



VIA MEDICA

www.fn.viamedica.pl

Tomasz Stompór<sup>1</sup>, Kazimierz Ciechanowski<sup>2</sup>, Magdalena Durlik<sup>3</sup>, Jolanta Małyško<sup>4</sup>, Michał Nowicki<sup>5</sup>, Przemysław Rutkowski<sup>6, 7</sup>, Andrzej Więcek<sup>8</sup>, Bolesław Rutkowski<sup>7</sup><sup>1</sup>Klinika Nefrologii, Hipertensjologii i Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie<sup>2</sup>Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie<sup>3</sup>Klinika Medycyny Transplantacyjnej i Nefrologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny<sup>4</sup>Klinika Nadciśnienia Tętniczego, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku<sup>5</sup>Klinika Nefrologii, Hipertensjologii i Transplantologii Nerek, Uniwersytet Medyczny w Łodzi<sup>6</sup>Zakład Pielęgniarstwa Ogólnego, Gdański Uniwersytet Medyczny<sup>7</sup>Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Gdański Uniwersytet Medyczny<sup>8</sup>Katedra i Klinika Nefrologii, Endokrynologii i Chorób Przemiany Materii, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

# Agoniści receptora dla witaminy D — mechanizmy selektywności działania

## Agonists of vitamin D — mechanisms of action selectivity

### ABSTRACT

Vitamin D has long been considered not just a factor that controls calcium — phosphate homeostasis and bone metabolism. Discovering the role of vitamin D receptor (VDR) as a molecule that controls transcription of multiple genes that are entirely unrelated to the ‘classical’ action of vitamin D led to special attention paid on this compound as a potential drug for prophylaxis and treatment of cardiovascular disease, neoplasm, chronic nephropathies, autoimmune diseases and many others. Stimulating intestinal calcium absorption substantially limited the potential usefulness of ‘native’ calcitriol or its precursors in these potential, new indications; the use of this

drug can also be severely compromised even in patients with secondary (renal) hyperparathyroidism. An intensive research has been undertaken to overcome this limitation and to create substances which – having all expected positive functions of VDR ligands would not lead to increased calcium absorption (or such an absorption is significantly diminished). In this review principles of VDR molecular action after being liganded with different agonists (including those that do not lead to hypercalcemia) was discussed. Special attention has been paid to highlight the mechanisms of selectivity that characterize those new agents.

Forum Nefrologiczne 2012, vol. 5, no 1, 89–97

**Key words:** vitamin D, vitamin D receptor, vitamin D receptor agonists, paricalcitol

### WSTĘP

Witamina D od dawna już nie jest postrzegana wyłącznie jako substancja regulująca metabolizm wapnia i fosforu oraz odpowiedzialna za proces kościotworzenia. Wyniki badań podstawowych oraz gromadzonych doświadczeń klinicznych wskazują, że jest to hormon w istotny sposób wpływający na nieswoistą obronę przed zakażeniem przez drobnoustroje, promujący dojrzewanie i różnicowanie komórek, chroniący przed stresem oksydacyjnym, indukujący apoptozę komórek nowotworowych, odgrywający istotną rolę w regulacji ciśnienia

krwi, hamujący odpowiedź autoimmunologiczną i zmniejszający ryzyko rozwoju licznych chorób z autoagresji. Lista genów, których ekspresja znajduje się pod wpływem witaminy D, przekroczyła już 1000 i zapewne nie należy uznawać ją za zamkniętą. Wśród białek, których geny są „kontrolowane” przez receptor dla witaminy D (VDR, *vitamin D receptor*), znajdują się zatem zarówno te w sposób oczywisty związane z gospodarką mineralną i metabolizmem kości (np. osteopontyna, osteokalcyna, parathormon, transportery wapniowe TRPV5 i TRPV6, receptor RANK i jego ligand RANKL, fosfataza alkaliczna, kalbindyna,

### Adres do korespondencji:

dr hab. n. med. Tomasz Stompór,  
profesor UWM  
Katedra Chorób Wewnętrznych  
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego  
Oddział Nefrologii, Hipertensjologii  
i Chorób Wewnętrznych  
Wojewódzki Szpital Specjalistyczny  
ul. Żołnierska 18  
10–516 Olsztyn  
tel.: (89) 538 62 19  
faks: (89) 533 78 82  
e-mail: stompin@mp.pl

▶▶Plejotropowe działanie witaminy D jest przedmiotem ogromnego zainteresowania z punktu widzenia nowych zastosowań w terapii◀◀

1 $\alpha$ -hydroksylaza, 24-hydroksylaza 25-OH-D<sub>3</sub>), jak i związane z całkowicie odmiennymi procesami fizjologicznymi (np. składowe dopełniacza, hormon wzrostu, receptor dla insuliny, cytochrom P450 CYP3A4, czy wreszcie renina budząca w ostatnim czasie szczególne zainteresowanie jako hormon zależny od witaminy D) [1].

Plejotropowe działanie witaminy D jest przedmiotem ogromnego zainteresowania z punktu widzenia nowych zastosowań w terapii. W modelach doświadczalnych (*in vitro*, u zwierząt laboratoryjnych) udowodniono jej liczne, korzystne działania, między innymi w terapii chorób autoimmunologicznych (w tym: cukrzycy typu 1, stwardnienia rozsianego), nowotworów, chorób układu krążenia, nefropatii o różnym podłożu i innych. Jednak w stężeniach wywołujących pożądane efekty farmakologiczne w określonych wskazaniach witamina D lub jej aktywne postacie (alfa-kalcydol, kalcytriol) prowadzą do hiperkalcemii, która w praktyce często ogranicza lub uniemożliwia jej zastosowanie. Klasycznym przykładem takiego wskazania jest także wtórna nadczynność przytarczyc towarzysząca przewlekłej chorobie nerek — alfa-kalcydol i kalcytriol, będąc lekami niezwykle skutecznymi w hamowaniu syntezy parahormonu, muszą być nierzadko odstawione w trakcie terapii ze względu na wzrost stężenia wapnia i fosforanów wskutek wzrostu ich wchłaniania z przewodu pokarmowego albo wręcz nie mogą być zastosowane ze względu na już wyjściowo niepożądaną konstelację parametrów biochemicznych (hiperkalcemia z hiperfosfatemią przed rozpoczęciem terapii).

Z tego względu, zarówno w odniesieniu do terapii nadczynności przytarczyc, jak i leczenia innych chorób, podjęto prace nad poszukiwaniem substancji, które wskutek wielu modyfikacji „podstawowej” cząsteczki wywierają silniejsze (lub co najmniej jednakowe) efekty związane z „pożądanymi” skutkami aktywacji receptora dla witaminy D, działają jednak znacznie słabiej na proces wchłaniania wapnia i fosforanów z przewodu pokarmowego. W niniejszym artykule poglądowym opisano mechanizmy, poprzez które VDR sprawuje kontrolę nad transkrypcją i ekspresją różnych genów, oraz wyjaśniono selektywność działania agonistów tego receptora, pozwalającą na uzyskanie określonych efektów biologicznych przy minimalizacji niepożądanych efektów ubocznych. Liczba analogów, które badano lub bada się pod kątem zastosowania w terapii, przekroczyła 2 tysiące! Jest zadziwiające, że za-

ledwie kilka znalazło zastosowanie w praktyce klinicznej [2].

## MECHANIZMY DZIAŁANIA AGONISTÓW VDR

Analizując mechanizmy działania VDR i jego ligandów, nie sposób oprzeć się wrażeniu, że pewne substancje są najpierw rejestrowane i wprowadzane do terapii w jednym, konkretnym wskazaniu i są w tym celu stosowane przez wiele lat, a stopniowo odkrywa się i poznaje kolejne, wcześniej nieoczekiwane mechanizmy działania. W medycynie nie brakuje takich przykładów — tak było chociażby z inhibitorami enzymu konwertującego angiotensynę I, które „wymyślono” w celu leczenia nadciśnienia tętniczego, a później stopniowo poznawano nowe mechanizmy molekularne wyjaśniające początkowo zupełnie nieoczekiwane działanie kardio- czy nefroprotecyjne. Niemal identycznie stało się z parikalcytolem, agonistą VDR zarejestrowanym już kilkanaście lat temu w leczeniu wtórnej (nerkopochodnej) nadczynności przytarczyc, a obecnie badany jako lek nefro- i kardioprotekcyjny, hamujący białkomocz oraz proces twrdnienia kłębuszków i włóknienia śródmiąższowego, obniżający ciśnienie tętnicze czy ograniczający dynamikę patologicznej kalcyfikacji układu naczyniowego [3].

Pierwszym czynnikiem warunkującym sposób działania agonistów VDR jest siła ich wiązania ze specyficznym białkiem wiążącym (VDBP, *Vitamin D binding protein*) — im słabsze powinowactwo do białek transportujących, tym szybsza eliminacja substancji z osocza i tym mniej nasilony efekt kalcemizujący. Spośród „naturalnych” postaci witaminy D obecnych w osoczu siła wiązania z VDBP przedstawia się następująco: 25-(OH) D<sub>3</sub> > 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> > 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Spośród analogów witaminy D stosowanych w terapii, 22-oxa-kalcytriol wiąże się z VDBP aż 500 razy słabiej niż kalcytriol, podczas gdy siła wiązania parikalcytolu z białkiem transportującym jest tylko 3-krotnie słabsza. Białko wiążące witaminę D występuje w osoczu w znacznym nadmiarze, co powoduje że 99% pochodnych witaminy D w warunkach fizjologicznych znajduje się w postaci związanej — ma to istotne znaczenie w ochronie przed ich toksycznością. Nadmiar VDBP w warunkach fizjologicznych powoduje, że nawet w sytuacjach patologicznych, takich jak zespół nerczycowy czy choroby wątroby, frakcja wolnej (niezwiązanej z białkiem transportującym) witaminy D nie ulega istotnemu

zwiększeniu. Wpływ na systemowy efekt biologiczny witaminy D wywiera także megalina, niespecyficzny receptor obecny na luminalnej powierzchni komórek nerkowych cewek proksymalnych, pośredniczący w dostarczaniu witaminy związanej z VDBP i przesączonej do moczu pierwotnego do wnętrza tych komórek. Megalina — obok funkcji transportujących — ma także zdolność wiązania się z białkiem *Skip*, jednym z istotnych koaktywatorów VDR (patrz niżej), przez co w istotny sposób reguluje odpowiedź na aktywację VDR w komórkach cewki proksymalnej. Na losy 25-(OH)D<sub>3</sub> w cewkach proksymalnych wpływają także wewnątrzkomórkowe białka wiążące witaminę D (IDBP, *intracellular vitamin D binding proteins*); IDBP-3 „kieruje” 25-(OH)D<sub>3</sub> do mitochondriów, gdzie zachodzi jej hydroksylacja i bezpośrednio pobudza 1 $\alpha$ -hydroksylazę, podczas, gdy IDBP-1 stymuluje wiązanie się powstałego w wyniku tego procesu kalcytriolu z VDR [4, 5].

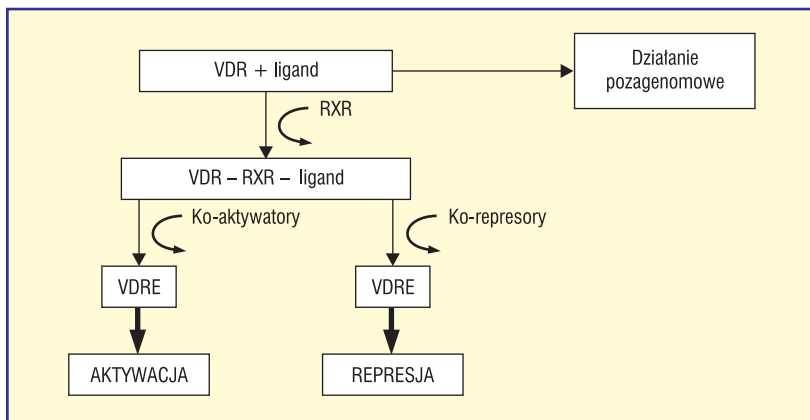
Receptor dla witaminy D pod wpływem wiązania się z ligandem łączy się z receptorem retinoidowym X (RXR, *retinoid X receptor*), a powstały w ten sposób heterodimer VDR — RXR przyłącza się do regionów odpowiedzi na witaminę D (VDRE, *vitamin D responsive elements*) szeregu genów. To z kolei jest możliwe dzięki indukcji odpowiedniej konformacji domeny wiążącej się z DNA (DBD, *DNA binding domain*), powodującej, że staje się ona komplementarna do określonych sekwencji nukleotydów w obrębie VDRE. Przypuszcza się, że VDRE różnych genów mogą się różnić — nie jest to zawsze uniwersalna sekwencja nukleotydów.

Do tego momentu sposób reagowania na dowolnego agonistę witaminy D wydaje się dość uniwersalny, chociaż każdy z agonistów ma nieco odmienne powinowactwo do VDR, na przykład 22-oxa-kalcytriol wiąże się z VDR 8 razy słabiej, parikalcytol — 3 razy słabiej, a 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> — aż 100 razy słabiej w porównaniu z 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Powinowactwo do ligandu nie decyduje wyłącznie o sile działania — w każdej komórce podlegają bowiem odmiennej ekspresji różne białka transportujące agonistę VDR do jądra (mechanizm, który opisano powyżej dla IDBP). Transport agonisty VDR wymaga między innymi elementów mikrotubularnych cytoszkieletu — zaburzenia funkcji struktur „motorycznych” w komórce mogą również spowodować brak zdolności do reakcji na witaminę D. Od momentu translokacji do jądra, uformowania heterodimeru

i połączenia z DNA dokonują się zdarzenia, które powodują odmienny wpływ na określone geny. Agonista VDR może dokonać aktywacji transkrypcji określonego genu (genami „prototypowymi” dla takiego typu odpowiedzi są geny dla osteokalcyny, osteopontyny czy 24-hydroksylazy witaminy D) albo zahamować ten proces (najbardziej klasycznym przykładem tego rodzaju odpowiedzi jest naturalnie gen dla parathormonu). Fragment VDR nazywany regionem aktywującym funkcję pod wpływem ligandu (*ligand-dependent activation function 2*, AF-2) po połączeniu z ligandem zmienia swą trójwymiarową strukturę. To z kolei pozwala na przyłączenie do heterodimeru VDR-RXR szeregu białek, które mogą pełnić rolę koaktywatorów lub korepresorów. Dopiero połączenie się z białkami należącymi do jednego z wymienionych rodzajów przesądza o ostatecznej odpowiedzi genu (VDRE) na witaminę D lub inne ligandy VDR. Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały, że w „repertuarze” koaktywatorów VDR znajdują się między innymi białka o aktywności polimeraz RNA oraz acetylotransferaz histonów. Ich współpraca pozwala na „rozluźnienie” chromatyny i „wyeksponowanie” określonej sekwencji DNA, a następnie — transkrypcję docelowego genu.

Z kolei w przypadku genów, których transkrypcja ustaje pod wpływem witaminy D, kompleks VDR-RXR-ligand łączy się z korepresorami; są to między innymi enzymy deacetylujące histony, co w konsekwencji uniemożliwia polimerazie RNA dostęp do określonych sekwencji DNA. Zagadnienie uległo dalszemu skomplikowaniu po odkryciu białek określanym mianem komodulatorów, które w zależności od rodzaju komórki mogą się zachowywać albo jak koaktywatory, albo jak korepresory [2, 3, 6–10]. Opisany mechanizm działania VDR w znacznym uproszczeniu przedstawiono na rycinie 1.

Typ ligandu, z jakim wiąże się VDR, w istotny sposób wpływa na to, z jakimi koaktywatorami (lub korepresorami) wiąże się heterodimer VDR-RXR, i tym samym jaki będzie ostateczny efekt działania takiego kompleksu. Wyniki badań eksperymentalnych wskazują, że VDR-RXR „rekrutuje” odmienne koaktywatory lub korepresory pod wpływem połączenia się z kalcytriolem, 22-oxa-kalcytriolem lub parikalcytolem. To z kolei może w istotny sposób wpływać na repertuar aktywowanych lub hamowanych przez ligand genów w określonych komórkach. O odmiennym wpływie na ekspre-



Rycina 1. Schemat mechanizmu działania VDR pod wpływem połączenia z agonistą

się różnych genów w różnych komórkach obszernej napisano poniżej [10, 11].

Jak wskazują Brown i wsp., na niektóre efekty biologiczne agonistów VDR wpływ może mieć także sposób ich podania. Podawanie krótkodziałających (słabo wiążących się z VDBP) leków w formie pulsów może bowiem wywoływać pożądany i przedłużony efekt biologiczny w tkankach docelowych (np. trwającą ponad 48 godzin po pojedynczym podaniu supresję przytarczyc) z przejściowym, krótkotrwałym i nieznacznym wzrostem stężenia wapnia w surowicy. Podawanie takiego samego preparatu w postaci przedłużonej infuzji może być natomiast mniej skuteczne z punktu widzenia supresji syntezy parathormonu, ale może w sposób przedłużony pobudzać wchłanianie wapnia z przewodu pokarmowego i resorpcję kości [11].

W podsumowaniu tej części rozważań warto dodać, że tworzenie heterodimeru VDR-RXR jest najważniejszą (i preferowaną) drogą, poprzez którą dokonuje się reakcja biologiczna na ligand VDR. Należy jednak pamiętać, że VDR może tworzyć homodimery VDR<sub>2</sub> oraz heterodimery z innymi receptorami jądrowym [np. receptorem dla kwasu retinowego (RAR, *retinoic acid receptor*)]. Z kolei agoniści receptora retinoidowego X mogą być ligandami „konkurującymi” o ten receptor i limitującymi jego dostępność do tworzenia heterodimeru VDR-RXR (powstaje wówczas heterodimer RAR-RXR, który łączy się z sekwencjami odpowiednich genów zależnych od pochodnych witaminy A (RARE, *retinoid acid responsible element*). Wiadomo na przykład, że kwas 9-*cis*-retinowy jest czynnikiem hamującym efekty biologiczne witaminy D i blokującym łączenie się heterodimeru VDR-RXR z VDRE [6, 7, 12]. Z drugiej strony, ostatnio wykazano, że

synteza nefryny w hodowlach podocytów jest indukowana dzięki jednoczesnemu działaniu kwasu retinowego i kalcytiolu. Rola „współpracy” między pochodnymi kwasu retinowego i witaminą A oraz heterodimeru VDR-RAR została udowodniona także w przypadku innych „klasycznych” genów regulowanych przez witaminę D, na przykład osteokalcyny [13].

## POZAGENOMOWE DZIAŁANIE WITAMINY D I INNYCH AGONISTÓW VDR

Wiele efektów biologicznych obserwowanych po podaniu witaminy D występuje zbyt szybko, aby mogła być za nie odpowiedzialna indukcja odpowiednich genów. Witamina D może na przykład wywoływać natychmiastowy wpływ na zawartość wapnia w poszczególnych kompartmentach komórkowych, regulować ilość fosfoinozytolu i cGMP w cytoplazmie, wpływać na czynność kanałów błonowych, metabolizm prostaglandyn, katabolizm lipidów błon komórkowych i wiele innych. Kalcytriol ma także zdolność aktywacji takich enzymów obecnych w cytoplazmie, jak: kinaza białkowa C, kinaza Ras, kinaza aktywowana mitogennem (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) i sfingomielinaza [14].

Działaniem pozagenomowym jest też wpływ ligandów VDR na szlak pośredniczony przez Wnt i  $\beta$ -kateninę. Wnt to grupa białek regulatorowych, odpowiedzialnych za kontrolę licznych procesów fizjologicznych i patologicznych w ustroju, w tym między innymi embriogenezy i nowotworzenia, natomiast  $\beta$ -katenina, obok udziału w utrzymaniu prawidłowej struktury połączeń międzykomórkowych i regulacji czynności cytoszkieletu, może także pełnić rolę czynnika transkrypcyjnego. W pracach eksperymentalnych wykazano, że parikalcytol ma zdolność indukcji ekspresji mRNA dla nefryny i podocyny oraz syntezy białek, a także hamowania ekspresji genów i syntezy cytokin pozapalnych (RANTES, TNF $\alpha$ ), działających profibrotycznie czynników wzrostowych (CTGF, TGF $\beta$ ) oraz białek macierzy pozakomórkowej (kolagen typu I i III oraz fibronektyna) właśnie poprzez blokadę szlaku sygnałowego Wnk/ $\beta$ -kateniny w modelu nefropatii adriamycynowej. Efektom tym towarzyszy spadek białkomoczu i redukcja stopnia nasilenia histologicznych wykładników uszkodzenia nerek [15]. Odkrycia te mają kluczowe znaczenie w wyjaśnieniu mechanizmów nefroprotektynego działania tego leku, które stają się ostatnio szczególnie atrakcyjnym przedmiotem

►► Wnt to grupa białek regulatorowych, odpowiedzialnych za kontrolę licznych procesów fizjologicznych i patologicznych w ustroju ◀◀

badania nie tylko eksperymentalnych, ale także klinicznych.

Oczywiście staje się więc istnienie pozajądrowego receptora (receptorów) dla witaminy D. Jednym z najlepiej zidentyfikowanych receptorów tego typu jest związany z błoną, odpowiedzialny za szybką odpowiedź receptor wiążący steroidy (1,25-D<sub>3</sub>-MARRS, *membrane-associated rapid-response steroid-binding protein*). Niektóre efekty biologiczne witaminy D (np. wpływ na zawartość wapnia w komórce) zdołano także zablokować przeciwciałami przeciwko aneksynie II — stąd to właśnie białko (odpowiedzialne m.in. za procesy endo- i egzocytozy oraz „zarządzanie” strukturą błon komórkowych) uznano za jeden z pozajądrowych receptorów dla witaminy D. Wreszcie, do wielu „natychmiastowych” efektów witaminy D nie dochodzi przy braku „klasycznej” formy VDR, a sam VDR identyfikowano w bogatych w kaweole obszarach cytoplazmy — oznacza to, że VDR może pośredniczyć w wielu efektach związanych z pozagenomowym działaniem witaminy D. Ponadto, to co dokonuje się w obrębie błony komórkowej i cytoplazmie pod wpływem witaminy D, w istotny sposób modyfikuje ostateczny efekt genomowy, dodatkowo komplikując jeszcze opisaną powyżej interakcję: ligand–VDR–RXR–VDRE–komodulatory [4, 14].

### **SELEKTYWNOŚĆ DZIAŁANIA AGONISTÓW VDR NA POZIOMIE KOMÓRKI**

Współczesne techniki badawcze pozwalają na dalszą identyfikację różnic w działaniu i selektywności efektów biologicznych poszczególnych agonistów VDR w różnych typach komórek. Zastosowanie technik analizy mikromacierzy pozwoliło na przykład na stwierdzenie, że pod wpływem kalcytriolu i parikalcytolu dochodziło do istotnej zmiany w ekspresji 176 genów w komórkach mięśniówki gładkiej naczyń wieńcowych: w przypadku kalcytriolu 116 genów ulegało większej, a 60 — mniejszej ekspresji, podczas gdy w przypadku parikalcytolu było to odpowiednio 115 i 61 genów. „Repertuar” genów aktywowanych lub inaktywowanych pod wpływem działania obu substancji był niemal identyczny. Pozwala to zatem stwierdzić, że pozbawienie parikalcytolu niekorzystnego działania hiperkalcemizującego pozwala zachować tej substancji wszystkie „fizjologiczne” działania witaminy D (w menu genów regulowanych przez obie substancje aktywne znajdowały się geny dla wielu białek

regulujących wzrost komórek mięśniówki gładkiej, proces krzepnięcia i fibrylizacji oraz regenerację śródbłonna) [16].

Ta sama grupa autorów przebadła ostatnio wpływ tych samych ligandów VDR (kalcytriolu i parikalcytolu) na ekspresję niektórych genów w kardiomiocytach. Dodatkowo autorzy poddali ocenie modyfikujący wpływ aldosteronu na odpowiedź komórek na odpowiednie ligandy. W pracy wykazano, że aldosteron w istotny sposób zmniejszał lub wręcz całkowicie znosił ekspresję VDR oraz w istotny sposób redukował ekspresję mRNA dla tego receptora. Dodatkowo kalcytriolu i parikalcytolu pozwoliło jednak nawet w obecności aldosteronu w dużych stężeniach odtworzyć zawartość VDR w komórkach — efekt ten był w przypadku obu ligandów proporcjonalny do ich dawki (stężenia) i bardzo podobny. Aldosteron w tym samym eksperymencie nie obniżał jednak zawartości mRNA dla CYP24A1, czyli 25-(OH)D<sub>3</sub>-24-hydroksylazy, enzymu kluczowego w procesie inaktywacji agonistów VDR (ekspresja ta była w warunkach podstawowych i po dodaniu aldosteronu niska). Oba badane ligandy w identyczny sposób indukowały mRNA dla CYP24A1 w obecności aldosteronu. Receptor dla witaminy D jest jednym z istotnych czynników kontrolujących ekspresję genu dla czynnika natriuretycznego pochodzenia mózgowego (BNP, *brain natriuretic peptide*). W tym samym eksperymencie stwierdzono, że aldosteron podwyższał ponad 4-krotnie zawartość mRNA dla BNP w kardiomiocytach. Kalcytriol i parikalcytol okazały się natomiast jednakowo skutecznymi, silnymi inhibitorami zwiększonej ekspresji mRNA dla BNP w obecności aldosteronu [17]. Te i inne dane eksperymentalne świadczą, że parikalcytol zachowuje wiele właściwości „naturalnej” witaminy D, których lek ten nie utracił przy modyfikacji pozwalającej na zniesienie wpływu hiperkalcemizującego.

Interesujące, że taka zgodność pomiędzy agonistami VDR nie zawsze jest pełna i — co ważne — bardziej korzystna w przypadku parikalcytolu. Ekspresja mRNA dla reniny w nerkach zwierząt eksperymentalnych pojawiała się w przypadku parikalcytolu przy stężeniach 10-krotnie wyższych niż niezbędne do wywołania efektu supresyjnego na przytarczyce, przy czym zarówno w tym, jak i w wyższych stężeniach leku nasilał się efekt supresyjny w stosunku do reniny przy braku efektu hiperkalcemizującego. W przypadku kalcytriolu stężenie hormonu również musiało wzrosnąć 10-krot-

nie ponad to, które prowadziło do supresji transkrypcji mRNA dla PTH, aby zahamować ekspresję mRNA dla reniny. Jednak wraz z dalszym wzrostem stężenia kalcytriolu siła hamowania ekspresji reniny zmniejszała się, natomiast efekt hiperkalcemizujący narastał. Mogłoby to sugerować, że sama hiperkalcemia jest czynnikiem modyfikującym ekspresję mRNA dla reniny pod wpływem pobudzenia VDR [18]. Te i inne dane eksperymentalne wskazują, że przy odmiennym efekcie kalce-micznym działanie parikalcytolu na syntezę re-niny i parathormonu jest podobne, jak w przy-padku kalcytriolu [19].

Wyniki przełomowych prac eksperymentalnych przeprowadzonych przez grupę Slatopolsky'ego [20] wykazały, że podanie pojedynczej dawki 100 ng parikalcytolu zwierzęciu laboratoryjnemu z mocnicą powodowało wzrost kalcemii odpowiadający podaniu 10 ng kalcytriolu. Dalsze zwiększanie pojedynczej dawki do 1 µg powodowało istotny wzrost stę-żenia wapnia. W przewlekłym podawaniu leku obserwowano natomiast proporcjonalną do dawki supresję wydzielania parathoromonu i zmniejszenie ekspresji mRNA dla pre-pro-PTH w przedziale 8–75 ng/dawkę przy braku wpływu na wchłanianie wapnia lub fosforanów z przewodu pokarmowego. Kalcytriol wykazywał identyczny potencjał w hamowaniu syntez-y PTH, natomiast towarzyszył temu istotny wzrost wchłaniania wapnia z przewodu pokar-mowego. Pod wpływem wzrastających dawek kalcytriolu dochodziło do wzrostu ekspresji VDR w jelicie, podczas gdy zjawisko takie nie zachodziło pod wpływem parikalcytolu, co można byłoby uznać za swego rodzaju „odczu-lanie” enterocytów na działanie omawianego analogu [20, 21]. Wyniki tych badań w sposób jednoznaczny wskazują na odmienny (selek-tywny) wpływ parikalcytolu na komórki jelit i przytarczyc.

Proces transportu wapnia w jelicie składa się z co najmniej 3 istotnych etapów. Są to: pobór wapnia przez kanał wapniowy TRPV6 (*calcium transport channel*), określane także mianem *epithelial calcium channel 2*, ECaC2), transport transcelularny wapnia między biegunem lu-minalnym i bazolateralnym przez kalbindynę D9K (*vitamin D-dependent calcium binding protein*) oraz oddanie jonów wapnia do mi-krokążeńa dzięki aktywnemu transportowi pośredniczonymu przez PMCA1 (*plasma membrane calcium ATP-se*) na biegunie bazo-lateralnym. Kalbindyna oraz błonowy kanał wapniowy TRPV6 są genami „docelowymi”

dla VDR. Zależny od witaminy D wzrost re-sorpcji jelitowej wapnia i hiperkalcemia zale-żą od znacznego wzrostu ekspresji kalbindy-ny i TRPV6 w komórkach śluzówki jelit. Pod wpływem kalcytriolu obserwuje się także wy-rażnie wzmożony „pasaż” wapnia między bło-ną luminalną i bazolateralną [2, 22]. Parikalcy-tol (19-nor-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>), w przeciwieństwie do 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, nie powoduje wzrostu trans-portu transcelularnego wapnia w komórkach jelit. Pod wpływem parikalcytolu nie obserwu-je się także wzrostu ekspresji mRNA dla kal-bindyny (ściślej — ekspresja taka pojawia się, natomiast jest ona 10-krotnie słabiej wyrażona niż w przypadku podania 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>). Pari-kalcytol zwiększa natomiast ekspresję mRNA dla TRPV6, jednak słabiej w stosunku do 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> i 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; żadna z wymie-nionych substancji nie ma natomiast wpływu na ekspresję mRNA dla PMCA1. Można byłoby zatem podsumować, że kluczowa z punktu wi-dzenia zapobiegania hiperkalcemii przez pari-kalcytol jest zdolność do hamowania transportu wapnia przez kalbindynę wskutek braku istot-nej indukcji transkrypcji genu dla tego białka w komórkach jelita (oraz – w mniejszym stop-niu – słabsza indukcja syntezy TRPV6). W wie-lu wcześniejszych badaniach sugerowano, że ten właśnie etap jest krytyczny z punktu widzenia tempa wchłaniania wapnia w jelicie [22].

## **INNE CZYNNIKI MODYFIKUJĄCE ODPOWIEŹ NA LIGANDY VDR**

Opisane powyżej zagadnienia w najmniej-szym stopniu nie wyczerpują złożoności me-chanizmów regulujących ostateczny sposób odpowiedzi biologicznej na „natywną” wita-minę D lub inne ligandy VDR. Jednym z bar-dzo istotnych zagadnień są na przykład liczne polimorfizmy VDR oraz jego potranslacyjna modyfikacja. Zidentyfikowano liczne warianty VDR, które powodują, że pomimo prawidłowej jego zawartości w komórkach, dochodzi do objawów oporności na witaminę D [4]. Innym ciekawym zjawiskiem są stany chorobowe warunkujące ostateczny efekt biologiczny ligan-du. Oporność na działanie witaminy D jest zjawiskiem znanym powszechnie nefrologom, natomiast badania podstawowe pozwalają na wyjaśnienie molekularnego podłoża tego zjawiska. Okazało się między innymi, że w za-awansowanej mocnicy dochodzi do bardzo istotnej redukcji zawartości receptora RXR w komórkach. Toksyny mocnicowe (ultrafil-trat osocza mocnicowego) prowadzą do upo-

śledzenia interakcji między heterodimerem VDR-RXR a VDRE. Kalretikulina, białko gromadzące się między innymi w komórkach przytarczyc w mocznicy, ma zdolność wiązania wielu receptorów jądrowych, w tym także kompleksu VDR-RXR. Jednym z mechanizmów indukujących wzrost zawartości kalretikuliny jest hipokalcemia [6].

Szczególną rolę w modyfikowaniu efektów biologicznych pobudzenia VDR odgrywają fosforany. Jedną z wiodących badaczek mechanizmów działania witaminy D, Ruth Wu-Wong z laboratoriów *Amgen* w Illinois, stwierdziła, że *spectrum* genów, których ekspresja ulega modyfikacji pod wpływem parikalcytolu w różnych typach komórek, istotnie zależy od stężenia fosforanów. I tak, w komórkach mięśniówki gładkiej naczyń parikalcytol zwiększał ekspresję mRNA dla trombomoduliny ponad 3-krotnie przy niskim (0,9 mmol/l) stężeniu fosforanów w środowisku, natomiast ekspresja mRNA dla tego białka pod wpływem leku znacząco spadała przy wzroście zawartości fosforanów do 2,06 mmol/l. Samo tylko zwiększanie fosforanów nie miało znacznego wpływu na ekspresję mRNA dla tego białka. Z kolei parikalcytol w znaczący sposób hamował ekspresję mRNA dla trombospodiny 1 w niskim stężeniu fosforanów, natomiast efekt supresyjny leku znacząco zmniejszał się (choć nadal zauważalny) przy zwiększaniu ich stężenia. Lek zmniejszał ekspresję mRNA dla inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu typu pierwszego (PAI-1, *plasminogen activator inhibitor type 1*) przy niskim stężeniu fosforanów, lecz w tym przypadku zwiększanie ich zawartości w środowisku pozostawało bez wpływu na supresyjne działanie parikalcytolu na ten gen. Wzrost stężenia fosforanów nie miał także wpływu na indukcję lub hamowanie przez parikalcytol ekspresji genów dla białka macierzy Gla, kolagenu typu 1 i fosfatazy alkalicznej, natomiast zmniejszał wpływ leku na gen dla osteopontyny. Zastosowanie technik analizy mikromacierzy pozwoliło na wykazanie, że w niskim stężeniu fosforanów parikalcytol aktywuje 195 genów i hamuje 130. Przy zwiększeniu stężenia fosforanów lek zachowuje natomiast wpływ na 86 (z których aktywuje 55 i hamuje 31). Produkty wielu z tych genów (lub klasterów genów) pełnią zasadniczą rolę w regulacji procesów krzepnięcia i fibrylizacji, syntezy macierzy pozakomórkowej i eikozanoidów, aktywności stresu oksydacyjnego i innych. Z punktu widzenia badań

nad rolą witaminy D w rozwoju chorób serca i naczyń szczególnie ciekawe jest stwierdzenie, że w komórkach zwierzęcych przypominających komórki aparatu przykłębuszkowego parikalcytol istotnie hamował ekspresję genu dla reniny przy stężeniu fosforanów 0,9 mmol/l. Zwiększenie stężenia fosforanów w środowisku do 2,06 mmol/l nie znosiło jednak hamującego wpływu parikalcytolu na reninę. W podsumowaniu tych obserwacji można stwierdzić, że zmieniające się stężenie fosforanów może w istotnym stopniu modyfikować aktywujący lub hamujący wpływ leku na szereg genów, co w niektórych przypadkach może pozwolić na zachowanie, a niektórych na zniesienie jego efektów farmakologicznych [23].

Hamujący wpływ na interakcję kompleksu VDR-RXR z genomem może wywierać ponadto wiele cytokin, które według współczesnej teorii mocznic odgrywają kluczową rolę w rozwoju szeregu jej powikłań narządowych [6].

Obok opisanych wyżej licznych efektów, witaminie D przypisano ostatnio dodatkową jeszcze, odrębną właściwość, jaką jest rola „sensora” komórkowego dla kwasów żółciowych. Okazało się, że kwas lithocholowy i wiele pochodnych kwasów żółciowych ma zdolność aktywacji receptora dla witaminy D (są to tzw. niesekosteroidowe ligandy VDR, dla odróżnienia od ligandów sekosteroidowych; terminem „sekosteroidy” określa się substancje mające strukturę steroidową, jednak z „pękniętym” pierścieniem B — jak w przypadku witaminy D). Oznacza to, że kwasy żółciowe mogą również wpływać na ostateczną odpowiedź komórki na ligandy VDR. Kwasy żółciowe wiążą się z VDR w innym miejscu receptora niż kalcytriol i prowadzą do odmiennych zmian konformacyjnych w jego obrębie. Aktywacji VDR przez kwasy żółciowe nie towarzyszy efekt kalcemiczny. Zależność fizjologiczna pomiędzy kwasami żółciowymi i efektami metabolicznymi VDR, w tym zwłaszcza równowagą mineralną, nie została jednoznacznie określona, poza znanym od dziesięcioleci ich istotnym wpływem na wchłanianie witaminy D. Ponieważ jednak kwasy żółciowe są uznawane powszechnie za związki silnie toksyczne, najprawdopodobniej VDR pośredniczy w procesach obrony przed ich efektami niepożądanymi [2, 24].

Czynniki wpływające na ostateczną odpowiedź w postaci transkrypcji mRNA dla określonego genu pod wpływem VDR przedstawiono w tabeli 1.

**Tabela 1.** Mechanizmy działania receptora dla witaminy D warunkujące rodzaj działania, siłę odpowiedzi i selektywność jego agonistów

Droga podania ligandu
Powinowactwo ligandu do osoczowych białek transportujących
Powinowactwo ligandu do wewnątrzkomórkowych białek transportujących
Powinowactwo ligandu do VDR
Rodzaj powstających pod wpływem ligandu heterodimerów VDR (lub homodimeru VDR <sub>2</sub> ); proporcje pomiędzy powstającymi typami heterodimerów/homodimerem
„Konkurencja” o VDR — dostępność innych agonistów VDR w komórce
„Konkurencja” o RXR i RAR, wpływająca na proporcje pomiędzy heterodimerami VDR-RXR/VDR-RAR/RXR-RAR
Wpływ ligandu na aktywację genu dla VDR i indukcję ekspresji VDR
Rodzaj koregulatorów przyłączanych do kompleksu VDR–RXR–ligand
Podatność ligandu na inaktywację (np. przez CYP24A1)
Siła i rodzaj działań pozagenomowych ligandu
Stopień ekspresji czynników modulujących czynność kompleksu VDR–RXR–ligand (np. hipo- i hiperkalcemia, hipo- i hiperfosfatemia, cytokiny prozapalne, toksyny mocznicowe)

## PODSUMOWANIE

Lektura źródeł omawiających mechanizmy działania witaminy D jest zajęciem pasjonującym. Nie sposób jednak oprzeć się wrażeniu, że ta wyjątkowo skomplikowana wiedza, którą zarówno w poprzednim [25], jak i w tym artykule autorzy starali się przybliżyć Czytelnikowi „Forum Nefrologicznego”, to tysiące puzzli, które zdołano odkryć i poznać, jednak właściwa układanka składa się z dziesiątków lub setek tysięcy. Przykładem takiej nieznannej części układanki jest na przykład zdolność aktywowania przez witaminę D ekspresji genów, które w ogóle nie posiadają VDRE. Niezwykle ciekawy i nieco paradoksalny jest również fakt, iż w wiodących światowych laboratoriach tworzy się nowe substancje lecznicze, które wprowadza się do terapii i wykorzystuje przez wiele lat, a jednocześnie przez cały ten czas kontynuuje się wysiłki, aby w pełni poznać mechanizmy ich działania (tak, jak dzieje się to w przypadku parikalcytolu).

## STRESZCZENIE

Witamina D od dawna nie jest traktowana jedynie jako czynnik odpowiedzialny za homeostazę wapnia i fosforu oraz metabolizm kości. Odkrycie, że receptor dla witaminy D (VDR) kontroluje transkrypcję wielu genów całkowicie niemających związku z „klasycznym” pojmowanym działaniem witaminy D, spowodowało, że substancja ta znalazła się w centrum zainteresowania także w profilaktyce i leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego, nowotworów, przewlekłych nefropatii, chorób o podłożu autoimmunologicznym i wielu innych. Pobudzenie wchłaniania wapnia przez kalcytriol nie pozwala jednak zastosować witaminy D lub jej prekursorów nie tylko w wymienionych, nowych wskazaniach. Przydatność tych form leku jest także ograniczona

u pacjentów z wtórną (nerkopochodną) nadczynnością przytarczyc. Z tego względu rozpoczęto intensywne badania nad analogami witaminy D, które, pozostając agonistami VDR w większości swoich pożądanym działaniach, nie prowadzą jednak do wzrostu wchłaniania wapnia z przewodu pokarmowego lub ich efekt w tym zakresie jest znacznie zredukowany. W pracy przedstawiono zarys mechanizmów działania VDR pod wpływem połączenia z różnymi ligandami, w tym niehiperkalcemizującymi analogami witaminy D, oraz omówiono niektóre czynniki regulujące ten niezwykle złożony proces. Szczególną uwagę poświęcono proponowanym mechanizmom selektywności działania nowych agonistów VDR.

**Forum Nefrologiczne 2012, tom 5, nr 1, 89–97**

**Słowa kluczowe:** witamina D, receptor dla witaminy D, agonści receptora witaminy D, parikalcytol

## Piśmiennictwo

1. Stompór T. Plejotropowe działania witaminy D i jej analogów. W: Więcek A., Kokot F. (red.). Postępy w nefrologii i nadciśnieniu tętniczym. Tom VI. Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, Kraków 2007: 63–76.
2. Choi M., Makishima M. Therapeutic applications for novel non-hypercalcemic vitamin D receptor ligands. *Expert Opin. Ther. Patents* 2009; 19: 593–606.
3. Brancaccio D., Bommer J., Coyne D. Vitamin D receptor activator selectivity in the treatment of secondary hyperparathyroidism. Understanding the differences among therapies. *Drugs* 2007; 67: 1981–1998.
4. Dusso A.S., Brown A.J., Slatopolsky E. Vitamin D. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2005; 289: F8–F28.
5. Nykjaer A., Dragun D., Walther D. i wsp. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D<sub>3</sub>. *Cell* 1999; 96: 507–515.
6. Dusso A.S., Tadhani R., Slatopolsky E. Vitamin D receptor and analogues. *Semin. Nephrol.* 2004; 24: 10–16.



7. Haussler M.R., Haussler C.A., Jurutka P.W. i wsp. The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *J. Endocrin.* 1997; 154: S57–S73.
8. Haussler M.R., Jurutka P.W., Hsieh J.C. i wsp. New understanding of the molecular mechanism of receptor-mediated genomic actions of the vitamin D hormone. *Bone* 1997; 17 (supl.): 33S–38S.
9. Polly P., Herdick M., Moehren U. i wsp. VDR- Alien: a novel, DNA- selective vitamin D<sub>3</sub> receptor-corepressor partnership. *FAESB J.* 2000; 14: 1455–1463.
10. Issa L.L., Leong G.M., Sutherland R.L. i wsp. Vitamin D analogue-specific recruitment of vitamin D receptor co-activators. *J. Bone Mineral. Res.* 2002; 17: 879–890.
11. Brown A.J., Dusso A.S., Slatopolsky E. Vitamin D analogues for secondary hyperparathyroidism. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002; 17 (supl. 10): 10–19.
12. Sato M., Lu J., Iturria S. i wsp. A non-secosteroidal vitamin D receptor ligand with improved therapeutic window of bone efficacy over hypercalcemia. *J. Bone Mineral. Res.* 2010; 25: 1326–1336.
13. Okamura M., Takano Y., Saito Y. i wsp. Induction of nephrin gene expression by selective cooperation of the retinoid acid receptor and the vitamin D receptor. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009; 24: 3006–3012.
14. Gniadecki R. Nongenomic signaling by vitamin D. A new face of *Scr.* *Biochem. Pharmacol.* 1998; 56: 1273–1277.
15. He W., Kang Y.S., Dai C., Liu Y. Blockade of Wnt/β-catenin signaling by paricalcitol ameliorates proteinuria and kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2011; 22: 90–103.
16. Wu-Wong J.R., Nakane M., Ma J. i wsp. Effects of vitamin D analogs on gene expression profiling in human coronary artery smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2006; 186: 20–28.
17. Wu-Wong J.R., Chen W.W., Nakane M., Wolf M. Differential effects of vitamin D receptor agonists on gene expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Drug Ther.* 2011; 25: 215–222.
18. Fryer R.M., Rakestraw P.A., Nakane M. i wsp. Differential inhibition of renin mRNA expression by paricalcitol and calcitriol in C57/BL6 mice. *Nephron. Physiol.* 2007; 106: 76–81.
19. Andress D. Nonclassical aspects of differential vitamin D receptor activation: implications for survival in patients with chronic kidney disease. *Drugs* 2007; 67: 1999–2012.
20. Slatopolsky E., Finch J., Ritter C., Takahashi F. Effect of 19-nor-1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, a new analogue of calcitriol, on secondary hyperparathyroidism in uremic rats. *Am. J. Kidney Dis.* 1998; 32 (supl. 2): S40–S47.
21. Takahashi F., Finch J.L., Denda M. i wsp. A new analogue of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 19-nor-1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, suppresses serum PTH and parathyroid gland growth in uremic rats without elevation of intestinal vitamin D receptor content. *Am. J. Kidney Dis.* 1997; 30: 105–112.
22. Nakane M., Ma J., Rose A.E. i wsp. Differential effects of vitamin D analogs on calcium transport. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2007; 1003: 84–89.
23. Wu-Wong J.R., Nakane M., Ma J. i wsp. Elevated phosphorus modulates Vitamin D receptor-mediated gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2007; 293: F1592–1604.
24. Ishizawa M., Matsunawa M., Adachi R. i wsp. Litcholic acid derivatives act as selective vitamin D receptor modulators without inducing hypercalcemia. *J. Lipid. Res.* 2008; 49: 763–772.
25. Rutkowski P., Małyszko J., Stompór T. i wsp. Witamina D — komu, jaka i dlaczego? *Forum Nefrologiczne* 2011, 4: 356–361.