

Gdański Uniwersytet Medyczny  
Katedra i Zakład Chemii Medycznej



Urszula Berenika Popowska

**Zmiany w metabolizmie żelaza indukowane  
przez angiotensynę II i homocysteinę  
w komórkach śródbłonna naczyniowego**

---

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Michał Woźniak  
Kopromotor: dr Andżelika Borkowska

Gdańsk 2016

*Składam najserdeczniejsze podziękowania*

**Mojemu Promotorowi,**

**Panu Profesorowi Michałowi Woźniakowi**

za przekazaną mi wiedzę i ogromną życzliwość

**Panu Profesorowi Jędrzejowi Antosiewiczowi,**

za umożliwienie mi prowadzenia pracy naukowej

i czuwanie nad jej realizacją

**Pani Halinie Haloń,**

za wiarę we mnie i pomoc w każdej sprawie

**Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Chemii Medycznej**

**oraz z Zakładu Bioenergetyki i Fizjologii Wysiłku Fizycznego**

za życzliwość i wspianą atmosferę pracy naukowo-badawczej

**Pani dr Borkowkiej, dr Haloń i dr Sokółowskiej**

za to że zawsze mogłam na nich polegać

**Dziękuję również swoim Bliskim, Mamie, Tacie, siostrze Paulinie i Pawłowi**

za cierpliwość, wyrozumiałość oraz wsparcie.

Praca współfinansowana przez:

Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

w ramach grantu Iuventus Plus (Nr 0040/IP1/2011/71)

---

Spis treści.....	4
Wykaz skrótów:.....	7
1. Wprowadzenie.....	10
1.1 Choroby sercowo-naczyniowe .....	10
1.2 Niezależne czynniki rozwoju chorób sercowo-naczyniowych.....	11
1.2.1 Homocysteina.....	12
1.2.2 Angiotensyna II.....	19
1.2.3 Inne czynniki rozwoju chorób sercowo-naczyniowych.....	24
1.3 Choroby sercowo-naczyniowe a stres oksydacyjny .....	24
1.3.1 Stres oksydacyjny.....	24
1.3.2 Udział stresu oksydacyjnego w przebiegu chorób sercowo-naczyniowych .....	29
1.4 Metabolizm żelaza w przebiegu chorób sercowo-naczyniowych.....	30
1.4.1 Chemia żelaza i jego znaczenie fizjologiczne.....	30
1.4.2 Równowaga LIP-ferrytyna.....	31
1.4.3 Degradacja ferrytyny i udział żelaza w generacji RFT i RFN .....	34
1.4.4 Rola żelaza w rozwoju i przebiegu chorób sercowo-naczyniowych.....	36
1.5 Białkowe kinazy aktywowane mitogenami.....	38
1.5.1 Aktywacja kinaz MAP przez fosforylację kaskadową.....	38
1.5.2 Kinazy N-końcowego odcinka c-Jun .....	39
2. Cele .....	42
3. Materiały i metody .....	43
3.1 Materiały.....	43
3.1.1 Linia komórkowa .....	43
3.1.2 Odczynniki .....	43
3.1.3 Roztwory .....	44
3.1.4 Zestawy komercyjne .....	44
3.1.5 Przeciwciała .....	45
3.1.6 Plazmidy.....	45
3.2 Metody.....	46
3.2.1 Inkubacja komórek z angiotensyną II i homocysteiną .....	46
3.2.2 Transformacja E. Coli. ....	46

---

3.2.3	Izolacja plazmidowego DNA .....	47
3.2.4	Transfekcja komórek CPAE.....	47
3.2.5	Określenie żywotności komórek za pomocą testu SRB.....	48
3.2.6	Analiza cyklu komórkowego z zastosowaniem analizatora Muse.....	49
3.2.7	Pomiar poziomu wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (RTF) i azotu (RFN) metodą cytometrii przepływowej: .....	49
3.2.8	Pomiar labilnej puli żelaza .....	50
3.2.9	Hodowla komórek eukariotycznych CPAE .....	52
3.2.10	Określanie poziomu mRNA wybranych genów.....	52
3.2.11	Western blotting .....	55
3.2.12	Analiza densytometryczna i statystyczna.....	58
4.	Wyniki.....	59
4.1	Wyniki .....	59
4.1.1	Angiotensyna II nie wpływa na żywotność komórek śródbłónka i nie indukuje zmian w cyklu komórkowym.....	59
4.1.2	Zmiany w poziomie białka ferrytyny L zależne od czasu inkubacji z angiotensyną II .....	60
4.1.3	Zmiany w poziomie mRNA ferrytyny L zależne od czasu inkubacji z angiotensyną II .....	61
4.1.4	Wywołana przez angiotensynę II wzmożona produkcja RFT i RFN w komórkach śródbłónka naczyniowego.....	62
4.1.5	Wywołany przez angiotensynę II wzrost poziomu labilnej puli żelaza w komórkach śródbłónka naczyniowego.....	63
4.1.6	Indukowana angiotensyną II degradacja ferrytyny L jest hamowana przez SP600125, inhibitor N- terminalnych kinaz c- Jun.....	64
4.1.7	Kinazy JNK1 oraz JNK2 uczestniczą w procesie regulacji ferrytyny w komórkach CPAE traktowanych angiotensyną II.....	65
4.1.8	Indukowana przez angiotensynę II degradacja ferrytyny L regulowana jest przez białko p66Shc.....	67
4.1.9	Homocysteina nie indukuje zmian w cyklu komórkowym ani nie wpływa na ich żywotność .....	69
4.1.10	Zmiany w poziomie białka ferrytyny L zależne od czasu inkubacji z homocysteiną.. .....	70

---

4.1.11	Zmiany w poziomie mRNA ferrytyny L zależne od czasu inkubacji z homocysteiną .....	71
4.1.12	Wywołane przez homocysteinę obniżenie poziomu RFT i RFN w komórkach śródbłonna naczyniowego.....	74
4.1.13	Indukowana homocysteiną degradacja ferrytyny L jest hamowana przez SP600125, inhibitor N- terminalnych kinaz c- Jun .....	74
4.1.14	Kinazy JNK1 oraz JNK2 uczestniczą w procesie regulacji poziomu ferrytyny L w komórkach CPAE traktowanych homocysteiną .....	75
4.1.15	Indukowana przez homocysteinę degradacja ferrytyny L regulowana jest przez białko p66Shc.....	77
5.	Dyskusja .....	79
6.	Wnioski .....	87
7.	Streszczenie w języku polskim .....	88
8.	Streszczenie w języku angielskim.....	90
9.	Piśmiennictwo .....	91
10.	Załączniki .....	103
11.	Spis tabel .....	108
12.	Spis rycin.....	109

## Wykaz skrótów:

Skrót:	Rozwinięcie skrótu:
<b>2',7'-DCF</b>	2',7'-dichlorofluoresceina
<b>2',7'-DCFH</b>	2',7'-dichlorodihydrofluoresceina
<b>2',7'-DCFH-DA</b>	2',7'-dioctan dichlorodihydrofluoresceiny
<b>ACE</b>	Konwertaza angiotensyny
<b>ADMA</b>	Asymetryczna N, N-dimetyloarginina
<b>Ang II</b>	Angiotensyna II
<b>CPAE</b>	Linia komórkowa śródbłónka pochodzącego z głównego pnia tętnicy płucnej młodej krowy ( <i>łac. Bos taurus</i> )
<b>CRP</b>	Białko C-reaktywne
<b>CVDs</b>	Choroby sercowo-naczyniowe ( <i>ang. CardiovascularDiseases</i> )
<b>DATS</b>	Trisulfid diallilu
<b>DDMH</b>	Dimetyloaminohydrolazadimetyloargininowa
<b>DFO</b>	Deferoksamina
<b>DMSO</b>	Dimetylosulfotlenek
<b>DTT</b>	DL-Ditiotreitol
<b>EC-SOD</b>	Pozakomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa ( <i>ang. Extracelularsuperoxidedismutase</i> )
<b>FBS</b>	Surowica płodowa bydłęca
<b>GSH</b>	Glutation
<b>GSSG</b>	Disulfid glutationu
<b>Hcy</b>	Homocysteina
<b>HTL</b>	Tiolaktonhomocysteiny

<b>IL-1</b>	Interleukina-1
<b>IL-6</b>	Interleukina-6
<b>IRE</b>	Sekwencje reagujące na żelazo( <i>ang. Iron responsive element</i> )
<b>IRP-1</b>	Białko regulujące homeostazę żelaza-1( <i>ang. Iron Regulatory Protein-1</i> )
<b>IRP-2</b>	Białko regulujące homeostazę żelaza-2 ( <i>ang. Iron Regulatory Protein-2</i> )
<b>LDL</b>	Lipoproteiny o niskiej gęstości ( <i>ang. Low-densitylipoprotein</i> )
<b>LH</b>	Wielonienasycone kwasy tłuszczowe
<b>LIP</b>	Labilna pula żelaza ( <i>ang. LabileIron Pool</i> )
<b>LOOH</b>	Nadtlenki lipidowe
<b>LOX-1</b>	Lektyno podobny receptor dla utlenionych LDL
<b>LPS</b>	Lipopolisacharyd
<b>MAPK</b>	Kinazy aktywowane miogenami ( <i>ang. Mitogenactivated protein kinase</i> )
<b>MPO</b>	Mieloperoksydaza
<b>MTFHR</b>	Reduktaza 5,10-metylenotetrahydrofolianowa
<b>NOS</b>	Syntaza tlenku azotu
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Nadtlenoazotyn
<b>p66Shc</b>	Białko p66Shc
<b>P-p66Shc</b>	Ufosforylowane białko p66Shc
<b>PAI-1</b>	Inhibitor aktywatora plazminogenu
<b>PCR</b>	Łańcuchowa reakcja polimerazy
<b>PEI</b>	Chlorowodorek polietylenoiminy
<b>PPA2</b>	Fosfataza białkowa A2



---

<b>RAA</b>	Układ renina-angiotensyna-aldosteron
<b>RFN</b>	Reaktywne formy azotu
<b>RFT</b>	Reaktywne formy tlenu
<b>SAH</b>	S – adenozylohomocysteina
<b>SAM</b>	S – adenozylometionina
<b>SDS</b>	Laurylosiarczan sodu
<b>SOD</b>	Dysmutaza ponadtenkowa
<b>SP600125</b>	Inhibitor JNK
<b>SRB</b>	Sulforodamina B
<b>TCA</b>	Kwas trichlorooctowy
<b>TEMED</b>	<i>N,N,N,N'</i> -Tetrametyloetylenodiamina
<b>Tfr</b>	Receptor transferynowy
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Czynnik martwicy nowotworu
<b>TRIS</b>	2-amino-2-(hydroksymetylo)propano-1,3-diol
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboksan A <sub>2</sub>
<b>WHO</b>	Światowa Organizacja Zdrowia ( <i>ang. World Health Organization</i> )

# 1. Wprowadzenie

## 1.1 Choroby sercowo-naczyniowe

Choroby sercowo-naczyniowe (CVDs) są główną przyczyną zachorowalności i zgonów, zarówno w Polsce jak i na całym świecie. CVDs stanowią poważny problem zdrowotny, określany mianem epidemii XXI wieku. Wspólnym podłożem powyższych jednostek chorobowych jest proces miażdżycowy toczący się w różnych obszarach układu krążenia [1].

Do najczęściej występujących chorób sercowo-naczyniowych zalicza się:

- zawał serca, czyli uszkodzenie serca spowodowane ostrym niedokrwieniem. Przyczyną zawału mięśnia sercowego w większości przypadków jest znaczne zwężenie lub całkowite zamknięcie naczynia wieńcowego, odpowiedzialnego za doprowadzanie krwi do serca,
- udar mózgu, zgodnie z definicją WHO to zespół kliniczny charakteryzujący się nagłym wystąpieniem ogniskowego, a niekiedy również uogólnionego zaburzenia czynności mózgu. Jego objawy utrzymują się dłużej niż 24 godziny lub prowadzą wcześniej do śmierci i nie mają przyczyny innej niż naczyniowa,
- miażdżycę tętnic, która według obowiązującej definicji WHO z 1958 roku to: „Zmienna kombinacja ognisk w błonie wewnętrznej ściany naczynia, składających się z lipidów, węglowodanów złożonych, składników krwi oraz złogów fibryny i wapnia, rozprzestrzeniających się w kierunku dośrodkowym”.

O tym, że miażdżycą jest procesem długotrwałym, złożonym i wieloprzyczynowym jako pierwsi pisali już dziewiętnastowieczni badacze: Karl von Rokitansky i Rudolf Virchow. Pomimo upływu wielu lat teza ta nie straciła na ważności. Współczesny pogląd na patogenezę miażdżycy zakłada, że w odpowiedzi na długotrwałe uszkodzenia śródbłonna dochodzi do reakcji obronnej organizmu manifestującej się przewlekłym stanem zapalnym [2]. Przebieg tej reakcji modyfikowany jest przez stres oksydacyjny, zaburzenia w metabolizmie lipidów oraz proces fibroproliferacyjny zachodzący w ścianach naczyń krwionośnych. W odpowiedzi na wiele współtowarzyszących czynników dochodzi do dysfunkcji komórek śródbłonna i powiązanej z nią

adhezji limfocytów i monocytów do śródbłonka wyściełającego naczynia tętnicze. W kolejnym etapie komórki te wędrują i gromadzą się w błonie wewnętrznej ściany naczynia. Pod wpływem zmodyfikowanych lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) dochodzi do przekształcenia monocytów w makrofagi, które wychwytyjąc i fagocytyując utleniony LDL przeistaczają się w komórki piankowate (makrofagi wypełnione kroplami estrów cholesterolu). Wraz z wyczerpaniem się możliwości tworzenia estrów cholesterolu, w komórkach piankowych zachodzi wytrącanie kryształów wolnego cholesterolu, co może być przyczyną ich rozpadu i tworzenia pozakomórkowych jego złogów [3]. Procesowi temu towarzyszy migracja mięśni gładkich z błony środkowej do wewnętrznej ściany naczynia, gdzie komórki mięśni gładkich dzielą się, a część z nich ulega przekształceniu, które umożliwia im syntezę proteoglikanów, elastyny oraz kolagenu. Powyższe procesy prowadzą do wzrostu blaszki miażdżycowej i formowania się w ścianie naczynia ogniska stłuszczenia, na którym potem powstają pasma tkanki włóknistej.

## 1.2 Niezależne czynniki rozwoju chorób sercowo-naczyniowych

Jak wynika z przeprowadzonych badań epidemiologicznych występowanie i umieralność z powodu CVDs, ściśle związane są z występowaniem czynników ryzyka miażdżycy. Koncepcja czynników ryzyka powstała w połowie XX wieku, kiedy to badacze The Framingham Heart Study jako pierwsi wskazali główne elementy odpowiedzialne za rozwój procesu miażdżycowego [4]. Wraz z upływem czasu rosło zainteresowanie tym tematem i odkrywano kolejne czynniki mogące mieć związek z rozwojem chorób o podłożu sercowo-naczyniowym. Obecnie jest ich już znanych ponad 300 [1]. Patrząc przez pryzmat epidemiologiczny, czynnik ryzyka jest elementem poszczególnej osoby lub całej populacji, którego pojawienie się w życiu wiąże się, ze zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby w przyszłości. Zasadniczy podział czynników ryzyka przeprowadzony został na podstawie możliwości ich tzw. modyfikowalności. Cechy podzielono na poddające się modyfikacji oraz cechy niemodyfikowalne. Pierwsza grupa, czyli czynniki modyfikowalne, związane są ze stylem życia oraz właściwościami fizjologicznymi i biochemicznymi. Grupa ta gromadzi najczęściej występujące czynniki ryzyka takie jak palenie tytoniu, zaburzenia lipidowe, nadciśnienie tętnicze, otyłość, podwyższony poziom homocysteiny itp. Czynniki ryzyka, które nie mogą być celem działań prewencyjnych, tzw. czynniki

niemodyfikowalne dotyczą pewnych właściwości osobniczych, jak wiek czy płeć. Na tego rodzaju cechy nie jesteśmy w stanie wpłynąć jednak pozwalają one na wskazanie osób, u których ryzyko rozwoju chorób sercowo-naczyniowych jest wysokie.

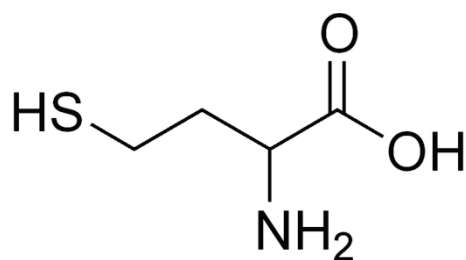
Tab.1- Najważniejsze czynniki ryzyka chorób sercowo-naczyniowych.

STYL ŻYCIA:	CECHY MODYFIKOWALNE:	CECHY NIEMODYFIKOWALNE:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Palenie tytoniu</li> <li>• Nieprawidłowa dieta</li> <li>• Mała aktywność fizyczna</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dyslipidemia</li> <li>• Otyłość</li> <li>• Nadciśnienie tętnicze</li> <li>• Cukrzyca</li> <li>• Zespół metaboliczny</li> <li>• Czynniki prozakrzepowe</li> <li>• <b>Homocysteina</b></li> <li>• <b>Angiotensyna II</b></li> <li>• Markery procesu prozapalnego</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Płeć</li> <li>• Wiek</li> <li>• Obecność choroby sercowo-naczyniowej</li> <li>• Markery genetyczne</li> </ul>

### 1.2.1 Homocysteina

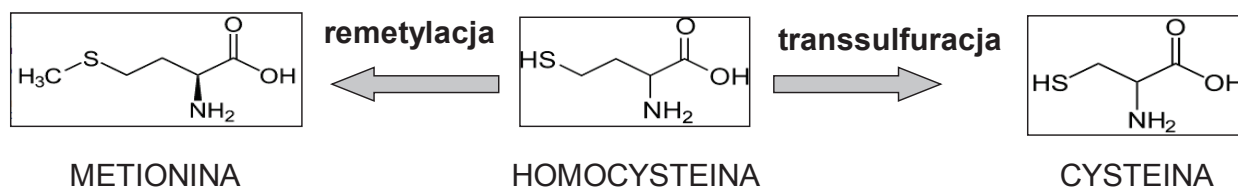
Homocysteina (Hcy, kwas 2-amino-4-merkaptomasłowy) odkryta została przez de Vigneauda w 1932 roku. Trzydzieści lat później Carson i Neil wykryli jej wysokie stężenie w moczu rodzeństwa z opóźnionym rozwojem umysłowym. W 1969 roku McCully po raz pierwszy wskazał na rolę Hcy w patogenezie miażdżycy, opisując rozległe zmiany zakrzepowo-miażdżycowe u dwojga dzieci cierpiących na homocystynurię [5]. W 1991 Clark oraz współpracownicy uznali hiperhomocysteinemię za prawdopodobny czynnik rozwoju chorób naczyniowych [6]. Obecnie homocysteina powszechnie uważana jest za niezależny czynnik rozwoju zmian miażdżycowych, zawału mięśnia sercowego, udaru mózgu oraz zmian zakrzepowych, a jej udział coraz częściej rozpatrywany jest w patomechanizmie innych chorób [7].

Homocysteina jest aminokwasem siarkowym, który naturalnie nie występuje w pokarmach i nie jest wbudowywany do białek. Może jednak łączyć się z białkami przez utworzenie mostków disulfidowych lub łączyć się z wolną grupą aminową lizyn w białkach, modyfikując w ten sposób ich strukturę oraz właściwości.



Rys. 1- Wzór strukturalny homocysteiny.

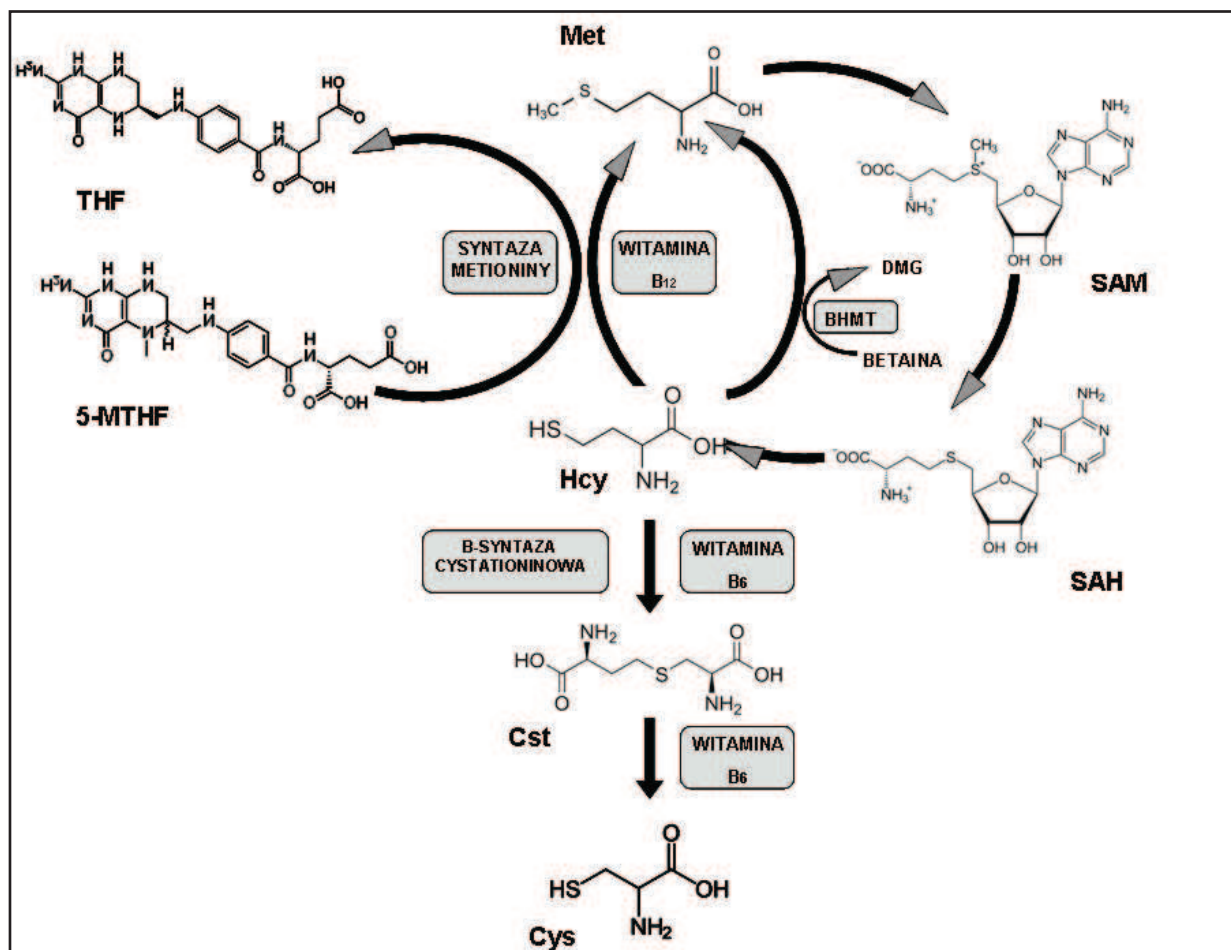
Homocysteina powstaje w procesie wewnątrzkomórkowej demetylacji metioniny wszystkich komórek organizmu, natomiast detoksykacji ulega głównie w wątrobie i w nerkach, na drodze remetylacji lub transulfuracji [8] (Rys.2).



Rys.2- Główne kierunki przemian homocysteiny.

W komórkach naczyń krwionośnych i skóry homocysteina ulega przemianie wyłącznie na drodze remetylacji (brak jest w nich ekspresji enzymów szlaku transulfuracji). Dla obu typów komórek znaczącą rolę odgrywa kwas foliowy, organiczny związek chemiczny z grupy witamin B, którego dostępność jest warunkiem usuwania homocysteiny[9]. Homocysteina uwolniona z komórek, w osoczu występuje w różnych formach - w 70-80% jest związana z albuminą, 20-30% występuje w postaci dimerów, a pozostała część pozostaje w postaci wolnej lub związana z innymi tiolami[10]. Dalsze jej przemiany zależą od aktualnych potrzeb organizmu i przebiegają

w kierunku odtworzenia metioniny (reakcje remetylacji), bądź też w kierunku syntezy cysteiny (reakcje transsulfurylacji) (Rys. 2).



Rys. 3- Metabolizm homocysteiny (zmodyfikowany [11]).

(gdzie: **THF**-tetrahydrofolian, **5-MTHF**-5-metylotetrahydrofolian, **Met**- metionina, **SAM**-S-adenozylometionina, **SAH**-S-adenozylhomocysteina, **DMG**- N,N-dimetyloglicyna **Cys**-cysteina, **BHMT**- metylotransferazabetainowo-homocysteinowa, **Cst**- cystationina.)

Metionina będąca aminokwasem egzogennym, z diety dostarczana jest do organizmu. W organizmie ulega ona reakcji katalizowanej przez adenozylotransferazęmetioninową, której produktem jest S-adenozylometionina (SAM), będąca uniwersalnym dawcą grup metylowych. Reakcja metylacji zachodzi przy udziale metylotransferaz, które przenosząc grupę metylową przekształcają ją w S-adenozylhomocysteinę, która z kolei przekształcana jest bezpośrednio w homocysteinę (Rys. 3).

W warunkach fizjologicznych bilans powstawania i detoksykacji homocysteiny jest zrównoważony. Nadmierna podaż metioniny, bądź też zaburzenia jej przemiany prowadzić mogą do wzrostu stężenia homocysteiny w komórkach, z których przechodzi ona do krwi i jest następnie wydalana z moczem. Za zakres normy stężenia homocysteiny przyjęto 5-15 $\mu$ mol/l. Poziom tego aminokwasu jest jednak różny w przypadku kobiet i mężczyzn. Mężczyźni mają wyższy poziom Hcy niż kobiety, różnice te jednak zanikają po menopauzie. Wzrost stężenia homocysteiny jest również obserwowany z wiekiem zarówno u kobiet jak i mężczyzn. Podwyższony poziom Hcy we krwi określany jest mianem hiperhomocysteinemii, a jej toksyczny wpływ jest zależny od jej stężenia. W zależności od stężenia Hcy we krwi, zaburzenia z nią związane, dzieli się ją na trzy postaci:

- postać łagodna- stężenie Hcy 15-30 $\mu$ mol/l
- postać umiarkowana- stężenie Hcy 31-100  $\mu$ mol/l
- postać ciężka- stężenie Hcy powyżej 100  $\mu$ mol/l

Wśród przyczyn hiperhomocysteinemii wymienia się uwarunkowania genetyczne, nadmiar metioniny w diecie, przyjmowanie pewnych leków lub wpływ niektórych chorób. Powodem mogą być mutacje i polimorfizmy genów kodujących białka enzymów biorących udział w przemianach homocysteiny (Rys. 3). Mutacja genu kodującego białko  $\beta$ -syntazy cystationiny, znajdującego się w locus 21q22.3 powoduje występowanie homocystynurii. Choroba ta jest dziedziczona autosomalnie, recesywnie. Osoby z homozygotyczną postacią tej choroby nie dożywają 30 roku życia. Przyczyną śmierci tych osób jest bardzo wczesne rozwinięcie się miażdżycy i wystąpienie powikłań sercowo-naczyniowych. W 60% przypadków homocystynurii zmianom miażdżycowym towarzyszy również upośledzenie umysłowe [12]. Częściej spotykana jest jednak mutacja genu dla reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej (MTFHR), która znacznie obniża lub całkowicie wyłącza aktywność tego enzymu. MTFHR ma podstawowe znaczenie w procesie remetylacji homocysteiny. Pacjenci z tego rodzaju mutacją są szczególnie narażeni na wzrost stężenia homocysteiny, rozwój choroby wieńcowej, a w konsekwencji wystąpienia zawału serca [13].

Do innych przyczyn wystąpienia hiperhomocysteinemii zalicza się niedobory witamin, które pełnią funkcję akceptorów grup metylowych lub kofaktorów enzymów w procesach

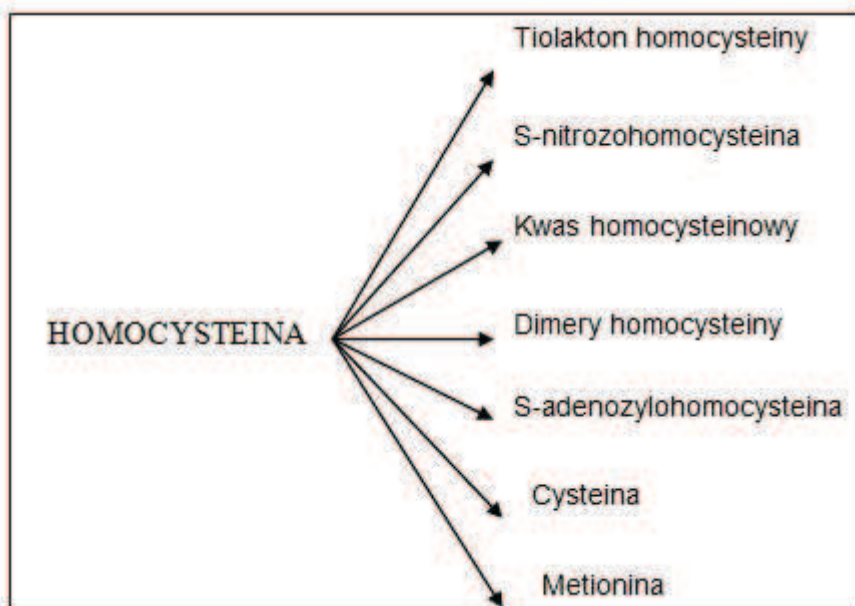
przemian homocysteiny. Podwyższony poziom homocysteiny można korygować poprzez dietę lub farmakologicznie. Leczenie oparte jest na suplementacji witaminami z grupy B. Największy jednak wpływ na poziom Hcy we krwi wywiera spożycie kwasu foliowego [10]. Stężenie homocysteiny może również istotnie wzrastać po zastosowaniu pewnych leków. Należą do nich substancje zaburzające wchłanianie i metabolizm witamin (Tab.-2). Warto wspomnieć, że również nadmierne spożycie alkoholu i kawy oraz palenie tytoniu przyczynia się do wzrostu poziomu Hcy we krwi [14].

Tab.2- Czynniki jatrogenne wywołujące wzrost poziomu homocysteiny.

<b>LEKI:</b>	<b>WITAMINA, NA KTÓREJ WCHŁANIANIE LUB METABOLIZM DZIAŁA DANY LEK:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metotreksat</li> <li>• Fenytoina</li> <li>• Trimetoprim</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• KWAS FOLIOWY</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metformina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• KOBALAMINA</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niacyna</li> <li>• Teofilona</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PIRYDOKSYNA</li> </ul>

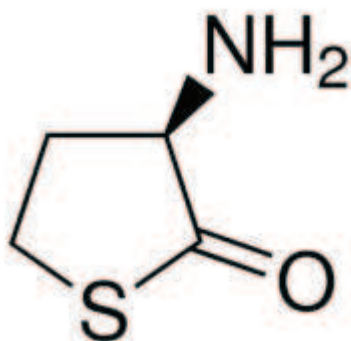
Do wzrostu w poziomie Hcy dochodzi także podczas przebiegu pewnych chorób, takich jak cukrzyca, łuszczyca, choroby nowotworowe, niedoczynność tarczycy, czy choroby autoimmunologiczne. Mechanizm szkodliwego działania homocysteiny nie został jeszcze w pełni poznany. Uważa się jednak, że Hcy wykazuje silne właściwości cytotoksyczne prowadząc do uszkodzenia śródbłonna naczyń i zaburzając jego funkcje. Hcy ulega przemianom do różnych aktywnych metabolitów (Rys.4), które przyczyniać się mogą do powstawania i rozwoju chorób sercowo-naczyniowych [9].





Rys. 4- Metabolity homocysteiny.

W literaturze opisano kilka możliwych mechanizmów patogenicznego wpływu hiperhomocysteinemii na ściany naczyń krwionośnych. Uważa się, że podwyższony poziom Hcy może prowadzić do uszkodzeń komórek śródbłonna, zmniejszyć elastyczność naczyń krwionośnych i niekorzystnie wpływać na ich funkcję rozkurczową. Jednym z najbardziej reaktywnych metabolitów homocysteiny, powstającym w efekcie błędnej aktywacji przez syntezę metionilo-t-RNA jest tiolakton homocysteiny (HTL) (Rys.4,5).



Rys.5- Tiolakton homocysteiny (HTL).

HTL jest bardzo reaktywny, ponieważ zawiera wysokoenergetyczne wiązanie tioestrowe. Reagując nieenzymatycznie z grupami aminowymi łańcucha bocznego reszt lizyny, modyfikuje białka, zmieniając w ten sposób ich właściwości fizykochemiczne oraz aktywność biologiczną. Zmodyfikowane w ten sposób białka charakteryzują się obniżoną rozpuszczalnością w stosunku do białek niezmodyfikowanych, mają również zaburzoną strukturę przestrzenną, przez co nieprawidłowo zachodzi składanie ich struktury i bardzo często ulegają agregacji. Mechanizm ten nosi nazwę homocysteinylacji białek. Homocysteinylacja, może przebiegać pomiędzy tiolaktonem i grupą aminową białek (N-homocysteinylacja) lub między homocysteiną, a grupą sulfhydrylową białek (S-homocysteinylacja) [15]. Takie modyfikacje białek mogą prowadzić do osłabienia ich funkcji lub doprowadzić do całkowitej dezaktywacji.

Kolejnym z proponowanych mechanizmów rozwoju CVDs w przypadku hiperhomocysteinemii jest ograniczenie biodostępności pochodnych adenozyliny. Podczas przemiany metioniny do homocysteininy, związkami pośrednimi jest S-adenozylometionina (SAM) (Rys. 3), natomiast po demetylacji powstaje S-adenozylhomocysteina (SAH). Akumulacja SAH może zmniejszyć biodostępność adenozyliny, która zaliczana jest do endogennych regulatorów ciśnienia krwi, a także pełni funkcję neuroprzekaźnika w komórkach śródbłonna oraz w miocytach. Dodatkowo związek ten hamuje m. in. wytwarzanie angiotensyny II i noradrenaliny [16].

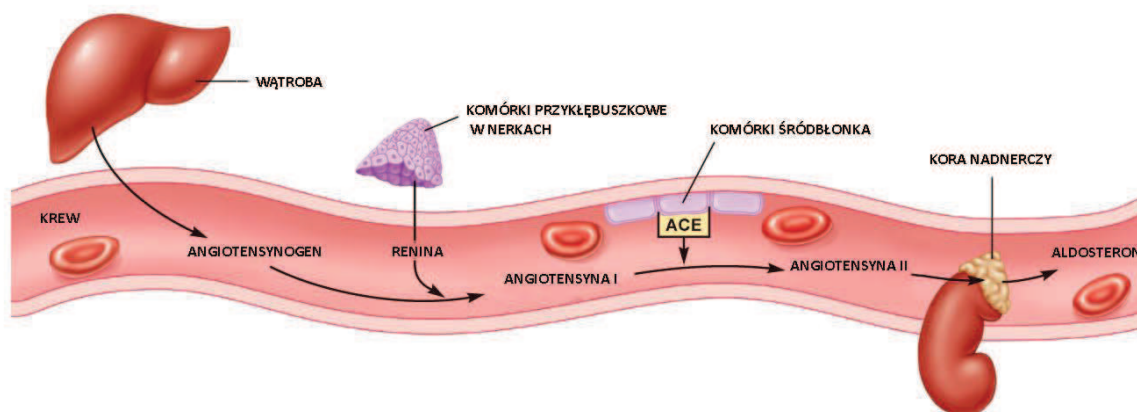
Innym metabolitem Hcy, podejrzewanym o uszkodzenia śródbłonna jest S-nitrozohomocysteina. Związek ten powstaje podczas nieenzymatycznej reakcji Hcy z tlenkiem azotu II (NO). NO ulega przyłączeniu do atomu siarki tworząc w ten sposób S-nitrozohomocysteinę. Powstały związek ma strukturę na tyle podobną do metioniny, że metionyl-t-transferaza-RNA mylnie uznając go za metioninę, katalizuje reakcję syntezy S-nitrozohomocysteiloadenylanu. W obecności przenoszącego metioninę t-RNA dochodzi do utworzenia S-nitrozohomocysteilo-t-RNA, który podczas biosyntezy białek zamiast metioniny dostarcza grupę nitrozohomocysteilową. Jest to kolejny możliwy sposób modyfikacji białek przez Hcy, jednak wpływ tego rodzaju modyfikacji nie jest jeszcze dobrze poznany [17].

Do niedawna popularny był pogląd, że toksyczne mechanizmy działania podwyższonego stężenia Hcy w osoczu bezpośrednio prowadzą do nadmiernej generacji reaktywnych form tlenu i azotu. Hipoteza ta jednak została częściowo podważona, ponieważ aby dochodziło

do uszkodzenia komórek śródbłonna wywołanego stresem oksydacyjnym używano bardzo wysokich, niefizjologicznych stężeń Hcy. Co więcej podobne wyniki otrzymano również dla cysteiny czy 2-merkaptoetanolu [16]. Istnieją jednak doniesienia odnośnie obniżenia przez homocysteinę zarówno ekspresji mRNA jak również syntezy białka dla pozakomórkowej dysmutazy ponadtlenkowej (EC-SOD) [18]. Warto również zwrócić uwagę na powiązanie przemian homocysteiny, tlenu azotu oraz argininy. Tlenek azotu powstaje z argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenu azotu. Wykazano, że u osób z hipercholesterolemią i chorujących na miażdżycę dochodzi do nadmiernego gromadzenia asymetrycznej N,N-dimetyloargininy (ADMA), która hamuje aktywność syntazy NO, zmniejszając tym samym aktywność rozkurczową [19]. Dodatkowo wzrost poziomu Hcy przyczynia się do wzrostu poziomu ADMA poprzez hamowanie aktywności dimetyloaminohydrolazy dimetyloargininowej (DDAH), która katalizuje rozpad ADMA [20]. Przeprowadzone badania wykazały, że aktywność syntazy NO może zostać zablokowana przez ADMA lub LDL, na zasadzie rozprzęgnięcia. W takiej sytuacji działa jedynie domena reduktazowa enzymu, domena oksigenazowa natomiast przekazuje elektrony na tlen zamiast na argininę. W takiej sytuacji synteza NO zaczyna generować reaktywne formy tlenu, ograniczając tym samym dostępność tlenu azotu. A zatem poziom NO może zostać obniżony bezpośrednio poprzez reakcję z Hcy, tworząc S-nitrozylohomocysteinę jak również przez zahamowanie jego tworzenia przez ADMA. Dodatkowo wytworzony anionorodnik ponadtlenkowy może, reagując z NO, utworzyć toksyczny oksydant jakim jest nadtlenoazotyn [19].

### **1.2.2 Angiotensyna II**

Główną funkcją hormonalno-enzymatycznego układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) jest fizjologiczna regulacja gospodarki wodno-elektrolitowej oraz ciśnienia tętniczego krwi. Renina uwalniana jest przez ziarniste komórki ściany tętniczki doprowadzającej krew do kłębuszka nerkowego i uczestniczy w przekształcaniu angiotensynogenu do angiotensyny I. Ta natomiast pod wpływem enzymu konwertującego (ACE) jest rozkładana do angiotensyny II (Ang II), wykazującej bardzo silne działanie wazokonstrykcyjne. Co więcej Ang II pobudza wydzielanie aldosteronu przez komórki kory nadnerczy (Rys. 6).



Rys.6- Schemat przemian w układzie RAA.

Dotychczas najlepiej poznanym elementem RAA jest Ang II. Wiele przeprowadzonych badań klinicznych i eksperymentalnych potwierdziło jej udział w przebiegu zmian miażdżycowych, dlatego uznana została za niezależny czynnik rozwoju CVDs. Początkowym i najważniejszym etapem powstawania i progresji zmian miażdżycowych jest dysfunkcja komórek endotelialnych, prowadząca do miejscowej adhezji jednojądrzastych leukocytów i w następnym etapie ich gromadzenia w błonie wewnętrznej ściany naczynia. Ang II może zarówno bezpośrednio jak i pośrednio przyczyniać się do zaburzeń w funkcjonowaniu śródbłonna. Ten oktapeptyd odgrywa istotną rolę w generowaniu reaktywnych form tlenu (RFT) oraz azotu (RFN) w ścianie naczynia poprzez stymulację związanej z błoną komórkową oksydazy fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADP(H)) w komórkach śródbłonna [21] oraz mięśniach gładkich [22]. Nadmierna generacja RFT i RFN prowadzi do inaktywacji NO i tym samym do upośledzenia jego biodostępności. Dodatkowo reakcja anionorodnika ponadtlenkowego z NO generuje silnie toksyczny produkt jakim jest nadtlenoazotyn, który z kolei może prowadzić do oksydacyjnego uszkodzenia lipoprotein oraz innych struktur komórkowych. W ten właśnie sposób Ang II może wpływać na funkcje wazodylatacyjne śródbłonna w sposób pośredni. Zmodyfikowane oksydacyjnie LDL hamują ekspresję mRNA dla syntazy NO oraz aktywują kinazę białkową C, która również upośledza wytwarzanie syntazy NO. Utlenione LDL stymulują również tworzenie endoteliny-1 [23], która powoduje silne obkurczenie naczyń oraz zwiększa proliferację mięśni gładkich [24]. Powstałe w wyniku

oksydacji lipidy mogą aktywować receptory błonowe komórek endotelialnych, do których zaliczany jest lektyno podobny receptor dla utlenionych LDL (LOX-1). Zagęszczenie receptora LOX-1 ulega zwiększeniu na skutek LDL, jak również poprzez działanie prozapalnych cytokin, toksycznych rodników czy sił hemodynamicznych. Aktywacja LOX-1 pobudza czynnik jądrowy kappa B, będący przekaźnikiem wielu reakcji wewnątrzkomórkowych, od których zależy między innymi zwiększenie aktywności enzymu konwertującego Ang II oraz zwiększenie ekspresji jej receptora AT1 [25]. Ang II wpływa również niekorzystnie na procesy związane z krzepnięciem krwi i fibrynolizy. Inicjator zewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia, czynnik tkankowy, nie występuje normalnie w monocytach czy komórkach endotelialnych. Jego ekspresja jest natomiast indukowana przez wiele czynników pełniących istotną rolę w rozwoju miażdżycy [26]. Zaliczany jest on do głównych czynników dopowiadzianych za proces nadkrzepliwości w CVDs [27]. Czynnikiem uszkadzającym śródbłonek, poprzez indukcję procesu tworzenia czynnika krzepnięcia, jest również czynnik martwicy nowotworu TNF- $\alpha$ . Przeprowadzone badania wykazały, że Ang II zwiększa syntezę TNF- $\alpha$  w monocytach [28], a także sama stymuluje komórki śródbłonka do syntezy czynnika krzepnięcia [29]. W komórkach śródbłonka Ang II zwiększa również ekspresję mRNA dla inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1) [30], głównego inhibitora fibrynolizy. Podwyższone stężenie PAI-1 we krwi wiąże się z niebezpieczeństwem wystąpienia zakrzepicy [31]. Ang II również w sposób pośredni może wpływać na procesy związane z krzepnięciem krwi. Przyczyniając się do generacji wolnych rodników i utlenienia LDL może także doprowadzić do szeregu zmian prowadzących do uszkodzeń śródbłonka. Zmodyfikowany oksydacyjnie LDL prowadzi do zmniejszenia ekspresji genu dla trombomoduliny oraz podwyższenie ekspresji genu dla PAI-1. Dodatkowo poprzez zaburzenie syntezy prostacykliny (PGI-2) dochodzi do wzmożonej syntezy eikozanoidu stymulującego kurczenie naczyń oraz agregację płytek- tromboksanu A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>).

W przebiegu wczesnych etapów miażdżycy w błonie wewnętrznej naczynia dochodzi do miejscowego gromadzenia się monocytów i leukocytów. Podobnie jak w przebiegu innych stanów zapalnych, ważną rolę w tym procesie odgrywają białka adhezyjne, mieszczące się na powierzchni komórek. Uczestniczą one w wielu interakcjach międzykomórkowych. Do śródbłonkowych białek adhezyjnych zaliczane są:

- Selektyna E
- ICAM-1 (*ang. Intracellular adhesion molecule-1*)
- ICAM-2 (*ang. Intracellular adhesion molecule-2*)
- VCAM-1 (*ang. Vascular cell adhesion molecule*)
- PECAM-1 (*ang. Platelet endothelial adhesion molecule*)

Najbardziej istotne dla rozwoju CVDs, a przez to najlepiej poznane są dwie cząsteczki adhezyjne- VCAM-1 oraz ICAM-1. Obecność tych białek została potwierdzona w miejscach dotkniętych miażdżycą, natomiast nie stwierdzono obecności VCAM-1 w okolicach niezmiennych, natomiast ICAM-1 znajduje się w nich tylko w niewielkiej ilości. Znanymi cząsteczkami stymulującymi ekspresję VCAM-1 są TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-4, utleniony LDL, natomiast dla ICAM-1, interferon  $\gamma$ , IL-1, TNF- $\alpha$  oraz utleniony LDL [32].

Angiotensyna II może wpływać na gromadzenie się monocytów i leukocytów bezpośrednio poprzez generację stresu oksydacyjnego i stymulację ekspresji VCAM-1 [33] lub poprzez powstanie utlenionego LDL, w którego skład wchodzi lizofosfatydylocholina, indukująca ekspresję genu dla VCAM-1 i ICAM-1. Wśród proponowanych mechanizmów, za pomocą których Ang II reguluje ekspresję śródbłonkowych cząsteczek adhezyjnych, jest jej wpływ na NF- $\kappa$ B. Jak wykazały przeprowadzone badania Ang II aktywuje ten prozapalny czynnik transkrypcyjny w komórkach endotelialnych, monocytach oraz komórkach mięśni gładkich [33, 34].

Przebiegowi miażdżycy towarzyszą przewlekłe, lokalne stany zapalne, za które w głównej mierze odpowiedzialne są interakcje pomiędzy makrofagami a limfocytami oraz uwalnianie cytokin prozapalnych. Uwalnianie cytokin prozapalnych, w tym przypadku, podobnie jak było w przypadku cząsteczek adhezyjnych, regulowane jest przez NF- $\kappa$ B. Jak wspomniałam już wcześniej, Ang II jest aktywatorem NF- $\kappa$ B, co sugeruje, że może ona przyczyniać się lub wzmacniać stany zapalne w ścianach naczyń. Potwierdzeniem istotnej roli zapalenia w przebiegu miażdżycy są wyniki badań bezsprzecznie potwierdzające podwyższenie wskaźników systemowej odpowiedzi zapalnej. Wśród najczęściej badanych wskaźników odpowiedzi zapalnej należy wymienić:

- Białko C-reaktywne (CRP)
- Fibrynogen
- Amyloid A

Podstawowym źródłem tych, ale również innych wskaźników systemowej odpowiedzi zapalnej jest wątroba, stymulowana do ich syntezy przez interleukinę-6 (IL-6). Najczęściej stosowanym i uznanym oznaczeniem jest badanie wskaźnika CRP. Jak wynika z przeprowadzonych badań, u osób ze zmianami miażdżycowymi, stężenie tego wskaźnika jest dwukrotnie wyższe, niż u osób zdrowych [35]. Pomimo faktu, że wiele markerów systemowej odpowiedzi zapalnej koreluje ze wzrostem ryzyka wystąpienia CVDs, to właśnie CRP zdobyło miano istotnego czynnika stosowanego do oceny stanu pacjentów. Białko C-reaktywne jest niezwykle cennym biomarkerem, bo nie tylko odzwierciedla aktywację cytokin (szczególnie IL-6), ale bezpośrednio może również wykazywać działanie pro-miażdżycowe [36]. Badania eksperymentalne wykazały, że białko to podwyższa ekspresję receptora AT1 na powierzchni komórek mięśni gładkich, przyczynia się do ich migracji i proliferacji oraz zwiększa produkcję RFT[37]. Dodatkowo pobudza syntezę PAI-1 przez komórki śródbłonna, obniża ekspresję syntazy NO, a także stymuluje syntezę cytokin oraz czynnika tkankowego przez monocyty [38, 39]. Co więcej, pod wpływem CRP w komórkach śródbłonna dochodzi do zwiększonej ekspresji VAM-1 i ICAM-1 i mimo, że białko C-reaktywne w głównej mierze produkowane jest przez wątrobę, to może też powstawać w komórkach obecnych w blaszce miażdżycowej [40]. Działanie Ang II może przyczynić się do pęknięcia blaszki miażdżycowej, ponieważ jak wynika z przytoczonej literatury, jest ona stymulatorem IL-6 zarówno w komórkach mięśni gładkich jak i makrofagach [41]. Ważne jest, że destabilizacja blaszki miażdżycowej nie jest wynikiem wyłącznie reakcji zapalnej, ale również zwiększonej apoptozy oraz nasilonej degradacji składników macierzy pozakomórkowej przez metaloproteinazy. Co więcej Ang II jest bezpośrednim aktywatorem metaloproteinaz, jak również pośrednio przez wpływ na NF-κB, może wzmacniać proteolizę składników macierzy pozakomórkowej, ponieważ cytokiny takie jak IL-6 czy TNF stymulują makrofagi do syntezy metaloproteinaz [42, 43].

### **1.2.3 Inne czynniki rozwoju chorób sercowo-naczyniowych**

W ocenie ryzyka wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych oraz ocenie przewidywanej długości życia pacjentów, bierze się pod uwagę przede wszystkim czynniki uznane obecnie za istotne, czyli tzw. czynniki klasyczne. Zaliczane są do nich: palenie tytoniu, brak ruchu, nadciśnienie tętnicze, szybka akcja serca, cukrzyca, nadwaga czy markery przewlekłego stanu zapalnego. Są one dobrze poznane i charakteryzują się udowodnionym związkiem przyczynowo skutkowym. W rzeczywistości jest jednak tak, że część pacjentów z rozwiniętą chorobą wieńcową nie wykazuje żadnego z klasycznych czynników ryzyka rozwoju CVDs. Fakt ten skłania do rozważenia udziału innych, mniej poznanych przyczyn rozwoju choroby, które chociaż cechują się słabszym i nie w pełni udokumentowanym powiązaniem z patomechanizmem CVDs, mogą mieć istotny wpływ na przebieg całego procesu, a poznanie mechanizmu ich działania otworzy nowe drogi leczenia, a co ważniejsze prewencji tego schorzenia.

## **1.3 Choroby sercowo-naczyniowe a stres oksydacyjny**

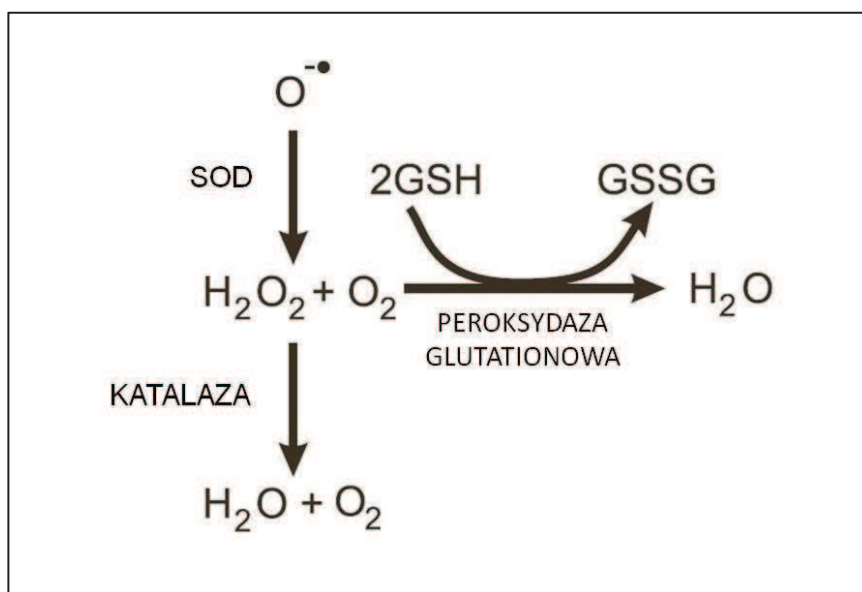
Stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w etiopatogenezie CVDs, a zainteresowanie jego znaczeniem w rozwoju chorób stale rośnie. Zaburzenie równowagi pomiędzy czynnikami antyoksydacyjnymi, a prooksydacyjnymi przyczynia się do uszkodzenia śródbłonna i sprzyja rozwojowi chorób sercowo-naczyniowych. Dokładne poznanie procesów związanych z uwikłaniem stresu oksydacyjnego w patomechanizm CVDs może mieć ogromne znaczenie w leczeniu jak i prewencji tych chorób.

### **1.3.1 Stres oksydacyjny**

Termin stres oksydacyjny jest powszechnie używany i określa się nim wiele różnych biochemicznych, fizjologicznych i patofizjologicznych procesów. Z definicji według Helmuta Sies'a z Uniwersytetu w Duasseldorfie, stres oksydacyjny to "zaburzenie równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w kierunku reakcji utleniania" [44]. Innymi słowy, w sytuacji takiej dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy tempem powstawania reaktywnych form



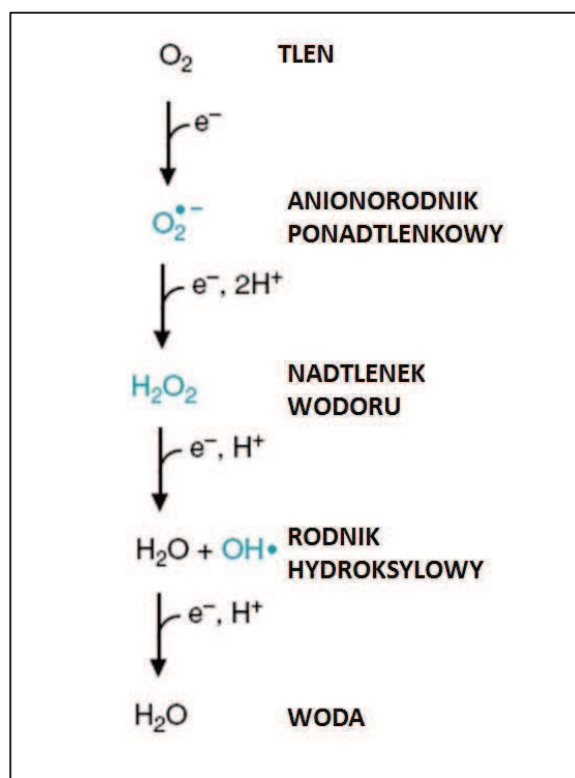
tlenu (RFT) i azotu (RFN), a wydolnością układu antyoksydacyjnego. RFT i RFN odgrywają kluczową rolę w podstawowych procesach biologicznych zachodzących w organizmie ludzkim zarówno w stanie fizjologicznym, jak i w różnych stanach patologicznych. Stanowią one kluczowy element dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. W warunkach homeostazy RFT i RFN pełnią funkcje mediatorów i regulatorów metabolizmu. Odpowiadają między innymi za aktywację wielu genów, indukują różnicowanie się komórek, indukują apoptozę, działają rozszerzająco bądź obkurczająco na ścianę naczyń krwionośnych, stymulują transport glukozy do komórek, wpływają na przekazywanie sygnałów do i wewnątrz komórek oraz biorą udział w procesach obronnych organizmu. Stan równowagi utrzymywany jest przez enzymy antyoksydacyjne (Rys. 7), substancje aktywne takie jak glutation (GSH), witaminy A, C i E, tioredoksyna oraz wiele innych. Związki te umożliwiają usuwanie nadmiaru wolnych rodników z komórki. Nadmierna produkcja RFT i RFN i jednocześnie osłabienie bariery antyoksydacyjnej może być pierwotną przyczyną, bądź wtórnym powikłaniem choroby. Wysokie stężenia RFT i RFN wyzwalają reakcje łańcuchowe, nasilające procesy uszkodzenia biomolekuł komórkowych. Utlenianiu ulegają lipidy, w tym reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzące w skład fosfolipidów, będących głównym składnikiem budującym błony komórkowe. Produkty peroksydacji lipidów zmieniają właściwości fizyczne błon komórkowych, co może prowadzić do ich uszkodzenia. Dochodzi również do oksydacyjnej modyfikacji białek (w tym enzymów) oraz zaburzenia syntezy i inaktywacji proteoglikanów. Dodatkowo dojść może do pęknięć nici DNA, uszkodzenia chromosomów, powstawania mutacji mogących prowadzić nawet do zmian nowotworowych.



Rys. 7- Podstawowe enzymy usuwające RFT w komórkach zwierzęcych. (gdzie: SOD- dysmutaza ponadtlenkowa, GSH- zredukowana forma glutationu, GSSG- utleniona forma glutationu).

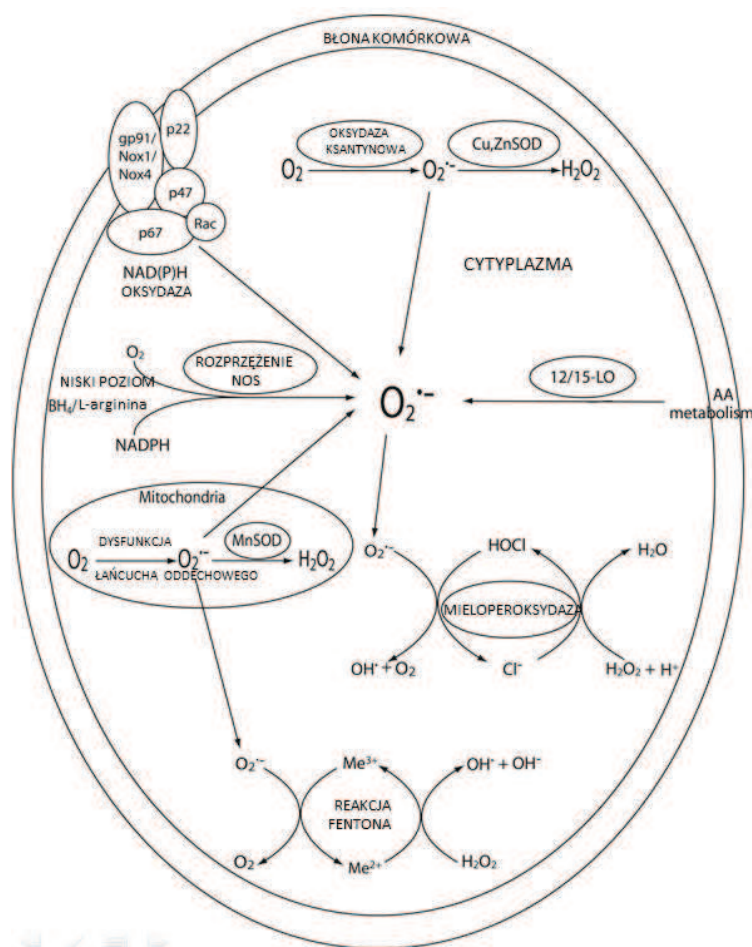
### 1.3.1.1 Endogenna produkcja RFT

Organizmy żywe wytwarzają RFT w wielu podstawowych procesach biochemicznych. Łańcuch oddechowy jest źródłem około 90% RFT generowanych w organizmie. Pozostałe 10% powstaje w trakcie rozmaitych reakcji fizjologicznych, zachodzących w różnych strukturach komórki (np. reakcji katalizowanych przez oksydazy, czy cytochrom p450), w wyniku autooksydacji związków biologicznie czynnych (np. hydrochinonów, epinefryny, hemoglobiny) [13,33] lub podczas reakcji układu odpornościowego (wybuch tlenowy). Powstające RFT są produktami pośrednimi, które powinny ulec dalszej redukcji w kolejnych etapach reakcji biochemicznych, jednak z różnych przyczyn nie zawsze tak się dzieje. Zdecydowanie największa ilość RFT powstaje w mitochondriach. W mitochondrialnym łańcuchu oddechowym dochodzi do reakcji cztero elektronowej redukcji tlenu, której produktem jest cząsteczka wody. W procesie tym 1-3% elektronów ulega niecałkowitej redukcji tlenu (jedno, dwu lub trzy elektronowej), której produktami są RFT (Rys. 8). Proces ten nosi nazwę „przecieku elektronów”.



Rys. 8- Produkty niecałkowitej redukcji cząsteczki tlenu- „przeciek elektronów” w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym.

Jak wspomniałam już wcześniej, powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego zachodzi także podczas niektórych reakcji enzymatycznych, katalizowanych przez enzymy z klasy oksydoreduktaz, takich jak oksydaza ksantynowa, aldehydowa, acylo-CoA, NAD(P)H (Rys.9). Wśród wymienionych enzymów największe znaczenie ma oksydaza ksantynowa, która utlenia hipoksantynę do ksantyny i ksantynę do kwasu moczowego oraz oksydaza NAD(P)H, obecna między innymi w błonach fagocytów. Pojawienie się w organizmie ogniska zapalnego stymuluje gwałtowny wzrost zużycia tlenu przez komórki fagocytujące, takie jak neutrofile czy makrofagi. Proces ten nazywany jest potocznie „wybuchem tlenowym”. Aktywowany kompleks oksydazy NAD(P)H katalizuje produkcję anionorodnika ponadtlenkowego, który ulega następnie dysmutacji do nadtlenu wodoru.  $H_2O_2$  pod wpływem mieloperoksydazy (MPO)- enzymu należącego do peroksydaz i w obecności jonów halogenkowych (np.  $Cl^-$ ) generuje powstanie silnego utleniacza, kwasu podchlorawego oraz innych związków biorących udział w walce z patogenami [45].



Rys. 9- Źródła anionorodnika nadtlenkowego w komórce.

### 1.3.1.2 Egzogenna generacja RFT

Reaktywne formy tlenu i azotu mogą powstawać również ze źródeł egzogennych. Należy do nich między innymi promieniowanie jonizujące, które należy do szczególnie niebezpiecznych ponieważ może prowadzić do uszkodzenia tkanek i rozwoju wielu chorób w tym powstania nowotworów [46]. Do egzogennych czynników środowiskowych zaliczyć można także palenie tytoniu, nieprawidłową dietę, spożywanie alkoholu, wzmożone tempo oddychania podczas wysiłku fizycznego, zanieczyszczenia środowiskowe i przemysłowe, ozon oraz promieniowanie UV. Czynniki te mogą powodować powstawanie reaktywnych form tlenu w podstawowym metabolizmie komórek lub poprzez aktywację endogennych źródeł RFT [47]. Kolejną grupą czynników zewnętrznych są różnego rodzaju czynniki terapeutyczne. Zalicza się do nich głównie

związki działające antynowotworowo. Ich mechanizm działania związany jest z nadprodukcją RFT, zatrzymaniem cyklu komórkowego i indukcją apoptozy [48]. Leki przeciwnowotworowe takie jak cisplatyna i adriamycyna prowadzą do nadmiernego wytwarzania RFT, co w rezultacie prowadzi do uszkodzeń DNA i śmierci komórek [49]. Podobny mechanizm działania wykazują również niektóre substancje pochodzenia naturalnego. Substancje takie jak bursztynian tokoferolu czy fikobiliproteina uzyskiwana z alg zwiększają w komórkach nowotworowych poziom RFT i prowadzą do ich śmierci na drodze apoptozy [50].

### **1.3.2   Udział stresu oksydacyjnego w przebiegu chorób sercowo-naczyniowych**

W złożony i wielokierunkowy mechanizm CDVs niewątpliwie uwikłany jest stres oksydacyjny [51]. Do głównych źródeł RFT i RFN w naczyniach krwionośnych odpowiedzialnych za rozwój chorób sercowo-naczyniowych zalicza się oksydazę NAD(P)H [52]. Aktywność tego enzymu ulega pobudzeniu pod wpływem Ang II, do jego stymulacji dochodzi również poprzez działanie takich substancji jak endotelina 1 oraz czynniki wzrostu PDGF (*ang. platelet-derived growth factor*) lub TGF- $\beta$  (*ang. Tumor growth factor  $\beta$* ) [53]. Dotychczas opisano siedem izoform oksydazy NAD(P)H u ssaków. W komórkach śródbłonna człowieka zachodzi ekspresja czterech izoform tego białka. NOX1, NOX2 i NOX5 generujące anionorodnik nadadtlenkowy oraz NOX4 generująca nadtlenek wodoru [54]. Powstający w dużych ilościach anionorodnik nadadtlenkowy z jednej strony powoduje uszkodzenia oksydacyjne w sposób bezpośredni, z drugiej strony poprzez reakcję z tlenkiem azotu tworzy kolejny toksyczny związek jakim jest nadtlenoazotyn (ONOO<sup>-</sup>). ONOO<sup>-</sup> wykazuje wysoką reaktywność oraz łatwość dyfuzji. Dodatkowo zaliczany jest do głównych czynników utleniających i nitrujących, jakie powstają w układzie krążenia w stanach zapalnych oraz zjawisku niedokrwienia i reperfuzji. Udowodniony został jego potencjał do oksydacyjnej modyfikacji składników osocza oraz uszkodzeń komórek, w tym płytek krwi [55]. ONOO<sup>-</sup> utlenia również lipoproteiny, reszty nitrotyrozyny wykryto w blaszce miażdżycowej [56]. W warunkach stresu oksydacyjnego zmniejsza się produkcja prostacykliny (PGI<sub>2</sub>), substancji wpływającej rozkurczowo na naczynia krwionośne i hamującej agregację płytek krwi. Stwierdzono, że to właśnie nadtlenoazotyn, poprzez nitrację tyrozyny w centrum aktywnym syntazy PGI<sub>2</sub> hamuje produkcję prostacykliny [57]. Stanom zapalnym oraz infekcjom towarzyszy również pobudzenie indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS)

zarówno w makrofagach jak i komórkach mięśni gładkich ścian naczyń, czego następstwem jest zwiększona generacja NO [58]. Tlenek azotu uwalniany jest także przez komórki zaangażowane w odpowiedź immunologiczną takie jak monocyty, makrofagi, eozynofile czy neutrofile. W neutrofilach zachodzi również produkcja mieloperoksydazy, która uwalniana jest podczas ich aktywacji. Enzym ten ulega związaniu z glikozoaminoglikanami śródbłonna, po czym przechodzi do warstwy podśródbłonkowej, gdzie katalizuje powstanie silnie reaktywnego kwasu podchlorawego. HOCl ulegać może reakcji z reaktywną formą azotu jaką jest NO<sub>2</sub>, prowadząc do powstania NO<sub>2</sub>Cl, związku wykazującego bardzo silne działanie nitrujące oraz mogącego powodować uszkodzenia białek [59]. RFT i RFN powstające w wyżej wymienionych procesach mogą utleniać tetrahydrobiopteryny (BH<sub>4</sub>), służącej jako kofaktor dla enzymu syntazy tlenu azotu [60]. W przypadku niedoboru tego kofaktora, dochodzi do tzw. „rozprężnięcia” syntazy tlenu azotu, rezultatem czego jest generacja anionorodnika ponadtlenkowego [61]. Innym źródłem RFT i RFN w ścianach naczyń jest lipooksygenaza (LO), enzym zaangażowany w szlak przemian kwasu arachidonowego. Jak wykazały badania, inhibicja 12/15 LO obniżyła ciśnienie u szczurów z nadciśnieniem tętniczym [62], natomiast jego aktywacja prowadziła do wzmożonej proliferacji mięśni gładkich oraz wzmożonej oksydacji LDL [63, 64].

## **1.4 Metabolizm żelaza w przebiegu chorób sercowo–naczyniowych**

Żelazo jest niezbędnym czynnikiem do funkcjonowania organizmu, ma ono jednak swoje drugie „niebezpieczne” oblicze. Nadmierna akumulacja tego pierwiastka może stanowić istotne zagrożenie dla organizmu. Istnieje wiele hipotez opisujących rolę żelaza w etiopatogenezie różnorodnych schorzeń. Niestety pełen mechanizm degradacji ferrytyny (białka magazynującego żelazo) i funkcji żelaza w przebiegu chorób sercowo-naczyniowych nie został jeszcze dokładnie poznany.

### **1.4.1 Chemia żelaza i jego znaczenie fizjologiczne**

Żelazo jest pierwiastkiem o liczbie atomowej 26 posiadającym masę molową 55,85 g/mol. Maksymalny stopień utlenienia żelaza wynosi 6+, jednak w środowisku biologicznym najczęściej występuje na 2+ i 3+ stopniu utlenienia. W stanie podstawowym atom żelaza posiada cztery

niesparowane elektrony na orbitalu 3d i dwa sparowane elektrony na orbitalu 4s. Usunięcie elektronów z powłoki 4s skutkuje wzrostem stopnia utlenienia do 2+, natomiast dodatkowe usunięcie jednego elektronu z powłoki 3d prowadzi do powstania jonu żelaza 3+. Istnieje wyraźna różnica w rozpuszczalności soli żelaza na drugim i trzecim stopniu utlenienia. Sole Fe<sup>3+</sup> są praktycznie nierozpuszczalne (maksymalna rozpuszczalność dla Fe(OH)<sub>3</sub> w pH 7 wynosi 10<sup>-17</sup>M) [65]. Dlatego to forma Fe<sup>2+</sup> występuje głównie w płynnym środowisku wewnątrzkomórkowym. Niemniej jednak w wyniku utleniania przez O<sub>2</sub>, żelazo ulega ciągłym procesom utleniania i redukcji pomiędzy stanem 2+ i 3+. W środowisku komórkowym zarówno Fe<sup>2+</sup> jak i Fe<sup>3+</sup> tworzą kompleksy koordynacyjne z wieloma różnorodnymi ligandami. Kompleksy żelaza wykazują różny potencjał oksydacyjno-redukcyjny, od wartości wysoko dodatnich do ujemnych. Właściwości te wynikają z podstawowych założeń chemii koordynacyjnej, zakładających, że obecność ligandu modyfikuje chmurę elektronową otaczającą metal, zmieniając tym samym tego potencjał redukcyjny. Oszacowano, że potencjał redukcyjny w środowisku wewnątrzkomórkowym wynosi około 0V [66]. Biorąc to pod uwagę, żelazo jeszcze łatwiej ulega reakcją redoks. Tego rodzaju wymiana elektronu jest powszechnie obserwowanym zjawiskiem, występującym w naturze. Żelazo wchodzi w skład wielu enzymów, takich jak: katalazy, oksydazy, peroksydazy, cytochromy, akonitaza mitochondrialna, dehydrogenazy, reduktazy rybonukleotydowe, uczestniczące w podstawowych procesach metabolicznych, takich jak synteza kwasów nukleinowych oraz zaangażowane są w transport tlenu i elektronów. Jony żelaza warunkują aktywność białek transportujących żelazo (hemoglobiny i mioglobiny). Działają jako kofaktor w wielu przemianach metabolicznych ustroju, w tym: w syntezie niektórych hormonów, procesie fagocytozy, wytwarzaniu związków bogatoenergetycznych, syntezie kolagenu. Wpływają ponadto na cykl komórkowy, różnicowanie i proliferację komórek przez regulację transkrypcji kilku genów (kinazy białkowej C-b, syntazy tlenu azotu, p21), są niezbędne do tworzenia osłonki mielinowej nerwów oraz wypustek komórek nerwowych [67].

#### 1.4.2 Równowaga LIP-ferrytyna

Żelazo jest metalem niezbędnym do funkcjonowania niemalże wszystkich form życia. Jego szczególne znaczenie w układach biologicznych związane jest z jego przejściowym charakterem. To właśnie właściwości redoks były determinantem tego, że żelazo stało się funkcjonalnym elementem wielu białek i enzymów uczestniczących w kluczowych procesach

biochemicznych. Właściwości żelaza, które czynią je składnikiem niezbędnym do życia, decydują również o jego toksycznym oddziaływaniu, co ściśle związane jest z metabolizmem tlenu. Z tego względu organizmy żywe chronione są przed uszkodzeniami oksydacyjnymi poprzez białka wiążące żelazo. Krążące w osoczu jony żelaza wiązane są do transferyny, natomiast w komórkach, akumulowane są w formie ferrytyny. Ferrytyna jest białkiem, które dzięki swojej zdolności do wiązania atomów żelaza, przechowuje je w komórkach w bezpiecznej dla organizmu formie oraz jest źródłem jego zapasów. Jest białkiem o dużej masie cząsteczkowej (450kDa), dzięki czemu ma zdolność do wiązania nawet 4500 atomów żelaza, tworząc tzw. rdzeń mineralny, w którym pierwiastek ten magazynowany jest w postaci wodoronadtlenku skompleksowanego z fosforanem. Ferrytyna zbudowana jest z 24 podjednostek. Każda z tych podjednostek skręcona jest w cztery długie helisy, połączone w pary, tworząc w ten sposób białkową część ferrytyny- apoferrytynę. Podjednostki ferrytyny złożone są z łańcucha lekkiego „L” (*ang. Ferritin light chain*) oraz łańcucha ciężkiego „H” (*ang. Ferritin heavy chain*). Łańcuch ciężki ferrytyny, o masie 21 kDa, wykazuje aktywność enzymatyczną. Utleniając jony żelaza z  $Fe^{2+}$  do  $Fe^{3+}$  pełni funkcję feroksydazy. Łańcuch lekki, o masie 19kDa, pełni funkcję głównego magazynu żelaza. W zależności od lokalizacji komórek oraz stanu fizjologicznego, stosunek ilości łańcucha ciężkiego do lekkiego może się różnić. Forma L przeważa w wątrobie oraz śledzionie, natomiast forma H w sercu oraz nerkach [68]. Ferrytyna w głównej mierze znajduje się w cytoplazmie komórek, jej niewielkie ilości obserwuje się również w mitochondriach. Ferrytyna znajdująca się w surowicy jest tylko niewielką frakcją ferrytyny komórkowej, jednak ta pula ferrytyny odzwierciedla zasoby żelaza w stanach fizjologicznych. Wytwarzanie ferrytyny kontrolowane jest przez białka IRP1 i IRP2. Białka cytoplazmatyczne: IRP1 oraz IRP2 (*ang. Iron Regulatory Proteins 1, 2*) odpowiedzialne są za regulowanie metabolizmu żelaza u ssaków. Wiążą się one do swoistych sekwencji RNA, określanych jako sekwencje reagujące z żelazem (*ang. Iron Responsive Element- IRE*). W stanach niedoboru żelaza, białka IRP przyłączają się do sekwencji IRE, hamując syntezę ferrytyny. Jak wykazano w badaniach *in vitro*, poziom ferrytyny w hepatocytach regulowany jest również przez cytokiny prozapalne IL-1, IL-6 czy TNF [69]. Oprócz udziału ferrytyny homeostaza żelaza koordynowana jest poprzez działanie receptora transferynowego (TfR), białka, które odpowiedzialne jest za transport żelaza do wnętrza komórki w postaci kompleksu z transferyną. Podobnie jak w przypadku ferrytyny ekspresja tego receptora również jest regulowana przez działanie białek



IRP1 i IRP2. W przypadku niedoboru żelaza białko IRP1 przyłącza się do sekwencji IRE mRNA TfR i chroni je przed degradacją zwiększając syntezę receptora transferynowego.

Żelazo w warunkach fizjologicznych występuje w komórkach również w formie LIP (*ang. Labile Iron Pool*) tzn. w postaci luźno związanej ze związkami drobnocząsteczkowymi. Taka forma żelaza zużywana jest na bieżące potrzeby organizmu, a jego ilość, ze względu na reaktywny charakter, podlega ścisłej kontroli. Stężenia tej formy żelaza są niewielkie, wynoszą 0,2-1,25  $\mu\text{M}$  [70]. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły, że zmniejszenie produkcji ferrytyny, prowadzi do wzrostu labilnej puli żelaza oraz wzmożonej generacji RFT i RFN [71]. Ze względu na fakt, iż biosynteza kontrolowana jest przez poziom labilnej puli żelaza, można zatem przypuszczać, że wzrost poziomu tego białka pośrednio będzie świadczył o wcześniejszym wzroście LIP. Zmiany w poziomie labilnej puli żelaza odpowiedzialne są między innymi za regulację ekspresji hepcydyny. Ten 25-aminokwasowy peptyd syntetyzowany jest głównie w hepatocytach, jednak w mniejszej ilości wyizolowano go również z makrofagów, adipocytów, komórek nerki czy śledziony jak i wielu innych typów tkanek. Gen HAMP koduje 84-aminokwasową preprohepcydynę, która po odłączeniu sekwencji sygnałowej tworzy składającą się z 60 reszt aminokwasowych prohepcydynę. Dominującą formą w ustroju jest bioaktywna forma tego peptydu- hepcydyna. Działanie hepcydyny i jej wpływ na regulację gospodarki żelaza oparte jest na oddziaływaniu z ferroportyną. Ferroportyna jest białkiem odpowiedzialnym za transport żelaza z komórek. Hepcydyna łącząc się z ferroportyną na powierzchni komórek wywołuje jej fosforylację na reszcie tyrozyny, co jest sygnałem do przemieszczenia białka z błony komórkowej do cytoplazmy. Ferroportyna ulega następnie defosforylacji i przy udziale ligazy ubikwitynowej E3, ulega procesowi ubikwitynacji prowadząc do degradacji tego białka [72, 73]. W następstwie, pewna pula żelaza zostaje zablokowana w enterocytach, zmniejszając w ten sposób ilość żelaza transportowanego do krwi. Regulacja poziomu ferroportyny w komórkach, podobnie jak ferrytyna, podlega ścisłej kontroli przez system IRP/IRE. Przeprowadzono szereg badań potwierdzających korelację pomiędzy ekspresją genu HAMP, a metabolizmem żelaza. Niedobór hepcydyny powodował odkładanie się żelaza w trzustce i wątrobie, prowadząc do uszkodzenia tych narządów. Natomiast myszy transgeniczne, produkujące zwiększoną ilość genu dla hepcydyny ginęły zaraz po urodzeniu z powodu poważnych niedoborów żelaza. Rolę hepcydyny podkreśla się również w patomechanizmie chorób przebiegających z przewlekłym, ogólnym lub miejscowym stanem

zapalnym. Niedokrwistość w przebiegu chorób przewlekłych charakteryzuje się zmniejszoną dostępnością żelaza dla procesu erytropoezy, pomimo jego prawidłowego poziomu w układzie makrofagów. Stany niedoboru żelaza związane są ze zmniejszeniem jego absorpcji z jelita, a także z zahamowaniem uwalniania go z makrofagów. Jednym z głównych mediatorów procesów zapalnych, indukujących powstawanie hepcydyny w hepatocytach oraz uwolnienie jej do krążenia jest IL-6. Jak wykazały badania Nemeth i wsp. z 2003 roku, inkubacja ludzkich hepatocytów z IL-6, w przeciwieństwie do IL-1 czy TNF- $\alpha$  prowadziła do wzmożonej ekspresji genu dla hepcydyny.

### 1.4.3 Degradacja ferrytyny i udział żelaza w generacji RFT i RFN

Żelazo może zostać uwolnione z ferrytyny na dwa sposoby, poprzez jej degradację lub w sposób nieuszkodzający jej struktury. Istnieją dwa podstawowe procesy prowadzące do degradacji ferrytyny w lizosomach, poprzez działanie enzymów proteolitycznych lub na drodze proteasomalnej zależnej od ubikwityny. Proteasom to wielkocząsteczkowy agregat białkowo-rybonukleinowy zlokalizowany w jądrze oraz cytozolu. Zbudowany jest z trzech jednostek:

- Jednostki 20S, będącej wieloenzymatycznym cylindrem, którego główną rolą jest degradacja związków,
- Dwóch jednostek 19S, identycznych w swej budowie, znajdujących się na dwóch końcach cylindra. Ich funkcją jest rozpoznawanie znakowanych związków.

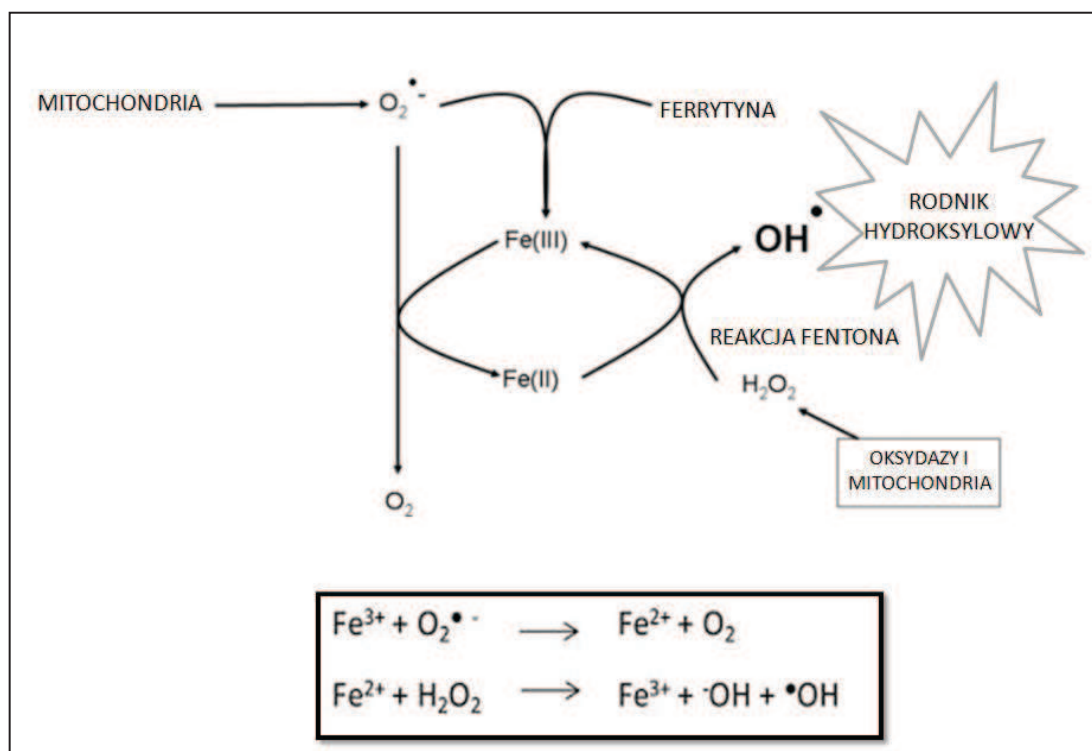
Funkcje jakie pełni proteasom w komórce nie są w pełni poznane, wiadomo jednak że jest niezastąpiony w poza lizosomalnym systemie degradującym białka zbędne i szkodliwe dla organizmu. Proteasomalna proteoliza zależna od ubikwityny polega na poliubikwitylacji białka, na skutek czego kierowane jest ono do degradacji. W mechanizmie tym uczestniczą enzymy: E1, E2 i E3, a proces ten składa się z trzech etapów: zaktywowania ubikwityny przez enzym E1, skoniugowania ubikwityny z enzymami E2 i przyłączenia do ubikwityny białkowej ligazy E3. Ligazy ubikwitynowe są enzymami zbudowanymi z wielu podjednostek, które pełnią istotną funkcję w rozpoznawaniu specyficznych substratów. Dotychczas odkryto u ludzi ponad 1000

ligaz E3, różniące się od siebie budową i mechanizmem działania. Ze względu na obie te właściwości podzielono je na dwie grupy:

- Ligazy z domeną RING, przenoszące ubikwitynę z enzymu E2 bezpośrednio na dany substrat,
- Ligazy z domeną HECT, przenoszące ubikwitynę z enzymu E2 na ligazę ubikwitynową E3, a dopiero następnie na substrat.

Do grupy HECT zaliczana jest ligaza ubikwitynowa E3 Itch. Ludzki gen ligazy ubikwitynowej Itch zlokalizowany jest na chromosomie 20q11.22 i koduje monomeryczne białko złożone z 854 aminokwasów o masie 113kDa [74]. Po raz pierwszy białko to zostało zbadane u myszy, u których zmiany w genie Itch skutkowały upośledzeniem układu immunologicznego. Itch bierze udział w odpowiedzi immunologicznej poprzez wiązanie czynników transkrypcyjnych c-jun i JunB do domen WW powodując ich ubikwitynację i degradację wpływając tym samym na proces różnicowania limfocytów T [75]. Jak wykazano na komórkach raka prostaty, linii komórkowej PC-3, pod wpływem trisulfidu diallilu dochodzi do degradacji ferrytyny. W proces ten zaangażowana jest aktywowana kinazą JNK1, ligaza ubikwitynowa Itch [76].

Żelazo może jednak zostać uwolnione z ferrytyny bez uszkodzenia struktury białka. Dzieje się tak, gdy cząsteczki o właściwościach redukujących mają zdolność do penetracji rdzenia tego białka [77]. Do takich cząsteczek zaliczany jest anionorodnik ponadtlenkowy. Powoduje on redukcję  $Fe^{3+}$  do  $Fe^{2+}$ , umożliwiając tym samym oderwanie jonu żelaza związanego z ferrytyną [78]. W obecności jonów wolnego żelaza, przy udziale stosunkowo mało reaktywnych form tlenu, takich jak anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru powstaje silnie toksyczny i bardzo reaktywny rodnik hydroksylowy. Proces ten, w którym żelazo pełni funkcje katalityczne, nosi nazwę reakcji Fentona (Rys.10).



Rys.10-Schemat reakcji Fentona.

Generowany w wyniku reakcji rodnik hydroksylowy wykazuje bardzo silne właściwości utleniające. Jego okres półtrwania wynosi zaledwie 10<sup>-9</sup> sekundy. Działa on niespecyficycznie i może prowadzić do uszkodzeń większości podstawowych struktur komórkowych. Reakcje rodnikowe przebiegają kaskadowo, czego konsekwencją mogą być poważne uszkodzenia istotnych biomolekuł, których funkcje warunkują homeostazę całego organizmu.

#### 1.4.4 Rola żelaza w rozwoju i przebiegu chorób sercowo-naczyniowych

Mimo, że w ostatnich kilkudziesięciu latach dokonano znacznego postępu w zakresie poznania i zrozumienia przyczyn leżących u podłoża CVDs, ciągle jeszcze nasza wiedza jest niewystarczająca, aby można było wprowadzić w pełni skuteczne leczenie oraz działania zapobiegające powstawaniu tych schorzeń. Hipotezę zakładającą, że podwyższone stężenie żelaza może mieć istotne znaczenie w rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego wysnuł po raz pierwszy Sullivan w 1981 [79]. Do dnia dzisiejszego znaczna ilość prac naukowych

potwierdziła jego założenia. Istotą homeostazy żelaza jest utrzymanie ciągłości procesów biologicznych, w które zaangażowane są jony żelaza i jednocześnie ograniczenie ich dostępności dla reakcji Fentona. Niebezpieczeństwo jakie pociąga za sobą ta reakcja pozwala zrozumieć dlaczego obieg żelaza jest w organizmie tak precyzyjnie kontrolowany. Z punktu widzenia powstawania i rozwoju CVDs, jednym z najbardziej istotnych procesów z udziałem wolnych rodników, w tym m. in. rodnika hydroksylowego, jest peroksydacja lipidów. Reakcje peroksydacji, w których rodnik hydroksylowy inicjuje oderwanie atomu wodoru od cząsteczki wielonienasyconego kwasu tłuszczowego (LH) wchodzącego w skład fosfolipidów lipoprotein osocza, prowadzi do powstania nadtlenków lipidowych (LOOH). W obecności jonów żelaza oraz LOOH dochodzić może do reinicjacji peroksydacji lipidów, w skutek czego powstają produkty wolnorodnikowe oraz ulega zmianie stopień utlenienia żelaza. Jony żelaza z kolei mogą reagować z rodnikowymi produktami peroksydacji lipidów, prowadząc do utworzenia pochodnych hydroksylowych (LOH) lub nadtlenków (LOOH). Utlenione LDL uważa się za główne czynniki prozapalne odpowiedzialne za przewlekły stan zapalny w miażdżycy [80]. Oksydacyjnym modyfikacjom zachodzącym przy udziale żelaza ulegają również białka. Ma to szczególne znaczenie ze względu na funkcje sygnalizacyjne jakie pełnią w organizmie [81]. Oksydacyjne zmiany mogą prowadzić do zaburzenia szlaków sygnalizacyjnych zapewniających homeostazę organizmu, przyczyniając się w ten sposób do rozwoju wielu chorób. Oprócz LIP, potencjalnym źródłem jonów żelaza w osoczu jest hemoglobina. Aby zapobiec jej udziałowi w katalizowaniu reakcji Fentona organizm wyposażony został w haptoglobinę oraz hemopeksynę. Haptoglobina jest białkiem silnie wiążącym wolną hemoglobinę, natomiast hemopeksyna hem [82]. Mimo złożonego mechanizmu chroniącego zdrowy organizm przed żelazozależnymi uszkodzeniami, w stanach patologicznych dochodzi do zaburzenia homeostazy tego pierwiastka, co prowadzi do negatywnych skutków jego reaktywności. W badaniu wykonanym przez naukowców z Innsbrucku, przeprowadzonym na 826 pacjentach wykazano, że podwyższony poziom białka magazynującego żelazo (ferrytyny) w surowicy stanowi ważny czynnik ryzyka oraz progresji zmian miażdżycowych [83]. Wyniki badań Sullivana z 2002 roku wykazały natomiast, że obniżenie ustrojowej puli labilnego żelaza chroni przed rozwojem CVDs [84]. Zaobserwowano również, że występowanie CVDs u kobiet w okresie przedmenopauzalnym, w porównaniu z mężczyznami w tym samym wieku, jest o połowę rzadsze. Jako jeden z czynników wyjaśniających tę sytuację wymienia się regularny ubytek żelaza wraz z krwią

menstruacyjną, co może być jednym z mechanizmów chroniących kobiety przed występowaniem CVDs [85].

## 1.5 Białkowe kinazy aktywowane mitogenami

Kinazy aktywowane mitogenami (MAPK) należą do rodziny enzymów, które przekazują sygnał zewnętrzny poprzez kaskadę fosforylacji w celu generowania właściwej odpowiedzi komórki na środowisko. MAPK należą do kinaz białkowych o aktywności serynowo-treoninowej, regulujących wiele wewnątrzkomórkowych procesów, takich jak transkrypcja genów, biosynteza białek, podziały i różnicowanie komórek oraz ich przeżycie lub apoptozę. Kinazy MAP dzielą się na trzy grupy:

- ERK1/2 (*ang. Extracellular signaling kinases*)
- JNK 1-3 (*ang. c-Jun N-terminal kinases*)
- P 38MAPK

### 1.5.1 Aktywacja kinaz MAP przez fosforylację kaskadową

Kinazy MAP zaangażowane są w szlaki sygnalizacyjne w formie trójpoziomowej kaskady kinaz, w której każdy enzym ulega aktywacji poprzez fosforylację. W pierwszym etapie kinaza kinazy aktywującej MAPK (MAP3K) aktywuje kinazę aktywującą MAPK (MAP2K), a ta z kolei fosforyluje efektorowe kinazy MAP (MAPK).

BODZIEC → MAP3K → MAP2K → MAPK → ODPOWIEDŹ

Rys. 11-Kaskada przekazywania sygnału z udziałem kinaz MAP.

Aktywacja kinaz MAP dokonywana jest przez podwójną fosforylację treoniny i tyrozyny w sekwencji Thr-X-Tyr, gdzie X to: kwas glutaminowy dla ERK, prolina dla JNK oraz glicyna dla p38. W warunkach fizjologicznych aktywacja MAPK bywa często krótkotrwała i jest ograniczona czasem stymulacji.

### 1.5.2 Kinazy N-końcowego odcinka c-Jun

Kinazy N-końcowego odcinka c-Jun (JNK), określane również jako SAPK (*ang. stress activated protein kinase*) zalicza się do rodziny kinaz białkowych aktywowanych mitogenami. Kinazy JNK są kodowane przez 3 różne geny: JNK1, JNK2 i JNK3, które w komórkach ssaczych zostały zidentyfikowane w co najmniej 10 formach splicingowych [86]. Zarówno JNK1 jak i JNK2 ulegają ekspresji prawie we wszystkich tkankach [87], natomiast JNK3 w mózgu i w mniejszym stopniu w sercu i jądrach [88]. Kinaza JNK1 i JNK2 o masach odpowiednio 46 i 54 kDa, fosforylowane są przez MKK4 (SEK1) i MEKK7 (Rys.36) [89]. Kaskada kinaz JNK aktywowana jest również przez takie czynniki jak promieniowanie UV, szok cieplny, hiperosmolarność. Co więcej, może być również aktywowane przez TNF- $\alpha$ , lipopolisacharyd (LPS) czy IL-1. Aktywna postać JNK fosforyluje w c-Jun seryny w pozycjach 63 i 73, co pozwala na dimeryzację c-Fos i powstanie AP-1, w którego składzie znajduje się właśnie c-Jun. AP-1 wiązana jest następnie do swoistych sekwencji w promotorach niektórych genów zmieniając tym samym ich aktywność. Między innymi stymuluje ekspresję c-Jun, co tworzy samonapędzający się mechanizm.

#### 1.5.2.1 Rola kinaz MAP w przebiegu chorób sercowo-naczyniowych

Z dotychczasowych badań wynika, że kinaza p38 MAP zaangażowana jest w upośledzenie funkcji śródbłonna, związanego zależną od NO wazodylatacją. Jak wykazał Hein i wsp. CRP hamuje tą funkcję śródbłonna poprzez aktywację kinazy p38 [90]. Natomiast Willette i wsp. podając szczurom z nadciśnieniem inhibitor tej kinazy obserwowali zależną od tlenu azotu relaksację naczyń. Ułatwia to przechodzenie cząsteczek LDL do błony wewnętrznej ściany naczyń. Ułatwia to przechodzenie cząsteczek LDL do błony wewnętrznej ściany naczyń. Jak wykazali Duran i wsp. szlaki sygnałowe zależne od kinaz ERK1/2 oraz p38 uczestniczą w indukowanej VEGF zwiększonej przepuszczalności komórek śródbłonna [92]. Cechą dysfunkcji śródbłonna jest również pojawienie się na jego powierzchni zwiększonej ilości komórek adhezyjnych. Z przeprowadzonych badań wynika, że komórki śródbłonna poddane działaniu TNF- $\alpha$  aktywują kinazy ERK, JNK i p38 z następującą translokacją NF- $\kappa$ B do jądra, a w konsekwencji wzmożoną ekspresją ICAM-1. Wywołany

działaniem TNF- $\alpha$  wzrost ekspresji ICAM-1 został zahamowany poprzez działanie inhibitora kinazy JNK -SP600125 oraz inhibitora kinazy p38 -SB203580. Nie zadziałał natomiast inhibitor kinazy ERK -PD98059 [93]. Otrzymane wyniki sugerują, że zarówno kinaza JNK jak p38 zaangażowane są w przekazywanie sygnału prowadzące do indukowanej przez TNF- $\alpha$  zwiększonej ekspresji ICAM-1.

### 1.5.3 Budowa i funkcje białka p66Shc

Białko p66Shc to białko adaptorowe, odkryte stosunkowo niedawno, bo dopiero w 1997 roku. Białka adaptorowe to rodzaj białek, które nie wykazują aktywności enzymatycznej, jednak posiadają zdolność interakcji z innymi białkami przekazując sygnał komórkowy. P66Shc należy do rodziny białek Shc składającej się z czterech grup określanych jako ShcA, ShcB, ShcC oraz RaLP, gdzie ShcA to właściwe białka Shc, ShcB to białka Sli, natomiast ShcC to białka Rai [94]. Grupa białek ShcA złożona jest z trzech izoform o masach cząsteczkowych 46, 52 i 66kDa. Wszystkie trzy kodowane są przez ten sam gen zlokalizowany na chromosomie 1q21 [95] oraz mają podobny schemat budowy. Zbudowane są z trzech funkcjonalnie tożsamyh domen:

- Umiejscowiona na C-końcu domena SH2 (*ang. src homology domain 2*)
- Centralna domena CH1 (*ang. collagen homology domain 1*)
- Domena PTB (*ang. phosphotyrosine binding domain*)

W przypadku białek p46 i p52 domena PTB znajduje się na N-końcu cząsteczki. W przypadku białka p66 poza wyżej wymienionymi domenami izoforma ta posiada dodatkową, bogatą w reszty proliny oraz glicyny:

- domenę CH2 (*ang. collagen homology domain 2*)

Domena CH2 zawiera w swej budowie ważne miejsca fosforylacji seryny (36 oraz 54). Fosforylacja Ser 36 ma istotne znaczenie dla właściwości proapoptotycznych tego białka oraz odgrywa ważną rolę w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Białka p52Shc oraz p66Shc posiadają także pomiędzy domenami CH2 i PTB region CB (*ang. cytochrome c binding domain*), odpowiedzialny za wiązanie cytochromu c-CB [96].



Badania wykonane przez naukowców z Mediolanu okazały się przełomowe dla poznania funkcji białka p66. Pelicci i wsp. prowadzili badania na modelu mysim, w którym zwierzęta pozbawione zostały genu kodującego białka p66Shc (p66Shc<sup>-/-</sup>) [95]. Badacze wykazali u tych zwierząt zwiększoną oporność na stres oksydacyjny, co manifestowało się mniejszymi uszkodzeniami wywołanymi stanem ischemii czy hipercholesterolemii oraz wydłużeniem czasu życia w stosunku do zwierząt dzikiego typu. Konsekwencją fosforylacji seryny 36, białka p66Shc, jest jego izomeryzacja przez izomerazę propylową, prowadząca do zmiany jego konformacji. Zainicjowanie tego procesu umożliwia defosforylację P-p66Shc przez fosfatazę 2A (PP2A) i przemieszczenie się tego białka do mitochondriów. Tam ulega związaniu i może zaburzać ich strukturę i funkcje. Niezwykle istotny wydaje się fakt, że proces ten prowadzi do wzmożonej generacji RFT. Fosforylacja seryny 36 zachodzi przy udziale kinazy serynowo-treoninowych w wyniku stresu. Jak wykazał Le i wsp. pod wpływem działania UV, dochodzi do fosforylacji białka p66Shc pod wpływem kinazy JNK [97]. Jednak w procesie tym mogą uczestniczyć zarówno PKC $\beta$ , ERK, jak również ASK1 czy p38 MAPK. Co ciekawe, zależna od Rac1 fosforylacja seryny w pozycji 54 i treoniny w pozycji 386 zwiększa stabilność białka p66Shc i obniża możliwość jego ubikwitynacji. Istotny również wydaje się wpływ białka p66Shc na poziom enzymów antyoksydacyjnych. Jak wykazali w swoich badaniach Nemono i Finkiel, wysoki poziom białka P-p66Shc (Ser 36), powoduje inaktywację czynników transkrypcyjnych FKHL, a w szczególności FKHL 1 (FOXO3a), który odpowiedzialny jest za regulację ekspresji genów SOD2 i katalazy. Zjawisko to tłumaczy zwiększoną oporność na stres zwierząt pozbawionych genu kodującego białko p66Shc.

## 2. Cele

Celem niniejszej pracy było zbadanie zmian w metabolizmie żelaza indukowanych przez angiotensynę II i homocysteinę oraz określenie roli szlaku sygnałowego JNK/p66Shc/ITCH w komórkach śródbłonna naczyniowego.

Wyznaczono cztery podstawowe cele szczegółowe:

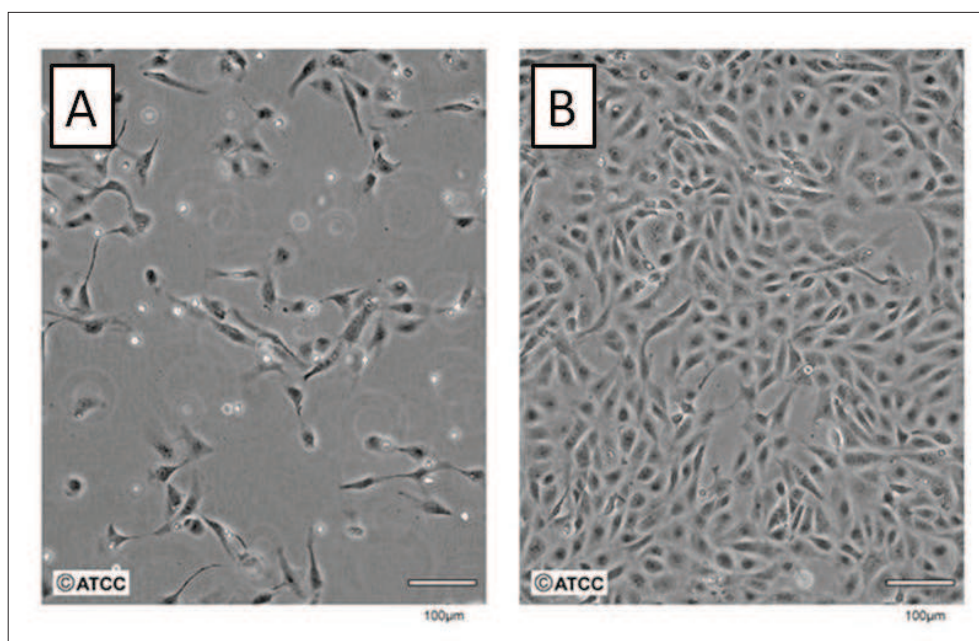
1. Określenie czy homocysteina i angiotensyna II spowodują degradację ferrytyny i zmiany w poziomie LIP w komórkach śródbłonna naczyniowego.
2. Zbadanie roli kinaz JNK1 oraz JNK2 w procesie degradacji ferrytyny w komórkach śródbłonna naczyń traktowanych angiotensyną II i homocysteiną.
3. Zbadanie roli ligazy ubikwitynowej Itch w regulacji degradacji ferrytyny w komórkach śródbłonna naczyń ekspozowanych na angiotensynę II i homocysteinę.
4. Zbadanie udziału białka adaptorowego p66Shc w degradacji ferrytyny.

## 3. Materiały i metody

### 3.1 Materiały

#### 3.1.1 Linia komórkowa

Badania w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały przeprowadzone na linii komórek śródbłonka pochodzącego z głównego pnia tętnicy płucnej młodej krowy (CPAE). Linia komórkowa CPAE została zakupiona z amerykańskiego banku linii komórkowych ATCC (*ang. American Type Culture Collection*). Certyfikat analizy linii komórkowej wykorzystanej do badań znajduje się w załączniku nr 1. Po raz pierwszy linia CPAE została wyprowadzona w styczniu 1979 roku przez P. Del Vecchio Lumen z fragmentów tętnicy, rozproszonych po obróbce enzymatycznej.



Rys. 12- Komórki CPAE przy niskiej (A) i wysokiej (B) konfluencji [98].

#### 3.1.2 Odczynniki

Spis użytych odczynników- załącznik nr 2

### 3.1.3 Roztwory

Do przeprowadzonych badań użyte zostały roztwory wymienione poniżej:

Tab.3-Roztwory użyte do badań.

Nazwa roztworu:	Skład roztworu:
Roztwór A	1% Triton® X-100, 0,1% SDS, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl; pH 7,5
Roztwór B	250 mM TRIS-HCl, 8% SDS, 40% glicerol, 0,4% błękit bromofenolowy, 400 mM DTT
Roztwór C	1,5 M TRIS-HCl, 0,4% SDS; pH 8,8
Roztwór D	0,5 M TRIS-HCl, 0,4% SDS; pH 6,8
Roztwór E	25 mM TRIS, 192 mM Glicyna, 0,01% (x/v) SDS; pH 8,3
Roztwór F	25 mM Tris-HCl, 200 mM glicyna, 20% metanol
Roztwór G	5 mM TRIS-HCl, 15 mM NaCl, 0,01% Tween 20; pH 7,4
Roztwór H	10 mM Tris, pH 10,5

### 3.1.4 Zestawy komercyjne

Tab.4- Zestawy komercyjne użyte do badań.

Nazwa:	Firma:
„Plasmid Midi AX”-Zestaw do izolacji ultra czystego plazmidowego DNA	A&A Biotechnology
„Total RNA Mini Plus Concentrator” -Zestaw do izolacji RNA	A&A Biotechnology
“RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit”- Zestaw do odwrotnej transkrypcji	Thermo Scientific Fermentas
“Real Time 2 x PCR Master Mix SYBR Set B” -Mieszanka reagentów do reakcji qPCR	A&A Biotechnology
Muse® Cell Cycle Assay Kit	Merck Millipore

### 3.1.5 Przeciwciała

Tab. 5- Przeciwciała I rządowe.

Nazwa:	Firma:	Numer katalogowy:	Użyte rozcieńczenie:	Typ:
anti- ferritin L (M)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-74513	1:500	Mysie monoklonalne
Anty-ferritin H (R)	Santa Cruz Biotechnology	sc-25617	1:1000	Królicze poliklonalne
Anti-Itch	Lifespan Biosciences	LS-C138387	1:1000	Królicze monoklonalne
Anti-HA (M)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-7392	1:500	Mysie monoklonalne
anti- $\beta$ action-HRP	SIGMA	A3854	1:50000	Mysie monoklonalne
anti- P-p66S36	ABCAM	ab54518	1:500	Mysie monoklonalne
anti-Shc	Santa Cruz Biotechnology	A3854	1:1000	Królicze poliklonalne

Tab. 6- Przeciwciała II rządowe sprzężone z peroksydazą chrzanową.

Nazwa:	Firma:	Numer katalogowy:	Rozcieńczenie:
anti- rabbit IgG	Sigma Aldrich Poland	A9169	1:12500
anti- mouse IgG	Sigma Aldrich Poland	A9044	1:12500

### 3.1.6 Plazmidy

Mapy plazmidów przedstawiono w załączniku nr 3. Plazmidy eksprymujące katalitycznie nieaktywne mutanty JNK1, JNK2 oraz Itch otrzymano dzięki uprzejmości Prof. Michael Karin (Univeristy of California, San Diego, USA). Plazmid kodujący formę białka p66Shc zmienioną w wyniku mutacji genu p66Shc S36A (S36A) został otrzymany dzięki uprzejmości Dr Toren Finkel

(National Institutes of Health, Bethesda; USA). Wektor plazmidowy pcDNA 3.1 został zakupiony w firmie Invitrogen.

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Inkubacja komórek z angiotensyną II i homocysteiną

Do odpowiednich doświadczeń komórki pasażowałam na właściwe szalki 24h przed rozpoczęciem inkubacji z badanymi związkami. W poniższej tabeli znajdują się informacje na temat ilości komórek oraz rodzaju naczyń hodowlanych użytych do wykonanych doświadczeń:

Tab. 7- Ilość wysianych komórek oraz rodzaj naczyń hodowlanych wykorzystanych w odpowiednich doświadczeniach.

Doświadczenie:	Rodzaj użytej szalki:	Ilość wysianych komórek:
Pomiar żywotności komórek	96-dołkowa	$1 \times 10^4$
Analiza cyklu komórkowego	Szalka 6-dołkowa	$3 \times 10^5$
Pomiar reaktywnych form tlenu	Szalka 6-dołkowa	$3 \times 10^5$
Pomiar labilnej puli żelaza	Szalka 60mm	$5 \times 10^5$
PCR	Szalka 100mm	$3 \times 10^6$
Western blotting	Szalka 150mm	$8 \times 10^6$

### 3.2.2 Transformacja E. Coli.

W celu powielenia plazmidowego DNA, niewielką jego ilość wtransformowano do komórek kompetentnych szczepu *E.coli*. Całość hodowano, a następnie wysiewano na płytki z podłożem LA uzupełnionym odpowiednim antybiotykiem. Cała procedura została przeprowadzona w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego, dzięki uprzejmości Prof. dr hab. Anny Herman-Antosiewicz.

### 3.2.3 Izolacja plazmidowego DNA

Izolację plazmidowego DNA przeprowadziłam używając zestawu Plasmid Midi AX (A&A Biotechnology). Bakterie z 50- 100ml hodowli, po odwirowaniu zawiesiłam w buforze L1 (50mM TRIS pH 8,0; 10mM EDTA; 100µg/ml RNA-za A). W trakcie zawieszania osadu bakteryjnego roztwór zmieniał wygląd z całkowicie transparentnego w odcieniu ciemnoróżowym na nieprzeźroczysty w odcieniu jasnoróżowym. Zawieszanie bakterii zakończyłam po całkowitym zniknięciu osadu u dołu probówki. Następnie dodałam 5ml buforu L2 (0,2M NaOH; 1%SDS), wymieszałam całość i pozostawiłam na 5 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie dodałam 5 ml buforu L3 (3M roztwór octanu potasu, pH 4,8), wymieszałam kilkakrotnie przez odwracanie probówki, a następnie przelałam całość do wkładu filtrującego umieszczonego w probówce 50ml. Całość wirowałam przez 5 minut przy prędkości 1500 x g. Uzyskany podczas wirowania przesącz przeniosłam na kolumnę Plasmid 200. Po przejściu lizatu przez kolumnę płukałam ją 20ml roztworu K2 (0,9M NaCl; 100mM octanem potasu pH 5,5), a następnie przeniosłam ją do nowej probówki 50ml i eluowałam DNA za pomocą 6ml roztworu K3 (1,2M NaCl; 50mM TRIS pH 8,5; 15% izopropanol) Do tak otrzymanego eluatu dodałam wzmacniacz precypitacji i izopropanol, a następnie wirowałam 10 minut przy prędkości 11000 x g. Po zakończeniu wirowania supernatant ostrożnie zlałam, a do uzyskanego osadu dodałam 2ml 70% etanolu i ponownie wirowałam 3 minuty przy 11000 x g. Ponownie zlałam supernatant znajdujący się nad osadem, a następnie osuszony (10 minut w temperaturze pokojowej) osad rozpuściłam w 200µl ultra czystej wody. Stężenie plazmidowego DNA w otrzymanym roztworze mierzyłam przy pomocy spektrofotometru NanoDrop 1000.

### 3.2.4 Transfekcja komórek CPAE

Komórki transfekowałam plazmidami niosącymi allele kodujące nieaktywne formy białek JNK1, JNK2, 3E Itch, p66Shc oraz kontrolnie wektorem plazmidowym pcDNA3.1. Zmutowane allele wykazują cechę dominującą, unieczynnijającą jednocześnie produkt genu dzikiego typu. Linię komórkową CPAE pasażowałam na 15 cm płytkę (8x10<sup>6</sup> komórek na każdy dołek). Po upływie doby pożywkę zmieniałam na świeżą i przystępowałam do procedury transfekcji. W sterylnej probówce zawieszałam 11µg plazmidowego DNA w 2ml pożywki (OPTI MEM)

pozbawionej surowicy oraz czerwieni fenolowej. Następnie dodawałam 33µl PEI o stężeniu 1µg/µL i mieszałam za pomocą wroteksu. Przygotowaną mieszaninę inkubowałam w temperaturze pokojowej przez 15 minut, po czym dodawałam bezpośrednio na przygotowaną wcześniej płytkę z komórkami CPAE. Po upływie 4 godzin pożywkę wymieniałam na świeżą i ponownie umieszczałam komórki w inkubatorze na 24h, a po upływie tego czasu przechodziłam do kolejnych etapów doświadczeń.

### **3.2.5 Określenie żywotności komórek za pomocą testu SRB**

W celu sprawdzenia, czy badane przeze mnie stężenia Ang II i Hcy wykazują cytotoksyczne działanie na komórki śródbłonna linii CPAE, żywotność komórek została zmierzona za pomocą testu kolorymetrycznego z wykorzystaniem sulforodaminy B. Sulforodamina B (SRB) jest anionowym barwnikiem, który wiąże się z podstawowymi aminokwasami białek komórkowych za pomocą oddziaływań elektrostatycznych. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej w tym teście prowadzi się na podstawie pomiaru ilości białka komórkowego. Utrwalony barwnik SRB został zmierzony fotometrycznie po rozpuszczeniu i koreluje on z współczynnikiem całkowitej ilości białek. Komórki CPAE pasażowałam na płytkę 96-dołkową (1x10<sup>4</sup> komórek na dołek). Po upływie 24 godzin, wymieniałam pożywkę na świeżą (kontrola) bądź roztwór 0,4µM Ang II 3mM Hcy, przygotowany przeze mnie w pożywce, tuż przed dodaniem do komórek. Po 24 godzinnej inkubacji z badanymi związkami, komórki utrwalalam przez 1 godzinę w temperaturze 4°C przy pomocy 100µl 20% kwasu trichlorooctowego (TCA). Po tym czasie usunęłam supernatant, a próby płukałam 3 razy wodą dejonizowaną. Następnie komórki wybarwiałam 0,4% roztworem SRB i ponownie inkubowałam przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu nadmiar barwnika usuwałam przez 5- krotne płukanie 1% roztworem kwasu octowego. Związany z białkami barwnik rozpuszczałam w 10mM buforze (Roztwór H), a wynik odczytałam używając czytnika mikropłytek (EPOCH, BioTek), przy długości fali 570 nm.



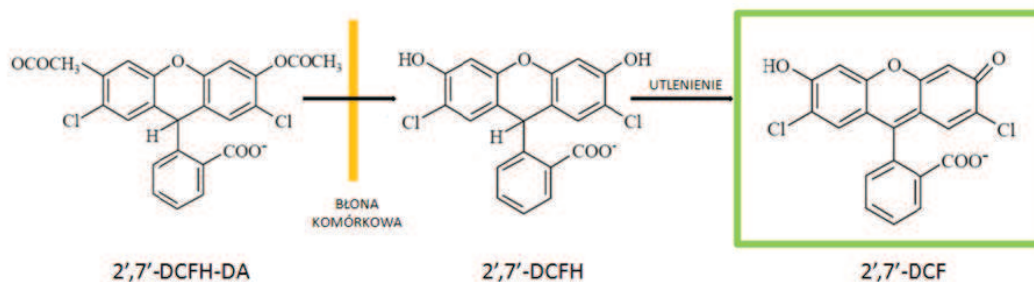
### 3.2.6 Analiza cyklu komórkowego z zastosowaniem analizatora Muse

Dzień przed badaniem pasażowałam komórki na płytkę 6-dołkową ( $3 \times 10^5$  komórek na dołek). W dniu badania w próbie kontrolnej wymieniałam pożywkę na świeżą natomiast w próbach badanych na roztwór  $0,4 \mu\text{M}$  Ang II lub  $3 \text{mM}$  Hcy, przygotowany przeze mnie w pożywce, tuż przed dodaniem do komórek. Po upływie 24 godzin zbierałam próby do analizy cyklu komórkowego. Zawieszona w pożywce komórki przenosiłam do probówek typu Eppendorf i wirowałam przy prędkości  $500 \times g$ . Po usunięciu supernatantu, przepłukiwałam komórki 1 ml PBS i ponownie wirowałam. Następnie ponownie usuwałam supernatant, a otrzymany osad komórkowy zawieszałam w  $50 \mu\text{l}$  PBS po czym utrwalałam w 1 ml 70% etanolu uprzednio schłodzonym w  $-20^\circ\text{C}$ . Przygotowane w ten sposób próby przechowywałam przez co najmniej 3 godziny w temperaturze  $-20^\circ\text{C}$ . Utrwalone komórki wirowałam przy prędkości  $600 \times g$ , usuwałam supernatant i przepłukiwałam  $700 \mu\text{l}$  PBS. Powtarzałam tę czynność dwa razy, a uzyskany osad komórkowy zawieszałam ponownie w  $175 \mu\text{l}$  odczynnika do analizy cyklu komórkowego (Muse® Cell Cycle Assay Kit, Merck Millipore) zawierającego jodek propidyny. Po upływie 30 minut inkubacji w temperaturze pokojowej w zaciemnionym miejscu, przystępowałam do analizy prób na mikrokapilarnym cytometrze przepływowym Muse™. Otrzymane wyniki wyrażone były w postaci procentowej zawartości komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego w badanej próbie.

### 3.2.7 Pomiar poziomu wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (RTF) i azotu (RFN) metodą cytometrii przepływowej:

Pomiar RFT i RFN wykonałam używając w tym celu cytometru przepływowego z zastosowaniem odpowiedniego barwnika organicznego-2',7'-dioctanu dichlorodihydrofluoresceiny (2',7'-DCFH-DA). Związek ten wykazuje charakter lipofilny i swobodnie przechodzi przez błonę komórkową, wnikając do wnętrza komórki. W żywej komórce 2',7'-dwuoctan dichlorodihydrofluoresceiny ulega rozkładowi przez esterazy wewnątrzkomórkowe do 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (2',7'-DCFH) (Rys.13) o właściwościach hydrofilowych. 2',7'-DCFH reaguje wewnątrz komórki zarówno z reaktywnymi formami tlenu takimi jak nadtlenkiem wodoru, rodnikiem hydroksylowym czy

rodnikami peroksyłowymi, jak również z reaktywnymi formami azotu jak na przykład tlenek azotu czy nadtlenoazotynem [99]. Utleniona dichlorofluoresceina (2',7'-DCF) wykazuje maksimum absorbancji przy 525nm.

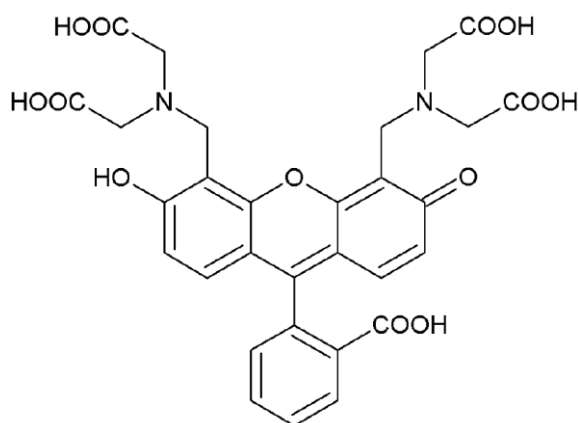


Rys.13- Mechanizm wykrywania RFT i RFN przy użyciu 2',7'-diocjanu dichlorodihydrofluoresceiny.

Komórki CPAE pasażowałam na płytki 6-dołkowa dobrą dobę przed planowanym doświadczeniem. Następnie inkubowałam komórki z 0,4µM Ang II lub 3 mM Hcy przez godzinę. Na pół godziny przed zakończeniem inkubacji, do komórek dodawałam 2',7'-DCFH-DA w stężeniu końcowym 5µM. Po zakończonej inkubacji komórki zbierałam przez trypsynizację, następnie płukałam trzykrotnie PBS-em, za każdym razem odwirowując z prędkością 1500 obr./ minutę i zlewając supernatant. Komórki zawieszałam w 200µl PBS-u i natychmiast poddawałam je analizie na cytometrze przepływowym FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) posiadającym filtry (495 nm ekscytacji i 530 nm emisji) dla widma barwnika. Pomiar cytometryczny wykonywany był we współpracy z dr. Tomaszem Ślebiodą w Katedrze Histologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

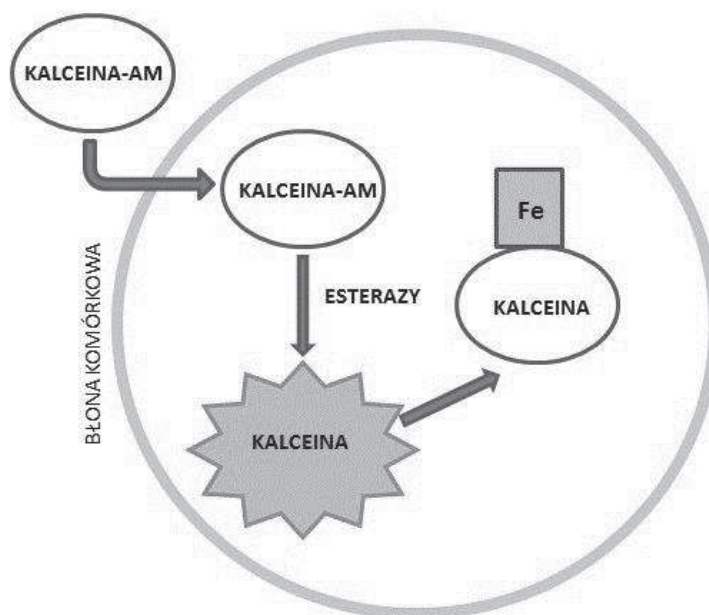
### 3.2.8 Pomiar labilnej puli żelaza

Acetoksymetylowy ester kalceiny (Kalceina-AM) jest niefluorescencyjnym estrem lipofilowym, który łatwo przenika przez błony komórkowe. Następnie szybko ulega przekształceniu przez nieswoiste esterazy do alkoholu (kalceiny), w wyniku czego generowany jest hydrofilowy fluorogen nie mogący już opuścić komórki [70]. Kalceina wykazuje maksimum absorpcji przypadającej na długość fali świetlnej równej 495nm, natomiast maksimum emisji przy 515 nm.



Rys.14-Wzór kalceiny.

Poziom LIP określany jest poprzez wygaszenie sygnału fluorescencji kalceiny po związaniu z jonami żelaza [100].



Rys.15- Schemat procesu wygaszania fluorescencji kalceiny przez LIP.

Komórki linii CPAE pasażowałam na płytce 60mm ( $5 \times 10^5$  komórek) dobę przed rozpoczęciem badania. W dniu eksperymentu komórki traktowałam  $25 \mu\text{M}$  DFO (1 godzinna preinkubacja),  $0,4 \mu\text{M}$  angiotensyną II,  $3 \text{mM}$  homocysteiną (godzinne traktowanie). 30 minut

przed końcem inkubacji ze związkami do komórek dodałam kalceinę- AM o stężeniu końcowym 5  $\mu$ M. Po zakończeniu inkubacji komórki płukałam 5 razy 2ml PBS, które następnie zostały poddane analizie pod mikroskopem fluorescencyjnym.

### 3.2.9 Hodowla komórek eukariotycznych CPAE

Komórki eukariotyczne CPAE hodowałam w inkubatorze (Biolab, 190S) w temperaturze 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Hodowlę komórek prowadziłam w pożywce MEM (*ang. Modified Essential Medium*) wzbogaconej 20% płodową surowicą bydlęcą (Sigma Aldrich), 1% mieszaniną antybiotyków penicylina/ streptomycyna (Sigma Aldrich), 1% roztworem L-glutaminy (Sigma Aldrich) oraz 1% roztworem pirogronianu sodu (Sigma Aldrich). Hodowlę zakładałam poprzez rozmrożenie zawiesiny komórek z dodatkiem krioprotektanta (5% DMSO) przechowywanych w ciekłym azocie. Hodowlę prowadziłam w butelkach T-75 oraz T-175, natomiast do kolejnych doświadczeń, komórki pasażowałam odpowiednio na plastikowe szalki o średnicy 150mm, 50mm, płytki 6-dołkowe lub 96-dołkowe. Komórki pasażowałam regularnie przy konfluencji ok. 80%, przy czym maksymalna, całkowita liczba pasaży nie przekraczała 30. Wszystkie czynności prowadzone były z wykorzystaniem komory z laminarnym przepływem powietrza, co zapewniło zachowanie sterylnych warunków podczas pracy z komórkami.

### 3.2.10 Określanie poziomu mRNA wybranych genów

#### 3.2.10.1 Izolacja RNA

W celu wyizolowania RNA, na dobę przed planowanym badaniem, pasażowałam komórki na płytki o średnicy 100mm. W dzień eksperymentu komórki inkubowałam z Ang II i Hcy przez 0,5h, 1h, 2h, 4h, 8h i 24h. Po upływie wymaganego czasu inkubacji, komórki przepłukiwałam 2ml PBS i odrywałam od podłoża za pomocą jednorazowych skrobaków, po czym zawieszałam komórki w 400 $\mu$ l fenozolu. Mieszaninę inkubowałam 5 minut w 50 °C. Następnie do mieszaniny dodawałam 200 $\mu$ l chloroformu, delikatnie mieszałam i inkubowałam w temperaturze pokojowej przez 3 minuty. Po tym czasie zawiesinę komórek wirowałam 10 minut z prędkością 12000 obrotów na minutę. Górną frakcję nanosiłam na minikolumnę z zestawu do

izolacji RNA i dalej postępowałam zgodnie ze wskazówkami producenta (A&A Biotechnology). Wyizolowane RNA przechowywałam w temperaturze - 80 °C.

### 3.2.10.2 Określenie stężenia i czystości RNA

Do określenia stężenia i czystości wyizolowanego RNA używano czytnika płytek (EPOCH, BioTek). Uzyskane mRNA uznawano za odpowiednie do dalszej analizy jeśli wartość stosunku absorbancji przy długościach fali OD260nm i OD280nm mieściła się w granicach 1,9 - 2,1.

### 3.2.10.3 Odwrotna transkrypcja

Odwrotną transkrypcję przeprowadzano używając zestawu komercyjnego RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific), postępując zgodnie z instrukcją producenta. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono przez 60 minut w temperaturze 42°C, następnie enzymy inaktywowano termicznie 5 minutową inkubacją w temperaturze 70°C. Uzyskany cDNA przechowywany był w temperaturze -20°C. Charakterystykę mieszaniny reakcyjnej przedstawia Tabela 8.

Tab. 8- Skład roztworu do odwrotnej transkrypcji.

Składnik mieszaniny	Objętość [ $\mu$ l]	Stężenie końcowe
Roztwór wodny RNS	10,5	1-2 $\mu$ g RNA
Oligo (dT) <sub>18</sub>	1	0,5 $\mu$ g
5xbufor do odwrotnej transkrypcji	4	1x
RiboLock (inhibitory RNaz)	0,5	20u
Mieszanina dNTP (10mM każdy)	2	1mM
Odwrotna transkryptaza M-MuLV	2	40u
Objętość końcowa	20 $\mu$ l	

### 3.2.10.4 Projektowanie starterów

Startery stosowane do powielania fragmentów genów ferrytyny L oraz H zaprojektowano stosując program Primer Quest (Integrated DNA Technology) (Tabela 9).

Tab.9- Sekwencje starterów projektowanych w celu powielania fragmentów genów wołu-ferrytyny L oraz genu referencyjnego  $\beta$ -aktyny, (\*) długość produktu reakcji PCR w parach zasad.

Sekwencja	Nazwa genu	Temperatura topnienia produktu	PZ* (dł. amplikonu)
5'-GCTCCCAGATTCGTCAGAATTA-3'	Ferrytyna L F	87,5 °C	107
5'-ATAGAAGCCCAGAGAGAGGTAG-3'	Ferrytyna L R		
5'-GAC TAC CTC ATG AAG ATC CT-3'	$\beta$ -aktyna F	88 °C	510
5'-CCACAT CTG CTG GAA GGT GG-3	$\beta$ -aktyna R		

### 3.2.10.5 PCR w czasie rzeczywistym

Do ilościowej analizy ekspresji genów stosowano komercyjnie dostępne zestawy PCR Master Mix SYBR Green (A&A Biotechnology, Polska). Skład ilościowy reagentów reakcji PCR umieszczono w Tabeli 10, natomiast profil czasowo – temperaturowy w Tabeli 11. Aby ocenić specyficzność reakcji wyznaczono krzywą topnienia po 40 cyklach PCR.

Tab. 10- Skład 1 x stężonego roztworu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Składnik mieszaniny	Objętość [ $\mu$ l] na 1 reakcję	Stężenie końcowe
cDNA	1,7	
SyberGreen mix	8,5	1x
Starter sensowny	0,28	0,165 $\mu$ M

Starter antysensowny	0,28	0,165 $\mu$ M
ddH <sub>2</sub> O	6,24	
Objętość końcowa	17 $\mu$ l	

Tab. 11- Najczęściej stosowany profil czasowo- temperaturowy reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Etap		Temperatura (°C)	Czas
1. Denaturacja wstępna		95	3 minuty
40 cykli	2. Denaturacja	95	5 sekund
	3. Przyłączanie starterów	60	15 sekund
	4. Wydłużanie starterów	72	15 sekund
5. Odczyt		79	10 sekund

Poziom ekspresji badanych genów mierzony metodą PCR w czasie rzeczywistym porównywano wykorzystując metodę  $2^{-\Delta Ct}$  normalizowaną względem genu referencyjnego  $\beta$ -aktyny. Jako kontrolę negatywną stosowano próby, w których cDNA zastąpiono wodą.

### 3.2.11 Western blotting

#### 3.2.11.1 Przygotowanie lizatów komórkowych

Po upływie odpowiedniego czasu inkubacji komórek ze związkami, komórki zbierałam za pomocą jednorazowych skrobaków do probówek o objętości 50 ml i wirowałam 5 minut przy prędkości 2250 obrotów/minutę w temperaturze 4°C. Po zlaniu supernatantu otrzymane osady zawieszałam w 1ml schłodzonego PBS, przenosiłam do probówek typu Ependorf i wirowałam 5 minut przy prędkości 1500 obrotów/minutę. Czynność tą powtarzałam dwukrotnie. Do tak przygotowanych osadów komórkowych dodawałam 60-80 $\mu$ l buforu lizującego (roztwór A) z dodatkiem inhibitorów proteaz i/lub fosfataz (Roche). W celu przygotowania lizatów komórkowych próby mroziłam czterokrotnie w -20°C przez 10 minut, następnie energicznie wytrząsałam za pomocą vortexu, po czym wirowałam przy prędkości 16000x g w temperaturze

4°C przez 20 minut. Otrzymany lizat komórkowy zbierałam ostrożnie znad osadu i używałam do dalszych badań.

### 3.2.11.2 Pomiar poziomu białka w lizatach komórkowych

Stężenie białka w przygotowanych lizatach komórkowych mierzyłam za pomocą metody Bradford [101], używając odczynnika Bradford (Sigma Aldrich). Pomiar absorbancji przeprowadziłam używając spektrofotometru (DR 3900, Hach Lange) przy długości fali  $\lambda = 595$  nm zgodnie z instrukcją producenta.

### 3.2.11.3 Elektroforeza w żelu akryl amidowym

W celu detekcji badanych przeze mnie białek, w pierwszym etapie prowadziłam pionowy elektroforetyczny rozdział zdenaturowanych białek według ich mas cząsteczkowych. W tym celu odmierzałam równe ilości białka z przygotowanych lizatów komórkowych i zawieszałam je w buforze lizującym (roztwór A) w celu ich normalizacji. Następnie dodawałam buforu obciążającego (roztwór B), dokładnie mieszałam za pomocą vortexu i ogrzewałam przez 10 minut w temperaturze 95°C, w celu denaturacji białek. Tak przygotowane próby nanosiłam na 12% żel poliakrylamidowy (skład podany w tabeli 12 i 13) wylewany dzień wcześniej w kasetach Mini-PROTEAN III (Bio-Rad).

Tab.12- Skład żelu zagęszczającego.

Żel zagęszczający	
LIQUACRYL	0,63 ml
LIQUABIS	0,33 ml
dH <sub>2</sub> O	2,8 ml
ROZTWÓR D	1,25 ml
10% APS	25 $\mu$ l
TEMED	6 $\mu$ l



Tab.13- Skład żelu rozdzielającego 12%

12% żel rozdzielający	
LIQUACRYL	2,9 ml
LIQUABIS	1,86 ml
dH <sub>2</sub> O	4,2 ml
ROZTWÓR C	3 ml
10% APS	42 µl
TEMED	12 µl

Pierwszą próbą nakładaną na każdy żel był marker (Page Ruler Plus- Fermentas), będący wzorcem masy dla pozostałych badanych przeze mnie próbek. Rozdział elektroforetyczny prowadziłam w buforze do elektroforezy (roztwór E) w aparacie Mini PRTOLEAN III Electrophoresis System (Bio-Rad) przy napięciu prądu 100 V dla żelu zgęszczającego i 130 V dla żelu rozdzielającego.

#### 3.2.11.4 Transfer białek na membranę oraz ich identyfikacja

Elektrotransfer rozdzielonych w żelu białek, na membranę PVDF prowadziłam w buforze do transferu (Roztwór F) w aparacie firmy Bio-Rad (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell), przy stałym natężeniu prądu 260 mA i napięciu 25 V przez 1 godzinę. W celu przeprowadzenia transferu układałam tzw. „kanapkę transferową”, złożoną z dwóch grubych bibułek typu Whatman, pomiędzy które umieszczona jest aktywowana za pomocą metanolu membrana PVDF. Po zakończeniu elektrotransferu membrany PVDF blokowałam w 5% odtłuszczonym mleku rozpuszczonym w buforze płuczącym (Roztwór G) przez jedną godzinę. Następnie membrany inkubowałam przez noc na wytrząsarce w temperaturze 4°C z właściwymi przeciwciałami I rzędownymi. Kolejnego dnia membrany płukałam 3 x 5 minut w buforze płuczącym (Roztwór G), a następnie inkubowałam z odpowiednimi przeciwciałami II rzędownymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową przez jedną godzinę w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu

inkubacji membrany ponownie płukałam 3 x 5 minut w buforze płuczącym (Roztwór G), a następnie detekcję białek wykonywałam przy użyciu odczynnika do wizualizacji peroksydazy chrzanowej -Hyper Film ECL (Amersham Bioscience). Ocenę poziomu białek wykonywałam za pomocą programu Quantity- One (Bio-Rad). Normalizację wykonywałam względem  $\beta$ - aktyny.

### **3.2.12 Analiza densytometryczna i statystyczna**

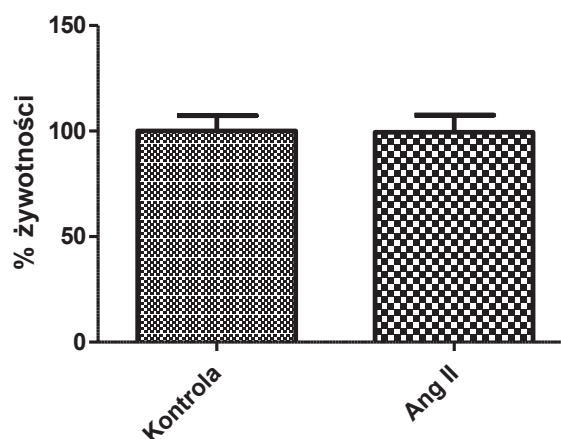
Poziom oznaczonych białek za pomocą metody Western blotting przedstawiłam jako jeden reprezentatywny wynik, natomiast podobne rezultaty otrzymałam w co najmniej trzech niezależnych doświadczeniach. Analizę densytometryczną wykonałam w programie Quantity One 4.5.2 firmy BIO-RAD, a otrzymane wyniki wyraziłam jako średnią arytmetyczną z wartościami odchylenia standardowego i przedstawiłam w formie wykresu. W pozostałych zastosowanych metodach wyniki również przedstawiłam jako średnią arytmetyczną z wartościami odchylenia standardowego z przynajmniej trzech niezależnych doświadczeń. Weryfikację istotności statystycznej pomiędzy badanymi próbkami analizowałam przy użyciu programu statystycznego GraphPad Prism 5.0

## 4. Wyniki

### 4.1 Wyniki

#### 4.1.1 Angiotensyna II nie wpływa na żywotność komórek śródbłonka i nie indukuje zmian w cyklu komórkowym

Szybki rozwój badań prowadzonych w ostatnich latach doprowadził do ustalenia wielu niezależnych czynników ryzyka rozwoju CVDs. Stwierdzono, że komórki śródbłonka charakteryzują się niezwykle różnorodną aktywnością biologiczną, która może zostać zaburzona, a zaburzenie takie z kolei prowadzić może do jego dysfunkcji, czego skutkiem jest rozwój procesów miażdżycowych. Jedną z substancji wytwarzaną w naszym organizmie, której podwyższony poziom prowadzić może do uszkodzenia komórek śródbłonka jest Ang II. W celu sprawdzenia czy w badanym przeze mnie modelu, dochodzi do indukowanego przez Ang II zatrzymania cyklu komórkowego lub zmian w poziomie żywotności komórek śródbłonka, w pierwszym etapie badań komórki śródbłonka linii CPAE poddałam działaniu 0,4 $\mu$ M Ang II przez 24h.



Rys. 16- Brak zmian w żywotności komórek CPAE traktowanych Ang II.

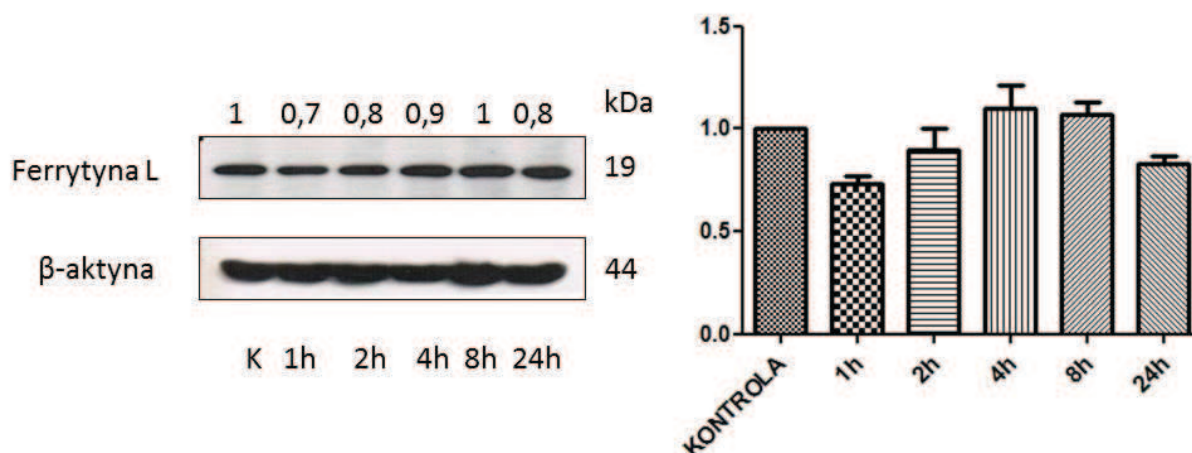
Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$ SD z 3 niezależnych doświadczeń. Nie wykazano różnic istotnych statystycznie w porównaniu do kontroli używając testu t-Studenta (\* $P < 0.05$ ).

---

Jak przedstawiłam na Rys. 16, w żywotności komórek traktowanych Ang II, w porównaniu do komórek kontrolnych, nie zaobserwowałam różnic istotnych statystycznie. Podobne wyniki otrzymałam w badaniu cyklu komórkowego. Nie zaobserwowałam istotnych statystycznie różnic w procentowej ilości komórek, znajdujących się w danej fazie (wyniki nie zostały zaprezentowane w pracy).

#### **4.1.2 Zmiany w poziomie białka ferrytyny L zależne od czasu inkubacji z angiotensyną II**

Badania ostatniej dekady dowodzą, że nadprodukcja reaktywnych form tlenu i azotu leży u podłoża genezy wielu chorób naczyniowych. Wzrost produkcji RFT i RNF w śródbłonku naczyniowym obserwowano w szczególności w następstwie wzrostu stężenia Ang II i Hcy. Obecnie zarówno Ang II jak i Hcy uważane są za niezależne czynniki chorób sercowo-naczyniowych takich jak: choroba niedokrwienna serca, udar mózgu, miażdżyca czy wystąpienie incydentów zakrzepowo-zatorowych. Dotychczas przeprowadzone badania, prowadzone na ludziach wskazują, iż toksyczność Hcy jest niemal całkowicie niwelowana w obecności chelatorów żelaza. Co więcej wyniki tych badań wskazują, iż żelazo zmagazynowane w nabłonku naczyniowym może być ważnym determinantem toksyczności Hcy [102]. Metabolizm żelaza podlega ścisłej kontroli, co jest wynikiem tego, iż z jednej strony jest ono niezbędnym mikroelementem, a z drugiej może ono wykazywać bardzo toksyczne działanie. Przeprowadzone badania wskazują, iż białko magazynujące żelazo-ferrytyna ulegając degradacji uwalnia tzw. labilną pulę żelaza, odpowiedzialną za żelazo zależną generację RFT. Z tego względu w kolejnym etapie badań postanowiłam sprawdzić jak angiotensyna II wpływa na poziom białka magazynującego żelazo, ferrytynę. W tym celu komórki śródbłonka naczyniowego linii CPAE inkubowałam przez 1, 2, 4, 8 i 24 godziny z 0,4 $\mu$ M angiotensyną II, a następnie za pomocą metody Western blotting, przy użyciu odpowiednich przeciwciał oznaczyłam poziom ferrytyny L, której główną funkcją jest magazynowanie żelaza.



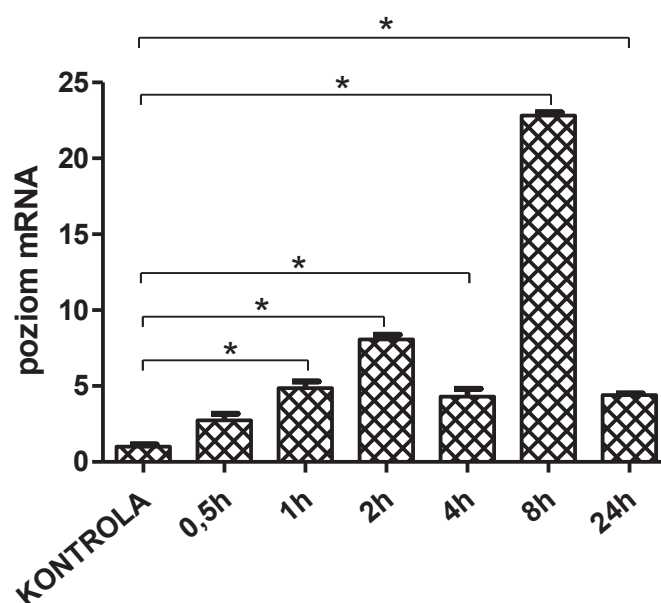
Rys.17- Zależność między poziomem ferrytyny L a czasem inkubacji z angiotensyną II.

Poziom ferrytyny L w komórkach CPAE traktowanych  $0,4\mu\text{M}$  Ang II w czasie 0-24 godzin. Rysunek przedstawia reprezentatywny wynik poziomu białka ferrytyny L i aktyny uwidoczniony za pomocą metody Western blotting. Zmiany w poziomie ferrytyny L densytometrycznie znormalizowano względem aktyny (wartości umieszczono nad prążkami). Wykresy słupkowe w prawym panelu ryciny przedstawiają wyniki trzech niezależnych doświadczeń.

Jak przedstawiłam na Rys. 17 największy spadek w poziomie w ferrytyny L odnotowałam po pierwszej godzinie traktowania komórek śródbłonka AngII, w kolejnych godzinach poziom tego białka powraca do wartości kontrolnej, po czym ponowny spadek następuje po 24 godzinach. Ze względu na fakt, iż zauważalny spadek w poziomie białka ferrytyny L zachodzi po jedno godzinnej inkubacji z Ang II, czas ten został zastosowany w pozostałych doświadczeniach.

#### 4.1.3 Zmiany w poziomie mRNA ferrytyny L zależne od czasu inkubacji z angiotensyną II

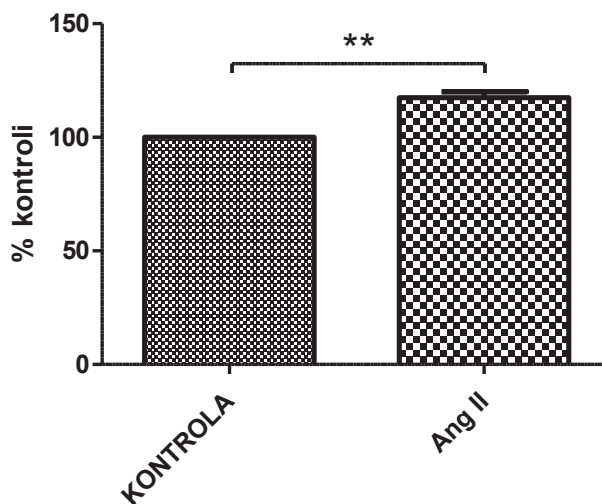
W przeprowadzonych doświadczeniach oceniałam poziom mRNA ferrytyny L dla komórek CPAE inkubowanych w czasie 0-24h z  $0,4\mu\text{M}$  Ang II. Wyniki zaprezentowałam na Rys. 18 w formie wykresów słupkowych, przedstawiając relatywną zmianę poziomu mRNA badanego genu w odniesieniu do kontroli, dla której przyjęto wartość 1,0.



Rys. 18- Porównanie poziomu mRNA genu ferrytyny L w linii komórkowej CPAE poddawanej inkubacji z Ang II w stężeniu  $0,4\mu\text{M}$  w czasie 0-24h. Do analizy istotności statystycznej użyto testu parametrycznego One-way ANOVA i testu nieparametrycznego Dunn's, gdzie: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Na wykresie pokazano wartości średnie zmiany poziomu mRNA w badanych próbach  $\pm$  SD dla trzech pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego aktywnej. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych. Wykres przedstawia wynik reprezentatywny, ta sama tendencja zmian widoczna była dla trzech niezależnych powtórzeń doświadczenia.

#### 4.1.4 Wywołana przez angiotensynę II wzmożona produkcja RFT i RFN w komórkach śródbłonna naczyniowego

Stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w etiopatogenezie chorób układu sercowo-naczyniowego. Zachwianie równowagi między czynnikami antyoksydacyjnymi, a reaktywnymi formami tlenu i azotu prowadzi do uszkodzenia śródbłonna i sprzyja rozwojowi schorzeń układu krążenia. Z tego względu postanowiłam sprawdzić, czy Ang II wpłynie na zmianę poziomu RFT i RFN w komórkach śródbłonna naczyniowego.

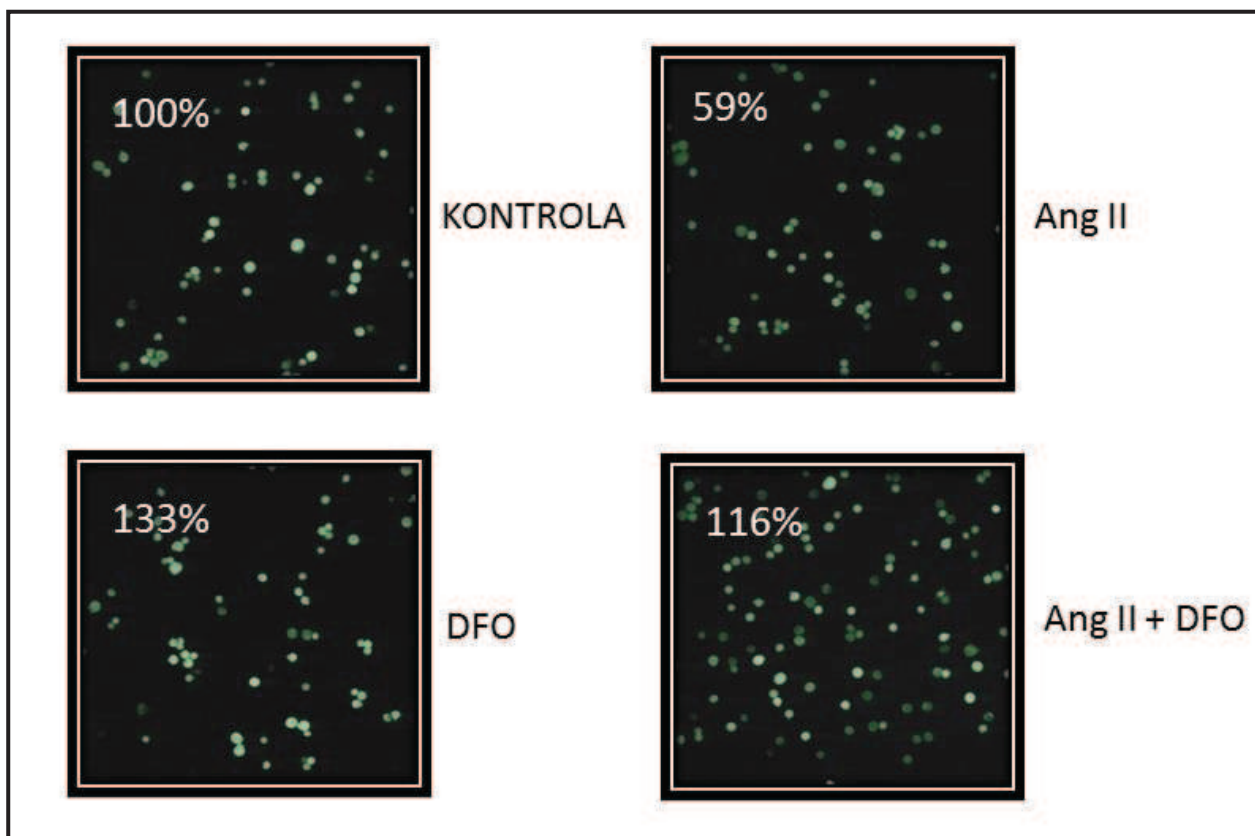


Rys.19- Wpływ Ang II na poziom RFT i RFN w komórkach śródbłonka naczyniowego.

Komórki linii CPAE kontrolne oraz traktowane Ang II przez 1h. Poziom RFT i RFN wykrywano metodą cytometrii przepływowej. Doświadczenie powtórzone w 3 niezależnych eksperymentach. Wykazano różnice istotne statystycznie w porównaniu do kontroli, gdzie \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Do analizy używano testu t-Studenta.

#### 4.1.5 Wywołany przez angiotensynę II wzrost poziomu labilnej puli żelaza w komórkach śródbłonka naczyniowego

Dotychczas przeprowadzone badania wskazują, iż białko magazynujące żelazo-ferrytyna ulegając degradacji uwalnia tzw. labilną pulę żelaza, odpowiedzialną za żelazo zależną generację stresu oksydacyjnego, charakterystycznego dla wielu stanów patologicznych. Aby potwierdzić, że po godzinnej inkubacji z  $0,4 \mu\text{M}$  Ang II poziom LIP w komórkach śródbłonka wzrasta, poziom wolnego żelaza w komórkach linii CPAE określałam na podstawie wiązania żelaza do kalceiny. Poziom LIP określany jest poprzez wygaszenie sygnału fluorescencji kalceiny po związaniu z jonami żelaza. Badanie przeprowadziłam również w obecności deferoksaminy (DFO), która jest silnym chelatorem żelaza. Otrzymane wyniki pozwoliły także na pośrednie potwierdzenie żelazo zależnej generacji RFT.



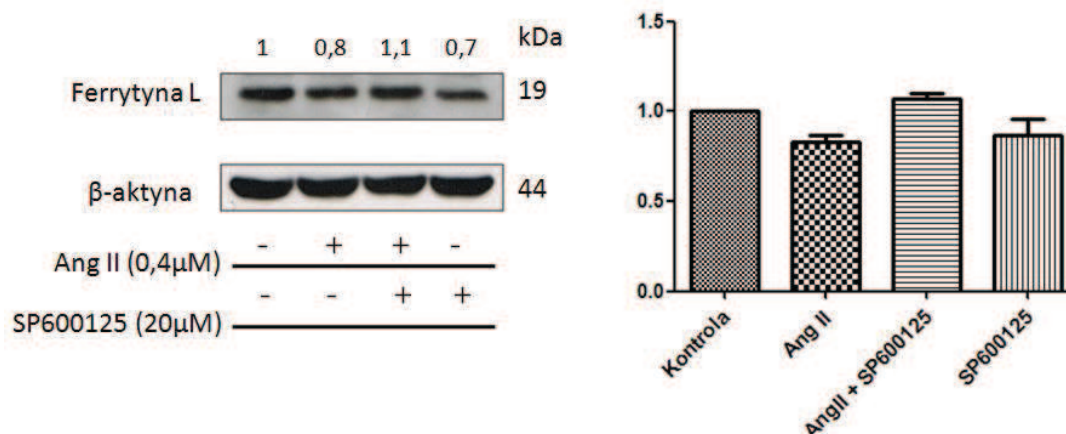
Rys.20- Wpływ Ang II na poziom LIP w komórkach śródbłonna naczyniowego.

Rysunek przedstawia zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego komórek CPAE wybarwionych kalceiną-AM, po wcześniejszej inkubacji z Ang II i DFO. Analiza danych wykonana została przy pomocy programu ImageJ. Przedstawione na zdjęciach wartości procentowe odpowiadają intensywności świecenia w stosunku do próby kontrolnej.

#### 4.1.6 Indukowana angiotensyną II degradacja ferrytyny L jest hamowana przez SP600125, inhibitor N- terminalnych kinaz c- Jun

Aby sprawdzić czy indukowana Ang II degradacja ferrytyny L w komórkach CPAE, jest zależna od N- terminalnych kinaz c- Jun, komórki CPAE poddawałam działaniu inhibitora SP600125 o stężeniu 20 $\mu$ M.



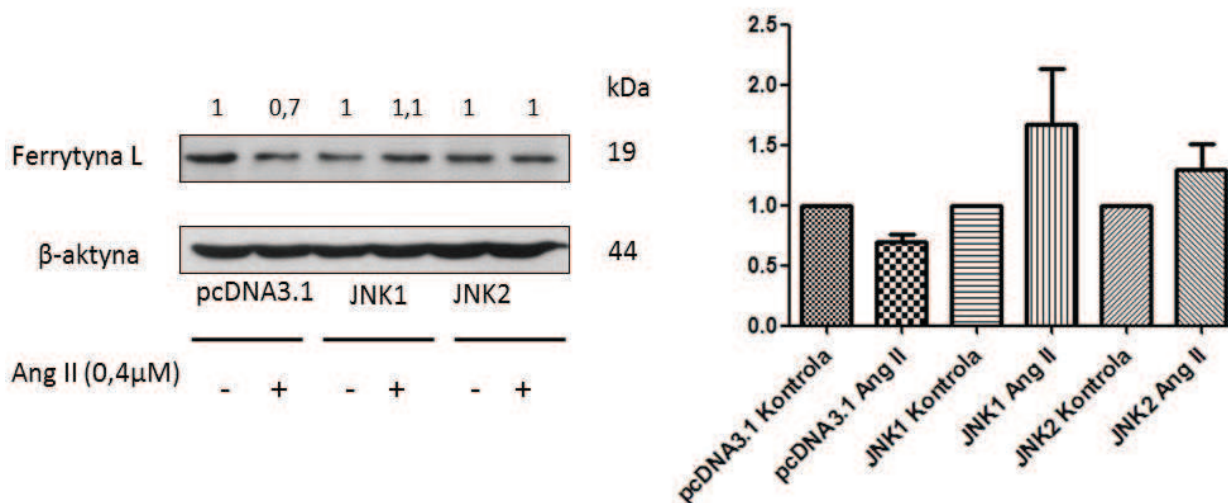


Rys.21- Kinazy N-końcowego odcinka c – Jun uczestniczą w regulacji poziomu ferrytyny L w komórkach śródbłonna naczyniowego poddanego działaniu Ang II.

Poziom ferrytyny L w komórkach CPAE traktowanych 0,4 $\mu$ M Ang II przez 1 godzinę. Rysunek przedstawia reprezentatywny wynik poziomu białka ferrytyny L i aktyny uwidoczniony za pomocą metody Western blotting. Zmiany w poziomie ferrytyny L densytometrycznie znormalizowano względem aktyny (wartości umieszczono nad prążkami). Wykresy słupkowe w prawym panelu ryciny przedstawiają wyniki trzech niezależnych doświadczeń.

#### 4.1.7 Kinazy JNK1 oraz JNK2 uczestniczą w procesie regulacji ferrytyny w komórkach CPAE traktowanych angiotensyną II

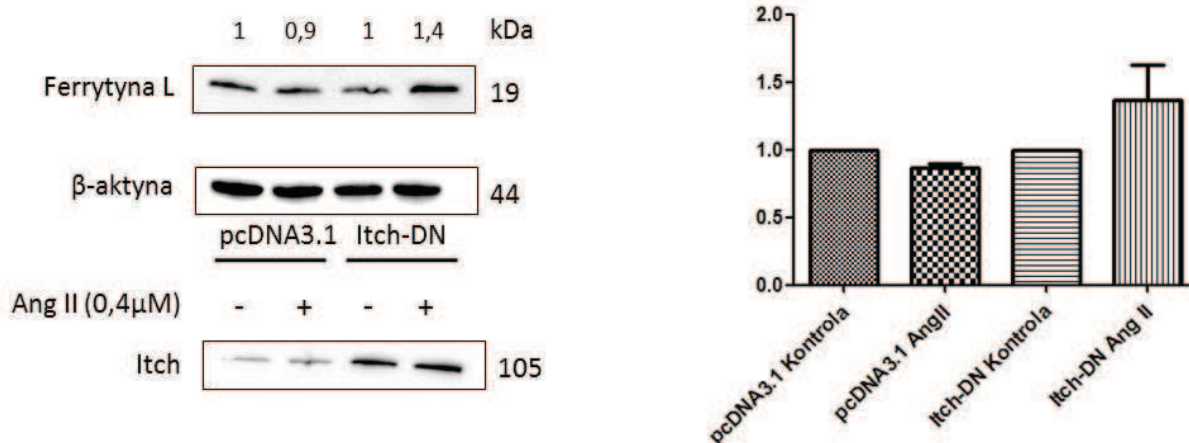
Aby sprawdzić, która z kinaz JNK uczestniczy w procesie regulacji poziomu ferrytyny w komórkach poddawanych działaniu Ang II, wykonałam przejściową transfekcję plazmidami niosącymi allele kodujące nieaktywne formy białek JNK1, JNK2 oraz kontrolnie wektorem plazmidowym pcDNA3.1. Następnie poddałam komórki działaniu 0,4 $\mu$ M Ang II przez 1h, po czym za pomocą metody Western blotting, przy użyciu odpowiednich przeciwciał oznaczyłam poziom ferrytyny L.



Rys.22- Kinazy JNK1 i JNK2 uczestniczą w procesie regulacji poziomu ferrytyny L w komórkach śródbłonka naczyniowego poddanego działaniu Ang II.

Poziom ferrytyny L w komórkach CPAE traktowanych 0,4μM Ang II przez 1 godzinę. Rysunek przedstawia reprezentatywny wynik poziomu białka ferrytyny L i aktywny uwidoczniony za pomocą metody Western blotting. Zmiany w poziomie ferrytyny L densytometrycznie znormalizowano względem aktywny (wartości umieszczono nad prążkami). Wykresy słupkowe w prawym panelu ryciny przedstawiają wyniki trzech niezależnych doświadczeń.

Jak wykazał Chang i wsp. w 2006 roku, aktywacja JNK1 prowadzi do podwyższenia poziomu ubikwitynacji białka antyapoptotycznego c-FLIP [103]. Aktywna kinaza JNK1 stymuluje proteasomalną degradację białka c-FLIP poprzez fosforylację, a tym samym aktywację ligazy 3E Itch, co prowadzi komórki na drogę apoptozy. Posiadając powyższe informacje założyłam, że ligaza 3E Itch może być odpowiedzialna za ubikwitynację i proteasomalną degradację ferrytyny. W celu sprawdzenia, czy ligaza 3E Itch uczestniczy w regulacji degradacji ferrytyny L w komórkach CPAE traktowanych Ang II, komórki transfekowałam przejściowo wektorem plazmidowym pcDNA3.1 oraz plazmidami niosącym allele kodujące nieaktywne formy białka 3E Itch (Itch-DN).

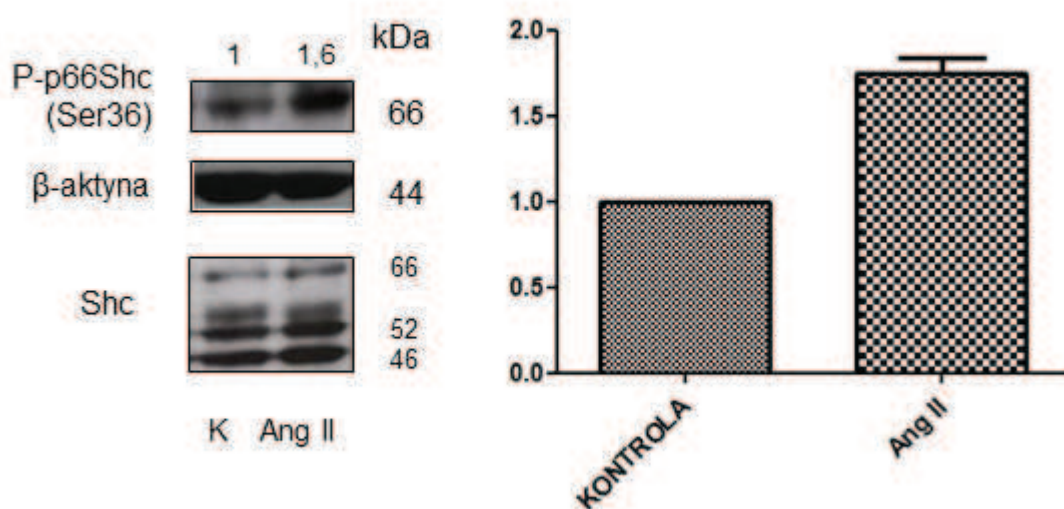


Rys.23- Ligaza 3E Itch regulują degradację ferrytyny L indukowaną Ang II w komórkach CPAE.

Poziom ferrytyny L w komórkach CPAE traktowanych 0,4μM Ang II przez 1 godzinę. Rysunek przedstawia reprezentatywny wynik poziomu białka ferrytyny L i aktywności wykazany za pomocą metody Western blotting. Zmiany w poziomie ferrytyny L densytometrycznie znormalizowano względem aktywności (wartości umieszczono nad prążkami). Wykresy słupkowe w prawym panelu ryciny przedstawiają wyniki trzech niezależnych doświadczeń.

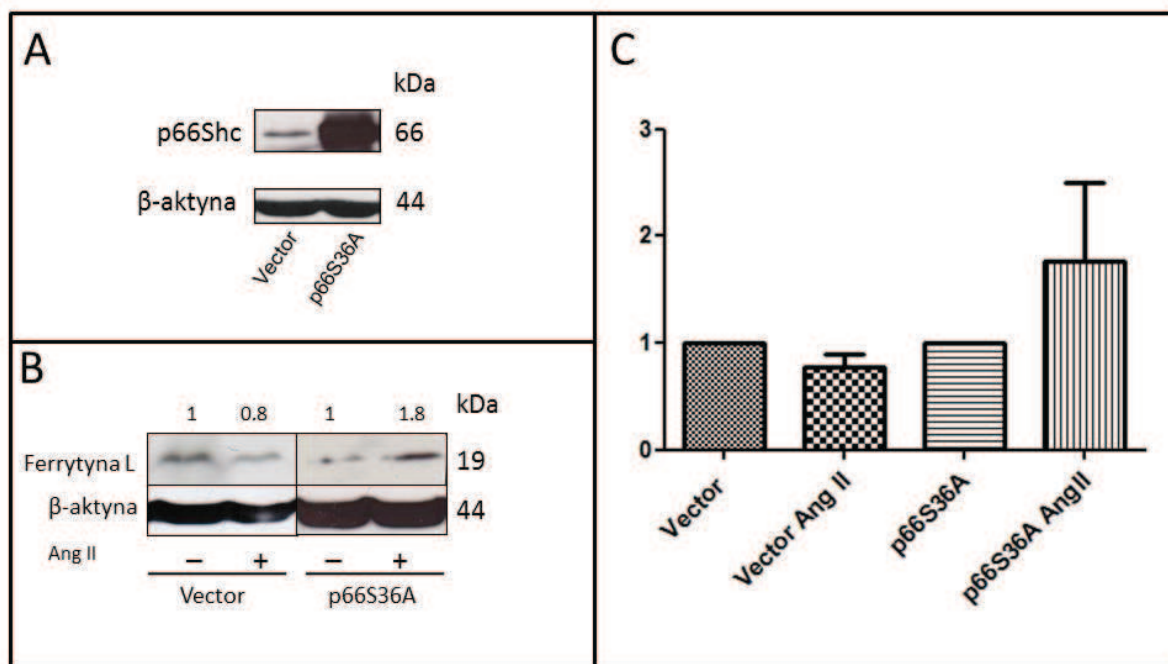
#### 4.1.8 Indukowana przez angiotensynę II degradacja ferrytyny L regulowana jest przez białko p66Shc

W celu sprawdzenia czy białko p66Shc uwikłane jest w mechanizm regulacji ferrytyny w pierwszym etapie sprawdzałam czy pod wpływem działania Ang II w komórkach CPAE zmieni się poziom aktywnej (ufosforylowanej) formy tego białka P-p66Shc



Rys. 24-Wpływ angiotensyny II na poziom aktywnej formy białka p66Shc w linii komórkowej CPAE. Aktywacja białka p66Shc w komórkach CPAE traktowanych 0,4  $\mu$ M Ang II. Rysunek przedstawia reprezentatywny wynik poziomu ufosforylowanej postaci białka p66Shc i aktywny uwidoczniony za pomocą metody Western blotting. Zmiany w poziomie P-p66Shc densytometrycznie znormalizowano względem aktywny (wartości umieszczono nad prążkami). Wykresy słupkowe w prawym panelu ryciny przedstawiają wyniki trzech niezależnych doświadczeń.

W kolejnym etapie komórki CPAE transfekowałam przejściowo plazmidami: pustym wektorem pcDNA3.1 oraz plazmidem niosącym allele kodujące nieaktywne formy białka p66Shc (S36A), w którym odpowiedzialna za aktywację tego białka, seryna w pozycji 36, zamieniona została na alaninę.

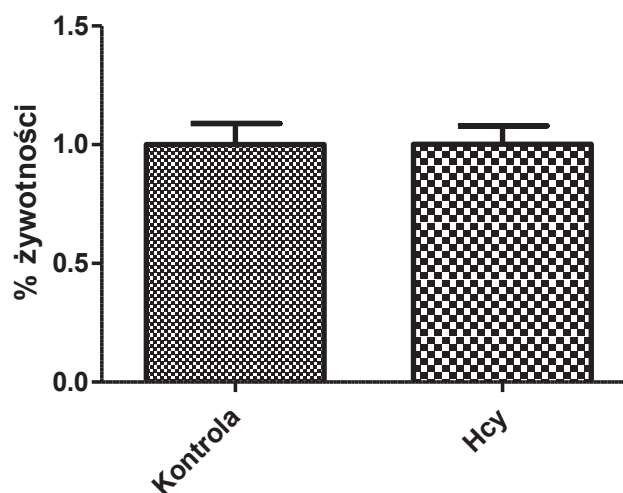


Rys. 25- Wpływ angiotensyny II na poziom ferrytyny L w komórkach CPAE transfekowanych przejściowo pustym wektorem pcDNA3.1 oraz plazmidami niosącym allele kodujące nieaktywną formę białka p66Shc (S36A).

Rysunek A przedstawia reprezentatywny wynik poziomu białka p66Shc i aktyny po przejściowej transfekcji plazmidem p66Shc, natomiast rysunek B przedstawia reprezentatywny wynik poziomu ferrytyny L i aktyny uwidoczniony za pomocą metody Western blotting. Zmiany w poziomie ferrytyny L densytometrycznie znormalizowano względem aktyny (wartości umieszczono nad prążkami). Wykresy słupkowe w prawym panelu ryciny przedstawiają wyniki trzech niezależnych doświadczeń.

#### 4.1.9 Homocysteina nie indukuje zmian w cyklu komórkowym ani nie wpływa na ich żywotność

Aby ocenić czy 24 godzinna inkubacja komórek śródbłoka z 3mM Hcy prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego lub zmian w poziomie żywotności komórek śródbłoka, wykonałam analizę cyklu komórkowego oraz test na żywotność komórek SRB.



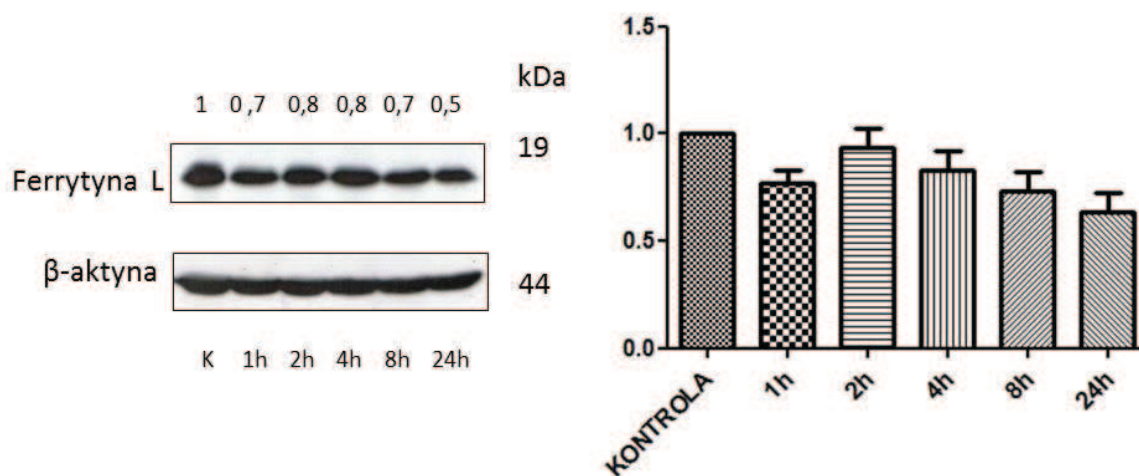
Rys. 26- Brak zmian w żywotności komórek CPAE traktowanych Hcy.

Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$ SD z 3 niezależnych doświadczeń. Nie wykazano różnic istotnych statystycznie w porównaniu do kontroli, zastosowano test t-Studenta (\* $p < 0.05$ ).

Jak przedstawiłam na Rys. 26, w żywotności komórek traktowanych Hcy, w porównaniu do komórek kontrolnych, nie zaobserwowałam różnic istotnych statystycznie. Podobne wyniki otrzymałam w badaniu cyklu komórkowego. Nie zaobserwowałam istotnych statystycznie różnic w procentowej ilości komórek, znajdujących się w danej fazie (wyniki nie zostały zamieszczone w pracy).

#### 4.1.10 Zmiany w poziomie białka ferrytyny L zależne od czasu inkubacji z homocysteiną

Podobnie jak w przypadku doświadczeń wykonanych z Ang II, w kolejnym etapie badań sprawdziłam jak homocysteina wpływa na poziom ferrytyny. W tym celu komórki śródbłonna naczyniowego linii CPAE inkubowałam przez 1, 2, 4, 8 i 24 godziny z 3mM roztworem Hcy, a następnie za pomocą metody Western blotting, przy użyciu odpowiednich przeciwciał oznaczyłam poziom ferrytyny L.



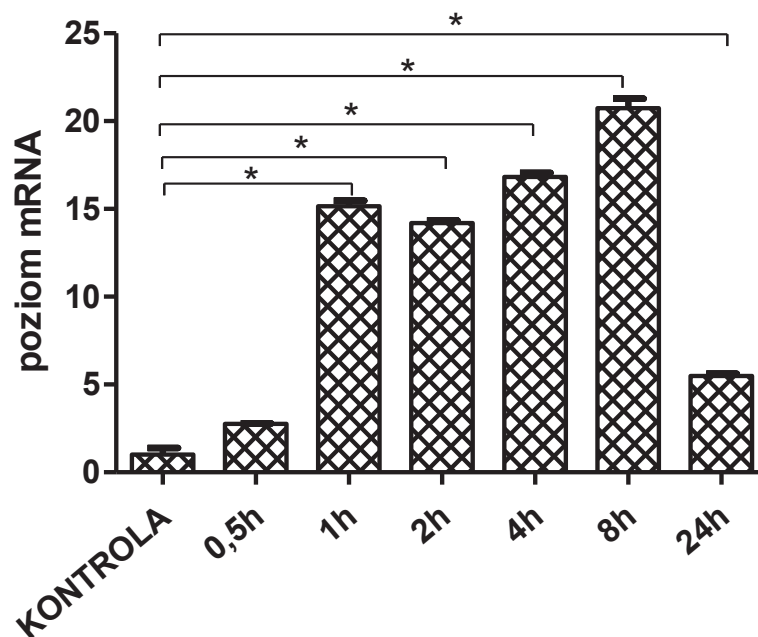
Rys.27- Zależność między poziomem ferrytyny L a czasem inkubacji z homocysteina.

Poziom ferrytyny L w komórkach CPAE traktowanych 3mM Hcy w czasie 0-24 godzin. Rysunek przedstawia reprezentatywny wynik poziomu białka ferrytyny L i aktyny uwidoczniony za pomocą metody Western blotting. Zmiany w poziomie ferrytyny L znormalizowano densytometrycznie względem aktyny (wartości umieszczono nad prążkami). Wykresy słupkowe w prawym panelu ryciny przedstawiają wyniki trzech niezależnych doświadczeń.

Jak wynika z przedstawionych przeze mnie wyników (Rys. 27), po pierwszej godzinie traktowania komórek CPAE z Hcy dochodzi do spadku w poziomie ferrytyny L w porównaniu do komórek kontrolnych. W kolejnych godzinach poziom tego białka powraca do wartości kontrolnej, po czym ponowny spadek następuje po 8 godzinach. Jednogodzinny czas inkubacji został zastosowany również w pozostałych doświadczeniach.

#### 4.1.11 Zmiany w poziomie mRNA ferrytyny L zależne od czasu inkubacji z homocysteina

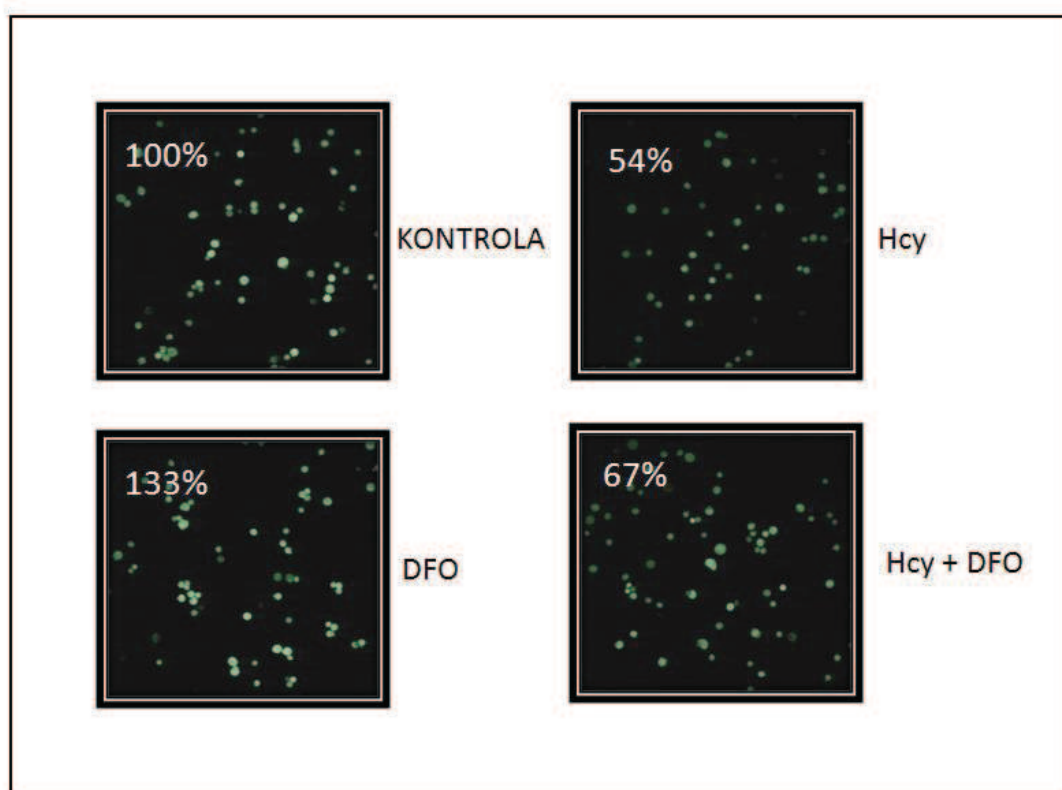
W przeprowadzonych doświadczeniach oceniałam poziom mRNA ferrytyny L dla komórek CPAE inkubowanych w czasie 0-24h z 3HcymM. Wyniki zaprezentowałam na rysunku 28 w formie wykresów słupkowych, przedstawiając względną zmianę poziomu mRNA badanego genu w odniesieniu do kontroli, dla której przyjęto wartość 1,0.



Rys. 28- Porównanie poziomu mRNA genu ferrytyny L w linii komórkowej CPAE poddawanej inkubacji z Hcy w stężeniu 3mM w czasie 0-24h. Do analizy istotności statystycznej używano testu parametrycznego One-way ANOVA i testu nieparametrycznego Dunn's, gdzie: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Na wykresie pokazano średnie wartości zmiany poziomu mRNA w badanych próbach  $\pm$  SD dla trzech pomiarów, w odniesieniu do ilości mRNA genu kontrolnego aktywny. Względny poziom mRNA dla kontroli przyjęto jako 1, a następnie obliczono krotność dla poszczególnych punktów doświadczalnych. Wykres przedstawia wynik reprezentatywny, ta sama tendencja zmian widoczna była dla trzech niezależnych powtórzeń doświadczenia.

W celu sprawdzenia czy po godzinnej inkubacji komórek śródbłónka z 3mM Hcy dojdzie do zmian w poziomie LIP, określiłam poziom wolnego żelaza poprzez wygaszenie sygnału fluorescencji kalceiny. Badanie przeprowadziłam również w obecności deferoksaminy.

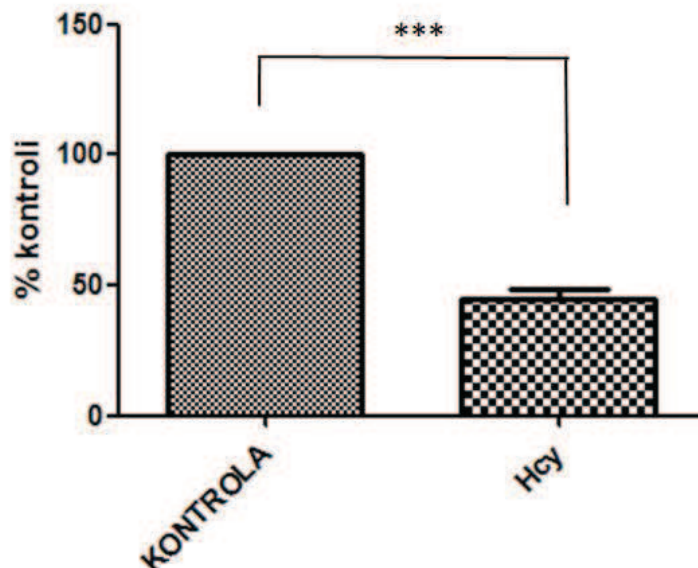




Rys.29– Wpływ Hcy na poziom LIP w komórkach śródbłónka naczyniowego.

Rysunek przedstawia zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego, komórek CPAE wybarwionych kalceiną-AM, po wcześniejszej godzinnej inkubacji z 3mM Hcy i DFO. Analiza danych wykonana została przy pomocy programu ImageJ. Przedstawione na zdjęciach wartości procentowe odpowiadają intensywności świecenia w stosunku do próby kontrolnej.

#### 4.1.12 Wywołane przez homocysteinę obniżenie poziomu RFT i RFN w komórkach śródbłonna naczyniowego



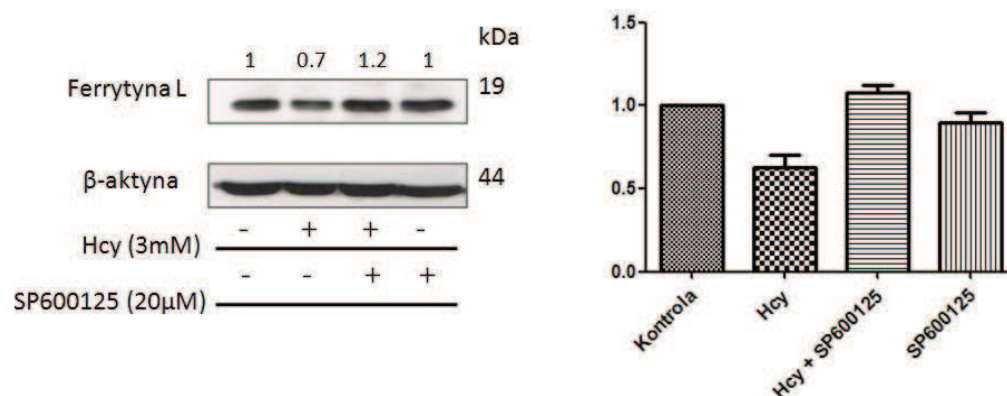
Rys.30- Wpływ Hcy na poziom RFT i RFN w komórkach śródbłonna naczyniowego.

Komórki linii CPAE kontrolne oraz traktowane Hcy przez 1h. Poziom RFT i RFN wykrywano metodą cystometrii przepływowej. Doświadczenie powtórzono w 3 niezależnych eksperymentach. \*\*\* $P < 0.001$ , różnice istotne statystycznie w porównaniu do kontroli. Do analizy używano testu t-Studenta.

W odróżnieniu od wyników otrzymanych dla Ang II, po godzinnej inkubacji komórek aorty płucnej wołu z 3mM Hcy, doszło do znacznego obniżenia poziomu RFT i RFN, w stosunku do komórek kontrolnych.

#### 4.1.13 Indukowana homocysteiną degradacja ferrytyny L jest hamowana przez SP600125, inhibitor N- terminalnych kinaz c- Jun

Aby sprawdzić czy indukowana Hcy degradacja ferrytyny L w komórkach CPAE, jest zależna od N- terminalnych kinaz c- Jun, komórki CPAE poddawałam działaniu inhibitora SP600125 o stężeniu 20 $\mu$ M.

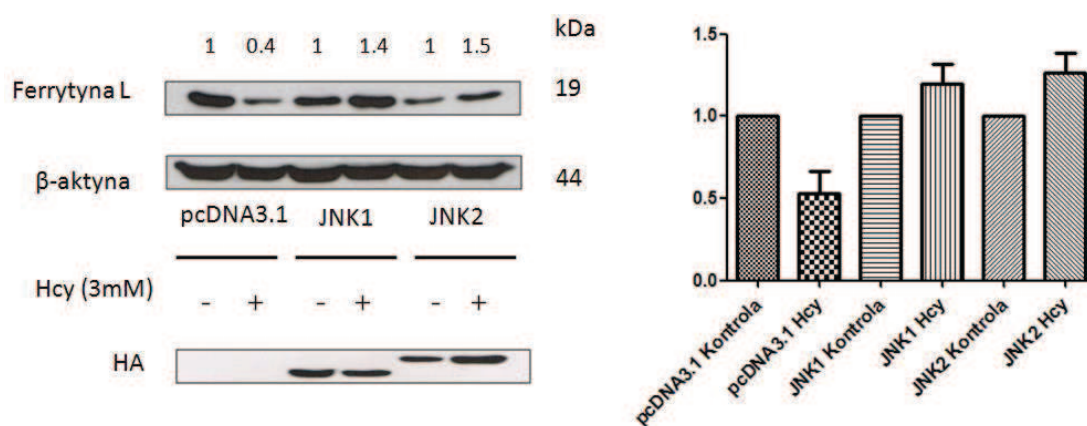


Rys.31- Kinazy N-końcowego odcinka c-Jun uczestniczą w regulacji poziomu ferrytyny L w komórkach śródbłonna naczyniowego poddanego działaniu Hcy.

Poziom ferrytyny L w komórkach CPAE traktowanych 3mM Hcy przez 1 godzinę. Rysunek przedstawia reprezentatywny wynik poziomu białka ferrytyny L i aktywny uwidoczniony za pomocą metody Western blotting. Zmiany w poziomie ferrytyny L znormalizowano densytometrycznie względem aktywny (wartości umieszczono nad prążkami). Wykresy słupkowe w prawym panelu ryciny przedstawiają wyniki trzech niezależnych doświadczeń.

#### 4.1.14 Kinazy JNK1 oraz JNK2 uczestniczą w procesie regulacji poziomu ferrytyny L w komórkach CPAE traktowanych homocysteiną

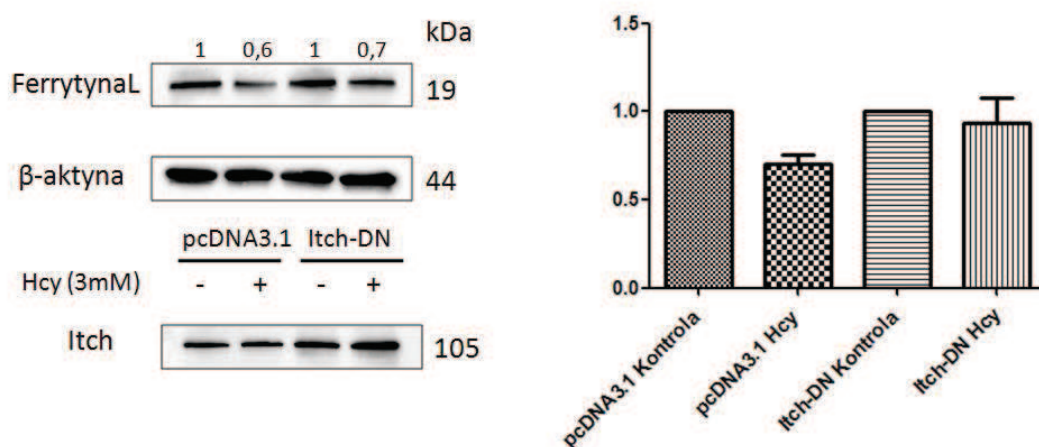
Chcąc sprawdzić, która z kinaz JNK uczestniczy w procesie regulacji poziomu ferrytyny w komórkach poddawanych działaniu Hcy, wykonałam przejściową transfekcję plazmidami niosącymi allele kodujące nieaktywne formy białek JNK1, JNK2 oraz kontrolnie wektorem plazmidowym pcDNA3.1. Następnie poddałam komórki działaniu 3mM przez 1h, po czym za pomocą metody Western blotting, przy użyciu odpowiednich przeciwciał oznaczyłam poziom ferrytyny L.



Rys.32 - Kinazy JNK1 i JNK2 uczestniczą w procesie regulacji poziomu ferrytyny L w komórkach śródbłonna naczyniowego poddanego działaniu Hcy.

Poziom ferrytyny L w komórkach CPAE traktowanych 3mM Hcy przez 1 godzinę. Rysunek przedstawia reprezentatywny wynik poziomu białka ferrytyny L i aktywny uwidoczniony za pomocą metody Western blotting. Zmiany w poziomie ferrytyny L znormalizowano densytometrycznie względem aktywny (wartości umieszczono nad prążkami). Wykresy słupkowe w prawym panelu ryciny przedstawiają wyniki trzech niezależnych doświadczeń.

W celu sprawdzenia, czy ligaza 3E Itch uczestniczy w regulacji degradacji ferrytyny L w komórkach CPAE traktowanych Hcy, komórki ponownie transfekowałam przejściowo wektorem plazmidowym pcDNA3.1 oraz plazmidami niosącym allele kodujące nieaktywne formy białka 3E Itch (Itch-DN).

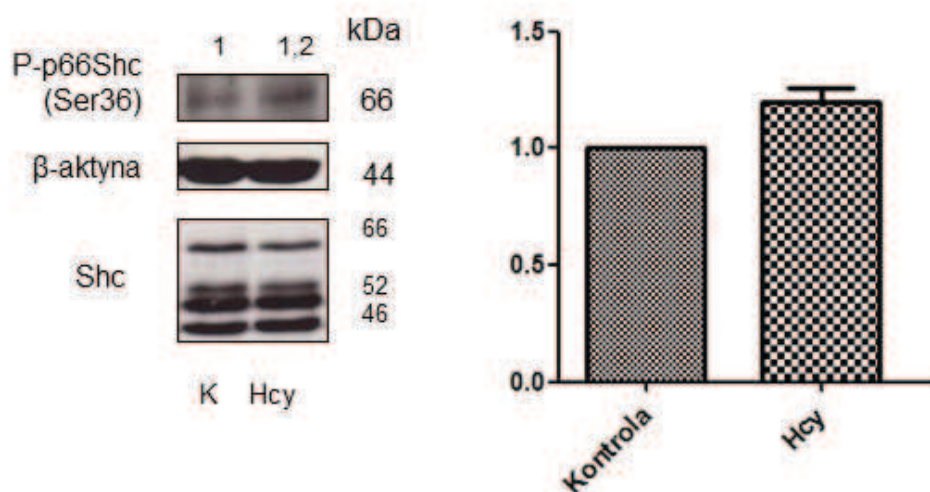


Rys. 33- Ligaza 3E Itch reguluje degradację ferrytyny L indukowaną przez homocysteinę w komórkach CPAE.

Poziom ferrytyny L w komórkach CPAE traktowanych 3mM Hcy przez 1 godzinę. Rysunek przedstawia reprezentatywny wynik poziomu białka ferrytyny L i aktywny uwidoczniiony za pomocą metody Western blotting. Zmiany w poziomie ferrytyny L znormalizowano densytometrycznie względem aktywny (wartości umieszczono nad prążkami). Wykresy słupkowe w prawym panelu ryciny przedstawiają wyniki trzech niezależnych doświadczeń.

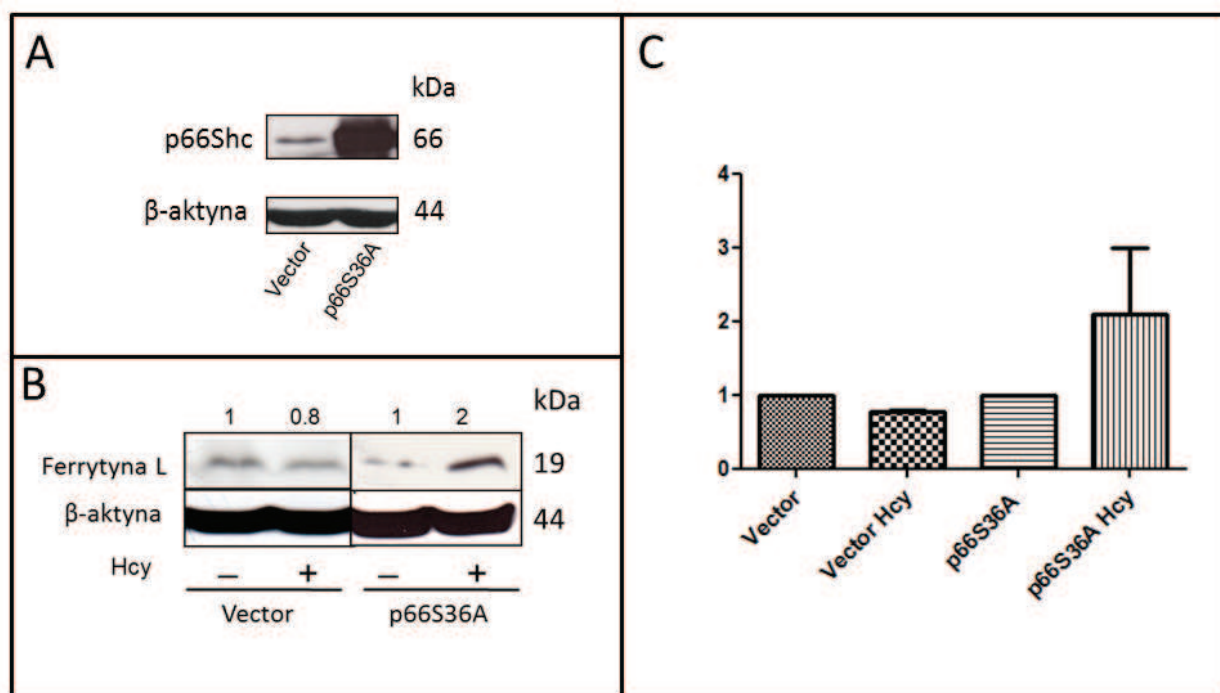
#### 4.1.15 Indukowana przez homocysteinę degradacja ferrytyny L regulowana jest przez białko p66Shc

W celu sprawdzenia czy białko p66Shc uwikłane jest w mechanizm regulacji ferrytyny L w komórkach CPAE traktowanych 3mM Hcy, komórki transfekowałam przejściowo plazmidami niosącym allele kodujące nieaktywne formy białka p66Shc (S36A), w którym odpowiedzialna za aktywację tego białka, seryna w pozycji 36, zamieniona została na alaninę.



Rys. 34- Wpływ Hcy na poziom aktywnej formy białka p66Shc w linii komórkowej CPAE.

Rysunek przedstawia reprezentatywny wynik poziomu białka P-p66Shc i aktywny uwidoczniiony za pomocą metody Western blotting. Zmiany w poziomie P-p66Shc znormalizowano densytometrycznie względem aktywny (wartości umieszczono nad prążkami).



Rys. 35- Wpływ homocysteiny na poziom ferrytyny L w komórkach CPAE transfekowanych przejściowo pustym wektorem pcDNA3.1 oraz plazmidami niosącym allele kodujące nieaktywne formy białka p66Shc (S36A).

Rysunek A przedstawia reprezentatywny wynik poziomu białka p66Shc i aktyny po przejściowej transfekcji plazmidem p66Shc, natomiast rysunek B przedstawia reprezentatywny wynik poziomu ferrytyny L i aktyny uwidoczniony za pomocą metody Western blotting. Zmiany w poziomie ferrytyny L znormalizowano densytometrycznie względem aktyny (wartości umieszczono nad prążkami). Wykresy słupkowe w prawym panelu ryciny przedstawiają wyniki trzech niezależnych doświadczeń.

## 5. Dyskusja

W niniejszej pracy wykazałam, że żelazo magazynowane w postaci ferrytyny nie jest w pełni bezpieczną formą przechowywania tego pierwiastka w komórkach. Działanie zarówno Ang II jak i Hcy prowadzi do degradacji ferrytyny i uwolnienia silnie reaktywnych jonów żelaza. Ilość żelaza zmagazynowanego w ferrytynie u zdrowego człowieka wynosi około 1g, z kolei w postaci LIP zaledwie kilka miligramów. Dotychczas dostarczono wiele danych wskazujących, że żelazo zmagazynowane w formie ferrytyny jest podstawowym źródłem wolnego żelaza. Poznanie szlaków sygnałowych regulujących proces degradacji ferrytyny, a tym samym regulacji poziomu LIP może mieć istotne znaczenie dla poznania patomechanizmu chorób sercowo-naczyniowych oraz wielu innych. Odkąd w 2004 roku w jednej ze swoich publikacji Sullivan rozważał, czy żelazo zmagazynowane jest w bezpiecznej formie, dostarczono niewiele nowych dowodów potwierdzających lub zaprzeczających tezie, że ferrytyna jest w pełni bezpieczną formą jego przechowywania [104]. Mimo, że podstawowy metabolizm żelaza został już szeroko opisany, to wciąż istnieje wiele luk w wiedzy dotyczącej tego zagadnienia. Wewnątrzkomórkowa homeostaza tego pierwiastka polega przede wszystkim na dostarczeniu odpowiedniej ilości żelaza w celu zachowania ciągłości procesów biologicznych, niezbędnych dla życia komórki. Z drugiej strony biodostępność żelaza musi być ściśle kontrolowana, w celu ograniczenia jego toksyczności wynikającej w głównej mierze z jego katalitycznego udziału w reakcji Fentona. W znacznej większości komórek ssaczych homeostaza żelaza regulowana jest poprzez kilka procesów takich jak: transport żelaza do komórki i do poszczególnych organelli, jego wewnątrzkomórkowe magazynowanie, pobieranie do syntezy żelazoprotein oraz usuwanie do środowiska pozakomórkowego. Procesy te w stanach patologicznych często ulegają zaburzeniu, dlatego naukowcy na całym świecie od lat badają wpływ tego pierwiastka na patogenezę różnych schorzeń. Wysoki poziom ferrytyny, odzwierciedla całkowitą ilość żelaza w organizmie i koreluje z obniżeniem rozkurczowej funkcji naczyń [105]. Wraz z wiekiem ilość ferrytyny w osoczu zwiększa się, a ryzyko zachorowania na choroby układu sercowo-naczyniowego gwałtownie wzrasta [106, 107]. Zjawisko to dotyczy szczególnie kobiet po menopauzie. Jako jeden z czynników wyjaśniających tę sytuację wymienia się regularny ubytek żelaza wraz z krwią menstruacyjną, którego zaprzestanie wiąże się ze zwiększoną akumulacją żelaza [85]. Analizowano wpływ poszczególnych parametrów związanych z metabolizmem żelaza, takich jak

stężenie wolnego żelaza w osoczu, czy stopień wysycenia transferyny. Okazało się jednak, że to poziom ferrytyny w szczególnym stopniu odpowiedzialny jest za ryzyko występowania udaru niedokrwinnego u kobiet po menopauzie [108]. Opisano szereg działań prewencyjnych przeciwdziałających nadmiernemu nagromadzeniu żelaza w organizmie. Zmiana diety poprzez zmniejszenie ilości spożywanego czerwonego mięsa i alkoholu, unikanie suplementacji żelaza, czy upusty krwi, mogą obniżyć ryzyko wystąpienia wielu chorób [109]. Jak w 2012 roku wykazali Kim i Bae, u kobiet po menopauzie, które stosowały dietę wegetariańską, zaobserwowano niższy poziom ferrytyny niż u kobiet spożywających mięso. Co więcej, u wegetarianek ryzyko wystąpienia zespołu metabolicznego było znacznie niższe [110]. Zastąpienie czerwonego mięsa, bogatego w żelazo, produktami pochodzenia roślinnego, zawierającymi szereg związków posiadających właściwości chelatujące jony metali, takimi jak polifenole, może również wpłynąć ochronnie na układ krążenia [111]. Szczególnie zalecana jest dieta bogata we flawonoidy, czyli polifenole pochodzenia roślinnego wykazujące nie tylko właściwości antyoksydacyjne i chelatujące żelazo, ale także zmniejszające adhezję leukocytów czy agregację płytki miażdżycowej [112]. Z całej grupy polifenoli, wśród najbardziej efektywnych w prewencji i terapii antymiażdżycowej opisuje się fizetynę, która w największej ilości występuje w truskawkach oraz mirycetynę, występującą w orzechach włoskich oraz czerwonym winie [113]. W 1981 roku Sullivan opisał również swoją hipotezę, w myśl której żelazo odgrywa istotną rolę w rozwoju choroby wieńcowej [79]. Od tego czasu badania wielu naukowców skupione są na odkrywaniu molekularnych mechanizmów tego schorzenia. W związku z tym w swojej pracy skupiłam się na poznaniu szlaków sygnalizacyjnych prowadzących do degradacji ferrytyny oraz zmian poziomu labilnej puli żelaza w komórkach śródbłonna naczyniowego traktowanego Ang II lub Hcy, czyli substancji uznanych za niezależne czynniki rozwoju CVDs. W tym celu, w pierwszym etapie badań sprawdziłam czy pod wpływem działania Ang II oraz Hcy dochodzi do zmian w poziomie białka magazynującego żelazo –ferrytyny. Zarówno w przypadku Ang II jak i Hcy doszło do zauważalnego spadku w poziomie tego białka już po pierwszej godzinie inkubacji (Rys. 17, Rys. 27). Wartym zauważenia jest, że odwrotną tendencję zaobserwowałam w poziomie mRNA dla ferrytyny L, po jednogodzinnym traktowaniu komórek CPAE Ang II oraz Hcy (Rys.18, Rys. 28). Zwiększenie ekspresji mRNA dla ferrytyny L może być spowodowane uwolnieniem dużej ilości żelaza z ferrytyny, czego skutkiem jest uruchomienie mechanizmu mającego na celu ochronę komórek przed nadmiernym poziomem LIP w komórce i związanymi



z tym procesami wolnorodnikowego uszkodzenia. Rozbieżność otrzymanych wyników dla białka i mRNA ferrytyny L może tłumaczyć w następujący sposób. Degradacja ferrytyny w komórkach traktowanych Ang II lub Hcy prowadzi do wzrostu poziomu LIP. Wzrost wolnego żelaza uruchamia szereg procesów adaptacyjnych na poziomie transkrypcji i translacji, które ostatecznie mają doprowadzić do utrzymania odpowiedniego poziomu ferrytyny. Jak wspominałam już wcześniej, synteza ferrytyny kontrolowana jest przez potranskrypcyjny mechanizm regulatorowy IRP/IRE, w którym białka IRP1 i IRP2, przyłączając się do sekwencji IRE, hamują syntezę ferrytyny. Z kolei w obecności żelaza IRP2 ulega utlenieniu i przestaje się wiązać do IRE co w konsekwencji prowadzi do wzrostu mRNA dla ferrytyny i wzrostu jej biosyntezy [114]. Większość komórkowej puli żelaza przechowywana jest w ferrytynie i żelazo zmagazynowane w tej formie nie może pełnić funkcji katalitycznej w reakcji Fentona, a tym samym wpływać na wzmożoną generację RFT i RFN. Za te właściwości odpowiedzialna jest labilna pula żelaza. RFT i RFN pełnią w komórce funkcje sygnalizacyjne, niezbędne do życia, jednak w obecności żelaza rodzaj generowanych rodników jak i ich ilość ulegają znacznym zmianom, co może prowadzić do ich zaburzeń. Cytoplazmatyczna pula labilnego żelaza jest niezwykle istotna dla wielu szlaków metabolicznych i jest swoistym stanem pośrednim formy występowania tego pierwiastka. Z jednej strony, pula ta jest uzupełniana przez żelazo transportowane do komórki oraz przez żelazo pochodzące ze zdegradowanych białek wiążących ten metal, w tym w głównej mierze ferrytyny. Z drugiej strony, jest źródłem żelaza dla syntezy hemu i centrów [Fe-S]. Epsztejn i wsp. wykazali, że nadekspresja ferrytyny H prowadzi do spadku poziomu LIP oraz zmniejszenia zależnej od żelaza produkcji RFT i RFN [115]. Z kolei, jak wykazał Konijn i wsp., obniżenie ilości LIP, poprzez zastosowanie chelatorów metali, prowadzi do obniżenia poziomu ferrytyny H i L [116]. W badaniach przeprowadzonych na szczurach wykazano również, że wraz z wiekiem dochodzi do zwiększenia ilości ferrytyny, co korelowało ze wzmożoną produkcją RFT i RFN, a co za tym idzie zwiększonym poziomem utlenionych lipidów [117]. Sullivan wykazał natomiast, że wysoki poziom ferrytyny korelował z podwyższonym stężeniem markera uszkodzeń DNA, 8-hydroksydeoksyguanozyny [104].

Aby sprawdzić, czy w badanym przeze mnie modelu degradacja ferrytyny prowadzi do wzrostu RFT i RFN, wykonałam pomiar ich poziomu w komórkach traktowanych zarówno Ang II jak i Hcy. Jak przedstawiłam na Rys. 19 po godzinnej inkubacji komórek śródbłonna z AngII doszło do istotnego wzrostu RFT i RFN. Odwrotny wynik otrzymałam natomiast dla komórek

inkubowanych z Hcy (Rys. 29). Uzyskany wynik w przypadku Ang II sugeruje, że podwyższony poziom oksydantów może być spowodowany uwolnieniem z ferrytyny reaktywnego żelaza, natomiast obniżenie poziomu RFT i RFN po traktowaniu homocysteiną może wynikać z jej antyoksydacyjnych właściwości. Aminokwas ten posiada w swej strukturze wolną grupę tiolową, która w obecności utleniaczy może tworzyć mostki disulfidowe z innymi związkami posiadającymi wolne grupy –SH. Aby potwierdzić, że po degradacji ferrytyny dochodzi do wzrostu LIP, kolejnym przeprowadzonym przeze mnie badaniem była ocena poziomu „wolnego żelaza” w komórkach traktowanych Ang II, Hcy oraz deferoksaminą – silnym chelatorem żelaza. Jak przedstawia Rys. 20 i Rys. 30, pod wpływem działania Ang II oraz Hcy dochodzi do wygaszenia fluorescencji kalceiny przez LIP, natomiast dodanie DFO odwraca ten proces. Wyniki tego badania potwierdzają pośrednio, że wzrost RFT i RFN w przypadku działania Ang II na komórki śródbłonna jest żelazo zależny. Poziom LIP w dużej mierze regulowany jest przez ferrytynę, proces magazynowania oraz uwalniania żelaza poprzez degradację białka musi być ściśle kontrolowany, aby stężenie żelaza w „wolnej” postaci było utrzymane na granicznym poziomie, nie limitującym jednak jego biodostępności. Do chwili obecnej proces ten nie został jeszcze dokładnie poznany, natomiast wielu badaczy wskazuje w swych pracach, że stres oksydacyjny może być potencjalnym czynnikiem prowadzący do degradacji ferrytyny .

W świetle aktualnych doniesień naukowych, kinazy N-końcowego odcinka c-Jun mogą wpływać na stabilność białek takich jak c-jun, p53 czy c-myc poprzez regulację ich ubikwitynacji oraz proteasomalną degradację [118]. Wyniki te zasugerowały, że regulacji ulegać mogą również inne białka, w tym także ferrytyna. Jak wykazano na komórkowej linii nowotworowej prostaty, założenia te okazały się słuszne. Degradacja ferrytyny w komórkach raka prostaty poddanych działaniu trisulfidu diallilu (DATS) zależy od aktywacji kinazy JNK1 i odbywa się poprzez aktywację ligazy 3EItch [76]. Szlaki sygnalizacyjne w których uczestniczą kinazy JNK związane są z procesem zapalnym oraz biorą udział w odpowiedzi metabolicznej na zjawiska towarzyszące otyłości, takich jak insulinooporność. Z procesami tymi związane są ściśle makrofagi. W celu sprawdzenia roli kinaz JNK, myszom kontrolnym oraz myszom z niedoborem kinaz JNK w makrofagach, podawano pokarm bogaty w tłuszcz. Zaobserwowano, że spożycie wysokoenergetycznej karmy, prowadziło do podobnego stopnia otyłości w obu grupach, ale tylko u myszy z deficytem kinaz JNK zachowana została wrażliwość na insulinę. Zjawisko to było spowodowane zmniejszonym naciekiem tkanek przez makrofagi. Badanie immunofenotypu

komórek, wykazało, że kinazy JNK uczestniczą w prozapalnej polaryzacji makrofagów [119]. Co więcej, badania prowadzone na kardiomiocytach wykazały, że dochodzi do aktywacji kinaz JNK 1/2 w wyniku działania Ang II [120]. W związku z powyższym postanowiłam sprawdzić, czy podobny mechanizm towarzyszy degradacji ferrytyny w komórkach śródbłonka naczyniowego traktowanego Ang II oraz Hcy. W celu sprawdzenia, czy degradacja ferrytyny w badanym przeze mnie modelu doświadczalnym zależna jest od kinaz N-końcowego odcinka c-Jun, komórki CPAE poddałam działaniu inhibitora tych kinaz. Jak przedstawiłam na Rys. 21 i Rys. 31 zastosowanie inhibitora SP600125 hamuje degradację ferrytyny wywołaną zarówno Ang II jak i Hcy. Wynik ten potwierdził zaangażowanie kinaz N-końcowego odcinka c-Jun w proces degradacji ferrytyny w komórkach śródbłonka poddanych działaniu Ang II oraz Hcy. Do spadku w poziomie ferrytyny doszło także po traktowaniu komórek samym inhibitorem SP600125. Wynik ten jest trudny do interpretacji, najprawdopodobniej jednak, obniżenie poziomu ferrytyny L związane jest z niespecyficznym oddziaływaniem inhibitora, niezwiązanym z hamowaniem kinaz N-końcowego odcinka c-Jun. Aby sprawdzić, która z izoform kinaz JNK odpowiedzialna jest za przekazywanie sygnału prowadzącego do degradacji ferrytyny, komórki transfekowałam plazmidami niosącymi allele kodujące nieaktywne formy białek JNK1, JNK2, oraz kontrolnie wektorem plazmidowym pcDNA3.1. Jak przedstawiłam na Rys. 22 i Rys. 32 zarówno dezaktywacja JNK1, jak i JNK 2 hamuje degradację ferrytyny. Otrzymane wyniki sugerują, że obie izoformy kinazy JNK zaangażowane są w proces degradacji ferrytyny zarówno po traktowaniu Ang II jak i Hcy. Białkami, które mogą być fosforylowane przez kinazy JNK oprócz czynników transkrypcyjnych c-Jun i JunB jest także ligaza ubikwitynowa Itch. Chang i wsp. w 2006 roku wykazali, że aktywna kinaza JNK1 stymuluje proteasomalną degradację białka c-FLIP poprzez fosforylację, a tym samym aktywację ligazy 3E Itch [103]. W związku z powyższym, w kolejnym etapie badań postanowiłam sprawdzić, czy transfekcja plazmidem niosącym allele kodujące nieaktywną formę białka ligazy ubikwitynowej Itch zahamuje degradację ferrytyny wywołaną działaniem Ang II i Hcy. Zaobserwowałam protekcyjny wpływ transfekcji komórek Itch-DN przed degradacją ferrytyny L (Rys. 23, Rys. 33), co potwierdziło zaangażowanie ligazy ubikwitynowej Itch w proces degradacji ferrytyny L wywołanej działaniem Ang II i Hcy.

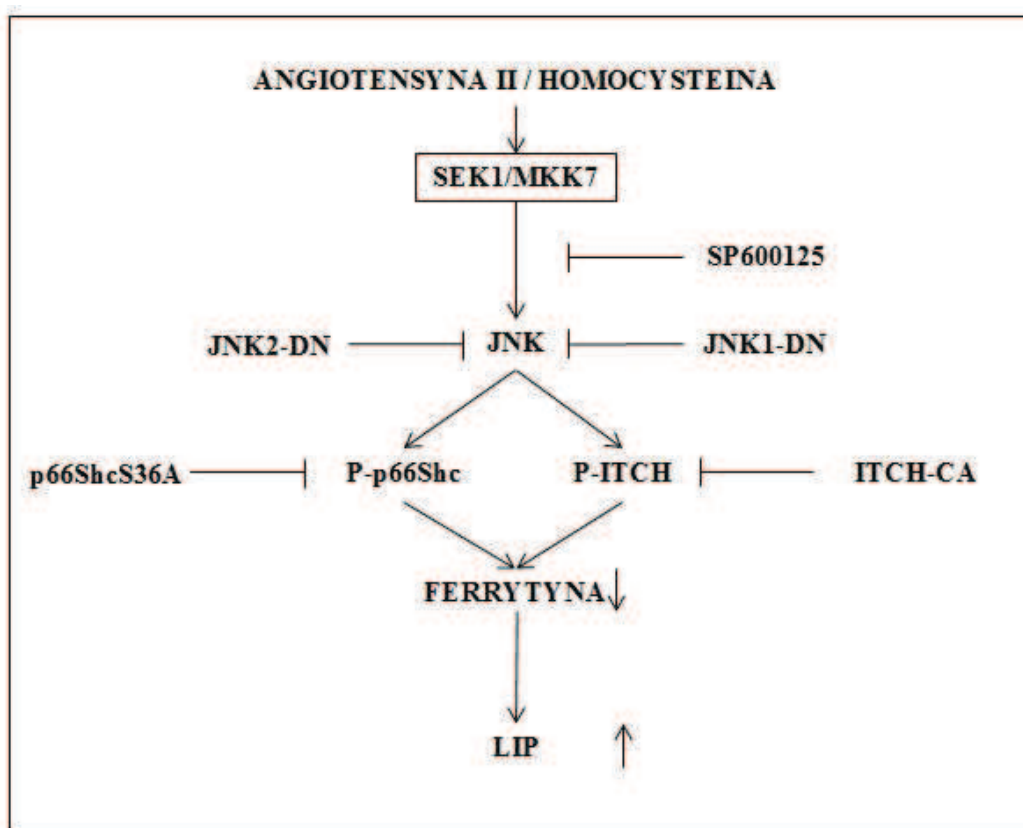
Innym białkiem, które również może być fosforylowane przez kinazy JNK jest białko p66Shc [97]. Jak wykazano wcześniej, fosforylacja seryny 36 białka p66Shc prowadzi do zwiększonego powstawania RFT [121]. Myszy pozbawione białka p66Shc mają zwiększoną

odporność na RFT, a ich długość życia jest o 30% dłuższa, w stosunku do myszy dzikiego typu [122]. Białko p66Shc zlokalizowano w mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej, gdzie utlenia cytochrom C i przenosi elektrony na tlen, powodując w ten sposób wzrost poziomu nadtlenu wodoru [121]. Ponadto wykazano, że komórki p66Shc  $-/-$ , posiadają wyższą zdolność do neutralizacji nadtlenu wodoru niż komórki z aktywnym białkiem p66Shc [123]. Jak wykazali w swoich badaniach w 2007 roku Camici i wsp., inaktywacja genu p66Shc chroni przed wywołanym hiperglikemią uszkodzeniem naczyń krwionośnych. U myszy p66 (Shc $-/-$ ) poziom RFT był znacznie niższy, co wpływało na lepszą wazodylatację naczyń w porównaniu z myszami dzikiego typu (WT) [124]. Podwyższone było również stężenie niektórych enzymów takich jak eNOS czy oksydazy hemowej-1. W naczyniach myszy WT obserwowano wzmożoną generację nadtlenoazotynu, podwyższony poziom nitrotyrozyny oraz nasilenie procesu peroksydacji lipidów w stosunku do myszy p66 (Shc $-/-$ ). Francia i wsp. w 2004 roku opublikowali wyniki badań dotyczące uszkodzeń naczyń krwionośnych w procesie starzenia się organizmu. Wykazali także udział białka p66Shc w tym procesie, podkreślając, że białko to może stać się nowym celem terapeutycznym w walce z chorobami naczyń krwionośnych [125]. W świetle przedstawionych badań białko p66Shc jest istotnym czynnikiem mogącym uczestniczyć w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. Mechanizm działania białka p66Shc w patogenezie CVDs nie był jednak dotychczas rozpatrywany pod względem ujęcia udziału żelaza w tym procesie.

Kolejnym celem mojej pracy było określenie, czy traktowanie Ang II i Hcy prowadzi do aktywacji białka p66Shc i czy białko to odgrywa rolę w wywoływanej przez Ang II i Hcy degradacji ferrytyny. Jak przedstawiłam na Rys. 24 i Rys. 34 poziom białka P-p66Shc jest wyższy w porównaniu z próbą kontrolną, co świadczy o aktywacji białka p66Shc. Wartym podkreślenia jest fakt, że aktywacja białka p66Shc była większa po traktowaniu Ang II. W kolejnym etapie wykazałam, że transfekcja plazmidem niosącym allele kodujące nieaktywną formę białka p66Shc (p66S36A) zahamowała degradację ferrytyny indukowaną Ang II i Hcy (Rys. 25 i Rys. 35), co wskazuje na bezpośrednie zaangażowanie białka p66Shc w proces degradacji ferrytyny w badanym przeze mnie modelu. Rola białka p66Shc zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych wydaje się bardzo złożona. Biorąc pod uwagę fakt, że białko p66Shc może prowadzić do uwolnienia z ferrytyny żelaza, nadmiernej generacji RFT, a także

wpływać pośrednio na aktywność oksydazy NADPH, jego działanie może być ściśle powiązane z uszkodzeniem komórek śródbłonna w przebiegu chorób sercowo-naczyniowych [126].

Wiele obserwacji klinicznych, badań epidemiologicznych oraz doświadczalnych wskazuje na potencjalny udział żelaza w procesie miażdżycowym. Wraz z wiekiem u ludzi dochodzi do zwiększenia ilości gromadzonego żelaza. Jest to spowodowane brakiem aktywności fizycznej oraz nieprawidłową dietą, ubogą w związki chelatujące [127, 128]. Przykładowo, badania przeprowadzone na starszych ludziach poddanych treningowi Nordic Walking wykazały, że 32 tygodniowy trening spowodował spadek zasobów żelaza w organizmie [Kortas i wsp. 2015]. Salonen natomiast, wykazał w swoich badaniach, że ryzyko zawału serca u mężczyzn z jednoczesnym wysokim poziomem LDL oraz wysokim stężeniem ferrytyny było znacznie wyższe w porównaniu z osobnikami wykazującymi podwyższenia tylko jednego z badanych parametrów [129]. Wyniki te wydają się szczególnie interesujące w kontekście molekularnego patomechanizmu chorób sercowo naczyniowych. Pula żelaza gromadzonego w ferrytynie jest wielokrotnie większa niż LIP, dlatego wzmożona degradacja tego białka może powodować uwolnienie znacznej ilości reaktywnego żelaza przyczyniając się w ten sposób do żelazo zależnej generacji reaktywnych form tlenu i uszkodzenia struktur komórkowych. Zaproponowany przeze mnie szlak sygnalizacyjny JNK/p66Shc/Itch prowadzący do degradacji ferrytyny (Rys. 36) regulowany jest przez inne złożone szlaki sygnalizacyjne, dlatego proces ten może być zależny od wielu czynników.



Rys.36 Proponowany mechanizm degradacji ferrytyny przez Ang II i Hcy.

Dotychczas przeprowadzone badania dostarczyły wiele dowodów na to, że nadmierny poziom LIP przyczynia się do uszkodzenia śródbłonna naczyniowego [130, 131]. Wykazano również, że wraz z wiekiem poziom ferrytyny wzrasta, co koreluje ze wzmożoną generacją RFT i RFN [117]. Stres oksydacyjny prowadzi z kolei do utlenienia lipidów, będących jedną z głównych przyczyn CVDs. Nie wykazano jednak dotąd w jaki sposób dochodzi do degradacji ferrytyny i uwolnienia z niej jonów żelaza. Ze względu na fakt, że zarówno Ang II jak i Hcy uważane są za niezależne czynniki rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, wykazanie przede wszystkim, że pod wpływem ich działania na szlak JNK/p66Shc/Itch dochodzi do degradacji ferrytyny (Rys.36), wydaje się być szczególnie interesujące. Z kolei biorąc pod uwagę fakt, że aktywacja kinaz JNK jak i białka p66Shc jest bardzo złożonym procesem, kontrolowanym przez wiele szlaków sygnalizacyjnych, konieczne są dalsze badania nad pełnym wyjaśnieniem fizjologicznego znaczenia procesu degradacji ferrytyny. Otrzymane wyniki unaoczniają jak ważna może być jednoczesna kontrola stężeń Ang II, Hcy oraz wewnątrzkomórkowych zasobów żelaza u człowieka, w profilaktyce chorób sercowo naczyniowych.

## 6. Wnioski

1. Homocysteina oraz angiotensyna II indukują degradację ferrytyny oraz prowadzą do wzrostu LIP w komórkach śródbłonka naczyniowego
2. Degradacja ferrytyny w komórkach śródbłonka wywołana działaniem angiotensyny II i homocysteiny zależy od kinaz aktywowanych stresem (JNK1 i JNK2)
3. W komórkach śródbłonka naczyniowego traktowanych angiotensyną II i homocysteiną dochodzi do degradacji ferrytyny, w której pośredniczy ligaza 3E Itch
4. Istotnym elementem sygnalizacyjnym, uczestniczącym w procesie degradacji ferrytyny w komórkach śródbłonka wywołanej przez angiotensynę II i homocysteinę, jest fosforylacja seryny w pozycji 36 białka p66Shc, prowadząc w ten sposób do jego aktywacji.

## 7. Streszczenie w języku polskim

Przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej są badania metabolizmu żelaza prowadzone na komórkach śródbłonna naczyniowego poddanych działaniu angiotensyny II (Ang II) oraz homocysteiny (Hcy). Obie wykorzystane do badań substancje od ponad dekady uznawane są za niezależne czynniki rozwoju chorób sercowo-naczyniowych (CVDs). CVDs są główną przyczyną zachorowalności i zgonów, zarówno w Polsce jak i na całym świecie. Stanowią poważny problem zdrowotny, określany mianem epidemii XXI wieku. Zasadniczym celem mojej pracy było zbadanie zmian w metabolizmie żelaza indukowanych przez Ang II i Hcy oraz określenie roli szlaku sygnałowego JNK/p66Shc/ITCH w komórkach śródbłonna naczyniowego. W pierwszej kolejności wykazałam, że Ang II oraz Hcy powodują degradację ferrytyny L, a także wzrost mRNA dla tego białka w komórkach śródbłonna naczyniowego. W komórkach tych dochodziło także do wzrostu puli labilnego żelaza (LIP), co było najprawdopodobniej efektem uwolnienia jonów żelaza ze zdegradowanej ferrytyny. Dodatkowo, uzyskane przeze mnie wyniki wykazały wzrost generacji reaktywnych form tlenu i azotu po traktowaniu komórek Ang II. Proces ten może w dużej mierze być zależny od ilości uwolnionego z ferrytyny żelaza, które w postaci LIP jest silnie reaktywne. W procesie generacji reaktywnych form tlenu i azotu, odwrotny efekt uzyskałam po traktowaniu komórek Hcy, wynika to prawdopodobnie z obecności grupy sulfidowej w jej strukturze. Wykazałam także, że degradacja, w komórkach śródbłonna, wywołana działaniem Ang II i Hcy zależy od kinaz N-końcowego odcinka c-Jun. Zaobserwowałam, że komórki transfekowane JNK1-DN i JNK2-DN są odporne na indukowaną przez Ang II i Hcy degradację ferrytyny. Wyniki te wskazują na zaangażowanie obu badanych izoform JNK w ten proces. Dlatego też kolejnym celem pracy było wykazanie czy ligaza ubikwitynowa Itch, która może być aktywowana przez JNK1, bierze udział w degradacji ferrytyny L w badanym przeze mnie modelu. W komórkach transferowanych plazmidem kodującym nieaktywną formę tej ligazy dochodziło do znacznie mniejszej degradacji ferrytyny, co świadczy o jej udziale w procesie degradacji ferrytyny L. Kolejnym etapem mojej pracy było sprawdzenie czy w procesie degradacji ferrytyny L wywołanym Ang II i Hcy uczestniczy białko p66Shc. Ze względu na fakt, że fosforylacja białka p66Shc jest zależna od kinaz JNK, na początku wykonałam badanie, które potwierdziło, że zarówno Ang II jak i Hcy indukują fosforylację białka p66Shc w pozycji seryny 36, czyli w miejscu niezbędnym do aktywacji tego



białka. Następnie wykazałam, że transfekcja komórek śródbłonka nieaktywną formą białka p66Shc, hamuje degradację ferrytyny L indukowaną Ang II i Hcy.

Dotychczas dostarczono wiele danych wskazujących, że żelazo zmagazynowane w formie ferrytyny jest podstawowym źródłem puli wolnego żelaza. Poznanie szlaków sygnałowych regulujących proces degradacji ferrytyny, a tym samym regulacji poziomu LIP może mieć istotne znaczenie dla poznania patomechanizmu chorób sercowo-naczyniowych oraz wielu innych. W niniejszej pracy wykazałam, że żelazo magazynowane w postaci ferrytyny nie jest w pełni bezpieczną formą przechowywania tego pierwiastka w komórkach. Działanie zarówno Ang II jak i Hcy prowadzi do degradacji ferrytyny i uwolnienia silnie reaktywnych jonów żelaza na szlaku sygnalizacyjnym JNK/p66Shc/Itch.

## 8. Streszczenie w języku angielskim

The subject of this dissertation was the study of iron metabolism, conducted on vascular endothelial cells treated with Angiotensin II (Ang II) and Homocysteine (Hcy). These substances, for over a decade, have been considered independent factors in the development of cardiovascular diseases (CVDs). CVDs are the main cause of morbidity and mortality in Poland, and around the world. CVDs represent a major health problem, which is considered to be a 21<sup>st</sup> century epidemic. The essential goal of my work was to investigate changes in iron metabolism as induced by Ang II and Hcy in endothelial cells, and also to examine potential involvement of JNK/p66Shc/ITCH signaling pathway in the process. Initially, I demonstrated that Ang II and Hcy caused degradation of L-ferritin with a simultaneous increase in L-ferritin mRNA level as observed in the endothelial cells. An increase of labile iron pool (LIP) was most likely the result of iron ions having been released from the degraded L-ferritin. Additionally, the results demonstrated that after cells were treated with Ang II, an increase in generation of reactive oxygen and nitrogen species occurred. This process can be largely dependent on the amount of released iron ions, which are highly reactive as LIP. The opposite effect in generation of reactive oxygen and nitrogen species was observed when cells were treated with Hcy. This is most likely due to the presence of a sulfide group in the (Hcy) structure. I also demonstrated that L-ferritin degradation in the endothelial cells caused by Ang II and Hcy activity depends on N-terminal c-Jun kinases. I observed that transfected cells, JNK1-DN and JNK2-DN, were resistant to Ang II and Hcy induced L-ferritin degradation. The results indicate the participation of both isoforms of JNK in the above process. Consequently, the next objective was to determine whether the ubiquitin ligase Itch, which can be activated by JNK1, takes part in L-ferritin degradation in the experimental model. In the cells transfected with plasmid encoding the inactive form of ligase, the degradation of L-ferritin was significantly decreased. This demonstrates the participation of the inactive form of ligase in L-ferritin degradation. The next step of my work was to verify whether p66Shc protein was involved in the degradation of L-ferritin, as induced by Ang II and Hcy. Due to the fact that phosphorylation of the p66Shc is JNK kinase-dependent, I initially conducted a test which confirmed that both Ang II and Hcy induced p66Shc phosphorylation at serine 36 which is necessary for the protein activation. Lastly, I proved that transfection of the endothelial cells with the inactive form of p66Shc protein, inhibits Ang II and Hcy induced L-ferritin degradation. To date, much data has been published evidencing that iron pool stored in the form of L-ferritin, is a basic source of free iron ions. A better understanding of signaling pathways which regulate the process of L-ferritin degradation and LIP levels can contribute significantly to clarification of the pathomechanism for CVDs and other pathologies. In this work, I demonstrated that Ang II and Hcy triggered L-ferritin degradation via the JNK/p66Shc/Itch signaling pathway leading to the release of highly reactive iron ions.

## 9. Piśmiennictwo

- [1] Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J.* 2012;33:1635-701.
- [2] Khan R, Spagnoli V, Tardif JC, L'Allier PL. Novel anti-inflammatory therapies for the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2015;240:497-509.
- [3] Janoudi A, Shamoun FE, Kalavakunta JK, Abela GS. Cholesterol crystal induced arterial inflammation and destabilization of atherosclerotic plaque. *Eur Heart J.* 2015.
- [4] Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation.* 1998;97:1837-47.
- [5] McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nat Med.* 1996;2:386-9.
- [6] Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med.* 1991;324:1149-55.
- [7] Schalinske KL, Smazal AL. Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker. *Adv Nutr.* 2012;3:755-62.
- [8] Jakubowski H. The molecular basis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45:1704-16.
- [9] Jakubowski H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:470-87.
- [10] Aleksander J, Bogdan M, Mariusz K, Katarzyna S, Halina B-M, Beata K-K, et al. Homocysteina a cukrzyca. *Wiadomości Lekarskie.* 2005;58:319-23.
- [11] Robinson K. Homocysteine, B vitamins, and risk of cardiovascular disease. *Heart.* 2000;83:127-30.

- [12] Tsai MY, Welge BG, Hanson NQ, Bignell MK, Vessey J, Schwichtenberg K, et al. Genetic causes of mild hyperhomocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery diseases. *Atherosclerosis*. 1999;143:163-70.
- [13] Geisel J, Hubner U, Bodis M, Schorr H, Knapp JP, Obeid R, et al. The role of genetic factors in the development of hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:1427-34.
- [14] Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem*. 2004;50:3-32.
- [15] Jakubowski H, Głowacki R. Chemical biology of homocysteine thiolactone and related metabolites. *Adv Clin Chem*. 2011;55:81-103.
- [16] Wojciech T, Edward B. Mechanizm molekularny biotoksyczności homocysteiny- fakty i hipotezy. *Postępy biochemii*. 2005;51:395-406.
- [17] Jakubowski H. Translational incorporation of S-nitrosohomocysteine into protein. *J Biol Chem*. 2000;275:21813-6.
- [18] Nonaka H, Tsujino T, Watari Y, Emoto N, Yokoyama M. Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation*. 2001;104:1165-70.
- [19] Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, Bode-Boger SM, Tsikas D, Hornig B, et al. ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovasc Res*. 2003;57:244-52.
- [20] Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*. 2001;104:2569-75.
- [21] Zhang H, Schmeisser A, Garlich CD, Plotze K, Damme U, Mugge A, et al. Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc Res*. 1999;44:215-22.
- [22] Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994;74:1141-8.

- 
- [23] Xu H, Duan J, Wang W, Dai S, Wu Y, Sun R, et al. Reactive oxygen species mediate oxidized low-density lipoprotein-induced endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase in vascular endothelial cells. *J Hypertens*. 2008;26:956-63.
- [24] Ljuca F, Drevensek G. Endothelin-1 induced vascular smooth muscle cell proliferation is mediated by cytochrome p-450 arachidonic acid metabolites. *Bosn J Basic Med Sci*. 2010;10:223-6.
- [25] Bhatt SR, Lokhandwala MF, Banday AA. Vascular oxidative stress upregulates angiotensin II type I receptors via mechanisms involving nuclear factor kappa B. *Clin Exp Hypertens*. 2014;36:367-73.
- [26] Steffel J, Luscher TF, Tanner FC. Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation*. 2006;113:722-31.
- [27] Tatsumi K, Mackman N. Tissue Factor and Atherothrombosis. *J Atheroscler Thromb*. 2015;22:543-9.
- [28] Hahn AW, Jonas U, Buhler FR, Resink TJ. Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. *FEBS Lett*. 1994;347:178-80.
- [29] Celi A, Cianchetti S, Dell'Omo G, Pedrinelli R. Angiotensin II, tissue factor and the thrombotic paradox of hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2010;8:1723-9.
- [30] Mehta JL, Li DY, Yang H, Raizada MK. Angiotensin II and IV stimulate expression and release of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured human coronary artery endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;39:789-94.
- [31] Yamamoto K, Takeshita K, Saito H. Plasminogen activator inhibitor-1 in aging. *Semin Thromb Hemost*. 2014;40:652-9.
- [32] Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76:301-14.
- [33] Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:645-51.

- [34] Kranzhofer R, Browatzki M, Schmidt J, Kubler W. Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257:826-8.
- [35] Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet.* 1997;349:462-6.
- [36] Viridis A, Dell'Agnello U, Taddei S. Impact of inflammation on vascular disease in hypertension. *Maturitas.* 2014;78:179-83.
- [37] Wang CH, Li SH, Weisel RD, Fedak PW, Dumont AS, Szmítko P, et al. C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation.* 2003;107:1783-90.
- [38] Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation.* 2003;107:398-404.
- [39] Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation.* 2002;106:1439-41.
- [40] Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation.* 2000;102:2165-8.
- [41] Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, et al. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation.* 2000;101:1372-8.
- [42] Arenas IA, Xu Y, Lopez-Jaramillo P, Davidge ST. Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286:C779-84.
- [43] Funck RC, Wilke A, Rupp H, Brilla CG. Regulation and role of myocardial collagen matrix remodeling in hypertensive heart disease. *Adv Exp Med Biol.* 1997;432:35-44.
- [44] Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997;82:291-5.

- [45] Delporte C, Van Antwerpen P, Vanhamme L, Roumeguere T, Zouaoui Boudjeltia K. Low-density lipoprotein modified by myeloperoxidase in inflammatory pathways and clinical studies. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:971579.
- [46] Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 1994;65:27-33.
- [47] Churg A. Interactions of exogenous or evoked agents and particles: the role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2003;34:1230-5.
- [48] Kirshner JR, He S, Balasubramanyam V, Kepros J, Yang CY, Zhang M, et al. Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress. *Mol Cancer Ther.* 2008;7:2319-27.
- [49] Conklin KA. Cancer chemotherapy and antioxidants. *J Nutr.* 2004;134:3201s-4s.
- [50] Kang YH, Lee E, Choi MK, Ku JL, Kim SH, Park YG, et al. Role of reactive oxygen species in the induction of apoptosis by alpha-tocopheryl succinate. *Int J Cancer.* 2004;112:385-92.
- [51] Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:29-38.
- [52] Sun QA, Runge MS, Madamanchi NR. Oxidative stress, NADPH oxidases, and arteries. *Hamostaseologie.* 2015;35.
- [53] Weseler AR, Bast A. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. *Curr Hypertens Rep.* 2010;12:154-61.
- [54] Drummond GR, Sobey CG. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25:452-63.
- [55] Lufano M, Balazy M. Interactions of peroxynitrite and other nitrating substances with human platelets: the role of glutathione and peroxynitrite permeability. *Biochem Pharmacol.* 2003;65:515-23.
- [56] Matsunaga T, Nakajima T, Sonoda M, Koyama I, Kawai S, Inoue I, et al. Modulation of reactive oxygen species in endothelial cells by peroxynitrite-treated lipoproteins. *J Biochem.* 2001;130:285-93.
- [57] Zou MH, Leist M, Ullrich V. Selective nitration of prostacyclin synthase and defective vasorelaxation in atherosclerotic bovine coronary arteries. *Am J Pathol.* 1999;154:1359-65.

- [58] Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2001;1:1397-406.
- [59] Schopfer FJ, Baker PR, Freeman BA. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem Sci.* 2003;28:646-54.
- [60] Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:9220-5.
- [61] Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukui T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 2003;111:1201-9.
- [62] Nozawa K, Tuck ML, Golub M, Eggena P, Nadler JL, Stern N. Inhibition of lipoxygenase pathway reduces blood pressure in renovascular hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1990;259:H1774-80.
- [63] Reddy MA, Thimmalapura PR, Lanting L, Nadler JL, Fatima S, Natarajan R. The oxidized lipid and lipoxygenase product 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid induces hypertrophy and fibronectin transcription in vascular smooth muscle cells via p38 MAPK and cAMP response element-binding protein activation. Mediation of angiotensin II effects. *J Biol Chem.* 2002;277:9920-8.
- [64] Kuhn H, Romisch I, Belkner J. The role of lipoxygenase-isoforms in atherogenesis. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49:1014-29.
- [65] Nunez MT, Urrutia P, Mena N, Aguirre P, Tapia V, Salazar J. Iron toxicity in neurodegeneration. *Biomaterials.* 2012;25:761-76.
- [66] Wood PM. The potential diagram for oxygen at pH 7. *Biochem J.* 1988;253:287-9.
- [67] Boldt DH. New perspectives on iron: an introduction. *Am J Med Sci.* 1999;318:207-12.
- [68] Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood.* 2002;99:3505-16.
- [69] Hirayama M, Kohgo Y, Kondo H, Shintani N, Fujikawa K, Sasaki K, et al. Regulation of iron metabolism in HepG2 cells: a possible role for cytokines in the hepatic deposition of iron. *Hepatology.* 1993;18:874-80.



- [70] Epsztejn S, Kakhlon O, Glickstein H, Breuer W, Cabantchik I. Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal Biochem. United States* 1997. p. 31-40.
- [71] Kakhlon O, Gruenbaum Y, Cabantchik ZI. Repression of ferritin expression increases the labile iron pool, oxidative stress, and short-term growth of human erythroleukemia cells. *Blood*. 2001;97:2863-71.
- [72] De Domenico I, Ward DM, Kaplan J. Hepcidin regulation: ironing out the details. *J Clin Invest*. 2007;117:1755-8.
- [73] Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306:2090-3.
- [74] Melino G, Gallagher E, Aqeilan RI, Knight R, Peschiaroli A, Rossi M, et al. Itch: a HECT-type E3 ligase regulating immunity, skin and cancer. *Cell Death Differ*. 2008;15:1103-12.
- [75] Perry WL, Hustad CM, Swing DA, O'Sullivan TN, Jenkins NA, Copeland NG. The itchy locus encodes a novel ubiquitin protein ligase that is disrupted in a18H mice. *Nat Genet*. 1998;18:143-6.
- [76] Sielicka-Dudzin A, Borkowska A, Herman-Antosiewicz A, Wozniak M, Jozwik A, Fedeli D, et al. Impact of JNK1, JNK2, and ligase Itch on reactive oxygen species formation and survival of prostate cancer cells treated with diallyl trisulfide. *Eur J Nutr*. 2012;51:573-81.
- [77] Koorts AM, Viljoen M. Ferritin and ferritin isoforms I: Structure-function relationships, synthesis, degradation and secretion. *Arch Physiol Biochem*. 2007;113:30-54.
- [78] Bolann BJ, Ulvik RJ. On the limited ability of superoxide to release iron from ferritin. *Eur J Biochem*. 1990;193:899-904.
- [79] Sullivan JL. Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet*. 1981;1:1293-4.
- [80] Bochkov VN, Mechtcheriakova D, Lucerna M, Huber J, Malli R, Graier WF, et al. Oxidized phospholipids stimulate tissue factor expression in human endothelial cells via activation of ERK/EGR-1 and Ca(++)/NFAT. *Blood*. 2002;99:199-206.
- [81] Stanley N, Stadler N, Woods AA, Bannon PG, Davies MJ. Concentrations of iron correlate with the extent of protein, but not lipid, oxidation in advanced human atherosclerotic lesions. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:1636-43.

- 
- [82] Grzegorz B. Druga Twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2009.
- [83] Kiechl S, Willeit J, Egger G, Poewe W, Oberhollenzer F. Body iron stores and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation*. 1997;96:3300-7.
- [84] Sullivan JL. Stored iron and myocardial perfusion deficits. *Am Heart J. United States* 2002. p. 193-5.
- [85] Emerit J, Beaumont C, Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother*. 2001;55:333-9.
- [86] Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, et al. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo j*. 1996;15:2760-70.
- [87] Minden A, Lin A, McMahon M, Lange-Carter C, Derijard B, Davis RJ, et al. Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science*. 1994;266:1719-23.
- [88] Mohit AA, Martin JH, Miller CA. p493F12 kinase: a novel MAP kinase expressed in a subset of neurons in the human nervous system. *Neuron*. 1995;14:67-78.
- [89] Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*. 2001;22:153-83.
- [90] Qamirani E, Ren Y, Kuo L, Hein TW. C-reactive protein inhibits endothelium-dependent NO-mediated dilation in coronary arterioles by activating p38 kinase and NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:995-1001.
- [91] Ju H, Behm DJ, Nerurkar S, Eybye ME, Haimbach RE, Olzinski AR, et al. p38 MAPK inhibitors ameliorate target organ damage in hypertension: Part 1. p38 MAPK-dependent endothelial dysfunction and hypertension. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;307:932-8.
- [92] Varma S, Breslin JW, Lal BK, Pappas PJ, Hobson RW, 2nd, Duran WN. p42/44MAPK regulates baseline permeability and cGMP-induced hyperpermeability in endothelial cells. *Microvasc Res*. 2002;63:172-8.

- [93] Chang YL, Chen CL, Kuo CL, Chen BC, You JS. Glycyrrhetic acid inhibits ICAM-1 expression via blocking JNK and NF-kappaB pathways in TNF-alpha-activated endothelial cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2010;31:546-53.
- [94] Luzi L, Confalonieri S, Di Fiore PP, Pelicci PG. Evolution of Shc functions from nematode to human. *Curr Opin Genet Dev.* 2000;10:668-74.
- [95] Pelicci G, Lanfrancone L, Grignani F, McGlade J, Cavallo F, Forni G, et al. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell.* 1992;70:93-104.
- [96] Rajendran M, Thomes P, Zhang L, Veeramani S, Lin MF. p66Shc--a longevity redox protein in human prostate cancer progression and metastasis : p66Shc in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29:207-22.
- [97] Le S, Connors TJ, Maroney AC. c-Jun N-terminal kinase specifically phosphorylates p66ShcA at serine 36 in response to ultraviolet irradiation. *J Biol Chem.* 2001;276:48332-6.
- [98] ATTC. <http://www.lgcstandards-atcc.org/>. Georgetown University in Washington: ATTC in Partnership with LGC Standards; 2015.
- [99] Gomes A, Fernandes E, Lima JL. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods.* Netherlands2005. p. 45-80.
- [100] Kakhlon O, Cabantchik ZI. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med.* United States2002. p. 1037-46.
- [101] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
- [102] Sullivan JL. Is homocysteine an iron-dependent cardiovascular risk factor? *Kidney Int.* 2006;69:642-4.
- [103] Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, et al. The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell.* 2006;124:601-13.
- [104] Sullivan JL. Is stored iron safe? *J Lab Clin Med.* 2004;144:280-4.

- [105] Kim MK, Baek KH, Song KH, Kang MI, Choi JH, Bae JC, et al. Increased serum ferritin predicts the development of hypertension among middle-aged men. *Am J Hypertens*. 2012;25:492-7.
- [106] Ueno Y, Fujita K, Takashina N, Chiba S, Uzuka Y, Kinouchi T, et al. [Studies on the change in the levels of serum ferritin, serum iron and total iron binding capacity caused by aging and sex difference]. *Rinsho Byori*. 1991;39:523-30.
- [107] Pourmoghaddas A, Sanei H, Garakyaraghi M, Esteki-Ghashghaei F, Gharaati M. The relation between body iron store and ferritin, and coronary artery disease. *ARYA Atheroscler*. 2014;10:32-6.
- [108] van der AD, Grobbee DE, Roest M, Marx JJ, Voorbij HA, van der Schouw YT. Serum ferritin is a risk factor for stroke in postmenopausal women. *Stroke*. 2005;36:1637-41.
- [109] Mascitelli L, Pezzetta F. Reduction of body iron stores and the prevention of type 2 diabetes. *Am J Med*. United States 2007. p. e13; author reply e5.
- [110] Kim MH, Bae YJ. Postmenopausal vegetarians' low serum ferritin level may reduce the risk for metabolic syndrome. *Biol Trace Elem Res*. 2012;149:34-41.
- [111] Tuso P, Stoll SR, Li WW. A plant-based diet, atherogenesis, and coronary artery disease prevention. *Perm J*. 2015;19:62-7.
- [112] Mladenka P, Zatloukalova L, Filipsky T, Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med*. 2010;49:963-75.
- [113] Salvamani S, Gunasekaran B, Shaharuddin NA, Ahmad SA, Shukor MY. Antiatherosclerotic effects of plant flavonoids. *Biomed Res Int*. 2014;2014:480258.
- [114] Rouault TA. Cell biology. An ancient gauge for iron. *Science*. 2009;326:676-7.
- [115] Epsztejn S, Glickstein H, Picard V, Slotki IN, Breuer W, Beaumont C, et al. H-ferritin subunit overexpression in erythroid cells reduces the oxidative stress response and induces multidrug resistance properties. *Blood*. 1999;94:3593-603.
- [116] Konijn AM, Glickstein H, Vaisman B, Meyron-Holtz EG, Slotki IN, Cabantchik ZI. The cellular labile iron pool and intracellular ferritin in K562 cells. *Blood*. 1999;94:2128-34.

- [117] Choi JH, Kim DW, Yu B. Modulation of age-related alterations of iron, ferritin, and lipid peroxidation in rat brain synaptosomes. *J Nutr Health Aging*. 1998;2:133-7.
- [118] Fuchs SY, Fried VA, Ronai Z. Stress-activated kinases regulate protein stability. *Oncogene*. 1998;17:1483-90.
- [119] Han MS, Jung DY, Morel C, Lakhani SA, Kim JK, Flavell RA, et al. JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science*. 2013;339:218-22.
- [120] Huang CY, Kuo WW, Yeh YL, Ho TJ, Lin JY, Lin DY, et al. ANG II promotes IGF-IIR expression and cardiomyocyte apoptosis by inhibiting HSF1 via JNK activation and SIRT1 degradation. *Cell Death Differ*. 2014;21:1262-74.
- [121] Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, et al. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell*. 2005;122:221-33.
- [122] Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, et al. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature*. 1999;402:309-13.
- [123] Nemoto S, Finkel T. Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science*. 2002;295:2450-2.
- [124] Camici GG, Schiavoni M, Francia P, Bachschmid M, Martin-Padura I, Hersberger M, et al. Genetic deletion of p66(Shc) adaptor protein prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:5217-22.
- [125] Francia P, delli Gatti C, Bachschmid M, Martin-Padura I, Savoia C, Migliaccio E, et al. Deletion of p66shc gene protects against age-related endothelial dysfunction. *Circulation*. 2004;110:2889-95.
- [126] Oshikawa J, Kim SJ, Furuta E, Caliceti C, Chen GF, McKinney RD, et al. Novel role of p66Shc in ROS-dependent VEGF signaling and angiogenesis in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302:H724-32.

[127] Fleming DJ, Tucker KL, Jacques PF, Dallal GE, Wilson PW, Wood RJ. Dietary factors associated with the risk of high iron stores in the elderly Framingham Heart Study cohort. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:1375-84.

[128] Lakka TA, Nyssonen K, Salonen JT. Higher levels of conditioning leisure time physical activity are associated with reduced levels of stored iron in Finnish men. *Am J Epidemiol.* 1994;140:148-60.

[129] Salonen JT, Nyssonen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppanen R, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation.* 1992;86:803-11.

[130] Thomas SR, Schulz E, Keaney JF, Jr. Hydrogen peroxide restrains endothelium-derived nitric oxide bioactivity -- role for iron-dependent oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2006;41:681-8.

[131] Rajapurkar MM, Shah SV, Lele SS, Hegde UN, Lensing SY, Gohel K, et al. Association of catalytic iron with cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2012;109:438-42.

## 10. Załączniki

Załącznik nr 1- Certyfikat analizy dla linii komórkowej CPAE użytej do badań

Test	Specifications	Results
Passage limitation	Passage must be ≤ 18	15
Post-freeze viability	≥ 50% average	89% average
Growth properties	Adherent	Adherent
Morphology	Endothelial-like	Endothelial-like
<b>Test for Mycoplasma Contamination:</b> Hoechst DNA stain Agar Culture	None detected None detected	None detected None detected
Post-freeze cell growth	Cells are able to be successfully subcultured for two passages post-freeze	Cells are able to be successfully subcultured for two passages post-freeze
Species determination: Isoenzyme (interspecies)	Bovine	Bovine
<b>Sterility Test (visual inspection)</b> HTYE Broth, 37°C and 26°C, Aerobic, 21-day incubation TSB Broth, 37°C and 26°C, Aerobic, 21-day incubation Sabouraud Broth, 37°C and 28°C, Aerobic, 21-day incubation DMEM with 10% FBS, 37°C, Aerobic, 21-day incubation Blood Agar, 37°C, Aerobic, 21-day incubation Blood Agar, 37°C, Anaerobic, 21-day incubation THIO Broth, 37°C, Anaerobic, 21-day incubation	No growth No growth No growth No growth No growth No growth No growth	No growth No growth No growth No growth No growth No growth No growth

*Kim Ellis* 10 September 2007  
 Kim Ellis Date  
 Quality Control Supervisor; Quality, Compliance and Biosafety

ATCC hereby represents and warrants that the material provided under this certificate has been subjected to the tests and procedures specified and that the results described, along with any other data provided in this certificate, are true and correct to the best of the company's knowledge and belief.

This product is intended to be used for laboratory research use only. It is not intended for use in human, animals or for diagnostics.

ATCC® products may not be resold, modified for resale, used to provide commercial services or to manufacture commercial products without prior written agreement from ATCC®.

The ATCC trademark and trade name and any and all ATCC catalog numbers are trademarks of the American Type Culture Collection.

© 2007 ATCC. All rights reserved.

---

ATCC (American Type Culture Collection)  
 P.O. Box 1549  
 Manassas, VA 20108 USA  
 www.atcc.org

800-638-6597 or 703-365-2700  
 Fax: 703-365-2750  
 E-mail: tech@atcc.org  
 or contact your local distributor.

- Page 1 of 1 -

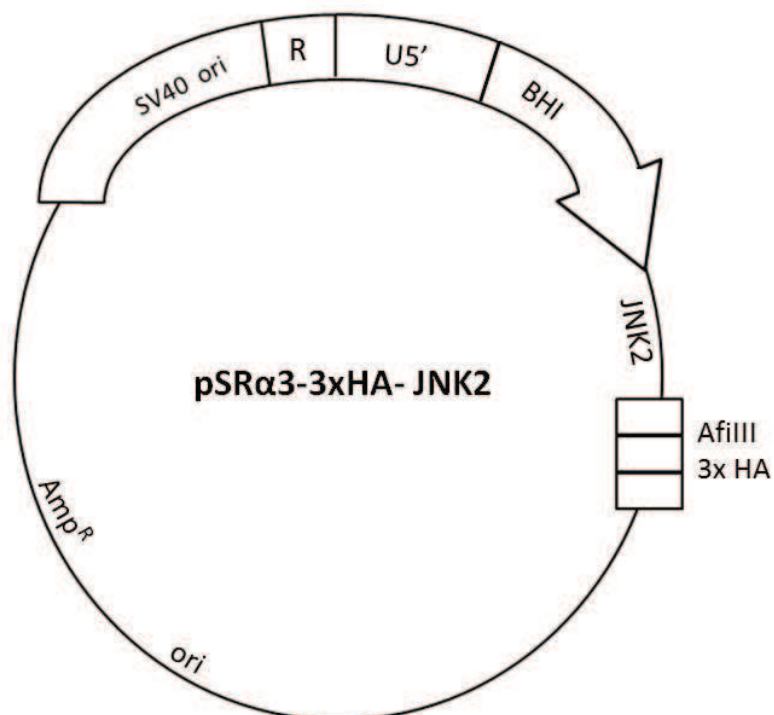
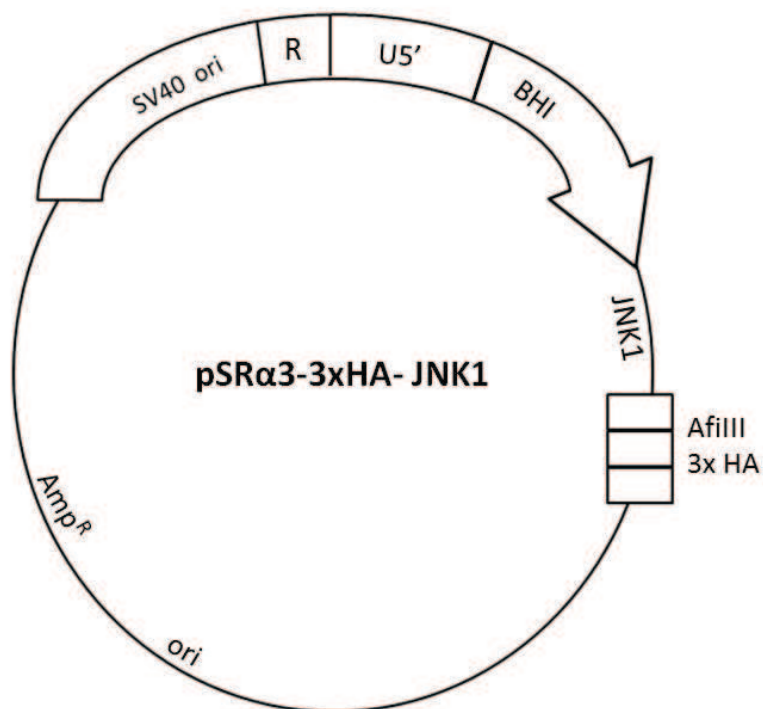
## Załącznik nr 2- Spis użytych odczynników

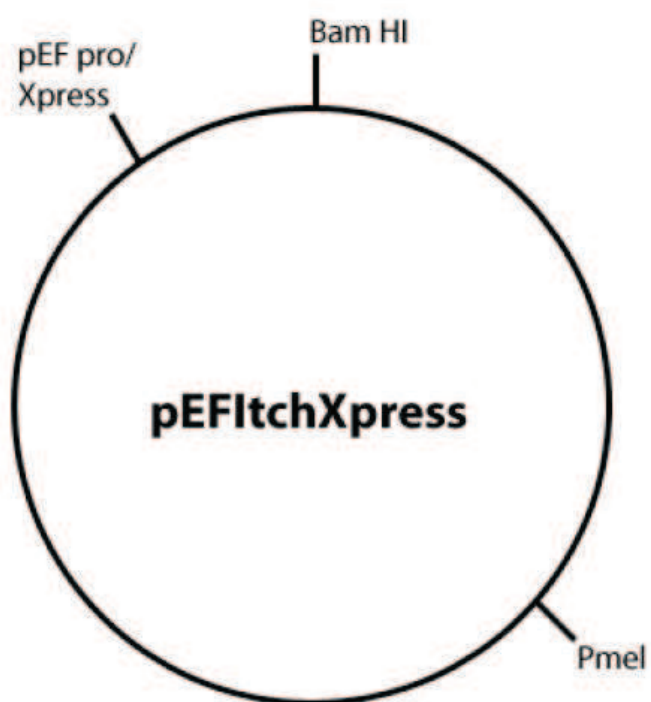
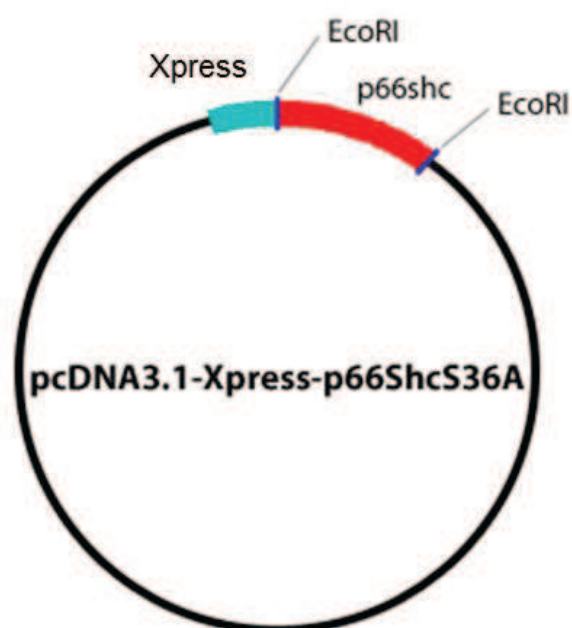
Nazwa odczynnika:	Numer katalogowy:	Firma:
2-amino-2-(hydroksymetylo)propano-1,3-diol	T1003	Sigma Aldrich
Akrylamid	80800	MP Biomedicals
Alkohol etylowy	396420113	POCH
Alkohol metylowy	621990110	POCH
Angiotensyna II	A9525	Sigma Aldrich
Bisakrylamid	800801	MP Biomedicals
Błękit bromofenolowy	B5525	Sigma Aldrich
Chlorek sodu	794121116	POCH
Chlorowodorek polietylenoiminy	764965	Sigma Aldrich
Dimetylosulfotlenek	D5878	Sigma Aldrich
DL-Ditiotreitol	D9779	Sigma Aldrich
Dwuoctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny	D3999	Invitrogen
Glicerol	1331-11-443220-4	POCH
Glicyna	G8898	Sigma Aldrich
Homocysteina	H4628	Sigma Aldrich
Inhibitory fosfataz (FOSFO-STOP)	04906845001	Roche
Inhibitory proteaz (Coctail Tablets)	04693154001	Roche
Kalceina	C1359	Sigma Aldrich
Kwas solny	575283115	POCH
L-glutamina	G7513	Sigma Aldrich
Laurylosiarczan sodu	L3771	Sigma Aldrich
Marker białkowy (Page Ruler Plus)	SM1811	Fermentas
Mezylan deferoksaminy	D9533	Sigma Aldrich
Nadsiarczan amonu	A3678	Sigma Aldrich
<i>N,N,N,N'</i> -Tetrametyloetylenodiamina	T-9281	Sigma Aldrich
Odczynnik Bradford	B6916	Sigma Aldrich
PBS	7391	Lonza
Penicylina-Streptomycyna	P4333	Sigma Aldrich
Pirogronian sodu	S8636	Sigma Aldrich
Płodowa surowica bydlęca	F7524	Sigma Aldrich
Pożywka do hodowli (MEM)	M5650	Sigma Aldrich
Pożywka do transfekcji (OPTI MEM)	11058	Gibco
SP600125	S5567-10MG	Sigma Aldrich
Substrat do chemiluminescencji (Plus-ECL)	NEL103001EA	Perkin Elmer
Triton® X-100	T8787	Sigma Aldrich
Trypsyna-EDTA	BE17-161F	Sigma Aldrich
Tween 20	568760421	POCH
Utrwalacz do klisz	1901875	KODAK
Wywoływacz do klisz	1900943	KODAK

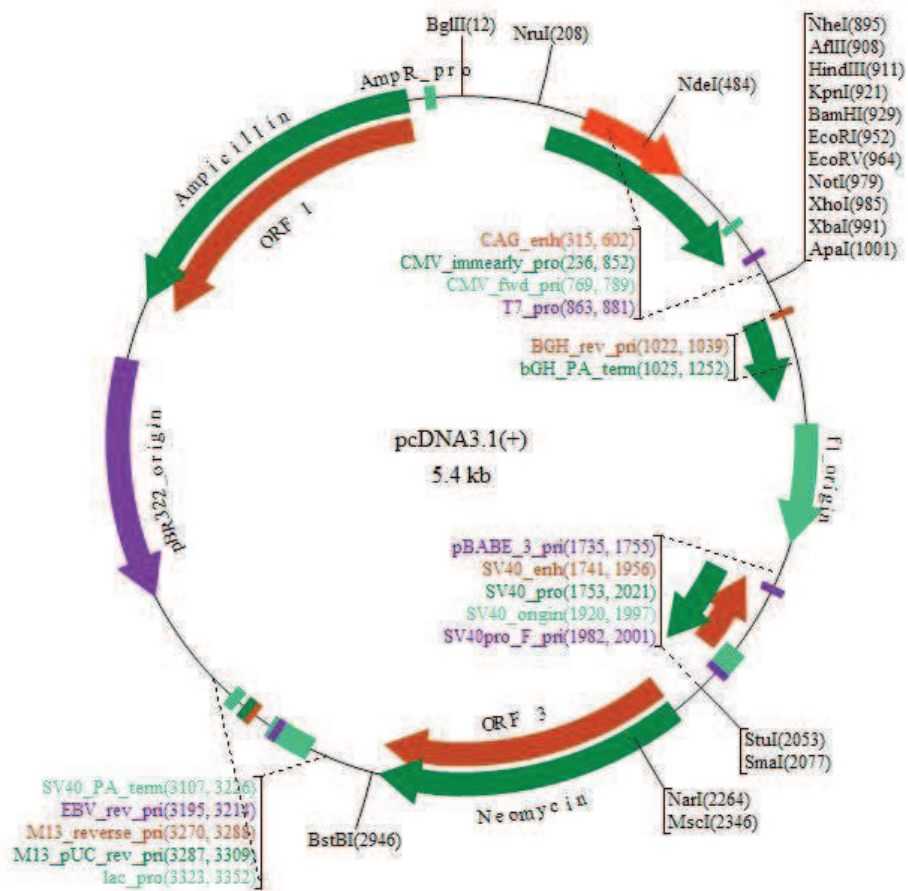


## Załącznik nr 3- Mapy plazmidów

Poniżej przedstawione zostały mapy plazmidów eksprymujących katalitycznie nieaktywne mutanty JNK1, JNK2, Itch oraz p66Shc oraz pusty wektor pcDNA3.1.







## 11. Spis tabel

Tabela 1- Najważniejsze czynniki ryzyka chorób sercowo-naczyniowych.

Tabela 2- Czynniki jatrogenne wywołujące wzrost poziomu homocysteiny.

Tabela 3- Roztwory użyte do badań.

Tabela 4- Zestawy komercyjne użyte do badań.

Tabela 5- Przeciwciała I rzędowe.

Tabela 6- Przeciwciała II rzędowe sprzężone z peroksydazą chrzanową.

Tabela 7- Ilość wysianych komórek oraz rodzaj naczyń hodowlanych wykorzystanych w odpowiednich doświadczeniach.

Tabela 8- Skład roztworu do odwrotnej transkrypcji.

Tabela 9- Sekwencje starterów projektowanych w celu powielania fragmentów genów wołoferrytyny L oraz genu referencyjnego  $\beta$ -aktyny.

Tabela 10- Skład 1 x stężonego roztworu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Tabela 11- Najczęściej stosowany profil czasowo – temperaturowy reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Tabela 12- Skład żelu zagęszczającego.

Tabela 13- Skład żelu rozdzielającego 12%.

## 12. Spis rycin

Rysunek 1- Wzór strukturalny homocysteiny.

Rysunek 2- Główne kierunki przemian homocysteiny.

Rysunek 3- Metabolizm homocysteiny.

Rysunek 4- Metabolity homocysteiny.

Rysunek 5- Tiolakton homocysteiny (HTL).

Rysunek 6- Schemat przemian w układzie RAA.

Rysunek 7- Podstawowe enzymy usuwające RFT w komórkach zwierzęcych.

Rysunek 8- Produkty niecałkowitej redukcji cząsteczki tlenu- „przeciek elektronów” w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym.

Rysunek 9- Źródła anionorodnika ponadtlenkowego w komórce.

Rysunek 10- Schemat reakcji Fentona.

Rysunek 11- Kaskada przekazywania sygnału z udziałem kinaz MAP.

Rysunek 12- Komórki CPAE przy niskiej (A) i wysokiej (B) konfluencji [98].

Rysunek 13- Mechanizm wykrywania RFT i RFN przy użyciu 2',7'-dioctanu dichlorodihydrofluoresceiny.

Rysunek 14- Wzór kalceiny.

Rysunek 15- Schemat procesu wygaszania fluorescencji kalceiny przez LIP.

Rysunek 16- Brak zmian w żywotności komórek CPAE traktowanych Ang II.

Rysunek 17- Zależność między poziomem ferrytyny L a czasem inkubacji z angiotensyną II.

Rysunek 18- Porównanie poziomu mRNA genu Ferrytyny L w linii komórkowej CPAE poddawanej inkubacji z Ang II w stężeniu 0,4μM w czasie 0-24h.

Rysunek 19- Wpływ Ang II na poziom RFT i RFN w komórkach śródbłónka naczyniowego.

Rysunek 20- Wpływ Ang II na poziom LIP w komórkach śródbłónka naczyniowego.

Rysunek 21- Kinazy N-końcowego odcinka c – Jun uczestniczą w regulacji poziomu ferrytyny w komórkach śródbłónka naczyniowego poddanego działaniu Ang II.

Rysunek 22- Kinazy JNK1 i JNK2 uczestniczą w procesie regulacji poziomu ferrytyny L w komórkach śródbłónka naczyniowego poddanego działaniu Ang II

Rysunek 23- Ligaza 3E Itch reguluje degradację ferrytyny indukowaną Ang II w komórkach CPAE.

Rysunek 24- Wpływ angiotensyny II na poziom aktywnej formy białka p66Shc w linii komórkowej CPAE.

Rysunek 25- Wpływ angiotensyny II na poziom ferrytyny L w komórkach CPAE transferowane przejściowo pustym wektorem pcDNA3.1 oraz plazmidami niosącym allele kodujące nieaktywne formy białka p66Shc (S36A).

Rysunek 26- Brak zmian w żywotności komórek CPAE traktowanych Hcy.

Rysunek 27- Zależność między poziomem ferrytyny L a czasem inkubacji z homocysteiną.

Rysunek 28- Porównanie poziomu mRNA genu Ferrytyny L w linii komórkowej CPAE poddawanej inkubacji z Hcy w stężeniu 3mM w czasie 0-24h.

Rysunek 29- Wpływ Hcy na poziom LIP w komórkach śródbłónka naczyniowego.

Rysunek 30- Wpływ Hcy na poziom RFT i RFN w komórkach śródbłónka naczyniowego.

Rysunek 31- Kinazy N-końcowego odcinaka c – Jun uczestniczą w regulacji poziomu ferrytyny w komórkach śródbłónka naczyniowego poddanego działaniu Hcy.

Rysunek 32- Kinazy JNK1 i JNK2 uczestniczą w procesie regulacji poziomu ferrytyny L w komórkach śródbłonna naczyniowego poddanego działaniu Hcy.

Rysunek 33- Ligaza 3E Itch reguluje degradację ferrytyny indukowaną przez homocysteinę w komórkach CPAE.

Rysunek 34- Wpływ Hcy na poziom aktywnej formy białka p66Shc w linii komórkowej CPAE.

Rysunek 35- Wpływ homocysteiny na poziom ferrytyny L w komórkach CPAE transferowane przejściowo pustym wektorem pcDNA3.1 oraz plazmidami niosącym allele kodujące nieaktywne formy białka p66Shc (S36A).

Rysunek 36- Proponowany mechanizm degradacji ferrytyny przez Ang II i Hcy.