



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

## *Płytki krwi a procesy naprawcze w ścianie naczynia*

Od wielu lat znana jest kluczowa rola płytek krwi w procesach zakrzepowych i zapalnych układu krążenia. Główny nurt badań zajmujących się płytkami krwi dotyczył więc ich roli w rozwoju blaszki miażdżycowej i jej powikłań zakrzepowych. Należy jednak przypomnieć, że od samego odkrycia płytek krwi w 1882 roku dobrze znany był fakt, że te bezjądrzaste elementy morfotyczne krwi gromadzą się przy uszkodzonej ścianie naczynia i pojawiają się wszędzie tam gdzie naczynie krwionośne ulega uszkodzeniu i uruchamiany jest proces naprawy uszkodzonej ściany naczynia krwionośnego. W ostatnich latach zaczynamy rozumieć, że płytki przylegają do ściany naczynia nie tylko, aby aktywować procesy zakrzepowe, ale aktywnie uczestniczą również w procesach naprawczych ściany naczynia. W warunkach fizjologicznych natomiast krążące płytki krwi są prawdziwymi strażnikami integralności ściany naczynia i utrzymują prawidłową strukturę i czynność śródbłonna przez regulowane uwalnianie wielu czynników wzrostu, takich jak np. VEGF, PDGF, TGF-β, IGF, SDF-1. Artykuł przedstawiony w obecnym odcinku działu Śródbłonek w chorobach układu krążenia autorstwa Nachmana i Rafiiego opublikowany w *New England Journal of Medicine* we wrześniu 2008 roku zarysowuje współczesny stan wiedzy o roli płytek w utrzymywaniu prawidłowej czynności śródbłonna i ściany naczyń krwionośnych oraz zależnych od płytek mechanizmach naprawczych ściany naczynia. Upośledzenie tych zależnych od płytek krwi i dobroczynnych dla ściany naczynia mechanizmów najbardziej widoczne jest w małopłytkowości i skutkuje znanymi objawami, takimi jak wybroczyny (petecje) i mikrowynaczynienia. Polecam lekturę artykułu Nachmana i Rafiiego oraz uzupełniających je komentarzy dr. Sebastiana Szmita i prof. Krzysztofa J. Filipiaka oraz prof. Anetty Undas, aby lepiej poznać mało znane oblicze czynności płytek krwi.

Dla przypomnienia, ostatnio na łamach *Kardiologii po Dyplomie* (KpD 2008, 7 (5), 76-89) ukazał się artykuł Giovanniego Davi i Carlo Patrono, również pierwotnie opublikowany w *New England Journal of Medicine*, który całościowo opisywał rolę płytek krwi w procesach miażdżycowo-zakrzepowych. Autorzy szeroko omawiali w nim zagadnienia dotyczące skuteczności farmakologii płytek krwi w hamowaniu procesów zapalnych i zakrzepowych *atherothrombosis*. Te dwa artykuły uzmysławiają, że z jednej strony nadmierna aktywność płytek krwi prowadzi do rozwoju zapalenia ściany naczynia i do groźnych powikłań zakrzepowych układu krążenia, a z drugiej, podstawowa aktywność krążących płytek krwi jest kluczowa w utrzymaniu zdrowego śródbłonna i uruchamia regenerację śródbłonna uszkodzonego.

W świetle tej wiedzy pojawia się myśl o wykorzystaniu potencjału naprawczego płytek krwi w medycynie regeneracyjnej. Jak się okazuje, nie jest to już myśl zupełnie nowa. W badaniach doświadczalnych wykazano bowiem, że serotonina z płytek krwi ogrywa kluczową rolę w regeneracji wątroby [1], a podawanie preparatów płytek krwi zawieszonych w osoczu przyspiesza regenerację ran skórnych, owrzodzeń w cukrzycy, uszkodzonych tkanek przyzębia, innych tkanek miękkich i nawet kości [2]. W swojej aktywności regeneracyjnej płytka krwi współdziała z komórkami progenitorowymi i rozwikłanie mechanizmów tych interakcji może przynieść lepsze zrozumienie, kiedy aktywacja płytek krwi w układzie krążenia prowadzi do regeneracji, a kiedy do procesów zakrzepowych i zapalnych. Rozdzielenie tych procesów nie będzie jednak łatwe.

Farmakologia płytek zyskuje więc nowe i trudne zadanie: najskuteczniej przytłumić nadmierną aktywność płytek, która prowadzi do procesów zakrzepowych i zapalnych układu krążenia, a nie hamować przy tym mechanizmów utrzymujących integralność śródbłonna i uruchamiających lub wzmacniających procesy naprawcze ściany naczynia.

Stefan Chłopicki

## Piśmiennictwo

1. Lesurtel M, Graf R, Aleil B, et al.: Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* 2006, 312: 104-107.
2. Langer HF, Gawaz M: Platelets in regenerative medicine. *Basic Res Cardiol* 2008, 103: 299-307.

# Płytki, wybroczyny i szczelność ściany naczyniowej

Ralph L. Nachman, MD, Shahin Rafii, MD

## Adres:

Weill Cornell Medical College, Nowy Jork, Stany Zjednoczone

## Prośby o przedruki:

Dr Nachman, Weill Cornell Medical College, 1300 York Ave., New York, NY 10065, USA

e-mail: rlnachm@med.cornell.edu

N Engl J Med 2008; 359:1261-1270.

**P**łytki krwi pomagają utrzymać krążenie krwi, umożliwiając opanowanie krwawienia po uszkodzeniu ściany naczynia krwionośnego, które jest przyczyną fizycznych i biochemicznych zaburzeń w śródbłonku. Wytworzenie się czopa z pobudzonych płytek w miejscu uszkodzenia uszczelnia naczynia i umożliwia uzyskanie hemostazy. Ukierunkowane błonowo procesy podśródbłonkowej adhezji płytek, uwalniania zawartości ich ziarnistości, kohezji, agregacji oraz stabilizacji czopa płytkowego obejmują kilka dobrze scharakteryzowanych interakcji ligandów z receptorami [1] i nie będą dokładniej omawiane w tym przeglądzie.

Uwaga skoncentruje się natomiast na innych czynnościowych reakcjach między płytkami a komórkami śródbłonka. Najważniejszym z tych procesów jest utrzymywanie szczelności naczyń poprzez konstytutywne uwalnianie z płytek proangiogennych cytokin i czynników wzrostu (które nazywamy trofogenami). Te cząsteczki, magazynowane przez płytki w ziarnistościach, wiążą się ze swoistymi receptorami na powierzchni komórek śródbłonka, inicjując w ten sposób wewnątrzkomórkowe procesy sygnałowe, które stabilizują kompleks kadheryn śródbłonka naczyniowego w miejscach zwierających połączeń międzykomórkowych typu połączeń przylegania (adherens junction; patrz Słowniczek).

Jeden z klinicznych aspektów tych interakcji między płytkami a komórkami śródbłonka można zaobserwować u pacjentów z małopłytkowością. Kiedy liczba płytek spada poniżej krytycznych wartości (zwykle do mniej niż 10 000-20 000 w milimetrze sześciennym), procesy demontażu molekularnego otwierają połączenia międzykomórkowe sąsiadujących komórek śródbłonka (zippers), co prowadzi do wynaczynienia erytrocytów do otaczających tkanek. Charakterystyczne mikroskopijne wybroczyny (petocje), będące typową cechą kliniczną małopłytkowości, odpowiadają wynaczynieniu krwinek czerwonych z żyłek zawłośniczkowych, do którego dochodzi pomimo braku jawnego urazu w miejscach połączeń lub

luk między komórkami śródbłonka [2]. Znaczne ścięczenie i osłabienie śródbłonka z rozdzielaniem połączeń międzykomórkowych obserwuje się też u zwierząt z małopłytkowością [3].

## Oś komórka śródbłonka-megakariocyt-płytką krwi

Komórki śródbłonka i megakariocyty wspólnie uczestniczą w wielu procesach fizjologicznych. Są to jedyne komórki syntetyzujące czynnik von Willebranda [4,5], a ponadto razem definiują one swoistą niszę naczyniową w szpiku kostnym, w której następuje bezpośrednia interakcja prekursorów hematopoezy i śródbłonka naczyń zatokowych [6]. Proces wytwarzania płytek poprzez tworzenie proplateletów (proplatelets) i uwalnianie gotowych płytek następuje w tych megakariocytach, które pozostają w bezpośrednim kontakcie z komórkami śródbłonka naczyń zatokowych [7]. W eksperymentach *in vitro* megakariocyty podtrzymują przeżycie komórek śródbłonka naczyń zatokowych pochodzących ze szpiku kostnego, a pojedyncza warstwa komórek śródbłonka naczyń zatokowych szpiku kostnego sprzyja ekspansji megakariocytów *ex vivo* [8,9]. Megakariocyty wytwarzają duże ilości proangiogennych cytokin oraz syntetyzują lub transportują wiele głównych trofogenów działających na komórki śródbłonka, w tym czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego typu A (vascular endothelial growth factor A, VEGF-A), czynnik typu 1 pochodzący z komórek podścieliska (stromal cell-derived factor 1), angiopoetynę 1, czynnik wzrostu naskórka (epidermal growth factor) oraz mózgowy czynnik neurotroficzny (brain-derived neurotrophic factor). Wszystkie te czynniki są mediatorami interakcji między megakariocytami a komórkami śródbłonka. Z kolei komórki śródbłonka oddziałują w przeciwnym kierunku, wytwarzając różne cytokiny wzrostowe, które wspomagają rozwój megakariocytów i wytwarzanie płytek (ryc. 1) [10-13].

Płytki wpływają również na rozwój i los komórek progenitorowych śródbłonka. Oprócz działania sprzyjającego migracji i przyleganiu komórek pochodzących ze szpiku kostnego w miejscach angiogenezy, płytki indukują również różnicowanie komórek progenitorowych w dojrzałe komórki śródbłonka. Pod wpływem płytek w komórkach progenitorowych śródbłonka następuje zmniejszenie ekspresji białka c-kit (receptor czynników wzrostu na powierzchni niedojrzałych komórek) oraz zwiększenie syntezy CD31 (cząsteczka adhezyjna płytek i komórek śródbłonka, czyli PECAM1 [platelet-endothelial cell adhesion molecule]) i innych markerów dojrzałych komórek śródbłonka. Te dojrzałe komórki zawierają ciała Weibel-Palade'a, organella, w których magazynowane są czynnik von Willebranda i selektyna P [14]. Agregacja i aktywacja płytek w miejscach odsłoniętej warstwy podśródbłonkowej powoduje uwalnianie czynnika typu 1 pochodzącego z komórek podścieliska, silnego angiogenego trofogeny, który sprzyja rekrutacji i retencji pochodzących ze szpiku kostnego komórek progenitorowych śródbłonka w miejscach postawiania nowych naczyń krwionośnych (nisze neoangiogenezy). W ten sposób płytki przyczyniają się do rewaskularyzacji niedokrwiomych tkanek, wzrostu guzów oraz rozwoju zmian miażdżycowych [10,15]. Najnowsze badania wskazują, że płytki krwi uczestniczą nie tylko w rekrutacji komórek dendrytycznych do blaszek miażdżycowych, ale również w różnicowaniu hematopoetycznych komórek pnia CD34<sup>+</sup> w komórki piankowate (makrofagi obciążone lipidami), które powstają w tych blaszkach [16].

## Płytki krwi a układ VEGF

Językiem, którym porozumiewają się płytki i komórki śródbłonka, są swoiste trofogeny uwalniane przez komórki w określonym mikrośrodkowisku. Czynniki angiogenne i antyangiogenne, znajdujące się w oddzielnych zestawach ziarnistości alfa i uwalniane przez płytki w określonych miejscach, wpływają na wiele procesów patologicznych, od gojenia się ran do retinopatii cukrzycowej [17-19]. Ważnym mediatorem interakcji między płytkami krwi a komórkami śródbłonka zarówno w stanach równowagi, jak i nierównowagi jest rodzina angiogennych czynników z grupy VEGF, która w znacznym stopniu odpowiada za rolę płytek w angiogenezie i utrzymaniu szczelności naczyń [20].

Pełne zrozumienie homeostazy naczyń musi uwzględnić to, w jaki sposób płytki krwi i komórki śródbłonka kierują ekspresją licznych cząsteczek i ich izoform, zarówno z rodziny VEGF, jak i innych trofogenów, w ciągu całego cyklu życiowego naczynia krwionośnego, od waskulogenezy we wczesnym okresie rozwoju zarodkowego do regresji naczyń w tkankach dorosłego organizmu (ryc. 2). Ważnymi cechami tego cyklu są stabilizacja naczyń krwionośnych oraz podtrzymywanie przez płytki szczelności naczyń w stanie równowagi.

VEGF, odkryty 25 lat temu, postrzegano początkowo jako czynnik regulujący przepuszczalność naczyń [21].

## Słowniczek

**α-katenina:** wewnątrzkomórkowa katenina, która wiąże się z β-kateniną i łączy cały kompleks z cytoszkieletem aktynowym.

**Połączenie przylegania (adherens junction):** kompleks cząsteczek przezbłonowych białek adhezji międzykomórkowej, kadheryn śródbłonka naczyniowego, połączonych z białkami z rodziny wewnątrzkomórkowych katenin, które są z kolei połączone z cytoszkieletem.

**Angiopoetyna 1 (ANG1):** białko stabilizujące naczynia, którego ekspresję obserwuje się głównie w komórkach okołonaczyniowych i komórkach ścian naczyń.

**β-katenina:** wewnątrzkomórkowa katenina, które wiąże się z cytoplazmatyczną domeną kadheryny śródbłonka naczyniowego, a kiedy nie jest z nią związana, działa jak czynnik transkrypcyjny.

**Receptor mózgowego czynnika neurotroficznego (brain-derived neurotrophic factor receptor, BDNF-R):** służy jako receptor neurotrofyny w śródbłonku.

**CD148:** składnik kompleksu połączenia przylegania, znany również jako DEP-1 (density-enhanced phosphatase-1); defosforyluje receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego typu 2 (VEGF-R2).

**Gen różnicowania śródbłonka typu 1 (endothelial differentiation gene 1, EDG1):** gen, którego produkt jest receptorem 1-fosforanu sfingozyny.

**P120:** wewnątrzkomórkowa katenina, która uczestniczy w stabilizacji kompleksu wewnątrzkomórkowego.

**Czynnik aktywujący płytki (platelet-activating factor, PAF):** bioaktywny fosfolipid o działaniu prozapalnym.

**Receptor czynnika aktywującego płytki (platelet-activating factor receptor, PAF-R):** receptor sprzężony z białkiem G, który jest indukowany przez siły ścinające.

**1-fosforan sfingozyny (sphingosine-1-phosphate, S1P):** bioaktywny lizofosfolipid, którego głównym źródłem są płytki.

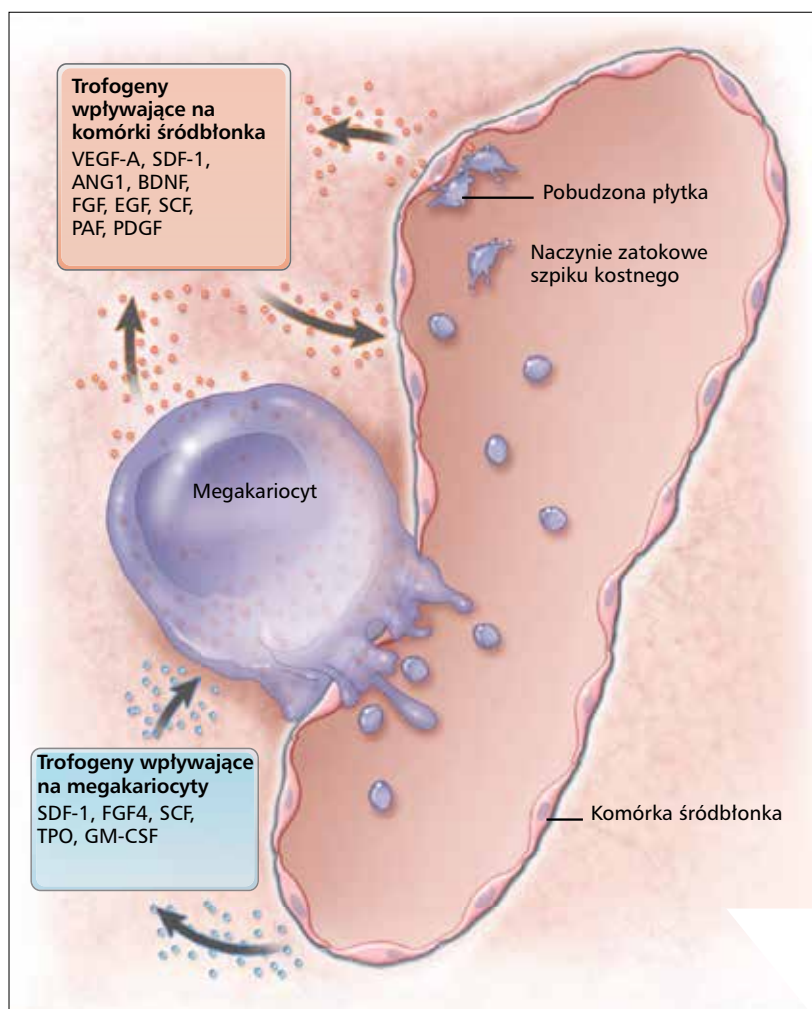
**Adheryna śródbłonka naczyniowego:** białko adhezji międzykomórkowej śródbłonka naczyniowego, które tworzy homodimery zależne od wapnia.

U ssaków występują co najmniej cztery cząsteczki należące do rodziny VEGF: VEGF-A, VEGF-B, oraz para VEGF-C/VEGF-D, która ma wspólny receptor VEGF typu 3 (VEGF-R3) [22].

VEGF-A, najlepiej zbadany z tej grupy, wchodzi w interakcję z dwoma receptorami o aktywności kinazy tyrozynowej, receptorem VEGF typu 1 (VEGF-R1) oraz receptorem VEGF typu 2 (VEGF-R2), których aktywacja sprzyja angiogenezie. VEGF-A przyczynia się również do zachowania szczelności naczyń: selektywna eliminacja VEGF-A w komórkach śródbłonka nasila śmierć komórek w mechanizmie apoptozy, a to zaburza integralność połączeń między komórkami śródbłonka [23]. W okresie embriogenezy VEGF-A jest cytokiną o działaniu proangiogenym. U myszy delecja jednego allelu *VEGF* prowa-

### RYCINA 1 Interakcje między megakariocytem a komórką śródbłonna.

Megakariocyt bezpośrednio warunkuje integralność i żywotność łożyska mikronaczyniowego w szpiku kostnym poprzez wytwarzanie płytek oraz uwalnianie głównych trofogenów działających na komórki śródbłonna. W mikrośrodoisku „niszy naczyniowej” zachodzi również odwrotny proces, ponieważ śródbłonek bezpośrednio wpływa na integralność megakariocytów, uwalniając wiele trofogenów działających na te komórki. ANG1 – angiopoetyna-1; BDNF – mózgowy czynnik neurotroficzny (brain-derived neurotrophic factor); EGF – czynnik wzrostu naskórka (epidermal growth factor); FGF – czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor); FGF4 – czynnik wzrostu fibroblastów typu 4; GM-CSF – czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów i makrofagów (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor); PAF – czynnik aktywujący płytki (platelet-activating factor); PDGF – płytkopochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor); SCF – czynnik komórek pnia (stem cell factor; ligand receptora c-kit); SDF-1 – czynnik typu 1 pochodzący z komórek podścieliska (stromal cell-derived factor 1); TPO – trombopoetyna; VEGF-A – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego typu A.



dzi do krwotoków i śmierci zarodka, co podkreśla znaczenie dawki genu *VEGF* w okresie rozwoju [24].

VEGF-B, który może tworzyć heterodimery z VEGF-A, występuje głównie w białej tkance tłuszczowej, mięśni sercowym i mięśniach szkieletowych [25]. VEGF-C i VEGF-D najprawdopodobniej regulują angiogenezę naczyń limfatycznych, głównie poprzez interakcję z własnym receptorem o aktywności kinazy tyrozynowej, VEGFR-3.

Ekspresja VEGFR-3 u dorosłych jest ograniczona do naczyń limfatycznych i śródbłonna okienkowego [26,27]. Receptorami, które wiążą się z poszczególnymi członkami rodziny VEGF i odgrywają ważną rolę w rozwoju neuronów i embrionalnej waskulogenezie, są neuropilina 1 i neuropilina 2 [28].

Ta mnogość ligandów i receptorów VEGF prawdopodobnie odzwierciedla niejednorodność różnych łożysk naczyniowych w zarodkach i dorosłych organizmach. Nie ulega wątpliwości, że układ VEGF działa w warunkach różnych ograniczeń regulacyjnych stanu nierównowagi w rozwijającym się zarodku, a także fizjologicznego stanu równowagi w dorosłym organizmie. Do stanów, w których dochodzi do ponownego uruchomienia proangiogennych szlaków sygnałowych podobnych do procesów kontrolujących angiogenezę w okresie rozwoju zarodko-

wego, należą ciąża, żeński cykl rozrodczy [29,30], reakcje zapalne [31] oraz rozwój i wzrost nowotworów [18].

Megakariocyty i płytki krwi zawierają trzy główne izoformy VEGF-A, VEGF121, VEGF165 i VEGF189, które uwalniają *in vitro* po ekspozycji na trombinę [8]. VEGF-A zmienia fenotyp komórek śródbłonna, zwiększając przepuszczalność naczyń oraz ekspresję urokinazy, tkankowego aktywatora plazminogenu, koneksyny, osteopontyny i cząsteczki adhezyjnej komórek naczyniowych (vascular cell adhesion molecule, VCAM) [32,33]. Szlaki śmierci komórek w komórkach śródbłonna reagują na szlak sygnałowy receptora VEGF wzrostem aktywności antyapoptotycznego (sprzyjającego przeżyciu komórek) czynnika Bcl-2 oraz modulacją szlaku kinaz białkowych aktywowanych przez mitogeny, który reguluje różne czynności komórki [34,35].

## Biologiczna charakterystyka połączeń międzykomórkowych

Głównymi anatomicznymi miejscami krwawienia u pacjentów z małopłytkowością są przestrzenie międzykomórkowe w łożysku żył zawłośniczkowych [3,36]. Do

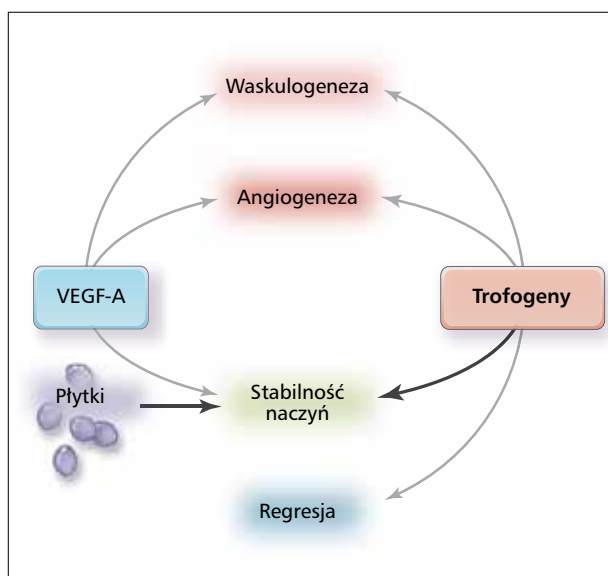


głównych cząsteczek tworzących połączenia międzykomórkowe w tym obszarze należą przezbłonowe białka adhezyjne oraz związane z nimi wewnątrzkomórkowe komponenty wiążące [37,38]. Różne łożyska naczyniowe, z których każde ma swoiste wymagania czynnościowe, potrzebują różnych typów połączeń międzykomórkowych, składających się z tworzących je wyspecjalizowanych białek i charakteryzujących się swoistymi zależnościami między makrocząsteczkami. Na przykład mechanizmy regulujące przepuszczalność żył zawłośniczkowych w skórze i na powierzchni błon śluzowych są zupełnie inne od analogicznych mechanizmów w mikrokrążeniu w mózgu [39]. Naczynia włosowate w mózgu zawierają ścisłe połączenia międzykomórkowe typu połączeń zamykających (tight junctions), zbudowane z kilku wyspecjalizowanych białek przezbłonowych związanych ze swoistymi kinazami i fosfatazami wewnątrzkomórkowymi. Ścisła regulacja przepuszczalności naczyń włosowatych w mózgu ma niezwykle duże znaczenie, a wyciekanie międzykomórkowe musi być ograniczone do absolutnego minimum. Dlatego też nawet u pacjentów z ciężką ostrą małopłytkowością nieurazowe krwawienia śródmózgowe zdarzają się stosunkowo rzadko [40].

W łożysku żył zawłośniczkowych występują liczne połączenia przylegania. Składają się one z grup wysoko wyspecjalizowanych cząsteczek kadheryn śródbłonka naczyniowego, które tworzą mostki łączące błony komórkowe sąsiadujących komórek (ryc. 3). Kadheryny śródbłonka naczyniowego są połączone od wnętrza komórki z kateninami, rodziną białek tworzących kompleksy sygnałowe z kinazami i fosfatazami [41-43]. Połączenia ścisłe, charakterystyczne dla naczyń włosowatych mózgu, w łożyskach żył zawłośniczkowych mają prymitywną budowę lub w ogóle nie występują [44].

Szlaki sygnałowe indukowane przez VEGF-A bezpośrednio kontrolują interakcje aparatu połączeń międzykomórkowych. Cytoplazmatyczna domena VEGF-R2 jest częścią makromolekularnego cytoplazmatycznego kompleksu kadheryny śródbłonka naczyniowego i  $\beta$ -kateniny [45,46]. Wydaje się, że siły ścinające zwiększają tworzenie tego kompleksu, przekształcając w ten sposób połączenia przylegania w mechaniczne przetworniki, które inicjują szlak sygnałowy łączący środowisko zewnętrzne z wnętrzem komórki („outside-inside” signalling) [47]. Wiązanie wewnątrzkomórkowej  $\beta$ -kateniny z kadheryną śródbłonka naczyniowego zwiększa się nawet 700 razy po fosforylacji określonych reszt serynowych kadheryny [48,49]. Natomiast fosforylacja określonych reszt tyrozynowych  $\beta$ -kateniny destabilizuje połączenia przylegania [50,51]. Architektoniczna szczelność wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego aparatu połączeń międzykomórkowych zależy od fosforylacji głównych składników tworzących ten aparat od strony cytoplazmy.

Zakłada się, że interakcje z udziałem receptorów VEGF obejmują wielokomórkowy szlak sygnałowy, w którym ligand (VEGF) wydzielany przez jedną lub wiele komórek aktywuje receptor (VEGF-R2) na powierzchni sąsiedniej komórki docelowej. W tym mechanizmie

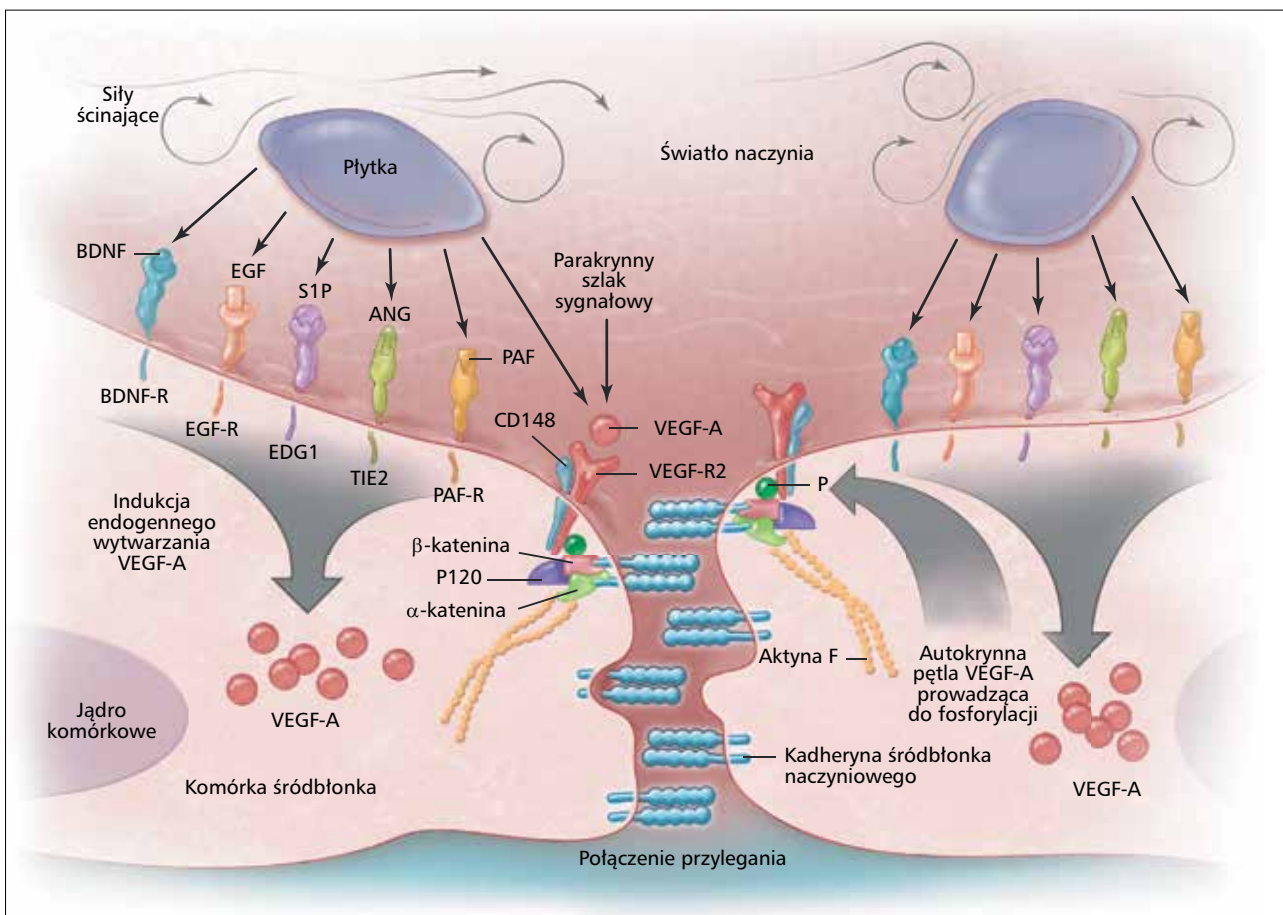


**RYCINA 2** Homeostaza naczyniowa.

Przedstawiono kolejne stadia cyklu życiowego naczyń, od waskulogenezy w okresie rozwoju poprzez angiogenezę w dorosłych tkankach w stanie nierównowagi aż do fizjologicznej regresji. Stabilność naczyń w fizjologicznym stanie równowagi zależy od konstytutywnego, endogennego wytwarzania czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego typu A (VEGF-A), stymulowanego przez płytki. W tych stadiach uczestniczy również wiele angiogennych trofogenów. Czarne strzałki wskazują główne oddziaływania umożliwiające utrzymanie szczelności naczyń.

parakrynnym VEGF pochodzący z płytek może indukować fosforylację i aktywację VEGF-R2 w śródbłonku. Najnowsze dane przemawiają silnie za tym, że śródbłonkowy VEGF-A aktywuje własne receptory VEGF-R2 komórek śródbłonka [23]. Ten szlak autokryny odkryto u myszy, u których wyeliminowano gen *VEGFA* tylko w komórkach śródbłonka. U takich myszy obserwuje się nasilony fenotyp krwotoczny z mikrozawałami i rozlanymi nieprawidłowościami naczyń [23]. W komórkach śródbłonka pozbawionych genu *VEGFA* nie wykrywa się fosforylacji VEGF-R2, następującej w śródbłonku typu dzikiego pomimo braku egzogennego VEGF (działającego parakrynnie). Ten autokryny szlak sygnałowy VEGF jest więc konieczny dla prawidłowej czynności śródbłonka w stanie równowagi [23]. Autorzy uważają, że fosforylacja VEGF-R2 przez endogenny VEGF i spowodowane tym przekazanie sygnału z wnętrza na zewnątrz komórki w obrębie kompleksu kateniny i kadheryny śródbłonka naczyniowego stabilizuje ektodomeny struktur połączeń typu zipper śródbłonkowej wyściółki naczyń krwionośnych (ryc. 3). Wydaje się, że ta pętla autokryny ogranicza przepuszczalność naczyń w stanie równowagi, natomiast szlak parakryny ma zasadnicze znaczenie jako czynnik sprzyjający większej przepuszczalności naczyń w stanach nierównowagi, takich jak embriogeneza, zapalenie i ciąża.

Parakryny i autokryny szlaki aktywacji inicjowane przez VEGF-A charakteryzują się różnymi punktami końcowymi (ryc. 4). Każdy z tych szlaków wywiera również inny wpływ na makromolekularny kompleks  $\beta$ -kate-



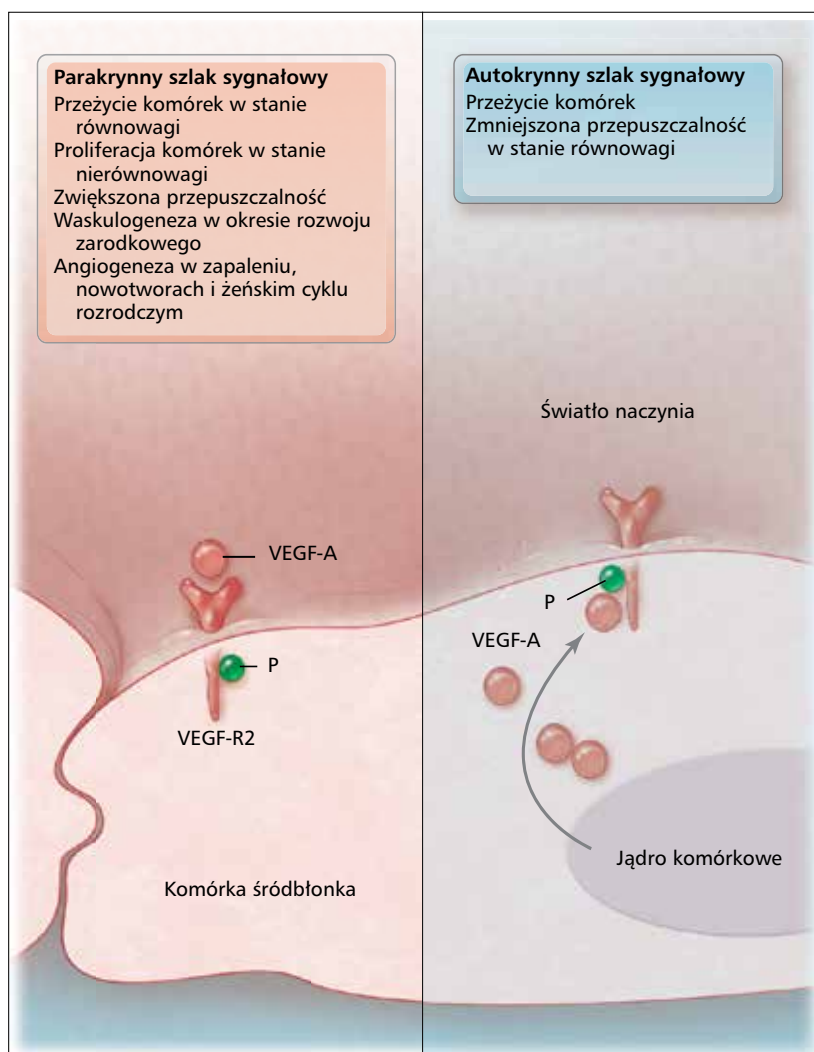
**RYCINA 3** Połączenie przylegania (adherens junction) w łożysku żył zawłócnickowych.

W stanie równowagi przezłonowe cząsteczki kadheryny śródbłonka naczyniowego wchodzą w homofilne interakcje i tworzą zależne od wapnia, suwakopodobne (zipperlike) struktury łączące błony sąsiednich komórek. Cytoplazmatyczne ogony cząsteczek kadheryny są częścią wewnątrzkomórkowego, makromolekularnego kompleksu obejmującego również  $\beta$ -kateninę, białko P120,  $\alpha$ -kateninę, receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego typu 2 (VEGF-R2) oraz fosfatazę CD148. W stanie równowagi płytki podtrzymują molekularną integralność połączenia przylegania poprzez konstytutywne uwalnianie wielu trofogenów działających na komórkę śródbłonka, takich jak mózgowy czynnik neurotroficzny (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), czynnik wzrostu naskórka (epidermal growth factor, EGF), czynnik aktywujący płytki (platelet-activating factor, PAF), 1-fosforan sfingozyny (sphingosine-1-phosphate, S1P), angiopoetyna (ANG), czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego typu A (VEGF-A) i inne. Te trofogeny przekazują sygnały za pomocą własnych swoistych receptorów (BDNF-R, który wiąże BDNF; EGF-R, który wiąże EGF; produkt genu różnicowania śródbłonka typu 1 [endothelial differentiation gene 1; EDG1], który wiąże S1P; receptor angiopoetyny swoisty dla komórek śródbłonka [TIE2], który wiąże ANG; oraz PAF-R, który wiąże PAF). Wynikiem aktywacji tych receptorów jest indukcja endogennego wytwarzania VEGF-A i aktywacja autokrynynej pętli VEGF-A, a to z kolei indukuje fosforylację VEGF-R2, która jest wymagana dla utrzymania stabilności połączeń typu zipper. Swoiste miejsca fosforylacji cząsteczek kateniny i kadheryny, które wchodzą w skład kompleksu, kontrolują stabilność i integralność połączenia międzykomórkowego, a także ułatwiają przyłączenie cytoszkieletu za pośrednictwem aktyny F. Parakrynyny szlak egzogenego VEGF-A sprzyja przeżyciu komórek w stanie równowagi oraz ich proliferacji w stanie nierównowagi. W konstytutywnym inicjowaniu tych odpowiedzi płytek mogą uczestniczyć siły ścinające działające na ścianę naczynia od strony jego światła, a także na błonę płytek. P – reszta fosforanowa. CD148, P120 – patrz Słowniczek.

niny i kadheryny śródbłonka naczyniowego. W stanach nierównowagi szlak parakrynyny rozkłada kompleks  $\beta$ -kateniny i kadheryny śródbłonka naczyniowego, natomiast w stanie równowagi aktywacja szlaku autokrynyny stabilizuje ten kompleks [23]. Stymulacja parakrynyna, która zwiększa przepuszczalność naczyń, jest bezwzględnie warunkiem waskulogenezy zarodkowej oraz angiogenezy w nowotworach, zapaleniu, ciąży i żeńskim cyklu rozrodczym. Stymulacja autokrynyna, która zmniejsza przepuszczalność naczyń, nie podtrzymuje angiogenezy, ale jest niezbędna do utrzymania integralności połączeń między komórkami śródbłonka w stanie równowagi [23]. Hematopojeza zależy od endogennego VEGF-A, natomiast powstawanie zaangażowanych w ten proces komórek pnia

wymaga co najwyżej niewielkich ilości egzogenego VEGF-A lub nie wymaga go wcale [52].

W jaki sposób płytki wpływają na te dwa szlaki? Wydaje się, że liczne sygnały pochodzenia płytkowego, działające synchronicznie lub sekwencyjnie, aktywują szlak autokrynyny (ryc. 3). W stanach nierównowagi VEGF-A uwalniany przez płytki aktywuje szlak parakrynyny, przyczyniając się do zwiększonej przepuszczalności i proliferacji. Do stabilności naczyń mikrokrążenia przyczyniają się również inne czynniki. Jednym z nich jest Bcl-xL, antyapoptyczny czynnik przeżycia komórek. W komórkach śródbłonka Bcl-xL zwiększa wytwarzanie VEGF-A [53], a w płytkach jest jednym z głównych czynników określających czas ich życia [54]. Co wię-



**RYCINA 4** Interakcje komórki śródbłonna indukowane przez czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego typu A (VEGF-A) działający parakrynnie lub autokrynnie.

W fizjologicznym stanie równowagi egzogenny VEGF-A inicjuje szlak sygnałowy poprzez fosforylację receptora VEGF typu 2 (VEGF-R2), sprzyjając przeżyciu komórek. W stanach nierównowagi następuje zwiększenie przepuszczalności naczyń i proliferacji komórek. Ten parakryny szlak sygnałowy jest niezbędny dla waskulogenezy w okresie rozwoju zarodkowego, a także angiogenezy w zapaleniu, nowotworach i żeńskim cyklu rozrodczym. Endogenny, autokrynnie wydzielany VEGF-A także przekazuje sygnał poprzez fosforylację VEGF-R2, zmniejszając przepuszczalność naczyń w stanie równowagi poprzez stabilizację połączeń międzykomórkowych. Stymulacja autokrynną podtrzymuje waskulogenezę, natomiast nie jest konieczna do angiogenezy. Miejsca fosforylacji VEGF-R2 mogą obejmować różne fragmenty cząsteczki receptora w przypadku parakrynniej stymulacji egzogennej i autokrynniej stymulacji endogennej. P – reszta fosforanowa.

cej, pochodzący z płytek czynnik wzrostu naskórka zwiększa wytwarzanie Bcl-xL w komórkach śródbłonna [53]. Parakrynnie działający VEGF-A, docierający do wysięczki naczyń z płytek i innych komórek, zwiększa wytwarzanie w komórkach śródbłonna Bcl-2, innego inhibitora szlaku śmierci komórek [34,55], a czynnik aktywujący płytki (platelet-activating factor), fosfolipidowy mediator o działaniu prozapalnym, indukuje ekspresję VEGF-A w komórkach śródbłonna [56]. W warunkach fizjologicznych te złożone interakcje między płytkami a komórkami śródbłonna są prawdopodobnie ciągłymi procesami, które zostają przerwane przez znaczną małopłytkowość bądź upośledzenie uwalniania ziarnistości z płytek pod wpływem kwasu acetylosalicylowego lub kłopotogrelu.

## Stabilność komórek śródbłonna

Jeszcze inne cząsteczki wpływają na stabilność naczyń mikrokrążenia. Ważnymi regulacyjnymi elementami szlaków apoptozy są ceramid i sfingozyna [57,58]. Sfingozyna uwalniana z umierających komórek jest szybko

wbudowywana w płytki i ulega fosforylacji [59]. Uwalniana z płytek postać ufosforylowana, 1-fosforan sfingozyny, sprzyja integralności i przeżyciu komórek śródbłonna, hamuje apoptozę, a także stabilizuje połączenia między komórkami śródbłonna poprzez przebudowę cytoszkieletu aktynowego [59,60]. Siły ścinające związane z fazą płynną indukują uwalnianie 1-fosforanu sfingozyny z płytek [61] i w ten sposób zjawiska reologiczne wpływające na płytki w łożysku żył zawłośniczkowych mogą stabilizować komórki śródbłonna. Cytoprotekcyjne działanie aktywowanego białka C także obejmuje 1-fosforan sfingozyny poprzez aktywację receptora 1-fosforanu sfingozyny w komórkach śródbłonna oraz reorganizację cytoszkieletu aktynowego [62]. Antyapoptotyczny wpływ 1-fosforanu sfingozyny na naczynia mikrokrążenia może stanowić mechanizm ochronny przed wpływem promieniowania, ponieważ wykazano, że napromienianie aktywuje sfingomielinazę w naczyniach mózgu, jelit i płuc [63].

Płytkowy 1-fosforan sfingozyny reguluje połączenia między komórkami śródbłonna a perycytami tworzone przez kadherynę N. Perycyty powstające z prekursorowych komórek mięśni gładkich otaczają naczynia mikro-



krążenia, wysuwając długie wypustki cytoplazmatyczne dookoła powierzchni komórek śródbłonna od strony przeciwległej do światła naczynia. Częsteczki kadheryny N rozciągają się między błonami komórkowymi, łącząc sąsiednie perycyty i komórki śródbłonna. Perycyty zwiększają stabilność naczyń, tworząc macierz pozakomórkową oraz uwalniając czynniki wzrostu, które wiążą się z komórkami śródbłonna [64,65]. Pojedynczy perycyt wchodzi w interakcje z kilkoma komórkami śródbłonna i w ten sposób może modulować integralność łożyska naczyń włosowatych i żył.

## Implikacje kliniczne

Płytki krwi i komórki śródbłonna są ściśle powiązane ze sobą, a ich wzajemne interakcje mają bezpośrednie implikacje kliniczne. W fizjologicznym stanie równowagi prawidłowa liczba sprawnych czynnościowo płytek tworzy masę płytkową, która jest niezbędna do utrzymania stabilności naczyń. Proces ten prawdopodobnie obejmuje wiele różnych mechanizmów, w tym konstytutywną ekspresję trofogenów na powierzchni płytek lub ich toniczne uwalnianie za pośrednictwem mechanizmów, które nie zostały jeszcze w pełni poznane. Regulowana, konstytutywna aktywacja płytek o niewielkim nasileniu może być prawidłowym zjawiskiem reologicznym w zawłośniczkowym łożysku naczyniowym [66]. Interesujące jest, że krwawienia obserwowane u pacjentów otrzymujących leki przeciwplatek, takie jak kwas acetylosalicylowy i kłopidogrel, rzadko wiążą się z występowaniem wybroczyn, które charakteryzują małopłytkowość, natomiast manifestują się łatwym powstawaniem wylewów podskórnych, krwawieniami z błon śluzowych przewodu pokarmowego oraz rzadko udarami krwotocznymi mózgu. Wszystkie te incydenty zapewne występują w obszarach, w których wcześniej wystąpiły utajone uszkodzenia naczyń. Leki przeciwplatekowe interferują z uwalnianiem ziarnistości płytkowych i agregacją płytek, modyfikując w ten sposób pierwotną odpowiedź hemostatyczną na uszkodzenie. Korzystny wpływ, jaki wywiera na śródbłonek fizjologiczna, niewielka aktywacja płytek, może odzwierciedlać ilościową różnicę uwalniania ziarnistości płytkowych – innymi słowy, w tych warunkach mamy do czynienia z „szepem” płytek zamiast ich „krzyku”, który jest konieczny w sytuacji wymagającej pełnego uruchomienia mechanizmów hemostazy.

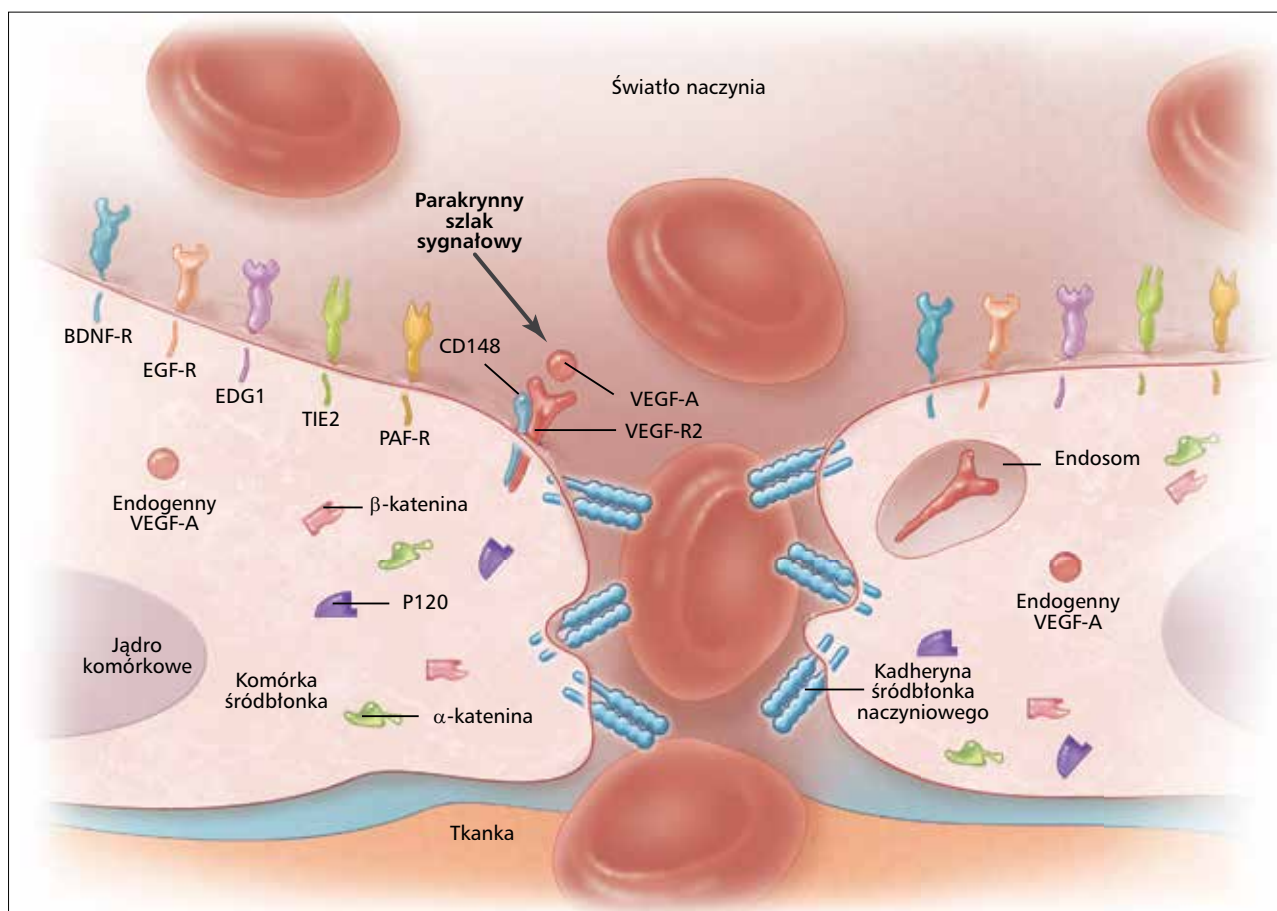
Zaburzenie prawidłowej interakcji między płytkami krwi a komórkami śródbłonna ujawnia się klinicznie u pacjentów z ciężką małopłytkowością, u których kontakt z błoną płytek i uwalnianie trofogenów działających na komórki śródbłonna są zmniejszone do takiego stopnia, że następuje rozpad makromolekularnych kompleksów kadheryny śródbłonna naczyniowego, co powoduje utratę bariery międzykomórkowej i wynaczynienie krwinek czerwonych do tkanek (ryc. 5). Szybki spadek liczby płytek, który obserwuje się u niektórych pacjentów z polekową małopłytkowością, wiąże się z większym nasileniem wynaczyniania się erytrocytów, manifestującym się

masywnymi wybroczynami oraz rozległymi krwistymi wylewami w obrębie błon śluzowych. U pacjentów ze złożonymi stanami chorobowymi istotne klinicznie zaburzenia związane z małopłytkowością mogą również odzwierciedlać złożony wpływ małej liczby płytek w połączeniu z układowym oddziaływaniem posocznicy, nowotworów, zapalenia lub współistniejących procesów immunologicznych, które mogą bezpośrednio uszkadzać naczynia mikrokrażenia, dodatkowo zaburzając integralność połączeń między komórkami śródbłonna.

Bewacizumab, humanizowane przeciwciało monoklonalne przeciwko VEGF, a także inhibitory kinazy tyrozynowej VEGF-R2, sorafenib i sunitinib, są lekami antyangiogennymi stosowanymi obecnie z pewnym powodzeniem w leczeniu nowotworów. Leki te są potencjalnymi inhibitorami interakcji płytek z komórkami śródbłonna, a więc ich stosowanie może wiązać się z krwotocznymi działaniami niepożądanymi. Główne zastrzeżenia dotyczące bezpieczeństwa stosowania antagonistów VEGF wiążą się z niewielką liczbą zgonów związanych z leczeniem, które były spowodowane perforacją jelita, tętniczymi incydentami zakrzepowo-zatorowymi i krwotokami [67,68]. W większości z tych prób klinicznych istotne działanie toksyczne wystąpiły w przypadku jednoczesnego stosowania bewacizumabu i chemioterapii. W większości prób klinicznych z zastosowaniem bewacizumabu częstość występowania krwawień nieprowadzących do zgonu wynosiła 2-3% [69]. Ta stosunkowo mała częstość występowania krwawień może odzwierciedlać niedostępność wewnątrzkomórkowej puli VEGF dla przeciwciał znajdujących się poza komórkami, co powoduje zachowanie stabilizującego wewnątrzkomórkowego autokrynnego szlaku VEGF. Skojarzone leczenie bewacizumabem i drobnocząsteczkowym inhibitorem kinazy tyrozynowej może zwiększać potencjał krwawień, ponieważ inhibitor kinazy tyrozynowej może interferować z wewnątrzkomórkowymi szlakami sygnałowymi. W próbie klinicznej, w której stosowano bewacizumab w połączeniu z erlotynibem, inhibitorem kinazy tyrozynowej czynnika wzrostu naskórka, drobne krwawienia wystąpiły u około 40% pacjentów z przerzutowym rakiem nerki [70].

Nowe drobnocząsteczkowe inhibitory poszczególnych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, które są obecnie opracowywane jako leki o bardziej ukierunkowanym działaniu, mogą interferować ze złożoną maszyną molekularną wykorzystywaną przez śródbłonek do stabilizacji połączeń przylegania. Dotyczy to zwłaszcza inhibitorów kinaz, które powodują zmiany potranslacyjnej modyfikacji kompleksów kadheryny śródbłonna naczyniowego i kateniny. Biorąc pod uwagę znaczną niejednorodność łożyska naczyń mikrokrażenia w różnych narządach i obszarach anatomicznych, prawdopodobne wydaje się zróżnicowanie swoistych szlaków sygnałowych uruchamianych w śródbłonku przez płytki, wynikające z oddziaływania różnych czynników mikrośrodowiskowych. Potencjalne działanie niepożądane różnych leków o bardziej ukierunkowanym działaniu, jakim jest krwawienie, może więc występować tylko w niektó-





**RYCINA 5** Krwawienie u pacjentów z małopłytkowością jest spowodowane osłabieniem połączeń przylegania.

Jeżeli liczba płytek zmniejszy się poniżej pewnej krytycznej wartości, ich troficzny wpływ na śródbłonek w stanie równowagi ulega zaburzeniu i następuje rozpad makromolekularnych kompleksów kadheryny śródbłonka naczyniowego, co powoduje utratę bariery międzykomórkowej i umożliwia wynacznienie krwinek czerwonych do otaczających tkanek. Następuje przerwanie autokryny pętli czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego typu A (VEGF-A), czego konsekwencją są zmiany ufosforylowania składników kompleksu kadheryny śródbłonka naczyniowego. Receptor VEGF typu 2 (VEGF-R2) jest internalizowany przez komórkę w endosomach. U większości pacjentów rozpad kompleksów kadheryny śródbłonka naczyniowego manifestuje się wybroczynami (petecjami) w skórze, a także ogniskowymi pęcherzykami krwotocznymi na powierzchni błon śluzowych. Te trofogeny przekazują sygnały za pomocą własnych swoistych receptorów. BDNF-R – receptor mózgowego czynnika neurotroficznego (brain-derived neurotrophic factor receptor); EDG1 – produkt genu różnicowania śródbłonka typu 1 (endothelial differentiation gene 1); EGF-R – receptor czynnika wzrostu naskórka (epidermal growth factor receptor); PAF-R – receptor czynnika aktywującego płytki (platelet-activating factor receptor); TIE2 – receptor angiopoetyny swoisty dla komórek śródbłonka. CD148, P120 – patrz Słowniczek.

rych narządach, natomiast w innych nie. Uzasadnione jest też oczekiwanie, że bezpośrednie podawanie niektórych z tych trofogenów lub ich połączeń za pomocą liposomów bądź wektorów wirusowych może okazać się przydatne w leczeniu ciężkiej małopłytkowości, a także krwawień pęcherzykowych lub śródmózgowych wywołanych przez leki o bardziej ukierunkowanym działaniu.

## Podsumowanie

Płytki krwi i komórki śródbłonka są ściśle powiązane ze sobą. Nie ulega wątpliwości, że u pacjentów z patologicznymi zdarzeniami lub urazami, w których dochodzi do uszkodzenia naczyń krwionośnych i zaburzenia ich ciągłości, płytki szybko przybywają na ratunek, inicjując sekwencję potencjalnie ratujących życie zjawisk hemostacyjnych, których ostatecznym rezultatem jest zatrzyma-

nie krwawienia, a następnie naprawa uszkodzonej ściany naczyń krwionośnych. Jeżeli te hemostatyczne mechanizmy obrony i naprawy zostaną uruchomione w niewłaściwym czasie lub niewłaściwym miejscu, konsekwencją może być incydent zakrzepowy.

W fizjologicznym stanie równowagi płytki utrzymują stabilność naczyń za pośrednictwem kilku mechanizmów, w tym konstytutywnej ekspresji trofogenów na powierzchni płytek oraz tonicznego uwalniania cytokin i czynników wzrostu, które zachowują strukturalną i czynnościową integralność suwakopodobnej maszyny kadheryny śródbłonka naczyniowego, tworzącej połączenia przylegania w obrębie przestrzeni międzykomórkowych. Regulowana, konstytutywna aktywacja płytek o niewielkim nasileniu może być prawidłowym zjawiskiem reologicznym w zawłósczkowym łożysku naczyniowym [66]. Prawidłowa struktura połączeń międzykomórkowych również przyczynia się do zachowania

stanu równowagi i homeostazy poprzez aktywny udział w dwukierunkowych szlakach sygnałowych związanych z powstawaniem kompleksów indukowanych przez interakcję trofogeny z receptorem, a także zaangażowaniem czynników transkrypcyjnych, takich jak  $\beta$ -katenina po wewnętrznej stronie błony komórkowej [51]. Potranslacyjne modyfikacje kompleksów kadheryny śródbłonna naczyniowego i  $\beta$ -kateniny, takie jak fosforylacja i defosforylacja, są ważne dla stabilizacji czynnych połączeń przylegania, a inną cechą o zasadniczym znaczeniu jest połączenie tych kompleksów z cytoszkieletem. W przypadku ciężkiej małopłytkowości kontakt z błoną płytek i uwalnianie trofogenów działających na komórki śródbłonna są zmniejszone do takiego stopnia, że następuje rozkład makromolekularnych kompleksów kadheryny śródbłonna naczyniowego, co powoduje utratę suwakopodobnej bariery międzykomórkowej i wynaczynienie krwinek czerwonych do tkanek (ryc. 5). Biorąc pod uwagę znaczną niejednorodność łożyska naczyń mikrokrążenia w różnych narządach i obszarach anatomicznych, można oczekiwać, że w tych fizjologicznych procesach uczestniczy wiele różnych trofogenów zmagazynowanych w płytkach i działających na komórki śródbłonna. Wciąż nie wiadomo, w jakim stopniu te indukowane szlaki sygnałowe nakładają się na siebie, oraz czy autokrynną pętla VEGF-A i receptora VEGF-R2 jest wspólnym końcowym szlakiem.

W fizjologicznym stanie równowagi płytki można postrzegać jako rezerwuar biochemiczny, który odżywia i stabilizuje nieuszkodzony śródbłonek. Swoiste szlaki sygnałowe uruchamiane przez płytki w wyspecjalizowanych łożyskach naczyniowych różnych narządów mogą różnić się w następstwie oddziaływania odmiennych czynników mikrośrodowiskowych. Bezpośrednie podawanie niektórych z tych trofogenów lub ich połączeń za pomocą liposomów bądź wektorów wirusowych może okazać się przydatne u pacjentów z ciężką małopłytkowością.

Praca sfinansowana z grantów Howard Hughes Medical Institute, Ansary Center for Stem Cell Therapeutics oraz National Heart, Lung, and Blood Institute (dla dr. Rafii).

Nie zgłoszono żadnych potencjalnych konfliktów interesów odnoszących się do tego artykułu.

From The New England Journal of Medicine 2008; 359: 1261-1270. Translated and reprinted in its entirety with permission of the Massachusetts Medical Society. Copyright © 2008, 2009 Massachusetts Medical Society. All Rights Reserved.

## Piśmiennictwo

- Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007; 357: 2482-2494.
- Joris I, Majno G, Corey EJ, Lewis RA. The mechanism of vascular leakage induced by leukotriene E4: endothelial contraction. *Am J Pathol* 1987; 126: 19-24.
- Kitchens CS. Amelioration of endothelial abnormalities by prednisone in experimental thrombocytopenia in the rabbit. *J Clin Invest* 1977; 60: 1129-1134.
- Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; 71: 1906-1909.
- Nachman R, Levine R, Jaffe EA. Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea pig megakaryocytes. *J Clin Invest* 1977; 60: 914-921.
- Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* 2004; 10: 64-71.
- Junt T, Schulze H, Chen Z, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 2007; 317: 1767-1770.
- Möhle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 663-668.
- Rafii S, Shapiro F, Pettengell R, et al. Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. *Blood* 1995; 86: 3353-3363.
- Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol* 2007; 28: 299-307.
- Anteby EY, Greenfield C, Natanson-Yaron S, et al. Vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor and fibroblast growth factor-4 and -10 stimulate trophoblast plasminogen activator system and metalloproteinase-9. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 229-235.
- Li WM, Huang WQ, Huang YH, Jiang DZ, Wang QR. Positive and negative hematopoietic cytokines produced by bone marrow endothelial cells. *Cytokine* 2000; 12: 1017-1023.
- El Andaloussi AE, Duchez P, Rieffers J, Ripoche J, Grosset C. Expression of thrombopoietin by umbilical vein endothelial cells. *Eur Cytokine Netw* 2001; 12: 268-273.
- Jin DK, Shido K, Kopp HG, et al. Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4<sup>+</sup> hemangiocytes. *Nat Med* 2006; 12: 557-567.
- Gawaz M, Stellos K, Langer HF. Platelets modulate atherosclerosis and progression of atherosclerotic plaques via interaction with progenitor and dendritic cells. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 235-242.
- Langer HF, Daub K, Braun G, et al. Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1463-1470.
- Italiano JE Jr, Richardson JL, Patel-Hett S, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet {alpha} granules and differentially released. *Blood* 2008; 111: 1227-1233.
- Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 273-286.
- Yamashiro K, Tsujikawa A, Ishida S, et al. Platelets accumulate in the diabetic retinal vasculature following endothelial death and suppress blood-retinal barrier breakdown. *Am J Pathol* 2003; 163: 253-259.
- Rhee JS, Black M, Schubert U, et al. The functional role of blood platelet components in angiogenesis. *Thromb Haemost* 2004; 92: 394-402.
- Dvorak HF. Discovery of vascular permeability factor (VPF). *Exp Cell Res* 2006; 312: 522-526.
- Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 550-563.
- Lee S, Chen TT, Barber CL, et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* 2007; 130: 691-703.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380: 435-439.
- Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10: 528-535.
- Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 3566-3570.

27. Partanen TA, Arola J, Saaristo A, et al. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J* 2000; 14: 2087-2096.
28. Klagsbrun M, Takashima S, Mamluk R. The role of neuropilin in vascular and tumor biology. *Adv Exp Med Biol* 2002; 515: 33-48.
29. Bdolah Y, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Angiogenic imbalance in the pathophysiology of preeclampsia: newer insights. *Semin Nephrol* 2004; 24: 548-556.
30. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004; 350: 672-683.
31. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 902-906.
32. Lucerna M, Zerneck A, de Nooijer R, et al. Vascular endothelial growth factor-A induces plaque expansion in ApoE knock-out mice by promoting de novo leukocyte recruitment. *Blood* 2007; 109: 122-129.
33. Seipelt RG, Backer CL, Mavroudis C, et al. Osteopontin expression and adventitial angiogenesis induced by local vascular endothelial growth factor 165 reduces experimental aortic calcification. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 129: 773-781.
34. Kaneko T, Zhang Z, Mantellini MG, et al. Bcl-2 orchestrates a cross-talk between endothelial and tumor cells that promotes tumor growth. *Cancer Res* 2007; 67: 9685-9693.
35. Gupta K, Kshirsagar S, Li W, et al. VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp Cell Res* 1999; 247: 495-504.
36. Kitchens CS. The anatomic basis of purpura. *Prog Hemost Thromb* 1980; 5: 211-244.
37. Lampugnani MG, Dejana E. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 674-682.
38. Bundgaard M. The three-dimensional organization of tight junctions in a capillary endothelium revealed by serial-section electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 1984; 88: 1-17.
39. Dejana E, Lampugnani MG, Martinez-Estrada O, Bazzoni G. The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability. *Int J Dev Biol* 2000; 44: 743-748.
40. Butros LJ, Bussel JB. Intracranial hemorrhage in immune thrombocytopenic purpura: a retrospective analysis. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25: 660-664.
41. Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 261-270.
42. Liebner S, Cavallaro U, Dejana E. The multiple languages of endothelial cell-to-cell communication. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1431-1438.
43. Sharma M, Henderson BR. IQ-domain GTPase-activating protein 1 regulates beta-catenin at membrane ruffles and its role in macropinocytosis of N-cadherin and adenomatous polyposis coli. *J Biol Chem* 2007; 282: 8545-8556.
44. Citi S. The molecular organization of tight junctions. *J Cell Biol* 1993; 121: 485-489.
45. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, et al. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 1999; 98: 147-157.
46. Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol* 2006; 174: 593-604.
47. Shay-Salit A, Shushy M, Wolfovitz E, et al. VEGF receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 9462-9467.
48. Huber AH, Weis WI. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 2001; 105: 391-402.
49. Choi HJ, Huber AH, Weis WI. Thermodynamics of beta-catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity. *J Biol Chem* 2006; 281: 1027-1038.
50. Lilien J, Balsamo J. The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 459-465.
51. Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda)* 2007; 22: 303-309.
52. Gerber HP, Malik AK, Solar GP, et al. VEGF regulates hematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 2002; 417: 954-958.
53. Karl E, Zhang Z, Dong Z, et al. Unidirectional crosstalk between Bcl-xL and Bcl-2 enhances the angiogenic phenotype of endothelial cells. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1657-1666.
54. Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JJ, et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 2007; 128: 1173-1186.
55. Pidgeon GP, Barr MP, Harmey JH, Foley DA, Bouchier-Hayes DJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells. *Br J Cancer* 2001; 85: 273-278.
56. Ma X, Ottino P, Bazan HE, Bazan NG. Platelet-activating factor (PAF) induces corneal neovascularization and upregulates VEGF expression in endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 2915-2921.
57. Olivera A, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 1993; 365: 557-560.
58. Kolesnick R, Golde DW. The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* 1994; 77: 325-328.
59. Hisano N, Yatomi Y, Satoh K, et al. Induction and suppression of endothelial cell apoptosis by sphingolipids: a possible in vitro model for cell-cell interactions between platelets and endothelial cells. *Blood* 1999; 93: 4293-4299.
60. Singleton PA, Dudek SM, Chiang ET, Garcia JG. Regulation of sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cytoskeletal rearrangement and barrier enhancement by S1P1 receptor, PI3 kinase, Tiam1/Rac1, and alpha-actinin. *FASEB J* 2005; 19: 1646-1656.
61. Aoki S, Osada M, Kaneko M, Ozaki Y, Yatomi Y. Fluid shear stress enhances the sphingosine 1-phosphate responses in cell-cell interactions between platelets and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 1054-1057.
62. Feistritzer C, Riewald M. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood* 2005; 105: 3178-3184.
63. Kolesnick R, Fuks Z. Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene* 2003; 22: 5897-5906.
64. von Tell D, Armulik A, Betsholtz C. Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res* 2006; 312: 623-629.
65. Armulik A, Abramson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005; 97: 512-523.
66. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002; 8: 1227-1234.
67. Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2006; 3: 24-40.
68. Scappaticci FA, Skillings JR, Holden SN, et al. Arterial thromboembolic events in patients with metastatic carcinoma treated with chemotherapy and bevacizumab. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1232-1239.
69. Cannistra SA, Matulonis UA, Penson RT, et al. Phase II study of bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5180-5186. [Erratum, *J Clin Oncol* 2008; 26: 1773.]
70. Hainsworth JD, Sosman JA, Spigel DR, Edwards DL, Baughman C, Greco A. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with a combination of bevacizumab and erlotinib. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7889-7896.





## Komentarz

dr n. med. Sebastian Szmit<sup>1,2</sup>

prof. nadzw. dr hab. n. med. Krzysztof J. Filipiak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>I Katedra i Klinika Kardiologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup>Klinika Onkologii, Wojskowy Instytut Medyczny, Warszawa

### PLYTKI KRWI – OBIEKT BADANIA NIE TYLKO KARDIOLOGÓW...

Skoro, jak przeczytaliśmy w artykule, „megakariocyty wytwarzają duże ilości proangiogennych cytokin oraz syntetyzują lub transportują wiele głównych trofogenów działających na komórki śródbłonna, w tym czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego typu A (VEGF-A), czynnik typu 1 pochodzący z komórek podścieliska (SCSF-1), angiopoetynę 1, czynnik wzrostu naskórka (EGF) oraz mózgowy czynnik neurotroficzny (BDNF)”, można domniemywać, że selektywne hamowanie takiej aktywności megakariocytów przełoży się na ograniczenie angiogenezy, a więc pośrednio – wzrostu nowotworów. Jeżeli „agregacja i aktywacja płytek w miejscach odsłoniętej warstwy podśródbłonkowej powoduje uwalnianie (...) silnego angiogennego trofogenu” można założyć, że działanie antyagregacyjne, w tym również działanie przeciwtrombinowe, niesie ze sobą skutki przeciwnowotworowe. Czy doświadczenia z antykancerogennymi właściwościami kwasu acetylosalicylowego czy zmniejszającym ryzyko rozsiewu nowotworu działaniem heparyn drobnocząsteczkowych tego nie potwierdzają?

Odpowiedzi na te pytania nie zostały ostatecznie udzielone, a tym bardziej wnikliwie wyjaśnione z perspektywy patofizjologicznej, ale artykuł, o którego skomentowanie zostaliśmy poproszeni, stanowi niewątpliwie jeden z punktów wyjścia do takich rozważań. Płytki krwi, przyczyniające się do rewaskularyzacji niedokrwionych tkanek, wzrostu guzów oraz rozwoju zmian miażdżycowych są zatem w coraz większym stopniu obiektem badań zarówno kardiologów, jak i onkologów. Wybrany przez redakcję artykuł nie jest prosty w lekturze. Zdajemy sobie z tego sprawę. Wydaje się jednak, że jako kardiolodzy powinniśmy również posiadać teoretyczne podstawy, aby zrozumieć i śledzić postępy wiedzy o płytkach krwi, ich mediatorach, widziane z perspektywy czynników wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF), hamowania ich aktywności i ograniczania neoangiogenezy. Czyli – z perspektywy onkologów.

Niewątpliwym przełomem w onkologii stało się wprowadzenie tzw. terapii celowanych, czyli leków działających na poznane, dokładnie określone miejsca i drogi biologicznego przewodnictwa komórek. Przykładem terapii celowanych są leki blokujące rozprzestrzenianie się nowotworu poprzez hamowanie tworzenia nowych naczyń. Leki te, nazywane lekami

antyangiogennymi, są skuteczne i istotnie wydłużają przeżycie pacjentów z przerzutową chorobą nowotworową, ale wszystkie stwarzają potencjalne ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych [1].

Po raz pierwszy hipotezę o możliwości leczenia nowotworów poprzez zastosowanie inhibitorów angiogenezy postawił Judah Folkmann w 1971 roku [2]. W tym samym roku wyizolował on substancję, która stymulowała wzrost naczyń w modelach zwierzęcych. Już wówczas podejrzewano, że do wzrostu guza nowotworowego ponad 1-2 mm potrzebne jest dodatkowe unaczynienie, rozwijające się pod wpływem swoistych substancji uwalnianych przez nowotwór. VEGF to jeden z najsilniejszych i dominujących czynników proangiogennych który ma wpływ nie tylko na nowo powstające naczynia, stymuluje również tworzenie naczyń już istniejących: VEGF sprzyja ich integralności i zwiększa ich przepuszczalność. Istniejące naczynia dostarczają tlen i składniki odżywcze niezbędne do podtrzymania metabolizmu guza [3]. Bez VEGF, nowoutworzone mikronaczynia ulegają rozpadowi, zaś komórki śródbłonna ulegają apoptozie [4]. VEGF, zwiększając przepuszczalność naczyń, przyczynia się do przenikania białek osocza i wzrostu ciśnienia w przestrzeni międzykomórkowej [5-8]. Wykazano również, że VEGF powoduje powstawanie nowych naczyń w ciągu kilku dni, oraz podwaja gęstość unaczynienia w ciągu około tygodnia [9]. Czytelnik śledzący fakty przedstawione w artykule, na kolorowych rycinach, jak wyżej wymienione uwagi o VEGF już dawno odkryje swoisty paradoks onkologiczno-kardiologiczny. Podczas gdy ta pierwsza grupa specjalistów szuka środków ograniczenia neoangiogenezy, zahamowania VEGF, kardiolodzy upatrywaliby nowych możliwości leczenia np. pozawałowego uszkodzenia mięśnia sercowego w działaniach odwrotnych – stymulowaniu angiogenezy i uwalniania VEGF. Co oznacza to w praktyce? Swoiste kroki podejmowane przez jednych specjalistów i wdrażane nowe metody leczenia mogą dawać groźne działania niepożądane – obiekt terapii specjalistów drugiej dziedziny. Aby rozwiązać w przyszłości ten paradoks, zmuszeni jesteśmy poszukiwać złotego środka. Jego odkrycie wymaga znacznie większej wiedzy o patofizjologii płytek i ich interakcji ze śródbłonkiem.

Co warto wiedzieć dziś o doświadczeniach z leczeniem przeciwnaczyniowym naszych kolegów onkologów? Istotą leczenia antyangiogennego w onkologii jest hamowanie mechanizmów związanych z VEGF. Rezultaty takiego leczenia mogą być wczesne, kiedy to z po-

wodu odcięcia VEGF od patologicznych naczyń guza powodujemy ich regresję oraz normalizację tych naczyń, które pozostają. Wynikiem może być stabilizacja zaawansowanej choroby nowotworowej (brak progresji, czyli powiększania się zmian przerzutowych).

Pierwszym wynikiem terapii przeciwko VEGF jest regresja części z istniejących naczyń mikrokrążenia guza. Pojedyncze podanie leku znacząco zmniejsza gęstość unaczynienia guza, (w zakresie 29-59% pierwotnego unaczynienia) [10]. Rezultat ten zauważalny jest bardzo szybko, bo już w ciągu 24 h od rozpoczęcia leczenia.

Należy jednak pamiętać, że oprócz śródbłonna i perycytów w skład systemu naczyń wchodzi również błona podstawna. Prawdopodobnie ma ona olbrzymie znaczenie w procesie ponownej odbudowy naczyń po zaprzestaniu leczenia przeciwko VEGF. Okazuje się bowiem, że w trakcie terapii przeciwko VEGF komórki śródbłonna ulegają apoptozie, ale błona podstawna pozostaje niezmienniona i dzięki niej może nastąpić szybka odbudowa nowych naczyń [11,12]. Sugeruje się, że błona podstawna może być rezerwuarem wielu czynników proangiogennych. W badaniu przedklinicznym wykazano, że przerwanie leczenia przeciwko VEGF skutkuje szybkim wzrostem nowych naczyń w tempie, pozwalającym na odbudowę struktury łożyska sprzed leczenia w ciągu zaledwie 3 tygodni [13,14].

Wśród obecnie stosowanych w onkologii leków antyangiogennych wyróżnia się między innymi bewacizumab – humanizowane przeciwciało monoklonalne hamujące VEGF. Rzeczywiście najczęstszym niepożądanym zdarzeniem podczas terapii bewacizumabem są tętnicze incydenty zakrzepowo-zatorowe i krwawienia. Najnowsza metaanaliza 15 badań obejmujących łącznie 7956 pacjentów z przerzutową chorobą nowotworową pokazuje, że ryzyko powikłań zakrzepowo-zatorowych podczas terapii bewacizumabem jest o 33% wyższe w stosunku do terapii alternatywnych (względny współczynnik ryzyka [RR] 1,33; 95% przedział ufności [CI] 1,13-1,56;  $p < 0,001$ ) [15]. Częstość wszystkich zdarzeń niepożądanych wynosi 11,9% oraz zdarzeń istotnych klinicznie – 6,3%. Ryzyko wzrosło istotnie z dawką bewacizumabu (istotna różnica ryzyka między dawką 2,5 mg/kg/tydzień a dawką 5 mg/kg/tydzień). Również rodzaj choroby nowotworowej decyduje o ryzyku powikłań zakrzepowo-zatorowych. Najwyższe ryzyko dotyczy chorych z rakiem jelita grubego (19,1%), a najniższe chorych z rakiem nerki (3%). Pośrednie ryzyko dotyczy chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuca (14,9%) i chorych z rakiem piersi (7,3%). Jednak ryzyko poważnych klinicznie powikłań zakrzepowo-zatorowych jest takie samo niezależnie od rodzaju choroby nowotworowej.

Innym bardzo częstym objawem niepożądanym terapii bewacizumabem jest nadciśnienie tętnicze [16], ale u chorych leczonych wcześniej antracyklinami oraz po radioterapii lewego śródpiersia występowały rów-

niez incydenty niewydolności serca. Częstość tych zdarzeń wynosiła około 4% podczas terapii sekwencyjnej, ale jeśli równolegle podawano antracykliny i bewacizumab częstość ta wzrastała do 14% [17,18]. W badaniu randomizowanym [19] u chorych z rakiem piersi dodanie bewacizumabu do taksanów zwiększyło częstość występowania nadciśnienia tętniczego do około 15%, epizodów zakrzepowo-zatorowych tętniczych do około 2,5%, wystąpienia białkomoczu do 3,1% oraz zaburzenia funkcji lewej komory do 1,4%. Jedna chora z ramienna leczonego bewacizumabem i paklitakselem zmarła z powodu zawału mięśnia sercowego. Ryzyko krwawień wynosiło 1,4%. W innym badaniu klinicznym III fazy z podwójnie ślełą próbą u chorych z przerzutowym rakiem nerki terapia bewacizumabem była związana z 33% ryzykiem krwawień i 6% ryzykiem rozwoju małopłytkowości [20].

Do pełnego hamowania angiogenezy nie wystarcza jednak blokowanie VEGF. Znaczna część zjawisk związanych z angiogenezą nowotworową jest wynikiem zaburzonej aktywności swoistych receptorowych białek błonowych. Nowoczesne leki onkologiczne to związki wiążące się mniej lub bardziej swoiście ze strategiczną częścią kompleksu receptorowego, jakim są kinazy tyrozynowe – transbłonowe białka o złożonej budowie [21]. Ich domena zewnątrzkomórkowa pełni funkcję receptorową i swoiście wiąże się z właściwym dla siebie ligandem, np. czynnikami wzrostu: naczyniowo-śródbłonkowym (vascular endothelial growth factor receptor, VEGF) oraz płytkowo-pochodnym (platelet-derived growth factor receptor, PDGF). Okazuje się, że jednoczesna blokada sygnału od PDGF i VEGF daje większą skuteczność leczenia antyangiogennego.

Sunitinib jest doustnym inhibitorem kinazy tyrozynowej, który blokuje m.in.: receptory dla VEGF (receptory VEGFR1-3) i PDGF (receptor PDGFR) [22]. Jedna z hipotez zakłada, że powodem rozwoju kardiotoksyczności podczas stosowania tego leku jest blokowanie PDGFR, którego stopień ekspresji ma związek z prawidłowym funkcjonowaniem kardiomiocytów warunkującym jego przeżycie [23]. Inna hipoteza dotyczy znaczenia rodziny kinazy rybosomalnej S6 (RSK), która warunkuje prawidłowe przeżycie kardiomiocytów poprzez hamowanie fosforylacji czynników aktywujących apoptozę (BAD i AMPK) [24,25]. Sunitinib hamując dodatkowo RSK i AMPK, może powodować dysfunkcję mięśnia sercowego [26]. Demetri i wsp. stwierdzili, że u 11% chorych odnotowano zmniejszenie frakcji wyrzucania lewej komory serca do wartości poniżej wartości prawidłowej, czyli poniżej 50% [27]. Natomiast w drugim badaniu dotyczącym chorych z przerzutowym rakiem nerki odnotowano, że u 10% spośród chorych obserwowano zmniejszenie frakcji wyrzucania po leczeniu, którego czas trwania wynosił 6 miesięcy [28]. Małopłytkowość występowała z częstością 65% (!), nadciśnienie tętnicze – 24%, krwawienia – 12%.

Sorafenib jest również doustnym inhibitorem kinaz tyrozynowych. Udowodniono, że stosowanie tego leku wiąże się z ryzykiem ostrego zespołu wieńcowego, w tym zawału mięśnia sercowego. Takie zdarzenie wystąpiło u 2,9% chorych leczonych (w grupie placebo wystąpiło ono tylko u 0,4% chorych) [29]. Wu i wsp. [30] w analizie retrospektywnej obejmującej 4599 chorych leczonych sorafenibem wykazali, że łączne występowanie nadciśnienia tętniczego wszystkich stopni wynosiło 23,4% (95% CI 16,0-32,9%). Poza blokowaniem receptorów: VEGFR2, VEGFR3, FLT3, KIT i PDGFR, sorafenib hamuje także receptory RAF1 i BRAF. RAF1, hamuje aktywność dwóch kinaz warunkujących apoptozę: ASK1 i MST2 (obie kinazy biorą udział w mechanizmach stresu oksydacyjnego i związanych z nim patomechanizmami uszkodzenia tkanek) [31-33]. Aktywność kinazy RAF1 nie jest ważna dla spoczynkowej funkcji serca, ale ma zasadnicze znaczenie przy obciążeniach serca [34]. W dwóch badaniach potwierdzono, że podczas terapii hamującej szlak VEGF dochodziło do wzrostu ciśnienia w jamach serca, do zmniejszenia gęstości naczyń włosowatych w sercu, zwiększenia włóknienia serca, a to klinicznie było związane z dysfunkcją skurczową oraz z rozwojem pełnoobjawowej niewydolności serca [35,36]. Te badania pokazują, że prawidłowa angiogeneza koreluje z prawidłową odpowiedzią kardiomiocytów na wzrost obciążenia.

Z punktu widzenia biologii molekularnej bardzo istotna wydaje się tzw. oporność wtórna, czyli progresja choroby nowotworowej, która następuje po wstępnych sukcesach terapii antyangiogennej, np. po uzyskaniu częściowej remisji zmian przerzutowych. Prawdopodobnie istotną rolę odgrywa tu tzw. ucieczka angiogenna, czyli uruchomienie i dominacja alternatywnych mechanizmów molekularnych prowadzących do tworzenia nowych naczyń krwionośnych dla guza. To pokazuje, jak mało nadal wiemy o wzajemnych relacjach pomiędzy płytkami krwi a komórkami śródbłonna i jak ważne są te mechanizmy dla optymalnej terapii kardiologicznej i onkologicznej.

Żyjemy w czasach, kiedy istotne postępy wiedzy patofizjologicznej są następstwem wprowadzania nowych leków przez przemysł farmaceutyczny (bevacizumab, sorafenib, sunitinib). Dawniej wprowadzenie leku było końcem długiej drogi odkryć patofizjologicznych. Dzisiaj, paradoksalnie, nowoczesne molekuly stosowane w praktyce odkrywają przed nami zaskakujące działania już po wprowadzeniu na rynek. Obserwacje tych działań, w tym również działań niepożądanych, znacznie przekraczają wiedzę ich odkrywców i osób pierwotnie określających zakres ich działań terapeutycznych. Tak było ze statynami i inhibitorami konwertazy angiotensyny w kardiologii, tak będzie – naszym zdaniem – z lekami onkologicznymi wpływającymi na angiogenezę.

## Piśmiennictwo:

1. Szmít S, Opolski G, Szczylik C: Powikłania kardiologiczne jako powikłania terapii celowanych. *Współczesna Onkologia* 2008, 12: 7: 318-323.
2. Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971, 285: 1182-1186.
3. Bergers G, Benjamin LE: Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003, 3: 401-410.
4. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, et al.: Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998, 273: 30336-30343.
5. Jain RK: Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005, 307: 58-62.
6. Jain RK: Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 2001, 7: 987-989.
7. Gerber HP, Ferrara N: Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res* 2005, 65: 671-680.
8. Carmeliet P, Jain RK: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000, 407: 249-257.
9. Baluk P, Lee CG, Link H, et al.: Regulated angiogenesis and vascular regression in mice overexpressing vascular endothelial growth factor in airways. *Am J Pathol* 2004, 165: 1071-108.
10. Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, et al.: Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 2004, 10: 145-147.
11. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM: Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2005, 15: 102-111.
12. Inai T, Mancuso M, Hashizume H, et al.: Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am J Pathol* 2004, 165: 35-52.
13. Vosseler S, Mirancea N, Bohlen P, et al.: Angiogenesis inhibition by vascular endothelial growth factor receptor-2 blockade reduces stromal matrix metalloproteinase expression, normalizes stromal tissue, and reverts epithelial tumor phenotype in surface heterotransplants. *Cancer Res* 2005, 65: 1294-1305.
14. Bocci G, Man S, Green SK, et al.: Increased plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) as a surrogate marker for optimal therapeutic dosing of VEGF receptor-2 monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2004, 64: 6616-6625.
15. Nalluri SR, Chu D, Keresztes R, Zhu X, Wu S: Risk of venous thromboembolism with the angiogenesis inhibitor bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. *JAMA* 2008, 300: 277-2285.
16. Yeh ETH, Tong AT, Lenihan DJ, et al.: Cardiovascular Complications of Cancer Therapy: Diagnosis, Pathogenesis, and Management. *Circulation* 2004, 109: 3122-3131
17. Cobleigh MA, Langmuir VK, Sledge GW, et al.: A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 2003, 30: 117-124.
18. Raghavan D, Cox K, Childs A, et al.: Hypercholesterolemia after chemotherapy for testis cancer. *J Clin Oncol* 1992, 10: 1386-1389.
19. Miller K, Wang M, Gralow J, et al.: Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2007, 357 (26): 2666-2676.



20. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, et al.: Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* 2007, 370: 2103-2111.
21. Zołnierek J: Sorafenib w leczeniu zaawansowanego raka nerki. *Współczesna Onkologia* 2008, 12: 314-317.
22. Branca MA: Multi-kinase inhibitors create buzz at ASCO. *Nature Biotech* 2005, 23, 639.
23. Hsieh PC, MacGillivray C, Gannon J, Cruz FU, Lee R T: Local controlled intramyocardial delivery of platelet-derived growth factor improves postinfarction ventricular function without pulmonary toxicity. *Circulation* 2006, 114, 637-644.
24. Dyck JRB, Lopaschuk GD: AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? *J Physiol* 2006, 574, 95-112.
25. Terai K, et al.: AMP-activated protein kinase protects cardiomyocytes against hypoxic injury through attenuation of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 2005, 25: 9554-9575.
26. Fabian MA, et al.: A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nature Biotechnol* 2005, 23, 329-336.
27. Demetri GD, et al.: Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 2006, 368, 1329-1338.
28. Motzer RJ, et al.: Sunitinib versus interferon in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007, 356: 115-124.
29. Bayer Pharmaceuticals. Nexavar (sorafenib) Prescribing Information <<http://www.univgraph.com/bayer/inserts/nexavar.pdf>> (2006).
30. Wu S, Chen JJ, Kudelka A, et al.: Incidence and risk of hypertension with sorafenib in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 2008, 9 (2): 117-23.
31. Chen J, Fujii K, Zhang L, Roberts T, Fu H: Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulated kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 7783-7788.
32. Muslin AJ: Role of Raf proteins in cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival. *Trends Cardiovasc Med* 2005, 15: 225-229.
33. Yamaguchi O, et al.: Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100: 15883-15888.
34. Harris IS, et al.: Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload. *Circulation* 2004 110, 718-723.
35. Shiojima I, et al.: Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest* 2005, 115: 2108-2118.
36. Izumiya Y, et al.: Vascular endothelial growth factor blockade promotes the transition from compensatory cardiac hypertrophy to failure in response to pressure overload. *Hypertension* 2006, 47: 887-893.



## Komentarz

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

Poza kluczową rolę w tworzeniu zakrzepu w miejscu uszkodzenia naczynia płytki krwi są niezbędne do utrzymania integralności łożyska naczyniowego, gdy nie dochodzi do mechanicznego przerwania ciągłości ściany. Ziarnistości zawarte w płytkach stanowią bowiem źródło licznych cytokin i czynników wzrostu, których niewielkie stałe uwalnianie zapewnia stabilność połączeń międzykomórkowych w śródbłonku. Kluczową rolę w tych interakcjach płytkowo-śródbłonkowych przypisuje się rodzinie cytokin o nazwie czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (vascular endothelial growth factor, VEGF), obejmującego u ludzi VEGF-A, VEGF-B i sprzężone VEGF-C-VEGF-D [1]. VEGF-A znajdujący się m.in. w śródbłonku jest niezbędny w embriogenezie. Ziarnistości alfa płytek również zawierają dużo VEGF-A (dokładnie 3 różne jego izoformy), który po stymulacji płytek jest uwalniany wraz w takimi białkami uczestniczącymi w hemostazie, jak fibrynogen, czynnik V i XIII, selektyna P i inne. Miejscowo uwalniany VEGF-A wiąże się

ze swoim receptorem na komórce śródbłonka, ostatecznie zwiększając przepuszczalność i proliferację śródbłonka oraz ekspresję białek nasilających fibrynoлизę (np. tkankowego aktywatora plazminogenu w śródbłonku), a także przeciwdziałając apoptozie poprzez wzmożoną ekspresję jej inhibitorów w komórkach śródbłonka [1]. Ponadto płytki wzmagają różnicowanie śródbłonkowych komórek progenitorowych w formy dojrzałe oraz migrację tych komórek do miejsc nasilonej angiogenezy.

Omówione w artykule Nachmana i Rafiiego niezwykle złożone mechanizmy kontrolujące dwukierunkowe interakcje między płytkami krwi a komórkami śródbłonka naczyniowego tłumaczą przynajmniej częściowo kilka znanych od lat, prostych obserwacji klinicznych. Po pierwsze, dlaczego u osób, u których szybko doszło do spadku liczby płytek, zwykle poniżej 20 000-30 000/mm<sup>3</sup> obserwuje się często wylewy podskórne, a nie tylko wybroczyny na skórze kończyn, tułowia, rzadziej twarzy oraz na błonach śluzowych jamy

ustnej? Takie zmniejszenie liczby płytek możemy zaobserwować u leczonych inhibitorami GpIIb/IIIa lub rzadziej jako niepożądane działanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych z nagłym przejściowym spadkiem nawet do wartości wręcz nieoznaczalnych. Ponadto, dlaczego u pacjentów leczonych kwasem acetylosalicylowym lub kłopidogrelem przy prawidłowej liczbie płytek we krwi może wystąpić tendencja do łatwego powstawania tzw. siniaków?

Obecnie uważa się, że znamy już przynajmniej jednego z winowajców. Niedobór trofogenów pochodzenia płytkowego, w tym VEGF-A, angiopoetyny 1, nabłonkowego czynnika wzrostu, powoduje dezintegrację kompleksu kadheryny odpowiedzialnego za ścisłe przyleganie komórek śródbłonka, najlepiej par excellence widoczną w drobnych pozawłośniczkowych żyłach skóry i błon śluzowych, szczególnie bogatych w te ścisłe połączenia. Upośledzona integralność śródbłonka prowadzi do wynaczynienia krwi i powstawania tego, co potocznie nazywamy siniakami.

Po drugie, dlaczego stosunkowo rzadko w ciężkiej trombocytopenii, a także w czasie podwójnej terapii przeciwpłytkowej obserwuje się krwawienia mózgowe? Włośniczki mózgu mają odmienny system transbłonowych białek zapewniający ścisłe połączenia międzykomórkowe, co znacznie ogranicza krwawienia do tkanki mózgowej nie związane z urazem lub wcześniejszym uszkodzeniem naczyń.

Różnorodność działań trofogenów na poziomie śródbłonka utrudnia wykorzystanie m.in. VEGF-A do celowanego działania. Czy możliwa jest zatem modulacja funkcji VEGF poprzez zachowanie jej działania proangiogenne, a wyłączenia funkcji polegającej na zwiększaniu przepuszczalności? W modelu mysim udało się wykazać, że hamowanie aktywności kinazy Src, regulującej funkcję kadheryny w różnych komórkach, zapobiega występowaniu obrzęków i upośledzeniu integralności śródbłonka pod wpływem VEGF [2]. A te procesy są nie tylko odpowiedzialne za często akceptowalne łatwe powstawanie siniaków, ale także znacznie groźniejsze powikłania niedokrwienia mięśnia sercowego, takie jak omdlenie, poreperfuzyjne zaburzenia rytmu, upośledzenie kurczliwości, a również powikłania udaru mózgu. Możliwość rozdzielenia różnych funkcji VEGF *in vivo* wydaje się ciekawą terapeutyczną opcją.

Dodatkowy aspekt praktyczny przedstawiony w artykule Nachmana i Rafiego dotyczy powikłań obserwowanych w czasie stosowania leków mogących modyfikować interakcje płytkowo-śródbłonkowe. Najlepszym przykładem są spostrzeżenia kliniczne związane z podawaniem bewacizumabu. Jest to humanizowane białko monoklonalne skierowane przeciwko VEGF podawane chorym na zaawansowanego raka jelita grubego, niedrobnokomórkowego raka płuca i raka piersi z przerzutami. Stosowanie bewacizumabu wiąże się u takich

pacjentów z chorobą nowotworową z poprawą przeżycia, ale jednocześnie zwiększa ryzyko powikłań zarówno zakrzepowych, jak i krwotocznych. Jak wskazuje artykuł redakcyjny niedawno opublikowany na łamach *European Heart Journal* [3], problem incydentów sercowo-naczyniowych u osób z chorobą nowotworową staje się również problemem kardiologicznym. Choć w praktyce w Polsce takich pacjentów jest niewiele, warto zapamiętać, że tak leczeni chorzy obciążeni zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym powinni stosować małą dawkę kwasu acetylosalicylowego, a w przypadku konieczności stentowania tętnicy wieńcowej bezpieczniejsze jest wszczepić stent metalowy, aby skrócić czas stosowania kłopidogrelu wobec zwiększonego zagrożenia krwawieniem. Ponadto warto wspomnieć nieporuszoną w artykule kwestię wpływu powszechnie stosowanych leków kardiologicznych, innych niż przeciwpłytkowe, na regulację uwalniania i działanie VEGF. Tu najlepszym przykładem są statyny o znanej dwoistej modulacji angiogenezy poprzez wpływ na VEGF – małe stężenia statyny nasilają angiogenezę, a wysokie ograniczają ten proces, niezależnie od ich działania hipolipemizującego [4]. Statyny w dawkach terapeutycznych mogą zmniejszyć uwalnianie VEGF z płytek krwi w miejscu uszkodzenia naczyń, podobnie jak innych białek zawartych w ziarnistościach alfa, w tym innego trofogeny, tj. płytkopochodnego czynnika wzrostu (platelet-derived growth factor, PDGF) [5]. Zmniejszone stężenia VEGF opisywano także we krwi krążącej w trakcie leczenia atorwastatyną [6]. Nie jest jasne jednak, na ile to zjawisko jest istotne dla lokalnych procesów wobec innego potężnego źródła VEGF, jakim jest śródbłonek naczyniowy. Jednak niewątpliwie leki zmieniające czynność płytek, poza swoim głównym działaniem mogą u pewnych osób przyczynić się do wystąpienia objawów przypisywanych zakłóconej równowadze między konstytutywnie działającymi trofogenami i ich receptorami na płytkach i śródbłonku.

Nie wolno także zapominać, że ingerencja w skomplikowaną sieć interakcji na poziomie śródbłonka, kierowanych przez substancje w większości działające angio- i mitogennie, może mieć inne konsekwencje wykraczające poza problem przepuszczalności śródbłonka i wybroczyn. VEGF i wiele innych cytokin i czynników wzrostu utrzymujących ciągłość ścian naczyniowych jest bowiem czynnikiem sprzyjającym rozwojowi miażdżycy [7].

Podsumowując, wiemy, że w warunkach fizjologicznych płytki zapewniają trwałość połączeń międzykomórkowych i „codzienną” integralność naczyń. Zmieniając ich czynność, możemy naruszyć tę delikatną równowagę, a chcąc wykorzystać wiedzę o trofogenach do jej naprawy, badacze muszą poznać ją znacznie lepiej, niż poznali dotąd, zatem na praktyczne implikacje dla kardiologów trzeba będzie naprawdę długo czekać.

## Piśmiennictwo

1. Neufeld G, Cohen I, Gengrinovitch S, Pótorak Z: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999, 13: 9-22.
2. Weis S, Shintani S, Weber A, et al.: Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest* 2004, 113: 885-894.
3. Pereg D, Lishner M: Bevacizumab treatment for cancer patients with cardiovascular disease: a double edged sword? *Eur Heart J* 2008, 29: 2325-2326.
4. Weiss M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP: Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* 2002, 105: 739-45.
5. Undas A, Celinska-Lowenhoff M, Stepień E, Nizankowski R, Tracz W, Szczeklik A: Effects of simvastatin on angiogenic growth factors released at the site of microvascular injury. *Thromb Haemost* 2006, 95: 1045-1047.
6. Alber HF, Dulak J, Frick M, et al.: Atorvastatin decreases vascular endothelial growth factor in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2002, 39: 1951-1955.
7. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, et al.: Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* 2001, 7: 425-429.