

Przemysław Jerzy KWASIBORSKI¹
 Paweł KOWALCZYK¹
 Piotr MRÓWKA¹
 Michał KWASIBORSKI²
 Andrzej CWETSCH³
 Jacek PRZYBYLSKI¹

¹Zakład Biofizyki i Fizjologii Człowieka WUM,
 Warszawa
 Kierownik: Prof. dr hab. Jacek Przybylski

²Zakład Anestezjologii i Intensywnej
 Terapii ICZMP, Łódź
 Kierownik: Prof. dr hab. Wojciech Krajewski

³Klinika Kardiologii i Chorób Wewnętrznych
 WIM, oddział kardiologii interwencyjnej,
 Wojskowy Instytut Medyczny CSK MON,
 Warszawa
 Kierownik: Prof. dr hab. Andrzej Cwetsch

Dodatkowe słowa kluczowe:

hipoksja
 erytropoetyna
 osteopontyna
 HIF
 VEGF

Additional key words:

hypoxia
 erythropoietin
 osteopontin
 HIF
 VEGF

Adres do korespondencji:
 Lek. Przemysław Jerzy Kwasiborski
 Zakład Biofizyki i Fizjologii Człowieka WUM,
 Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa
 Tel. 0-22 628-63-34, faks: 0-22 628-78-46
 Email: przemyslaw.kwasiborski@wum.edu.pl

Wybrane, biochemiczne markery hipoksji

Selected, biochemical markers of hypoxia

Pomimo, że wiele tkanek może funkcjonować przy obniżonym stężeniu tlenu dzięki glikolitycznej syntezie ATP, jest to jednak sposób niezwykle kosztowny z punktu widzenia zasobów energetycznych organizmu. Hipoksja jest stanem, w którym dochodzi do zmniejszenia ciśnienia parcjalnego tlenu na poziomie tkanek organizmu. Istnieje wiele sytuacji klinicznych, w których może dojść do krótkotrwałego lub przewlekłego, ogólnego bądź miejscowego obniżenia utlenowania tkanek. Ze względu na mnogość sytuacji prowadzących do hipoksji i jej groźne konsekwencje niezwykle istotna jest możliwość jej monitorowania i diagnostyki. Globalna ocena homeostazy tlenowej organizmu opierająca się na parametrach gazometrycznych krwi oraz stężeniu jonów mleczanowych nie odzwierciedla w pełni stanu utlenowania tkanek. Natomiast badania przy pomocy mikroelektrod tlenowych wykazały olbrzymie zróżnicowanie wartości pO₂ na poziomie tkanek. Wartość punkto- wa pO₂ zależy od odległości od naczynia włosowatego, wielkości dyfuzji w płynie śródkomórkowym i macierzy zewnątrzkomórkowej, a w przypadku pomiarów wewnątrzkomórkowych także odległości od mitochondriów, ich liczby i aktywności. Tak więc, w chwili obecnej nie ma możliwości wyznaczenia norm prawidłowego pO₂ na poziomie poszczególnych tkanek. Niedobór tlenu jest ważnym regulatorem ekspresji genów, zaś podstawowym białkiem odpowiedzi na hipoksję jest czynnik transkrypcyjny indukowany przez hipoksję (HIF). Jak dotąd zidentyfikowano około 70 genów zależnych od HIF. Kaskada HIF odpowiada za zwiększenie dostarczania tlenu m.in. poprzez nasilenie angiogenezy za pośrednictwem śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) i zwiększenie ilości erytrocytów poprzez erytropoetynę (EPO). Neoangiogeneza związana z VEGF jest jednym z kluczowych kierunków adaptacji do hipoksji. Rozrost łożyska naczyniowego w odpowiedzi na hipoksję dotyczy praktycznie każdej tkanki i narządu, zaobserwowano go przede wszystkim w mięśniach szkieletowych, ale również w mózgu. Ekspresja niektórych markerów hipoksji jest jednak niezależna od HIF. Niezwykle interesu-

Although tissues may exist regardless of reduced oxygen pressure, this requires glycolytic ATP generation, which is very expensive from the energetic viewpoint. Hypoxia is defined as the condition in which oxygen pressure is reduced at the level of bodily tissues. There are many clinical situations during which decreased tissue oxygenation may occur. It may be transient or chronic, as well as systemic or local. An emergent need exists for monitoring and diagnosis with respect to numerous possible clinical circumstances leading to hypoxia and its life-threatening consequences. The assessment of global oxygen homeostasis relies on blood gas analysis and lactate concentration, but such an approach does not fully reflect the local oxygenation of tissues. Oxygen needle microelectrode measurements reveal great differences in tissue pO₂ levels. Local pO₂ levels depend on many factors, among which the most important are: the distance to the nearest capillary, the extracellular and intracellular fluid diffusion rates and intracellular measurements of the number and activity levels of mitochondria. Thus, nowadays, it is impossible to establish an accurate normal value ranges for local tissue pO₂. Oxygen deficiency is an important gene regulator. A sequence-specific DNA-binding factor, the hypoxia induced factor (HIF), is the fundamental hypoxia response protein. 70 genes identified so far have been found to be HIF-dependent. They are responsible for increased oxygen delivery, i.e. by boosting angiogenesis due to vascular endothelial growth factor (VEGF) release and the enhancement of red blood cell production by erythropoietin (EPO). VEGF-induced angiogenesis is one of several key hypoxia adaptations. An enhanced vascular bed in response to hypoxia affects almost every bodily tissue and organ. This was observed particularly in skeletal muscles as well as in the brain. The expression of a few hypoxia markers does not require HIF activation. An especially interesting member of this group is osteopontin (OPN), whose synthesis increases during hypoxia. OPN was originally linked to bone

jąca w tym kontekście wydaje się być osteopontyna (OPN), której synteza wzrasta podczas hipoksji. Glikoproteinie tej pierwotnie związanej z przebudową kości, obecnie przypisuje się rolę w procesach odpornościowych, zapalnych i nowotworzeniu. Ocena głębokości hipoksji ma duże znaczenie, tak prognostyczne jak i terapeutyczne w warunkach klinicznych. Biorąc pod uwagę fakt, że pojęcie prężności tlenu na poziomie tkanek nie ma charakteru ilościowego (brak norm, brak porównywalnych metod pomiaru) szczególnego znaczenia nabierają parametry biochemiczne, które mogłyby odzwierciedlać stopień niedotlenienia tkanek. W tym kontekście szczególnego znaczenia nabierają czynniki indukowane przez hipoksję takie jak HIF, EPO, VEGF czy prawdopodobnie OPN.

Wstęp

Dostateczna podaż tlenu warunkuje prawidłowe funkcjonowanie komórek, między innymi umożliwiając syntezę ATP w tlenowych przemianach metabolicznych i utrzymując stały potencjał oksydo-redukcyjny. Pomimo, że wiele tkanek może funkcjonować przy obniżonym stężeniu tlenu dzięki glikolitycznej syntezie ATP, jest to jednak mało efektywne i niezwykle kosztowne z punktu widzenia zasobów energetycznych organizmu. Niektóre tkanki jak tkanka nerwowa czy mięsień sercowy są bardzo wrażliwe na niedotlenienie. W skali organizmu brak wystarczającego utlenowania prowadzi do poważnych zaburzeń funkcji i w konsekwencji śmierci komórek, tkanek i organizmu.

Hipoksja jest stanem, w którym dochodzi do zmniejszenia ciśnienia parcjalnego tlenu na poziomie tkanek. Jego przyczynami mogą być zredukowana zawartość tlenu we krwi (hipoksja hipoksemiczna), upośledzony proces dostawy tlenu do tkanek (hipoksja ischemiczna) lub inne mechanizmy. Pojęcie to często mylone jest z hipoksemią, która oznacza jedynie zmniejszenie ciśnienia parcjalnego tlenu we krwi tętniczej. Tak więc, hipoksja może być czynnikiem powodującym hipoksję, ale nie jest z nią tożsama.

Istnieje wiele sytuacji klinicznych, w których może dojść do krótkotrwałego lub przewlekłego, ogólnego bądź miejscowego zmniejszenia utlenowania tkanek. Przyczynami hipoksji mogą być między innymi wady i choroby układu oddechowego, krążenia płucnego, niewydolność i wady serca np. przeciek prawo-lewy. Ze względu na mnogość sytuacji prowadzących do hipoksji i jej groźne konsekwencje niezwykle istotna jest możliwość jej monitorowania i diagnostyki.

Trudności diagnostyczne hipoksji.

Głównym problemem dotyczącym diagnostyki hipoksji jest brak metody pozwalającej na oznaczenie tkankowej prężności tlenu (pO_2). Co prawda obecnie dla badań podstawowych dostępne są cienkoigłowe elektrody tlenowe pozwalające ocenić pO_2 w płynie śródkomórkowym lub nawet we wnętrzu komórki, jednakże pomiar ten ograniczony jest do wartości punktowych. Dla stanu pacjenta większe znaczenie ma natomiast ogólne nasilenie hipoksji, będące wypadkową utlenowania miejscowego.

Badania przy pomocy mikroelektrod tlenowych wykazały olbrzymie zróżnicowanie

remodeling, but currently it seems to possess an important role in immunity, inflammation and tumor pathogenesis. Quantification of hypoxia is clinically essential both for therapy and prognosis. Taking account of the fact that the concept of oxygen pressure at the tissue level is not quantitative (norms do not exist, results are incomparable), biochemical markers are preferable. Particularly significant in this context are hypoxia-induced proteins such as HIF, EPO, VEGF or potentially OPN.

wartości pO_2 na poziomie tkanek. Wartość punktowa pO_2 zależy od odległości od naczyń włosowatych, od wielkości dyfuzji w płynie śródkomórkowym i macierzy zewnątrzkomórkowej, a w przypadku pomiarów wewnątrzkomórkowych także odległości od mitochondriów, ich liczby i aktywności. Tak więc, w chwili obecnej nie ma możliwości wyznaczenia norm prawidłowego pO_2 na poziomie tkanek.

W praktyce klinicznej ocena utlenowania tkanek ogranicza się do wyników gazometrii krwi tętniczej i/lub żyłnej oraz stężenia mleczanów w osoczu. Zarówno wynik badania gazometrycznego jak i wartość stężenia mleczanów pozwalają ocenić stan globalnego wyrównania tlenowego organizmu. Obie metody dają wgląd jedynie w aktualny stan metaboliczny chorego, nie pozwalają wnioskować o wyrównaniu tlenowym w dłuższym okresie. Wyniki gazometrii krwi tętniczej odzwierciedlają stan homeostazy tlenowej dokładnie w momencie pobierania krwi natomiast zwiększone stężenie mleczanów utrzymuje się do 60 min. od epizodu hipoksji [52]. Należy podkreślić, iż zwiększone stężenie mleczanów w surowicy krwi nie musi świadczyć o hipoksji. Do wzrostu stężenia mleczanów dochodzi także w trakcie podawania adrenaliny [3], leków antywirusowych [24], w zapaleniu płuc [25], niewydolności wątroby [7], ostrym i przewlekłym nadużyciu alkoholu [35].

W związku z powyższym część autorów neguje zasadność stosowania stężenia mleczanów jako wskaźnika hipoksji, traktując ten parametr jako wykładnik toczącego się procesu zapalnego [16] lub stresu metabolicznego [34].

Z kolei badania gazometryczne krwi mogą narażać na duże trudności interpretacyjne. I tak na wynik gazometrii krwi tętniczej duży wpływ może mieć zachowanie chorego w chwili pobierania krwi. Hiperwentylacja emocjonalna może w znaczący sposób wpływać na uzyskiwane wartości pO_2 i pCO_2 krwi tętniczej. Z kolei parametry gazometryczne mieszanej krwi żyłnej nie muszą odzwierciedlać wartości pO_2 , pCO_2 i pH na poziomie tkanek. Wartość powyższych parametrów we krwi żyłnej może być w dużym stopniu modyfikowana poprzez otwarcie bądź zamknięcie połączeń tętniczko-żylnych. Otwarcie tych połączeń prowadzi do hipoksji z równoczesnym wzrostem pO_2 we krwi żyłnej drenażącej daną tkankę bądź narząd.

Występuje, zatem całe spektrum sytuacji klinicznych, w których nawet głęboka hipoksja pozostaje poza zasięgiem standardowego monitorowania. Identyfikacja chorób, u których pomimo prawidłowych wyników badań zapotrzebowanie tkanek na tlen przekracza możliwości jego dostawy, jest kluczowa dla dalszego leczenia i rokowania takich pacjentów [5]. Biorąc powyższe pod uwagę wydaje się, że wychwycenie takich i specyficznych markerów biochemicznych hipoksji może być istotnym klinicznie wskaźnikiem odzwierciedlającym stan metabolizmu tlenowego zarówno narządów jak i całego organizmu.

Adaptacja do hipoksji

Częstym błędem, nawet w piśmiennictwie fachowym jest utożsamianie mechanizmów adaptacji do hipoksji z reakcjami odruchowymi w warunkach hipoksemii. Te drugie inicjowane są pobudzeniem chemoreceptorów tętniczych a w przypadku hiperkapnii stref chemowrażliwych pnia mózgu. Ogólnoustrojowe adaptacje do hipoksji - wzrost wentylacji minutowej [15, 63] oraz reakcja sercowo-naczyniowa [6, 38, 54, 76] - wystąpią tylko w tych przypadkach, w których hipoksja spowodowana jest hipoksemią, natomiast w przypadku innych patomechanizmów hipoksji reakcja układu krążenia i układu oddychania nie wystąpi.

Tak więc, hipoksja wywołana innymi przyczynami niż hipoksja wydaje się być groźniejsza dla organizmu i/lub określonej tkanki niż hipoksja hipoksemiczna. W hipoksji niehipoksemicznej jedynie komórki mechanizmy będą decydowały o adaptacji do obniżonych wartości pO_2 .

Komórkowe mechanizmy adaptacji do hipoksji

Hipoksja jest ważnym regulatorem ekspresji genów, o potencjale zarówno ich stymulacji jak i supresji [74]. Hipoksja może decydować o ekspresji genu także na poziomie posttranskrypcyjnym i posttranslacyjnym [22]. Przewlekły niedobór tlenu prowadzi do stopniowej aktywacji genetycznego programu odpowiedzi na hipoksję, który obejmuje przede wszystkim nasilenie glikolizy jako beztlenowego źródła ATP. W program ten wpisuje się także pobudzenie angiogenezy [17] w niedotlenionych tkankach oraz zwiększenie erytropoezy [21] (jeśli hipoksja występuje również w nerce).

W wyniku niedotlenienia obserwuje się znaczne obniżenie pobierania tlenu przez

komórki i tak w hodowlach neuronów [42] i hepatocytów [65] w warunkach hipoksji obserwuje się obniżenie pobierania tlenu aż o 85%. Obniżenie zużycia tlenu jest głównie wynikiem zmniejszenia aktywności pompy sodowo-potasowej oraz szlaków anabolicznych [18]. Mimo oszczędnej gospodarki energetycznej i wzrostu tempa glikolizy beztlenowej poziom ATP w komórkach wyraźnie spada [68,70].

W warunkach hipoksji obserwuje się wzrost ekspresji genów dla enzymów glikolitycznych takich jak dehydrogenaza mleczanowa (LDH), kinaza pirogronianowa w mięśniach szkieletowych [69] i astrocytach [39] oraz kinaza fosfoglicerynianowa [12]. Jako że glikoliza jest procesem mniej wydajnym niż fosforylacja oksydacyjna, w hipoksji wzrasta zużycie glukozy. Zwiększony wychwyt glukozy i wzrost syntezy białkowych transporterów glukozy GLUT1 wykazano w komórkach macierzystych [32], adipocytach [71], neuronach i astrocytach [73] oraz w chondrocytach [51], a GLUT 4 w komórkach mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego [8].

Przesunięcie metabolizmu z oddychania tlenowego w kierunku glikolizy beztlenowej ma swoje odzwierciedlenie w zmianach morfologicznych i biochemicznych mitochondriów. W warunkach hipoksji obserwuje się redukcję ich objętości, kondensację matriks mitochondrialnej oraz pogrubienie krist [46]. Zmniejszenie podaży tlenu dla komórek prowadzi do 30% spadku aktywności enzymów łańcucha oddechowego w mitochondriach (kompleks I, II, III, IV - reduktaza NADH-Q, reduktaza bursztynian-Q, reduktaza cytochromowa, oksydaza cytochromowa) [46]. Zmniejsza się także aktywność cytoplazmatycznych enzymów tlenowego szlaku metabolizmu, obniżeniu o 15% ulega aktywność kluczowego enzymu cyklu Krebsa, syntazy cytrynianowej [36]. Zmiany w mitochondriach utrzymują się także po reoksygenacji [18].

Potencjalne biochemiczne markery hipoksji

Czynnik indukowany przez hipoksję - HIF

Głównym czynnikiem regulującym metabolizm i zmiany adaptacyjne podczas hipoksji jest czynnik transkrypcyjny indukowany przez hipoksję *hypoxia-inducible factor* - HIF [53]. Należy on do rodziny białkowych czynników transkrypcyjnych zawierającej charakterystyczną strukturę wiążącą DNA typu helisa-pętla-helisa (*basic helix-loop-helix* - bHLH) ponadto jest heterodimerem złożonym z dwóch podjednostek: a oraz b. W obecności tlenu podjednostka a jest hydroksylowana przez enzym hydroksylazę prolilową (PHD), po czym jest degradowana proteolitycznie. Jednakże w warunkach hipoksji podjednostka a nie ulega degradacji tworząc z podjednostką b aktywny transkrypcyjny kompleks. Największe znaczenie posiada izoforma HIF 1. Jak dotąd zidentyfikowano około 70 genów zależnych od HIF, które dzielą się na następujące kategorie: geny regulujące metabolizm komórkowy, wzrost komórki i apoptozę oraz geny związane z zapewnieniem dostaw tlenu. HIF zwiększa wychwyt glukozy i glikolizę po-

przez aktywację transporterów glukozy GLUT1 i GLUT3 [1] i enzymów glikolitycznych takich jak kinaza fosfoglicerynianowa i aldolaza A [12, 56]. Na poziomie komórkowym reguluje ekspresję czynników wzrostu IGF2 i TGF α [10,29]. HIF odpowiada za zwiększenie dostarczenia tlenu m.in. poprzez nasilenie angiogenezy za pośrednictwem śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) [14] i zwiększenie ilości erytrocytów poprzez erytropoetynę [57].

W chwili obecnej brak jest odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób dochodzi do ekspresji genu odpowiedzialnego za powstanie HIF w warunkach hipoksji. Nie zidentyfikowano w komórkach receptora wewnątrzkomórkowej prężności tlenu. Istnieją dane doświadczone sugerujące, że czynnikiem odpowiedzialnym za ekspresję tego genu nie jest bezpośrednie obniżenie pO $_2$, a zaburzenie potencjału energetycznego komórki. [20, 48].

Niezależnie od potencjalnego mechanizmu odpowiedzialnego za syntezę HIF, czynnik ten wydaje się spełniać wszystkie kryteria idealnego markera biochemicznego hipoksji. Problem klinicznego zastosowania HIF w diagnostyce związany jest z faktem, że jest to marker wewnątrzkomórkowy. W warunkach hipoksji hipoksemicznej oznaczenie stężenia HIF w limfocytach krwi wydaje się być uzasadnione natomiast w innych rodzajach hipoksji jawi się pytanie czy czas pasażu tych komórek przez hipoksyjne tkanki jest wystarczający dla jego indukcji.

Erytropoetyna

W czasie hipoksji uwolnienie HIF pobudza syntezę erytropoetyny (EPO) przez nerki [55]. EPO reguluje różnicowanie komórek progenitorowych szpiku w erytrocyty [13,31]. W rejonie enhancerowym genu *epo* znajduje się element odpowiadający na hipoksję, z którym łączy się HIF [40]. Jednakże niektóre dane wskazują, że u zdrowych ludzi synteza erytropoetyny, co prawda, zwiększa się już po 120 minutowej hipoksji, kiedy zawartość O $_2$ w powietrzu spadnie do 10% [28], to wzrost ten jest krótkotrwały [9] i obniża się po kilku dniach pomimo przebywania na dużych wysokościach [21].

Podawanie egzogennej EPO poprawiało neowaskularyzację indukowaną przez proces zapalny lub niedokrwienie. Co niezwykle ciekawe, w wspomnianym badaniu chorzy z niestabilną chorobą wieńcową mieli prawie dwukrotnie wyższy poziom EPO niż chorzy ze stabilną chorobą wieńcową [19].

Wydaje się zatem, że niezwiązane z erytropoezą działania erytropoetyny, w tym również na układ sercowo-naczyniowy, są niezwykle obiecującym kierunkiem badań. Prawdopodobnie poprzez zahamowanie apoptozy EPO zwiększa przeżywalność komórek poddanych stresowi oksydacyjnemu *in vitro*, a także zapobiega uszkodzeniu kardiomiocytów spowodowanym ischemią i zawałem serca *in vivo* [49,50]. Poziom endogennej EPO u chorych osiągał szczyt w 3. dniu po zawałe i był jednocześnie istotnie wyższy niż u chorych z niestabilną chorobą wieńcową. Zmiany stężenia EPO korelowały ze zmianami frakcji wyrzutowej lewej komory (LVEF) [43]. Sugeruje się nawet, że zawartość EPO we krwi może być pomoc-

ny czynnikiem prognostycznym w ocenie rozległości zawału i rokowaniach po wykonaniu przezskórnej angioplastyki wieńcowej, gdyż większa zawartość EPO we krwi pacjentów z zawałem serca, którzy w ciągu 12 godzin przeszli zabieg, korelowała z mniejszym poziomem kinazy kreatyninowej, interpretowanym jako wyznacznik utraty kardiomiocytów [45].

Podawanie EPO chorym z przewlekłą niewydolnością serca poprawiło funkcjonowanie serca i zdolność do wysiłków maksymalnych i submaksymalnych. U pacjentów z tej grupy, której podawano EPO zwiększyło się maksymalne zużycie tlenu (VO 2 max), wydłużył się czas wykonywania próby wysiłkowej oraz poprawiła się jakość życia [37].

Dostępne dane doświadczalne i kliniczne sugerują, że stężenie EPO może być czułym markerem hipoksji na poziomie nerek.

Coraz większe zainteresowanie budzi tkankowa synteza EPO. Bez odpowiedzi pozostaje jednak pytanie czy tkankowa synteza EPO, podobnie jak nerkowa, podlega kontroli przez lokalną wartość pO $_2$. Dostępne metody badawcze nie pozwalają również na określenie jaką część całkowitego stężenia EPO stanowi frakcja pozanerkowa.

VEGF

Neoangiogeneza jest jednym z kluczowych kierunków adaptacji do hipoksji. Rozrost łożyska naczyniowego w odpowiedzi na hipoksję dotyczy praktycznie każdej tkanki i organu. Zaobserwowano go przede wszystkim w mięśniach szkieletowych [60], ale również w mózgu [2,17]. Za neowaskularyzację odpowiada szereg czynników wzrostu, z których główną rolę odgrywa czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF), a jego synteza wzrasta w komórkach poddanych hipoksji, co doświadczenie potwierdzono w hodowlach komórkowych śródbłonka naczyń pępowinowych [44] oraz w liniach komórek nowotworowych [23]. Rejon promotorowy genu zawiera również miejsce wiążące dla HIF [33]. Czynnikiem ten jest podstawowym, aczkolwiek nie jedynym aktywatorem syntezy VEGF.

VEGF, głównie poprzez swoje właściwości proangiogenne jest czynnikiem, który wzbudza zainteresowanie badaczy w kontekście chorób układu sercowo-naczyniowego. Zawartość VEGF we krwi u pacjentów ze >70% stenozą jednej tętnicy wieńcowej była wyższa niż w grupie kontrolnej [30]. Przypuszcza się, że przyczyną zaobserwowanego wzrostu może być niedokrwienie z następczą hipoksją wywołaną stenozą. Natomiast zastosowanie prowadzącej do zwiększenia syntezy VEGF w sercu terapii genowej w czasie doświadczalnie wywołanego zawału mięśnia sercowego skutkowało zmniejszeniem powierzchni ściany bocznej dotkniętej niedokrwieniem [72].

Jednak jest też druga strona angiogenezy, która w sposób szczególny dotyczy patofizjologii choroby niedokrwiennej serca (ChNS). W odniesieniu do patogenyzy miażdżycy nie istnieje konsensus, co do roli neowaskularyzacji. Co więcej, dotychczas nie rozstrzygnięto kwestii zasadniczej - czy zwiększone stężenie VEGF w osoczu, odzwierciedlające nasilenie angiogenezy w

przebiegu CHNS jest dla chorego korzystne czy też jest czynnikiem ryzyka? Narasta liczba obserwacji wiążących zwiększone unaczynienie blaszki miażdżycowej z ryzykiem ostrego zespołu wieńcowego [27] burzących jednoznacznie korzystny pogląd na procesy neowaskularyzacji. Dotychczas podejmowane działania terapeutyczne, jak również badania podstawowe koncentrowały się na próbach poprawy unaczynienia obszarów miokardium położonych dystalnie w stosunku do blaszki miażdżycowej. Pojęcie "terapeutycznej angiogenezy" wkroczyło do kliniki chorób układu sercowo-naczyniowego wraz z możliwością zastosowania cytokin z grupy VEGF oraz FGF [58].

Rozstrzygnięcia dotyczące roli VEGF w patogenezie chorób układu sercowo-naczyniowego stały się szczególnie istotne z chwilą dopuszczenia do terapii antagonisty VEGF - Bevacizumabu.

OPN

Ekspresja niektórych markerów hipoksji jest niezależna od HIF. Niezwykle interesująca w tym kontekście wydaje się być osteopontyna (OPN). Glikoproteinie tej pierwotnie wiązanej z przebudową kości, obecnie przypisuje się rolę w procesach odpornościowych, zapalnych i nowotworowych. Produkowana jest w wielu narządach takich jak wątroba, nerki, serce, płuca, rdzeń nadnerczy, jednak przede wszystkim przez komórki nabłonkowe [4, 67]. Jej synteza wzrasta podczas hipoksji, a czynnik aktywujący przylączy się do rejonu enhancera RAE (*ras-activated enhancer*) [77].

Ostatnio zaobserwowano, że OPN bierze udział nie tylko w odpowiedzi hipoksyjnej, ale ma także związek z chorobami sercowo-naczyniowymi. Wyższe stężenie OPN we krwi stwierdzono w grupach chorych ze stenozą naczyń wieńcowych. Było ono proporcjonalnie wyższe w zależności od liczby naczyń wieńcowych dotkniętych większą niż 50% stenozą [47]. Wyższy poziom OPN korelował z częstością poważnych zdarzeń sercowo-naczyniowych podczas 3 letniej obserwacji pacjentów po wykonanej przeszłokornej angioplastyce wieńcowej [26]. Podobnie w stabilnej dusznicy bolesnej początkowy poziom osteopontyny korelował z liczbą zawałów i zgonów występujących podczas blisko 3 letniego okresu obserwacji [41].

Produkowana w sercu osteopontyna uwalniana jest do krążenia wieńcowego także podczas zawału. Jej poziom jest wówczas odwrotnie proporcjonalny do wartości frakcji wyrzutowej lewej komory LVEF [64]. Produkcję OPN w sercu podczas zawału potwierdzają badania na myszach i to zarówno w miejscu zawału, jak też w rejonach od niego oddalonych. Ponadto myszy genetycznie pozbawione OPN odznaczały się dwukrotnie większym przyrostem pojemności lewej komory po zawale i mniejszą zawartością włókien kolagenowych w miejscu zawału i poza nim w stosunku do szczepu dzikiego [66]. Rak osteopontyny spowalniał również rozwój nowych naczyń krwionośnych w bliźnie pozawałowej u myszy pozbawionych genu *opn*. Podawanie egzogennej OPN przyspieszało proces neowaskularyzacji [75].

Badania na szczurach wykazują rów-

nież, że źródłem sercowej OPN nie są kardiomiocyty, a wzrost poziomu tej glikoproteiny znajduje się w koincydencji z rozwojem niewydolności serca [59]. Podobnie u ludzi stężenie OPN we krwi jest najwyższe u chorych z klasą III/IV NYHA, choć już u pacjentów z klasą II zawartość OPN jest wyższa niż w grupie kontrolnej złożonej z osób bez chorób serca [61].

Potencjalne znaczenie OPN jako markera hipoksji w innych tkankach niż mięsień sercowy wymaga dalszych badań.

Zarówno VEGF jak i OPN działają na drodze autokrynej i parakrynej [11, 62]. Określenie zatem zależności pomiędzy zmianą ich stężenia w osoczu a ich lokalną ekspresją wymaga dalszych badań tak klinicznych jak i eksperymentalnych.

Podsumowanie

Ocena głębokości hipoksji wydaje się mieć duże znaczenie, tak prognostyczne jak i terapeutyczne w warunkach klinicznych. W chwili obecnej brak jest czynnościowych wykładników hipoksji. Biorąc pod uwagę fakt, że pojęcie prężności tlenu na poziomie tkanek nie ma charakteru ilościowego (brak norm, brak porównywalnych metod pomiaru) szczególnego znaczenia nabierają parametry biochemiczne, które mogłyby odzwierciedlać stopień niedotlenienia tkanek.

Z uwagi na najkrótszy czas półtrwania HIF wydaje się optymalnym markerem hipoksji ostrej, podczas gdy EPO oraz VEGF pozwalają wyciągać wnioski dotyczące stanu równowagi tlenowej dłuższym okresie. Znaczenie OPN jako potencjalnego markera niezależnego od HIF jest nie do przecenienia, jednak skąpość literatury nie pozwala na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków odnoszących się do tkanek innych niż mięsień sercowy.

Istotną wadą oznaczania stężenia HIF jest fakt, że mierzalne wartości stwierdza się jedynie w środowisku wewnątrzkomórkowym. Wartość kliniczna oznaczania HIF-u w limfocytach krwi krążącej w diagnostyce hipoksji bez towarzyszącej hipoksemii wymaga weryfikacji. Innymi parametrami biochemicznymi mogącymi pełnić rolę markerów hipoksji są VEGF, EPO i OPN. Należy dodać, że obecnie żaden z wymienionych markerów nie jest standardowo stosowany w praktyce klinicznej, pozostając domeną dociekań naukowych. Narastające zainteresowanie fizjologią czynników wzrostu do, których zaliczają się zarówno EPO oraz VEGF jak i OPN pozwala oczekiwać rychłej publikacji wyników badań, które wykażą czy wypełnią one pokładane w nich nadzieje jako markery hipoksji.

Już obecnie jest dostępnych wiele gotowych zestawów biochemicznych przeznaczonych do oznaczania stężeń HIF, EPO, VEGF i OPN we krwi chorego. W związku z ciągle poszerzającą się ofertą obniżeniu ulegają koszty pojedynczego badania, co także zwiększa szansę zastosowania klinicznego takich testów.

Piśmiennictwo

1. Baumann M.U., Zamudio S., Illsley N.P.: Hypoxic upregulation of glucose transporters in BeWo chori-

ocarcinoma cells is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007, 293, C477.

2. Boero J.A., Ascher J., Arregui A. et al.: Increased brain capillaries in chronic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 1999, 86, 1211.
3. Bolton J.D.: Clinical use of lactate testing in shock states. *Semin. Anesth.* 2007, 26, 35.
4. Brown L.F., Berse B., Van de Water L. et al.: Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol. Biol. Cell* 1992, 3, 1169.
5. da Silva Ramos F.J., Azevedo L.C.: Hemodynamic and perfusion end points for volemic resuscitation in sepsis. *Shock* 2010, 34 (Suppl. 1), 34.
6. Davidson D., Stalcup S.A., Mellins R.B.: Systemic hemodynamics affecting cardiac output during hypocapnic and hypercapnic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 1986, 60, 1230.
7. De Jonghe B., Cheval C., Misset B. et al.: Relationship between blood lactate and early hepatic dysfunction in acute circulatory failure. *J. Crit. Care* 1999, 14, 7.
8. Dill R.P., Chadan S.G., Li C. et al.: Aging and glucose transporter plasticity in response to hypobaric hypoxia. *Mech. Ageing Dev.* 2001, 122, 533.
9. Eckardt K.U., Boutellier U., Kurtz A. et al.: Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 1989, 66, 1785.
10. Feldser D., Agani F., Iyer N.V. et al.: Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.* 1999, 59, 3915.
11. Ferrara N., Kerbel R.S.: Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005, 438, 967.
12. Firth J.D., Ebert B.L., Pugh C.W. et al.: Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 6496.
13. Foley R.N.: Erythropoietin: physiology and molecular mechanisms. *Heart Fail. Rev.* 2008, 13, 405.
14. Forsythe J.A., Jiang B.H., Iyer N.V. et al.: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell Biol.* 1996, 16, 4604.
15. Garcia N., Hopkins S.R., Elliott A.R. et al.: Ventilatory response to 2-h sustained hypoxia in humans. *Respir. Physiol.* 2001, 124, 11.
16. Gutierrez G., Wulf M.E.: Lactic acidosis in sepsis: another commentary. *Crit. Care Med.* 2005, 33, 2420.
17. Harik S.I., Hritz M.A., LaManna J.C.: Hypoxia-induced brain angiogenesis in the adult rat. *J. Physiol.* 1995, 485, 525.
18. Heerlein K., Schulze A., Hotz L. et al.: Hypoxia decreases cellular ATP demand and inhibits mitochondrial respiration of a549 cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2005, 32, 44.
19. Heeschen C., Aicher A., Lehmann R. et al.: Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003, 102, 1340.
20. Heidebreder M., Qadri F., Jöhren O. et al.: Non-hypoxic induction of HIF-3alpha by 2-deoxy-D-glucose and insulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 352, 437.
21. Heinicke K., Prommer N., Cajagal J. et al.: Long-term exposure to intermittent hypoxia results in increased hemoglobin mass, reduced plasma volume, and elevated erythropoietin plasma levels in man. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2003, 88, 535.
22. Hockel M., Vaupel P.: Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001, 93, 266.
23. Ikeda E., Achen M.G., Breier G. et al.: Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 19761.
24. Imhof A., Ledergerber B., Gunthard H.F. et al.: Risk factors for and outcome of hyperlactatemia in HIV-infected persons: is there a need for routine lactate monitoring? *Clin. Infect. Dis.* 2005, 41, 721.
25. Iscra F., Gullo A., Biolo G.: Bench-to bedside review: lactate and the lung. *Crit. Care* 2002, 6, 327.
26. Kato R., Momiyama Y., Ohmori R. et al.: Prognostic significance of plasma osteopontin levels in patients undergoing percutaneous coronary interven-

- tion. *Circ. J.* 2009, 73, 152.
27. **Khurana R., Simons M., Martin J.F. et al.:** Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal. *Circulation* 2005, 112, 1813.
 28. **Knaupp W., Khilnani S., Sherwood J. et al.:** Erythropoietin response to acute normobaric hypoxia in humans. *J. Appl. Physiol.* 1992, 73, 837.
 29. **Krishnamachary B., Berg-Dixon S., Kelly B. et al.:** Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res.* 2003, 63, 1138.
 30. **Kucukardali Y., Aydogdu S., Ozmen N. et al.:** The relationship between severity of coronary artery disease and plasma level of vascular endothelial growth factor. *Cardiovasc. Res.* 2008, 9, 66.
 31. **Lacombe C., Mayeux P.:** The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1999, 14 (Suppl. 2), 22.
 32. **Lee S.H., Heo J.S., Han H.J.:** Effect of hypoxia on 2-deoxyglucose uptake and cell cycle regulatory protein expression of mouse embryonic stem cells: involvement of Ca²⁺/PKC and MAPKs and HIF-1 α . *Cell Physiol. Biochem.* 2007, 19, 269.
 33. **Levy A.P., Levy N.S., Wegner S. et al.:** Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 13333.
 34. **Levy B., Gibot S., Franck P. et al.:** Relation between muscle Na⁺K⁺ ATPase activity and raised lactate concentrations in septic shock: a prospective study. *Lancet* 2005, 365, 871.
 35. **MacDonald L., Kruse J.A., Levy D.B. et al.:** Lactic acidosis and acute ethanol intoxication. *Am. J. Emerg. Med.* 1994, 12, 32.
 36. **Malthankar-Phatak G.H., Patel A.B., Xia Y. et al.:** Effects of continuous hypoxia on energy metabolism in cultured cerebro-cortical neurons. *Brain Res.* 2008, 1229, 147.
 37. **Mancini D.M., Katz S.D., Lang C.C. et al.:** Effect of erythropoietin on exercise capacity in patients with moderate to severe chronic heart failure. *Circulation* 2003, 107, 294.
 38. **Marcus N.J., Olson E.B., Jr., Bird C.E. et al.:** Time-dependent adaptation in the hemodynamic response to hypoxia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2009, 165, 90.
 39. **Marrif H., Juurlink B.H.:** Astrocytes respond to hypoxia by increasing glycolytic capacity. *J. Neurosci. Res.* 1999, 57, 255.
 40. **Marzo F., Lavorgna A., Coluzzi G. et al.:** Erythropoietin in heart and vessels: focus on transcription and signalling pathways. *J. Thromb. Thrombolysis* 2008, 26, 183.
 41. **Minoretto P., Falcone C., Calcagnino M. et al.:** Prognostic significance of plasma osteopontin levels in patients with chronic stable angina. *Eur. Heart J.* 2006, 27, 802.
 42. **Munns S.E., Meloni B.P., Knuckey N.W. et al.:** Primary cortical neuronal cultures reduce cellular energy utilization during anoxic energy deprivation. *J. Neurochem.* 2003, 87, 764.
 43. **Nakamura R., Takahashi A., Yamada T. et al.:** Erythropoietin in patients with acute coronary syndrome and its cardioprotective action after percutaneous coronary intervention. *Circ. J.* 2009, 73, 1920.
 44. **Namiki A., Brogi E., Kearney M. et al.:** Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 31189.
 45. **Namiuchi S., Kagaya Y., Ohta J. et al.:** High serum erythropoietin level is associated with smaller infarct size in patients with acute myocardial infarction who undergo successful primary percutaneous coronary intervention. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005, 45, 1406.
 46. **Nouette-Gaulain K., Malgat M., Rocher C. et al.:** Time course of differential mitochondrial energy metabolism adaptation to chronic hypoxia in right and left ventricles. *Cardiovasc. Res.* 2005, 66, 132.
 47. **Ohmori R., Momiyama Y., Taniguchi H. et al.:** Plasma osteopontin levels are associated with the presence and extent of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2003, 170, 333.
 48. **Otto T., Fandrey J.:** Thyroid hormone induces hypoxia-inducible factor 1 α gene expression through thyroid hormone receptor beta/retinoid x receptor alpha-dependent activation of hepatic leukemia factor. *Endocrinology* 2008, 149, 2241.
 49. **Parsa C.J., Kim J., Riel R.U. et al.:** Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 20655.
 50. **Parsa C.J., Matsumoto A., Kim J. et al.:** A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 999.
 51. **Peansukmanee S., Vaughan-Thomas A., Carter S.D. et al.:** Effects of hypoxia on glucose transport in primary equine chondrocytes in vitro and evidence of reduced GLUT1 gene expression in pathologic cartilage in vivo. *J. Orthop. Res.* 2009, 27, 529.
 52. **Rimaud D., Messonnier L., Castells J. et al.:** Effects of compression stockings during exercise and recovery on blood lactate kinetics. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2010, 110, 425.
 53. **Rocha S.:** Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends. Biochem. Sci.* 2007, 32, 389.
 54. **Russell M.J., Dombkowski R.A., Olson K.R.:** Effects of hypoxia on vertebrate blood vessels. *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* 2008, 309, 55.
 55. **Semenza G.L.:** HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 2000, 88, 1474.
 56. **Semenza G.L., Roth P.H., Fang H.M. et al.:** Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 23757.
 57. **Semenza G.L., Wang G.L.:** A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 1992, 12, 5447.
 58. **Simons M., Ware J.A.:** Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2003, 2, 863.
 59. **Singh K., Sirokman G., Communal C. et al.:** Myocardial osteopontin expression coincides with the development of heart failure. *Hypertension* 1999, 33, 663.
 60. **Smith K., Marshall J.M.:** Physiological adjustments and arteriolar remodelling within skeletal muscle during acclimation to chronic hypoxia in the rat. *J. Physiol.* 1999, 521 Pt 1, 261.
 61. **Soejima H., Irie A., Fukunaga T. et al.:** Osteopontin expression of circulating T cells and plasma osteopontin levels are increased in relation to severity of heart failure. *Circ. J.* 2007, 71, 1879.
 62. **Standal T., Borset M., Sundan A.:** Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp. Oncol.* 2004, 26, 179.
 63. **Steinback C.D., Poulin M.J.:** Ventilatory responses to isocapnic and poikilocapnic hypoxia in humans. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2007, 155, 104.
 64. **Tamura A., Shingai M., Aso N. et al.:** Osteopontin is released from the heart into the coronary circulation in patients with a previous anterior wall myocardial infarction. *Circ. J.* 2003, 67, 742.
 65. **Tinton S., Tran-Nguyen Q.N., Buc-Calderon P.:** Role of protein-phosphorylation events in the anoxia signal-transduction pathway leading to the inhibition of total protein synthesis in isolated hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 1997, 249, 121.
 66. **Trueblood N.A., Xie Z., Communal C. et al.:** Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin. *Circ. Res.* 2001, 88, 1080.
 67. **Uenoyama M., Ogata S., Nakanishi K. et al.:** Osteopontin expression in normal and hypobaric hypoxia-exposed rats. *Acta. Physiol. (Oxf).* 2008, 193, 291.
 68. **Vijayasathya C., Damle S., Prabu S.K. et al.:** Adaptive changes in the expression of nuclear and mitochondrial encoded subunits of cytochrome c oxidase and the catalytic activity during hypoxia. *Eur. J. Biochem.* 2003, 270, 871.
 69. **Webster K.A.:** Regulation of glycolytic enzyme RNA transcriptional rates by oxygen availability in skeletal muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* 1987, 77, 19.
 70. **Webster K.A., Discher D.J., Bishopric N.H.:** Induction and nuclear accumulation of fos and jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 16852.
 71. **Wood I.S., Wang B., Lorente-Cebrian S. et al.:** Hypoxia increases expression of selective facilitative glucose transporters (GLUT) and 2-deoxy-D-glucose uptake in human adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 361, 468.
 72. **Yockman J.W., Choi D., Whitten M.G. et al.:** Polymeric gene delivery of ischemia-inducible VEGF significantly attenuates infarct size and apoptosis following myocardial infarct. *Gene. Ther.* 2009, 16, 127.
 73. **Yu S., Zhao T., Guo M. et al.:** Hypoxic preconditioning up-regulates glucose transport activity and glucose transporter (GLUT1 and GLUT3) gene expression after acute anoxic exposure in the cultured rat hippocampal neurons and astrocytes. *Brain Res.* 2008, 1211, 22.
 74. **Yuan J., Narayanan L., Rockwell S. et al.:** Diminished DNA repair and elevated mutagenesis in mammalian cells exposed to hypoxia and low pH. *Cancer Res.* 2000, 60, 4372.
 75. **Zhao X., Johnson J.N., Singh K. et al.:** Impairment of myocardial angiogenic response in the absence of osteopontin. *Microcirculation* 2007, 14, 233.
 76. **Zhou H., Sidel G.M., LaManna J.C.:** Cerebral blood flow adaptation to chronic hypoxia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008, 614, 371.
 77. **Zhu Y., Denhardt D.T., Cao H. et al.:** Hypoxia upregulates osteopontin expression in NIH-3T3 cells via a Ras-activated enhancer. *Oncogene* 2005, 24, 6555.