: hamowaniu osi renina-angiotensyna-aldosteron, leczeniu hipolipemizującym, optymalnej kontroli metabolicznej cukrzycy, a w przyszłości – być może pobudzaniu mobilizacji i aktywności komórek progenitorowych śródbłonka lub ich wlewu w celach terapeutycznych.

## Piśmiennictwo:

1. Isermann B, Vinnikov IA, Maghusudhan T, et al.: Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. *Nature Med* 2007, 13: 1349-1358.
2. Shackland SJ: The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2006, 69: 2131-2147.
3. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J: Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* 2006, 354: 1387-1401.
4. Bidani AK, Griffin KA: Pathophysiology of hypertensive renal damage. Implications for therapy. *Hypertension* 2004, 44: 595-601.
5. Durvasula RV, Petermann AT, Hiromura K, et al.: Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. *Kidney Int* 2004, 65: 30-39.
6. Gruden G, Setti G, Hayward A, et al.: Mechanical stretch induces monocyte chemoattractant activity via an NF-kappaB-dependent monocyte chemoattractant protein-1-mediated pathway in human mesangial cells: inhibition by rosiglitazone. *J Am Soc Nephrol* 2005, 16: 688-696.
7. Riser BL, Varani J, Cortes P, et al.: Cyclic stretching of mesangial cells up-regulates intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte adherence: a possible new mechanism for glomerulosclerosis. *Am J Pathol.* 2001, 158: 11-17.
8. Eremina V, Quaggin SE: The role of VEGF-A in glomerular development and function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004, 13: 9-15.
9. Usui HK, Shikata K, Sasaki M, et al.: Macrophage scavenger receptor-a-deficient mice are resistant against diabetic nephropathy through amelioration of microinflammation. *Diabetes* 2007, 56: 363-372.

10. Suzuki D, Toyoda M, Yamamoto N, et al.: Relationship between the expression of advanced glycation end-products (AGE) and the receptor for AGE (RAGE) mRNA in diabetic nephropathy. *Intern Med* 2006, 45: 435-441.
11. Myint KM, Yamamoto Y, Doi T, et al.: RAGE control of diabetic nephropathy in a mouse model: effects of RAGE gene disruption and administration of low-molecular weight heparin. *Epub* 2006 May 1. *Diabetes* 2006, 55: 2510-2522.
12. Yamaji K, Wang Y, Liu Y, et al.: Activated protein C, a natural anticoagulant protein, has antioxidant properties and inhibits lipid peroxidation and advanced glycation end products formation. *Thromb Res* 2005, 115: 319-325.
13. Contreras JL, Eckstein C, Smyth CA, et al.: Activated protein C preserves functional islet mass after intraportal transplantation. A novel link between endothelial cell activation, thrombosis, inflammation and islet death. *Diabetes* 2004, 53: 2804-2814.
14. Matsumoto K, Yano Y, Gabazza EC, et al.: Inverse correlation between activated protein C generation and carotid atherosclerosis in type 2 diabetic patients. *Diabetic Med* 2007, 24: 1322-1328.
15. De Backer D: Benefit-risk assessment of drotrecogin alfa (activated) in the treatment of sepsis. *Drug Saf* 2007, 30: 995-1010.



## Komentarz

prof. dr hab. n. med. Anetta Undas  
Instytut Kardiologii Collegium Medicum  
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

### AKTYWOWANE BIAŁKO C – ROLA W UKŁADZIE KRZEPNIĘCIA I NIE TYLKO

Trombina, przerywając wiązanie przy argininie 169, uwalnia peptyd aktywacyjny z zymogenu – białka C produkowanego w wątrobie (ciężar cząsteczkowy 62 kDa; okres półtrwania 6-8 godzin; stężenie w osoczu 80 nmol/l). Pozostała część białka tworzy aktywowane białko C (APC; ciężar cząsteczkowy 56 kDa; stężenie w osoczu 40 pmol/l) [1,2]. Reakcja ta zachodzi na powierzchni komórek śródbłonna, gdy białko C przyłącza się do trombomoduliny (ciężar cząsteczkowy 60 kDa), co przyspiesza aktywację białka C 400 razy. Kofaktorem aktywacji białka C do APC jest inne białko zależne od witaminy K – białko S (ciężar cząsteczkowy 70 kDa; stężenie w osoczu 300 nmol/l). Przyłączenie sodu do trombiny decyduje o swoistości tego enzymu, ujawniając jego prokoagulacyjną aktywność wobec fibrynogenu, a nieobecność sodu zamienia trombinę w aktywatora układu białka C o działaniu antykoagulacyjnym. Działanie przeciwzakrzepowe APC polega na proteolitycznej inaktywacji aktywnych czynników krzepnięcia V i VIII, kofaktorów w kompleksie odpowiednio protrombinazy i tenazy wewnątrzpochodnej, niezbędnych w sprawnej produkcji trombiny *in vivo* [1].

Na każdej komórce śródbłonna znajduje się ok. 100 000 cząsteczek trombomoduliny, których liczba w stosunku do jednostki objętości krwi jest odwrotnie proporcjonalna do średnicy naczynia. Konsekwencją jest duża wydajność mechanizmów antykoagulacyjnych układu białka C w łożysku drobnych naczyń, chociaż powinowactwo trombiny nawet w kompleksie z trombomoduliną do białka C jest bardzo małe. Zatem w na-

czyniach mniejszego kalibru dominuje działanie antykoagulacyjne właśnie układu białka C, a nie innych inhibitorów krzepnięcia, w tym antytrombiny [1].

Trombomodulina nie jest jedynym receptorem dla białka C. Na powierzchni śródbłonna (ale także na monocytach, niektórych limfocytach, neutrofilach i eozynofilach) występuje inny receptor o dużym powinowactwie dla białka C i do APC, oznaczany w skrócie EPCR (endothelial protein C receptor) [2,3]. EPCR nasila aktywację białka C przez kompleks trombina-trombomodulina, ale także wiąże APC, hamując w ten sposób aktywność antykoagulacyjną tego enzymu. Uważa się, że w dużych tętnicach, gdzie efektywne stężenie trombomoduliny jest małe, EPCR przyczynia się do zwiększenia aktywacji białka C.

Znaczenie antykoagulacyjnego układu białka C najlepiej widoczne jest w zwiększonym ryzyku zakrzepicy żyłnej (częstość występowania wśród niewyselekcjonowanych chorych z zakrzepicą ok. 4%, a populacji ogólnej 0,3% [4]) obserwowanym u osób z niedoborem białka C i jego aktywnej formy. W październiku 2008 roku dość nieoczekiwanie, w największym dotąd holenderskim badaniu kohorty rodzinnych [5], stwierdzono, że niedobór białka C zwiększa również ryzyko incydentów sercowo-naczyniowych.

Działanie APC wykracza poza fizjologiczną antykoagulację. APC ma także wpływ cytoprotekcyjny poprzez:

- działanie przeciwzapalne obejmujące zmniejszenie uwalniania mediatorów zapalnych z leukocytów i śródbłonna oraz ekspresji cząsteczek adhezyjnych na śródbłonnku, co hamuje adhezję leukocytów i ogranicza naciekanie przez nie tkanek;

- przeciwdziałanie apoptozie komórek, APC zmniejsza m.in. ekspresję takich cząsteczek kluczowych dla wewnątrzpodrodnej apoptozy, jak p53 i Bax oraz ważnych dla zewnątrzpodrodnej szlaku, czyli kaspaz; skuteczność rekombinowanego APC w ciężkiej posocznicy, w tym poprawę przeżywalności, przypisuje się głównie zmniejszeniu apoptozy;

- stabilizację bariery śródbłonkowej, m.in. poprzez zmniejszenie przepuszczalności z powodu zwiększonego powstawania fosforanu sfingozyny 1 [2,3].

Nefropatia cukrzycowa jest w większości krajów wysoko rozwiniętych najczęstszą przyczyną krańcowej niewydolności nerek. W ostatnich latach okazało się, że utrata podocytów w kłębuszkach nerkowych występuje wcześniej w nefropatii cukrzycowej. Przyczyny tego zjawiska są niejasne. Isermann i wsp. opublikowali w *Nature Medicine* artykuł pokazujący nowy, nieoczekiwany mechanizm nefropatii cukrzycowej łączący mikroangiopatyczne zmiany z antykoagulacyjnym układem białka C [6]. Spostrzeżenia poczynione w tym badaniu w modelu mysim można streścić następująco. W cukrzycy dochodzi do upośledzenia powstawania APC, co nasila indukowaną glukozą apoptozę śródbłonka i podocytów. Antyapoptotyczne działanie APC wymaga pośrednictwa 2 receptorów śródbłonkowych, tj. EPCR i sprzężonego z białkiem G receptora typu 1 aktywowanego proteazą (PAR-1), głównego receptora trombiny. Autorzy uważali, że utrzymanie właściwego stężenia APC we krwi chroni przed nefropatią cukrzycową.

Gilbert i Marsden w swoim komentarzu zwracają uwagę, że wnioski płynące z pracy Isermanna i wsp. potwierdzają mocno alternatywne wyjaśnienie patomechanizmu nefropatii cukrzycowej. Według tej koncepcji pierwotną patologią są zmiany w naczyniach kłębuszka, za które przynajmniej częściowo odpowiedzialny jest niedobór APC, z wtórnym rozplemem mezangium. Co ciekawe, antykoagulacja za pomocą enoksaparyny zmniejszająca tworzenie trombiny nasila nefropatię cukrzycową, co zdaniem komentatorów wskazuje, że dominujące znaczenie w korzystnym działaniu APC w modelu nefropatii cukrzycowej odgrywają mechanizmy niezwiązane z działaniem przeciwkrzepliwym.

Nie należy jednak interpretować doniesienia Isermanna i wsp. jako ostatecznego wyjaśnienia patomechanizmu nefropatii cukrzycowej. Niewątpliwie co najmniej współistniejącym mechanizmem jest wzmożona produkcja wolnych rodników tlenowych m.in. za pośrednictwem oksydazy NADPH, której hamowanie chroni przed rozwojem nefropatii cukrzycowej na pewno myszy [7], ale może podobne działania mogą ograniczyć tę patologię u ludzi.

Czy zatem w świetle artykułu Isermanna i wsp. oraz komentarza autorstwa Gilberta i Marsdena, nie mając do dyspozycji rekombinowanych preparatów APC, które zachowując działanie cytoprotekcyjne, wykazują upośledzone działanie przeciwkrzepliwie [8], nie możemy przeciwdziałać uszkodzeniu bariery filtracyjnej i utracie podocytów w cukrzycy? Nie jest tak źle. Proces ten powstrzymują w pewnym stopniu leki hamujące układ renina-angiotensyna-aldosteron oraz dobre wyrównanie cukrzycy. Działanie ochronne na podocyty opisano także w przypadku inhibitorów glikacji i antyoksydantów, choć tu korzyści kliniczne u ludzi nie są pewne.

Warto przypomnieć, że statyny potrafią, oprócz wielu działań niezależnych od obniżenia stężenia cholesterolu, zwiększać także aktywację białka C, podwyższając ekspresję trombomoduliny na śródbłonku [9]. Zatem w świetle omawianego badania być może część korzyści w aspekcie zmian nerkowych obserwowanych u chorych na cukrzycę leczonych statynami wynika właśnie z tego przeciwwkrzepliwego działania tej klasy leków.

Niewątpliwie jednak to, czy do badań klinicznych trafią rekombinowane preparatów APC, które uchronią nie tylko pacjentów z posocznicą, ale także innymi uszkodzeniami narządowymi, w tym udarem mózgu i nefropatiami, jest zapewne kwestią czasu. Czy przeniosą oczekiwany przełom? Czas pokaże.

## Piśmiennictwo

1. Undas A: Fizjologia krzepnięcia. W: Pasiński T, Undas A, Zawilska K, Sosnowski C. Leczenie przeciwkrzepliwie. Med Prakt 2007, 19-51.
2. Griffin JH, Fernandez JA, Gale AJ, Mosnier LO: Activated protein C. J Thromb Haemost. 2007, 5 (suppl. 1): 73-80.
3. Mosnier LO, Zlotovic BV, Griffin JH: The cytoprotective protein C pathway. Blood 2007, 109: 3161-3172.
4. Undas A: Stany nadkrzepliwosci. W: Szczeklik A (red). Choroby wewnętrzne. Med Prakt 2006, 1579-1582.
5. Mahmoodi BK, Brouwer JL, Veeger NJ, van der Meer J: Hereditary deficiency protein C or protein S confers increased risk of arterial atherothrombotic events at a young age: results from a large family cohort study. Circulation 2008, 118: 1659-1667.
6. Isermann B, Vinnikov IA, Madhusudhan T, et al.: Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. Nat Med 2007, 13: 1349-1358.
7. Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Bottinger EP: Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. Diabetes 2006, 55: 225-233.
8. Kerschen EJ, Fernandez JA, Cooley BC, et al.: Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-coagulant activated protein C. J Exp Med 2007, 204: 2439-2448.
9. Undas A, Brummel-Ziedins K, Mann KG: Statins and blood coagulation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005, 25: 287-294.