

Ewa Koc-Żórawska, *Jolanta Małyszko, Jacek Małyszko, Michał Myśliwiec

VAP-1 u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek oraz cukrzycową chorobą nerek**

VAP-1 in chronic kidney disease and diabetic kidney disease

Klinika Nefrologii i Transplantologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Michał Myśliwiec

Streszczenie

VAP-1 (naczyniowa cząsteczka adhezyjna-1 – ang. *vascular adhesion protein-1*) to glikoproteina o podwójnej roli, pełni funkcję cząsteczki adhezyjnej oraz aminooksydazy wrażliwej na semikarbazyd. Jest on wydzielany przez szereg komórek np. śródbłonna, mięśniówki gładkiej naczyń czy adipocytów. Wykazano, iż stężenie VAP-1 wzrasta w hiperglikemii oraz w przewlekłej chorobie nerek.

Celem obecnej pracy była ocena stężenia VAP-1 oraz renalazy, która jest wydzielana przez podobne komórki i ma posiadać własności monoaminooksydazy, u pacjentów dializowanych otrzewnowo w zależności od współistnienia cukrzycy.

Ponadto oceniano inne markery uszkodzenia śródbłonna: czynnik von Willebranda i cząsteczki adhezyjne: P and E-selektyny, ICAM i VCAM, CD40L, CD44, CD146 oraz wybrane parametry układu hemostazy kompleksy trombina-antitrombina-TAT, fragmenty protrombiny 1+2, kompleksy plazmina-antyplazmina PAP, tkankowy aktywator plazminogenu-tPA i jego inhibitor-PAI-1, oraz VAP-1 i renalazę przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów. Pacjenci z nefropatią cukrzycową mieli istotnie wyższe stężenie VAP-1 i CD146, zaś niższe renalazy niż pacjenci bez nefropatii cukrzycowej. VAP-1 w analizie jednoczynnikowej, korelował z czasem dializ, obecnością cukrzycy, liczbą płytek krwi, stężeniem CD146, zaś stężenie renalazy z obecnością cukrzycy, CD40L i PAP. W analizie wieloczynnikowej predyktorem VAP-1 była tylko obecność cukrzycy.

Podsumowując, stężenie VAP-1 jest zależne od obecności cukrzycy w grupie pacjentów dializowanych otrzewnowo. Biorąc pod uwagę specyfikę dializy otrzewnowej, podwyższone stężenie VAP-1 i markerów uszkodzenia śródbłonna może przyczynić się do szybszego rozwoju miażdżycy w tej szczególnej populacji.

Słowa kluczowe: dializa otrzewnowa, śródbłonek, cukrzyca, VAP-1

Summary

VAP-1 (vascular adhesion protein-1) is a copper-containing SSAO (semi-carbazide sensitive amine oxidase) with dual function. It is secreted by vascular smooth muscle cells, adipocytes, and endothelial cells with functional monoamine oxidase activity. VAP-1 is elevated in hyperglycemia and chronic kidney disease.

The aim of the study was to assess VAP-1 levels and its correlations with renalase, which possesses possible monoamine oxidase activity, in patients on peritoneal dialyses in regard to the presence of diabetes.

We assessed adhesion molecules: P and E-selectins, ICAM i VCAM, CD40L, CD44, CD146 and some hemostatic parameters thrombin-antithrombin complexes-TAT, prothrombin fragments 1+2, plasmin-antiplasmin complexes PAP, tissue plasminogen activator-tPA and its inhibitor-PAI-1, VAP-1 and renalase with commercially available assays. Diabetic patients had higher VAP-1 and CD146 levels but lower renalase than non-diabetic subjects. In univariate analysis VAP-1 was related to time on dialyses, presence of diabetes, platelet count, CD146, and renalase was related to presence of diabetes, CD40L and PAP. In multivariate analysis, predictor of VAP-1 was only the presence of diabetes.

Concluding, VAP-1, elevated in patients on peritoneal dialyses was predominantly dependent the presence of diabetes, both factors associated with endothelial damage and promoting cardiovascular complications. Taking into consideration the principle of peritoneal dialysis, elevated VAP-1 and markers of endothelial cell damage might contribute to the enhanced progression of atherosclerosis in this population.

Key words: peritoneal dialysis, endothelium, diabetes, VAP-1

**Praca częściowo finansowana z grantu Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego (grant edukacyjny firmy Baxter).

WSTĘP

VAP-1 (naczyniowa cząsteczka adhezyjna-1 – ang. *vascular adhesion protein-1*) jest glikoproteiną o masie 170-180 kDa, która pośredniczy w przyłączaniu limfocytów do śródbłonka naczyniowego (1). Dwie identyczne podjednostki są połączone z sobą wiązaniami dwusiarczkowymi (1). Jest to białko przez błonowe zbudowane z 764 aminokwasów, z krótką N-końcową częścią cytoplazmatyczną, pojedynczą domeną transbłonową i dużą pozakomórkową domeną C-końcową (2). Każda podjednostka ma sześć miejsc N-glikozylacji (3). Łańcuchy N-glikozydowe VAP-1, różniące się między sobą w zależności od tkanki, w której występują, zawierają na końcu kwas sialowy. Zróżnicowanie poszczególnych łańcuchów N-glikozydowych VAP-1 może sugerować ich odmienną funkcję (4). Zewnątrzkomórkowa domena VAP-1 zawierająca w swym centrum aktywnym atom miedzi wykazująca aktywność SSAO (aminooksydaz wrażliwych na semikarbazyd – ang. *semicarbazide-sensitive amine oxidase*) (5). Białko to katalizuje dwuetapową reakcję deaminacji oksydacyjnej grup aminowych do aldehydów z wytworzeniem nadtlenu wodoru oraz amoniaku (6). Powoduje to ochronę organizmu przed endo- i egzogennymi aminami. Postać rozpuszczalna VAP-1 (soluble VAP-1 – sVAP-1) występuje fizjologicznie w surowicy osób zdrowych. U chorych z przewlekłą chorobą nerek czy cukrzycą wszechobecne jest uszkodzenie śródbłonka i upośledzenie odporności (7). W naszej poprzedniej pracy wykazaliśmy korelacje pomiędzy renalazą, mającą posiadać własności monoaminooksydazy (8), a VAP-1 w populacji chorych po zabiegu transplantacji nerki (9). Nie stwierdzono takich korelacji u chorych hemodializowanych (10). Mając powyższe na uwadze za cel pracy przyjęto ocenę stężenia VAP-1 w surowicy pacjentów z cukrzycową chorobą nerek oraz przewlekłą chorobą nerek o innej etiologii dializowanych otrzewnowo.

PACJENCI I METODY

Badania zostały przeprowadzone na grupie 60 chorych z przewlekłą chorobą nerek, w tym 18 chorych z nefropatią cukrzycową jako przyczyną schyłkowej niewydolności nerek, dializowanych otrzewnowo. Do badania zakwalifikowano pacjentów spełniających następujące kryteria: stabilny stan kliniczny, brak powikłań zakrzepowych, czy jawnego klinicznie stanu zapalnego (białko C-reaktywne w granicach normy tj. poniżej 6 mg/L), brak przetoczeń krwi w ostatnich 2 miesiącach oraz leków wpływających na układ hemostazy w ciągu ostatnich 2 tygodni przed badaniem. Pacjenci byli poinformowani o celu badań i wyrazili świadomą zgodę. Krew była pobierana rano, przy okazji wizyty kontrolnej, a próbki przechowywane w temperaturze -70°C do czasu oznaczeń. Oceniano aktywność trombiny (kompleksy trombina-antitrombina-TAT, Enzygnost TAT micro, DadeBehring, Niemcy, fragmenty protrombiny 1+2, Enzygnost F1+2 micro, DadeBehring, Niemcy), stopień generacji plazminy (kompleksy plazmina-antyplazmina PAP, Enzygnost PAP micro, DadeBehring, Niemcy)

przy użyciu gotowych zestawów. Markery uszkodzenia śródbłonka – czynnik von Willebranda i cząsteczki adhezyjne: P and E-selektyny, oraz ICAM i VCAM oceniano przy pomocy zestawów firmy American Diagnostica, USA, i R&D Systems, Quantikine, UK, odpowiednio. Rozpuszczalny CD40L, CD44 były oceniane przy pomocy zestawów firmy Bender, MedSystem, Austria a CD146 Biocytex, Marseille, Francja. Tkankowy aktywator plazminogenu-tPA i jego inhibitor-PAI-1 przy użyciu gotowych zestawów firmy Bioopol, Umea, Sweden. Renalaza była oceniana metodą ELISA przy pomocy zestawów firmy USCN Life Sci.China a VAP-1 BioVendor, Modrice, Czechy. Stężenie hemoglobiny, liczbę płytek krwi, fibrynogenu, gospodarkę lipidową, stężenie albumin, białka całkowitego badano standardowymi metodami laboratoryjnymi. Dane analizowano przy pomocy programu statystycznego Statistica 10.0 PL, stosując odpowiednie testy statystyczne (test rank Mann-Whitney lub test t-Studenta) przyjmując $p < 0,05$ jako istotne statystycznie. Korelacje oceniano przy pomocy współczynników Pearsona lub Spearmana.

WYNIKI

Podstawowe parametry kliniczne i biochemiczne przedstawiono w tabeli 1. Pacjenci z nefropatią cukrzycową byli starsi niż chorzy dializowani otrzewnowo z innych przyczyn. W tabeli 2 zawarte zostały wyniki oznaczeń wybranych parametrów układu hemostazy i funkcji śródbłonka. Pacjenci z nefropatią cukrzycową mieli istotnie wyższe stężenie VAP-1 i CD146, zaś niższe renalazy niż pacjenci bez nefropatii cukrzycowej. VAP-1, w analizie jednoczynnikowej, korelował z czasem dializ ($r = 0,29$, $p < 0,05$), obecnością cukrzycy ($r = 0,30$, $p < 0,05$), liczbą płytek krwi ($r = -0,48$, $p < 0,01$), stężeniem CD146 ($r = -0,50$, $p < 0,001$), zaś stężenie renalazy z obecnością cukrzycy ($r = -0,33$, $p < 0,05$), CD40L ($r = -0,36$, $p < 0,05$) i PAP ($r = -0,37$, $p < 0,05$). W analizie wieloczynnikowej predyktorem VAP-1 była obecność cukrzycy wyjaśniając 82% zmienności tego parametru (wartość beta wynosiła 0,82, $p = 0,047$).

Tabela 1. Kliniczne i biochemiczne parametry badanej populacji w zależności od współistnienia cukrzycy.

	DM (+) (n = 18)	DM (-) (n=42)
Wiek (lata)	58,56 ± 11,56	49,79 ± 15,95*
Czas dializ (miesiące)	23,33 ± 14,96	17,86 ± 15,95
Hemoglobina (g/dL)	11,47 ± 1,04	10,58 ± 1,55
Liczba płytek krwi (x10 ⁶ /μL)	287,14 ± 82,44	208,19 ± 80,16*
Cholesterol (mg/dL)	196,71 ± 47,75	226,14 ± 50,12
HDL (mg/dL)	40,25 ± 6,13	43,08 ± 9,71
LDL (mg/L)	117,00 ± 31,70	142,00 ± 26,07
Triglicerydy (mg/dL)	157,86 ± 67,22	146,57 ± 59,60
Fibrynogen (mg/L)	318,13 ± 125,36	416,43 ± 109,06
Albumina (g/dL)	3,57 ± 0,43	3,17 ± 0,61
Białko całkowite (g/dL)	6,50 ± 0,69	6,09 ± 0,88

Wartości przedstawione to średnie ± SD, * $p < 0,05$

Tabela 2. Parametry układu hemostazy i markery uszkodzenia śródbłonna w badanej populacji.

	DM (+) (n = 18)	DM (-) (n = 42)
Renalaza (ng/mL)	17,60 ± 7,74	25,23 ± 11,18*
VAP-1 (ng/mL)	361,42 ± 229,61	268,56 ± 83,47*
CD44 (ng/mL)	1116,83 ± 200,54	1138,07 ± 213,81
CD40L (ng/mL)	0,75 ± 0,51	0,71 ± 0,43
CD146 (ng/mL)	628,83 ± 141,67	542,05 ± 118,04*
P-selektyna (ng/mL)	52,24 ± 47,49	37,80 ± 36,28
E-selektyna (ng/mL)	64,28 ± 29,55	59,87 ± 31,77
ICAM (ng/ml)	277,50 ± 71,60	224,52 ± 111,89
VCAM (ng/mL)	1685,00 ± 661,86	1596,19 ± 709,67
vWF (%)	138,84 ± 16,91	132,07 ± 20,28
tPA (ng/ml)	15,40 ± 8,94	14,38 ± 7,24
PAI (ng/ml)	14,38 ± 4,96	12,95 ± 3,43
F 1+2 (nM/l)	3,17 ± 2,66	3,17 ± 1,39
TAT (μg/l)	2 (1; 6)	2 (1; 6)
PAP (μg/l)	366,5 (49; 864)	290,5 (35; 592)

Wartości podane to średnie ± SD lub mediana oraz pierwszy i ostatni kwartyl, *p < 0,05

DYSKUSJA

W grupie chorych dializowanych otrzewnowo VAP-1 był istotnie wyższy u pacjentów z cukrzycą, podobnie jak stężenie CD146, cząsteczki adhezyjnej związanej ze śródbłonkiem. Predyktorem stężenia VAP-1 w populacji chorych dializowanych otrzewnowo była obecność cukrzycy. CD146 jest nową cząsteczką adhezyjną zlokalizowaną na złączu komórek śródbłonna (11). Znajduje się ona na wszystkich komórkach śródbłonna niezależnie od położenia anatomicznego, czy wielkości naczynia (11). Ponadto, wzrost stężenia CD146 obserwuje się w komórkach HUVEC poddanych działaniu prozapalnych cytokin (12), co sugeruje aktywację komórek śródbłonna. Bardin i wsp. (13) opisali wzrost stężenia CD146 w różnych patologich związanych z uszkodzeniem śródbłonna, m.in. w przewlekłej niewydolności nerek leczonej zachowawczo. **W badaniach własnych wykazano zaburzenia hemostazy i funkcji śródbłonna u chorych dializowanych i z przewlekłą niewydolnością nerek (14, 15), oraz powiązania CD146 z dysfunkcją śródbłonna u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek (16) oraz po transplantacji nerki (17).** W populacji chorych po zabiegu transplantacji nerki VAP-1 korelował ze stężeniem renalazy (9), a ta ostatnia z markerami uszkodzenia śródbłonna (18). Natomiast w analizie wieloczynni-

kowej predyktorami stężenia VAP-1 była funkcja nerek oraz stężenie CD146 w populacji chorych po transplantacji nerki (9). Wynikać to może z faktu, iż VAP-1 ma podwójną rolę jako cząsteczka adhezyjna oraz aminooksydaza wrażliwa na semikarbazyd. Podobnie renalaza, która zdaniem Xu i wsp. (8) ma aktywność monoaminooksydazy, aczkolwiek w tej kwestii istnieje wiele kontrowersji (19). VAP-1 jest wydzielany przez różne komórki, np. mięśni gładkich naczyń, śródbłonna czy adipocyty, podobnie jak renalaza. VAP-1 może brać udział w procesie zapalnym, ponadto, jak pokazały badania na hodowlach komórkowych, metaloproteinazy mogą uwalniać VAP-1 z adipocytów, i ten proces może być nasilony w warunkach hiperglikemii (20). W poprzednio opublikowanych pracach, w populacji chorych hemodializowanych pacjenci z cukrzycą mieli istotnie wyższe stężenia VAP-1 niż chorzy bez cukrzycy, natomiast wartości renalazy były podobne (10). W analizie jednoczynnikowej stężenie VAP-1 korelowało z obecnością cukrzycy, natomiast w analizie wieloczynnikowej predyktorem VAP-1 było stężenie fibrynogenu i frakcja wyrzutowa. W poprzednich badaniach Li i wsp. (21) wykazali zależność pomiędzy stężeniem VAP-1 i funkcją nerek u osób z przewlekłą chorobą nerek w stadium 2 i 3 w porównaniu do osób bez przewlekłej choroby nerek. VAP-1 korelował ujemnie z oszacowanym przesączaniem kłębuszkowym (21). W dodatku ta sama grupa badaczy wykazała, iż VAP-1 był istotnie wyższy u osób z ostrą i przewlekłą hiperglikemią oraz z cukrzycą. W grupie chorych dializowanych otrzewnowo, cały czas stosowane są płyny zawierające glukozę, zatem pacjenci są narażeni stale na przewlekłą hiperglikemię. Z praktycznego punktu widzenia, przy stałej obecności płynu w jamie otrzewnej, oceniana glikemia nie jest w rzeczywistości glikemią na czczo. Oceniając stężenie VAP-1 po podaniu glukozy, zaobserwowali oni korelację tej cząsteczki z markerami stresu oksydacyjnego, grubością kompleksu intima-media, stężeniem produktów końcowej glikacji białek, czyli wykładnikami miażdżycy (22). **Ponadto, po raz pierwszy wykazano, że VAP-1 jest predyktorem zgonu z powodu sercowo-naczyniowego u osób z cukrzycą typu 2 (23).**

Podsumowując, stężenie VAP-1 jest zależne od obecności cukrzycy w grupie pacjentów dializowanych otrzewnowo. Biorąc pod uwagę specyfikę dializy otrzewnowej, podwyższone stężenie VAP-1 i markerów uszkodzenia śródbłonna może przyczyniać się do szybszego rozwoju miażdżycy w tej szczególnej populacji.

PIŚMIENNICTWO

1. Salmi M, Tohka S, Jalkanen S: Human vascular adhesion protein-1 (VAP-1) plays critical role in lymphocyte-endothelial cell adhesion cascade under shear. *Circ Res* 2000; 86: 1245-1251.
2. Salmi M, Jalkanen S: VAP-1: an adhesin and an enzyme. *Trends Immunol* 2001; 22: 211-216.
3. Salminen TA, Smith DJ, Jalkanen S, Johnson MS: Structural model of the catalytic domain of an enzyme with cell adhesion activity: human vascular adhesion protein-1 (HVAP-1) D4 domain is an amine oxidase. *Protein Eng* 1998; 11: 1195-1204.

4. Jaakkola K, Kaunismaki K, Tohka S et al.: Human vascular adhesion protein-1 in smooth muscle cells. *Am J Pathol* 1999; 155: 1953-1965.
5. Smith DJ, Salmi M, Bono P et al.: Cloning of vascular adhesion protein-1 reveals a novel multifunctional adhesion molecule. *J Exp Med* 1998; 188: 17-27.
6. Lyles GA: Mammalian plasma and tissue-bound semicarbazide-sensitive amine oxidases: biochemical, pharmacological and toxicological aspects. *Int J BiochemCell Bio* 1996; 28: 259-274.
7. Małyszko J: Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 1412-1420.
8. Xu J, Li G, Wang P, Velazquez H et al.: Renalase is a novel, soluble monoamine oxidase that regulates cardiac function and blood pressure. *J Clin Invest* 2005; 115: 1275-1280.
9. Koc-Żórawska E, Małyszko J, Małyszko JS, Myśliwiec M: VAP-1, a novel molecule linked to endothelial damage and kidney function in kidney allograft recipients. *Kidney Blood Pressure Res* 2012; 36: 242-247.
10. Koc-Żórawska E, Małyszko J, Zbroch E et al.: VAP-1 and renalase in regard to diabetes in hemodialyzed patients. *Arch Med Sci* 2012; 8: 1048-1052.
11. Bardin N, Frances V, Lesaule G et al.: Identification of the S-Endo 1 endothelial-associated antigen. *BiochemBiophys Res Commun* 1996; 218: 210-216.
12. Bardin N, George F, Mutin M et al.: S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen. *Tissue Antigens* 1996; 548: 531-539.
13. Bardin N, Moal V, Anfossio F et al.: Soluble CD146, a novel endothelial marker, is increased in physiopathological settings linked to endothelial junctional alteration. *Thromb Haemost* 2003; 11: 285-291.
14. Małyszko J, Małyszko JS, Myśliwiec M: Comparison of hemostatic disturbances between patients on CAPD and HD. *Perit Dial Int* 2001; 21: 158-165.
15. Małyszko J, Małyszko JS, Myśliwiec M: Endothelial cell injury markers in chronic renal failure on conservative treatment and continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *Kidney Blood Press Res* 2004; 27: 71-77.
16. Małyszko J, Małyszko JS, Wolczyński S et al.: Adiponectin is related to CD146, a novel marker of endothelial cell activation/injury in chronic renal failure and peritoneally dialyzed patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4620-4627.
17. Małyszko J, Małyszko JS, Brzosko S et al.: Markers of endothelial cell activation/injury: CD146 and thrombomodulin are related to adiponectin in kidney allograft recipients. *Am J Nephrol* 2005; 25: 203-210.
18. Zbroch E, Małyszko J, Małyszko J et al.: Renalase, kidney function and markers of endothelial dysfunction in renal transplant recipients. *Pol Arch Med Wewn* 2012; 122: 174-179.
19. Małyszko J, Małyszko JS, Mikhailidis DP et al.: Hypertension and kidney disease: is renalase a new player or an innocent bystander? *J Hypertens* 2012; 30: 457-462.
20. Li HY, Wei JN, Lin MS et al.: Serum vascular adhesion protein-1 is increased in acute and chronic hyperglycemia. *Clin Chim Acta* 2009; 404: 149-153.
21. Lin MS, Li HY, Wei JN et al.: Serum vascular adhesion protein-1 is higher in subjects with early stages of chronic kidney disease. *Clin Biochem* 2008; 41: 1362-1367.
22. Li HY, Lin MS, Wei JN et al.: Change of serum vascular adhesion protein-1 after glucose loading correlates to carotid intima-medial thickness in non-diabetic subjects. *Clin Chim Acta* 2009; 403: 97-101.
23. Li HY, Jiang YD, Chang TJ et al.: Serum vascular adhesion protein-1 predicts 10-year cardiovascular and cancer mortality in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 2011; 60: 993-999.

otrzymano/received: 04.01.2013
zaakceptowano/accepted: 15.02.2013

Adres/address:
*Jolanta Małyszko
Klinika Nefrologii i Transplantologii
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
ul. Żurawia 14, 15-540 Białystok
tel.: +48 (85) 740-94-64
e-mail: jolmal@poczta.onet.pl