

Reaktywne formy tlenu – znaczenie w fizjologii i stanach patologii organizmu

Reactive oxygen species – physiological and pathological function in the human body

Adam Łuszczewski¹, Ewa Matyska-Piekarska², Jakub Trefler², Iwona Wawer¹, Jan Łącki²,
Paula Śliwińska-Stańczyk²

¹Zakład Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Warszawie,

kierownik Zakładu prof. dr hab. farm. Iwona Wawer

²Klinika i Poliklinika Układowych Chorób Tkanki Łącznej Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie,

kierownik Kliniki prof. dr hab. med. Jan Łącki, dyrektor Instytutu prof. dr hab. med. Sławomir Maśliński

Słowa kluczowe: reaktywne formy tlenu, wolne rodniki, biomarkery stresu oksydacyjnego.

Key words: reactive oxygen species, free radicals, biomarkers of oxidative stress.

Streszczenie

Reaktywne formy tlenu (RFT) odgrywają kluczową rolę w podstawowych procesach biologicznych zachodzących w organizmie ludzkim zarówno w stanie zdrowia, jak i choroby. W sytuacji określonej mianem „stresu oksydacyjnego” dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy tempem powstawania RFT a wydolnością układu antyoksydacyjnego. Reaktywne formy tlenu powodują utlenienie tłuszczów, białek, DNA, a co za tym idzie, mogą przyczynić się do uszkodzenia tkanek. Toksyczne produkty reakcji utleniania wywierają działanie cytostaticzne na komórkę, doprowadzają do uszkodzenia błon komórkowych i aktywują mechanizmy apoptozy. Stan równowagi komórek jest utrzymywany przez enzymy antyoksydacyjne oraz takie substancje, jak glutation, witaminy E, C i A czy tioredoksyna. Związki te umożliwiają usuwanie nadmiaru RFT z komórki. Działania zmierzające do zmniejszenia stresu oksydacyjnego w komórkach organizmu mogą skutkować poprawą kliniczną chorych, natomiast nadmierna produkcja wolnych rodników jest pierwotną przyczyną bądź wtórnym powikłaniem choroby.

Do chorób, w których stres oksydacyjny odgrywa kluczową rolę, zalicza się m.in. choroby układu krążenia, neurodegeneracyjne czy choroby zapalne, takie jak np. reumatoidalne zapalenie stawów. Dlatego też znajomość patofizjologii stresu oksydacyjnego oraz jego biomarkerów może okazać się bardzo użyteczna w codziennej praktyce klinicznej.

Summary

Reactive oxygen species (ROS) are involved in both human health and disease. ROS are produced during normal metabolism. Overproduction of ROS is called “oxidative stress”. Free radicals and other oxidants cause oxidation of lipids, proteins and DNA, thereby increasing the likelihood of tissue injury. Toxic products of radicals’ reactions exert cytostatic effects, cause membrane damage and activate pathways of cell death. The redox status of the cell is maintained by antioxidant enzymes and substances such as glutathione, vitamins E, C and A, and thioredoxin, which serve to remove ROS. Lowering oxidative stress can have a clinical benefit, whereas the excess production of ROS is either the primary cause of diseases or secondary complication. Oxidative stress diseases include cardiovascular, neurodegenerative and inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis. Therefore, knowledge about oxidative stress and its biomarkers may be very useful.

Adres do korespondencji:

mgr farm. Adam Łuszczewski, Zakład Chemii Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna w Warszawie, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa, e-mail: a.luszczewski@onet.pl

Praca wpłynęła: 6.09.2007 r.

Tlen, którym oddychamy, ulega w organizmie czterostopniowej redukcji, w wyniku której powstaje cząsteczka wody. Produkty niecałkowitej redukcji cząsteczki tlenu nazwano reaktywnymi formami tlenu, – RFT (tab. I). Mogą być to neutralne cząsteczki lub jony oraz wolne rodniki tlenowe. Wolne rodniki tlenowe są bardzo reaktywne, szybko wchodzą w reakcje, w tym łańcuchowe. Reagują z białkami, lipidami, cukrami i kwasami nukleinowymi obecnymi w komórkach, prowadząc do powstania kolejnych produktów wolnorodnikowych. Jednym z najbardziej reaktywnych wolnych rodników jest rodnik hydroksylowy (OH^\bullet) [1].

Źródła reaktywnych form tlenu w organizmie

Organizmy żywe wytwarzają RFT w wielu podstawowych procesach biochemicznych, takich jak łańcuch oddechowy, metabolizm nukleotydów purynowych, mikrosomalny cykl hydroksylacyjny (cytochrom P-450), reakcje zachodzące z udziałem oksydoreduktaz. Produktem tych reakcji jest najczęściej anionorodnik ponadtlenkowy lub nadtlenek wodoru. Powstające RFT są produktami pośrednimi, które powinny ulec dalszej redukcji w kolejnych etapach reakcji biochemicznych, jednak z różnych przyczyn nie zawsze tak się dzieje.

Metaboliczne działania reaktywnych form tlenu

W warunkach homeostazy RFT pełnią funkcje mediatorów i regulatorów metabolizmu – indukują różnicowanie komórek, aktywują wiele genów, m.in. onkogen c-fos, indukują apoptozę, wpływając na syntezę, uwalnianie lub inaktywację śródbłonkowego czynnika rozszerzającego naczynia (EDRF), działają rozszerzająco bądź kurcząco na ścianę naczyń krwionośnych, zwiększają przepuszczalność ścian naczyń włosowatych, stymulują transport glukozy do komórek, serotoniny do płytek krwi. Wpływają na przekazywanie sygnałów do komórek i wewnątrz komórek, regulują ekspresję genów. Mogą stawać się wtórnymi przekaźnikami zarówno w procesie wzrostu, jak i śmierci komórki. Aktywują białka kierujące podziałami komórkowymi (*mitogenic activated protein*). Biorą udział w procesach obronnych organizmu. Nadtlenki regulują ponadto syntezę prostanoidów.

Toksyczne działanie reaktywnych form tlenu – stres oksydacyjny

Nadmierna produkcja RFT oraz wyczerpanie przez organizm rezerw antyoksydacyjnych jest zjawiskiem nazywanym „stresem oksydacyjnym”. Stres oksydacyjny prowadzi do utleniania białek, co powoduje modyfi-

kację ich struktury i zaburzenie funkcji. Następuje też utlenianie lipidów, uszkodzenia kwasów nukleinowych, depolimeryzacja kwasu hialuronowego i gromadzenie IgG. Reaktywne formy tlenu inaktywują ponadto inhibitory proteaz, co nasila działanie proteolityczne tych enzymów na tkanki.

Wysokie stężenia RFT wywołują reakcje łańcuchowe, nasilające procesy uszkodzania biocząsteczek. Utlenianiu ulegają reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzące w skład fosfolipidów, które są głównym składnikiem budulcowym błon komórkowych. Produkty takiej nieenzymatycznej peroksydacji lipidów zmieniają właściwości fizyczne błon komórkowych, co może prowadzić do ich uszkodzenia. Na poziomie molekularnym RFT powodują degradację kolagenu, zaburzenia syntezy i inaktywację proteoglikanów, inaktywację enzymów, pęknięcia nici DNA, uszkodzenie chromosomów, powstawanie mutacji prowadzących do zmian nowotworowych, inhibicję fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach, zaburzenia struktury cytoszkieletu (polimeryzację aktyny, rozerwanie mikrofilamentów), modyfikację właściwości antygenowych komórek oraz zaburzenie wewnątrzkomórkowej homeostazy wapnia.

Mechanizmy obronne komórek przed reaktywnymi formami tlenu

W komórkach istnieje wiele skutecznych mechanizmów chroniących przed toksycznym działaniem RFT. W warunkach homeostazy, dzięki działaniu enzymatycznym i nieenzymatycznym antyoksydantów, nadmiar RFT jest likwidowany i uszkodzenia biomolekuł są naprawiane (tab. II) [2, 3].

Tabela I. Reaktywne formy tlenu (RFT)

Table I. Reactive oxygen species

Reaktywne formy tlenu (RFT) rodniki (WRT)	
anionorodnik ponadtlenkowy	O_2^\bullet
rodnik hydroksylowy	OH^\bullet
rodnik wodoronadtlenkowy	HO_2^\bullet
rodnik nadtlenkowy	ROO^\bullet
rodnik alkoksylowy	RO^\bullet
inne RFT	
nadtlenek wodoru	H_2O_2
kwas podchlorawy	HOCl
kwas podbromawy	HOBr

Tabela II. Antyoksydanty jako obrona przed RFT
Table II. Antioxidants as a defense against reactive oxygen species

Antyoksydanty	
nienenzymatyczne	enzymatyczne
glutation (GSH)	dysmutaza ponadtlenkowa (CuZnSOD, MnSOD)
witamina E	peroksydaza glutationowa (GPx)
witamina C	katalaza
albuminy	ceruloplazmina
bilirubina	białka hemowe
kwas moczowy	tiodoksyna (TRX)
kreatynina	paraoksonaza (PON1)
cysteina	
karotenoidy	
flawonoidy	
koenzym Q (zredukowany)	

W miejscu lokalnego pojawienia się nadmiaru RFT są uruchamiane mechanizmy obronne. To, który antyoksydant zostanie użyty w reakcji z rodnikiem lub inną reaktywną formą tlenu, zależy od jej właściwości i miejsca powstania oraz od tego, jakie struktury mogą potencjalnie stać się jej celem. Kwas askorbinowy jest najskuteczniejszym antyoksydantem rodników rozpuszczalnych w wodzie. Kwas moczowy najlepiej neutralizuje działanie dwutlenku azotu. W walce z żelazozależną peroksydacją lipidów najbardziej skutecznymi antyoksydantami są transferyna i ceruloplazmina [2, 4, 5].

Warto zauważyć, że w odpowiedzi na stres oksydacyjny bierze udział nie pojedynczy antyoksydant, lecz cała grupa antyoksydantów, ponieważ ten sam rodnik (RFT) może uszkadzać różne struktury docelowe. Dobrym przykładem jest kwas askorbinowy, który przeciwdziała peroksydacji lipidów wywołanej przez RFT z dymu tytoniowego, ale nie ma wpływu na oksydacyjne uszkodzenia białek osocza [6].

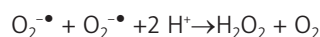
Można wyróżnić 3 podstawowe systemy obrony organizmu przed RFT:

- pierwszą linię obrony – zapobieganie powstawaniu rodnika wodorotlenowego; biorą w niej udział takie enzymy antyoksydacyjne, jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza, peroksydaza glutationowa (GPx),

- drugą linię obrony polegającą na skierowaniu reakcji wolnorodnikowych na tory terminacji; najważniejszą rolę odgrywają w niej antyoksydanty małowcząsteczkowe,
- trzecią linię obrony, którą stanowi naprawa uszkodzeń już powstałych w wyniku działania RFT; do tej linii obrony należą enzymy antyoksydacyjne o aktywności oksydoreduktaz, które potrafią zredukować produkty peroksydacji lipidów (paraoksonaza) lub mostki disulfidowe powstałe w wyniku peroksydacji DNA (tiodoksyna – TRX, peroksydaza glutationowa).

Pierwsza linia obrony

Wśród antyoksydantów enzymatycznych pierwszej linii obrony największe znaczenie ma dysmutaza ponadtlenkowa, która katalizuje reakcję dysproporcjonowania anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru i tlenu cząsteczkowego.



Szkodliwy nadtlenek wodoru jest następnie neutralizowany w organizmach przez 2 równie ważne enzymy antyoksydacyjne – katalazę i peroksydazę glutationową. Końcowym produktem obu enzymów jest woda, a w przypadku katalazy również cząsteczka tlenu. Peroksydaza glutationowa wymaga do swojego działania obecności zredukowanej formy glutationu (GSH). Stosunek stężeń zredukowanej postaci glutationu (GSH) do jego formy utlenionej (GSSG) w organizmach żywych w homeostazie procesów redukcyjno-oksydacyjnych wynosi od 1:10 do 1:100 i gwałtownie się zmniejsza w przypadku nasilania się procesów oksydacyjnych, szczególnie podczas stresu oksydacyjnego [7]. Ważną funkcję w walce z RFT pełni również białka enzymatyczne, takie jak ceruloplazmina i białka hemowe.

Druga linia obrony

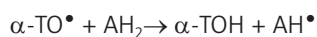
Drugą linię obrony stanowią antyoksydanty małowcząsteczkowe, takie jak witaminy C czy E. Antyoksydanty małowcząsteczkowe konkurują z innymi związkami chemicznymi, które mogłyby zostać utlenione przez RFT (np. $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, $HOCl$). W wyniku reakcji RFT z antyoksydantem powstaje wolny rodnik, który jest znacznie mniej reaktywny niż rodnik, który powstałby np. w wyniku peroksydacji lipidów. Następuje wtedy przerwanie łańcuchowej reakcji wolnorodnikowej i zahamowanie peroksydacji kolejnych związków biologicznie czynnych.

W ten sposób działa α -tokoferol (α -TOH). Ze względu na swoje właściwości lipofilowe i obecność w błonach komórkowych przerywa on łańcuch reak-

cji wolnorodnikowych będących następstwem peroksydacji lipidów:



Produkt utlenienia – rodnik α -tokoferolowy ($\alpha\text{-TO}\cdot$) – dzięki reakcji z kwasem askorbinowym może zostać następnie zredukowany znowu do witaminy E.



Trzecia linia obrony

Mechanizmem „ostatniej szansy” obrony przed RFT są enzymy naprawcze. Tioredoksyna jest polipeptydem zdolnym do redukcji mostków disulfidowych, powstałych w wyniku utlenienia grup tiolowych – SH, m.in. białek. W podobny sposób działa glutation i GPx, jednak redukcja przez TRX jest wielokrotnie szybsza.

Utleniona tioredoksyna jest redukowana przez NADPH w reakcji katalizowanej przez reduktazę tioredoksyny.

Jednostki chorobowe związane ze szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu

Lista chorób, w patogenezie których RFT odgrywają ważną bądź kluczową rolę, jest obecnie dość długa. Do najważniejszych z nich można zaliczyć miażdżycę, nadciśnienie tętnicze, cukrzycę, nowotwory, stany zapalne wywołane bakteriami czy innymi czynnikami patogennymi, a więc choroby występujące w populacji powszechnie.

Miażdżycyca

Obecnie wymienia się wiele czynników ryzyka miażdżycy, ale rozwój zmian miażdżycowych jest przede wszystkim związany z zaburzoną funkcją śródbłonna naczyń, aktywacją płytek krwi i zmianami oksydacyjnymi lipoprotein zawartych w osoczu. Głównym zaburzeniem odpowiedzialnym za rozwój zmian miażdżycowych jest akumulacja utlenionych lipoprotein o niskiej gęstości. Modyfikacje struktury LDL przebiegają z udziałem wolnych rodników tlenowych [8].

Rola RFT w patogenezie miażdżycy nie ogranicza się do oksydacji lipoprotein. Powodują one również uszkodzenia śródbłonna naczyniowego, co potwierdziły liczne badania. Zapoczątkowują w ten sposób cały proces prowadzący do rozwoju blaszki miażdżycowej. Śródbłonek naczyniowy jest wrażliwy na działanie wolnych rodników. Jego uszkodzenie jest następstwem utleniania przez wolne rodniki białek, lipidów, DNA oraz aktywacji wapniowoależnych układów enzymatycznych – fosfo-

lipaz, endonukleaz i proteaz. Procesy te zubożają komórki śródbłonna w ATP i NADPH, a następnie powstaje ich uszkodzenie. Przewaga procesów wykrzepiania i czynników naczyniozwiązujących prowadzi do narastającej dysfunkcji śródbłonna [6, 8, 9].

Nadciśnienie tętnicze

Ostatnio wiele uwagi poświęcono hipotezie, że rozwój nadciśnienia tętniczego jest związany z zaburzeniem równowagi między czynnikami zwężającymi i rozszerzającymi naczynia, w szczególności wytwarzanymi przez komórki śródbłonna naczyniowego. Uważa się, że jedną z substancji endogennych, najsilniej działających kurcząco na naczynia jest endotelina. Silnie rozkurczająco działa natomiast śródbłonnkowy czynnik rozszerzający naczynia (*endothelium-derived relaxing factor* – EDRF), który zidentyfikowano jako tlenek azotu (NO). Tlenek azotu działa silnie, ale krótkotrwale, jest szybko unieczynniany przez reakcję z anionorodnikiem tlenowym lub tlenem. W warunkach stresu oksydacyjnego nadmierne unieczynnianie EDRF może być jedną z głównych przyczyn przewagi czynników kurczących naczynia i rozwoju nadciśnienia tętniczego. Możliwe jest, że u osób z nadciśnieniem tętniczym następuje nasilenie syntezy anionorodnika ponadtlenkowego przez granulocyty obojętne. Wykazano ponadto dodatnią korelację między syntezą tego rodnika tlenowego a ciśnieniem skurczowym i rozkurczowym [11, 12]. Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że angiotensyna II wywiera działanie plejotropowe na ścianę naczyń poprzez NADPH–zależną syntezę RFT [12].

Cukrzyca

U chorych na cukrzycę zjawisko stresu oksydacyjnego występuje przypuszczalnie na poziomie wielu komórek rozmieszczonych w różnych tkankach. Może przemawiać za tym stwierdzana w większości badań niższa (niż u osób zdrowych) zawartość naturalnych antyoksydantów – witaminy C, witaminy E, glutationu oraz kwasu moczowego w osoczu lub komórkach krwi [13–16]. Wydaje się, że za powstawanie stresu oksydacyjnego odpowiedzialne jest przede wszystkim podwyższenie stężenia glukozy. Glukoza, jako związek aldehydowy, reaguje z grupami aminowymi białek, prowadząc do ich nieenzymatycznej glikozylacji (glikacji). W trakcie tej reakcji uwalniane są wolne rodniki tlenowe, dlatego proces ten nazwano glikoksydacją.

Nowotwory

Powszechnie panuje pogląd, że złośliwe transformacje komórkowe i rozwój nowotworów są związane z uszkodzeniem genomu. Ostatnio wiele uwagi poświęco-

no działaniu reaktywnych form tlenu, w szczególności rodnika wodorotlenowego, który uszkadza DNA. Uszkodzenia DNA obserwowane w komórkach poddanych stresowi oksydacyjnemu mogą prowadzić do mutacji [17].

Stany zapalne

W stanach zapalnych wywołanych bakteriami czy innymi czynnikami patogennymi ważną funkcję obronną pełnią granulocyty obojętne. Jest to możliwe dzięki zdolności tych komórek do fagocytozy. Wiele badań wykazało, że bakteriobójcza aktywność neutrofilii związana z procesem fagocytozy jest połączona z gwałtownym zużyciem tlenu przez te komórki, co jest określane jako „wybuch oddechowy” (*respiratory burst*) [18]. Pochłonięty tlen jest przekształcany w nadtlenek wodoru, który ma właściwości bakteriobójcze. W badaniach *in vitro* wykazano, że nie tylko bakterie wywołują gwałtowne zużycie tlenu przez granulocyty, ale również immunoglobuliny, kompleksy immunologiczne, fragmenty C5a dopeptniacza, substancje kancerogenne, kwas arachidonowy.

Markery stresu oksydacyjnego

W wyniku reakcji lipidów z RFT i dalszych przemian powstaje wiele małych cząsteczkowych produktów rozpadu, m.in. dialdehyd malonowy (MDA). Jest on obecnie najpowszechniej stosowanym markerem peroksydacji lipidów. Innym dobrym markerem peroksydacji lipidów może być oznaczenie w surowicy przeciwciał przeciw utlenionej postaci LDL (Ab oxLDL).

Użytecznym markerem uszkodzenia białek powodowanego przez RFT wydaje się oznaczenie grup karbonylowych białek.

W komórkach poddanych stresowi oksydacyjnemu obserwowano uszkodzenia kwasu deoksyrybonukleinowego. Przypuszcza się, że prooksydacyjny stan komórek zmienia wewnątrzkomórkową homeostazę żela-

za i miedzi, a reakcje Fentona odgrywają istotną rolę w procesach uszkodzenia materiału genetycznego. Z badań radiobiologicznych wynika, że rodniki wodorotlenowe mogą powodować kilka typów uszkodzeń DNA [20]. Dobrym markerem uszkodzeń DNA jest 8-hydrok-
sy-2'-deoksyguanozyna (8-OHdG) [20].

Markerem procesu zapalnego zachodzącego z udziałem RFT może być również podwyższone stężenie jonów żelaza. Żelazo, w szczególności na II stopniu utlenienia, jest katalizatorem reakcji Fentona, w wyniku której powstaje najbardziej toksyczny z RFT – rodnik wodorotlenowy (tab. III).

Podsumowanie

Reaktywne formy tlenu stanowią istotny element wielu procesów biologicznych kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Zaburzenie równowagi metabolicznej, skutkujące nasileniem reakcji oksydacji kwasów tłuszczowych, białek, cukrów i DNA, jest nazywane stresem oksydacyjnym i towarzyszy wielu powszechnie występującym i częstokroć groźnym dla życia jednostkom chorobowym. Znajomość znaczenia RFT dla prawidłowego funkcjonowania organizmu oraz mechanizmów towarzyszących zjawisku stresu oksydacyjnego, pozwala lepiej zrozumieć patofizjologię wielu stanów chorobowych, w których nasilone działanie RFT odgrywa istotną, a nawet kluczową rolę. W niniejszej pracy zaprezentowano przykłady jednostek chorobowych często spotykanych w praktyce klinicznej. Użytecznym narzędziem do jakościowego i ilościowego określenia zjawiska stresu oksydacyjnego oraz kontrolowania przebiegu leczenia chorób o etiologii wolnorodnikowej mogą okazać się markery stresu oksydacyjnego.

Piśmiennictwo

1. Boveris A. Biochemistry of free radicals: from electron to tissues. *Medicina (B Aires)* 1998; 58: 350-356.
2. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 1-8.
3. Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 125-126.
4. Gutteridge JM, Quinlan GJ. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1156: 144-150.
5. Hu ML, Louie S, Cross CE, et al. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med* 1993; 121: 257-262.
6. Sugden PH, Clerk A. Oxidative stress and growth-regulating intracellular signaling pathways in cardiac myocytes. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 2111-2124.
7. Gohil K, Viguie C, Stanley WC, et al. Blood glutathione oxidation during human exercise. *J Appl Physiol* 1988; 64: 115-119.

Tabela III. Biomarkery uszkodzeń wywołanych przez stres oksydacyjny

Table III. Biomarkers of tissue injury caused by oxidative stress

Biomarkery uszkodzeń wywołanych przez stres oksydacyjny	
uszkodzenie lipidów	MDA, Ab-oxLDL
uszkodzenie białek	grupy karbonylowe białek
uszkodzenie DNA	8-OHdG
stan zapalny z udziałem RFT	podwyższone stężenie jonów żelaza w płynach ustrojowych

8. Sattler W, Kostner GM, Waeg G, Esterbauer H. Oxidation of lipoprotein Lp (a). A comparison with low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1081: 65-74.
9. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 39: 44-84.
10. Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1302-1314.
11. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 247-258.
12. Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells – implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 1263-1273.
13. Packer L. The role of antioxidative treatment in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993; 36: 1212-1213.
14. Maxwell SR. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 1995; 49: 345-361.
15. Łącka B, Grzeszczak W. Rola wolnych rodników tlenowych w patogenezie nadciśnienia samoistnego. *Pol Arch Med Wewn* 1997; 98: 67-75.
16. Kinalska J, Gosiewska A. Plasma ascorbic acid concentration in type I and II diabetic patients with and without microangiopathy. *Diabetes* 1991; 40: 474-475.
17. Badwey JA, Curnutte JT, Karnovsky ML. cis-Polyunsaturated fatty acids induce high levels of superoxide production by human neutrophils. *J Biol Chem* 1981; 256: 12640-12643.
18. Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 2003; 22: 5734-5754.
19. Martins EA, Robalinho RL, Meneghini R. Oxidative stress induces activation of a cytosolic protein responsible for control of iron uptake. *Arch Biochem Biophys* 1995; 316: 128-134.
20. Rall LC, Roubenoff R, Meydani SN, et al. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a marker of oxidative stress in rheumatoid arthritis and aging: effect of progressive resistance training. *Nutr Biochem* 2000; 11: 581-584.