

Oksydacyjne uszkodzenia śródbłonka naczyniowego w cukrzycy typu 2 – udział mitochondriów i oksydazy NAD(P)H

Dorota Dymkowska✉

Pracownia Metabolizmu Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej, PAN, Warszawa

✉Instytut Biologii Doświadczalnej, PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel.: (22) 589 22 25, e-mail: d.dymkowska@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 9 maja 2016 r.
Artykuł zaakceptowano 19 maja 2016 r.

Słowa kluczowe: śródbłonek naczyniowy, stres oksydacyjny, mitochondria, oksydaza NAD(P)H, reaktywne formy tlenu, cukrzyca

Wykaz skrótów: Cu/Zn-SOD – cynkowo-miedziowa izoforma dysmutazy nadadtlenkowej; HUVEC – komórki śródbłonka izolowane z ludzkiej żyły pępowinowej; iNOS – indukwalna izoforma syntazy tlenu azotu; Mn-SOD – manganowa izoforma dysmutazy nadadtlenkowej, mitochondrialna; nNOS – neuronalna izoforma syntazy tlenu azotu; eNOS – śródbłonkowa izoforma syntazy tlenu azotu; NOX – oksydaza NAD(P)H (izoformy NOX1, 2, 4, 5); RFT – reaktywne formy tlenu; TNF-alfa – czynnik martwicy nowotworu alfa; UCP2 – białko rozprzęgające – izoforma 2

STRESZCZENIE

W przebiegu cukrzycy różnego typu nieprawidłowe funkcjonowanie (dysfunkcja) śródbłonka naczyniowego odgrywa decydującą rolę w rozwoju poważnych powikłań. Uważa się, że u podłoża zmian patologicznych leży stres oksydacyjny. Potwierdzono, że w warunkach hiperglikemii i/lub hiperlipidemii dochodzi do zwiększenia wytwarzania reaktywnych form tlenu równolegle ze znacząco obniżoną wydolnością systemów antyoksydacyjnych. Śródbłonek naczyniowy nie jest tylko bierną wyściółką naczyń. Ta niezwykle aktywna metabolicznie tkanka wytwarza i wydzielą szereg aktywnych biologicznie czynników odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy naczyń, a tym samym oddziałuje na stan całego organizmu. Stres oksydacyjny prowadzi do zaburzenia funkcji śródbłonka związanych z napięciem naczyń krwionośnych, co głównie wiąże się z ograniczeniem dostępności NO. W śródbłonku naczyniowym, podobnie jak w innych typach komórek, istnieje szereg mechanizmów wytwarzających RFT. Wydaje się jednak, że mitochondrialny łańcuch oddechowy oraz oksydaza NAD(P)H odgrywają najbardziej znaczącą rolę. W dalszych rozdziałach tej pracy omówiono zaburzenia funkcji śródbłonka w cukrzycy oraz znaczenie mitochondriów i oksydazy NAD(P)H w rozwoju dysfunkcji tej tkanki.

WPROWADZENIE

Cukrzyca jest jedną z chorób metabolicznych o niezwykle złożonej etiologii. Dochodzi do zwiększenia zawartości glukozy we krwi (hiperglikemia) oraz zaburzenia metabolizmu białek, lipidów i węglowodanów, co zazwyczaj jest skutkiem upośledzonego wydzielania insuliny bądź niewłaściwego działania tego hormonu na tkanki obwodowe (insulinooporność). Najczęściej występującym typem cukrzycy na świecie jest cukrzyca typu 2. Choroba ta stanowi jedno z największych wyzwań medycyny, gdyż według danych Międzynarodowej Federacji Diabetologicznej dotyka obecnie ponad 415 milionów ludzi na świecie. Co 6 sekund umiera chory na cukrzycę. Liczba osób ze zdiagnozowaną cukrzycą drastycznie wzrasta, a na leczenie tej choroby przeznaczają się około 12% wszystkich środków skierowanych na ochronę zdrowia [1]. Zaburzenia sercowo-naczyniowe są bez wątpienia najczęstszą przyczyną śmierci bądź niepełnosprawności pacjentów cierpiących na cukrzycę typu 2. Prowadzą do nich zmiany strukturalne i funkcjonalne naczyń krwionośnych, czego następstwem są poważne uszkodzenia wtórne, takie jak: stopa cukrzycowa, kardiomiopatia, retinopatia, nefropatia czy też neuropatia. W wyniku tego dochodzi do ślepoty, niewydolności nerek, czy też neurologicznych dysfunkcji innych narządów, co znacząco utrudnia życie pacjentom. W dużej mierze problemy te są skutkiem angiopatii spowodowanej dysfunkcją śródbłonka naczyniowego [2, 3]. Efektem tego typu powikłań narządowych wynikających ze zmian zwyrodnieniowych w naczyniach krwionośnych jest przedwczesna śmierć ponad 50% chorych na cukrzycę [4]. Manifestacja problemów sercowo-naczyniowych nasila się również z wiekiem, co koreluje z rozwojem miażdżycy, jednego z istotnych powikłań cukrzycy [2].

U chorych na cukrzycę zaburzone są funkcje śródbłonka związane z neowaskularyzacją czy potencjalnymi możliwościami naprawczymi. Uważa się, że w warunkach hiperglikemii i/lub hiperlipidemii jednym z czynników o kluczowym znaczeniu w rozwoju zmian patologicznych w śródbłonku jest nadmierne wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT), czy raczej zaburzenie równowagi między ilością wytwarzanych RFT a wydolnością systemów antyoksydacyjnych. W konsekwencji dochodzi do powstawania uszkodzeń oksydacyjnych prowadzących do dysfunkcji komórek i ich śmierci [5]. RFT to nie tylko czynniki uszkadzające komórki, ale również bardzo ważne cząstki uczestniczące w przekazywaniu sygnałów, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Odgrywają one istotną rolę w kontrolowaniu funkcji śródbłonka, napięcia i integralności ścian naczyń krwionośnych, a także w patofizjologii zapalenia czy hipertrofii. Biorą udział w przebiegu szeregu procesów fizjologicznych, takich jak: wrodzona odpowiedź immunologiczna, dynamika macierzy zewnątrzkomórkowej, proliferacja, różnicowanie czy migracja komórek [6,7].

Stres oksydacyjny ma istotne znaczenie w rozwoju wielu chorób sercowo-naczyniowych, stanów zapalnych czy schorzeń neurodegeneracyjnych. W 1956 roku wytwarzanie RFT stało się podstawą do opracowania teorii starzenia przez Harmana, która głosi, że reaktywne formy tlenu są czynnikiem warunkującym długość życia [8]. Postuluje się, że naczyniopatnie towarzyszące cukrzycy powodowane są przez RFT pochodzące zarówno z cytoplazmy, jak też z mitochondriów. Istnieje kilka systemów wytwarzających reaktywne formy tlenu. Wydaje się jednak, że obok mitochondrialnego łańcucha oddechowego, oksydaza NAD(P)H (NOX) odgrywa szczególną rolę w rozwoju dysfunkcji naczyniowych. W prezentowanej pracy zestawiono dane związane z oksydacyjnymi uszkodzeniami śródbłonna naczyniowego w cukrzycy typu 2, jak również opisano udział mitochondriów i oksydazy NAD(P)H w tym procesie.

ŚRÓDBŁONEK NACZYNIOWY W CUKRZYCY

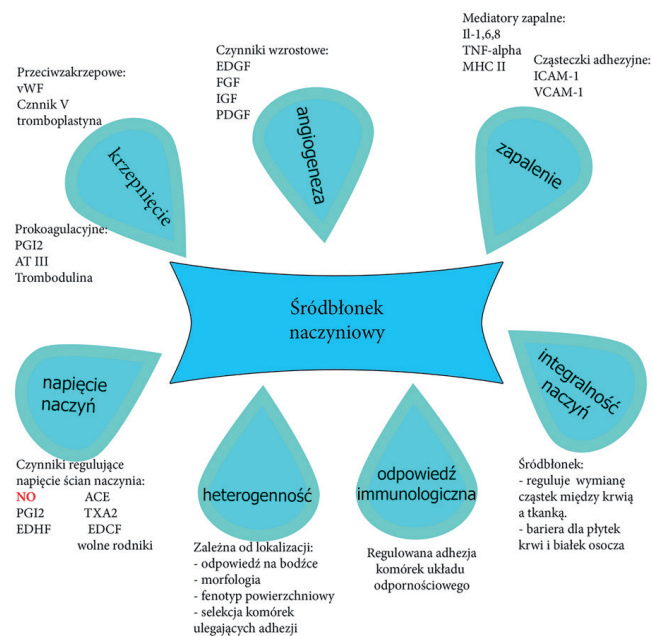
ŚRÓDBŁONEK I JEGO ZADANIA

Śródbłonek naczyniowy tworzy unikalną barierę pomiędzy ścianami naczyń a jego światłem. Jest kluczowy dla zachowania homeostazy naczyniowej oraz adaptacji układu naczyniowego do zmian środowiskowych. Obok wątroby jest to największy organ wydzielniczy w organizmie człowieka, którego całkowita powierzchnia jest porównywalna z powierzchnią boiska piłkarskiego. Należące do grupy nabłonków płaskich komórki śródbłonna wyszczelniają wszystkie naczynia krwionośne od dużych tętnic po małe naczynia włosowate, naczynia limfatyczne oraz przedsionki i komory serca. Obecnie wiadomo, że tkanka ta nie jest tylko bierną wyściółką naczyń krwionośnych („warstwa celofanu”), ale jest ona niezwykle aktywna metabolicznie i fizjologicznie, gdyż kontroluje funkcje naczyń, ale również odpowiada za prawidłowe funkcjonowanie całego organizmu. Śródbłonek naczyniowy jest niezwykle niejednorodną tkanką. Co szczególnie istotne i ciekawe, zależnie od specyficznej lokalizacji w organizmie oraz od stanu fizjologicznego, komórki śródbłonna zdecydowanie różnią się odpowiedzią na różne bodźce, np. na hemokiny czy czynniki zapalne, ale również mają inną morfologię i fenotyp powierzchniowy. Ta niezwykle niejednorodna tkanka jest zdolna do selekcji komórek ulegających adhezji do warstwy śródbłonna, a także może pośrednio regulować inwazyjność komórek transformowanych. Ma to szczególne znaczenie w przypadku oddziaływania z komórkami krążącymi we krwi, zarówno prawidłowymi, jak i transformowanymi. Ponadto tego rodzaju specyficzność śródbłonna może zostać wykorzystana w celu projektowania ukierunkowanej terapii farmakologicznej, genowej czy z wykorzystaniem komórek macierzystych. Selektowność reakcji objawia się także w stanach patologicznych, kiedy zależnie od specyficznej lokalizacji komórek śródbłonna, aktywowana jest odpowiedź właściwa dla danego mikrośrodowiska [9].

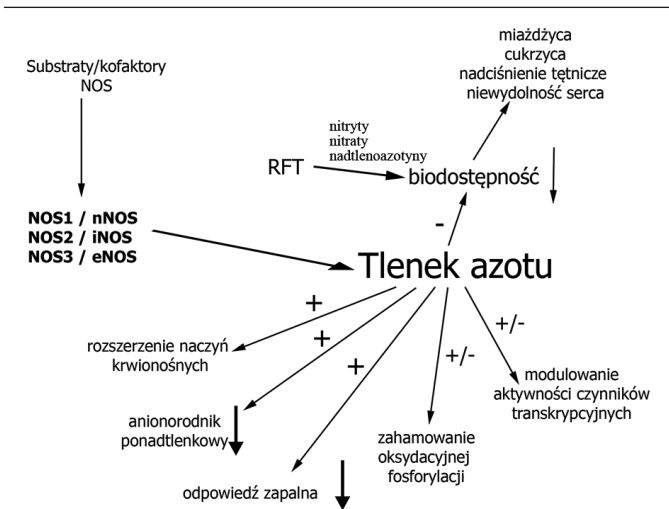
Utrzymanie równowagi pomiędzy skurczem i rozluźnieniem ścian naczyń krwionośnych w odpowiedzi na bodźce jest jednym z podstawowych zadań śródbłonna. Poza kontrolowaniem przepływu krwi i zachowaniem właściwej struktury naczyń, czynnie uczestniczy on w aktywacji procesów zapalnych; odpowiedzi immunologicznej poprzez regulację adhezji komórek układu odpornościowego; kontroli proce-

sów krzepnięcia krwi; regulacji przepuszczalności i integralności ścian naczyń oraz kontroli wymiany substancji między osoczem a głębiej położonymi narządami. Należy wyjaśnić, że zapalenie jest rozumiane jako aktywacja śródbłonna, której towarzyszy obniżenie szczelności tej warstwy oraz podwyższona adhezja leukocytów i zwiększenie aktywności prozapalnej [10]. Jednym z istotnych zadań tej tkanki jest udział w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych i przebudowie już istniejących. Jest to zjawisko, które poza normą, przy nadmiernej aktywacji komórek śródbłonna, może być przyczyną poważnych komplikacji, zwłaszcza gdy powstają nieprawidłowe bądź niefunkcjonalne naczynia krwionośne (np. retinopatia cukrzycowa, czy tworzenie naczyń podczas wzrostu nowotworu) [11]. Zasadniczo, w warunkach normy komórki śródbłonna pozostają w stanie spoczynku. Tworzenie nowych naczyń krwionośnych wymaga ich aktywacji, do której dochodzi pod wpływem VEGF (śródbłonkowy czynnik wzrostu). Neowaskularyzacja ma istotne znaczenie podczas naturalnego gojenia się ran, inicjując procesy naprawcze i uczestnicząc w tworzeniu ziarniny oraz ograniczając obszar martwicy. Proces ten stanowi także niezbędną podstawę prawidłowego dojrzewania kości i wzrostu włosów [12].

Śródbłonek wytwarza i wydziela szereg substancji bioaktywnych (Ryc. 1), które działają w świetle naczyń, ale również wpływają na komórki mięśni gładkich współtworzących naczynie krwionośne. Najbardziej istotnym wydaje się tlenek azotu, który jest niezwykle reaktywną cząsteczką o krótkim okresie półtrwania (szerzej będzie opisany w kolejnym pod-



Rycina 1. Śródbłonek naczyniowy i jego fizjologiczne funkcje. Śródbłonek naczyniowy pełni wiele istotnych funkcji, co jest możliwe dzięki wytwarzaniu i wydzielaniu szeregu czynników. ACE – enzym konwertujący angiotensynę; AT III – antytrombina III; EDHF – śródbłonkowy czynnik wywołujący skurcz mięśniocytów; EDGF – czynnik wzrostowy wydzielany przez śródbłonek; EDHF – śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący; ICAM-1 – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna 1, FGF – czynnik wzrostu fibroblastów; IGF – insulinopodobny czynnik wzrostu; PDGF – płytkowy czynnik wzrostu; IL-1,6,8 – interleukina (1,6,8); MHC II – główny układ zgodności tkankowej klasy II; NO – tlenek azotu; PGI2 – prostacyklina 2; TNF-alfa – czynnik martwicy nowotworu alfa; TXA2 – tromboksan A2; VCAM-1 – naczyniowa cząstka adhezji komórek, vWF – czynnik von Willebranda.



Rycina 2. Tlenek azotu – jego rola w zachowaniu homeostazy śródbłonnka naczyniowego. NO powstaje z L-argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenku azotu. Kofaktorem tej reakcji jest tetrahydrobiopteryna (BH4). W warunkach typowego dla cukrzycy środowiska metabolicznego dochodzi do zaburzenia dostępności NO i rozwoju licznych patologii.

rozdziale). NO reguluje napięcie ścian naczyń krwionośnych oraz adhezję i agregację płytek krwi, wpływa na proliferację mięśni gładkich współtworzących naczynie, a także chroni komórki przed apoptozą i stanem zapalnym oraz jest istotnym czynnikiem przeciwmiażdżycowym (Ryc. 2). Śródbłonek naczyniowy, jak pokazano na rycinie 1, wydziela również takie czynniki, jak: prostacyklina rozszerzająca naczynia i hamująca agregację płytek krwi; czynnik von Willebranda aktywujący agregację płytek krwi; trombomodulina hamująca krzepnięcie krwi, czy selektyna, która aktywuje przyleganie granulocytów obojętnochłonnych [13]. Wydzielanie tak wielu czynników determinuje pełnienie licznych, niezwykle istotnych funkcji przez śródbłonek naczyniowy. Wobec tego zaburzenia w działaniu tak wszechstronnej tkanki mają poważne konsekwencje i prowadzą do rozwoju różnych patologii, między innymi leżą u podłoża nadciśnienia tętniczego czy miażdżycy.

TLENEK AZOTU - WYKŁADNIK FUNKCJI ŚRÓDBŁONKA

W warunkach fizjologicznych, w stanie spoczynku tlenek azotu stanowi kluczowy czynnik warunkujący zachowanie integralności ścian naczyń, co pokazano na rycinie 2. NO wpływa hamująco na odpowiedź zapalną, procesy krzepnięcia i proliferację poprzez hamowanie oksydacyjnej fosforylacji w mitochondriach i nitrozyłacji reszt cysteinowych w licznych białkach, w tym czynnikach transkrypcyjnych (np. Nf-κB) czy białkach kontrolujących cykl komórkowy [14]. Jedną z charakterystycznych cech dysfunkcji śródbłonnka jest obniżenie dostępności NO (Ryc. 2). W przypadku wielu patologii (miażdżyca, cukrzyca, nadciśnienie tętnicze czy niewydolność serca) na różnych etapach zaawansowania choroby obserwowano zaburzenia napięcia naczyń krwionośnych wynikające z niedostatecznej dostępności NO. Należy wspomnieć, że jedynie w przypadku sepsy obserwuje się znacząco zwiększone wytwarzanie tlenku azotu czy raczej podwyższoną jego biodostępność. Wykazano, że reaktywne formy tlenu, hiperglikemia czy brak wrażliwości na insulinę istotnie wpływają na równowagę związaną z tlenkiem azotu [15].

W warunkach fizjologicznych NO jest syntezowany z L-argininy w reakcji katalizowanej przez śródbłonkową syntazę tlenku azotu (eNOS). Kluczowym aktywatorem tego enzymu są siły związane z napięciem ścinającym, a ponadto liczne cząsteczki uczestniczące w przekazywaniu sygnału, jak bradykinina, adenozylna, insulina czy serotoninina. Do pełnej aktywacji ludzkiej eNOS konieczna jest fosforylacja reszty seryny w pozycji 1177. Białkowa kinaza A (PKA), białkowa kinaza aktywowana AMP (AMPK) czy kinaza PKB (Akt) katalizują tę fosforylację [16]. Ponadto aktywność eNOS jest ściśle regulowana obecnością jonów wapnia. Zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} przyczynia się do wzrostu wydzielania NO, a tym samym wpływa na skurcz naczyń krwionośnych [17]. Poza eNOS NO jest wytwarzany w wyniku aktywności neuronalnej syntazy tlenku azotu (nNOS), która jest obecna w komórkach śródbłonnka naczyniowego. W szczególnych przypadkach, na przykład pod wpływem cytokin czy endotoksyn, NO powstaje również na skutek aktywacji procesu syntezy indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS). Dostępność NO jest zatem wynikiem równowagi jego wytwarzania na drodze zależnej od aktywności wymienionych izoform NOS oraz jego przekształcania w produkty bardziej stabilne (nitryty czy nitraty) czy też niezwykle reaktywne nadtlenoazotyny, które powstają w reakcji NO z anionorodnikiem ponadtlenkowym. OONO⁻ są cząstkami o silnych właściwościach oksydacyjnych, które mogą powodować fragmentację DNA oraz peroksydację lipidów [18]. Jednym z istotnych czynników uczestniczących w degradacji NO są reaktywne formy tlenu, o których będzie mowa w dalszej części tej pracy. Warto wspomnieć, że NO wydzielany na drodze zależnej od nNOS uczestniczy w regulacji napięcia naczyń krwionośnych zlokalizowanych w obrębie mięśni szkieletowych. Wykazano, że zaburzenie aktywności nNOS pośredniczy w powstawaniu uszkodzeń mięśni u pacjentów z mięśniową dystrofią Duchenne'a, do których dochodzi na skutek długotrwałego skurczu naczyń krwionośnych [19].

W przypadku chorób układu sercowo-naczyniowego różne mechanizmy mogą zaburzać dostępność NO. Często wynika to ze zmniejszonego wytwarzania tlenku azotu na skutek obniżenia aktywności eNOS, gdyż nie dochodzi do fosforylacji reszty seryny 1177. Zaburzona może również być synteza białka bądź też ograniczona dostępność niezbędnych kofaktorów. Nadmierne wytwarzanie RFT na drodze zależnej od oksydazy NAD(P)H, oksydaz ksantynowych, mitochondrialnego łańcucha oddechowego czy też tzw. rozprężenia eNOS, przyczynia się do degradacji NO i tym samym istotnie zmniejsza jego dostępność. W komórkach śródbłonnka z aorty człowieka wykazano, że glukoza w wysokich stężeniach zmniejsza ilość mRNA śródbłonkowej syntazy tlenku azotu oraz wpływa na poziom białka eNOS na drodze zależnej od RFT wytwarzanych przez mitochondrialny łańcuch oddechowy [20].

Wydaje się, że dostępność NO może też wpływać na tworzenie struktur kapilarnych i możliwość mobilizacji śródbłonkowych komórek progenitorowych ze szpiku kostnego. W warunkach cukrzycy dochodzi do zmniejszenia ilości tych komórek na skutek obniżenia tempa proliferacji czy też skrócenia czasu życia w krwi obwodowej. Wykazano, że w stanie insulinooporności dochodzi do uszkodzenia efektywności naprawy i regeneracji śródbłonnka naczyniowego. Przypuszcza

się, że jest to wynikiem nieprawidłowości w szlaku kinazy Akt [21]. Ścieżka ta jest ważna dla funkcjonowania tej tkanki, gdyż reguluje między innymi przeżywalność komórek śródbłonna, ich migrację czy tworzenie struktur kapilarnych. Dodatkowo aktywna kinaza Akt kontroluje syntezę NO poprzez regulowanie fosforylacji eNOS w pozycji 1177, wobec czego reguluje skurcz i rozkurcz naczyń krwionośnych, a tym samym równowagę układu sercowo-naczyniowego [22]. Zmniejszona aktywność kinazy Akt jest wskaźnikiem oporności tkanek obwodowych, w tym również śródbłonna naczyniowego, na insulinę, do której dochodzi w warunkach hiperglikemii czy hiperlipidemii. Wydaje się, że zmniejszenie dostępności NO jest jednym z etapów w rozwoju dysfunkcji śródbłonna.

DYSFUNKCJA ŚRÓDBŁONKA

Śródbłonek naczyniowy oddziałuje ze wszystkimi czynnikami obecnymi w przepływającej krwi i limfie i jako pierwszy reaguje na pojawienie się nowych czy też nietypowych substancji. Co istotne, w stanie spoczynkowym warstwa śródbłonna gwarantuje swobodny przepływ krwi, gdyż uniemożliwia adhezję innych komórek. Dopiero pojawienie się molekuł adhezyjnych (ICAM-1, VCAM-1) zmienia właściwości tej powierzchni. Wielokierunkowe działanie czynników wydzielanych przez śródbłonek oraz liczne pełnione przez tą tkankę funkcje (Ryc. 1) sprawiają, że zaburzenie integralności tej warstwy wyścielającej naczynia krwionośne, może stanowić czynnik determinujący zmiany patologiczne związane ze stanem zapalnym, posocznicą czy wstrząsem septycznym. Zaburzenie funkcji śródbłonna stanowi jeden z pierwszych etapów w rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego, takich jak miażdżycy oraz niewydolność serca, wpływa również na funkcjonowanie innych komórek budujących naczynie, w tym komórek mięśni gładkich oraz komórek układu odpornościowego, co w konsekwencji jest podstawą do rozwoju niewydolności naczyniowej. W dużej mierze jest to efektem zwiększonego stresu oksydacyjnego czy też indukcji odpowiedzi zapalnej, z czym wiąże się istotny wzrost wytwarzania reaktywnych form tlenu. Przyczyną zaburzeń funkcjonowania śródbłonna naczyniowego są zarówno procesy fizjologiczne (np. starzenie), stany patologiczne (cukrzyca czy nadciśnienie), jak też czynniki środowiskowe, na przykład dieta. Należy wspomnieć, że posiłki z wysoką zawartością tłuszczu wywołują zwiększenie poziomu wolnych kwasów tłuszczowych we krwi, co może przyczyniać się do nadmiernego wytwarzania RFT i tym samym negatywnie oddziaływać na funkcjonowanie śródbłonna [23]. Wykazano, że u osób z rozwiniętą opornością tkanek obwodowych na insulinę, otyłych i chorych na cukrzycę typu 2 dochodzi do zaburzenia funkcji śródbłonna naczyniowego. Jednocześnie wydaje się, że zaburzenie funkcji tej tkanki stanowi wczesny i kluczowy etap w rozwoju towarzyszących cukrzycy zaburzeń naczyniowych, jak również sprzyja zaostrzeniu zmian miażdżycowych, które również są jednym z głównych powikłań cukrzycowych [24].

Cukrzyca typu 2, jak wcześniej wspomniano, jest złożonym schorzeniem, któremu towarzyszy dyslipidemia, nadciśnienie tętnicze, choroby układu sercowo-naczyniowego czy otyłość. Charakterystyczne dla cukrzycy środowisko metaboliczne (hiperglikemia, zwiększona podaż wolnych kwasów tłuszczowych czy insulinooporność tkanek obwodowych) indukują szereg zdarzeń oddziałujących negatyw-

nie na ściany naczyń krwionośnych. Wszystko to prowadzi do zaburzenia zależnej od śródbłonna regulacji ciśnienia krwi, upośledzenia fibrylizy, czy też zwiększenia ekspresji molekuł adhezyjnych i genów związanych z procesem zapalnym. Dochodzi do pogłębienia zaburzeń funkcji śródbłonna, czemu towarzyszy nasilenie stresu oksydacyjnego, a w konsekwencji wzrasta skurcz naczyń, rozwija się stan zapalny, co sprzyja zakrzepicy [25]. Do rozwoju kardiomiopatii cukrzycowych przyczynia się aktywacja szlaków związanych z nagromadzeniem produktów nieenzymatycznej glikacji białek (AGE, ang. *advanced glycation end products*), w wyniku czego dochodzi do aktywacji białkowej kinazy C i szlaku heksozamininy, co następuje wtórnie do zwiększonego wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego [26]. Wspomniane wcześniej duże zróżnicowanie komórek śródbłonna w organizmie człowieka dotyczy również zmian zachodzących w cukrzycy. Siatkówka oka czy nerki są szczególnie narażone na uszkodzenia funkcji naczyń w tej chorobie. W wielu przypadkach zaburzenia śródbłonna towarzyszące cukrzycy mogą być skutkiem upośledzonej odpowiedzi tej tkanki na insulinę, co sprawia, że śródbłonek staje się jednym z celów terapeutycznych w cukrzycy. Postuluje się, że poprawa funkcji śródbłonna na wczesnym etapie rozwoju tej choroby pomoże w zwiększeniu wrażliwości tkanek obwodowych na insulinę i obniży ryzyko rozwoju powikłań sercowo-naczyniowych, a tym samym poprawi jakość i długość życia pacjentów [27].

W ostatnim czasie coraz powszechniej wskazuje się, że zaburzenia w funkcji naczyń są skutkiem nie tylko dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, ale wynikają ze złożonego oddziaływania tej tkanki z autonomicznym układem nerwowym (ANS, ang. *autonomous nervous system*). Sugeruje się, że zaburzenia funkcjonowania śródbłonna współistnieją z zaburzeniami w ANS, co koreluje z towarzyszącą cukrzycy neuropatią. Podstawą do tego typu sugestii były badania, w których funkcje śródbłonna odnoszono do poziomu nora-drenaliny w osoczu [28,29].

STRES OKSYDACYJNY A FUNKCJE ŚRÓDBŁONKA

Stan zaburzonej równowagi między ilością wytwarzanych reaktywnych form tlenu, a zdolnością do ich usuwania, stanowi podłoże do rozwoju wielu patologii. W wyniku zwiększonego stresu oksydacyjnego dochodzi do uszkodzenia tkanek. Odgrywa to niezwykle istotną rolę w przebiegu wielu procesów fizjologicznych, takich jak starzenie, ale przede wszystkim patologicznych, wśród których wymienić należy rozwój chorób nowotworowych, chorób neurodegeneracyjnych, cukrzycę, miażdżycę, nadciśnienie, ostry zespół niewydolności oddechowej, astmę czy też choroby autoimmunologiczne. Stres oksydacyjny jest też główną przyczyną następstw poudarowych, bezpośrednio wywołany ischemią a następnie reperfuzyją. W przypadku cukrzycy, RFT pośredniczą w indukcji insulinooporności tkanek obwodowych, przyczyniają się do zaburzeń funkcjonowania komórek β trzustki, a także, co szczególnie istotne z punktu widzenia tej pracy, stanowią kluczowy czynnik w rozwoju komplikacji naczyniowych towarzyszących cukrzycy związanych z zaburzeniami w funkcji naczyń [30]. RFT mogą aktywować różne mechanizmy promujące rozwój wyżej wspomnianych patologii. Dotyczy to między innymi podwyższonego utleniania lipoprotein, aktywacji genów prozapalnych, zmiany fenotypu mięśni gładkich wchodzących w skład naczynia czy wreszcie,

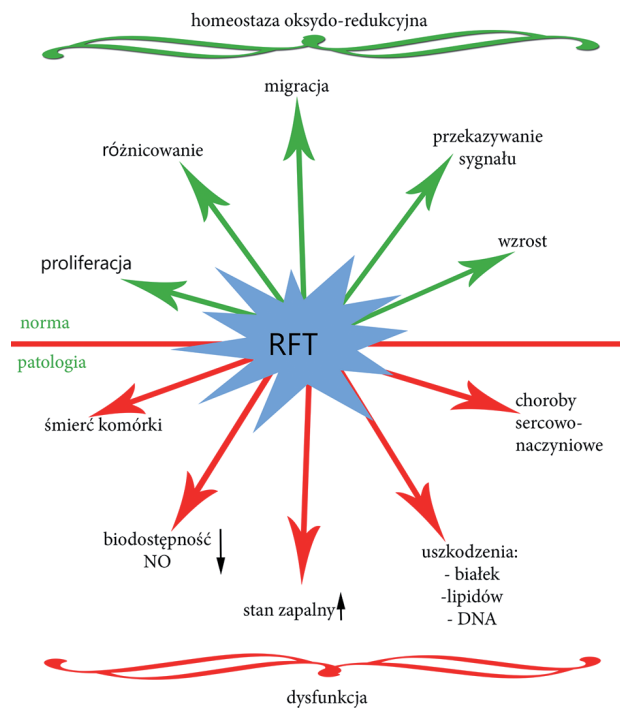
co najbardziej istotne, redukuje dostępność NO, o czym była mowa powyżej. Wydaje się, że oksydacyjne zaburzenia struktury naczyń towarzyszące cukrzycy typu 2 stanowią główną przyczynę niepełnosprawności i śmierci. Dochodzi bowiem do poważnych wtórnych komplikacji wielonarządowych, jak kardiomiopatia, nefropatia czy retinopatia. Uważa się, że nadmierne wytwarzanie RFT stanowi jeden z kluczowych czynników w rozwoju patologicznych zmian w śródbłonku naczyniowym w warunkach hiperglikemii bądź na skutek zwiększonej dostępności wolnych kwasów tłuszczowych [31,32]. Ponadto, wytwarzanie RFT przekraczające możliwości obrony antyoksydacyjnej sprzyja uszkodzeniu komórek śródbłonka, powoduje wzrost przepuszczalności tej warstwy, co pozwala na przenikanie szkodliwych substancji do głębszych tkanek.

Poza wytwarzaniem RFT, istotne dla utrzymania prawidłowego funkcjonowania tkanek i narządów są mechanizmy obronne, przyczyniające się do neutralizacji RFT, ale biorące również udział w naprawianiu powodowanych przez nie uszkodzeń oksydacyjnych. W komórce istnieje szereg enzymatycznych i nieenzymatycznych systemów antyoksydacyjnych. Jednym z nieenzymatycznych antyoksydantów jest glutation, który występuje w komórce w formie utlenionej (GSSG) i zredukowanej (GSH). Równowaga tych form definiuje stan redoks komórki [33]. Inny nieenzymatyczny mechanizm antyoksydacyjny jest związany z tioredoksynami i glutaredoksynami. Te małe białka posiadają aktywne domeny dwusiarczkowe, dzięki którym redukują białkowe tiole i disulfidy utrzymując stan zredukowany w komórce [34]. Enzymy antyoksydacyjne usuwają różne RFT. Wśród nich należy wymienić dysmutazy ponadtlenkowe, które neutralizują anionorodnik ponadtlenkowy przekształcając go w nadtlenek wodoru, oraz peroksydazę glutationową i katalazę, które przekształcają H_2O_2 w wodę [35]. Ponadto wykazano działanie antyoksydacyjne białek z rodziny UCP (ang. *uncoupling proteins*). Wykazano, że UCP2 hamuje wytwarzanie RFT w mitochondriach komórek śródbłonka aorty poddawanych działaniu kwasów tłuszczowych [36]. Ponadto stwierdzono, że UCP2 zwiększa wtórnie wydzielanie NO w śródbłonku otyłych myszy cukrzycowych [37] oraz poprawia funkcje śródbłonka, który był narażony na działanie glukozy w wysokim stężeniu [38]. Sprawnie działające mechanizmy obrony utrzymują RFT na poziomie koniecznym do spełniania ich fizjologicznych funkcji, ale niezagrażającym funkcjonowaniu komórki i organizmu, co pozwala na zachowanie funkcji śródbłonka, w tym szczególnie tej związanej z dostępnością NO.

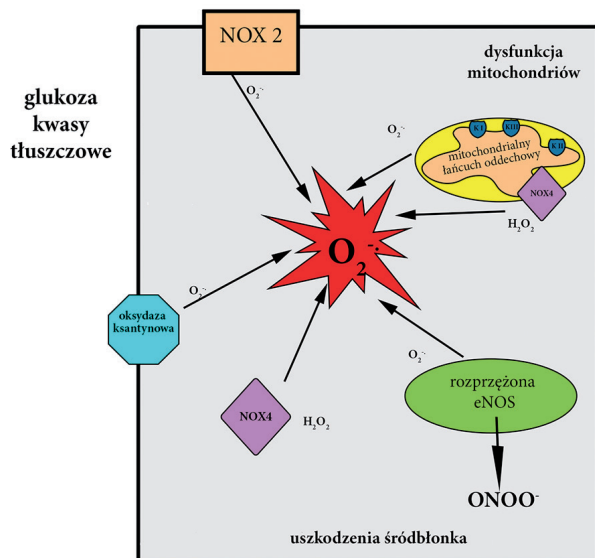
Powstające w nadmiarze RFT mogą wpływać na strukturę DNA, powodować modyfikacje białek i lipidów, aktywować czynniki transkrypcyjne oraz syntezę cytokin prozapalnych. Birben i współpracownicy szeroko opisują możliwe skutki stresu oksydacyjnego [39]. Między innymi wskazują, że peroksydacja lipidów może być przyczyną zmian w strukturze błon biologicznych, co sprzyja zaburzeniu aktywności receptorów błonowych i wielu enzymów oraz wpływa na przepuszczalność tworzonej przez śródbłonek bariery. RFT wpływają również na strukturę białek, które wówczas są bardziej wrażliwe na proteolizę. W kolejnych podrozdziałach zostanie omówiony wpływ RFT na funkcjonowanie śródbłonka naczyniowego oraz główne mechanizmy związane z wytwarzaniem RFT.

Reaktywne formy tlenu, podobnie jak reaktywne formy azotu, są produktami prawidłowego metabolizmu komórki. RFT pełnią kluczowe funkcje w przekazywaniu sygnału i dzięki temu regulują szereg procesów w każdej komórce, ale mogą też powodować poważne uszkodzenia białek, lipidów i DNA, przez co zaburzone są ich właściwe funkcje (Ryc. 3). W niskich stężeniach, kiedy system obrony antyoksydacyjnej funkcjonuje prawidłowo, RFT regulują wzrost, przeżywalność, proliferację, migrację oraz inne funkcje komórek, jak również pełnią znaczącą rolę w ochronie przed patogenami. Obecnie wiadomo, że RFT wraz z innymi wtórnymi przekaźnikami, przenoszą informację z wewnątrzkomórkowego środowiska w celu indukcji specyficznej odpowiedzi komórkowej. Co istotne, ta sama cząstka (np. H_2O_2) ma zdolność wywołania kilku różnych efektów biologicznych, zależnie od aktualnych potrzeb. Wydaje się, że specyficzna odpowiedź (biologiczny efekt) zależy od typu komórek, miejsca wytwarzania RFT i wreszcie również od rodzaju działającej cząstki (np. anionorodnik ponadtlenkowy - O_2^- ; rodnik hydroksylowy - OH czy nadtlenek wodoru - H_2O_2) [40]. W przypadku śródbłonka naczyniowego RFT pośrednio kontrolują przepływ krwi, gdyż wpływają na wydzielanie NO. Są także związane ze zdolnością do tworzenia struktur kapilarnych i angiogenezą. Znaczące zwiększenie wytwarzania RFT może być przyczyną śmierci komórek na drodze apoptozy bądź nekrozy, modulować napięcie naczyniowe, osłabiać funkcje bariery śródbłonkowej, czy też pośredniczyć w przebudowie naczyń.

W śródbłonku naczyniowym, podobnie jak w innych typach komórek, istnieje kilka potencjalnych źródeł RFT,



Rycina 3. Reaktywne formy tlenu w normie i patologii. Zachowanie homeostazy oksydoredukcyjnej warunkuje prawidłowy przebieg szeregu istotnych dla życia komórki procesów. RFT wytwarzane w nadmiarze powodują liczne uszkodzenia przyczyniające się do dysfunkcji komórek. Szczególnie istotne są towarzyszące cukrzycy oksydacyjne uszkodzenia śródbłonka naczyniowego leżące u podłoża szeregu chorób układu sercowo-naczyniowego.



Rycina 4. Źródła RFT w komórkach śródbłonna naczyniowego. Wytwarzanie RFT może przebiegać przy współdziałaniu kilku systemów. Wydaje się, że w warunkach cukrzycy szczególnie istotne są mitochondrialny łańcuch oddechowy i oksydaza NAD(P)H.

w tym mitochondrialny łańcuch oddechowy, oksydaza NAD(P)H, oksydaza ksantynowa, enzymy metabolizujące kwas arachidonowy (cytochrom P450, lipooksygenaza, cyklooksygenaza) czy w końcu śródbłonna syntaza tlenu azotu w stanie rozprężonym (Ryc. 4). Wydaje się, że NOX jest głównym enzymem kontrolującym stres oksydacyjny w śródbłonna, a jego aktywacja może przyczyniać się do dysfunkcji mitochondriów i uszkodzenia komórek w cukrzycy [41]. Ponadto stwierdzono, że wytwarzanie RFT w układzie mikronaczyń jest skutkiem wzrostu stężenia glukozy w komórce. Natomiast w układzie dużych naczyń krwionośnych, jak również w sercu, zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu stanowi prawdopodobnie konsekwencję podwyższonego utleniania kwasów tłuszczowych [26].

W warunkach stresu oksydacyjnego dochodzi do istotnego obniżenia dostępności NO, co opisywano w poprzednim rozdziale. Zmniejszone wydzielanie tlenu azotu obserwowano u pacjentów z cukrzycą typu 2. Jest to między innymi związane z zahamowaniem ścieżki sygnałowej kinazy Akt na skutek zmniejszonej wrażliwości na insulinę. Dochodzi również do zwiększenia ilości białka iNOS, które może kompensować zmniejszoną dostępność NO. Najbardziej istotnym wydaje się zmniejszenie syntezy eNOS i prostacykliny [42], co znacząco zmniejsza zdolność relaksacyjną naczyń krwionośnych. Ponadto wiadomo, że zahamowanie syntezy NO jest skutkiem utleniania tetrahydrobiopteryny (BH4) pod wpływem zwiększonej dostępności nadtlenuazotynów. BH4 jest niezbędnym kofaktorem eNOS [43]. Śródbłonek naczyniowy narażony na wzrastający poziom RFT wytwarza szereg cytokin, w tym białko chemotaktyczne dla monocytów -1 (MCP-1), czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α), NF- κ B, interleukinę-8 (IL-8) [44,45], a czynniki te jak wiadomo również powodują wzrost wytwarzania RFT.

RFT są przedmiotem zainteresowania badaczy od wielu lat. Próba wyjaśnienia mechanizmów ich wytwarzania i sposoby działania na komórkę/organizm ma na celu znalezienie poten-

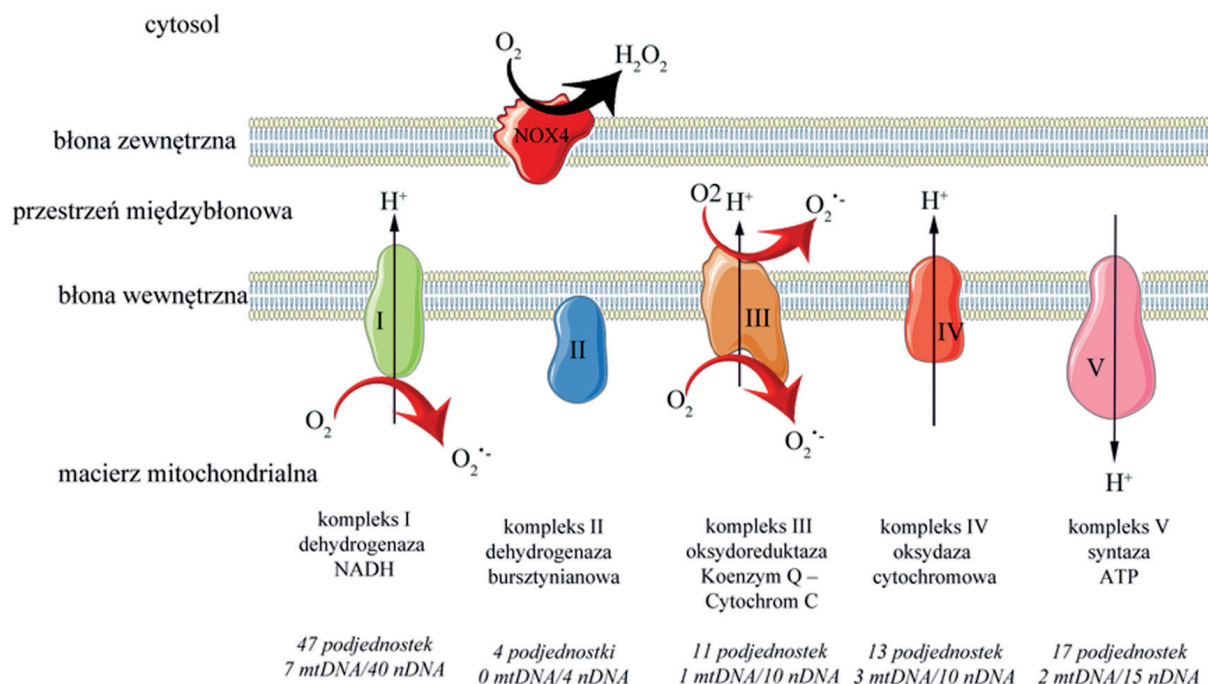
cjalnego miejsca ingerencji terapeutycznej. Ze względu na ich złożony metabolizm, kluczowe znaczenie w przebiegu wielu procesów fizjologicznych oraz niezwykle istotną rolę w rozwoju wielu patologii, jest to bardzo trudne. Postuluje się jednak, że podstawową strategią leczenia cukrzycy powinna być ochrona przed skutkami wzrastającego stresu oksydacyjnego.

MITOCHONDRIA W ŚRÓDBŁONKU NACZYNIOWYM

W komórkach śródbłonna naczyniowego mitochondria przez szereg lat nie były badane, gdyż zapotrzebowanie energetyczne jest tu prawie całkowicie pokrywane przez proces glikolizy. Obecnie wiadomo, że mitochondria są nie tylko centrum energetycznym komórki, ale również niezwykle ważnymi organellami sygnalizacyjnymi. Mogą one być miejscem zainicjowania sygnału komórkowego, bądź uczestniczą w przekazywaniu sygnału pochodzącego z innego miejsca w komórce. W efekcie mitochondria aktywnie uczestniczą w przebiegu wielu procesów regulacyjnych w komórce. W śródbłonna naczyniowym przekazywanie sygnału jest wiodącą funkcją mitochondriów, podczas gdy w komórkach o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym (np. mięśni czy wątroby) przede wszystkim na drodze oksydacyjnej fosforylacji wytwarzają ATP. W wyniku pracy łańcucha oddechowego powstaje również anionorodnik ponadtlenkowy, którego znaczenie opisano powyżej.

Mitochondria są wielofunkcyjnymi organellami, które mają swój własny genom, transkryptom i proteom. Mitochondrialne DNA koduje 13 białek wchodzących w skład kompleksów łańcucha oddechowego (pozostałe 79 białek oksydacyjnej fosforylacji i około 1000 innych białek mitochondrialnych koduje DNA jądrowe) oraz 22 tRNA (transferowe) i 2 rRNA (Ryc. 5). Utworzone są przez dwie błony lipidowo-białkowe: zewnętrzną, która jest stosunkowo łatwo przepuszczalna dzięki obecności poryn, oraz wewnętrzną, która jest przepuszczalna bardzo selektywnie. Błona wewnętrzna jest silnie pofałdowana, tworzy grzebienie mitochondrialne. W niej zlokalizowane jest wiele białek, w tym białka kompleksów oddechowych, syntaza ATP, liczne białka transportujące, kanały jonowe i wiele innych. Błony lipidowe mitochondriów wydzielają przestrzeń międzybłonową oraz macierz mitochondrialną, która zawiera około 70% wszystkich białek mitochondrialnych, w tym na przykład enzymy związane z β -oksydacją oraz DNA mitochondrialne [46,47].

Mitochondria są dynamicznymi strukturami tworzącymi ściśle regulowaną i uorganizowaną, rozgałęzioną sieć mitochondrialną, która podlega nieustająco procesom fragmentacji i fuzji w odpowiedzi na różnego rodzaju bodźce. Dynamiczne zmiany sieci mitochondrialnej zapewniają odpowiednią dystrybucję mitochondriów w komórce w celu dostarczenia energii tam, gdzie jest to potrzebne. Pozwalają na równomierne segregację mitochondriów do dwóch komórek potomnych w trakcie podziałów, a także stanowią jeden ze sposobów komunikacji z innymi organellami wewnątrzkomórkowymi i jądrem [46,48]. Ponadto utworzenie sieci mitochondrialnej chroni przed kumulacją uszkodzonego DNA w jednym mitochondrium. Dzięki temu możliwe jest kompensowanie niedoborów wynikających z mutacji czy oksydacyjnego uszkodzenia mtDNA w komórkach, nawet w przypadku, kiedy te zmiany są bardzo duże (wysoki procent penetracji mutacji czy uszko-



Rycina 5. Kompleksy oksydacyjnej fosforylacji i miejsca wytwarzania RFT.

dzeń mtDNA). Zachowanie prawidłowej dynamiki mitochondriów jest również istotne dla homeostazy śródbłonka. Zaburzenie procesów fuzji i fragmentacji mitochondriów obserwowano w wielu chorobach układu sercowo-naczyniowego. Wykazano, że u pacjentów cierpiących na cukrzycę obserwuje się zmienioną morfologię mitochondriów, sieć mitochondrialna jest mniej rozległa i wzrasta pula białka adaptorowego Fis1, które sprzyja fragmentacji sieci mitochondrialnej [49]. Ważnym dla funkcjonowania komórki i ściśle regulowanym parametrem jest również ilość (masa) mitochondriów. W procesie biogenezy dochodzi do replikacji DNA mitochondrialnego i ekspresji genów kodowanych zarówno przez geny jądrowe, jak i mitochondrialne. Do aktywacji i przebiegu tego procesu konieczny jest udział czynników transkrypcyjnych, w tym koaktywatora 1 α receptorów γ aktywowanych proliferatorami peroksyosomów (PGC-1 α), jądrowego czynnika oddechowego 1 i 2 (NRF-1 i NRF-2) oraz mitochondrialnych czynników transkrypcyjnych A i B (TFAM i TFBM). Co ważne, biogeneza mitochondriów może być aktywowana przez NO, CO, a także RFT pochodzące z mitochondrialnego łańcucha oddechowego w wyniku sygnału przekazywanego z mitochondriów do jądra komórkowego (tzw. *retrograde signalling*). Taki scenariusz obserwowano pod wpływem działania cytokin prozapalnych, w tym TNF- α czy IL-1 β . Substancje te indukowały stres oksydacyjny, powodowały wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia oraz sprzyjały wytwarzaniu NO, który pośredniczył nie tylko w uszkodzaniu mitochondriów, ale również powodował aktywację biogenezy tych organelli [50]. Co ciekawe, w starzejącym się śródbłonku zaobserwowano zahamowanie biogenezy mitochondriów, czemu towarzyszyły obniżenie syntezy białka oksydazy cytochromowej i nadmierne nagromadzenie RFT wytwarzanych w mitochondriach [51].

Reaktywne formy tlenu powstające w mitochondriach są ważnymi czynnikami w wielu procesach fizjologicznych. Wymienić należy tutaj regulację autofagii, wrodzoną odporność

czy różnicowanie. Wydaje się również, że długość życia jest związana z aktywnością mitochondriów. Organelle te są ważnym elementem w inicjacji apoptozy poprzez uwalnianie cytochromu c. Pełnią również istotną rolę w regulacji homeostazy jonów wapnia, gdyż w sposób zależny od stanu energetycznego buforują Ca²⁺. W wyniku przeładowania mitochondriów jonami wapnia następuje zwiększenie wytwarzania RFT i może dojść do aktywacji apoptozy [więcej w 52]. Wykazano, że produkcja RFT w mitochondriach wzrasta w wyniku zwiększenia stężenia jonów wapnia w tych organellach, na przykład po aktywacji receptorów sprzężonych z białkami G. Aktywatorem może być między innymi trombina. Mobilizacja Ca²⁺ następuje w wyniku współdziałania z receptorem IP₃. Jest to jedna z dróg umożliwiających adhezję leukocytów do komórek śródbłonka w przypadku zapalenia indukowanego trombiną [53]. Korelację między zmianami wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia a produkcją RFT zauważono między innymi w komórkach śródbłonka tętnicy płucnej stymulowanych ATP. Nie do końca wiadomo jednak, jakie jest główne źródło reaktywnych form tlenu w tym przypadku, gdyż podanie inhibitorów mitochondrialnego łańcucha oddechowego, rotenonu i antymycyny A, nie dało jednoznacznych odpowiedzi i nasunęło przypuszczenia, co do aktywacji innych niż mitochondrialny łańcuch oddechowy mechanizmów zwiększających produkcję RFT [54]. W mitochondriach aktywnie wytwarzających ATP, anionodnik ponadtlenny powstaje w niewielkiej ilości za pośrednictwem kompleksu I łańcucha oddechowego, zaś dominuje wytwarzanie tej reaktywnej cząstki przez kompleks III [55]. Potencjalne miejsca wytwarzania RFT przez kompleksy łańcucha oddechowego pokazano na rycinie 5.

Wykazano, że u pacjentów z cukrzycą typu 2 upośledzone są funkcje mitochondriów. Obserwowano bowiem zmniejszoną szybkość zużycia tlenu i obniżony potencjał transbłonowy mitochondriów. Może to być powodowane tym, że w warunkach cukrzycy dochodzi do nieprawidłowości w

procesie biogenezy. Dodatkowo następuje fragmentacja sieci mitochondrialnej, jak też zaburzona jest autofagia. Sprzyja to gromadzeniu się nieprawidłowo funkcjonujących mitochondriów, a tym samym ułatwia aktywację szlaków prowadzących do śmierci komórek [56]. Ponadto wykazano obniżoną wydajność systemów antyoksydacyjnych, co oceniano na podstawie stosunku GSH/GSSG, a w efekcie obserwowano wzrost wytwarzania RFT w mitochondriach [44]. Zatem warunki metaboliczne, które towarzyszą cukrzycy przyczyniają się do dysfunkcji śródbłonna naczyniowego zależnej od mitochondriów (Ryc. 4), które poprzez zwiększone wytwarzanie RFT mogą indukować śmierć komórek na drodze apoptozy, ale również w wyniku zmian epigenetycznych (np. metylacji DNA) indukowana jest pamięć metaboliczna i oksydacyjne uszkodzenia DNA mitochondrialnego pogłębiają się mimo normalizacji glikemii [57]. Ponadto wydaje się, że oksydacyjne uszkodzenia w DNA jądrowym i/lub mitochondrialnym kumulują się w czasie rozwoju choroby. Nie jest wykluczone, aby na skutek zmian w DNA jądrowym i mitochondrialnym, dochodziło do uszkodzeń w obrębie genów kodujących białka tego samego kompleksu oddechowego, czego skutkiem są deficyty w pracy łańcucha oddechowego. Warto wspomnieć, że jeśli dochodzi do zaburzenia funkcji kompleksu V (ATPaza mitochondrialna), wówczas dotyka to tylko syntezy ATP. Natomiast uszkodzenia w kompleksie I, III lub IV przyczyniają się do obniżenia potencjału mitochondrialnego, co w konsekwencji uniemożliwia wytwarzanie ATP, zaburza homeostazę wapniową i wpływa na aktywność życiową komórki [58].

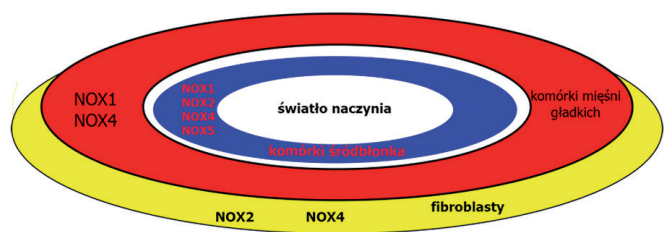
Podsumowując, zaburzenia w funkcji mitochondriów wpływają na aktywność systemu oksydacyjnej fosforylacji, sprzyjają zwiększeniu wytwarzania RFT, a także znacząco oddziałują na metabolizm Ca^{2+} w komórce. Zwiększone wytwarzanie RFT przez mitochondrialny łańcuch oddechowy może indukować dysfunkcję mitochondriów, która jest skutkiem uszkodzeń DNA mitochondrialnego i zaburzeń w szybkości zużywania tlenu. Zmiany te zwrótnie stymulują wytwarzanie RFT przyczyniając się do dalszego nasilania stresu oksydacyjnego i pogłębiają uszkodzenia w obrębie samych mitochondriów oraz całej komórki.

OKSYDAZA NAD(P)H

Mitochondrialny łańcuch oddechowy jest istotnym źródłem RFT, które wpływają na funkcje śródbłonna naczyniowego. Uważa się jednak, że szczególnie istotnym źródłem RFT w tej tkance jest oksydaza NAD(P)H występująca w różnych błonach komórki (Ryc. 4). Enzym ten katalizuje powstawanie anionorodnika nadtlenkowego na drodze jednoelektronowej redukcji tlenu z użyciem NAD(P)H lub NADH jako donora elektronów. Może wytwarzać znaczne ilości wolnych rodników tlenowych. Jego aktywatorami są między innymi angiotensyna II, trombina, TNF- α , ale także stres mechaniczny. Wiele doniesień sugeruje, że RFT wytwarzane w sposób kontrolowany przez enzymy z rodziny NOX aktywują prozyciowe szlaki przekazywania sygnału zależne od AMPK, ponadto zwiększają aktywność eNOS i relaksację naczyń, czyli działają normalizująco na funkcje komórek śródbłonna. Wykazano, że zastosowanie inhibitorów NOX w komórkach śródbłonna z naczyń wieńcowych, z żyły pępowinowej oraz ze skóry powodowało istotne zahamowanie

prolifracji, co może być skutkiem zmniejszonej aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B po obniżeniu dostępności RFT [59]. U pacjentów z cukrzycą obserwowano podwyższenie poziomu białka NOX, co tłumaczy znaczące zwiększenie ilości powstających RFT. Podobnie sytuacja wygląda w przypadku nadciśnienia czy zwiększonej podaży wolnych kwasów tłuszczowych. Zależnie od lokalizacji wewnątrzkomórkowej enzymów odpowiedzialnych za nadmierne wytwarzanie RFT może dochodzić do hiperaktywacji szlaków prowadzących do indukcji stanu zapalnego, niedostatecznej dostępności kofaktorów czy molekuł sygnałowych, jak również zbyt małej wydajności mechanizmów antyoksydacyjnych, co prowadzi do oksydacyjnego uszkodzenia białek i lipidów [60]. RFT wytwarzane przez oksydazę NAD(P)H mogą wpływać na inne systemy generujące reaktywne formy tlenu, a aktywność NOX może być regulowana przez RFT pochodzące z innych źródeł, w tym z mitochondrialnego łańcucha oddechowego. To, co wyróżnia enzymy z rodziny NOX, to fakt, że ich podstawową funkcją jest wytwarzanie reaktywnych form tlenu. W przypadku pozostałych „producentów”, RFT są jedynie produktem ubocznym powstającym przy okazji spełniania ich zasadniczych funkcji [61].

Białka z rodziny NOX zlokalizowane są w błonach biologicznych. Poza błoną plazmatyczną, enzymy te zlokalizowano w siateczce śródplazmatycznej, mitochondriach i otocze jądrowej. Profil ekspresji genów kodujących oksydazy NAD(P)H w warunkach patologicznych jest różny zależnie od rodzaju i stopnia zaawansowania choroby. Wydaje się, że w warunkach fizjologicznych aktywność tych enzymów jest stosunkowo niska, natomiast istotnie wzrasta w odpowiedzi na czynniki stymulujące, takie jak: cytokiny, czynniki wzrostu, hiperlipidemia czy glukoza w wysokim stężeniu. Czynniki te zaburzają homeostazę śródbłonna naczyniowego i powodują zmiany patologiczne w tej tkance. W układzie sercowo-naczyniowym, w tym również w warstwie śródbłonna, występują następujące izoformy oksydazy NAD(P)H: NOX1, NOX2, NOX4 i NOX5. Schematycznie występowanie izoform NOX w kolejnych warstwach tworzących naczynie przedstawiono na rycinie 6. Dla funkcji śródbłonna szczególnie istotna wydaje się izoforma NOX4. Ilość mRNA dla tego enzymu przekracza około 20-krotnie ilość mRNA izoformy NOX2 związanej z reakcją obronną organizmu [62]. Jego ekspresja może być regulowana na drodze zależnej od czynnika NF- κ B. Ligandy receptorów PPAR γ , na przykład roziglitazon, zmniejszają aktywację tego czynnika transkrypcyjnego w komórkach śródbłonna naczyniowego eksponowanych na wysokie stężenia glukozy i tym samym obniżają ekspresję genu *Nox4* [63]. NOX4 jest aktywną konstytutywnie izoformą NOX i, podobnie jak inne białka z tej rodziny, zawiera błonową domenę katalityczną. Stwierdzono jednak, że do aktywacji tej izoformy enzymu dochodzi bez udziału podjednostek cytosolowych p47phox, p67phox, p40phox, czy białka Rac. Mutacje w ważnej dla funkcjonowania innych oksydaz NAD(P)H podjednostce p22phox również nie wpływają na jego funkcje. NOX4 reguluje aktywność wielu kinaz i fosfataz białkowych oraz czynników transkrypcyjnych [64]. Ponadto jest to enzym unikatowy, gdyż w przeciwieństwie do pozostałych izoform, jest w stanie bezpośrednio wytwarzać H_2O_2 bez uchwytnej fazy powstawania anionorodnika nadtlenkowego (Ryc. 4). Cząsteczka ta pozytywnie oddziałuje na układ naczyniowy. Takie protekcyjne działanie RFT komplikuje możliwość terapeutycznego zasto-



Rycina 6. Lokalizacja izoform NOX w kolejnych warstwach naczyń krwionośnych.

sowania substancji o działaniu antyoksydacyjnym, gdyż może zaburzać pozytywny efekt aktywacji NOX [41]. Wykazano, że w komórkach śródbłonki mózgu NOX4 sprzyja aktywacji szlaków prożyciowych [65]. Mimo takiego pozytywnego działania RFT wytwarzane w nadmiarze mogą wywierać działanie cytotoksyczne. Wykazano bowiem, że aktywna oksydaza NAD(P)H (izoforma 4) oraz glukoza w wysokich stężeniach mogą być przyczyną zaburzeń w homeostazie wapniowej komórek śródbłonki naczyniowego, powodując wzrost stężenia Ca^{2+} w cytosolu [66-68]. Podobnie, w komórkach HUVEC poddawanych działaniu hiperglikemii wydaje się, że enzym ten jest dominującym miejscem podwyższonej syntezy RFT [60]. Ponadto istnieją dowody, że NOX4 może być również zlokalizowany w mitochondriach [70]. Bezpośrednie sąsiedztwo łańcucha oddechowego sprawia, że te dwa systemy wytwarzające RFT mogą na siebie wzajemnie oddziaływać i na zasadzie sprzężenia zwrotnego aktywować wytwarzanie coraz większych ilości reaktywnych form tlenu.

Poza chorobami sercowo-naczyniowymi, zmiany na poziomie aktywności i ilości NOX4 obserwowano również w starzeniu. Stwierdzono, że w śródbłonku aorty z wiekiem wzrasta stres oksydacyjny, co jest związane z wyższą aktywnością NOX4, zwiększonym wytwarzaniem anionorodnika nadtlenkowego, ale również z obniżoną aktywnością dysmutaz nadtlenkowych. Nie stwierdzono natomiast zmian w ilości białka Cu,Zn-SOD i Mn-SOD (izoformy SOD występujące odpowiednio w przedziałach poza macierzą mitochondrialną i w mitochondriach). Wzrastający stres oksydacyjny koreluje z rosnącym wraz z wiekiem stanem zapalnym [71].

W 2001 roku Cheng i współpracownicy odkryli, że poza NOX2 i NOX4, istotną rolę w ludzkich komórkach śródbłonki odgrywa NOX5 [72]. Wydaje się, że białko to może mieć znaczenie w kontrolowaniu zależnych od RFT procesów związanych z angiogenezą. Może również wpływać na proliferację komórek śródbłonki, a w szczególności na przestrzenną organizację związaną z tworzeniem sieci kapilarnych [73]. Ciekawe jest to, że NOX5 naturalnie nie występuje w komórkach gryzoni, nie znaleziono tam genu kodującego ten enzym. Inaczej niż w przypadku pozostałych izoform NOX, aktywność NOX5 jest regulowana przez jony wapnia, zawiera on bowiem na końcu aminowym domenę wiążącą Ca^{2+} (ang. *calmodulin-like domain*). Indukcja ekspresji genu kodującego NOX5 w komórkach śródbłonki z mysiej aorty sprzyjała podwyższeniu aktywności eNOS, co według autorów może wyjaśniać wpływ RFT na dostępność NO [74]. Wydaje się, że kinaza białkowa C (PKC) aktywuje NOX5. Stwierdzono, że w obecności glukozy w wysokim stężeniu dochodzi do wzrostu aktywności PKC α w komórkach śródbłonki naczyniowego, czemu towarzyszy

zwiększone wytwarzanie anionorodnika nadtlenkowego na drodze zależnej od NOX5 [75]. W systemie *in vitro* wykazano, że w przypadku NOX5, przeciwnie do pozostałych enzymów z rodziny oksydaz NAD(P)H, NADH nie może być donorem elektronów w zastępstwie NAD(P)H i aktywować wytwarzania anionorodnika nadtlenkowego [76].

W związku ze znaczącym udziałem enzymów z rodziny NOX w powstawaniu problemów sercowo-naczyniowych towarzyszących cukrzycy, upatruje się możliwości terapeutycznych w modyfikowaniu ich ilości czy aktywności, co w efekcie będzie związane ze ścisłą kontrolą wytwarzania reaktywnych form tlenu. Niezwykle trudno jest bowiem ustalić granicę pomiędzy protekcyjnym a toksycznym działaniem RFT pochodzących z NOX, podobnie jak ma to miejsce w przypadku RFT pochodzących z mitochondrialnego łańcucha oddechowego.

PODSUMOWANIE

Dysfunkcja śródbłonki leży u podłoża wielu chorób układu sercowo-naczyniowego. W głównej mierze przyczynia się do tego stres oksydacyjny. Środowisko metaboliczne towarzyszące cukrzycy (wysokie stężenie glukozy we krwi, nadmiar wolnych kwasów tłuszczowych itp.) przyczynia się do zaburzenia wydolności systemów antyoksydacyjnych oraz znaczącego wzrostu wytwarzania reaktywnych form tlenu. Ze względu na wielorakie funkcje RFT niezwykle trudne jest opracowanie sposobu eliminacji toksycznego ich działania, głównie ze względu na fakt, że mechanizmy ich wytwarzania są niezwykle złożone. Często przyczyną nadmiernej syntezy RFT jest aktywacja kilku wzajemnie na siebie oddziałujących i zwrotnie aktywujących się systemów, co dodatkowo komplikuje próby ingerencji farmakologicznej. Wobec tego istotne jest pełniejsze wyjaśnienie mechanizmów wytwarzania RFT i dzięki temu opracowanie sposobów ich regulacji. Jest to przedmiotem intensywnych badań farmakologicznych. Kontrolowanie wytwarzania RFT, które przecież pełnią tak ważną rolę cząstki sygnałowej, krytycznej dla funkcji naczyń, wymaga ostrożności i precyzji, aby nie zaburzać funkcjonowania śródbłonki naczyniowego, a przy tym wielu organów i w konsekwencji całego organizmu.

PIŚMIENNICTWO

1. International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. 7th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2015
2. Mudau M, Genis A, Lochner A, Stridjorn H (2012) Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr* 23: 222-231
3. Hadi HAR, Carr CS, Al Suwaidi J (2005) Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag* 1: 183-198
4. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva, World Health Organization, 2012
5. Son SM (2007) Role of vascular reactive oxygen species in development of vascular abnormalities in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 77S: S65-S70
6. Montezano AC, Touyz RM (2011) Reactive oxygen species and endothelial function - role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 110: 87-94
7. Wingler K, Hermans JJR, Schiffrers P, Moens AL, Paul M, Schmidt HHHW (2011) NOX1, 2, 4, 5: counting outoxidative stress. *Br J Pharmacol* 164: 866-883

8. Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300
9. Kieda C (2003) How endothelial cell organo-specificity mediates circulating cell homing. *Archivum Immunol Therapie Experimentalis* 51: 81-89
10. Cook-Mills JM, Deem TL (2005) Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol* 77: 487-495
11. Costa PZ, Soares R (2013) Neovascularization in diabetes and its complications. Unraveling the angiogenic paradox. *Life Sci* 92: 1037-1045
12. Zhang M, Brewera AC, Schröder K, Santos CXC, Grieve DJ, Wang M, Anilkumar N, Yu B, Dong X, Walker SJ, Brandes RP, Shah AM (2010) NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 18121-18126
13. Obońska K, Grąbczewska Z, Fisz J (2010) Ocena czynności śródbłonna naczyniowego – gdzie jesteśmy, dokąd zmierzamy? *Folia Cardiologica* 5: 292-297
14. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ (2007) Endothelial function and dysfunction. Testing and clinical relevance. *Circulation* 115: 1285-1295
15. Rubanyi GM, Vanhoutte PM (1986) Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 250: H822-H827
16. Sessa WC (2004) eNOS at a glance. *J Cell Sci* 117: 2427-2429
17. Fleming I, Busse R (2009) Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R1-R12
18. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87: 315-424
19. Dabiré H, Barthélémy I, Blanchard-Gutton N, Sambin L, Sampedrano CC, Gouni V, Unterfinger Y, Aguilar P, Thibaud JL, Ghaleh B, Bizé A, Pouchelon JL, Blot S, Berdeux A, Hittinger L, Chetboul V, Su JB (2012) Vascular endothelial dysfunction in Duchenne muscular dystrophy is restored by bradykinin through upregulation of eNOS and nNOS. *Basic Res Cardiol* 107: 240
20. Srinivasan S, Hatley ME, Bolick DT, Palmer LA, Edelstein D, Brownlee M, Hedrick CC (2004) Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression *via* AP-1 activation in aortic endothelial cells. *Diabetologia* 47: 1727-1734
21. Fadini GP, Sartore S, Agostini C, Avogaro A (2007) Significance of endothelial progenitor cells in subjects with diabetes. *Diabetes Care* 30: 1305-1313
22. Shiojima I, Walsh K (2002) Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res* 90: 1243-1250
- Rejendran P, van Rengarajan T, Thangavel R, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I (2013) The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci* 9: 1057-1069
23. Zeeuw P, Wong BW, Carmeliet P (2015) Metabolic adaptations in diabetic endothelial cells. *Circ J* 79: 934-941
24. Sena CM, Pereira AM, Seica R (2013) Endothelial dysfunction – a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta* 1832: 2216-2231
25. Giacco F, Brownlee M (2010) Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 107: 1058-1070
26. Utsunomiya K (2012) Treatment strategy for type 2 diabetes from the perspective of systemic vascular protection and insulin resistance. *Vasc Health Risk Manag* 8: 429-436
27. Kaplon RE, Walker AE, Seals DR (2011) Plasma norepinephrine is an independent predictor of vascular endothelial function with aging in healthy women. *J Appl Physiol* 111: 1416-1421
28. Amiya E, Watanabe M, Komuro I (2014) The relationship between vascular function and the autonomous nervous system. *Ann Vasc Dis* 7: 109-119
29. Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME (2008) Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes* 57: 1446-1454
30. Silver AE, Beske SD, Christou DD, Donato AJ, Moreau KL, Eskurza I, Gates PE, Seals DR (2007) Overweight and obese humans demonstrate increased vascular endothelial NAD(P)H oxidase-p47phox expression and evidence of endothelial oxidative stress. *Circulation* 115: 627-637
31. Palem SP, Abraham P (2015) A study on the level of oxidative stress and inflammatory markers in type 2 diabetes mellitus patients with different treatment modalities. *J Clin Diagn Res* 9: BC04-BC07
32. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134: 489-492
33. Lu J, Holmgren A (2014) The thioredoxin antioxidant system. *Free Rad Biol Med* 66: 75-87
34. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G (2004) Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 44: 381-386
35. Duval C, Nègre-Salvayre A, Dogilo A, Salvayre R, Pénicaud L, Casteilla L (2002) Increased reactive oxygen species production with antisense oligonucleotides directed against uncoupling protein 2 in murine endothelial cells. *Biochem Cell Biol* 80: 757-764
36. Tian XY, Wong WT, Xu A, Lu Y, Zhang Y, Wang L, Cheang WS, Wang Y, Yao X, Huang Y (2012) Uncoupling protein-2 protects endothelial function in diet-induced obese mice. *Circ Res* 110: 1211-1216
37. Koziel A, Sobieraj I, Jarmuszkiewicz W (2015) Increased activity of mitochondrial uncoupling protein 2 improves stress resistance in cultured endothelial cells exposed *in vitro* to high glucose levels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 309: H147-H156
38. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative stress and antioxidant defence. *WAO J* 5: 9-19
39. Fatehi-Hassanabad Z, Chan CB, Furman BL (2010) Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes. *Eur J Pharmacol* 636: 8-17
40. Schröder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J, Kruse C, Luedike P, Michaelis UR, Weissmann N, Dimmeler S, Shah AM, Brandes RP (2012) Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circ Res* 110: 1217-1225
41. Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou MH, Brownlee M (2006) Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest* 116: 1071-1080
42. Milstien S, Katusic Z (1999) Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 681-684
43. Hernandez-Mijares A, Rocha M, Rovira-Llopis S, Bañuls C, Bellod L, de Pablo C, Alvarez A, Roldan-Torres I, Sola-Izquierdo E, Victor VM (2013) Human leukocyte/endothelial cell interactions and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic patients and their association with silent myocardial ischemia. *Diabetes Care* 36: 1695-1702
44. Li J, Solus J, Chen Q, Rho YH, Milne G, Stein CM, Darbar D (2010) Role of inflammation and oxidative stress in atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 7: 438-444
45. Friedman JR, Nunnari J (2014) Mitochondrial form and function. *Nature* 505: 335-343
46. Wojtczak L, Zablocki K (2008) Mitochondria in cell life, death and disease. *Postepy Biochem* 54: 129-141
47. Westermann B (2012) Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochem Biophys Acta* 1817: 1833-1838
48. Shenouda AM, Widlansky ME, Chen K, Xu G, Holbrook M, Tabit CE, Hamburg NM, Frame AA, Caiano TL, Kluge MA, Duess MA, Levit A, Kim B, Hartman ML, Joseph L, Shirihai OS, Vita JA (2011) Altered mitochondria dynamics contributes to endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation* 124: 444-453
49. Piantadosi CA, Suliman HB (2012) Redox regulation of mitochondrial biogenesis. *Free Rad Biol Med* 53: 2043-2053
50. Ungvari Z, Labinskyy N, Gupte S, Chander PN, Edwards JG, Csiszar A (2008) Dysregulation of mitochondrial biogenesis in vascular endothelial and smooth muscle cells of aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H2121-H2128
51. Drabarek B, Dymkowska D (2012) Znaczenie jonów wapnia w śródbłonie naczyń. *Postępy Biochem* 48: 418-428
52. Hawkins BJ, Solt LA, Chowdhury I, Kazi AS, Ruhul Abid M, Aird WC, May MJ, Foskett JK, Madesh M (2007) G protein-coupled recep-

- tor Ca^{2+} -linked mitochondrial reactive oxygen species are essential for endothelial/leucocyte adherence. *Mol Cell Biol* 27: 7582-7593
53. Wilkinson JA, Jacob R (2003) Agonist-induced calcium and oxidative stress responses in endothelial cells. *Biochem Soc Trans* 31: 960-962
 54. Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417: 1-13
 55. Pangare M, Makino A (2012) Mitochondrial function in vascular endothelial cell in diabetes. *J Smooth Muscle Res* 48: 1-26
 56. Madsen-Bouterse SA, Mohammad G, Kanwar M, Kowluru RA (2010) Role of mitochondrial DNA damage in the development of diabetic retinopathy, and the metabolic memory phenomenon associated with its progression. *Antioxid Redox Signal* 13: 797-805
 57. Wallace DC (2009) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-1488
 58. Abid MR, Kachra Z, Spokes KC, Aird WC (2000) NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration. *FEBS Lett* 486: 252-256
 59. Drummond GR, Sobey CG (2014) Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular diseases? *Trends Endocrinol Metabolism* 25: 452-463
 60. Lassègue B, San Martín A, Griendling KK (2012) Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res* 110: 1364-1390
 61. Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, Wakisaka M, Ibayashi S, Utsumi H, Iida M (2004) Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* 109: 227-233
 62. Willialms CR, Lu X, Sutliff RL, Hart CM (2012) Rosiglitazone attenuates NF- κ B-mediated Nox4 upregulation in hyperglycemia-activated endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 303: C213-C223
 63. Serrander L, Cartier L, Bedard K, Banfi B, Lardy B, Plastre O, Sienkiewicz A, Forro L, Schlegel W, Krause KH (2007) NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem J* 406: 105-114
 64. Basuroy S, Tcheranova D, Bhattacharya S, Leffler CW, Parfenova H (2011) Nox4 NADPH oxidase-derived reactive oxygen species, via endogenous carbon monoxide, promote survival of brain endothelial cells during TNF- α -induced apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C256-C265
 65. Paltauf-Doburzynska J, Malli R, Graier W (2004) Hyperglycemic conditions affect shape and Ca^{2+} homeostasis of mitochondria in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 44: 423-436
 66. Tamareille S, Mignen O, Capiod T, Rucker-Martin C, Feuvray D (2006) High glucose-induced apoptosis through store-operated calcium entry and calcineurin in human umbilical vein endothelial cells. *Cell Calcium* 39: 47-55
 67. Bishara NB, Ding H (2010) Glucose enhances expression of TRPC1 and calcium entry in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H171-H178
 68. Dymkowska D, Drabarek B, Podrzywałow-Bartnicka P, Szczepanowska J, Zabłocki K (2014) Hyperglycaemia modifies energy metabolism and reactive oxygen species formation in endothelial cells *in vitro*. *Arch Biochem Biophys* 542: 7-13
 69. Block K, Gorin Y, Abboud HE (2009) Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 106: 14385-14390
 70. Li L, Smith A, Hagen TM, Frei B (2010) Vascular oxidative stress and inflammation increase with age: ameliorating effects of α -lipoic acid supplementation. *Ann N Y Acad Sci* 1203: 151-159
 71. Cheng G, Cao Z, Xu X, Meir EG, Lambeth JD (2001) Homologs of gp-91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 269: 131-140
 72. Ushio-Fukai M, Nakamura Y (2008) Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett* 266: 37-52
 73. Zhang Q, Malik P, Pandey D, Gupta S, Jagnandan D, Belin de Chantemele E, Banfi B, Marrero MB, Rudic RD, Stepp DW, Fulton DJ (2008) Paradoxical activation of endothelial nitric oxide synthase by NADPH oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1627-1633
 74. Chen F, Yu Y, Haigh S, Johnson J, Lucas R, Stepp DW, Fulton DJR (2014) Regulation of NADPH oxidase 5 by protein kinase C isoforms. *PLoS One* 9: e88405
 75. Bánfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnár GZ, Krause KH, Cox JA (2004) Mechanism of Ca^{2+} activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem* 279: 18583-18591

Oxidative damage of the vascular endothelium in type 2 diabetes – the role of mitochondria and NAD(P)H oxidase

Dorota Dymkowska 

Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, 3 Pasteura St., 02-093 Warsaw, Poland

 e-mail: d.dymkowska@nencki.gov.pl

Key words: endothelium, oxidative stress, mitochondria, NAD(P)H oxidase, reactive oxygen species, diabetes

ABSTRACT

Endothelial dysfunction is one of the major diabetic complications causing morbidity and mortality of large number of patients. Oxidative stress is key factor in the development and progression of such pathological changes. Hyperglycaemia and/or hyperlipidaemia accompanying diabetes, cause increased production of reactive oxygen species in parallel with significantly reduced antioxidative defence. The vascular endothelium is not only passive lining of the vessels but also highly metabolically active tissue. It produces and secretes a number of factors responsible for the maintenance of vascular homeostasis. Oxidative stress leads to changes in vascular tone, which mainly involves the reduction of NO bioavailability. There are several ROS generating mechanisms, however it seems that the mitochondrial respiratory chain and NAD(P)H oxidase play a most significant role in endothelium. The endothelial dysfunction in diabetes, the importance of mitochondria and NAD(P)H oxidase in the development of pathological changes would be discussed below.