

Rola stresu oksydacyjnego w etiologii wybranych chorób cywilizacyjnych

Patrycja Bojdo¹, Bartosz Gąsiorkiewicz¹, Paulina Koczurkiewicz-Adamczyk¹, Elżbieta Pękala¹

¹Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków, Polska

Farmacja Polska, ISSN 0014-8261 (print); ISSN 2544-8552 (on-line)

Adres do korespondencji

Patrycja Bojdo, Zakład Biochemii Farmaceutycznej,
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum,
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, Polska;
e-mail: patrycjabojdo381@gmail.com

Źródła finansowania

Praca została zrealizowana w ramach projektu „Podanie skojarzone antybiotyków antracyklinowych i pochodnych kwasu cynamonowego – nowa perspektywa ograniczania efektów niepożądanych chemioterapii” o numerze N42/DBS/000125, finansowanego w ramach badań własnych (finansowanych z subwencji) na Uniwersytecie Jagiellońskim Collegium Medicum w latach 2020–2021.

Konflikt interesów:

Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2021.02.24

Zaakceptowano: 2021.03.23

Opublikowano on-line: 2021.03.26

DOI

10.32383/farmpol/134797

ORCID

Paulina Koczurkiewicz-Adamczyk

(ORCID iD: 0000-0003-2939-224X)

Bartosz Gąsiorkiewicz (ORCID iD: 0000-0001-6287-3657)


Elżbieta Pękala (ORCID iD: 0000-0002-1260-4253)

Patrycja Bojdo (ORCID iD: 0000-0001-6609-3148)

Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

To jest artykuł o otwartym dostępie,

na licencji CC BY NC 

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

The role of oxidative stress in the etiology of selected civilization diseases

The evolutionary ability to use oxygen in the process of respiration has provided living organisms with an efficient source of energy and made the development of life on Earth possible. However, oxygen and its derivatives can also pose a threat. During physiological processes, ROS (reactive oxygen species) are generated. Excessive amounts of these chemically active molecules may lead to the modification of biologically important macromolecules (proteins, nucleic acids), resulting in irreversible disturbances in the structure of key cell structures (cell nucleus, membranes). Another consequence of ROS activity is the disruption of signal transduction pathways in the cell, which leads to the development of many serious diseases (atherosclerosis, cancer).

On the other hand, similarly to excess oxygen, its deficiency can be disastrous for cells. Hypoxia, i.e. a state of insufficient oxygen supply in relation to demand, is relevant not only in ischaemic heart disease and myocardial infarction but also in many other cardiovascular, neurodegenerative and even cancerous diseases. A major role in the response to hypoxia at the cellular level is played by hypoxia-inducible factor (HIF), whose hyperactivation is associated with multidirectional disruption of intracellular pathways.

There is a close link between hypoxia-related phenomena and ROS at the molecular level, which is based on bidirectional regulation. Therefore, both factors should be considered together in regards to the development of many pathologies. Despite the role of ROS and hypoxia in the development of lifestyle diseases, which has been discussed for years, it has still not been possible to introduce effective targeted therapy in this area. Notwithstanding encouraging initial data, many studies have provided inconclusive results on the efficacy of antioxidant therapy in neurodegenerative, cardiovascular and cancer diseases. In the latter case, however, the use of hypoxia-activated drugs and HIF-1 inhibitors seems to be a promising strategy. This demonstrates the need for a better understanding of the mechanisms involved in the action of the aforementioned factors and warrants further research in this area.

The aim of this work is to present the mechanism of action of RFTs and hypoxia, their role in the pathophysiology of the most common human diseases and their potential use as targets for therapy.

Keywords: ROS, civilization diseases, oxidative stress.

© Farm Pol, 2021, 77(2): 111–120

Wprowadzenie

Wykształcona w procesie ewolucji zdolność do wykorzystania tlenu w procesie oddychania zapewniła organizmom żywym wydajne źródło energii i umożliwiła rozwój życia na Ziemi. Tlen i jego pochodne mogą stanowić również pewne zagrożenie. Podczas fizjologicznych procesów dochodzi do generowania reaktywnych form tlenu (RFT) – aktywnych chemicznie cząsteczek, których nadmierne ilości mogą prowadzić do modyfikacji ważnych biologicznie makromolekuł (białka, kwasy nukleinowe), co skutkuje nieodwracalnymi zaburzeniami w budowie kluczowych struktur komórkowych (jądro komórkowe, błony). Inną konsekwencją działania RFT są zaburzenia w szlakach przekazywania sygnału w komórce, co prowadzi do rozwoju wielu poważnych schorzeń (miażdżyca, nowotwory). Z drugiej strony, podobnie jak nadmiar tlenu, jego niedobór może być dla komórek katastrofalny w skutkach. Hipoksja, czyli stan niewystarczającej podaży tlenu wobec zapotrzebowania, ma znaczenie nie tylko w chorobie niedokrwiennej serca i zawałe mięśnia sercowego, ale także w wielu innych chorobach układu krążenia, neurodegeneracyjnych, a nawet nowotworowych. W przypadku wielu patologii obserwuje się współdziałanie hipoksji i RFT. Celem tej pracy jest przybliżenie roli RFT i hipoksji w najczęstszych schorzeniach występujących u człowieka.

Stres oksydacyjny

RFT zawierają w swojej cząsteczce atomy tlenu z niesparowanym elektronem (np. anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy) lub wiązanie ponadtlenkowe (np. nadtlenuk wodoru). Cechują się dużą reaktywnością, prowadząc do modyfikacji chemicznej białek, lipidów i wielu innych składników komórki. RFT uczestniczą zarówno w fizjologicznych procesach: transdukcji sygnału, różnicowaniu komórek, apoptozie, metabolizmie oraz reakcji immunologicznej, jak i stanowią element patofizjologii wielu schorzeń cywilizacyjnych, w tym choroby nowotworowej [1]. W momencie, gdy dochodzi do naruszenia równowagi między procesami oksydacyjnymi a antyoksydacyjnymi pojawia się stres oksydacyjny. Komórki, w których następuje nadprodukcja RFT mogą wykształcić mechanizmy adaptacyjne. Gdy są one niewystarczające, działanie RFT wymyka się spod kontroli i prowadzi do licznych patologii – rozwoju stanu zapalnego, wzrostu tempa proliferacji i migracji komórek, czy też powstawania mutacji w DNA. Dokładne poznanie mechanizmu stresu oksydacyjnego i jego wpływ na komórkę stanowi ważny cel w poszukiwaniu

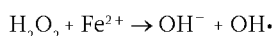
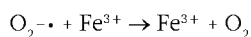
nowych strategii terapeutycznych chorób zapalnych oraz nowotworowych, jest także kluczowe z punktu widzenia powstrzymania procesu starzenia komórkowego – SIPS (ang. *stress-induced premature senescence*, SIPS). Do RFT zalicza się przede wszystkim anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), nadtlenuk wodoru (H_2O_2) oraz rodnik wodorotlenkowy ($\cdot OH$) [1]. Ich źródłem są procesy fizjologicznie zachodzące w komórce oraz ksenobiotyki.

Źródłem RFT są endogenne procesy oddechowe zachodzące w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym. Podczas transportu elektronów pomiędzy elementami łańcucha dochodzi do ich „wycieku” (ang. *leakage*). Następnie w wyniku jednoelektronowej redukcji dochodzi do powstania anionorodnika ponadtlenkowego $O_2^{\cdot-}$. Głównym miejscem wycieku jest kompleks I łańcucha oddechowego, jednak w procesie tym uczestniczą również kompleksy II i III. Nasilenie wycieku zaobserwowano w określonych warunkach, między innymi podczas hipoksji, uszkodzenia mitochondriów czy też zmian w metabolizmie komórkowym.

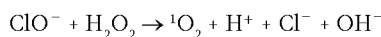
Innym źródłem endogennego anionorodnika ponadtlenkowego są związane z błoną enzymy z grupy oksydaz NADPH (ang. *NADPH oxidase*, NOX). Poszczególne izoformy NOX mają znaczenie w regulacji funkcjonowania wielu szlaków sygnalizacyjnych, ruchliwości komórki oraz w procesie „wybuchu tlenowego” w fagocytach [2]. Anionorodnik ponadtlenkowy powstaje również w wyniku autoutleniania niskocząsteczkowych związków, takich jak adrenalina, noradrenalina, tetrahydropterdyne czy związki tiolowe [3]. Ponadto, pewne ilości anionorodnika ponadtlenkowego tworzą się w trakcie metabolizmu kwasu arachidonowego, a także reakcji enzymatycznych z udziałem oksydaz, np. oksydazy ksantynowej.

Okres półtrwania anionorodnika ponadtlenkowego w fizjologicznych warunkach jest bardzo krótki – cząsteczka szybko ulega reakcji dysmutacji do nadtlenuku wodoru katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową (ang. *Superoxide dismutase*, SOD) [2]. Nadtlenuk wodoru, sam również będący RFT, wykazuje znacznie mniejszą reaktywność. Reakcja dysmutacji stanowi istotny element obrony komórki przed szkodliwym wpływem anionorodnika ponadtlenkowego. Ponadto, w związku z dłuższym okresem półtrwania oraz zdolnością do przenikania przez dwuwarstwą lipidową, nadtlenuk wodoru pełni rolę istotnego wtórnego przekaźnika, biorąc udział w regulacji wielu procesów wewnątrzkomórkowych zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w patofizjologii wielu chorób.

Chociaż duża część nadtlenu wodoru powstaje w mitochondriach, to peroksosomy stanowią główne miejsce jego syntezy. Peroksosomy to organella otoczone pojedynczą błoną komórkową, zawierające w swoim wnętrzu enzymy uczestniczące w metabolizmie między innymi długolącuchowych kwasów tłuszczowych oraz rozgałęzionych aminokwasów. W wyniku zachodzących w peroksosomach reakcji z udziałem oksydoreduktaz powstają duże ilości nadtlenu wodoru, który ulega rozkładowi do wody oraz tlenu z udziałem rezydualnej katalazy. Jak wspomniano nadtlenek nie należy do bardzo reaktywnych związków, ale bardzo łatwo przenika przez błony i ulega przemianie w rodnik hydroksylowy $\text{OH}\cdot$ w reakcji Fentona z jonami żelaza (II):



Nadtlenek może być także prekursorem tlenu singletowego:



Ostatnia reakcja nie jest jednak istotnym źródłem endogennego tlenu singletowego.

Wśród najczęstszych czynników sprzyjających powstawaniu RFT o etiologii pozakomórkowej wymienia się: promieniowanie jonizujące, ultradźwięki, promieniowanie nadfioletowe, a także dym papierosowy, podwyższone ciśnienie parcjalne tlenu, ekspozycję na ozon, nadtlenek wodoru czy substancje organiczne [1].

Dla utrzymania homeostazy konieczne jest prawidłowe działanie układów antyoksydacyjnych zdolnych do detoksykacji RFT lub usuwania skutków ich działania. Do systemów tych zalicza się zarówno substancje o działaniu antyoksydacyjnym (np. glutation, tioredoksyna, tokoferole, kwas askorbinowy), jak i wyspecjalizowane układy enzymatyczne. Spośród tych ostatnich najważniejsza wydaje się peroksydaza glutationowa, której substratem jest glutation oraz nadtlenek wodoru, a produktem woda. Co istotne, układy antyoksydacyjne podlegają ściślejszej regulacji, a ich działanie jest potęgowane w obecności stresu oksydacyjnego. Jednym z najważniejszych białek odpowiedzialnych za tę odpowiedź jest czynnik transkrypcyjny Nrf2 (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), który w odpowiedzi na retencję RFT ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z elementami odpowiedzi antyoksydacyjnej (ang. *antioxidant response element*, ARE) i aktywuje transkrypcję odpowiednich genów [2].

Szkodliwe działanie RFT opiera się na: (i) inaktywacji enzymów, głównie w wyniku reakcji z jonami metali przejściowych, które mogą być częścią ich centrów aktywnych; (ii) modyfikacji funkcji polipeptydów i białek – zrywanie wiązań polipeptydowych, modyfikacji kowalencyjnej łańcuchów bocznych (szczególnie aminokwasów aromatycznych i zawierających reszty tiolowe), zrywaniu mostków siarczkowych, modyfikacji grup prostetycznych; (iii) peroksydacji lipidów wchodzących w skład błon; (iv) uszkodzeniu DNA jądrowego i mitochondrialnego w wyniku modyfikacji zasad azotowych, deoksyrybozy czy wiązań fosfodiesterowych, tworzeniu adduktów oraz jedno- i dwuniciowych pęknięć łańcucha.

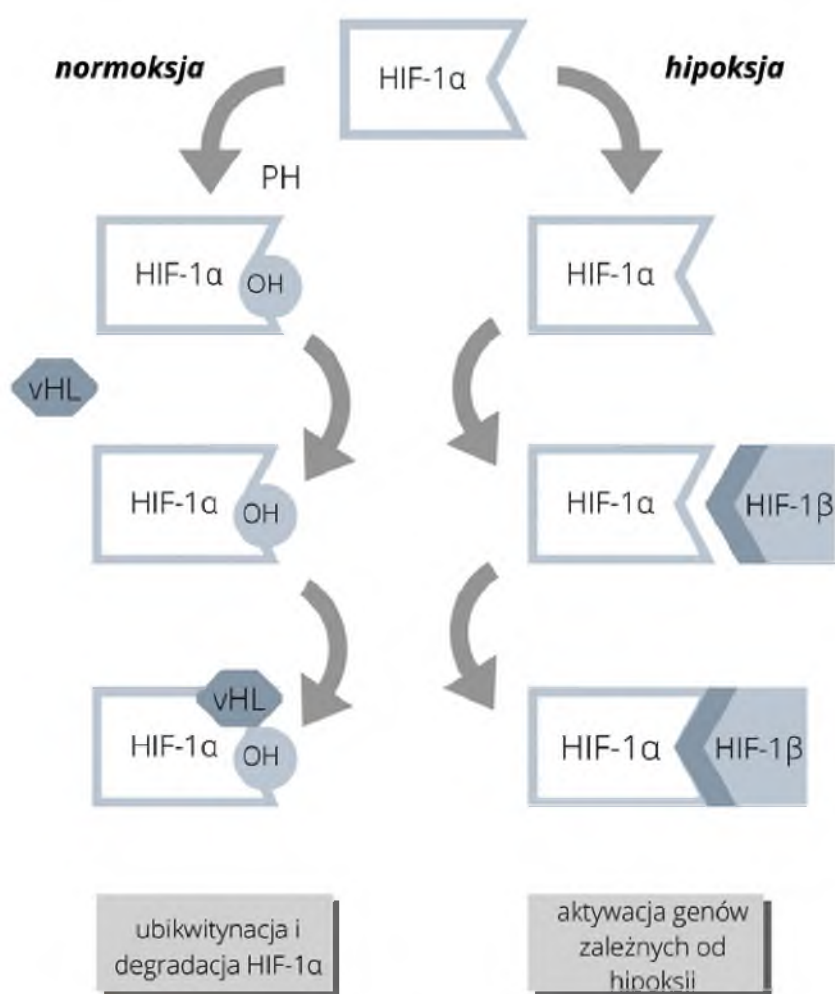
Modyfikacja enzymów i białek zaburza metabolizm i sygnalizację wewnątrzkomórkową. Może to między innymi prowadzić do nasilenia odpowiedzi zapalnej, niekontrolowanej proliferacji komórek, zwiększenia ruchliwości komórek, indukcji przejścia mezenchymalno-nabłonkowego czy też wprowadzić komórkę na szlak apoptozy [4]. Wszystkie powyższe zjawiska odgrywają istotną rolę w patogenezie większości chorób cywilizacyjnych. Ponadto, białka zmodyfikowane przez RFT wykazują tendencję do tworzenia agregatów, które nie ulegają ubikwintynizacji i są odporne na degradację. Komórka, w której doszło do takich zmian ma zaburzoną homeostazę i jest kierowana na szlak apoptozy lub nekrozy, co wydaje się istotne w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych [5].

Utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych powoduje powstanie nadtlenu lipidów, inicjując kaskadową reakcję peroksydacji, co jeszcze bardziej nasila stres oksydacyjny. Modyfikacja lipidów prowadzi do zmiany w płynności i przepuszczalności błon biologicznych, które pociągają za sobą zmianę funkcjonowania wielu białek transbłonowych – receptorów zewnątrzkomórkowych, kanałów jonowych oraz białek odpowiadających za kontakt z macierzą pozakomórkową. Między innymi zwiększa się napływ kationów wapniowych do komórki i następuje aktywacja fosfolipazy A2, istotnej w rozwoju stanu zapalnego. Bezpośrednim działaniem jonów Ca^{2+} może być również indukcja genów odpowiedzialnych za rozwój zapalenia oraz niektórych protoonkogenów. Ostatnie dwie aktywności w dużej mierze zależą od aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny NFAT przez kompleks wapń/kalmodulina/kalretikulina [3, 6].

Hipoksja

Stan niedotlenienia, czyli niewystarczającego zaopatrzenia komórki w tlen, nazywany jest hipoksją. Komórka do pewnego stopnia adaptuje

się do hipoksji przez wykształcenie odpowiednich mechanizmów, np. zmianę w profilu ekspresji genów odpowiadających za zwalczanie skutków niedotlenienia czy też promujących metabolizm beztlenowy. Główną rolę w tej regulacji odgrywają czynniki transkrypcyjne indukowane hipoksją (ang. *hypoxia inducible factor*, HIF). Co ważne, czasami działanie HIF nie ogranicza się jedynie do przeciwdziałania negatywnym skutkom hipoksji. W niektórych przypadkach aktywacja HIF prowadzi do niekorzystnych zmian, nasilając stan zapalny oraz sprzyjając nowotworzeniu [7]. Utrzymująca się hipoksja jest cechą wielu stanów patologicznych, w tym nowotworów. Podziały komórek nowotworowych są szybkie i niekontrolowane, powinny być zatem uzależnione od ciągłej podaży tlenu. Jednak wskutek niewystarczającego unaczynienia guza, komórki nie są odpowiednio zaopatrywane w tlen, co przekłada się na hipoksję i obniżenie pH w mikrośrodowisku guza [8].



Rycina 1. Regulacja aktywności HIF-1 α . PH – hydroksylaza prolinowa; vHL – białko von Hippla-Lindaua.

Figure 1. Regulation of HIF-1 α activity. PH – proline hydroxylase; vHL – protein von Hippel-Lindau.

Czynnik indukowany hipoksją

Czynnik HIF zbudowany jest z dwóch podjednostek – α i β . Podjednostka α występuje w postaci 3 różnych izoform (HIF-1 α , HIF-2 α i HIF-3 α), natomiast gen podjednostki β posiada 3 paralogi (Arnt1, Arnt2 i Arnt3) [9]. Domenami charakterystycznymi dla obu podjednostek są: domena PAS (odpowiedzialna za dimeryzację) i motyw bHLH (odpowiedzialny za dimeryzację oraz wiązanie do odpowiednich sekwencji w DNA) [10]. W odpowiedzi na brak tlenu główną rolę pełnią HIF-1 α , HIF-1 β , a także HIF-2 α .

W warunkach normoksji HIF-1 α ulega degradacji. Główną rolę w tej regulacji odgrywa hydroksylacja dwóch aminokwasów (proliny P402 i P564 w obrębie domeny degradacyjnej zależnej od tlenu ODD) zależna od dostępności tlenu i katalizowana przez hydroksylazę prolinową (ang. *Prolyl Hydroxylase Domain*, PHD). Kolejnym etapem jest rozpoznanie hydroksylowanego czynnika przez pVHL (produkt genu supresorowego von Hippela-Lindaua) oraz następcza ubikwytynacja przy udziale kompleksu ligazy E3. Tak zmodyfikowany HIF-1 α ulega degradacji proteasomalnej. Istnieją też doniesienia o obecności dodatkowego sygnału degradacji proteasomalnej – acetylacji lizyny-532 w domenie ODD [9]. W warunkach ograniczonego dostępu tlenu, dochodzi do stabilizacji czynnika HIF-1 i jego dimeryzacji. Istotą tego zjawiska jest interakcja między podjednostką HIF-1 α a HIF-1 β , dzięki czemu izoforma HIF-1 α może związać się z DNA i wpływać na regulację transkrypcji określonych genów. Na stabilizację czynnika HIF-1 α oprócz hipoksji wpływają także inne czynniki, np. białka szoku cieplnego Hsp90, białko Jab1 (ang. *Jun activation domain-binding protein-1*). Ponadto warunkiem pełnej aktywacji czynnika HIF-1 α jest obecność kofaktorów, do których zaliczają się p300/Creb-binding protein, TIF-2 czy też SRC-1. Istnieją też pewne unikatowe kofaktory dla izoformy HIF-2 α , np. NEMO (ang. *NF- κ B essential modulator*).

Pomiędzy RFT i HIF-1 istnieje pewna zależność. W warunkach hipoksji może paradoksalnie dojść do zwiększenia generacji RFT m.in. w mitochondriach. Z drugiej strony, aktywacja HIF-1 może prowadzić do nasilenia bądź zmniejszenia stresu oksydacyjnego w zależności od okoliczności. Niektóre badania dowiodły, że stres oksydacyjny sprzyja

stabilizacji HIF-1, choć wobec wielu niejednoznacznych danych istota tej regulacji jest przedmiotem dyskusji [11]. Niezależnie od skomplikowanej relacji stresu oksydacyjnego i odpowiedzi na hipoksję, oba te czynniki odgrywają niezwykle istotną rolę w rozwoju schorzeń cywilizacyjnych i powinny być rozpatrywane wspólnie w kontekście patogenezy i możliwości terapii tych chorób.

Stres oksydacyjny i hipoksja w stanach patologicznych

Choroby neurodegeneracyjne

U podstaw chorób neurodegeneracyjnych, prowadzących do uszkodzenia neuronów, leży wiele mechanizmów. Do najważniejszych zaliczyć można: agregację białek (np. białka *tau*, α -synukleiny, β -amyloidu), zmiany w metabolizmie jonów żelaza, zaburzoną eliminację uszkodzonych mitochondriów, przewlekły proces zapalny oraz stres oksydacyjny [12].

Komórki układu nerwowego charakteryzują się mniejszą aktywnością enzymów antyoksydacyjnych niż w innych tkankach. Ponadto, tkanka nerwowa zużywa znaczne zasoby tlenu, tym samym produkując duże ilości wolnych rodników. Błona komórkowa neuronów jest bogata w wielonienasycone kwasy tłuszczowe bardzo podatne na proces peroksydacji. Utlenianie lipidów w błonach komórkowych niesie za sobą zwiększenie przepuszczalności dla jonów wodorowych i innych polarnych substancji, co zmienia potencjał elektryczny po obu stronach błony. Peroksydacja lipidów może również indukować ekspresję COX-2, enzymu biorącego udział w reakcji zapalnej, a tym samym prowadzić do przewlekłego stanu zapalnego [13]. W badaniach zwiększone stężenie markerów peroksydacji lipidów stwierdzono u chorych na chorobę Parkinsona (ang. *Parkinson's disease*, PD) oraz stwardnienie boczne zanikowe (ang. *amyotrophic lateral sclerosis*, ALS). Udowodniono, że w chorobie Alzheimera (ang. *Alzheimer's Disease*, AD) czynnik Nrf2 pozostaje uwięziony w cytozolu, co upośledza procesy antyoksydacyjne i uwrażliwia neurony na nadmierną ilość wolnych rodników [5]. Stres oksydacyjny przyczynia się do demielinizacji i uszkodzenia aksonów w chorobach neurodegeneracyjnych, co z kolei sprzyja zwiększonej generacji nadtlenoazotynu i wtórnie – szerzeniu się uszkodzenia neuronów. Ponadto, w generowaniu stresu oksydacyjnego ważną rolę odgrywają komórki mikrogleju, które po aktywacji uwalniają wolne rodniki i prowadzą do rozwoju niekontrolowanej reakcji neurozapalnej [14]. Poza tym, RFT mogą pośrednio wpływać na osłabienie przekazywania nerwowego, co jest jednym

z czynników etiologicznych choroby Parkinsona. U podłoża PD leży spadek aktywności parkiny, enzymu należącego do ligaz ubikwityny E3, bądź dysfunkcja białka PINK-1 będącego adaptorem dla parkiny. Prowadzi to do spadku eliminacji uszkodzonych mitochondriów w procesie mitofagii. Z kolei nagromadzenie dysfunkcyjnych mitochondriów sprzyja nadmiernej generacji RFT i rozwojowi stresu oksydacyjnego uszkadzającego neurony. Zmiany te dotyczą głównie miere neuronów dopaminergicznych, prowadząc do niedoboru dopaminy. W ostatnim czasie podkreśla się również rolę dysfunkcji białka DJ-1, będącego ważnym elementem obrony przed stresem oksydacyjnym [15].

Tkankę nerwową cechuje duże zapotrzebowanie metaboliczne i ogromna zależność od obecności tlenu. W normalnych warunkach neurony nie są w stanie podtrzymać swojej funkcji przy wykorzystaniu metabolizmu beztlenowego, dlatego centralny system nerwowy jest niezwykle wrażliwy nawet na przejściowe niedotlenienie. Hipoksja i towarzyszące jej zmiany odgrywają rolę nie tylko w patofizjologii udaru mózgu, kiedy zatrzymanie dopływu krwi pozbawia tkankę dostępu do tlenu, prowadząc do martwicy, ale również w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych, takich jak AD i PD. Odpowiednie zmiany adaptacyjne w pewnej mierze mogą odwrócić jej negatywne skutki, łagodząc przebieg tych schorzeń. W tym kontekście wykazano, że aktywacja HIF-1 ogranicza postęp AD oraz PD. W badaniach na modelach zwierzęcych AD udowodniono, że czynnik ten zmniejsza hiperfosforylację białka tau oraz cytotoksyczność indukowaną amyloidem β . Zostało to powiązane z indukowaną HIF-1 poprawą adaptacji komórki do niskiego stężenia tlenu, glukozy oraz stresu oksydacyjnego. Ponadto, niska aktywność HIF-1 koreluje z rozwojem PD. HIF-1 odpowiada za ekspresję genu hydroksylazy tyrozyny (HT) – enzymu odpowiedzialnego za syntezę dopaminy. Aktywacja HIF-1 wiąże się ze zwiększonym stężeniem neuroprzekaźnika i polepsza przebieg choroby. Podkreśla się również rolę HIF-1 w regulacji metabolizmu żelaza, ograniczaniu stresu oksydacyjnego oraz zwiększaniu wydzielania czynników wzrostowych, jak VEGF. W badaniach na modelach zwierzęcych udowodniono skuteczność stabilizatorów HIF-1, będących inhibitorami hydroksylazy prolinowej w ograniczaniu postępu AD, PD, a także ALS i choroby Huntingtona (ang. *Huntington's disease*, HD) [16].

Sugerując się dużą rolą stresu oksydacyjnego w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych, przeprowadzono wiele badań nad wpływem antyoksydantów na przebieg tych schorzeń. Jednakże wyniki, chociaż czasami obiecujące, nie

potwierdzają jednoznacznie klinicznej skuteczności tych związków [17–19].

Choroby układu krwionośnego

Według WHO choroby układu krążenia stanowią najczęstszą przyczynę zgonów na świecie. Równocześnie stres oksydacyjny lub/i hipoksja leżą u podstawy patofizjologii większości schorzeń z tej grupy.

RFT mają istotne znaczenie w rozwoju nadciśnienia tętniczego (NT), które stanowi niezależny czynnik ryzyka miażdżycy, choroby niedokrwiennej serca, udarów i zawału mięśnia sercowego. W ścianach naczyń krwionośnych źródłem RFT są: oksydaza NADPH, oksydaza ksantynowa, mitochondrialny łańcuch transportu elektronów i śródbłonkowa synteza tlenu azotu (eNOS). W patogenezie NT ważną rolę odgrywa anionorodnik ponadtlenkowy, który reaguje z tlenkiem azotu (NO), prowadząc do wytworzenia niezwykle reaktywnego nadtlenoazotynu. Wynikające stąd zmniejszenie biodostępności NO ogranicza jego fizjologiczną funkcję – regulację przepływu krwi poprzez rozszerzanie średnicy naczyń krwionośnych. Ponadto, anionorodnik ponadtlenkowy niezależnie zmniejsza aktywność eNOS. Naturalnym kofaktorem eNOS jest tetrahydrobiopteryna, która w czasie stresu oksydacyjnego jest utleniana i nie pełni prawidłowo swojej funkcji. Pozbawiona kofaktora eNOS nie tylko produkuje mniejsze ilości NO, ale staje się źródłem anionorodnika ponadtlenkowego, nasilając stres oksydacyjny [20]. W warunkach stresu oksydacyjnego dochodzi także do zmniejszenia syntezy prostacykliny (PGI₂) – czynnika rozkurczającego naczynia krwionośne, zmniejszającego ciśnienie krwi i hamującego agregację płytek krwi [21]. NOX związane z błoną komórkową endotelium stanowi istotne źródło anionorodnika ponadtlenkowego. Enzym ten jest aktywowany m.in. w odpowiedzi na naprężenie ścinające obecne w przypadku lokalnych zaburzeń przepływu krwi [22].

W reakcjach katalizowanych przez śródbłonkową oksydazę ksantynową wytwarzany jest nadtlenek wodoru i tlen cząsteczkowy. Aktywność oksydazy ksantynowej jest wzmagana przez działanie czynników proaterogennych, na przykład angiotensyny II, co ma miejsce między innymi w przypadku NT [23].

Kolejną przyczyną schorzeń sercowo-naczyniowych są zmiany miażdżycowe. Miażdżycy rozwija się preferencyjnie w obszarach naczyniowych z zaburzonym przepływem krwi. Miejsca te charakteryzują się zwiększonym stresem oksydacyjnym i zmniejszonym wytwarzaniem NO w śródbłonku. W ewolucji i progresji blaszek

miażdżycowych biorą udział RFT. Cząsteczki LDL, przechodząc do błony wewnętrznej naczyń krwionośnych, ulegają procesom oksydacyjnym pod wpływem wolnych rodników. Prowadzi to do zmiany ich właściwości i zwiększonej aktywności fagocytarnej makrofagów. Te ostatnie wytwarzają substancje chemotaktyczne, czynniki prozapalne, a same ulegają przemianie w komórki piankowate. Efektem tego procesu jest powstanie blaszki miażdżycowej w naczyniach [24].

Hipoksja i jej następstwa w chorobach sercowo-naczyniowych są najczęściej rozpatrywane w kontekście choroby niedokrwiennej serca. W wyniku zmniejszenia dopływu krwi do tkanki, najczęściej przez pękniętą blaszkę miażdżycową, dochodzi do hipoksji, a w skrajnym przypadku do rozwoju martwicy (zawału mięśnia sercowego). Rola HIF-1 w adaptacji kardiomiocytów do zmniejszonej podaży tlenu została udowodniona w wielu badaniach. Efekt ten zależy od nadekspresji indukowanej NOS, oksygenazy hemowej oraz kardiotrofiny-1, a także od promowania glikolizy oraz zmniejszania produkcji RFT przez mitochondria. Zgodnie z tymi rozważaniami, w zwierzęcym modelu zawału mięśnia sercowego stabilizatory HIF-1 znacząco zmniejszały obszar zawału. Ponadto, czynniki proangiogenne (np. VEGF), będące pod transkrypcyjną kontrolą HIF-1, sprzyjają rozwojowi krążenia obocznego, poprawiając przebieg choroby niedokrwiennej.

Do uszkodzenia mięśnia sercowego dochodzi również w przypadku nagłego przywrócenia przepływu krwi po zawałe. Zjawisko to, zwane uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym (ang. *ischemia-reperfusion*, I/R), tłumaczy się nagłym wzrostem RFT po przywróceniu dostawy tlenu oraz rozwojowi stanu zapalnego. Udowodniono, że aktywacja HIF-1 chroni kardiomiocyty przed I/R.

Z drugiej strony aktywacja HIF-1 odgrywa rolę w rozwoju i dojrzewaniu blaszki miażdżycowej. Polega ona na zwiększeniu wydzielania czynników zapalnych, osłabieniu połączeń międzykomórkowych śródbłonka, promocji przemiany makrofagów w komórki piankowe, a także zwieszeniu migracji i proliferacji komórek endotelium i miocytów. Pomimo tego inhibicja hydroksylazy prolinowej i następcza stabilizacja HIF-1 może przeciwnie polepszać przebieg miażdżycy, co tłumaczy się plejotropowym działaniem czynnika, prowadzącym między innymi do obniżenia stężenia VLDL, LDL i glukozy [25].

Terapia celowana mająca za zadanie zwalczanie stresu oksydacyjnego w chorobach układu krążenia wydaje się być uzasadniona z punktu widzenia ich patofizjologii. W badaniach na zwierzęcym modelu NT skuteczne okazały się

takie związki, jak: lazaroid, N-acetylocysteina, allopurinol. Lazaroid i N-acetylocysteina są zmiataczami RFT, zaś allopurinol inhibitorem oksydazy ksantynowej, która w nadciśnieniu wykazuje wzmożoną aktywność, przyczyniając się do powstawania RFT. Wnioski z badań klinicznych pozostają jednak niejednoznaczne. W kontekście modyfikacji stresu oksydacyjnego warto także wspomnieć o obecnie stosowanych lekach przeciwnadciśnieniowych. Nebivolol (lek β -adrenolityczny z komponentą działania wzmagającą aktywności NOS) wykazuje także mechanizm zależny od redukcji produkcji RFT. Podobnie amlodypina (bloker kanału wapniowego) zmniejsza wytwarzanie aldehydu malonowego oraz powoduje wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, prowadząc do zmniejszenia stresu oksydacyjnego [26].

Choroby nowotworowe

Stres oksydacyjny w procesach nowotworowych należy rozpatrywać wielopoziomowo – jako inicjatora progresji nowotworowej, jako element sprzyjający progresji nowotworu przez zwiększenie proliferacji i ruchliwości komórek oraz jako czynnik szkodliwy dla nowotworu wywołujący apoptozę. Ostateczny efekt stresu oksydacyjnego zależy od jego nasilenia oraz kontekstu biologicznego. Oksydacyjne modyfikacje DNA mogą prowadzić do mutacji inicjujących rozwój nowotworu bądź sprzyjających promocji i progresji [27].

Oprócz tego wolne rodniki mogą przyczynić się do wyczerpania rezerw antyoksydantów, zmniejszenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych, zahamowania apoptozy i indukcji nekrozy, aktywacji onkogenów i inaktywacji genów supresorowych [28].

RFT stymulują angiogenezę w mikrośrodoisku guza, a także sprzyjają migracji komórek nowotworowych, zwiększając ich zdolność do tworzenia przerzutów. Wolne rodniki odgrywają dużą rolę w regulacji sygnalizacji komórki nowotworu przez utlenianie grup tiolowych kinaz i fosfataz białkowych. Wynikająca stąd inhibicja fosfataz przyczynia się do przewagi aktywności kinaz, które będąc pozbawione mechanizmu dezaktywacji wykazują permanentną aktywność sygnalizacyjną. Zjawisko to dotyczy między innymi receptorów czynników wzrostowych, prowadząc do obecności konstytutywnego sygnału wzrostowego dla komórek. Stres oksydacyjny wpływa także na czynniki jądrowe regulujące ekspresję genów odpowiedzialnych za proliferację lub śmierć komórki, np.: czynnik jądrowy NF- κ B, czynnik transkrypcyjny AP-1 czy też STAT3 oraz czynnik regulujący homeostazę tlenową komórki HIF-1 [28].

Wielopoziomowa funkcja RFT w komórkach nowotworowych, stanowi motywację dla poszukiwania punktu uchwytu leków, których mechanizm działania opiera się na modyfikacji stresu oksydacyjnego. Pomimo licznych badań w tym zakresie, nie udało się do tej pory wprowadzić podobnego związku do terapii chorób nowotworowych. Istnieje jednak potrzeba prowadzenia dalszych badań, aby w pełni odpowiedzieć na pytanie, jaką rolę pełnią antyoksydanty w hamowaniu tumorogenezy [29, 30].

Warto jednak wspomnieć, że stres oksydacyjny jest istotnym elementem mechanizmu działania obecnie stosowanych chemioterapeutyków z grupy antracyklin, jak doksorubicyna. Związki te sprzyjają generacji RFT, co jest istotne zarówno dla aktywności przeciwnowotworowej, jak w rozwoju działań niepożądanych takich jak kardiotoksyczność. W ograniczeniu tej ostatniej stosuje się deferoksaminę – substancję, która przez chelatowanie jonów żelaza zmniejsza ilość generowanych RFT w kardiomiocytach. Niezależnie od bezpośredniej aktywności antyoksydacyjnej, deferoksamina jest również aktywatorem HIF-1, co może mieć znaczenie w jej mechanizmie działania [16].

Jak wspomniano, mikrośrodoisko guza nowotworowego cechuje się zmniejszonym dostępem tlenu oraz ograniczoną podażą składników odżywczych. W związku z tym komórki nowotworowe wykształciły wiele mechanizmów przystosowawczych. Adaptacja ta jest koordynowana przez czynnik HIF-1. Indukuje on między innymi ekspresję genów zaangażowanych w zwiększenie przepływu glikolitycznego. Zwiększenie udziału glikolizy beztlenowej w porównaniu do oddychania tlenowego to tak zwany efekt Warburga [31]. Głównym źródłem ATP dla komórek nowotworowych przy niedotlenieniu jest proces glikolizy, w którym jednym z produktów jest mleczan, odpowiadający za obniżenie pH w mikrośrodoisku guza. Obecnie podkreśla się, że poza wymiarem adaptacyjnym efekt Warburga niezależnie sprzyja progresji nowotworu. Obniżenie pH mikrośrodoiska oraz aktywacja programów transkrypcyjnych w odpowiedzi na hipoksję może prowadzić do zwiększenia sygnalizacji sprzyjającej progresji choroby. Z kolei produkty glikolizy beztlenowej wydzielane do mikrośrodoiska guza stanowią źródło materiału budulcowego do syntezy złożonych makromolekuł, których zapotrzebowanie w szybko proliferujących komórkach jest bardzo duże [32].

Do innych zmian indukowanych czynnością HIF-1 należy również stymulacja angiogenezy – dochodzi do zwiększonej ekspresji czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (ang. *vascular*

endothelial growth factor, VEGF), jego receptora VEGFR1/Flt-1 oraz czynników modulujących napięcie naczyń – indukowanej syntezy tlenu azotu, iNOS (ang. *inducible nitric oxide synthase*); oksygenazy hemowej-1 (ang. *heme oxygenase-1*, HO-1) i endoteliny-1. Utrzymanie optymalnej dostawy tlenu związane jest ze wzrostem ekspresji genów odpowiedzialnych za transport żelaza (geny ceruloplazminy, transferyny i receptora transferyny). Zmiana metabolizmu na bez-tlenową glikolizę powoduje znaczny spadek pH, produkcję dużych ilości mleczanu. Mleczan jest usuwany na zewnątrz komórki przy udziale specjalnego transportera MCT4 (ang. *monocarboxylate transporter 4*), którego ekspresja jest zależna od aktywacji HIF-1. Z kolei zależna od HIF-1 ekspresja anhidrazy węglanowej (ang. *Carbonic anhydrase*, CA) – jednego z głównych enzymów biorących udział w regulacji homeostazy pH cytozolu, odgrywa kluczową rolę w zmniejszeniu kwasicy wewnątrz komórki, przez co umożliwia przeżycie i wzrost komórkom nowotworowym w warunkach niedotlenienia. Szczególnie izoforma CAIX zależna od aktywacji HIF-1 ulega nadekspresji w warunkach hipoksji. Natomiast kwasowe środowisko przestrzeni pozakomórkowej może przyczynić się do wzrostu ryzyka inwazji i metastazy komórek nowotworowych.

HIF-1 stymuluje także ekspresję genów kodujących białka transportujące glukozę do wnętrza komórek, a także enzymy biorące udział w konwersji glukozy do pirogronianu oraz redukujące pirogronian do kwasu mlekowego. Zwiększona transkrypcja genów SLC2A1 i SLC2A3, kodujących transportery glukozy GLUT1 i GLUT3, przyczynia się do skutecznego wychwytu glukozy przez komórki guza. W celu przetrwania w mikrośrodkowisku odznaczającym się hipoksją, komórki nowotworowe zmniejszają również zapotrzebowanie na ATP. Związane jest to z ograniczeniem procesów zależnych od dużej ilości ATP, takich jak reakcje zależne od Na^+/K^+ -ATPazy. Jeśli zmniejszenie zapotrzebowania na ATP nie jest wystarczające do utrzymania odpowiedniego stosunku adenozyno-5'-trifosforanu do adenozyno-5'-difosforanu (ADP), wzrost ADP aktywuje kinazę adenylnową, która równoważy spadek poziomu ATP poprzez konwersję dwóch cząsteczek ADP w 5'-monofosforan adenozyliny (AMP) i ATP. Z kolei wzrost AMP wywołuje aktywację kinazy AMP (AMPK), która uruchamia szlaki kataboliczne, jak utlenianie kwasów tłuszczowych, i zwiększa produkcję ATP [33].

Korzyści dla nowotworu wynikające z aktywacji HIF-1 wykraczają poza adaptację do hipoksji. Niektóre guzy wykazują konstytutywną aktywację HIF-1 także w warunkach normoksyicznych

poprzez różne mechanizmy, m.in.: hiperaktywację szlaku mTORC1, utratę białka von Hippel-Lindau (vHL), akumulację RFT i niektórych metabolitów cyklu Krebsa. W komórkach nowotworowych z konstytutywną aktywacją mTORC1 niedotlenienie prowadzi do stanu zależności od dostępu do pozakomórkowych nienasyconych kwasów tłuszczowych. Pozwala to utrzymać integralność retikulum endoplazmatycznego i biosyntezę białek [33].

Hipoksja w mikrośrodkowisku guza stanowi również duży problem terapeutyczny, przyczyniając się do zwiększenia oporności na standardowe schematy leczenia. Odgrywa ona kluczową rolę w oporności na promieniowanie jonizujące stosowane w radioterapii. Większą wrażliwość nowotworu na promieniowanie jonizujące w obecności tlenu tłumaczy się zwiększoną generacją RFT oraz utrwaleniem zmian w DNA. Stosunek wrażliwości na radioterapię pomiędzy komórkami w normoksji a hipoksji (a nawet anoksji) definiuje się jako wskaźnik wzmocnienia tlenowego. Szacuje się, że hipoksyiczne guzy są ok. 3 razy mniej wrażliwe na fotonowe promieniowanie jonizujące.

Jak wspomniano, pomiędzy RFT i HIF-1 występuje ścisła współpraca, która zależy w dużej mierze od mitochondriów. Obecnie istnieją dwie teorie dotyczące oddziaływania mitochondriów z enzymami regulującymi aktywność HIF: redystrybucji tlenu oraz reaktywnych form tlenu. Hipoteza redystrybucji tlenu opiera się na fakcie, że dla aktywności enzymów modyfikujących HIF- α – PHDs (hydroksylaza prolinowa, ang. *proline hydroxylase*) i FIH-1 (czynnik hamujący HIF-1, ang. *factor inhibiting HIF-1*) niezbędna jest obecność tlenu. W komórce głównym miejscem konsumpcji tlenu są mitochondria, a w szczególności oksydaza cytochromowa. W stanie niedotlenienia enzym ten wykorzystuje większość dostępnego tlenu, co ze względu na mniejsze powinowactwo do tlenu ogranicza aktywność PHDs i FIH-1. Skutkiem tego jest inhibicja hydroksylacji białka HIF-1 α i jego stabilizacja. Hipoteza reaktywnych form tlenu została zaproponowana dla wyjaśnienia wyników eksperymentu, w którym wykazano, że aktywacja transkrypcji genów przez HIF-1 podczas hipoksji jest hamowana przez antyoksydanty (ditiokarbaminian pirolidyny oraz ebselen). Głównym źródłem RFT w komórce w stanie hipoksji są kompleksy I i III mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Niektóre wyniki sugerują, że szczególną rolę odgrywają te powstające w kompleksie III, powodując aktywację czynnika HIF. Fakt ten może wynikać z unikalnej zdolności kompleksu III do uwalniania anionorodnika ponad-tlenkowego zarówno do przestrzeni międzylonowej, jak i do macierzy mitochondrialnej [9].

Z powyższych powodów hipoksja stanowi potencjalny punkt uchwytu dla poszukiwania nowych terapii przeciwnowotworowych. Do badanych w tym kontekście substancji można zaliczyć m.in. leki aktywowane w warunkach hipoksji oraz substancje hamujące aktywność czynnika transkrypcyjnego HIF-1. Pierwsze z nich są aktywne tylko w mikrośrodkowisku guza, np. przez obniżone pH lub brak tlenu [34]. Po aktywacji mogą generować toksyczne rodniki, prowadząc do selektywnej apoptozy. Jako inhibitory HIF-1 badano związki takie jak echinomycyna, a także chetominy. Echinomycyna jest antybiotykiem o budowie cyklicznego peptydu, który wyizolowano z *Streptomycesechinatus*. Jej mechanizm opiera się na hamowaniu wiązania czynnika HIF-1 z HRE (ang. *hypoxia responsive element*), będącym elementem regulującym ekspresję genów zależnych od hipoksji na DNA [35]. Z kolei chetomin to antybiotyk wyizolowany z *Chaetomium spp.*, który hamuje przyłączenie kofaktora HIF-1 – białka p300 (ang. *p300/cyclic-AMP-response-element binding protein*). Badania wykazały, że traktowanie komórek niedotlenionych chetominem zmniejsza zależną od niedotlenienia transkrypcję i uwalnia na promieniowanie hipoksyjne ludzkie komórki w warunkach *in vitro* [36].

Podsumowanie

Trudno byłoby wyobrazić sobie możliwość powstania zaawansowanych form życia na Ziemi bez tlenu. Będąc jednym z pierwiastków biogenych, jest on nie tylko niezbędnym elementem budulcowym, ale również substratem dla najważniejszych reakcji w komórce. Jednak w związku ze swoją dużą reaktywnością chemiczną, tlen może również stanowić zagrożenie. Jego reaktywne formy powodują zmiany i modulują funkcje wielu kluczowych biocząsteczek. Oksydacyjne uszkodzenia składników komórki, a także ich ingerencja w główne szlaki przekazywania sygnału w komórce stoją u podłoża wielu chorób cywilizacyjnych. Kaskada reakcji inicjowana przez RFT prowadzi do wielokierunkowych zmian patologicznych. Wiele z tych reakcji jest dobrze poznanych i opisanych, jednak wiedza na ten temat jest jeszcze ciągle niewystarczająca, aby przeciwdziałać negatywnym skutkom RFT i skutecznie je eliminować, bez naruszenia homeostazy komórki. Dokładniejsze poznanie mechanizmów reakcji związanych ze stresem oksydacyjnym dałoby możliwość poszukiwania i projektowania nowych terapii, których celem mogłyby być cele ściśle związane ze stanem hipoksji, np. czynnik HIF-1. Liczne prace w tym

zakresie dają obiecujące wyniki, chociaż obecnie nie ma dostępnych leków [10].

Piśmiennictwo

1. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015; 97: 55–74.
2. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 2017; 86: 715–748.
3. Ścibior-Bentkowska D, Czaczo H. Komórki nowotworowe a stres oksydacyjny. *Postępy Hig Med. Dosw.* (online), 2009; 63: 58–72. Dostępny w internecie: <https://phmd.pl/api/files/view/25841.pdf>. Dostęp: 20.03.2021.
4. Kumari S, Badana AK, Murali MG, Shailender G, Malla RR. Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival. *Biomark. Insights.* 2018; 13: 1177271918755391.
5. Karpińska A, Gromadzka G. Stres oksydacyjny i naturalne mechanizmy antyoksydacyjne – znaczenie w procesie neurodegeneracji. Od mechanizmów molekularnych do strategii terapeutycznych. *Postępy Hig Med. Dosw.* 2013; 67: 43–53.
6. Pan MG, Xiong Y, Chen F. NFAT gene family in inflammation and cancer. *Curr Mol Med.* 2013; 13(4): 543–554.
7. Al Tameemi W, Dale TP, Al-Jumaily RMK, Forsyth NR. Hypoxia-modified cancer cell metabolism. *Front cel Dev Biol.* 2019; 7: 4.
8. Błaszczak-Świątkiewicz K, Olszewska P, Mikiciuk-Olasik E. Wpływ hipoksji na zmiany metabolizmu komórek nowotworowych. *Journal of Oncology* 2012; 62(4): 283–290.
9. Stachurska A, Florczyk U, Jozkowicz A, Dulak J, Loboda A. Nowe oblicza czynników indukowanych przez hipoksję – HIF-1 i HIF-2 a stres oksydacyjny. *Postępy Biochemii* 2010; 56(2): 156–64.
10. Bhattarai D, Xu X, Lee K. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) inhibitors from the last decade (2007 to 2016): A “structure-activity relationship” perspective. *Med Res Rev.* 2018; 38(4): 1404–1442.
11. Movafagh S, Crook S, Vo K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1a by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *J Cell Biochem.* 2015; 116(5): 696–703.
12. Szwed A, Miłowska K. Rola białek w chorobach neurodegeneracyjnych. *Postępy Hig Med Dosw.* 2012; 66: 187–195.
13. Kulbacka J, Sączko J, Chwilkowska A. Stres oksydacyjny w procesach uszkodzenia komórek. *Pol. Merk. Lek.* 2009; 27(157): 44–47.
14. Tarafdar A, Pula G. The Role of NADPH Oxidases and Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(12): 3824.
15. Weng M, Xie X, Liu C, Lim KL, Zhang CW, Li L. The Sources of Reactive Oxygen Species and Its Possible Role in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis.* 2018; 2018: 9163040.
16. Zhang Z, Yan J, Chang Y, ShiDu Yan S, Shi H. Hypoxia inducible factor-1 as a target for neurodegenerative diseases. *Curr. Med. Chem.* 2011; 18: 4335–4343.
17. Farina N, Llewellyn D, Isaac M, Tabet N. The use of vitamin E in the treatment of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease (AD). 2017. Cochrane library. Dostępny w internecie: https://www.cochrane.org/CD002854/DEMENTIA_use-vitamin-e-treatment-mild-cognitive-impairment-and-alzheimers-disease-ad. Dostęp: 13.09.2020.
18. Takeda A, Nyssen O, P, Syed A, Jansen E, Bueno-de-Mesquita B, Gallo V: Vitamin A and Carotenoids and the Risk of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology* 2014; 42: 25–38.
19. Chew EY, et al: Effect of Omega-3 Fatty Acids, Lutein/Zeaxanthin, or Other Nutrient Supplementation on Cognitive Function: The AREDS2 Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2015; 314(8): 791–801.
20. Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul Pharmacol.* 2015; 71: 40–56.
21. Kołodziejczyk J, Saluk J, Wachowicz B. Stres oksydacyjny – reaktywne formy tlenu i azotu w patogenezie zaburzeń układu krążenia. *Ann Acad Med. Siles.* 2011; 65(4): 63–69.
22. Santillo M, Colantuoni A, Mondola P, Guida B, Damiano S. NOX signaling in molecular cardiovascular mechanisms involved in the blood pressure homeostasis. *Front. Physiol.* 2015; 6: 194.
23. Forstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circulation Research* 2017; 120(4): 713–735.
24. Jopkiewicz S. Stres oksydacyjny. Część I. Stres oksydacyjny jako czynnik rozwoju chorób cywilizacyjnych. *Med. Środow.* 2018; 21(2): 48–52.

25. Li X, Zhang Q, Nasser MI, et al. Oxygen homeostasis and cardiovascular disease: A role for HIF?. *Biomed Pharmacother.* 2020; 128: 110338.
26. Sorriento D, De Luca N, Trimarco B, Iaccarino G. The Antioxidant Therapy: New Insights in the Treatment of Hypertension. *Front Physiol.* 2018; 9: 258.
27. Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, et al. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *Int J Mol Sci.* 2014; 16(1): 193–217.
28. Sawicka E, Lisowska A, Kowal P, Długosz A. Rola stresu oksydacyjnego w raku pęcherza moczowego. *Postepy Hig Med. Dosw.* 2015; 69: 744–752.
29. Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements cannot be recommended for gastrointestinal cancer prevention. 2008. Cochrane Library. Dostępny w internecie: https://www.cochrane.org/CD004183/LIVER_antioxidant-supplements-cannot-be-recommended-for-gastrointestinal-cancer-prevention. Dostęp: 13.09.2020.
30. Athreya K, Xavier MF. Antioxidants in the Treatment of Cancer. *NutrCancer.* 2017; Nov-Dec: 69(8): 1099–1104.
31. Hitosugi T, Chen J. Post-translational modifications and the Warburg effect. *Oncogene* 2014; 33: 4279–4285.
32. Gasińska A, Janecka A, Adamczyk A, Slonina D. Jak oddychają komórki nowotworowe. Nowotwory. *Journal of Oncology* 2013; 63(2): 124–131.
33. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* 2016; 2: e1600200.
34. Manoochehri Khoshinani H, Afshar S, Najafi R. Hypoxia: A Double-EdgedSword in CancerTherapy. *Cancer Invest.* 2016; Nov 25; 34(10): 536–545.
35. Owczarek A, Gieczewska K, Jarzyna R, Jagielski AK, Kiersztan A, Gruza A, Winiarska K. Hypoxia increases the rate of renal gluconeogenesis via hypoxia-inducible factor-1-dependent activation of phosphoenolpyruvatecarboxykinase expression. *Biochimie* 2020; Apr-May: 171–172: 31–37.
36. Staab A et al. Effects of HIF-1 inhibition by chetomin on hypoxia-related transcription and radiosensitivity in HT 1080 human fibrosarcoma cells. *BMC Cancer.* 2007; 7: 213.