

**Received:** 2007.05.22  
**Accepted:** 2007.09.11  
**Published:** 2007.09.28

## Molekularne aspekty nefrotoksyczności antybiotyków aminoglikozydowych

### Molecular aspects of aminoglycoside nephrotoxicity

**Bogusława Konopska, Maria Warwas**

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej we Wrocławiu

#### Streszczenie

Antybiotyki aminoglikozydowe to związki bakteriobójcze działające szczególnie skutecznie na bakterie Gram-ujemne. W niniejszym opracowaniu przedstawiono molekularny mechanizm nefrotoksyczności tych antybiotyków. Endocytoza kierowana receptorami odgrywa istotną rolę w gromadzeniu się aminoglikozydów w kanalikach proksymalnych nerek, dlatego opisano biochemiczne właściwości dwóch głównych receptorów biorących udział w tym procesie, tj. megaliny i kubiliny. Przytoczono ponadto dane literaturowe dotyczące zapobiegania nefrotoksyczności wywołanej aminoglikozydami z wykorzystaniem m.in. agonistów megaliny i fosfolipidów.

**Słowa kluczowe:**

**aminoglikozydy • nefrotoksyczność • megalina • zasadowe peptydy**

#### Summary

Aminoglycosides are potent bactericidal antibiotics particularly active against aerobic Gram-negative bacteria. This review focuses on the recent concept of a molecular understanding of aminoglycoside-induced nephrotoxicity. As receptor-mediated endocytosis plays an important role in the accumulation of aminoglycosides in renal proximal tubules, the biochemical properties of the two main receptors, megalin and cubilin, involved in this process are described. Literature data on megalin and acidic phospholipids as potential targets for preventing aminoglycoside-induced nephrotoxicity are also presented.

**Key words:**

**aminoglycoside • nephrotoxicity • megalin • basic peptides**

**Full-text PDF:**

[http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_61/11280.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/11280.pdf)

**Word count:**

3473

**Tables:**

2

**Figures:**

–

**References:**

36

**Adres autora:**

prof. dr hab. Maria Warwas, Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej AM, ul. Szewska 38/39, 50-139 Wrocław; e-mail: warwas@biochfarm.am.wroc.pl

## CHARAKTERYSTYKA CHEMICZNA AMINOGLIKOZYDÓW

Antybiotyki aminoglikozydowe należą do niskocząsteczkowych związków chemicznych, których charakterystyczną cechą jest obecność aminocukrów połączonych wiązaniem glikozydowym z pierścieniem heksozy, najczęściej w postaci streptominy, streptydyny lub 2-deoksystreptominy. Jedynie spektynomycyna, uważana za aminoglikozyd, nie zawiera w swej budowie aminocukru. Większość aminoglikozydów to naturalnie występujące substancje wytwarzane przez promieniowce z rodzaju *Streptomyces* oraz *Micromonospora*. Półsyntetyczne pochodne z rodzaju *Streptomyces*, takie jak: amikacyna, netilmycyna, dibekacyna, isepamycyna oraz arbekacyna, mają końcówki -cyna, podczas gdy oryginalne pochodne z rodzaju *Micromonospora* mają końcówki -mycyna, np. neomycyna, tobramycyna, paromomycyna.

W zależności od położenia wiązań glikozydowych w obrębie cząsteczki, wyróżnia się trzy podstawowe grupy:

- grupę streptomycyny, zawierającą streptydynę (streptomycyna i spektynomycyna);
- grupę neomycyny, 4,5-dipodstawione pochodne 2-deoksystreptominy (neomycyna, paromomycyna);
- grupę kanamycyny, 4,6-dipodstawione pochodne 2-deoksystreptominy, do których należą najbardziej użyteczne klinicznie gentamycyna, tobramycyna, amikacyna oraz netilmycyna [21].

Pośród jedenastu dostępnych aminoglikozydów, najczęściej stosuje się gentamycynę, tobramycynę, netilmycynę i amikacynę.

Cząsteczki aminoglikozydów są silnie spolaryzowane i mają dodatni ładunek elektryczny. Charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, względnie słabą rozpuszczalnością w lipidach i silniejszą aktywnością przeciwdrobnoustrojową w środowisku zasadowym. W rezultacie aminoglikozydy są wchłaniane z jelit w stopniu minimalnym i słabo dyfundują przez barierę krew-mózg [10].

Przeciwbakteryjne właściwości aminoglikozydów wynikają ze struktury chemicznej. Dzięki dużemu dodatniemu ładunkowi łatwo wiążą się z ujemnie naładowanymi lipopolisacharydami ścian komórek bakteryjnych oraz różnymi wewnątrzkomórkowymi i błonowymi cząsteczkami o charakterze anionów, takimi jak DNA, RNA i fosfolipidy [13].

## MECHANIZM I ZAKRES DZIAŁANIA

Główny mechanizm działania aminoglikozydów polega na zaburzeniu translacji przez trwałe wiązanie się z podjednostką 30S rybosomu bakteryjnego lub/i wiązaniu się z białkami rybosomalnymi, co skutkuje śmiercią komórki. Wśród innych sposobów działania przeciwbakteryjnego tych leków wymienia się dezintegrację błony komórkowej i wzrost jej przepuszczalności dla jonów, zaburzenie syntezy DNA i RNA w komórce. Zasadniczym etapem poprzedzającym wiązanie antybiotyku z rybosomem jest aktywny transport leku do komórki bakteryjnej, zależny od tlenu i energii. Transport ten jest zahamowany w warunkach beztlenowych i przy niskim pH. Wychwył aminoglikozydów przez drobnoustroje, zwłaszcza przez Gram-dodatnie zia-

renkowce, ulega nasileniu w obecności związków zaburzających syntezę bakteryjnej ściany komórkowej, tj. antybiotyków beta-laktamowych i wankomycyny. Działanie przeciwbakteryjne aminoglikozydów zależy od ich stężenia w ognisku zakażenia i jest tym silniejsze, im większe stężenie leku. Ponadto aminoglikozydy wywierają tzw. efekt poantybiotykowy - działanie bakteriobójcze utrzymuje się nawet wtedy, gdy stężenie leku w surowicy spada poniżej minimalnego stężenia hamującego [13].

Wszystkie aminoglikozydy mają podobny zakres aktywności, obejmujący przede wszystkim tlenowe pałeczki Gram-ujemne. Są również aktywne wobec niektórych szczepów *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* i *M. tuberculosis*. Nie zwalczają zakażeń bakteriami beztlenowymi. Niewielka aktywność wobec ziarenkowców Gram-dodatnich sprawia, że aminoglikozydy muszą być zazwyczaj kojarzone z innymi antybiotykami, najczęściej beta-laktamami. Skojarzenie takie potęguje działanie bakteriobójcze wobec ziarenkowców Gram-dodatnich, w tym *Enterococcus*, zmniejsza częstość selekcji szczepów opornych oraz zapewnia zwiększenie aktywności przeciwbakteryjnej wobec bakterii Gram-ujemnych, zwłaszcza *Pseudomonas aeruginosa*, gronkowców oraz niektórych prątków. Antybiotyki aminoglikozydowe są powszechnie stosowane do leczenia ciężkich zakażeń bakteriami Gram-ujemnymi. Dotyczy to zwłaszcza infekcji szpitalnych, posocznicy, zakażeń będących powikłaniem rozległych oparzeń i zakażeń układowych. Streptomycyna stosowana jest w leczeniu tularemii, gruźlicy, czy dżumy; gentamycyna, amikacyna i netilmycyna w zapaleniu płuc i sepsie; paromomycyna w czerwonicy bakteryjnej; spektynomycyna w rzeżączce, a neomycyna w leczeniu ran, oparzeń, owrzodzeń i dermatoz [10].

W porównaniu z antybiotykami beta-laktamowymi aminoglikozydy mają znacznie węższy zakres działania, ale rzadziej indukują oporność wśród bakterii. Istnieją 3 główne mechanizmy oporności na aminoglikozydy:

- zmniejszenie powinowactwa podjednostki 30S rybosomu do antybiotyku (najczęściej na skutek mutacji bakteryjnego DNA), ale także 16S rRNA oraz białek rybosomalnych;
- zmniejszenie transportu antybiotyku do wnętrza komórki bakteryjnej na skutek uruchomienia pompy usuwającej lek (dotyczy to przede wszystkim gronkowców i pałeczek z rodzaju *Pseudomonas*);
- modyfikacja aminoglikozydów przez enzymy kodowane plazmidowo.

Najczęstszym i najważniejszym mechanizmem oporności jest enzymatyczna modyfikacja antybiotyku. Biorą w niej udział trzy acetylotransferazy, cztery adenylotransferazy i pięć fosfotransferaz. Enzymy te wykazują swoistość substratową, a ich geny są często umiejscowione na plazmidach; dzięki temu możliwe jest nabywanie oporności na aminoglikozyd przez drobnoustroje. Niektóre z tych genów występują również na transpozonach i integronach, czego skutkiem jest szybkie rozprzestrzenianie się ich na poziomie cząsteczkowym. Gentamycyna i tobramycyna podlegają działaniu przynajmniej kilku enzymów, co często powoduje oporność krzyżową bakterii na te leki. Netilmycyna jest modyfikowana przez cztery enzymy, natomiast amikacyna tylko przez jeden, dzięki czemu wykazuje aktywność wobec wielu gentamycynoopornych pałeczek z ro-

dziny *Enterobacteriaceae* oraz wielu opornych szczepów *P. aeruginosa* [13].

#### FARMAKOKINETYKA I METABOLIZM

Poszczególne aminoglikozydy mają wiele wspólnych właściwości farmakokinetycznych. Związki te w niewielkim stopniu wiążą się z białkami osocza i bardzo słabo wchłaniają się z przewodu pokarmowego, dlatego w celu zapewnienia odpowiedniego stężenia we krwi należy je podawać pozajelitowo. Po takim podaniu objętość dystrybucji aminoglikozydów odpowiada w przybliżeniu wielkości przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Zmiana objętości płynu zewnątrzkomórkowego (np. w przypadku odwodnienia, zastoinowej niewydolności serca lub wodobrzucha) prowadzi do zmiany objętości dystrybucji antybiotyku i wówczas bywa konieczna modyfikacja dawkowania. Ze względu na spolaryzowaną strukturę cząsteczki aminoglikozydy słabo przenikają przez błony biologiczne i stosowane ogólnie osiągają małe stężenie we wnętrzu komórek. Stosunkowo dobrze przenikają do tkanki kostnej, płynu maziowego i otrzewnej. Nie należy podawać tych antybiotyków dzieciom poniżej 3 roku życia i osobom powyżej 65 lat, a także przy niewydolności nerek i wątroby, upośledzeniu słuchu, niedrożności jelit i w ciąży. Nie należy też powtarzać terapii aminoglikozydem w krótkim odstępie czasu [10].

Aminoglikozydy są szybko wydalane z ustroju, głównie w wyniku filtracji kłębuszkowej. U osób dorosłych z prawidłową czynnością nerek okres biologicznego półtrwania aminoglikozydów we krwi wynosi około 2 godziny, istnieją jednak bardzo duże różnice osobnicze. Spożycie pokarmów bogatobiałkowych zwiększa klirens tych leków. Okres biologicznego półtrwania ulega wydłużeniu wraz z pogarszaniem się czynności nerek, a w schyłkowej niewydolności nerek może przekraczać 24 godziny. Natomiast stężenie tych antybiotyków w moczu osób z prawidłową czynnością nerek znacznie (nawet 100-krotnie) przekracza stężenie w surowicy [10]. W celu zminimalizowania działania toksycznego przy leczeniu antybiotykami aminoglikozydowymi wymagana jest kontrola funkcji nerek, polegająca na oznaczaniu wielkości przesączania kłębuszkowego (GFR – glomerular filtration rate), aktywności enzymów lizosomalnych i enzymów rąbka szczoteczkiowego w moczu [23].

Zalety terapii antybiotykami aminoglikozydowymi to: szybkie działanie bakteriobójcze, względnie niski koszt leczenia, stabilność przy przechowywaniu, szeroki zakres działania, brak reakcji uczulających i synergizm z innymi antybiotykami. Do wad zaliczyć można: złe wchłanianie po podaniu doustnym, nieaktywność wobec bakterii bez-tlenowych, wąski indeks terapeutyczny i stosunkowo dużą toksyczność [13].

#### OBJAWY KLINICZNE I MORFOLOGICZNE NEFROTOKSYCZNOŚCI ANTYBIOTYKÓW AMINOGLIKOZYDOWYCH

Dodatni ładunek aminoglikozydów w warunkach fizjologicznego pH jest także źródłem ich toksyczności, którą podzielić można na ciężką (ototoksyczność przedsionkowa i słuchowa, nefrotoksyczność, hamowanie przewodnictwa nerwowo-mięśniowego) i łagodną (gorączka pole-

kowa, osutka). W przeciwieństwie do nefrotoksyczności, skutki działania ototoksycznego (zarówno uszkodzenie narządu przedsionkowego, jak i ślimaka) są nieodwracalne. Dokładny mechanizm ototoksyczności opisany jest w pracach przeglądowych [24,29]. Blokada przewodnictwa nerwowo-mięśniowego jest rzadkim, ale poważnym powikłaniem, występującym niemal wyłącznie w wyniku płukania otrzewnej roztworem zawierającym dużą dawkę antybiotyku lub w następstwie szybkiej iniekcji dożylniej [1]. W niniejszym opracowaniu ograniczymy się do nefrotoksyczności.

Jak już wcześniej wspomniano, aminoglikozydy słabo wiążą się z białkami krwi i łatwo ulegają przesączaniu kłębuszkowemu, wskutek czego są wydalane z organizmu w niezmienionej postaci. Większość antybiotyku podanego dożylnie jest wydzielana do moczu, przy jednoczesnej wybiórczej kumulacji leku w korze nerki (około 10% dawki). Ze względu na różny stopień gromadzenia się aminoglikozydów w nerkach, ich siła toksycznego działania jest różna i przedstawia się następująco: neomycyna > paramomycyna > gentamycyna > amikacyna = kanamycyna > tobramycyna > netilmycyna. Streptomycyna rzadko powoduje uszkodzenie nerek [23]. Wiele badań *in vivo* i *in vitro* poświęcono na zbadanie mechanizmu wchłaniania zwrotnego aminoglikozydów w nerkach oraz wyjaśnienie molekularnych podstaw ich nefrotoksyczności. Początkowo sądzono, że za wiązanie antybiotyków aminoglikozydowych do nabłonka kanalików proksymalnych są odpowiedzialne głównie kwaśne fosfolipidy obecne w błonie komórkowej, tzn. kwas fosfatydowy, fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforan, fosfatydyloinozytolo-4-monofosforan i fosfatydyloseryna [27]. Jednakże powszechność występowania fosfolipidów, stanowiących główny składnik błon biologicznych, w zestawieniu z niemal wybiórczą kumulacją aminoglikozydów w komórkach nabłonka kanalikowego nerki wskazywał na udział innych czynników w tym procesie. Obecnie podkreśla się dużą rolę megaliny, receptora rodziny LDL, w metabolizmie zasadowych antybiotyków w nerkach [16,20]. Po związaniu przez megalinę aminoglikozydy trafiają do wnętrza komórek nabłonka kanalików nerkowego, gdzie ulegają fuzji z lizosomami. W silnie kwaśnym środowisku lizosomu aminoglikozydy ulegają uprotonowaniu, uzyskując duże powinowactwo do ujemnie naładowanych struktur komórkowych. We wnętrzu lizosomów obecne są także liczne fragmenty błon komórkowych pochodzące z procesu fagocytozy. Kwaśne fosfolipidy błonowe, po związaniu przez antybiotyki aminoglikozydowe, tracą zdolność płynnego przemieszczania się w błonie i tworzą agregaty, co powoduje obniżenie aktywności fosfolipaz. Konsekwencją zahamowania fosfolipaz w lizosomach jest fosfolipiduria i fosfolipidoza. Obecność antybiotyku w komórkach nabłonka kanalików proksymalnych nerki prowadzi do zmian strukturalnych oraz upośledzenia funkcjonowania błon komórkowych, mitochondriów i lizosomów. Przy niewielkich dawkach wczesne zmiany obejmują gromadzenie się fosfolipidów w lizosomach, zahamowanie aktywności enzymów lizosomalnych, zmniejszenie wchłaniania zwrotnego niskocząsteczkowych białek ze światła kanalików proksymalnych oraz wypłukiwanie enzymów błonowych obecnych w rąbku szczoteczkiowym. W późniejszym okresie obserwuje się apoptozę komórek nabłonka kanalikowego, białkomocz, hiposmotyczny wielomocz i ostatecznie obniżenie przesączania kłębusz-

kowego. W badaniach morfologicznych można zauważyć skutki kompensacji, tzn. proliferację nabłonka kanalikowego, rozplem komórek rdzenia nerki z ogniskowymi naciekami przez komórki żerne. Przy dużych dawkach antybiotyku aminoglikozydowego pojawiają się: uszkodzenie błony komórkowej i ucieczka jonów, zaburzenie transportu aktywnego i działania pomp jonowych, spadek resorpcji wody, wodorowęglanów i glukozy, zahamowanie fosfolipazy C i wytwarzania energii w mitochondriach [23]. Leczenie aminoglikozydami może indukować zwiększone wydalanie z moczem naturalnych ligandów megaliny na skutek konkurencyjnego hamowania ich wiązania się z receptorem. W ten sposób dochodzi m.in. do calciurii. Zaburzenie gospodarki wapniem dodatkowo może być spowodowane zahamowaniem dokomórkowego transportu białka wiążącego witaminę D i zmniejszeniem syntezy aktywnej witaminy D przez komórki kanalikowe [20]. Co więcej, antybiotyki aminoglikozydowe są agonistami receptorów wapniowych obecnych w komórkach nabłonka kanalików proksymalnych nerek. W wyniku pobudzenia tych receptorów przez lek dochodzi do uwolnienia jonów  $Ca^{2+}$  z wewnątrzkomórkowych magazynów i aktywacji kinaz białkowych. W efekcie dochodzi do nadmiernej proliferacji komórek nabłonka kanalikowego, a przy dłuższej ekspozycji na aminoglikozyd, do uruchomienia sygnałów apoptotycznych [32].

#### **MOŻLIWOŚCI ZAPOBIEGANIA NEFROTOKSYCZNOŚCI AMINOGLIKOZYDÓW**

W przypadku leczenia antybiotykami aminoglikozydowymi należy uwzględnić czynniki, które zwiększają ryzyko uszkodzenia nerek (tab. 1). Wiele badań doświadczalnych i klinicznych wskazuje, że dawkowanie antybiotyków aminoglikozydowych jeden raz na dobę jest tak samo skuteczne terapeutycznie jak dawkowanie konwencjonalne, natomiast niesie mniejsze ryzyko działań toksycznych dzięki mniejszemu stężeniu leku w surowicy w przerwach między kolejnymi dawkami. Skutkiem tego jest wolniejszy wychwyt aminoglikozydu przez korę nerki i stąd mniejsza toksyczność przy zachowanej aktywności przeciwbakteryjnej. Ze względu na znaczne różnice objętości dystrybucji, fizjologii nerek i stanu klinicznego pacjentów, w celu zapewnienia odpowiedniego maksymalnego stężenia w surowicy i uniknięcia działania toksycznego, u wszystkich chorych leczonych aminoglikozydami według tradycyjnego schematu dawkowania (2–3 razy na dobę) wskazane jest monitorowanie stężenia antybiotyku w surowicy. Wprowadzenie szybkich, zautomatyzowanych metod pomiaru stężenia leków znacznie ułatwiło monitorowanie terapii i dostosowywanie dawkowania do indywidualnych potrzeb chorego. Wśród technik wykrywania obecności aminoglikozydów we krwi, mleku, moczu i tkankach wyróżnić można testy mikrobiologiczne, chromatografię gazową, wysokociśnieniową chromatografię cieczą oraz test immunoenzymatycznej fazy stałej – ELISA. Spośród tych metod oznaczania najpopularniejszą stała się ELISA, dzięki swej czułości, prostocie oraz możliwości zastosowania do badania dużej liczby małych próbek. W ocenie stężenia leku w surowicy zasadniczą rolę odgrywa moment pobrania próbki krwi do analizy. Maksymalne stężenie aminoglikozydu należy określać w próbce pobranej 1/2 godziny po zakończeniu 30-minutowego wlewu dożylnego lub godzinę po wstrzyknięciu domięśniowym.

Stężenie podstawowe mierzy się bezpośrednio przed kolejnym podaniem leku [14].

Podawanie kwasów poliaminowych wraz z antybiotykami aminoglikozydowymi zapobiega wiązaniu się leku z fosfolipidami w lizosomach i zmniejsza jego toksyczność [23]. Ochronne działanie aminoguanidyny, silnego antyutleniaacza, polega nie tylko na neutralizacji wolnych rodników tlenowych, lecz również na hamowaniu syntazy tlenu azotu, której produkt może wtórnie generować powstawanie nadtlenków. Skuteczność aminoguanidyny w zapobieganiu nefrotoksyczności aminoglikozydów została potwierdzona w badaniach na zwierzętach [22]. Podobnie ochronne działanie wydaje się mieć suplementacja diety jonami wapnia, które mogą zaburzać interakcję antybiotyków aminoglikozydowych z ujemnie naładowanymi fosfolipidami błon komórek nabłonka kanalikowego [12].

#### **MEGALINA I KUBILINA JAKO ENDOCYTARNE RECEPTORY RĄBKA SZCZOTECZKOWATEGO NERKI**

Dzięki swoim niewielkim rozmiarom białka niskocząsteczkowe (10–50 kDa) swobodnie przechodzą przez filtr kłębuszkowy nerek i są następnie wchłaniane w części proksymalnej kanalików krętych. Podstawowym mechanizmem resorpcji białek niskocząsteczkowych jest endocytoza z udziałem receptorów [31]. Nerki uczestniczą również w metabolizmie ksenobiotyków, w szczególności tych o charakterze zasadowym. Także i w tym przypadku proces zachodzi z udziałem receptorów endocytarnych nabłonka kanalików proksymalnych [19].

Endocytoza rozpoczyna się od związania białkowego liganda z receptorem komórek nabłonka kanalikowego od strony światła kanalika. Następnie receptory gromadzą się w opłaszczonych klatryną dołkach u podstawy mikrosomów rąbka szczoteczkiowego nabłonka kanalikowego. Uformowane dołki odrywają się w postaci pęcherzyków. W procesie tym bierze udział klatryna, białka adaptacyjne i inne białka wewnątrzkomórkowe, odpowiedzialne za powstawanie i dojrzewanie endosomów. Dzięki działaniu błonowej pompy protonowej, wewnątrz pęcherzyków jest zakwaszane, co powoduje oddysocjowanie liganda od receptora. Wolne receptory powracają do błony komórkowej, gdzie mogą wiązać kolejne cząsteczki. Wchłonięte białka są w większości rozkładane przez enzymy lizosomalne. Część z nich poprzez transcytozę może być uwalniana do krążenia po stronie podstawnej komórek nabłonka. Dla wielu białek niskocząsteczkowych zidentyfikowano dwa receptory rąbka szczoteczkiowego nabłonka kanalikowego, megalinę i kubilinę. Są to koreceptory, ulegające ekspresji w bliskim sąsiedztwie i mające część wspólnych ligandów. Te dwa współpracujące ze sobą białka wykazują duże różnice strukturalne [7].

W niniejszym opracowaniu omawiając te receptory ograniczono się do informacji związanych z nefrotoksycznością aminoglikozydów. Historię badań, szczegółową charakterystykę molekularną megaliny i kubiliny oraz pełną listę wiązanych ligandów przedstawiają prace przeglądowe [7,8,31].

Megalina jest dużą transbłonową glikoproteiną o masie cząsteczkowej około 600 kDa, należąca do rodziny recep-

Tabela 1. Czynniki wpływające na nefrotoksyczność aminoglikozydów [23]

Wiek	starsze osoby mają zazwyczaj mniej sprawne nerki
Stan kliniczny	posocznica, kwasica oraz zmniejszenie objętości płynów ustrojowych zwiększają ryzyko uszkodzenia nerek
Schemat dawkowania	podawanie większych dawek antybiotyku raz na dobę zmniejsza stopień kumulacji leku w nerkach
Droga podania	wskazane jest podanie dożylnie, gdyż nerkowa kumulacja aminoglikozydów jest procesem wysycalnym
Pora podania	optymalne jest podawanie aminoglikozydów w godzinach popołudniowych po posiłku, ponieważ obserwowany wówczas wzrost pH moczu wpływa na zmniejszenie wchłaniania leku w nerkach
Długość leczenia	dłuższy okres terapii (konieczny m.in. w zapaleniu wsierdza) zwiększa ryzyko toksycznego uszkodzenia nerek
Interakcje z innymi lekami	jednoczesne podawanie antybiotyków aminoglikozydowych z wankomycyną, cefalosporyną, amfoterycyną, cyklosporyną, cispłatyką, związkami litu nasila działanie nefrotoksyczne

torów lipoprotein o niskiej gęstości. Miejsce wiążące ligand tworzy zewnątrzkomórkowa domena, zawierająca cztery obszary bogate w cysteinę. Region wiążący jest oddzielony od części zakotwiczonej przez kilka powtórzeń sekwencji podobnej do naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) oraz fragment ubogi w cysteinę, zawierający motywy YWTD (Tyr-Trp-Thr-Asp). Ten ostatni odcinek jest odpowiedzialny za zależną od jonów wodorowych dysocjację receptora od liganda w kwaśnym środowisku endosomu. Cytoplazmatyczna część zawiera dwa motywy NPXY (Ans-Pro-X-Tyr, gdzie X oznaczać może każdy aminokwas), które pośredniczą w zagęszczaniu receptorów w opłaszczonych dołkach i tym samym rozpoczynają proces endocytozy. Te oraz inne fragmenty cytoplazmatyczne są też prawdopodobnie związane z funkcjami sygnalizacyjnymi pełnionymi przez megalinę. Megalina podlega regulowanej wewnątrzkomórkowej proteolizie (regulated intramembrane proteolysis – RIP). W wyniku przekształcenia regulowanego przez kinazę białkową C oraz przemieszczenia się domeny zewnętrznej, zależnej od metaloproteinaz, powstaje połączony z błoną C-końcowy fragment megaliny, który jest substratem gamma-sekretazy. Megalina jest zatem centralnym punktem drogi sygnałowej (podobnej do drogi receptora Notch) łączącej wchłanianie zwrotne białek z regulacją genową w komórkach nabłonków proksymalnych nerki [4,36].

Kubilina jest zewnątrzkomórkową glikoproteiną o masie cząsteczkowej około 460 kDa. W odróżnieniu od megaliny nie ma domeny transbłonowej. Zbudowana jest ze 110-aminokwasowego N-końca, po którym następuje 8 fragmentów EGF-podobnych oraz 27 domen CUB (complement C1r/C1s, uegf, and bone morphogenic protein-1), obszarów podobnych do białek dopełniacza, peptydów z jeżówki morskiej (sea urchin) i białek charakterystycznych dla morfogenezy szpiku. N-koniec odpowiada za zakotwiczenie białka w błonie. Każda domena CUB składa się ze 110 reszt aminokwasowych. Strukturę domeny CUB charakteryzują dwie warstwy pięciu przeciwnych płaszczyzn  $\beta$ , połączonych również przez struktury  $\beta$ , które stanowią najbardziej konserwatywny obszar i są prawdopodobnie odpowiedzialne za wiązanie liganda [7].

Megalina, jako receptor transbłonowy, może działać samodzielnie, natomiast internalizacja kubiliny i jej ligandów, przynajmniej w części, zachodzi po związaniu z megaliną.

Oba te receptory do swej pełnej aktywności wymagają jonów wapnia. Nerkowa ekspresja megaliny i kubiliny jest ograniczona do kanalików proksymalnych. Megalina występuje ponadto w podocytach kłębuszków nerkowych [31].

Do wspólnych ligandów megaliny i kubiliny należą: białko wiążące witaminę D, lekkie łańcuchy immunoglobulin, hemoglobina, mioglobina, albumina oraz białko wiążące receptor (receptor-associated protein – RAP). Wśród ligandów megaliny znajdują się hormony (insulina, prolaktyna, parathormon), enzymy (lizozym, cytochrom c,  $\alpha$ -amylaza), inhibitory enzymów (inhibitory aktywatorów plazminogenu, aprotynina, cystatyna C) oraz białka odpowiedzialne za wchłanianie witamin i jonów (transkobalamina, laktoferyna). Kubilina jest również receptorem wieloligandowym i poza ligandami wspólnymi z megaliną wiąże białko wydzielnicze komórek Clara, apolipoproteinę A-I, lipoproteiny HDL, kompleks IF-witamina B<sub>12</sub> i transferynę. W ostatnich latach lista związków wiązanych przez megalinę poszerzyła się m.in. o apolipoproteinę M [9], leptynę [34], końcowe produkty glikacji białek [25], metalotioneiny [15,35], angiotensynę II [11], białko wiążące kwas foliowy [5].

Megalina i kubilina są istotne w prawidłowej reabsorpcji białek w kanalikach proksymalnych nerek. W warunkach fizjologicznych, dzięki aktywności tych receptorów, zostają odzyskane z moczu pierwotnego ważne biologicznie substancje, m.in. aminokwasy, witaminy i minerały. W stanach zwiększonego przesączania białek do moczu pierwotnego, wskutek nasilonej endocytozy, do komórek nabłonka trafia ilość białek przekraczająca wydolność aparatu lizosomalnego. Wynikiem niekontrolowanego wzrostu aktywności kwaśnych proteaz w komórce lub bezpośredniego działania toksycznego niektórych wchłoniętych białek (generacja wolnych rodników, indukcja czynników zapalnych i mitogennych) jest uszkodzenie kanalików nerkowych i rozwój niewydolności nerek z przeciążenia [8]. W przypadku przeładowania albuminą dochodzi do zmniejszenia ekspresji megaliny, spadku aktywności błonowej kinazy białkowej B i fosforylacji białka Bad, co prowadzi do indukcji apoptozy w komórkach proksymalnych nerki [6]. Podobny patomechanizm może odpowiadać za rozwój nefropatii w szpiczaku mnogim (toksyczne działanie łańcuchów lekkich) [3], cukrzyca czy zespół metaboliczny (uszkodzenie nerek przez końcowe produkty glikacji) [26].

Tabela 2. Zestawienie wyników dotyczących hamowania wiązania aminoglikozydów w nerkach

Model doświadczenia	Kompetytor wiązania aminoglikozydu	Wnioski
Badania <i>in vivo</i>	białko RAP (receptor-associated protein)	mimo dużego powinowactwa do megaliny ( $K_d=8$ nM) białko RAP słabo hamowało wchłanianie gentamycyny w kanalikach proksymalnych nerki szczurzej, co tłumaczono odmienną dostępnością domen wiążących dla tych związków [16]
Badania <i>in vivo</i>	lizozym	gentamycyna konkurowała z lizozymem o miejsca wiążące w kanalikach nerek w sposób zależny od stężenia [17]
Badania <i>in vivo</i> (szczury, myszy)	lizozym, aprotynina, cytochrom c	cytochrom c najskuteczniej hamował kumulację gentamycyny w korze nerki, a działanie to było zależne od dawki i nie wpływało na osoczowe stężenie antybiotyku [33]
Badania <i>in vitro</i> (komórki z nerek oposa) i <i>in vivo</i>	krótkołańcuchowe peptydy pochodne cytochromu c i białek regulatorowych aktywny	silne hamowanie nerkowej akumulacji gentamycyny przez zasadowe peptydy wynikało z jednoczesnego upośledzenia wiązania antybiotyku z kwaśnymi fosfolipidami błonowymi i receptorami endocytarnymi nabłonka kanalikowego [33]
Badania <i>in vitro</i> (rąbek szczoteczki nerki szczura)	peptyd N-WASP (neural Wiskott-Aldrich syndrome protein) i jego warianty	hamowanie wiązania gentamycyny do rąbka szczoteczki nerki przez zasadowe peptydy zachodziło głównie przez blokowanie oddziaływań leku z megaliną. O powinowactwie związków do megaliny decyduje przede wszystkim obecność $\alpha$ -helisy w cząsteczce [18]

### MEGALINA JAKO CEL ZAPOBIEGANIA NEFROTOKSYCZNOŚCI

W 1995 roku Moestrup i wsp. [16] donieśli, że aminoglikozydy oraz inne zasadowe leki (polimiksyna B, aprotynina) wiążą się w warunkach *in vitro* z megaliną komórek nabłonka kanalików proksymalnych nerki z większym powinowactwem niż z fosfolipidami. Potwierdził to w badaniach *in vivo* zespół prof. Nagai [20]. Drastyczny spadek akumulacji gentamycyny w nerce myszy pozbawionych genu megaliny przy zachowanej funkcji kłębuszków sugerował, że endocytoza z udziałem megaliny jest jedyną drogą jej wchłaniania [28]. Obecnie przyjmuje się, że w pierwszym etapie aminoglikozydy wiążą się z kwaśnymi fosfolipidami błon nabłonka kanalikowego, a następnie ulegają zageszczeniu u podstawy mikrosomów rąbka szczoteczki nerki wskutek interakcji z występującą tam megaliną [19].

Ponieważ powinowactwo aminoglikozydów do megaliny jest stosunkowo słabe ( $K_d$  rzędu kilkudziesięciu – kilkuset  $\mu$ M), możliwość stosowania endogennych, obojętnych biologicznie ligandów megaliny o dużym powinowactwie ( $K_d$  rzędu kilkuset nM) wydaje się obiecującą metodą zapobiegania uszkodzeniu nerek w następstwie terapii antybiotykami aminoglikozydowymi [16,17]. Idealny antagonist megaliny powinien cechować się: małą toksycznością, większym powinowactwem do megaliny niż aminoglikozyd i łatwą filtracją przez błonę kłębuszka nerkowego [19].

Zestawienie najważniejszych eksperymentów dotyczących hamowania wiązania aminoglikozydów w nerkach przedstawiono w tabeli 2. Pierwszym czynnikiem badanym pod względem hamowania wchłaniania aminoglikozydów w kanalikach nerkowych było białko wiążące receptor (RAP). Podczas jednoczesnej perfuzji pojedynczych kanalików proksymalnych nerki szczura roztworem [ $^3$ H] gentamy-

cyny i 10  $\mu$ M RAP zaobserwowano wzrost radioaktywności moczu o około 20% w porównaniu z kontrolą [16]. Stosunkowo niski potencjał hamujący RAP wynikał z odmiennego sposobu oddziaływań tych związków z megaliną. Z jednym receptorem wiążą się tylko 1–2 cząsteczki białka RAP, podczas gdy cząsteczki gentamycyny zajmują około 60–100 miejsc wiążących [28]. Wśród związków konkurujących z gentamycyną o miejsca wiążące błon rąbka szczoteczki nerki, oprócz białek zasadowych, takich jak lizozym, cytochrom c czy aprotynina, badano również szczególnie bogate w reszty aminokwasów zasadowych fragmenty peptydowe cytochromu c oraz białek regulatorowych aktywny, takich jak: białko neuronalne związane z zespołem Wiskotta-Aldricha (N-WASP), gelsolina, CapG [17,18,33]. Spośród badanych białek akumulację gentamycyny w korze nerek najsilniej hamował cytochrom c, a jego działanie było zależne od stężenia. Jednocześnie nie obserwowano wpływu tego białka na okres półtrwania i osoczowe stężenie antybiotyku [33]. Celem zwiększenia powinowactwa czynnika konkurującego do megaliny, skonstruowano wiele peptydów pochodnych cytochromu c o sekwencjach Cyto22-41, Cyto70-89, Cyto79-88. Te fragmenty peptydowe okazały się silniejszymi czynnikami wypierającymi gentamycynę z miejsc wiążących rąbka szczoteczki nerki niż macierzyste białko w hodowli komórek z nerki oposa, jednakże w badaniach *in vivo* ich działanie okazało się niezadowolające. Tłumaczono to niestabilnością krótkich peptydów w krążeniu i w efekcie zbyt małym stężeniem w kanalikach nerek. Natomiast w przypadku zasadowych fragmentów białek regulatorowych aktywny (N-WASP181-200, gelsolina150-169, CapG137-146) zaobserwowano silne hamowanie wiązania gentamycyny przez nabłonek kanalikowy w warunkach *in vivo* i *in vitro* [33]. Małe peptydy zawierające reszty Lys i/lub Arg łatwiej osiągały ujemnie naładowane miejsca wiążące w błonie kanałika proksymalnego i dlatego okazały się skuteczniejsze-

mi czynnikami konkurującymi z gentamycyną. Ponadto, ich działanie dotyczyło jednoczesnego blokowania interakcji aminoglikozydu z kwaśnymi fosfolipidami błonowymi i z megaliną [19]. W przypadku N-WASP181-200, o powinowactwie do megaliny nie decydowała tylko zasadowość łańcucha polipeptydowego, ale przede wszystkim jego konformacja przestrzenna. Warianty genetyczne tego peptydu z substytucją reszt Lys przez reszty Gly lub Glu, które są istotne dla interakcji liganda z sekwencją Ser-Asp-Glu receptora, nie miały silniejszego działania hamującego na wiązanie się gentamycyny z rąbkami szczoteczko-watym nerki szczura. Ponieważ ta substytucja powodowała zmniejszenie procentowego udziału  $\alpha$ -helisy w strukturze przestrzennej N-WASP181-200, wydaje się, że  $\alpha$ -helisa jest krytyczna dla wiązania się ligandów z receptorami LDL, do których należą również megalina [18].

Prowadzone są także badania wykorzystania podobnej strategii w zapobieganiu jatrogenemu uszkodzeniu nerek w chemioterapii nowotworów. Leki z grupy analogów somatostatyny są w większości wydalane z moczem, jednak prawie 2% dawki jest wchłaniana zwrótnie i gromadzona w komórkach kanalików proksymalnych nerek. Prowadzi to do toksycznego uszkodzenia cewek i przewlekłej niewydolności

nerek. Resorpcja zwrótna chemioterapeutyków zachodzi za pośrednictwem endocytozy w fazie płynnej i endocytozy zależnej od receptorów z udziałem megaliny i/lub kubiliny. Hamowanie tego drugiego mechanizmu miałooby obniżyć toksyczne działanie pochodnych somatostatyny oraz cisplatinę na nerki. Można to uzyskać podając jednocześnie związku konkurujące o ujemnie naładowane miejsca wiązania na receptorach lub naturalne ligandy megaliny [2,30].

## PODSUMOWANIE

Pomimo wprowadzenia na rynek farmaceutyczny nowych, mało toksycznych związków bakteriobójczych, aminoglikozydy nadal stanowią poważny oręż w walce z zakażeniami wywołanymi przez Gram-ujemne pałeczki i enterokoki. Dlatego istnieje konieczność kontynuowania badań nad udoskonaleniem sposobu leczenia tymi antybiotykami oraz poszukiwania metod zmniejszenia ich toksyczności. Zahamowanie wchłaniania zwrótnego antybiotyków aminoglikozydowych w nerkach przez substancje konkurujące o miejsca wiążące rąbka szczoteczko-watego nabłonka kanalików proksymalnych może zapobiec nefrotoksyczności tych antybiotyków.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Amici M., Eusebi F., Miledi R.: Effects of the antibiotic gentamicin on nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 2005; 49: 627–637
- [2] Barone R., Van Der Smissen P., Devuyt O., Beaujean V., Pauwels S., Courtoy P.J., Jamar F.: Endocytosis of the somatostatin analogue, octreotide, by the proximal tubule-derived opossum kidney (OK) cell line. *Kidney Int.*, 2005; 67: 969–976
- [3] Batuman V.: Proximal tubular injury in myeloma. *Contrib. Nephrol.*, 2007; 153: 87–104
- [4] Biemesderfer D.: Regulated intramembrane proteolysis of megalin: linking urinary protein and gene regulation in proximal tubule? *Kidney Int.*, 2006; 69: 1717–1721
- [5] Birn H., Zhai X., Holm J., Hansen S.I., Jacobsen C., Christensen E.I., Moestrup S.K.: Megalin binds and mediates cellular internalization of folate binding protein. *FEBS J.*, 2005; 272: 4423–4430
- [6] Caruso-Neves C., Pinheiro A.A., Cai H., Souza-Menezes J., Guggino W.B.: PKB and megalin determine the survival or death of renal proximal tubule cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 18810–18815
- [7] Christensen E.I., Birn H.: Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Mol. Cell Biol.*, 2002; 3: 256–266
- [8] Christensen E.I., Gburek J.: Protein reabsorption in renal proximal tubule-function and dysfunction in kidney pathophysiology. *Pediatr. Nephrol.*, 2004; 19: 714–721
- [9] Christoffersen C., Dahlbäck B., Nielsen L.B.: Apolipoprotein M: progress in understanding its regulation and metabolic functions. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2006; 66: 631–637
- [10] Edson R.S., Terrell C.L.: The aminoglycosides. *Mayo Clin. Proc.*, 1999; 74: 519–528
- [11] Gonzalez-Villalobos R., Klassen R.B., Allen P.L., Navar L.G., Hammond T.G.: Megalin binds and internalizes angiotensin II. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2005; 288: F420–F427
- [12] Humes H.D., Sastrasinh M., Weinberg J.M.: Calcium is a competitive inhibitor of gentamicin-renal membrane binding interactions and dietary calcium supplementation protects against gentamicin nephrotoxicity. *J. Clin. Invest.*, 1984; 73: 134–147
- [13] Jana S., Deb J.K.: Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006; 70: 140–150
- [14] Jin Y., Jang J.W., Lee M.H., Han C.H.: Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of neomycin. *Clin. Chim. Acta*, 2006; 364: 260–266
- [15] Klassen R.B., Crenshaw K., Kozyraki R., Verroust P.J., Tio L., Atrian S., Allen P.L., Hammond T.G.: Megalin mediates renal uptake of heavy metal metallothionein complexes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2004; 287: F393–F403
- [16] Moestrup S.K., Cui S., Vorum H., Bregengard C., Bjorn S.E., Norris K., Gliemann J., Christensen E.I.: Evidence that epithelial glycoprotein 330/megalin mediates uptake of polybasic drugs. *J. Clin. Invest.*, 1995; 96: 1404–1413
- [17] Nagai J., Katsube T., Murakami T., Takano M.: Effect of gentamicin on pharmacokinetics of lysozyme in rats: interaction between megalin substrates in the kidney. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2002; 54: 1491–1496
- [18] Nagai J., Saito M., Adachi Y., Yumoto R., Takano M.: Inhibition of gentamicin binding to rat renal brush-border membrane by megalin ligands and basic peptides. *J. Control. Release*, 2006; 112: 43–50
- [19] Nagai J., Takano M.: Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for preventing the nephrotoxicity. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2004; 19: 159–170
- [20] Nagai J., Tanaka H., Nakanishi N., Murakami T., Takano M.: Role of megalin in renal handling of aminoglycosides. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2001; 281: F337–F344
- [21] Ochocki Z., Stańczak A.: Antybiotyki aminoglikozydowe. *Farm. Pol.*, 2005; 61: 707–718
- [22] Parlakpınar H., Koc M., Polat A., Vardi N., Ozer M.K., Turkoz Y., Acet A.: Protective effect of aminoguanidine against nephrotoxicity induced by amikacin in rats. *Urol. Res.*, 2004; 32: 278–282
- [23] Rougier F., Claude D., Maurin M., Maire P.: Aminoglycoside nephrotoxicity. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, 2004; 4: 153–162
- [24] Rybak L.P., Whitworth C.A.: Ototoxicity: therapeutic opportunities. *Drug Discov. Today*, 2005; 10: 1313–1321
- [25] Saito A., Nagai R., Tanuma A., Hama H., Cho K., Takeda T., Yoshida Y., Toda T., Shimizu F., Horiuchi S., Gejyo F.: Role of megalin in endocytosis of advanced glycation end products: implications for a novel protein binding to both megalin and advanced glycation end products. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2003; 14: 1123–1131
- [26] Saito A., Takeda T., Hama H., Oyama Y., Hosaka K., Tanuma A., Kaseda R., Ueno M., Nishi S., Ogasawara S., Gondaira F., Suzuki Y., Gejyo F.: Role of megalin, a proximal tubular endocytic receptor, in the pathogenesis of diabetic and metabolic syndrome-related nephropathies: protein metabolic overload hypothesis. *Nephrology*, 2005; 10(Suppl.): S26–S31
- [27] Sastrasinh M., Knauss T.C., Weinberg J.M., Humes H.D.: Identification of the aminoglycoside binding site in rat renal brush border membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1982; 222: 350–358

- [28] Schmitz C., Hilpert J., Jacobsen C., Boensch C., Christensen E.I., Luft F.C., Willnow T.E.: Megalin deficiency offers protection from renal aminoglycoside accumulation. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 618–622
- [29] Selimoglu E.: Aminoglycoside- induced ototoxicity. *Curr. Pharm. Des.*, 2007; 13: 119–126
- [30] Takano M., Nakanishi N., Kitahara Y., Sasaki Y., Murakami T., Nagai J.: Cisplatin-induced inhibition of receptor-mediated endocytosis of protein in the kidney. *Kidney Int.*, 2002; 62: 1707–1717
- [31] Verroust P.J., Christensen E.I.: Megalin and cubilin – the story of two multipurpose receptors unfolds. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2002; 17: 1867–1871
- [32] Ward D.T., Maldonado-Perez D., Hollins L., Riccardi D.: Aminoglycosides induce acute cell signaling and chronic cell death in renal cells that express the calcium-sensing receptor. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2005; 16: 1236–1244
- [33] Watanabe A., Nagai J., Adachi Y., Katsube T., Kitahara Y., Murakami T., Takano M.: Targeted prevention of renal accumulation and toxicity of gentamicin by aminoglycoside receptor antagonists. *J. Control. Release*, 2004; 95: 423–433
- [34] Wolf G., Ziyadeh F.N.: Leptin and renal fibrosis. *Contrib. Nephrol.*, 2006; 151: 175–183
- [35] Wolff N.A., Abouhamed M., Verroust P.J., Thévenod F.: Megalin-dependent internalization of cadmium-metallothionein and cytotoxicity in cultured renal proximal tubule cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006; 318: 782–791
- [36] Zou Z., Chung B., Nguyen T., Mentone S., Thomson B., Biemesderfer D.: Linking receptor-mediated endocytosis and cell signalling: Evidence for regulated intramembrane proteolysis of megalin in proximal tubule. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 34302–34310