

Choroby układu kręgowego są najczęstszymi przyczynami zgonów w krajach cywilizacji zachodniej. Wspólnym elementem ich patomechanizmu jest zwiększona naczyniowa produkcja reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*) skutkująca naczyniowym stresem oksydacyjnym. W następstwie stresu oksydacyjnego jest dysfunkcja błonki, o której wiadomo, że jest czynnikiem ryzyka zgonów w różnych postaciach choroby sercowo-naczyniowej. Paradoksalnie, mechanizm stresu oksydacyjnego jest słabo poznany. Wskazuje na to chociażby fakt, że kliniczne próby zapobiegania chorobie sercowo-naczyniowej przy pomocy anty-oksydantów zakończyły się niepowodzeniem.

Naczyniowy stres oksydacyjny; W komórkach organizmów tlenowych, produktem ubocznym enzymatycznych reakcji oksydo-redukcyjnych (np. mitochondrialna fosforylacja oksydacyjna) jest przeniesienie elektronu na tlen i powstanie anionorodnika nadtlenkowego ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$), tj. cząsteczki O_2 z nadmiarowym, niesparowanym elektronem (wolny rodnik tlenowy). Wyjatkowa pod tym względem jest oksydaza NADPH, której jedyną znaną funkcją jest produkcja O_2^- (ewentualnie H_2O_2). O_2^- zapoczątkowuje kaskadę reakcji wolnorodnikowych, której produktami są: nadtlenoazotyn ($ONOO^-$), nadtlenek wodoru (H_2O_2), rodnik wodorotlenowy (OH^*) i kwas podchloryny ($HClO$) (Ryc. 1). Substancje te cechuje duża reaktywność chemiczna (są to terminy ROS, są akceptorami lub donorami elektronu i odpowiednio utleniaczami lub reduktorami). W małych stężeniach służą jako przekazywanie informacji w fizjologicznej transdukcji sygnałów, a w większych są toksyczne. Ich efekty komórkowe wynikają z faktu, że atakują: (i) tlenek azotu (NO), co ogranicza biodostępność NO i skutkuje dysfunkcją błonki. Równocześnie nie powstaje nadtlenoazotynu ($O_2^- + NO \rightarrow ONOO^-$), który jest źródłem toksycznego rodnika OH^* , oraz skutkuje S-nitrozylacją białek, co zmienia ich właściwości (Ryc. 1); (ii) reszty $-SH$ aminokwasów (głównie cysteiny), co skutkuje zmianą właściwości białek; (iii) lipidy w miejscu ich nienasyconych wiąz, co zaburza strukturę fosfolipidów błonowych oraz (iv) kwasy nukleinowe, których destrukcja skutkuje zaburzeniami genomu komórkowego. Ochronę przed toksycznością ROS zapewniają, m.in., enzymy SOD, katalaza i peroksydaza glutationu. Termin „stres oksydacyjny” odnosi się do stanów, w których produkcja ROS przeważa nad ich eliminacją i ujawniają się niepożądane efekty ROS.

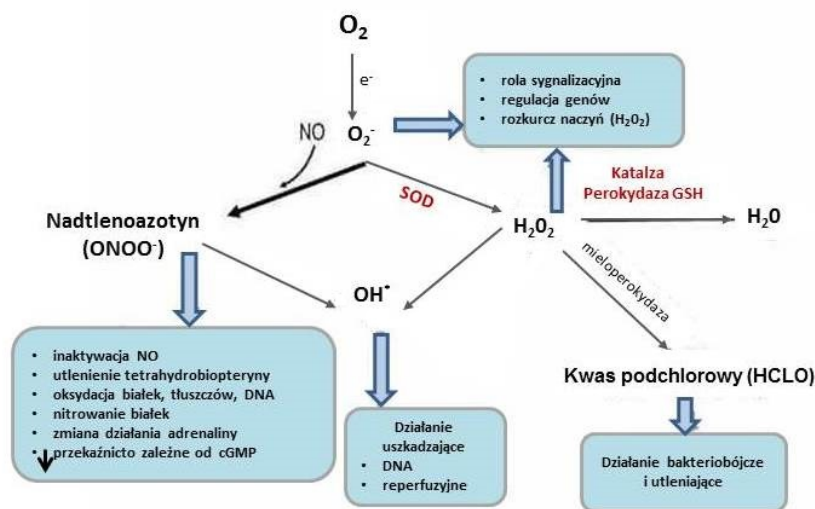


Fig. 1. Reakcje z udziałem O_2^- . Reakcja O_2^- z NO jest preferowana bo jest najszybsza ($6,7 \times 10^9$ mol/L/sec). Wolniejsze są dwie reakcje dysmutacji mutacji O_2^- do H_2O_2 : szybsza - przy udziale dysmutazy nadtlenkowej (SOD) ($1,8 \times 10^9$ mol/L/sec) oraz ~ 10 tys. razy wolniejsza - spontaniczna, bez udziału SOD ($8,0 \times 10^4$ mol/L/sec). Nadtlenoazotyn i H_2O_2 mogą być źródłem bardzo toksycznego rodnika wodorotlenowego (OH^*). Zwykle jednak H_2O_2 jest rozkładany do wody (bez udziału OH^*) przez katalazę i peroksydazę glutationu. H_2O_2 przekształca się w OH^* jedynie w obecności jonów zredukowanego elaza (Fe^{2+}) lub miedzi (Cu^+) (reakcja Fentona) i w tym mechanizmie metale te mogą być źródłem toksycznej oksydo-redukcyjnej. W obecności mieloperoksydazy komórek zapalnych, H_2O_2 przekształca się w kwas

podchloryny- silny oksydant o działaniu bakteriobójczym.

Wszystkie czynniki ryzyka choroby sercowo-naczyniowej (hypercholesterolemia, nadciśnienie, starzenie, palenie papierosów, otyłość, cukrzyca i inne) skutkują zwiększoną naczyniową produkcją O_2^- . Aktualna hipoteza zakłada, że O_2^- działa: (i) bezpośrednio lub poprzez H_2O_2 ; (ii) poprzez inaktywację NO lub (iii) przez nadtlenoazotyn i S-nitrozylację, aktywując różne składowe komórkowe szlaki sygnalizacyjne (np. kinazy MAP, kinazy tyrozynowe, fosfatazy, czynniki transkrypcyjne), co ostatecznie skutkuje indukcją pro-zapalnego i pro-mięśniowego fenotypu ściany naczyniowej (np. indukcja molekuł adhezyjnych), jej przewlekłym zapaleniem i przebudową.

Oksydaza NADPH i jej izoformy (Nox); Jedyną funkcją Nox jest produkcja ROS i enzym ten prawdopodobnie odgrywa centralną rolę w mechanizmie stresu oksydacyjnego. Tak jest dlatego, że indukuje produkcję ROS przez inne systemy enzymatyczne (mitochondria, oksydaza ksantynowa, zmodyfikowana oksydacyjnie błonka syntaza NO, tzw. rozprzgnięta eNOS). Nox ma kilka izoform różniących się mechanizmem aktywacji, komórkową lokalizacją i rodzajem produkowanego ROS. W układzie kręgowym u ludzi (i winek morskich, badania własne) obecne są izoformy Nox1, Nox2, Nox4 i Nox5, a u myszy i szczurów – tylko Nox1, Nox2 i Nox4. Izofory Nox1/2 są najlepiej poznane. Są enzymami związanyymi z błoną komórkową (m.in. komórek błonki) i produkują O_2^- zarówno do wnętrza jak i na zewnątrz komórki. Nox4 i Nox5 są związane z błonami wewnątrzkomórkowymi, ale ich rola biologiczna jest słabo poznana. W modelach stresu oksydacyjnego u gryzoniów stwierdza się wzrost aktywności enzymatycznej Nox oraz wzrost ekspresji Nox1/2. Podobnie w naczyniach ludzi z miażdżycą czy cukrzycą opisano naczyniową nadekspresję Nox1/2 oraz Nox5. Standardne przekonanie, że „up-regulacja”, głównie Nox1/2, jest przyczyną naczyniowego stresu oksydacyjnego. Ostatnio pokazano, że farmakologiczna indukcja ekspresji Nox4 ma, paradoksalnie, protekcyjne działanie naczyniowe, natomiast eliminacja genu Nox4 skutkuje niekorzystnymi efektami błonkowymi. Może to być konsekwencją faktu, że Nox4 produkuje H_2O_2 , a Nox1/2 - O_2^- i H_2O_2 i O_2^- mają odmienne działania sygnalizacyjne. Dla przykładu, O_2^- skutkuje aktywacją głównie czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, a H_2O_2 czynnika transkrypcyjnego Nrf2. Istnieje także sugestia, że Nox4 działa korzystnie na naczynia poprzez indukcję ekspresji błonkowej

syntazy NO (eNOS) i r6db6onkowej produkcji NO.

Celem og6lnym obecnego projektu jest zbadanie indywidualnej roli r6nych izoform Nox w mechanizmie stresu oksydacyjnego, w tym weryfikacja hipotezy, e: (i) przyczyn naczyniowego stresu oksydacyjnego mo e by zarówno „up-regulacja” toksycznych Nox1/2 jak i „down-regulacja” protekcyjnej Nox4; (ii) e Nox1/2 i Nox4 wzajemnie reguluj swoj ekspresj , oraz (iii) e mo liwym po rednikiem w mechanizmie tej regulacji jest r6db6onkowy NO. W celu weryfikacji tych hipotez proponuj realizacj trzech zada :

1. Zbadanie sercowej ekspresji Nox1/2 i Nox4 w dw6ch r6nych modelach stresu oksydacyjnego (stres towarzyszy cy sezonowi letniemu oraz cukrzycy typu I indukowanej streptozotocyn) u dw6ch gatunk6w zwierz t (winka morska, szczur). W tym kontek cie wykona6am ju **wst pne eksperymenty**, kt6re, **w zgodzie z hipotez** , pokaza6y, e ka demu z tych czterech modeli eksperymentalnych towarzyszy6: wzrost sercowej produkcji O_2^- , enzymatycznej aktywno ci Nox i ekspresji Nox1 i Nox2 oraz spadek sercowej ekspresji Nox4 i eNOS (analiza Western blot). Okaza6o si tak e, e istnia6a dodatnia liniowa korelacja mi dzy sercow 6 produkcj O_2^- i ekspresj Nox1 i Nox2 (ale nie Nox4) oraz ujemna liniow korelacja mi dzy ekspresj Nox2 i Nox4.

2. Zbadanie wp6ywu treningu fizycznego i diety wzbogaconej o azotyny na poziom sercowej ekspresji Nox1/2 i Nox4 oraz na liczne wyk6adniki (i) stresu oksydacyjnego; (ii) homeostazy NO oraz (iii) pro-zapalnej aktywacji r6db6onka u szczur6w z cukrzycy typu I. Trening fizyczny i azotyny, s interwencjami, o kt6rych wiadomo, e indukuj ekspresj eNOS oraz przeciwdzia6aj nadekspresji Nox2 i stresowi oksydacyjnego w r6nych zwierz cych modelach stresu oksydacyjnego. Od niedawna wiadomo tak e, e azotyny, przy udziale r6nych ustrojowych reduktaz, s przekszta6cane do NO, kt6ry nast pne skutecznie zast puje/uzup6lnia NO produkowany przez r6db6onek;

3. Zbadanie, wp6ywu przewlek6ego zahamowania eNOS (inhibitor L-NAME podawany w wodzie pitnej) u normalnych szczur6w na poziom sercowej ekspresji Nox1/2 i Nox4 oraz na wyk6adniki (i) stresu oksydacyjnego; (ii) homeostazy NO oraz (iii) pro-zapalnej aktywacji r6db6onka.

Je eli moja hipoteza badawcza jest s6uszna to: (i) cukrzycy powinien towarzyszy wzrost ekspresji Nox1/2 i spadek ekspresji Nox4, spadek ekspresji eNOS i zwi kszone r6db6onkowa ekspresja moleku66 adhezyjnych (ICAM-1 i VCAM-1, miara prozapalnej aktywacji r6db6onka); (ii) podobne efekty jak cukrzyca powinno mie przewlek6e zahamowanie eNOS oraz (iii) trening fizyczny i azotyny powinny zapobiega efektom cukrzycy.

Pozytywna weryfikacja hipotezy, mo e sta si impulsem do poszukiwania strategii leczenia stresu oksydacyjnego (i choroby sercowo-naczyniowej) polegaj cych: (i) na wybi66rczej eliminacji jednego konkretnego, a nie wszystkich rodzaj66w ROS i/lub (ii) na wybi666rczym hamowaniu (b d aktywacji) jednej konkretnej, a nie wszystkich naraz, izoform Nox.