

Oxidační stres a jeho vztah ke komplikacím diabetu

prof. MUDr. Jan Škrha, DrSc.

III. interní klinika 1. LF UK v Praze

Oxidační stres při diabetu je v současné době považován za klíčovou příčinu rozvoje pozdních komplikací. Je současně spojujícím článkem mezi jednotlivými patogenetickými pochody, které se účastní rozvoje cévních změn. Hyperglykemie, která je hlavním vyvolavatelem vystupňovaného oxidačního stresu, vede zejména v kombinaci s dyslipoproteinemií k urychlené aterogeneze. V přehledu jsou uvedeny základní spojitosti mezi oxidačním stresem a mechanismy vedoucími k postižení cévní stěny. Hlavním cílem je proto intenzivní léčba diabetu a přidružených rizikových faktorů, což pak následně může snížit úroveň oxidačního stresu a zpomalit vývoj cévních změn.

Klíčová slova: oxidační stres, diabetes mellitus, patogenetické mechanismy, chronické cévní komplikace.

Oxidative stress and its relationship to diabetes compliations

Oxidative stress in diabetes is considered at present time as a key cause in development of late complications. It is contemporary binding element between separate pathogenic pathways participating at development of vascular changes. Hyperglycemia, which is the main source of accelerated oxidative stress, induces especially in combination with dyslipoproteinemia advanced atherogenesis. Main associations between oxidative stress and mechanisms leading to vascular wall changes are summarized in this overview. The main goal is therefore the intensive diabetes therapy as well as the treatment of associated risk factors which may decrease oxidative stress and slow down development of vascular changes.

Key words: oxidative stress, diabetes mellitus, pathogenic mechanisms, chronic vascular complications.

Interní Med. 2010; 12(9): 414–418

Diabetes mellitus provázejí chronické komplikace, k nimž dochází vlivem následků způsobených metabolickými změnami při nedostatku inzulínu. Jsou postiženy buňky i mimobuněčná hmota, u nichž podmiňuje zvýšená koncentrace glukózy funkční a morfologické abnormality, a tím dochází k postupnému zhoršování funkce orgánů a tkání a nakonec až k jejich selhání. Tyto změny jsou bezprostředně spjaté s biochemickými abnormalitami provázejícími diabetes jako jeho integrální součást, a proto chronické komplikace diabetu jsou v podstatě jeho chronickými následky. Porucha vedoucí k hyperglykemii je sice společná pro různé typy diabetu (absolutní nebo relativní nedostatek inzulínu), avšak rozvoj komplikací nezávisí jen na metabolických abnormalitách, ale též na genetické dispozici, která může jak zesilovat, tak oslabovat vliv metabolických změn na jednotlivé tkáně. Podstata této genetické dispozice však zatím není známa. Předpokládá se kombinace více genů, jde tedy o polygenně podmíněný sklon ke komplikacím. Výsledkem biochemických odchylek a jejich vzájemných interakcí jsou zejména poruchy cévní stěny podílející se následně i na patologických změnách tkání.

Oxidační stres jako následek metabolických změn při diabetu

Hlavním vyvolávajícím faktorem rozvoje komplikací při diabetu je chronická hypergly-

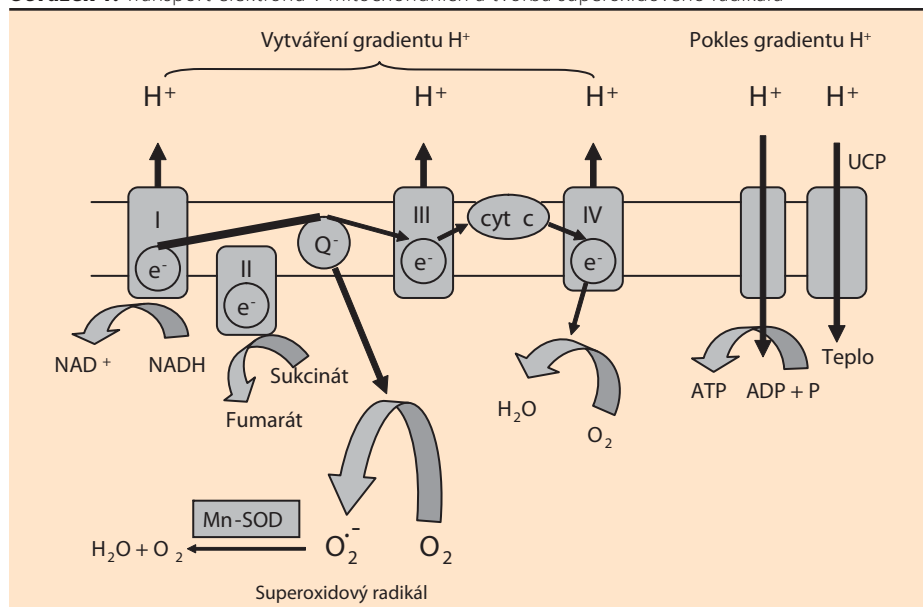
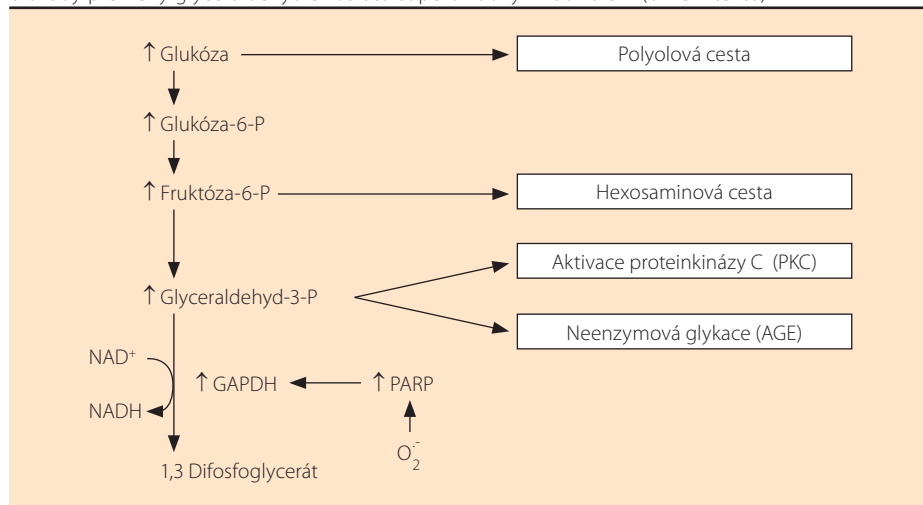
kemie, která působí jak na cirkulující krevní elementy, tak na endotelové buňky a nepřímo i na fibroblasty a další buňky intersticia. Vlivem zvýšené koncentrace glukózy se mění nejen kvantitativní průběh reakcí, ale jsou vystupňovány pochody, při nichž vznikají produkty podmiňující poruchu regulace funkce buněk i pojiva (1). Podstata spočívá ve struktuře samotné glukózy, která umožňuje, aby jednak reagovala s proteiny a měnila jejich vlastnosti, jednak aby se spontánně oxidovala (tzv. autooxidace) a vytvářela tak reaktivní meziprodukty (glyoxal, metylglyoxal) a přitom umožnila vznik reaktivním formám kyslíku (ROS).

Vystupňovaný oxidační stres je výrazem nepochopitelnosti mezi tvorbou ROS, někdy ne zcela správně označovaných jako kyslíkové radikály, a jejich „odklížením“ enzymovým nebo neenzymovým systémem. Efektivita tohoto procesu pak závisí na kapacitě, resp. na schopnosti aktivace tohoto úklidového systému při zvýšené nabídce ROS.

Zatímco původně jednotlivé teorie patogenese diabetických komplikací se snažily vysvětlit vztah glukózy k cévním změnám samostatně, řada experimentálních prací využívajících inhibice těchto mechanismů doložila, že efekt je pouze částečný. Bližší objasnění přinesly práce Brownleeho, který poukázal na vnitřní vztahy a souvislosti mezi jednotlivými pochody formování jednotli-
cívho mechanismu (2).

Buňky reagují na okolní zvýšenou koncentraci glukózy odlišně. Zatímco u jedné je vytvořen ochranný mechanismus, který snižuje při vyšší koncentraci vstup glukózy do buňky (např. ve svaly hyperglykemie snižuje transport glukózy zprostředkovaný transportéry GLUT4 „regulovanými dolů“), jiné nejsou chráněny a u nich pak dochází k transportu glukózy podle koncentračního spádu (3). K těmto buňkám patří i endotelie, u nichž glukózový transportér GLUT1 nepodléhá při hyperglykemii regulaci dolů (tzv. down-regulaci), která by pak snížila vstup glukózy do buňky.

Zvýšená intracelulární koncentrace glukózy podmiňuje vystupňovanou glykolýzu s následným zpracováním pyruvátu v Krebsově cyklu. Tím se zvyšuje nabídka elektronů pro dýchací řetězec v mitochondriích, který sestává ze čtyř proteinů (I, II, III, IV), komplexu Q a cytochromoxidázy (obrázek 1). Přenašeče elektronů NADH a FADH₂ však dodávají při hyperglykemii do řetězce tolik elektronů, že gradient napětí na membráně mitochondrie dosáhne kritické hodnoty a komplex III se zablokuje. Elektrony z komplexu Q pak alternativně vytvářejí z molekulárního kyslíku superoxidový radikál. Jeho vyšší tvorba znamená nebezpečí pro normální průběh reakcí uvnitř buňky, včetně poruchy v genomu, tedy DNA, jejíž mutace se účinně opravují reparačními enzymy. V buněčném jádře takto působí

Obrázek 1. Transport elektronů v mitochondriích a tvorba superoxidového radikálu**Obrázek 2.** Lokalizace patogenetických cest chronických komplikací diabetu v glykolýze a vliv blokady přeměny glyceraldehyd-3-fosfátu superoxidovým radikálem (blíže v textu)

polymeráza ADP-ribózy (PARP), která reparuje DNA. Vlivem superoxidového radikálu se aktivuje polymeráza ADP-ribózy, která inhibuje klíčový enzym glykolýzy, glyceraldehydfosfátdehydrogenázu. Tím se však blokuje přeměna glukózy na pyruvát a substráty lokalizované retrográdně mezi glyceraldehydfosfátem a glukózou se pak hromadí (obrázek 2). Zvyšuje se tudíž jejich nabídka pro alternativní zpracování ve čtyřech cestách, které jsou patogenetickými mechanismy rozvoje komplikací (neenzymová glykace, aktivace proteinkinázy C, hexosaminová cesta a polyolová cesta) (4). Experimentálně bylo doloženo, že blokování tvorby superoxidového radikálu přidáním enzymu superoxiddismutázy (SOD) nebo prostřednictvím uncoupling proteinu (UCP), který snižuje gradient napětí na membráně mitochondrie, vede k poklesu tvorby produktů ve všech čtyřech zmíněných cestách.

Podobně jako hyperglykemie působí stejným mechanismem volné mastné kyseliny, jejichž koncentrace je zvýšená u diabetiků 2. typu též vlivem inzulínové rezistence. Beta-oxidací vznikající acetylkoenzym A se stává stejným zdrojem pro Krebsův cyklus jako glukóza. Zvýšený tok elektronů přes dýchací řetězec má pak stejné důsledky pro blokádu glykolýzy. Znamená to, že i změny postihující arterie v rámci diabetické makroangiopatie mají obdobný původ, neboť zpracování glukózy i volných mastných kyselin přes Krebsův cyklus je identické. Vedle toho se však účastní na poruše cévní stěny i lipidy modifikované kombinovaně oxidací a glykací (glykoxidované lipidy), které jsou významným urychlovačem aterosklerotických změn.

Pro celkový průběh a úroveň (hladinu) oxidačního stresu mají význam antioxidantní mechanismy, jejichž selhání může být nakonec

mohutným stimulatorem změn. Dokonce se zdá, že právě selhání antioxidantních mechanismů je hlavní příčinou diabetických změn včetně angiopatie.

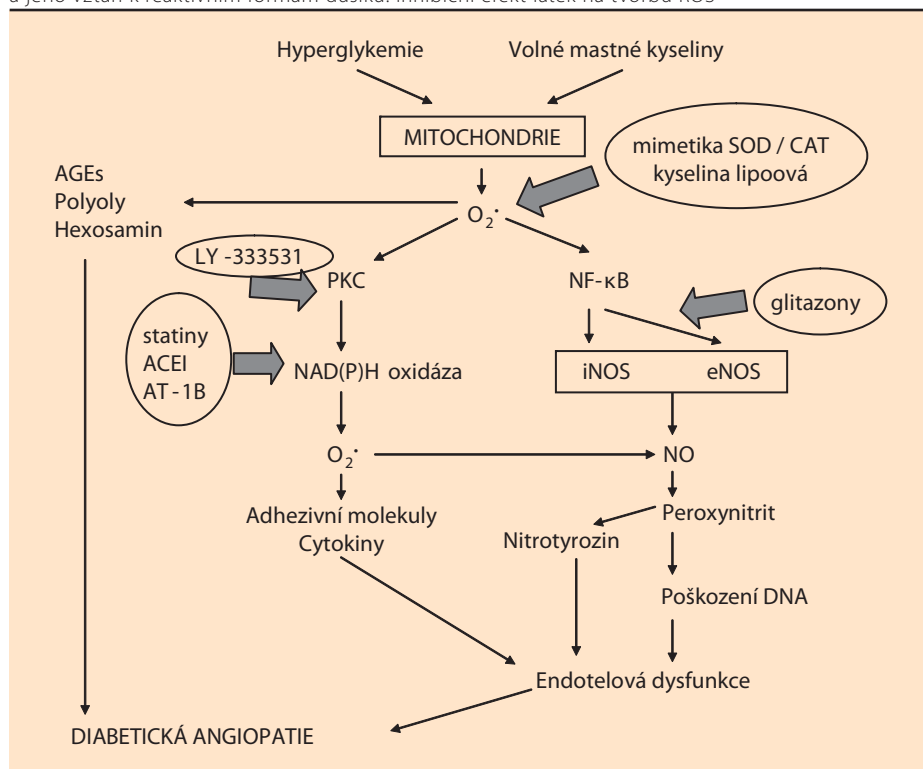
Chronické komplikace jako důsledek selhání scavengerového systému

Postižení tkání závisí na obranných mechanismech organismu, které čelí vystupňovanému oxidačnímu stresu. Zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku může být „neutralizována“ dostatečnou kapacitou aktivovaného scavengerového systému, který brání změnám postihujícím buňky cévní stěny. Pokud se kapacita antioxidantního systému zvýší při vyšší tvorbě reaktivních forem kyslíku, organismus udrží úroveň oxidačního stresu na fyziologické hladině. Tento fenomén byl pozorován při navození akutní hyperglykemie, která podminila vzestup aktivity superoxiddismutázy (5). Jednotlivé enzymy však mohou reagovat rozdílně, což se pak projeví buď prooxidačně, nebo antioxidantně (5).

Jinak tomu bývá při chronické expozici vysoké koncentraci glukózy. Při ní se mohou uplatnit okolnosti podmíněné endogenně nebo exogenně, které zamezí patřičné ochraně antioxidantním systémem. V prvním případě jde o geneticky podmíněnou změnu, v širším kontextu chronických komplikací nejspíše polygenně způsobenou, při níž určité polymorfismy snižují účinnost daných enzymů, které při vyšších nárocích organismu nejsou schopny vykompenzovat stav zvýšením aktivity. Ve druhém případě pak může dojít k uplatnění „paměti z hyperglykemie“. Vlivem vysoké koncentrace glukózy dochází nejen k vyšší produkci reaktivních forem kyslíku, ale též k aktivaci transkripčního faktoru NF-κB a ke změnám v expresi proteinů. Dochází i k mutacím nukleových kyselin, které se reparují patřičnými endonukleázami. Při změně však může vzniknout nový polymorfismus, který ovlivní vlastnosti daného proteinu. Tyto změny byly pozorovány zejména u proteinů s dlouhým biologickým poločasem, ale nelze vyloučit i ovlivnění enzymů.

Náchylnost jedinců k pozdním komplikacím při diabetu je rozdílná. U některých výborně kompenzovaných diabetiků byl pozorován poměrně časný rozvoj komplikací a naopak diabetici s dlouhodobě neuspokojivou kontrolou diabetu měli poměrně malé změny ve smyslu diabetické mikroangiopatie. Zdá se tedy, že genetické změny antioxidantních enzymů mohou způsobit nedostatečnou ochranu před reaktivními molekulami kyslíku a tím usnadnit vznik

Obrázek 3. Vliv hyperglykemie a volných mastných kyselin na tvorbu superoxidového radikálu a jeho vztah k reaktivním formám dusíku. Inhibiční efekt látek na tvorbu ROS



komplikací. Naopak dobře a pružně reagující komplex enzymů může snížit úroveň oxidačního stresu a tím působit protektivně.

V popředí pozornosti jsou proto v současné době látky stimulující ochranný systém. Použití antioxidantů (SOD, CAT) se zdá perspektivní, i když se zatím zkouší jen v experimentálních studiích. Vedle toho řada běžně užívaných léků, jako jsou statiny, inhibitory angiotenzin-konvertujícího enzymu nebo thiazolidindiony, může působit na oxidační stres. Také u koenzymu Q (10), který je účinným antioxidantem, bylo popsáno zlepšení endotelové dysfunkce, které se vysvětluje spojením ("recoupling") endotelové syntázy oxidu dusnatého (eNOS) a oxidativní fosforylace v mitochondriích (6). Naopak rozpojení domén eNOS vede k oxidaci molekulárního kyslíku na superoxid, kdežto tvorba oxidu dusnatého je snížena.

Vedle oxidačního stresu se rozvíjí i tzv. nitrační stres, při němž vznikají reaktivní formy dusíku.

Nitrotyrozin

Oxidační stres má úzký vztah k rozvoji endotelové dysfunkce, jak vyplývá ze snížené dostupnosti oxidu dusnatého při jeho likvidaci superoxidovým radikálem a přeměnou na peroxynitritový radikál (obrázek 3). Tato nestabilní látka reaguje s tyrozinem obsaženým v proteinech za vzniku nitrotyrozinu, který má cytotoxické

účinky (7). V endotelové buňce reaguje oxid dusnatý se superoxidovým radikálem tvořeným při přeměně prostanoidů vlivem zvýšené koncentrace glukózy. Tím se snižuje množství, a tedy i dostupnost oxidu dusnatého pro vazodilatační efekt a další jeho příznivé účinky (8). Dále se nedostatek oxidu dusnatého projevil i poruchou angiogeneze v myokardu (9). Nitrotyrozin obsažený v molekule enzymu snižuje jeho katalytickou aktivitu, což bylo popsáno u superoxid-dismutázy nebo prostacyklinsyntázy (10).

Pokročilé produkty glykace

S oxidačním stresem souvisejí i pokročilé produkty glykace (AGE, advanced glycation endproducts), které ovlivňují v buňce řadu signálních molekul. Snižují expresi endotelové NO syntázy, zvyšují expresi endotelinu 1, aktivují nukleární faktor NF-kappaB, který indukuje řadu růstových faktorů (TGF-beta, VEGF), snižují tvorbu prostacyklinu, indukují expresi inhibitoru tkáňového aktivátoru (PAI-1) a konečně stimulují expresi cytoadhezivních molekul v endotelu (11). Proto se zkouší řada látek blokujících tvorbu nebo působení AGE. Zatímco aminoguanidin se pro toxicitu nerozšířil, podobně účinné jsou inhibitory enzymu konvertujícího angiotenzin (ACEI) (12). Mechanismus spočívá v blokádě NADPH oxidázy, která je považována za klíčový enzym ovlivňující endotelovou dysfunkci. Enzym je významným aktivátorem tvorby superoxidového

radikálu v endotelových buňkách. Potlačení jeho aktivity může tudíž významně snížit úroveň oxidačního stresu, ale i stresu nitračního (obrázek 3).

Aktivace proteinkinázy C

Další patogenetický mechanismus rozvoje cévních komplikací je spřažen s enzymem proteinkinázou C (PKC). Enzym PKC se aktivuje vlivem diacylglycerolu (DAG) vznikajícího z membránových fosfoinositidů. Aktivovaná PKC pak indukuje expresi některých růstových faktorů, zasahuje do exprese nukleárního faktoru NF-kappaB, indukuje VEGF a endotelin-1 a ovlivňuje jejich účinky. Touto cestou se zvyšuje i tvorba reaktivních forem kyslíku (13). Naproti tomu však samotný superoxid aktivuje PKC, což dokládá oboustrannou propojenost PKC s oxidačním stresem. Použití specifických inhibitorů PKC vedlo ke snížení nežádoucích účinků a ke zlepšení endotelové dysfunkce. Zatím se inhibitory PKC nerozšířily do klinické praxe.

Růstové faktory

Se zvýšenou hladinou oxidačního stresu souvisí i aktivace a působení růstových faktorů, které se často uplatňují synergicky a ve svých účincích se doplňují nebo zesilují. Tkáňová hypoxie je jedním ze stimulů zvyšujících expresi TGFbeta a VEGF zesilujících angiogenezi. Efekt VEGF v neovaskularizaci se plně rozvíjí pod vlivem IGF-1 a podobně se doplňují FGF a PDGF. Často to bývá ve tkáni, kde je zvýšená tvorba ROS. VEGF je mediátorem angiogeneze a permeability cévní stěny (14). Jeho exprese v různých částech řečiště může být různá. Zatímco zvýšený obsah byl asociován s patologickými změnami v retině a ledvinách, naopak jeho snížená exprese v myokardu i defektní odpověď při neuropatii svědčí o limitovaných možnostech neovaskularizace v těchto orgánech či tkáních. To pak může omezovat jeho klinické využití. Úloha TGFbeta v ledvinách při rozvoji změn mesangia, resp. nefropatie byla opakovaně doložena včetně efektu protilátek snižujících expanzi mesangia.

Závěr

Uvedené mechanismy, u nichž je hyperglykemie základním spouštěcím podnětem, jsou úzce spojeny s oxidačním stresem, což dokládá i samotný význam oxidačního stresu pro rozvoj cévních změn. Posun rovnováhy mezi tvorbou ROS a jejich likvidací ve prospěch jejich zvýšené koncentrace znamená vystupňování řady dějů, které se podílejí na chronických komplikacích diabetu.

Dosažení co nejlepší kompenzace diabetu je tudíž zdůvodněnou prevencí pozdních komplikací. Současně je třeba zdůraznit, že tato snaha by neměla být prováděna v klinické praxi rozkolísáním glykemií se zvýšenou frekvencí hypoglykemií, neboť následné reaktivní hyperglykemie jsou nebezpečnější pro rozvoj cévních změn než konstantní hyperglykemie (15). Tyto reakce by proto měly vždy vést k zamyšlení nad příčinou a k jejich odstranění úpravou farmakoterapie diabetu.

Literatura

1. Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 1992; 263: H321–H326.
2. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54: 1615–1625.
3. Kaiser N, Sasson S, Feener EP, et al. Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes* 1993; 42: 80–89.
4. Škrha J. Biochemie a patofyziologie. In: Škrha J, et al. *Diabetologie*. Galén 2009: 33–75.
5. Weidig P, McMaster D, Bayraktutan U. High glucose mediates pro-oxidant and antioxidant enzyme activities in coronary endothelial cells. *Diabetes Obesity Metabolism* 2004; 6: 432–441.
6. Chew GT, Watts GF. Coenzyme Q (10) and diabetic endotheliopathy: oxidative stress and the “recoupling hypothesis”. *Quat J Med* 2004; 97: 537–548.
7. Kowluru RA. Effect of reinstitution of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes* 2003; 52: 818–823.
8. Studer RK, Derubertis FR, Craven PA. Nitric oxide suppresses increases in mesangial cell protein kinase C, transforming growth factor beta, and fibronectin synthesis induced by thromboxane. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 999–1005.
9. Zhao X, Lu X, Feng Q. Deficiency in endothelial nitric oxide synthase impairs myocardial angiogenesis. *Am J Cardiol* 2002; 283: H2371–H2378.
10. Zou MH, Shi C, Cohen RA. High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H (2) receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells. *Diabetes* 2002; 51: 198–203.
11. Basta G, Lazzerini G, Massaro M, et al. Advanced glycation endproducts activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation* 2002; 105: 816–822.
12. Forbes JM, Cooper ME, Thallas V, et al. Reduction of the accumulation of advanced glycation endproducts by ACE inhibition in experimental diabetic nephropathy. *Diabetes* 2002; 51: 3274–3282.
13. Cosentino F, Eto M, DePaolis P, et al. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* 2003; 107: 1017–1023.
14. Ferrara N, Gerber HP, Lecouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669–676.
15. Risso A, Mercuri F, Quagliaro L, et al. Intermitent high glucose enhances apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in culture. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281: E924–E930.

prof. MUDr. Jan Škrha, DrSc.

*III. interní klinika 1. LF UK v Praze
U Nemocnice 1, 128 08 Praha 2
jan.skrha@lf1.cuni.cz*
