

Maciej Śledziński

**Stres oksydacyjny - rola labilnej puli żelaza
w modelu komórkowym ostrego zapalenia
trzustki**

Rozprawa doktorska została wykonana
w Zakładzie Bioenergetyki i Fizjologii
Wysiłku Fizycznego Gdańskiego Uniwersytetu
Medycznego
Praca dotowana z ST-89

Promotor pracy:

Prof. dr hab. Jędrzej Antosiewicz

**Wydział Nauk o Zdrowiu
Gdański Uniwersytet Medyczny**

Gdańsk 2017

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	4
2. WSTĘP	8
2.1 ANATOMIA I FIZJOLOGIA TRZUSTKI	8
2.2 OSTRE ZAPALENIE TRZUSTKI	10
2.2.1 Etiologia ostrego zapalenia trzustki	10
2.2.2 Czynniki indukujące ostre zapalenie trzustki	12
2.2.3 Częstość występowania, śmiertelność i przebieg ostrego zapalenia trzustki	15
2.2.4 Faza wczesna ostrego zapalenia trzustki	17
2.2.5 Odpowiedź uogólniona	20
2.2.6 Bakteryjna translokacja	21
2.2.7 Stres oksydacyjny	21
2.3 REAKTYWNE FORMY TLENU	22
2.3.1 Powstawanie reaktywnych form tlenu	22
2.3.2 Mitochondrialny transport elektronów	25
2.3.3 Mikrosomalny transport elektronów	28
2.3.4 Enzymy utleniające peroksydomów	28
2.3.5 Mechanizmy ochraniające komórki przed reaktywnymi formami tlenu	29
2.3.6 Uszkodzający wpływ reaktywnych form tlenu na tkanki	30
2.4 MODELE ZWIERZĘCE OSTREGO ZAPALENIA TRZUSTKI	31
2.5 KOMÓRKI AR42J	35
2.6 TRANSFEKCJA	38
2.7 ŻELAZO	40
2.7.1 Toksyczność żelaza	40
2.7.2 Hemostaza żelaza	41
2.7.3 Labilna pula żelaza	42
2.7.4 Ferrytyna jako źródło labilnej puli żelaza	43
2.7.5 Rola labilnej puli żelaza w odpowiedzi komórkowej na stres oksydacyjny	44
2.8 SZLAKI SYGNAŁOWE KINAZ BIAŁKOWYCH	45
2.8.1 Kinazy białkowe aktywowane mitogenami	45
2.8.2 Ścieżka sygnałowa kinaz ERK	48
2.8.3 Kinazy JNK	49
3. CEL PRACY	51
4. MATERIAŁ I METODY	52
4.1 MATERIAŁY	52
4.1.1 Linia komórkowa	52
4.1.2 Odczynniki, zestawy, przeciwciała	52
4.1.3 Bufory	53
4.1.4 Plazmidy	53
4.2 METODY	54
4.2.1 Hodowla komórkowa	54
4.2.2 Transformacja <i>E.coli</i>	54
4.2.3 Oczyszczanie plazmidowego DNA	54
4.2.4 Transfekcja komórek	55
4.2.5 Pomiar reaktywnych form tlenu	55
4.2.6 Pomiar labilnej puli żelaza	56
4.2.7 Przygotowanie lizatów komórkowych	56
4.2.8 Pomiar stężenia białka w lizatach	57
4.2.9 Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym	57
4.2.10 Transfer białek na membranę oraz ich identyfikacja	58
4.2.11 Analiza statystyczna	58
5. WYNIKI	59
5.1 CERULEINA INDUKUJE STRES OKSYDACYJNY W KOMÓRKACH AR42J	59

5.2 TWORZENIE REAKTYWNYCH FORM TLENU W KOMÓRKACH AR42J ZABLOKOWANE PRZECZ CHELATAJĄCĄ ŻELAZA	60
5.3 CERULEINA WPŁYWA NA WZROST LABILNEJ PULI ŻELAZA	61
5.4 CERULEINA INDUKUJE WZROST REAKTYWNYCH FORM TLENU ORAZ DEGRADACJĘ FERRYTYNY ..	64
5.5 SIŁNIEJSZE TWORZENIE REAKTYWNYCH FORM TLENU PO WYSYCENIU KOMÓREK AR42J ŻELAZEM	66
5.6 ROLA PROTEASOMÓW W DEGRADACJI FERRYTYNY.	69
5.7 DEGRADACJA FERRYTYNY PO INDUKCJI CERULEINĄ JEST ZALEŻNA OD KINAZY JNK1	71
6. DYSKUSJA	75
6.1 UDZIAŁ REAKTYWNYCH FORM TLENU W MODYFIKACJI PRZEBIEGU OSTREGO ZAPALENIA TRZUSTKI	76
6.2 INDUKCJA OSTREGO ZAPALENIA TRZUSTKI W MODELU KOMÓRKOWYM	77
6.3 ROLA FERRYTYNY W OCHRONIE KOMÓREK PRZED TOKSYCZNOŚCIĄ ŻELAZA	78
6.4 UDZIAŁ SZLAKU KINAZY JNK W REGULACJI PROCESU DEGRADACJI FERRYTYNY	84
6.5 WPŁYW NADMIARU ŻELAZA NA TWORZENIE REAKTYWNYCH FORM TLENU I USZKODZENIE KOMÓREK TRZUSTKOWYCH	86
6.6 SKUTKI NADMIERNEGO GROMADZENIA ŻELAZA W TKANCE TRZUSTKOWEJ	87
6.7 ZMNIJSZENIE DOSTĘPNOŚCI ŻELAZA OGRANICZA DZIAŁANIE REAKTYWNYCH FORM TLENU W OSTRYM ZAPALENIU TRZUSTKI	89
7. WNIOSKI.....	92
8. STRESZCZENIE	93
9. PIŚMIENNICTWO.....	96
10. ZAŁĄCZNIKI	107

1. Wykaz stosowanych skrótów

- ANT** - translokator nukleotydów adeninowych (ang. *adenine nucleotide translocase*)
- AP-1** - kompleks białkowy zbudowany z dimerów białek z rodzin Fos, Jun, ATF i *Maf*, który działa jako czynnik transkrypcyjny (ang. *activator protein 1*)
- APS** - nadsiarczan amonu (ang. *ammonium persulfate*)
- AR42J** - linia komórek groniastych trzustki szczura
- ARDS** - zespół ostrej niewydolności oddechowej (ang. *acute respiratory distress syndrome*)
- AS601245** - specyficzny inhibitor kinazy JNK
- CARS** - zespół kompensacyjnej odpowiedzi przeciwzapalnej (ang. *compensatory anti-inflammatory response syndrome*)
- CaSR** - receptor wapnia pozakomórkowego (ang. *calcium-sensing receptor*)
- CAT** - katalaza (ang. *catalase*)
- CCK** - cholecystokinina (ang. *cholecystokinin*)
- CEP-1347** - inhibitor kinazy JNK
- CFTR** - błonowy regulator przewodnictwa – białko mukowiscydozy (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)
- CoQ** - koenzym Q, ubichinon (ang. *coenzyme q, ubiquinone*)
- CR-1409** - antagonist receptoru dla cholecystokininy (ang. *cholecystokinin receptor antagonist*)
- CTRC** - gen chymotrypsyny C (ang. *chymotrypsin C gene*)
- CytC** - cytochrom C (ang. *cytochrome complex*)
- DCF** - dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCFDA, ang. *2',7' - dichlorodihydrofluorescein diacetate*)
- DCYTB** - dwunastniczy cytochrom B (ang. *duodenal cytochrome B*)
- DFO** - deferoksamina, lek chelatujący o dużym powinowactwie do żelaza (ang. *deferoxamine*)
- DFP** - deferypron, związek chelatujący żelazo (ang. *deferiprone*)
- DFX** - deferazyroks, związek chelatujący żelazo (ang. *deferasirox*)
- D-JNKI-1** - peptyd hamujący penetrację komórkową kinazy JNK (ang. *cell penetrating JNK peptide inhibitor*)

DMSO - dimetylosulfotlenek (ang. *dimethyl sulfoxide*)

DMT1 - transporter żelaza dwuwartościowego 1 (ang. *divalent metal transporter 1*)

EDTA - etylenodiaminotetraoctan sodowy (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

EGF - naskórkowy czynnik wzrostu (ang. *epidermal growth factor*)

ERK - kinazy z grupy MAPK regulowane przez czynniki zewnątrzkomórkowe takie jak czynniki wzrostu (ang. *extracellular signal regulated kinases*)

FAEE - estry etylowych kwasów tłuszczowych (ang. *fatty acid ethyl esters*)

FBS - płodowa surowica bydlęca (ang. *fetal bovine serum*)

Fe²⁺ - forma zredukowana żelaza

FFA - wolne kwasy tłuszczowe (ang. *free fatty acids*)

GPx - peroksydaza glutationowa (ang. *glutathione peroxidase*)

H₂O₂ - nadtlenek wodoru

HFE - gen kodujący białko HFE, ludzkie białko hemochromatozy (ang. *human hemochromatosis protein*)

HO - oksygenaza hemowa (ang. *heme oxygenase*)

HP - zapalenie trzustki o charakterze dziedzicznym (ang. *hereditary pancreatitis*)

HSP - białka szoku cieplnego (ang. *heat shock proteins*)

ICAM-1 - białko adhezji międzykomórkowej-1 (ang. *intercellular adhesion molecule-1*)

IRE - element odpowiedzi na żelazo (ang. *iron response element*)

IRP - białko regulacji żelaza (ang. *iron regulatory protein*)

JAK - kinaza Janus (ang. *Janus kinase*)

JNK - c-Jun N-terminalna kinaza (ang. *c-Jun N-terminal kinase*)

JNK-DN - mutacja nieaktywnej kinazy JNK (ang. *dominant-negative mutant of JNK*)

LDH - dehydrogenaza mleczanowa (ang. *lactate dehydrogenase*)

LIP - labilna pula żelaza (ang. *labile iron pool*)

LOXs - lipooksygenazy (ang. *lipoxygenases*)

MAPK (MAPKK – MAPK2, MAPKKK – MAPK3) - kinazy białkowe aktywowane mitogenem (ang. *mitogen-activated protein kinases*)

MDF - czynnik uszkadzający mięsień sercowy (ang. *myocardial depressant factor*)

MG132 - specyficzny inhibitor proteasomu (ang. *specific proteasome inhibitor*)

- MODS** - zespół niewydolności wielonarządowej (ang. *multiple organ dysfunction syndrome*)
- MOF** - niewydolność wielonarządowa (ang. *multiorgan failure*)
- MPO** - mieloperoksydaza (ang. *myeloperoxidase*)
- mRNA** - matrycowy kwas rybonukleinowy (ang. *messenger RNA*)
- MPTP** - kanał zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej (ang. *mitochondrial permeability transition pore*)
- NADPH** - fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)
- NF-κB** - kompleks białkowy działający jako czynnik transkrypcyjny, bierze udział w odpowiedzi komórki na bodźce (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
- NOS** - syntaza tlenku azotu (ang. *nitric oxide synthesis*)
- NOX** - oksydaza NADPH (ang. *NADPH oxidase*)
- OZT** - ostre zapalenie trzustki
- PAP** - białko powiązane z zapaleniem trzustki (ang. *pancreatitis-associated protein*)
- PAF** - czynnik aktywujący płytki krwi (ang. *platelet-activating factor*)
- Phox** - oksydaza NADPH fagocytów (ang. *phagocytic NADPH oxidase*)
- PGE2** - prostaglandyna E2 (ang. *prostaglandin E2*)
- PKC** - kinaza białkowa C (ang. *protein kinase C*)
- PBS** - jednokrotnie stężony, zbuforowany roztwór soli fizjologicznej będący roztworem wodnym chlorku sodu i fosforanu sodu (ang. *phosphate-buffered saline*)
- PP** - polipeptyd trzustkowy (ang. *pancreatic polypeptide*)
- PRSS1** - gen kodujący kationowy tripsynogenu, proteaza serynowa 1 (ang. *protease serine 1*)
- PSTI** - inhibitor tripsyny wydzielany przez trzustkę (ang. *pancreatic secretory trypsin inhibitor*)
- ROOH** - nadtlenki (wodoronadtlenki) lipidowe
- RFT** - reaktywne formy tlenu
- SD** - odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*)
- SDS** - laurylosiarczan sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate*)
- SIRS** - uogólniona reakcja zapalna (ang. *systemic inflammatory response*)

syndrome)

SOD - dysmutaza nadtlenkowa (ang. *superoxide dismutase*)

SP600125 - inhibitor kinazy JNK

SPINK1 - inhibitor proteaz serynowych typu Kazal-1 (ang. *serine protease inhibitor Kazal-type 1*), zwany inaczej inhibitorem trypsyny wydzielanym przez trzustkę PSTI

***t*BuOOH** - wodoronadtlenek tert-butylu

TFR - receptor dla transferyny (ang. *transferrin receptor*)

TF - transferyna (ang. *transferrin*)

THIF - główny metabolit izoflawonu sojowego (ang. *7,3,4-trihydroisoflavone*)

TNF - czynnik martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor*), cytokina biorąca udział w odpowiedzi zapalnej i immunologicznej

UVB - promieniowanie ultrafioletowe o długości fali 290-320nm

VDAC - kanał anionowy napięciowo-zależny (ang. *voltage dependent anion channel*)

VEGF - czynnik wzrostu śródbłónka (ang. *vascular endothelial growth factor*)

2. Wstęp

2.1 Anatomia i fizjologia trzustki

Trzustka u człowieka jest narządem o wadze 60-140 g, co stanowi 0,1 - 0,2% masy ciała. Leży w przestrzeni zaotrzewnowej w nadbrzuszu do przodu od kręgosłupa na wysokości kręgów lędźwiowych L₁-L₂. To położenie z jednej strony chroni ją przed urazem, natomiast z drugiej strony czyni trzustkę niedostępną w badaniu przedmiotowym, co znacznie utrudnia diagnostykę chorób trzustki. Anatomicznie trzustka dzieli się na trzy równe części podobne pod względem czynnościowym: głowę, trzon i ogon. Istotnym elementem anatomicznym jest przebieg przewodu żółciowego wspólnego przez głowę trzustki. W najczęstszym wariantcie anatomicznym przewód żółciowy wspólny łączy się z przewodem trzustkowym tworząc wspólny kanał przed ujściem do dwunastnicy.

Na część wewnątrzwydzielniczą składa się około 1 miliona wysepek trzustkowych (wysp Langerhansa), które stanowią 1 - 2% masy trzustki. Wysepki są rozproszone po całym narządzie; ich gęstość jest większa w obrębie ogona w porównaniu do głowy trzustki. Średnica wyspy wynosi około 0,1 - 0,2 mm, w skład ich struktury wchodzi pasma i gniazda wielościennych komórek nabłonkowych. Zadaniem wysepek jest produkcja substancji dokrewnych:

- komórki B (β) (około 54% wszystkich komórek wyspowych) – produkują insulinę, proinsulinę, peptyd C i amylinę,
- komórki A (α) (około 35%) – produkują glukagon,
- komórki D (δ) (około 11%) – produkują somatostatynę,
- komórki PP (γ) – produkują polipeptyd trzustkowy (PP) [1].

Komórki pęcherzykowe oraz system przewodów trzustkowych tworzą część zewnątrzwydzielniczą trzustki. Komórki pęcherzykowe, które stanowią około 80% masy trzustki, produkują enzymy trawienne wydzielane do dwunastnicy poprzez przewody trzustkowe. Sok trzustkowy złożony z enzymów trzustkowych i śluzu wytwarzanego przez komórki kubkowe przewodów trzustkowych, wydzielany jest w ciągu doby w objętości około 1 litra. Funkcje zewnątrzwydzielnicze trzustki kontrolują dwa hormony polipeptydowe - sekretyna i cholecystokinina. Nabłonkowe komórki przewodów trzustkowych wydzielają wodorowęglany i wodę w odpowiedzi na stymulację sekretyną, która jest wydzielana do krwi przez śluzówkę dwunastnicy

po kontakcie z pasażowaną treścią żołądka o niskim pH. Wydzielanie enzymów zawartych w ziarnistościach zymogenu z komórek pęcherzykowych do kanalików trzustkowych jest stymulowane poprzez cholecystokininę (dawniej znana również jako pankreozymina). Podobnie pokarm działa pobudzająco na uwalnianie cholecystokininy przez śluzówkę dwunastnicy. Wodorowęglany soku trzustkowego zobojętniają kwaśną treść soku żołądkowego i tym samym stwarzają optymalne warunki do aktywności enzymów trawiennych. Proteolityczne enzymy trzustkowe są pod względem chemicznym podobne do enzymów lizosomalnych. Komórki pęcherzykowe produkują:

- amylazę trzustkową,
- trypsynogen – enzym aktywuje się do trypsyny pod wpływem enterokinazy jelitowej przy pH 5,2 - 6,0 lub autokatalitycznej aktywacji przy pH 7,9 w dwunastnicy,
- chymotrypsynogen – enzym aktywuje się do chymotrypsyny pod wpływem trypsyny przy pH 8,0 w dwunastnicy,
- elastazę,
- lipazę trzustkową,
- nukleazy: rybonukleazę i deoksyrybonukleazę,
- hydrolazę estrów cholesterolowych,
- fosfolipazę A2,
- karboksypeptydazę.

Komórki pęcherzykowe są zabezpieczone przed działaniem ich własnych enzymów poprzez oddzielenie enzymów w otoczonych błoną organellach - ziarnistościach siateczki endoplazmatycznej, aparatu Golgiego czy też ziarnistościach zymogenu. Funkcję ochronną odgrywa również synteza enzymów w postaci nieczynnych proenzymów (zymogenów) oraz obecność inhibitorów trypsyny w komórkach zrazikowych trzustki, soku trzustkowym, płynie międzykomórkowym i w surowicy krwi [2].

2.2 Ostre zapalenie trzustki

Ostre zapalenie trzustki (OZT) jest chorobą zapalną trzustki objawiającą się bólem brzucha i podwyższonym poziomem enzymów trzustkowych we krwi. Ostre zapalenie trzustki rozwija się w momencie zaburzenia równowagi mechanizmów hamujących lub stabilizujących aktywność enzymów w komórkach pęcherzykowych trzustki skutkującym aktywacją enzymów trzustki w jej obrębie. Aktywne enzymy prowadzą do samotrawienia trzustki i okolicznych tkanek. Liza tkanek wyzwala bardzo silną reakcję miejscową, w której biorą udział liczne mediatory (chemokiny, cytokiny, składniki dopełniacza, prostaglandyny) oraz komórki zapalne (neutrofile, eozynofile, monocyty, makrofagi i limfocyty). W niektórych przypadkach miejscowy proces zapalny wymyka się spod kontroli organizmu, prowadząc do uogólnionej reakcji zapalnej (ang. *Systemic Inflammatory Response Syndrome* - SIRS) i zespołu niewydolności wielonarządowej (ang. *Multiple Organ Dysfunction Syndrome* - MODS). W przebiegu ciężkiej postaci ostrego zapalenia trzustki może dojść do niewydolności układu oddechowego, niewydolności nerek, niewydolności układu krążenia i zaburzeń krzepnięcia krwi. W około 17% przypadków ciężka postać OZT kończy się śmiercią [3].

2.2.1 Etiologia ostrego zapalenia trzustki

Ostre zapalenie trzustki może być wyzwolone przez każdy czynnik, który uszkadza komórkę pęcherzykową trzustki i upośledza wydzielanie enzymów. W przeważającej większości przypadków (około 80%) choroba jest następstwem kamicy żółciowej, bądź spożycia nadmiernej ilości alkoholu (tabela 1), w około 10% przypadków przyczyna OZT jest niemożliwa do ustalenia – mówimy wówczas o idiopatycznym ostrym zapaleniu trzustki [4].

Tabela 1. Przyczyny ostrego zapalenia trzustki ([4–14] w modyfikacji własnej)

Mechaniczne	Kamienie żółciowe, błoto żółciowe, glistnica, uchyłek brodawki, rak trzustki, rak brodawki, zwężenie brodawki, zwężenie lub niedrożność dwunastnicy
Toksyczne	Etanol, metanol, jad skorpiona, zatrucie fosforoorganiczne
Metaboliczne	Hiperlipidemia (typy I, IV, V), hiperkalcemia
Leki	Didanozyna, pentamidyna, metronidazol, stiboglukonian, tetracykliny, furosemid, tiazydy, sulfasalazyna, kwas 5-aminosalicylowy, L-asparaginaza, azatiopryna, kwas walproinowy, sulindak, salicylany, wapń, estrogen
Zakażenie	Wirusy: świnki, Cocksackie, zapalenia wątroby typu B, cytomegalii, ospy wietrznej-półpaśca, opryszczki pospolitej, ludzki wirus niedoboru odporności Bakterie: <i>Mycoplasma</i> , <i>Legionella</i> , <i>Leptospira</i> , <i>Salmonella</i> Grzyby: <i>Aspergillus</i> Pasożyty: <i>Toxoplasma</i> , <i>Cryptosporidium</i> , <i>Ascaris</i>
Uraz	Tępy lub penetrujący uraz brzucha, jatrogenne uszkodzenie podczas zabiegu chirurgicznego lub endoskopowej cholangiopankreatografii (sfinkterotomia)
Wrodzone	Wrodzone wady rozwojowe trzustki - trzustka dwudzielna
Naczyniowe	Niedokrwienie, zator miażdżycowy, zapalenie naczyń (zapalenie guzkowe tętnic, toczeń rumieniowaty układowy)
Genetyczne	Mutacje: genu trypsynogenu kationowego (PRSS1): typ 1 - mutacja R122H i typ 2 - mutacja N29, genu CFTR (mukowiscydoza), genu SPINK1; niedobór α 1-antytrypsyny
Inne	Ciąża, transplantacja nerek

2.2.2 Czynniki indukujące ostre zapalenie trzustki

Pomimo występowania wielu różnorodnych czynników wywołujących OZT, tylko niewielka część pacjentów narażonych na ich działanie rozwija w pełni objawową chorobę. OZT obserwuje się u 3-7% pacjentów z kamicią żółciową, 10% alkoholików i niewielkim odsetku pacjentów z hiperkalcemią. W 1886 roku Chiari i wsp. na podstawie stwierdzonych zmian pozapalnych w trzustce w badaniach autopsyjnych postawili aktualną do dziś koncepcję o samostrawieniu narządu jako głównej przyczynie choroby. Za czynniki indukujące OZT uznaje się zatem czynniki prowadzące do przedwczesnej śródtrzustkowej aktywacji enzymów trawiennych. Działanie aktywnych enzymów oraz zwiększone ciśnienie w przewodach trzustkowych jako skutek ich niedrożności może uszkodzić komórki pęcherzykowe trzustki. Powoduje to uwolnienie aktywnych proteaz i innych enzymów do mięszu trzustki powodując dalszą kaskadę zdarzeń typowych dla OZT. Obecnie coraz więcej wiadomo na temat łańcucha zjawisk następujących po uwolnieniu aktywnych enzymów z komórek pęcherzykowych, jednak mechanizm indukcji OZT, czyli aktywacji proenzymów na poziomie komórkowym pozostaje ciągle niejasny.

- Kamica żółciowa

Rozwój OZT w przebiegu kamicy żółciowej inicjują przeważnie dwa procesy - zarzucanie żółci do przewodu trzustkowego w momencie przejścia kamieni żółciowych (chwilowa blokada brodawki Vatera) oraz wtórna niedrożność brodawki w postaci jej obrzęku (skutek pasażu złogów żółciowych). U pacjentów po cholecystektomii z powodu kamicy pęcherzyka żółciowego ryzyko OZT zmniejszyło się 3-7 krotnie, a u pacjentów po incydencie OZT wykonanie tego zabiegu zmniejszyło ryzyko ponownego rozwinięcia OZT niemal do wartości ryzyka populacyjnego [9]. W przypadku zaklinowania się kamienia żółciowego w brodawce, obrzęk i ogniskowa martwica trzustki rozwija się już po 3 godzinach. Usunięcie złogu i odblokowanie brodawki w ciągu 24 godzin zmniejsza ryzyko rozwoju OZT do 6%, w przypadku zwłoki ponad 48 godzin, ewolucję OZT obserwuje się u 90% przypadków [9]. Zwiększone ryzyko rozwoju OZT dotyczy pacjentów z współistniejącym zakażeniem bakteryjnym żółci. Endotoksyny bakteryjne powodują uwolnienie cytokin i nasilenie odczynu zapalnego prowadzącego do uszkodzenia komórki pęcherzykowej [9].

- Alkohol

Czynnikiem toksycznym wywołującym OZT jest etanol, który ulega utlenieniu do aldehydu octowego, a następnie do kwasu octowego. Za działania toksyczne najbardziej odpowiedzialny jest aldehyd octowy. Zaproponowano kilka mechanizmów szkodliwego działania etanolu w trzustce [10]:

- uczulenie komórek groniastych na cholecystokininę wywołane przedwczesną aktywacją proenzymów,
- nasilenie działania cholecystokininy w kierunku aktywacji czynników transkrypcyjnych, jądrowego czynnika kappaB - NF-kB (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) i aktywacji kompleksu białek transkrypcyjnych AP-1 (ang. *activation protein 1*),
- wytwarzanie toksycznych metabolitów, takich jak aldehyd octowy i estry etylowych kwasów tłuszczowych (FAEE, ang. *fatty acid ethyl esters*),
- uczulenie trzustki na toksyczne działanie wirusa Cocksackie B3,
- aktywacja trzustkowych komórek gwiaździstych poprzez aldehyd octowy i stres oksydacyjny, a następnie zwiększenie produkcji kolagenu i innych białek macierzy,
- obrzęk brodawki Vatera i zarzucenie treści z dwunastnicy do przewodów trzustkowych w wyniku działania etanolu. W takim przypadku działa równocześnie kilka czynników uszkadzających komórki pęcherzykowe trzustki: zwiększone ciśnienie w przewodach trzustkowych, żółć, bakterie i ich endotoksyny (lipopolisacharydy) oraz FAEE.

- Hiperlipidemia - (hipertriglicerydemia).

Wewnątrz kapilar trzustki lipaza uwalnia z triglicerydów surowicy wolne kwasy tłuszczowe (FFA) w toksycznych stężeniach [11]. Koncentracja FFA jest szczególnie niebezpieczna, gdy stężenie trójglicerydów w surowicy przekracza 1000 mg%. Takie wartości dotyczą zwykle pacjentów z hiperlipidemią typu I, IV i V.

- Genetyczne mutacje

Szereg mutacji genetycznych może prowadzić do przedwczesnej aktywacji zymogenów w obrębie trzustki; prawdopodobnie ten mechanizm występuje u pacjentów z OZT o charakterze dziedzicznym (ang. *hereditary pancreatitis* – HP). Definicja dziedzicznego zapalenia trzustki jest definiowane jako występowanie co

najmniej dwóch osób z zapaleniem trzustki w co najmniej dwóch pokoleniach tej samej rodziny (wzorzec dziedziczenia autosomalnie dominujący) lub zapalenie trzustki związane z inną rozpoznaną chorobą o charakterze dziedzicznej mutacji [12].

- Mutacje genu PRSS1 i SPINK1

Mutacja genu kodującego kationowy tripsynogen – proteazy serynowej 1 (ang. *protease serine 1* – PRSS1) jest związana z typem autosomalnie dominującego dziedzicznego zapalenia trzustki, który charakteryzuje się nawracającymi epizodami OZT. Opisano dwie najczęściej występujące mutacje genu PRSS1: R122H i N29 – obie zwiększają przemianę tripsynogenu do aktywnej tripsyny w komórkach pęcherzykowych trzustki lub ograniczają proces degradacji aktywnej tripsyny. W rezultacie zwiększa się ilość aktywnej tripsyny wewnątrz trzustki, która aktywuje inne zymogeny, powoduje bezpośrednie uszkodzenie mięszu trzustki oraz aktywuje układ immunologiczny prowadząc do rozwoju zapalenia trzustki [13].

Udowodniono, że ekspresja genu PRSS1, zarówno typu dzikiego jak i zmutowanego, może wywołać spontaniczne zapalenie trzustki w modelu zwierzęcym oraz zwiększa wrażliwość na indukcję ceruleiną. Rozwój OZT na skutek zwiększonej ekspresji genu PRSS1 jest związany w większej mierze z apoptozą komórek pęcherzykowych niż ich martwicą [15].

Dziedziczne zapalenie trzustki zależne od mutacji PRSS1 ma progresywny przebieg. Zaczyna się od nagłego epizodu OZT trwającego do 6 miesięcy, następnie pojawia się co najmniej 1 nawrót OZT i ostatecznie przechodzi w fazę przewlekłą utrzymującą się powyżej 6 miesięcy. Cechą charakterystyczną HP jest wczesny początek – faza ostra pojawia się już w wieku 10 lat, natomiast przewlekła w 20 roku życia. Z powodu wieloletniego trwania przewlekłego zapalenia trzustki (PZT), stopniowo wzrasta u tych chorych ryzyko rozwoju raka trzustki, szczególnie po 50 r.ż.

Wewnętrzna aktywacja tripsynogenu może też być związana z utratą funkcji zmutowanych genów kodujących określone białka [16, 17]:

- inhibitor tripsyny wydzielany przez trzustkę (gen SPINK1),
- chymotrypsyna C (gen CTSC),
- receptor wapnia zewnątrzkomórkowego (gen CaSR),
- błonowy regulator przewodnictwa (gen CFTR).

Inhibitor trypsyny wydzielany przez trzustkę PSTI (ang. *pancreatic secretory trypsin inhibitor*), zwany inaczej inhibitorem proteaz serynowych typu Kazal-1 SPINK1 (ang. *serine protease inhibitor Kazal-type 1*), jest częścią mechanizmów obronnych komórek pęcherzykowych trzustki przed wewnątrztrzustkową aktywacją zymogenów. PSTI może zahamować do 20% aktywności trypsyny i osłabienie jego aktywności przez mutację genu SPINK1 może prowadzić do zapalenia trzustki [18, 19].

- Mutacje genu CFTR (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* - błonowy regulator przewodnictwa - białko mukowiscydozy)

Wpływ mutacji CFTR na rozwój OZT nie został w pełni wyjaśniony. Prawdopodobnie poprzez obniżenie pH wewnątrzkomórkowego i zaburzenie transportu błonowego, większe zagęszczenie i niższe pH soku trzustkowego prowadzi do niedrożności przewodu trzustkowego i zaburzeń funkcji komórek pęcherzykowych. Mutacje co najmniej jednego allelu CFTR wykazano w przybliżeniu u 3 - 16 % pacjentów z idiopatycznym przewlekłym i ostrym nawracającym zapaleniem trzustki oraz u 21% pacjentów z trzustką podzieloną [14, 20]. Częstość mutacji CFTR w OZT na tle kamicy żółciowej i w przewlekłym zapaleniu trzustki związanej z alkoholem (0 - 5%) nie jest większa niż w populacji ogólnej. Diagnostyczne, prognostyczne i terapeutyczne znaczenie tych badań wymaga jeszcze sprecyzowania. Jest możliwe, że mutacje CFTR są odpowiedzialne za OZT u pacjentów z trzustką dwudzielną i z zaburzeniami działania zwieracza Oddiego. Większość pacjentów, u których mutacja została zidentyfikowana miała normalny poziom chlorków w pocie, co podważa funkcjonalne znaczenie mutacji [20].

2.2.3 Częstość występowania, śmiertelność i przebieg ostrego zapalenia trzustki

Częstość występowania i śmiertelność w OZT jest trudna do oszacowania. Łagodne zapalenie trzustki może przebiegać subklinicznie co utrudnia właściwe rozpoznanie schorzenia, a OZT w postaci ciężkiego i piorunującego ataku może doprowadzić do zgonu przed postawieniem diagnozy. Podawana roczna częstość występowania ostrego zapalenia trzustki waha się w różnych częściach świata od 4,9 do 44 przypadków na 100 000 ludności [21]. W ostatnich latach częstość

występowania ostrego zapalenia trzustki wzrasta w wielu krajach na całym świecie, a kamica żółciowa staje się jego dominującą przyczyną [22]. Może być to następstwem epidemii otyłości i związanym z nią częstszym występowaniem kamicy żółciowej. Ponadto poszerzają się możliwości diagnostyczne oraz wiedza lekarzy w rozpoznawaniu zapalenia trzustki, co doprowadziło także do spadku liczby zgonów w przebiegu OZT, zwłaszcza u osób z ciężkim, martwiczym zapaleniem trzustki. W wieloośrodkowym prospektywnym badaniu na grupie 1005 pacjentów z ostrym zapaleniem trzustki odnotowano ogólną śmiertelność na poziomie 5% (1,5% w łagodnej postaci ostrego zapalenia trzustki, a 17% w ciężkim zapaleniu trzustki) [3]. Śmiertelność w ostrym zapaleniu trzustki dotyczy głównie chorych, u których w okresie pierwszych dwóch tygodni rozwinęły się MODS oraz SIRS. Zgony w późniejszym okresie dotyczyły przypadków sepsy i jej powikłań [23].

Wyróżnia się dwa okresy w przebiegu OZT - wczesny, trwający do 2 tygodni i późny, który może trwać kilka tygodni lub miesięcy. We wczesnym okresie może dojść do uogólnionej odpowiedzi organizmu na kaskadę cytokin przejawiającej się jako SIRS i/lub zespół kompensacyjnej odpowiedzi przeciwzapalnej (CARS, ang. *Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome*) doprowadzający do MODS. Późny okres OZT charakteryzuje się objawami trwającego stanu zapalnego, powikłań miejscowych i układowych prowadzących do przejściowej lub przewlekłej niewydolności narządów. Późny okres OZT definiuje umiarkowanie ciężki lub ciężki stopień OZT [24].

Uwzględniając przebieg kliniczny oraz wyniki badań radiologicznych wyróżniamy dwie postacie ostrego zapalenia trzustki - śródmiąższowe obrzękowe zapalenie trzustki i martwicze zapalenie trzustki. Śródmiąższowe OZT występuje częściej - dotyczy 80–90% chorych na OZT i ma łagodniejszą postać. W badaniach obrazowych stwierdza się rozlane lub rzadziej ograniczone powiększenie trzustki z zatarciem struktury i granic jej miąższu oraz tkanek okołotrzustkowych spowodowane obrzękiem zapalnym. Ta postać OZT ustępuje w ciągu tygodnia.

Martwicze zapalenie trzustki jest postacią OZT o cięższym przebiegu i gorszym rokowaniu. Rozpoznanie opiera się na stwierdzeniu w badaniu obrazowym (tomografii komputerowej z kontrastem) martwicy tkanki trzustkowej i/lub tkanek okołotrzustkowych. Martwica miąższu trzustki przebiega ciężiej niż martwica ograniczona do tkanek okołotrzustkowych [25, 26].

Celem optymalizacji postępowania u pacjentów z rozpoznanym OZT wprowadzono trzystopniową klasyfikację ciężkości OZT: łagodne, umiarkowane i ciężkie OZT [24, 27].

W łagodnym OZT stan zapalny szybko ustępuje, zwykle w ciągu tygodnia, rzadko dochodzi do zgonu. Nie dochodzi do niewydolności narządowej, nie stwierdza się powikłań miejscowych i ogólnoustrojowych. W umiarkowanym OZT pojawia się przemijająca niewydolność narządowa (ustępująca w ciągu 48 godzin) i/lub występują powikłania miejscowe bądź ogólnoustrojowe. W porównaniu z łagodnym OZT większa jest chorobowość i śmiertelność (<8%). Chorzy mogą wymagać dłuższej hospitalizacji z powodu powikłań [28].

Przetrwiała niewydolność narządowa (powyżej 48 godzin) dotycząca co najmniej jednego układu definiuje ciężkie OZT, które może wystąpić we wczesnej lub późnej fazie choroby, Chorzy z ciężkim OZT rozwijającym się we wczesnej fazie mają największe ryzyko zgonu (do 55%) [29]. Wystąpienie niewydolności narządowej lub zakażonej martwicy związane jest z bardzo dużą śmiertelnością (30 - 32%), wystąpienie jednocześnie niewydolności narządowej i zakażonej martwicy zwiększa ryzyko zgonu do 43% [30].

2.2.4 Faza wczesna ostrego zapalenia trzustki

Zewnątrzwydzielnicza czynność trzustki polega na syntezie i wydzielaniu enzymów trawiennych, które zwykle ulegają aktywacji w dwunastnicy. Niewielkie ilości tripsynogenu ulegają spontanicznej aktywacji wewnątrz trzustki - dlatego narząd ten posiada mechanizmy ochronne, które szybko usuwają aktywowaną tripsynę:

- pierwszą linią obrony jest inhibitor tripsyny (PSTI, SPINK1), który wiąże i inaktywuje około 20% aktywności tripsyny [31, 32]
- drugą linią obrony jest autoliza przedwcześnie aktywnej tripsyny. Brak tego mechanizmu może być odpowiedzialny za dziedziczną postać OZT
- inny mechanizm obronny angażuje mezotripsynę i enzym Y, które rozkładają i dezaktywują tripsynę.
- kolejnym elementem są niespecyficzne inhibitory proteaz, takie jak alfa-1 antytrypsyna oraz alfa-2-makroglobuliny, które występują w tkance śródmiąższowej trzustki.

Dotychczasowe badania potwierdzają, że zasadniczym elementem indukcji OZT jest wewnątrzpęcherzykowa aktywacja enzymów proteolitycznych oraz blokada wydzielania enzymów przy ciągle trwającej ich syntezie, co w efekcie prowadzi do samostrawienia tkanki trzustkowej [33]. Te niszczące zdarzenie występuje bardzo wcześnie, co umożliwia generowanie dużej ilości aktywnej trypsyny w trzustce. W niestabilnych wakuolach komórki pęcherzykowej obserwuje się kolokalizację dwóch grup enzymów: enzymów lizosomalnych (katepsyna B) i enzymów trawiennych (trypsynogen), które w normalnych warunkach są posortowane przez aparat Golgiego. Katepsyna B odczepia peptyd aktywacyjny trypsynogenu wewnątrz wakuoli, które pękają i uwalniają aktywną trypsynę. Wewnątrztrzustkowe uwolnienie trypsyny prowadzi do aktywacji dalszych trypsyn i innych proenzymów trzustkowych - fosfolipazy, chymotrypsyny i elastazy. Naturalne mechanizmy obronne trzustki nie nadążają z inaktywacją tak dużej ilości enzymów. Trypsyna aktywuje również inne kaskady enzymatyczne - układu dopełniacza, kalikreina-kininy, krzepnięcia i fibrynolizy. Wewnątrztrzustkowe uwalnianie aktywnych enzymów prowadzi do powstania błędnego koła, w którym aktywne enzymy uszkadzają komórki, z których uwalnia się jeszcze więcej aktywnych enzymów. Proces samostrawienia rozprzestrzenia się poza gruczoł do tkanek okołotrzustkowych. Sok trzustkowy z aktywowanymi enzymami niszczy tkanki przestrzeni zaotrzewnowej, a wnikać zgodnie z siłą grawitacji potrafi rozprzeszczyć się przez kanał pachwinowy nawet na kończynę dolną (doświadczenie własne).

Ceruleina - analog cholecystokininy stosowany do indukcji OZT u zwierząt doświadczalnych, podawany w dużych dawkach szczurom powoduje już po 10 minutach aktywację trypsynogenu wewnątrz trzustki. Udowodniono, że w następstwie biochemicznego lub morfologicznego urazu komórek pęcherzykowych dochodzi do aktywacji trypsynogenu. W modelu *in vitro* zaobserwowano, że całkowite zahamowanie aktywności katepsyny B trzustki przy zastosowaniu E-64d (silnego i specyficznego nieodwracalnego inhibitora katepsyny B) zapobiega aktywacji trypsynogenu po indukcji ceruleiną [34]. To doświadczenie potwierdza znaczenie katepsyny B w aktywacji trypsynogenu i znaczenie kolokalizacji trzustkowych enzymów trawiennych i hydrolaz lizosomalnych. Ponadto, sugeruje, że całkowite hamowanie katepsyny B może być korzystne zarówno w profilaktyce, jak i w leczeniu ostrego zapalenia trzustki. Innym

mechanizmem obserwowanym we wczesnej fazie po indukcji OZT jest wzrost stężenia wapnia i spadek pH wewnątrz komórek pęcherzykowych trzustki, co może prowadzić do przedwczesnej aktywacji trypsynogenu i zwiększenia ekspresji NF- κ B oraz aktywowania kompleksu AP-1. Aktywacja NF- κ B poprzez ścieżkę sygnałową Jak2/Stat3 indukuje ekspresję genów odpowiedzialnych za proces zapalny i apoptozę w komórkach pęcherzykowych trzustki. Hamowanie NF- κ B i Jak2/Stat3 może złagodzić stan zapalny i apoptozę komórek pęcherzykowych trzustki w OZT [35].

Uwolnione aktywne enzymy trzustkowe uszkodzają nie tylko komórki pęcherzykowe, ale również śródbłonek naczyń i istotę międzykomórkową. Modele doświadczalne OZT już we wczesnej fazie wykazują zmiany w mikrokrażeniu, takie jak skurcz naczyń, zastój kapilarny, zmniejszenie wysycenia tlenem i postępujące niedokrwienie [36]. Powodują one zwiększoną przepuszczalność naczyń i obrzęk (obrzękowa postać OZT), co prowadzi do niewydolności mikrokrażenia i wzmocnienia procesu uszkodzenia trzustki. Kilku badaczy wykazało, że uraz typu niedokrwienie - reperfuzja jest ważnym mechanizmem patofizjologicznym w rozwoju OZT [37]. Różne okresy niedokrwienia mogą powodować OZT, jednak z powodu indywidualnych różnic w unaczynieniu trzustki oraz tolerancji niedokrwienia, wyniki badań doświadczalnych są zmienne. Wiadomo, że niewydolność mikrokrażenia w trzustce prowadzi do powstawania zakrzepów w kapilarach z aktywacją leukocytów i uwalniania enzymów proteolitycznych i cytokin prozapalnych, jednakże główne uszkodzenia tkanek są indukowane przez reperfuzję z uwolnieniem wolnych rodników. Znaczenie upośledzenia mikrokrażenia w patogenezie OZT może mieć zastosowanie kliniczne w postaci agresywnej płynoterapii w leczeniu OZT, która minimalizuje to zaburzenie [37].

Mikroskopowe i radioizotopowe badania z użyciem leukocytów znakowanych Indem-111 wykazują znaczną inwazję makrofagów i leukocytów wielojądrzastych we wczesnych etapach OZT u ludzi i zwierząt [38]. Aktywacja dopełniacza i następnie uwolnienie komponentu C5a, odgrywa istotną rolę w rekrutacji tych komórek zapalnych. Ponadto istnieją również pewne dowody na to, że komponent C5a wywiera także działanie przeciwzapalne w OZT, dlatego efekt działania komponentu C5a dopełniacza nie jest jasny [39]. Aktywacja granulocytów i makrofagów powoduje uwalnianie reaktywnych form tlenu oraz enzymów proteolitycznych i lipolitycznych, a także wielu cytokin pozapalnych, takich jak

czynnik martwicy nowotworu (TNF, ang. *tumor necrosis factor*), interleukiny 1, 6 i 8, prostaglandyny, czynnik aktywujący płytki krwi oraz leukotrieny. Substancje te wpływają również na mikrokążenie trzustki zwiększając przepuszczalność naczyń oraz indukując zakrzepicę i krwotok, co prowadzi do martwicy krwotocznej trzustki.

Aktywowane enzymy trzustkowe, niewydolność mikrokążenia i uwalnianie mediatorów zapalnych prowadzi do gwałtownie narastającego uszkodzenia mięszu trzustki i martwicy. Interakcje między tymi mechanizmami utrudniają ocenę indywidualnego znaczenia każdego z elementów.

Białko szoku cieplnego, angiotensyna II, substancja P oraz cyklooksygenaza 2 są opisane jako patogenetyczne czynniki doświadczalnego modelu OZT, a białko szoku cieplnego jest jedynym czynnikiem ochronnym [40].

2.2.5 Odpowiedź uogólniona

W dalszym przebiegu OZT aktywowane enzymy trzustkowe i cytokiny uwolnione do kążenia powodują uogólnioną reakcję zapalną (SIRS) [41] oraz mogą doprowadzić do wystąpienia zespołu ostrej niewydolności oddechowej (ang. *acute respiratory distress syndrome* - ARDS), która może być też wtórna do zakrzepicy w mikrokążeniu, jak i działania aktywowanej fosfolipazy na surfaktant. Uwalniane z trzustki naczyniowo aktywne peptydy i czynnik uszkodzający mięsień sercowy (ang. *myocardial depressant factor*, MDF) mogą spowodować upośledzenie funkcji, a nawet zawał mięśnia sercowego. Tworzenie mydła poprzez wiązanie wapnia z kompleksami wolnych kwasów tłuszczowych i albumin, zaburzenia hormonów gospodarki wapniowej oraz przemieszczanie wapnia do komórki powoduje hipokalcemię. Inne powikłania metaboliczne obejmują hiperlipidemię, hiperglikemię z kwasicą ketonową lub hipoglikemię. Hipowolemia i spadek ciśnienia tętniczego może doprowadzić do ostrej niewydolności nerek. Wyżej wymienione powikłania ogólnoustrojowe są rzadkie i znacznie łżejsze u pacjentów z postacią obrzękową OZT w porównaniu do martwiczego OZT. Około 50 % pacjentów z martwiczym OZT rozwija niewydolność wielonarządową (ang. *multiorgan failure*, MOF), jednakże na podstawie stopnia martwicy trzustki lub obecności zakażonej martwicy nie udaje się przewidzieć, który z pacjentów rozwinie MOF [42]. Jedno z badań sugeruje, że zwiększenie stężenia tkankowego czynnika hamowania migracji

makrofagów jest czynnikiem krytycznym w patogenezie ciężkiego ostrego zapalenia trzustki [43].

2.2.6 Bakteryjna translokacja

W warunkach fizjologicznych bariera zbudowana z elementów morfologicznych, immunologicznych zapobiega translokacji bakterii do układu krążenia. W przebiegu OZT wskutek niedokrwienia dochodzi do uszkodzenia bariery jelitowej i translokacji bakterii. Za większość infekcji w OZT odpowiedzialne są typowe bakterie jelitowe. W psich modelach OZT, *Escherichia coli* znakowana plazmidem pUC4K, po kolonizacji jelit została znaleziona w trzustce oraz węzłach chłonnych krezkowych [44]. Konsekwencje translokacji bakterii z jelita w OZT mogą być śmiertelne. Lokalna infekcja bakteryjna tkanek trzustki i okołotrzustkowych występuje u około 30 procent pacjentów z ciężkim OZT, potencjalnie prowadząc do niewydolności wielonarządowej i jej następstw. Dlatego obecnie trwają badania nad próbą utrzymania funkcji bariery jelitowej w przewodzie pokarmowym. Najbardziej korzystne wydaje się żywienie dojelitowe, szczególnie produktami zawierającymi glutaminę, co wiąże się ze zmniejszoną translokacją bakterii w modelu zwierzęcym OZT i wydaje się być korzystne u ludzi z OZT [45].

2.2.7 Stres oksydacyjny

Istnieje wiele dowodów na to, iż stres oksydacyjny związany jest z patogenezą ostrego zapalenia trzustki [46]. Doświadczenia przeprowadzone na różnych modelach OZT zgodnie wykazują w trzustce wzrost stężenia produktów utleniania lipidów i białek - aldehydów i karbonyli oraz spadek stężenia glutationu w przebiegu OZT. W badaniach przeprowadzonych na modelach eksperymentalnych zaobserwowano, że przeciwutleniacze łagodzą zapalenie trzustki [47].

Mechanizm powstawania reaktywnych form tlenu (RFT) w OZT pozostaje ciągle niejasny. Proponuje się, iż oksydaza fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH, ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) odgrywa istotną rolę w tworzeniu RFT [48]. Ponadto, wiele przeprowadzonych badań udowodniło, że również oksydaza ksantynowa może być źródłem RFT. Komórki groniaste trzustki wykazują istotny wzrost poziomu RFT już

po 15 min traktowania ceruleiną. Efekt ten nie jest obserwowany w komórkach transfekowanych antysensownymi oligonukleotydami przeciwko mRNA zaprojektowanymi dla podjednostek oksydazy NADPH [48].

2.3 Reaktywne formy tlenu

Reaktywne formy tlenu (RFT) to reaktywne indywidua chemiczne zawierające w swoim składzie atomy tlenu z niesparowanym elektronem (rodniki) lub wiązania O–O. Ze względu na naturalną tendencję do posiadania pary elektronów RFT są wyjątkowo aktywne i zdolne są do uczestniczenia w reakcjach chemicznych, które odgrywają znaczącą rolę w metabolizmie i starzeniu się organizmów żywych. Niektóre RFT mogą powstawać w czasie reakcji biochemicznych w żywych organizmach, inne powstają w układach nieożywionych [49, 50]. W szczególnych sytuacjach stężenie RFT może gwałtownie wzrosnąć powodując uszkodzenie struktur komórkowych. Proces ten nazywany jest stresem oksydacyjnym.

2.3.1 Powstawanie reaktywnych form tlenu

Do RFT należą wolne rodniki tlenowe:

- anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet -}$),
- rodnik wodoronadtlenowy ($HO_2^{\bullet}$),
- rodnik wodorotlenowy (hydroksylowy) ($^{\bullet}OH$),

wolne rodniki azotowe:

- tlenek azotu ($NO^{\bullet}$),
- dwutlenek azotu ($NO_2^{\bullet}$),
- nadtlendioazotyn ($ONOO^-$)

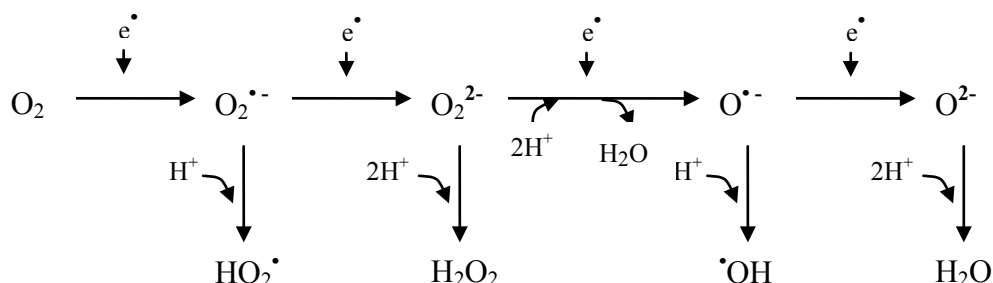
oraz formy nie będące wolnymi rodnikami (nie posiadają niesparowanego elektronu):

- tlen singletowy (1O_2),
- nadtlenek wodoru (H_2O_2),
- ozon (O_3).

Za RFT uważa się także kompleksy tlenu i żelaza: rodnik ferrylowy (FeO^{2+}) i rodnik nadferrylowy (FeO^{3+}). Do rodziny rodników tlenowych związanych

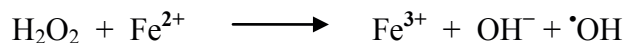
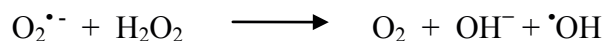
z substancjami organicznymi należą: rodnik alkoksylowy ($\text{RO}^\bullet$) i nadtlenny ($\text{ROO}^\bullet$), rodnik semichinonowy ($\text{H-Ch}^\bullet$) i anionorodnik semichinonowy ($\text{Ch}^{\bullet-}$) oraz formy pokrewne RFT o charakterze nierodnikowym, takie jak kwas podjodawy (IOH), kwas podchlorawy (ClOH), kwas podbromawy (BrOH) i inne [51].

Podstawowa forma tlenu cząsteczkowego - tlen trypletowy (3O_2) jest podwójnym wolnym rodnikiem - posiada dwa niesparowane elektrony. W warunkach fizjologicznych tlen cząsteczkowy ulega czteroelektronowej redukcji w mitochondrialnych łańcuchach transportu elektronów tworząc w końcowym etapie dwie cząsteczki wody. Na każdym etapie redukcji powstają formy pośrednie posiadające pewną ilość niesparowanych elektronów będące RFT (**Rycina 1**).



Rycina 1. Kolejne cząsteczki w procesie powstawania reaktywnych form tlenu: tlen cząsteczkowy (O_2), anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\bullet-}$), anion ponadtlenkowy (O_2^{2-}), rodnik tlenkowy ($\text{O}^\bullet$), anion tlenkowy (O^{2-}), nadtlenek wodoru (H_2O_2), rodnik wodoronadtlenowy ($\text{HO}_2^\bullet$), rodnik wodorotlenowy ($\text{OH}^\bullet$), woda (H_2O)

Najbardziej niebezpieczny dla ludzkiego organizmu jest rodnik wodorotlenowy ($\text{OH}^\bullet$). Anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\bullet-}$) i nadtlenek wodoru (H_2O_2) są istotne ze względu na reakcję Habera-Weissa, w której powstaje rodnik wodorotlenowy ($\text{OH}^\bullet$). Reakcja Habera-Weissa przebiega wolno w warunkach fizjologicznych, dlatego głównym źródłem rodników wodorotlenowych w organizmie jest reakcja Fentona. Katalizatorami tej reakcji są kationy żelaza i miedzi, jak również kobaltu, niklu, manganu, chromu:



Wolne rodniki powstają w jednoelektronowych reakcjach redoks oraz w reakcjach homolizy, czyli rozerwania wiązania kowalencyjnego w cząsteczce z utworzeniem dwóch atomów lub rodników, co wymaga dużego nakładu energii (wysoka temperatura, promieniowanie, ultradźwięki). Może też dojść do addycji wolnego rodnika do cząsteczki w reakcji zwanej prolongacją, albo rozerwania wiązania między atomami w cząsteczce przekształcanej w wolny rodnik w reakcji eliminacji, czyli usuwania atomów z cząsteczki.

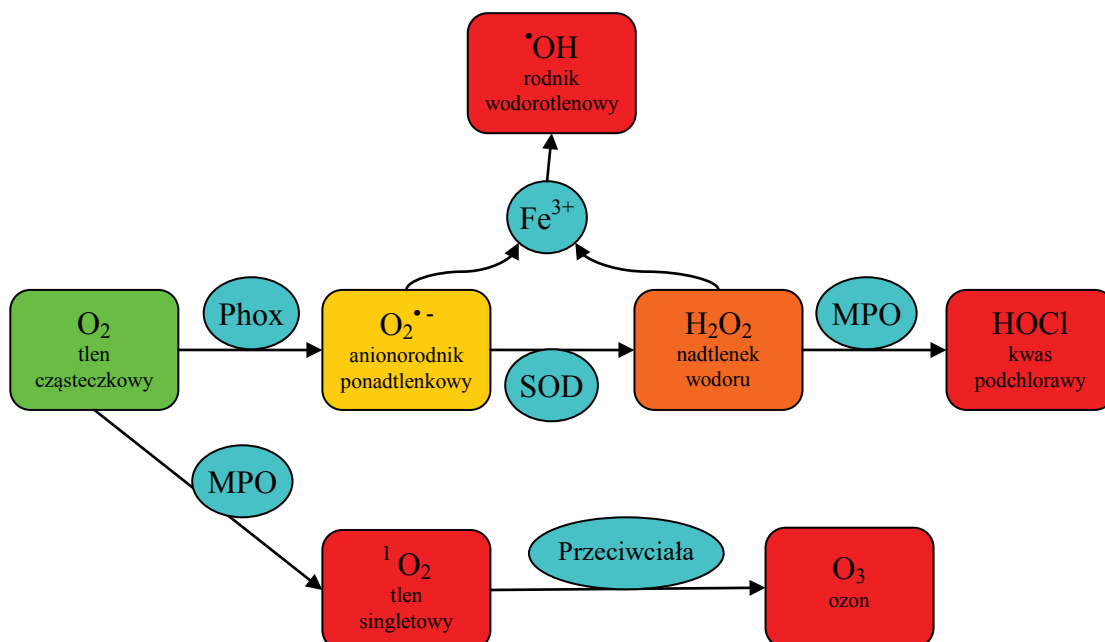
Tlen cząsteczkowy i wolne rodniki tlenowe mogą oddziaływać na substancje organiczne w komórce prowadząc do powstawania rodników białek, lipidów i kwasów nukleinowych, które istotnie zaburzają szlaki metaboliczne w komórce poprzez swoją niespecyficzną reaktywność.

W organizmach żywych RFT mogą powstawać pod wpływem czynników zewnętrznych, takich jak promieniowanie jonizujące i ultrafioletowe (światło słoneczne), ultradźwięki oraz niektóre substancje chemiczne (acetaminophen, czterochlorek węgla).

Wewnątrzpoходne źródła powstawania RFT zlokalizowane są wewnątrzkomórkowo, gdzie powstają podczas utleniania zredukowanych form szeregu związków przez tlen molekularny oraz w procesie wielu reakcji enzymatycznych.

W organizmach żywych najczęściej występujące RFT to anionorodnik ponadtlenkowy i rodnik wodorotlenkowy, które powstają w mitochondrialnym łańcuchu tlenowym. Enzymy komórek odpornościowych - oksydaza NADPH (NOX, ang. *NADPH oxidase*) i w fagocytach – Phox (ang. *phagocytic NADPH oxidase*) oraz mieloperoksydaza (MPO, ang. *myeloperoxidase*) redukują tlen cząsteczkowy tworząc anionorodnik ponadtlenkowy, a dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, ang. *superoxide dismutase*) redukuje anionorodnik ponadtlenkowy do nadtlenku wodoru. W obecności żelaza anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru tworzą rodnik wodorotlenkowy. Mieloperoksydaza neutrofili katalizuje reakcję tworzenia kwasu

podchloraowego z nadtlenku wodoru i chloru. MPO i Phox biorą też udział w tworzeniu tlenu singletowego, który może być przetworzony przez przeciwciała w ozon (O_3) (rycina 2) [52].



Rycina 2. RFT tworzone w procesach immunologicznych. Kodowanie koloru wskazuje na reaktywność poszczególnych cząsteczek (zielony: względna niereaktywność; żółty: ograniczona reaktywność; pomarańczowy: umiarkowana reaktywność; czerwony: wysoka reaktywność i niespecyficzność).

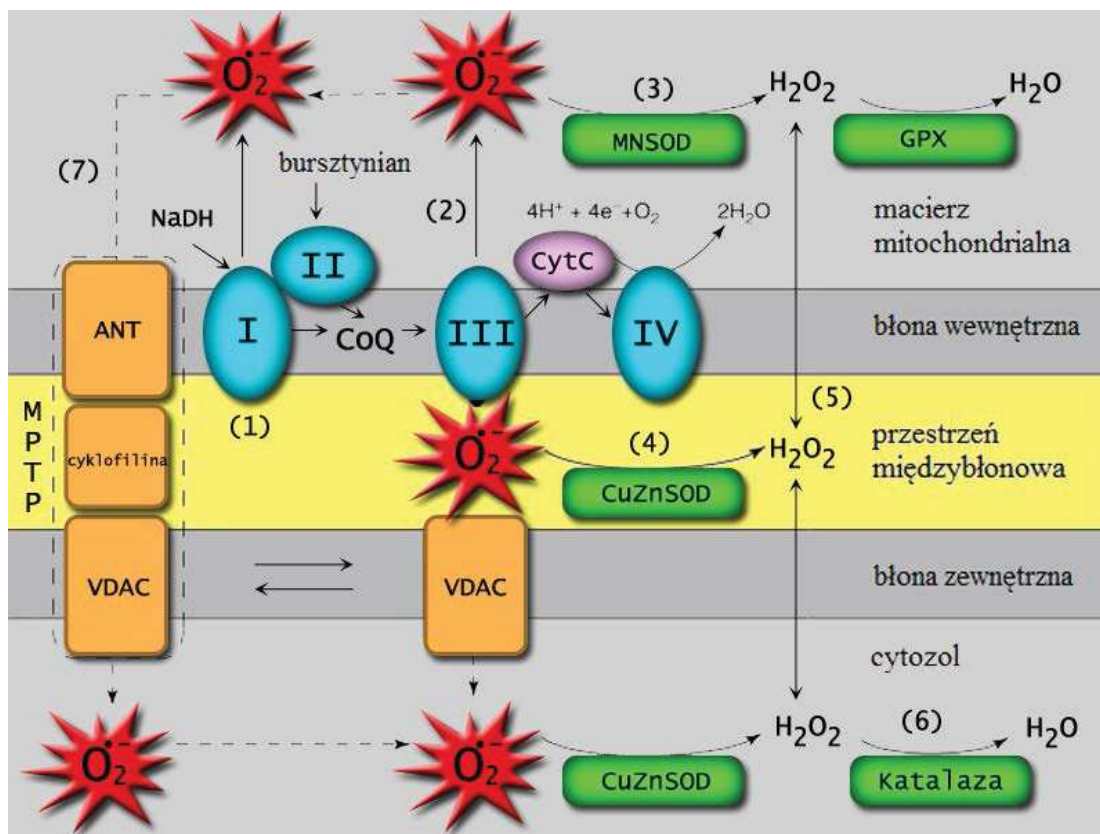
Główne źródła wewnątrzpo pochodnego powstawania RFT to:

- mitochondrialny transport elektronów (mitochondrialny łańcuch oddechowy),
- mikrosomalny transport elektronów (NADPH-zależna reduktaza i cytochrom P450),
- enzymy utleniające peroksysomów,
- fagocyty (neutrofile, eozynofile, komórki endotelium, monocyty, makrofagi).

2.3.2 Mitochondrialny transport elektronów

Większość RFT w komórce powstaje w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym. Tworzenie RFT w mitochondrium zależy w znacznej mierze od szybkości przepływu elektronów przez kompleksy łańcucha oddechowego. W warunkach hipoksji mitochondrialny łańcuch oddechowy wytwarza RFT, w tym tlenek azotu ($\text{NO}^\bullet$), który może tworzyć inne reaktywne formy azotu. Tworzenie wolnych rodników w warunkach hipoksji ma istotny wpływ na procesy zapalne, nowotworzenie i wiele innych stanów chorobowych.

Podczas oddychania większość tlenu redukuje się do wody, jednak ok. 1 - 2% zużytego tlenu nie ulega całkowitej redukcji tworząc anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\bullet-}$), który może generować rodnik wodoronadtlenowy ($\text{HO}_2^\bullet$), a także może być przekształcony w nadtlenek wodoru (H_2O_2). H_2O_2 w obecności jonów metali ciężkich (głównie Fe^{2+}) daje w reakcji Fentona jeszcze bardziej reaktywny rodnik wodorotlenowy ($^\bullet\text{OH}$). $\text{HO}_2^\bullet$ i $^\bullet\text{OH}$ reagują z białkami, mitochondrialnym DNA oraz inicjują proces peroksydacji lipidów. Wiele reakcji zachodzących w mitochondriach może skutkować powstawaniem RFT, jednak uważa się, że główne miejsce odpowiedzialne za niepełną redukcję tlenu to III kompleks łańcucha oddechowego (**rycina 3**) [53].



Rycina 3. Główne źródła mitochondrialnych RFT (opracowanie własne na podstawie [53])

Mitochondrialny łańcuch oddechowy znajduje się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i składa się z czterech kompleksów białkowo - enzymatycznych (I, II, III i IV), koenzymu Q (ubichinon, CoQ, ang. *coenzyme Q*, *ubiquinone*) i cytochromu C (CytC, ang. *cytochrome complex*)

Kompleks I (oksydoreduktaza NADH - CoQ) przyjmuje elektrony z NADH i kompleksu II (dehydrogenaza bursztynianowa). Elektrony przechodzą następnie w dół gradientu elektrochemicznego poprzez CoQ do kompleksu III (CoQ - oksydoreduktaza CytC), z kompleksu III do CytC, i dalej do kompleksu IV (oksydaza CytC), który wykorzystuje cztery elektrony redukując tlen cząsteczkowy do wody. Jednoelektronowa redukcja tlenu do anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) odbywa się głównie w kompleksach I i III.

Kompleks I (rycina 3 - 1) uwalnia $O_2^{\cdot-}$ do macierzy mitochondrialnej, natomiast kompleks III (rycina 3 - 2) uwalnia $O_2^{\cdot-}$ zarówno do macierzy mitochondrialnej jak i do przestrzeni międzybłonowej. Z przestrzeni międzybłonowej $O_2^{\cdot-}$ może przeniknąć do cytozolu wykorzystując kanał anionowy

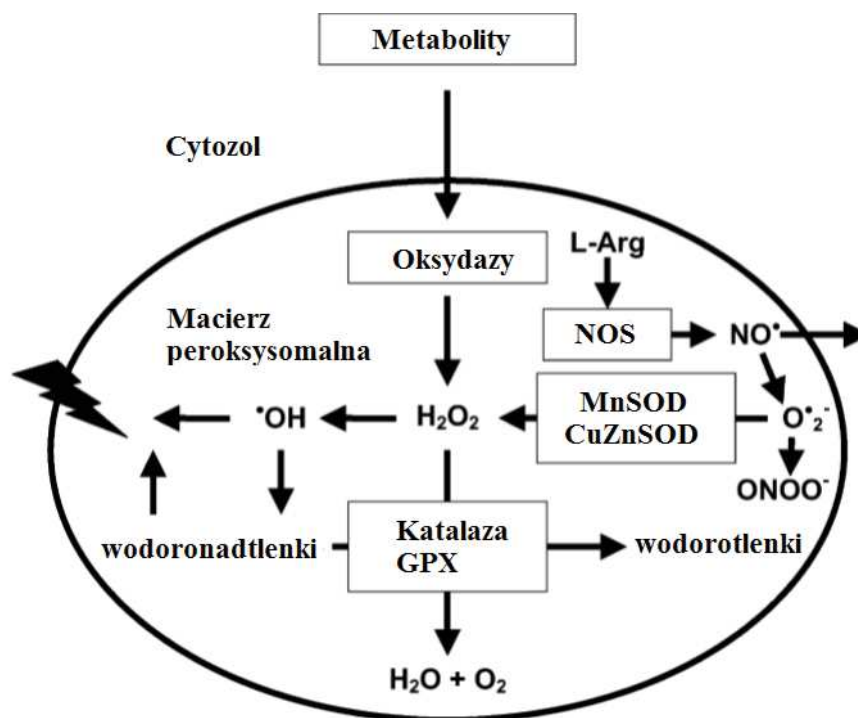
napięciowo- zależny (VDAC, ang. *voltage dependent anion channel*) umieszczony w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, natomiast z macierzy mitochondrialnej $O_2^{\bullet -}$ może przechodzić bezpośrednio do cytozolu poprzez kanał zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej (MPTP, ang. *mitochondrial permeability transition pore*) (**rycina 3 - 7**), który tworzą VDAC, cyklofilina D i translokaza nukleotydu adeniny (ANT, ang. *adenine nucleotide translocase*). Ta droga przyczynia się do śmierci komórek w zmianach martwiczych [53].

2.3.3 Mikrosomalny transport elektronów

Następnym źródłem RFT w komórce jest mikrosomalny łańcuch transportu elektronów. Ten kompleks enzymatyczny składa się z cytochromu P450 i reduktazy zależnej od NADPH. Kompleks ten uczestniczy w reakcjach hydroksylacji odpowiedzialnych za syntezę hormonów steroidowych i kwasów żółciowych oraz detoksykacji ksenobiotyków. Podczas przepływu elektronów przez mikrosomalny łańcuch transportu elektronów wytwarzany jest anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet -}$) i nadtlenek wodoru (H_2O_2) [54].

2.3.4 Enzymy utleniające peroksysomów

Ważnym źródłem RFT są enzymy utleniające wewnątrz peroksysomów: oksydaza D-aminokwasów, oksydaza α -hydroksykwasowa, oksydaza acylo-CoA, oksydaza moczanowa, oksydaza kwasu pipekolinowego oraz oksydaza poliamid. Ich głównym produktem jest nadtlenek wodoru (H_2O_2), który po przekształceniu w rodnik wodorotlenowy ($\cdot OH$) może uszkodzić błonę peroksysomu poprzez peroksydację lipidów. W peroksysomach powstaje też tlenek azotu ($NO^{\bullet}$) produkowany przez syntazę tlenku azotu (NOS, ang. *nitric oxide synthesis*) oraz anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet -}$) tworzony przez oksydazę ksantynową. NOS katalizuje utlenianie L-argininy (L-Arg) do $NO^{\bullet}$, który może reagować z $O_2^{\bullet -}$ tworząc nadtlendioazotyn ($ONOO^-$) (**rycina 4**) [55].



Rycina 4. Schemat produkcji i rozkładu RFT w peroksysomach (opracowanie własne na podstawie [55]).

2.3.5 Mechanizmy ochraniające komórki przed reaktywnymi formami tlenu

W procesie ewolucji zachowały się tylko te gatunki, które rozwinęły naturalne mechanizmy obronne przeciwko szkodliwym działaniom RFT [56]. Niskocząsteczkowe przeciwutleniacze, takie jak kwas askorbinowy (witamina C), kwas moczowy lub glutation również pełnią rolę ochronną przed stresem oksydacyjnym. Kolejnym naturalnym mechanizmem ochrony jest utrzymanie niskiej (ok. 26 mmHg) prężności tlenu w tkankach - co zapobiega powstawaniu anionorodników ponadtlenkowych. Najstotniejszym mechanizmem ochrony jest układ enzymów usuwających RFT z komórki, do którego należy dymutaza ponadtlenkowa (SOD, *superoxide dismutase*), katalaza (CAT, ang. *catalase*) i peroksydaza glutationu (GPx, ang. *glutathione peroxidase*) [57].

SOD została wyizolowana w 1939 r. przez Mann i Kielin, którzy początkowo nazwali ją hemokupreina [57] ze względu na połączenie z miedzią. SOD jest proteiną złożoną z 151 aminokwasów, jej masa cząsteczkowa to 32000 Daltonów, zawiera atomy miedzi i cynku [58]. SOD cieszyła się dużym zainteresowaniem ze względu

na jej ewentualne użycie w terapii. Nazwa dysmutaza ponadtlenkowa została po raz pierwszy użyta przez McCord i Fridovich w 1969 i wynika z jej aktywności enzymatycznej - zamiany anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) w tlen cząsteczkowy i nadtlenek wodoru (H_2O_2).

CAT i GPx katalizują reakcję usuwania nadtlenu wodoru do wody. Oba enzymy różnią się czułością – GPx aktywuje się w niskich stężeniach nadtlenu wodoru, zaś CAT przy wysokich stężeniach. Ten układ enzymatyczny zapobiega również powstawianiu rodnika wodorotlenkowego w reakcji Fentona i Haber – Weissa i dalszym reakcjom peroksydacji lipidów i uszkodzenia komórek.

W mitochondrialnym łańcuchu oddechowym SOD zależna od manganu (MnSOD) znajduje się w macierzy mitochondrialnej, a zależna od miedzi i cynku (CuZnSOD) zlokalizowana jest w przestrzeni międzybłonowej i w cytozolu (**rycina 3 - 4**). W wyniku ich działania $O_2^{\bullet-}$ tworzony przez kompleksy I i III (**rycina 3 - 3**) zmienia się w H_2O_2 , który jest obojętny elektrycznie i łatwo przenika przez błony mitochondriów do cytozolu (**rycina 3 - 5**). H_2O_2 może być rozkładany do wody przez CAT zlokalizowaną w cytozolu (**rycina 3 - 6**) lub GPx w macierzy mitochondrialnej [53].

Nadtlenek wodoru (H_2O_2) wytwarzany przez większość peroksysomalnych oksydaz może przekształcić się w rodnik wodorotlenowy ($\bullet OH$) lub ulec rozkładowi przez CAT lub GPx do wody. Wodoronadtlenki powstałe w peroksysomach mogą być również rozkładane przez CAT i GPx do wodorotlenków (**rycina 4**) [55].

Drobnocząsteczkowe przeciwutleniacze, do których zaliczamy szereg witamin (A,C,E,K), selen, glutamina, cysteina, cysteamina, ubichinon, kwas moczowy i metionina, stanowią drugą linię ochrony komórki przed RFT, a ich podstawowym działaniem jest zapobieganie toksycznym skutkom reakcji RFT na tkanki. Kolejną, trzecią linią komórkowej obrony jest cytochrom P450 [57].

W przestrzeni międzykomórkowej znajdują się nieznaczące ilości SOD, transferyny, glukozy, kwasu moczowego i ceruloplazminy, które wykazują pewną niewielką aktywność ochronną przed uszkodzającym działaniem RFT.

2.3.6 Uszkodzający wpływ reaktywnych form tlenu na tkanki

W warunkach stresu oksydacyjnego reakcje tworzenia RFT przeważają nad procesami ochronnymi, prowadząc do toksycznego działania RFT na pobliskie

cząsteczki, zwłaszcza fosfolipidy wchodzące w skład błon komórkowych. Dochodzi do powstania licznych nieprawidłowych połączeń krzyżowych (lipidowo-lipidowych, lipidowo-białkowych i białkowo-białkowych), utleniania aminokwasów oraz powstawania szczelin w części białkowej błon komórkowych. Prowadzi to do zaburzeń czynnościowych błon komórkowych, zaburzeń gradientu stężeń, wzrostu przepuszczalności, utraty potasu oraz akumulacji sodu i wapnia, a ostatecznie dezintegracji błony komórkowej i śmierci komórki [59]. Podobny efekt występuje w mechanizmie peroksydacji lipidów, czyli wolnorodnikowego procesu utleniania lipidów, w wyniku którego powstają nadtlenki lipidów. Produkty te zmieniają właściwości fizyczne błon komórkowych obniżając hydrofobowość lipidowego wnętrza błon i zaburzając ich asymetrię lipidową oraz hamując aktywność błonowych białek transportujących. Produkty pośrednie peroksydacji lipidów aktywują fosfolipazę A₂, która uwalnia kwas arachidonowy z fosfolipidów błon komórkowych, a następnie bierze udział w syntezie prostaglandyn, tromboksanu i leukotrienów (mediatory stanu zapalnego i zaburzeń krzepnięcia). RFT zarówno bezpośrednio jak i w mechanizmie peroksydacji lipidów stymulują powstawanie czynników chemotaktycznych nasilających zmiany zapalne [58]. Czynniki te pobudzają komórki fagocytyczne do naciekania tkanki objętej zapaleniem. Wśród tych komórek wyróżniamy leukocyty wielojądrzaste, makrofagi, komórki śródbłónka i monocyty, które w reakcji obronnej uwalniają dużą ilość anionodniaka nadtlenkowego i rodnika wodorotlenowego. W efekcie doprowadza to do niszczenia mikroorganizmów, ale równocześnie działania toksycznego na tkanki i śródbłonek naczyń poprzez degradację kolagenu i kwasu hialuronowego na zewnątrz komórek oraz uszkodzenie lipidów błon komórkowych. Proces ten został nazwany wybuchem oddechowym fagocytów (ang. *respiratory burst*) [58, 60]. Skutkiem tych uszkodzeń jest pojawienie się większej ilości kolejnych mediatorów stanu zapalnego, w tym frakcji C5a układu dopełniacza, chemotaktycznych peptydów (PAF, TNF, leukotrien B4), przeciwciał IgG oraz kompleksów antygen - przeciwciało co dodatkowo nasila proces zapalny [61].

2.4 Modele zwierzęce ostrego zapalenia trzustki

Aby jak najlepiej zrozumieć patogenezę OZT opracowano wiele modeli zwierzęcych tego schorzenia; żaden z nich nie oddaje jednak w pełni warunków

panujących w ludzkim organizmie. Najczęstsze przyczyny OZT - alkohol i kamica żółciowa nie mają swojego odpowiednika na modelach zwierzęcych. Co więcej powszechnie stosowane środki wywołujące zapalenie trzustki na modelach zwierzęcych, takie jak ceruleina i taurocholan sodowy nie są uznawane jako przyczyny ludzkiego OZT. Mimo tych różnic, zmiany strukturalne i biochemiczne widoczne w fazie ostrej OZT są zasadniczo stałe w różnych modelach zwierzęcych - podobne zmiany wykazano w OZT u człowieka. Również kliniczne cechy OZT u ludzi są bardzo podobne do tych obserwowanych na modelach zwierzęcych, niezależnie od przyczyny i środka, które go wywołało.

Pomimo ograniczenia modeli zwierzęcych, badania sugerują, że podobna kaskada zdarzeń wystąpi w OZT u człowieka i w modelu zwierzęcym niezależnie od zdarzenia lub mechanizmu inicjującego. Badania na zwierzętach wykazały, że trudno jest skutecznie powstrzymać kaskadę, jeśli nie zostanie zastosowana właściwa terapia w ciągu kilku godzin od inicjacji [62]. Badania nadal nie wyjaśniają z jakiego powodu niektórzy ludzie doświadczają tylko śródmiąższowej lub obrzękowej postaci OZT, a u innych rozwija się forma martwiczej OZT.

Najczęściej stosowany model OZT oparty jest na podawaniu ceruleiny. Model ten został rozpowszechniony w badaniach naukowych ze względu na swoją powtarzalność i wartość ekonomiczną. Do badań wykorzystuje się szczury lub myszy, a ostatnio również hodowle komórek trzustki szczura [48].

Ceruleina (ang. *cerulein* lub *ceruletide*) jest oligopeptydem dziesięciu aminokwasów:



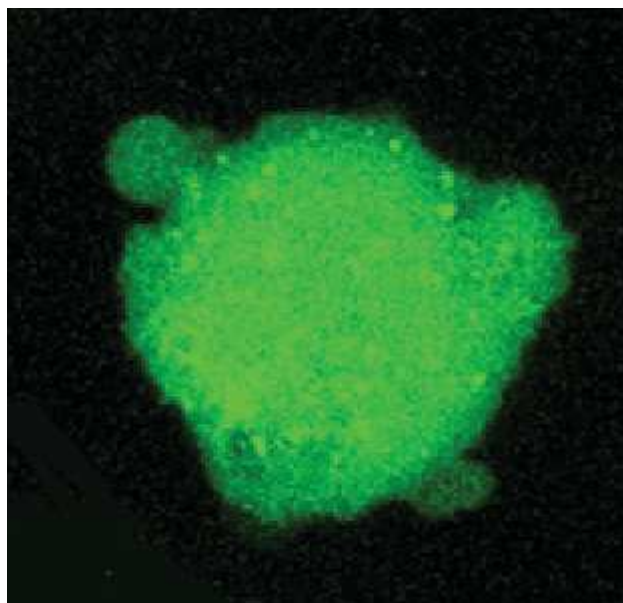
Ceruleina jest podobna w działaniu i składzie do cholecystokininy (ang. *cholecystokinin*; CCK) - pobudza wydzielanie soków trawiennych z żołądka, dróg żółciowych i trzustki oraz pobudza mięśnie gładkie przewodu pokarmowego. Ceruleina została odkryta i wyizolowana z suszonych skórek australijskiej żaby *Litoria caerulea* w 1967 roku przez australijskich i włoskich naukowców [63]. Ostre zapalenie trzustki może być wywołane przez dożylną lub dootrzewnową wstrzyknięcie ceruleiny. Ceruleina indukuje aktywację enzymów trzustkowych w ciągu 30 minut od podania dożylnego [64].

Ceruleina działa poprzez receptory CCK [35]. Zidentyfikowano dwa receptory CCK o wysokim i niskim powinowactwie. Receptory o wysokim powinowactwie łączą się z ceruleiną, co indukuje egzocytozę proenzymów z komórek pęcherzykowych trzustki, zwiększając wydzielanie enzymów trawiennych. Tymczasem receptory o niskim powinowactwie łączą się z ceruleiną dopiero po wysyceniu się receptorów CCK o wysokim powinowactwie. Wiązanie ceruleiny z receptorami CCK o niskim powinowactwie hamuje wydzielanie enzymów trawiennych z komórek groniastych trzustki. Odpowiedź receptorów CCK na ceruleinę jest więc dwufazowa: po stymulacji następuje hamowanie. Kiedy komórki pęcherzykowe trzustki są stymulowane przez nadmierne ilości ceruleiny egzocytaza proenzymów z komórek jest hamowana, co prowadzi do nagromadzenia enzymów trawiennych w obrębie komórek pęcherzykowych trzustki. Mechanizm, w jakim te enzymy ulegają aktywacji w trzustce i wywołują zapalenie pozostaje ciągle tematem licznych badań. W modelu OZT wywołanym ceruleiną zmiany histologiczne trzustki postępują łagodnie w ciągu kilku godzin, dlatego model ten umożliwia badanie zmian komórkowych obserwowanych w początkowych fazach ostrego zapalenia trzustki, a w szczególności najistotniejszy proces wewnątrzztrzustkowej aktywacji enzymów trawiennych. Zmiany histopatologiczne w modelu zwierzęcym ceruleinowego OZT dokładnie przypominają OZT u ludzi. Obserwuje się infiltrację komórek zapalnych w trzustce, obrzęk trzustki, wakuolizację komórek pęcherzykowych, obecność aktywnych enzymów w trzustce i podwyższone stężenie amylazy w surowicy. Uszkodzenia dotyczą tylko komórek pęcherzykowych, a nie komórek przewodowych czy wyspowych. Usunięcie ceruleiny powoduje ustąpienie OZT [64].

Model ceruleinowy jest uważany za reprezentatywny model łagodnej postaci OZT. Został uznany jako wartościowy model służący badaniom nad patogenezą OZT, szczególnie mechanizmów wewnątrzkomórkowej aktywacji enzymów trawiennych i odpowiedzi zapalnej. Model był krytykowany za swoją niezdolność do dokładnego odzwierciedlenia sytuacji klinicznej związanej z nadmiernym wydzielaniem cholecystokininy, jednak wspomniane liczne podobieństwa między zwierzęcym modelem OZT po ceruleinie i OZT u człowieka wystarczająco uzasadniają zastosowanie tego modelu do badania ostrego zapalenia trzustki [64]. Ceruleina zwiększa ilość cząsteczek adhezji międzykomórkowej-1 (ICAM-1, ang. *intercellular adhesion molecule-1*) w komórkach pęcherzykowych trzustki poprzez

wewnątrzkomórkową aktywację NF- κ B. Większa ilość ICAM-1 na powierzchni komórek sprzyja adhezji neutrofilów na komórkach pęcherzykowych trzustki wzmagając proces zapalny trzustki [65]. Ceruleina wywołuje również zapalenie trzustki przez rozregulowanie produkcji enzymów trawiennych i wakuolizację cytoplazmy, co prowadzi do śmierci komórek pęcherzykowych oraz obrzęku trzustki. Ostatnie badania naukowe pokazują, że NOX jest istotnym źródłem nadtlenu generowanych w komórkach AR42J stymulowanych ceruleiną [48]. Ceruleina indukuje proces zapalny aktywując NOX oraz kinazę Janus (JAK, ang. *Janus kinase*), która przenosi sygnały za pośrednictwem cytokin w szlaku JAK-STAT [35].

2.5 Komórki AR42J



Rycina 5. Obraz komórki AR42J z mikroskopu fluorescencyjnego w barwieniu kalceiną (materiał własny)

Komórki AR42J (**rycina 5**) pochodzą ze złośliwych guzów trzustki szczura indukowanych azaseryną [66]. Komórki AR42J są używane jako model egzokrynnego zapalenia trzustki do badań komórkowych szlaków sygnałowych prowadzących do m. in. ekspresji cytokin, powstawania RFT i śmierci komórki. Utrzymują wiele cech prawidłowych komórek pęcherzykowych trzustki, takich jak synteza i wydzielanie enzymów trawiennych. Ze względu na pochodzenie nowotworowe różnią się od prawidłowych komórek kilkoma cechami, m. in. wzmożoną proliferacją. Mimo iż, produkują, przechowują i wydzielają enzymy trawienne, regulacja ich funkcji zewnątrzwydzielniczej jest zaburzona (mają nietypowe receptory dla CCK oraz nietypowy metabolizm fosforanu inozytolu). Komórki AR42J posiadają dodatkowo neuroendokrynnie regulowany szlak wrażliwy na napięcie jonowe, uwalniają małe neuroprzekaźniki (kwas 7-aminomasłowy, glicynę i kwas glutaminowy), przetwarzają peptydowe prohormony i prawdopodobnie substancje autokrynne. Deksametazon sprzyja ich różnicowaniu w kierunku fenotypu egzokrynnego. Proliferację komórek AR42J pobudza wysycenie receptorów dla kinaz tyrozynowych i adenozylo 3',5' cyklicznego monofosforanu oraz ekspresja dekarboksylazy ornityny i wymiana Na^+/H^+ . Somatostatyna ogranicza proliferację komórek AR42J przez aktywność fosfataz

białkowych. Wszystkie komórki trzustki, te odpowiedzialne za czynność egzokrynną i te z funkcją endokrynną, rozwijają się z endodermalnej komórki macierzystej. Początkowo komórki AR42J były uważane wyłącznie jako zewnątrzwydzielnicze, ponieważ syntezują, magazynują i wydzielają enzymy trawienne. Ponieważ wywodzą się z guza pierwotnego nabłonka przewodowego, wykazują cechy nie tylko komórek pęcherzykowych, ale też pewne właściwości neuroendokrynne. Te mieszane właściwości sugerują obecność dwóch wyraźnie regulowanych dróg wydzielniczych. Te cechy potwierdza traktowanie glukosteroidami, które zwiększa syntezę enzymów trawiennych, ale nie wpływa na produkcję związków neuroendokrynnych, których uwalnianie następuje po depolaryzacji zależnej od jonów wapnia i nie zmienia się po traktowaniu glukosteroidami [67].

Pierwotne hodowle komórek pęcherzykowych trzustki miały krótki czas przeżycia, dlatego do badania biologii izolowanych komórek pęcherzykowatych trzustki powszechnie stosuje się unieśmiertelnioną stabilną linię komórek pęcherzykowych nowotworu trzustki AR42J. Podczas procesu unieśmiertelnienia i transformacji nowotworowej linia komórek AR42J wykazała duży potencjał egzo- i endokrynną, mimo że funkcje wydzielnicze tych komórek charakteryzują się nieco odmiennym mechanizmem stymulacji.

Współistnieją trzy rodzaje wydzielania w komórkach AR42J:

- podstawowe wydzielanie enzymów trawiennych, które nie zależy od bodźców stymulujących wydzielanie - ich uwalnianie następuje bezpośrednio po syntezie i jest znacznie wyższe niż w normalnych komórkach trzustki
- regulowana droga wydzielnicza enzymów trawiennych - odpowiada na stymulację sekrecji
- wydzielanie aminokwasowych neurotransmiterów.

W typowych komórkach pęcherzykowych trzustki istnieją dwie grupy receptorów i dróg przenoszenia sygnału wydzielania enzymów trawiennych:

- receptory sprzężone z fosfolipazą C powodujące mobilizację jonów wapnia, takie jak receptory dla CCK typu A, acetylocholiny, bombezyny i tachykininy
- receptory sprzężone z cyklazą adenylanową, takie jak receptory sekretyny i wazoaktywnego peptydu jelitowego.

Komórki AR42J prezentują receptory dla CCK typu B co różni je od komórek trzustki szczura, gdzie nie wykryto tego typu receptorów. Należy jednak zauważyć, że receptory CCK-B w komórkach AR42J są identyczne molekularnie jak receptory CCK-B w korze mózgu szczura i ściśle spokrewnione z receptorami CCK-B spotykanymi u człowieka [68]. Po stymulacji gastryną komórek AR42J przez wiązanie z receptorami CCK-B następuje co najmniej 90% nadmiernej sekrecji amylazy na drodze przekazywania sygnału z rozkładem fosfatydyloinozytololu, uwolnieniem Ca^{2+} i stymulacją kinazy białkowej C (ang. *protein kinase C* - PKC) [69]. Funkcje te pełnią w typowych komórkach pęcherzykowych trzustki szczura selektywne receptory CCK-A.

Po wstępnym traktowaniu deksametazonem komórek AR42J regulacja wydzielania bardziej przypomina typowe komórki pęcherzykowe trzustki szczura. Komórki gromadzą hydrolazy w wydzielniczych pęcherzykach i uwalniają je po stymulacji gastryną. Transport wyprodukowanych białek wydzielniczych z retikulum endoplazmatycznego do lub przez przedziały aparatu Golgiego wymaga ATP i białek wiążących GTP [70]. Po egzocytozie z komórek AR42J, integralne błonowe glikoproteiny są resorbowane na drodze endocytozy, transportowane do endosomów i sieci aparatu Golgiego, następnie do granulek wydzielniczych. Organizacja komórkowa odpowiadająca za wydzielanie w zróżnicowanych komórkach AR42J nie jest prawidłowa, ale nie przeszkadza to w mobilizacji wydzielania granulatu po stymulacji gastryną.

Deksametazon wykazuje plejotropowe działanie na komórki AR42J, które po traktowaniu deksametazonem przez 4 dni zwiększają swoją objętość o 30% i produkują dwukrotnie więcej białka [71]. Deksametazon prowadzi do powstawania połączeń międzykomórkowych typu nexus, jednak nie prowadzi do pełnego zróżnicowania komórek. Receptor glukokortykoidowy, po fosforylacji i transaktywacji, wiąże się z odpowiednim elementem w regionie regulatorowym genu amylazy i zewnątrzwydzielniczego czynnika transkrypcyjnego. W szybkim tempie wzrasta poziom transkrypcji mRNA dla amylazy i równolegle wzrost samej amylazy.

W przeciwieństwie do deksametazonu ceruleina nie zwiększa rozmiaru komórek AR42J i nie stymuluje proliferacji w pożywkach bez surowicy. Natomiast zwiększa transkrypcję i stabilizację mRNA zwiększając biosyntezę chymotrypsynogenu o 200%, a amylazy o 40%. Antagonista receptora CCK-A - CR-1409 całkowicie

hamuje syntezę chymotrypsynogenu po stymulacji caruleiną. W obecności CCK lub sekretyny dochodzi od 2 do 5-krotnego wzrostu produkcji esterazy cholesterolu w AR42J oraz do wzrostu mRNA peptydu kontrolującego, który pobudza uwalnianie CCK i pośrednio indukuje nadmierną sekrecję enzymów z trzustki *in vivo* [72].

2.6 Transfekcja

Zastosowanie hodowli komórkowych spowodowało gwałtowny postęp nauk biologicznych. Technologia ta jest tańsza, bezpieczniejsza i mniej kontrowersyjna pod względem etycznym w porównaniu do badań nad zwierzętami. Modele komórkowe badanych procesów zachowują w pełni całokształt metabolizmu komórkowego przy odizolowaniu od czynników zewnętrznych. Hodowle umożliwiają namnażanie komórek, ale także zamrażanie, przechowywanie i transportowanie komórek między laboratoriami. Hodowle komórkowe pozwalają również na modyfikowanie materiału genetycznego komórek poprzez wprowadzanie do wnętrza komórek molekuł DNA (transfekcja). Najczęściej stosuje się metodę wprowadzania materiału DNA poprzez wektory plazmidowe, która umożliwia ekspresję genu kodującego docelowe białko [73].

Techniki transfekcji DNA zaczęto opracowywać w latach sześćdziesiątych dwudziestego wieku. Początkowo wprowadzano obcy materiał do komórek poprzez mikroiniekcję, rozbijanie komórek ultradźwiękami i strącaniem DNA solami fosforanowymi wapnia i cząsteczkami dekstranu [74]. Obecnie największą wydajnością i powtarzalnością charakteryzuje się technika lipofekcji z zastosowaniem liposomów zbudowanych z kationowych lipidów. Ta metoda jest ponad stukrotnie bardziej wydajna niż techniki z solami fosforanowymi wapnia czy dekstranem i umożliwia nie tylko wprowadzanie do komórek cząsteczek DNA, ale również cząsteczek RNA i białek [75].

Metoda transfekcji przy pomocy liposomów zaczyna się od tworzenia kompleksów liposomów z plazmidowym DNA, które umieszcza się razem z komórkami w pożywce pozbawionej surowicy. W czasie kilkugodzinnej inkubacji kompleksy liposomów i DNA wnikają do komórek na drodze endocytozy. Efektywność transfekcji zależy od budowy liposomów - ilości dodatnich ładunków lipidów, typu połączeń między składnikiem kationowym i hydrofobowym oraz strukturą składnika hydrofobowego [76].

Wektor to cząsteczka DNA (wirus, plazmid) służąca do wprowadzenia obcego materiału genetycznego do komórki w procesie transfekcji. Wektor, zwany inaczej rekombinowanym DNA, przenosi krótki fragment DNA, zawierający badany gen lub sekwencję. Wprowadzony do komórki wektor nie powinien zakłócać jej funkcji życiowych, ale powinien być łatwo wykrywalny i posiadać zdolność do niezależnej replikacji razem z wbudowanym fragmentem DNA. Najczęściej jako wektory stosowane są plazmidy [73]. Plazmid to pozachromosomowa cząsteczka DNA zdolna do samodzielnej replikacji, która występuje w organizmach prokariotycznych i niektórych eukariotycznych. Plazmidy pełnią w komórkach funkcje pomocniczych chromosomów i są przenoszone w trakcie procesu koniugacji między komórkami bakteryjnymi.

Wektor oparty na plazmidach musi zawierać region początku replikacji, który pozwala na niezależne namnażanie się w komórkach oraz wiele miejsc rozpoznawalnych przez różne enzymy restrykcyjne, między które wprowadza się żądany fragment DNA, czyli insert. Dodatkowo wektor plazmidowy powinien posiadać promotor, sekwencje wiążące rybosom, kodon inicjacji translacji czy np. sekwencje umożliwiające łatwiejsze oczyszczanie na drodze chromatografii.

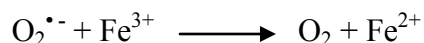
2.7 Żelazo

2.7.1 Toksyczność żelaza

Żelazo jest niezbędne dla większości organizmów żywych, ponieważ posiada wyjątkowe zdolności zmieniania swojego stanu utleniania i potencjału redoks. Wiele enzymów kluczowych dla reakcji przemiany materii zawiera żelazo. Jego podstawową funkcją jest pośredniczenie w jednoelektronowych reakcjach redoks. Nieprawidłowo osłonięte żelazo może być jednocześnie bardzo niebezpieczne, ponieważ jest zdolne katalizować jednoelektronową redukcję tlenu tworząc bardzo reaktywne wolne rodniki. Śladowe ilości wolnego żelaza katalizują wytwarzanie wysoce toksycznego rodnika wodorotlenowego ($\cdot\text{OH}$). Prawdopodobny mechanizm powstawania $\cdot\text{OH}$ *in vivo* opisują dwie reakcje określane jako cykl Fentona. Pierwsza z tych reakcji to właściwa reakcja Fentona [77] :



Druga reakcja opisuje mechanizm regeneracji jonu Fe^{2+} przez $\text{O}_2^{\cdot-}$:



Sumaryczna reakcja jest nazywana reakcją Haber–Weissa:



Wolne rodniki powstające w reakcjach katalizowanych przez żelazo mogą utleniać lipidy, białka, lipoproteiny i kwasy nukleinowe prowadząc do śmierci komórek i uszkodzenia tkanek, a nawet do zmiany fenotypu komórek i tworzenia nowotworu. Aby uniknąć niebezpieczeństwa powstawania wolnych rodników wolne żelazo musi być utrzymywane na najniższym poziomie energetycznym. Istnieje jednak fizjologiczne zapotrzebowanie na pulę łatwo dostępnego żelaza. Mechanizm hemostazy polega na utrzymywaniu ograniczonej przejściowej puli słabo schelatowanego żelaza określanej jako wolna pula żelaza (LIP, ang. *labile iron pool*). W większości komórek homeostaza żelaza jest kilkustopniowym procesem

wchłaniania żelaza, następnie jego utylizacji i składowania. W ten proces zaangażowane są białka wychwytyjące żelazo, receptory dla transferyny (TFR, ang. *transferrin receptor*), transportery żelaza dwuwartościowego 1 (DMT1, ang. *divalent metal transporter 1*) oraz ferrytyna - główne białko magazynujące żelazo [78].

2.7.2 Hemostaza żelaza

Zawartość żelaza w organizmie człowieka waha się od 3 do 4g. Żelazo wbudowane do hemoglobiny w krążących erytrocytach i powstających erytroblastach stanowi większość tego zasobu – ok. 2,5 g. Pozostałe białka funkcjonalne zawierające żelazo jak mioglobina, CAT i cytochromy mieszczą w sobie 400 mg z całej puli żelaza. Białkiem regulującym stężenie jonów żelaza w surowicy i transportującym je do komórek jest transferyna (TF, ang. *transferrin*). Ponieważ TF nie ma właściwości magazynujących, ilość żelaza związanego z nią w organizmie jest nieduża – od 3 do 7 mg. Ważną cechą tego białka jest duża masa (niecałe 80 kDa) co zabezpiecza ją przed filtracją w kłębuszkach nerkowych i utratą żelaza z organizmu [79]. Pozostała ilość żelaza (szacunkowo 1 g) związana jest z ferrytyną lub hemosyderyną i stanowi magazyn tkankowy żelaza, przede wszystkim w komórkach wątroby, śledziony i szpiku kostnego. Dobowy obrót żelaza jest niewielki – w przybliżeniu 1mg tego pierwiastka jest tracony z potem oraz ze złuszczonej skórą i przewodu pokarmowego. Kobiety w trakcie krwawienia miesięczkowego tracą dodatkowo 0,5 – 1 mg żelaza. Straty te są wyrównywane przez wchłanianie żelaza z pokarmem. W typowej diecie spożywa się od 10 do 20 mg żelaza i 10 % z tej ilości jest wchłaniane w przewodzie pokarmowym. Większość żelaza w organizmie jest odzyskiwana wtórnie z krwinek czerwonych po ich rozpadzie przez makrofagi układu fagocytarnego. Ilość wolnego żelaza, które ma właściwości toksyczne, jest ściśle regulowana przez szybkie wiązanie wchłoniętego żelaza z przewodu pokarmowego i uwalnianego z makrofagów przez TF i następnie wiązanie przez ferrytynę i hemosyderynę w magazynach tkankowych [80].

2.7.3 Labilna pula żelaza

Termin "labilna pula żelaza" został zaproponowana w 1946 roku przez Greenberga i Wintrobe [81] i ponownie przez Jacobso [82] jako "przejściowa pula żelaza". Ostatnio pojawiło się określenie "chelatowalne żelazo", jako że większość metod wykrywania tej puli żelaza wymaga użycia chelatorów.

Zgodnie z definicją LIP jest pulą słabo schelatowanego żelaza, które szybko przechodzi przez komórkę. Najprawdopodobniej składa się z obu postaci żelaza: Fe^{2+} i Fe^{3+} związanych z różnymi związkami o niskim powinowactwie do jonów żelaza. Mogą to być organiczne związki chelatujące o niskiej masie cząsteczkowej, takie jak fosforany, cytryniany i inne jony organiczne, węglowodany i karboksylany, nukleotydy i nukleozydy, polipeptydy i fosfolipidy.

LIP stanowi jedynie niewielki ułamek całkowitej ilości żelaza komórkowego (3 - 5 %), ale prawdopodobnie cała ilość żelaza wchłoniętego z pokarmu (1 – 2 mg) trafia do LIP zanim zostanie związana z białkami docelowymi. W większości komórek ssaków wychwyt żelaza przeprowadzany jest na dwa różne sposoby. Pierwsza droga jest zależna od TF, która jest białkiem regulującym stężenie jonów żelaza w osoczu krwi i transportującym je do tkanek. TF wysycona żelazem łączy się ze TFR na powierzchni komórki i na drodze endocytozy zostaje wchłonięta do wnętrza komórki w pęcherzyku. Pompa protonowa zależna od ATP obniża pH w pęcherzyku do ok 5,5 powodując uwolnienie jonów żelaza z TF. Pęcherzyk z TF związaną ze swoim receptorem jest następnie transportowany na powierzchnię komórki, a apotransferryna (czyli TF niewysycona żelazem) wraca do krwiobiegu gotowa do następnego etapu absorpcji żelaza. Każda cząsteczka TF jest zdolna do przenoszenia dwóch jonów żelaza Fe^{3+} . Odłączone z TF żelazo jest redukowane prawdopodobnie przez dwunastniczy cytochrom B (DCYTB, ang. *duodenal cytochrome B*) i uwolnione do cytoplazmy przez DMT1. Ta droga wydaje się istotnym źródłem LIP.

Drugim mechanizmem jest droga niezależna od TF. W tej drodze uczestniczy DMT1 wspomagane przez aktywność DCYTB. Obecność DMT1 i DCYTB, które zlokalizowane są głównie w początkowym odcinku dwunastnicy, jest regulowana przez stężenia żelaza co sugeruje, że to ta droga jest głównym sposobem jelitowego wchłaniania żelaza. Mutacja białka DMT1 powoduje poważne niedobory żelaza z powodu zmniejszonego jelitowego wchłaniania żelaza [83].

Kolejnym ważnym źródłem LIP jest hem (hemopeksyna bez żelaza), który transportuje do komórki żelazo poprzez drogę zależną od receptora podobną do TF. W odróżnieniu od żelaza związanego z TF i ferrytyną, żelazo związane z grupą hemu wchodzi do reakcji redoks tworząc silnie toksyczne produkty. Toksyczność hemu jest stabilizowana przez oksygenazę hemową i anty-utleniające działanie bilirubiny, jednak jony żelaza uwalniane podczas rozkładu hemu zasilają LIP stwarzając dodatkowe zagrożenie stresem oksydacyjnym.

Wśród innych, mniej znanych źródeł LIP duże znaczenie mogą mieć białka żelaza i siarki tworzące płaskie lub sześciennie klastry Fe-S. Ich główną rolą jest transfer elektronów w różnych procesach komórkowych. Aktywność wielu białek Fe-S jest wrażliwa na stres oksydacyjny reagując zwiększeniem LIP.

2.7.4 Ferrytyna jako źródło labilnej puli żelaza

Poza wychwytem pozakomórkowego żelaza, potencjalnym źródłem LIP może być żelazo związane z białkami wewnątrz komórki. Najbardziej znanym białkiem, które przechowuje żelazo w bezpiecznej postaci i uwalnia je w sposób kontrolowany jest ferrytyna (ang. *ferritin*). Ferrytyna występuje w większości tkanek jako białko cytoplazmatyczne o masie 450 kDa składającym się z 24 podjednostek, które mogą być lekkie (ferrytyna L - 19 kDa) lub ciężkie (ferrytyna H - 21 kDa). Niewielka jej ilość wydzielana jest do osocza, gdzie funkcjonuje jako nośnik żelaza. Stężenie ferrytyny w osoczu jest pośrednim markerem całkowitej ilości żelaza w organizmie, co jest wykorzystywane w diagnostyce niedoboru żelaza. Ferrytyna, która nie jest połączona z żelazem nazywana jest apoferrytyną. Mechanizm uwalniania żelaza z ferrytyny pozostaje niejasny, ale wydaje się, że proteolityczna degradacja tego białka i uwolnienie żelaza następuję głównie w proteasomach lub lizosomach [84, 85].

Proteosomalny system ubikwitynozależnej specyficznej proteolizy białek reprezentuje główną nielizosomalną ścieżkę przez którą w komórkach eukariotycznych są degradowane wewnątrzkomórkowe białka biorące udział w cyklu komórkowym, proliferacji, różnicowania i apoptozy. Proteasomy to duże wielkocząsteczkowe zespoły enzymatyczne złożone z kilku rodzajów białkowych proteaz tworzących kształt cylindra. Występują zarówno w cytoplazmie i jądrze komórkowym wszystkich eukariotycznych komórek. Proteasomy skupiają się wokół

centrioli tworząc centrum proteolityczne komórki. Proteasomy złożone są z podjednostek peptydowych regulatorowych i katalitycznych. W ich centrum znajduje się kanał odpowiedzialny za aktywność proteazy o trzech specyfikacjach enzymatycznych: chymotrypsynopodobne, trypsynopodobne i kaspazopodobne. Odpowiedzialne są one za degradację ubikwitynowanego białka do małych peptydów. W przebiegu tej degradacji zużywana jest energia z ATP [86]. Szczegółowe badania wskazują na główny udział proteasomów, a nie lizosomów w procesie degradacji ferrytyny wewnątrzkomórkowej [87].

Każdy kompleks ferrytyny może przechowywać około 4500 jonów żelaza Fe^{3+} w postaci nano-klatki. Żelazo uwolnione z ferrytyny może być wykorzystane w komórce lub uwolnione na zewnątrz komórki. Na powierzchni komórek, które uwalniają żelazo do osocza, obecny jest błonowy eksporter żelaza do osocza - ferroportyna. Wzrost ekspresji ferroportyny skutkuje większym wyrzutem żelaza z cytozolu komórki na zewnątrz co wzmacnia degradację ferrytyny przez proteasomy. Degradacja jest poprzedzona ubikwityzacją podjednostek ferrytyny co pozwala zdemontować konstrukcję nano-klatki utrzymującej jony żelaza i utrzymać dalszą degradację ferrytyny w proteasomach.

Udział ferrytyny w utrzymaniu poziomu LIP jest dwukierunkowy. Zwiększona ekspresja ferrytyny powoduje zwiększone wiązanie wolnego żelaza i zmniejszenie LIP. Z drugiej strony ferrytyna może dostarczać żelaza do LIP. Inkubowanie komórek z załadowaną żelazem ferrytiną powoduje wzrost LIP równoległe z degradacją dostarczanej ferrytyny. Inhibitory proteaz powodują zarówno degradację ferrytyny jak i wzrost LIP.

2.7.5 Rola labilnej puli żelaza w odpowiedzi komórkowej na stres oksydacyjny

W modelu zwierzęcym OZT wyindukowanym ceruleiną udokumentowano poprawę po podaniu chelatora żelaza - 2,2 dipirydyli, co sugeruje, że żelazo odgrywa istotną rolę w tworzeniu RFT. Żelazo podobnie jak tlen, jest niezbędne dla poprawnego funkcjonowania organizmu, jakkolwiek bywa równocześnie niezwykle niebezpieczne. Metabolizm żelaza jest ściśle regulowany, tak aby jego poziom był poniżej poziomu toksycznego dla organizmu. LIP jest to metabolicznie aktywną formą żelaza, luźno związaną z białkami, aminokwasami, kwasami organicznymi i nukleotydami. Pozostała część żelaza występującego w komórce jest związana pod

postacią ferrytyny. Istotną różnicą pomiędzy LIP a żelazem w ferrytynie jest taka, że ta pierwsza może silnie stymulować produkcję RFT.

Żelazo może generować rodniki hydroksylowe na drodze reakcji Fentona, a poprzez reakcję z produktami peroksydacji lipidów tworzyć rodniki alkoksylowe i peroksyłowe. Ponadto, reakcja Fe^{2+} z tlenem może prowadzić do tworzenia się bardzo silnych utleniaczy, takich jak jony perferryłu i ferryłu z reaktywnością porównywalną z rodnikiem wodorotlenkowym.

Wykazano, że labilna pula żelaza zwiększa się podczas różnych warunków doświadczalnych, kiedy dochodzi do degradacji ferrytyny. TNF, światło UV, nadtlenek wodoru i wiele innych powoduje zwiększenie intensywności tworzenia RFT przy jednoczesnej zintensyfikowanej degradacji ferrytyny i zwiększaniu się puli LIP [88].

2.8 Szlaki sygnałowe kinaz białkowych

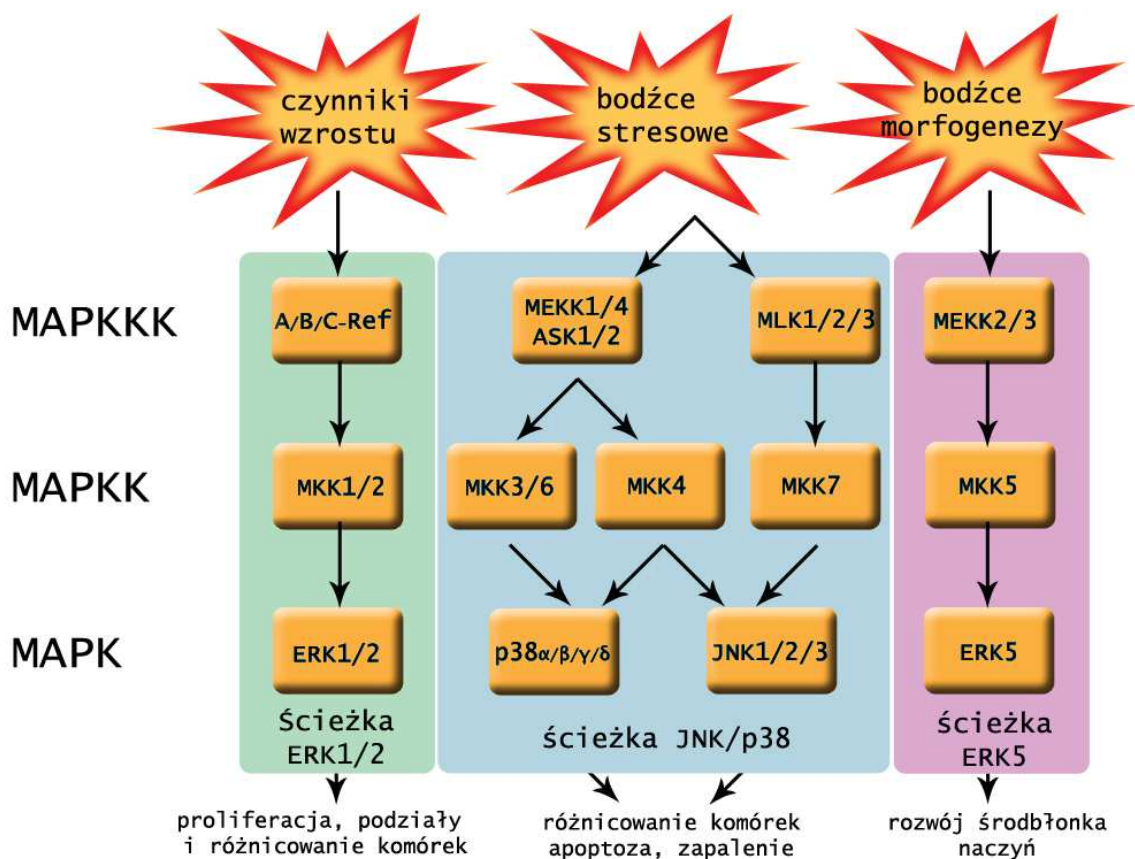
Funkcjonowanie każdej komórki jądrowej jest uzależnione od sprawnych mechanizmów przekazywania informacji. Szlaki sygnałowe w komórce angażują wiele białek, wśród których najliczniejszą grupą są kinazy białkowe. Kinazy białkowe przekazują informację do komórki z otoczenia, ale też do każdej organelli komórkowej i jej przedziału. Ich działanie polega na odwracalnej fosforylacji wewnątrzkomórkowych białek, przez co zmienia ich funkcję. Kinazy, są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórki - jej różnicowania, proliferacji, reakcji obronnych jak i śmierci na drodze apoptozy.

2.8.1 Kinazy białkowe aktywowane mitogenami

Kinazy białkowe aktywowane mitogenami (MAPK, ang. *mitogen-activated protein kinases*) to grupa kinaz serynowo-treoninowych, które regulują odpowiedź komórki na różne czynniki stymulujące docierające do komórki z zewnątrz - takie jak mitogeny, stres osmotyczny, cytokiny zapalne i szok termiczny. Wpływają one na funkcje komórki, w tym proliferację, ekspresję genów, różnicowanie, przeżycie i apoptozę.

MAPK występują tylko w organizmach eukariotycznych, są jednak dość zróżnicowane i można je spotkać u wszystkich zwierząt, grzybów, roślin i nawet u jednokomórkowych organizmów eukariotycznych.

Kinazy MAPK są nieaktywne enzymatycznie w swojej podstawowej formie. Do aktywacji wymagają one fosforylacji, które przeprowadzają wyspecjalizowane enzymy z grupy kinaz białkowych. Każda grupa MAPK złożona jest z układu trzech działających kolejno po sobie kinaz: MAPK, MAPKK (MAPK2) i MAPKKK (MAPK3) (**rycina 6**). Bodźce działające na komórkę powodują aktywację MAPK poprzez wielopoziomową kaskadę zdarzeń i fosforylacji. Na błonie komórkowej dochodzi do aktywacji MAPKKK w wyniku interakcji z białkami Ref (mediatory odpowiedzi na czynniki wzrostu) lub innymi białkami (MEKK, MLK, MKK) jako odpowiedź na bodziec zewnątrzkomórkowy. Aktywacja MAPKKK prowadzi do fosforylacji i aktywacji MAPKK, która w końcu fosforyluje i aktywuje MAPK. W ten sposób sygnał aktywacji przechodzi z błony komórkowej (MAPKKK) do wnętrza komórki i jądra komórkowego [89].



Rycina 6. Schemat aktywacji MAPK z podziałem na ścieżki sygnałowe ERK1/2, JNK/p38 oraz ERK5 (opracowanie własne na podstawie [89]).

U ssaków zidentyfikowano cztery grupy kinaz MAP:

- kinazy z grupy MAPK regulowane przez czynniki zewnątrzkomórkowe (ERK, ang. *extracellular signal-regulated kinases*) - poprzez kinazy tej grupy działają czynniki wzrostu i estry forbolu; odpowiadają za regulację proliferacji, podziału i różnicowania komórek
- JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinases*) określane też jako kinazy aktywowane stresem - są wrażliwe na bodźce stresowe: cytokiny, promieniowanie ultrafioletowe, szok termiczny i osmotyczny, zmiany poziomu reaktywnych form tlenu, inhibitory syntezy białka i TNF; pośredniczą w różnicowaniu komórek i procesie apoptozy
- Kinazy p38 - ich funkcja jest zbliżona do kinaz grupy JNK
- ERK5 – ERK aktywowane działaniem stymulantów morfogenezy

2.8.2 Ścieżka sygnałowa kinaz ERK

U ssaków charakterystyczną dla MAPK jest ścieżka ERK1/2. Aktywatorami szlaku w odpowiedzi na czynniki wzrostu (EGF, FGF, PDGF) z grupy MAPKKK są białka Raf (A-Raf, B-Raf, C-Raf). W dalszej kolejności dochodzi do fosforylacji MAPKK, które są specyficznymi aktywatorami ERK1 i ERK2, które fosforylują wiele substratów ważnych dla proliferacji, cyklu komórkowego i różnicowania.

Ścieżka ERK1/2 jest dość dobrze oddzielona od innych szlaków sygnałowych, w przeciwieństwie do szlaków kinazy p38 i JNK, w których aktywacja jednego szlaku idzie zwykle w parze z drugim. Wynika to z wspólnych aktywatorów na poziomie MAPKKK i MAPKK. Ścieżki p38 i JNK są wrażliwe na bodźce stresowe, takie jak cytokiny, promieniowanie nadfioletowe, szok termiczny i szok osmotyczny. Przekazywane sygnały są więc potrzebne w mechanizmach adaptacji do stresu, różnicowania komórek i w procesie apoptozy. Dużo białek docelowych w mechanizmach odpowiedzi na bodźce stresowe mogą być fosforylowane tylko przez kinazy JNK lub tylko przez kinazy p38 co potwierdza ich wagę w procesie odpowiedzi na stres.

Kolejną dobrze poznaną i dość dobrze oddzieloną ścieżką u ssaków jest ścieżka ERK5, która odpowiada za przekazywanie stymulantów rozwoju śródbłónki naczyń i morfogenezy serca. Potwierdza to śmiertelność ssaków z zablokowanym szlakiem ERK5 w przebiegu zaburzeń krążenia i zaburzeń śródbłonkowej bariery. W szlaku ERK5 biorą udział kinazy MAPKKK - MEKK2 i MEKK3 fosforylujące specyficzny aktywator MKK5. Mutacje elementów szlaku ERK5 prawdopodobnie są przyczyną jamistych malformacji w ludzkim mózgu.

Ponieważ ścieżki sygnalizacyjne ERK biorą udział w regulacji proliferacji, blokowanie tej ścieżki znalazło zastosowanie w leczeniu różnego typu nowotworów. Wprawdzie nie opracowano jeszcze inhibitorów MKK 1/2 ani ERK 1/2 z zastosowaniem klinicznym, inhibitory kinazy Raf mają już swoje sukcesy kliniczne - np. Sorafenib – lek wprowadzony do leczenia zaawansowanego raka nerki i raka wątrobowokomórkowego [90].

Mimo, że blokowanie szlaku sygnałowego kinazy p38 wydaje się być dobrym celem dla leków przeciwzapalnych, to dotychczas nie opracowano związku, który by działał skutecznie i długotrwale nie powodując poważnych skutków ubocznych.

Podobnie związki blokujące szlak JNK są jeszcze w fazie doświadczalnej, jednak obiecujące są wyniki badań na zwierzętach, u których hamowanie JNK zmniejsza insulinooporność komórek, zwiększa tolerancję na niedokrwienie po udarze i działa protekcyjnie w zaburzeniach słuchu [91].

2.8.3 Kinazy JNK

Kinazy JNK zostały zidentyfikowane pierwotnie jako kinazy, które wiążą i fosforylują białka c-Jun w pozycjach Ser-63 i Ser-73 w domenie aktywacji transkrypcji. Aktywacja kinaz JNK odbywa się za pomocą dwóch kinaz MAPK (MKK4 i MKK7 - **rycina 6**) poprzez fosforylację treoniny (Thr) i tyrozyny (Tyr) w obrębie sekwencji Thr-Pro-Tyr w VIII subdomenie kinazy JNK. Kinazy JNK mogą być inaktywowane przez fosfatazy białkowe Ser / Thr oraz Tyr. Te specyficzne fosfatazy hamują aktywność JNK jak i aktywność białek związanych z aktywacją JNK.

Kinazy JNK mają 10 izoform pochodzących z trzech genów: JNK1 (cztery izoformy), JNK2 (cztery izoformy) i JNK3 (dwie izoformy). Każdy gen ulega ekspresji jako białko kinazy o masie cząsteczkowej 46 kDa lub 55 kDa, w zależności od tego, jak kodujący region odpowiadającego mRNA jest przetwarzany. Nie znaleziono różnic funkcjonalnych pomiędzy formami 46 kDa i 55 kDa, natomiast w czasie alternatywnego składania transkryptów JNK1 i JNK2 powstają formy JNK1- α i JNK2- α oraz JNK1- β i JNK2- β . Różnice w interakcji z substratami tych białek wynikają z wzajemnego wyłączonego wykorzystania dwóch eksonów w obrębie domeny kinazy. JNK1 i JNK2 występują we wszystkich komórkach i tkankach, natomiast JNK3 występuje głównie w mózgu i w mniejszym stopniu sercu oraz jądrach.

Kinazy JNK poprzez fosforylację modyfikują aktywność wielu białek mitochondrialnych i jądrowych. Aktywują takie białka jak: c-Jun, ATF2, ELK1, SMAD4, p53 i HSF1, a z innej strony hamują białka NFAT4, NFATC1 i STAT3. Dzięki tym oddziaływaniom kinazy JNK regulują wiele ważnych funkcji komórkowych, w tym wzrost komórek, ich przeżycie, różnicowanie, proliferację i apoptozę. JNK1 uczestniczy w procesie apoptozy, neurodegeneracji, różnicowania i proliferacji komórek. Bierze udział w procesie zapalnym i w produkcji cytokin pośredniczonych przez kompleks AP-1. Kinazy JNK są enzymami zaangażowanymi

w regulację stabilności niektórych białek, np. zwiększają one poziom degradacji anty-apoptycznego białka c-FLIP oraz chronią białka c-Jun przed degradacją.

Ostatnio wykazano, że aktywacja JNK nasila produkcję RFT [84]. Na chwilę obecną nie wiadomo, czy ten proces przebiega w trzustce w trakcie OZT. Postuluje się, że podczas OZT indukowanego ceruleiną, tworzenie RFT może odbywać się zarówno na drodze zależnej jak i niezależnej od JNK.

3. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było zbadanie udziału labilnej puli żelaza w tworzeniu reaktywnych form tlenu w komórkowym modelu ostrego zapalenia trzustki indukowanego ceruleiną. Celem dodatkowym było prześledzenie roli szlaku sygnałowego kinazy terminalnej c-Jun (JNK) oraz czynności proteasomów w zmianach labilnej puli żelaza badanego modelu ostrego zapalenia trzustki.

Wymagało to postawienia celów pośrednich:

1. Zbadanie czy ceruleina indukuje tworzenie RFT w komórkach AR42J.
2. Sprawdzenie czy dochodzi do zmniejszenia formowania RFT po ograniczeniu ilości żelaza w komórkach AR42J za pomocą związku chelatującego – deferoksaminy.
3. Analiza wpływu ceruleiny na zmiany poziomu labilnej puli żelaza.
4. Zbadanie czy traktowanie komórek AR42J ceruleiną wpływa na poziom ferrytyny.
5. Określenie nasilenia produkcji RFT po nadmiernym wysyceniu komórek AR42J żelazem za pomocą heminy.
6. Zbadanie roli proteasomów w procesie degradacji ferrytyny.
7. Sprawdzenie udziału szlaku sygnałowego kinazy JNK w przebiegu degradacji ferrytyny pod wpływem inkubacji komórek AR42J z ceruleiną

4. Materiał i metody

4.1 Materiały

4.1.1 Linia komórkowa

Materiał badań stanowiła linia komórek AR42J, pozyskana ze zbiorów The American Type Culture Collection (pancreatoma, ATCC CRL 1492) - jedyna dostępna linia komórkowa, która utrzymuje wiele cech prawidłowych komórek groniastych trzustki, takich jak m.in. synteza i wydzielanie enzymów trawiennych. Linia ta jest używana jako model egzokrynnego zapalenia trzustki do badań komórkowych szlaków sygnałowych wiodących do ekspresji cytokin, powstawania RFT, śmierci komórki i wielu innych.

4.1.2 Odczynniki, zestawy, przeciwciała

Użyte w doświadczeniach odczynniki, zestawy i przeciwciała przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Odczynniki, zestawy, przeciwciała

Odczynnik	Nr kat.	Firma
Alkohol etylowy	396420113	Poch
Alkohol metylowy	621990110	Poch
APS - nadsiarczan amonu	161-0700	Bio-Rad
Przeciwciała p-ferrytynie L	SC-74513	Santa Cruz Biotechnology
Przeciwciała p- β aktynie	A3854	Sigma-Aldrich
Błękit bromofenolowy	B5525	Sigma-Aldrich
Ceruleina	C9026	Sigma-Aldrich
Chlorek sodu	794121116	Poch
DCF - H2DCFDA - dwuacetyna 2',7'- dichlorodihydrofluoresceiny	D399	Invitrogen
DFO – deferoksamina	D9533	Sigma-Aldrich
Wywoływacz	1900943	Kodak
DMSO – dimetylosulfotlenek	D5879	Sigma-Aldrich
VEGF - czynnik wzrostu śródbłónka	V4512	Sigma-Aldrich
EDTA - wersenian dwusodowy	1331-11- 8798103	Poch
F-12 K - pożywka dla komórek	21127	Gibco
FBS - płodowa surowica bydłęca	F0804	Sigma-Aldrich
Utrwalacz	1901875	Kodak
Hemina	H9039	Sigma-Aldrich
LIQUABIS	800801	MP Biomedicals
LIQUACRYL	80800	MP Biomedicals
N-butanol	203230421	Poch

MG-132	474790	Calbiochem
OPTI- MEM I	31985-047	Gibco
Page Ruler Plus	SM 1811	Fermentas
PBS	7391	Lonza
Penicylina – Streptomycyna	P4333-100ML	Sigma-Aldrich
Plasmid Midi AX	092-10	A&A Biotechnology
Mieszanki inhibitorów proteaz	04693154001	Roche
SDS - laurylosiarczan sodu	L3771	Sigma-Aldrich
SP600125	S5567-10MG	Sigma-Aldrich
TEMED	T9281	Sigma-Aldrich
Trypsin EDTA	BE17-161F	Lonza
Tryton X-100	T8787	Sigma-Aldrich
Trizma base	T1503	Sigma-Aldrich
Tweed 20	568760421	Poch
Western Lightning® Plus–ECL	NEL103001E A	Perkin Elmer

4.1.3 Bufory

Użyte w doświadczeniach bufory przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Bufory

Nazwa używana w opisie metod	Skład
Bufor A:	1% TX- 100, 0,1% SDS, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5
Bufor B:	250 mM Tris-HCl, 8% SDS, 40% glicerol, 0,4% błękit bromofenolowy, 400 mM DTT
Bufor C:	25 mM Tris, 192 mM glycina, 0,01% (x/v) SDS, pH 8,3
Bufor D:	25 mM Tris-HCl, 200 mM glicyna, 20% metanol
Bufor E:	5% odtłuszczone mleko rozpuszczone w buforze F
Bufor F:	5 mM Tris–HCl pH 7,4, 15 mM NaCl, 0,01% Tween 20
Bufor G:	50mM TRIS (pH 8,0), 10mM EDTA, 100µg/ml RNA-za A
Bufor H:	0,2M NaOH, 1% SDS
Bufor I:	3M roztwór octanu potasu, pH 4,8
Bufor J:	1,2M NaCl, 50mM TRIS pH 8,5, 15% izopropanol

4.1.4 Plazmidy

Do badań użyto plazmidów niosących allele kodujące nieaktywne formy białek JNK1-DN, JNK2-DN, które uzyskano dzięki uprzejmości Prof. Michael Karin

(Univeristy of California, San Diego, USA). Wektor plazmidowy pcDNA 3.1 został zakupiony w firmie Invitrogen.

Mapy plazmidów znajdują się w załączniku nr 1.

4.2 Metody

4.2.1 Hodowla komórkowa

Linie komórkową AR42J hodowano w pożywce F12K z dodatkiem 20 % FBS, penicyliny, streptomycyny i czynnika wzrostu śródbłonna (VEGF) (1 ng/mL). Temperatura otoczenia hodowli wynosiła 37°C; atmosfera składała się w 95 % z tlenu i w 5 % z dwutlenku węgla. Komórki pasażowano w sterylnych warunkach, w komorze laminarnej II klasy bezpieczeństwa, przy konfluencji 70 - 80 %.

4.2.2 Transformacja *E.coli*

Aby powielić plazmidowe DNA transformowano je do komórek kompetentnych szczepu *E.coli*, następnie wszystko wysiewano na płytki z podłożem LA uzupełnianym właściwym antybiotykiem. Procedura została wykonana w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego, dzięki uprzejmości prof. UG, dr hab. Anny Herman - Antosiewicz.

4.2.3 Oczyszczanie plazmidowego DNA

Do oczyszczenia plazmidowego DNA użyto zestaw firmy A&A Biotechnology - Plasmid Midi AX. 100 ml hodowli bakteryjnej wirowano, a następnie zawieszano w buforze G. Następnie dodawano bufor H, mieszano i odstawiano na 5 minut inkubacji w temperaturze pokojowej. Po upływie 5 minut w celu precypitacji chromosomalnego DNA, soli potasowych SDS oraz białek dodano bufor I. Mieszaninę wirowano 5 minut przy 1500 x g. Utworzony na skutek wirowania przesącz przeniesiono na kolumnę Plasmid 200. Kolumnę, przez którą przeszedł lizat płukano 20 ml buforu I. Następnie za pomocą buforu H eluowano DNA. Do powstałego eluatu dodano wzmacniacz precypitacji oraz izopropanol, po czym próbkę wirowano przez 10 minut przy 11 000 x g. Powstały po wirowaniu

osad płukano w 70 % etanolu i wirowano ponownie 3 minuty z prędkością 11000 x g. Powstały supernatant zlano a osad osuszano, po czym rozpuszczano w 200 μ l ultraczystej H₂O. Poziom DNA mierzono przy pomocy spektrofotometru NanoDrop 1000.

4.2.4 Transfekcja komórek

Komórki linii AR42J 24 godziny przed transfekcją siano na płytkę 6 - cio dołkową w ilości 5×10^5 na każdy dołek. Komórki transfekowano plazmidami kodującymi nieaktywne formy białek JNK1-DN, JNK2-DN oraz kontrolnie wektorem plazmidowym pcDNA 3.1. W sterylnej probówce przygotowywano mieszaninę zawierającą: 200 μ l pożywki OPTI- MEM (bez dodatku FBS i antybiotyków), 6 μ l odczynnika FuGENE HD, oraz 2 μ g plazmidowego DNA (proporcja na jeden dołek). Całość mieszano delikatnie i odstawiano do inkubacji na 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie 200 μ l mieszaniny transfekcyjnej dodawano do odpowiednich dołków i odstawiano do inkubatora na 24 godziny. Po upływie tego czasu komórki przez 1 godzinę traktowano 10 nmol/L ceruleiną rozpuszczoną w PBS lub samym PBS.

4.2.5 Pomiar reaktywnych form tlenu

Ilość RFT zbadano za pomocą cytometrii przepływowej używając barwnika organicznego diocjanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H2DCFDA) [92, 93]. H2DCFDA ma charakter lipofilny dzięki czemu łatwo przenika do wnętrza komórki, gdzie ulega rokładowi przez komórkowe esterazy do 2',7' - dichlorodihydrofluoresceiny (H2DCF). Ostatecznie, po reakcji z nadtlenkami i żelazem, powstaje silnie fluoryzująca 2',7'- dichlorofluoresceina (DCF), która jest następnie łatwo oznaczana na przykład za pomocą cytometru przepływowego.

Komórki AR42J na 24 godziny przed doświadczeniem siano na płytkę 6-cio dołkową (5×10^5). Po przyklejeniu do podłoża komórki przez 1 godzinę były ekspozowane na PBS lub 10 nmol/L roztwór ceruleiny rozpuszczony w PBS. 30 minut przed zakończeniem inkubacji z ceruleiną komórki zostały wybarwione 5 μ mol/L H2DCFDA. Następnie komórki zebrano i wirowano przez 5 minut przy 1500 x g. Supernatant zdekantowano, a komórki dwukrotnie płukano w 1 ml

PBS i wirowano z predkością 1500 x g. Uzyskane osady zawieszono w 200 μ l PBS i poddawano analizie na cytometrze przepływowym Coulter Epics XL flow cytometer - posiadający filtry dla widma barwnika (λ = 495nm wzbudzenia i λ = 530nm emisji). Pomiar cytometryczny był wykonywany we współpracy z dr Agnieszką Jóźwik z Zakładu Fizjopatologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

W niektórych eksperymentach komórki były traktowane ceruleiną po 2 godzinnej wstępnej inkubacji z 25 μ mol/L deferoksaminy (DFO) - związkiem chelatującym o dużym powinowactwie do żelaza.

Obciążenie komórek żelazem uzyskano poprzez 24 godzinną inkubację komórek AR42J z 1 μ mol/L heminą.

4.2.6 Pomiar labilnej puli żelaza

Ustalenie wpływu ceruleiny na zmiany w puli labilnego żelaza wykonano poprzez analizę fluorescencji kalceiny w mikroskopii. Wpływ ceruleiny na ilość labilnego żelaza wyznaczono poprzez analizę fluorescencji kalceiny jak to opisał Breuer i wsp. [94]. Komórki zostały wysiane z gęstością 1×10^5 na studzienkę płytki 6-cio dołkowej. Po przyklejeniu komórek do podłoża, poddano je działaniu 10 nmol/L ceruleiny przez 1 godzinę. Komórki wybarwiano 5 μ mol/L kalceiną 30 minut przed końcem inkubacji z ceruleiną. Następnie komórki zebrano, przepłukano dwukrotnie roztworem PBS, po czym dokonano pomiaru fluorescencji kalceiny przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Szkiełka mikroskopowe były analizowane przy użyciu systemu konfokalnego Radiance 2100 (Bio-Rad, Hemel Hempstead, Wielka Brytania), z laserem kryptonowo-argonowym, zamontowanym na mikroskopie świetlnym Eclipse 600 (Nikon, Tochigi, Japonia). Zdjęcia uzyskano używając obiektywu (x60) z substancją imersyjną i aperturą liczbową = 1,4.

4.2.7 Przygotowanie lizatów komórkowych

Komórki po inkubacji z odpowiednimi odczynnikami przy pomocy skrobaków laboratoryjnych zbierano wraz z pożywką do odpowiednich probówek i wirowano przez 9 minut z prędkością 1500 x g w temperaturze 4°C. Uzyskane osady komórkowe płukano dwukrotnie w PBS i wirowano z prędkością 1500 x g. Po ostatnim wirowaniu osady zawieszano w zimnym buforze lizującym (Bufor A) z

dodatkiem inhibitorów proteaz (Roche). Następnie próbki mrożono 4 x 10 minut w temperaturze -20°C, po czym wirowano z prędkością 16 000 x g w temperaturze 4°C. Uzyskany lizat komórkowy przenoszono do odpowiedniej probówki typu Ependorf i używano do dalszych badań.

4.2.8 Pomiar stężenia białka w lizatach

Pomiar poziomu białka w lizatach komórkowych wykonywano za pomocą metody Bradford [95]. Do badania stosowano odczynnik Bradford Reagent firmy Sigma Aldrich. Pomiar absorbancji przeprowadzono używając spektrofotometru (DR 3900, Hach Lange) przy długości fali $\lambda = 595$ nm zgodnie z instrukcją producenta.

4.2.9 Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

Aby rozdzielić białka na żelu poliakrylamidowym do lizatów komórkowych dodano odpowiednie ilości buforu obciążającego (bufor B) oraz buforu A. W celu denaturacji białek, tak zmieszane próby gotowano w temperaturze 95°C przez 10 minut. Elektroforetycznego rozdziału białek dokonywano w 12 % żelu poliakrylamidowym – skład żelu podano w tabeli 4.

Tabela 4. Skład żelu poliakrylamidowego 12%

12%	Rozdzielający	Zagęszczający
LIQUACRYL	2,9 ml	0,63 ml
LIQUABIS	1,86 ml	0,33 ml
dH2O	4,2 ml	2,8 ml
4xTRIS/SDS pH 8.8/ 6.8	3 ml	1,25 ml
10% APS	42 μ l	25 μ l
TEMED	12 μ l	6 μ l

Na wcześniej przygotowany żel nanoszono wzorec masy - Page Ruler Plus firmy Fermentas oraz badane próby. Elektroforeza została przeprowadzona na aparacie Mini Protean 3 (Bio-Rad) w buforze elektrodowym (bufor C) przy napięciu 100 V dla żelu zagęszczającego i 120 V dla żelu rozdzielającego.

4.2.10 Transfer białek na membranę oraz ich identyfikacja

Transfer białek znajdujących się na żelu, na membranę PVDF wykonano używając buforu do transferu (bufor D) oraz aparatu firmy Bio-Rad- Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (natężenie prądu 260 mA, napięcie 25 V, czas 1 godzina). W tym celu składano tzw. „kanapkę transferową” złożoną z dwóch grubych bibułek typu Whatman, między którymi umieszczona jest membrana PVDF oraz żel poliakrylamidowy. Po transferze membranę blokowano przez 1 godzinę w 5% odtłuszczonym mleku (bufor E). Zablockowane membrany inkubowano z wytrząsaniem z monoklonalnymi przeciwciałami I rzędowymi skierowanymi przeciwko ferrytynie L, całą noc, w temperaturze 4 °C. Następnego dnia membrany płukano 4 x 5 minut w TBST (Bufor F) po czym przez 1 godzinę inkubowano je z mysimi przeciwciałami II rzędowymi skoniugowanymi z peroksydazą chrzanową. Po inkubacji z przeciwciałami II-rzędowymi membrany ponownie płukano 4 x 5 minut w TBST. Wizualizację białek wizualizację białek dokonywano używając odczynnika Western Lightning® Plus-ECL (PerkinElmer) i utrwalano na kliszy rentgenowskiej- Amersham Hyper Film ECL (Amersham Bioscience). Analizę densytometryczną badanych białek wykonano za pomocą programu ImageJ (National Institutes of Health, USA) [96] i normalizowano względem β - aktyny.

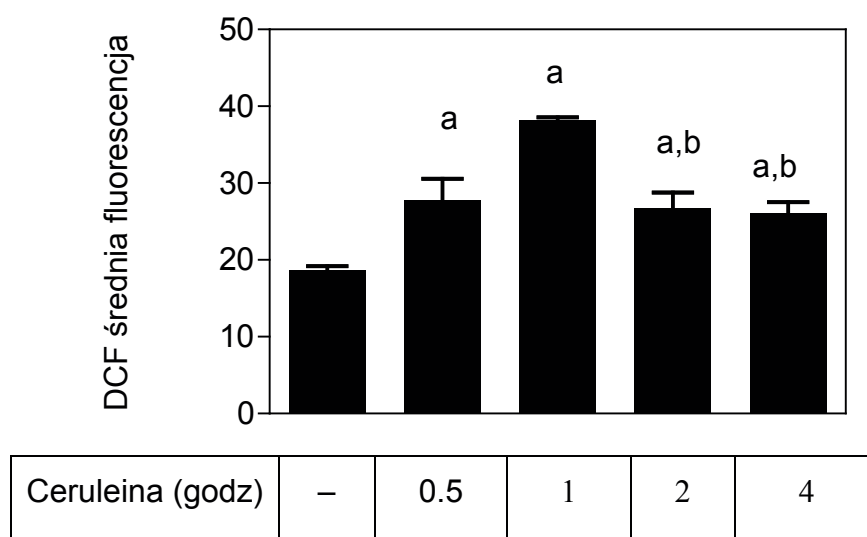
4.2.11 Analiza statystyczna

Istotność wyników intensywności fluorescencji DCF sprawdzono jednokierunkową analizą wariancji, a następnie testem porównań wielokrotnych Bonferroniego. Istotność wyników fluorescencji kalceiny oraz Western Blot ferrytyny sprawdzono testem T-Studenta. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią oraz odchylenie standardowe.

5. Wyniki

5.1 Ceruleina indukuje stres oksydacyjny w komórkach AR42J

Komórki AR42J wykazały wzrost poziomu RFT po 30 minutach od potraktowania ceruleiną. Maksymalny poziom RFT zaobserwowano po 1 godzinie. Poziom RFT obniżył się w 2 i 4 godzinie (**rycina 7**), jednak utrzymywał się na wyższym poziomie niż w grupie kontrolnej traktowanej PBS. Dane te potwierdzają wcześniejsze obserwacje wzrostu RFT w komórkach AR42J traktowanych ceruleiną [97].



Rycina 7. Tworzenie zależnych od ceruleiny RFT. Średnia intensywność fluorescencji DCF w AR42J po traktowaniu PBS w grupie kontrolnej oraz 10 nmol/l ceruleiny przez 0.5, 1, 2 i 4 godziny.

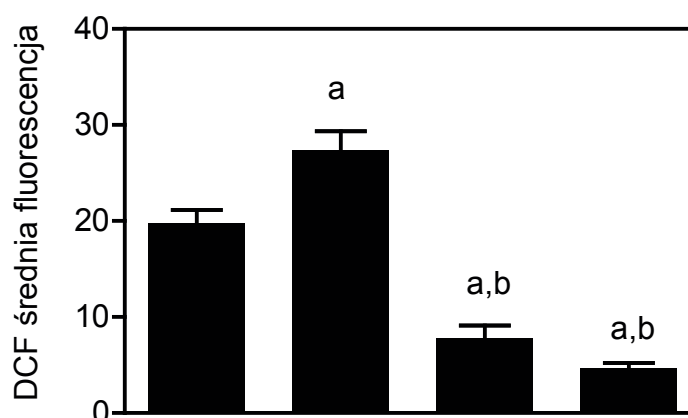
Podano średnią wartość $\pm$ SD (n=3).

a) $p < 0,05$ istotna różnica w porównaniu do grupy kontrolnej traktowanej PBS

b) $p < 0,05$ istotna różnica w porównaniu do grupy traktowanej ceruleiną przez 1 godzinę.

5.2 Tworzenie reaktywnych form tlenu w komórkach AR42J zablockowane przez chelatację żelaza

By potwierdzić hipotezę o znacznym udziale labilnej puli żelaza (LIP) w tworzeniu RFT komórki AR42J potraktowano chelatorem żelaza - DFO. Jak pokazano na **rycina 8** wcześniejsze podanie komórkom AR42J 25 - $\mu\text{mol/L}$ DFO obniża poziom RFT poniżej wartości obserwowanej w komórkach kontrolnych (nie traktowanych ceruleiną).



Ceruleina	-	+	+	-
DFO	-	-	+	+

Rycina 8. Tworzenie RFT stłumione przez deferoksaminy (DFO). Średnia intensywność fluorescencji DCF w AR42J po traktowaniu 10 nmol/L ceruleiny przez 2 godziny z lub bez wstępnego 2 godzinnego traktowania 25- $\mu\text{mol/L}$ DFO.

Podano średnią wartość $\pm$ SD (n=3).

a) $p < 0,05$ istotna różnica w porównaniu do grupy kontrolnej traktowanej PBS

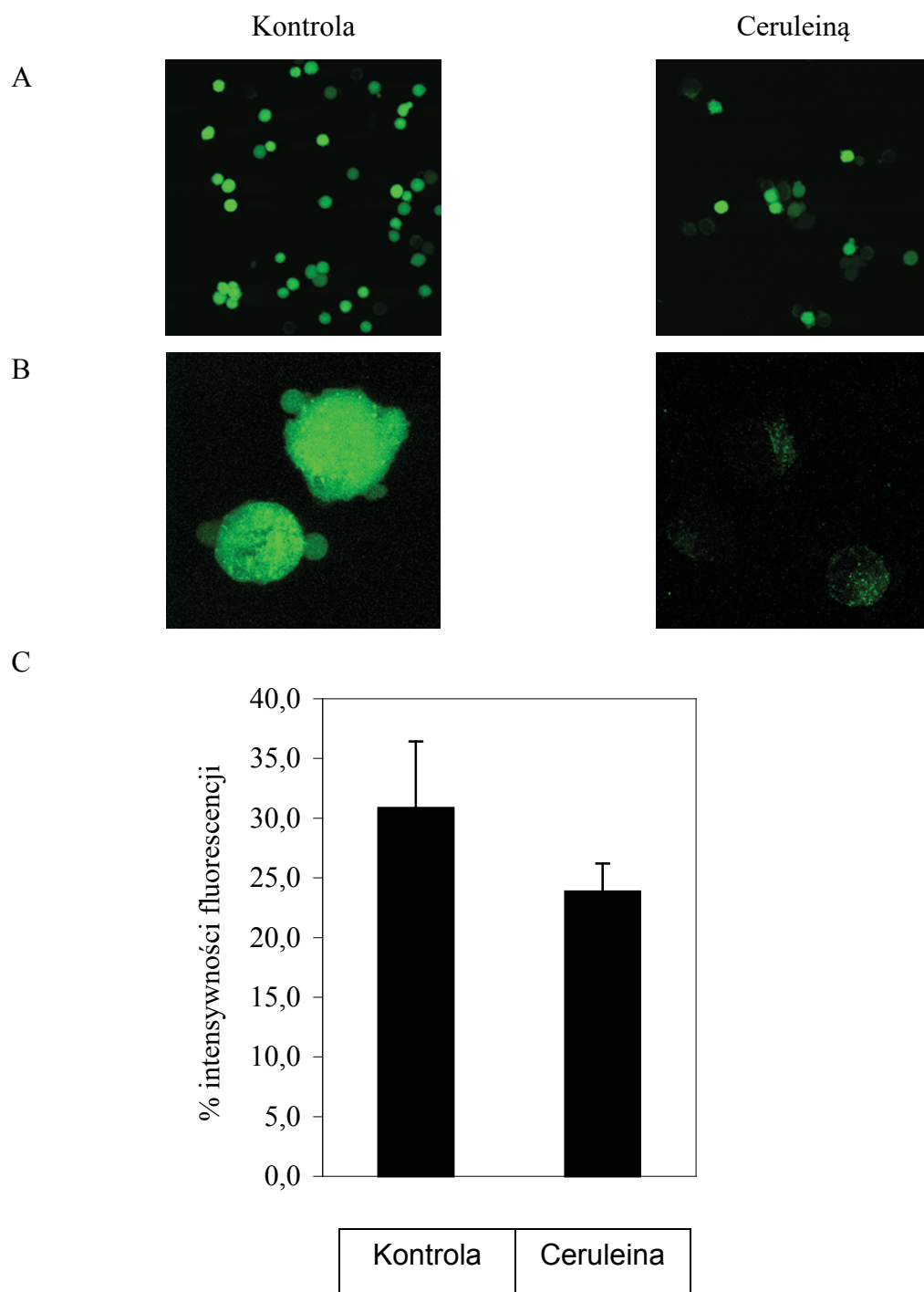
b) $p < 0,05$ istotna różnica w porównaniu do grupy traktowanej ceruleiną.

Wyniki pokazane powyżej (**rycina 7** i **rycina 8**) wskazują razem na przynajmniej częściowy udział LIP w tworzeniu RFT. Jest to spójne z moją hipotezą, że ceruleina wpływa na wzrost RFT w komórkach AR42J poprzez mechanizm

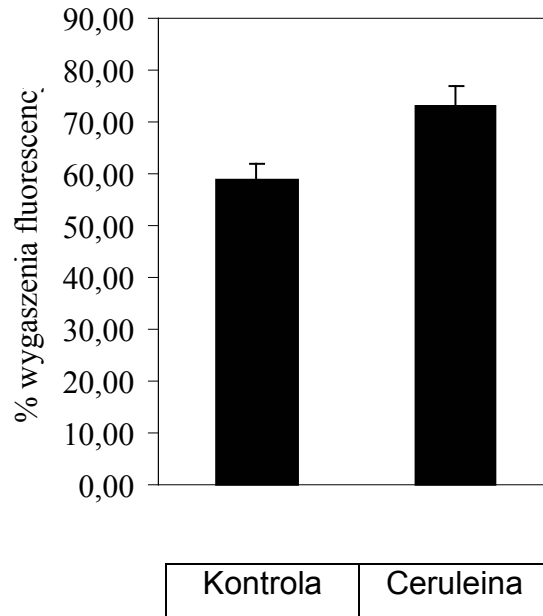
zależny od żelaza. To badanie sugeruje, że ograniczenie dostępności LIP, która normalnie jest obecna w każdej komórce, powinno również ograniczyć tworzenie RFT.

5.3 Ceruleina wpływa na wzrost labilnej puli żelaza

By ustalić czy tworzenie RFT po indukcji ceruleiną jest zależne od zmian w LIP czy tylko od tworzenia nadtlenków, oceniliśmy wpływ ceruleiny na LIP po wybarwieniu komórek AR42J kalceiną. Jak wykazano we wcześniejszych badaniach wygaszenie fluorescencji kalceiny następuje po uwolnieniu żelaza z wewnątrzkomórkowych zapasów [84]. Intensywność fluorescencji spadła średnio z 30,8% do 23,9% w komórkach traktowanych ceruleiną względem komórek grupy kontrolnej traktowanych PBS. Odsetek komórek (uwzględniając ich powierzchnię) z wygaszoną fluorescencją kalceiny wzrósł średnio z 58,67 % do 73,24 % w komórkach traktowanych ceruleiną względem komórek grupy kontrolnej traktowanych PBS (**rycina 9**). Spadek fluorescencji kalceiny w komórkach traktowanych ceruleiną potwierdza wzrost poziomu labilnej puli żelaza (LIP) w komórkach pęcherzykowatych trzustki AR42J po indukcji zapalenia przez ceruleinę.



D



Rycina 9. Ceruleina indukuje wzrost LIP.

A: Reprezentatywny obraz z mikroskopu fluorescencyjnego fluorescencji

kalceiny w AR42J po traktowaniu PBS (kontrola) i jednej dawki 10 nmol/L ceruleiny przez 1 godzinę.

B: Powiększony obraz komórki AR42J w grupie kontrolnej i po traktowaniu ceruleiną.

C: Procentowa zmiana intensywności fluorescencji kalceiny w grupie kontrolnej i po traktowaniu ceruleiną

100% = najwyższa zanotowana wartość fluorescencji.

Podano średnią wartość $\pm$ SD (n=4).

p=0,1 bez istotnej różnicy w porównaniu do grupy kontrolnej traktowanej PBS

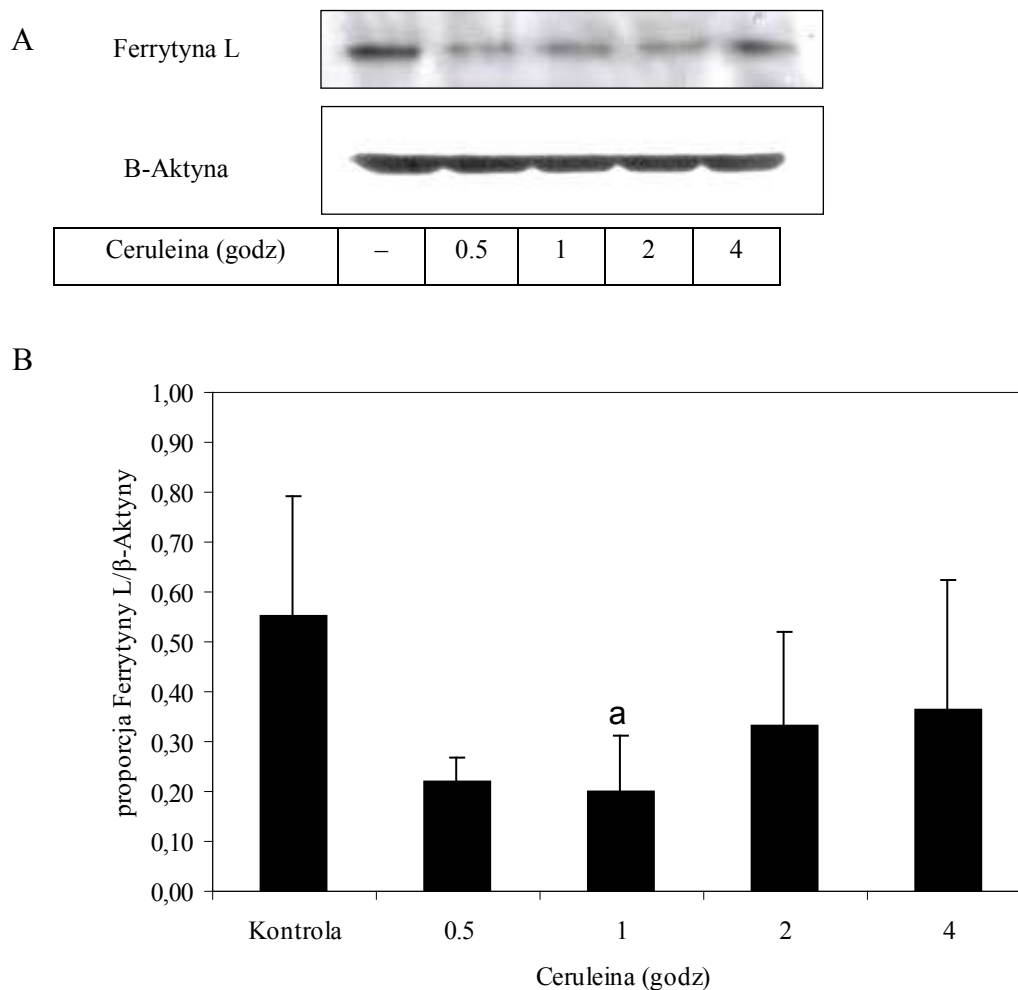
D: Odsetek powierzchni komórek z wygaszoną fluorescencją kalceiny w grupie kontrolnej i po traktowaniu ceruleiną.

Podano średnią wartość $\pm$ SD (n=4).

p<0,05 istotna różnica w porównaniu do grupy kontrolnej traktowanej PBS

5.4 Ceruleina indukuje wzrost reaktywnych form tlenu oraz degradację ferrytyny

Kilka doniesień pokazuje, że ferrytyna wewnątrz komórek jest głównym białkiem magazynującym żelazo i jednocześnie głównym źródłem LIP [98, 99]. Zarówno ograniczenie biosyntezy ferrytyny jak i stymulacja jej degradacji może powodować wzrost LIP [100]. Co więcej jest wiele dowodów, że żelazo może być uwalniane z ferrytyny i innych białek magazynujących przez przykładowo anion ponadtlenkowy [101, 102]. W tej pracy oceniono ilość ferrytyny w komórkach traktowanych ceruleiną, zakładając, że spadek stężenia ferrytyny może wskazywać jej przyspieszoną degradację. Ceruleina obniża ilość ferrytyny w komórkach AR42J (**rycina 10**). Już po 30 minutach stymulacji ceruleiną obserwuje się wyraźny spadek ferrytyny, a po 60 minutach osiągnięto maksymalny efekt. Zmiany ferrytyny są odwrotnie skorelowane ze zmianami w powstawaniu RFT. Najsilniejsze tworzenie RFT zaobserwowano po 1 godzinie stymulacji ceruleiną, kiedy ilość ferrytyny jest najniższa. Po 2 godzinach od początku stymulacji ilość ferrytyny rośnie (**rycina 10**), natomiast poziom RFT spada (**rycina 7**). Wyniki te sugerują, że żelazo uwolnione z ferrytyny bierze udział w tworzeniu RFT w komórkach AR42J traktowanych ceruleiną.



Rycina 10. Degradacja ferrytyny po indukcji ceruleiną.

A: Western Blot ferrytyny L z użyciem lizatów komórek AR42J traktowanych 10-nmol/L ceruleiną przez 0.5, 1, 2, i 4 godziny. Kontrola traktowana PBS. Żele zostały odizolowane i ponownie inkubowane z przeciwciałami p-aktynie w celu zapewnienia równego obciążenia białkiem.

B: Wynik analizy Western Blot przy użyciu programu ImageJ (National Institutes of Health, USA) [96] – pomiary densytometryczne prążków ferrytyny L podzielono przez pomiary β-aktyny.

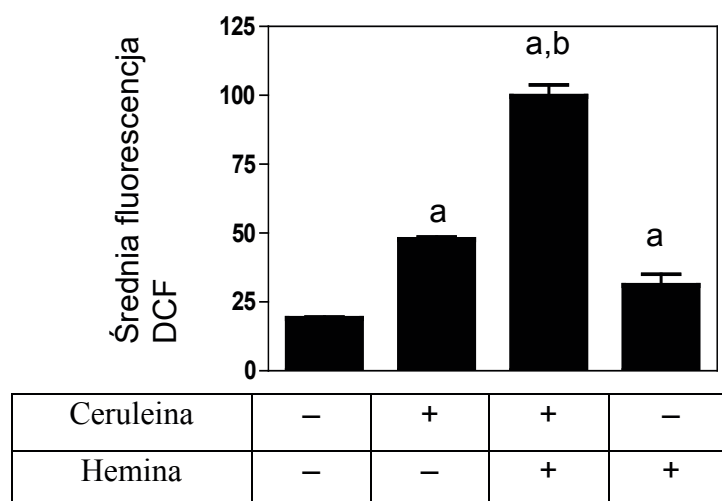
Podano średnią wartość $\pm$ SD (n=3).

a) $p < 0,05$ istotna różnica w porównaniu do grupy kontrolnej traktowanej PBS

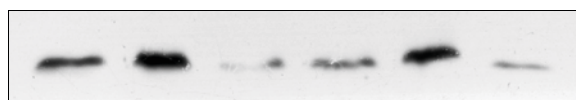
5.5 Silniejsze tworzenie reaktywnych form tlenu po wysyceniu komórek AR42J żelazem

Aby dodatkowo zbadać relację między tworzeniem RFT po indukcji ceruleiną i żelazem, oceniono wpływ wstępnego traktowania heminą na tworzenie RFT. Hemina jest porfiryną zawierającą żelazo, którą można użyć do wzbogacania komórek w żelazo. Komórki AR42J wykazują znacznie silniejsze tworzenie RFT po ceruleinie, gdy wstępnie zostaną wzbogacone żelazem z heminy (**rycina 11A**). Komórki AR42J wstępnie obciążone heminą, ale nie potraktowane ceruleiną, wykazują tylko nieznacznie silniejsze tworzenie RFT w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Traktowanie heminą prowadzi do wzrostu poziomu ferrytyny, co potwierdza spodziewany wzrost zapasu żelaza w komórce (**rycina 11B**, **rycina 11C**). Ceruleina obniża poziom ferrytyny w komórkach traktowanych heminą podobnie jak w tych bez heminy (**rycina 11B**, **rycina 11C**). Dane te sugerują, że tworzenie RFT po stymulacji ceruleiną jest zależne od ilości żelaza uwalnianego z ferrytyny. W celu obserwacji zmian w wolnej puli żelaza (LIP) komórek AR42J, traktowanych heminą i ceruleiną, zmierzono odsetek powierzchni komórek z wygaszoną fluorescencją kalceiny. Po godzinie od inkubacji z ceruleiną zauważa się większe wygaszenie fluorescencji (wzrost LIP) (**rycina 11D**). Potwierdza to zwiększenie LIP po indukcji zapalenia w komórkach AR42J przez ceruleinę.

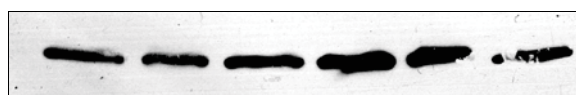
A



B Ferrytyna L

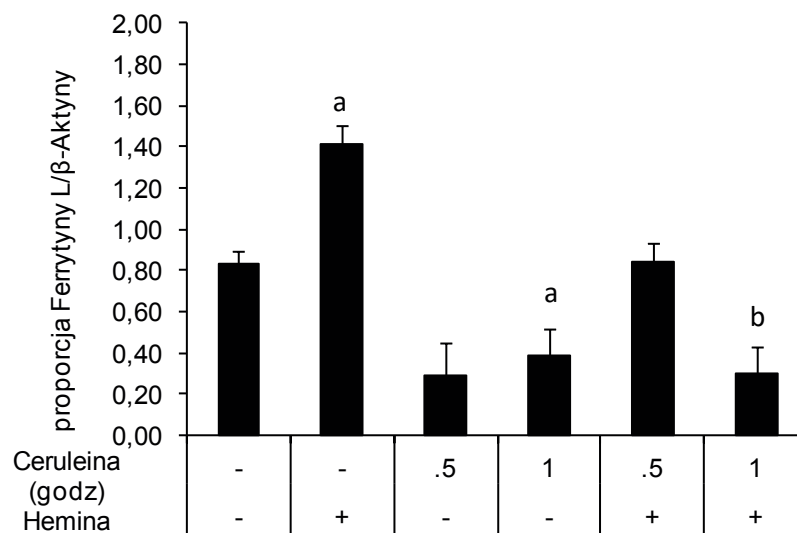


B-Aktyna

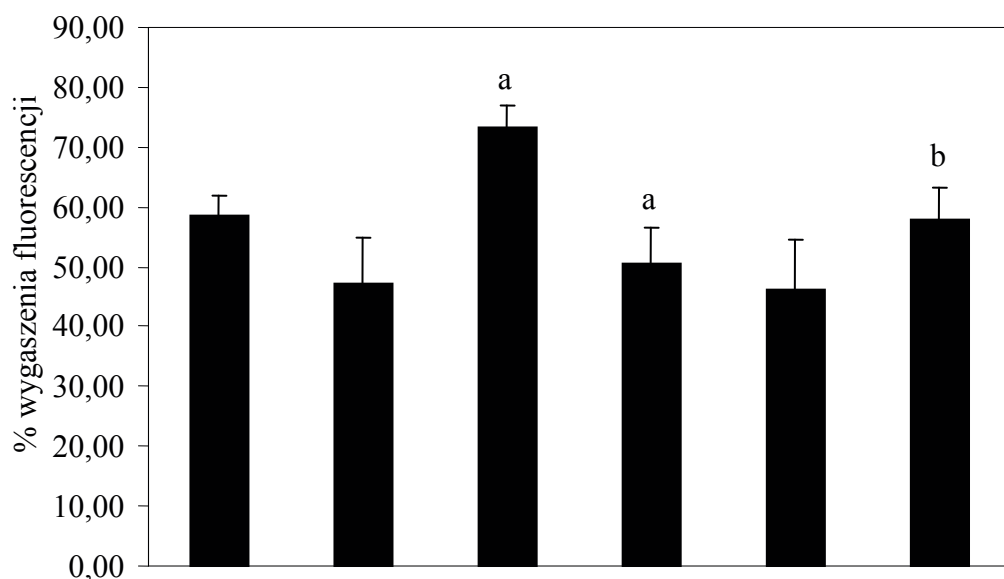


Ceruleina(godz)	–	–	0.5	1	0.5	1
Hemina	–	+	–	–	+	+

C



D



Ceruleina (godz)	–	0.5	1	–	0.5	1
Hemina	–	–	–	+	+	+

Rycina 11. Indukcja ceruleiną po wstępnym obciążeniu heminą.

A: Średnia fluorescencja DCF w komórkach AR42J traktowanych przez 1 godzinę ceruleiną (10 nmol/l) oraz z i bez heminy (1 μ mol/l), którą podano 24 godziny przed ceruleiną. Podano średnią wartość $\pm$ -SD (n=3).

a) $p < 0,05$ istotna różnica w porównaniu do grupy kontrolnej traktowanej PBS

b) $p < 0,05$ istotna różnica w porównaniu do grupy traktowanej tylko ceruleiną

B: Western Blot ferrytyny L z użyciem lizatów komórek AR42J traktowanych przez 0,5 i 1 godzinę ceruleiną (10-nmol/l) oraz z i bez heminy (1 μ mol/l), którą podano 24 godziny przed ceruleiną. Kontrola traktowana PBS. Żele zostały odizolowane i ponownie inkubowane z przeciwciałami p-aktynie w celu zapewnienia równego obciążenia białkiem.

C: Wynik analizy Western Blot przy użyciu programu ImageJ (National Institutes of Health, USA) [96] – pomiary densytometryczne prążków ferrytyny L podzielono przez pomiary β -aktyny.

Podano średnią wartość $\pm$ -SD (n=3).

a) $p < 0,05$ istotna różnica w porównaniu do grupy kontrolnej traktowanej PBS

b) $p < 0,05$ istotna różnica w porównaniu do grupy traktowanej heminą

D: Odsetek powierzchni komórek z wygaszoną fluorescencją kalceiny traktowanych przez 1 godzinę z ceruleiną (10 nmol/l) oraz z i bez heminy (1 μ mol/l), którą podano 24 godziny przed ceruleiną.

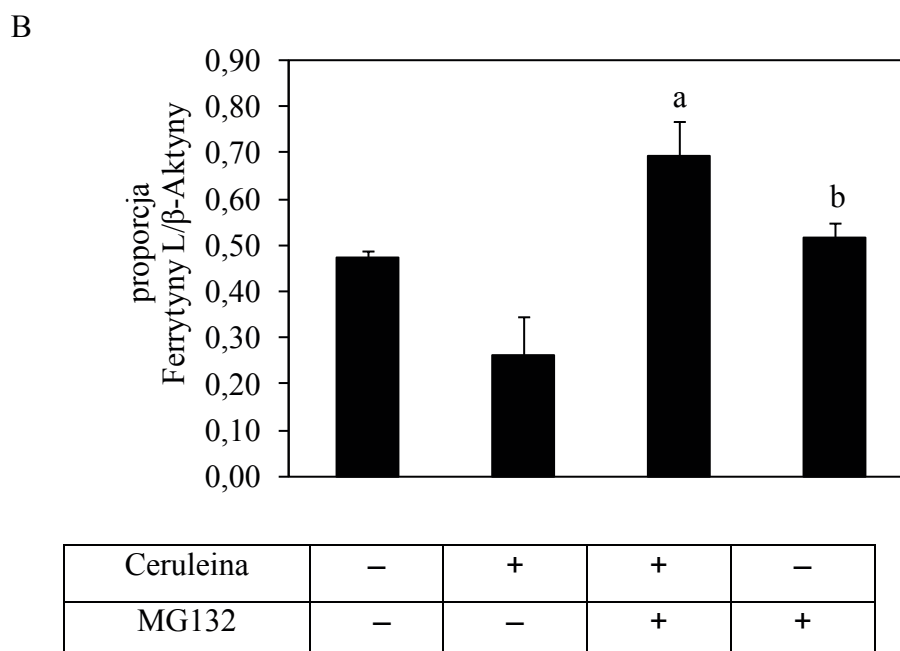
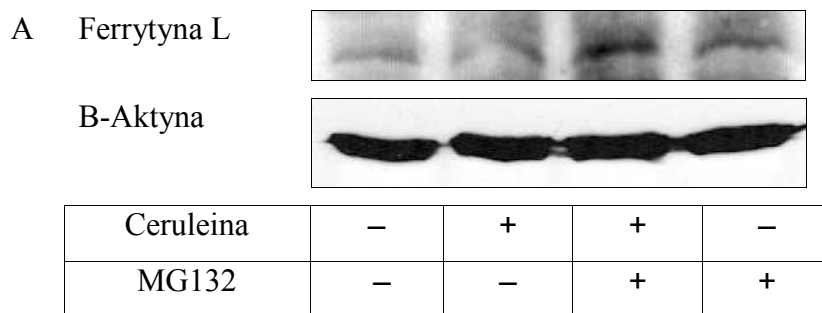
Podano średnią wartość $\pm$ SD (n=4).

a) $p < 0,05$ istotna różnica w porównaniu do grupy kontrolnej traktowanej PBS

b) $p = 0,06$ w porównaniu do grupy traktowanej tylko hemina

5.6 Rola proteasomów w degradacji ferrytyny.

Celem ustalenia udziału proteasomów w procesie degradacji ferrytyny zależnej od indukcji ceruleiną potraktowano wstępnie komórki AR42J inhibitorem proteasomów MG132, który jest aldehydem białkowym i na zasadzie analogii do substratu efektywnie blokuje proteolityczną aktywność proteasomu o charakterze chymotrypsynopodobnym [103]. Inkubacja komórek AR42J z MG132 zwiększa poziom ferrytyny w porównaniu do kontroli i znosi całkowicie obserwowaną degradację ferrytyny po indukcji zapalenia ceruleiną. Wyniki jednoznacznie potwierdzają udział proteasomów tym procesie (**rycina 12**).



Rycina 12. Wpływ inhibitora proteasomów MG132 na degradację ferrytyny.

A: Western Blot ferrytyny L z użyciem lizatów komórek AR42J traktowanych przez 1 godzinę z ceruleiną (10-nmol/l) oraz z i bez inhibitora proteasomów MG132, którą podano 2 godziny przed ceruleiną. Kontrola traktowana PBS. Żele zostały odizolowane i ponownie inkubowane z przeciwciałami p-aktynie w celu zapewnienia równego obciążenia białkiem.

B: Wynik analizy Western Blot przy użyciu programu ImageJ (National Institutes of Health, USA) [96] – pomiary densytometryczne prążków ferrytyny L podzielono przez pomiary β-Aktyny.

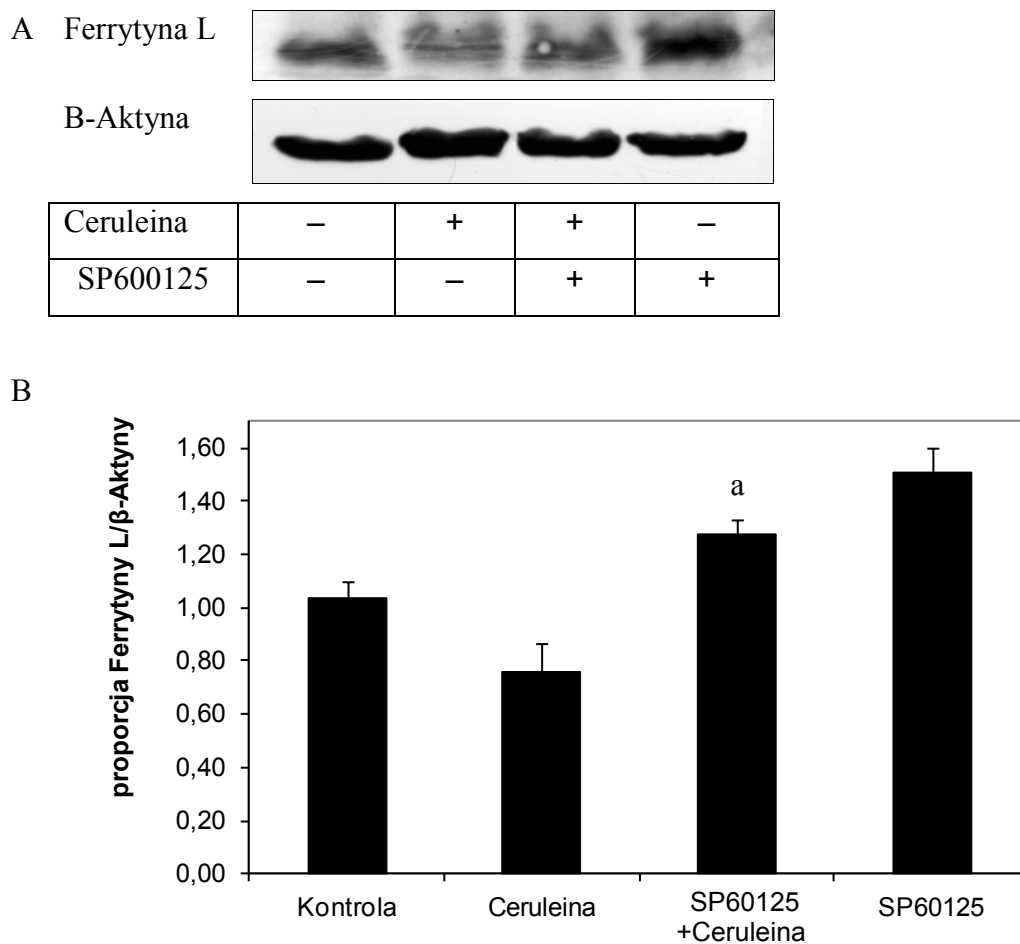
Podano średnią wartość $\pm$ SD (n=3).

a) $p < 0,05$ istotna różnica w porównaniu do grupy traktowanej ceruleiną

b) $p < 0,05$ istotna różnica w porównaniu do grupy kontrolnej traktowanej PBS

5.7 Degradacja ferrytyny po indukcji ceruleiną jest zależna od kinazy JNK1

Wcześniejsze badanie pokazują, że szlak sygnałowy kinazy JNK1 jest zaangażowany w kontrolę degradacji ferrytyny-L w komórkach raka prostaty, które potraktowano TNF [88]. W pracy tej postawiono hipotezę, że proces degradacji ferrytyny w komórkach AR42J po indukcji ceruleiną, może być również kontrolowany przez JNK1. Celem oceny tego procesu zbadano wpływ inhibitora kinazy JNK – SP600125 na komórki AR42 traktowane ceruleiną. Jak można zobaczyć poniżej (**rycina 13**), wstępna inkubacja z SP600125, chroni komórki AR42J przed degradacją ferrytyny wywołanej ceruleiną.



Rycina 13. Wpływ inhibitora kinazy JNK – SP600125 na komórki AR42 traktowane ceruleiną.

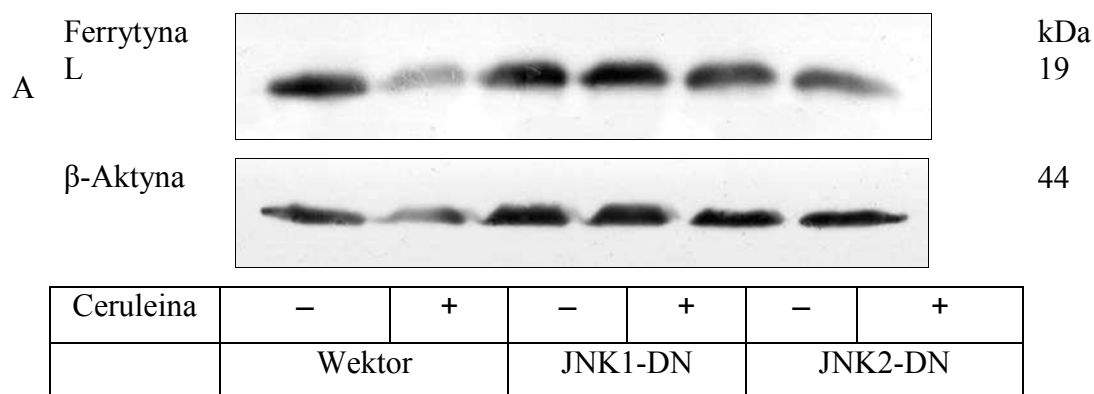
A: Western Blot ferrytyny L z użyciem lizatów komórek AR42J traktowanych przez 1 godzinę z ceruleiną (10-nmol/l) oraz z i bez inhibitora kinazy JNK - SP600125, który podano 1 godzinę przed ceruleiną. Kontrola traktowana PBS przez 1 godzinę. Żele zostały odizolowane i ponownie inkubowane z przeciwciałami p-aktynie w celu zapewnienia równego obciążenia białkiem.

B: Wynik analizy Western Blot przy użyciu programu ImageJ (National Institutes of Health, USA) [96] – pomiary densytometryczne prążków ferrytyny L podzielono przez pomiary β-Aktyny.

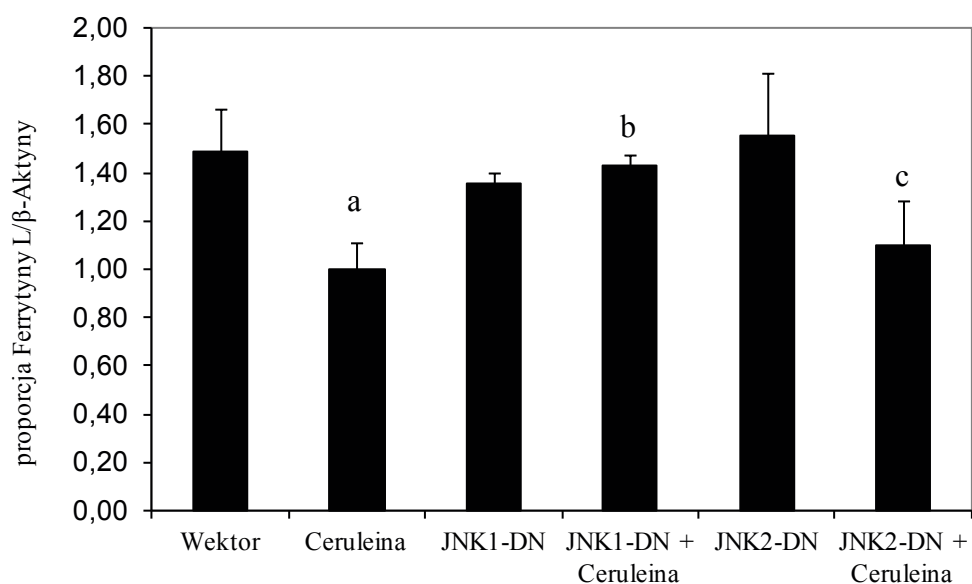
Podano średnią wartość $\pm$ SD (n=3).

a) $p < 0,05$ istotna różnica w porównaniu do grupy traktowanej tylko ceruleiną

Celem potwierdzenia udziału szlaku kinaz JNK w degradacji ferrytyny po indukcji ceruleiny wykonano doświadczenie z zastosowaniem komórek AR42J transfekowanych wektorem plazmidowym z mutacją powodującą inaktywację kinazy JNK1 oraz JNK2. W komórkach transfekowanych pustym wektorem zaobserwowano jak w poprzednich eksperymentach degradację ferrytyny po inkubacji komórek z ceruleiną. Podobny wynik zaobserwowano w komórkach transfekowanych wektorem z mutacją nieaktywnej kinazy JNK2. W komórkach transfekowanych wektorem z mutacją nieaktywnej kinazy JNK1 nie zaobserwowano degradacji ferrytyny (**rycina 14**).



B



Rycina 14. Degradacja ferrytyny w komórkach transfekowanych wektorem z mutacją nieaktywnej kinazy JNK1.

A: Western Blot ferrytyny L z użyciem lizatów komórek AR42J transfekowanych pustym wektorem plazmidowym, wektorem z mutacją nieaktywnej kinazy JNK1 (JNK1-DN) lub JNK2 (JNK2-DN) traktowanych przez 1 godzinę z PBS (kontrola) lub ceruleiną (10-nmol/l). Żele zostały odizolowane i ponownie inkubowane z przeciwciałami p-aktynie w celu zapewnienia równego obciążenia białkiem.

B: Wynik analizy Western Blot przy użyciu ImageJ (National Institutes of Health, USA) [96] – pomiary densytometryczne prążków ferrytyny L podzielono przez pomiary β-Aktyny.

Podano średnią wartość $\pm$ SD (n=3).

a) $p < 0,05$ istotna różnica w porównaniu do grupy z pustym wektorem

b) $p = 0,07$ bez istotnej różnicy w porównaniu do grupy z JNK1-DN

c) $p < 0,05$ istotna różnica w porównaniu do grupy z JNK2-DN

Potwierdza to jednoznacznie udział szlaku sygnałowego zależnego od JNK1 w procesie degradacji ferrytyny w komórkach AR42J po indukcji doświadczalnego modelu ostrego zapalenia trzustki za pomocą ceruleiny.

6. Dyskusja

Ostre zapalenie trzustki jest chorobą o nieprzewidywalnym przebiegu i dużym ryzyku zgonu. Szczegółowy patomechanizm tej choroby nie jest dokładnie poznany. W wielu publikacjach potwierdza się istotny udział RFT w patogenezie OZT [33, 40, 46, 47, 98, 104]. Reaktywne formy tlenu stanowią szeroką grupę związków do których zaliczane są wolne rodniki, nadtlenki, wodoronadtlenki i inne. Wykazano, że obecność żelaza ma istotny wpływ na rodzaj powstających wolnych rodników. Wolne rodniki różnią się między sobą nie tylko strukturą, ale też reaktywnością. Przykładowo aminokwas siarkowy - cysteina w białku jest bardzo wolno utleniany przez nadtlenek wodoru. Jednocześnie cysteina w białku posiada duże powinowactwo do żelaza. Związane z białkami żelazo stymuluje powstawanie rodnika hydroksylowego, który powoduje utlenienie reszty sulfhydrylowej cysteiny co w konsekwencji może powodować wzrost lub spadek biologicznej aktywności danego białka. W związku z powyższym biologiczny efekt białek może być inny w przypadku obecności wolnego żelaza i nadmiernej produkcji RFT. W niniejszej pracy podjęto próbę molekularnego wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za regulację poziomu wolnej puli żelaza (LIP) – żelaza wchodzącego w reakcję wolnorodnikowe. Dotychczasowe badania wskazują, że trzustka jest narządem gromadzącym żelazo [105, 106]. Z chemicznego punktu widzenia wydaje się oczywistym, że taka akumulacja żelaza może sprzyjać powstawaniu żelazo zależnych RFT i tym samym stymulować rozwój OZT. Jednakże z biologicznego punktu widzenia nie jest to takie oczywiste. Wynika to z faktu, że żelazo w komórce jest wykorzystywane bezpośrednio w procesach metabolicznych, a jego nadmiar jest magazynowany w ferrytynie. Istotnym jest podkreślenie, że żelazo w ferrytynie nie stymuluje produkcji RFT, ale jest głównym potencjalnym źródłem wolnego reaktywnego żelaza. Badania przeprowadzone przez innych autorów jak i w naszym laboratorium wykazały, że ferrytyna może ulegać proteolitycznej degradacji co doprowadza do uwolnienia zmagazynowanego żelaza [88, 107, 108]. Proces ten wydaje się być kontrolowany przez kinazy aktywowane stresem. Co ciekawe w badaniach Dąbrowskiego i wsp. [109] wykazano, że zahamowanie kinaz JNK, które należą do kinaz aktywowanych stresem, prowadziło do ograniczenia procesu zapalnego w przebiegu OZT.

W mojej pracy przyjąłem hipotezę badawczą, że aktywacja kinaz JNK w komórkach traktowanych ceruleiną spowoduje degradację ferrytyny i uwolnienie zmagazynowanego żelaza.

6.1 Udział reaktywnych form tlenu w modyfikacji przebiegu ostrego zapalenia trzustki

Przebieg OZT i jego skutki kliniczne zależą od zaburzeń równowagi mechanizmów obronnych i kaskady aktywacji enzymatycznej połączonych z procesami zapalnymi. Udowodniono, że RFT mają istotny wpływ na tę równowagę. Sam mechanizm nie został jeszcze dokładnie wyjaśniony, istnieje wiele badań wskazujących na wysoką złożoność tych mechanizmów. Poznanie w pełni wszystkich mechanizmów procesu OZT, w szczególności tych zależnych od powstawania RFT, pozwoli być może na modyfikację przebiegu choroby i sukces terapeutyczny.

Badania na modelu zwierzęcym OZT po indukcji ceruleiną wykazały znamienny wzrost stężenia wodoronadtlenków lipidowych w trzustkach we wczesnym okresie trwania choroby (3 godziny) [47]. Potwierdza to udział patologicznych reakcji wolnorodnikowych w przebiegu OZT skutkujących pojawieniem się intensywnych procesów peroksydacji lipidów. Wraz ze wzrostem stężenia wodoronadtlenków lipidowych obserwowano zmiany morfologiczne wskazujące na rozwój ostrego zapalenia trzustki oraz wzrost stężenia amylazy w surowicy badanych zwierząt [47]. Zaobserwowano również powrót do normalnego stężenia wodoronadtlenków po 6 godzinach od indukcji OZT, pomimo pogłębiających się zmian morfologicznych, co wskazuje na istotną rolę reakcji wolnorodnikowych w bardzo wczesnym okresie OZT. Jak wykazały badania kliniczne największa śmiertelność jest związana z ciężką postacią OZT we wczesnej fazie OZT (do 55 %) [29]. Skuteczność potencjalnej terapii OZT musi skoncentrować się na działaniu w jak najwcześniejszym okresie tak by zatrzymać rozwój patologicznych procesów zapalnych prowadzących do powstania niewydolności narządowej i powikłań (zakażona martwica i sepsa). Dotychczasowe badania wskazują na możliwość zastosowania naturalnych i sztucznych przeciwutleniaczy w leczeniu i zapobieganiu OZT [47].

6.2 Indukcja ostrego zapalenia trzustki w modelu komórkowym

Materiał do badań niniejszej pracy stanowiła linia komórek AR42J. Linia ta jest używana jako model egzokrynnego zapalenia trzustki do badań komórkowych szlaków sygnałowych wiodących do ekspresji cytokin, powstawania RFT i śmierci komórki [66]. Model komórkowy OZT, w przeciwieństwie do modeli zwierzęcych, jest w pełni niezależny od czynników zewnętrznych i fenotypowych. Pozwala na badanie populacji milionów klonów komórek pęcherzykowych trzustki podczas jednego doświadczenia w tych samych warunkach i uzyskiwanie wiarygodnych wyników trudnych metodologicznie badań mechanizmów zachodzących na poziomie molekularnym. Pierwszym etapem tej pracy było zbadanie czy w wybranym modelu doświadczalnym zachodzą opisywane wcześniej reakcje wolnorodnikowe.

Komórki AR42J potraktowano ceruleiną wywołując OZT. Zbadano ilość RFT mierząc fluorescencję DCF metodą fluorymetrii przepływowej i zaobserwowano istotny wzrost poziomu RFT po godzinie od indukcji ceruleiną (**rycina 7**). Doświadczenie potwierdziło obserwowany wcześniej efekt w badanym modelu doświadczalnym [97]. Hodowla komórkowa AR42J okazała się dobrym materiałem do badań reakcji wolnorodnikowych w ceruleinowym modelu ostrego zapalenia trzustki. Szybki wzrost RFT wskazuje na udział procesów wolnorodnikowych w początkowej fazie rozwoju OZT. Podobny efekt obserwowano w badaniach na modelu zwierzęcym [47]. Kliniczne zastosowanie przeciwutleniaczy i związków blokujących powstawanie wolnych rodników może być ograniczone do działania profilaktycznego i ewentualnie do ograniczenia progresji procesów zapalnych. Trudno sobie wyobrazić możliwość zastosowania leku w pierwszej godzinie po indukcji OZT - w większości przypadków OZT moment indukcji (spożycie alkoholu, zablokowanie ujścia przewodu trzustkowego przez zstępujący z dróg żółciowych) jest poza zakresem terapeutycznym. Są jednak przypadki, w których moment możliwej indukcji OZT podlega obserwacji lekarskiej - dotyczą one OZT jako powikłania po zabiegach diagnostycznych (endoskopowa cholangiopankreatografia wsteczna, endoskopowe drenowanie przewodów trzustkowych) oraz zabiegach chirurgicznych (częściowa resekcja trzustki, splenektomia, limfadenektomia przy gastrektomii). W tych przypadkach zastosowanie profilaktyczne terapeutyków ograniczających powstawanie RFT może mieć zastosowanie kliniczne [47, 110].

Zatrzymanie indukcji OZT jest trudne w praktyce klinicznej, natomiast ograniczenie procesów zapalnych z zastosowaniem leków z grupy przeciwutleniaczy (m.in.: witaminy A, C, E, selen, glutamina, N-acetylocysteina) jest już w trakcie badań klinicznych. Leki z tej grupy zmniejszyły czas hospitalizacji, wskaźnik śmiertelności i ograniczyły odsetek powikłań i niewydolności wielonarządowej w przebiegu OZT. Badania potwierdziły istotny spadek stężenia białka C-reaktywnego oraz stężenia amylazy i lipazy. Zastosowanie przeciwutleniaczy nie wpłynęło na złagodzenie bólu i wiązało się z łagodnymi działaniami ubocznymi (biegunka, wymioty, hipernatremia) [111].

6.3 Rola ferrytyny w ochronie komórek przed toksycznością żelaza

Wzrost LIP wewnątrz komórek trzustki może odbywać się poprzez przechwytywanie żelaza krążącego we krwi drogą zależną od TF i jest powiązany z jego stężeniem, które może wzrastać przy zwiększonej podaży żelaza z pokarmem. Głównym źródłem LIP wydaje się jednak proces degradacji ferrytyny. Każdy kompleks ferrytyny może związać do 4500 jonów żelaza, dlatego jest to główna pula zapasowego żelaza komórkowego. Przeważająca część ferrytyny jest umiejscowiona w komórkach, jedynie niewielka jej ilość jest obecna w surowicy. Stężenie ferrytyny w surowicy ma bezpośrednią korelację z całkowitą ilością żelaza zmagazynowanego w organizmie [112].

Pomiary laboratoryjne stężenia ferrytyny w surowicy są częścią badań pozwalających określić niedobór żelaza zapasowego w organizmie. Niskie stężenie ferrytyny powiązane z niskim stężeniem hemoglobiny jest jednym z wskaźników niedokrwistości z niedoboru żelaza [113]. Niskie stężenie ferrytyny obserwuje się w stanach niedoborów pokarmowych obserwowanych u wegetarian [114] oraz u chorych na celiakię, niedoczynność tarczycy i u ludzi z niedoborem witaminy C. Czułość tego badania jest jednak znacznie mniejsza w stanach zapalnych, w obecności nowotworu, infekcjach i niedotlenieniu, kiedy poziom ferrytyny wzrasta, co wskazuje na rolę ferrytyny jako białka ostrej fazy [115]. Endotoksyny zwiększają ekspresję genów ferrytyny z wyjątkiem endotoksyn *Pseudomonas aeruginosa*, które powodują spadek stężenia ferrytyny [116]. Wysokie wartości ferrytyny mogą więc świadczyć, albo o dużych zapasach żelaza w organizmie, albo

o ostrej reakcji zapalnej. Aby rozróżnić te dwa stany należy oznaczyć poziom białka C reaktywnego.

Wysokie stężenie ferrytyny w surowicy świadczy o schorzeniach związanych z nadmiernym gromadzeniem żelaza, takich jak hemochromatoza, hemosyderoza i niektóre porfirie oraz o chorobach układowych i autoimmunologicznych (np.: w zespole aktywacji makrofagów i chorobie Still'a) [117].

Biosynteza ferrytyny i TFR jest regulowana na poziomie translacji przez białka regulacji żelaza (ang. *iron regulatory protein* – IRP). W sytuacji niedoboru żelaza, IRP wiąże się z elementami odpowiedzi na żelazo (ang. *iron response element* – IRE) na odpowiednich odcinkach mRNA dla TFR blokując syntezę ferrytyny. Gdy ilość żelaza jest duża, IRP nie wiąże się z IRE, co skutkuje degradacją mRNA dla TFR pozwalając na ekspresję mRNA ferrytyny i wzrost jej ilości w komórce [100, 118].

W doświadczeniach wykonanych w ramach tej pracy wykazano, że indukcja OZT poprzez inkubację komórek AR42J z ceruleiną powoduje spadek ilości ferrytyny L zgromadzonej w komórkach (**rycina 10**). Warto podkreślić fakt, iż metoda użyta w tym doświadczeniu pozwalała określić degradację ferrytyny wewnątrz komórki. Degradacja wewnątrzkomórkowa ferrytyny w przebiegu OZT nie musi objawiać się obniżeniem stężenia ferrytyny w surowicy, ponieważ jej stężenie wzrasta w stanach zapalnych w konsekwencji udziału ferrytyny w puli białek ostrej fazy [115, 117].

Istotnym zjawiskiem zaobserwowanym w tej pracy jest korelacja czasowa między spadkiem ilości ferrytyny L w komórkach AR42J (**rycina 10**), a wzrostem RFT mierzonych za pomocą cytometru przepływowego (**rycina 7**). Potwierdza to hipotezę, że ceruleina indukując OZT w komórkach AR42J prowadzi do tworzenia RFT poprzez wzrost LIP w procesie degradacji wewnątrzkomórkowej ferrytyny.

Celem dalszego zbadania udziału żelaza w tworzeniu RFT po indukcji ceruleiną, komórki potraktowano wcześniej heminą, która jest porfiryną zawierającą żelazo [119]. Hemina powstaje po utlenieniu hemu (hemoglobiny) w obecności jonów chlorkowych, jest protoporfiryną IX zawierającą trójwartościowy atom żelaza z podstawnikiem chlorkowym. W medycynie doświadczalnej hemina znalazła zastosowanie do badania zjawisk związanych z przeładowaniem komórek żelazem. Poprzez traktowanie badanych komórek heminą dostarcza się komórkom dodatkowe

ilości żelaza z zewnątrz [120, 121]. Kliniczne zastosowanie heminy ogranicza się do terapii ostrej przerywanej porfirii [122].

Ferrytyna jest białkiem magazynującym jony żelaza, którego biosynteza ulega zwiększeniu wraz ze wzrostem ilości żelaza w komórce. Umożliwia to komórce kontrolę ilości tworzonych RFT na drodze zależnej od żelaza, ponieważ żelazo zawarte w ferrytynie nie bierze udziału w reakcji redox. Hemina moduluje biosyntezę ferrytyny w co najmniej dwóch mechanizmach: transkrypcji i translacji. Hemina zwiększa transkrypcję prowadząc do istotnego zwielokrotnienia ilości mRNA ferrytyny. Nasilenie transkrypcji mRNA ferrytyny ulega też wzmożeniu pod wpływem samej protoporfiryny IX bez jonów żelaza. Hemina wzmacnia również proces translacji ferrytyny, czego nie obserwuje się w przypadku samej protoporfiryny IX. Skuteczność heminy w zwiększaniu wewnątrzkomórkowego magazynu żelaza i ilości ferrytyny potwierdza 10 - krotny wzrost ilości mRNA ferrytyny oraz 20 - krotny wzrost ilości białek ferrytyny [120].

W niniejszej pracy doświadczenie z traktowaniem komórek AR42J heminą potwierdziło obserwowany u innych autorów wzrost stężenia ferrytyny i związany z tym przyrost zapasów żelaza w komórce (**rycina 11B**). Jak wykazały badania nad działaniem heminy [120] wzrost stężenia ferrytyny w komórkach AR42J następuje najpewniej na drodze zwiększonej biosyntezy ferrytyny. Większa ilość wewnątrzkomórkowej ferrytyny wiąże większą ilość wolnego żelaza. Pomimo pomnożenia ilości żelaza w komórce po traktowaniu heminą stężenie LIP powinno pozostać na podobnym poziomie lub nawet może się zmniejszyć zważywszy na zdolność wiązania nowopowstającej ferrytyny. Ten mechanizm potwierdziła próba z kalceiną (**rycina 11D**).

Komórki obciążone heminą wykazywały tylko nieznacznie silniejszą produkcję RFT (**rycina 11A**) przy prawie dwukrotnym wzroście ilości ferrytyny (**rycina 11B** i **rycina 11C**) w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Pobudzenie biosyntezy ferrytyny zabezpiecza komórkę przed nadmiarem ilości wolnego i reaktywnego żelaza, dlatego mimo przeładowania komórek żelazem poziom RFT nie wzrasta nadmiernie. Sytuacja zmieniła się diametralnie, gdy komórki przeładowane żelazem heminy zostały poddane działaniu ceruleiny, co spowodowało degradację ferrytyny, uwolnienie żelaza i wzrost żelazo-zależnej generacji RFT. Po stymulacji ceruleiną komórek traktowanych heminą zaobserwowano istotny ponad 3 - krotny wzrost poziomu RFT (**rycina 11A**), natomiast ilość ferrytyny zmniejszyła

się (**rycina 11B** i **rycina 11C**). Wynikie te wyraźnie wskazują, że żelazo zgromadzone w ferrytynie w komórkach trzustkowych odgrywa istotną rolę w generacji RFT indukowanej przez ceruleinę. Badania ostatnich lat sugerowały, że NOX oraz oxydaza ksantynowa są istotnym źródłem RFT w komórkach trzustkowych po traktowaniu ceruleiną. Produktami reakcji katalizowanych przez te enzymy są nadtlenek wodoru i anionorodnik ponadtlenkowy. Moje badania nie wykluczają roli tych enzymów w generacji RFT, jednakże jak wspomniano wyżej, wzrost LIP jaki obserwowałem w komórkach AR42J po stymulacji ceruleiną może istotnie zmieniać rodzaj syntetyzowanych RFT oraz ich biologiczny efekt. Zarówno nadtlenek wodoru i anionorodnik ponadtlenkowy w obecności żelaza będą stymulowały powstawanie rodnika hydroksylowego, którego reaktywność ze strukturami komórkowymi znacznie przewyższa reaktywność pozostałych RFT.

Zaobserwowałem też różnicę w zmianach stężenia ferrytyny komórek traktowanych ceruleiną bez i z obciążeniem heminą. Komórki obciążone heminą zwiększyły znacznie ilość ferrytyny, a następnie po indukcji ceruleiną sukcesywnie traciły jej zasoby. Zaobserwowany w tym doświadczeniu efekt świadczy o naturalnej odpowiedzi adaptacyjnej komórki na nadmiar żelaza. Komórki traktowane żelazem pozyskują dużo toksycznego dla nich żelaza, dlatego naturalną odpowiedzią jest zwiększenie biosyntezy ferrytyny, która broni je przed nadmiarem wolnego żelaza. W sytuacji nadmiaru żelaza w komórce, białka IRP nie łączą się z IRE na nici mRNA wspólnej dla TFR i ferrytyny umożliwiając nukleazom strawienie fragmentu nici mRNA kodującej TFR i odsłaniając odcinek mRNA dla biosyntezy ferrytyny [118]. Efektem tych procesów jest spadek biosyntezy TFR i wzrost biosyntezy ferrytyny. Zmniejsza się transport żelaza do komórki z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a w cytoplazmie dochodzi do zmniejszenia stężenia LIP przez wzmożone wiązanie żelaza w nowych zasobach ferrytyny. Mniejsza ilość LIP chroni komórkę przed toksycznością wolnego żelaza.

Komórki chronią się przed toksycznością wolnego żelaza zwiększając produkcję ferrytyny, która jest najważniejszym białkiem wiążącym żelazo. Znaczny wzrost ilości ferrytyny skutkuje bardzo efektywnym procesem wiązania wolnego żelaza. Traktowanie przez 24 godziny heminą komórek AR42J nie spowodowało spodziewanego wzrostu LIP, ale wręcz niewielki spadek LIP obserwowany w badaniu fluorescencji kalceiny (**rycina 11D**). Potwierdza to dużą zdolność ferrytyny do wiązania żelaza oraz sugeruje skłonność do nieznacznie nadmiernej

produkcji ferrytyny względem ilości przyjętego żelaza. Świadczyć to może o bardzo wrażliwym mechanizmie obronnym wykształconym w procesie ewolucyjnym jako odpowiedź na ryzyko wzrostu reaktywnego żelaza w organizmie.

W komórkach nietraktowanych heminą po 30 minutach indukcji ceruleinowego OZT doszło do dużego spadku ferrytyny, ale po kolejnych 30 minutach zanotowano niewielki wzrost ilości tego białka. Podobny wzór zmian w stężeniu ferrytyny zaobserwowano w komórkach potraktowanych nadtleniem wodoru [123]. Może to świadczyć o uruchomieniu mechanizmu obronnego komórek AR42J w odpowiedzi na stres oksydacyjny w postaci krótkotrwałej aktywacji transkrypcji ferrytyny, co umożliwia przystosowanie komórek do czynnika stresogennego. Ponieważ OZT indukowana ceruleiną jest procesem, który ulega samozahamowaniu, jest wielce prawdopodobne, że zwiększenie poziomu ferrytyny może być częścią programu adaptacyjnego mającego na celu dostosowanie się do stresu oksydacyjnego wywołanego ceruleiną. Jak już wspomniano podanie heminy powoduje nieznaczny spadek LIP w porównaniu do kontroli, natomiast działanie ceruleiny zwiększa poziom LIP zarówno w komórkach traktowanych PBS jak i obciążonych heminą (**rycina 11D**). Wzrost LIP w tych ostatnich nie jest istotny jak by mogło się spodziewać zestawiając dane z badaniem zmian ilości ferrytyny, ale należałoby wziąć pod uwagę stan początkowego zmniejszenia ilości LIP związanego z większym wychwytem żelaza przez nowo wyprodukowane zasoby ferrytyny. Degradacja ferrytyny i wzrost LIP po indukcji ceruleiny powoduje większe tworzenie RFT nasilając stres oksydacyjny i uszkodzenia komórek i tkanek trzustkowych.

Poziom RFT jest znacznie większy po obciążeniu komórek heminą, co sugeruje, że stany związane z nagromadzeniem żelaza mogą być niebezpieczne dla komórki i w przypadku rozwoju stanów zapalnych takich jak OZT potęgują procesy wolnorodnikowe. Jest to zgodne z badaniami związku między akumulacją żelaza, a zwiększonym ryzykiem zachorowalności na często spotykane choroby takie jak miażdżyca [124], stany zapalne płuc [125], reumatoidalne zapalenie stawów [126], choroby neurodegeneracyjne (choroba Parkinsona [127] i Alzheimera [128]). Jak już wspomniano ferrytyna pełni specyficzną rolę jako magazyn wewnątrzkomórkowego żelaza i dlatego jest niezwykle istotnym elementem mechanizmu ochronnego komórki przed reakcjami wolnorodnikowymi zależnymi od żelaza. Należy jednak

pamiętać, że ferrytyna może być również źródłem reaktywnego żelaza. Degradacja ferrytyny prowadzi do uwolnienia żelaza i zależnej od żelaza produkcji RFT. Wykazano, że ferrytyna komórkowa może ulegać degradacji proteolitycznej, w której czynny udział biorą proteasomy lub lizosomy [84, 85, 87].

W doświadczeniu przedstawionym powyżej (**rycina 12**) zastosowany inhibitor proteosomu MG132 prezentuje zdolność hamowania degradacji ferrytyny indukowanej ceruleiną, co sugeruje, że raczej to proteasomy aniżeli lizosomy są miejscem, gdzie ferrytyna ulega degradacji. Dane te potwierdzają wcześniejsze obserwacje, gdzie wykazano, że MG132 redukuje symptomy OZT w modelu zwierzęcym, jednak uwaga badaczy [129] skoncentrowała się na wpływie hamowania proteasomów na indukcję stanu zapalnego zależną od NF- κ B - transkrypcyjnego czynnika stresowego. MG132 blokuje nie tylko proteasomy, ale też kalpainę i katepsynę [103, 130]. Zarówno kalpaina jak i proteasomy niszczą białko I κ B - inhibitor aktywacji NF- κ B, dlatego MG132 blokując zarówno proteasomy, jak i kalpainę zwiększają dostępność I κ B doprowadzając do ograniczenia aktywacji NF- κ B i zmniejszenia stanu zapalnego. Kolejne doświadczenia pokazały, że MG132 wykazuje też właściwości wzmagające ekspresję białek szoku cieplnego (HSP, ang. *heat shock proteins*), które działają ochronnie w sytuacji stresowej, jaką niewątpliwie jest OZT [131].

Wyniki prezentowane w tej pracy pokazują zahamowanie degradacji ferrytyny przez MG132 po indukcji OZT przez ceruleinę (**rycina 12**). Zaobserwowano zniesienie rozpadu ferrytyny i jak wykazano uprzednio (**rycina 8**) taki przebieg ogranicza produkcję RFT, co może manifestować się kliniczną poprawą w dalszej ewolucji OZT. Ten dotychczas nie zbadany mechanizm świadczy o dodatkowym pozytywnym działaniu MG132 wskazując potrzebę dalszych eksperymentów rozstrzygających efekt terapeutyczny MG132 w OZT.

6.4 Udział szlaku kinazy JNK w regulacji procesu degradacji ferrytyny

Badania zrealizowane w mojej pracy potwierdziły hipotezę, że kinaza JNK1 reguluje proces degradacji ferrytyny i związane z tym uwolnienie żelaza oraz żelazo-zależną generację RFT.

Kinaza terminalna c-Jun (JNK) jest kinazą aktywowaną w wyniku stresu - stresu oksydacyjnego, osmotycznego, a także pod wpływem innych czynników stresogennych. Zwiększona produkcja wolnych rodników prowadzi do aktywacji JNK, a z drugiej strony aktywacja JNK pod wpływem innych bodźców może prowadzić do zwiększenia ilości RFT. Zaobserwowano, że tworzenie RFT indukowane przez TNF zostało zahamowane w komórkach z wyłączonym genem JNK, jednakże molekularny mechanizm tego zjawiska był nieznany [132]. Dopiero badania przeprowadzone między innymi w naszym laboratorium wykazały, że JNK1 reguluje tworzenie RFT na drodze indukcji degradacji ferrytyny i zwiększenia puli LIP w komórkach raka prostaty traktowanych TNF [84].

Traktowanie komórek trzustki ceruleiną aktywuje kinazę JNK, która została określona jako mediator zapalenia trzustki. Jednakże, dokładna rola JNK w OZT nie została jeszcze wyjaśniona. Odkryto, że RFT mogą aktywować JNK w trzustce po stymulacji ceruleiną, natomiast zahamowanie JNK poprzez specyficzne związki jak CEP-1347 albo SP600125 ogranicza proces OZT [133, 134]. Wyniki powyższych badań pozwoliły mi na sformułowanie hipotezy, że degradacja ferrytyny w komórkach pęcherzykowych trzustki będzie zależna od kinaz aktywowanych stresem.

Doświadczenia, które wykonałem w tej pracy potwierdziły udział szlaku sygnałowego JNK1 w procesie degradacji ferrytyny w komórkach pęcherzykowatych trzustki AR42J. Po zastosowaniu inhibitora kinazy JNK – SP600125 zaobserwowałem ograniczenie degradacji ferrytyny wywołanej ceruleiną (**rycina 13**). W komórkach AR42J transfekowanych wektorem nieaktywnej kinazy JNK1 nie obserwowałem degradacji ferrytyny po indukcji ceruleiną (**rycina 14**), ale degradacja ferrytyny była obecna w komórkach AR42J transfekowanych wektorem nieaktywnej kinazy JNK2. Jeżeli degradacja ferrytyny podlega regulacji przez szlak sygnałowy JNK1 to prawdopodobnie inne białka aktywowane w sytuacji stresowej też regulują metabolizm żelaza w komórce wpływając na szlak JNK i pośrednio na

degradację ferrytyny. Możliwe, że zjawiska, które zaobserwowałem w doświadczeniu w obciążeniu komórek AR42J heminą są związane z tą właśnie regulacją. Obciążenie heminą spowodowało nieznaczny spadek LIP w porównaniu do kontroli, a wzrost LIP po stymulacji ceruleiną komórek obciążonych wcześniej heminą nie był istotny jak się tego spodziewano (**rycina 11D**). Być może stres wywołany traktowaniem heminą powoduje, że proces degradacji ferrytyny jest hamowany właśnie na drodze regulacji szlaku sygnałowego zależnego od kinazy JNK1. Traktowanie heminą mogło spowodować wzrost aktywacji białek, które hamują aktywację JNK1, w związku z tym degradacja ferrytyny była niepełna i uwolnienie wolnego żelaza mniejsze niż zakładano. Te przypuszczenia potwierdzają badania nad wpływem takich białek jak np. HSP 70 [135] i transferaza glutationowa (GST) [136], które działają hamująco na szlak JNK w sytuacjach stresogennych dla komórki. Wyżej wymienione spostrzeżenia wskazują na nowy ciekawy kierunek badań nad regulacją procesu degradacji ferrytyny, który warto podjąć w kolejnych projektach badawczych.

Znaczenie szlaku JNK w wielu chorobach intensyfikuje poszukiwania specyficznych inhibitorów JNK do zastosowania klinicznego. Konkurencyjność do ATP dla JNK wykazuje SP600125, który jest jednym z najbardziej przebadanych inhibitorów JNK i wiele doświadczeń *in vivo* potwierdziło potencjał hamowania JNK w zastosowaniu terapeutycznym mimo, że SP600125 hamuje jednocześnie wszystkie trzy izoformy JNK i nawet szlak p38 w wyższych dawkach. Hamowanie przez SP600125 wszystkich trzech izoform JNK może być problematyczne, zwłaszcza w leczeniu raka, gdzie JNK1 i JNK2 mogą działać przeciwnie [137]. Efektywność kliniczną SP600125 ogranicza też słaba rozpuszczalność w wodzie. Jak pokazuje doświadczenie przedstawione w tej pracy (**rycina 13**), SP600125 chroni komórki AR42J przed degradacją ferrytyny. Potwierdza to nie tylko udział szlaku JNK1, ale też potencjalną użyteczność terapeutyczną SP600125 w modyfikowaniu przebiegu OZT poprzez stabilizację żelaza w komórkach pęcherzykowatych trzustki.

Coraz więcej prac badawczych analizuje zastosowanie różnych związków blokujących szlak JNK również w chorobach nowotworowych i neurodegeneracyjnych. Bardzo specyficznym inhibitorem o podobnym mechanizmie jak SP600125 jest AS601245, którego działanie na JNK3 przeważa nad JNK1 i JNK2. Ze względu na umiejscowienie i charakter działania JNK3, AS601245 wydaje się być obiecującym terapeutycznym w chorobach neurodegeneracyjnych, co

potwierdzono w modelach doświadczalnych [138]. Jak dotąd AS601245 nie wykazał wystarczającej skuteczności by przejść badania kliniczne. Inną drogą hamowania szlaku JNK jest blokowanie miejsca wiązania substratu lub miejsca regulacyjnego kinazy JNK. Poprzez fuzję sekwencji aminokwasowej odpowiadającej miejscu wiążącemu JNK w białku JIP1 do transaktywatora transkrypcji HIV-TAT wygenerowano peptyd hamujący penetrację komórkową JNK (ang. *cell penetrating JNK peptide inhibitor*, D-JNKI-1). Pewne manipulacje długości generowanego peptydu umożliwiły wytworzenie stosunkowo specyficznego inhibitora dla JNK3 i również specyficznego dla JNK2, co czyni go atrakcyjnym w potencjalnej terapii nowotworów skóry, gdzie znaczenie ma szlak sygnałowy JNK2, a nie JNK1 [139].

6.5 Wpływ nadmiaru żelaza na tworzenie reaktywnych form tlenu i uszkodzenie komórek trzustkowych

Kolejnym etapem tej pracy było zbadanie udziału LIP w procesie powstawiania RFT w badanym modelu doświadczalnego OZT. Labilna pula żelaza w obecności nadtlenu wodoru wchodzi w reakcję Fentona tworząc silnie reaktywny rodnik wodorotlenowy. Utlenione żelazo ulega redukcji przez anionorodnik ponadtlenkowy umożliwiając następny cykl reakcji. Poziom LIP jest utrzymywany między minimalnym zapotrzebowaniem komórki, a niebezpieczeństwem tworzenia rodnika wodorotlenowego, którego oddziaływanie na składniki komórkowe może powodować uszkodzenia cząsteczek biologicznych w tym DNA, RNA i białek. Ponadto rodniki wodorotlenowe generowane przez reakcję Fentona powodują peroksydację lipidów. Żelazo może też pośredniczyć w redukcji nadtlenu lipidów tworząc formy rodnikowe (ang. *epoxyallylic peroxy radicals*) wywołujące kolejne cykle tworzenia wolnych rodników. Ostatnio zaproponowano, że żelazo pełni jednak dwukierunkową rolę w peroksydacji lipidów - z jednej strony może zainicjować proces peroksydacji lipidów, z drugiej strony może kończyć tę inicjację wchodząc w interakcje z związkami rozpoczynającymi proces peroksydacji. Kolejne badania dowodzą kluczową rolę żelaza w procesie peroksydacji lipidów. Podanie dużej ilości żelaza zwierzętom doświadczalnym spowodowało uszkodzenie tlenowe lipidów [140], natomiast podanie związków chelatujących wiążących żelazo zapobiega tworzeniu zależnych od żelaza nadtlenu lipidów [141].

Ponieważ większość komórek zawiera LIP, można oczekiwać, że zwiększona intensywność tworzenia nadtlenków przy jednoczesnym braku zmian w LIP, może być wystarczająca do zwiększenia stresu oksydacyjnego. Dane prezentowane przez inne doświadczenia sugerują, że w komórkach traktowanych ceruleiną dochodzi do zwiększenia produkcji nadtlenków [48] podobnie do obserwowanego wzrostu LIP w moim doświadczeniu (**rycina 9**).

Jak wykazano we wcześniejszych badaniach wygaszenie fluorescencji kalceiny następuje po uwolnieniu żelaza z wewnątrzkomórkowych zapasów [84, 94]. W doświadczeniu wykonanym w ramach tej pracy użyto metody z kalceiną by ocenić wzrost LIP po uwolnieniu żelaza z zapasów wewnątrzkomórkowych. Uzyskany wynik nie umożliwia ustalenia dokładnej wielkości zmian do których doszło, jednak potwierdza wzrost stężenia LIP w komórkach pęcherzykowatych trzustki AR42J po indukcji zapalenia przez ceruleinę (**rycina 9**). Podobną metodę do oceny zmian w wolnej puli żelaza użyto przy badaniu procesów zapalnych wywołanych przez lipopolisacharydy [142].

6.6 Skutki nadmiernego gromadzenia żelaza w tkance trzustkowej

Nadmierna akumulacja żelaza jest zjawiskiem dość powszechnym u ludzi. Z wiekiem dochodzi do gromadzenia coraz większej ilości żelaza [143, 144]. Gromadzenie żelaza zależy od diety bogatej w żelazo hemowe i ubogiej w związki chelatujące żelaza, które znajdują się głównie w warzywach i owocach. Również brak aktywności fizycznej sprzyja akumulacji żelaza. Koncentracja żelaza występuje w różnych narządach, również w trzustce [105, 106], co potwierdzają badania pokazujące, że nadmierna akumulacja żelaza w organizmie prowadzi do insulinooporności [145]. Upuszczanie krwi, czyli pozbycie się nadmiaru żelaza, poprawiało wrażliwość na insulinę.

Przeciążenie żelaza jest powszechnym problemem klinicznym, wynikającym z zaburzeń absorpcji żelaza (dziedziczna hemochromatoza, talasemia intermedia) lub w wyniku stosowania przewlekłych transfuzji krwi jako terapii [146]. Przewlekłe leczenie przetaczaniem krwi w sposób nieunikniony prowadzi do wtórnego przeciążenia żelazem, co może poprzez zwiększone wytwarzanie RFT powodować

znaczne uszkodzenie tkanek i narządów, w tym wątroby i serca oraz może zaburzyć równowagę hormonalną [147].

Skutki nadmiaru żelaza są widoczne dopiero w momencie uszkodzenia tkanek, gdy pacjenci prezentują zaburzenia funkcji wątroby, cukrzycy lub kardiomiopatii [148, 149].

Badania na zwierzętach wskazują na ważną rolę trzustki w absorpcji żelaza; nadmierne gromadzenie żelaza w organizmie jest związane z uszkodzeniem komórek wewnątrzwydzielniczych trzustki [150]. Wykazano również związek chorób trzustki i hemosyderozy oraz hemochromatozy. Dziedziczna hemochromatoza jest chorobą autosomalnie recesywną, powodująca znacznie zwiększoną absorpcję jelitową żelaza [151]. Choroba może wystąpić, jeżeli osoba dziedziczy od obu rodziców kopie zmutowanego genu HFE (gen kodujący białko HFE, ludzkie białko hemochromatozy, ang. *human hemochromatosis protein*). Gen ten odpowiada za kontrolę wchłaniania żelaza w komórkach nabłonka jelit.

Nadmierne gromadzenie żelaza w trzustce powoduje uszkodzenie głównie komórek wysp trzustkowych i rozwój cukrzycy. Wystąpienie cukrzycy i szaro brązowego zabarwienia skóry jest typowym objawem hemochromatozy. Stąd też pochodzi pierwotna nazwa tej choroby - cukrzyca brązowa lub cukrzyca brunatna.

Trudno określić jakie zmiany zachodzą w komórkach pęcherzykowych trzustki u chorych z hemochromatozą, gdyż w dostępnym piśmiennictwie nie ma takich badań na materiale klinicznym. W analogicznym modelu zwierzęcym, myszy z mutacją genetyczną prowadzącą do zablokowania syntezy TF, prezentowały nadmierne wchłanianie żelaza z przewodu pokarmowego, co skutkowało przeciążeniem tkanek zmagazynowanym żelazem. Zaobserwowano u tych myszy postępujące do 9 miesiąca życia zmiany biochemiczne i histologiczne typowe dla OZT. Stwierdzono wzrost biochemicznych markerów zapalenia trzustki oraz stopniowe obumieranie komórek pęcherzykowych [152].

Istnieje kilka doniesień przypadków zapalenia trzustki i hemochromatozy w literaturze [153, 154]. Nie wykazano istotności statystycznej między występowaniem heterozygot z mutacją genu HFE prowadzącą do hemochromatozy wśród pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki lub rakiem trzustki a zdrową populacją [155], co może być związane z nieistotnymi zmianami metabolicznymi u heterozygot, szczególnie że istnieją doniesienia potwierdzające obecność homozygotycznych i wieloskładnikowych heterozygotycznych zmian w genie HFE

w rodzinach z dziedzicznym zapaleniem trzustki [156]. Należy zaznaczyć, że OZT powiązane z chorymi na hemochromatozę jest dość rzadką sytuacją, jednak uwzględniając fakt nadmiernego gromadzenia żelaza w organizmie w znacznie szerszej populacji ryzyko rozwoju OZT oraz cięższego przebiegu OZT ma bardzo istotne znaczenie kliniczne. Wymaga to dalszych badań klinicznych w celu określenia skali problemu oraz badań molekularnych wpływu nadmiaru żelaza na rozwój OZT, które podjąłem się w tej pracy.

6.7 Zmniejszenie dostępności żelaza ogranicza działanie reaktywnych form tlenu w ostrym zapaleniu trzustki

Ilość żelaza w organizmie podlega fizjologicznej regulacji, jednak brak naturalnego mechanizmu odpowiedzialnego za wydalanie nadmiaru żelaza powoduje odkładanie żelaza w narządach prowadząc do ich dysfunkcji. Przeciążenie organizmu żelazem prowadzi do wzrostu labilnej puli żelaza (LIP), która wywiera bezpośrednie działanie toksyczne, ale jednocześnie jest formą chelatowalną żelaza [157]. Jedną z możliwości terapeutycznych w przypadku chorób z nadmiarem żelaza jest upust krwi. Tej metody nie można jednak zastosować u pacjentów z niedokrwistością - wtedy postępowaniem z wyboru jest chelatacja żelaza. Stworzono kilka związków chelatujących żelazo takie jak deferoksamina (DFO), deferypron (DFP) i deferazyroks (DFX), które mobilizują żelazo z tkanek, tworząc kompleksy wydalone z kałem i moczem.

Wprowadzenie DFO w 1970 r. poprawiło znacznie długość życia pacjentów wymagających przewlekłych transfuzji krwi [158, 159]. Leczenie DFO powoduje obniżenie stężenia ferrytyny w surowicy krwi oraz w tkance wątroby [160], zmniejsza odsetek powikłań kardiologicznych, zapobiega powikłaniom hormonalnym [161] i wydłuża przeżycie [158]. Poza grupą pacjentów z potransfuzyjnym nadmiarem żelaza, leczenie za pomocą chelatorów żelaza może być też skuteczne w dziedzicznej hemochromatozie [162], porfirii skórnej późnej [163] i mukormykozie [164]. Co więcej wykazano, że żelazo jest kluczowym elementem dla proliferacji komórek nowotworowych, co pozwala spodziewać się korzyści z zastosowania chelatorów żelaza w leczeniu chorób nowotworowych [165, 166].

W dostępnym piśmiennictwie nie ma badań wskazujących na wpływ nadmiernego gromadzenia żelaza w komórkach na proces OZT oraz potencjał związków chelatujących żelazo w leczeniu OZT. Doświadczenie zmniejszające dostępność żelaza w komórkach AR42J (**rycina 8**) udowodniło, iż w obecności specyficznego chelatora żelaza deferoksaminy (DFO), ceruleina nie ma wpływu na oksydację DCFH. Nie wyklucza to jednak możliwości, że nadtlenki są ciągle tworzone w takich warunkach, chociaż jak to wcześniej zaprezentowano, nadtlenki mogą utleniać DCFH jedynie w obecności hemoprotein i żelaza [167, 168]. Wyniki przedstawione powyżej (**rycina 8**) wskazują nie tylko na zależność tworzenia RFT od ilości żelaza dostępnego w komórce, ale też możliwości modyfikacji przebiegu OZT przez związki chelatujące żelazo jak DFO. Obserwowana niższa oksydacja DCF w obecności DFO wskazuje na to, że żelazo bierze czynny udział w tworzeniu RFT nawet w grupie kontrolnej komórek nie traktowanych ceruleiną. DFO obniżając LIP zmniejsza potencjał komórek AR42J do generowania RFT co sugeruje możliwość zastosowania DFO w prewencji rozwoju OZT.

Dane te sugerują, że żelazo odgrywa istotną rolę w produkcji RFT i prawdopodobnie w patogenezie OZT. Udowodniono, że w modelu zwierzęcym OZT dootrzewna iniekcja 2,2' - dipirydylem (chelator jonów żelaza) poprzedzająca iniekcję ceruleiną powoduje złagodzenie hyperamylazemii (wysokie stężenie amylazy w surowicy) i histologicznych zaburzeń trzustki [98].

W ceruleinowym modelu OZT zaobserwowano większe tworzenie pochodnych karbonylowych białek, które są wskaźnikiem stresu oksydacyjnego [169]. Proces ten przebiega równolegle ze zmniejszeniem ilości ferrytyny. Pochodne karbonylowe białka powstają zazwyczaj w wyniku oksydacji określonych aminokwasów na drodze zależnej od żelaza, bądź też w wyniku reakcji białek z produktami peroksydacji lipidów [170, 171]. Badanie na szczurzym modelu OZT po indukcji kwasem taurocholowym wykazały zwiększoną ilość pochodnych karbonylowych białek już po upływie 30 minut od indukcji zapalenia [104]. Autorzy tego badania wskazują, że w badanym modelu OZT, oksydacja białek nastąpiła przed peroksydacją lipidów w trzustce. Wyniki przedstawione w tych badaniach dodatkowo potwierdzają hipotezę niniejszej pracy, która zakłada, iż to żelazo odgrywa istotną rolę w tworzeniu się RFT w trakcie procesu zapalnego trzustki.

Podsumowując, wyniki badań wskazują, że degradacja ferrytyny jest wczesnym efektem odpowiedzi linii komórkowej AR42J na stymulację ceruleiną. Degradacja ferrytyny zależna od kinazy terminalnej c-Jun (JNK) jest skorelowana ze wzrostem stężeń LIP i RFT. Zgromadzone dane wskazują, iż stres oksydacyjny który obserwuje się w trzustce podczas OZT może być związany z zaburzonym metabolizmem żelaza, a także, że ilość związanego żelaza ma wpływ na poziom RFT podczas OZT. Kolejne analizy na modelach zwierzęcych i liniach komórkowych będą niezwykle przydatne w celu odkrycia dalszych zależności pomiędzy rolą żelaza a patogenezą OZT.

7. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można sformułować następujące wnioski:

1. Zmiany wielkości labilnej puli żelaza są ściśle związane z powstawaniem RFT w komórkowym modelu OZT indukowanego ceruleiną. We wczesnym okresie komórkowego modelu OZT obserwuje się rozpad ferrytyny i uwolnienie zmagazynowanego żelaza co zwiększa ilość labilnej puli żelaza i jednocześnie zwiększa tworzenie RFT.
2. Tworzenie RFT w doświadczalnym modelu OZT nasila się przy wysyceniu komórek żelazem, natomiast zmniejsza się po traktowaniu związkiem wiążącym żelazo. Stany chorobowe związane z większym wysyceniem komórek trzustki żelazem obarczone są ryzykiem silniejszego szkodliwego działania RFT w OZT. Podanie substancji wiążącej żelazo, takiej jak deferoksamina, może zmniejszyć to ryzyko.
3. Proteasomy biorą udział w procesie degradacji ferrytyny. Zastosowanie inhibitorów proteasomów takich jak MG132 w OZT może ograniczyć zależne od żelaza tworzenie RFT poprzez ograniczenie degradacji ferrytyny.
4. Degradacja ferrytyny i żelazo-zależne powstawanie RFT w OZT jest kontrolowane przez szlak sygnałowy kinazy JNK. Komórki AR42J z nieaktywną, zmutowaną formą białka JNK1, nie wykazują indukowanej ceruleiną degradacji ferrytyny. Podanie inhibitora JNK - SP600125 zmniejsza rozpad ferrytyny i ogranicza tworzenie RFT. Związki blokujące szlak sygnałowy zależny od kinazy JNK1 mogą ograniczać stres oksydacyjny w przebiegu OZT.

8. Streszczenie

Komórki pęcherzykowe, które stanowią większą część masy trzustki, produkują enzymy trawienne w postaci nieczynnych proenzymów, które po wydzieleniu do dwunastnicy ulegają aktywacji. Komórki zabezpieczone są przed proteolitycznym działaniem własnych enzymów przez inhibitory tripsyny oraz mechanizmy dezaktywujące aktywne enzymy. Ostre zapalenie trzustki jest stanem chorobowym, który rozwija się z momencie zaburzenia mechanizmów ochronnych komórek pęcherzykowych i aktywacji enzymów trawiennych w obrębie trzustki. Autoliza tkanki trzustkowej prowadzi do silnej miejscowej reakcji zapalnej, a w niektórych przypadkach doprowadza do uogólnionej reakcji zapalnej, a nawet zespołu niewydolności wielonarządowej i w 17% przypadków do zgonu. Często przyczyną ostrego zapalenia trzustki jest wzrost ciśnienia w przewodach trzustkowych w przebiegu kamicy żółciowej. Równie często czynnikiem etiologicznym jest alkohol, który może wywołać obrzęk brodawki Vatera i wzrost ciśnienia w przewodzie trzustkowych podobnie jak kamica żółciowa. Ceruleina jest analogiem cholecystokininy i podawana zwierzętom powoduje aktywację tripsynogenu wewnątrz trzustki. Zmiany histologiczne i biochemiczne obserwowane u zwierząt po podaniu ceruleiny bardzo dobrze odpowiadają zmianom w przebiegu ostrego zapalenia trzustki u ludzi, dlatego model ceruleinowy jest uważany za reprezentatywny model do badań nad patogenezą ostrego zapalenia trzustki. Komórki AR42J, pochodzące ze złośliwych guzów trzustki szczura, utrzymują wiele cech prawidłowych komórek pęcherzykowych trzustki. Traktowanie linii komórkowej AR42J ceruleiną pozwala wiernie odwzorować mechanizmy zachodzące w przebiegu ostrego zapalenia trzustki bez konieczności użycia zwierząt doświadczalnych. Ponadto pozwala badać mechanizmy zachodzące na poziomie molekularnym z użyciem takich metod jak transfekcja DNA czy inhibicja szlaków sygnałowych. Stres oksydacyjny jest ściśle związany z procesem ostrego zapalenia trzustki, gdzie obserwuje się powstawanie wielu reaktywnych form tlenu oraz efekty ich toksycznego działania na fosfolipidy błon komórkowych i udział w nasileniu stanu zapalnego. Reaktywne formy tlenu powstają głównie w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, mikrosomalnym transporcie elektronów, procesach utleniania w peroksysomach oraz w komórkach fagocytujących. Komórki chronią się przed reaktywnymi formami tlenu układem enzymów usuwających reaktywne formy

tlenu z komórki (dysmutaza nadadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationu) oraz niskocząsteczkowym przeciwutleniaczom (kwas askorbinowy, kwas moczowy, glutation). Żelazo jest niezbędne w wielu reakcjach przemiany materii, jednak może być jednocześnie niebezpieczne katalizując wytwarzanie wysoce reaktywnych form tlenu. Bezpieczeństwo zapewnia utrzymanie wolnej (labilnej) puli łatwo dostępnego żelaza na jak najniższym poziomie. Pozostałe żelazo jest wbudowywane w hemoglobinę w krążących erytrocytach oraz związane z ferrytyną lub hemosyderyną stanowiąc magazyn tkankowy żelaza. Degradacja ferrytyny zwiększa labilną pulę żelaza narażając komórki na działanie powstających z udziałem żelaza reaktywnych form tlenu. Proteolityczna degradacja ferrytyny i uwolnienie żelaza następuje głównie w proteasomach lub lizosomach. W komórkach trzustkowych narażonych na stres związany z rozwojem ostrego zapalenia trzustki dochodzi do aktywacji szlaków sygnałowych wpływających na ekspresję genów, proliferację, różnicowanie i przeżycie komórki. Tworzenie reaktywnych form tlenu związane jest z aktywacją w komórkach szlaku sygnałowego zależnego od kinaz JNK. W pracy tej postawiono hipotezę, że w przebiegu OZT dochodzi do degradacji ferrytyny przez aktywowaną ceruleiną kinazę JNK i tworzenie RFT zależne od obecności żelaza.

Celem niniejszej pracy było zbadanie udziału labilnej puli żelaza w tworzeniu reaktywnych form tlenu w komórkowym modelu ostrego zapalenia trzustki indukowanego ceruleiną. Celem dodatkowym było prześledzenie roli szlaku sygnałowego kinazy terminalnej c-Jun (JNK) oraz czynności proteasomów w zmianach labilnej puli żelaza badanego modelu ostrego zapalenia trzustki.

Materiałem badań stanowiła linia komórek AR42J. Model komórkowy ostrego zapalenia trzustki uzyskano traktując komórki AR42J ceruleiną. Ilość tworzonych RFT zbadano przy pomocy cytometrii przepływowej używając barwnika dioctanu dichlorodihydrofluoresceiny. Zmniejszenie ilości żelaza w komórkach AR42J osiągnięto poprzez podanie związku chelatującego – deferoksaminy. Nadmierne wysycenie komórek AR42J żelazem uzyskano przez inkubację z heminą. Zmiany w puli labilnego żelaza określono poprzez analizę fluorescencji kalceiny przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego. Badanie zmian ilości ferrytyny w komórkach AR42J wykonano metodą Western Blot na lizatach komórkowych po elektroforezie w żelu poliakrylamidowym oraz transferze na membranę i inkubacji z

przeciwciałami monoklonalnymi. Udział proteasomów w procesie degradacji ferrytyny potwierdzono inkubując komórki AR42J inhibitorem proteasomów MG132. Rolę szlaku sygnałowego kinazy terminalnej c-Jun (JNK) badano stosując inhibitor kinazy JNK – SP6000125 oraz trasfekując komórki AR42J przy użyciu wektora plazmidowego DNA kodującego nieaktywne formy białek JNK.

Wyniki: Zaobserwowano, że w komórkowym modelu ostrego zapalenia trzustki, ferrytyna ulega degradacji, któremu to procesowi towarzyszy tworzenie się RFT. W obecności ceruleiny, linia komórkowa AR42J wykazuje zwiększoną pulę labilnego żelaza, z jednoczesnym spadkiem ilości komórkowej L-ferrytyny i zwiększeniem tworzenia się reaktywnych form tlenu (RFT). Zmiany ilości L-ferrytyny były odwrotnie proporcjonalne do poziomu powstających RFT. Rozpad ferrytyny zależy od proteasomów. Komórki wykazujące ekspresję nieaktywnego białka JNK1 były niewrażliwe na indukowaną obecnością ceruleiny degradację ferrytyny.

Wnioski: Wyniki badań wykazały, że w trakcie ostrego zapalenia trzustki indukowanego ceruleiną w modelu komórkowym dochodzi do jednoczesnej degradacji zależnej od JNK1 ferrytyny, zwiększenia puli labilnego żelaza oraz tworzenia reaktywnych form tlenu.

9. Piśmiennictwo

1. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 2005; 53(9):1087–1097.
2. Longnecker DS. Pathology and pathogenesis of diseases of the pancreas. *Am. J. Pathol.* 1982; 107(1):103–121.
3. Cavallini G, Frulloni L, Bassi C et al. Prospective multicentre survey on acute pancreatitis in Italy (ProInf-AISP): results on 1005 patients. *Dig. Liver Dis.* 2004; 36(3):205–211.
4. Paweł Lampe, Andrzej Grabarczyk, Ewa Karpel, Joanna Pilch-kowalczyk. *Podstawy chirurgii.* pod red. Jacka Szmidta i Jarosława Kuźdźała, Kraków 2010: Wydawnictwo Medycyna Praktyczna,
5. Lerch MM, Saluja AK, Rünzi M et al. Pancreatic duct obstruction triggers acute necrotizing pancreatitis in the opossum. *Gastroenterology* 1993; 104(3):853–861.
6. Imamura M. Epidemiology of acute pancreatitis--incidence by etiology, relapse rate, cause of death and long-term prognosis. *Nihon Rinsho Jpn. J. Clin. Med.* 2004; 62(11):1993–1997.
7. Zheng Y, Zhou Z, Li H et al. A multicenter study on etiology of acute pancreatitis in Beijing during 5 years. *Pancreas* 2015; 44(3):409–414.
8. Vinklerová I, Procházka M, Procházka V, Urbánek K. Incidence, severity, and etiology of drug-induced acute pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* 2010; 55(10):2977–2981.
9. Moreau JA, Zinsmeister AR, Melton LJ, DiMagno EP. Gallstone pancreatitis and the effect of cholecystectomy: a population-based cohort study. *Mayo Clin. Proc.* 1988; 63(5):466–473.
10. Purohit V, Russo D, Salin M, Brown R. Mechanisms of Alcoholic Pancreatitis: Introduction and Summary of the Symposium. *Pancreas* 2003; 27(4):281–355.
11. Toskes PP. Hyperlipidemic pancreatitis. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 1990; 19(4):783–791.
12. Solomon S, Whitcomb DC, LaRusch J. PRSS1-Related Hereditary Pancreatitis. In Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH et al. (eds): *GeneReviews(®)*, Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993.
13. Whitcomb DC. Mechanisms of disease: Advances in understanding the mechanisms leading to chronic pancreatitis. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 2004; 1(1):46–52.
14. Choudari CP, Lehman GA, Sherman S. Pancreatitis and cystic fibrosis gene mutations. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 1999; 28(3):543–549.
15. Athwal T, Huang W, Mukherjee R et al. Expression of human cationic trypsinogen (PRSS1) in murine acinar cells promotes pancreatitis and apoptotic cell death. *Cell Death Dis.* 2014; 5(4):e1165.

16. Chen J-M, Férec C. Chronic pancreatitis: genetics and pathogenesis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2009; 10:63–87.
17. Whitcomb DC. Genetic aspects of pancreatitis. *Annu. Rev. Med.* 2010; 61:413–424.
18. Nathan JD, Romac J, Peng RY et al. Transgenic expression of pancreatic secretory trypsin inhibitor-I ameliorates secretagogue-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 2005; 128(3):717–727.
19. Threadgold J, Greenhalf W, Ellis I et al. The N34S mutation of SPINK1 (PSTI) is associated with a familial pattern of idiopathic chronic pancreatitis but does not cause the disease. *Gut* 2002; 50(5):675–681.
20. Choudari C, Yu A, Imperiale T, et al. Significance of heterozygous cystic fibrosis gene (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations) in idiopathic pancreatitis (abstract). *Gastroenterology*. 1998.
21. Spanier BWM, Dijkgraaf MGW, Bruno MJ. Epidemiology, aetiology and outcome of acute and chronic pancreatitis: An update. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2008; 22(1):45–63.
22. Wang G-J, Gao C-F, Wei D et al. Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* 2009; 15(12):1427–1430.
23. Mutinga M, Rosenbluth A, Tenner SM et al. Does mortality occur early or late in acute pancreatitis? *Int. J. Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol.* 2000; 28(2):91–95.
24. Sarr MG, Banks PA, Bollen TL et al. The new revised classification of acute pancreatitis 2012. *Surg. Clin. North Am.* 2013; 93(3):549–562.
25. Sakorafas GH, Tsiotos GG, Sarr MG. Extrapancreatic necrotizing pancreatitis with viable pancreas: a previously under-appreciated entity¹. *J. Am. Coll. Surg.* 1999; 188(6):643–648.
26. Bakker OJ, Santvoort H van, Besselink MGH et al. Extrapancreatic necrosis without pancreatic parenchymal necrosis: a separate entity in necrotising pancreatitis? *Gut* 2013; 62(10):1475–1480.
27. Banks PA, Bollen TL, Dervenis C et al. Classification of acute pancreatitis—2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut* 2013; 62(1):102–111.
28. Dupuis CS, Baptista V, Whalen G et al. Diagnosis and management of acute pancreatitis and its complications. *Gastrointest. Interv.* 2013; 2(1):36–46.
29. Buter A, Imrie CW, Carter CR et al. Dynamic nature of early organ dysfunction determines outcome in acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* 2002; 89(3):298–302.
30. Petrov MS, Shanbhag S, Chakraborty M et al. Organ Failure and Infection of Pancreatic Necrosis as Determinants of Mortality in Patients With Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* 2010; 139(3):813–820.
31. Marchbank T, Freeman TC, Playford RJ. Human Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor. *Digestion* 1998; 59(3):167–174.

32. Ohmuraya M, Yamamura K. The Roles of Serine Protease Inhibitor Kazal Type 1 (SPINK1) in Pancreatic Diseases. *Exp. Anim.* 2011; 60(5):433–444.
33. Steer ML. Pathogenesis of Acute Pancreatitis. *Digestion* 1997; 58(1):46–49.
34. Saluja A, Donovan E, Yamanaka K et al. Cerulein-induced in vitro activation of trypsinogen in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin B. *Gastroenterology* 1997; 113(1):304–310.
35. Kim H. Cerulein Pancreatitis: Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis. *Gut Liver* 2008; 2(2):74–80.
36. Prinz RA. Mechanisms of acute pancreatitis. Vascular etiology. *Int. J. Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol.* 1991; 9:31–38.
37. Toyama MT, Lewis MP, Kusske AM et al. Ischaemia-reperfusion mechanisms in acute pancreatitis. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 1996; 219:20–23.
38. De Coninck B, Meert P, Hanique G et al. Scintigraphy with Indium-labelled leukocytes in acute pancreatitis. *Acta Gastro-Enterol. Belg.* 1991; 54(2):176–183.
39. Bhatia M, Saluja AK, Singh VP et al. Complement factor C5a exerts an anti-inflammatory effect in acute pancreatitis and associated lung injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2001; 280(5):G974–978.
40. Chan YC, Leung PS. Acute Pancreatitis: Animal Models and Recent Advances in Basic Research. *Pancreas* 2007; 34(1):1–14.
41. Agarwal N, Pitchumoni CS. Acute pancreatitis: a multisystem disease. *The Gastroenterologist* 1993; 1(2):115–128.
42. Tenner S, Sica G, Hughes M et al. Relationship of necrosis to organ failure in severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1997; 113(3):899–903.
43. Sakai Y, Masamune A, Satoh A et al. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2003; 124(3):725–736.
44. Kazantsev GB, Hecht DW, Rao R et al. Plasmid labeling confirms bacterial translocation in pancreatitis. *Am. J. Surg.* 1994; 167(1):201–206; discussion 206–207.
45. Foitzik T, Kruschewski M, Kroesen AJ et al. Does glutamine reduce bacterial translocation? A study in two animal models with impaired gut barrier. *Int. J. Colorectal Dis.* 1999; 14(3):143–149.
46. Sweiry JH, Mann GE. Role of oxidative stress in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 1996; 219:10–15.
47. Sledziński Z, Woźniak M, Antosiewicz J et al. Protective effect of 4-hydroxy-TEMPO, a low molecular weight superoxide dismutase mimic, on free radical toxicity in experimental pancreatitis. *Int. J. Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol.* 1995; 18(2):153–160.
48. Yu JH, Lim JW, Kim KH et al. NADPH oxidase and apoptosis in cerulein-stimulated pancreatic acinar AR42J cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 39(5):590–602.

49. Bartosz G. *Druga twarz tlenu*, 2nd edition. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2000.
50. McCord JM, Fridovich I. The Reduction of Cytochrome c by Milk Xanthine Oxidase. *J. Biol. Chem.* 1968; 243(21):5753–5760.
51. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984; 219(1):1–14.
52. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4(3):181–189.
53. Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* 2009; 20(7):332–340.
54. Ullrich R, Hofrichter M. Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 2007; 64(3):271–293.
55. Schrader M, Fahimi HD. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem. Cell Biol.* 2004; 122(4):383–393.
56. Dormandy TL. An approach to free radicals. *The Lancet* 1983; 322(8357):1010–1014.
57. Fehér J, Csomós G, Vereckei A. *Free Radical Reactions in Medicine*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1987.
58. Fantone JC, Ward PA. Oxygen-derived radicals and their metabolites: relationship to tissue injury, Upjohn, 1985.
59. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 1982; 47(5):412–426.
60. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.* 1984; 222(1):1–15.
61. Flohé L. Superoxide dismutase for therapeutic use: clinical experience, dead ends and hopes. *Mol. Cell. Biochem.* 1988; 84(2):123–131.
62. Rattner DW. Experimental models of acute pancreatitis and their relevance to human disease. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 1996; 219:6–9.
63. Anastasi A, Erspamer V, Endean R. Isolation and structure of caerulein, an active decapeptide from the skin of *Hyla caerulea*. *Experientia* 1967; 23(9):699–700.
64. Hyun JJ, Lee HS. Experimental Models of Pancreatitis. *Clin. Endosc.* 2014; 47(3):212–216.
65. Zaninovic V, Gukovskaya AS, Gukovsky I et al. Cerulein upregulates ICAM-1 in pancreatic acinar cells, which mediates neutrophil adhesion to these cells. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 2000; 279(4):G666–G676.
66. Christophe J. Pancreatic tumoral cell line AR42J: an amphicrine model. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 1994; 266(6):G963–G971.

67. Ahnert-Hilger G, Wiedenmann B. The amphicrine pancreatic cell line, AR42J, secretes GABA and amylase by separate regulated pathways. *FEBS Lett.* 1992; 314(1):41–44.
68. Pisegna JR, de Weerth A, Huppi K, Wank SA. Molecular cloning of the human brain and gastric cholecystokinin receptor: structure, functional expression and chromosomal localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 189(1):296–303.
69. Lambert M, Diem Bui N, Christophe J. Functional and molecular characterization of CCK receptors in the rat pancreatic acinar cell line AR 4-2J. *Regul. Pept.* 1991; 32(2):151–167.
70. Lambert M, Bui ND, Christophe J. Novel GTP-binding proteins in plasma membranes and zymogen granule membranes from rat pancreas and in pancreatic AR 4-2J cell membranes. *FEBS Lett.* 1990; 271(1-2):19–22.
71. Swarovsky B, Steinhilber W, Scheele GA, Kern HF. Coupled induction of exocrine proteins and intracellular compartments involved in the secretory pathway in AR4-2J cells by glucocorticoids. *Eur. J. Cell Biol.* 1988; 47(1):101–111.
72. Huang Y, Hui DY. Cholesterol esterase biosynthesis in rat pancreatic AR42J cells. Post-transcriptional activation by gastric hormones. *J. Biol. Chem.* 1991; 266(11):6720–6725.
73. Brown TA. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*, John Wiley & Sons, 2013.
74. Mueller C, Graessmann A, Graessmann M. Mapping of early SV40-specific functions by microinjection of different early viral DNA fragments. *Cell* 1978; 15(2):579–585.
75. Malone RW, Felgner PL, Verma IM. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989; 86(16):6077–6081.
76. Ryhänen SJ, Säily MJ, Paukku T et al. Surface Charge Density Determines the Efficiency of Cationic Gemini Surfactant Based Lipofection. *Biophys. J.* 2003; 84(1):578–587.
77. Fenton HJH. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.* 1894; 65(0):899–910.
78. Kruszewski M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 2003; 531(1-2):81–92.
79. Yamanishi H, Iyama S, Yamaguchi Y et al. Total iron-binding capacity calculated from serum transferrin concentration or serum iron concentration and unsaturated iron-binding capacity. *Clin. Chem.* 2003; 49(1):175–178.
80. Stremmel W, Karner M, Manzhali E et al. Liver and iron metabolism--a comprehensive hypothesis for the pathogenesis of genetic hemochromatosis. *Z. Gastroenterol.* 2007; 45(1):71–75.
81. Greenberg GR, Wintrobe MM. A labile iron pool. *J. Biol. Chem.* 1946; 165(1):397.
82. Jacobs A. An intracellular transit iron pool. *Ciba Found. Symp.* 1976; (51):91–106.

83. Skjærvinge T, Burkhart A, Johnsen KB, Moos T. Divalent metal transporter 1 (DMT1) in the brain: implications for a role in iron transport at the blood-brain barrier, and neuronal and glial pathology. *Front. Mol. Neurosci.* 2015.
84. Antosiewicz J, Herman-Antosiewicz A, Marynowski SW, Singh SV. c-Jun NH2-Terminal Kinase Signaling Axis Regulates Diallyl Trisulfide-Induced Generation of Reactive Oxygen Species and Cell Cycle Arrest in Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* 2006; 66(10):5379–5386.
85. Radisky DC, Kaplan J. Iron in cytosolic ferritin can be recycled through lysosomal degradation in human fibroblasts. *Biochem. J.* 1998; 336(Pt 1):201–205.
86. Park. The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncol. Rep.* 2009.
87. De Domenico I, Vaughn MB, Li L et al. Ferroportin-mediated mobilization of ferritin iron precedes ferritin degradation by the proteasome. *EMBO J.* 2006; 25(22):5396–5404.
88. Antosiewicz J, Ziolkowski W, Kaczor JJ, Herman-Antosiewicz A. Tumor necrosis factor- α -induced reactive oxygen species formation is mediated by JNK1-dependent ferritin degradation and elevation of labile iron pool. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 43(2):265–270.
89. Cargnello M, Roux PP. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 2011; 75(1):50–83.
90. Escudier B, Eisen T, Stadler WM et al. Sorafenib in Advanced Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356(2):125–134.
91. Bogoyevitch MA. Therapeutic promise of JNK ATP-noncompetitive inhibitors. *Trends Mol. Med.* 2005; 11(5):232–239.
92. Chen X, Zhong Z, Xu Z et al. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radic. Res.* 2010; 44(6):587–604.
93. Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* 2005; 65(2–3):45–80.
94. Breuer W, Epsztejn S, Millgram P, Cabantchik IZ. Transport of iron and other transition metals into cells as revealed by a fluorescent probe. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 1995; 268(6):C1354–C1361.
95. 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(1):248–254.
96. Gassmann M, Grenacher B, Rohde B, Vogel J. Quantifying Western blots: Pitfalls of densitometry. *ELECTROPHORESIS* 2009; 30(11):1845–1855.
97. Yu JH, Kim KH, Kim H. Role of NADPH Oxidase and Calcium in Cerulein-Induced Apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006; 1090(1):292–297.

98. Kitano Y, Yokoyama K, Matsumoto K et al. Amelioration of cerulein-induced acute pancreatitis by 2,2'-dipyridyl in rats. *Hokkaido Igaku Zasshi* 2002; 77(2):161–167.
99. Dérjard B, Hibi M, Wu I-H et al. JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 1994; 76(6):1025–1037.
100. Konijn AM, Glickstein H, Vaisman B et al. The Cellular Labile Iron Pool and Intracellular Ferritin in K562 Cells. *Blood* 1999; 94(6):2128–2134.
101. Mehlhase J, Sandig G, Pantopoulos K, Grune T. Oxidation-induced ferritin turnover in microglial cells: role of proteasome. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 38(2):276–285.
102. Agrawal R, Sharma PK, Rao GS. Release of iron from ferritin by metabolites of benzene and superoxide radical generating agents. *Toxicology* 2001; 168(3):223–230.
103. Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 1998; 8(10):397–403.
104. Reinheckel T, Nedeleev B, Prause J et al. Occurrence of oxidatively modified proteins: an early event in experimental acute pancreatitis. *Free Radic. Biol. Med.* 1998; 24(3):393–400.
105. Restaino G, Meloni A, Positano V et al. Regional and global pancreatic T2 MRI for iron overload assessment in a large cohort of healthy subjects: Normal values and correlation with age and gender. *Magn. Reson. Med.* 2011; 65(3):764–769.
106. İdilman İS, Gümrük F, Haliloğlu M, Karçaaltıncaba M. The Feasibility of Magnetic Resonance Imaging for Quantification of Liver, Pancreas, Spleen, Vertebral Bone Marrow, and Renal Cortex R2 and Proton Density Fat Fraction in Transfusion-Related Iron Overload. *Turk. J. Haematol. Off. J. Turk. Soc. Haematol.* 2016; 33(1):21–27.
107. Pourzand C, Watkin RD, Brown JE, Tyrrell RM. Ultraviolet A radiation induces immediate release of iron in human primary skin fibroblasts: the role of ferritin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999; 96(12):6751–6756.
108. Kurz T, Eaton JW, Brunk UT. The role of lysosomes in iron metabolism and recycling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2011; 43(12):1686–1697.
109. Dąbrowski A, Grady T, Logsdon CD, Williams JA. Jun Kinases Are Rapidly Activated by Cholecystokinin in Rat Pancreas both in Vitro and in Vivo. *J. Biol. Chem.* 1996; 271(10):5686–5690.
110. Erbis H, Aykota MR, Ozturk B et al. Effects of Tempol on Experimental Acute Necrotizing Pancreatitis Model in Rats. *J. Invest. Surg.* 2015; 28(5):268–275.
111. Gooshe M, Abdolghaffari AH, Nikfar S et al. Antioxidant therapy in acute, chronic and post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis: An updated systematic review and meta-analysis. *World J. Gastroenterol. WJG* 2015; 21(30):9189–9208.
112. Cazzola M, Ascari E. Red Cell Ferritin as a Diagnostic Tool. *Br. J. Haematol.* 1986; 62(2):209–213.

113. Guyatt GH, Patterson C, Ali M et al. Diagnosis of iron-deficiency anemia in the elderly. *Am. J. Med.* 1990; 88(3):205–209.
114. Pongstaporn W, Bunyaratavej A. Hematological parameters, ferritin and vitamin B12 in vegetarians. *J. Med. Assoc. Thai. Chotmaihet Thangphaet* 1999; 82(3):304–311.
115. Beck G, Ellis TW, Habicht GS et al. Evolution of the acute phase response: iron release by echinoderm (*Asterias forbesi*) coelomocytes, and cloning of an echinoderm ferritin molecule. *Dev. Comp. Immunol.* 2002; 26(1):11–26.
116. Ong DST, Wang L, Zhu Y et al. The response of ferritin to LPS and acute phase of *Pseudomonas* infection. *J. Endotoxin Res.* 2005; 11(5):267–280.
117. Maria A, Viljoe M. Acute Phase Proteins: Ferritin and Ferritin Isoforms. In Veas F (ed): *Acute Phase Proteins - Regul. Funct. Acute Phase Proteins*, InTech, 2011.
118. Zecca L, Youdim MBH, Riederer P et al. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004; 5(11):863–873.
119. Cermak J, Balla J, Jacob HS et al. Tumor cell heme uptake induces ferritin synthesis resulting in altered oxidant sensitivity: possible role in chemotherapy efficacy. *Cancer Res.* 1993; 53(21):5308–5313.
120. Coccia EM, Profita V, Fiorucci G et al. Modulation of ferritin H-chain expression in Friend erythroleukemia cells: transcriptional and translational regulation by hemin. *Mol. Cell. Biol.* 1992; 12(7):3015–3022.
121. Hintze KJ, Theil EC. DNA and mRNA elements with complementary responses to hemin, antioxidant inducers, and iron control ferritin-L expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005; 102(42):15048–15052.
122. Jones SR, Bell A, Brink G. Treatment of Acute Intermittent Porphyria in the Emergency Department. *J. Emerg. Nurs.* 2014; 40(3):257–259.
123. Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 2002; 99(10):3505–3516.
124. Pang JH, Jiang MJ, Chen YL et al. Increased ferritin gene expression in atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 1996; 97(10):2204–2212.
125. Ryan TP, Krzesicki RF, Blakeman DP et al. Pulmonary ferritin: differential effects of hyperoxic lung injury on subunit mRNA levels. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 22(5):901–908.
126. Biemond P, Swaak AJ, van Eijk HG, Koster JF. Intraarticular ferritin-bound iron in rheumatoid arthritis. A factor that increases oxygen free radical-induced tissue destruction. *Arthritis Rheum.* 1986; 29(10):1187–1193.
127. Linert W, Jameson GN. Redox reactions of neurotransmitters possibly involved in the progression of Parkinson's Disease. *J. Inorg. Biochem.* 2000; 79(1-4):319–326.
128. Kondo T, Shirasawa T, Itoyama Y, Mori H. Embryonic genes expressed in Alzheimer's disease brains. *Neurosci. Lett.* 1996; 209(3):157–160.
129. Letoha T, Somlai C, Takács T et al. The proteasome inhibitor MG132 protects against acute pancreatitis. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 39(9):1142–1151.

130. Elliott PJ, Zollner TM, Boehncke W-H. Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 2003; 81(4):235–245.
131. Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 1998; 18(1):30–38.
132. Ventura J-J, Cogswell P, Flavell RA et al. JNK potentiates TNF-stimulated necrosis by increasing the production of cytotoxic reactive oxygen species. *Genes Dev.* 2004; 18(23):2905–2915.
133. Minutoli L, Altavilla D, Marini H et al. Protective effects of SP600125 a new inhibitor of c-jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular-regulated kinase (ERK1/2) in an experimental model of cerulein-induced pancreatitis. *Life Sci.* 2004; 75(24):2853–2866.
134. Wagner CL, Greer FR, American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding, American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. Prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants, children, and adolescents. *Pediatrics* 2008; 122(5):1142–1152.
135. Padmini E, Uthra V, Lavanya S. Effect of HSP70 and 90 in Modulation of JNK, ERK Expression in Preeclamptic Placental Endothelial Cell. *Cell Biochem. Biophys.* 2012; 64(3):187–195.
136. Thévenin AF, Zony CL, Bahnson BJ, Colman RF. GST pi modulates JNK activity through a direct interaction with JNK substrate, ATF2. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 2011; 20(5):834–848.
137. Renlund N, Pieretti-Vanmarcke R, O'Neill FH et al. c-Jun N-terminal Kinase Inhibitor II (SP600125) Activates Müllerian Inhibiting Substance Type II Receptor-Mediated Signal Transduction. *Endocrinology* 2008; 149(1):108–115.
138. Carboni S, Boschert U, Gaillard P et al. AS601245, a c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) inhibitor, reduces axon/dendrite damage and cognitive deficits after global cerebral ischaemia in gerbils. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 153(1):157–163.
139. Gao Y-J, Cheng J-K, Zeng Q et al. Selective inhibition of JNK with a peptide inhibitor attenuates pain hypersensitivity and tumor growth in a mouse skin cancer pain model. *Exp. Neurol.* 2009; 219(1):146–155.
140. Sochaski MA, Bartfay WJ, Thorpe SR et al. Lipid peroxidation and protein modification in a mouse model of chronic iron overload. *Metabolism* 2002; 51(5):645–651.
141. Santos NCF, Castilho RF, Meinicke AR, Hermes-Lima M. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe(II)-citrate. *Eur. J. Pharmacol.* 2001; 428(1):37–44.
142. Hsu H-Y, Wen M-H. Lipopolysaccharide-mediated Reactive Oxygen Species and Signal Transduction in the Regulation of Interleukin-1 Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(25):22131–22139.
143. Wang J-L, Shaw N-S. Iron status of the Taiwanese elderly: the prevalence of iron deficiency and elevated iron stores. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2005; 14(3):278–284.

144. Fleming DJ, Jacques PF, Tucker KL et al. Iron status of the free-living, elderly Framingham Heart Study cohort: an iron-replete population with a high prevalence of elevated iron stores. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 73(3):638–646.
145. Simcox JA, McClain DA. Iron and diabetes risk. *Cell Metab.* 2013; 17(3):329–341.
146. Poggiali E, Cassinerio E, Zanaboni L, Cappellini MD. An update on iron chelation therapy. *Blood Transfus.* 2012; 10(4):411–422.
147. Kushner JP, Porter JP, Olivieri NF. Secondary Iron Overload. *ASH Educ. Program Book* 2001; 2001(1):47–61.
148. Shander A, Cappellini MD, Goodnough LT. Iron overload and toxicity: the hidden risk of multiple blood transfusions. *Vox Sang.* 2009; 97(3):185–197.
149. Takatoku M, Uchiyama T, Okamoto S et al. Retrospective nationwide survey of Japanese patients with transfusion-dependent MDS and aplastic anemia highlights the negative impact of iron overload on morbidity/mortality. *Eur. J. Haematol.* 2007; 78(6):487–494.
150. Deller DJ. Iron⁵⁹ absorption measurements by whole-body counting: Studies in alcoholic cirrhosis, hemochromatosis, and pancreatitis. *Am. J. Dig. Dis.* 1965; 10(3):249–258.
151. Brittenham GM, Weiss G, Brissot P et al. Clinical Consequences of New Insights in the Pathophysiology of Disorders of Iron and Heme Metabolism. *ASH Educ. Program Book* 2000; 2000(1):39–50.
152. Simpson RJ, Deenmamode J, McKie AT et al. Time-Course of Iron Overload and Biochemical, Histopathological and Ultrastructural Evidence of Pancreatic Damage in Hypotransferrinaemic Mice. *Clin. Sci.* 1997; 93(5):453–462.
153. Simon M, Le Mignon L, Edan G et al. [So-called “other types” of diabetes: chronic pancreatitis and hemochromatosis]. *Journ. Annu. Diabétologie Hôtel-Dieu* 1984:85–114.
154. Bourel M, Simon M, Ferrand B et al. [4 cases of calcifying pancreatitis in hemochromatosis]. *Sem. Hôp. Organe Fondé Par Assoc. Enseign. Méd. Hôp. Paris* 1970; 46(13):879–884.
155. Hucl T, Kylanpää-Bäck M-L, Witt H et al. HFE genotypes in patients with chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 2007; 9(7):479–483.
156. Simon P, Zimmer K, Domschke W, Lerch M. Hereditary pancreatitis in a family with hemochromatosis (HFE) gene mutations. *Digestion* 2000; 61:266.
157. Cabantchik ZI, Breuer W, Zanninelli G, Cianciulli P. LPI-labile plasma iron in iron overload. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2005; 18(2):277–287.
158. Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P et al. Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. *Haematologica* 2004; 89(10):1187–1193.
159. Olivieri NF, Nathan DG, MacMillan JH et al. Survival in medically treated patients with homozygous beta-thalassemia. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331(9):574–578.

160. Cohen A, Martin M, Schwartz E. Depletion of excessive liver iron stores with desferrioxamine. *Br. J. Haematol.* 1984; 58(2):369–373.
161. De Sanctis V, Eleftheriou A, Malaventura C, Thalassaemia International Federation Study Group on Growth and Endocrine Complications in Thalassaemia. Prevalence of endocrine complications and short stature in patients with thalassaemia major: a multicenter study by the Thalassaemia International Federation (TIF). *Pediatr. Endocrinol. Rev. PER* 2004; 2 Suppl 2:249–255.
162. Pietrangelo A. Iron chelation beyond transfusion iron overload. *Am. J. Hematol.* 2007; 82(S12):1142–1146.
163. Gorman N, Zaharia A, Trask HS et al. Effect of an oral iron chelator or iron-deficient diets on uroporphyrin in a murine model of porphyria cutanea tarda. *Hepatol. Baltim. Md* 2007; 46(6):1927–1834.
164. Ibrahim AS, Gebermarian T, Fu Y et al. The iron chelator deferasirox protects mice from mucormycosis through iron starvation. *J. Clin. Invest.* 2007; 117(9):2649–2657.
165. Yu Y, Kovacevic Z, Richardson DR. Tuning cell cycle regulation with an iron key. *Cell Cycle Georget. Tex* 2007; 6(16):1982–1994.
166. Yamasaki T, Terai S, Sakaida I. Deferoxamine for Advanced Hepatocellular Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365(6):576–578.
167. Tampo Y, Kotamraju S, Chitambar CR et al. Oxidative Stress–Induced Iron Signaling Is Responsible for Peroxide-Dependent Oxidation of Dichlorodihydrofluorescein in Endothelial Cells Role of Transferrin Receptor–Dependent Iron Uptake in Apoptosis. *Circ. Res.* 2003; 92(1):56–63.
168. Ohashi T, Mizutani A, Murakami A et al. Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescein with heme and hemoproteins: formation of the fluorescein is independent of the generation of reactive oxygen species. *FEBS Lett.* 2002; 511(1):21–27.
169. Levine RL, Garland D, Oliver CN et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186:464–478.
170. Requena JR, Chao CC, Levine RL, Stadtman ER. Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001; 98(1):69–74.
171. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003; 25(3-4):207–218.

10. Załączniki

Załącznik nr 1

Mapy plazmidów.

Poniżej przedstawiono mapy plazmidów kodujących katalitycznie nieaktywne mutanty JNK1, JNK2, oraz pusty wektor pcDNA3.1.

