Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Nukleární transkripční faktor NrF2

Bakalářská práce

2020 Nikola Suchá

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Nikola Suchá**
Osobní číslo:	**C17216**
Studijní program:	**B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor:	**Zdravotní laborant**
Téma práce:	**Nukleární transkripční faktor Nrf2**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Seznamte se s problematikou poškození buněk cévní stěny oxidačním stresem v souvislosti s věkem a prozánětlivými signálními cestami v buňkách cévní stěny a jejich úlohou v patogenezi ischemické choroby srdeční a dalších onemocnění srdce a cév se zaměřením na úlohu transkripčního faktoru Nrf2 v obraně buněk proti oxidačnímu stresu a stárnutí (vascular aging), uveďte strukturu, výskyt, fungování, degradaci Nrf2.

Proveďte literární rešerši k této problematice, při vyhledávání literárních údajů využijte elektronické databáze Science Direct, NCBI Pubmed, Web of Science.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **MUDr. Vladimíra Nováková Mužáková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kanďár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 3.7.2020

Nikola Suchá

PODĚKOVÁNÍ

Tímto způsobem bych chtěla poděkovat vedoucí své bakalářské práce MUDr. Vladimíře Novákové Mužákové, Ph.D. za její cenné rady a připomínky, trpělivost a čas, který mi věnovala při zpracování daného tématu. Poděkování patří také mé rodině a přátelům, kteří mi byli oporou v průběhu celého studia, poskytli mi příjemné a klidné zázemí a bez jejichž podpory bych tuto práci nemohla dokončit.

ANOTACE

Cílem práce je seznámení s nukleárním transkripčním faktorem Nrf2, jeho strukturou a funkcí v organismu. Práce popisuje vznik oxidačního stresu působícího na organismus a jeho souvislost s rozvojem onemocnění kardiovaskulárního systému jako jsou ateroskleróza, či onemocnění srdce v souvislosti s diabetem. Poukazuje na souvislost těchto onemocnění s Nrf2 a zabývá se možností jeho využití v terapii. Shrnuje základní principy aktivace i inhibice Nrf2.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nrf2, KEAP1, oxidační stres, reaktivní formy kyslíku, ateroskleróza

TITLE

Nuclear transcription factor Nrf2

ANNOTATION

Purpose of this work is basic description of the Nuclear transription factor Nrf2, its structure and function. Bachelor thesis describes the origin of oxidative stress and its effect on human organism. It focuses on the connection between oxidative stress and cardiovascular diseases, such as atherosclerosis and diabetes induced heart disease. It points out the link between these diseases and Nrf2 and submits its therapeutic abilities. It summarizes basic principles of activation and inhibition of Nrf2.

KEYWORDS

Nrf2, KEAP1, oxidative stress, reactive oxygen species, atherosclerosis

OBSAH

ÚVOD 10

1. Struktura Nrf2 11

2. Vztah Nrf2 a KEAP1 13

2.1. Struktura KEAP1 13

3. Degradace Nrf2 15

3.1. Degradace závislá na KEAP1 15

3.2. Degradace nezávislá na KEAP1 16

3.3. Proteasom 17

4. Účinky Nrf2 19

4.1. Oxidační stres 19

4.2. Reakce organismu na oxidační stres 20

5. Onemocnění spojená s oxidačním stresem 23

5.1. Oxidační stres a poškození buněk cévní stěny 23

5.1.1. Rozvoj aterosklerózy 24

5.1.2. Systémy produkující ROS při ateroskleróze 26

5.1.3. Úloha Nrf2 při ateroskleróze 29

5.2. Ischemická choroba srdeční 30

5.3. Kardiovaskulární onemocnění ve spojení s diabetem 30

6. Antioxidační odpověď organismu 32

6.1. Ovlivnění onemocnění pomocí Nrf2 32

6.1.1. Nejdůležitější antioxidační systémy 33

7. Terapeutický potenciál Nrf2 35

7.1.1. Exogenní aktivátory Nrf2 35

7.1.2. Exogenní inhibitory Nrf2 39

8. Závěr 40

POUŽITÁ LITERATURA 41

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Struktura Nrf2 znázorňující sedm domén Neh1-Neh7.....11
Obrázek 2: Struktura KEAP1 znázorňující 5 domén (Jiang, 2015).....14
Obrázek 3: Schéma a rozdíly degradace pomocí KEAP1 a β-TrCP.....16
Obrázek 4: Schéma uvolnění Nrf2 z jeho oxidovaného inhibitoru.....22
Obrázek 5: Proces vzniku aterosklerózy. 26
Obrázek 6: Schéma vzniku rozpojené eNOS. 28
Obrázek 7: Porovnání regulace Nrf2 za různých podmínek.. 37

Tabulka 1: Přehled některých, v dnešní době nejužívanějších, aktivátorů Nrf2.....38

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

Nrf2	Nukleární transkripční faktor (z angl. *nuclear factor erythroid 2–related factor 2*)
KEAP1	Kelch-like-ECH asociovaný protein
ROS	Reaktivní formy kyslíku (*reactive oxygen species*)
RNS	Reaktivní formy dusíku (*reactive nitrogen species*)
ARE	Antioxidační responzivní elementy
ICHS	Ischemická choroba srdeční
NQO-1	NADPH quinon dehydrogenasa 1
HO-1	hemoxygenasa 1
GCL	glutamát-cystein ligasa
GST	glutathion-S-transferasa
GPx	glutathion peroxidasa
SOD	superoxid dismutasa

ÚVOD

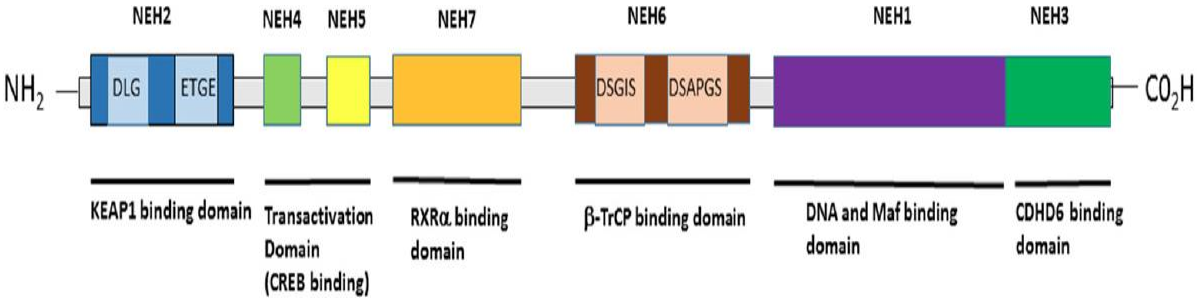
Nukleární transkripční faktor Nrf2 (z anglického *nuclear factor erythroid 2–related factor 2*) je signální molekula, která reguluje transkripci celé řady cytoprotektivních genů, čímž pomáhá organismu v překonání oxidačního stresu, udržování homeostázy a zdravého buněčného fenotypu. Bylo zjištěno, že Nrf2 dokáže působit v prevenci vzniku kardiovaskulárních onemocnění, diabetu, aterosklerózy, neurodegenerativních onemocnění, a dalších. V současnosti je snaha o prozkoumání jeho terapeutických účinků a jejich využití při ovlivnění vývoje těchto stavů a jejich léčby.

S přibývajícím věkem je na tělo kladena stále větší oxidační zátěž spojená se zvýšeným oxidačním stresem. Tento stav je způsoben větším množstvím reaktivních forem kyslíku (ROS) tvořených v buňkách cévních stěn. Zestárlé endoteliální buňky, oproti mladým a fenotypově zdravým buňkám, nejsou natolik schopné vyrovnávat se s oxidačním stresem, jelikož ztrácí schopnost antioxidační odpovědi řízené pomocí Nrf2. Tento stav velmi přispívá ke vzniku aterosklerózy a jejím komplikacím – infarktu myokardu, ischemické choroby srdeční až srdečnímu selhání.

1. Struktura Nrf2

Nukleární transkripční faktor Nrf2, objevený v roce 1994, je produktem genu NFE2L2 a strukturně se řadí do skupiny CNC (*cap'n'collar*) transkripčních faktorů – sobě navzájem velmi podobných transkripčních faktorů, kam dále řadíme např. faktory p45 NFE2, Nrf1 a Nrf3. Tato skupina je podrodinou tzv. leucinových zipů (bZip). Leucinový zip je strukturní motiv u proteinů vázajících se na DNA. Je tvořen dvěma α-helixy, v nichž každý sedmý aminokyselinový zbytek je leucin. Díky němu může protein vytvářet hydrofobní spoj, který se podobá zapnutému zipu, a slouží k dimerizaci dvou podjednotek. (Sykiotis, 2010; Kodíček 2004).

NrF2 je protein složený z 605 aminokyselin o hmotnosti 67 827 Da. Transkripční faktor obsahuje sedm Nrf2-ECH homologních domén (zkráceně Neh 1-7), z nichž každá plní svou specifickou funkci (viz obr. 1).



Obrázek 1: Struktura Nrf2 znázorňující sedm domén Neh1-Neh7 (Paramasivan, 2019)

Domény Neh1, Neh3 a Neh6 jsou lokalizovány blíže k C-konci, domény Neh2, Neh4, Neh5 a Neh7 se nacházejí na N-konci faktoru Nrf2.

Doména Neh1 zahrnuje základní leucinový zip. Jedná se o strukturní motiv, který zprostředkovává vazbu s DNA a zabezpečuje heterodimerizaci s dalšími transkripčními faktory, především s malými Maf (= *musculoaponeurotic fibrosarcoma.)* Skupina malých Maf proteinů (také sMaf – s = small) patří stejně jako Nrf2 do skupiny leucinových zipů. sMaf skupina zahrnuje tři důležité členy, kterými jsou MafF, MafG a MafK proteiny (Motohashi, 2004). Heterodimery Nrf2-sMaf pak fungují jako aktivní transkripční faktory regulující transkripci antioxidačních responzivních elementů (ARE).

Neh2 doména slouží jako degron, tedy část proteinu starající se o jeho míru degradace. Umožňuje vazbu s proteinem KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), což je přirozený inhibitor Nrf2 a zajišťuje degradaci Nrf2 za fyziologických „nestresových" podmínek. Jedna molekula Nrf2 asociuje se dvěma molekulami KEAP1 (tj. homodimerem KEAP1). Nese dva strukturní vazebné motivy, a to DLG a ETGE. Motiv DLG má k proteinu KEAP1 nižší afinitu než ETGE (Suzuki, 2016).

Domény Neh3, Neh4 a Neh5 jsou důležité pro transaktivační funkci Nrf2. Neh3 doména, situovaná na karboxylovém konci, interaguje s transkripčním koaktivátorem CHD6 (chromo-ATPasa/helikasa DNA-vázající protein) a Neh4 s Neh5 se váží s CH3 skupinami dalších faktorů, např. CBP (CREB-vázající protein), a všechny spolu postupně spouští transkripci genů závislých na ARE (Namani, 2014).

Doména Neh6 je oblast bohatá na serin. Jedná se o druhou část v molekule Nrf2, která slouží jako degron, a to degron nezávislý na KEAP1. Obsahuje dva základní strukturní motivy, DSGIS a DSAPGS, které interagují s *β-transducin repeat-containing proteinem* (β-TrCP). Tato vazba zapříčiňuje degradaci Nrf2 za stresových podmínek v buněčném jádře (Namani, 2014; Suzuki, 2016).

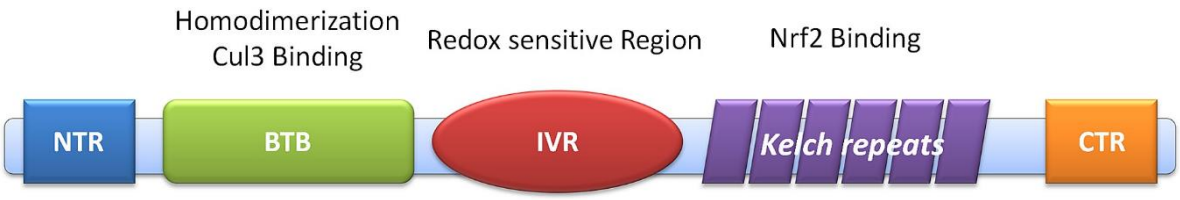
Poslední doména, Neh7, byla objevena poměrně nedávno. Asociuje s DNA-vázající doménou retinoidního X receptoru α a tím zmírňuje expresi genů závislých na antioxidačních responzivních elementech (Wang, 2013).

2. Vztah Nrf2 a KEAP1

KEAP1 (*Kelch-like erythroid cell-derived protein with Cap'n'collar homology (ECH) associated protein 1*) je hlavní regulátor Nrf2. Jedná se o tzv. negativní regulátor. To znamená, že za normálních okolností, tj. nestresových podmínek, kotví faktor Nrf2 v cytoplazmě. Díky 27 cysteinovým zbytkům v jeho molekule, které jsou náchylné k oxidaci, slouží jako citlivý senzor pro redoxní změny endogenního i exogenního původu. V závislosti na oxidaci cysteinů poté uvolňuje Nrf2 z vazby, aby mohlo následně dojít k transkripci důležitých cytoprotektivních látek (Robledinos-Antón, 2019).

2.1. Struktura KEAP1

KEAP1 je specifický substrátový adaptorový protein pro BCR (BTB-Cul3-Rbx1) E3 ubikvitin ligasu a slouží jako klíčový senzor pro oxidační či elektrofilní stres. Skládá se z 624 aminokyselin. V rámci struktury nacházíme pět domén (viz obr. 2). Na N-konci se nachází doména NTR (*N-terminal region*). Tu následuje doména BTB složená z *broad-complex, tram-track* a *brick-a-brack* proteinů, která zajišťuje homodimerizaci KEAP1 a je důležitá pro jeho následnou interakci s *Cullin 3* proteinem a zajišťuje ubikvitinaci Nrf2. Dále obsahuje cysteinové zbytky, které jsou citlivé na redoxní změny v buňce. Nejcitlivější na tyto redoxní změny je ovšem doména třetí v pořadí s názvem IVR (*intervening region*). Tato doména se vyznačuje svojí poměrně velkou bohatostí na cystein, díky kterému při sebemenších redoxních změnách ovlivňuje celou funkci KEAP1. Předposlední doména se nazývá DGR (*double-glycine repeat*) a zahrnuje šest *Kelch-repeating* motivů podněcujících interakce protein-protein (PPI) s regulátory KEAP1 včetně faktoru Nrf2 nebo například p62. Jako poslední na C-konci KEAP1 leží doména CTR (*carboxy terminal region*). DGR a CTR domény společně tvoří tzv. DC domény, které se starají o vazbu Neh2 domény Nrf2 (Panieri, 2019; Leung, 2019).



Obrázek 2: Struktura KEAP1 znázorňující 5 domén (Jiang, 2015)

3. Degradace Nrf2

Nrf2 má biologický poločas přibližně 10-30 minut a je držen na nízké bazální koncentraci pomocí jeho represorů v cytoplazmě. To jsou proteiny, které zajišťují ubikvitinaci a degradaci Nrf2. K degradaci může dojít různými způsoby a za přispění různých látek. Nejzákladnější rozdělení je však dělení na degradaci závislou a nezávislou na KEAP1.

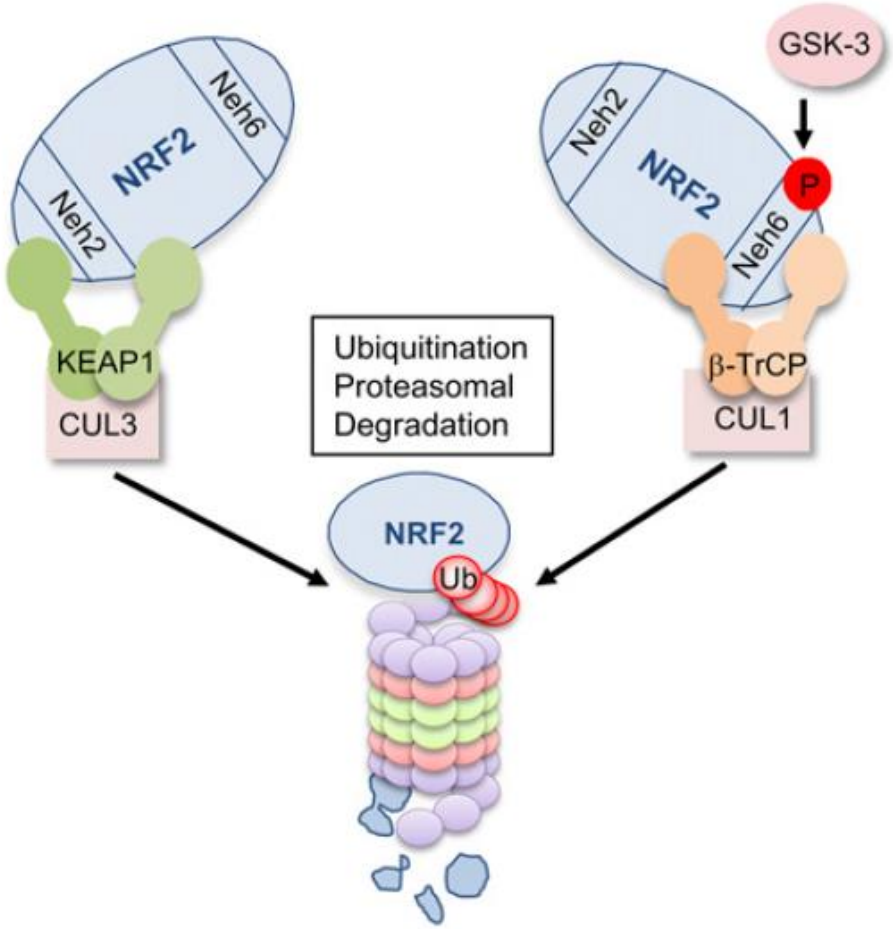
3.1. Degradace závislá na KEAP1

Jedná se o fyziologickou regulaci Nrf2. KEAP1 je ukotven v cytoskeletu a má v buňce dvě funkce. Za prvé kotvící funkci – udržuje Nrf2 v cytoplazmě a tím brání jeho translokaci do jádra; za druhé KEAP1 slouží jako adaptorový protein pro systémy zodpovědné za kontinuální ubikvitinaci, konkrétně adaptorový protein pro Cul3 E3 ubikvitin ligasu, a díky tomu zajišťuje následnou proteolýzu Nrf2, čímž tento regulátor udržuje jeho stálé, relativně nízké množství v cytoplazmě. E3 ligasa je tvořená Cullinem 3 a Ring box proteinem 1 (Rbx1). KEAP1 se váže na Cullin 3 a vytváří s Cul3-Rbx1 mnohapodjednotkovou Cullin3-RING (*really interesting new gene*) ligasu (Canning, 2015; Robledinos-Antón, 2019).

Běžně se tedy na Neh2 doménu Nrf2, konktrétně DLG a ETGE motivy, vážou dvě molekuly KEAP1 (obr. 3). Vazba na ETGE s vyšší afinitou zajistí navázání KEAP1 a druhá vazba s nižší afinitou uskutečňující se přes DLG udržuje molekuly obou proteinů ve správné orientaci. Vazba se uskutečňuje ze strany KEAP1 přes *Kelch-repeating* doménu (Pastorek, 2015; Tonelli, 2018). KEAP1 se dále naváže i s Cul3 E3 ubikvitin ligasou, kterou tak spojí i s Nrf2. Díky E3 ligase může dojít k navázání a ligaci ubikvitinů na lysinové zbytky na Nrf2. Vznikne řetězec několika spojených ubikvitinů (alespoň 4), které označují molekulu Nrf2 pro degradaci ve 26S podjednotce proteasomu (Deshaies, 2009).

3.2. Degradace nezávislá na KEAP1

Pokud není možno zabezpečit regulaci Nrf2 pomocí vazby na KEAP1, buňka využívá k udržení jeho stability alternativní mechanismus. V tomto případě se jedná o fosforylaci Nrf2, kterou zajišťuje glykogen syntasa kinasa 3 (GSK-3). GSK-3 má dvě varianty - GSK-3α a GSK-3β, které fosforylují serinové a threoninové zbytky. GSK-3 se běžně v buňce nachází v neaktivovaném stavu, protože je fosforylována na N-konci pomocí proteinové kinasy B (AKT) či sekvestrována v proteinových komplexech. Aktivuje se v případě absence KEAP1 receptorové signalizační cesty. Po aktivaci GSK-3 fosforyluje zbytky na DSGIS motivu Neh6 domény Nrf2. Takto modifikovaný strukturní motiv je rozpoznáván *β-transducin repeat-containing proteinem* (β-TrCP), který slouží jako adaptorový protein pro další E3 ligasu, jmenovitě Cul1-Rbx1 E3 ligasu. Toto vede k ubikvitinaci a následující degradaci, opět v 26S podjednotce proteasomu (viz obr. 3) (Qin, 2019; Robledinos-Antón, 2019).



Obrázek 3: Schéma a rozdíly degradace pomocí KEAP1 a β-TrCP (Cuadrado, 2018)

β-TrCP rozeznává i druhý strukturní motiv v rámci Neh6 a to DSAPGS. Tato struktura musí být pro uskutečnění vazby také fosforylována, ovšem fosforylace se děje jinou cestou, nezávisle na GSK-3.

Další pomocné cesty degradace jsou méně významné. Například se jedná o degradační systém schopný regulovat Nrf2 na posttranskripční úrovni. V tomto případě jde o další E3 ubikvitin ligasu, konkrétně synoviolin někdy nazývanou také HRD1. Tento systém vyžaduje pro svou funkčnost *Inositol-requiring enzyme 1* (IRE1). Tato cesta byla popsána především v cirhotických játrech. HRD1 je protein zabudovaný do stěny endoplazmatického retikula. V důsledku vystavení endoplazmatického retikula stresu IRE stimuluje produkci *X-box-binding proteinu 1* (XBP1), což zároveň vede k up-regulaci HRD1, jeho následné přímé interakci s Nrf2 a následující degradaci tohoto transkripčního faktoru (Panieri, 2019; Qin, 2019; Wu, 2014).

V neposlední řadě funguje jako inhibitor Nrf2 BACH1 (CNC homologní protein s BTB doménou). BACH1 je protein nacházející se v buněčném jádře a sloužící jako regulátor transkripce. Jelikož patří do skupiny leucinových zipů, stejně jako transkripční faktor Nrf2, mají tyto faktory podobné strukturní vzory. BACH1 v jádře aktivně soupeří s Nrf2 o vazbu se sMAF proteiny, díky čemuž blokuje expresi genů pro antioxidační responzivní elementy (ARE) (Robledinos-Antón, 2019).

3.3. Proteasom

Proteasom je rozsáhlý komplex složený z podjednotek enzymů štěpících proteiny (tj. proteas). V buňkách se vyskytuje buď volně v cytoplazmě nebo vázaný na stěnu endoplazmatického retikula. Hlavní úlohou proteasomu je hydrolytické štěpení peptidových vazeb proteinů určených k degradaci. Proteiny jsou zde štěpeny na peptidy o délce dvou až deseti aminokyselin, které jsou následně hydrolyzovány cytoplazmatickými exopeptidasami na jednotlivé aminokyseliny a využity pro syntézu nových molekul. Velká většina všech dějů v proteasomu se odehrává v jeho podjednotce označované jako 26S. 26S je ve své podstatě další komplex složený z proteolytické jednotky 20S a dvou regulačních jednotek 19S, každé na jednom konci 20S (Collins, 2017).

Proteiny určené pro degradaci proteasomem musí být ubikvitinovány, tzn. musí se na ně vázat několik molekul polypeptidu ubikvitinu. Tento krok slouží jako signalizace pro proteasomový komplex.

Hlavní částí, která obsahuje proteasy, je 20S jednotka. skládá se ze čtyř prstenců (dva β-prstence uložené uvnitř, dva α-prstence obklopující β-prstence). α-prstence slouží jako vstupní brána pro proteiny určené k degradaci, v β-prstencích dochází k samotnému štěpení.

19S podjednotka je tvořena dvěma oblastmi – bází a víkem. Funkce víka je zřejmě rozpoznávání ubikvitinů a vazba s nimi. Báze obsahuje šest ATPas, které mají za úkol rozvolnění proteinů. Přes vazbu s α-prstenci dále napomáhá translokaci proteinů do centra proteasomu k degradaci (Hamazaki, 2006).

4. Účinky Nrf2

V těle jsou neustále generovány reaktivní formy kyslíku a dusíku (ROS, RNS) jako vedlejší produkty metabolismu a stejně tak jsou přijímány i z okolí. Faktor Nrf2 je neustále tvořen skoro všemi buňkami těla, aby zabraňoval negativnímu vlivu tohoto oxidačního, ale také elektrofilního, stresu na lidský organismus. Oxidační stres je spojený přímo či nepřímo s řadou onemocnění, ale také s některými fyziologickými procesy odehrávajícími se v organismu. Přímou souvislost má například zvýšený oxidační stres v důsledku kumulace ROS a RNS v buňkách s jejich stárnutím, což se projevuje zhoršenou buněčnou regenerací nebo úplnou zástavou proliferace. V buňkách dochází k nadprodukci různých působků jako jsou interleukiny, chemokiny, růstové faktory a různé součásti extracelulární matrix. Každá z těchto látek poté může zapříčiňovat jiný patologický pochod. U zestárlých svalových buněk pak zejména dochází k poruše Ca^{2+} ATPasy endoplazmatického retikula (SERCA = *sarco/endoplasmic reticulum* Ca^{2+} *ATPase*), která nedostatečně čerpá vápenaté ionty do endoplazmatického retikula, nemůže dojít ke svalovému stahu, což konečně může vyústit v poruchy srdce. Během tohoto procesu vzniká oxidovaná forma LDL lipoproteinů, která se dále hromadí v cévách a způsobuje vznik aterosklerózy. Oxidační stres se zde podílí i na patogenezi komplikací spojených s diabetem II. typu cestou glykooxidace aminoskupin na lysinu a argininu vedoucí k produkci různých pokročilých produktů glykace (Gagné, 2014; Ghafouri-Fard, 2020).

4.1. Oxidační stres

Pojem oxidační stres a jeho principy byly pojmenovány v roce 1985. Původní definice oxidačního stresu byla definována jako „porucha rovnováhy mezi prooxidanty a antioxidanty ve prospěch prooxidantů“. V posledních letech bylo ale potřeba definici přeformulovat, jelikož byly objeveny a detailněji popsány jak účinky oxidačních látek, tak i způsoby, kterými organismus reaguje. Nová definice oxidačního stresu tedy zní „nerovnováha mezi antioxidanty a oxidanty, která se naklání ve prospěch oxidantů, což vede k rozvratu redoxních signálních drah a/nebo k poškození molekul‘‘. Oxidační stres může být klasifikován dle své intenzity na bazální oxidační stres (BOS), oxidační stres o nízké intenzitě (LOS = *low intensity oxidative stress*), oxidační stres se střední intenzitou (IOS = *intermediate intensity oxidative stress*)

a konečně oxidační stres o vysoké intenzitě (HOS = *high intensity oxidative stress*). Bazální, či nízká míra oxidačního stresu je pro organismus fyziologická a je klíčová pro správnou funkci některých signálních a regulačních drah. ROS v přiměřené koncentraci fungují jako důležití druzí poslové, kteří přenášejí signály v rámci nejrůznějších buněčných procesů. Tomuto, pro tělo příznivému, množství stresu se říká eustres, naopak vyšší hodnoty oxidačního stresu, které již mají na svědomí narušení molekul a signalizace v buňkách se označují jako distres (Lushchak, 2014; Sies, 2018; Incalza, 2018).

Oxidační stres je způsoben převážně nadměrnou tvorbou reaktivních forem kyslíku. Do této skupiny látek se řadí biomolekuly tvořené v těle jako produkt aerobního metabolismu, buněčného dýchání v mitochondriích, syntézy lipidů, metabolismu kovů, fagocytózy cizorodých částic, biotransformace xenobiotik, tj. látek pro organismus cizorodých atd. i látky přijaté do organismu z okolí. Příkladem některých ROS může být například peroxid vodíku (H_2O_2), superoxid ($\bullet O_2^-$), hydroxylový radikál (HO•), peroxidy lipidů, proteinů a nukleových kyselin (Gagné, 2014; Lushchak, 2014; Sies, 2018). Kromě ROS přispívají ke vzniku oxidačního stresu i reaktivní formy dusíku. Do skupiny RNS se řadí oxid dusnatý, oxid dusičitý, či peroxynitrit.

4.2. Reakce organismu na oxidační stres

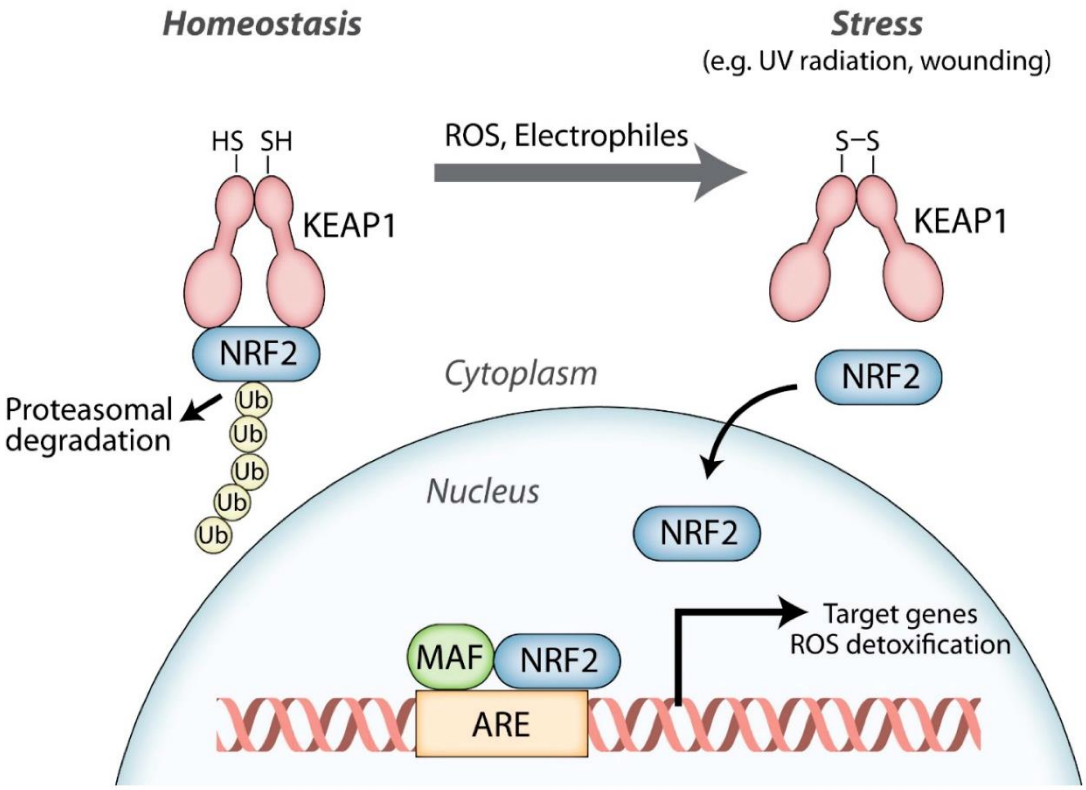
Jako odpověď na oxidační změny tělo mobilizuje antioxidační mechanismy jako je např. systém Nrf2-KEAP1, které pak dále mají na starosti zajištění adekvátní odpovědi formou stimulace produkce antioxidantů.

Aktivace Nrf2 v reakci na oxidační stres může probíhat dvěma následujícími způsoby. V jednom z případů může dojít k oxidaci vysoce reaktivních cysteinových zbytků v IVR (Cys288 a Cys273) a BTB (Cys151) doménách KEAP1, což vede v molekule k vnitřní změně uspořádání a následnému uvolnění Nrf2 z vazby v tomto komplexu. Zároveň se na Neh2 doménu Nrf2 váže protein p21, zlepšuje jeho disociaci z komplexu, a navíc zabraňuje opětovné vazbě Nrf2 s KEAP1. Transkripční faktor se nemůže vázat s Cul3 proteinem, a tudíž nemůže docházet k polyubikvitinaci v proteasomu (Chen, 2015).

Druhým způsobem je tzv. „*hinge and latch*" model. V tomto případě je oxidací narušena vazba s KEAP1 jen částečně. Díky strukturním změnám dochází k odpojení molekuly v místě

DLG motivu, ale silnější vazba s ETGE motivem přetrvává. Díky tomuto částečnému přerušení vazby je zabráněno rozpoznání molekuly Nrf2 pro ubikvitinaci. Jelikož je ale vazebné místo KEAP1 stále obsazeno, mohou nově vzniklé molekuly Nrf2 snadno pronikat do buněčného jádra (Kansanen, 2013; Chen, 2015). Kromě oxidace KEAP1 má na přesunu Nrf2 do jádra podíl také fosforylace Nrf2 kinasami podílejícími se na přenosu signálu v buňce. Jedná se o proteinkinasy C, mitogenem aktivované proteinkinasy, fosfatidylinositol proteinkinasy a proteinkinasy endoplazmatického retikula (Kloska, 2019).

Po translokaci volného transkripčního faktoru do jádra dochází k vazbě se sMaf proteiny a k vytváření jejich heterodimerů. Tato vazba usnadňuje navázání Nrf2 na segmenty DNA v místě antioxidačních responzivních elementů (ARE). ARE jsou speciální promotorové sekvence DNA na 5‘ konci vlákna. Touto vazbou Nrf2 aktivuje expresi mnoha cílových genů pro antioxidanty (cca 500), mezi něž patří i detoxifikační enzymy, proteiny reagující na stres, enzymy vychytávající reaktivní formy kyslíku aj. (obr. 4). Zároveň komplex Nrf2-ARE napomáhá ke stabilizaci cytoplazmatického faktoru Nrf2 a brání jeho ubikvitinaci. Tvoří se tak cesta pozitivní zpětné vazby. Mezi, pro organismus nejdůležitější, antioxidanty vznikající tímto způsobem patří například NADPH-quinon oxidoreduktasa 1 (NQO-1), hemoxygenasa 1 (HO-1), glutamát-cystein ligasa (GCL), glutathion-S-transferasa (GST), glutathion peroxidasa (GPx), superoxid dismutasa (SOD), cystinový transportér a další (Chen, 2015; Kloska, 2019; Guo, 2020).



Obrázek 4: Schéma uvolnění Nrf2 z jeho oxidovaného inhibitoru (cytoplazma). Následuje translokace do buněčného jádra, kde Nrf2 dimerizuje, váže s Maf proteiny, váže se na ARE a spouští transkripci cytoprotektivních genů (Hiebert, 2019).

5. Onemocnění spojená s oxidačním stresem

Oxidační stres hraje důležitou roli při regulování redoxních signálních cest a tím ovlivňuje různé buněčné struktury a orgány. Pokud není množství ROS a RNS správně regulováno, může jejich vyšší koncentrace v organismu přispívat ke vzniku a rozvoji řady onemocnění a patologických stavů. Regulace oxidačního stresu je umožněna působením mnoha antioxidačních mechanismů. Jedním z nejdůležitějších cest ochrany přes ROS a RNS je umožnění transkripce antioxidantů pomocí faktoru Nrf2, jehož aktivity v průběhu života ubývá.

Existuje několik teorií, zabývajících se příčinou stárnutí, které tvrdí, že modifikovaný buněčný fenotyp, typický pro zestárlý organismus, vzniká následkem kumulativního poškozování buněk oxidačním stresem v průběhu života. Nahromaděná poškození způsobená oxidačním stresem jsou brána jako přímý následek nerovnováhy mezi produkcí a eliminací oxidantů a elektrofilních látek. S přibývajícím věkem se hladina ROS v těle pozvolna zvedá, což může ve stáří vyvolávat nebo komplikovat průběh řady onemocnění (Zhang, 2015). Mimo jiné přispívá i ke vzniku kardiovaskulárních onemocnění, které jsou v dnešní době považovány za jednu z hlavních příčin úmrtí. Mezi nejdůležitější onemocnění se řadí infarkt myokardu, ischemická choroba srdeční a srdeční selhání (Satta, 2017).

5.1. Oxidační stres a poškození buněk cévní stěny

Endotel tvoří jedna vrstva buněk na vnitřní straně cévní stěny. Zdravé buňky cévního endotelu produkují řadu biologicky aktivních molekul, jež se podílejí na udržení funkce stěny cév a ovlivňují její vlastnosti, vasodilataci a vasokonstrikci, trombolýzu a další. Neporušené endotelové buňky zachovávající si správnou funkci tak přispívají k udržení vnitřní homeostázy.

Dysfunkce endotelu je jednou z hlavních příčin vzniku kardiovaskulárního onemocnění a umožňuje rozvoj aterosklerózy aj. Mezi rizikové faktory zapříčiňující poruchu endotelu patří hypertenze, hypercholesterolémie, obezita, diabetes mellitus, stárnutí organismu nebo mužské pohlaví a mnoho dalších. V dysfunkčním endotelu dochází ke změnám, při kterých se snižuje množství oxidu dusnatého (NO), který ve fyziologické koncentraci umožňuje vasodilataci. NO je produkovaný endoteliální frakcí syntasy oxidu dusnatého (eNOS) (Satta, 2017).

Poškození struktury buněk cévní stěny, vedoucí k poruše funkce, může být způsobeno řadou mechanismů. Může jít o fyzické poškození, poškození způsobené buňkami imunitního systému a další. Nadměrný oxidační stres je jedním z hlavních patologických procesů podílejících se na endoteliální dysfunkci (Chen, 2015). K tomu může docházet při hypo i při hyperaktivaci faktoru Nrf2. Oba tyto stavy se uplatňují při narušené buněčné funkci (Satta, 2017).

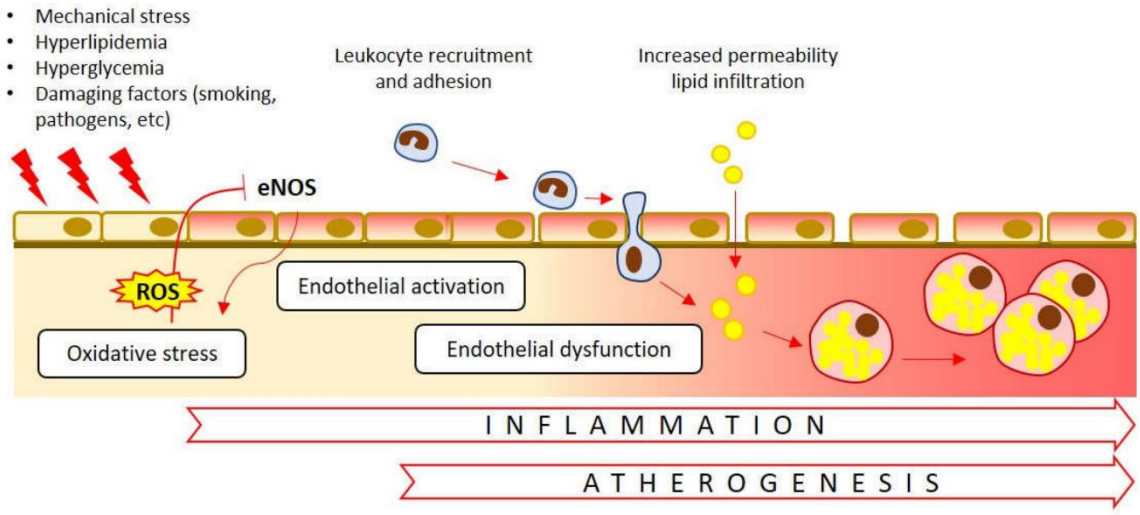
V zestárlých buňkách cévní stěny je vysoká koncentrace ROS převážně původem z mitochondrií. Dalším významným přispěvatelem je zvýšená aktivace NADPH oxidázy, díky které vzniká množství ROS (Ungvari, 2019). V průběhu stárnutí narůstá počet poškozených mitochondrií, které syntetizují stále více ROS a čím dál méně ATP, což se děje vesměs kvůli mutacím v mitochondriální DNA jako přímý důsledek oxidací (Warraich, 2020). Následkem toho jsou buňky méně odolné, přestávají se dělit, častěji prochází různými fenotypovými přeměnami, které přispívají k poruše regenerace endotelu, vzniku sterilního zánětu, přestavbě extracelulární matrix a poruše transportu látek z a do buňky. Zestárlé buňky mají také tendenci čím dál dříve podléhat apoptóze nebo nekróze. Takto poškozené buňky jsou základním stavebním kamenem pro vznik cévních onemocnění, která jsou jednou z hlavních příčin smrti u starších osob (Ungvari, 2019).

5.1.1. Rozvoj aterosklerózy

Ateroskleróza se řadí do skupiny chronických zánětlivých onemocnění cév spojených s oxidačním stresem a poruchou buněk cévní stěny. Ovlivňuje zejména stěny velkých a středních arterií. V průběhu aterosklerózy vznikají v cévách aterosklerotické pláty (tzv. ateromy). Jedná se o nakupeniny lipidů a přidružených buněk (především bílých krvinek), které se ukládají ve stěnách cév a způsobují zúžení jejich průsvitu (Kattoor, 2017).

Prvotní příčinou rozvoje aterosklerózy je poškození buněk cévního endotelu. K tomu může dojít různými způsoby – mechanickým poškozením, působením vysokého krevního tlaku i působením volných radikálů a toxických sloučenin vznikajících při nadměrném oxidačním stresu atd. (Marchio, 2019). Cévní stěna obsahuje mnohé systémy produkující ROS, jako jsou NADPH oxidasa, myeloperoxidasa, xantin oxidasa, enzymy mitochondriálního dýchacího řetězce a nefunkční NO syntasa. Dochází k narušení rovnováhy mezi oxidačními a antioxidačními systémy ve prospěch oxidantů (Förstermann, 2017; Pignatelli, 2018).

V časné fázi rozvoje aterosklerózy dochází pouze k malým změnám v buňkách endotelu. Endotelové buňky se aktivují a začínají na svém povrchu exprimovat adhezní molekuly. Tento stav je vyvolán prozánětlivými cytokiny, v jejichž produkci hraje významnou roli právě oxidační stres. Adhezní molekuly k sobě připojují buňky imunitního systému (Incalza, 2018), především monocyty, které se dále diferencují v makrofágy, a T-lymfocyty (Kattoor, 2017). Zvyšuje se propustnost buněčné membrány pro lipoproteinové částice, nejčastěji v místech, kde se arterie větví, či ohýbají. V těchto místech k tomu dochází hlavně z důvodu změněného proudění krve. Dochází zde k recirkulacím a krev proudí turbulentně (tj. vířivě) (Marchio, 2019). Na poškozenou cévní stěnu se začnou nalepovat částice LDL lipoproteinů, které pronikají do subendoteliálního prostoru. V průběhu patologického procesu dochází k oxidaci LDL na oxidovanou formu – ox-LDL, který následně podporuje adhezi dalších molekul na endotel tím, že ho dále aktivuje (Kattoor, 2017). Monocyty diferencované v makrofágy pohlcují LDL a spolu s T-lymfocyty podporují produkci dalších adhezních molekul, navíc se uvolňuje množství prozánětlivých cytokinů a dalších reaktivních forem kyslíku, a tak podporují další oxidace, čímž spouští řetězovou reakci. Makrofágy se transformují v pěnové buňky, hromadí se a tvoří tzv. tukové proužky. Dalším vrstvením lipidů a pěnových buněk vznikají až ateromové pláty. V pozdní fázi může docházet k prasknutí ateromu a odhalená puklina spouští koagulační kaskádu a vznik trombu. Následkem může dojít k uzavření konkrétní cévy a nedostatečnému prokrvení zásobované oblasti (Pignatelli, 2018).



Obrázek 5: Proces vzniku aterosklerózy. Poškození buněk cévní stěny oxidačním stresem způsobuje vznik nefunkční NO syntasy, která přispívá ke vzniku většího množství ROS. Dochází k aktivaci endotelu, což zapříčiňuje adherenci buněk imunitního systému a rozvoj zánětu. Zánětem poškozená cévní stěna je propustnější pro lipidové částice, které do ní vstupují a ukládají se zde (Shemiakova, 2020).

5.1.2. Systémy produkující ROS při ateroskleróze

a) NADPH oxidasa

NADPH oxidasa (zkráceně Nox) je exprimována endotelovými buňkami cévní stěny i monocyty a makrofágy, které se do cévy dostanou až po aktivaci jejího povrchu. Za normálních podmínek je produkce ROS NADPH oxidasou v endotelových buňkách na nízké úrovni a oxidanty slouží pouze jako druzí poslové signálních drah. Po vystavení NADPH oxidasy cytokinům, transformujícím růstovým faktorům, vyšší koncentraci glukosy a hyperlipidémii dochází k její regulaci a následné zvýšené produkci ROS (Perrotta, 2015).

NADPH oxidasa se skládá z několika podjednotek. Je zastoupena sedmi izoformami (Nox1-5, Duox1-2), z nichž pouze čtyři se nachází v cévním systému a to Nox1, Nox2, Nox4 a Nox5. Nox1 je produkována hladkými svalovými buňkami a ve velmi nízkých koncentracích i buňkami endotelovými. Produkuje superoxidový aniont, ovšem za fyziologických podmínek je inaktivní. Nox2 je přítomna v endotelových buňkách, fibroblastech a buňkách imunitního systému (monocyty, makrofágy) účastnících se tvorby ateromového plátu. Také produkuje

superoxidový aniont (Perrotta, 2015; Pignatelli, 2018). Nox4 oproti Nox1 a Nox2 působí proti vzniku aterosklerózy. Upřednostňuje tvorbu peroxidu vodíku, díky kterému je schopný ovlivňovat vazodilataci, jelikož peroxid vodíku aktivuje endoteliální NO syntasu. Peroxid vodíku v Nox4 vzniká na základě spontánních superoxidových dismutací, neinteraguje s NO, a tak nedává vznikat peroxynitritu, a v neposlední řadě inhibuje proliferaci hladkých svalových buněk a předchází vzniku zánětu (Förstermann, 2017). Nox5 je na rozdíl od ostatních závislý na vápníku a ke své aktivaci nepotřebuje jiné podjednotky. Byla prokázána jeho zvýšená aktivita v aterosklerotických cévách a v proliferujících endotelových buňkách a buňkách hladké svaloviny. Nox5 přímo aktivuje endotelovou NO syntázu v endotelových buňkách aorty, což vede k produkci peroxynitritu a přímo přispívá k poruchám funkce endotelových buněk (Perrotta, 2015).

Ve zkratce řečeno, NADPH oxidasa se podílí na oxidaci LDL lipoproteinů, kdežto ROS produkované NADPH oxidasovým systémem v endotelových a svalových buňkách jsou esenciální pro aktivaci endotelu (Förstermann, 2017).

b) Myeloperoxidasa (MPO)

Reaktivní formy kyslíku tvořené myeloperoxidasou mají schopnost oxidovat lipidy, a to nejen LDL, ale i HDL lipoproteiny. Mezi ROS produkované tímto enzymem se řadí kyselina chlorná, chloramin, tyrosylové radikály a oxid dusičitý (Pignatelli, 2018).

c) Xantin oxidasa (XO)

Xantin oxidasa využívá kyslík a tvoří superoxid a peroxid vodíku. XO je exprimována endotelovými buňkami. Navíc může být do krevního oběhu uvolněna z jater, a poté adheruje na endotelové buňky pomocí interakce s glykosaminoglykany. Inhibice xantin oxidasy zlepšuje vasodilataci, která je dependentní na oxidu dusnatém a je schopná zvrátit endotelovou dysfunkci u kuřáků (Förstermann, 2017).

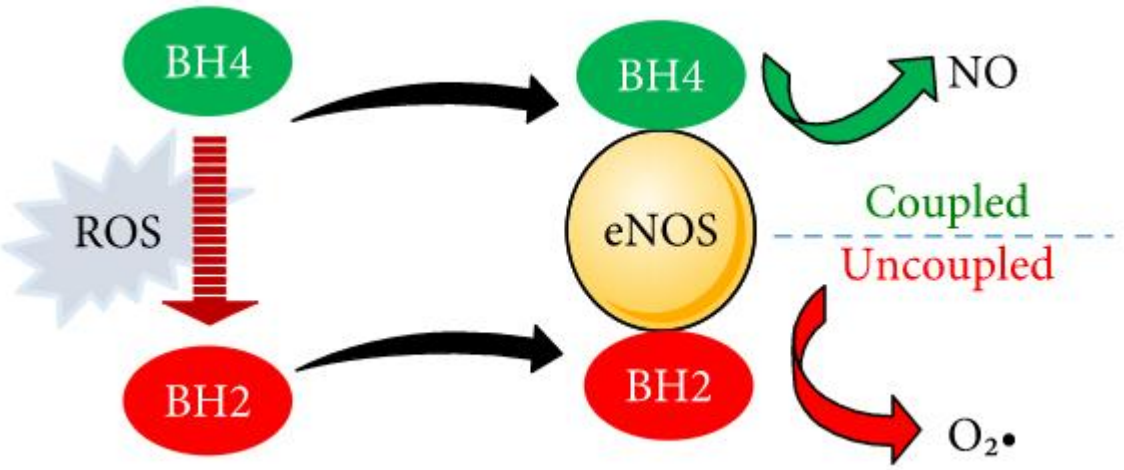
d) Mitochondrie

Zdrojem reaktivních forem kyslíku v mitochondriích je přesun elektronů v dýchacím řetězci a vytváření elektrochemického gradientu mezi membránami. Za normálních okolností produkují mitochondrie ROS na bazální úrovni a tyto ROS jsou následně likvidovány mitochondriálními antioxidačními systémy (Peoples, 2019). Mitochondrie produkují především superoxidový aniont, který je vychytáván superoxid dismutasou a přeměňován na peroxid vodíku. Ten je následně glutation peroxidasou transformován na vodu. V případě

chybění některého z antioxidačních systémů, či nadbytečné tvorby ROS může mitochondriální oxidační stres urychlovat vývoj aterosklerózy (Förstermann, 2017).

e) Syntasa oxidu dusnatého (NOS)

Oxid dusnatý má ve zdravých cévách funkci vasodilatátoru, tj. rozšiřuje cévy, a působí antioxidačně, tudíž proti vzniku aterosklerózy. Produkce NO je uskutečňována endoteliální syntasou oxidu dusnatého (eNOS) pomocí vazby její hemové skupiny s L-argininem za využití tetrahydrobiopterinu (BH4) jako kofaktoru (Satta, 2015). Za patologických podmínek se ovšem eNOS rozpojuje a stává se nefunkční (Pignatelli, 2018). Rozpojená eNOS je producentem reaktivních forem kyslíku, které přispívají ke vzniku aterosklerózy (Poznyak, 2020). Rozpojená se eNOS nazývá díky konverzi BH4 reaktivními formami kyslíku na 7,8-dihydrobiopterin (BH2), což má za následek nemožnost vazby s L-argininem. To ve výsledku vede k produkci superoxidu namísto NO. Superoxid následně reaguje s již přítomným NO a tvoří peroxynitrit.



Obrázek 6: Schéma vzniku rozpojené eNOS**.** Působením ROS dochází ke konverzi BH4 na BH2, což má za následek rozpojení eNOS a L-argininu a produkci superoxidu namísto oxidu dusnatého (Satta, 2015).

5.1.3. Úloha Nrf2 při ateroskleróze

Nrf2 v endotelových buňkách je aktivován zvýšenou produkcí ROS a signální cestou přes fosfatidylinositol-3-kinasu a proteinkinasu B (PI3K-Akt), která se spouští působením laminárního smykového napětí. Aktivace Nrf2 vyúsťuje ve zvýšení koncentrace intracelulárních antioxidantů jako HO-1, GPx, GCL a dalších. Zároveň se snižuje exprese TNF-α, IL-1β, MCP1, a VCAM1, což poukazuje na protizánětlivý vliv tohoto transkripčního faktoru (Satta, 2015). V návaznosti na oxidační stres může být endoteliální Nrf2 aktivován také přímo laminárním tokem krve (Mimura, 2015).

Oxidační stres ve spojení se zvýšenou koncentrací lipidů v séru je rizikovým faktorem, protože způsobuje tvorbu lipidových peroxidů. Lipidové peroxidy vyvolávají poruchy endotelu, hladkých svalových buněk a makrofágů, což je stav přímo spojený se vznikem aterosklerózy. Některé lipidové peroxidy a jejich metabolity (např. ox-LDL, 4-hydroxynonenal aj.) aktivují faktor Nrf2 buď inaktivací KEAP1 nebo jiným dosud neznámým způsobem. Nrf2 přímo podporuje expresi receptorů CD36 na povrchu makrofágů, čímž přispívá k ingesci ox-LDL makrofágy a následné transformaci makrofágů v pěnové buňky. Tímto způsobem dochází k tzv. pozitivní zpětné vazbě, kdy oxidované LDL aktivací Nrf2 umocňují akumulaci dalších ox-LDL a přispívají k tvorbě lipidových proužků (Mimura, 2015).

Obecně se věří, že k poruše regulace Nrf2 vede i zvýšený krevní tlak díky zvýšenému oxidačnímu stresu a poruchám cévní funkce. Na regulaci krevního tlaku a vasokonstrikce se významně podílí renin-angiotensinový systém, jehož nadbytečná aktivace vede ke vzniku hypertenze. Angiotenzin II zvyšuje expresi NADPH oxidasy a s ní i generaci ROS (Satta, 2015).

Nejhojněji se vyskytující antioxidant v buňkách a tkáních je glutathion, který hraje primární roli v ochraně před oxidačním stresem. Nrf2 reguluje expresi genů zapojujících se do homeostatického působení glutathionu, jako jsou geny pro glutamát-cystein ligasu (modifikační, GCLM, i katalytickou, GCLC, podjednotku), glutathion reduktasu a glutathion peroxidasu. V buňkách endotelu a v makrofázích podněcuje Nrf2 expresi GCLC nebo GCLM a syntézu glutathionu, čímž chrání buňky před poškozením vyvolaným oxidovanou formou LDL. Vyšší tvorba glutathion reduktasy má dále pozitivní účinky na snížení výskytu aterosklerotických lézí (Mimura, 2015).

5.2. Ischemická choroba srdeční

Srdce je ve srovnání s ostatními orgány zvláště citlivé vůči poškození oxidačním stresem, jelikož má nízkou bazální úroveň antioxidační ochrany (Satta, 2015).

Primárním rizikem pro vznik kardiovaskulárních onemocnění je vyšší věk ve spojení s nadměrnou konzumací tučných jídel, soli, výskytem diabetu, vysokého krevního tlaku, kouřením a sedavým způsobem života. Předstupněm vzniku ischemické choroby srdeční (ICHS) je poškození cévního endotelu a výskyt aterosklerózy (Hrdina, 2008, Špác, 2017).

ICHS se vyznačuje zmenšením průsvitu věnčitých tepen. Toto jsou tepny, které přivádí okysličenou krev pro srdeční svalovinu a vyživují ji. Překážku v průtoku krve tvoří ve většině případů aterosklerotické pláty. Do srdečního svalu se nedostává dostatečné množství živin a kyslíku v poměru k jeho potřebě. Se zúžením cév se také pojí vyšší krevní tlak, který ještě navyšuje potřebu kyslíku pro myokard (Pagliaro, 2020).

Mezi nejčastější projevy ICHS se řadí *angina pectoris*, projevující se svíravou bolestí na hrudníku a akutní infarkt myokardu, který je způsoben úplným ucpáním koronární tepny a následným prasknutím aterosklerotického plátu, což vede k nekróze zásobované části myokardu. Dalšími projevy mohou být náhlá srdeční smrt, poruchy srdečního rytmu, či srdeční selhání (Hrdina, 2008)

5.3. Kardiovaskulární onemocnění ve spojení s diabetem

Incidence diabetu v posledních letech narůstá, a i navzdory léčbě jsou pacienti s diabetem náchylnější k rozvoji některých onemocnění jako jsou kardiovaskulární onemocnění, chronické selhání ledvin nebo retinopatie.

Diabetes se vyvíjí přes inzulinovou rezistenci, porušenou glukózovou toleranci až v *diabetes mellitus* (DM) jako takový. DM výrazně zhoršuje průběh onemocnění, neboť je spojen s poruchou několika metabolických procesů. Díky tomu může narušovat rovnováhu mezi oxidanty a antioxidanty (Selvaraju, 2012). Tímto způsobem se DM podílí na zhoršování průběhu mnoha patologických procesů jako jsou abnormality v plazmatických lipidech,

poruchy funkce endotelu, zvýšená reaktivita vnitřního povrchu cév, aktivace krevních destiček, stimulace koagulační kaskády a vyvolání zánětlivých procesů, vedoucích ke kardiovaskulárním onemocněním (Penckofer, 2002).

Oxidační stres je zvýšený především díky samooxidaci glukózy vedoucí k produkci volných radikálů. Snižuje se schopnost antioxidační obrany organismu, jak v podobě snížené koncentrace antioxidantů v buňkách, tak i snížení aktivity enzymových systémů podílejících se na vychytávání volných radikálů. Při onemocnění cukrovkou se zároveň zvyšují koncentrace některých prooxidačních látek jako jsou např. ferritin nebo homocystein.

Diabetická kardiomyopatie a jiné komplikace jsou hlavní příčinou úmrtí pacientů s diabetem. Společným jmenovatelem poruchy srdce a diabetu je nadměrný oxidační stres.

Hyperglykémie a s ní spojené různé glykační produkty negativně ovlivňují buněčnou signalizaci, podporují tvorbu dalších ROS a RNS a mohou způsobit další poškození cévní stěny, čímž zhoršují průběh aterosklerózy, či postižení srdce. Oxidanty zde vznikají aktivací NADPH oxidasy, v mitochondriích, působením xanthin oxidasy, rozpojováním eNOS atd. Snížení hladiny glukózy v krvi tedy snižuje riziko vzniku kardiovaskulárního onemocnění (Ceriello, 2004).

Nrf2 je důležitý faktor v prevenci vzniku komplikací diabetu. Studie ukazují, že v rané fázi je Nrf2 exprimován ve velké míře. S neustávající nadměrnou generací ROS je ovšem bariéra, kterou Nrf2 tvoří, překonána, a naopak je pozorováno značné snížení exprese tohoto faktoru především v levé srdeční komoře (Satta, 2015).

6. Antioxidační odpověď organismu

Nadměrná produkce ROS a RNS v těle je vyvažována působením antioxidantů. Fyziologické antioxidační mechanismy organismu zahrnují mnoho enzymů vychytávajících ROS (*ROS scavenging enzymes*), detoxikační enzymy druhé fáze a jiné antioxidanty. Každou z těchto látek kóduje ARE v promotorové části DNA (Chen, 2015). Jeden antioxidační responzivní element má přesně dané pořadí bazí a jejich přepisem a následnou translací vzniká konkrétní molekula antioxidantu.

Antioxidanty jsou molekuly schopné bránit pro-oxidantům v oxidaci dalších látek, a fungují buď jako vychytávací enzymové systémy, které zachytávají ROS, nebo dokáží přímo omezovat tvorbu ROS v těle. Za fyziologických podmínek antioxidanty chrání před účinky oxidačních produktů a umožňují průběh redoxních reakcí, které jsou důležité pro správnou funkci metabolismu, tvorbu energie, buněčnou signalizaci a podobné funkce.

Dle původu rozlišujeme antioxidanty na endogenní a exogenní. Mezi antioxidanty endogenního původu patří např. kyselina močová, koenzym Q_{10} nebo bilirubin, jako antioxidanty exogenního původu se označují vitaminy C a E, flavonoidy nebo třeba karoteny. Mezi hlavní antioxidační systémy přítomné přímo v cévní stěně řadíme superoxid dismutasu (SOD), katalasu, gluthation peroxidasu, paraoxonasu (brání oxidaci LDL) a syntasu oxidu dusnatého (NOS) (Poznyak, 2020).

6.1. Ovlivnění onemocnění pomocí Nrf2

Nrf2 je jedním z nejdůležitějších transkripčních faktorů, který zabezpečuje přepis velikého množství genů kódovaných v ARE. Pravděpodobně je právě tento transkripční faktor jedním z těch, které mají na ochranu endotelu před oxidačním stresem a onemocněními s ním spojenými největší vliv (Chen, 2015). Mezi enzymy ovlivňované tímto transkripčním faktorem, které se podílí na regulaci oxidačního stresu při stárnutí a kardiovaskulárním onemocnění, patří glutamát-cystein ligasa, všechny tři podjednotky superoxid dismutasy, katalasa, glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, některé peroxiredoxiny, glutathion peroxidasa, glutation S-transferasa, sulfiredoxin a thioredoxin reduktasa (Zhang, 2015).

6.1.1. Nejdůležitější antioxidační systémy

a) Superoxid dismutasa (SOD)

SOD reaguje se superoxidovým radikálem, který mění na peroxid vodíku. Peroxid vodíku pak následně prochází dalšími změnami pod vedením dalších antioxidačních enzymů. Rozlišujeme tři isoformy SOD. Dvě se vyskytují v cytosolu buněk. Jsou to SOD1, superoxid dismutasa obsahující měď a zinek (Cu, Zn-SOD), a SOD2, superoxid dismutasa obsahující mangan (Mn-SOD). SOD1 je konkrétně situována v cytoplasmě a na vnitřní mitochondriální membráně, SOD2 v matrix mitochondrií. Třetí isoforma, SOD3, také obsahuje měď a zinek, ale vyskytuje se extracelulárně, kde hraje důležitou roli v buněčné signalizaci (Zhang, 2015; Poznyak, 2020).

Samostatné zvýšení produkce SOD nevede ke snížení koncentrace ROS díky transformaci superoxidového radikálu na peroxid, který také přispívá ke vzniku aterosklerózy. Naopak může průběh onemocnění zhoršit a pro antioxidační účinky je potřeba, aby navazovaly další mechanismy, např. glutation peroxidasa, katalasa nebo thioredoxin reduktasa (Poznyak, 2020).

Studie ukazují, že aktivita každé formy se u lidí s věkem vyvíjí jinak a liší se i dle tkáně a buněk, ve kterých se nachází. Aktivita SOD1 s věkem klesá ve fibroblastech, lymfocytech, kosterních svalech. Nejasný je vývoj aktivity s věkem v plasmě. zde některé studie ukazují na zvýšení aktivity, jiné na její snížení. Aktivita SOD2 u lidí se zvyšuje ve fibroblastech kůže, ovšem ukazuje se, že začíná klesat po věku šedesáti let (Zhang, 2015).

b) Katalasa

Katalasa rozkládá peroxid vodíku na vodu a kyslík. V buňce se vyskytuje v peroxisomech. Společně se zvýšenou produkcí SOD (převážně SOD1) má vyšší koncentrace katalasy pozitivní vliv na aterosklerózu. Vyšší aktivita katalasy se vyskytuje především v pěnových buňkách aterosklerotických plátů (Poznyak, 2020).

c) Glutathion peroxidasy (GPx)

Jedná se o rodinu enzymů o osmi členech (GPx1-GPx8). Substrátová specifita každého z těchto enzymů se liší a společně působí proti velkému spektru oxidantů. V tomto případě je

především důležité, že GPx umí také rozkládat peroxid vodíku na vodu a kyslík. Při tomto procesu využívá glutathion, který redukuje na jeho disulfidickou formu (Higuchi, 2014).

d) Thioredoxin reduktasa

Thioredoxinový systém je jedním ze stěžejních ochránců před oxidačním stresem. Dokáže odstraňovat vznikající peroxid vodíku díky NADPH, který slouží jako donor potřebných elektronů (Zhang, 2013). Thioredoxin reduktasa se nachází uvnitř i vně buňky. Hraje důležitou roli v regulaci metabolických procesů, inzulinové signalizace, regulaci krevního tlaku a rozvoje zánětlivého procesu (Poznyak, 2020).

e) Syntasa oxidu dusnatého (NOS)

V rozvoji aterosklerózy může NOS hrát dvojí roli, a to jak pro-oxidantu, tak i antioxidantu. NO je neustále tvořena endoteliálními buňkami. Mimo vasodilatace zastává mnoho dalších funkcí, jako je inhibice oxidace LDL lipoproteinů, adheze a migrace leukocytů, proliferace cévních hladkých svalových buněk a agregace trombocytů. Za patologických procesů ovšem dochází k tvorbě „rozpojených“ eNOS, které podporují tvorbu ROS a přispívají k rozvoji aterosklerózy (Poznyak, 2020).

7. Terapeutický potenciál Nrf2

Spolu se zjištěním, že Nrf2 dokáže ovlivňovat průběh nejrůznějších onemocnění se rozmohla snaha o kontrolu jeho účinků. Faktor Nrf2 je možné ovlivnit podáváním vyvinutých léčiv. Záleží na charakteru onemocnění, jestli je třeba zvýšit antioxidační ochranu a Nrf2 ve vyšší míře aktivovat, nebo naopak je potřeba podpořit inhibici tohoto faktoru.

Z terapeutického hlediska se ovšem jedná jen o podpoření další léčby a zlepšení prognózy onemocnění. Cílení na regulaci Nrf2 samo o sobě momentálně nemá v léčbě velký účinek.

7.1.1. Exogenní aktivátory Nrf2

Díky značnému vlivu oxidačního stresu na vznik aterosklerózy a dalších onemocnění kardiovaskulárního systému je snaha vyvinout terapeutické prostředky, které by vedly ke snížení oxidačního stresu. Přezkoumávají se různé látky a jejich antioxidační účinky (Poznyak, 2020).

Jedná se o syntetické či přírodní látky, jež dokáží uměle aktivovat Nrf2 (uvolnit jej z vazby na KEAP1), podpořit jeho translokaci do jádra, a tak ovlivnit transkripci antioxidačních látek. Mnohé z nich by se mohly označovat spíše jako inhibitory KEAP1, jelikož se zaměřují na jeho deaktivaci a narušují jeho vazbu s faktorem Nrf2. Řadí se sem skupiny elektrofilních molekul, inhibitory interakcí protein-protein (PPI inhibitory), léky zaměřující se na více cílových struktur najednou (Robledinos-Antón, 2019) či fytochemikálie (Reuland, 2013).

Většina používaných aktivátorů patří do skupiny elektrofilních molekul. Tyto látky modifikují cysteinové zbytky KEAP1 oxidací či alkylací.

Dodnes nejúspěšnější aktivátor Nrf2 z této skupiny je ester kyseliny fumarové, dimethyl fumarát (DMF). Má protizánětlivé účinky, snižuje počty B-lymfocytů, produkci IL-6 a TNF-α. Z většiny je v těle přeměněn na monomethyl fumarát (MMF) a jen malá část se dostává do krevního oběhu (Robledinos-Antón, 2019). MMF interaguje s Cys151 KEAP1, a tak aktivuje Nrf2. Bylo pozorováno, že DMF může mít určité nežádoucí účinky. Z toho důvodu se vyvíjejí

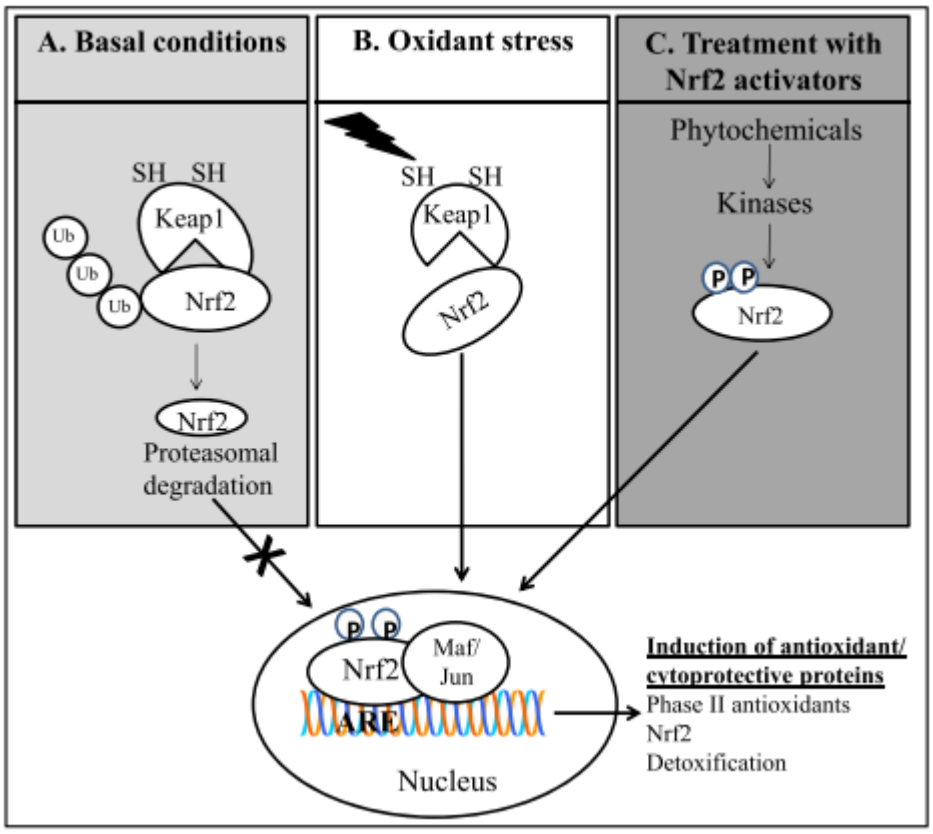
přípravky, které by dokázaly postupně uvolňovat jen MMF a obejít možný vznik komplikací (Cuadrado, 2019).

Sulforafan (SFN) je široce užívaný přírodní aktivátor Nrf2. Také interaguje s Cys151 na KEAP1. Především podporuje transkripci enzymu NADPH-quinon oxidoreduktasa 1. Sulforafan je při pokojové teplotě nestabilní a z důvodu potřeby znát přesnou dávku byla vyvinuta syntetická forma (SFX-01), která je mnohem stabilnější (Cuadrado, 2019).

PPI inhibitory zasahují přímo do vazby Nrf2 na Kelch motivy ETGE domény KEAP1, a tím zajišťují vyšší selektivitu v aktivaci Nrf2 oproti elektrofilním molekulám. Z této skupiny stojí za zmínku především tetrahydroisoquinolin, thiopyrimidin, naftalen nebo deriváty močoviny (Robledinos-Antón, 2019).

Další hojně používanou skupinou aktivátorů Nrf2 jsou fytochemikálie. Jedná se o skupinu přírodních biologicky aktivních látek, někdy označovaných také jako barevné pigmenty rostlin.

Jedna z nynějších dobře prozkoumaných kombinací účinných fytochemikálií je lék Protandim, který zajištuje zvýšení koncentrace Nrf2 v již poměrně nízkých dávkách, díky čemuž je jeho užívání bezpečné. Je směsí kurkuminu, silymarinu, withaferinu A, skupiny bacosidů, polyfenolů a epigalokatechin-3-galátu (Reuland, 2013).



Obrázek 7: Porovnání regulace Nrf2 za různých podmínek**. A)** Za normálních podmínek je Nrf2 zadržován v cytoplazmě svým inhibitorem a pomocí ubikvitinace je směřován k proteosomální degradaci. **B)** Působením oxidačního stresu dochází k oxidaci KEAP1 a následnému uvolnění Nrf2 z vazby. Dochází k translokaci Nrf2 do jádra. **C)** Alternativní cesta aktivace Nrf2 pomocí terapeutických přípravků dodávaných do organismu z vnějšího prostředí. Odehrává se pomocí fosforylace Nrf2, čímž je zabráněno ubikvitinaci a umožněna translokace do jádra. Jakmile je aktivní Nrf2 v jádře, indukuje transkripci důležitých cytoprotektivních a antioxidačních látek (Reuland, 2013).

Aktivátor	Efekt v kardiovaskulárním systému	Původ
Sulforafan	ochrana proti oxidaci LDL, prevence kardiomyopatie	přírodní
Miltiron	ochrana před ox-LDL	přírodní
Rutin	ochrana před H_2O_2	přírodní
1,25-dihydroxycholekalciferol	předchází oxidačnímu stresu a vzniku zánětu	přírodní
Celastrol	tlumí poškození endotelu způsobené angiotensinem II	přírodní
Dimethyl fumarát	protizánětlivý účinek, brání kalcifikaci cévní stěny	přírodní
Oltipraz	podporuje syntézu glutathionu	syntetický
Quercetin	inhibuje expresi adhezních molekul a produkci ROS	přírodní
Sofalcone	potlačuje endotelovou dysfunkci	syntetický
Salidrosid	zmírňuje poškození způsobené ROS	přírodní
Resveratrol	ochrana před poškozením hyperglykémií, brání kalcifikaci cévní stěny, protizánětlivý účinek	přírodní

Tabulka 1: Přehled některých, v dnešní době nejužívanějších, aktivátorů Nrf2 (Reuland, 2013; (Robledinos-Antón, 2019).

7.1.2. Exogenní inhibitory Nrf2

Jejich využití se omezuje výhradně při léčbě rakoviny. Rakovinotvorné buňky často produkují vysoké množství Nrf2, který je chrání před poškozením oxidačním stresem. Tyto buňky bývají rezistentnější k chemoterapii a radioterapii, proto je nutné je nejprve oslabit. Mechanismus inhibice však stále ještě v mnoha případech není úplně popsán.

Jako látky inhibující se používají agonisté nukleárních receptorů, které inhibují Nrf2 tak, že mu brání v translokaci do jádra, dále přírodní látky, u kterých bylo zjištěno, že inhibují Nrf2 (např. flavonoidy luteolin a wogonin nebo mykotoxiny) nebo se zkouší jiné přístupy. Hledají se molekuly, které by inhibovaly konkrétní domény na Nrf2. Například inhibice domény Neh1 by bránila interakci s Maf proteiny či ARE (Robledinos-Antón, 2019).

8. Závěr

Cílem této práce bylo nahlédnutí do struktury a funkce nukleárního transkripčního faktoru Nrf2 a jeho hlavního represoru v buňkách, proteinu KEAP1, přiblížit problematiku regulace transkripce cytoprotektivních látek a antioxidantů přes aktivaci Nrf2 a popsat mechanismy, kterými k tomu dochází. Seznámit se s problematikou zvýšeného oxidačního stresu a úbytku Nrf2 s přibývajícím věkem a popsat rozvoj onemocnění s tímto se spojujících.

Nrf2 je důležitým faktorem pro transkripci antioxidačních systémů jako jsou enzymy NADPH-quinon oxidoreduktasa 1, hemoxygenasa 1, glutamát-cystein ligasa, glutathion-S-transferasa, superoxid dismutasa a mnoha dalších. Tyto látky se uplatňují při zvýšených nárocích buňky na ochranu před oxidačním stresem. V průběhu stárnutí organismu a v průběhu téměř všech patologických procesů dochází k nadměrné tvorbě ROS a RNS v poškozených buňkách a zároveň poruchám regulace Nrf2 a nedostatečné odpovědi organismu na oxidační zátěž. Tento stav je zásadní pro poruchu funkce cévního endotelu, který produkuje ROS a prozánětlivé cytokiny, způsobující zapojení buněk imunitního systému a rozvoj zánětu. Spouští se kaskádovitá reakce, při níž dochází k oxidaci lipoproteinů (převážně LDL), jejich ingesci makrofágy, tvorbě pěnových buněk a vzniku aterosklerotických plátů. Rozvoj ateroskleróz je předstupněm výskytu onemocnění srdce, především ischemické choroby srdeční.

V souvislosti oxidačního stresu s rozvojem onemocnění lze předpokládat možnost terapeuticky se zaměřit na up-regulaci faktoru Nrf2, jakožto hlavního strůjce antioxidační odpovědi. Mnohé studie se v dnešní době zaměřují na různé mechanismy aktivace Nrf2, či inhibice KEAP1, pro léčebné účely. Řada látek ať přírodního původu či syntetických je v různých fázích testování a u mnohých byl prokázán pozitivní vliv na snížení koncentrace oxidantů cestou aktivace Nrf2. Žádný z těchto přípravků bohužel ale doposud nemá natolik blahodárné účinky, aby mohl být používán bez kombinace s jinými léčivy.

POUŽITÁ LITERATURA

1) PAUNKOV, A., CHARTOUMPEKIS, D.V., ZIROS, P. G., SYKIOTIS, G. P.; 2019. A Bibliometric Review of the Keap1/Nrf2 Pathway and its Related Antioxidant Compounds. Antioxidants [online]. **8**(9) [cit. 2020-02-17]. DOI: 10.3390/antiox8090353. ISSN 2076-3921

2) UNGVARI, Z., TARANTINI, S., NYÚL-TÓTH, Á., et al.; 2019. Nrf2 dysfunction and impaired cellular resilience to oxidative stressors in the aged vasculature: from increased cellular senescence to the pathogenesis of age-related vascular diseases. GeroScience [online]. **41**(6), 727-738 [cit. 2020-02-29]. DOI:10.1007/s11357-019-00107-w. ISSN 2509-2715

3) BASAK, P., SADHUKHAN, P., SARKAR, P., SIL, P.C.; 2017. Perspectives of the Nrf-2 signaling pathway in cancer progression and therapy. Toxicology Reports [online]. 4, 306-318 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1016/j.toxrep.2017.06.002. ISSN 2214 7500

4) MOTOHASHI, H., KATSUOKA, F., ENGEL J.D., YAMAMOTO, M.; 2004. Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences [online]. 101(17), 6379-6384 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1073/pnas.0305902101. ISSN 0027-8424

5) PARAMASIVAN, P., KANKIA, I. H., LANGDON, S. P., DEENI, Y.Y.; 2019. Emerging role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in the mechanism of action and resistance to anticancer therapies. Cancer Drug Resistance [online]. [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.20517/cdr.2019.57

6) SYKIOTIS, G.P., BOHMANN, D.; 2010. Stress-Activated Cap'n'collar Transcription Factors in Aging and Human Disease. Science Signaling [online]. 3(112), re3-re3 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1126/scisignal.3112re3. ISSN 1937-9145

7) NAMANI, A., LI, Y., WANG, X.J., TANG, X.; 2014. Modulation of NRF2 signaling pathway by nuclear receptors: Implications for cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research [online]. 1843(9), 1875-1885 [cit. 2020-04-03]. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.003. ISSN 01674889

8) SUZUKI, M., OTSUKI, A., KELEKU-LUKWETE, N., YAMAMOTO, M.; 2016. Overview of redox regulation by Keap1–Nrf2 system in toxicology and cancer. Current Opinion in Toxicology [online]. 1, 29-36 [cit. 2020-04-03]. DOI: 10.1016/j.cotox.2016.10.001. ISSN 24682020

9) WANG, H., LIU, K., GENG, M., et al.; 2013. RXR Inhibits the NRF2-ARE Signaling Pathway through a Direct Interaction with the Neh7 Domain of NRF2. Cancer Research [online]. 73(10), 3097-3108 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3386. ISSN 0008-5472

10) TONELLI, C., CHIO, I.I.C., TUVESON, D.A.; 2018. Transcriptional Regulation by Nrf2. Antioxidants & Redox Signaling [online]. 29(17), 1727-1745. DOI: 10.1089/ars.2017.7342. ISSN 1523-0864

11) PANIERI, E., SASO, L.; 2019. Potential Applications of NRF2 Inhibitors in Cancer Therapy. Oxidative Medicine and Cellular Longevity [online]. 2019, 1-34 [cit. 2020-04-24]. DOI: 10.1155/2019/8592348. ISSN 1942-0900

12) LEUNG, C.H., ZHANG, J.T., YANG, G.J., et al.; 2019. Emerging Screening Approaches in the Development of Nrf2–Keap1 Protein–Protein Interaction Inhibitors. International Journal of Molecular Sciences [online]. 20(18) [cit. 2020-04-24]. DOI: 10.3390/ijms20184445. ISSN 1422-0067

13) PASTOREK, M., MÜLLER, M., VOJTĚŠEK, B.; 2015. Nrf2 – Two Faces of Antioxidant System Regulation. Klinicka onkologie [online]. 28(Suppl 2), 2S26-2S31 [cit. 2020-04-29]. DOI: 10.14735/amko20152S26. ISSN 0862495X

14) CANNING, P., SORRELL, F.J., BULLOCK, A. N.; 2015. Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. Free Radical Biology and Medicine [online]. 88, 101-107 [cit. 2020-04-29]. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.034. ISSN 08915849

15) JIANG, Z.Y., CHU, H.X., XI, M.Y., et al.; 2015. Domain structure of Nrf2 and Keap1. PLOS ONE. Figure. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075076.g002

16) ROBLEDINOS-ANTÓN, N., FERNÁNDEZ-GINÉS, R., MANDA, G., CUADRADO, A.; 2019. Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development. Oxidative Medicine and Cellular Longevity [online]. 2019, 1-20 [cit. 2020-05-04]. DOI: 10.1155/2019/9372182. ISSN 1942-0900

17) DESHAIES, R.J., JOAZEIRO, C.A.P.; 2009. RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. Annual Review of Biochemistry [online]. 78(1), 399-434 [cit. 2020-05-04]. DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.101807.093809. ISSN 0066-4154

18) QIN, J.J., CHENG, X.D., ZHANG, J., ZHANG, W.D.; 2019. Dual roles and therapeutic potential of Keap1-Nrf2 pathway in pancreatic cancer: a systematic review. Cell Communication and Signaling [online]. 17(1) [cit. 2020-05-04]. DOI: 10.1186/s12964-019-0435-2. ISSN 1478-811X

19) CUADRADO, A., MANDA, G., HASSAN, A., et al.; 2018. Transcription Factor NRF2 as a Therapeutic Target for Chronic Diseases: A Systems Medicine Approach. Pharmacological Reviews [online]. 70(2), 348-383 [cit. 2020-05-04]. DOI: 10.1124/pr.117.014753. ISSN 0031-6997

20) WU, T., ZHAO, F., GAO, B., et al.; 2014. Hrd1 suppresses Nrf2-mediated cellular protection during liver cirrhosis. Genes and development [online]. 28(7), 708-722 [cit. 2020-05-05]. DOI: 10.1101/gad.238246.114. ISSN 0890-9369

21) SIES, H.; 2018. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. Current Opinion in Toxicology [online]. 7, 122-126 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1016/j.cotox.2018.01.002. ISSN 24682020

22) KODÍČEK, M.; 2007. Bílkoviny – strukturní motivy. From: Biochemické pojmy: výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT Praha, [cit. 2020-05-16]. ISBN 978-80-7080-669-2

23) LUSHCHAK, V. I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Chemico-Biological Interactions [online]. 224, 164-175 [cit. 2020-05-24]. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.10.016. ISSN 00092797

24) GAGNÉ, F., 2014. Oxidative Stress. Biochemical Ecotoxicology [online]. Elsevier, 2014, 103-115 [cit. 2020-05-25]. DOI: 10.1016/B978-0-12-411604-7.00006-4. ISBN 9780124116047.

25) GHAFOURI-FARD, S., SHOOREI, H., TAHERI, M., 2020. Non-coding RNAs are involved in the response to oxidative stress. Biomedicine & Pharmacotherapy [online]. 127 [cit. 2020-06-10]. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110228. ISSN 07533322

26) CHEN, B., LU, Y., CHEN, Y., CHENG, J., 2015. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. Journal of Endocrinology [online]. 225(3), R83-R99 [cit. 2020-06-12]. DOI: 10.1530/JOE-14-0662. ISSN 0022-0795

27) KANSANEN, E., KUOSMANEN, S. M., LEINONEN, H., LEVONEN, A. L., 2013. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biology [online]. 1(1), 45-49 [cit. 2020-06-12]. DOI: 10.1016/j.redox.2012.10.001. ISSN 22132317

28) KLOSKA, D., KOPACZ, A., PIECHOTA-POLANCZYK, A., et al, 2019. Nrf2 in aging – Focus on the cardiovascular system. Vascular Pharmacology [online]. 112, 42-53 [cit. 2020-06-12]. DOI: 10.1016/j.vph.2018.08.009. ISSN 15371891.

29) GUO, Z., MO, Z., 2020. Keap1-Nrf2 signaling pathway in angiogenesis and vascular diseases. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine [online]. 14(6), 869-883 [cit. 2020-06-12]. DOI: 10.1002/term.3053. ISSN 1932-6254.

30) INCALZA, M. A., D'ORIA, R., NATALICCHIO, A. et al, 2018. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. Vascular Pharmacology [online]. 100, 1-19 [cit. 2020-06-15]. DOI: 10.1016/j.vph.2017.05.005. ISSN 15371891

31) WARRAICH, U., HUSSAIN, F., KAYANI, H. U. R., 2020. Aging – Oxidative stress, antioxidants and computational modeling. Heliyon [online]. 6(5) [cit. 2020-06-15]. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04107. ISSN 24058440

32) KATTOOR, A. J., POTHINENI, N. V. K, PALAGIRI, D., MEHTA, J. L., 2017. Oxidative Stress in Atherosclerosis. Current Atherosclerosis Reports [online]. 19(11) [cit. 2020-06-15]. DOI: 10.1007/s11883-017-0678-6. ISSN 1523-3804

33) MARCHIO, P., GUERRA-OJEDA, S., VILA, J. M. et al., 2019. Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Harmful and Beneficial Role of ROS 2019 [online]. 2019, 1-32 [cit. 2020-06-15]. DOI: 10.1155/2019/8563845. ISSN 1942-0900

34) FÖRSTERMANN, U., XIA, N., LI, H., 2017. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. Circulation Research [online]. 120(4), 713-735 [cit. 2020-06-15]. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309326. ISSN 0009-7330

35) PIGNATELLI, P., MENICHELLI, D., PASTORI, D., VIOLI, F., 2018. Oxidative stress and cardiovascular disease: New insights. Kardiologia Polska [online]. 713-722 [cit. 2020-06-16]. DOI: 10.5603/KP.a2018.0071. ISSN 0022-9032

36) PERROTTA, I., AQUILA, S., 2015. The Role of Oxidative Stress and Autophagy in Atherosclerosis. Oxidative Medicine and Cellular Longevity [online]. 2015, 1-10 [cit. 2020-06-16]. DOI: 10.1155/2015/130315. ISSN 1942-0900

37) PEOPLES, J. N., SARAF, A., GHAZAL, N., et al, 2019. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. Experimental & Molecular Medicine [online]. 51(12), 1-13 [cit. 2020-06-17]. DOI: 10.1038/s12276-019-0355-7. ISSN 1226-3613

38) POZNYAK, A. V., GRECHKO, A. V., OREKHOVA, V. A. et al, 2020. Oxidative Stress and Antioxidants in Atherosclerosis Development and Treatment. Biology [online]. 9(3) [cit. 2020-06-17]. DOI: 10.3390/biology9030060. ISSN 2079-7737

39) PAGLIARO, B. R., CANNATA, F., STEFANINI, G. G., BOLOGNESE, L., 2020. Myocardial ischemia and coronary disease in heart failure. Heart Failure Reviews [online]. 25(1), 53-65 [cit. 2020-06-19]. DOI: 10.1007/s10741-019-09831-z. ISSN 1382-4147

40) HRDINA, R., MLADĚNKA, P., BOBROVÁ, Z., HÜBL, M., 2008. Farmakoterapie ischemické choroby srdeční. Medicína pro praxi. 5(11), 426–431 [cit. 2020-06-19].

41) ŠPÁC, J., 2017. Hypertenze a ischemická choroba srdeční – dva nebezpeční sourozenci. Kardiologická revue – Interní medicína [online]. 19(2), 98-101. ISSN 1803-6597

42) ZHANG, H., DAVIES, K. J. A., FORMAN, H. J., 2015. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. Free Radical Biology and Medicine [online]. 88, 314-336 [cit. 2020-06-20]. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.036. ISSN 08915849

43) PENCKOFER, S., SCHWERTZ, D., FLORCZAK, K., 2002. Oxidative Stress and Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes: The Role of Antioxidants and Pro-Oxidants. The Journal of Cardiovascular Nursing [online]. 16(2), 68-85 [cit. 2020-06-20]. DOI: 10.1097/00005082-200201000-00007. ISSN 0889-4655.

44) SELVARAJU, V., JOSHI, M., SURESH, S., 2012. Diabetes, oxidative stress, molecular mechanism, and cardiovascular disease – an overview. Toxicology Mechanisms and Methods [online]. 22(5), 330-335 [cit. 2020-06-20]. DOI: 10.3109/15376516.2012.666648. ISSN 1537-6516

45) CERIELLO, A. a E. MOTZ, 2004. Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease? The Common Soil Hypothesis Revisited. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology [online]. 24(5), 816-823 [cit. 2020-06-20]. DOI: 10.1161/01.ATV.0000122852.22604.78. ISSN 1079-5642

46) CHEN, B., LU, Y., CHEN, Y., CHENG, J., 2015. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. Journal of Endocrinology [online]. 225(3), R83-R99 [cit. 2020-06-21]. DOI: 10.1530/JOE-14-0662. ISSN 0022-0795

47) HIGUCHI, M., 2014. Antioxidant Properties of Wheat Bran against Oxidative Stress. Wheat and Rice in Disease Prevention and Health. Elsevier [online]. 181-199 [cit. 2020-06-21]. DOI: 10.1016/B978-0-12-401716-0.00015-5. ISBN 9780124017160

48) ZHANG, M., AN, C., GAO, Y., et al, 2013. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. Progress in Neurobiology [online]. 100, 30-47 [cit. 2020-06-21]. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2012.09.003. ISSN 03010082

49) HIEBERT, P., WERNER, S., 2019. Regulation of Wound Healing by the NRF2 Transcription Factor—More Than Cytoprotection. International Journal of Molecular Sciences [online]. 20(16) [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.3390/ijms20163856. ISSN 1422-0067

50) SHEMIAKOVA, T., IVANOVA, E., GRECHKO, A. V., 2020. Mitochondrial Dysfunction and DNA Damage in the Context of Pathogenesis of Atherosclerosis. Biomedicines [online]. 8(6) [cit. 2020-06-24]. DOI: 10.3390/biomedicines8060166. ISSN 2227-9059

51) HAMAZAKI, J., IEMURA, S., NATSUME, T., et al., 2006. A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes. The EMBO Journal [online]. 25(19), 4524-4536 [cit. 2020-06-27]. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601338. ISSN 0261-4189

52) COLLINS, G. A., GOLDBERG, A. L., 2017. The Logic of the 26S Proteasome. Cell [online]. 169(5), 792-806 [cit. 2020-06-27]. DOI: 10.1016/j.cell.2017.04.023. ISSN 00928674

53) SATTA, S., MAHMOUD, A. M., WILKINSON, F. L., et al., 2017. The Role of Nrf2 in Cardiovascular Function and Disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity [online]. 2017, 1-18 [cit. 2020-06-28]. DOI: 10.1155/2017/9237263. ISSN 1942-0900

54) MIMURA, J. a K. ITOH, 2015. Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis. Free Radical Biology and Medicine [online]. 88, 221-232 [cit. 2020-06-28]. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.019. ISSN 08915849

55) CUADRADO, A., ROJO, A. I., WELLS, G., et al., 2019. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. Nature Reviews Drug Discovery [online]. 18(4), 295-317 [cit. 2020-06-29]. DOI: 10.1038/s41573-018-0008-x. ISSN 1474-1776