

Received: 2011.01.31
Accepted: 2011.08.16
Published: 2011.09.28

Patofizjologiczne konsekwencje hemolizy. Rola wolnej hemoglobiny

Pathophysiological consequences of hemolysis. Role of cell-free hemoglobin

Tomasz Misztal, Marian Tomasiak

Zakład Chemii Fizycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Streszczenie

Nadmierna hemoliza nieodłącznie towarzyszy wielu wrodzonym i nabytym chorobom wliczając w to anemię sierpowatą (SCD), czerwienicę, nocną napadową hemoglobinurię (PNH) czy polekowe niedokrwistości hemolityczne. Mimo różnej etiopatologii tych chorób, towarzyszące im objawy są zbliżone i obejmują m.in. nadciśnienie, hemoglobinurię i nadkrzepliwość. Badania ostatnich lat wskazują coraz więcej mechanizmów, leżących u podstaw tych objawów, zwracając szczególną uwagę na znaczenie wiązania przez wolną hemoglobinę (Hb) tlenku azotu (NO) – endogennego czynnika wazorelaksacyjnego i przeciwzakrzepowego. Wyczerpanie ochronnych, fizjologicznych mechanizmów usuwania wolnej hemoglobiny, prowadzi do jej nagromadzenia w osoczu i hemoglobinemii. Ciężka hemoglobinemia prowadzi do hemoglobinurii, która może skutkować uszkodzeniem nerek i rozwojem syndromu Fanconiego. Poważnym zagrożeniem cierpiących na SCD i PNH jest nadciśnienie płucne i ogólnoustrojowe. Może ono prowadzić do wstrząsu krążeniowego, wliczając w to udar i jest związane ze zniesieniem biodostępności NO dla komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Główną przyczyną zgonu pacjentów chorych na SCD i PNH są epizody zakrzepowe. Ich występowanie jest związane z brakiem hamowania płytek krwi przez NO w wyniku jego wiązania przez wolną Hb. Poważnym problemem cierpiących na choroby przebiegające z nadmierną hemolizą są zaburzenia erekcji. Także bezpośrednio cytotoksyczne, prooksydacyjne i prozapalne działanie wolnej hemoglobiny i wolnego hemu składają się na obraz kliniczny chorób hemolitycznych. W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat pojawiania się w osoczu wolnej Hb, mechanizmów jej usuwania oraz interakcji Hb z NO i patofizjologicznych konsekwencji tych procesów. Zrozumienie krytycznej roli hemolizy i wolnej Hb jest istotne z punktu widzenia leczenia pacjentów i projektowania nowych strategii walki z chorobami hemolitycznymi.

Słowa kluczowe:

wolna hemoglobina • hemoliza • tlenek azotu • hemoglobinemia • anemia sierpowata • nocna napadowa hemoglobinuria • nadciśnienie płucne • zaburzenia erekcji • płytki krwi • stan zapalny

Summary

Abundant hemolysis is associated with a number of inherent and acquired diseases including sickle-cell disease (SCD), polycythemia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and drug-induced hemolytic anemia. Despite different etiopathology of hemolytic diseases, many concomitant symptoms are comparable and include e.g. hypertension, hemoglobinuria and hypercoagulation state. Studies in the last years have shown a growing list of mechanisms lying at the basis of those symptoms, in particular irreversible reaction between cell-free hemoglobin (Hb) and nitric oxide (NO) – endogenous vasorelaxant and anti-thrombotic agent. Saturation of protective physiological cell-free Hb-scavenging mechanisms results in accumulation of Hb in plasma and

hemoglobinemia. Extensive hemoglobinemia subsequently leads to hemoglobinuria, which may cause kidney damage and development of Fanconi syndrome. A severe problem in patients with SCD and PNH is pulmonary and systemic hypertension. It may lead to circulation failure, including stroke, and it is related to abolition of NO bioavailability for vascular smooth muscle cells. Thrombotic events are the major cause of death in SCD and PNH. It ensues from lack of platelet inhibition evoked by Hb-mediated NO scavenging. A serious complication that affects patients with excessive hemolysis is erectile dysfunction. Also direct cytotoxic, prooxidant and proinflammatory effects of cell-free hemoglobin and heme compose the clinical picture of hemolytic diseases. The pathophysiological role of plasma Hb, mechanisms of its elimination, and direct and indirect (via NO scavenging) deleterious effects of cell-free Hb are presented in detail in this review. Understanding the critical role of hemolysis and cell-free Hb is important in the perspective of treating patients with hemolytic diseases and to design new effective therapies in future.

Key words: free hemoglobin • hemolysis • nitric oxide • hemoglobinemia • sickle-cell disease • paroxysmal nocturnal hemoglobinuria • pulmonary hypertension • erectile dysfunction • platelets • inflammation

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=961007>

Word count: 4407

Tables: –

Figures: 6

References: 67

Adres autora: mgr Tomasz Misztal, Zakład Chemii Fizycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2B, 15-089 Białystok; e-mail: chemfiz@umwb.edu.pl

Wykaz skrótów: **AMP** – adenosynomonofosforan; **ATP** – trifosforan adenozyne; **cAMP** – 3',5'-cykliczny adenosynomonofosforan; **cgMP** – cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan; **CO** – tlenek węgla; **EDRF** – śródbłonkowy czynnik rozluźniający; **eNOS** – śródbłonkowa syntaza tlenu azotu; **GMP** – guanozynomonofosforan; **gp IIb/IIIa** – glikoproteina IIb/IIIa; **GTP** – trifosforan guanozyne; **Hb** – hemoglobina; **HDL** – lipoproteina o dużej gęstości; **HO-1** – oksygenaza hemowa 1; **Hp** – haptoglobina; **Hx** – hemopeksyna; **ICAM-1** – cząsteczka 1 adhezji międzykomórkowej; **IP₃** – inozytolo-1,4,5-trifosforan; **IRAG** – substrat dla zależnej od cgMP kinazy związany z receptorem inozytolo-1,4,5-trifosforanu; **LDH** – dehydrogenaza mleczanowa; **LDL** – lipoproteina o niewielkiej gęstości; **metHb** – methemoglobina; **MLCK** – kinaza lekkiego łańcucha miozyny; **MLCP** – fosfataza lekkiego łańcucha miozyny; **NADPH** – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego; **NO** – tlenek azotu; **O₂⁻** – anionorodnik ponadtlenkowy; **ODQ** – 1H-[1,2,4]oksadiazolo[4,3-a]chinoksalin-1-on; **ONOO⁻** – nadtlenoazotyn; **oxyHb** – oksyhemoglobina; **PDE3** – fosfodiesteraza 3; **PDE5** – fosfodiesteraza 5' PIP₂ – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan; **PKA** – kinaza białkowa A; **PKG** – kinaza białkowa G; **PLC** – fosfolipaza C; **PNH** – nocna napadowa hemoglobinuria; **PS** – fosfatydyloseryna; **SCD** – anemia sierpowata; **SERCA** – sarkoplazmatyczna Ca²⁺-ATPaza; **sGC** – rozpuszczalna cykla guanylanowa; **TxA2** – tromboksan A2; **VASP** – fosfoproteina stymulowana czynnikiem rozluźniającym; **VCAM-1** – cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonka 1.

WSTĘP

Istnienie skutecznych mechanizmów usuwania wolnej hemoglobiny z osocza krwi oraz bardzo efektywna kompartmentalizacja tego białka wewnątrz erytrocytów sugerują konieczność zapobiegania nadmiernemu nagromadzeniu się wolnej hemoglobiny w osoczu. Lista klinicznych konsekwencji uwalniania hemoglobiny z erytrocytów w wyniku hemolizy spowodowanej przyczynami wrodzonymi, nabytymi lub jatrogennymi stale się wydłuża. Istnieje ogromna liczba prac dotyczących hemolizy wewnątrznaczyniowej i klinicznych implikacji hemoglobinemii w przebiegu

chorób, takich jak czerwienica, zimna i nocna napadowa hemoglobinuria, anemia sierpowata, talasemie, wrodzone enzymopatie i hemoglobinopatie czy polekowe niedokrwistości hemolityczne [2,17,36,40,69]. Obraz kliniczny wymienionych chorób jest odmienny, istnieją jednak wspólne objawy związane z towarzyszącą tym schorzeniom hemoglobinemią. Spośród następstw hemolizy wewnątrznaczyniowej przede wszystkim należy wymienić anemię, nadciśnienie płucne, występowanie epizodów zakrzepowych i inne nieprawidłowości dotyczące układów krwionośnego, pokarmowego, moczowo-płciowego i oddechowego [36,71,78]. Wiele z tych zaburzeń można

tłumaczyć opierając się na mechanizmie nieodwracalnej reakcji hemoglobiny (Hb) z tlenkiem azotu (NO), która zachodzi z dużą szybkością i uniemożliwia dyfuzję NO z miejsc wytwarzania do miejsc docelowych, a tym samym wyklucza jego rolę jako parakrynej cząsteczki sygnałowej [27,42]. Inne zaburzenia są wynikiem bezpośredniego cytotoksycznego, prooksydacyjnego i prozapalnego działania wolnej hemoglobiny oraz uwalnianego się z niej hemu [74].

Od czasu odkrycia roli NO jako czynnika regulującego napięcie mięśni naczyń krwionośnych oraz odpowiadającego za homeostazę wewnątrznaczyniową, szczególnie zainteresowanie badaczy skupiło się na interakcji hemoglobiny z NO u ssaków. W literaturze światowej bardzo dobrze udokumentowana została rola NO także w takich procesach jak aktywacja i agregacja płytek krwi, utrzymanie napięcia wazomotorycznego czy ekspresja cząstek adhezyjnych komórek śródbłonna naczyń [13,15]. Wydaje się, że mechanizmy homeostazy wewnątrznaczyniowej ewoluowały w kierunku ograniczenia toksycznego wpływu wolnej Hb. Szybkość reakcji Hb z NO w warunkach fizjologicznych jest ograniczona kompartmentalizacją Hb wewnątrz erythrocytu. Istnieją jednak mechanizmy zapewniające skuteczne wiązanie i eliminację zewnątrzkomórkowej Hb w czasie prawidłowej, fizjologicznej hemolizy, nieniosącej ze sobą zauważalnych negatywnych skutków. W pracy podjęto próbę syntezy aktualnej wiedzy na temat pojawiania się wolnej Hb i hemu w osoczu, mechanizmów ich usuwania, interakcji Hb z NO i czynników ten proces modulujących, ze szczególnym uwzględnieniem szlaków transdukcji sygnału oraz klinicznych implikacji tych procesów.

MECHANIZMY USUWANIA WOLNEJ HEMOGLOBINY I HEMU Z OSOCZA

Po uwolnieniu Hb z erythrocytu białko to przedostaje się do fazy płynnej osocza, gdzie z formy tetramerycznej przechodzi w formę dimeryczną. Następnie wiąże się z tetramerycznym białkiem osoczym – haptoglobina (Hp), tworząc niedysocjujący kompleks. Kompleks tych białek nie ulega przesączaniu nerkowemu, co zapobiega utracie żelaza. Kompleks hemoglobina-haptoglobina prezentuje neoepitop receptora zmiatającego CD163 obecnego na powierzchni błony makrofagów i monocytów. Następnie odbywa się wiązanie kompleksu do tego receptora, endocytoza i degradacja wewnątrz komórek fagocytujących. W przypadku wiązania przez makrofagi dotyczy to głównie komórek Kupffera (makrofagi osiadłe w zatokach wątroby). Podczas tego procesu nie dochodzi do uwolnienia wolnej Hp i jej powrotu do osocza, dlatego też podczas wzmożonej hemolizy, np. w anemii sierpowatej, stężenie osoczowej Hp jest często poniżej progu detekcji tego białka. Możliwa jest także bezpośrednia interakcja pomiędzy Hb a CD163, jednak z mniejszym powinowactwem niż powyższa reakcja [57]. Buehler i wsp. udowodnili protekcyjną rolę Hp względem Hb, znajdującej się z nią w kompleksie, przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Nieodwracalna modyfikacja oksydacyjna, zachodząca np. podczas stanów zapalnych, utrudnia wychwytywanie wolnej, niezwiązanej z haptoglobina Hb przez receptor CD163. Natomiast w postaci kompleksu z Hp, Hb jest mniej podatna na uszkodzenia oksydacyjne, co pozwala na bardziej efektywne jej usuwanie z osocza [10]. U człowieka gen kodujący Hp występuje w postaci

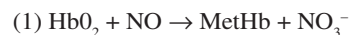
allelicznej, w związku z tym możliwe są trzy genotypy, określane mianem Hp1-1, Hp 2-1 oraz Hp 2-2. Hp 1-1 wykazuje najwyższe powinowactwo do wolnej Hb, allotyp Hp 2-1 pośrednie, a Hp 2-2 najsłabsze [46]. Jeżeli ilość zewnątrzkomórkowej Hb przewyższa możliwości wiązania jej przez Hp, wówczas dochodzi do gromadzenia wolnej Hb w osoczu i wystąpienia hemoglobinemii [4].

Obserwacje Borsody'ego i wsp. dowodzą, że u pacjentów z allelem Hp 2 znacznie częściej dochodzi do skurczu tętnic mózgowych po krwotoku podopajęczynówkowym niż u pacjentów z allelem Hp 1 [7]. Także w wywołanym eksperymentalnie krwawieniu podopajęczynówkowym u transgenicznych myszy z allelem Hp 2 skurcz tętnic mózgowych występował wyraźnie częściej niż u myszy z allelem Hp 1 [12]. Azarov i wsp. wykazali, że kompleks Hb z Hp allotypu 2 jest wiązany i usuwany przez receptor CD163 z wydajnością 2–3-krotnie mniejszą niż kompleks Hb-Hp 1. Związana w kompleks z hemopeksyną wolna Hb posiada podobny potencjał do wiązania NO jak wolna Hb [4]. Dłuższy czas półtrwania kompleksów Hb-Hp 2 w porównaniu do Hb-Hp 1 sprawia więc, że można uznać genotyp Hp 2-2 za czynnik ryzyka w wypadku krwawienia w ośrodkowym układzie nerwowym, mogącym skutkować udarem zatorowym.

Hem, stanowiący element wiążący tlen w cząsteczce Hb – hem (Fe^{2+}) może być utleniany do postaci – hem (Fe^{3+}), która jest uwalniana z części białkowej Hb, a następnie wiązana z dużym powinowactwem przez osoczową glikoproteinę – hemopeksynę (Hx). Kompleks Hx-hem prezentuje neoepitop, który rozpoznawany jest przez receptor zmiatający CD91 komórek Kupffera [50]. Podobnie jak w przypadku Hp obniżone stężenie Hx w osoczu jest markerem wewnątrznaczyniowej hemolizy (ryc. 1). Wyciszenie wszystkich wolnych cząstek Hp i Hx w osoczu, co może wystąpić w przebiegu ostrej bądź przewlekłej hemolizy, powoduje nagromadzenie Hb i hemu w osoczu i moczu. Powoduje to wiele niekorzystnych konsekwencji – Hb z bardzo dużą wydajnością wiąże NO, natomiast hem jest czynnikiem prozapalnym i prooksydacyjnym [1].

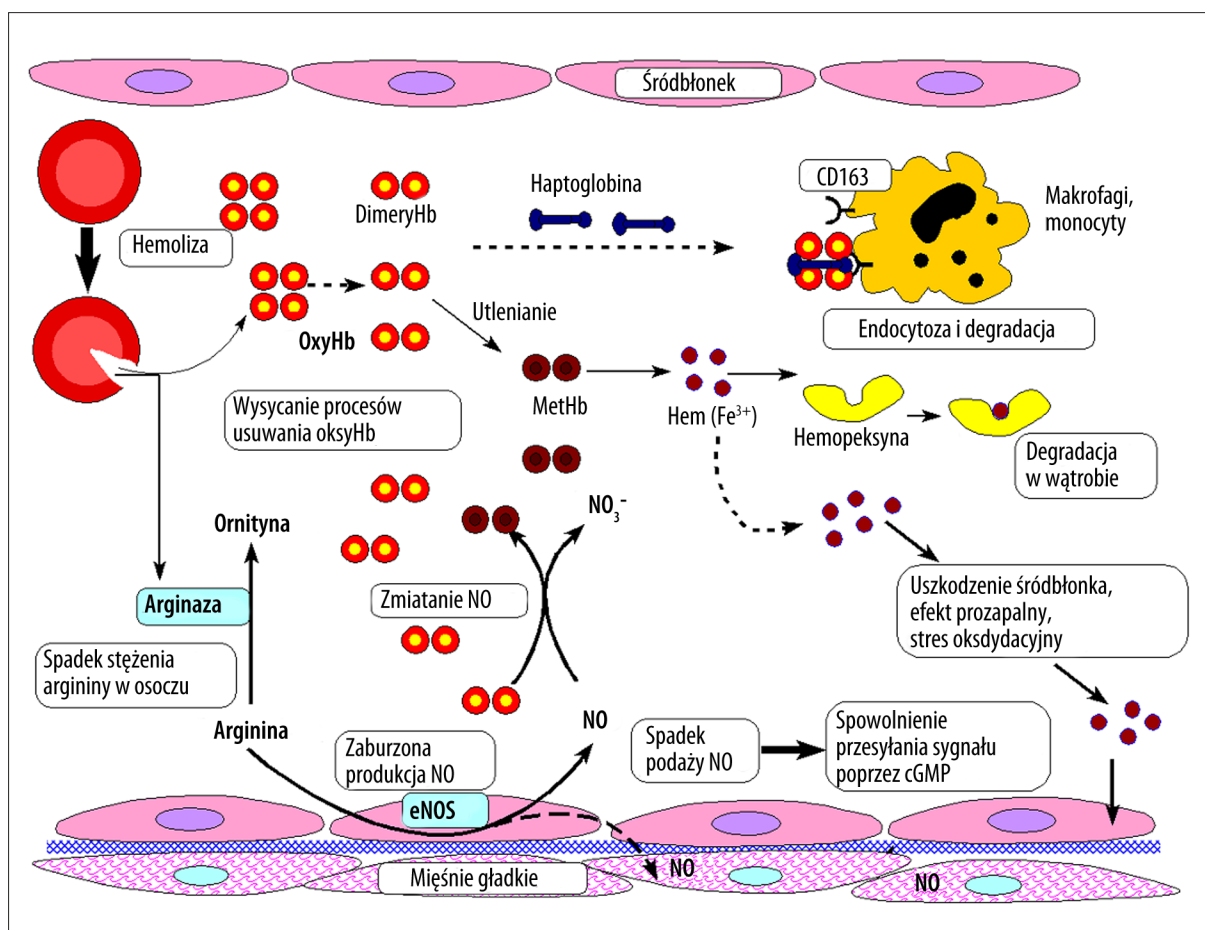
MECHANIZMY OGRANICZAJĄCE REAKCJE HEMOGLOBINY Z TLENKIEM AZOTU

Główną reakcją zachodzącą między NO a Hb jest reakcja dioksygenacji z utlenowaną Hb – oksyhemoglobina, w wyniku której powstają methemoglobina i anion azotanowy (V) (reakcja 1). Stałą szybkości tej reakcji określa się w granicach $6-8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [47]. Podobnie przedstawia się szybkość reakcji NO z nieutlenowaną Hb [4].



W warunkach fizjologicznych oprócz mechanizmów utrzymujących kompartmentalizację Hb wewnątrz erythrocytu (integralność błon plazmatycznych) oraz usuwających wolną Hb z osocza, istnieją naturalne bariery, które znacznie ograniczają reakcję NO z Hb znajdującą się wewnątrz erythrocytu. Należy wymienić tu:

- strefę wolną od erythrocytów,
- „martwą strefę” (unstirred layer) otaczającą erythrocyt oraz
- właściwą barierę błonową erythrocytu.



Ryc. 1. Mechanizmy usuwania wolnej Hb i hemu z osocza. Szczegóły w tekście [47, zmodyfikowano]

Współlistnienie tych trzech naturalnych barier ogranicza reaktywność NO z Hb znajdującą się wewnątrz erythrocytu prawie 1000-krotnie [31].

Pierwszą zewnętrzną barierą jest strefa wolna od erythrocytów (co za tym idzie także od hemoglobiny) znajdującą się w bezpośrednim sąsiedztwie komórek śródbłonnka naczyń. Jej istnienie jest spowodowane występowaniem gradientu prędkości w laminarnym przepływie krwi przez naczynie. Zgodnie z prawem Bernoulliego w centralnej części naczyń krwionośnych prędkość przepływu krwi jest większa, tam też panuje niższe ciśnienie niż w strefie przy ścianie naczyń. Gradient ciśnień kieruje erythrocyty w kierunku środka osi przepływu krwi przez naczynie – w ten sposób powstaje strefa wolna od erythrocytów [31]. Taki sposób przepływu krwi wiąże się z powstawaniem naprężeń ścinających (shear stress), które stymulują komórki śródbłonnka do wytwarzania NO [34,68]. Istnienie strefy wolnej od erythrocytów wydłuża czas półtrwania NO około 1000-krotnie [30]. Liao i wsp. stwierdzili, że ilość Hb zamkniętej w erythrocytach, która jest wymagana do wygenerowania skurczu modelowego naczynia krwionośnego jest 1000-krotnie większa niż ilość wolnej Hb, która powoduje ekwiwalentny skurcz [55].

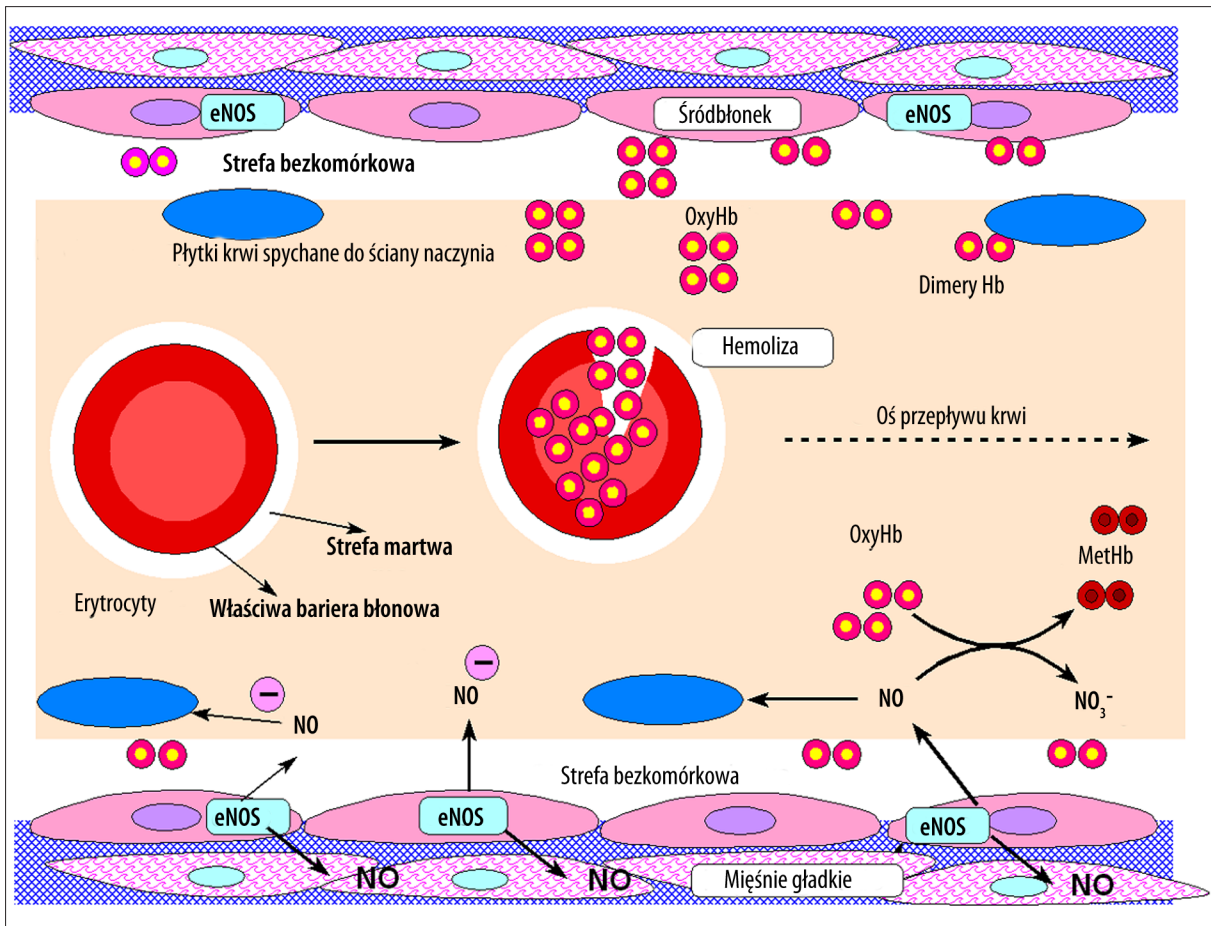
Drugim rodzajem zewnętrznej bariery ograniczającej reakcje NO z Hb jest obecność tzw. „martwej strefy” wokół erythrocytu. W doświadczeniach z wykorzystaniem techniki stopped-flow, w których dokonywano nagłego zmieszania NO z erythrocytami wykazano istnienie regionu

otaczającego erythrocyty, który nawet podczas gwałtownego mieszania pozostawał nieruchomy. Stanowił on dodatkową przestrzeń, przez którą NO musiał przedyfundować, co spowalniało przedostawanie się NO do wnętrza erythrocytu [16,31]. Liu i inni autorzy uważają, że „martwa strefa” wokół erythrocytu jest głównym czynnikiem ograniczającym dyfuzję NO do wnętrza krwinki [37].

Po odkryciu znaczącej roli „martwej strefy” wokół erythrocytu jako głównego ogranicznika dyfuzji NO do erythrocytu, zaproponowano inną, fizyczną barierę dyfuzyjną zwaną „właściwą barierą błonową” (intrinsic membrane barrier). W wielu badaniach polegających na chemicznych i fizycznych modyfikacjach błony oraz białek błonowych uzyskano wyniki sugerujące istotny wpływ błon erythrocytarnych na szybkość zużycia NO [21]. Te doniesienia są jednak kontrowersyjne zważywszy, że NO ma zbliżone właściwości przenikania błon plazmatycznych do tlenu. Integralność błon erythrocytu zapobiega przedostawaniu się do osocza arginazy – enzymu katalizującego rozkład argininy do ornityny, a tym samym ograniczającego dostępność substratu do syntezy NO, jakim jest arginina [17] (ryc. 2). Udział każdej z wyżej wymienionych barier w ograniczaniu interakcji Hb z NO jest obecnie obiektem intensywnych badań.

INTERAKCJE HEMOGLOBINY Z TLENKIEM AZOTU

Za prawidłowe wartości całkowitej Hb we krwi dorosłego człowieka przyjmuje się 13–18 g/dl u mężczyzn, 12–15 g/dl



Ryc. 2. Mechanizmy ograniczające wiązanie NO przez Hb. Szczegóły w tekście [23, zmodyfikowano]

u kobiet, 11–16 g/dl u dzieci. Wartość Hb spada podczas ciąży przeważnie do 11–12 g/dl [39]. Hb zamknięta w obrębie erytrocytów ma zdolność wychwytywania NO, jednak reakcja ta jest limitowana przez wiele czynników omówionych wcześniej. Erythrocyty są zbyt duże, by móc przenikać poza obręb światła naczynia krwionośnego. Może to jednak czynić Hb, która w wyniku hemolizy wydostaje się z erythrocytu i może przedostawać się w pobliże komórek śródbłonka i strefy podśródbłonkowej, a więc bezpośrednio do źródła wytwarzania NO. Wolna Hb ma zatem większy potencjał wychwytywania NO niż Hb zawarta w erythrocytach, gdyż:

- może przedostawać się do strefy wolnej od erythrocytów,
- ma zdolność penetrowania strefy podśródbłonkowej oraz
- nie jest ograniczona przez bariery dyfuzyjne erythrocytu.

Biorąc pod uwagę, że reakcja Hb z NO jest nieodwracalna, a przy tym szybka, stosunkowo niewielka ilość wolnej Hb może doprowadzić do całkowitego związania śródbłonkowego NO i dysfunkcji śródbłonka. Na przykład już 0,01 g/dl wolnej Hb całkowicie blokuje rozkurcz pierścienia aorty poddanego ekspozycji na acetylocholinę [55]. W przebiegu anemii sierpowatej stężenia Hb, które stwierdza się w osoczu pacjentów mieszczą się w zakresie 0,001–0,041 g/dl. U chorych tych stwierdza się często nadciśnienie płucne oraz wyraźne osłabienie rozkurczowego działania donorów NO, takich jak nitroprusydek sodowy i nitrogliceryna. U pacjentów z anemią sierpowatą, w badaniach *in vitro*, uzyskano wysoką korelację ($R=0,92$)

między spadkiem biodostępności NO a stężeniem wolnej Hb w osoczu [55]. Przyjmuje się, że u chorych ze stężeniem wolnej Hb wyższym niż 0,01 g/dl odnotowuje się 80% redukcję zależnych od NO odpowiedzi związanych z przepływem krwi [55]. Na potwierdzenie tego mechanizmu przytoczyć można wyniki doświadczeń, w których wstrzyknięcie osocza pochodzącego od pacjenta z anemią sierpowatą, znosiło vazorelaksacyjne działanie donorów NO na krążenie w przedramieniu osoby zdrowej [18]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach transgenicznych myszy z anemią sierpowatą. U zwierząt tych wykazano także osłabiony wpływ działania donorów NO, skorelowany z poziomem Hb w osoczu [30]. Przytaczane wyżej efekty są nasilone u chorych z nocną napadową hemoglobinurią, drugą obok anemii sierpowatej chorobą, która traktowana jest jako reprezentatywne schorzenie z hemolizą jako cechą charakterystyczną. W jej przebiegu stężenie Hb w osoczu wynosi typowo 0,05–0,2 g/dl i sięga 1 g/dl podczas epizodów hemolitycznych. U tych chorych znakiem rozpoznawczym wzmożonej hemolizy jest hemoglobinuria, znacznie zwiększona aktywność dehydrogenazy mleczanowej w osoczu, a także często dysfagia, ból brzucha, zaburzenia erekcji, epizody zakrzepowe i przewlekłe zmęczenie [8]. Część wyżej wymienionych objawów stwierdza się także u wielokrotnie dializowanych pacjentów, u których stężenie Hb w osoczu może sięgać nawet 3 g/dl [60]. Interesujące wyniki przyniosły badania Donadee i wsp., którzy ocenili, że krew przechowywana przez 39 dni w banku krwi wykazuje zbliżone

do wolnej Hb efekty wazokonstrykcyjne. W wyniku długiego przechowywania zachodzi hemoliza erytrocytów i/lub zrzucanie mikropecherzyków erytrocytarnych, które z podobną stałą szybkości co wolna Hb, reagują z NO (~1000 razy szybciej niż Hb w nieuszkodzonych erytrocytach) [14]. Podkreśla to wagę problemu jakim jest deficyt krótko przechowywanej krwi w stacjach krwiodawstwa i bankach krwi oraz zagrożenie dla pacjentów wypływające z tej sytuacji. U podstaw wyżej wymienionych zaburzeń leży obecność wolnej Hb w osoczu, która pociąga za sobą wiele uciążliwych oraz niebezpiecznych dla zdrowia i życia chorych działań. Mechanizmy szkodliwego wpływu wolnej Hb na funkcjonowanie niektórych narządów i komórek są intensywnie badane. Niżej przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat mechanizmu działania wolnej Hb w poszczególnych zaburzeniach.

HEMOGLOBINURIA

Jednym z najczęstszych objawów nasilonej hemolizy, ale także podania preparatów na bazie hemoglobiny, jest wystąpienie hemoglobinurii [22]. Hemoglobina jest filtrowana w kłębuszkach nerkowych i aktywnie reabsorbowana w kanalikule proksymalnym. W komórkach kanalikula proksymalnego zachodzi uwolnienie żelaza z hemu i magazynowanie go w postaci hemosyderyny [55]. Gdy zdolność komórek kanalikula proksymalnego do aktywnej reabsorpcji Hb ulegnie wyczerpaniu, wówczas Hb pojawia się w moczu. Hemoglobinuria może prowadzić do ostrej niewydolności nerek i często współistnieje ze znacznym nagromadzeniem hemosyderyny w komórkach kanalików proksymalnych, rozwojem przewlekłej niewydolności nerek i zespołu Fanconiego (charakteryzującego się zaburzeniem reabsorpcji drobnocząsteczkowych substancji w tym wody, aminokwasów, glukozy i licznych jonów) [26,47,52]. Wyniki najnowszych badań wskazują, że wolna Hb pojawiająca się we krwi pacjentów po transplantacjach (np. serca), operacji pomostowania aortalno-wieńcowego oraz wielokrotnych hemodializ, może występować w podwyższonym stężeniu przez relatywnie długi okres rekonwalescencji. Skutkiem tego może być rozwinięcie przewlekłego zapalenia nerek z charakterystycznymi zmianami, np. nekroza komórek kanalików proksymalnych czy obniżenie klirensu kreatyniny [42,70,81].

WPLYW WOLNEJ HEMOGLOBINY NA NAPIĘCIE MIĘŚNI GŁADKICH NACZYŃIA KRWIONOŚNEGO

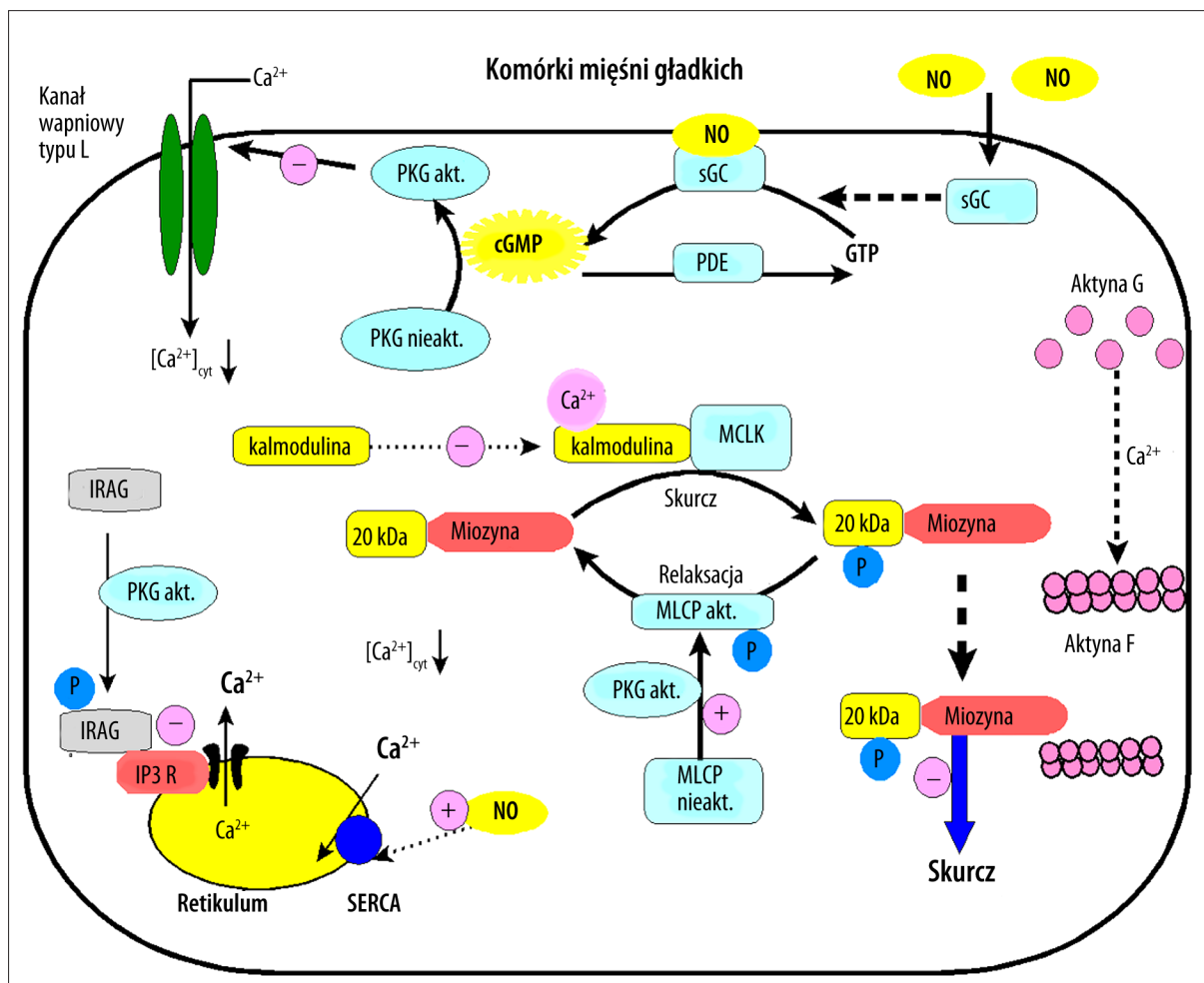
NO jest śródbłonkowym czynnikiem rozluźniającym (EDRF – endothelium-derived relaxing factor), który reguluje stan napięcia mięśni gładkich naczyń krwionośnych. W komórkach śródbłonka naczyń NO wytwarzany jest z argininy przez śródbłonkową izoformę syntazy tlenu azotu (eNOS – endothelial nitric oxide synthase). Cząsteczki NO dyfundują przez błonę komórek śródbłonka we wszystkich kierunkach, w tym w kierunku warstwy komórek mięśni gładkich naczyń, leżących bezpośrednio pod warstwą śródbłonka. Mechanizm wazorelaksacyjnego działania NO opiera się na aktywacji rozpuszczalnej cyklicznej guanylanowej (sGC – soluble guanylate cyclase) w komórkach mięśni gładkich naczyń. Ten cytosolowy enzym katalizuje reakcję przekształcenia GTP w cykliczną postać – cGMP, który jest cząsteczką sygnałową, aktywującą zależną od cGMP kinazę białkową – kinazę białkową G (PKG – protein kinase

G). Enzym ten jest serynowo-treoninową kinazą, fosforylującą wiele cytosolowych białek, a jednocześnie miejscem rozgałęzienia szlaku transdukcji sygnału. Wynikiem końcowym jest zahamowanie możliwości skurczu komórki mięśniowej poprzez spadek cytosolowego stężenia wapnia i regulacyjną modyfikację miozyny [25,63]. W miozytach naczynia krwionośnego swoistym substratem dla PKG jest fosfataza lekkiego łańcucha miozyny (MLCP – myosin light chain phosphatase). Ufosforylowana postać MLCP defosforyluje lekki łańcuch w cząsteczce miozyny, co uniemożliwia zajście interakcji miozyny z aktyną. Rezultatem jest brak skurczu komórki mięśniowej, a więc relaksacja mięśniówki naczynia [63].

Innym mechanizmem prowadzącym do relaksacji mięśni gładkich jest obniżenie cytosolowego stężenia jonów wapnia. Napięcie mięśni gładkich jest regulowane przez cytosolowe stężenie jonów wapnia. Wzrost stężenia Ca^{2+} jest molekularnym sygnałem do skurczu mięśnia. Mechanizm obniżania wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} przez NO odbywa się za pośrednictwem szlaku, w którym główną rolę odgrywa PKG [24]. PKG bezpośrednio fosforyluje błonowy kanał potasowy, co prowadzi do zwiększonej przepuszczalności dla jonów K^+ , które przemieszczają się na zewnątrz komórki. Otwarcie kanałów potasowych powoduje depolaryzację błony plazmatycznej i zamknięcie obecnych w niej kanałów wapniowych typu L. Skutkiem tego jest ograniczenie napływu jonów Ca^{2+} ze środowiska wewnątrzkomórkowego do cytosolu [63].

Drugi mechanizm prowadzący do ograniczenia cytosolowego stężenia Ca^{2+} opiera się na fosforylacji przez PKG białka IRAG (Ins(1,4,5)P-receptor-associated cGKI substrate). Białko to po fosforylacji oddziałuje z receptorem dla inozytolo-1,4,5-trifosforanu (IP_3). Receptor ten umiejscowiony jest w błonie retikulum endoplazmatycznego i pełni funkcję kanału wapniowego. IP_3 jest produktem hydrolizy fosfolipidu błonowego – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP_2) przez fosfolipazę C (PLC – phospholipase C) i pełni funkcję wtórnego przekaźnika sygnału. Oddziaływanie białka IRAG z receptorem IP_3 hamuje wpływ Ca^{2+} z retikulum endoplazmatycznego, które jest wewnątrzkomórkowym rezerwuarem Ca^{2+} [59]. W komórkach mięśni gładkich dominującą postacią PKG jest izoforma PKG typu I β , dla której głównym substratem jest białko IRAG. Wskazuje to, że głównym mechanizmem oddziaływania NO/cGMP na stężenie wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} w mięśniach gładkich naczyń jest fosforylacja białka IRAG [25].

Kolejny mechanizm obniżający cytosolowe stężenie Ca^{2+} opiera się na bezpośredniej, niezależnej od PKG, aktywacji przez NO sarkoplazmatycznej Ca^{2+} -ATP-azy (SERCA – sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase). Enzym ten pełni funkcję zależnej od ATP pompy wapniowej transportującej jony Ca^{2+} z cytosolu do magazynów wewnątrzkomórkowych. W ten sposób obniżone zostaje cytosolowe stężenie jonów wapnia po aktywacji (której towarzyszy powstanie sygnału wapniowego) do poziomu spoczynkowego. NO poprzez stymulację pompy SERCA przyczynia się do napełnienia wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych, ograniczenia napływu jonów Ca^{2+} do cytosolu i w konsekwencji do obniżenia wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} [49] (ryc. 3).



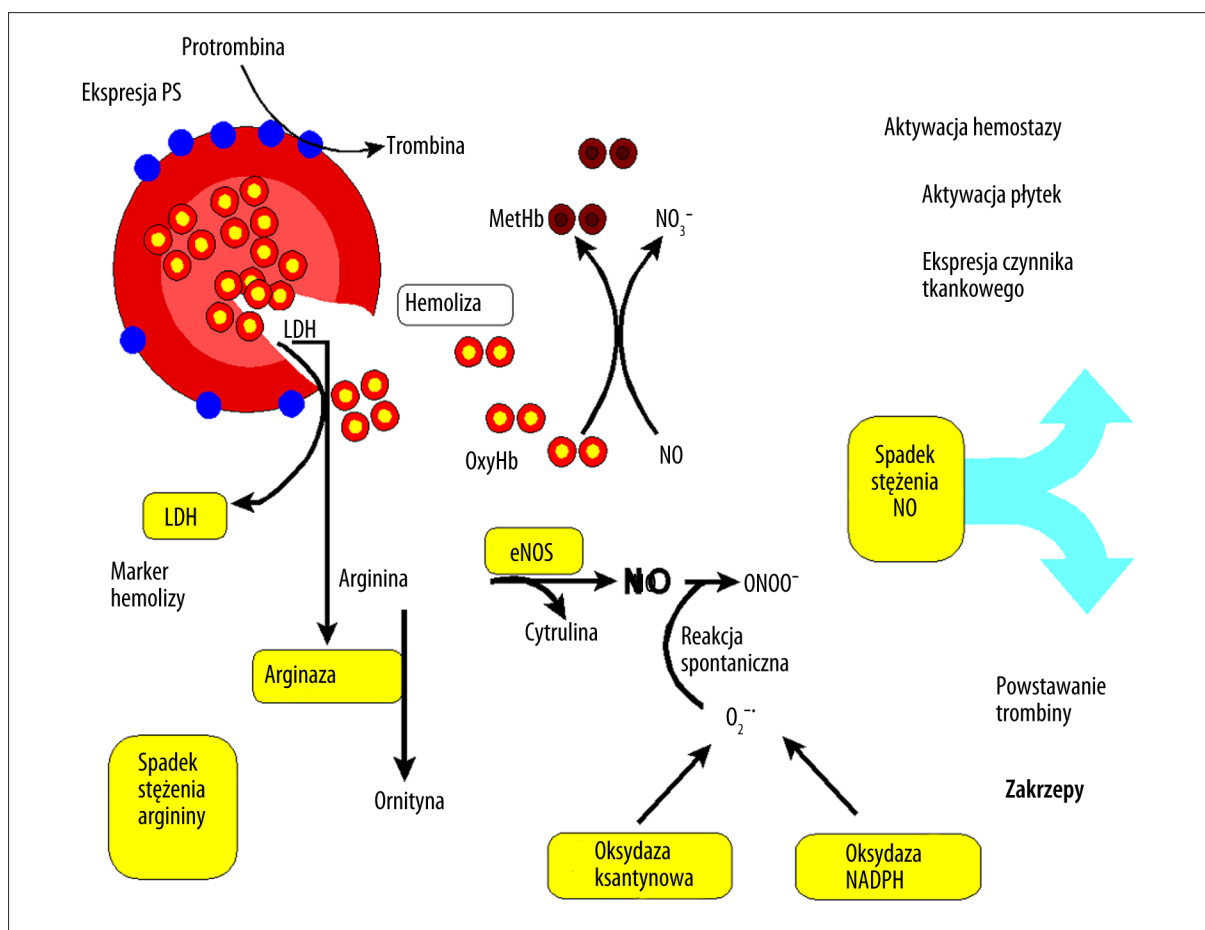
Ryc. 3. NO oddziałuje na wiele wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału w komórkach mięśni gładkich. Objawia się to wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia cGMP, spadkiem cytosolowego stężenia jonów Ca^{2+} i relaksacją aparatu kurczliwego komórki. Szczegóły w tekście

Przerwanie powyższych szlaków transdukcji sygnału, w wyniku ograniczenia biodostępności NO przez Hb, skutkuje zniesieniem kontroli nad napięciem mięśni naczyń krwionośnych, skurczem mięśni ściany naczyń i w rezultacie wzrostem ciśnienia.

NADCIŚNIENIE TĘTNICZE

Wzrost ciśnienia tętniczego jest jednym z głównych skutków wewnątrznaczyniowej hemolizy. Towarzyszy on takim chorobom jak: wrodzone i nabyte anemie hemolityczne, w tym anemia sierpowata [11,19,44], talasemie [45,64], nocna napadowa hemoglobinuria [23,24], wrodzona sfero- i stomatocytoza [28], mikroangiopacyjne anemie hemolityczne. Obecnie panuje zgodność, co do mechanizmu powstawania nadciśnienia w chorobach związanych z hemolizą. Za główną przyczynę uznaje się zużywanie NO przez uwolnioną z erytrocytów Hb, co prowadzi do skurczu mięśni gładkich naczyń krwionośnych i w rezultacie do wzrostu ciśnienia tętniczego [29,32,38,43]. Nadciśnienie jest jednym z głównych czynników wpływających na jakość życia chorych z wewnątrznaczyniową hemolizą i może prowadzić do śmierci wskutek udaru, będącego główną przyczyną zgonu u chorych na anemię sierpowatą, zwłaszcza u dzieci. Często w tych schorzeniach

nadciśnieniu towarzyszy tendencja do powstawania zakrzepów. U chorych stwierdza się zakrzepy w drobnych naczyniach krwionośnych, a także w głęboko położonych, dużych żyłach i tętnicach. Potęguje to ryzyko udaru niedokrwiennego mózgu i stanowi bezpośrednie zagrożenie dla życia chorych [11] (ryc. 4). Podawanie donatorów NO, takich jak nitrogliceryna czy nitroprusydek sodowy, cierpiącym na związane z hemolizą nadciśnienie powodowało relaksację mięśni naczyń krwionośnych i obniżenie ciśnienia [55]. Podobny efekt obserwowany był podczas inhalacji NO [65]. Wczesne doświadczenia z zastosowaniem preparatów krwiozastępczych na bazie roztworów Hb związane były z problemem wzrostu ciśnienia u pacjentów, co stanowiło zagrożenie dla ich życia. Jednak, jak wykazali Yu i wsp., podawanie tych preparatów bez szkodliwego wzrostu ciśnienia jest możliwe przy zapewnieniu jednoczesnej inhalacji NO przez pacjenta [79]. Jest to związane z całkowitym zniesieniem biodostępności NO dla komórek mięśni gładkich naczyń i w konsekwencji z niemożnością relaksacji mięśniówki naczyń. Skutkuje to nagłym skurczem mięśni naczyń i wzrostem ciśnienia. Potwierdza to rolę dostępności NO w etiopatologii nadciśnienia związanego z hemolizą i stanowi wyznacznik kierunku poszukiwań skutecznych środków do walki z tą postacią nadciśnienia.



Ryc. 4. W przebiegu anemii sierpowatej dochodzi do nadmiernej hemolizy erytrocytów. Uwolniana z komórek Hb wiąże NO, natomiast wydostająca się z nich arginaza ogranicza syntezę NO *de novo*. Wolna Hb może indukować powstawanie anionorodnika nadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) poprzez stymulację oksydazy ksantynowej lub oksydazy NADPH. W wyniku spontanicznej reakcji NO z $O_2^{\cdot-}$ powstaje bardzo reaktywny nadtlenoazotyn ($ONOO^-$). Spadek biodostępności NO powoduje aktywację płytek krwi. Ulegające hemolizie erytrocyty ekspozycją ponadto na zewnętrznej monowarstwie błony plazmatycznej fosfatydyloserynę (PS), co prowadzi do aktywacji trombiny i powstawania zakrzepów [10, zmodyfikowano]

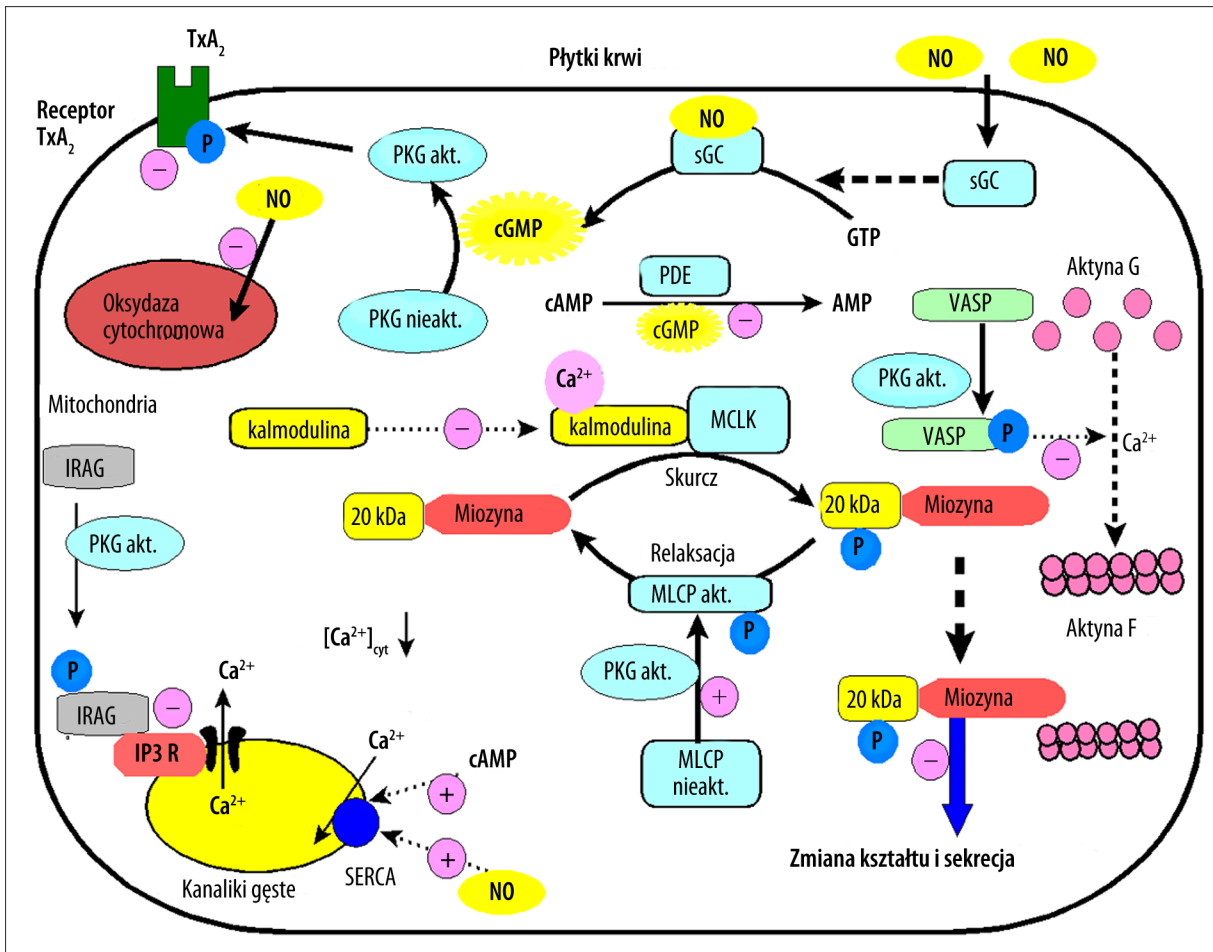
ZABURZENIA EREKCJI

Częstym problemem u chorych z podwyższonym stężeniem wolnej Hb w osoczu są zaburzenia erekcji. Przyczynę tej dysfunkcji upatruje się w wychwytywaniu NO przez wolną Hb. NO wytwarzany jest przez stymulowane komórki nerwowe unerwiające ciała jamiste penisa oraz komórki śródbłonna naczyń. NO jest czynnikiem warunkującym relaksację mięśni gładkich naczyń odpowiadających za doprowadzenie krwi do ciał jamistych, czego następstwem jest pełna erekcja [61]. W sytuacji niedoboru NO nie jest możliwy dostateczny rozkurcz mięśniówki tychże naczyń i stąd zaburzenia erekcji. Mechanizm relaksującego działania NO na komórki mięśni gładkich przedstawiono wcześniej. Związki będące inhibitorami fosfodiesterazy 5 (PDE5 – phosphodiesterase 5), takie jak sildenafil, wardenafil, tadalafil czy awanafil hamują rozkład cGMP do GMP. Zastosowanie tych leków prowadzi do akumulacji cGMP w komórkach mięśni gładkich naczyń, co umożliwia ich relaksację i w rezultacie erekcję [35]. Inhibitory PDE5 okazały się skuteczne nie tylko w leczeniu zaburzeń erekcji, ale też nadciśnienia spowodowanego obecnością wolnej Hb w osoczu [33,48].

WPLYW WOLNEJ HEMOGLOBINY NA PŁYTKI KRWI

Zwiększona aktywność płytek krwi jest poważnym objawem towarzyszącym chorobom, których przebieg jest związany z pojawieniem się wolnej Hb w osoczu. Epizody zakrzepowe często występują u chorych na anemię sierpowatą [71] oraz stanowią główną przyczynę zgonu u chorych na nocną napadową hemoglobinurię [55]. Mechanizm hamującego wpływu NO na płytki polega głównie na blokowaniu wzrostu cytosolowego stężenia jonów Ca^{2+} , hamowaniu reorganizacji cytoskieletu oraz wytwarzaniu energii w mitochondriach.

NO aktywuje w płytkach sGC, która wytwarza cGMP. Prowadzi to do aktywacji PKG, której przypisuje się rolę w hamowaniu aktywności płytek, w tym agregacji, sekrecji, aktywacji receptorów integrynowych i reorganizacji cytoskieletu [75]. Poznano część mechanizmów hamowania aktywności płytek krwi przez PKG. Jednym z nich jest fosforylacja białka VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein), które reguluje dynamikę powstawania aktywnej F poprzez wiązanie się do mikrofilamentów aktynowych i monomerów aktyny [77]. Fosforylacja swoistej reszty seryny w białku VASP dodatnio koreluje z zahamowaniem agregacji płytek, wiązania fibrynogenu do receptorów integrynowych gp IIb/IIIa i adhezji płytek [58,77].



Ryc. 5. NO działa hamująco na odpowiedzi płytek krwi poprzez wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cGMP i cAMP, spadek cytosolowego stężenia jonów Ca²⁺, hamowanie wytwarzania energii w mitochondriach, inaktywację receptora TxA₂ oraz blokowanie interakcji aktyny z miozyną. Szczegóły w tekście

Innym scharakteryzowanym w płytkach mechanizmem jest, podobnie jak w mięśniach gładkich, fosforylacja przez PKG białka IRAG, co skutkuje zahamowaniem napływu do cytosolu Ca²⁺ z magazynów wewnątrzkomórkowych (układu kanalików gęstych) [3]. PKG może też fosforylować receptor tromboksanowy, co uniemożliwia jego interakcje z białkiem G po związaniu agonisty. W rezultacie blokuje to szlak transdukcji sygnału biegnący od receptora tromboksanowego poprzez PLC do IP₃ [25]. Wyniki badań Massberga i wsp. z wykorzystaniem myszy pozbawionych genu PKG typu I dowodzą, że PKG niewątpliwie pełni funkcję antyagregacyjną. W badaniu tym płytki myszy pozbawionych genu PKG okazały się niewrażliwe na działanie NO oraz analogów cGMP [41]. Podobnie jak w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych, także w ludzkich płytkach krwi, w systemie kanalików gęstych, znajduje się pompa SERCA aktywowana przez NO [67]. Obniżenie cytosolowego stężenia jonów Ca²⁺ uniemożliwia aktywację kinazy lekkiego łańcucha miozyny (MLCK – myosine light chain kinase), przez co hamuje zmianę kształtu płytek, a tym samym adhezję i agregację [58].

cGMP *per se* także hamuje odpowiedzi płytek krwi. W dużych stężeniach hamuje on fosfodiesterazę 3 (PDE3 – phosphodiesterase 3), która odpowiada za hydrolizę cAMP (i w mniejszym stopniu cGMP) do postaci niecyklicznej

– AMP (i analogicznie GMP) [6]. W rezultacie dochodzi do nagromadzenia cAMP w cytosolu, co pociąga za sobą wiele hamujących działań. Hamujące działanie podwyższonego stężenia cAMP na proces aktywacji płytek polega na jego oddziaływaniu na kinazę białkową A (PKA – protein kinase A), co powoduje oddysocjowanie jej aktywnej podjednostki katalitycznej. Podjednostka ta aktywuje pompę wapniową, umiejscowioną w błonach układu kanalików gęstych, co powoduje transport jonów Ca²⁺ z cytosolu do wewnątrzkomórkowych magazynów [80] (ryc. 5).

NO może także hamować sekrecję płytkową (proces w dużym stopniu zależny od ATP) przez zmniejszenie wytwarzania energii w mitochondriach. Zachodzi to poprzez przejściowe wiązanie NO do miejsca wiążącego tlen w oksydoreduktazie cytochrom c: tlen i zmniejszenie w ten sposób jej aktywności [9]. Tomasiak i wsp. wykazali, że zastosowanie inhibitora sGC – ODQ, nie wpływa na zahamowanie wytwarzania energii w mitochondriach płytek wieprzowych poddanych działaniu donorów NO. Dowodzi to bezpośredniego, niezależnego od szlaku cGMP/PKG, hamowania wytwarzania energii w płytkach przez NO [66].

NO może także bezpośrednio wpływać na aktywność czynników krzepnięcia, interferując w procesy tworzenia skrzepu. Na przykład NO modyfikuje czynnik XIII

(czynnik stabilizujący skrzep), zmniejszając jego aktywność. Wiązanie NO przez wolną hemoglobinę może więc wzmacniać stabilność skrzepu i utrudniać jego lizę [73].

Biorąc pod uwagę, że zakrzepy wewnątrznaczyniowe stanowią znaczny procent bezpośredniej przyczyny zgonów w chorobach hemolitycznych, duży nacisk kładzie się obecnie na opracowanie skutecznych leków znoszących aktywację płytek. Zastosowanie znalazły leki będące inhibitorami fosfodiesterazy 3, swoistej dla płytek krwi, np. dipirydamol, powodujący wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cGMP i cAMP [52]. Villagra i wsp. wykazali natomiast, że sildenafil (inhibitor PDE 5) istotnie hamuje ekspresję aktywnych receptorów integrynowych gp IIb/IIIa na powierzchni płytek pacjentów z anemią sierpowatą [72]. Sildenafil potencjalizuje także hamujący wpływ donorów NO na aktywację płytek u pacjentów z anemią sierpowatą [20]. Ze względu na swoistą ścieżkę aktywacji płytek w chorobach hemolitycznych, polegającą w mniejszym stopniu na aktywacji przez agonistę, a raczej na zniesieniu zależnego od NO hamowania, znalezienie skutecznego leku przeciwplatekowego stanowi skomplikowane wyzwanie. Konieczne są jednak dalsze intensywne badania nad lekami przeciwplatekowymi, dające nowe nadzieje na wydłużenie i poprawę jakości życia pacjentów.

PROZAPALNE DZIAŁANIE WOLNEJ HEMOGLOBINY I HEMU

W wyniku hemolizy wolna Hb i hem przedostają się do osocza, co niesie ze sobą ryzyko odpowiedzi prozapalnej. Hem prowadzi do aktywacji neutrofilów, a także stymuluje ekspresję cząstek adhezyjnych ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) i selektyny E na powierzchni komórek śródbłonna *in vitro* [72]. Ekspresja tych cząstek prawdopodobnie jest związana także z wychwytywaniem NO przez Hb. De Caterina i wsp. wykazali, że NO hamuje indukowaną przez cytokiny ekspresję ICAM-1, VCAM-1 i selektyny E, wykazując działanie przeciwzapalne [55]. Wolna Hb z żelazem hemowym w drugim stopniu utlenienia (Fe^{2+}) może brać udział w reakcji Fentona, czego następstwem jest generowanie ekstremalnie reaktywnego rodnika hydroksylowego.

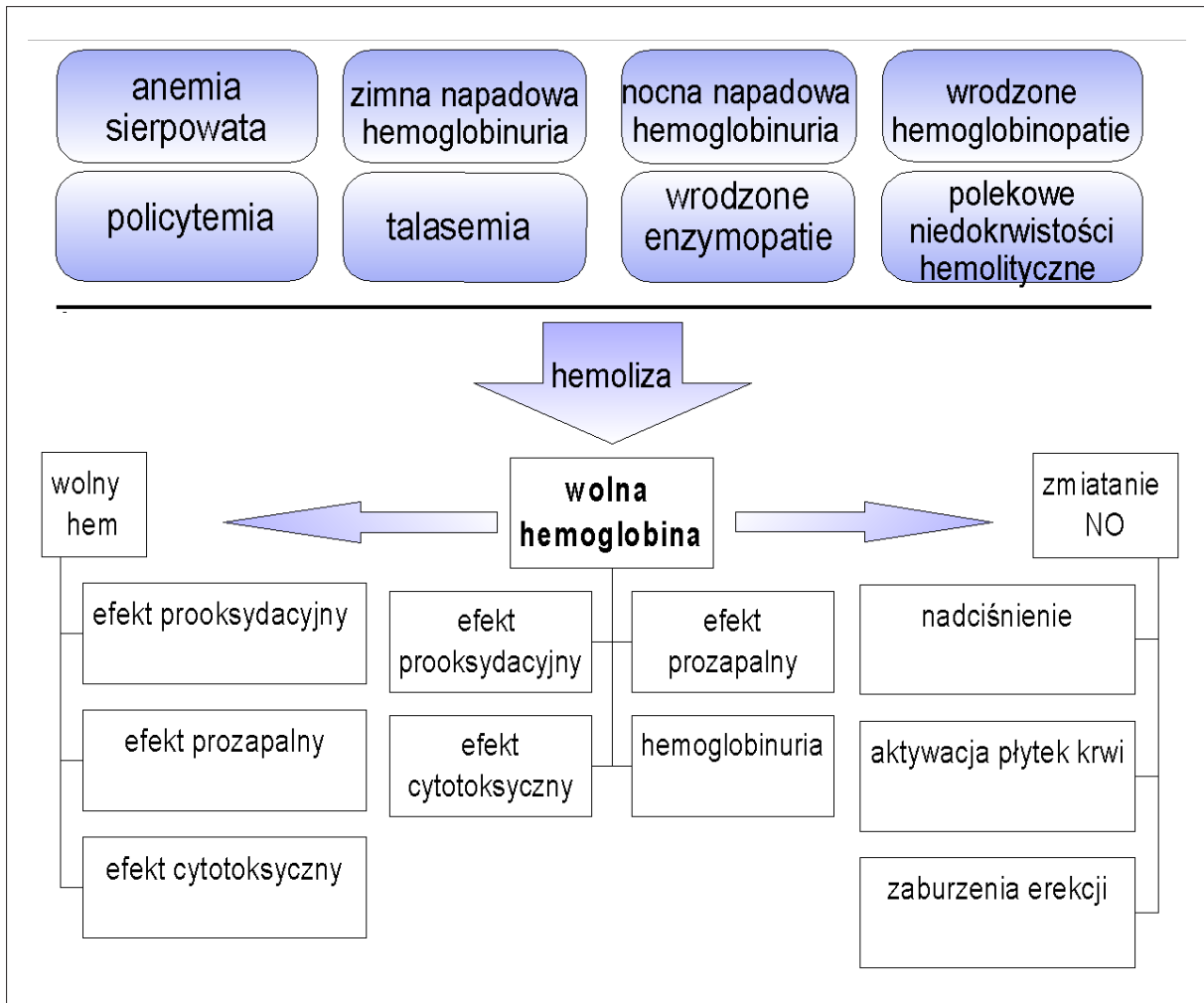
Jak wykazali Watanabe i wsp., haptoglobina i hemopeksyna mogą się przyłączać do osoczowych lipoprotein o dużej gęstości (HDL – high density lipoprotein) i modulować ich funkcje przeciwzapalne. Wolna Hb i wolny hem, które w wyniku hemolizy przedostają się do osocza, mogą być związane zarówno przez (odpowiednio) Hp i Hx przyłączone do HDL, jak i przez postaci wolne, krążące w osoczu. Jeżeli Hb wiąże się z Hp połączoną z HDL, wówczas nie jest możliwe rozpoznanie neopeptopu przez receptor CD163 makrofaga. Analogicznie sytuacja wygląda w przypadku hemu i Hx związanych do HDL i niemożności wychwycenia tego kompleksu przez receptor CD91. Autorzy tych badań sugerują, że kompleksy Hb/Hp/HDL i hem/Hx/HDL indukują efekty prozapalne, takie jak: spadek stężenia i aktywności czynników przeciwzapalnych oraz antyoksydantów, zwiększenie zawartości nadtlenków lipidów w błonach plazmatycznych, zmniejszenie zdolności HDL do zapobiegania utlenianiu lipoprotein o niewielkiej gęstości (LDL – low density lipoprotein) [76].

Na drugim biegunie modulacji stanu zapalnego znajdują się bezpośrednie produkty rozkładu hemu i Hb. Oksygenaza

hemowa 1 (HO-1 – hem oxygenase-1) katalizuje reakcję rozpadu układu hemowego, w wyniku czego powstają: CO, biliwerdyna i wolne żelazo. Wolne żelazo jest inkorporowane przez ferrytynę, co zapobiega reakcji Fentona [55]. Z kolei biliwerdyna wykazuje właściwości antyoksydacyjne, podobnie jak reduktaza biliwerdyny, redukująca biliwerdynę do bilirubiny [62]. CO jest z kolei związkami o właściwościach wazorelaksacyjnych, przeciwzapalnych i antyoksydacyjnych m.in. poprzez indukcję ekspresji wewnątrzkomórkowej dysmutazy ponadtlenkowej (katalizującej rozkład $O_2^{\cdot-}$ i ograniczającej przez to formowanie silnie toksycznego ONOO⁻ oraz zwiększanie biodostępności NO) [1, 56]. Degradacja hemu przez HO-1 ogranicza także ekspresję indukcyjnych, zależnych od hemu enzymów prozapalnych, takich jak iNOS (inducible nitric oxide synthase) oraz oksydaza NADPH [1]. Przyłączenie kompleksu Hb/Hp do receptora CD163 skutkuje z kolei indukcją przeciwzapalnej interleukiny 10 oraz HO-1 w krążących monocytach [50]. Monocyty CD163⁺ wykazują wysoką ekspresję HO-1 w odpowiedzi na wiązanie kompleksu Hb-Hp, podczas gdy inne populacje leukocytów nie wykazują tej właściwości. Z drugiej strony traktowanie monocytów lipopolisacharydem skutkuje zmniejszeniem stopnia ekspresji CD163 na powierzchni błony plazmatycznej i obniżeniem wychwytu kompleksów Hb-Hp [57]. Upośledzenie wychwytu kompleksów Hb-Hp przez monocyty może więc przyczyniać się do zwiększonej toksyczności kompleksów Hb-Hp w ogólnoustrojowych stanach zapalnych. Układ CD163/HO-1/reduktaza biliwerdyny wydaje się ewolucyjnym przystosowaniem kompensującym prozapalne i wazokonstrykcyjne efekty wiązania NO oraz prooksydacyjne funkcje wolnej Hb, hemu i żelaza hemowego [1].

PODSUMOWANIE

Zachodząca w niekontrolowany sposób, patologiczna hemoliza i towarzyszące jej pojawienie się w osoczu wolnej Hb mogą stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia i życia chorych. Liczne badania, prowadzone zarówno na ochotnikach, jak i na modelach zwierzęcych, przedstawiają długą listę poważnych komplikacji zdrowotnych będących skutkiem nadmiernej hemolizy, wliczając w to: nadciśnienie ogólnoustrojowe i płucne, zaburzenia erekcji, nadmierną aktywację płytek krwi, dysfunkcję śródbłonna naczyń krwionośnych, nerek czy pojawianie się stanów zapalnych (ryc. 6). Szkodliwe działanie hemoglobinemii obecnie tłumaczy się bezpośrednim cytotoksycznym i prozapalnym działaniem wolnej Hb i wolnego hemu oraz wychwytywaniem tlenu azotu przez uwolnioną z erytrocytów Hb, co prowadzi do zaburzenia homeostazy wewnątrznaczyniowej. W chorobach przebiegających z wewnątrznaczyniową hemolizą stężenia wolnej Hb w osoczu chorych są na tyle wysokie by efektywnie wiązać NO znosząc tym samym jego biodostępność. Obecnie powszechnie akceptowany jest pogląd, że nieodwracalne wiązanie NO stanowi najpoważniejszą konsekwencję nadmiernej hemolizy. Ograniczanie dostępności NO jest również najbardziej ograniczającym czynnikiem w opracowywaniu i stosowaniu preparatów krwiozastępczych bazujących na hemoglobinie. Zrozumienie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw, opisywanych w niniejszym opracowaniu, stanów patologicznych pozwala mieć nadzieję na opracowanie skutecznych leków poprawiających jakość życia chorych. Przykładem takich leków są



Ryc. 6. W przebiegu wielu wrodzonych i nabytych chorób występuje nadmierna hemoliza. Uwalniana z erytrocytów wolna Hb może działać niekorzystnie poprzez uwalnianie hemu, wiązanie NO, bądź też bezpośrednio

inhibitory fosfodiesteraz, z powodzeniem stosowane w zaburzeniach erekcji, a także w nadciśnieniu płucnym i jako leki przeciwplatetkowe. Ścisłe powiązanie podstaw chorób

z wewnątrznaczyniową hemolizą stwarza obszar, na którym wiedza naukowa i praktyka medyczna mogą być wspólnie realizowane w celu poprawy jakości i długości życia chorych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Allen A., Fisher C., Premawardhena A., Peto T., Allen S., Arambepola M., Thayalsutha V., Olivieri N., Weatherall D.: Adaptation to anemia in hemoglobin E- β thalassemia. *Blood*, 2010; 116: 5368–5370
- [2] Antl M., von Brühl M.L., Eiglsperger C., Werner M., Konrad I., Kocher T., Wilm M., Hofmann F., Massberg S., Schlossmann J.: IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. *Blood*, 2007; 109: 552–559
- [3] Bender A.T., Beavo J.A.: Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol. Rev.*, 2006; 58: 488–520
- [4] Brown G.C., Borutaite V.: Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovasc. Res.*, 2007; 75: 283–290
- [5] Buehler P.W., Abraham B., Vallelian F., Linnemayr C., Pereira C.P., Cipollo J.F., Jia Y., Mikolajczyk M., Boretta F.S., Schoedon G., Alayash A.I., Schaefer D.J.: Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification. *Blood*, 2009; 113: 2578–2586
- [6] Bunn H.F., Nathan D.G., Dover G.J., Hebbel R.P., Platt O.S., Rosse W.F., Ware R.E.: Pulmonary hypertension and nitric oxide depletion in sickle cell disease. *Blood*, 2010; 116: 687–692
- [7] De Palma C., Meacci E., Perrotta C., Bruni P., Clementi E.: Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor α through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase 1, and sphingosine 1 phosphate receptors: a novel pathway relevant to the pathophysiology of endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006; 26: 99–105
- [8] Gkaliagkousi E., Ritter J., Ferro A.: Platelet-derived nitric oxide signaling and regulation. *Circ. Res.*, 2007; 101: 654–662
- [9] Gladwin M.T.: Role of the red blood cell in nitric oxide homeostasis and hypoxic vasodilation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2006; 588: 189–205
- [10] Gladwin M.T., Kato G.J.: Hemolysis-associated hypercoagulability in sickle cell disease: the plot (and blood) thickens! *Haematologica*, 2008; 93: 1–3
- [11] Gordeuk V.R., Sachdev V., Taylor J.G., Gladwin M.T., Kato G., Castro O.L.: Relative systemic hypertension in patients with sickle cell disease is associated with risk of pulmonary hypertension and renal insufficiency. *Am. J. Hematol.*, 2008; 83: 15–18
- [12] Gudmundsdóttir I.J., McRobbie S.J., Robinson S.D., Newby D.E., Megson I.L.: Sildenafil potentiates nitric oxide mediated inhibition of human platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 337: 382–385

- [13] Han T.H., Pelling A., Jeon T.J., Gimzewski J.K., Liao J.C.: Erythrocyte nitric oxide transport reduced by a submembrane cytoskeletal barrier. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005; 1723: 135–142
- [14] Henkel-Honke T., Oleck M.: Artificial oxygen carriers: a current review. *AANA J.*, 2007; 75: 205–211
- [15] Hill A., Hillmen P., Richards S.J., Elebute D., Marsh J.C., Chan J., Mojcik C.F., Rother R.P.: Sustained response and long-term safety of eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 2005; 106: 2559–2565
- [16] Hill A., Richards S.J., Hillmen P.: Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br. J. Haematol.*, 2007; 137: 181–192
- [17] Hofmann F., Ammendola A., Schlossmann J.: Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J. Cell Sci.*, 2000; 113: 1671–1676
- [18] Hsiao P.J., Wang S.C., Wen M.C., Diang L.K., Lin S.H.: Fanconi syndrome and CKD in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and hemosiderosis. *Am. J. Kidney Dis.*, 2010; 55: e1–e5
- [19] Hsu L.L., Champion H.C., Campbell-Lee S.A., Bivalacqua T.J., Mancini E.A., Diwan B.A., Schimel D.M., Cochard A.E., Wang X., Schechter A.N., Noguchi C.T., Gladwin M.T.: Hemolysis in sickle cell mice causes pulmonary hypertension due to global impairment in nitric oxide bioavailability. *Blood*, 2007; 109: 3088–3098
- [20] Jardine D.L., Laing A.D.: Delayed pulmonary hypertension following splenectomy for congenital spherocytosis. *Intern. Med. J.*, 2004; 34: 214–216
- [21] Kato G.J., Heibel R.P., Steinberg M.H., Gladwin M.T.: Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *Am. J. Hematol.*, 2009; 84: 618–625
- [22] Kaul D.K., Liu X.D., Chang H.Y., Nagel R.L., Fabry M.E.: Effect of fetal hemoglobin on microvascular regulation in sickle transgenic-knockout mice. *J. Clin. Invest.*, 2004; 114: 1136–1145
- [23] Kim-Shapiro D.B., Schechter A.N., Gladwin M.T.: Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006; 26: 697–705
- [24] Krajewski M.L., Hsu L.L., Gladwin M.T.: The proverbial chicken or the egg? Dissection of the role of cell-free hemoglobin versus reactive oxygen species in sickle cell pathophysiology. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2008; 295: H4–H7
- [25] Lee A.J., Chiao T.B., Tsang M.P.: Sildenafil for pulmonary hypertension. *Ann. Pharmacother.*, 2005; 39: 869–884
- [26] Li Y.S., Haga J.H., Chien S.: Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J. Biomech.*, 2005; 38: 1949–1971
- [27] Limin M., Johnsen N., Hellstrom W.J.: Avanafil, a new rapid-onset phosphodiesterase 5 inhibitor for the treatment of erectile dysfunction. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2010; 19: 1427–1437
- [28] Lindorfer M.A., Pawluczysz A.W., Peek E.M., Hickman K., Taylor R.P., Parker C.J.: A novel approach to preventing the hemolysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: both complement-mediated cytotoxicity and C3 deposition are blocked by a monoclonal antibody specific for the alternative pathway of complement. *Blood*, 2010; 115: 2283–2291
- [29] Liu X., Samouilov A., Lancaster J.R.Jr., Zweier J.L.: Nitric oxide uptake by erythrocytes is primarily limited by extracellular diffusion not membrane resistance. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 26194–26199
- [30] Machado R.F., Gladwin M.T.: Chronic sickle cell lung disease: new insights into the diagnosis, pathogenesis and treatment of pulmonary hypertension. *Br. J. Haematol.*, 2005; 129: 449–464
- [31] Magnussen K., Bork N., Asmussen L.: The effect of a standardized protocol for iron supplementation to blood donors low in hemoglobin concentration. *Transfusion*, 2008; 48: 749–754
- [32] Maier-Redelsperger M., Lévy P., Lionnet F., Stankovic K., Haymann J.P., Lefevre G., Avellino V., Perol J.P., Girot R., Elion J.: Strong association between a new marker of hemolysis and glomerulopathy in sickle cell anemia. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2010; 45: 289–292
- [33] Massberg S., Sausbier M., Klatt P., Bauer M., Pfeifer A., Siess W., Fässler R., Ruth P., Krombach F., Hofmann F.: Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine^{3',5'}-monophosphate kinase I. *J. Exp. Med.*, 1999; 189: 1255–1264
- [34] Meyer C., Heiss C., Drexhage C., Kehmeier E.S., Balzer J., Mühlfeld A., Merx M.W., Lauer T., Kühl H., Floege J., Kelm M., Rassaf T.: Hemodialysis-induced release of hemoglobin limits nitric oxide bioavailability and impairs vascular function. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2010; 55: 454–459
- [35] Morris C.R., Gladwin M.T., Kato G.J.: Nitric oxide and arginine dysregulation: a novel pathway to pulmonary hypertension in hemolytic disorders. *Curr. Mol. Med.*, 2008; 8: 620–632
- [36] Morris C.R., Kato G.J., Poljakovic M., Wang X., Blackwelder W.C., Sachdev V., Hazen S.L., Vichinsky E.P., Morris S.M. Jr., Gladwin M.T.: Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA*, 2005; 294: 81–90
- [37] Morris C.R., Vichinsky E.P., Singer S.T.: Pulmonary hypertension in thalassemia: association with hemolysis, arginine metabolism dysregulation, and a hypercoagulable state. *Adv. Pulm. Hypertens.*, 2007; 6: 31–38
- [38] Na N., Ouyang J., Taes Y.E., Delanghe J.R.: Serum free hemoglobin concentrations in healthy individuals are related to haptoglobin type. *Clin. Chem.*, 2005; 51: 1754–1755
- [39] Nair R.K., Khaira A., Sharma A., Mahajan S., Dinda A.K.: Spectrum of renal involvement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: report of three cases and a brief review of the literature. *Int. Urol. Nephrol.*, 2008; 40: 471–475
- [40] Pepke-Zaba J., Gilbert C., Collings L., Brown M.C.: Sildenafil improves health-related quality of life in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest*, 2008; 133: 183–189
- [41] Perrier E., Fournet-Bourguignon M.P., Royere E., Molez S., Reure H., Lesage L., Gosgnach W., Frapart Y., Boucher J.L., Villeneuve N., Vilaine J.P.: Effect of uncoupling endothelial nitric oxide synthase on calcium homeostasis in aged porcine endothelial cells. *Cardiovasc. Res.*, 2009; 82: 133–142
- [42] Philippidis P., Mason J.C., Evans B.J., Nadra I., Taylor K.M., Haskard D.O., Landis R.C.: Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses *in vitro*, in resolving skin blisters *in vivo*, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ. Res.*, 2004; 94: 119–126
- [43] Piccard H., Van den Steen P.E., Opendakker G.: Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins. *J. Leukoc. Biol.*, 2007; 81: 870–892
- [44] Qian Q., Nath K.A., Wu Y., Daoud T.M., Sethi S.: Hemolysis and acute kidney failure. *Am. J. Kidney Dis.*, 2010; 56: 780–784
- [45] Reiter C.D., Wang X., Tanus-Santos J.E., Hogg N., Cannon R.O.3rd, Schechter A.N., Gladwin M.T.: Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat. Med.*, 2002; 8: 1383–1389
- [46] Reiter R., Jilma B.: Platelets and antiplatelet drugs. *Therapy*, 2005; 2: 465–502
- [47] Rother R.P., Bell L., Hillmen P., Gladwin M.T.: The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*, 2005; 293: 1653–1662
- [48] Schäfer A., Wiesmann F., Neubauer S., Eigenthaler M., Bauersachs J., Channon K.M.: Rapid regulation of platelet activation *in vivo* by nitric oxide. *Circulation*, 2004; 109: 1819–1822
- [49] Schlossmann J., Ammendola A., Ashman K., Zong X., Huber A., Neubauer G., Wang G.X., Allescher H.D., Korth M., Wilm M., Hofmann F., Ruth P.: Regulation of intracellular calcium by a signaling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Iβ. *Nature*, 2000; 404: 197–201
- [50] Schneider A., Asmus G., Biggar P., Braun J., Dellanna F., Fiedler R., Galle J., Girdt M., Gondolf K., Hahn K., Koch M., Müller H.J., Rump L.C., Vosskuhler A., Winkler R., Wanner C.: Hemoglobin cycling in hemodialysis patients. *Nephrol. Rev.*, 2010; 2: e1
- [51] Schwarz E.R., Rastogi S., Kapur V., Sulemanjee N., Rodriguez J.J.: Erectile dysfunction in heart failure patients. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2006; 48: 1111–1119
- [52] Sedlak T.W., Snyder S.H.: Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. *Pediatrics*, 2004; 113: 1776–1782
- [53] Surks H.K.: cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: a tale of two isoforms. *Circ. Res.*, 2007; 101: 1078–1080
- [54] Tam D.H., Farber H.W.: Pulmonary hypertension and β-thalassemia major: report of a case, its treatment, and a review of the literature. *Am. J. Hematol.*, 2006; 81: 443–447
- [55] Tanaka Y., Hayashi T., Kitajima H., Sumi K., Fujimura M.: Inhaled nitric oxide therapy decreases the risk of cerebral palsy in preterm infants with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics*, 2007; 119: 1159–1164
- [56] Tomasiak M., Stelmach H., Rusak T., Wysocka J.: Nitric oxide and platelet energy metabolism. *Acta. Biochim. Pol.*, 2004; 51: 789–803

- [57] Trepakova E.S., Cohen R.A., Bolotina V.M.: Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase-dependent refilling of Ca^{2+} stores. *Circ. Res.*, 1999; 84: 201–209
- [58] Tsai A.G., Acero C., Nance P.R., Cabrales P., Frangos J.A., Buerk D.G., Intaglietta M.: Elevated plasma viscosity in extreme hemodilution increases perivascular nitric oxide concentration and microvascular perfusion. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 2005; 288: H1730–H1739
- [59] van Wijk R., van Solinge W.W.: The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood*, 2005; 106: 4034–4042
- [60] Verduzco L.A., Nathan D.G.: Sick cell disease and stroke. *Blood*, 2009; 114: 5117–5125
- [61] Villagra J., Shiva S., Hunter L.A., Machado R.F., Gladwin M.T., Kato G.J.: Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood*, 2007; 110: 2166–2172
- [62] Wagener F.A., Eggert A., Boerman O.C., Oyen W.J., Verhofstad A., Abraham N.G., Adema G., van Kooyk Y., de Witte T., Figdor C.G.: Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*, 2001; 98: 1802–1811
- [63] Walter U., Gambaryan S.: cGMP and cGMP-dependent protein kinase in platelets and blood cells. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2009; 191: 533–548
- [64] Watanabe J., Grijalva V., Hama S., Barbour K., Berger F.G., Navab M., Fogelman A.M., Reddy S.T.: Hemoglobin and its scavenger protein haptoglobin associate with apoA-1-containing particles and influence the inflammatory properties and function of high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 18292–18301
- [65] Yamanouchi J., Hato T., Niiya T., Nakagawa K., Kumon Y., Fujiwara H., Yakushijin Y., Yasukawa M.: Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) phosphorylation assay for platelet response to cilostazol. *Platelets*, 2011; 22: 135–142
- [66] Yin D.L., Liu L.X., Zhang S.G., Tian L.T., Lu Z.Y., Jiang H.C.: Portal hypertension resulted from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a case report and review of literature. *Int. J. Hematol.*, 2009; 89: 302–304
- [67] Zaccolo M., Magalhaes P., Pozzan T.: Compartmentalisation of cAMP and Ca^{2+} signals. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2002; 14: 160–166

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.