

Received: 2015.12.14
Accepted: 2016.09.15
Published: 2017.01.28

Rola stresu oksydacyjnego i oksydazy NADPH w patogenezie miażdżycy

The role of oxidative stress and NADPH oxidase in the pathogenesis of atherosclerosis

Dorota Bryk, Wioletta Olejarz, **Danuta Zapolska-Downar**

Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie

Reaktywne formy tlenu odgrywają istotną rolę w patogenezie miażdżycy. Głównymi mechanizmami odpowiedzialnymi za promiażdżycowe działanie RFT są: oksydacyjna modyfikacja lipoprotein niskiej gęstości, inaktywacja tlenu azotu oraz modulowanie redox-wrażliwych dróg sygnałowych. RFT mogą się przyczyniać do uruchamiania wielu mechanizmów istotnych dla patogenezy miażdżycy, takich jak: dysfunkcja komórek śródbłonna, rekrutacja monocytów/makrofagów i ich aktywacja, stymulacja odpowiedzi zapalnej czy indukcja migracji i proliferacji komórek mięśni gładkich. Głównym źródłem reaktywnych form tlenu w komórkach ściany naczynia jest oksydaza NADPH. Enzym ten składa się z dwóch elementów połączonych z błoną (gp91^{phox} i p22^{phox}) i trzech elementów w cytosolu (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}). Dodatkowo w skład oksydazy wchodzi małe białko rac1 lub rac2. Zidentyfikowano siedem różnych izoform tego enzymu z czego cztery (NOX1, 2, 4 i 5) funkcjonują w układzie sercowo-naczyniowym. W artykule omówiono rolę stresu oksydacyjnego i enzymów z rodziny NOX w patogenezie miażdżycy. Ponadto przeanalizowano badania eksperymentalne, których celem było zbadanie zależności między enzymami z rodziny NOX a miażdżycą.

Słowa kluczowe: stres oksydacyjny • oksydaza NADPH • miażdżycy

Summary

Reactive oxygen species (ROS) play a key role in the pathogenesis of atherosclerosis. The main mechanisms which are involved are low-density lipoprotein oxidative modification, inactivation of nitric oxide and modulation of redox-sensitive signaling pathways. ROS contribute to several aspects of atherosclerosis including endothelial cell dysfunction, monocyte/macrophage recruitment and activation, stimulation of inflammation, and inducing smooth muscle cell migration and proliferation. NADPH oxidase is the main source of ROS in the vasculature. This enzyme consists of a membrane-bound heterodimer of gp91^{phox} and p22^{phox}, cytosolic regulatory subunits p47^{phox}, p67^{phox} and p40^{phox}, and small GTP-binding proteins rac1 and rac2. Seven distinct isoforms of this enzyme have been identified, of which four (NOX1, 2, 4 and 5) may have cardiovascular function. In this paper, we review the current state of knowledge concerning the role of oxidative stress and NOX enzymes in pathogenesis of atherosclerosis. Moreover, we analyze the experimental studies that explore the relationship between the NOX family and atherosclerosis.

Keywords: oxidative stress • NADPH oxidase • atherosclerosis

Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1229823
DOI:	10.5604/01.3001.0010.3790
Word count:	4880
Tables:	–
Figures:	–
References:	93

Adres autorki: dr Dorota Bryk, Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa; e-mail: katedrabiochemii@wum.edu.pl

Wykaz skrótów: **Ang II** – angiotensyna II; **AP-1** – aktywator białkowy 1; **bFGF** – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; **BH₄** – tetrahydrobiopteryna; **DAG** – diacyloglicerol; **ERK** – kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo; **FAD** – dinukleotyd flawinoadeninowy; **FAK** – kinaza ognisk przylegania; **FMD** – wskaźnik rozszerzalności tętnicy ramiennej; **H₂O₂** – nadtlenek wodoru; **ICAM-1** – cząsteczka adhezji międzykomórkowej-1; **JNK** – kinaza c-Jun N-terminalna; **LPS** – lipopolisacharyd; **MAPK** – kinazy aktywowane mitogenami; **MCP-1** – białko chemotaktyczne monocytów 1; **MKP** – fosfataza kinaz **MAP**; **MMP 9** – metaloproteinaza 9; **NADH** – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy; **NADPH** – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego; **NF-κB** – jądrowy czynnik transkrypcyjny; **NO** – tlenek azotu; **NOS** – śródbłonkowa syntaza tlenku azotu; **NOX 1-5** – izoformy oksydazy NADPH; **O₂⁻** – anionorodnik ponadtlenkowy; **OH[•]** – rodnik hydroksylowy; **oxLDL** – oksydacyjnie zmodyfikowane LDL; **PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu; **PI3K** – kinaza 3-fosfoinozytolu; **PI(3,4,5)P₃** – fosfatydyloinozytolo-trifosforan; **PKA** – kinaza białkowa zależna od cyklicznego AMP; **PKC** – kinaza białkowa C; **PKG** – kinaza białkowa zależna od cyklicznego GMP; **p38 MAPK** – kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny; **RFT** – reaktywne formy tlenu; **SHP-2** – fosfataza fosfotyrozynowa; **STAT-3** – przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 3; **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworu; **VCAM-1** – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń.

WPROWADZENIE

Miażdżycza jest chorobą o wieloczynnikowej etiopatogenezie i jest główną przyczyną chorób naczyniowo-sercowych [49]. Na powstawanie i przebieg miażdżycy duży wpływ ma toczący się w ścianie naczynia stres oksydacyjny. Stres oksydacyjny definiuje się jako brak równowagi między generacją reaktywnych form tlenu (RFT), a zdolnościami antyoksydacyjnymi organizmu [55]. Do RFT zalicza się małe i silnie reaktywne związki, takie jak wolne rodniki zawierające niesparowany elektron, czyli anionorodnik ponadtlenkowy (O₂⁻) i rodnik hydroksylowy (OH[•]) oraz nadtlenek wodoru (H₂O₂), który nie jest wolnym rodnikiem. W fizjologii RFT pełnią istotną rolę w wielu ważnych procesach komórkowych, takich jak wzrost, proliferacja, różnicowanie, apoptoza, regulacja ekspresji genów, fosforylacja białek, mechanizmy obrony immunologicznej. Natomiast w sytuacji stresu oksydacyjnego, wytwarzane w nadmiarze RFT przyczyniają się do wielu patologicznych procesów zaangażowanych w powstawanie i progresję miażdżycy. Wyróżnia się trzy typy działalności RFT. Stres oksydacyjny indukuje silne utlenianie i tym samym uszkodzenie białek, lipidów, fosfolipidów błon komórkowych i DNA, czym przyczynia się do dysfunkcji i destrukcji komórek. Wytwarzane w nadmiarze RFT reagują z tlenkiem azotu (NO), a to upośledza biodostępność NO i tym samym osłabia funkcję wazodylatacyjną śródbłonka. Ponadto RFT modulują aktywność wielu białek komórkowych i dróg sygnałnych (redox signaling) indukując tym samym swoiste ostre lub przewlekłe zmiany w fenotypie i funkcjonowaniu komórek.

Do potencjalnych źródeł RFT w komórce zalicza się: łańcuch oddechowy, oksydazę NADPH, oksydazę ksantynową, rozprężoną (uncoupled) śródbłonkową syntazę NO (eNOS), cyklooksygenazę, mieloperoxydazę czy lipo-oksyzgenazę [46]. Wśród tych źródeł enzymy z rodziny oksydazy NADPH (NOX) wydają się głównymi enzymami odpowiedzialnymi za wytwarzanie RFT w komórkach ściany naczyń. Z wielu dotychczasowych badań wynika, że ich aktywność jest zwiększona w chorobach naczyniowo-sercowych, a wiele czynników ryzyka miażdżycy ma wpływ na ich funkcjonowanie [11,74]. W pracy omówiono stan wiedzy na temat roli stresu oksydacyjnego i enzymów z rodziny NOX w patogenezie miażdżycy, ze szczególnym uwzględnieniem funkcji, ekspresji i regulacji poszczególnych oksydaz w różnych stanach patologicznych przyczyniających się do powstania i progresji miażdżycy.

MOLEKULARNE MECHANIZMY ODPOWIEDZIALNE ZA PROMIAŻDŻYCOWE DZIAŁANIE STRESU OKSYDACYJNEGO

Miażdżycza jest swoistą postacią przewlekłego zapalenia [49,51]. Proces zapalny jest cechą charakterystyczną wszystkich etapów miażdżycy, od aktywacji śródbłonka do pęknięcia płytki miażdżycowej. W powstawanie i rozwój miażdżycy jest zaangażowanych wiele komórek, włączając komórki śródbłonka, monocyty/makrofagi, komórki mięśni gładkich i limfocyty T. Przebieg miażdżycy jest modyfikowany zaburzeniami w metabolizmie lipidów, stresem oksydacyjnym i toczącym się w ścianie naczynia procesem fibroproliferacyjnym. Złożoność procesów odpowiedzialnych za powstawanie i progresję

sję miażdżycy wyklucza możliwość ich szerokiego omówienia w tym miejscu. Ogólnie miażdżycą jest skutkiem takich procesów jak dysfunkcja śródbłonna, gromadzenie zmodyfikowanych lipoprotein, infiltracja monocytów i limfocytów i ich akumulacja w błonie wewnętrznej ściany naczyń, aktywacja mechanizmów odpowiedzi immunologiczno-zapalnej oraz proliferacja komórek mięśni gładkich prowadząca do przebudowy ściany naczyń. Reaktywne formy tlenu mogą być zaangażowane na wszystkich tych etapach.

Wiadomo, że w patogenezie miażdżycy to RFT są odpowiedzialne za powstawanie oksydacyjnie zmodyfikowanych LDL (oxLDL). OxLDL są substancjami o silnych właściwościach proaterogennych [32,73,86]. Powstające w nadmiarze oxLDL są wyłapywane przez makrofagi za pomocą receptorów wymiatających (scavenger receptors) w sposób niekontrolowany, a to doprowadza do powstawania komórek piankowatych. Uaktywniają się makrofagi, które m.in. nasilają syntezę cytokin prozapalnych i uruchamiają odpowiedź zapalną. OxLDL mogą być prezentowane limfocytom T, co uaktywnia odpowiedź immunologiczną. Zmodyfikowane oksydacyjnie LDL wykazują też inne właściwości proaterogenne: są jednym z głównych czynników sprawczych dysfunkcji śródbłonna, stymulują adhezję leukocytów i ich transendotelialną wędrówkę, promują zwężanie naczyń, nasilają agregację płytek krwi oraz zwiększają ekspresję czynników wzrostu, przyczyniając się do przebudowy ściany naczyń. Wpływają także na procesy krzepnięcia pobudzając syntezę czynnika tkankowego i inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu.

Jedną z ważnych cech dysfunkcji śródbłonna jest zmniejszenie biodostępności NO, w wyniku zmniejszenia syntezy lub nasilenia biodegradacji [14,20]. Śródbłonna syntetaza NO syntetyzuje tlenek azotu w obecności kofaktora tetrahydrobiopteryny (BH_4) i NADPH (fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego) jako dawcy elektronu. Powstające w nadmiarze RFT utleniają BH_4 powodując jej degradację. Długotrwały stres oksydacyjny upośledza funkcję eNOS, co objawia się tym, że wytwarza O_2^- – a nie NO. Mówi się wówczas o działaniu rozprężonej eNOS. Reaktywne formy tlenu wchodzą w interakcje z NO i powstaje anion nadtlenoazotanowy (III), substancja, która już nie pełni funkcji NO, a staje się toksyczną postacią RFT. Warto podkreślić, że obniżenie ilości tlenu azotu to nie tylko zaburzenia w wazodylatacji i hiperagregacji płytek krwi. Wiadomo, że NO wpływa hamująco na tworzenie RFT, proliferację i migrację mięśni gładkich i aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (nuclear factor κ B). Jest to czynnik który, reguluje wiele genów odpowiedzi zapalnych. Następstwem upośledzenia biodostępności NO może być nadmierny skurcz naczyń, przebudowa ściany naczyń, rekrutacja mononuklearnych leukocytów, zapalenie i zakrzepica.

Umiarkowane poziomy RFT, szczególnie O_2^- i H_2O_2 pośredniczą w aktywacji wielu dróg sygnałnych w odpowiedzi na substancje wazoaktywne, hormony, czynniki

wzrostu, cytokiny, czynniki krzepnięcia czy siły ścinalnia [55,68]. RFT uczestniczą w przekazywaniu sygnałów przez potranslacyjne kowalencyjne modyfikacje miejsc aktywnych i allosterycznych w białkach. Polega to na utlenianiu redoks – reaktywnej cysteiny w wyniku czego powstaje kwas sulfenowy – SOH, który może tworzyć mostki siarczkowe z sąsiednio umiejscowioną cysteiną lub podlegać dalszej oksydacji do kwasu sulfinowego – SO_2H lub kwasu sulfonowego – SO_3H . Modyfikacje zmieniają strukturę i funkcję białek. Redoks wrażliwe drogi sygnałne mogą mieć skutek natychmiastowy, tak jak w przypadku białek kanałów jonowych lub białek kurczliwych lub skutek długoterminowy przez wpływ na kinazy białkowe i redoks wrażliwe czynniki transkrypcyjne. Skutkiem aktywacji kinaz jest uruchomienie wielu procesów, takich jak proliferacja, metabolizm, różnicowanie oraz proces przeżycia. Wydaje się, że głównym celem RFT, szczególnie H_2O_2 , są fosfatazy tyrozynowe białek. Jest to grupa enzymów, które defosforylują wiele kinaz aktywowanych w wyniku ich fosforylacji. Reaktywne formy tlenu hamują ich aktywność przez utlenianie cysteiny w domenach odpowiedzialnych za hydrolizę miejsc fosfotyrozynowych w białkach, tym samym przyczyniają się do utrzymania kinaz białkowych w postaci aktywnej. Przykładowymi kinazami, w aktywacji których pośredniczą RFT są: kinaza 3-fosfoinozytolu (phosphatidylinositol-3-kinases; PI3K), kinaza białkowa C (protein kinase C; PKC), kinaza białkowa zależna od cyklicznego AMP (cyclic AMP-dependent protein kinase; PKA) i kinaza białkowa zależna od cyklicznego GMP (cyclic GMP-dependent protein kinase; PKG).

Kinazy aktywowane mitogenami (mitogen activated protein kinases; MAPK) są rodziną enzymów zaliczaną również do grupy redox wrażliwych molekuł sygnałnych zaangażowanych w przekazywanie sygnałów związanych z różnymi procesami istotnymi w patogenezie miażdżycy [67]. Kinazy MAP dzielą się na trzy rodziny: JNK (c-Jun N-terminal kinase), ERK (extracellular signal-regulated kinase) oraz kinaza p38 MAPK. MAPK są kinazami białkowymi o aktywności serynowo-treoninowej, które regulują wiele wewnątrzkomórkowych procesów, włączając w to transkrypcję genów, biosyntezę białek, podziały komórkowe, różnicowanie i przeżycie lub apoptozę komórki. Mimo że aktywacja kinaz MAP jest ściśle regulowana podczas kaskady fosforylacji jest wiele dowodów, że wytwarzane wewnątrzkomórkowo RFT są zaangażowane w proces ich aktywacji [56,68]. Może się to odbywać przez uczestnictwo w aktywacji kinaz wyżej leżących w kaskadzie prowadzącej do aktywacji MAPK. Wydaje się, że RFT uczestniczą w aktywacji kinaz MAP przez ich hamujący wpływ na fosfatazy kinaz MAP (MKP). Defosforylacja kinaz przez MKP jest głównym mechanizmem odpowiedzialnym za zmniejszenie aktywności MAPK i jest najbardziej skutecznym sposobem negatywnej regulacji. Analogiczna sytuacja zachodzi w przypadku fosfataz tyrozynowych białek MKP, które mają również redox wrażliwą cysteinę w rdzeniu katalitycznym i która może być utleniana przez powstające w pobliżu RFT. Funkcjonalną konsekwencją aktywa-

cji kinaz MAP jest regulacja mechanizmów odpowiedzi zapalnej, cyklu komórkowego, apoptozy różnicowania, proliferacji czy migracji.

Czynnikami transkrypcyjnymi wrażliwymi na stres zależnymi również od kinaz MAP są: AP-1 (activator protein-1), STAT-3 (signal transducer and activator of transcription-3) czy NF-κB [22]. Aktywacja AP-1 i NF-κB doprowadza m.in. do transkrypcji genów zaangażowanych w mechanizmy odpowiedzi zapalnej. Stres oksydacyjny może również nasilać ekspresję mRNA c-fos i c-jun.

Inną możliwością oddziaływania RFT na wewnątrzkomórkowe drogi sygnalizacyjne jest ich wpływ na wewnątrzkomórkowe stężenia Ca^{2+} przez utlenianie miejsc cysteinowych obecnych w kanałach jonowych i transporterach [54,56]. Tym samym reaktywne formy tlenu zwiększają napływ jonów Ca^{2+} zewnątrzkomórkowego oraz mobilizację z magazynów wewnątrzkomórkowych z jednoczesnym hamowaniem wylapywania przez retikulum endoplazmatyczne.

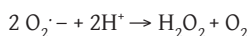
OKSYDAZA NADPH I JEJ IZOFORMY

Charakterystyka biochemiczna oksydazy NADPH

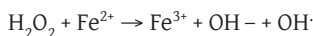
Oksydaza NADPH [EC 1.6.3.1] jest kompleksem enzymatycznym zbudowanym z wielu podjednostek [25]. Jest głównym źródłem $\text{O}_2^{\cdot -}$ (anionorodnik ponadtlenny) w komórkach wchodzących w skład naczyń krwionośnych, mięśnia sercowego i leukocytów. Katalizuje powstawanie $\text{O}_2^{\cdot -}$ – przez jednoelektronową redukcję tlenu z użyciem NADPH lub NADH jako donora elektronów:



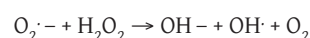
Anionorodnik ponadtlenny ulega dysmutacji spontanicznej lub enzymatycznej do nadtlenu wodoru (H_2O_2):



Czysty nadtlenek wodoru jest mało reaktywny, ale w obecności jonów metali (np. miedzi, żelaza) staje się bardzo aktywny, przechodząc w rodnik hydroksylowy (OH $\cdot$). Powstaje w komórce według reakcji Fentona, katalizowanej przez jony żelaza (II):



lub w reakcji Habera-Weissa:



Po raz pierwszy oksydazę NADPH znaleziono w neutrofilach, natomiast późniejsze badania wykazały, że jest obecna w innych komórkach, m.in. w komórkach śródbłonna [34], w komórkach mięśni gładkich naczyń [57] oraz fibroblastach przydanki naczyniowej [64].

Neutrofilowa oksydaza składa się z pięciu komponentów: p40^{phox} (phox-phagocyte oxidase), p47^{phox} , p67^{phox} oraz p22^{phox} i $\text{gp91}^{\text{phox}}$ [56]. W spoczynkowych neutrofilach trzy z nich: p40^{phox} , p47^{phox} , p67^{phox} znajdują się w cytosolu tworząc kompleks. Pozostałe dwa komponenty: (heterodimer) p22^{phox} i glikoproteina $\text{gp91}^{\text{phox}}$ są umiejscowione w błonie komórkowej, tworząc cytochrom b558. Miejsce katalityczne enzymu znajduje się w obrębie hemu w białku $\text{gp91}^{\text{phox}}$. Heterodimer jest jednak nieaktywny, jeżeli nie są przyłączone do niego białka cytoplazmatyczne: p40^{phox} , p47^{phox} i p67^{phox} oraz białka rac-1 (w monocytach i makrofagach) lub rac-2 (w neutrofilach) z rodziny białek G, jak również białko rap1A występujące w błonach komórkowych. Regulacja aktywności oksydazy NADPH odbywa się zarówno przez małe białka G, jak i przez procesy fosforylacji i defosforylacji podjednostek enzymu za pomocą odpowiednich kinaz, w tym kinazę białkową A, kinazę białkową C [7,89]. Fosforylacja podjednostek powoduje przyłączenie białek cytoplazmatycznych do składników błonowych i w rezultacie aktywację enzymu.

Białka wchodzące w skład oksydazy NADPH

$\text{gp91}^{\text{phox}}$

Białko $\text{gp91}^{\text{phox}}$, inaczej NOX2 (NADPH oxidase 2) jest podjednostką katalityczną oksydazy neutrofilowej [81], zbudowane z 570 reszt aminokwasowych. Łańcuch polipeptydowy $\text{gp91}^{\text{phox}}$ tworzy sześć domen w błonie i zawiera przynajmniej trzy miejsca glikozylacji: Asn131, Asn148, Asn239 [87]. W rejonie C-końcowym jest umiejscowione w centrum flawinowe i miejsca wiązania NADPH.

Białko $\text{gp91}^{\text{phox}}$ jest hemoproteiną, która zawiera dwa centra hemowe usytuowane między trzecią i piątą domeną błonową. $\text{Gp91}^{\text{phox}}$ oraz pozostałe białka z rodziny NOX, to oksydazy zależne od FAD (dinukleotyd flawinoadeninowy) generujące transport elektronu na tlen cząsteczkowy, który jest redukowany do anionorodnika ponadtlennego [59]. Donorem elektronów jest NADPH lub NADH, a ich pośrednimi akceptorami są FAD, centrum hemowe 1 i 2. Ostatecznym akceptorem elektronu jest zewnątrzkomórkowy tlen cząsteczkowy. Białko $\text{gp91}^{\text{phox}}$ jest kodowane przez gen CYBB (cytochrome b beta).

p22^{phox}

Białko p22^{phox} pośredniczy w przyłączaniu cytoplazmatycznych składników oksydazy [78], składa się ze 195 reszt aminokwasowych i ma cztery domeny błonowe. Oba końce polipeptydu znajdują się po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej. Na C-końcu białka p22^{phox} (pozycje aminokwasowe 151-160) znajduje się region bogaty w reszty proliny (domena PRR – proline rich region), który bierze udział w oddziaływaniach między p22^{phox} , a N-końcową domeną SH3 (Src homology domain-3) białka p47^{phox} . Białko p22^{phox} ma również

dodatkowe miejsce wiązania dla p47^{phox} (w pozycji 51-63 reszt aminokwasowych) i dwa potencjalne miejsca wiązania dla p67^{phox}. Białko p22^{phox} kodowane jest przez gen CYBA (cytochrome b alpha).

p47^{phox}

Białko to jest zbudowane z 390 reszt aminokwasowych, które tworzą kilka funkcjonalnych domen [41]; p47^{phox} ma dwie domeny SH3, które uczestniczą w oddziaływaniach typu białko-białko z regionami białek bogate w reszty proliny. Domena SH3_A znajduje się na N-końcu i jest umiejscowiona między 159-213 resztami aminokwasowymi. Domena SH3_B znajduje się na C-końcowym rejonie białka, między 231-287 resztami aminokwasowymi. Regiony bogate w reszty proliny są umiejscowione w części C-końcowej białka p47^{phox}. Między domeną SH3_B a regionem bogatym w reszty proliny znajduje się domena bogata w reszty argininy i lizyny (Arg/Lys rich domain). To właśnie obecne w tym rejonie białka i powtarzające się reszty seryny są miejscami fosforylacji dla wielu kinaz np. kinazy białkowej C. Białko p47^{phox} jest kodowane przez gen NCF1 (neutrophil cytosol factor 1).

p67^{phox}

Białko jest zbudowane z 526 reszt aminokwasowych. Na N-końcu jest umiejscowiona domena TPR (tetratricopeptide repeat domain) zawierająca cztery motywy TPR [40,41]. Motywy TPR odpowiadają za wiązanie białka Rac. Białko p47^{phox} ma również dwie domeny SH3 i przynajmniej jeden region bogaty w reszty proliny. Na C-końcu znajduje się domena PB1 (Phox and Bemlp domain), odpowiada za tworzenie heterodimerów między białkami zawierającymi domeny PB1. Białko p67^{phox} jest kodowane przez gen NCF2 (neutrophil cytosol factor 2).

p40^{phox}

Białko jest zbudowane z 339 reszt aminokwasowych, zawiera domenę PX i jedną domenę SH3. Na C-końcu jest umiejscowiony motyw PC, który jest ewolucyjnie podobny do domeny PB1, a potrzebny do łączenia się domen PB1 w heterodimery [41]. Białko p40^{phox} nie jest konieczne do aktywacji kompleksu oksydazy. Jego funkcją jest prawdopodobnie stabilizacja kompleksu p67^{phox} – p47^{phox} w cytoplazmie. Białko p40^{phox} jest kodowane przez gen NCF4 (neutrophil cytosol factor 4).

Rac1 i Rac2

Są to najliczniejsze białka w komórkach neutrofilów, komórkach mięśni gładkich naczyń i komórkach śródbłonna, należą do GTPazy klasy Rho. Białka Rac w cytoplazmie występują w postaci nieaktywnej i są związane z GDP. Aktywacja kompleksu oksydazy NADPH wymaga wymiany GDP na GTP i związania białka Rac z p67^{phox} [40].

Molekularne mechanizmy odpowiedzialne za aktywację oksydazy NADPH

Białka p47^{phox}, p67^{phox} i p40^{phox}, które znajdują się w komórkach będące w stanie spoczynku tworzą kompleks. W kompleksie tym białko p67^{phox} jest łącznikiem między p40^{phox} a p47^{phox}. Białka p67^{phox} i p47^{phox} oddziałują ze sobą na dwa sposoby [41]. Po pierwsze domena SH3 C-końca p67^{phox} wiąże region bogaty w reszty proliny, który znajduje się na C-końcu p47^{phox}. Po drugie rejon bogaty w reszty proliny białka p67^{phox} wiąże domenę SH3_B białka p47^{phox}. Białko p40^{phox} jest związane z domeną PB1 białka p67^{phox} za pomocą motywu PC. Białko p47^{phox} pełni funkcję łącznika między składnikami cytosolowymi a błonowymi. W cytoplazmie białko p47^{phox} występuje w konformacji nieaktywnej (konformacja autoinhibicyjna), co uniemożliwia połączenie elementów błonowych z cytoplazmatycznymi. Obie domeny SH3 są zablokowane przez wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania z regionem bogatym w reszty proliny [26,31]. Molekularnym przełącznikiem i główną reakcją aktywacji kompleksu oksydazy NADPH jest fosforylacja białka p47^{phox}. Enzymem odpowiedzialnym za proces jest kinaza białkowa C (PKC) [26,71,80], która jest aktywowana przez Ca²⁺ i diacylglicerol (DAG). Za pomocą kinazy białkowej C ulegają fosforylacji reszty seryny w domenie bogatej w reszty argininy i lizyny. Dzięki temu domena SH3_A białka p47^{phox} może się związać z regionem bogatym w reszty proliny na C-końcu białka p22^{phox}. To prowadzi do integracji kompleksu i zapoczątkowania przepływu elektronów i wytwarzania O₂⁻ [26,31].

Do pełnej aktywacji kompleksu oksydazy NADPH są niezbędne białka Rac1. Wchodzące w skład kompleksu oksydazy NADPH białko Rac2, należące do rodziny białek Rho, łączy się od inhibitora – RhoGDI (RhoGDP dysociation inhibitor) i oddziałuje z flawocytochromem b₅₅₈, tworząc miejsce wiązania dla podjednostek cytoplazmatycznych oksydazy NADPH, a której kompletnie „złożenie”, warunkuje jej prawidłowe funkcjonowanie i wytwarzanie reaktywnych form tlenu [27,71]. Do aktywacji Rac1 oraz fosforylacji p47^{phox} indukowanej m.in. przez angiotensynę II jest konieczna obecność kinazy tyrozynowej c-Src [71,80]. Aktywacja kinazy c-Src zależy od obecności H₂O₂. Białko p47^{phox} jest fosforylowane przez aktywną kinazę c-Src, kinaza stymuluje aktywację receptora naskórkowego czynnika wzrostu, co powoduje wzrost aktywności PI3K, a to wzmacnia wytwarzanie fosfatydyloinozytol-trifosforanu (PI(3,4,5)P₃). (PI(3,4,5)P₃) stymuluje aktywność GTPazową białka Rac1, umożliwiając jego związanie z błoną [71,80]. Inhibitory kinazy fosfatydylo-3-fosfoinozytolu (np. LY294002) oraz receptora naskórkowego czynnika wzrostu (AG1478) osłabiają zarówno aktywację Rac-1, jak i wytwarzanie reaktywnych form tlenu [71].

Izoformy oksydazy NADPH

W warunkach fizjologicznych obecna w neutrofilach oksydaza występuje w postaci spoczynkowej, ale

w chwili aktywacji, najczęściej spowodowanej obecnością mikroorganizmów, wytwarza ogromne ilości rodnika nadadtlenkowego (tzw. wybuch tlenowy) [6]. W stanie fizjologicznym, oksydazy NADPH umieszczone w innych typach komórek niż fagocytarne, syntetyzują konstytutywnie znacznie mniejsze ilości anionorodnika nadadtlenkowego niż w fagocytach. Komórki ściany naczyń wytwarzają 1-10% ilości O_2^- – uwalnianego przez neutrofile w obecności mikroorganizmów podczas wybuchu tlenowego. Różnią się też tym, że w komórkach nefagocytujących większość RFT pojawia się wewnątrzkomórkowo [19].

Różnice w aktywności biochemicznej fagocytarnych i nefagocytarnych oksydaz doprowadziły do identyfikacji całej rodziny oksydaz NADPH w oparciu o 7 różnych izoform gp91^{phox} lub NOX (NADPH oxidase), kodowanych przez różne geny. Wyróżnia się izoformy oksydazy NADPH, takie jak: NOX1 – NOX5, Duox1 i Duox2 [19,74]. Wszystkie NOX wykorzystują NADPH jako dawcę elektronu i katalizują transfer elektronu na tlen cząsteczkowy generując albo O_2^- albo H_2O_2 . Enzymy rodziny NOX można zaliczyć do trzech grup w zależności od budowy. NOX1 – NOX4 są zbudowane z 6 transmembranowych domen o różnym stopniu podobieństwa do gp91^{phox} (NOX2) oraz mają domenę wiążącą NADPH w rejonie C-końcowym. NOX5 oprócz podobnej struktury podstawowej w rejonie N-końcowym zawiera podobną do kalmoduliny domenę wiążącą Ca^{2+} . Duox 1 i 2 są podobne do NOX5, ale w rejonie N-końcowym zawierają dodatkowo domenę homologiczną z peroksydazą.

Z wymienionych izoform oksydazy cztery (NOX1, NOX2, NOX4 i NOX5) są powszechnie obecne w komórkach ściany naczyń, podczas gdy pozostałe są nieobecne lub występują w niewielkich ilościach i ich znaczenie jak dotąd nie jest jeszcze poznane. NOX1, 2 i 4 połączone są z białkiem p22^{phox}, które jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania enzymów [74]. Pełna aktywacja NOX2 wymaga przyłączenia podjednostek cytoplazmatycznych i białka rac. NOX1 jest aktywowane po przyłączeniu NOXO1 (które jest homologiem p47^{phox}) i NOXA1 (inaczej białko p51^{phox}, które jest homologiem białka p67^{phox}) oraz białka rac [23,74]. Natomiast NOX4 jest enzymem aktywnym konstytutywnie i nie wymaga dodatkowych podjednostek regulatorowych. Regulacja jego aktywności jest związana raczej ze zmianami w poziomie ekspresji. Inaczej niż NOX1 i NOX2, które wytwarzają głównie O_2^- , a NOX4 H_2O_2 [16]. Aktywność NOX5 jest regulowana przez przyłączenie jonów wapnia [10], wytwarza H_2O_2 .

NOX2 występuje głównie w komórkach fagocytujących, gdzie odpowiada za wybuch tlenowy. Ponadto występuje w śródbłonku, komórkach mięśni gładkich czy fibroblastach [65,74]. NOX1 występuje głównie w komórkach mięśni gładkich, chociaż jej obecność stwierdza się również w komórkach śródbłonka [3,74]. RFT pochodzące z NOX1 odgrywają istotną rolę w transdukcji sygnału, proliferacji komórek i angiogenezie. NOX4 występuje w śródbłonku, komórkach mięśni gładkich i fibroblastach [9,24]. Znaczenie NOX4 jest różne w zależności od typu komórki i stymulatora. Wykazano, że może działać antagonistycznie do NOX1 i NOX2 [70]. Istnieją badania, które wskazują, że NOX4 działa ochronnie na naczynia podczas niedotlenienia czy zapalenia. NOX5 jest obecne w śródbłonku i komórkach mięśni gładkich [74].

ZNACZENIE OKSYDAZ NADPH W PATOGENEZIE MIAŻDŻYCY

Zależne od oksydazy NADPH zwiększenie wytwarzania RFT przyczynia się do szeroko pojętej dysfunkcji śródbłonka, migracji i proliferacji mięśni gładkich i tym samym przebudowy ściany naczyń oraz aktywacji mechanizmów odpowiedzi zapalnej i immunologicznej. Jak wspomniano wcześniej wszystkie te procesy są podstawowymi w rozwoju i progresji miażdżycy. Ponadto większość uznanych czynników ryzyka miażdżycy, takich jak hipercholesterolemia, cukrzyca, otyłość, zespół metaboliczny czy nadciśnienie są aktywatorami oksydazy NADPH [11]. Rzeczywiście aktywność i ekspresja głównych składowych oksydazy NADPH koreluje z liczbą czynników ryzyka miażdżycy u ludzi [29]. RFT wytwarzane przez oksydazę NADPH są zaangażowane w oksydacyjną modyfikację LDL [45,91]. Z dotychczasowych badań wynika, że NOX1, NOX2 i NOX4 są głównymi enzymami z rodziny NOX zaangażowanymi w powstawanie i progresję miażdżycy [1].

Wpływ na dysfunkcję śródbłonka

Najbardziej poznaną w patogenezie miażdżycy cechą dysfunkcji śródbłonka jest upośledzenie biodostępności NO. Jak wspomniano wcześniej stres oksydacyjny upośledza biodostępność NO. Badania przeprowadzone na zwierzętach pozbawionych NOX1 i NOX2 sugerują, że izoformy oksydazy NADPH mogą być zaangażowane w kontrolowanie funkcji wazodylatacyjnej naczyń przez wytwarzanie RFT i modulowanie biodostępności NO [36,58]. W innych badaniach zaobserwowano negatywną korelację między ekspresją NOX2, a zależną od śródbłonka relaksacją wyizolowanej aorty [79,92]. Istotną rolę oksydazy NADPH w dysfunkcji śródbłonka potwierdzają badania przeprowadzone u pacjentów z przewlekłą chorobą ziarniakową, u których występuje genetycznie uwarunkowany niedobór NOX2. U pacjentów tych wskaźniki FMD (flow mediated vasodilatation), których wartość zależy głównie od NO są dużo wyższe w porównaniu do osób zdrowych [85]. Ważne, że obciążenie miażdżycą u tych pacjentów jest dużo słabsze, co sugeruje istotną rolę NOX2 w patogenezie miażdżycy. Dużo mniejsze obciążenie miażdżycą u tych pacjentów można tłumaczyć tym, że NO działa również przeciwzapalnie i przeciwmiażdżycowo.

Inną cechą dysfunkcji śródbłonka jest zwiększona przepuszczalność, zjawisko niekorzystne w patogenezie miażdżycy, gdyż przyczynia się do zwiększonej akumulacji LDL w błonie wewnętrznej ściany naczyń, gdzie są zatrzymywane przez proteoglikany, co umożliwia ich oksydacyjną modyfikację w środowisku nasilonego

stresu oksydacyjnego [50]. Reaktywne formy tlenu, których źródłem jest oksydaza NADPH mogą nasilać przepuszczalność śródbłonna m.in. przez aktywację NF- κ B i zwiększenie napływu jonów Ca^{2+} [22].

Podstawowa zarówno dla rozwoju miażdżycy, jak i toczących się w ścianie naczynia reakcji immunologiczno-zapalnych jest dysfunkcja śródbłonna związana ze zmianą fenotypu antyadhezywnego na proadhezywny [49]. Jest to związane z pojawieniem się na ich powierzchni cząsteczek adhezyjnych, do których zalicza się m.in.: ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) i VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1). Są to cząsteczki adhezyjne, które wraz z MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) pośredniczą w interakcjach między leukocytami a komórkami śródbłonna. Interakcje te umożliwiają adhezję leukocytów z ich następową transendotelialną wędrówką do ściany naczynia. Z wielu badań wynika, że pochodzące z oksydazy NADPH reaktywne formy tlenu są zaangażowane w regulację ekspresji śródbłonkowych cząsteczek adhezyjnych. TNF- α (czynnik martwicy nowotworu), cytokina prozapalna o plejotropowym działaniu, indukuje ekspresję ICAM-1, VCAM-1 i MCP-1 przez aktywację NF- κ B w sposób zależny od aktywacji NOX2 [13,21,47]. Z innych badań wynika, że stymulowana TNF- α aktywacja oksydazy NADPH pośredniczy w aktywacji NF- κ B przez wpływ na kinazy MAPK, zwiększając ekspresję VCAM-1 [48]. RFT, których źródłem jest oksydaza NADPH są również zaangażowane w indukowaną angiotensyną II zwiększoną ekspresję ICAM-1, VCAM-1 i MCP-1 [15,52]. Wykazano, że w komórkach poddanych działaniu oscylacyjnych sił ścinania (stymulator promujący zapalenie i tworzenie zmiany miażdżycowej) ekspresja mRNA NOX2 koreluje z poziomem wytwarzania RFT z towarzyszącym wzrostem ICAM-1 i nasileniem adhezji monocytów [33]. W badaniach przeprowadzonych na zwierzęcych modelach doświadczalnych wykazano, że hipercholesterolemia promuje adhezję i migrację leukocytów w naczyniach postkapilarnych przez nasilenie wytwarzania RFT, których głównym źródłem była oksydaza NADPH [77].

Monocyty/makrofagi

Osiadłe w błonie wewnętrznej ściany naczynia monocyty zostają przekształcone w makrofagi, na powierzchni których pojawiają się receptory zmiatające [60,63]. Za pomocą tych receptorów makrofagi pochłaniają oxyLDL. Ekspresja receptorów zmiatających nie jest wytworze regulowana, tak jak ekspresja receptorów LDL, co wywołuje niekontrolowaną akumulację lipidów i powstanie tak charakterystycznych dla miażdżycy komórek piankowatych. Wyłapywanie oxyLDL czy innych patogenów lub wydzielane lokalnie cytokiny uaktywnia makrofagi, które wydzielają wiele czynników modulujących przebieg miażdżycy. Są źródłem: czynników chemotaktycznych, cytokin zapalnych, czynników wzrostowych, czynnika tkankowego, metaloproteinaz i reaktywnych form tlenu. Głównym źródłem RFT wytwarzanych w makrofagach jest oksydaza NADPH.

Uważa się, że jednym z głównych mechanizmów promiażdżycowego działania makrofagów jest ich udział w powstawaniu oxyLDL [12]. Z przeprowadzonych badań wynika, że za to odpowiadają RFT pochodzące z oksydazy NADPH. Podanie makrofagom apocyniny, swoistego inhibitora oksydaz NADPH, powoduje redukcję tlenowych modyfikacji LDL o 89% [4].

Istnieją badania wskazujące na udział oksydazy NADPH w powstawaniu komórek piankowatych. Wykazano bowiem, że NOX1 w połączeniu z LOX-1 (receptor oxyLDL) przez pobudzenie receptora Toll-podobnego 9 (TLR9) i aktywację kinazy p38MAPK nasila tworzenie komórek piankowatych [43,53].

Zatrzymywanie naładowanych lipidami makrofagów w błonie wewnętrznej ściany naczynia jest jednym z głównych, ale odwracalnych etapów miażdżycy [2]. Podczas gdy prawidłowo makrofagi migrują po zneutralizowaniu patogenów, komórki piankowe pozostają w błonie wewnętrznej, gdzie powodują lokalne zapalenie. Badania regresji zmiany miażdżycowej wykazały, że była związana ze znikaniem komórek piankowatych spowodowanych ich migracją do węzłów chłonnych [53]. Dostępne są badania, które implikują rolę oksydazy NADPH w zatrzymywaniu makrofagów w błonie wewnętrznej. Wykazano, że oxyLDL indukują zmiany w funkcjonowaniu makrofagów zależnie od CD36 (jeden z receptorów zmiatających) prowadzące do trwałej aktywacji FAK (focal adhesion molecule kinase) i inaktywację fosfatazy fosfotyrozynowej (SHP-2) [66]. Autorzy wykazali, że RFT pochodzące z oksydazy NADPH są odpowiedzialne za hamowanie SHP-2. Zdolności makrofagów do migracji nawet w obecności oxyLDL zostały odbudowane w obecności apocyniny.

Wytwarzane przez makrofagi metaloproteinazy trawią składowe tkanki łącznej, a więc kolagen, fibronektynę, elastynę, lamininę i inne proteoglikany, przyczyniając się do przebudowy ściany naczynia i pęknięcia płytki miażdżycowej. Autorzy wykazali, że izoforma oksydazy NADPH-NOX2 jest zaangażowana w regulację ekspresji metaloproteinaz w makrofagach [37].

Zapalenie

Mechanizmy odpowiedzi zapalnej odgrywają główną rolę w patogenezie miażdżycy. Rola oksydazy NADPH w miażdżycy jest złożona, cytokiny zapalne aktywują poszczególne oksydazy, a RFT pochodzące z oksydazy NADPH odgrywają istotną rolę w transdukcji sygnału prowadzącego do aktywacji odpowiedzi zapalnej [11]. Jak wspomniano wcześniej w transdukcji sygnału uruchamiającego odpowiedź zapalną pośredniczą wrażliwe na stres oksydacyjny kinazy MAP (p38MAPK, JNK i ERK) oraz czynniki transkrypcyjne (NF- κ B i AP-1). Z wielu badań wynika, że reaktywne formy tlenu, których źródłem jest oksydaza NADPH pośredniczą w transdukcji sygnału. Sygnał jest indukowany takimi czynnikami proaterogennymi jak: oxyLDL, angiotensyna II, LPS (lipopolysacharyd).

polisacharyd) czy hiperglikemia. Działanie czynników proaterogennych aktywuje NF- κ B i kinazy MAP z następowym promowaniem syntezy cytokin zapalnych, chemokin czy śródbłonkowych cząsteczek adhezyjnych [18].

Komórki mięśni gładkich

Komórki mięśni gładkich odgrywają istotną rolę w patogenezie miażdżycy [62]. Pod wpływem wydzielanych lokalnie czynników wzrostowych komórki mięśni gładkich migrują z błony środkowej do błony wewnętrznej, gdzie proliferują i syntetyzują składowe tkanki łącznej. Procesy uczestniczą w powstawaniu i progresji blaszki miażdżycowej. Dzięki działaniu obecnych w błonie wewnętrznej komórek mięśni gładkich dochodzi najpierw do powstania włóknistej czapeczki pokrywającej zmianę miażdżycową, a następnie do przebudowy ściany naczyń (tzw. remodeling), powodując jej zwężenie i upośledzenie dopływu krwi do tkanek. Stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w przebudowie ściany naczyń nasilając migrację i proliferację komórek mięśni gładkich. Dzieje się tak zarówno wskutek bezpośredniego działania RFT prowadzącego do zmiany fenotypu komórek śródbłonka, ale również przez zależne od stresu oksydacyjnego upośledzenie biodostępności NO mającego właściwości antyproliferacyjne.

Reaktywne formy tlenu pochodzące z oksydazy NADPH mają istotny udział w zmianie fenotypu i funkcjonowaniu komórek mięśni gładkich. Główną rolę odgrywa NOX1, zaangażowana zarówno w proliferację, jak i migrację komórek mięśni gładkich. Jest aktywowana m.in. Ang II, PDGF (platelet derived growth factor), trombinę czy oxyLDL [42,61,90]. Mechanizmy, za pomocą których NOX1 jest zaangażowana w regulację proliferacji mięśni gładkich, mogą być związane z redox wrażliwymi drogami transdukcji sygnału. W komórkach mięśni gładkich stymulowanych Ang II, NOX1 nasila proliferację przez wpływ na p38MAPK oraz kinazę Akt [82,83]. NOX1 pośredniczy również w nasileniu migracji stymulowanej PDGF, bFGF (basic fibroblast growth factor) czy trombiną [44,69,93]. W komórkach mięśni gładkich stymulowanych trombiną reaktywne formy tlenu, które pochodzą z NOX1 nasilają ich proliferację. Jest to związane, przynajmniej częściowo, ze wzrostem stężenia jonów Ca^{2+} w cytosolu [93]. Na proces przebudowy ściany naczyń duży wpływ ma również degradacja i reorganizacja składowych macierzy pozakomórkowej, za co są odpowiedzialne metaloproteiny. Jak już wspomniano RFT, których źródłem jest oksydaza NADPH nasilają ich ekspresję w makrofagach. Pochodzące z NOX1 reaktywne formy tlenu są zaangażowane również w nasilenie syntezy metaloproteiny 9 (MMP9) w fibroblastach przez aktywację NF- κ B [72].

OKSYDAZA NADPH A MIAŻDŻYCA

Przedstawione dane wskazują na istotną rolę promiażdżycowego działania oksydazy NADPH. Potwierdzają to badania oceniające ich obecność w wycinkach naczyń

objętych miażdżycą oraz niektóre badania przeprowadzone na zwierzęcym modelu doświadczalnym miażdżycy.

Jedną z najbardziej poznanych cech promiażdżycowego działania RFT jest upośledzenie biodostępności NO. Autorzy wykazali ujemną zależność między aktywnością NOX a funkcją wazodylatacyjną śródbłonka w ludzkich naczyniach żylnych pobranych od pacjentów z chorobami naczyniowo-sercowymi [29]. W innych badaniach wykazano zwiększoną ekspresję NOX w naczyniach wieńcowych pobranych od pacjentów z chorobami naczyń wieńcowych i osłabioną wazodylacją zależną od śródbłonka w porównaniu do osób zdrowych [76]. Wykazano również zwiększoną ekspresję p22^{phox} w ludzkiej zmianie miażdżycowej pobranej z naczyń wieńcowych w porównaniu do naczyń nieobjętych miażdżycą [5]. Zwiększoną ekspresję p22^{phox} stwierdzono w komórkach śródbłonka, makrofagach, komórkach mięśni gładkich i fibroblastach. Towarzyszyło temu nasilone wytwarzanie RFT oraz obecność oxyLDL. Ponadto autorzy donoszą, że wytwarzanie reaktywnych form tlenu było większe w wycinkach naczyń u pacjentów z niestabilną chorobą niedokrwinną w porównaniu do stabilnej postaci tej choroby. Wskazuje to, że RFT mogą modulować stabilność blaszki miażdżycowej. Inni autorzy stwierdzili, że p22^{phox} kolokalizuje z NOX2 głównie w makrofagach, a poziom mRNA p22^{phox} i NOX2 korelował z nasileniem zmian miażdżycowych [75]. Obserwacje potwierdzono w badaniach, w których analizowano źródła RFT i ekspresję NOX w zdrowych i objętych miażdżycą naczyniach wieńcowych pobranych od pacjentów poddanych zabiegowi przeszczepienia serca. Stwierdzono zwiększone wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego w zmiażdżonych naczyniach, a odpowiadała za to oksydaza NADPH [28]. Inne badania wykazały, że hipercholesterolemii towarzyszy zwiększona ekspresja receptorów angiotensyny z towarzyszącą dysfunkcją śródbłonka i zależną od oksydazy NADPH nasilonym wytwarzaniem anionorodnika ponadtlenkowego [88]. Zastosowanie blokerów receptorów angiotensyny poprawia funkcję śródbłonka. Ponadto hamuje nasilenie stresu oksydacyjnego z jednoczesną redukcją formowania zmiany miażdżycowej.

Istnienie powiązań między aktywnością NOX a progresją miażdżycy badano również w eksperymentalnym modelu miażdżycy z wykorzystaniem zwierząt znokautowanych. Niestety uzyskane wyniki nie są jednoznaczne. Myszy apoE^{-/-} pozbawione jednocześnie gp91^{phox} były karmione dietą bogatą w tłuszcze przez 24 tygodnie w celu stworzenia modelu hipercholesterolemii z jednocześnie upośledzoną aktywnością NOX [39]. Mimo obniżenia wytwarzania O_2^- nie stwierdzono różnic w wielkości zmian miażdżycowych w zatokach aorty między grupą kontrolną a grupą zwierząt pozbawionych gp91^{phox}. Podobne wyniki otrzymano w badaniach z wykorzystaniem myszy pozbawionych jednocześnie apoE i p47^{phox} [30]. Zwiększona ekspresja NOX2 w komórkach śródbłonka u myszy apoE^{-/-} była związana z nasi-

leniem wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego oraz aktywacją śródbłonna z następowym zwiększeniem rekrutacji makrofagów [17]. Nasilona rekrutacja makrofagów nie miała wpływu na progresję miażdżycy. Natomiast inni autorzy wykorzystując podobny model wykazali, że wielkość zmian miażdżycowych w aorcie jest mniejsza u myszy pozbawionych jednocześnie apoE i p47^{phox} sugerując, że NOX1 lub NOX2 może być zaangażowana w powstawanie miażdżycy [8]. Podobne wyniki otrzymano w eksperymencie z wykorzystaniem myszy apoE^{-/-} pozbawionych jednocześnie NOX2 karmionych dietą wysokotłuszczową [35]. Brak aktywności NOX2 nie wpływał na wielkość zmian miażdżycowych w zatokach aorty, natomiast był związany z 50% redukcją zmian w aorcie ocenianych między łukiem aorty a rozwidleniem biodrowym. Zmniejszenie nasilenia zmian miażdżycowych wiązało się z istotnym osłabieniem wytwarzania RFT z jednoczesnym zwiększeniem biodostępności NO. Ponadto wykazano, że brak funkcjonalnej aktywności NOX u myszy pozbawionych p47^{phox} było związane z zahamowaniem tworzenia zmiany mia-

żdżycowej wskutek zmniejszenia rekrutacji makrofagów przez zahamowanie ekspresji ICAM-1 i VCAM-1 na powierzchni śródbłonna [84].

Znaczenie oksydazy NADPH w patogenezie miażdżycy potwierdzają również badania z zastosowaniem apocyniny, która hamuje aktywność oksydazy przez zapobieganie translokacji p47^{phox}. Autorzy wykazali, że podawanie apocyniny myszom ApoE^{-/-}/LDL^{-/-} (hipercholesterolowy zwierzęcy model miażdżycy) zmniejszała zmiany miażdżycowe w aorcie [38].

Od czasów odkrycia oksydazy NADPH wiele już dowiedziano się o tym enzymie. Jej budowa została dokładnie już przebadana, sposób aktywacji wyjaśniony, przynajmniej w pewnej części. Jak wynika z dotychczasowych badań jest głównym źródłem reaktywnych form tlenu w ścianie naczynia i prawdopodobnie odgrywa ważną rolę w patogenezie chorób, których podłożem jest miażdżycy.

PÍSMIENICTWO

- [1] Ago T., Kuroda J., Kamouchi M., Sadoshima J., Kitazono T.: Pathophysiological roles of NADPH oxidase/NOX family proteins in the vascular system. Review and perspective. *Circ. J.*, 2011; 75: 1791-1800
- [2] Angeli V., Llodra J., Rong J.X., Satoh K., Ishii S., Shimizu T., Fisher E.A., Randolph G.J.: Dyslipidemia associated with atherosclerotic disease systemically alters dendritic cell mobilization. *Immunity*, 2004; 21: 561-574
- [3] Arbiser J.L., Petros J., Klafter R., Govindajaran B., McLaughlin E.R., Brown L.F., Cohen C., Moses M., Kilroy S., Arnold R.S., Lambeth J.D.: Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 715-720
- [4] Aviram M., Rosenblat M., Etzioni A., Levy R.: Activation of NADPH oxidase required for macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Metabolism*, 1996; 45: 1069-1079
- [5] Azumi H., Inoue N., Ohashi Y., Terashima M., Mori T., Fujita H., Awano K., Kobayashi K., Maeda K., Hata K., Shinke T., Kobayashi S., Hirata K., Kawashima S., Itabe H., Hayashi Y., Imajoh-Ohmi S., Itoh H., Yokoyama M.: Superoxide generation in directional coronary atherectomy specimens of patients with angina pectoris: important role of NAD(P)H oxidase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2002; 22: 1838-1844
- [6] Babior B.M.: NADPH oxidase; An update. *Blood*, 1999; 93: 1464-1476
- [7] Babior B.M.: NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.*, 2004; 16: 42-47
- [8] Barry-Lane P.A., Patterson C., van der Merwe M., Hu Z., Holland S.M., Yeh E.T., Runge M.S.: p47^{phox} is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE^{-/-} mice. *J. Clin. Invest.*, 2001; 108: 1513-1522
- [9] Bedard K., Krause K.H.: The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.*, 2007; 87: 245-313
- [10] BelAiba R.S., Djordjevic T., Petry A., Diemer K., Bonello S., Banfi B., Hess J., Pogrebniak A., Bickel C., Gorlach A.: NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007; 42: 446-459
- [11] Brandes R.P., Weissmann N., Schröder K.: NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 2010; 49: 687-706
- [12] Cathcart M.K.: Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004; 24: 23-28
- [13] Cave A.C., Brewer A.C., Narayanapanicker A., Ray R., Grieve D.J., Walker S., Shah A.M.: NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid. Redox. Signal.*, 2006; 8: 691-728
- [14] Chłopicki S.: Zapalenie śródbłonna w atherotrombosis. *Kardiologia po Dyplomie*, 2005; 4: 77-88
- [15] Costanzo A., Moretti F., Burgio V.L., Bravi C., Guido F., Levrero M., Puri P.L.: Endothelial activation by angiotensin II through NF-κB and p38 pathways: Involvement of NF-κB-inducible kinase (NIK), free oxygen radicals, and selective inhibition by aspirin. *J. Cell. Physiol.*, 2003; 195: 402-410
- [16] Dikalov S.I., Dikalova A.E., Bikineyeva A.T., Schmidt H.H., Harrison D.G., Griendling K.K.: Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. *Free Radic. Biol. Med.*, 2008; 45: 1340-1351
- [17] Douglas G., Bendall J.K., Crabtree M.J., Tatham A.L., Carter E.E., Hale A.B., Channon K.M.: Endothelial-specific Nox2 overexpression increases vascular superoxide and macrophage recruitment in ApoE^{-/-} mice. *Cardiovasc. Res.*, 2012; 94: 20-29
- [18] Drummond G.R., Sobey C.G.: Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol. Metab.*, 2014; 25: 452-463
- [19] Dworakowski R., Alom-Ruiz S.P., Shah A.M.: NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype. *Pharmacol. Rep.*, 2008; 60: 21-28
- [20] Endermann D.H., Schiffrin E.K.: Endothelial dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2004; 15: 1983-1992
- [21] Frey R.S., Gao X., Javaid K., Siddiqui S.S., Rahman A., Malik A.B.: Phosphatidylinositol 3-kinase g signaling through protein kinase Cγ induces NADPH oxidase-mediated oxidant generation and NF-κB activation in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 16128-16138
- [22] Frey R.S., Ushio-Fukai M., Malik A.B.: NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysio-

logy. *Antioxid. Redox Signal.*, 2009; 11: 791-810

[23] Geiszt M., Lekstrom K., Witta J., Leto T.L.: Proteins homologous to p47^{phox} and p67^{phox} support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 20006-20012

[24] Goettsch C., Goettsch W., Muller G., Seebach J., Schnittler H.J., Morawietz H.: Nox4 overexpression activates reactive oxygen species and p38 MAPK in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009; 380: 355-360

[25] Griendling K.K., Sorescu D., Ushio-Fukai M.: NADPH oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.*, 2000; 86: 494-501

[26] Groemping Y., Lapouge K., Smerdon S.J., Rittinger K.: Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell*, 2003; 113: 343-355

[27] Guichard C., Pedruzzi E., Dewas C., Fay M., Pouzet C., Bens M., Vandewalle A., Ogier-Denis E., Gougerot-Pocidallo M.A., Elbim C.: Interleukin-8-induced priming of neutrophil oxidative burst requires sequential recruitment of NADPH oxidase components into lipid rafts. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 37021-37032

[28] Guzik T.J., Sadowski J., Guzik B., Jopek A., Kapelak B., Przybylowski P., Wierzbicki K., Korbut R., Harrison D.G., Channon K.M.: Coronary artery superoxide production and Nox isoform expression in human coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006; 26: 333-339

[29] Guzik T.J., West N.E., Black E., McDonald D., Ratnatunga C., Pillai R., Channon K.M.: Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ. Res.*, 2000; 86: E85-E90

[30] Hsieh E., Segal B.H., Pagano P.J., Rey F.E., Paigen B., Deleonardis J., Hoyt R.F., Holland S.M., Finkel T.: Vascular effects following homozygous disruption of p47^{phox}: an essential component of NADPH oxidase. *Circulation*, 2000; 101: 1234-1236

[31] Huang J., Kleinberg M.E.: Activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47^{phox}. Phosphorylation controls SH3 domain-dependent binding to p22^{phox}. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 19731-19737

[32] Hulsmans M., Holvoet P.: The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med.*, 2010; 14: 70-78

[33] Hwang J., Saha A., Boo Y.C., Sorescu G.P., McNally J.S., Holland S.M., Dikalov S., Giddens D.P., Griendling K.K., Harrison D.G., Jo H.: Oscillatory shear stress stimulates endothelial production of O₂⁻ from p47^{phox}-dependent NAD(P)H oxidases, leading to monocyte adhesion. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 47291-47298

[34] Jones S.A., O'Donnell V.B., Wood J.D., Broughton J.P., Hughes E.J., Jones O.T.: Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, 1996; 271: H1626-H1634

[35] Judkins C.P., Diep H., Broughton B.R., Mast A.E., Hooker E.U., Miller A.A., Selemidis S., Dusting G.J., Sobey C.G., Drummond G.R.: Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2010; 298: H24-H32

[36] Jung O., Schreiber J.G., Geiger H., Pedrazzini T., Busse R., Brandes R.P.: gp91^{phox}-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation*, 2004; 109: 1795-1801

[37] Kim S.Y., Lee J.G., Cho W.S., Cho K.H., Sakong J., Kim J.R., Chin B.R., Baek S.H.: Role of NADPH oxidase-2 in lipopolysaccharide-induced matrix metalloproteinase expression and cell migration. *Immunol. Cell Biol.*, 2010; 88: 197-204

[38] Kinkade H., Streeter J., Miller F.J.: Inhibition of NADPH oxidase by apocynin attenuates progression of atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013; 14: 17017-17028

[39] Kirk E.A., Dinanuer M.C., Rosen H., Chait A., Heinecke J.W., LeBoeuf R.C.: Impaired superoxide production due to a deficiency in

phagocyte NADPH oxidase fails to inhibit atherosclerosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000; 20: 1529-1535

[40] Koga H., Terasawa H., Nunoi H., Takeshige K., Inagaki F., Sumimoto H.: Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67^{phox} participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 25051-25060

[41] Lapouge K., Smith S.J., Groemping Y., Rittinger K.: Architecture of the p40-p47-p67^{phox} complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67^{phox}. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 10121-10128

[42] Lassegue B., Sorescu D., Szocs K., Yin Q., Akers M., Zhang Y., Grant S.L., Lambeth J.D., Griendling K.K.: Novel gp91^{phox} homologues in vascular smooth muscle cells: Nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ. Res.*, 2001; 88: 888-894

[43] Lee J.G., Lim E.J., Park D.W., Lee S.H., Kim J.R., Baek S.K.: A combination of LOX-1 and NOX1 regulates TLR9-mediated foam cell formation. *Cell. Signal.*, 2008; 20: 2266-2275

[44] Lee M.Y., San Martin A., Mehta P.K., Dikalova A.E., Garrido A.M., Datla S.R., Lyons E., Krause K.H., Banfi B., Lambeth J.D., Lassegue B., Griendling K.K.: Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH oxidase 1 (nox1) contribution to injury-induced neointimal formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2009; 29: 480-487

[45] Levitan I., Volkov S., Subbiah P.V.: Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxid. Redox Signal.*, 2010; 13: 39-75

[46] Li H., Horke S., Förstermann U.: Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2013; 34: 313-319

[47] Li J.M., Fan L.M., Christie M.R., Shah A.M.: Acute tumor necrosis factor α signaling via NADPH oxidase in microvascular endothelial cells: role of p47^{phox} phosphorylation and binding to TRAF4. *Mol. Cell. Biol.*, 2005; 25: 2320-2330

[48] Liang C.J., Wang S.H., Chen Y.H., Chang S.S., Hwang T.L., Leu Y.L., Tseng Y.C., Li C.Y., Chen Y.L.: Viscolin reduces VCAM-1 expression in TNF- α -treated endothelial cells via the JNK/NF- κ B and ROS pathway. *Free Radic. Biol. Med.*, 2011; 51: 1337-1346

[49] Libby P.: Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2006; 83: 456S-460S

[50] Libby P., Aikawa M., Schonbeck U.: Cholesterol and atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1529: 299-309

[51] Libby P., Ridker P., Hansson G.K.: Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 2011; 473: 317-325

[52] Liu J.Q., Zelko I.N., Folz R.J.: Reoxygenation-induced constriction in murine coronary arteries: the role of endothelial NADPH oxidase (gp91^{phox}) and intracellular superoxide. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 24493-24497

[53] Llodra J., Angeli V., Liu J., Trogan E., Fisher E.A., Randolph G.J.: Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 11779-11784

[54] Lubos E., Handy D.E., Loscalzo J.: Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. *Front. Biosci.*, 2008; 13: 5323-5344

[55] Madamanchi N.R., Runge M.S.: Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 2013; 61: 473-501

[56] Manea A.: NADPH oxidase derived reactive oxygen species: involvement in vascular physiology and pathology. *Cell Tissue Res.*, 2010; 342: 325-339

[57] Marumo T., Schini-Kerth V.B., Fisslthaler B., Busse R.: Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF- κ B and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. *Circulation*, 1997; 96: 2361-2367

- [58] Matsuno K., Yamada H., Iwata K., Jin D., Katsuyama M., Matsuki M., Takai S., Yamanishi K., Miyazaki M., Matsubara H., Yabe-Nishimura C.: Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation*, 2005; 112: 2677-2685
- [59] Maturana A., Arnaudeau S., Ryser S., Banfi B., Hossle J.P., Schlegel W., Krause K.H., Demarex N.: Heme histidine ligands within gp91^{phox} modulate proton conduction by the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 30277-30284
- [60] McLaren J.E., Michael D.R., Ashlin T.G., Ramji D.P.: Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy. *Prog. Lipid Res.*, 2011; 50: 331-347
- [61] Niu X.L., Madamanchi N.R., Vendrov A.E., Tchivilev I., Rojas M., Madamanchi C., Brandes R.P., Krause K.H., Humphries J., Smith A., Burnand K.G., Runge M.S.: Nox activator 1: A potential target for modulation of vascular reactive oxygen species in atherosclerotic arteries. *Circulation*, 2010; 121: 549-559
- [62] Owens G.K., Kumar M.S., Wamhoff B.R.: Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol. Rev.*, 2004; 84: 767-801
- [63] Packard R.R., Lichtman A.H., Libby P.: Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Semin. Immunopathol.*, 2009; 31: 5-22
- [64] Pagano P.J., Chanock S.J., Siwik D.A., Colucci W.S., Clark J.K.: Angiotensin II induces p67^{phox} mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension*, 1998; 32: 331-337
- [65] Paravicini T.M., Touyz R.M.: NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*, 2008; 31: S170-S180
- [66] Park Y.M., Febbraio M., Silverstein R.L.: CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J. Clin. Invest.*, 2009; 119: 136-145
- [67] Raman M., Chen W., Cobb M.H.: Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, 2007; 26: 3100-3112
- [68] Ray P.D., Huang B.W., Tsui Y.: Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.*, 2012; 24: 981-990
- [69] Schroder K., Helmcke I., Palfi K., Krause K.H., Busse R., Brandes R.P.: Nox1 mediates basic fibroblast growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2007; 27: 1736-1743
- [70] Schroder K., Zhang M., Benkhoff S., Mieth A., Pliquett R., Kosowski J., Kruse C., Luedike P., Michaelis U.R., Weissmann N., Dimmeler S., Shah A.M., Brandes R.P.: Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circ. Res.*, 2012; 110: 1217-1225
- [71] Seshiah P.N., Weber D.S., Rocic P., Valppu L., Taniyama Y., Griendling K.K.: Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ. Res.*, 2002; 91: 406-413
- [72] Shinohara M., Adachi Y., Mitsushita J., Kuwabara M., Nagasawa A., Harada S., Furuta S., Zhang Y., Seheli K., Miyazaki H., Kamata T.: Reactive oxygen generated by NADPH oxidase 1 (nox1) contributes to cell invasion by regulating matrix metalloproteinase-9 production and cell migration. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 4481-4488
- [73] Singh U., Jialal I.: Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*, 2006; 13: 129-142
- [74] Sirker A., Zhang M., Shah A.M.: NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies. *Basic Res. Cardiol.*, 2011; 106: 735-747
- [75] Sorescu D., Weiss D., Lassegue B., Clempus R.E., Szocs K., Sorescu G.P., Valppu L., Quinn M.T., Lambeth J.D., Vega J.D., Taylor W.R., Griendling K.K.: Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*, 2002; 105: 1429-1435
- [76] Spiekermann S., Landmesser U., Dikalov S., Bredt M., Gamez G., Tatge H., Reepschlager N., Hornig B., Drexler H., Harrison D.G.: Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease. Relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation*, 2003; 107: 1383-1389
- [77] Stokes K.Y., Clanton E.C., Russell J.M., Ross C.R., Granger D.N.: NAD(P)H oxidase-derived superoxide mediates hypercholesterolemia-induced leukocyte-endothelial cell adhesion. *Circ. Res.*, 2001; 88: 499-505
- [78] Sumimoto H., Miyano K., Takeya R.: Molecular composition and regulation of the Nox family NADPH oxidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 338: 677-686
- [79] Takenouchi Y., Kobayashi T., Matsumoto T., Kamata K.: Gender differences in age-related endothelial function in the murine aorta. *Atherosclerosis*, 2009; 206: 397-404
- [80] Touyz R.M., Yao G., Schiffrin E.L.: c-Src induces phosphorylation and translocation of p47^{phox}: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2003; 23: 981-987
- [81] Ushio-Fukai M.: Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid. Redox Signal.*, 2009; 11: 1289-1299
- [82] Ushio-Fukai M., Alexander R.W., Akers M., Griendling K.K.: P38map kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways by angiotensin II: Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 15022-15029
- [83] Ushio-Fukai M., Alexander R.W., Akers M., Yin Q., Fujio Y., Walsh K., Griendling K.K.: Reactive oxygen species mediate the activation of akt/protein kinase b by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 22699-22704
- [84] Vendrov A.E., Hakim Z.S., Madamanchi N.R., Rojas M., Madamanchi C., Runge M.S.: Atherosclerosis is attenuated by limiting superoxide generation in both macrophages and vessel wall cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2007; 27: 2714-2721
- [85] Viola F., Sanguigni V., Carnevale R., Plebani A., Rossi P., Finocchi A., Pignata C., De Mattia D., Martire B., Pietrogrande M.C., Martino S., Gambineri E., Soresina A.R., Pignatelli P., Martino F., Basili S., Loffredo L.: Hereditary deficiency of gp91^{phox} is associated with enhanced arterial dilatation: results of a multicenter study. *Circulation*, 2009; 120: 1616-1622
- [86] Virella G., Lopes-Virella M.F.: Atherogenesis and the humoral immune response to modified lipoproteins. *Atherosclerosis*, 2008; 200: 239-246
- [87] Wallach T.M., Segal A.W.: Analysis of glycosylation sites on gp91^{phox}, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro. *Biochem. J.*, 1997; 321: 583-585
- [88] Warnholtz A., Nickenig G., Schulz E., Macharzina R., Bräsen J.H., Skatchkov M., Heitzer T., Stasch J.P., Griendling K.K., Harrison D.G., Böhm M., Meinertz T., Münzel T.: Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation*, 1999; 99: 2027-2033
- [89] Yamamori T., Inanami O., Nagahata H., Kuwabara M.: Phosphoinositide 3-kinase regulates the phosphorylation of NADPH oxidase component p47^{phox} by controlling cPKC/PKC δ but not Akt. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 316: 720-730
- [90] Yin C.C., Huang K.T.: H₂O₂ but not O₂ - elevated by oxidized LDL enhances human aortic smooth muscle cell proliferation. *J. Biomed. Sci.*, 2007; 14: 245-254
- [91] Yoshida H., Kisugi R.: Mechanisms of LDL oxidation. *Clin. Chim. Acta*, 2010; 411: 1875-1882

[92] Zemse S.M., Hilgers R.H., Webb R.C.: Interleukin-10 counteracts impaired endothelium-dependent relaxation induced by ANG II in murine aortic rings. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2007; 292: H3103-H3108

[93] Zimmerman M.C., Takapoo M., Jagadeesha D.K., Stanic B., Banfi B., Bhalla R.C., Miller F.J.Jr.: Activation of NADPH oxidase 1 increases

intracellular calcium and migration of smooth muscle cells. *Hypertension*, 2011; 58: 446-453

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.