

ĆELIJSKA SIGNALNA TRANSDUKCIJA – MODULACIJA SLOBODNIM RADIKALIMA

Dušica Pavlović, Vidosava Đorđević, Gordana Kocić

Institut za biohemiju – Medicinski fakultet Niš

Kratak sadržaj: Signalna transdukcija je proces prenosa signala sa ćelijske površine u unutrašnjost ćelije. Ovaj ubikvitarni mehanizam omogućava obavljanje osnovnih ali i ćelijsko-tkivno specifičnih procesa koji učestvuju u održavanju ćelijske homeostaze. Narušavanje normalnih transdukcionih procesa je najčešća molekulska baza u patogenezi i razvoju komplikacija mnogih bolesti. Takođe, poznavanje svih činioca uključenih u kaskade signalnih puteva otvara mogućnost primene različitih modulatora u terapijske svrhe. Jedan od najbolje proučenih puteva signalne transdukcije je aktivacija fagocitne NADPH oksidaze. Međutim, reaktivne kiseonične vrste koje nastaju u ovom procesu mogu modulirati brojne ćelijske transdukcione puteve. Šećerna bolest je praćena intenziviranim oksidativnim stresom koji dovodi do trajnog oštećenja tkiva. Oksidaciono oštećenje može da pokrene različite signalne kaskade koje modulišu ćelijske funkcije i mogu dovesti do ćelijske smrti. Hiperglikemijom indukovana aktivacija PKC-MAP kinaznog puta danas se smatra ključnim biohemijskim događajem u razvoju dijabetičkih komplikacija i insulinske rezistencije.

Cljučne reči: signalna transdukcija, NADPH oksidaza, dijabetes melitus.

Uvod

Signalna transdukcija predstavlja proces transmisije signala sa ćelijske površine u unutrašnjost ćelije. Sinhronizovanost i svrshodnost ćelijskog metabolizma, adaptacija na promenjene uslove sredine, proliferacija, diferencijacija, programirana ćelijska smrt, ostvaruju se zahvaljujući visokospecijalizovanim sistemima ćelije koji integrišu, prenose i amplifikuju vanćelijske informacije sadržane u hemijskim signalima. Signalni molekuli su najčešće prirodni produkti ćelije (endokrini hormoni, neurotransmiteri, parakrini i autokrini hormoni) mada i različiti sintetski produkti mogu inicirati, sprečiti ili modifikovati prenos signala.

Slobodni radikali i njihovi metaboliti uključeni u kompleksnu mrežu različitih signalnih puteva, najverovatnije funkcionišu kao intracelularni i intercelularni posrednici transformišući inicijalni signal (stimulaciju receptora) u biohemijski odgovor ćelije. Njihove osnovne karakteristike (veoma mali, visoko reaktivni i/ili difuzibilni molekuli) idu u prilog pretpostavci da slobodni radikali i redoks stres aktivno učestvuju u ćelijskoj signalizaciji kao sekundarni glasnici u aktivaciji faktora transkripcije i indukciji ekspresije gena. Naj-

češće u procesu aktivacije protein kinaza redoks stresom učestvuju slobodni kiseonični radikali (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$), azot monoksid (NO), modulatori redoks statusa (blokatori sinteze glutationa) ili hemijska jedinjenja koja generišu radikale. Međutim, i oksidisani produkti mogu pokrenuti ćelijsku signalizaciju aktiviranjem nekog od redoks senzora. Inicijacija ekspresije inducibilnih gena slobodnim radikalima i intermedijatima oksidativnog metabolizma u zavisnosti od stepena narušenog prooksidantnog/antioksidantnog balansa u ćeliji može dovesti do različitog odgovora ćelije kao što su: 1) fiziološki odgovor ćelije, 2) adaptacija ćelije na oksidacioni stres, 3) kancerogeni efekti, 4) pokretanje apoptoze, 5) iniciranje nekroze.

U ovom revijskom pregledu data su dva modela signalne transdukcije:

1. Signalna transdukcija u funkciji NADPH oksidaze,
2. Oksidacioni stres i modulacija signalne transdukcije u šećernoj bolesti.

Signalna transdukcija u funkciji NADPH oksidaze

Nakon više od jednog veka utvrđeno je da se fagocitna (Mečnikov, 1883) NADPH oksidaza (Iyer i Quastel, 1963) aktivira složenim mehanizmom signalne transdukcije uz učešće brojnih faktora ćelijske transdukcione mašinerije. Produkti NADPH oksidaznog sistema igraju značajnu ulogu u funkciji fagocita u akutnim i hroničnim inflamatornim reakcijama.

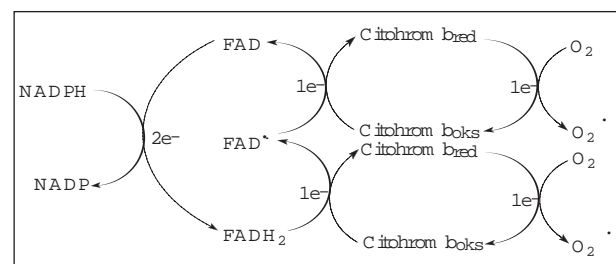
U slučaju patološkog inzulta imunološke ili neimunološke prirode dolazi do inflamatorne reakcije odnosno do infleksa fagocitnih ćelija u zahvaćen organ ili tkivo gde ispoljavaju svoje odbrambene funkcije sekvencom događaja koji obuhvataju migraciju, fagocitozu, sekreciju i oslobađanje reaktivnih kiseoničnih vrsti pri čemu je poslednji najvažniji u procesu ubijanja stranih mikroorganizama. Leukociti i monociti koji inače cirkulišu u sistemu krvnih sudova, vrlo brzo se akumuliraju na mestu infekcije ili oštećenja. Da bi stigli na mesto inflamacije leukociti prolaze kroz endotelnu barijeru i migriraju van krvnih sudova procesom poznatim kao ekstravazacija. Ekstravazacija je endotel zavisani proces koji uključuje kotrljanje, adheziju i migraciju leukocita u subendotelni prostor (1). Stimulisan citokinima vaskularni endotel indukuje selektine (E, P i L), intercelularne adhezivne molekule (ICAM 1, 2 i 3) i vaskularni ćelijski adhezivni molekul-1 (VCAM-1), koji interreaguju sa specifičnim receptorima na leukocitima (2). Endotelne ćelije sintetizuju i hemoatraktante kao što su MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) i interleukin 8 (IL-8), koji su značajni za aktivaciju adhezivnih receptora na leukocitima i za određivanje pravca migracije (3). Leukociti čvrsto adheriraju zahvaljujući interakciji PECAM (Platelet-endothelial-cell-adhesion-molecule), koji je ekspimiran na leukocitima i interćelijskim spojnica endotelnih ćelija. Ove interakcije omogućavaju leukocitima da prođu između endotelnih ćelija i penetriraju bazalnu membranu uz pomoć proteolitičkih enzima. Sam proces migracije regulišu hemoatraktantni citokini (1).

Pri razvoju inflamatornog procesa leukociti selektivno pristižu u target organe pod specifičnim uslovima. Selektivnost je regulisana kombinacijom različitih adhezivnih molekula i hemoatraktanata čija se ekspresija razlikuje u zavisnosti od vrste tkiva i inflamatornog procesa odnosno bolesti (3). Kad dospu u inflamirano područje neutrofilni eliminišu patogene procesom fagocitoze a monociti diferenciraju u makrofage takođe sposobne da fagocituju patogene uzročnike. Stimulaciju fagocita mogu izazvati brojni agensi kao što su bakterije, opsonizovani zimožan, imunoglobulini i imuni kompleksi, komponente komplekta, sintetički oligopeptidi, forbol miristat acetat, citokini, agonisti G proteina, aktivatori PKC, Ca^{2+} jonofor. Neki deluju vezujući se za receptore ćelijske membrane dok drugi aktiviraju NADPH oksidazu bypass-ujući receptore i aktivirajući neke od komponenti intraćelijske transdukcione mašinerije. Inkubacija po-

limorfonukleara sa citokinima ne dovodi do detektabilne produkcije kiseoničnih reaktivnih vrsti ukoliko se ne doda sekundarni stimulan recimo forbol-miristat acetat ili opsonizovani zimožan. Takođe, bakterijski lipopolisaharidi nemaju direktan aktivirajući efekat, ali u njihovom prisustvu polimorfonukleari intenzivnije odgovaraju na druge stimulanse (4). Ovaj fenomen je poznat kao »priming«. Priming efekat imaju INF- γ i TNF u toku inkubacije stimuliranih polimorfonuklearnih leukocita, dok IL-15 iste efekte ispoljava na humanim monocitima (5). Od svih agonista najbolje su proučeni hemoatraktanti, a najčešće korišćen je tripeptid formil-metionil-leucil-fenil alanin (f-Met-Leu-Phe) koji se specifično vezuje za receptor N-formil peptid. U jednom neutrofilu može biti oko 100 000 ovih receptora, a u zavisnosti od stanja neutrofila na ćelijskoj površini se može naći 2 100% specifičnih peptida (6).

Nakon prepoznavanja čestičnog ili rastvorljivog stimulansa neutrofilni i makrofagi doživljavaju »oksidacionu eksploziju« (oxidative burst) ranije označavanu kao »respiratory burst« koja se metabolički karakteriše sa »four increases« jer se povećava: 1. potrošnja kiseonika, 2. produkcija superoksid anjon radikala, 3. produkcija H_2O_2 i 4. aktivnost heksozo-monofosfatnog šanta. Iako se respiratorna eksplozija manifestuje kroz 4 separata događaja svi zavise od aktivnosti jednog enzimskog sistema koji katalizuje jednelektronsku redukciju kiseonika u superoksid anjon radikal koristeći NADPH kao donor elektrona. Potrošnja kiseonika i produkcija superoksida su direktan rezultat aktivnosti ovog sistema dok su produkcija H_2O_2 i aktivacija šanta sekundarne posledice njegove aktivnosti.

Potrošnja kiseonika u mirujućim fagocitima jako varira zavisno od tipa ćelija. Neutrofilni troše malo kiseonika čak i u sredini bogatoj kiseonikom dok alveolarni makrofagi uglavnom obezbeđuju energiju na račun potrošnje kiseonika. Međutim pri odgovoru na stimulanse i jedni i drugi povećavaju potrošnju kiseonika (8). Potrošnja kiseonika se povećava 2 20 puta sa istovremenim stvaranjem i sekrecijom serije kiseoničnih reaktivnih vrsti, pre svega superoksid anjon radikala i vodonik peroksida. Više od 90% kiseonika u procesu »oksidacione eksplozije« u fagocitima transformiše se u superoksid anjon radikal (9).



Slika 1. Protok elektrona kroz sistem NADPH oksidaze (7)

Za »oksidacionu eksploziju« je odgovoran enzim nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NADPH) oksidaza prvi put opisana od strane Iyer-a i Quastel-a 1963 (8). Aktivna NADPH oksidaza je multikomponentni enzimski sistem koji se sastoji iz dva redoks-aktivna centra: 1. FAD-zavisnog flavoproteina koji kao NADPH dehidrogenaza služi za vezivanje supstrata, pokazuje specifičnost prema redukovanim nikotinamid adenin dinukleotidima i ima veći afinitet za NADPH nego NADH, zbog čega intracelularni odnos ova dva nukleotida može biti kritičan u regulaciji produkcije superoksid anjon radikala i dva iz niskopotentijalnog (low potential) citohroma b-tipa, heterodimernog citohroma b_{558} (citohrom b_{559} ili b_{245}) koji oksidise redukovane koenzime u prisustvu molekularnog kiseonika (ponaša se kao terminalni donor elektrona molekularnom kiseoniku) generišući superoksid anjon radikal (7). Citohrom b_{558} je izgrađen iz velike β subjedinice molekulske mase 91 kDa (gp 91 phox) (10) koja je glikozilisana i α subjedinice molekulske mase 22 kDa (p22 phox) (11). Sinteza gp 91 phox u vidu glikozilisanog prekursora (p65) odvija se u endoplazmatskom retikulumu. Stvaranje heterodimera nije kotranslacioni proces, a insercija hema je ključni momenat u stabilizaciji nastalog hetero-dimera (10). Citohrom b_{558} vezuje FAD i njegove analoge i sadrži po 2 hema za svaki FAD. Vrlo hidrofobni N-terminalni kraj velike subjedinice obrazuje 5 transmembranskih α heliksa i u ovom regionu se nalaze 2 hema. Dve trećine C-terminalnog dela molekula sadrže homologe regione za vezivanje NADPH i FAD.

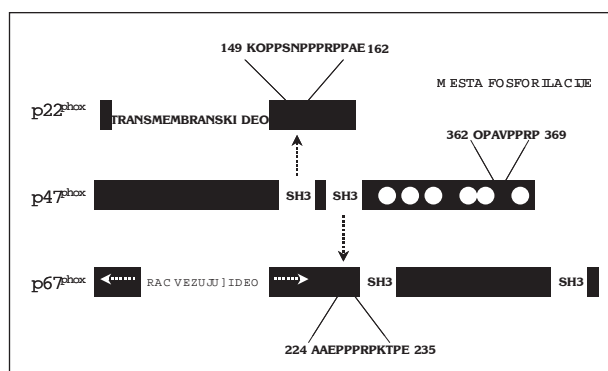
Mala subjedinica, p22 phox, sadrži 2 sekvence bogate prolinom na C-terminalnom kraju od kojih se jedna vezuje za SH3 domene p47 phox; N-terminalni deo obrazuje tri transmembranska heliksa i sadrži histidin koji kooperira sa velikom subjedinicom formirajući hem-vezujuća mesta (11). C-terminalni kraj, bogat prolinom okrenut je ka citozolskoj strani membrane gde može interreagovati sa p47 phox-om.

Pored ova dva membranska proteina, sistem NADPH oksidaze sadrži i četiri citozolska proteina: p47

phox, p67 phox, p40 phox i GTP-azu (Rac 1 ili 2). Prva dva egzistiraju u intaktnim ćelijama u obliku rastvorljivih proteina u citozolu, dok je p40 phox svojim C-terminalnim krajem vezan između dva SH3 domena p67 phox-a (12). U mirujućim ćelijama p47 phox, p67 phox i p40 phox formiraju visokomolekulski kompleks u citozolu. Aktivacija NADPH oksidaze počinje translokacijom citozolskih proteina p47 phox, p67 phox, p40 phox i Rac i asocijacijom sa citohromom b_{558} u plazma membrani (13) što se ostvaruje procesom signalne transdukcije (najbolje proučeni signalni kompleks u koji se uključuje mala GTP-aza).

Okidač za signalnu transdukciju je Rac1 (ili 2) ili p21 (Cdc 42 Hs/Rac) aktivisana kinaza (PAK). Rac 1 je mala GTP-aza koja pripada Ras/Rho familiji malih GTP-aza proteina (14) koje na C-terminalnom kraju imaju izoprenil-ostatak za koga se pretpostavlja da posreduje u interakciji proteina sa membranom. Rho familija je sub-familija Ras superfamilije. Članovi Rho familije regulišu citoskelet, ćelijski rast i transkripciju. Postoje dve izoforme Rac-a (Rac 1 i Rac 2) koje se razlikuju po C-terminalnom kraju, jer Rac 1 sadrži više ostataka baznih aminokiselina, dok je Rac 2 manje bazan. Rac učestvuje u regulaciji citoskeleta, mitogenog odgovora, produkcije superoksid anjon radikala u fagocitima i transformisanim ćelijama i u regulaciji transkripcije. Direktne mete Rac-a su NADPH oksidaza i PAK. Efektorski region Rac-a se specifično vezuje za p67 phox pri čemu je vezivanje i Rac1 i Rac 2 za p67 phox u odnosu 1:1 (15). Rac 2 ima veći afinitet za NADPH oksidazu nego Rac 1 i izgleda da je vezan za membranu dok se Rac 1 translocira iz citozola u membranu sa drugim proteinima pri stimulaciji oksidacione eksplozije. Moguće je da je Rac 2 odgovoran za produkciju baktericidnih koncentracija superoksid anjon radikala a Rac 1 za produkciju niskih koncentracija superoksida. Rac 2 čini 95% i više totalnog Rac-a u neutrofilima koji su najvažniji superoksid-produkujući fagociti, a njegova interakcija sa membranom zavisi jedino od citohroma b_{558} , dok Rac-a 1 zavisi od interakcije sa p67 phox-om (17).

Regulacija aktivnosti malih GTP-aza je posredovana vezivanjem, hidrolizom i oslobađanjem gvanozin trifosfata (14). Konstanta disocijacije (Kd) Rac-a i GTP je nekoliko puta manja od koncentracije gvanil nukleotida u ćelijama koji inače ne kontrolišu aktivnost Rac-a (18). Interakcija Rac-a i GTP je regulisana pomoću proteinskih liganada koji modulišu njegovu interakciju sa nukleotidom (14, 18). U mirujućim ćelijama Rac se nalazi u kompleksu sa GDP i proteinskim ligandom koji inhibiše izmenu GDP i GTP-a (GDP dissociation inhibitor ili GDI). Kada se aktivira receptor tirozin kinaza pomoću ekstraćelijskih liganada GDI se odvaja od Rac-a. Zatim se i GDP odvaja od Rac-a u reakciji koja se ubrzava dejstvom nukleotid izmenjujućeg faktora a GTP vezuje za Rac čime se on aktivira. Zahvaljujući postranslacionoj metilaciji i vezivanju prenil ostataka za C-terminalni kraj Rac-a omogućena je njegova asocijacija sa ćelijskom membranom (19).



Slika 2. Mogući mehanizmi kompleksiranja citozolskih faktora sa p22 phox-om

Efektorski molekuli Rac-a su fosfatidil-inozitol-4-fosfat (PtdIns P) 5-kinaza (ova reakcija je GTP nezavisna) i diacilglicerol kinaza (DGK) koja se vezuje za oba kompleksa GTP i GDP-Rac1 što ukazuje da ove dve lipidne kinaze mogu imati značajnu ulogu u regulaciji funkcije Rac-a (20).

Vezivanje liganda za receptor direktno izaziva konformacione promene u jednom ili više G proteina; G protein zatim reaguje sa ciljnim enzimom, najčešće fosfolipazom i aktivise ga. U interakciji sa G proteinom aktivise se samo jedna fosfolipaza a nastali sekundarni mesendžeri produkovani prvim enzimom aktivisu druge fosfolipaze. Hemoatraktanti mogu aktivisati nekoliko različitih fosfolipaza A, C, D, A2 (21). Aktivisana fosfolipaza C stvara 2 sekundarna mesendžera, inozitol-3-fosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG), fosfolipaza D fosfatidnu kiselinu (PA), a fosfolipaza A2 arahidonsku kiselinu (AA). Ima podataka koji ukazuju da je fosfolipaza A2 esencijalna u aktivaciji NADPH oksidaze (22). Od primarno nastalih sekundarnih mesendžera, PA i AA mogu direktno aktivisati NADPH oksidazu, dok DAG deluje sinergistički sa nekim amfilnim molekulima. IP3 oslobađa kalcijum deponovan u ćelijskim organelama koji aktivise protein kinazu C koja se može direktno aktivisati pomoću DAG i PA. Prisustvo specifičnih lipida u membrani (AA, PA, DAG) verovatno regulise reverzibilnu asocijaciju citozolskih komponenti NADPH oksidaze sa onima u membrani. Predpostavlja se da regulacija posredovana lipidima ima funkciju signalom-indukovane translokacije protein kinaze C i citoskeletnih proteina u membranu (21). Kako primena staurosporina (blokatora protein kinaze C) rezultuje inhibicijom translokacije citozolskih proteina u membranu, izvesno je da je ista uključena u pomenute procese. Inhibicija protein kinaze C udružena je i sa inhibicijom fosforilacije i translokacije p47 phox što ukazuje da je fosforilacija p47 phox kritični događaj u aktivaciji oksidaze u toku »oksidacione eksplozije«, jer izaziva ili ubrzava intracelularnu redistribuciju i asocijaciju p47 phox za membrane. Fosforilacija se ostvaruje na C terminalnom regionu p47 phox-a koji je bogat argininom i sadrži četiri domena sa 6 serinskih ostataka preko kojih se ostvaruje fosforilacija pomoću protein kinaze C ili drugih. Primarno se fosforilišu dva ostatka serina u položajima 359 i 370, ali mogu biti uključene i serinske rezidue u položajima 303 i 304. N-terminalni kraj sadrži glicin, potencijalno mesto za modifikaciju masnim kiselinama. U aminokiselinskoj sekvenci p47 phox-a u sredini molekula jedan region se ponavlja i homolog je sekvenci Src familije tirozin kinaza, poznat kao SRC homologi region 3 (SH3) (po Src proteinu gde je prvi put opisan). Prvi SH3 se vezuje za sekvencu C-terminalnog kraja p22 phox bogatu prolinom, a druga izgleda za prolinom bogatu sekvencu p67 phox. Prisustvo p47 phox 100 puta povećava vezivanje p67 phox i 50 puta vezivanje Rac-a za membranu što ukazuje da je p47 phox »regulisani adaptorni protein« i da ne učestvuje direktno u regulaciji aktivnosti NADPH oksidaze, mada ima

mišljenja da p47 phox ima 8 funkcionalnih domena (a-h), od kojih 4 (c, d, e, g) formiraju delove regiona, NADPH oksidazne jedinice. Direktnu aktivaciju ostvaruje Rac ili p67 phox. Odsustvo p47phox onemogućava translokaciju p67phox, dok je translokacija p47-phox normalna u slučaju nedostatka p67phox. To znači da je p47phox primarna komponenta u translokaciji, a p67phox sekundarna. Proces translokacije je posredovan interakcijom p47phox i citohroma b jer je peptidna sekvenca citoplazmatskog domena velike subjedinice citohroma b identifikovana kao target (20).

Komponenta p67phox je u centralnom regionu bogata prolinom i sadrži jedan SH3 domen dok se drugi SH3 domen nalazi na C-terminalnom kraju molekula. Funkcija prvog SH3 domena je nepoznata. Interakcija p67 phox i p47 phox se ostvaruje (»tail to tail«) vezivanjem SH3 domena prvog sa sekvencom bogatom prolinom drugog proteina (rezidue od 357-371) (23), dok se drugi SH3 domen p47 phox vezuje za region bogat prolinom p67 phox-a. N-terminalni deo p67 phox sadrži vezujuće mesto za Rac koji ne reaguje ni sa jednom drugom oksidaznom komponentom. Rac 1 i Rac 2 se mogu vezati za amino-kiselinske ostatke 170-199 p67 phox-a dok N-terminalni kraj (1-192 aminokiseline) može da se koristi kao specifični inhibitor prenosa signala preko Rac-a. Delecija C-terminalne sekvence p67 phox-a (aminokiseline 193-526), C-terminalni SH3 domen (aminokiseline 470-520) i prolinom bogato područje (aminokiseline 226-236) oko 8 puta povećavaju vezivanje Rac-a 1. PAK-p21 (Cdc 42Hs/Rac)-aktivisana kinaza fosforiliše amino-kiselinske rezidue p67 phox-a u susedstvu vezujućeg mesta za Rac1/2. Ovu fosforilaciju može stimulirati delecija C-terminalnog SH3 domena ili region bogat prolinom (24). U Rac-u 1 su identifikovana dva vezujuća aminokiselinska domena b (103-107) i d (163-169) kao i rezidue H103 i K166 esencijalne u aktivaciji NADPH oksidaze (25).

U toku aktivacije fagocita sa p67 phox i p47 phox u plazma membranu se translocira i p40 phox uz prethodnu fosforilaciju ostatka treonina (154) i serina (315) ovog proteina. U mirujućim i aktivisanim ćelijama p40 phox asocira sa p67 phox a stabilnost interakcije zavisi od C-terminalnog regiona p40 phox i regiona između SH3 domena p67 phox (12). Kako ima podataka da p40phox inhibiše aktivnost oksidaznog sistema nije isključena mogućnost da ima down-regulacionu ulogu, ili pomaže u održavanju citozolskih faktora u »off« stanju.

Produkti NADPH oksidaze i modulacija ćelijske signalizacije

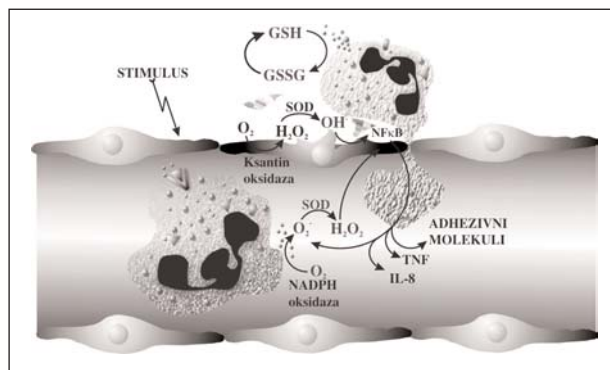
Tokom aktivacije NADPH oksidaze fagocitnih ćelija 90% utrošenog kiseonika se transformiše u superoksid anjon radikal (O_2^-) i produkuje 15 fmol/ćel/min ovog radikala (26). U reakciji dva molekula superoksid anjon radikala jedan se oksidiše a drugi reduku-

je, te nastaju vodonik peroksid i kiseonik. Ova spontana reakcija dizmutacije se brzo odvija u kiseloj sredini dok je u neutralnoj ista katalizovana superoksid dizmutazom. Sinteza vodonik peroksida u fagocitnim ćelijama moguća je i direktnom dvoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika. Interakcijom superoksid anjon radikala i vodonik peroksida nastaje hidroksilni radikal, a superoksida i azot-monoksida peroksinitritni radikal. Zahvaljujući mijelo-peroksidaza- H_2O_2 -halogenom sistemu stvaraju se, takođe visoko reaktivni toksični produkti oksidacijom halogena, a kvantitativno najznačajniji produkt hipohlorna kiselina (HOCl) može generisati u interakciji sa superoksid anjon radikalom hidroksilni radikal, sa vodonik peroksidom singletni kiseonik, a u reakciji sa amonijum jonom ili slobodnim aminokiselinama monohloramin anjon radikal sa izraženim baktericidnim svojstvima (20). Sintetisani reaktivni metaboliti kiseonika deluju baktericidno, fungicidno, ubijaju virusom inficirane ćelije, tumorske ćelije, parazite i inaktivišu toksine, inflamatorne regulatore, denaturisane imunoglobuline i komponente

komplementa. Stoga se produkcija aktivnih formi kiseonika može smatrati univerzalnim mehanizmom ne samo za baktericidno dejstvo nego i za razgradnju neinfektivnih čestica (27). S druge strane, »oksidacioni stres« u slučaju infiltracije neutrofilima može izazvati i toksična oštećenja tkiva domaćina (9).

Međutim, pored fagocitnih ćelija (koje proizvode velike količine superoksida u baktericidne svrhe) i mnogi drugi tipovi ćelija (limfociti, fibroblasti, endotelne ćelije, mezangijske ćelije, spermatozoidi, trombociti, plazma membrana ćelija sisara), mogu ekspresirati NADPH oksidazu na nižem nivou (20) koja sintetiše manje koncentracije superoksida. Postoje evidentni dokazi da u nekim od ovih ćelija reaktivni metaboliti kiseonika produkovani u NADPH oksidaznom sistemu učestvuju u procesima signalizacije. To znači da reaktivni metaboliti kiseonika, s jedne strane, nastaju procesom signalne transdukcije a s druge strane direktno su uključeni u druge transdukcione procese.

Delovanje oksidanata u svojstvu sekundarnih glasnika predstavlja značajan put njihovog fiziološkog dejstva koje se može manifestovati modifikacijom prenosa signala, prevođenjem sekundarnih u tercijarne glasnike ili pokretanjem odnosno finalizovanjem procesa signalne transdukcije. Pre svega, u eukariota reaktivni metaboliti kiseonika direktno aktivišu faktore transkripcije AP-1, AP-2, NF- κ B i p21ras koji učestvuju u kontroli ćelijske proliferacije, diferencijacije i morfogeneze. Vezujući se za promotor gena aktivator protein 1 (AP-1) kontrolišu ekspresiju mnogih gena uključujući i one koji determinišu sintezu citokina, kolagenaze i TGF- β . Ekspresija c-jun i c-fos gena, čiji je produkt AP-1, između ostalog indukuje se i dejstvom vodonik peroksida i superoksid anjon radikala. Vodonik peroksid može pozitivno regulisati AP-1 i postranslaciono fosforilisanjem određenih rezidua AP-1 subjedinica. Oksidacioni stres može posredovati i u reali-



Slika 3. Aktivisana NADPH oksidaza neutrofila

Tabela I Ćelije koje proizvode superoksid anjon radikal

»Profesionalni fagociti« Neutrofili (polimorfonuklearni leukociti, PMN) Monociti/makrofagi Eozinofili	Ubijanje mikroba Ubijanje virusom inficiranih ćelija i tumorskih ćelija Ubijanje parazita
Ćelije sa oksidazom »slične fagocitima« B-limfociti Fibroblasti Endotelne ćelije Mezangijske ćelije	? Signalizacija Signalizacija ?
Ćelije koje proizvode superoksid nepoznatim mehanizmom Spermatozoidi Lajdigove ćelije (testisi) Ūterus Tiroidea Karotidno telo Trombociti Tumorske ćelije Plazma membrane ćelija sisara	? ? ? Sinteza tiroidnih hormona ? ? ? ? Signalizacija

zaciji efekata liganada, koji se ostvaruju na postranclacionom nivou regulacije aktivnosti AP-1 i to aktivacijom signalizacije preko JNK-protein kinaze. Izražen oksidacioni stres stimuliše aktivnost nuklearnog faktora REF-1 i vezivanje FOS i JUN heterodimera za DNK. Čelije kod kojih je ekspresija REF-1 blokirana, pokazuju veliku osetljivost na oksidante, parakvat, hipoksiju, hiperoksiju i inhibitore sinteze glutaciona, što ukazuje da bi REF-1 mogao imati esencijalnu ulogu u zaštiti ćelije od različitih stresogenih faktora uključujući slobodne radikale i promenu parcijalnog pritiska kiseonika (20).

Transkripcioni faktor NF- κ B je regulatorni protein koji kontroliše ekspresiju mnogih inducibilnih i tkivno specifičnih gena, učestvujući na taj način u regulaciji proinflatornih i imunih odgovora ćelije, ćelijske proliferacije i apoptoze. Ovaj transkripcioni faktor aktivira gene koji kodiraju sintezu različitih citokina (IFN β , TNF α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8), hemotaksičnih proteina, receptora za citokine, adhezivnih ćelijskih molekula (ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1 i E-selektina), endotelina-1, hematopoetskih faktora rasta, reaktanata akutne faze kao i inducibilne azot-monoksid sintaze (20). Među brojnim signalnim molekulima (TNF α , IL-1 β , virusi, mitogeni, lipopolisaharidi, Ca²⁺-jonofor) koji aktiviraju NF- κ B spadaju i agensi koji uzrokuju oksidacioni stres. Reaktivni kiseonički metaboliti, koji nastaju u respiratornom lancu mitohondrija u ulozi sekundarnih glasnika posreduju u aktivaciji NF- κ B koju ostvaruju TNF α i IL-1 β . Rezultati ispitivanja različitih ćelija su pokazali da je uloga reaktivnih kiseoničkih intermedijata u aktivaciji NF- κ B pomoću proinflatornih citokina specifična. Na primer, pri stimulaciji limfoidnih ćelija sa IL-1 β izvor reaktivnih kiseoničkih vrsti koje posreduju u aktivaciji NF- κ B je 5-lipoksigenaza, pri stimulaciji epitelnih ćelija IL-1 β indukuje NF- κ B nezavisno od produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsti, dok u monocitima IL-1 β deluje preko aktivacije NADPH oksidaze (28). Aktivacija NF- κ B se ostvaruje uopšte prooksidativnim stanjem ćelije i posebno povećanim sadržajem H₂O₂ najverovatnije aktivacijom MAP-kinaznog puta. Da aktivnost NF- κ B direktno zavisi od redoks stanja ćelija pokazuju rezultati pozitivne regulacije aktivnosti ovog faktora pri niskoj koncentraciji tiolnih jedinjenja (glutaciona) i inhibicije njegove aktivacije pri visokim koncentracijama istih te otuda regulacija intraćelijskog glutaciona direktno reguliše ekspresiju gena koji poseduju NF- κ B-vezujuće mesto u promotoru (20). Glukoza i njeni oksidacioni produkti takođe mogu aktivirati transkripcioni faktor NF- κ B što se smatra ključnim događajem u transformaciji vaskulature u dijabetičnih bolesnika (29). Signalna transdukcija koja reguliše sintezu adhezivnih molekula u endotelnim ćelijama uključuje transkripcioni faktor NF- κ B čija translokacija direktno zavisi od intraćelijske sinteze reaktivnih kiseoničkih metabolita. Različiti prooksidantni signali (oksidisani LDL) izazivaju porast ICAM-1, VCAM-1 i E-selektina a u kombinaciji sa TNF α sinergistički indu-

kuju ekspresiju istih (30). Iako se učešće reaktivnih kiseoničnih vrsti u regulaciji produkcije TNF α razlikuje u zavisnosti od vrste ćelija centralnu ulogu u regulaciji ovog citokina u mononuklearnim ćelijama ima hidroksilni radikal (31).

Superoksid anjon radikal (i drugi reaktivni metaloliti kiseonika) učestvuju u reparaciji aktina citoskeleta oštećenih endotelnih ćelija (32) zbog čega je reparacija oštećenog endotela udružena sa povećanom produkcijom oksidanasa. Najviše radikala produkuju ćelije koje se najbrže kreću pri čemu se efikasna migracija endotelnih ćelija može sprečiti superoksid dizmutazom. Izgleda da se polimerizacija aktina odvija preko signalnog puta koji uključuje Rac 1, a isti je oksidač za NADPH oksidazu, pa je razumljivo da će primena superoksid dizmutaze inhibirati polimerizaciju (33). Odgovor aktina na oksidantse (ili antioksidantse) zavisi od tipa oksidansa (ili antioksidansa) kojem je endotel izložen (34). Povećana produkcija superoksid anjon radikala stimulirana je i dejstvom angiotenzina II preko aktivacije membranske NADPH oksidaze koja se ostvaruje stimulisanjem fosfolipaze A2 (35). Produkovani superoksid anjon radikal indukuje ekspresiju p27Kip1 i stimuliše hipertrofiju (36).

Vodonik peroksid indukuje fosforilaciju tirozinskih ostataka mnogih ćelijskih proteina. Isti se efekti postižu i primenom supstanci koje stimulišu produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsti najverovatnije preko stimulisanja NADPH oksidaze. Različiti nefiziološki stimulanasi (menadion, anti Fas antitela) promenom redoks statusa ćelije (B i T limfociti) učestvuju u modulaciji prenosa signala preko tirozin kinaznog puta (37). Reaktivni kiseonični intermedijati produkovani u sistemu ksantin/ksantin oksidaze, stimulišući fosforilaciju tirozina, izazivaju istovremeno porast i tirozin kinazne i tirozin fosfatase aktivnosti (38).

Oksidacioni stres dovodi i do modulacije ćelijskih funkcija fagocitnih ćelija u smislu da se obavljanje normalnih funkcija smanjuje dok se neke od njihovih pro-inflatornih funkcija intenziviraju. Sve ove funkcije su regulisane procesom signalne transdukcije. U toku oksidacionog stresa dolazi do poremećaja normalnog procesa signalne transdukcije. Sama »oksidaciona eksplozija« se suprimira prethodnim izlaganjem ćelija oksidacionom stresu. Pored brojnih stimulansa utvrđeno je da i depolarizacija plazma membrane može pokrenuti signalnu transdukciju za aktivaciju »oksidacione eksplozije«. Međutim depolarizacija ne-stimulatornim agensima, kao što je visoka koncentracija ekstracelularnog kalijum, inhibiše stimulaciju neutrofila. Vodonik peroksid kao i stimulanasi (forbol-miristat-acetat) izaziva depolarizaciju plazma membrane ali ne i inhibiciju »oksidacione eksplozije«. Primena vodonik-peroksida pre stimulansa dovodi do inhibicije i stimulansom izazvane depolarizacije i oksidacione eksplozije. Značajan modulator signalne transdukcije je i hidroperoksid, produkt lipidne peroksidacije koja je izražena u oksidacionom stresu. Hidro-

peroksid inhibiše signalnu transdukciju uključenu u aktivaciju NADPH oksidaze iako izaziva promene slične superoksid produkujućim stimulansima, dovodi do aktivacije inozitol-fosfatnog metabolizma i do porasta intracelularnog kalcijuma, mada je ovaj zadnji prolaznog karaktera u aktivaciji NADPH oksidaze. Hidroperoksid, takođe, izaziva depolarizaciju plazma membrane i mitohondrijalne membrane i može aktivirati protein kinazu C. Iako svi ovi efekti slične oksidaznoj signalnoj transdukciji vremenski i prostorno mogu interferirati sa normalnom signalnom transdukcijom. Oksidacioni stres izazvan hidroperoksidom dovodi do tranzitornih promena antioksidantnih komponenti, međutim porast intracelularnog kalcijuma i aktivacija protein kinaze C mogu prolongirati ili izazvati ireverzibilne promene koje su praćene poremećajem ćelijskih funkcija uključujući i supresiju oksidacione eksplozije. Niske koncentracije oksidazna (hidroperoksida) su aktivirajući faktor u biosintezi ciklo- i lipo-oksigenaznih produkata. Različiti hidroperoksidi mogu amplifikovati i ciklo- i lipooksigenaznu aktivnost u sintezi prostaglandina i leukotrijena dok oksidacioni stres (hidroperoksidi, vodonik peroksid) može inhibirati lipooksigenazni put i produkciju leukotrijena (39).

Oksidacioni stres i modulacija signalne transdukcije u šećernoj bolesti

Diabetes mellitus (DM) se prema patogenetskim mehanizmima i obliku kliničkog ispoljavanja deli na:

- Idiopatski (primarni ili esencijalni) dijabet koji se dalje deli u dve podgrupe: a) tip 1, i tip 2, sa dva podoblika: bez gojaznosti i sa gojaznošću.
- Sekundarni dijabet, koji se javlja kao posledica drugog oboljenja.

Nezavisno od tipa diabetes mellitusa nastanak ove bolesti, tok kao i razvoj komplikacija, usko je povezan sa disbalansom pro/antioksidacionog statusa ćelije i promenom redoks potencijala. Oksidacioni stres kao zajednički imenitelj predstavlja biohemijski mehanizam kojim poremećen metabolizam glukoze, i disregulacija ćelijske signalizacije dovode do razvoja komplikacija u dijabetu, indukujući pre svega dijabetesnu mikro i makro angiopatiju koje se nalaze u osnovi dijabetesne nefropatije, retinopatije, neuropatije i kardiovaskularne bolesti. Oksidacioni stres je u dijabetu posledica kako povećane produkcije slobodnih radikala, tako i smanjenja kapaciteta antioksidacione zaštite. Nekoliko mehanizama u čijoj osnovi leži hiper-glikemija odgovorno je za nastanak oksidacionog stresa (20, 40-45):

1. Autooksidacija glukoze tj. proces autooksidacione glikacije koji je praćen stvaranjem slobodnih kiseoničnih radikala ($O_2\cdot^-$, H_2O_2 i $OH\cdot$).
2. Smanjena koncentracija redukovane glutationa koja nastaje zbog smanjene aktivnosti glutation

reduktaze usled nedostatka NADPH koji se intenzivno troši u poliol putu glukoze.

3. Niska koncentracija tiolnih jedinjenja u ćeliji u prvom redu glutationa kao najrasprostranjenijeg tiolnog jedinjenja, ostvaruje ključnu ulogu u redoks ćelijskoj signalizaciji i pozitivnoj regulaciji aktivnosti transkripcionog faktora NF- κ B, odgovornog za stimulaciju ekspresije gena čiji produkti održavaju prooksidaciono stanje u ćeliji.
4. Neenzimska glikacija proteina, pre svega ekstracelularne i intracelularne superoksid dizmutaze (SOD), kao i drugih antioksidacionih enzima smanjuje njihovu katalitičku aktivnost.
5. Proces glikacije hemoglobina dovodi do stvaranja HbA1c koji teže otpušta kiseonik, zbog čega u perifernim tkivima nastaje hipoksija, koja pokreće ne samo aktiviranje ksantin oksidaze (XO), već i druge mehanizme koji iniciraju stvaranje slobodnih radikala u nedostatku kiseonika.
6. Oksidaciona modifikacija strukturnih i funkcionalnih metaloproteina (transferina, ceruloplazmina, Cu, ZnSOD-e) dovodi do njihove ubrzane degradacije, a oslobođeni metali uključivanjem u Fentonovu reakciju stimulišu dalju produkciju radikala.

Pored činjenice da je oksidacioni stres praćeni fenomen u razvoju komplikacija u dijabetu, on se smatra i neposrednim faktorom rizika za nastanak kako tipa 1 tako i tipa 2 DM. Nedavno je dokazano da apoptoza beta-ćelija pankreasa pokrenuta citokinima makrofaga (IL-1 β , IFN- γ i TNF-a) nastaje kao posledica »up« ili »down« regulacije različitih gena odgovornih za: smanjenu produkciju ATP-a (inhibicija akonitaze), destrukciju DNK i pad koncentracije NAD⁺ (poli-ADP-ribozo polimeraza), porast koncentracije NO (inducibilna azot monoksid sintaza) i aktivaciju faktora transkripcije c-fos, koji u složenom mehanizmu signalne transdukcije dovode do porasta permeabilnosti membrane mitohondrija, oslobađanja citohroma c i aktivaciju kaspaza (46). Podaci koji dovode u vezu oksidacioni stres i razvoj tip 2 DM-a odnose se na moguće uzroke nastanka insulinske rezistencije u uslovima povećane produkcije slobodnih radikala, što rezultuje smanjenom osetljivošću perifernih tkiva, pre svega masnog i mišićnog tkiva, na delovanje insulina. U *in vitro* eksperimentima pokazano je da indukcijom oksidacionog stresa različitim sistemima koji generišu slobodne radikale dolazi do smanjene aktivacije insulinskih receptora, posebno β -subjedinice koja poseduje tirozin kinaznu aktivnost, tj. do smanjene internalizacije insulina kao i smanjene auto-fosforilacije insulinskih receptora, pri čemu je kapacitet vezivanja insulina za receptore bio očuvan. Izgleda da fosforilacija serinskih rezidua u položaju 994 i 1023/25 β -subjedinice insulinskih receptora od strane aktivirane PKC sprečava njihovu auto-fosforilaciju. Genetska ekspresija transmembranskih proteina (GLUT-1 do GLUT-5) koji omogućavaju olakšanu difuziju glukoze u tkiva može

biti modifikovana oksidacionim stresom što predstavlja jedan od razloga za insulinsku rezistenciju tokom razvoja tip 2 DM-a. Mehanizam ove modifikacije je složen i nepoznat do detalja, ali zavisi od intenziteta i trajanja oksidacionog »insulta«. Smanjena koncentracija iRNK za GLUT-4 (protein prisutan u masnom tkivu i mišićima) rezultat je oksidacione modifikacije nuklearnih proteina koji tako izmenjeni poseduju smanjen afinitet za IRE (insulin responsive element) prisutan u promoteru GLUT-4 gena (47).

U slučajevima prolongirane hiperglikemije koja je prisutna u oba tipa diabetes mellitusa tkiva koja preuzimaju glukozu nezavisno od prisustva insulina, kao što su retina, očno sočivo, nervi i endotel pretrpeju izrazita oštećenja. Mehanizmi kojima se mogu objasniti štetni efekti hiperglikemije podrazumevaju sledeće procese:

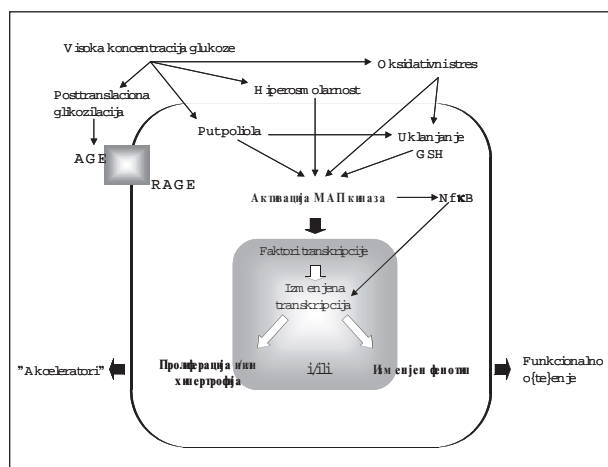
- Proces neenzimske glikacije: formiranje krajnjih produkata glikozilacije (AGEs - advanced glycation end products).
- Put poliola: aktivacija aldozo reduktaze.
- Poremećaj redoks potencijala ćelije.
- Aktivacija PKC.
- Aktivacija MAP kinaza.

Kako je jedan od najzastupljenijih načina prenosa signala kroz ćeliju proces fosforilacije efektornih proteina koji je kontrolisan kroz uzajamno sadejstvo kinaza i fosfataza, efekti oksidacionog stresa na aktivnost ovih enzima predstavljaju kritična mesta modulacije procesa signalne transdukcije oksidacionim stresom u dijabetu. Nedavno je sugerisano da hiperglikemija koja dovodi do oksidacionog stresa uzrokuje pojavu dijabetesnih komplikacija posredstvom dva signalna puta: aktivacijom PKC (48) i aktivacijom MAP kinaza (49). S obzirom na činjenicu da specifične izoforme PKC mogu aktivirati MAP kinaze koje fosfori-

lacijom transkripcionih faktora dovode do alteracije ekspresije gena uključenih u promenu ćelijskog fenotipa, proliferaciju i sintezu ekstracelularnog matriksa, može se smatrati da aktivacija MAP kinaza predstavlja kritični događaj u razvoju dijabetesnih komplikacija (slika 4).

Autooksidacija glukoze, proces neenzimske glikacije tj. formiranje krajnjih produkata glikosidacije (AGEs)

Hiperglikemija je osnovni uzrok porasta koncentracije slobodnih radikala u plazmi dijabetesnih bolesnika. Termin »autooksidaciona glikacija« podrazumeva sposobnost glukoze da u neenzimskom procesu reaguje sa proteinima redukujući pritom molekularni kiseonik do visoko reaktivnih produkata (superoksidni radikal, vodonik peroksid i hidroksilni radikal). Ovaj proces glikacije prolazi kroz dve faze: ranu-reverzibilnu i kasniju-ireverzibilnu. U ranoj fazi reaguje terminalna amino grupa proteina (ili ε-amino grupa lizina) sa aldehidnom grupom glukoze i formiranjem aminometilola i primarne Šifove baze nastaje Amadori produkt. Ova faza je reverzibilna. U kasnijoj ireverzibilnoj fazi dolazi do rearanžiranja unutar molekula (takozvana Amadori reakcija) i stvaranja prvog stabilnog produkta fruktozilizina (FL). Amadori produkt hemoglobina (HbA1c) upravo korelira sa koncentracijom FL. U proteinima koji poseduju spori »turnover« serijom reakcija (reakcije dehidratacije i kondenzacije), uz obavezno prisustvo slobodnih radikala koji nastaju u ovom procesu (50) iz ketoamin derivata, ili njegovih disocijacionih produkata (N-karboksimetilizin, pentozidin i pirlin) u drugoj ireverzibilnoj fazi nastaju uznapredovali krajnji produkti glikosidacije (AGEs). Produkti neenzimatske glikosidacije serum proteina i lipida (posebno LDL-a) aktiviraju puteve prenosa signala, vezujući se za specijalne scavenger receptore (SR) (51) i receptore za AGE produkte tzv. RAGE (52) prisutne na površini endotelnih ćelija i makrofaga. Najveći afinitet za vezivanje za RAGE poseduje N-karboksimetilizin (CML). Receptori prihvataju AGEs koji se dalje metabolisu u ćeliji, ali u uslovima intenziviranog oksidacionog stresa dugotrajna stimulacija receptora odgovorna je za aktivaciju Ras-MAP kinaznog puta (53). Aktivacija RAGE indukuje stvaranje slobodnih radikala, ali način njihovog stvaranja nije jasan tj. proksimalni efektori u RAGE putu ćelijske signalizacije nisu precizno utvrđeni. Najverovatnije stvoreni slobodni radikali interponirani u kaskadni sistem aktiviran stvaranjem kompleksa RAGE-ligand dalje aktiviraju Ras-MAP signalni put, što rezultuje perturbacijom vaskularne homeostaze i razvojem vaskularnih komplikacija u dijabetu. Za sada nisu poznati tačni efektori kao ni efekti aktivirane MAP kinaze preko RAGE kompleksa. Sugerisana je promena fenotipa ćelije i proliferacija (49). Dokazano je da vezivanje liganada za RAGE aktivira translokaciju NF-κB u jedro i ekspresiju NF-κB-zavisnih gena (53). Aktivirani faktor transkripci-



Slika 4. Aktivacija MAP kinaza i razvoj komplikacija u dijabetu

je NF- κ B stimuliše adheziju leukocita i monocita za endotel, genetskom ekspresijom tj. indukcijom transkripcije adhezivnih molekula (ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1 i E-selektina) posebno VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecul 1) ali i drugih hemotaksičnih faktora, kao što je MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), faktora proliferacije CSF (Colony Stimulating Factors) i proinflamatornih citokina - TGF- β i IL-8. Navedeni faktori dovode do proliferacije glatkih mišićnih ćelija, povećavaju hemotaksu monocita i T-limfocita, stimulišu adheziju i nakupljanje leukocita i monocita na površinu endotela, pri čemu monociti prodiru u subendotelni prostor, vršeći dalju oksidaciju i fagocitozu AGE-modifikovanih proteina i lipida (posebno Ox-LDL i Ox-albumina). Stimulisana sekrecija faktora rasta pospešuje diferencijaciju monocita u makrofage a daljim metabolisanjem Ox-LDL partikula monociti tj. makrofagi se postepeno pretvaraju u penaste ćelije, ubrzavajući na taj način razvoj ateroskleroze.

Nedavno je otkrivena nova klasa F₂-izoprostana (54) koji su analozi esterifikovanog 8-epi-PGF_{2 α} , produkta čija je koncentracija tri puta veća u serumu pacijenata tipa 2 DM u odnosu na kontrolne vrednosti. Ovi produkti koji nastaju u metaboličkoj kaskadi arahidonske kiseline, takođe posreduju u genetskoj ekspresiji VCAM-1, i dovode do aktivacije trombocita nezavisno od efekata TXB₂ (55). Proces glikacije serumskih proteina i lipoproteina praćen je fragmentacijom ceruloplazmina i otpuštanjem slobodnog bakra čime se povećava ekstracelularni pul metala promenljive valence, odgovornih za inicijaciju lipidne peroksidacije (56) i dalje stvaranje AGEs koji u interakciji sa specifičnim receptorima (RAGE) u procesu prenosa signala na NF- κ B indukuju stvaranje slobodnih radikala (57). Na taj način stvoreni »*circulus vitiosus*« u procesu neenzimske glikacije, dalje podržava oksidacioni stres promotivni faktor razvoja ateroskleroze u dejabetu.

Put sorbitola (poliola): aktivacija aldozo reduktaze

Put sorbitola (poliola) se intenzivno odvija u uslovima hiperglikemije dovodeći do promene u celularnom redoks potencijalu, čime utiče na nastanak dijabetesnih komplikacija (58). Ovaj put metabolisanja glukoze podrazumeva učešće enzima aldozo reduktaze koji korišćenjem kofaktora NADPH katalizuje redukciju glukoze u sorbitol koji dalje pod dejstvom sorbitol dehidrogenaze može preći u fruktozu. Aldoza reduktaza je široko zastupljena u tkivima sisara kao što su periferni nervi, retina, glomeruli bubrega i očno sočivo. Stimulacija ovog puta u uslovima hiperglikemije jedan je od patogenetskih mehanizama odgovornih za razvoj dijabetesne neuropatije, nefropatije i katarakte. Aktivacija ovog puta dovodi do strukturnih promena u tkivima preko nekoliko mehanizama od kojih su najznačajniji: povećan osmotski pritisak u ćelijama, opada-

nje mioinozitola i poremećaj redoks potencijala ćelije zbog opadanja koncentracije NADPH, zbog čega opada aktivnost NADPH zavisnih enzima uključujući glutathion reduktazu i NO sintazu. Smanjena produkcija NO dovodi do vazokonstrikcije, a nemogućnost regeneracije glutathiona u tzv. glutathion redoks ciklusu do opadanja koncentracije redukovanog glutathiona (GSH), s obzirom da se on regeneriše delovanjem NADPH zavisne glutathion reduktaze (59), zbog čega nastaje permanentni oksidacioni stres.

Iako je aldoza reduktaza ključni enzim u ovom metaboličkom putu, još uvek nisu indentifikovani precizni signalni molekuli uključeni u indukciju njene genetske ekspresije. Najverovatnije da je potencijalna karika u indukciji gena za ovaj enzim intracelularni »osmotski stres«. Osmoreceptori (osmosenzori), čija priroda nije utvrđena, kao odgovor na prisutni osmotski stres dalje aktiviraju različite MAP kinaze u zavisnosti od vrste tkiva. Nedavno je utvrđeno da je i oksidacioni stres, koji perzistira u sorbitol putu, odgovoran za aktivaciju ERK (MEK1) kinaze i p38 MAP kinaze koje indukuju genetsku ekspresiju aldozo reduktaze (60).

Promena redoks statusa ćelije koji je determinisan sadržajem tiol jedinjenja u ćeliji, pre svega sadržajem glutathiona, predstavlja značajan faktor u regulaciji transdukcije signala do odgovarajućih gena. Ovaj mehanizam signalne transdukcije ostvaruje se preko tzv. redoks senzora koji reaguju na promenu koncentracije intracelularnih tiola odgovornih za održavanje redoks statusa ćelije. Mnogi regulatorni faktori transkripcije suprimiraju transkripciju kada se u redukovanom stanju vežu za regulatorne sekvence nekih gena. U nedostatku GSH u ćeliji, u uslovima intenziviranog puta poliola glukoze oksidisana forma regulatornih nuklearnih faktora transkripcije gubi afinitet za regulatornu sekvencu gena što rezultuje pojačanom transkripcijom i sintezom odgovarajućih funkcionalnih i strukturnih proteina odgovornih za nastanak komplikacija u dijabetu i disregulacije homeostaze metabolizma glukoze. Poremećaj redoks potencijala inicira aktivaciju stres-signalne kaskade koja rezultuje direktnom aktivacijom drugih kinaza i faktora transkripcije i/ili indirektnom modulacijom (oksidacijom) cisteinom bogatih redoks-senzitivnih proteina kao što su tioredoksin i glutathion S-transferaza (61).

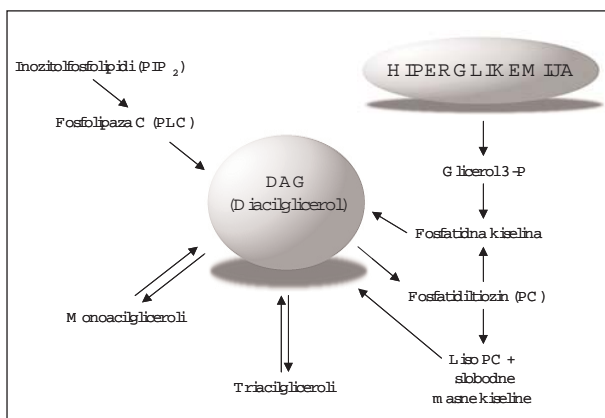
Oksidacioni stres i modulacija aktivnosti PKC i MAP kinaza u dijabetu

Prva zapažanja koja se odnose na modifikaciju aktivnosti PKC redoks senzitivnim modulatorima u dijabetu datiraju od pre desetak godina (62, 63). Protein kinaza C (PKC) predstavlja familiju multifunkcionalnih izoenzima (ukupno 12), koji se sintetišu na najmanje tri zasebna gena, a veći broj izoformi je rezultat alternativnog »splicinga« primarnih iRNK transkripta (64). Familija multifunkcionalnih izoenzima PKC ostvaruje fundamentalnu ulogu u signalnoj trans-

dukciji u različitim tkivima kroz fosforilaciju (up ili down regulaciju) enzima, receptora, transkripcionih faktora i drugih kinaza.

Aktivacija i translokacija PKC iz citozola na plazma membranu ćelija najčešće je posredovana porastom sekundarnog glasnika diacilglicerola (DAG-a) ili egzogenim delovanjem tumorskog promotora kao što su forbol estri (65). Diacilglicerol je centralni intermedijat koji nastaje u sintezi i katabolizmu različitih glicerolipida (slika 5). Visoka koncentracija glukoze ubrzava katabolizam fosfatidilholina, i stimuliše *de novo* sintezu DAG-a iz fosfatidne kiseline. S druge strane, oksidacioni stres izazvan hiperglikemijom aktiviranjem fosfolipaze C (66) intenzivira razgradnju inozitol fosfolipida što takođe rezultuje porastom koncentracije DAG-a. Primena antioksidanata (vitamina E i probukola) prevenira porast DAG-a i sprečava DAG-PKC aktivaciju (67). Protektivno delovanje vitamina E može biti i rezultat aktivacije DAG kinaze i olakšane konverzije DAG-a u fosfatidnu kiselinu (68). S obzirom da i glukoza i oksidacioni stres dovode do porasta DAG-a i aktivacije PKC najčešće se govori o aktivisanom DAG-PKC putu signalne transdukcije u tkivima dijabetskih bolesnika uključujući retinu, aortu, srce i glomerule bubrega (69) koji predstavlja molekularnu osnovu »toksičnosti glukoze« ne samo u perifernim tkivima već i u pankreasu. Nije isključena ni direktna modulacija SH grupa u regulatornom tj. »aktivacionom segmentu« PKC slobodnim radikalima. Poznato je da neestrifikovane masne kiseline, posebno nezasićene masne kiseline (arahidonska, oleinska, linolna i linolenska) kao i njihovi KoA estri, sinergistički sa DAG-om aktiviraju PKC (70). Kako je u dijabetu povećana koncentracija slobodnih masnih kiselina, to se aktivacija PKC može odvijati nezavisno od sinteze DAG-a.

Postoje pretpostavke da način sinteze DAG-a tj. njegovo različito poreklo (slika 5) determiniše »izbirljivu« aktivaciju jednog ili više izoenzima PKC u različitim tkivima. Tako npr. aktivacija PKC- β_{II} odvija se u srcu i aorti, PKC- α , - β_{II} i ϵ u retini, a PKC- α , - β_1 i δ u



Slika 5. Sinteza DAG-a

glomerulskim ćelijama (71). Interesantno je istaći da se samo PKC- β_1 u glomerularnim ćelijama bubrega aktivira hiperglikemijom (72). U skeletnim mišićima dijabetičkih životinja nađena je pojačana ekspresija tri izoforme PKC (alfa, epsilon i zeta). Hronična aktivacija ovih formi PKC visoko korelira sa sadržajem DAG-a. Povećana ekspresija PKC-e za koju se vezuje nastanak nekih oblika tipa 2 DM-a, odgovorna je za down-regulaciju broja insulinskih receptora i smanjenu aktivnost protein kinaze B (PKB) tj. Akt kinaze što rezultira insulinskom rezistencijom, hiperinsulinemijom i hiperglikemijom (73). Aktivacija PKC- β_1 u uslovima hiperglikemije, u kulturi mezangijskih ćelija glomerula bubrega dovodi do ekspresije i translokacije u jedro specifične subjediniice faktora transkripcije NF- κ B p65 ali ne i NF- κ B p50 (74).

Modulacija PKC oksidantima predstavlja kritični događaj za razvoj vaskularnih komplikacija u dijabetu. Intenziviran DAG-PKC put signalizacije u endotelnim ćelijama odgovoran je za poremećaj u regulaciji permeabilneta, kontrakcije, depozita ekstracelularnog matriksa, ćelijskog rasta, angiogeneze, aktivacije citokina i sinteze athezivnih molekula. U ovim poremećajima koji predstavljaju osnovne mehanizme u razvoju vaskularnih komplikacija kao što je aterogeneza i hipertenzija neka od target mesta delovanja PKC su sledeća (75-78):

- povećana ekspresija endotelina-1,
- povećana ekspresija iNOS (inducibilne azot oksid sintaze),
- inicijacija ekspresije faktora transkripcije Nf- κ B i AP-1,
- inicijacija kaskade arahidonske kiseline stimulacijom fosfolipaze A2,
- stimulacija NADH/NADPH oksidazne aktivnosti makrofaga i endotelnih ćelija,
- povećana sinteza vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF).

Vaskularni endotel kao izuzetno važan endokrini i metabolički organ ostvaruje ključnu ulogu u razmeni materija, održavanju integriteta i tonusa arterijskog zida, regulaciji hemostaze (koagulacija i fibrinoliza), permeabilnosti i lokalnoj aktivaciji trombocita. Njegova alteracija pod dejstvom različitih mehanizama smatra se inicijalnim događajem u procesu aterogeneze tj. u nastanku mikro- i makroangiopatija u diabetes melitusu. Endotelne ćelije sintetisu i sekretuju veliki broj aktivnih molekula: NO, angiotenzin II, endotelin-1 (ET-1), TGF β , vaskularni endotelijalni factor rasta (VEGF), aktivatore plazminogena, prostaglandine, prostacikline i von Willibrandov faktor (vWf) protein. Sve je više podataka koji hiperglikemiju i aktivaciju PKC dovode u vezu sa premorfološkim a zatim i morfološkim promenama u nastanku endotelijalne dis-

funkcije. Tako npr. poremećaj u održavanju normalnog tonusa arterijskog zida, tj. poremećaj u endotelnoj zavisnoj vazodilataciji posredovanoj NO-om nastaje zbog preterane aktivacije PKC u retini, a na račun PKC-posredovanoj inhibiciji konstitutivne azot monoksid sintaze i indukciji ekspresije ET-1. Primena inhibitora PKC popravljiva mikrovaskularnu hemodinamiku retine. U regulaciji renalne hemodinamike PKC može da posreduje u indukciji inducibilne azot-monoksid sintaze (iNOS) što rezultuje povećanjem NO, ali može dovesti i do smanjene produkcije NO što zavisi od tipa ćelija, tkivne lokalizacije i dužine trajanja dijabetesa. Najverovatnije ovakav dvojni efekat je posledica činjenice da posebne izoforme PKC mogu pozitivno ili negativno da regulišu genetsku ekspresiju iNOS (79).

Disregulacija aktivnosti PKC u signalnoj transdukciji u glatko mišićnim ćelijama koje održavaju vaskularni tonus i učestvuju u stvaranju i deponovanju ekstracelularnog matriksa predstavlja poseban entitet u razvoju dijabetesnih komplikacija. Razlikuju se dve vrste ovih ćelija: kontraktilne (nalaze se pretežno u mediji) i sekretorne koje proizvode različite komponente arterijskog matriksa. Permanentna hiperglikemija preko aktivirane PKC povećava tonus arterijskog zida dovodeći do vazokonstrukcije. Pored povećanja broja receptora za angiotenzin II, dolazi do fosforilacije miofibrilarnih proteina i ekspresije aktin-miozin regulatornog proteina (caldesman) (80). Nasuprot ovim efektima u srcu dijabetesnih miševa prekomerna ekspresija PKC-βII dovodi do fosforilacije troponina-I i smanjene osetljivosti miofilamenata na Ca^{2+} što za posledicu ima smanjenu kontraktilnost srčanog mišića. Primena inhibitora PKC poboljšava disfunkciju kardiomiocita (81). Apoptoza glatko-mišićnih ćelija indukovana slobodnim radikalima takođe je PKC-zavisan proces (82).

Povećana propustljivost krvnih sudova tj. gubitak endotelijalne barijere predstavlja rani patofiziološki mehanizam u nastanku dijabetesne angiopatije. Različiti stimulanzi, kao što su povećana koncentracija glukoze, aktivacija sekundarnih glasnika u endotelijalnim ćelijama, pre svega PKC, dovode do fosforilacije i relaksacije citoskeletnih i adhezivnih proteina, kao što su caldesmon i vimentin kao i »up-regulacije« NOS, što za posledicu ima povećanu propustljivost i disfunkciju endotelne barijere. Primenom specifičnih antisens oligonukleotida za PKC ovi efekti hiperglikemije se mogu sprečiti. Posebno mesto u regulaciji vaskularnog permeabiliteta i angiogeneze pripada vaskularnom endotelijalnom faktoru rasta (VEGF) tj. vaskulotropinu (VPF), homodimernom glikoproteinu, koga sekretno glatko mišićne ćelije. Povećana genetska ekspresija VPF koja nastaje u glukozo-PKC aktiviranom putu ćelijske signalizacije, odgovorna je za porast koncentracije VPF-a u očnoj vodici pacijenata sa dijabetesnom retinopatijom (83). Povećana sinteza VPF-a odgovorna je i za proces neovaskularizacije u oku kao i za stvaranje novih kolaterala u procesu

tumorogeneze. Vezivanje VPF-a za specijalne receptore (KDR/flk), prisutne samo na endotelijalnim ćelijama, kao i za flt-1 receptore, prisutne i na drugim ćelijama, stimuliše razgradnju fosfoinozitola i sintezu DAG-a koji aktivira specifične izoforme PKC (α , β_1 i δ). Indukovana povećana permeabilnost i ćelijski rast mogu se sprečiti primenom selektivnih inhibitora PKC-β. Zapažen je sinergizam između angiogenetičkih efekata VPF-a i bazičnog faktora rasta fibroblasta (bFGF), gde bFGF dovodi do povećane ekspresije KDR/flk preko PKC-MAP kinaza-zavisne signalne transdukcije (84).

U procesu razvoja dijabetesne nefropatije čitav niz argumenata govori u prilog gledištu da su proliferacija mezangijskih ćelija, kao i povećana sinteza a smanjena razgradnja ekstra-celularnog matriksa uzrokovani aktivacijom PKC-MAPK u uslovima hiperglikemije. Kada se mezangijske ćelije bubrega izlože visokoj koncentraciji glukoze (20 mmol/L) dolazi do aktivacije PKC-β1 koja indukuje sintezu kolagena tip IV, laminina i fibronektina (glikoproteina velike molekulske mase koji posreduje u ćelijskoj migraciji, adheziji i organizaciji citoskeleta). Protein kinazom C indukovana fosforilacija serinske residue u položaju 23 $Na^+-K^+-ATPaze$, dovodi do smanjene aktivnosti enzima. Na taj način afektirani su vaskularni permeabilitet (nastaje proteinurija), depozicija i interakcija ekstracelularnog matriksa kao i ekskrecija Na^+ i H^+ , što čini molekularnu osnovu dijabetesne nefropatije u kojoj glukoza indukuje proliferaciju mezangijskih ćelija i sintezu ekstracelularnog matriksa posredstvom PKC-NF-κB puta transdukcije signala (85). Faktori rasta posebno TGFβ (transforming growth factor-β) i CTGF (connective tissue growth factor) takođe mogu povećati sintezu kolagena, fibronektina i laminina u mezangijskim ćelijama bubrega. Genetska ekspresija i sinteza ovih faktora uslovljena je hiperglikemijom koja aktivira PKC a zatim ona dovodi do aktivacije c-jun i c-fos subedinica faktora transkripcije AP-1 proteina, te ovaj faktor kao dimerni kompleks reaguje sa DNK regulatornim elementom poznatim kao aktivator protein-1 (AP-1) vezujuće mesto. Ova mesta (elementi) su prisutni u regulatornom regionu AP-1 inducibilnih gena, kao što su geni na kojima se sintetišu TGFβ i CTGF. Primenom specifičnog inhibitora izoforme PKC-β LY333531 prevenira se pojačana ekspresija TGFβ, sinteza kolagena i fibronektina u renalnim glomerulima dijabetesnih pacova (86).

S obzirom, da u složenom putu prenosa signala kroz ćeliju dolazi do interakcije mnogih receptornih proteina (enzima i adaptera) koji specifičnom komunikacijom i međusobnim delovanjem (fosforilacija, defosforilacija, asocijacija, disocijacija, proteoliza) dovode do amplifikacije impulsa, najčešće se govori o udruženim tj. kaskadnim putevima signalne transdukcije. Jedan od takvih udruženih puteva, koji predstavlja osnovni molekularni supstrat za nastanak komplikacija u dijabetes mellitusu je PKC-MAP kinazni put

prenosa signala na faktore transkripcije koji zatim modifikuju ekspresiju određenih gena čiji produkti iniciraju, stimulišu i održavaju nastanak i razvoj komplikacija u ovoj bolesti.

Mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) predstavljaju grupu serin/treonin specifičnih kinaza koje se aktiviraju delovanjem ekstracelularnih stimula koji pokreću fosforilaciju i teoninskih i tirozinskih rezidua u enzimu. Unutar ove grupe enzima izdvajaju se: 1) ERK kinaze (ekstracelularnim signalima regulisane kinaze); 2) JNK kinaze (c-Jun N-terminalne kinaze) i p38 kinaze. Svaka od nabrojanih grupa MAPK poseduje svoje izoenzime koji predstavljaju produkte različitih gena. Tako ERK i JNK poseduju po tri (1, 2 i 3) a p38 četiri različita izoenzima (a, b, g, d). Mnoge izoenzimske forme ovih kinaza daljom posttranslacionom modifikacijom enzima dobijaju svoje specifične izoforme (četiri za JNK1 i JNK2, dve za JNK3) koje se međusobno razlikuju u odnosu na način aktiviranja kao i u odnosu na supstrat na koji deluju. Tako npr. p38 MAPK u dijabetu se aktivira posredstvom osmosenzora, čija priroda nije određena, ali je poznato da u uslovima stimulacije polyol puta glukoze, porast koncentracije sorbitola dovodi do aktivacije ove MAP kinaze. JNK kinaze obuhvataju i nekoliko formi stresaktivirajućih protein kinaza (SAPK), dok se ERK kinaze smatraju odgovornim za signalizaciju koju ostvaruju faktori rasta. Oksidacioni stres koji u dijabetu nastaje aktiviranjem puta poliola a koji dovodi do opadanja sadržaja redukovano glutaciona aktivira u humanim

fibroblastima ERK kinaze, dok JNK i p38 u istim uslovima nisu afektirane. S druge strane vodonik peroksid aktivira sve tri MAP kinaze (ERK, JNK, p38) u neonatalnim miocitima srca, kao i p38 u endotelnim ćelijama, dok je JNK u fibroblastima miša potpuno neosetljiva na delovanje vodonik peroksida. Aktivacija ERK kinaza čini zadnju kariku MAP kinaznog kaskadnog sistema, odgovornog za fosforilaciju različitih citozolarnih i nuklearnih proteina, koji najčešće predstavljaju faktore transkripcije ili proteine koji su sa njima asocirani. MAP-kinazna kaskada, kao i PKC, podleže down regulaciji posredovanoj N-acetil-L-cisteinom i redukovanim glutationom, dok smanjenje koncentracije glutaciona i prisutan oksidacioni stres iniciraju njihovu aktivaciju (20, 49, 87-89).

Razmatrajući napred izneto, može se zaključiti da su brojni podaci potvrdili da oksidacioni stres koji nastaje u oba tipa dijabeta dovodi do prolongirane aktivacije različitih puteva u prenosu signala (posebno PKC-MAP kaskade), čime se stvaraju uslovi za promenu fenotipa ćelije, apoptozu ili preživljavanje uz nastanak disbalansa koji dovodi do razvoja komplikacija na pojedinim organima i sistemima. S toga ne iznenađuju nastojanja da se definišu nove terapijske mogućnosti u lečenju dijabetesnih komplikacija. Primena antioksidanata, inhibitora aldozoreduktaze, NOS, poli-ADP-ribozo polimeraze, ACE inhibitora, poli-amina a posebno specifičnih inhibitora izoenzima PKC i MAP kinaza predstavlja novu strategiju lečenja dijabeta u budućnosti (86, 90-94).

SIGNAL TRANSDUCTION-FREE RADICAL MODULATION

Dušica Pavlović, Vidosava Đorđević, Gordana Kocić

Institute for Biochemistry, Faculty of Medicine, Niš, Yugoslavia

Summary: Signal transduction is the process of signal transmission from cell surface to cell interior. This ubiquitous mechanism enables functioning of general but also specific cell-tissue processes, involved in maintaining of cell homeostasis. Normal transduction processes disturbance represents the most frequent molecular basis in pathogenesis and complications of many diseases. Understanding of all sequences involved in signalling pathway cascades offers a possibility of different modulators application in therapeutic purposes. The activation of phagocyte NADPH oxidase is one of the best studied pathways of signal transduction. Meanwhile, reactive oxygen species generated in the process could modulate numerous cell transduction pathways. Diabetes mellitus may be associated with increase in oxidative stress, which may contribute to a long-term tissue damage. In addition to damage, oxidative stress can initiate cell signalling cascades that modulate cell function and finally could lead to the cell death. Hyperglycemia-induced activation of PKC-MAP kinase pathway has been now recognised as the key biochemical event in the pathogenesis of diabetic complications and insulin resistance.

Key words: signal transduction, NADPH oxidase, diabetes mellitus.

Literatura

1. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 827-872.
2. Luscinikas FW, Gimbrone MAJ. Endothelial-dependent mechanism in chronic inflammatory leukocyte recruitment. *Annu Rev Med* 1996; 47: 413-421.
3. Springer TA. Traffic signals for leucocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314.
4. DeLeo FR, Renee J, McCormick S, Nakamura M, Apicella M, Weiss JP, Nauseef WM. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest* 1998; 101: 455-463.
5. Vazquez N, Walsh TJ, Friedman D, Chanock SJ, Lyman CA. Interleukin-15 augments superoxide production and microbicidal activity of human monocytes against *Candida albicans*. *Infect Immun* 1998; 66: 145-150.
6. Jesaitis AJ. Organization of the leukocytes plasma membrane components of superoxide production. In: Jesaitis AJ, Dratz EA eds. *The molecular basis of oxidative damage by leukocytes*, Florida: CRC Press Inc, Boca Raton, 1992; 91-99.
7. Cross AR. The flavoprotein component of the superoxide generating NADPH oxidase. In: Jesaitis AJ, Dratz EA eds. *The Molecular basis of oxidative damage by leukocytes*, Florida, CRC Press Inc, Boca Raton, 1992, 37-44.
8. Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *NEJM* 1978; 298: 659-668.
9. Fantone JC, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *APJ* 1982; 107: 394-416.
10. Yu L, De Leo FR, Biberstine-Kinkade KJ, Renee J, Nauseef WM, Dinauer MC. Biosynthesis of flavocytochrome b558. gp 91(phox) is synthesized as a 65-kDa precursor (p65) in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1999; 274: 4364-4369.
11. Parkos CA, Quinn MT, Sheets S, Jesaitis AJ. The structure of the human neutrophil plasma membrane B-type cytochrome involved in superoxide production. In: Jesaitis AJ, Dratz EA eds. *The molecular basis of oxidative damage by leukocytes*, Florida: CRC Press Inc, Boca Raton, 1992, 45-55.
12. Nakamura R, Sumimoto H, Mizuki K, Hata K, Ago T, Kitajima S, Takeshige K, Sakaki Y, Ito T. The PC motif: a novel and evolutionarily conserved sequence involved in interaction between p40 phox, SH3 domain-containing cytosolic factors of the phagocyte NADPH oxidase. *Eur J Biochem* 1998; 251: 583-589.
13. DeLeo FR, Quinn MT. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leuk Biol* 1996; 60: 677-691.
14. Hall A. The cellular function of small GTP-binding proteins. *Science* 1990; 249: 635-640.
15. Kwong CH, Adams AG, Leto TL. Characterization of the effector-specifying domain of Rac involved in NADPH oxidase activation. *J Biol Chem* 1995; 270: 19868-19872.
16. Diekmann D, Abo A, Johnson C, Segal A, Hall A. Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* 1994; 265: 531-533.
17. Kreck ML, Uhlinger DJ, Tyagi SR, Inge KL, Lambeth JD, Dorseuli O, Reibel L, Bokoch GM, Camonis J, Gacon G. The Rac target NADPH oxidase p67 phox interacts preferentially with Rac 2 rather than Rac1. *J Biol Chem* 1996; 271: 83-88.
18. Feig LA. Guanine-nucleotide exchange factors: a family of positive regulators of Ras, related GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 204-211.
19. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 1990; 348: 125-132.
20. Đorđević BV, Pavlović DD, Kocić MG. *Biohemija slobodnih radikala*, Med fak, Niš, 2000.
21. McPhail LC, Ellenburg MD, Leone PA, Agwu DE, McCall CE, Qualliotine-Mann D, Strum SL. Molecular mechanism of activation of leukocyte superoxide production. In: Jesaitis AJ, Dratz EA eds. *The molecular basis of oxidative damage by leukocytes*, Florida: CRC Press Inc, Boca Raton, 1992, 11-24.
22. Dana R, Leto TL, Malech HL, Levy R. Essential requirement of cytosolic phospholipase A2 for activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1998; 273: 441-445.
23. Hata K, Takeshige K, Sumimoto H. Roles for proline rich regions of p47 phox and p67phox in the phagocyte NADPH oxidase activation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 226-231.
24. Ahmed S, Prigmore E, Govind S, Veryard C, Kozma R, Wientjes FB, Segal AW, Lim L. Cryptic Rac-binding and p21 (Cdc42Hs/Rac)-activated kinase phosphorylation sites of NADPH oxidase component p67(phox). *J Biol Chem* 1998; 273: 15693-15701.
25. Toporik A, Gorzalczyk Y, Hirshberg M, Pick E, Lotan O. Mutational analysis of novel effector domains in Rac1 involved in the activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced) oxidase. *Biochemistry* 1998; 37: 7147-7156.
26. Jesaitis AJ, Quinn MT, Makherjee G, Ward PA, Dratz EA. The molecular basis of oxidative damage by leukocytes. In: Jesaitis AJ, Dratz EA eds. *The molecular basis of oxidative damage by leukocytes*, Florida: CRC Press, Inc. Boca Raton, 1992, 1-9.

27. van der Goes A, Brouwer J, Hoekstra K, Roos D, van den Berg TK, Dijkstra CD. Reactive oxygen species are required for the phagocytosis of myelin by macrophages. *J Neuroimmunol* 1998; 92: 67-75.
28. Bonizzi G, Piette J, Schoonbroodt S, Greimers R, Havard L, Mersille MP, Bours V. Reactive oxygen intermediate-dependent NF-kappaB activation by interleukin-1 beta requires 5-lipoxygenase or NADPH oxidase activity. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1950-1960.
29. Rosen P, Du X, Tschöpe D. Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by alpha-tocopherol? *Mol Cell Biochem* 1998; 188: 103-111.
30. Cominacini L, Garbin U, Fratta-Pasimi A, Paulon T, Davoli A, Campagnola M, Marchi E, Pastorino-Gaviraghi G, Lo Cascio V. Lacidipine inhibits the activation of transcription factor NF-kappaB and the expression of adhesion molecules induced by pro-oxidant signals on endothelial cells. *J Hypertens* 1997; 15 (12 Pt2): 1633-1640.
31. Vulcano M, Rosa MF, Breyer I, Isturiz MA. Hydroxyl radical scavengers inhibit TNF-alpha production in mononuclear cells but not in polymorphonuclear leukocytes. *Int J Immunopharmacol* 1998; 20: 709-722.
32. Crawford LE, Milliken EE, Irani K, Zweier JL, Becker LC, Johnson TM, Eissa NT, Crystal RG, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ. Superoxide-mediated actin response in post-hypoxic endothelial cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 26863-26867.
33. Joneson T, Bar-Sagi D. A Rac1 effector site controlling mitogenesis through superoxide production. *J Biol Chem* 1998; 273: 17991-17994.
34. Goldschmidt-Clermont PJ, Moldovan L. Stress, superoxide and signal transduction. *Gene Expression* 1999; 7: 255-260.
35. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman AB, Grundling KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. *J Clin Invest* 1996; 97: 1916-1923.
36. Hannken T, Schroeder R, Stahl RA, Wolf G. Angiotensin II-mediated expression of p27Kip1 and induction of cellular hypertrophy in renal tubular cells depend on the generation of oxygen radicals. *Kidney Int* 1998; 54: 1923-1933.
37. Suzuki Y, Ono Y. Involvement of reactive oxygen species produced via NADPH oxidase in tyrosine phosphorylation in human B- and T-lineage lymphoid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255: 262-267.
38. Lowe GM, Hulley CE, Rhodes ES, Young AJ, Bilton RF. Free radical stimulation of tyrosine kinase and phosphatase activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245: 17-22.
39. Forman HJ, Robison TW, Skelton DC, Duncan DP. Perturbation of arachidonic metabolism and membrane function by oxidants. In: Jesaitis AJ, Dratz EA eds. *The molecular basis of oxidative damage by leukocytes*, Florida: CRC Press Inc, Boca Raton, 1992; 101-111.
40. Nerup J. On the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 1994; 37 (Suppl. 2): 282-289.
41. Bell JG. Molecular defects in diabetes mellitus. *Diabetes* 1991; 40: 413-422.
42. Pavlović D. Proučavanje povezanosti peroksidacije lipida i katabolizma poliamina u različitim metaboličkim uslovima. *Doktorska disertacija*, Niš, 1991.
43. Pavlović D, R. Kocić, G. Kocić, T. Jevtović, S. Radenković, D. Mikić M. Stojanović, PB Đorđević. Effect of a four week metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidative defense enzymes in newly diagnosed obese NIDDM patients. *Diabetes, Obesity & Metabol* 2000; 2: 251-256.
44. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-412.
45. Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L, Taboga C. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia* 2001; 44: 834-838.
46. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death the signal-transduction of immune mediated beta-cell apoptosis *Diabetologia* 2001; 44: 2115-2133.
47. Pessler D, Rudich A, Bashan N. Oxidative stress impairs nuclear proteins binding to the insulin responsive element in the GLUT4 promoter. *Diabetologia* 2001; 44: 2156-2164.
48. Tomkin GH. Diabetic vascular disease and the rising star of protein kinase C. *Diabetologia* 2001; 44: 657-658.
49. Tomlinson DR. Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complications. *Diabetologia* 1999; 42: 1271-1281.
50. Wolff SP, Dean RT. Glucose autooxidation and protein modification the potential role of »autooxidative glycosilation« in diabetes. *Biochem J* 1987; 245: 243-250.
51. Higashi T, Sano H, Saishoji T. The receptor for advanced glycation end products mediates the chemotaxis of rabbit smooth muscle cells. *Diabetes* 1997; 46: 463-472.
52. Schmidt AM, Hori O, Brett J Yan SD, Wautier J-L, Stern D. Cellular receptors for advanced glycation end products: Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1521-1528.
53. Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21ras-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem* 1997; 272: 17810-17814.

54. Roberts LJ II, Morrow JD. The generation and actions of isiprostanes. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1345: 121 135.
55. Keaney JF, Loscalzo J. Diabetes, oxidative stress, and platelet activation. *Circulation* 1999; 99: 189 191.
56. Islam KN, Takahashi M, Higashiyama S, Myint T, Uozumi N. Fragmentation of ceruloplasmin following non-enzymatic glycation reaction. *J Biochem* 1995; 118: 1054 1060.
57. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Beett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 1994; 269: 9889 9897.
58. Sinclair AJ. Free radical mechanisms and vascular complications of diabetes mellitus. *Diabetes Reviews* 1993; 2: 7 10.
59. Garlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 1975; 250: 5475 5480.
60. Nishinaka T, Yabe-Nishimura C. EGF receptor-ERK pathway is the major signaling pathway that mediates upregulation of aldose reductase expression under oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 205 216.
61. Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 1999; 18: 6104 6111.
62. Craven PA, De Rubertis FR. Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetes rats. *J Clin Invest* 1989; 83: 1667 1675.
63. Lee T-S, Saltsman KA, Ohashi H, King GL. Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: Proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5141 4145.
64. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988; 334: 661 665.
65. Derubertis FR, Craven PA. Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes: mechanisms and potential link to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes* 1994; 43: 1 8.
66. Avdonin PR. Receptor-dependent regulation of (Ca²⁺) and phospholipase C in vascular endothelial cells. *J Recept Signal Transduct Res* 2000; 20: 235 254.
67. Kunisaki M, Bursell S-E, Umeda F, Nawata H, King GL. Normalization of diacylglycerol-protein kinase C activation by vitamin E in aorta of diabetic rats and cultured rat smooth muscle cells exposed to elevated glucose levels. *Diabetes* 1994; 43: 1372 1377.
68. Tran K, Proulx PR, Chan AC. Vitamin E suppresses diacylglycerol (DAG) level in thrombin-stimulated endothelial cells through an increase of DAG kinase activity. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1212: 193 202.
69. Craven PA, Davidson MC, DeRubertis FR. Increase in diacylglycerol mass in isolated glomeruli by glucose from de novo synthesis of glycerolipids. *Diabetes* 1990; 39: 667 674.
70. Shimomura T, Asoka Y, Oka M, Yoshida K, Nishizuka Y. Synergistic action of diacylglycerol and unsaturated fatty acid for PKC activation: its possible implication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5149 5153.
71. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998; 47: 859 866.
72. Koya D, Lee IK, Ishii H, Kanoh H, King GL. Prevention of glomerular dysfunction in diabetes rats by treatment with d-alpha-tocopherol. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 426 435.
73. Ikeda Y, Olsen GS, Ziv E, Hansen LL, Busch AK, Hansen BF, Shafrir E, Mosthaf-seedorf L. Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance in Psammomys obesus: overexpression of protein kinase C-epsilon in skeletal muscle precedes the onset of hyperinsulinemia and hyperglycemia. *Diabetes* 2001; 50: 584 592.
74. Kumar A, Hawkins KS, Hannan MA, Ganz MB. Activation of PKC-beta(I) in glomerular mesangial cells is associated with specific NF-kappaB subunit translocation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281(4): F613 F619.
75. Fukuchi M, Giaid A. Endothelial expression of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 in human coronary artery disease. *Lab Invest* 1999; 79: 659 670.
76. Park CW, Kim JH, Lee JE, Kim YS, Ahn HJ, Shin YS, Kim SY, Choi EJ, Chang YS, Bang BK. High glucose intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression through an osmotic effect in rat mesangial cells is PKC-NF-kB-dependent. *Diabetologia* 2000; 43: 1544 1553.
77. Williams B, Schrier RW. Glucose-induced protein kinase C activity regulates arachidonic acid release and eicosanoid production by cultured glomerular mesangial cell. *J Clin Invest* 1993; 92: 2889 2896.
78. Williams B, Gallacher B, Patel H, Orme C. Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetologia* 1999; 46: 1497 1503.
79. Paul A, Doherty K, Plevin R. Differential regulation by protein kinase C isoforms of nitric oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages and rat aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 940 946.
80. Andrea JE, Walsh MP. Protein kinase C of smooth muscle. *Hypertension* 1992; 20: 585 595.
81. Takeishi Y, Chu G, Kirkpatrick DM, Li Z, Wakasaki H, Kranias EG, King GL, Walsh RA. In vivo phosphorylation

- of cardiac troponin I by protein kinase C β 2 decreases cardiomyocyte calcium responsiveness and contractility in transgenic mouse hearts. *J Clin Invest* 1998; 102: 72-8.
82. Li P-F, Maasch C, Haller H, Dietz R, von Harsdorf R. Requirement for protein kinase C in reactive oxygen species-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1999; 100: 967-973.
83. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331: 1480-1487.
84. Hata Y, Rook SL, Aiello LP. Basic fibroblast growth factor induces expression of Vege receptor DDR through a protein kinase C and p44/p42 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Diabetes* 1999; 48: 1145-1155.
85. Park CW, Kim JH, Lee JH, Kim Ys, Ahn HJ, Shin YS, Kim SY, Choi EL, Chang YS, Bang KB, Lee JW. High glucose-induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression through an osmotic effect in rat mesangial cells is PKC-NF- κ B-dependent. *Diabetologia* 2000; 43: 1544-1553.
86. Koya D, Jirousek MR, Lin Y-W, Issii H, Kuboki K, King GL. Characteristics of protein kinase C β isoform activation on gene expression of transforming growth factor β , extracellular matrix components and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest* 1997; 100: 115-126.
87. Davis RJ. Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 459-467.
88. Numazawa S, Yamade H, Furusho A, Nakahara T, Ogu-ro T, Yoshida T. Cooperative induction of c-fos and heme oxygenase gene products under oxidative stress in human fibroblastic cells. *Exp Cell Res* 1997; 237: 434-444.
89. Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by h202. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 1996; 271: 4138-4142.
90. English JM, Cobb MH. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 40-45.
91. Pavlović D. Spermidine functions in an antioxidant pathway to prevent diabetic complication. *J Hepatology* 2000; 32 (Suppl. 2): 138.
92. Pavlović D, Kocić R, Kocić G, Đorđević V, Bjelaković G, Koracevic D. Therapeutic effects of vitamins E and C on the serum lipid peroxidation and glycaemia in diabetic subjects. *Diabetologia* 1992; 35 (Suppl. 1): A 201.
93. Kocić R, Pavlović D, Kocić G, Milenović M, Cvetković T, Miladinović D. Protein glycosylation and insulin secretion during treatment of diabetics with antioxidative vitamins. *Facta Universitatis* 1996; 2: 19-23.
94. Pavlović D, Bjelaković G. A possible link between polyamines and thiol redox signaling pathways in diabetic liver. *J Hepatology* 2001; 34 (Suppl.1): 94.