



Gdański Uniwersytet Medyczny

Ewa Sokołowska

**Wpływ stresu oksydacyjnego indukowanego
przez wodoronadtlenek kumenu na aktywność
aromatazy w komórkach *choriocarcinoma***

Rozprawa doktorska wykonana
w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Praca dotowana z ST-40

Promotor pracy:
Prof. dr hab. Jerzy Klimek
Kierownik Katedry i Zakładu Biochemii Farmaceutycznej

Gdańsk 2010

Składam serdeczne podziękowania

Panu prof. dr hab. Jerzemu Klimkowi – mojemu promotorowi za pomoc i cenne uwagi merytoryczne, które umożliwiły nadanie ostatecznego kształtu pracy oraz za poświęcony czas, cierpliwość i wyrozumiałość podczas całego okresu przygotowywania niniejszej rozprawy

Dr Ryszardowi Milczarkowi za nieocenioną pomoc merytoryczną i praktyczną, anielską wręcz cierpliwość w trudnych chwilach, których było niemało oraz okazaną życzliwość i zrozumienie w ciągu całej naszej współpracy

Wszystkim pracownikom Katedry i Zakładu Biochemii Farmaceutycznej oraz Katedry i Zakładu Biochemii, za miłą atmosferę i wsparcie duchowe w chwilach zwątpienia, dzięki czemu powoli odbudowywała się moja wiara w człowieka

Wszystkim osobom, których nie wymieniłam, a które, w ten, czy inny sposób, przyczyniły się do powstania niniejszej pracy

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	- 9 -
1.1 AROMATAZA	- 9 -
1.1.1 Aromataza - struktura, funkcja	- 9 -
1.1.2 Gen aromatazy	- 11 -
1.1.3 Aromataza – niedobór i nadmiar	- 13 -
1.2 ESTROGENY I ICH ZNACZENIE W CIĄŻY	- 15 -
1.2.1 Synteza estrogenów w jednostce płodowo-łożyskowej	- 15 -
1.2.2 Znaczenie estrogenów w ciąży	- 17 -
1.3 STAN PRZEDRZUCAWKOWY (PREECLAMPSIA)	- 20 -
1.4 STRES OKSYDACYJNY	- 24 -
1.4.1 Źródła reaktywnych form tlenu (RFT)	- 24 -
1.4.2 Peroksydacja lipidów	- 27 -
1.4.3 Mechanizmy chroniące komórki przed stresem oksydacyjnym	- 30 -
1.4.4 Stres oksydacyjny w patogenezie preeclampsii	- 31 -
1.4.5 Metabolizm wodoronadtlenku kumenu – udział cytochromu P450	- 34 -
1.5 UZASADNIENIE CELÓW PRACY	- 36 -
2. CEL PRACY	- 37 -
3. MATERIAŁY I METODY	- 38 -
3.1 ODCZYNNIKI	- 38 -
3.2 HODOWLA KOMÓREK JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i>	- 39 -
3.3 OCENA CYTOTOKSYCZNOŚCI INDUKOWANEJ PRZEZ WODORONADTLENEK KUMENU W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i> SPEKTROFOTOMETRYCZNĄ METODĄ OZNACZANIA AKTYWNOŚCI DEHYDROGENAZY MLECZANOWEJ	- 40 -
3.4 WPŁYW INHIBITORÓW CYTOCHROMU P450 (α -NAFTOFLAWON, KETOKONAZOL, SKF525A), ANTYOKSYDANTÓW (α -TOKOFEROL, BHT) I DESFEROKSAMINY NA CYTOTOKSYCZNOŚĆ INDUKOWANĄ PRZEZ CUMOOH W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i>	- 40 -

3.5	POMIAR STRESU OKSYDACYJNEGO INDUKOWANEGO PRZEZ WODORONADTLENEK KUMENU (CUMOOH) W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i> METODĄ CYTOMETRII PRZEPŁYWOWEJ.	- 41 -
3.6	OZNACZANIE STĘŻENIA PRODUKTÓW PEROKSYDACJI LIPIDÓW Z KWASEM TIOBARBITUROWYM POD WPŁYWEM WODORONADTLENKU KUMENU W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i>	- 41 -
3.7	POMIAR METABOLIZMU WODORONADTLENKU KUMENU W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i>	- 42 -
3.8	OCENA WPŁYWU WODORONADTLENKU KUMENU NA AKTYWNOŚĆ AROMATAZY W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i>	- 42 -
3.9	WPŁYW INHIBITORÓW CYTOCHROMU P450 (α -NAFTOFLAWON, KETOKONAZOL, SKF525A) NA AKTYWNOŚĆ AROMATAZY W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i>	- 43 -
3.10	WPŁYW INHIBITORÓW CYTOCHROMU P450 (α -NAFTOFLAWON, KETOKONAZOL, SKF525A), ANTYOKSYDANTÓW (α -TOKOFEROL, BHT) I DESFEROKSAMINY NA AKTYWNOŚĆ AROMATAZY HAMOWANĄ PRZEZ CUMOOH W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i>	- 44 -
3.11	POMIAR STĘŻENIA BIAŁKA METODĄ BARDFORD Z UŻYCIEM BARWNIKA COOMASSIE BRILLIANT BLUE G-250	- 44 -
3.12	ANALIZA STATYSTYCZNA	- 44 -
4.	WYNIKI	- 45 -
4.1	WPŁYW WODORONADTLENKU KUMENU NA PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i>	- 45 -
4.2	POMIAR STRESU OKSYDACYJNEGO INDUKOWANEGO PRZEZ WODORONADTLENEK KUMENU W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i> METODĄ CYTOMETRII PRZEPŁYWOWEJ	- 47 -
4.3	METABOLIZM WODORONADTLENKU KUMENU W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i>	- 49 -

4.4	OZNACZANIE PRODUKTÓW PEROKSYDACJI LIPIDÓW (TBARS) POWSTAŁYCH POD WPLYWEM WODORONADTLENKU KUMENU W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i>	- 50 -
4.5	WPLYW WODORONADTLENKU KUMENU NA AKTYWNOŚĆ AROMATAZY W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i>	- 52 -
4.6	WPLYW INHIBITORÓW CYTOCHROMU P450 (α -NAFTOFLAWON, KETOKONAZOL, SKF525A) NA AKTYWNOŚĆ AROMATAZY W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i>	- 54 -
4.7	WPLYW INHIBITORÓW CYTOCHROMU P450 (KETOKONAZOL, SKF525A, α -NAFTOFLAWON) NA AKTYWNOŚĆ AROMATAZY HAMOWANĄ PRZEZ WODORONADTLENEK KUMENU W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i>	- 57 -
4.8	WPLYW INHIBITORÓW CYTOCHROMU P450 (α -NAFTOFLAWON, KETOKONAZOL, SKF525A) NA STRES OKSYDACYJNY I CYTOTOKSYCZNOŚĆ INDUKOWANĄ PRZEZ WODORONADTLENEK KUMENU W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i>	- 60 -
4.9	WPLYW ANTYOKSYDANTÓW (α -TOKOFEROL, BHT) NA STRES OKSYDACYJNY I CYTOTOKSYCZNOŚĆ INDUKOWANĄ PRZEZ WODORONADTLENEK KUMENU W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i>	- 62 -
4.10	WPLYW ANTYOKSYDANTÓW (α -TOKOFEROL, BHT) NA AKTYWNOŚĆ AROMATAZY HAMOWANĄ PRZEZ WODORONADTLENEK KUMENU W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i>	- 64 -
4.11	WPLYW CHELATORA ŻELAZA - DESFEROKSAMINY NA STRES OKSYDACYJNY I CYTOTOKSYCZNOŚĆ INDUKOWANĄ PRZEZ WODORONADTLENEK KUMENU W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i>	- 66 -
4.12	WPLYW DESFEROKSAMINY NA AKTYWNOŚĆ AROMATAZY HAMOWANĄ PRZEZ WODORONADTLENEK KUMENU W KOMÓRKACH JAR <i>CHORIOCARCINOMA</i>	- 68 -
5.	DYSKUSJA	- 70 -
6.	WNIOSKI	- 78 -
7.	STRESZCZENIE	- 79 -
8.	PIŚMIENNICTWO	- 81 -

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

$\cdot$ OH - rodnik hydroksylowy

11 β - HSD - dehydrogenaza 11 β - hydroksysteroidowa

17 β -HSD - dehydrogenaza 17 β - hydroksysteroidowa

3 β -HSD - dehydrogenaza 3 β - hydroksysteroidowa

Ang-1 - angiopoetyna 1

Ang-2 - angiopoetyna 2

ArKO - myszy z nokautem genu dla aromatazy

AT1 - receptor angiotensyny typu 1

BHT - butylowany hydroksytoluen

cAMP - cykliczny adenozynomonofosforan

COX - cyklooksygenaza

CPR - reduktaza NADPH-cytochrom P450

CREB - białko wiążące element odpowiedzi na cAMP

CRH2 - receptor hormonu uwalniającego kortykotropinę typu 2

CSN - choroby sercowo-naczyniowe

CumOOH - wodoronadtlenek kumenu

CYP11A1 - cytochrom P450_{scc}

CYP19A1 - cytochrom P450_{arom}

CYP19A1 - ludzki gen kodujący aromatazę

CYP1A1 - cytochrom P450 1A1

CYP3A4 - cytochrom P450 3A4

DCF - dichlorofluoresceina

DFO - desferoksamina

DHEA - dehydroepiandrosteron

DHEAS - siarczan DHEA

E₁ - estron

E₂ - 17 β -estradiol

E₃ - estriol

EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy

EPB50 - białko utrzymujące fosforan ezryny w błonie

ERM - rodzina białek, które umocowują mikrofilamenty do błony plazmatycznej, np. w mikrokosmkach

ER α , ER β - receptory estrogenowe

FAD - dinukleotyd flawinoadeninowy

FBS - płodowa surowica bydlęca

Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ - siarczan amonowo-żelazawy

FFA - wolne kwasy tłuszczowe

FMN - mononukleotyd flawinowy

GATA-4 - czynnik transkrypcyjny

GSH - zredukowany glutation

GSSH - utleniony glutation

H₂DCFDA - 2',7'-dioctan dichlorofluoresceiny

H₂O₂ - nadtlenek wodoru

HCHO - formaldehyd

HCl - kwas solny

HClO₄ - kwas nadchlorowy

HELLP - syndrom, występujący u kobiet ze stanem przedrzucawkowym, charakteryzujący się hemolizą, wzrostem aktywności enzymów wątrobowych i trombocytopenią

HEPES - kwas N-(2-hydroksyetylo)-piperazyno- N'-etanosulfonowy

HIF-1 α - czynnik transkrypcyjny indukowany przez hipoksję

HO₂[•] - rodnik wodoronadtlenkowy

HPAA - płodowa oś podwzgórze-przysadka-nadnercza

HPETE - kwas hydroperoksyekoizatetraenowy

HSP-70 - białko szoku termicznego

IL-1, IL-6, IL-8, IL-1 β - interleukiny 1, 6, 8, 1 β

JAR, JEG-3, BeWo - ustalone linie komórkowe wywodzące się z kosmówczaka łożyska *choriocarcinoma*

JNK - kinaza fosforylująca N-terminalną część białka Jun, co prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego AP-1; JNK związana jest z odpowiedzią organizmu na stres oksydacyjny

K₃PO₄ - ortofosforan potasowy

KSCN - rodanek potasowy

L[•] - wolny rodnik alkilowy

L-Arg - L-arginina

LDH - dehydrogenaza mleczanowa

LDL - lipoproteiny o małej gęstości

LO[•] - wolny rodnik alkoksylowy

LOO[•] - wolny rodnik nadtlenkowy

LOX - lipooksygenaza

Mash2 - czynnik transkrypcyjny (*ang. Mammalian achaete/scute homologue-2*)

MCF-7 - linia komórkowa wywodząca się z ludzkiego raka piersi

MDA - dialdehyd malonowy

MMP2, MMP9 - metaloproteinazy 2 i 9

NADP⁺ - fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego

NaHCO₃ - wodorowęglan sodowy

NaOH - wodorotlenek sodu

NO[•] - tlenek azotu

eNOS, iNOS, nNOS – endotelialna, indukowalna i neuronalna syntaza tlenku azotu

O₂^{•-} - anionorodnik ponadtlenkowy

OH⁻ - anion hydroksylowy

ONOO⁻ - nadtlenoazotyn

P450_{arom} - cytochrom P450 aromatazy

P450_{scc} - cytochrom P450 rozszczepiający łańcuch boczny cholesterolu

PBS - bufor potasowo-fosforanowy (*ang. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*)

PCOS - zespół jajników policystycznych (*ang. polycystic ovary syndrome*)

PE - stan przedrzucawkowy (*ang. preeclampsia*)

PGE₂ - prostaglandyna E2

PGI₂ - prostacyklina

PIGF - łożyskowy czynnik wzrostu (*ang. Placental Growth Factor*)

PPAR γ - receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (*ang. Peroxisome proliferator-activated receptors*)

RFT - reaktywne formy tlenu

RPMI -1640 - podłoże hodowlane do komórek (*ang. Roswell Park Memorial Institute*)

RXR - receptor retinoidowy X

sEng - rozpuszczalna forma endogliny

SF-1, LRH-1 - sieroce receptory jądrowe

sFlt-1 - rozpuszczalna forma receptora dla czynnika VEGF-1, która swoją aktywność przejawia w przestrzeni zewnątrzkomórkowej

SHBG - białko wiążące hormony płciowe (*ang. sex hormone binding globulin*)

TBA - kwas 2-tiobarbiturowy

TBARS - związki reagujące z kwasem tiobarbiturowym

TCA - kwas trójchlorooctowy

TGF β 1, TGF- β 3 - transformujący czynnik wzrostu beta 1 i 3

TNF α - czynnik martwicy nowotworu α (kachektyna)

TXA2 - tromboksan A2

USF1, USF2 - czynniki transkrypcyjne (*ang. upstream transcription factor 1, 2*)

VEGF - czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (*ang. Vascular Endothelial Growth Factor*)

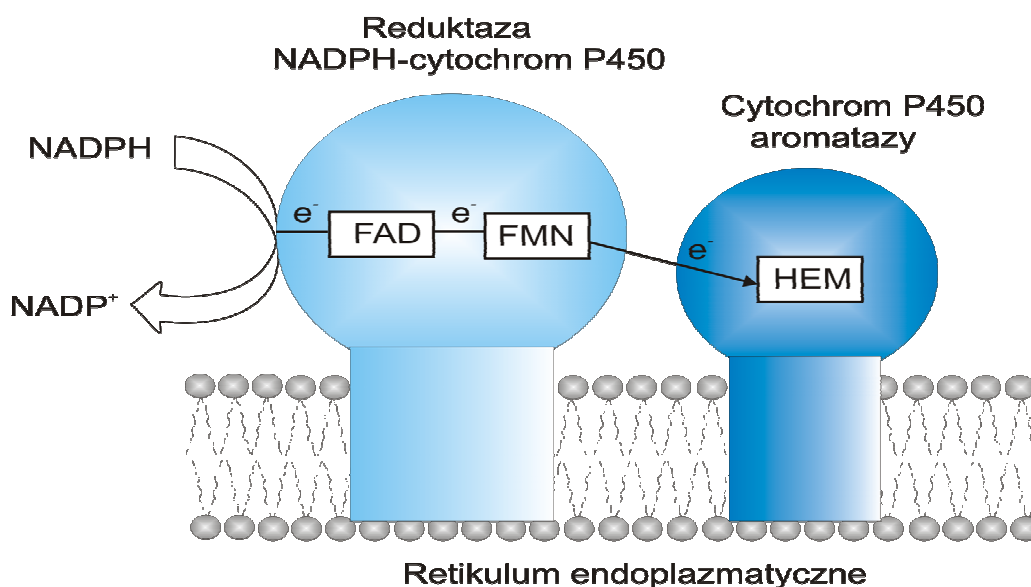
1. WSTĘP

1.1 Aromataza

1.1.1 Aromataza - struktura, funkcja

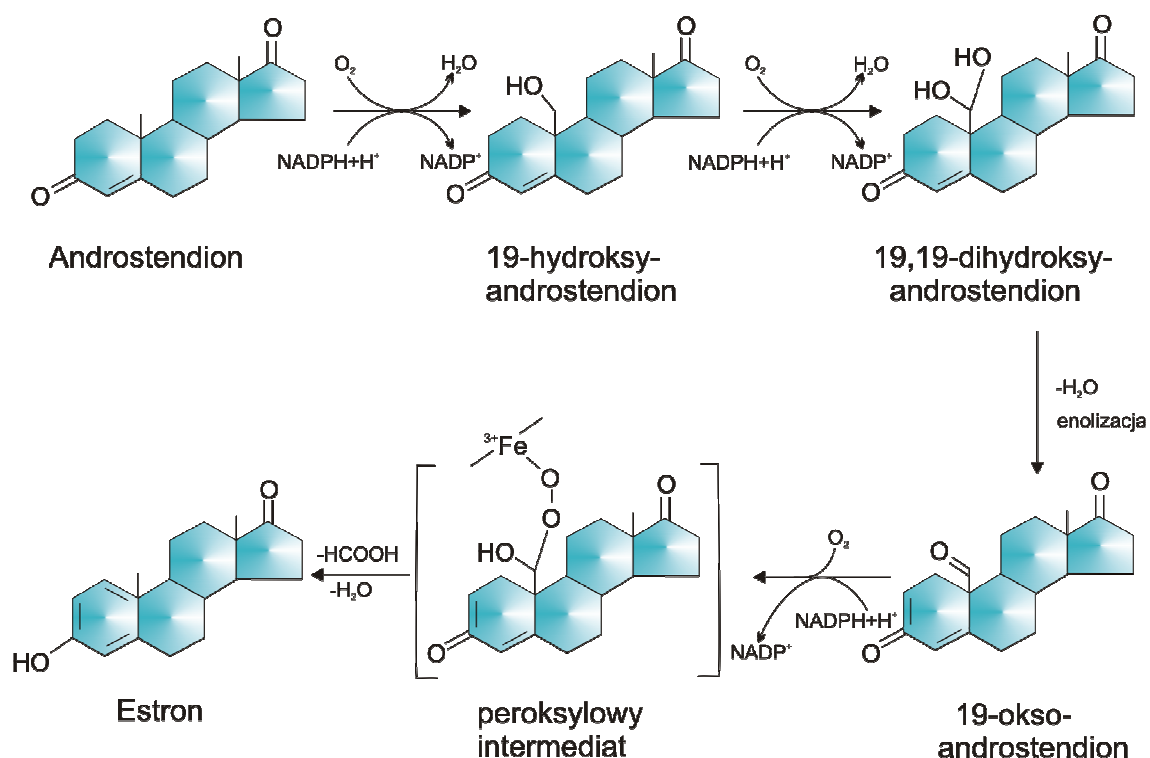
Aromataza jest kompleksem enzymatycznym odpowiedzialnym za biosyntezę estrogenów z androgenów, który występuje u wszystkich kręgowców. Kompleks ten zawiera dwa różne białka: reduktazę NADPH-cytochrom P450 oraz cytochrom P450_{arom} i jest związany z błoną retikulum endoplazmatycznego komórek produkujących estrogeny poprzez N-końcową, krótką, hydrofobową domenę transbłonową (1,2).

Reduktaza NADPH-cytochrom P450 (CPR), zawiera C-końcową domenę wiążącą FAD i NADPH, N-końcową domenę wiążącą FMN, element łączący oraz hydrofobowy rejon, który kotwiczcy białko w błonie i umożliwia oddziaływanie z cytochromem P450_{arom}. Rola CPR polega na transporcie elektronów z NADPH, przez FAD i FMN na żelazo hemowe cytochromu P450_{arom} (Ryc. 1). Natomiast cytochrom P450_{arom} (CYP19A1) jest hemoproteina, która uczestniczy w konwersji androgenów (C19) do estrogenów (C18), a konkretnie: androstendionu do estronu, testosteronu do 17 β -estradiolu i 16 α -hydroksyt testosteronu do 17 β -,16 α -estriolu. (3,4). Najnowsze badania dowodzą, że CPR i androstendion wiążą się do cytochromu P450_{arom} w różnych miejscach, przy czym CPR wiąże znacznie silniej do cytochromu P450_{arom}, niż substrat androgenowy (3).



Ryc. 1. Przepływ elektronów w kompleksie CPR - cytochrom P450_{arom}.

Aromataza była przedmiotem intensywnych badań w ostatnich latach, zwłaszcza jeśli chodzi o mechanizm reakcji katalizowanej przez ten enzym. Wiadomo, że przekształcenie jednego mola substratu (androgenu) do jednego mola produktu (estrogenu) wymaga trzech moli NADPH i trzech moli tlenu. Ryc. 2 przedstawia trójetapową reakcję katalizowaną przez aromatazę na przykładzie androstendionu, preferowanego substratu tego enzymu. W początkowych etapach dochodzi do kolejnych dwóch hydroksylacji kątowej grupy metylowej C19, odłączenia cząsteczki wody i wytworzenia 19-oksoandrostendionu. Związek ten w trzecim etapie, w obecności NADPH, przekształcany jest w peroksyłowy intermediat cytochromu P450_{arom}, który ulega rozpadowi do estronu (zawierającego pierścień aromatyczny) i kwasu mrówkowego (5).



Ryc. 2. Reakcja katalizowana przez aromatazę.

Najnowsze badania Ghosh i wsp. (2) doprowadziły do ustalenia krystalicznej struktury aromatazy oczyszczonej z łożyska ludzkiego. Dzięki temu poznano precyzyjny mechanizm wiązania androstendionu w centrum katalitycznym enzymu, co pozwoliło na lepsze zrozumienie przebiegu reakcji aromatyzacji w łożysku.

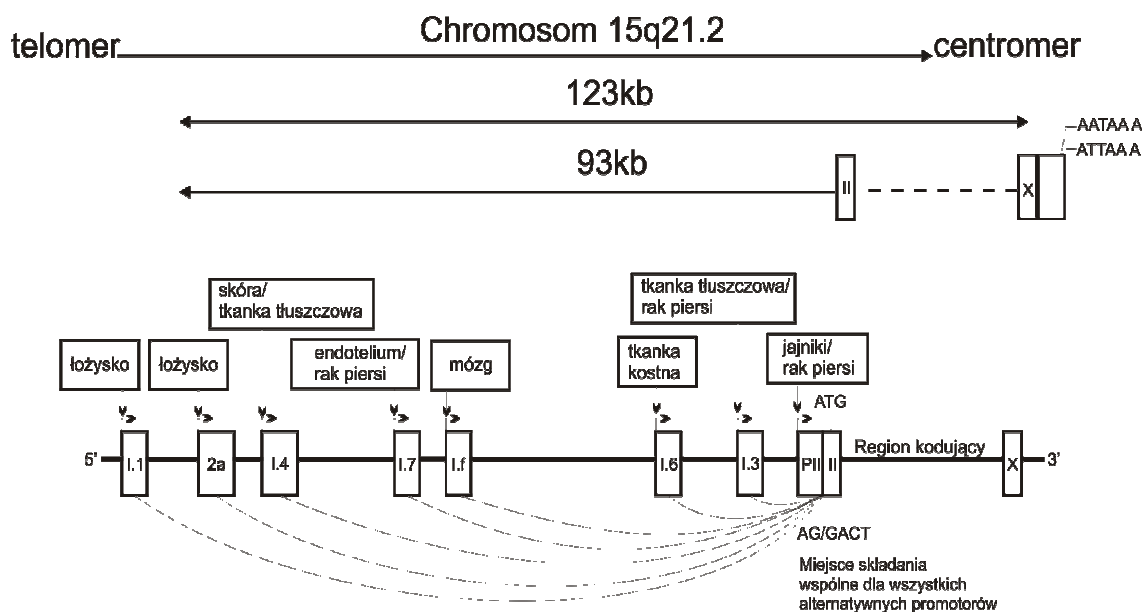
1.1.2 Gen aromatazy

U człowieka aromataza ulega ekspresji w licznych komórkach, takich jak komórki ziarniste jajnika, komórki łożyskowego syncytiotrofoblastu, komórki Leydiga, fibroblasty skóry i w wielu rejonach mózgu, takich jak: podwzgórze, hipokamp, ciało migdałowate (6,7). Aromataza ulega też ekspresji w ludzkiej tkance tłuszczowej. W okresie przedmenopauzalnym głównym miejscem ekspresji są komórki ziarniste jajnika, natomiast po menopauzie funkcja ta zostaje przejęta przez komórki mezenchymalne tkanki tłuszczowej, gruczoł piersiowy, osteoblasty i chondrocyty kości, śródbłonek naczyń i komórki mięśniówki gładkiej aorty (8). W jajniku głównym produktem działania aromatazy jest estradiol o silnym działaniu estrogenym, natomiast w tkance tłuszczowej powstaje głównie estron (o słabszym oddziaływaniu niż estradiol), który przynajmniej w połowie jest przekształcany do estradiolu w tkankach pozajajnikowych (6).

Aromataza jest kodowana przez pojedynczą kopię genu *CYP19A1*, który zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 15 (15q21.2). Gen ten rozciąga się na długość 123 tysiące par zasad, przy czym sekwencja niekodująca składa się z 93 tysięcy par zasad i odcinek ten pełni funkcję regulatorową, natomiast sekwencja kodująca składa się z 30 tysięcy par zasad i koduje on białko złożone z 503 aminokwasów (6,9). Gen aromatazy składa się z 10 eksonów, przy czym region kodujący zajmuje 9 eksonów (II-X) z dwoma miejscami poliadenylacji, natomiast region regulatorowy zawiera tkankowo specyficzne, nie ulegające translacji, alternatywne eksony pierwsze. Regulacja ekspresji genu aromatazy odbywa się przy udziale ośmiu tkankowo specyficznych alternatywnych promotorów charakterystycznych dla danej tkanki (Ryc. 3) (7,10). Te promotory nie tylko kontrolują tkankowo specyficzną ekspresję transkryptów mRNA P450_{arom}, ale również podlegają odmiennej regulacji przez poszczególne hormony lub inne czynniki regulujące (11). Miejsce startu translacji znajduje się w eksonie II i rozpoczyna się kodonem ATG. Najbardziej proksymalnie względem tego miejsca znajduje się promotor PII, który jest odpowiedzialny za ekspresję aromatazy w jajnikach i jądrach, a także w raku piersi, przy czym zawiera on element odpowiedzi na cAMP. Powyżej tego promotora znajdują się promotory I.3 i I.4, które odgrywają główną rolę w tkance tłuszczowej i odpowiadają na glukokortykoidy i cytokiny takie jak: IL-1 β , IL-6 i TNF α . Pomiędzy promotorami

specyficznymi dla tkanki tłuszczowej znajdują się jeszcze trzy inne promotory, tj. I.7 (specyficzny dla komórek endotelialnych), I.f (specyficzny dla mózgu), oraz I.6 (specyficzny dla kości). Najbardziej dystalnie względem miejsca startu translacji znajdują się promotory specyficzne dla łożyska, tj. promotor I.1, który jest głównym promotorem w łożysku oraz promotor 2a, przy czym ich regulacja jest jeszcze przedmiotem badań (10). W łożysku ekspresja *CYP19A1* jest ograniczona do warstwy syncytiotrofoblastu (12). Pomimo użycia alternatywnych promotorów wszystkie nie ulegające translacji eksony są składane w tym samym miejscu, w pewnej odległości od miejsca startu translacji, znajdującym się w eksonie II. W wyniku tego ramka odczytu sekwencji kodującej, zaczynającą się sekwencją ATG i kończącą się kodonem TAG, jest taka sama w każdym przypadku. W związku z tym, mRNA aromatazy transkrybowane z różnych promotorów prowadzi do translacji białka aromatazy, które ma zawsze identyczną budowę i wielkość, tzn. składa się z 503 aminokwasów (13).

Gen aromatazy (*CYP19A1*)



Ryc. 3. Gen aromatazy (*CYP19A1*). Objasnienia w tekście (wg *Chen 2009*).

W badaniach przeprowadzonych na hodowlach ludzkich komórek łożyskowych zaobserwowano, że różnicowanie cytotrofoblastu do syncytiotrofoblastu jest zależne od tlenu i związane ze znaczącą indukcją aktywności aromatazy i ekspresji genu

CYP19A1 (12). Wykazano, że hipoksja hamuje różnicowanie cytotrofoblastu w syncytiotrofoblast, a co za tym idzie również indukcję ekspresji genu *CYP19A1*. Odbywa się to pod wpływem czynnika transkrypcyjnego określanego jako Mash2 (*Mammalian achaete/scute homologue-2*). Białko to działa za pośrednictwem dwóch innych czynników transkrypcyjnych określanych jako USF1 i USF2 (14,15). Wykazano również, że urokortyna 2 zwiększa ekspresję aromatazy w hodowli ludzkich komórek łożyskowych, przy czym w działaniu tym pośredniczy receptor CRH2 (receptor hormonu uwalniającego kortykotropinę typu 2) (16).

W komórkach ziarnistych jajnika szczura prostaglandyna PGE2 stymuluje ekspresję genu *CYP19A1* i zwiększa ilość białka aromatazy, działając (przynajmniej częściowo) poprzez czynnik transkrypcyjny GATA-4 (17). PGE2 jest najbardziej znanym stymulatorem P450_{arom} również w endometriozie, przy czym odbywa się to prawdopodobnie przy udziale czynnika steroidogenezy 1 (SF-1), zwanego również sierocym receptorem jądrowym (*orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1*) (18). Promotory specyficzne dla jajników zawierają elementy wiążące CREB (białko wiążące element odpowiedzi na cAMP) oraz sieroce receptory jądrowe SF-1 i LRH-1, które są niezbędne w indukowanej przez cAMP ekspresji *CYP19A1* w komórkach ziarnistych i lutealnych podczas cyklu menstruacyjnego oraz w przebiegu ciąży (11). Wykazano, że ligandy RXR i PPAR γ hamują ekspresję mRNA aromatazy w ludzkich komórkach ziarnistych jajnika (19). Stwierdzono również, że w ludzkich komórkach łożyskowych *choriocarcinoma* (linie JAR, JEG-3 i BeWo), związki trialkilowe stymulują ekspresję łożyskowej aromatazy (20).

1.1.3 Aromataza – niedobór i nadmiar

Niedobór aromatazy jest rzadkim zaburzeniem dziedziczącym się w sposób autosomalny recesywny, które stwierdza się u pacjentów z wrodzonym niedoborem aromatazy i myszy z nokautem genu dla aromatazy (ArKO). Schorzenie to jest wynikiem mutacji w regionie kodującym genu *CYP19A1*, które prowadzą do spadku aktywności enzymu lub całkowitego zniesienia jego aktywności, wynikiem czego jest niedobór lub brak estrogenów. Fenotyp myszy ArKO charakteryzuje się otyłością, hiperinsulinemią i opornością na insulinę. U tych myszy stwierdza się również stłuszczenie wątroby, które jak wykazano może być odwrócone przez podawanie estradiolu. U obu płci obserwowano również zmniejszenie gęstości mineralnej kości.

U samic stwierdzano ponadto zaburzenia owulacji i degenerację jajników, a u samców ArKO zaburzoną spermatogenezę i zaburzone zachowania płciowe (21-24).

U ludzi pierwszy przypadek niedoboru aromatazy opisano w 1995 roku. Pierwsze objawy u kobiet pojawiają się jeszcze przed urodzeniem, gdy dochodzi do wirylicacji matek w ciąży na skutek zaburzonej aromatyzacji androgenów do estrogenów. U dorosłych kobiet z niedoborem aromatazy stwierdzano brak miesiączki i zaburzenia w rozwoju tkanki piersiowej. W badaniach hormonalnych stwierdzano hipogonadyzm z hiperandrogenizmem. Wraz z wiekiem na skutek androgenizacji ustroju rozwijały się objawy trądzikowe i hirsutyzm. Podobnie jak u myszy ArKO, stwierdzano również zmniejszoną mineralizację kości (24). W przypadku mężczyzn objawy niedoboru aromatazy pojawiają się dopiero po urodzeniu i dotyczą m.in. kości. U dorosłych mężczyzn z wrodzonymi mutacjami genu kodującego aromatazę występuje nasilona osteoporoza i opóźniony wiek kostny. Mają oni wysoki wzrost, wykazują eunuchoidalne proporcje ciała i znaczną koślawość kolan (25).

Z drugiej strony transgeniczne myszy z nadmierną ekspresją aromatazy (AROM+) stanowią doskonałe modele służące do badania procesów regulowanych przez estrogeny i są pomocne w zrozumieniu takich procesów jak rozwój gruczołów piersiowych, ginekomastia i rak piersi. Myszy AROM+ wykazują zwiększone poziomy estradiolu w surowicy, przy zmniejszonych poziomach testosteronu. Ponadto u samców tych myszy rozwijała się ginekomastia, przy czym proces ten mógł zostać zahamowany przez podanie inhibitorów aromatazy (26). Opisano również kilka rodzin z syndromem nadmiaru estrogenów na skutek zwiększonej ekspresji aromatazy. U mężczyzn stwierdzano ginekomastię, a u kobiet makromastię i zaburzenia cyklu menstruacyjnego. Co więcej nasilona aromatyzacja prowadziła do zwiększonego poziomu estrogenów w surowicy, zmniejszonego poziomu testosteronu i androstendionu oraz zahamowania wydzielania gonadotropin u tych pacjentów. Wykazano, że w tym przypadku inhibitory aromatazy wykazywały korzystne efekty lecznicze (27).

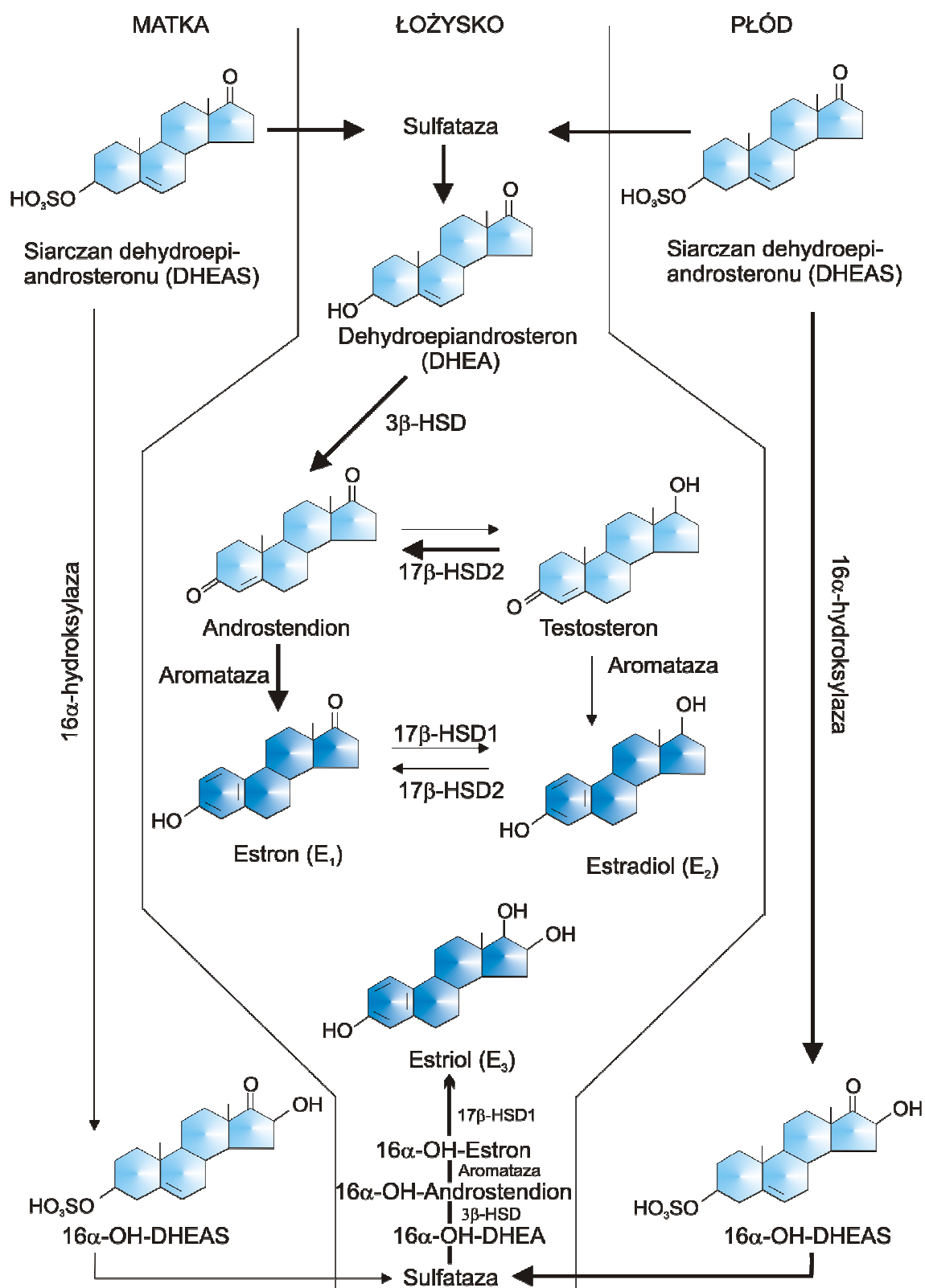
Zwiększona ekspresja aromatazy ma krytyczne znaczenie w patologii takich schorzeń jak rak piersi, endometrioza, czy hipogonadyzm. Z kolei brak lub zmniejszona aktywność aromatazy może być przyczyną zaburzeń np. w funkcjonowaniu neuronów mózgu i sprzyjać rozwojowi takich schorzeń jak choroba Alzheimer, czy choroba Parkinsona (28).

1.2 Estrogeny i ich znaczenie w ciąży

1.2.1 Synteza estrogenów w jednostce płodowo-łożyskowej

Estrogeny są syntetyzowane w wielu różnych tkankach steroidogenicznych, przy czym należy zaznaczyć, że podczas gdy w jajniku hormony te produkowane są *de novo* z cholesterolu, to w łożysku, ze względu na brak 17α -hydroksylazy/ $17,20$ -liazy, prekursorami estrogenów są androgeny dostarczane przez nadnercza matki i płodu. W czasie ciąży siarczan dehydroepiandrosteronu (DHEAS), pochodzący z nadnerczy matki i płodu, przechodzi przez barierę płodowo-łożyskową, gdzie jest hydrolizowany przez sulfatazę, po czym pod wpływem dehydrogenazy 3β -hydroksysteroidowej (3β -HSD), dehydrogenazy 17β -hydroksysteroidowej (17β -HSD) i aromatazy, jest ostatecznie przekształcany do odpowiednich estrogenów. DHEAS ulega również hydroksylacji w pozycji 16α w wątrobie matki i płodu, po czym już w łożysku jest przekształcany, przy udziale 3β -HSD, 17β -HSD i aromatazy do estriolu. Pochodzący z wątroby płodu 16α -OH-DHEAS jest głównym prekursorem biosyntezy estrogenów w łożysku (Ryc. 4) (29).

W łożysku ze względu na silnie działający promotor genu *CYP19A1*, aktywność aromatazy jest znacznie większa, niż w jakiegokolwiek innej tkance, przy czym głównym produktem działania aromatazy w tej tkance jest estriol. Łożyskowy typ mRNA aromatazy ulega ekspresji w ustalonych liniach komórek *choriocarcinoma* (JAR, JEG-3, BeWo), co czyni te linie komórkowe doskonałym modelem do badania tego enzymu. Aromataza ulega ekspresji w tych komórkach zarówno w warunkach niestymulowanych, jak i w odpowiedzi na estry forbolu, czy też inne aktywatory, które działają poprzez zwiększenie wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP (30). Samson i wsp. (31) wykazali, że komórki *choriocarcinoma* linii JEG-3 posiadają wszystkie enzymy konieczne do przekształcenia dehydroepiandrosteronu (DHEA) w E_2 . Badanie produktów pośrednich powstających w obecności i nieobecności inhibitorów dehydrogenazy 3β -hydroksysteroidowej, aromatazy i dehydrogenazy 17β -hydroksysteroidowej, enzymów biorących udział w ścieżce biosyntezy E_2 , wykazało, że DHEA jest przekształcany w androstendion przez 3β -HSD, następnie androstendion pod wpływem aromatazy ulega aromatyzacji do estronu, który ostatecznie jest przekształcany do E_2 przez 17β -HSD (31).



Ryc. 4. Biosynteza estronu (E₁), estradiolu (E₂), i estriolu (E₃) w ludzkiej jednostce płodowo-łożyskowej. DHEAS and 16 α -hydroksy-DHEAS pochodzące od płodu i matki są konwertowane, poprzez androstendion, testosteron i 16 α -hydroksytestosteron, odpowiednio do E₁, E₂ i E₃ [zmodyfikowano wg Albrecht i wsp. (29)].

1.2.2 Znaczenie estrogenów w ciąży

Łożysko wykazuje wysoką ekspresję aromatazy i jest głównym miejscem produkcji estrogenów w czasie ciąży. Estrogeny, poza ich podstawową rolą jaką odgrywają w reprodukcji, mają znaczenie również w biologii naczyniowej, metabolizmie lipidów i węglowodanów, mineralizacji kości, a także w rozwoju mózgu i funkcji poznawczych (32).

Rola aromatazy w utrzymaniu ciąży nie jest do końca wyjaśniona. Wykazano, że podanie samicom szczura w późnym okresie ciąży fadrozolu, niesteroidowego inhibitora aromatazy, może prowadzić do uszkodzenia płodu (33). W innym badaniu z kolei wykazano, że podskórne podanie samicom szczura fadrozolu w pierwszych dniach ciąży, zaburzało implantację, nie wpływając jednak na żywotność embrionu (34).

Badania Albrecht i Pepe (35) wykazały, że estrogeny odgrywają ważną fizjologiczną rolę w regulacji funkcjonalnego różnicowania łożyskowych kosmków trofoblastu. Manifestuje się to przede wszystkim up-regulacją enzymów uczestniczących w biosyntezie progesteronu, w tym cytochromu P-450_{scc}, a także dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej (11 β -HSD), enzymu ważnego w biosyntezie matczynych kortykosteroidów. Co więcej zależne od estrogenów zmiany w łożyskowym metabolizmie kortykosteroidów doprowadzają do aktywacji płodowej osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPAA) i w konsekwencji do dojrzewania nadnerczy u płodu (35).

Ostatnie badania wskazują, że za zwiększony poziom estronu w stosunku do progesteronu u płodu, a także wyższy poziom estradiolu w stosunku do 20 α -dihydroprogesteronu w krążeniu matki, odpowiedzialny jest typ i lokalizacja 17 β -HSD. I tak typ 2 17 β -HSD, który utlenia estradiol do estronu i 20 α -progesteron do progesteronu, ulega znacznej ekspresji w łożyskowych komórkach endotelialnych kontaktujących się z kompartmentem płodu. Przeciwnie syncytium kontaktujące się z krążeniem matki produkuje większe ilości estradiolu i 20 α -dihydroprogesteronu z powodu działania 17 β -HSD typu 1, 5 i 7 (36).

Estrogeny wykazują również działanie antyoksydacyjne. Okazuje się, że antyoksydacyjne wpływy estrogenów mogą dotyczyć różnych mechanizmów. Mogą one, więc interferować z mikrosomalnymi składnikami, które biorą udział w enzymatycznej peroksydacji lipidów, albo z jonami żelaza, wykazując działanie redukujące lub

chelatujące. Posiadają one również zdolność zmiatania rodników nadtlenkowych i hydroksylowych, a także mogą przekształcać rodniki α -tokoferylowe w α -tokoferol. Krytyczny dla aktywności antyoksydacyjnej estrogenów wydaje się pierścień fenolowy A, ponieważ inne hormony płciowe, które są pozbawione tego pierścienia, nie wykazują efektów ochronnych. Podstawową rolę w powstawaniu blaszki miażdżycowej przypisuje się obecnie utlenionym cząsteczkom cholesterolu w LDL, przy czym efekt antyoksydacyjny estrogenów powoduje obniżenie puli utlenionych LDL. Antyoksydacyjna rola estrogenów nie jest do końca zbadana, choć wykazano, że metabolity estrogenowe: 2- i 4-metoksyestrogeny, w warunkach *in vitro*, są silnymi donorami elektronów i hamują peroksydację lipidów (37,38). Wykazano również, że estrogeny, poprzez zapobieganie powstawaniu RFT w mitochondriach, hamują aktywność kinazy JNK (która jest aktywowana przez wolne rodniki). Co więcej mają także zdolność zwiększania aktywności manganowej dysmutazy nadadtlenkowej. Konsekwencją regulacji przez estrogeny obu tych procesów jest hamowanie apoptozy, co wykazano w badaniach przeprowadzonych na komórkach ludzkiego raka piersi MCF-7 (39).

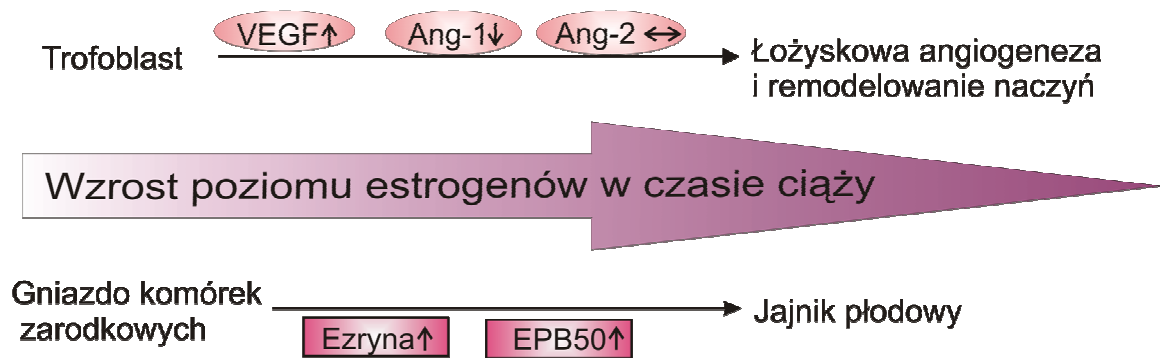
Sugeruje się, że estriol może wykazywać niegenomowy, antyoksydacyjny wpływ *in vivo*. Zarówno estradiol, jak i estriol mają silny wpływ antyoksydacyjny na autooksydację kwasu linolenowego. Z badań wynika, że oba estrogeny wykazują właściwości antyoksydacyjne w odniesieniu do lipidów *in vivo*, ale większą rolę w tym procesie odgrywa estriol, ze względu na to, że tylko jego poziom jest wystarczająco wysoki w czasie ciąży, aby wykazywać właściwości antyoksydacyjne (40).

Wykazano również, że estrogeny regulują powstawanie pierwotnych pęcherzyków jajnikowych u płodów żeńskich i tworzenie zdrowych oocytów przez kontrolowanie wewnątrzjajnikowego stosunku aktiwiny/inhibiny i regulację rozwoju mikrokosmków jajnika (41). Biochemiczny mechanizm przez który estrogeny regulują rozwój mikrokosmków jajnikowych u płodu wymaga jeszcze wyjaśnienia, niemniej jednak wiadomo, że istotną rolę w tym procesie odgrywają ezryny (należą do rodziny białek ERM umocowujących mikrofilamenty do błony plazmatycznej, np. w mikrokosmkach), które po fosforylacji wiążą się do białka EPB50 (Ryc. 5). Białko EPB50 utrzymuje fosforan ezryny w błonie i ułatwia w ten sposób wiązanie F-aktyny potrzebnej do kompletnego utworzenia mikrokosmków. Brak estrogenów zaburza

prawdopodobnie migrację ezryny z cytoplazmy do błony i tym samym jego fosforylację i wiązanie się z białkiem EPB50 (42).

Wiadomo, że estrogeny odgrywają ważną rolę w utrzymaniu homeostazy energetycznej zarówno u myszy, jak i ludzi. Brak estrogenów wydaje się być jedną z przyczyn rozwoju zespołu metabolicznego, ponieważ u myszy ArKO zaobserwowano objawy charakterystyczne dla tego zespołu, takie jak otyłość, czy hiperinsulinemię (43).

Właściwy poziom estrogenów jest również istotny w angiogenezie zachodzącej w łożysku. Szybkość przepływu krwi przez łożysko zależy od rozwoju naczyń w łożysku, angiogeneza łożyskowa jest więc krytyczna dla prawidłowego rozwoju płodu. W wielu patologiach ciąży wykazano nieprawidłowe unaczynienie doczesnej i kosmków łożyskowych. Wiadomo, że estrogeny stymulują ekspresję VEGF (czynnika wzrostu śródbłona naczyniowego) w macicy podczas normalnego cyklu menstruacyjnego. Stwierdzono, że takie działanie estradiolu u szczurów zwiększało przepuszczalność naczyń, obrzęk i mitozę komórek endotelialnych. W badaniach przeprowadzonych na pawianach wykazano, że cytotrofoblast kosmkowy jest głównym źródłem VEGF w łożysku i że mRNA VEGF wzrasta równolegle ze wzrostem estradiolu w surowicy kobiet z zaawansowaną ciążą (42). Z drugiej strony poziom mRNA Ang-1 (angiopoetyna 1) zarówno w cytotrofoblaście, jak i syncytiotrofoblaście stopniowo spada wraz ze wzrostem poziomu estrogenów podczas całego okresu ciąży u szympanów (44). Ekspresja Ang-2 (angiopoetyna 2) nie ulegała zmianie pod wpływem estrogenów. Indukowany przez estradiol i postęp ciąży spadek ekspresji w cytotrofoblaście Ang-1 jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami, że ekspresja Ang-1 jest hamowana przez zwiększony poziom estrogenów podczas zaawansowanej ciąży u naczelników (Ryc. 5) (42,45). Wzrostowi ekspresji VEGF w komórkach cytotrofoblastu towarzyszy jednoczesny spadek w ekspresji VEGF w zewnątrzkosmkowym cytotrofoblaście w okresie ciąży u szympanów (46).



Ryc. 5. Regulacja przez estrogeny łożyskowej angiogenezy i rozwoju jajników u płodów żeńskich podczas ciąży.

Estrogeny w ciąży, zwiększają również maciczny przepływ krwi (47). Badania dowodzą, że u matek, u których rozwija się preeclampsia stwierdza się zmniejszoną objętość osocza na początku drugiego trymestru ciąży. Niższa objętość osocza jest przyczyną obniżenia stężenia estradiolu i aldosteronu. Dodatkowo wykazano, że wartości progesteronu były zwiększone przed pojawieniem się objawów klinicznych preeclampsji. Zmniejszony poziom objętości osocza może prowadzić do kompensacyjnej wazodylatacji nerkowej i aktywacji systemu renina – angiotensyna - aldosteron. Łożyskowy estrogen może odgrywać również rolę w regulacji objętości naczyń poprzez stymulację wątrobowej syntezy angiotensynogenu i indukcję aktywności syntazy tlenku azotu. Z tego powodu zmiany w systemie renina-angiotensyna-aldosteron i w stężeniu estrogenów są głównymi modulatorami objętości osocza podczas ciąży. Istotnie badania wykazały spadek stężenia estradiolu u kobiet z preeclampią, sugerując, że jest to przyczyna spadku przepływu krwi w jednostce maciczno-łożyskowej (48).

1.3 Stan przedrzucawkowy (preeclampsia)

Preeclampsia (PE) jest wielonarządowym zaburzeniem występującym w ciąży, które charakteryzuje się głównie nadciśnieniem (>140/90 mmHg), białkomoczem (>0,3g/24h), obrzękami i rozwija się po około 20 tygodniu trwania ciąży (49,50). Zaburzenie to może spowodować przedwczesny poród, niską wagę urodzeniową, a nawet śmierć płodu, natomiast u matki powikłania stanu przedrzucawkowego obejmują: niewydolność nerek, syndrom HELLP (hemoliza, wzrost aktywności enzymów wątrobowych i trombocytopenia), uszkodzenie wątroby, obrzęk mózgu,

a w ciężkich przypadkach PE może zakończyć się rzucawką (eclampsia) i śmiercią (50,51). Etiologia tego schorzenia nie jest do końca jasna, choć centralna rola łożyska w PE nie podlega dyskusji, ponieważ objawy tego schorzenia zanikają po porodzie (52). Roberts i wsp. (53) wprowadzili teoretyczny model PE wskazując, że choroba przebiega w dwóch etapach. Pierwszy etap jest związany ze zredukowaną perfuzją łożyska w pierwszej połowie ciąży i wydzielaniem czynników łożyskowych, takich jak: reaktywne formy tlenu (RFT), cytokiny i eikozanoidy, przy czym w tym czasie nie obserwuje się objawów klinicznych PE. Natomiast w drugiej połowie ciąży na skutek stresu oksydacyjnego i aktywacji procesu zapalnego pojawiają się objawy PE, tzn. dysfunkcja komórek endotelialnych prowadzi do nadciśnienia i do tzw. endoteliozy kłębuszkowej, powodującej zaburzenia filtracji w nerkach, czego wynikiem jest białkomocz i obrzęki u matki (53,54). Ostatnio jednak sugeruje się, że sam etap pierwszy modelu PE (zredukowana perfuzja łożyskowa) nie jest wystarczający do wywołania etapu drugiego (objawów PE). Sugeruje się, że sygnały wysyłane z jednostki płodowo-łożyskowej, w odpowiedzi na zaburzoną implantację, modyfikują fizjologię matki i współdziałają z czynnikami występującymi konstytutywnie u matki, takimi jak np. genetyczne predyspozycje, otyłość, cukrzyca, dieta. Z drugiej strony te czynniki zwrótnie powodują zaburzenia rozwoju łożyska i dopiero powiązanie tych elementów razem pozwala na wystąpienie objawów PE (54,55).

Badania dowiodły, że rozwojowi PE sprzyjają m.in. takie zaburzenia, jak: wcześniej istniejące przewlekłe nadciśnienie, cukrzyca, otyłość, dyslipidemia (hiperlipidemia), czy przewlekła niewydolność nerek (56). Uważa się, że początek PE jest związany z nieprawidłowym wykształceniem krążenia macicznie-łożyskowego. Zaburzenia przekształcania tętnic spiralnych w naczynia pojemnościowe, prawdopodobnie na skutek nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej matki, powodują niezdolność komórek trofoblastu do inwazji w ścianę tych tętnic (zaburzenia implantacji). Efektem braku przekształcania tętnic spiralnych jest niedotlenienie i tym samym nadmierna produkcja wolnych rodników przez łożysko (57-59). Powstający w ten sposób stres oksydacyjny przyczynia się do peroksydacji lipidów, aktywacji leukocytów, głównie neutrofili i dysfunkcji śródbłonna naczyń u matki (60).

Pojawiają się doniesienia, które pozwalają przypuszczać, że hormony steroidowe takie jak testosteron, czy estrogeny mogą odgrywać rolę w patogenezie PE (Ryc. 6). Uważa się m.in., że potencjalnym czynnikiem wpływającym na zmniejszenie poziomu

argininy jest testosteron, który stymuluje aktywność arginazy II u samic myszy i szczurów. Potwierdza to fakt, że w PE stwierdza się wyższe stężenia tego hormonu, niż w prawidłowej ciąży. Zwiększona ekspresja arginazy II, spowodowana prawdopodobnie zwiększonym poziomem testosteronu, prowadzi do spadku poziomu argininy. Niski poziom argininy z kolei stymuluje eNOS do wytwarzania RFT: nadtlenoazotynu i rodnika hydroksylowego, w wyniku czego nasileniu ulega stres oksydacyjny. Spadek ilości NO powoduje zaburzenie angiogenezy, spadek aktywności metaloproteinaz 2 i 9 oraz skurcz naczyń łożyskowych, co prowadzi do zmniejszenia przepływu krwi, hipoksji i w konsekwencji do zaburzenia inwazji cytotrofoblastu. Stres oksydacyjny, wynikający z działania zarówno nadtlenoazotynu, jak i anionorodnika ponadtlenkowego, prowadzi również do zwiększonego uwalniania przez łożysko sFlt (rozpuszczalna forma receptora dla czynnika VEGF-1), która w krążeniu matki przyczynia się do spadku wolnego VEGF (podobne działanie wykazuje również spadek poziomu estrogenów) i tym samym do zwiększenia przepuszczalności endotelium matki, co prowadzi do zaburzeń w mózgu, wątrobie i nerkach, takich jak np. białkomocz, czy obrzęki. Z drugiej strony zarówno stres oksydacyjny pochodzenia łożyskowego, jak i stres spowodowany powstawaniem heterodimerów AT1 (receptor angiotensyny II) i receptora B2 (receptor bradykininy), będzie prowadził do dysfunkcji endotelialnej i nadciśnienia. Heterodimeryzacja AT1 i receptora B2 nasila oddziaływanie angiotensyny II na naczynia. PE charakteryzuje również zaburzona równowaga pomiędzy dwoma metabolitami kwasu arachidonowego powstającymi pod wpływem cyklooksygenazy, a mianowicie prostacykliną (PGI₂) i tromboksanem (TXA₂). Wykazano, że w zaburzeniu tym mamy do czynienia ze zwiększoną produkcją tromboksanu (wykazującego działanie wazokonstrykcyjne), przy jednocześnie zmniejszonej produkcji przez endotelium prostacykliny (czynnika działającego wazodylatacyjnie), efektem czego jest zwiększona kurczliwość naczyń, przyczyniająca się do wystąpienia nadciśnienia (54,61).

1.4 Stres oksydacyjny

1.4.1 Źródła reaktywnych form tlenu (RFT)

Wolne rodniki odgrywają ważną rolę w wielu procesach w organizmie. Małe ilości RFT są niezbędne dla prawidłowego przebiegu takich procesów jak przekazywanie sygnałów, odpowiedź komórki na hipoksję, czy indukcja odpowiedzi mitogennych. Z kolei tlenek azotu jest istotny w regulacji napięcia naczyń krwionośnych. Chociaż niewielkie ilości RFT są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, to wysokie stężenia mogą powodować liczne zaburzenia i prowadzić do uszkodzenia organów.

Uważa się, że jednym z głównych i najważniejszych źródeł wolnych rodników produkowanych wewnątrz komórki, jest mitochondrialny łańcuch transportu elektronów. W łańcuchu oddechowym cząsteczka tlenu ulega czteroelektronowej redukcji, w wyniku czego powstają dwie cząsteczki wody. Jednak oszacowano, że 1-2 % tlenu zużywanego podczas tego procesu, na skutek „nieszczelności” ulega niekompletnej redukcji do anionorodnika nadadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$), który następnie może być przekształcany do H_2O_2 i wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego ($\bullet OH$). $O_2^{\bullet-}$ może być produkowany w dwóch głównych miejscach mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów i jest to kompleks I (dehydrogenaza NADPH) i koenzym Q. Powstające w ten sposób RFT wpływają na liczne białka i ścieżki sygnałowe znajdujące się nie tylko w obrębie mitochondriów, ale również w innych kompartmentach komórkowych (62).

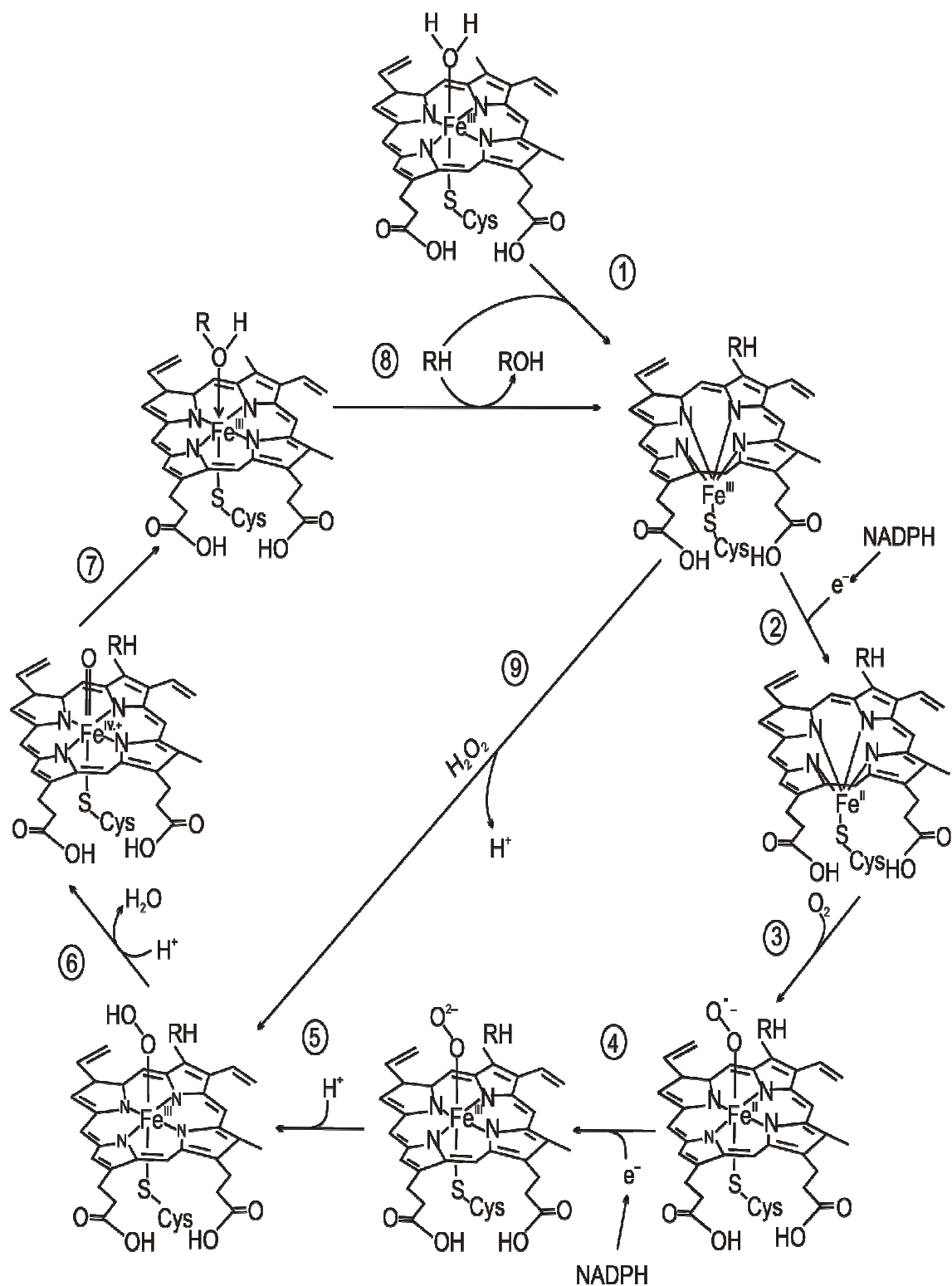
Wiadomo, że głównym źródłem stresu nitracyjnego w komórce jest, występująca w trzech izoformach syntaza tlenu azotu (eNOS, iNOS i nNOS), która katalizuje zależną od argininy syntezę $NO^{\bullet}$ w obecności NADPH i tlenu. Ostatnio pojawiają się doniesienia, że mitochondria mogą być również źródłem stresu nitracyjnego poprzez działanie mitochondrialnej NOS. Ostatnio uważa się, że obok tej ścieżki istnieje inna droga syntezy mitochondrialnego $NO^{\bullet}$, kiedy to w łańcuchu oddechowym dochodzi do redukcji NO_2^- do $NO^{\bullet}$. Odmienne od ścieżki NOS, ścieżka reduktazy NO_2^- jest niezależna od tlenu i ulega aktywacji w warunkach hipoksji lub anoksji. Synteza $NO^{\bullet}$, zależna od mitochondrialnego NO_2^- jest katalizowana przez oksydazę cytochromu c, przy czym w warunkach hipoksji, głównym oksydantem, produkowanym w tych warunkach, jest nie $O_2^{\bullet-}$, ale $ONOO^-$, powstający na skutek

reakcji pomiędzy wytwarzanymi w mitochondriach $O_2^{\bullet-}$ i $NO^{\bullet}$. Stężenia $ONOO^-$ są zależne od tlenu i wzrastają w warunkach niedotlenienia (62).

Istotnymi źródłami RFT w organizmie są również reakcje katalizowane przez cytochrom P450, peroksysomy i oksydazę NADPH (63).

Cytochromy P450 należą do monooksygenaz zawierających grupę hemową. Stanowią one składnik mikrosomalnego łańcucha transportu elektronów, uczestnicząc w reakcjach hydroksylacji mających miejsce podczas biosyntezy i metabolizmu substancji endogennych, takich jak cholesterol, kwasy żółciowe, hormony steroidowe, witaminy D i prostaglandyny, a także w detoksykacji ksenobiotyków. Podczas reakcji katalizowanych przez cytochrom P450 mogą powstawać również wolne rodniki. Cytochrom P450 może uczestniczyć w wytwarzaniu zarówno $O_2^{\bullet-}$, jak i H_2O_2 , a tym samym w indukcji stresu oksydacyjnego. Mikrosomalny cykl hydroksylacyjny (Ryc. 7) rozpoczyna się od przyłączenia substratu do cytochromu P450, w wyniku czego powstaje kompleks enzym – substrat [R-H...hem(Fe^{3+})] (reakcja 1). Następnie, w wyniku przyłączenia elektronu (transportowanego, przy udziale reduktazy NADPH-cytochrom P450, z NADPH) żelazo hemowe w kompleksie enzym - substrat ulega redukcji do Fe^{2+} (reakcja 2). W kolejnym etapie dochodzi do przyłączenia cząsteczki tlenu (O_2) na skutek czego powstaje kompleks [R-H...hem(Fe^{2+} - $O_2^{\bullet-}$)] (reakcja 3), który dalej przyłącza kolejny elektron pochodzący z NADPH, i tworzy się kompleks [R-H...hem(Fe^{3+} - O_2^{2-})] (reakcja 4). Następnie dochodzi do uprotonowania tak powstałego kompleksu i wytworzenia formy nadtlencowej [R-H...hem(Fe^{3+} - OOH)] (reakcja 5). Powstały kompleks ulega rozpadowi, tworząc przejściowo rodnik [R-H...hem($Fe^{4+}=O$) $^{\bullet+}$], który jest odpowiednikiem składnika I peroksydazy (reakcja 6). W końcowym etapie dochodzi do powstania kompleksu cytochromu P450 z hydroksylovanym produktem (reakcja 7). Ostatecznie produkt hydroksylacji jest uwalniany i jednocześnie dochodzi do regeneracji natywnego cytochromu P450, który jest zdolny do hydroksylacji kolejnych związków (reakcja 8). Uważa się, że pod wpływem H_2O_2 lub organicznych wodoronadtlenków (np. wodoronadtlenku kumenu) natywny cytochrom P450 może ulegać przekształceniu bezpośrednio do formy nadtlencowej (hem(Fe^{3+} - OOH), przeprowadzając jednocześnie heterolityczną, dwuelektronową redukcję wiązania -O-O- wodoronadtlenków. Proces ten przebiega z pominięciem O_2 i elektronów z NADPH (reakcja 9). Możliwy jest również

homolityczny rozpad wodoronadtlenków, przy jednoczesnym przekształceniu cytochromu P450 do formy $(\text{hem}(\text{Fe}^{4+}=\text{O})^{\bullet+})$ (63,64).



Ryc. 7. Mikrosomalny cykl hydroksylacyjny cytochromu P450. [zmodyfikowano wg Ullrich i wsp. (64)].

1.4.2 Peroksydacja lipidów

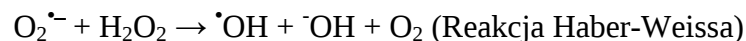
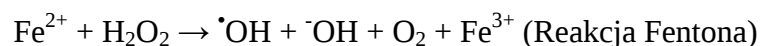
Wiadomo, że jedną z konsekwencji powstawania wolnych rodników w komórkach i tkankach, poza uszkodzeniem białek, węglowodanów i DNA, jest peroksydacja lipidów (65).

Peroksydacja lipidów jest to wolnorodnikowy proces łańcuchowy, który obejmuje utlenienie nienasyconych kwasów tłuszczowych zawartych w fosfolipidach błonowych, prowadząc do powstania nadtlenków lipidowych, które mogą z kolei uszkadzać fosfolipidy błon komórkowych (66,67). Naruszenie integralności błon przez peroksydację lipidów powoduje zmiany jej płynności, zmiany w transporcie jonów i hamowanie procesów metabolicznych w komórce. Uszkodzenia w mitochondriach indukowane przez peroksydację lipidów mogą prowadzić do powstania kolejnych RFT i dalszych uszkodzeń. Peroksydacja lipidów może być spowodowana przez trzy różne procesy: utlenianie indukowane przez wolne rodniki, nieenzymatyczne utlenianie niezależne od wolnych rodników oraz utlenianie enzymatyczne. Podczas tego procesu tworzone są specyficzne produkty, przy czym z drugiej strony specyficzne antyoksydanty są wymagane do hamowania tego procesu (67). Tlen singletowy i ozon utleniają lipidy przez mechanizm nierodnikowy. Natomiast enzymatyczne utlenianie lipidów dotyczy działania takich enzymów jak lipooksygenaza (LOX) i cyklooksygenaza (COX), które utleniają kwas arachidonowy do kwasu hydroperoksyseikozatetraenowego (HPETE), prostaglandyn, prostacyklin, tromboksanu i leukotrienów (68).

Peroksydacja lipidów obejmuje trzy etapy: inicjację, propagację i terminację (Ryc. 8).

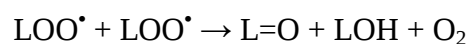
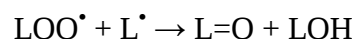
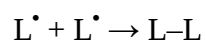
Inicjacja polega na oderwaniu atomu wodoru od wielonienasyconego kwasu tłuszczowego, w wyniku czego powstają wolne rodniki lipidowe. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe zawarte w błonach komórkowych łatwo poddają się atakowi wolnych rodników i tak peroksydacja lipidów może być inicjowana przez rodnik hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$), który może powstawać zarówno w reakcji Fentona, jak i Haber-Weissa, a także przez rodniki: nadtlenkowy ($\text{LOO}\cdot$), alkoksylowy ($\text{LO}\cdot$), alkilowy ($\text{L}\cdot$) i prawdopodobnie $\text{HO}_2\cdot$. Anionorodnik ponadtlenkowy i tlenek azotu nie są na tyle reaktywne, aby inicjować peroksydację lipidów, ale mogą one reagować ze sobą tworząc nadtlenoazotyn, który może inicjować ten proces.

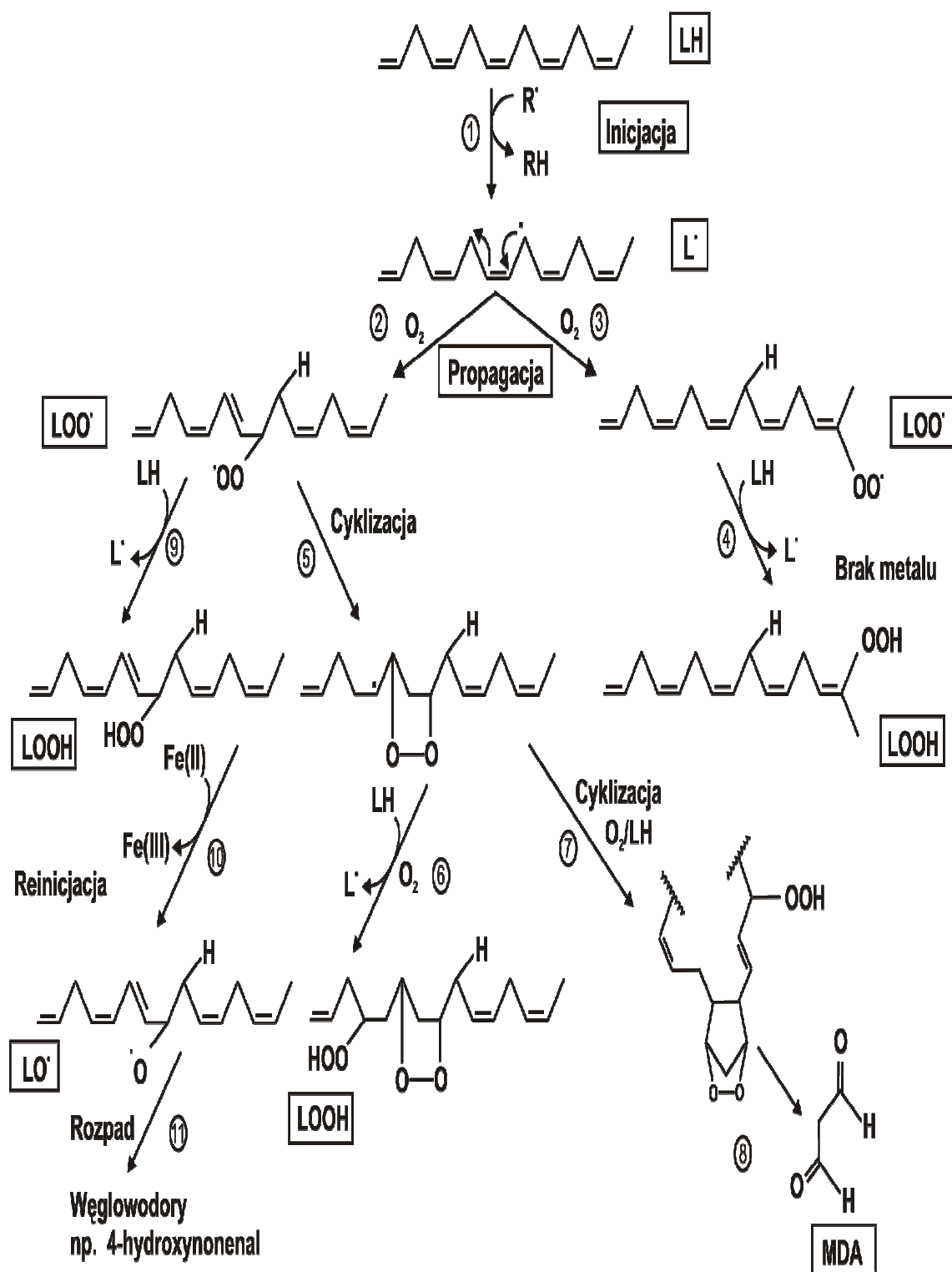
Rodniki hydroksylowe mogą powstawać w reakcji nadtlenu wodoru z jonem Fe^{2+} (reakcja Fentona) lub z $\text{O}_2^{\cdot-}$ (reakcja Haber-Weissa) (67).



W procesie propagacji, powstałe w trakcie inicjacji, wolne rodniki alkilowe ($\text{L}^\cdot$) reagują z cząsteczką tlenu tworząc rodniki nadtlenu ($\text{LOO}^\cdot$) (reakcja 2 i 3). Jeżeli rodnik nadtlenu znajduje się przy jednym z końcowych wiązań podwójnych w cząsteczce lipidu to następnie ulega on redukcji do wodoronadtlenku, który w nieobecności jonów metali jest względnie stabilny (reakcja 4). W przypadku, gdy wiązanie podwójne znajduje się wewnątrz cząsteczki lipidu, może on ulegać cyklizacji tworząc cykliczny rodnik nadtlenu (reakcja 5). Powstały rodnik nadtlenu może ulegać redukcji do wodoronadtlenku (reakcja 6). Rodniki nadtlenu zlokalizowane wewnątrz cząsteczki lipidu mogą poza cyklizacją (reakcja 5), również odrywać atomy wodoru od sąsiadujących cząsteczek kwasów tłuszczowych, tworząc wodoronadtlenki lipidowe i wolne rodniki lipidowe, które dalej mogą inicjować peroksydację lipidów (reakcja 9). Tak powstałe wodoronadtlenki lipidowe mogą dalej reagować z jonami metali, np. z jonami żelaza, produkując reaktywne rodniki alkoksylowe (reakcja 10), które po rozpadzie (reakcja 11) mogą tworzyć odpowiednie węglowodory. Rodnik nadtlenu (powstały w reakcji 5) może również ulegać ponownej cyklizacji tworząc bicykliczny nadtlenu, który po związaniu cząsteczki tlenu i redukcji przechodzi w endonadtlenek (reakcja 7). Z powstałego w ten sposób endonadtlenku produkowany jest dialdehyd malonowy (reakcja 8) (65).

Ostatnim etapem jest terminacja, czyli zakończenie peroksydacji lipidów na skutek reakcji dwóch rodników alkilowych, alkoksylowych lub nadtlenu (67).





Ryc. 8. Peroksydacja lipidów. R' - wolne rodniki, np. NO' , LOO' , $\cdot OH$; L' - rodnik lipidowy; LO' - rodnik alkoksylowy; LOO' - rodnik nadtlenkowy; MDA – dialdehyd malonowy. Objasnienia w tekście. [zmodyfikowano wg Valko i wsp. (65)].

1.4.3 Mechanizmy chroniące komórki przed stresem oksydacyjnym

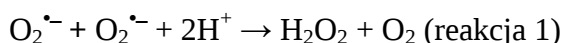
Pierwsza linia obrony przeciw RFT obejmuje białka wiążące jony metali i zapobiega w ten sposób powstawaniu reaktywnych form tlenu. Enzymatyczne i nieenzymatyczne mechanizmy neutralizacji wolnych rodników stanowią drugą linię obrony. Natomiast trzecia linia obrony dotyczy likwidowania niebezpiecznych skutków reakcji wolnych rodników z DNA, które podlegają intensywnej naprawie przez enzymy naprawcze.

Jak już wspomniano pierwszą linią obrony zapobiegającą powstawaniu RFT są białka, które wiążą jony metali grup przejściowych, dzięki czemu jony te nie katalizują reakcji Fentona, w wyniku której powstaje rodnik hydroksylowy. Wśród tych białek możemy wyróżnić: białka wiążące żelazo (ferrytynę, transferynę i laktoferynę), ferredoksynę, mioglobinę, hemoglobinę, cytochromy a, b i c oraz enzymy, takie jak: ferrochelataza, cytochrom P450 i oksydaza ksantyny, ceruloplazmina - wiążąca jony miedzi, metalotioneina - wiążąca różne jony metali oraz albuminy (69).

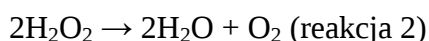
Druga linia obrony obejmuje dwa mechanizmy chroniące przed wolnymi rodnikami, a mianowicie enzymatyczne i nieenzymatyczne.

Do głównych enzymów uczestniczących w tym procesie należą:

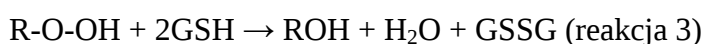
- dysmutaza nadadtlenkowa (SOD), katalizująca reakcję dysmutacji anionorodnika nadadtlenkowego do nadttlenku wodoru (reakcja 1):



- katalazy, rozkładające nadttlenek wodoru do wody i tlenu cząsteczkowego (reakcja 2):

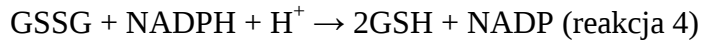


- peroksydazy glutationowe, rozkładające zarówno nadttlenek wodoru, jak i wodoronadtlenki lipidowe z wykorzystaniem zredukowanych form glutationu (reakcja 3):



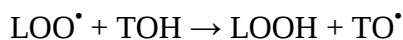
- S-transferazy glutationowe, katalizują reakcję połączenia glutationu ze związkami takimi jak wodoronadtlenki lipidowe, czy ksenobiotyki, blokując dalszą aktywację tych związków i tworzenie RFT

- reduktazy glutationowe, które utrzymują prawidłowe stężenie GSH w komórkach, dzięki zdolności do przekształcania GSSH w GSH (reakcja 4)



Nieenzymatyczne drobnocząsteczkowe antyoksydanty wspomagają enzymy antyoksydacyjne w ochronie przed RFT. Do tych związków zalicza się: tokoferole, glutation, kwas askorbinowy, cysteinę, retinoidy, kwas moczowy, karotenoidy, bilirubinę, ubichinol, a także glukozę i pirogronian (70).

α -Tokoferol jest najbardziej efektywnym, naturalnym antyoksydantem o charakterze hydrofobowym, którego antyoksydacyjne działanie polega głównie na ochronie błon komórkowych przed wolnymi rodnikami lipidowymi, a tym samym przed peroksydacją lipidów.



Tokoferol posiada również właściwości wygaszania tlenu singletowego oraz wychwytywania rodników hydroksylowych i ponadtlenkowych. Do skutecznego działania tego antyoksydanta (zwłaszcza w LDL) konieczna jest obecność również innych związków, takich jak koenzym Q, kwas askorbinowy, czy karotenoidy, które uczestniczą w regeneracji tokoferolu. W komórkach występuje wiele tokoferoli, które różnią się długością łańcucha izoprenowego. Wykazano jednak, że α -tokoferol jest najbardziej aktywnym antyoksydantem spośród tokoferoli, ale γ -tokoferol jest znacznie bardziej efektywny w neutralizowaniu reaktywnych form azotu (71,72).

1.4.4 Stres oksydacyjny w patogenezie preeclampsii

Stres oksydacyjny definiuje się jako zaburzoną równowagę między zdolnością komórek do wytwarzania reaktywnych form tlenu, a zdolnością antyoksydantów do ochrony przed oksydacyjnym uszkodzeniem. W związku z tym przyczyną tego destrukcyjnego procesu może być zarówno zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu, jak i zmniejszona wydajność systemów antyoksydacyjnych w komórce.

W wyniku tego procesu dochodzi do uszkodzenia lipidów, białek, węglowodanów i DNA. Nasilony stres oksydacyjny może spowodować śmierć komórki na drodze apoptozy lub nekrozy (66,69,73).

W czasie ciąży stwierdza się zwiększoną aktywność mitochondrialną łożyska i zwiększoną produkcję wolnych rodników. Łožysko produkuje takie RFT jak: $O_2^{\bullet-}$, $NO^{\bullet}$ i nadtlenoazotyn, które wpływają na proliferację i różnicowanie trofoblastu oraz na reaktywność naczyń. Wykazano, że w pierwszym trymestrze ciąży przepływowi krwi do przestrzeni międzykosmkowych towarzyszy zwiększona produkcja RFT. Wszystkie główne systemy antyoksydacyjne są obecne w łożysku, w tym: dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, glutation, peroksydaza glutationu, S-transferaza glutationu, oksydoreduktazy tiolowe/disulfidowe oraz witaminy C i E. Jednak niedostateczna obrona antyoksydacyjna w okresie ciąży zwykle doprowadza do utraty płodu. W trzecim trymestrze ciąży zwiększony stres oksydacyjny jest widoczny w ciążach powikłanych przez cukrzycę, czy preeclampsję i związany jest ze zwiększoną apoptozą trofoblastu i zmianą reaktywności naczyń łożyskowych. U kobiet z PE stwierdza się np. znacząco wyższe poziomy wodoronadtlenków lipidowych w porównaniu z prawidłową ciążą. Z drugiej strony wykazano, że całkowita zdolność antyoksydacyjna łożyska jest zmniejszona w tym zaburzeniu (74).

Dowody na istnienie stresu oksydacyjnego w ciąży obejmują wzrost nadtlenków lipidowych i izoprostanów oraz zmniejszoną ekspresję i aktywność antyoksydantów. Wykazano, że interakcja $NO^{\bullet}$ z $O_2^{\bullet-}$ prowadzi do powstania nadtlenoazotynu, silnego prooksydanta, którego uszkodzający wpływ polega na nitrowaniu reszt tyrozynowych białek oraz nitrowaniu lipidów i tym samym zmianę ich funkcji (74,75). Stres nitratywny będący następstwem stresu oksydacyjnego stwierdza się w preeclampsji i cukrzycy ciężarnych. Stres oksydacyjny indukuje ekspresję białek, takich jak oksygenaza hemowa (OH-1) i białka szoku termicznego (HSP-70), których zwiększone poziomy stwierdzono w PE (76). U kobiet w ciąży o prawidłowym przebiegu stwierdza się zwiększony poziom nadtlenków lipidowych, aktywację leukocytów i zwiększony poziom MDA w osoczu w porównaniu do kobiet nie będących w ciąży. W odpowiedzi na zwiększony stres oksydacyjny dochodzi do wzrostu poziomu antyoksydantów (witaminy E, ceruloplazminy, związków tiolowych w erytrocytach) i zwiększonej zdolności wiązania żelaza w osoczu kobiet będących w ciąży (77,78). Badania dowodzą, że w PE ta równowaga zostaje zaburzona. Liczne doniesienia wskazują, że

poziomy produktów peroksydacji lipidów, takich jak MDA i 8-izoprostany są zwiększone w osoczu i łożyskach kobiet z PE w porównaniu do ciąż prawidłowych (79-82). Z drugiej strony wykazano również zmniejszoną aktywność takich enzymów jak dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationu, a także stwierdzono obniżoną całkowitą zdolność antyoksydacyjną osocza w PE (83-85). Stwierdzono również, że istnieje zależność pomiędzy elementami zespołu metabolicznego, takimi jak zwiększony poziom triglicerydów i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (FFA) w surowicy, oporność na insulinę i upośledzona tolerancja glukozy, a przebiegiem PE. FFA wspierają dysfunkcję endotelialną służąc jako substraty do wytwarzania peroksydów lipidowych, których poziom jest znacząco zwiększony w PE, które z kolei wpływają na metabolizm tłuszczów, zwiększając poziom utlenionych LDL (oxLDL). oxLDL uszkodzają śródbłonek naczyń i przyczyniają się do rozwoju zmian miażdżycowych (nasilenia aterogenezy) w PE (86,87).

W PE stwierdza się również zwiększoną ekspresję HIF-1 α (czynnika indukowanego przez hipoksję). HIF1 α stymuluje ekspresję transformującego czynnika wzrostowego (TGF- β 3), który jest silnym inhibitorem wczesnego różnicowania trofoblastu (54). Spadek łożyskowej perfuzji stwarza warunki naprzemiennej hipoksji/reoksygenacji, który to stan sprzyja uszkodzeniu oksydacyjnemu. Chroniczna hipoksja zwiększa także stres nitrozylowy. Hipoksja zwiększa również aktywność oksydazy ksantynowej, która przyczynia się do generacji RFT. Wszystkie te zmiany, łącznie z nasiloną produkcją ONOO⁻, przyczyniają się do zwiększonego uwalniania RFT z łożyska do krążenia matki i wspierają dysfunkcję endotelium u matki (54).

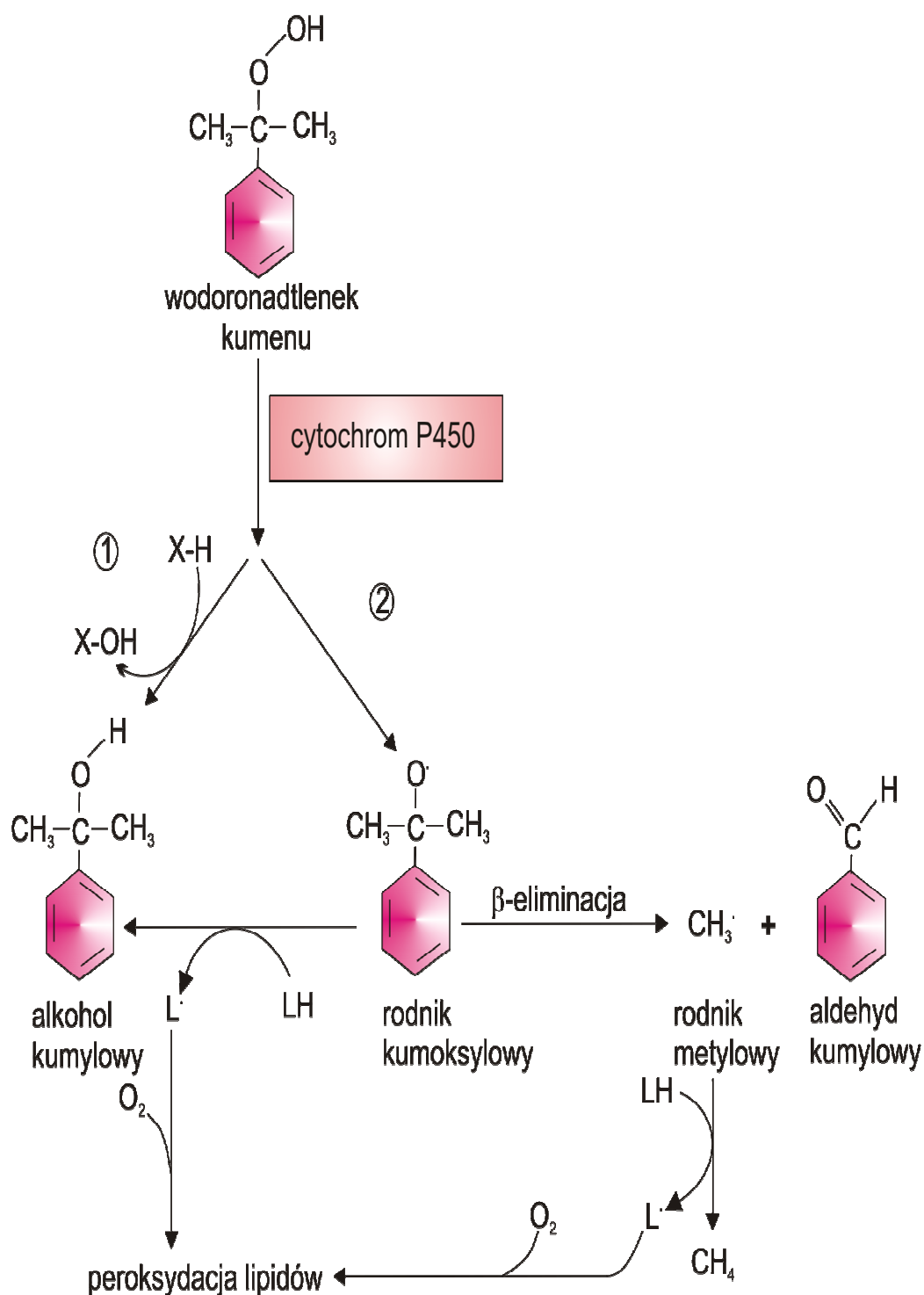
Rola stresu oksydacyjnego w patogenezie PE nie została jeszcze do końca zbadana, zwłaszcza w kontekście biosyntezy estrogenów, potencjalnej roli aromatazy i związanego z tym metabolizmu wodoronadtlenków lipidowych. W związku z tym wydaje się ciekawe, czy niski poziom estrogenów spowodowany hamowaniem aktywności aromatazy pod wpływem wysokich poziomów wodoronadtlenków lipidowych znajdujących w łożyskach preeclamptycznych, może odgrywać rolę w tym schorzeniu.

1.4.5 Metabolizm wodoronadtlenku kumenu – udział cytochromu P450

Wodoronadtlenek kumenu (CumOOH) jest związkiem lipofilnym, który łatwo dostaje się do komórek i nie jest metabolizowany przez katalazę. Lipofilność CumOOH pozwala na jego użycie jako inicjatora peroksydacji lipidów i powoduje, że głównym miejscem jego działania są błony komórkowe, wykazując tym samym działania zbliżone do naturalnych wodoronadtlenków lipidowych (88). Z tego też względu związek ten został zastosowany w obecnej pracy.

Wodoronadtlenek kumenu może, z jednej strony, ulegać redukcji przez peroksydazę glutationu do stabilnych, odpowiednich alkoholi i zostaje pozbawiony w ten sposób cytotoksyczności oraz zdolności indukowania dalszych uszkodzeń oksydacyjnych. Z drugiej strony wiadomo, że zarówno mitochondrialne, jak i mikrosomalne cytochromy P450 mogą metabolizować wodoronadtlenek kumenu (88).

Cytochrom P450 może przeprowadzać zarówno jedno-, jak i dwuelektronową redukcję wodoronadtlenku kumenu. Aktywność peroksygenazowa cytochromu P450, czyli heterolityczna, dwuelektronowa redukcja wiązania -O-O- wodoronadtlenków prowadzi do powstania odpowiednich nietoksycznych alkoholi. Natomiast homolityczna, jednoelektronowa redukcja (aktywność peroksydazowa cyt.P450) tego wiązania prowadzi do powstania rodników alkoksylowych, które z kolei mogą przyczyniać się zarówno do peroksydacji lipidów, jak i uszkodzenia samego cytochromu P450. Homolityczna, jednoelektronowa redukcja wiązania -O-O- wodoronadtlenku doprowadza do utworzenia rodników alkoksylowych. W przypadku wodoronadtlenku kumenu będą to rodniki kumoksyłowe i w dalszym etapie powstające z nich rodniki metylowe (Ryc. 9). Powstające rodniki mogą następnie inicjować peroksydację lipidów przez oderwanie atomu wodoru od lipidu lub uczestniczyć w propagacji tego procesu. Już wcześniejsze badania dowodziły, że cytotoksyczność wodoronadtlenku kumenu i związana z tym peroksydacja lipidów w nieuszkodzonych komórkach zależy od metabolizmu tego wodoronadtlenku przy udziale różnych cytochromów P450 (88,89).



Ryc. 9. Metabolizm wodoronadtlenku kumenu zależny od cytochromu P450. 1) Heterolityczny rozpad wiązania -O-O- wodoronadtlenku kumenu katalizowany przez cytochrom P450 (X-H – substrat [ksenobiotyk] cytochromu P450; LH – nienasycony kwas tłuszczowy), 2) Homolityczny rozpad wiązania -O-O- wodoronadtlenku kumenu katalizowany przez cytochrom P450 [zmodyfikowano wg Anari i wsp. (88) oraz Weiss i wsp. (89)].

1.5 Uzasadnienie celów pracy

Wcześniejsze badania prowadzone w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej wykazały, że w mitochondriach i mikrosomach izolowanych z łożyska ludzkiego zachodzi bardzo wydajnie, zależna od NADPH i jonów żelaza, peroksydacja lipidów błonowych. Za inicjację tego procesu zarówno w mitochondriach, jak i mikrosomach odpowiedzialny jest anionorodnik ponadtlenkowy uwalniany przez cytochrom P450. Wykazano również, że NADPH-zależna peroksydacja lipidów bardzo silnie hamuje syntezę progesteronu w mitochondriach i syntezę estrogenów w mikrosomach łożyska ludzkiego. Stwierdzono, że przyczyną spadku syntezy progesteronu i estrogenów jest degradacja kolejno cytochromu P450_{scc} i cytochromu P450_{arom}, spowodowana przez wolne rodniki lipidowe wytwarzane podczas peroksydacji lipidów. Interesujące było wykazanie, że wyżej wymienione cytochromy P450, uczestniczące w inicjacji NADPH – zależnej peroksydacji lipidów w łożysku ludzkim, ulegają następnie degradacji pod wpływem inicjowanego przez siebie procesu (90-92). Przebadano również wpływ zarówno naturalnie występujących wodoronadtlenków lipidowych, jak i ich organicznego analogu wodoronadtlenku kumenu na syntezę progesteronu w mitochondriach łożyska ludzkiego. Wykazano, że w wyniku metabolizmu wodoronadtlenków kwasu arachidonowego i kumenu dochodzi do wytwarzania wolnych rodników, które prowadzą do destrukcji cytochromu P450_{scc}, a w konsekwencji do hamowania syntezy progesteronu (90).

Do tej pory nie prowadzono jednak badań mających na celu wyjaśnienie mechanizmu, poprzez który stres oksydacyjny prowadzi do zaburzeń metabolizmu hormonów steroidowych w komórkach łożyska. Jako model komórek łożyskowych wybrano wysokoinwazyjne, ludzkie komórki nowotworowe *choriocarcinoma* linii JAR. Komórki te wywodzą się z trofoblastu, tkanki charakterystycznej dla łożyska, i obok wielu podobieństw do komórek trofoblastu, charakteryzują się one m.in. bardzo wydajną syntezą hormonów steroidowych, w tym estrogenów. Stres oksydacyjny w tych komórkach wywoływano dodaniem organicznego wodoronadtlenku kumenu, który łatwo penetruje błonę komórkową, generuje specyficzne wolne rodniki i inicjuje peroksydację lipidów błonowych.

2. CEL PRACY

- Zbadanie cytotoksycznego wpływu organicznego analogu wodoronadtlenków lipidowych, jakim jest wodoronadtlenek kumenu, na komórki JAR *choriocarcinoma*.
- Ocena nasilenia stresu oksydacyjnego indukowanego przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR.
- Ocena wpływu wodoronadtlenku kumenu na aktywność aromatazy, węzłowego enzymu syntezy estrogenów, w komórkach JAR *choriocarcinoma*.
- Zbadanie wpływu inhibitorów cytochromu P450, antyoksydantów i chelatorów żelaza na aktywność aromatazy modulowaną przez wodoronadtlenek kumenu.
- Wyjaśnienie mechanizmu wpływu stresu oksydacyjnego indukowanego przez wodoronadtlenek kumenu na proces syntezy estrogenów w łożysku ludzkim.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Odczynniki

Hodowla komórkowa:

Odczynniki (Sigma - Aldrich, USA):

RPMI-1640 - podłoże do hodowli komórek JAR,

Glutamina,

NaHCO₃ - wodorowęglan sodu

Glukoza,

HEPES - kwas N-(2-hydroksyetylo)-piperazyno- N'-etanosulfonowy,

Pirogronian sodu,

Penicylina + streptomycyna,

Trypsyna + EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy),

PBS - bufor potasowo-fosforanowy (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*)

FBS - inaktywowana bydlęca surowica płodowa (Gibco, USA)

Sprzęt (Sarstedt):

Płytki do hodowli komórkowych 21 cm², 58 cm² i 152 cm²,

Płytki do doświadczeń sześciostudzienkowe (6 x 9,5 cm²),

Probówki plastikowe 15 ml i 50 ml,

Pipety plastikowe 2 ml i 10 ml

Pozostałe odczynniki:

CumOOH - wodoronadtlenek kumenu (Sigma-Aldrich, USA)

H₂DCFDA - 2',7'- diocetan dichlorofluoresceiny (Molecular Probes, USA)

HCHO - formaldehyd (POCH, Polska)

Inhibitory cytochromu P450:

- Ketokonazol (Research Biomedicals International, USA)
- SKF525A - Proadifen (Sigma-Aldrich, USA)
- α-Naftoflawon (ICN Biomedicals, USA)

BHT - butylowany hydroksytoluen (Sigma-Aldrich, USA)

α -Tokoferol (Sigma-Aldrich, USA)
Desferoksamina (Sigma-Aldrich, USA)
NADH – zredukowany dinukleotyd nikotynamidodeninowy (Sigma-Aldrich, USA)
Pirogronian sodu (POCH, Polska)
Pirogronian sodu (Sigma-Aldrich, USA)
Tris - tris(hydroksymetylo)metan (Sigma-Aldrich, USA)
[1 β -H³] androst-4-ene-3,17-dion (Perkin Elmer, USA)
Węgiel aktywowany (Sigma-Aldrich, USA)
Coomassie Brilliant Blue G-250 (POCH, Polska)
H₃PO₄ - kwas ortofosforowy (Sigma-Aldrich, USA)
Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA)
NaOH - wodorotlenek sodu (POCH, Polska)
HCl - kwas solny (POCH, Polska)
TCA - kwas trójchlorooctowy (Sigma-Aldrich, USA)
TBA - kwas 2-tiobarbiturowy (Sigma-Aldrich, USA)
Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ – Amonu żelaza (II) siarczan (POCH, Polska)
KSCN - rodanek potasu (POCH, Polska)
HClO₄ - kwas nadchlorowy (POCH, Polska)
K₃PO₄ - fosforan (V) potasu (POCH, Polska)

3.2 Hodowla komórek JAR *choriocarcinoma*

Komórki JAR *choriocarcinoma* otrzymano z American Type Tissue Collection (ATCC). Komórki hodowano w 37°C w atmosferze 5 % CO₂ na płytkach 21 cm², 58 cm² i 152 cm² w odpowiedniej objętości podłoża hodowlanego. Jako podłoże hodowlane wykorzystano RPMI-1640 z 2 mM L-glutaminą i 1,5 g/L NaHCO₃. Podłoże uzupełniono dodatkowo następującymi odczynnikami: 4,5 g/L glukozy, 10 mM HEPES, 1 mM pirogronian sodu, 10 % bydlęca surowica płodowa (FBS) oraz 100 IU/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny. Kiedy komórki osiągały 80 - 100 % konfluencji były trypsynizowane przy użyciu 0,05 % trypsyny i 0,03 % EDTA w PBS. Następnie komórki odwirowywano przez 3 min przy 1500 obr/min, po czym usuwano supernatant i zawieszano komórki w świeżym podłożu hodowlanym. Do eksperymentu komórki hodowano najczęściej na 6-studzienkowych płytkach (6 x 9,5 cm²) w gęstości około

$2,5-3,5 \times 10^5$. Medium było wymieniane na 24 h przed eksperymentem na podłoże wolne od surowicy.

3.3 Ocena cytotoksyczności indukowanej przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma* spektrofotometryczną metodą oznaczania aktywności dehydrogenazy mleczanowej

Dehydrogenaza mleczanowa jest enzymem cytozolowym, którego wzrost aktywności w środowisku pozakomórkowym jest parametrem dowodzącym martwicy komórek lub zwiększonej przepuszczalności błon komórkowych. Aktywność LDH została zmierzona metodą Gallo i wsp. (93) z niewielkimi modyfikacjami. Aktywność enzymu zmierzono zarówno w medium, jak i w całkowitej objętości próby (lizat komórkowy + medium). Komórki lizowano przy użyciu 1 % Tritonu X-100. Próby badane mierzone w temperaturze 37°C, w środowisku zawierającym: 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM pirogronian sodu i 0,15 mM NADH. Procent uwolnionego LDH został określony przez pomiar aktywności LDH obecnego w medium w stosunku do całkowitej sumy aktywności LDH w medium i lizacie komórkowym. Miara aktywności LDH był spadek absorbancji NADH mierzony przy długości fali 340 nm z zastosowaniem spektrofotometru DU-68 firmy Beckman.

3.4 Wpływ inhibitorów cytochromu P450 (α -naftoflawon, ketokonazol, SKF525A), antyoksydantów (α -tokoferol, BHT) i desferoksaminy na cytotoksyczność indukowaną przez CumOOH w komórkach JAR *choriocarcinoma*

Odpowiednie stężenia inhibitorów cytochromu P450 zostały rozpuszczone w etanolu (końcowe stężenie etanolu nie przekraczało 0,5 %). Komórki do eksperymentu były hodowane na płytkach 6-studzienkowych, przy czym do eksperymentu wykorzystywano około $2,5 \times 10^5 - 3,5 \times 10^5$ komórek na próbę. 24 h przed eksperymentem usuwano podłoże hodowlane, komórki przemywano PBS i dalszą procedurę prowadzono w podłożu niezawierającym FBS. Komórki JAR preinkubowano w medium zawierającym inhibitory cytochromu P450 (przez 15 min) lub antyoksydanty (α -tokoferol przez 24 h, BHT przez 1 h) lub desferoksaminę (przez 1 h). Następnie

przeprowadzono 6 h inkubacji ze 100 μ M CumOOH. Po tym czasie mierzono aktywność LDH w medium i lizacie komórkowym jak opisano wyżej.

3.5 Pomiar stresu oksydacyjnego indukowanego przez wodoronadtlenek kumenu (CumOOH) w komórkach JAR *choriocarcinoma* metodą cytometrii przepływowej

Do pomiaru stresu oksydacyjnego metodą cytometrii przepływowej wykorzystano barwnik fluorescencyjny H₂DCFDA (zredukowany 2',7'-diocetan dichlorofluoresceiny), który we wnętrzu komórki ulega hydrolizie do H₂DCF, a następnie utlenieniu przez reaktywne formy tlenu, takie jak: H₂O₂, organiczne wodoronadtlenki, wodoronadtlenki lipidowe, rodniki nadtlenkowe i alkoksylowe, tlenek azotu oraz nadtlenoazotyn, w wyniku czego powstaje dichlorofluoresceina (DCF) (94-96). Intensywność fluorescencji powstającej dichlorofluoresceiny jest miarą nasilenia wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego. Komórki do eksperymentu były hodowane na płytkach 21 cm². Komórki JAR preinkubowano z inhibitorami cytochromu P450 przez 15 min, z α -tokoferolem przez 24 h oraz z desferoksaminą i BHT przez 1 h. 20 μ M H₂DCFDA był dodawany do komórek na 30 min przed dodaniem CumOOH, po czym dodawano 100 μ M CumOOH i ponownie przeprowadzano 30 - minutową inkubację. Po tym czasie, usuwano podłoże, komórki przemywano PBS, trypsynizowano i zawieszano w PBS. Następnie utrwalano komórki w 8 % formaldehydzie w stosunku 1:1 z PBS. W tak przygotowanych próbach mierzono fluorescencję DCF, będącą miarą stresu oksydacyjnego, przy użyciu cytometru przepływowego, który został udostępniony przez Katedrę Histologii i Immunologii AMG.

3.6 Oznaczanie stężenia produktów peroksydacji lipidów z kwasem tiobarbiturowym pod wpływem wodoronadtlenku kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*

Produkty peroksydacji lipidów oznaczono metodą spektrofotometryczną przez pomiar poziomu związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) (97). Komórki hodowano na płytkach 58 cm². Po 1 h inkubacji ze 100 μ M CumOOH

strypsynizowane i przepłukane PBS komórki użyto do badania. Następnie zarówno do próby kontrolnej, jak i próby badanej dodawano 2,25 ml mieszaniny zawierającej 40 ml 40 % TCA, 20 ml 5 N HCl i 140 ml H₂O. W kolejnym etapie do wszystkich prób dodano 2 % kwas tiobarbiturowy i próbki gotowano we wrzącej wodzie przez 10 min. Po zagotowaniu i ostudzeniu próby odwirowano przy 3000 obr/min przez 10 min, po czym zmierzono absorbancję otrzymanego w ten sposób supernatantu przy długości fali 535 nm używając spektrofotometru DU-68 firmy Beckman. Poziom MDA obliczono ze współczynnika absorbancji molowej równego $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.7 Pomiar metabolizmu wodoronadtlenku kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*

Komórki JAR hodowano na płytkach 152 cm², a następnie po osiągnięciu 80-90 % konfluencji, usuwano podłoże, komórki przemywano PBS i trypsynizowano. Ilość komórek w poszczególnych próbach eksperymentalnych wahała się w granicach 1×10^6 - $1,2 \times 10^6$. Następnie komórki były inkubowane ze 100 µM CumOOH, przy czym dokonywano pomiaru zawartości wodoronadtlenku kumenu w poszczególnych punktach czasowych (0 - 30 min). Po inkubacji do komórek dodawano 200 µl 40 % TCA, po czym całość odwirowywano (1500 obr/min przez 3 min). Do badania pobierano 1 ml próby, po czym dodawano 200 µl 10 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ i 100 µl 2,5 M KSCN. Absorbancję, powstającego pod wpływem wodoronadtlenku kumenu, czerwonego kompleksu tiocyjanianu żelaza (III), mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 490 nm (88). Stężenia CumOOH odczytano z krzywej wzorcowej, którą przygotowano używając znanych stężeń CumOOH. Do badania wykorzystano spektrofotometr DU-68 firmy Beckman.

3.8 Ocena wpływu wodoronadtlenku kumenu na aktywność aromatazy w komórkach JAR *choriocarcinoma*

Komórki do eksperymentu hodowano na płytkach sześciostudzienkowych do momentu, gdy osiągały one około 80 % konfluencji. Medium było wymieniane na 24 h przed eksperymentem na podłoże wolne od surowicy. Komórki JAR były traktowane przez 1 h 100 µM CumOOH, po czym podłoże usuwano i mierzono aktywność aromatazy. Pomiaru aktywności aromatazy dokonano metodą uwalniania wody

trytowanej opisaną przez Drenth i wsp. (98) z pewnymi modyfikacjami. Tworzenie $^3\text{H}_2\text{O}$ w komórkach JAR *choriocarcinoma* wykazywało liniowość przynajmniej przez 4 h, więc do dalszych badań wybrano czas inkubacji wynoszący 2 h. Po godzinnej inkubacji z CumOOH medium wymieniano na świeże, pozbawione FBS, ale zawierające 100 nM [$1\beta\text{-H}^3$] androst-4-ene-3,17-dion o radioaktywności specyficznej 500 dpm/pmol i przeprowadzano 2 h inkubację. Aktywność aromatazy oceniano przez pomiar $^3\text{H}_2\text{O}$, która tworzy się jako wynik aromatyzacji substratu [$1\beta\text{-H}^3$] androst-4-ene-3,17-dionu. Po 2 h inkubacji w 37°C , w atmosferze 5 % CO_2 z każdej studzienki pobierano 1 ml próby do oznaczenia aktywności aromatazy. Reakcję przerywano 0,2 ml 40 % TCA, próby odwirowywano przy 1500 obr/min. Następnie do 1ml supernatantu dodawano 0,5 ml 5 % zawiesiny węgla aktywowanego celem związania frakcji sterydowej. Mieszaninę wytrząsano przez 30 min i następnie odwirowywano (3000 obr/min przez 10 min), po czym pobierano 0,8 ml supernatantu i mieszano z płynem scyntylicyjnym w stosunku 1:5. Do pomiaru radioaktywności wykorzystano licznik scyntylicyjny Beckman LS 6000 IC. Zmierzone za pomocą licznika scyntylicyjnego wartości w dpm, przeliczano następnie na pmol, wyrażając aktywność aromatazy w pmol/h/mg białka.

3.9 Wpływ inhibitorów cytochromu P450 (α -naftoflawon, ketokonazol, SKF525A) na aktywność aromatazy w komórkach JAR *choriocarcinoma*

Komórki były hodowane na płytkach sześciostudzienkowych do momentu, gdy osiągały one około 80 % konfluencji. Podobnie jak we wcześniejszych eksperymentach, 24 h przed badaniem usuwano podłoże hodowlane, komórki przemywano PBS i dalszą procedurę prowadzono w podłożu niezawierającym FBS. Inhibitory cytochromu P450 rozpuszczano w etanolu, jak opisano wyżej. Eksperyment mający na celu zbadanie wpływu inhibitorów P450 na aktywność aromatazy polegał na inkubacji komórek JAR w podłożu zawierającym zarówno inhibitory (α -naftoflawon, ketokonazol, SKF525A), jak i [$1\beta\text{-H}^3$] androst-4-ene-3,17-dion. Następnie przeprowadzano 2-godziną inkubację i dalsze postępowanie polegało na oznaczaniu aktywności aromatazy metodą opisaną wyżej.

3.10 Wpływ inhibitorów cytochromu P450 (α -naftoflawon, ketokonazol, SKF525A), antyoksydantów (α -tokoferol, BHT) i desferoksaminy na aktywność aromatazy hamowaną przez CumOOH w komórkach JAR *choriocarcinoma*

Badania przeprowadzano na płytkach 6 x 9,5 cm², przy czym do eksperymentu wykorzystywano około $2,5 \times 10^5$ – $3,5 \times 10^5$ komórek na próbę. Dobę przed eksperymentem usuwano podłoże hodowlane, komórki przemywano PBS i dalszą procedurę prowadzono w podłożu niezawierającym FBS. Komórki preinkubowano z inhibitorami aromatazy: α -naftoflawon, ketokonazol, SKF525A (15 minut) lub z tokoferolem (24 h) lub z BHT (1 h) lub z desferoksaminą (1 h). Następnie przeprowadzono godziną inkubację ze 100 μ M CumOOH. Po tym czasie podłoże usuwano, komórki płukano PBS, a następnie komórki inkubowano przez 2 h w podłożu zawierającym [1β -H³] androst-4 ene-3,17-dione. W dalszym etapie oznaczano aktywność aromatazy, jak opisano wyżej.

3.11 Pomiar stężenia białka metodą Bardford z użyciem barwnika Coomassie Brilliant Blue G-250

Stężenie białka zostało zmierzone metodą Bradford (99). W metodzie tej wykorzystuje się zdolność wiązania białka z barwnikiem jakim jest błękit brylantowy Coomassie G-250. Barwnik ten maksimum absorpcji wykazuje przy długości fali 465 nm, natomiast po związaniu z białkiem maksimum absorpcji przesuwają się do 595 nm. Próby badane mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 595 nm. Stężenie białka w próbach badanych odczytano z przygotowanej wcześniej krzywej wzorcowej z wykorzystaniem albuminy bydlęcej jako standardu.

3.12 Analiza statystyczna

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie z kilku niezależnych eksperymentów, uwzględniając wartości odchylenia standardowego. Wyniki opracowano przy pomocy programu SigmaPlot 2000 i arkusza kalkulacyjnego Microsoft Office Excel 2003.

4. WYNIKI

W obecnej pracy badania zostały przeprowadzone na linii ludzkich komórek JAR pochodzących z kosmówczaka łożyska (*choriocarcinoma*), która stanowi modelową linię trofoblastycznych komórek łożyskowych. Do indukcji stresu oksydacyjnego zastosowano wodoronadtlenek kumenu (CumOOH), powszechnie stosowany jako syntetyczny analog naturalnie powstających w organizmie wodoronadtlenków lipidowych.

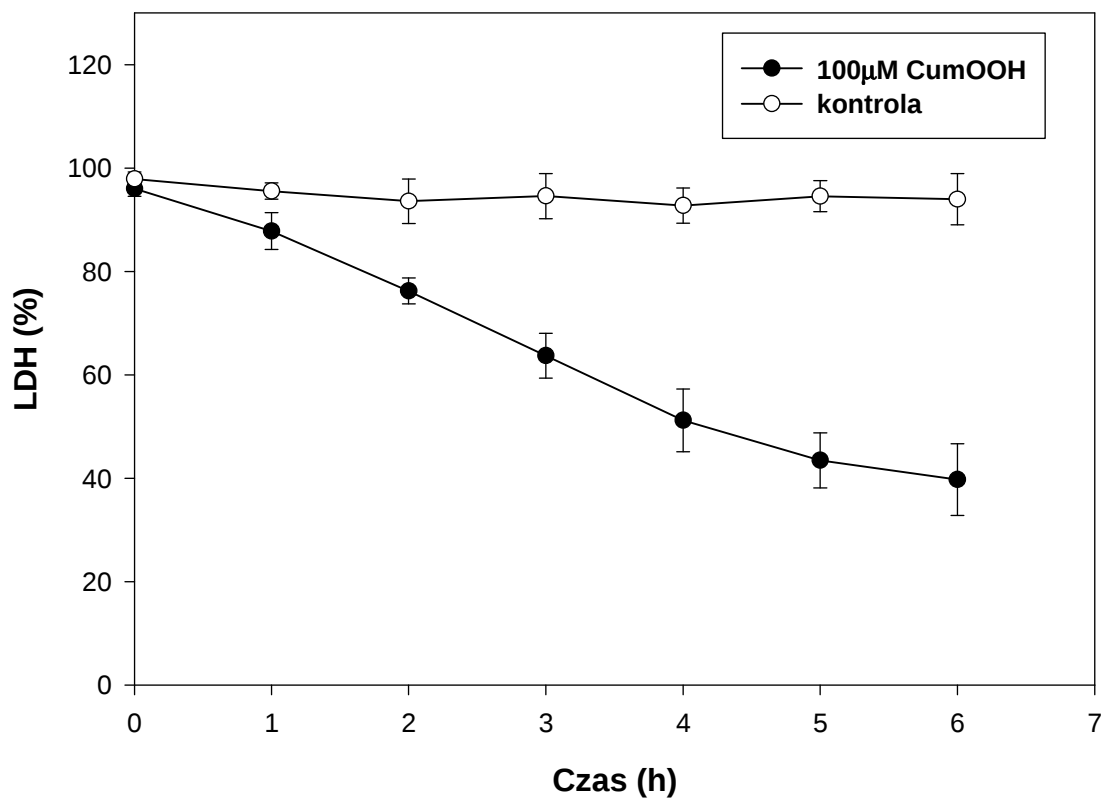
4.1 Wpływ wodoronadtlenku kumenu na przeżywalność komórek JAR *choriocarcinoma*

Przeprowadzone w tej pracy badania skupiły się początkowo na ocenie cytotoksycznego wpływu wodoronadtlenku kumenu na komórki JAR. Pomiaru przeżywalności komórek w obecności wodoronadtlenku kumenu dokonano przez pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Zwiększona aktywność LDH w środowisku pozakomórkowym jest miarą toksyczności badanej substancji (w tym przypadku CumOOH) względem komórek w hodowli.

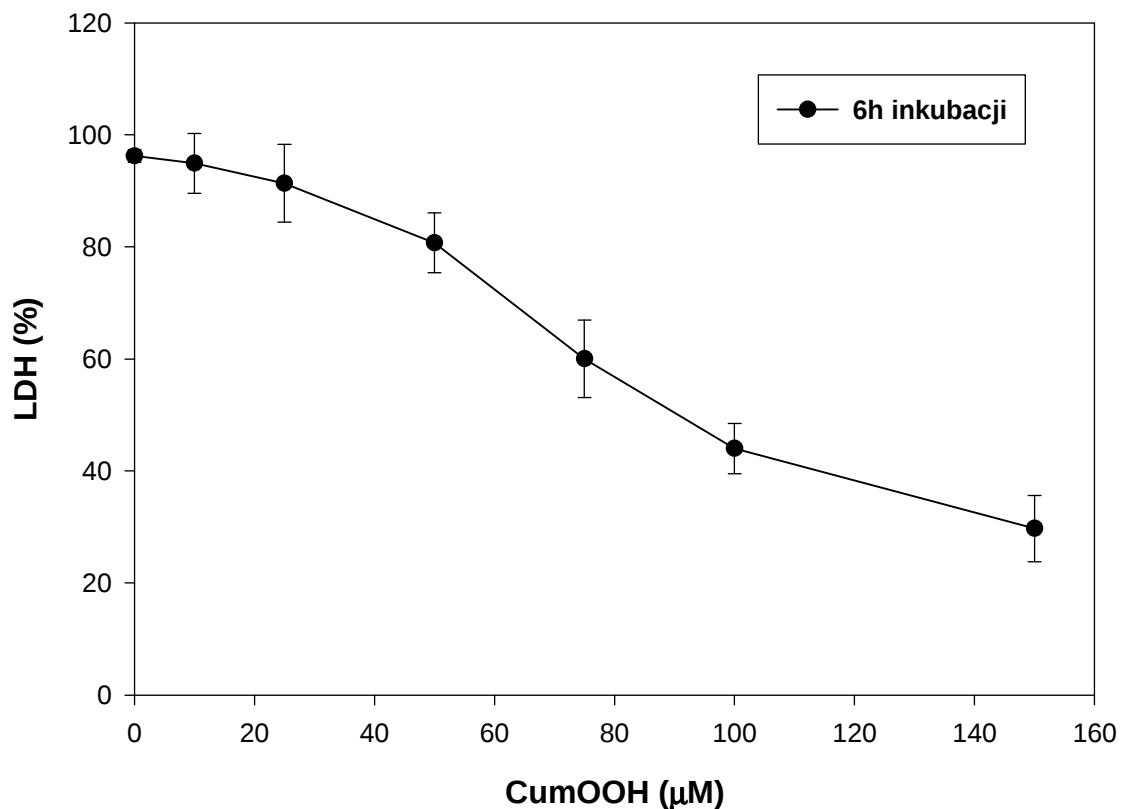
W pierwszym etapie zbadano cytotoksyczny wpływ, literaturowo wybranego, stężenia 100 μ M CumOOH, na komórki JAR w zależności od czasu. Badania te wykazały, że CumOOH wywołuje efekt cytotoksyczny. Po 6 h inkubacji ze 100 μ M wodoronadtlenkiem kumenu (Ryc. 10), stwierdzono silny spadek przeżywalności komórek z wartości 94 % do wartości 40 %. W związku z tym 6-godzinny czas inkubacji został wybrany do dalszych eksperymentów dotyczących oceny cytotoksyczności wodoronadtlenku kumenu w komórkach JAR.

W kolejnym etapie zbadano wpływ różnych stężeń (Ryc. 11) tego wodoronadtlenku na przeżywalność komórek JAR po wybranym 6-godzinnym czasie inkubacji. W miarę wzrostu stężenia CumOOH obserwuje się znaczny spadek żywotności komórek. Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły, że wcześniej wybrane stężenie 100 μ M CumOOH po 6 h inkubacji jest wysoce cytotoksyczne dla komórek JAR *choriocarcinoma*.

Na podstawie uzyskanych wyników w dalszych eksperymentach, dotyczących badania mechanizmu cytotoksyczności wodoronadtlenku kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*, zastosowano 100 μ M CumOOH i 6-godzinny czas inkubacji.



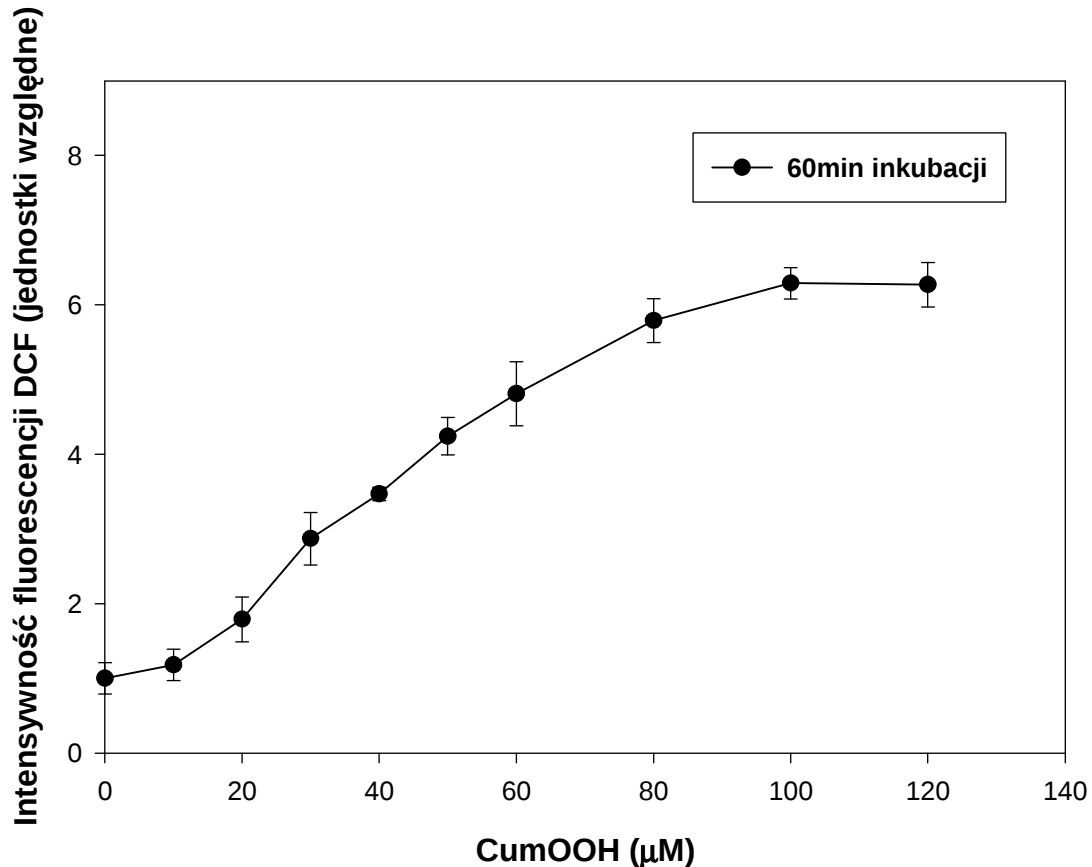
Ryc. 10. Czasowa zależność wpływu wodoronadtlenku kumenu na przeżywalność komórek JAR *choriocarcinoma*. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane przez 6 h bez CumOOH, pomiaru aktywności LDH dokonywano w tych samych punktach czasowych, co próby badane w obecności CumOOH. Wyniki podano w % LDH uwolnionej z komórek, przy czym 100 % żywotności komórek odpowiada 100 % LDH. Warunki doświadczenia jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 5 eksperymentów.



Ryc. 11. Wpływ różnych stężeń wodoronadtlenku kumenu na przeżywalność komórek JAR *choriocarcinoma*. Warunki doświadczenia jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 5 eksperymentów.

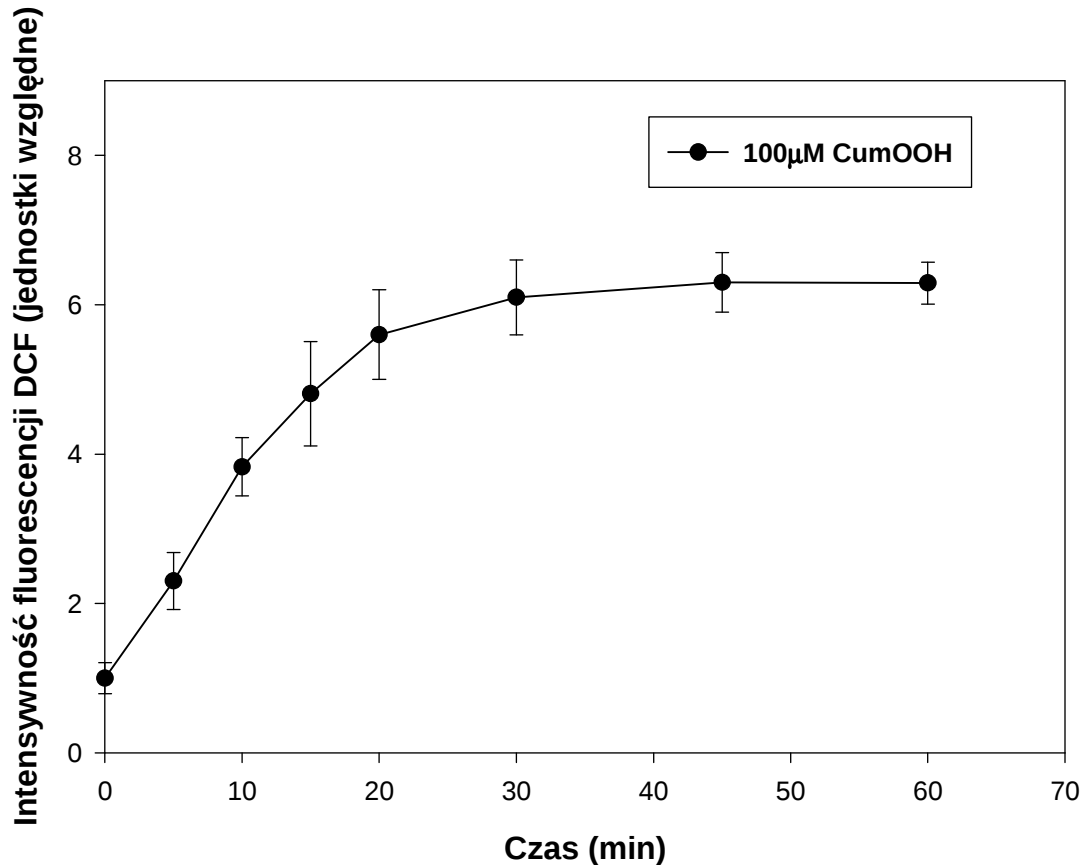
4.2 Pomiar stresu oksydacyjnego indukowanego przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma* metodą cytometrii przepływowej

W celu znalezienia odpowiednich warunków eksperymentu, w których wodoronadtlenek kumenu powoduje największy stres oksydacyjny w komórkach JAR, przeprowadzono godziną inkubację komórek w obecności różnych stężeń CumOOH. Rycina. 12 przedstawia wpływ różnych stężeń wodoronadtlenku kumenu (w zakresie 0-120 μM) na intensywność fluorescencji DCF w komórkach JAR. Wraz ze wzrostem stężenia wodoronadtlenku obserwuje się również wzrost fluorescencji dichlorofluoresceiny (DCF). Maksymalne nasilenie stresu oksydacyjnego uzyskałam przy stężeniu 100 μM , przy czym w wyższych stężeniach CumOOH nie obserwowano zmian intensywności fluorescencji.



Ryc. 12. Wpływ różnych stężeń wodoronadtlenku kumenu na intensywność fluorescencji, będącej miarą stresu oksydacyjnego w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Kontrolę stanowią komórki, które nie były traktowane CumOOH. Intensywność fluorescencji DCF przedstawiono w jednostkach względnych (wartość kontroli przyjęto umownie jako 1; wartości prób badanych przeliczono względem kontroli). Warunki doświadczenia jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 4 eksperymentów.

W kolejnym doświadczeniu zbadano jak kształtuje się stres oksydacyjny pod wpływem 100 μ M CumOOH w zależności od czasu inkubacji (Ryc. 13). Okazało się, że maksymalna fluorescencja DCF pojawia się już przy 30-minutowym czasie inkubacji z wodoronadtlenkiem kumenu i w dłuższym czasie nie ulega zmianie. W związku z tym, do dalszych badań dotyczących oceny intensywności stresu oksydacyjnego indukowanego przez CumOOH w komórkach JAR, wybrano stężenie 100 μ M CumOOH i 60-minutowy czas inkubacji komórek z wodoronadtlenkiem kumenu.

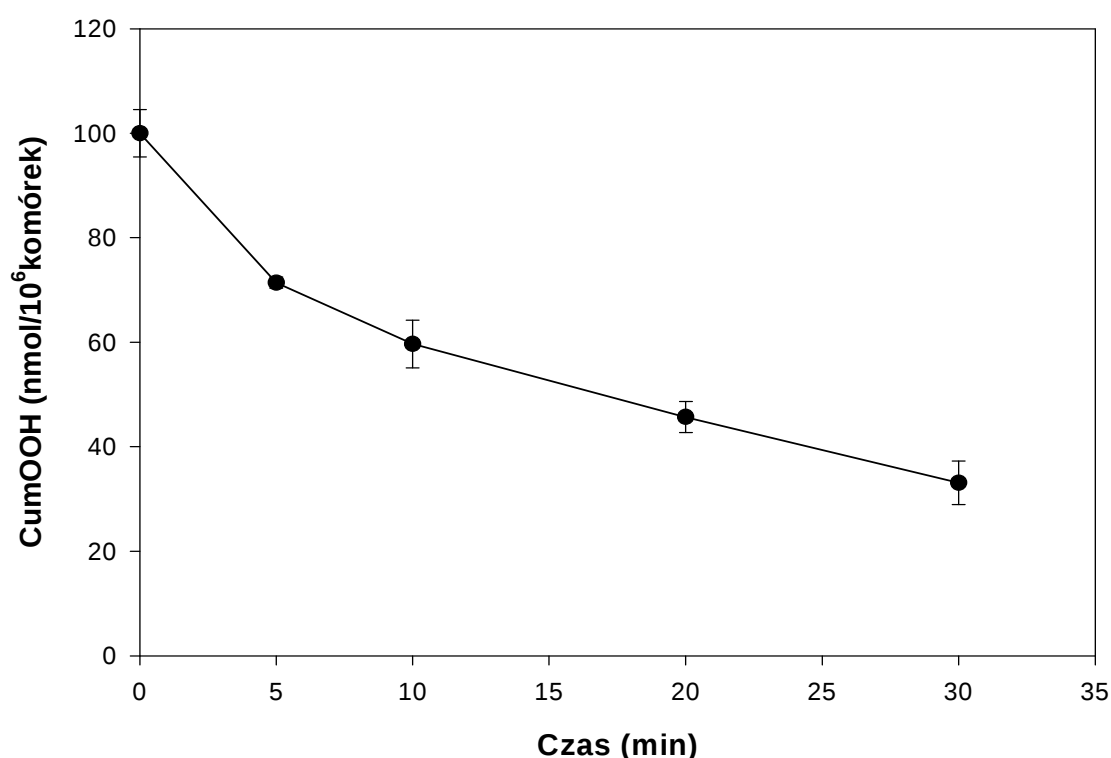


Ryc. 13. Czasowa zależność wpływu 100 μM wodoronadtlenku kumenu na intensywność fluorescencji, będącej miarą stresu oksydacyjnego w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Intensywność fluorescencji DCF przedstawiono w jednostkach względnych (wartość kontroli przyjęto umownie jako 1; wartości prób badanych przeliczono względem kontroli). Warunki doświadczenia jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 4 eksperymentów.

4.3 Metabolizm wodoronadtlenku kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*

Wiadomo, że niekorzystny wpływ wodoronadtlenku kumenu, prowadzący do pojawienia się stresu oksydacyjnego, wynika głównie z działania, powstających na skutek metabolizmu tego wodoronadtlenku, wolnych rodników (88). Zbadano więc szybkość metabolizmu 100 μM CumOOH w komórkach JAR *choriocarcinoma*. W badaniu wykorzystano metodę polegającą na spektrofotometrycznym pomiarze absorbancji czerwonego kompleksu tiocyjanianu żelaza (III) przy długości fali 490 nm, który powstaje na skutek utlenienia tiocyjanianu żelaza (II) przez wodoronadtlenki. Okazało się, że ponad połowa ilości CumOOH, w komórkach JAR *choriocarcinoma*,

jest rozkładana w ciągu 30 min (Ryc. 14). Metabolizm tego wodoronadtlenku jest więc dużo wolniejszy niż np. w hepatocytach szczura, gdzie w podobnych warunkach praktycznie cała ilość wodoronadtlenku jest rozkładana w ciągu 5 min (88). Uzyskane dane wskazują, że w komórkach JAR zachodzi wydajny metabolizm CumOOH. Co więcej przeprowadzone doświadczenia potwierdzają wcześniejsze przypuszczenia, że niekorzystny wpływ tego związku na komórki wynika z oddziaływania produktów jego metabolizmu, jakimi są m.in. wolne rodniki kumoksyłowe i metylowe.

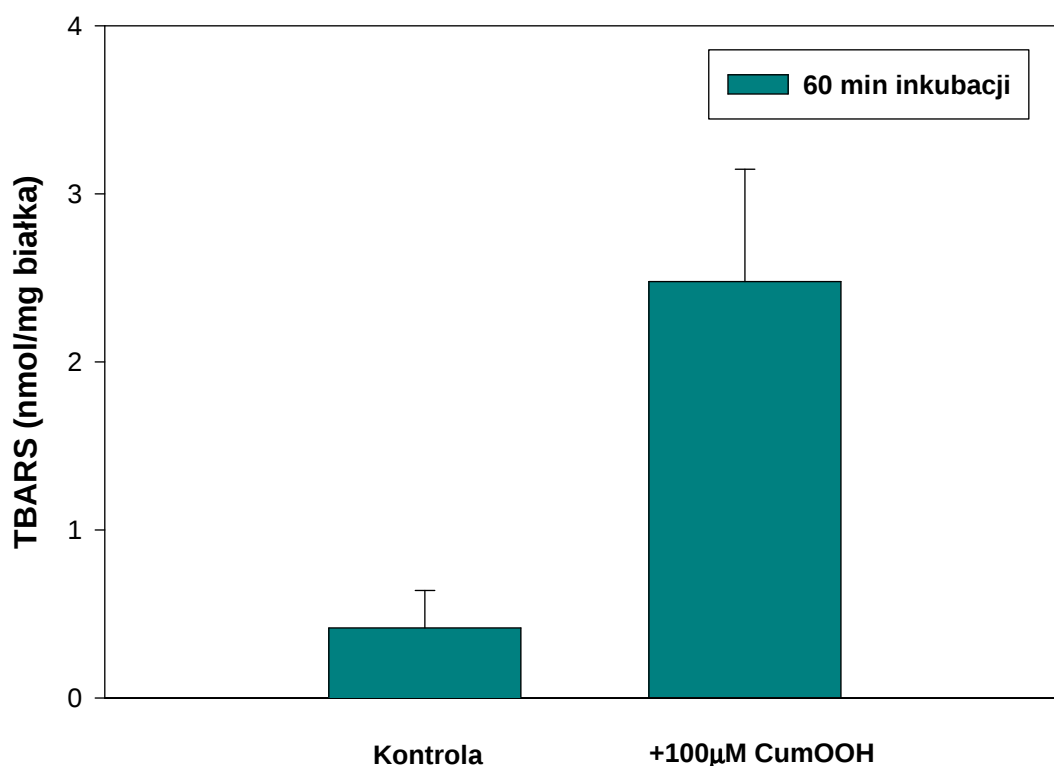


Ryc. 14. Szybkość metabolizmu wodoronadtlenku kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Warunki doświadczenia jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 6 eksperymentów.

4.4 Oznaczanie produktów peroksydacji lipidów (TBARS) powstałych pod wpływem wodoronadtlenku kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*

Proces peroksydacji nienasyconych kwasów tłuszczowych, znajdujących się w błonach biologicznych komórki, zachodzi również w warunkach fizjologicznych, niemniej jednak stan określany jako stres oksydacyjny charakteryzuje się nasileniem

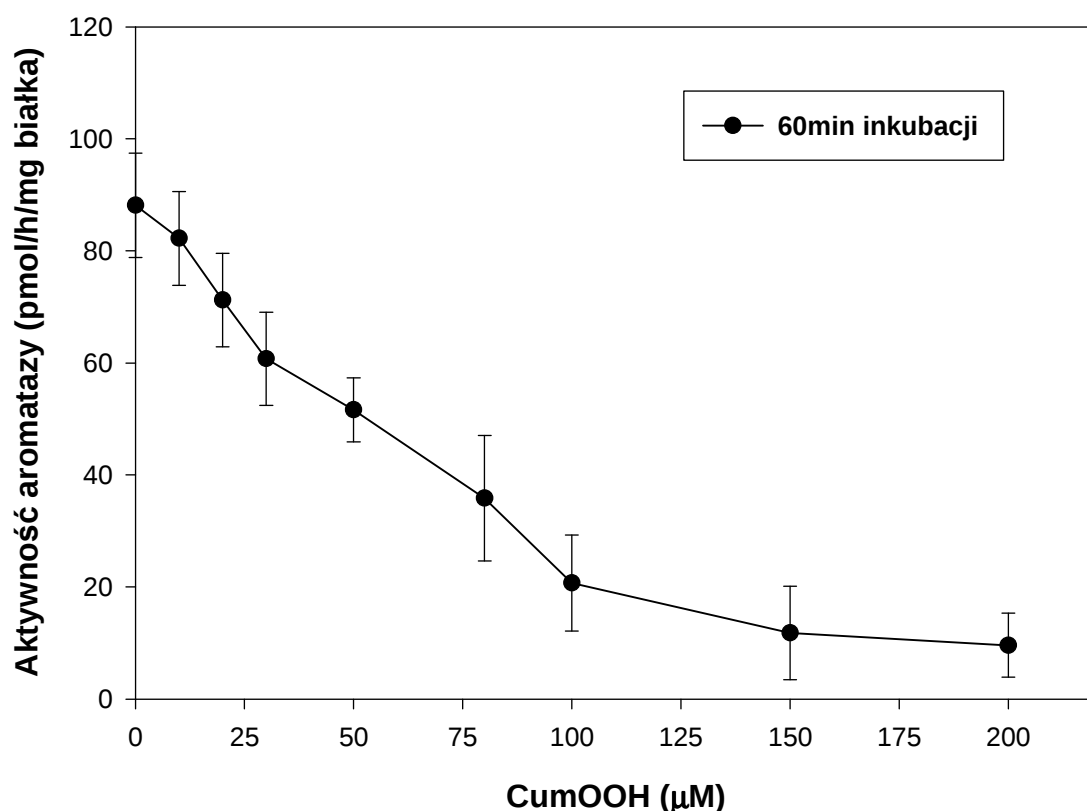
tego procesu. Produkty peroksydacji lipidów są doskonałymi markerami reakcji wolnorodnikowych w organizmie. Badania przeprowadzone przez Klimka i wsp. (90) wykazały, że CumOOH jest zdolny do indukcji peroksydacji lipidów niezależnej od NADPH w mitochondriach łożyska ludzkiego, postanowiono więc oznaczyć poziom produktów peroksydacji lipidów indukowanej przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma* (Ryc. 15). Komórki inkubowano przez godzinę ze 100 μM CumOOH, po czym oznaczono poziom TBARS w sposób, który opisano w Materiałach i Metodach. Godzinna inkubacja z wodoronadtlenkiem doprowadziła do około sześciokrotnego wzrostu peroksydacji lipidów względem kontroli potwierdzając, że jest to jedna z konsekwencji stresu oksydacyjnego indukowanego przez CumOOH w komórkach JAR *choriocarcinoma*.



Ryc. 15. Wpływ 100 μM CumOOH na peroksydację lipidów w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Warunki doświadczenia jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm\text{SD}$ z 6 eksperymentów.

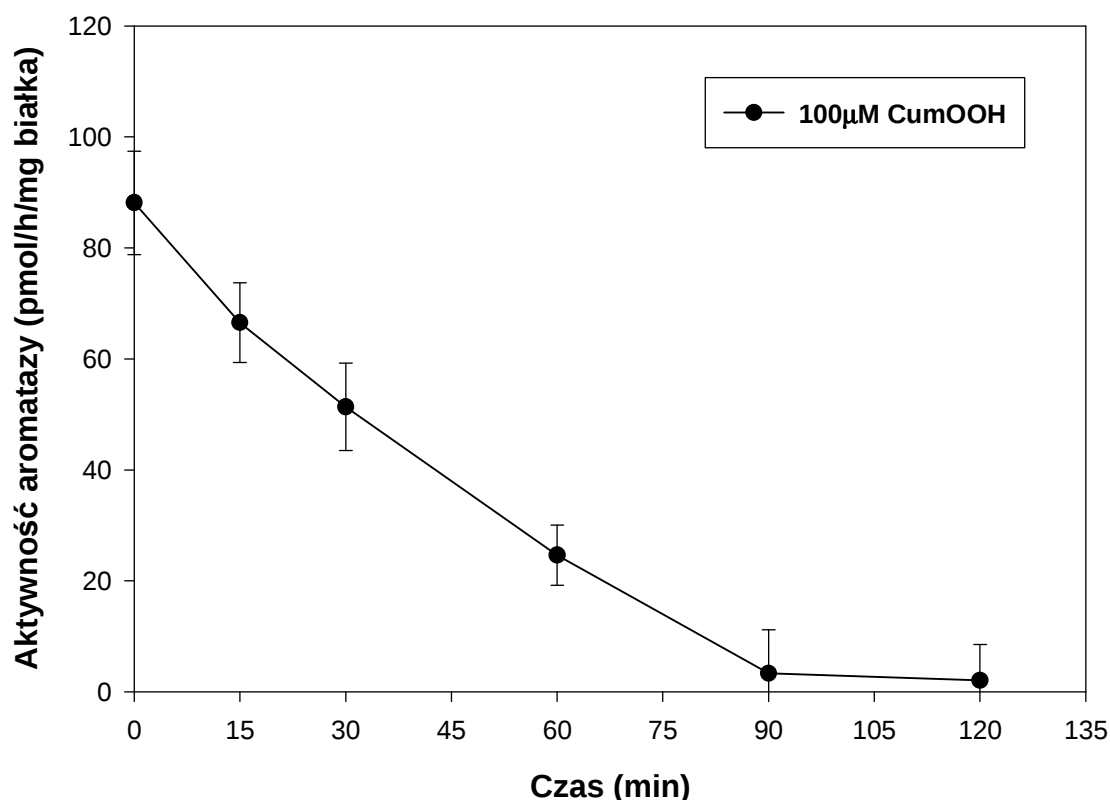
4.5 Wpływ wodoronadtlenku kumenu na aktywność aromatazy w komórkach JAR *choriocarcinoma*

Wiadomo, że wodoronadtlenki mogą być metabolizowane przez cytochrom P450, a z drugiej strony powstające na skutek ich metabolizmu wolne rodniki mogą wpływać destrukcyjnie na cytochrom P450 (89). Co więcej wiadomo, że aromataza jest kompleksem enzymatycznym, w skład którego, poza reduktazą NADPH–cytochrom P450, wchodzi również cytochrom P450_{arom}. W związku z tym oceniono oddziaływanie wodoronadtlenku kumenu na aktywność aromatazy w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Ryc. 16 przedstawia wpływ różnych stężeń wodoronadtlenku kumenu na aktywność aromatazy w komórkach JAR, po godzinnej inkubacji. Aktywność aromatazy w próbach kontrolnych wynosiła $88,13 \pm 4,65$ pmol/h/mg białka. Wraz ze wzrostem stężenia wodoronadtlenku kumenu obserwuje się gwałtowny spadek aktywności aromatazy. W obecności 100 μ M CumOOH aktywność enzymu wynosiła $20,71 \pm 4,27$ pmol/h/mg białka. W wyższych stężeniach obserwowano spadek efektu hamującego aktywność aromatazy.



Ryc. 16. Wpływ różnych stężeń wodoronadtlenku kumenu na aktywność aromatazy w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Warunki doświadczenia jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 6 eksperymentów.

W kolejnym etapie zbadano wpływ czasu inkubacji na aktywność aromatazy w obecności 100 μM wodoronadtlenku kumenu (Ryc. 17). Po 30 min inkubacji ze 100 μM CumOOH zaobserwowano ok. 42 % spadek aktywności enzymu. Natomiast godzinna inkubacja ze stężeniem 100 μM CumOOH powodowała silne, ok. 72 % hamowanie aktywności enzymu, stąd w dalszych eksperymentach w których mierzono aktywność aromatazy używano 100 μM stężenia wodoronadtlenku kumenu, a czas inkubacji wynosił 60 minut.

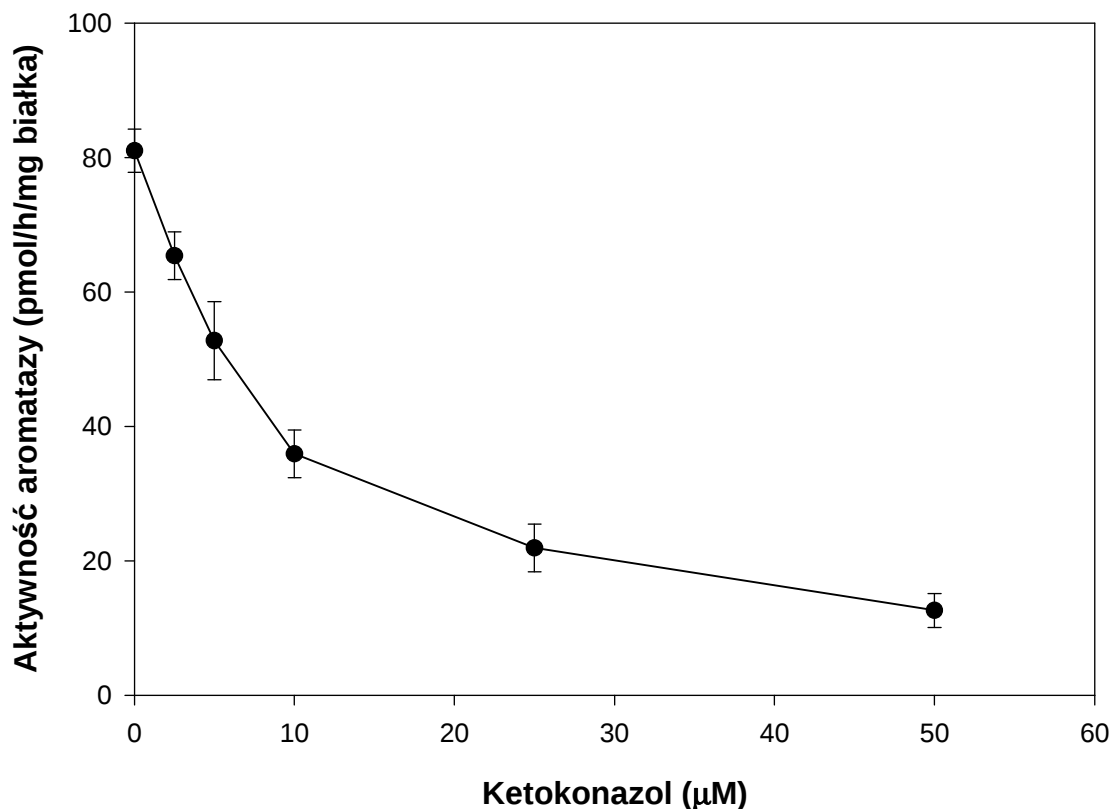


Ryc. 17. Czasowa zależność wpływu wodoronadtlenku kumenu na aktywność aromatazy w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Warunki doświadczenia jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 9 eksperymentów.

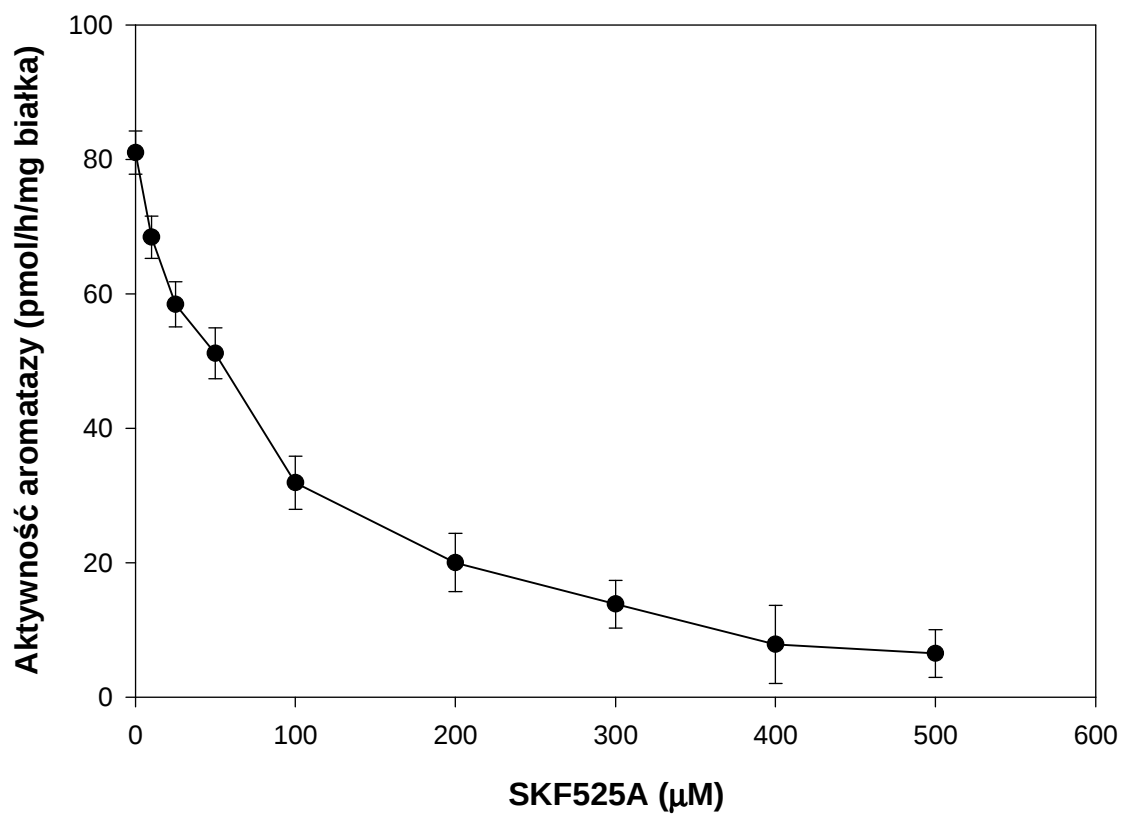
4.6 Wpływ inhibitorów cytochromu P450 (α -naftoflawon, ketokonazol, SKF525A) na aktywność aromatazy w komórkach JAR *choriocarcinoma*

Cytochrom P450 katalizuje homolityczny rozpad wiązania -O-O- wodoronadtlenku kumenu, prowadząc do powstania rodnika kumoksyłowego, który dalej może prowadzić do powstania rodnika metylowego. Powstające w ten sposób wolne rodniki mogą przyczyniać się do nasilenia stresu oksydacyjnego, w tym do inicjacji peroksydacji lipidów, i tym samym do cytotoksyczności tych wodoronadtlenków w komórkach (88,89). Co więcej wykazano, że cytochrom P450_{scc} bierze udział w zależnej od CumOOH peroksydacji lipidów w mitochondriach łożyska ludzkiego (90). Pojawiło się więc przypuszczenie, że cytochrom P450 aromatazy również może uczestniczyć w metabolizmie wodoronadtlenków lipidowych.

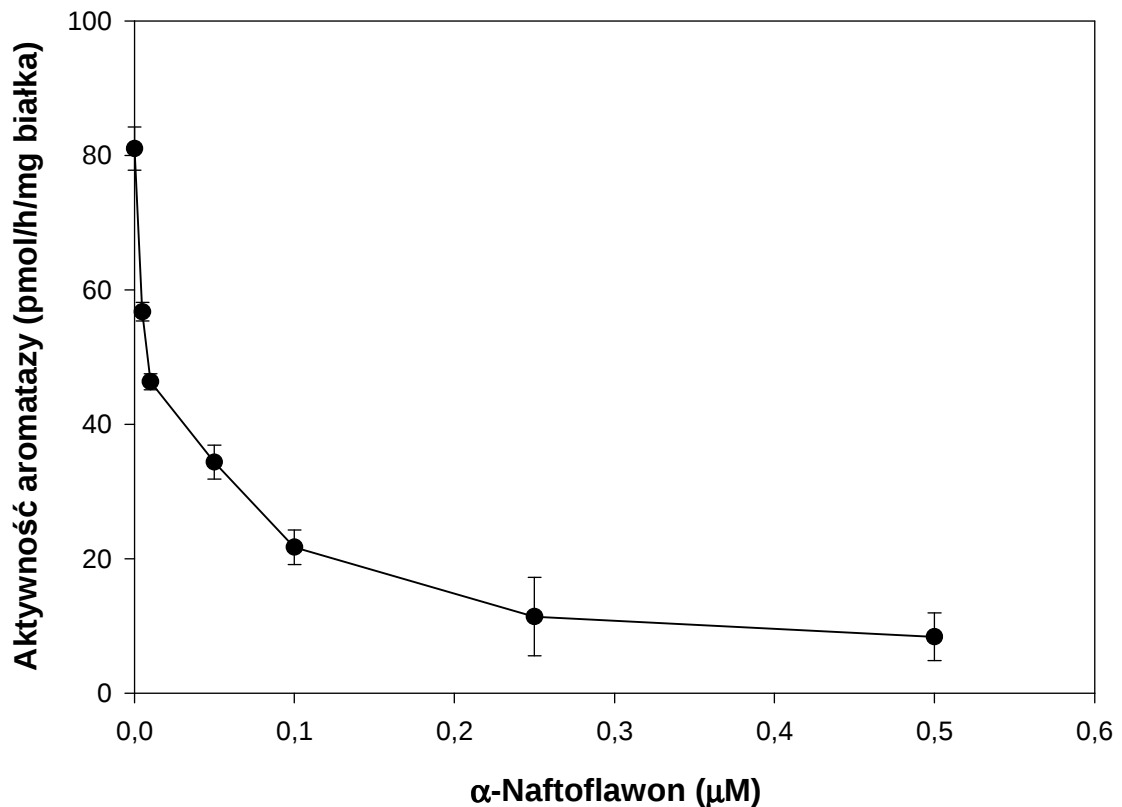
W początkowym etapie zbadano wpływ wybranych inhibitorów cytochromu P450: ketokonazolu (Ryc. 18), SKF525A (Ryc. 19) i α -naftoflawonu (Ryc. 20) na aktywność aromatazy w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Celem sprawdzenia wpływu inhibitorów cytochromu P450 na aktywność aromatazy, zastosowano procedurę jak opisano w punkcie 3.9 w Materiałach i Metodach. Wraz ze wzrostem stężenia wszystkie inhibitory silnie hamowały aktywność aromatazy. Stężenia, w których dochodziło do bardzo silnego hamowania aktywności aromatazy, to odpowiednio: 50 μM ketokonazol ($12,60 \pm 1,26$ pmol/h/mg białka), 100 μM SKF525A ($31,87 \pm 1,96$ pmol/h/mg białka) i 0,5 μM α -naftoflawon ($8,35 \pm 1,77$ pmol/h/mg białka). W związku z tym te stężenia inhibitorów cytochromu P450 zostały wybrane do dalszych badań dotyczących oceny wpływu wodoronadtlenku kumenu na aktywność aromatazy w komórkach JAR *choriocarcinoma*.



Ryc. 18. Wpływ różnych stężeń ketokonazolu na aktywność aromatazy w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Warunki doświadczenia jak podano w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 3 eksperymentów.



Ryc. 19. Wpływ różnych stężeń SKF525A na aktywność aromatazy w komórkach JAR choriocarcinoma. Warunki doświadczenia jak podano w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 3 eksperymentów.

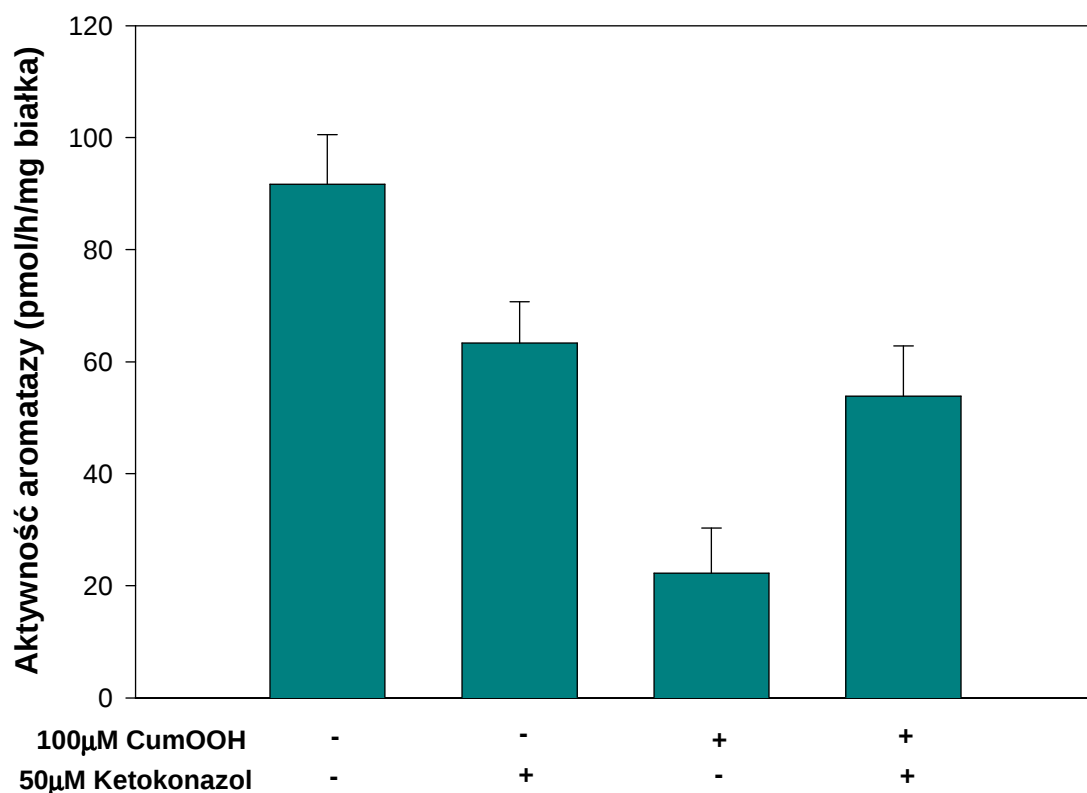


Ryc. 20. Wpływ różnych stężeń α -naftoflawonu na aktywność aromatazy w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Warunki doświadczenia jak podano w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 3 eksperymentów.

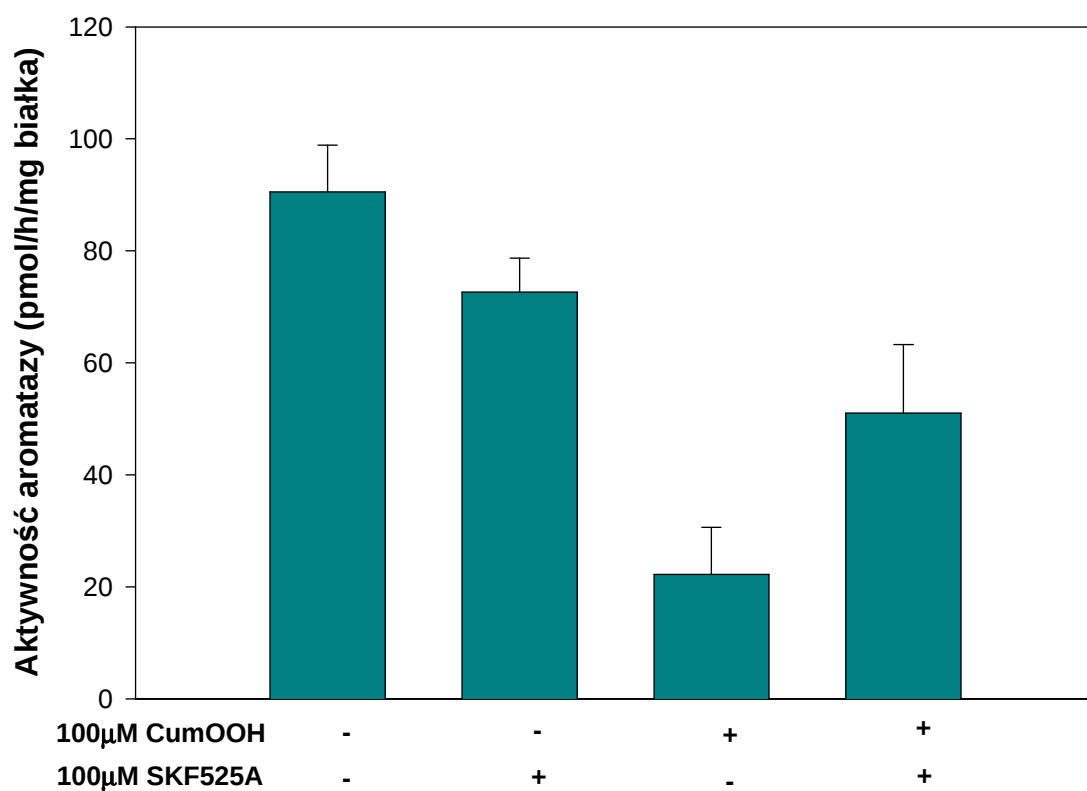
4.7 Wpływ inhibitorów cytochromu P450 (ketokonazol, SKF525A, α -naftoflawon) na aktywność aromatazy hamowaną przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*

W celu zbadania wpływu inhibitorów cytochromu P450 na aktywność aromatazy hamowaną przez wodoronadtlenek kumenu, przeprowadzono postępowanie, jak opisano w punkcie 3.10 w Materiałach i Metodach. Okazało się, że zastosowanie preinkubacji z inhibitorami cytochromu P450, przed właściwą godziną inkubacją z CumOOH, spowodowało zahamowanie wpływu tego wodoronadtlenku na aktywność aromatazy. Otrzymane wyniki porównywano w stosunku do kontroli z samym inhibitorem. W badaniu zastosowano inhibitory cytochromu P450 hamujące aktywność aromatazy w sposób odwracalny, co umożliwiło odpłukanie użytych związków od enzymu. Dzięki temu w kontrolach z inhibitorami obserwowano aktywność aromatazy zbliżoną do

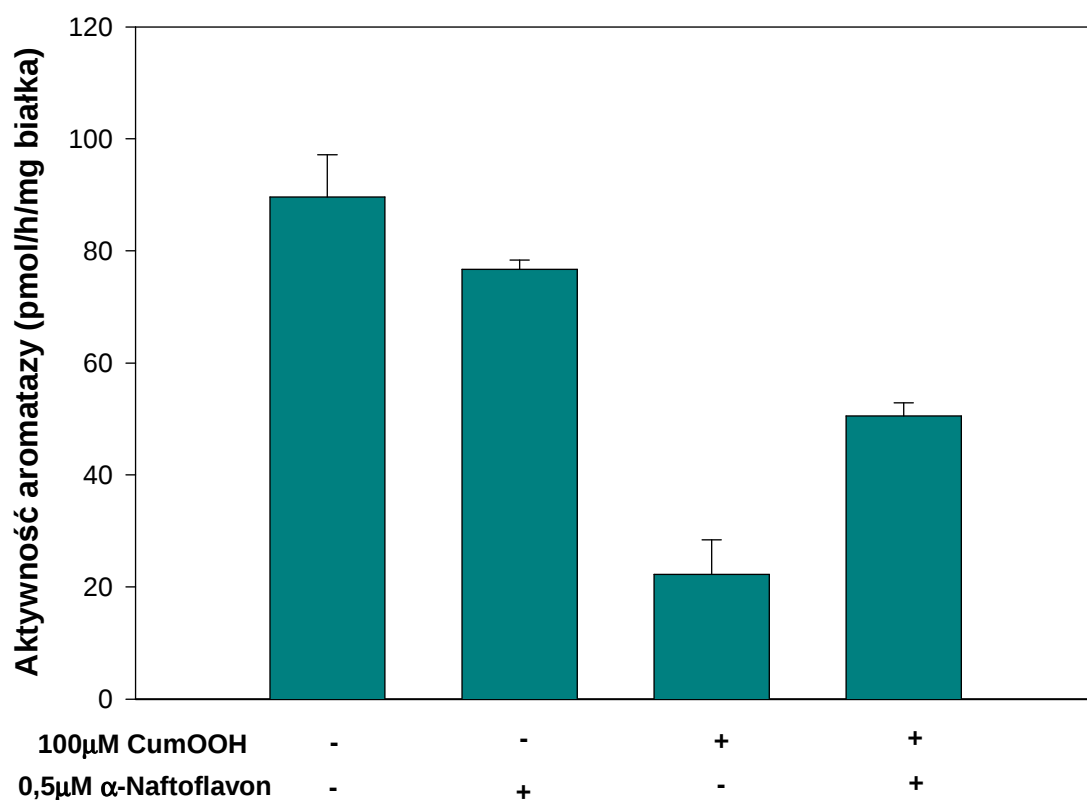
wartości próby kontrolnej nie zawierającej inhibitorów cytochromu P450. Podobnie jak w przeprowadzonych wcześniej doświadczeniach, w próbach badanych zawierających 100 μM CumOOH, obserwowano silne hamowanie aktywności aromatazy. Stwierdzono, że wszystkie inhibitory cytochromu P450: 50 μM ketokonazol (ok. 85 % kontroli z inhibitorem) (Ryc. 21), 100 μM SKF525A (ok. 70 % kontroli z inhibitorem) (Ryc. 22), i 0,5 μM α -naftoflawon (ok. 65 % kontroli z inhibitorem) (Ryc. 23), odwracały efekt CumOOH na aktywność aromatazy w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Otrzymane wyniki wskazują, że zablokowanie miejsca aktywnego cytochromu P450_{arom} przez inhibitory cytochromu P450, jest przyczyną zahamowania metabolizmu wodoronadtlenku kumenu. W konsekwencji nie powstają wolne rodniki kumoksyłowe, metylowe i w dalszym etapie wolne rodniki nadtlenkowe, dzięki czemu obserwuje się znaczące odwrócenie efektu hamowania aktywności aromatazy przez wodoronadtlenek kumenu.



Ryc. 21. Wpływ 50 μM ketokonazolu na aktywność aromatazy hamowaną przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Warunki doświadczenia jak podano w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 4 eksperymentów.



Ryc. 22. Wpływ 100 μ M SKF525A na aktywność aromatazy hamowaną przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Warunki doświadczenia jak podano w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 4 eksperymentów.



Ryc. 23. Wpływ 0,5 μ M α -naftoflawnu na aktywność aromatazy hamowaną przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Warunki doświadczenia jak podano w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 3 eksperymentów.

4.8 Wpływ inhibitorów cytochromu P450 (α -naftoflawn, ketokonazol, SKF525A) na stres oksydacyjny i cytotoksyczność indukowaną przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*

Wcześniejsze eksperymenty wykazały ochronny wpływ inhibitorów cytochromu P450 na aktywność aromatazy hamowaną przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*. W związku z tym interesujące wydawało się zbadanie wpływu zastosowanych inhibitorów na stres oksydacyjny indukowany przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR. Do badania zastosowano takie same stężenia inhibitorów cytochromu P450, które zostały wykorzystane we wcześniejszych badaniach nad aktywnością aromatazy, tzn. 50 μ M ketokonazol, 0,5 μ M α -naftoflawn

i 100 μM SKF525A. Po 15-minutowej preinkubacji komórek *choriocarcinoma* z wybranymi inhibitorami, dodawano 100 μM CumOOH i ponownie inkubowano komórki przez 1 h. Następnie mierzono nasilenie stresu oksydacyjnego z wykorzystaniem cytometru przepływowego jak opisano w Materiałach i Metodach. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że wszystkie użyte inhibitory hamowały stres oksydacyjny powstający pod wpływem CumOOH w komórkach JAR. Najsilniejsze działanie ochronne zaobserwowano w przypadku dwóch inhibitorów: 50 μM ketokonazolu i 100 μM SKF525A, które hamowały intensywność fluorescencji odpowiednio w około 64 % i 66 % w porównaniu do kontroli z wodoronadtlenkiem kumenu. Nieco słabsze działanie wykazywał 0,5 μM α -naftoflawon, niemniej jednak również odwracał wpływ CumOOH w około 46 % (Tab. 1).

Tab. 1. Wpływ wybranych inhibitorów cytochromu P450 na stres oksydacyjny indukowany przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Warunki doświadczenia jak podano w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 4 eksperymentów.

	Intensywność fluorescencji (jednostki względne)
<i>Kontrola (- 100 μM CumOOH)</i>	1,00 $\pm$ 1,57
<i>Kontrola (+ 100 μM CumOOH)</i>	6,34 $\pm$ 1,07
<i>+ 100 μM SKF525A</i>	2,14 $\pm$ 1,07
<i>+ 50 μM ketokonazol</i>	2,29 $\pm$ 0,27
<i>+ 0,5 μM α-naftoflawon</i>	3,44 $\pm$ 0,75

W celu zbadania, czy cytochrom P450 uczestniczy w cytotoksycznym działaniu wodoronadtlenku kumenu na komórki *choriocarcinoma*, oceniono wpływ wcześniej wybranych inhibitorów cytochromu P450 na żywotność komórek JAR hamowaną przez CumOOH. Badania dowiodły, że ketokonazol, SKF525A i α -naftoflawon wykazują korzystny wpływ na przeżywalność komórek JAR, która znacznie spada po 6-godzinnej inkubacji ze 100 μM CumOOH (Tab. 2). W przypadku każdego z użytych inhibitorów

zaobserwowano prawie całkowite odwrócenie cytotoksycznego wpływu wodoronadtlenku kumenu, i tak dla ketokonazolu i SKF525A w próbach badanych uzyskano ok. 90 % wartości prób kontrolnych z inhibitorami, natomiast dla α -naftoflawonu wartość ta wynosiła ok. 83 %.

Tab. 2. Wpływ wybranych inhibitorów cytochromu P450 na przeżywalność komórek JAR *choriocarcinoma* w obecności i nieobecności wodoronadtlenku kumenu. Warunki doświadczenia jak podano w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 3 eksperymentów.

	Aktywność LDH (%)	
	- 100 μ M CumOOH	+ 100 μ M CumOOH
Kontrola	98,69 $\pm$ 2,36	46,74 $\pm$ 1,68
+ 100 μ M SKF525A	95,07 $\pm$ 4,13	86,42 $\pm$ 6,20
+ 50 μ M ketokonazol	87,43 $\pm$ 4,39	71,73 $\pm$ 4,68
+ 0,5 μ M α -naftoflawon	98,55 $\pm$ 1,40	81,97 $\pm$ 0,46

Wpływ wybranych inhibitorów cytochromu P450 (ketokonazolu, SKF525A i α -naftoflawonu) na cytotoksyczność i stres oksydacyjny indukowany przez wodoronadtlenek kumenu, wskazuje, że cytochrom P450, w tym również cytochrom P450_{arom} uczestniczy w metabolizmie wodoronadtlenku kumenu prowadzącym do spadku przeżywalności komórek *choriocarcinoma*.

4.9 Wpływ antyoksydantów (α -tokoferol, BHT) na stres oksydacyjny i cytotoksyczność indukowaną przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*

Dalsze eksperymenty skoncentrowały się na badaniu mechanizmu stresu oksydacyjnego zależnego od CumOOH w komórkach JAR *choriocarcinoma*. W tym celu dokonano oceny wpływu wybranych antyoksydantów na ten proces. Wiadomo, że

CumOOH jest związkiem lipofilnym, w związku z tym zastosowano główny hydrofobowy antyoksydant działający w błonach biologicznych, czyli α -tokoferol, który jest zmiataczem wolnych rodników lipidowych i odgrywa rolę w utrzymaniu stabilności błon komórkowych (100). Kolejnym antyoksydantem użytym do badania był butylowany hydroksytoluen (BHT), syntetyczny fenolowy antyoksydant, o którym wiadomo, że hamuje peroksydację lipidów poprzez przekształcanie aktywnych rodników lipidowych w wodoronadtlenki (101). Wykorzystane w badaniu stężenia antyoksydantów, tzn. 25 μ M α -tokoferol i 100 μ M BHT dobrano literaturowo tak, aby nie wpływały na żywotność komórek. W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano, że już godzinna preinkubacja ze 100 μ M BHT całkowicie hamowała stres oksydacyjny indukowany przez CumOOH w komórkach JAR. Podobnie 24-godzinna preinkubacja komórek z 25 μ M α -tokoferolem, przed inkubacją z wodoronadtlenkiem kumenu, doprowadziła do spadku intensywności fluorescencji o ok. 77 % w odniesieniu do kontroli ze 100 μ M CumOOH (Tab. 3).

Tab. 3. Wpływ wybranych antyoksydantów na stres oksydacyjny indukowany przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Warunki doświadczenia jak podano w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 3 eksperymentów.

	Intensywność fluorescencji (jednostki względne)
Kontrola (- 100 μM CumOOH)	1,00 $\pm$ 0,89
Kontrola (+ 100 μM CumOOH)	6,40 $\pm$ 1,12
+ 25 μ M α -tokoferol	2,25 $\pm$ 0,43
+ 100 μ M BHT	1,10 $\pm$ 0,26

Zbadano również wpływ wybranych antyoksydantów na spadek przeżywalności komórek JAR, spowodowany wpływem wodoronadtlenku kumenu. Wykazano, że zarówno 25 μ M α -tokoferol, jak i 100 μ M BHT całkowicie chroniły komórki *choriocarcinoma* przed cytotoksycznym działaniem wodoronadtlenku kumenu (Tab. 4).

Tab. 4. Wpływ wybranych antyoksydantów na przeżywalność komórek JAR *choriocarcinoma* w obecności i nieobecności wodoronadtlenku kumenu. Warunki doświadczenia jak podano w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 3 eksperymentów.

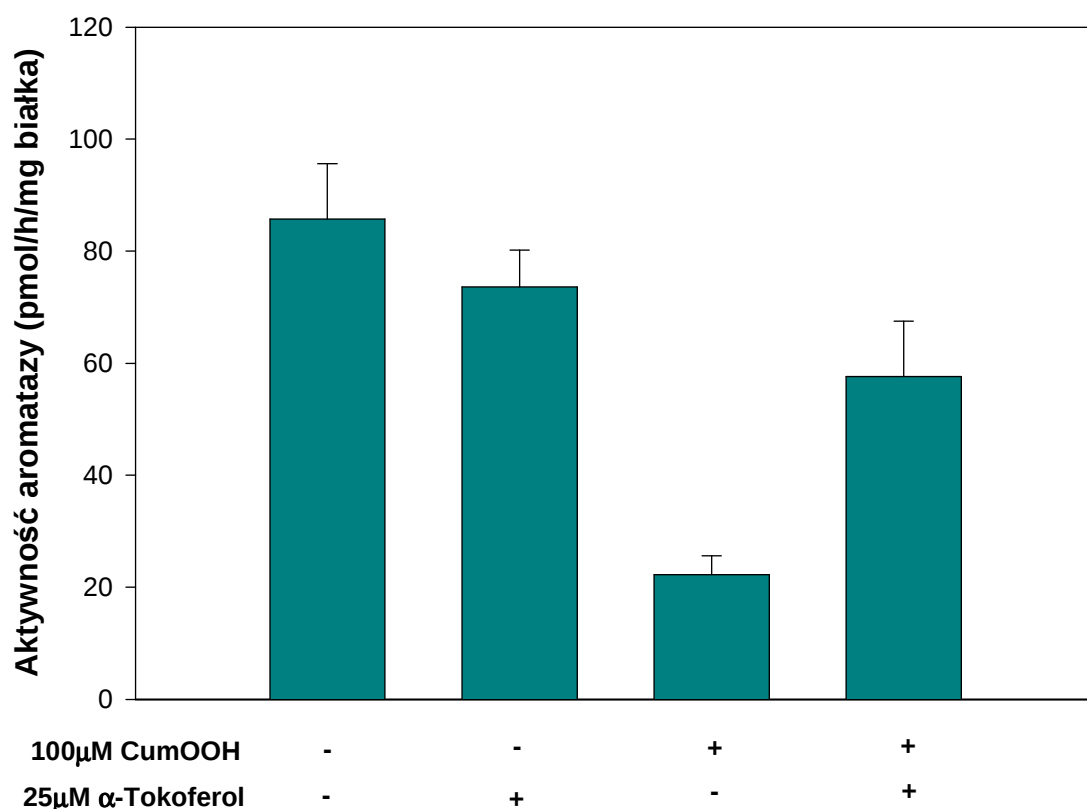
	Aktywność LDH (%)	
	-100 μ M CumOOH	+100 μ M CumOOH
Kontrola	95,48 $\pm$ 1,16	40,37 $\pm$ 4,20
+ 25 μ M α -tokoferol	87,76 $\pm$ 2,50	84,40 $\pm$ 4,68
+ 100 μ M BHT	93,11 $\pm$ 1,73	96,73 $\pm$ 1,48

Na podstawie uzyskanych wyników, obrazujących cytoprotekcyjne działanie zastosowanych antyoksydantów, można wnioskować o udziale wolnych rodników, powstających na skutek homolitycznego rozpadu wodoronadtlenku kumenu, w mechanizmie stresu oksydacyjnego indukowanego przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma* oraz w mechanizmie cytotoksyczności zależnej od tego wodoronadtlenku.

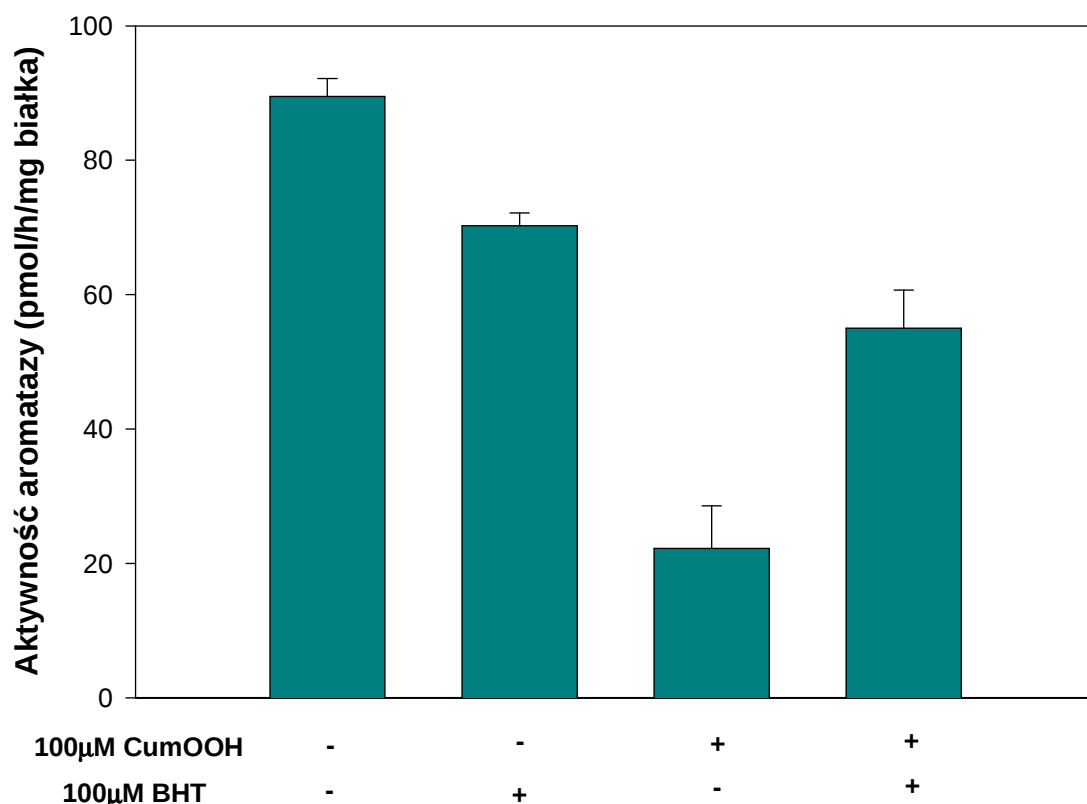
4.10 Wpływ antyoksydantów (α -tokoferol, BHT) na aktywność aromatazy hamowaną przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*

W celu sprawdzenia, czy wolne rodniki mogą uczestniczyć w hamowaniu aktywności aromatazy przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach *choriocarcinoma*, zbadano wpływ wybranych antyoksydantów na ten proces. Po 24-godzinnej preinkubacji z 25 μ M α -tokoferolem (Ryc. 24) i godzinnej preinkubacji ze 100 μ M BHT (Ryc. 25) komórki inkubowano następnie ze 100 μ M CumOOH przez 1 h, po czym oznaczano aktywność aromatazy jak opisano w Materiałach i Metodach. Oba antyoksydanty zapobiegały hamowaniu aktywności aromatazy przez wodoronadtlenek kumenu w podobnym stopniu. Aktywność aromatazy w obecności 25 μ M α -tokoferolu wynosiła 57,61 $\pm$ 9,88 pmol/h/mg białka, a w obecności 100 μ M BHT 55,01 $\pm$ 5,67 pmol/h/mg białka, w porównaniu do wartości uzyskanej w próbie ze 100 μ M CumOOH,

która wynosiła $22,25 \pm 3,39$ pmol/h/mg białka. Takie działanie antyoksydantów potwierdza, że wcześniej obserwowane (Ryc. 16) hamowanie aktywności aromatazy jest w znacznym stopniu zależne od powstających, wskutek metabolizmu wodoronadtlenku kumenu, wolnych rodników kumoksyłowych i metylowych oraz powstających w procesie peroksydacji lipidów aktywnych rodników lipidowych.



Ryc. 24. Wpływ 25 μM α-tokoferolu na aktywność aromatazy hamowaną przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Warunki doświadczenia jak podano w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 3 eksperymentów.

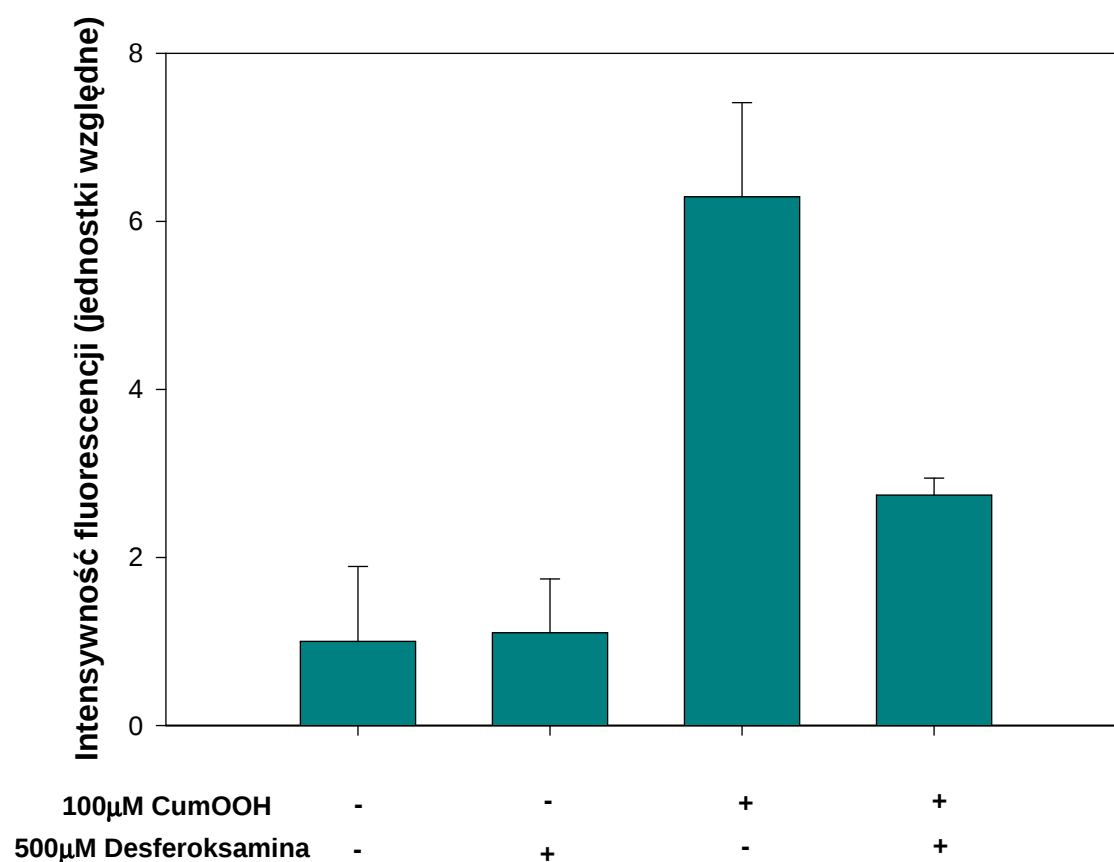


Ryc. 25. Wpływ 100 μ M BHT na aktywność aromatazy hamowaną przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Warunki doświadczenia jak podano w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 3 eksperymentów.

4.11 Wpływ chelatora żelaza - desferoksaminy na stres oksydacyjny i cytotoksyczność indukowaną przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*

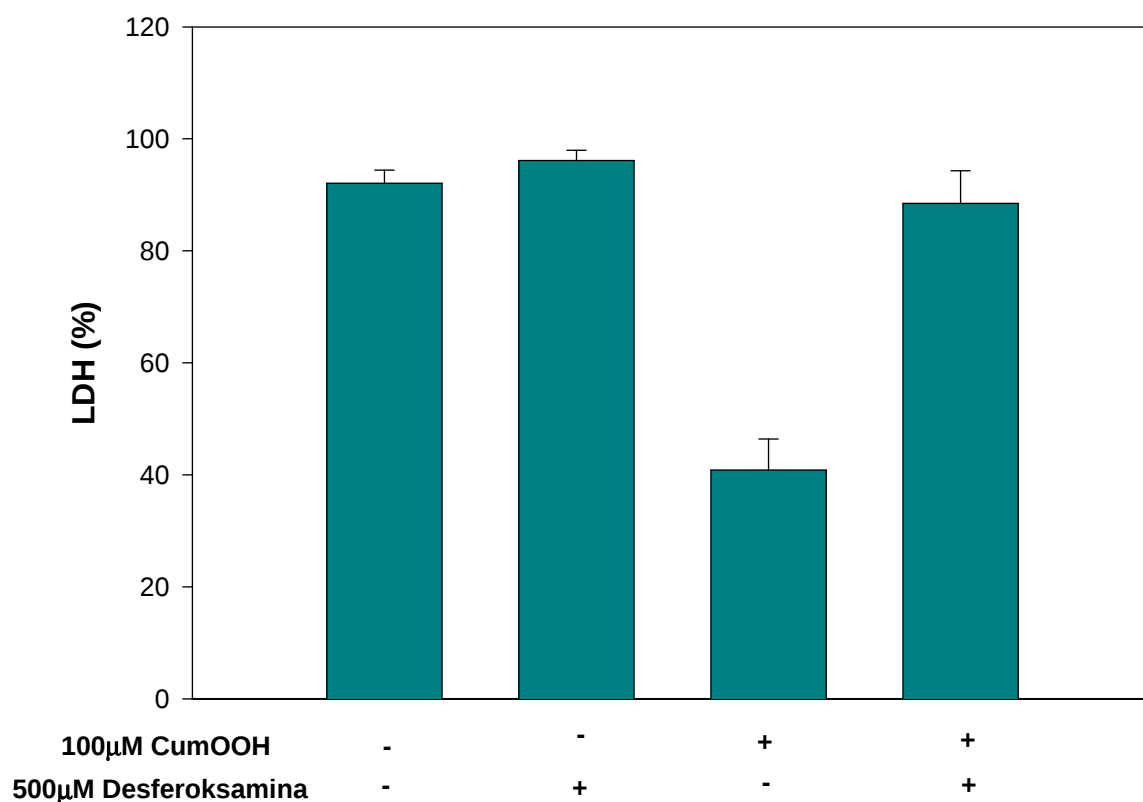
W celu wykazania roli jonów żelaza w mechanizmie stresu oksydacyjnego indukowanego przez CumOOH, zbadano wpływ chelatora jonów żelaza (III) - desferoksaminy na ten proces w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Do badania zastosowano, wybrane literaturowo, stężenie 500 μ M desferoksaminy. Intensywność fluorescencji mierzono metodą cytometrii przepływowej po godzinnej preinkubacji komórek z desferoksaminą przed inkubacją ze 100 μ M CumOOH. W tak przeprowadzonym doświadczeniu stwierdzono znaczne hamowanie stresu oksydacyjnego, będącego wynikiem wpływu CumOOH na komórki JAR, co zaobserwowano jako obniżenie intensywności fluorescencji z wartości $6,29 \pm 1,12$ j.w.

w obecności samego CumOOH do wartości $2,74 \pm 0,2$ j.w. w obecności zarówno desferoksaminy, jak i CumOOH (Ryc. 26).



Ryc. 26. Wpływ 500 μM desferoksaminy na stres oksydacyjny indukowany przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Warunki doświadczenia jak podano w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 3 eksperymentów.

Zbadano również wpływ desferoksaminy na żywotność komórek JAR poddanych działaniu wodoronadtlenku kumenu. Przeprowadzone badania pozwoliły wykazać, że desferoksamina w stężeniu 500 μM, podobnie jak w przypadku antyoksydantów (Tab. 4), prawie całkowicie chroniła przed cytotoksycznym wpływem wodoronadtlenku kumenu na komórki *choriocarcinoma* (Ryc. 27). Całkowita ochrona komórek JAR przed cytotoksycznością indukowaną przez CumOOH oraz silne hamowanie stresu oksydacyjnego przez desferoksaminy wskazuje, że jony żelaza odgrywają istotną rolę w obu tych procesach.

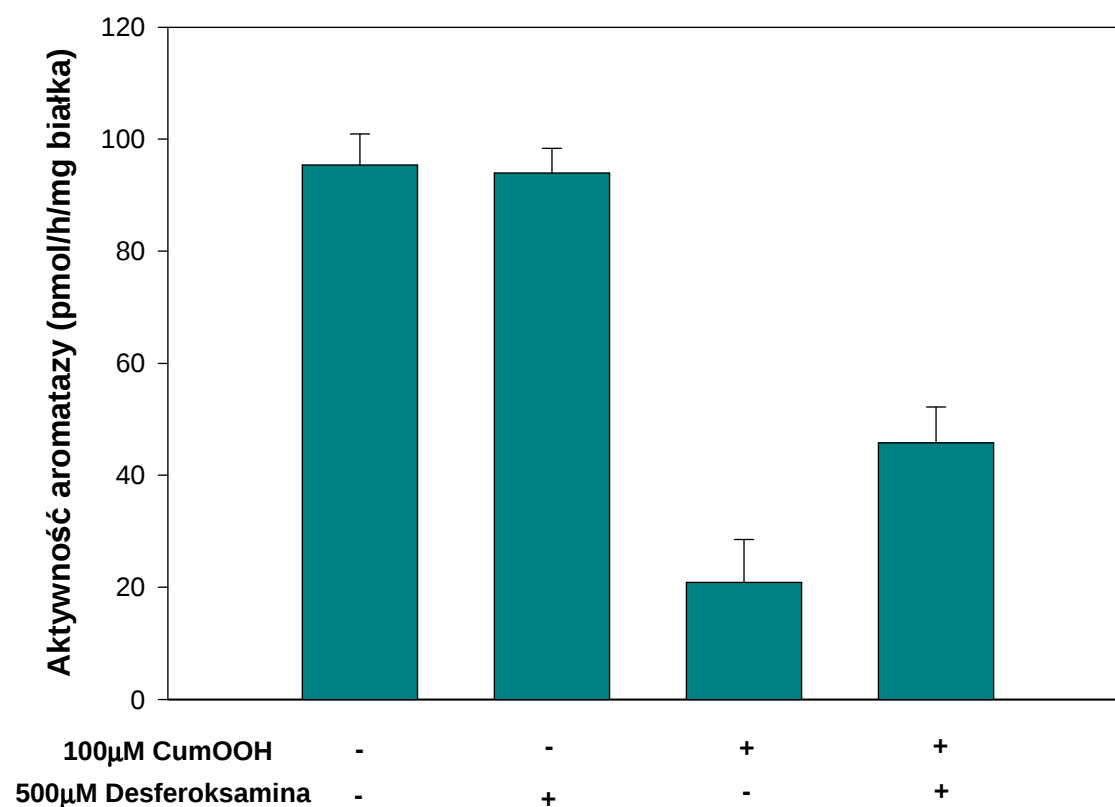


Ryc. 27. Wpływ 500 μM desferoksaminy na przeżywalność komórek JAR *choriocarcinoma* w obecności i nieobecności wodoronadtlenku kumenu. Warunki doświadczenia jak podano w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 3 eksperymentów.

4.12 Wpływ desferoksaminy na aktywność aromatazy hamowaną przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*

Ponieważ wykazano, że jony żelaza mogą odgrywać pewną rolę w indukowanym przez wodoronadtlenek kumenu stresie oksydacyjnym i cytotoksyczności (Ryc. 26 i 27), sprawdzono wpływ desferoksaminy na aktywność aromatazy hamowanej przez wodoronadtlenek kumenu. 500 μM desferoksamina częściowo chroniła aktywność aromatazy przed hamującym działaniem wodoronadtlenku kumenu, odwracając działanie CumOOH z wartości $20,89 \pm 7,63$ pmol/h/mg białka do wartości $45,78 \pm 6,39$ pmol/h/mg białka (Ryc. 28). Wyniki te wskazują na częściowy wpływ jonów żelaza na mechanizm hamowania aktywności aromatazy przez CumOOH. Można przypuszczać,

że to żelazo hemowe uwolnione na skutek destrukcji cytochromu P450_{arom} uczestniczy w rozwoju stresu oksydacyjnego i cytotoksyczności zależnych od CumOOH.



Ryc. 28. Wpływ 500 µM desferoksaminy na aktywność aromatazy hamowaną przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Warunki doświadczenia jak podano w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z 3 eksperymentów.

5. DYSKUSJA

Celem obecnej pracy była ocena wpływu stresu oksydacyjnego indukowanego przez wodoronadtlenek kumenu na aktywność aromatazy w komórkach JAR *choriocarcinoma* oraz zbadanie wzajemnych interakcji zachodzących pomiędzy cytochromem P450_{arom} a wodoronadtlenkiem kumenu. W przeprowadzonych w tej pracy badaniach użyto wodoronadtlenku kumenu, o którym wiadomo, że naśladuje działanie naturalnie występujących w organizmie wodoronadtlenków lipidowych. Jak wcześniej wspomniano badania przeprowadzono na modelu komórkowym wykorzystując linię JAR *choriocarcinoma*.

Stres oksydacyjny to stan, w którym dochodzi do zwiększonej produkcji wolnych rodników. Naturalnie powstające w błonach biologicznych wodoronadtlenki lipidowe odgrywają znaczącą rolę jako związki wspierające rozwój stresu oksydacyjnego. Ponadto wodoronadtlenki lipidowe są związane m.in. z procesem peroksydacji lipidów, przy czym mogą one uczestniczyć zarówno w inicjacji, jak i propagacji tego procesu. W prawidłowej ciąży stwierdza się niskie poziomy wodoronadtlenków lipidowych w łożysku, natomiast nadmierne ich wytwarzanie obserwowane jest w łożyskach kobiet ze schorzeniami takimi jak preeclampsia, czy cukrzyca ciążowa. Indukowane przez stres oksydacyjny zmiany w komórkach trofoblastu łożyska odgrywają krytyczną rolę zarówno w prawidłowym rozwoju łożyska, jak i w stanach patologicznych. W preeclampsii obserwuje się znaczny stres oksydacyjny, wynikający z wysokiego poziomu wodoronadtlenków lipidowych i niekontrolowanej peroksydacji lipidów. Co więcej zmniejszony jest poziom głównego, rozpuszczalnego w tłuszczach antyoksydanta α -tokoferolu, a także aktywność peroksydazy glutationu i dysmutazy ponadtlenkowej (90).

W wielu wcześniejszych badaniach indukowana przez wodoronadtlenki organiczne cytotoksyczność była szeroko używana jako model do badania oksydacyjnego uszkodzenia komórki (88,102). Wpływy cytotoksyczne wodoronadtlenków na komórki obejmują m.in. takie oddziaływania jak peroksydacja lipidów prowadząca do uszkodzenia integralności błon komórkowych, depolaryzacja błon mitochondrialnych, deplecja ATP, czy zależna od wapnia aktywacja proteaz i/lub fosfolipaz (88). W celu ustalenia warunków w jakich wodoronadtlenek kumenu indukuje stres oksydacyjny i cytotoksyczność w komórkach JAR *choriocarcinoma*,

zbadano wpływ CumOOH na te komórki, wykorzystując pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej. Zgodnie z przewidywaniami, zaobserwowano indukcję znacznej cytotoksyczności i spadek żywotności komórek kosmówczaka. Stwierdzono również, że CumOOH indukuje silny stres oksydacyjny, co wykazano, mierząc intensywność fluorescencji dichlorofluoresceiny z zastosowaniem metody cytometrii przepływowej. Przeprowadzone badania na komórkach JAR *choriocarcinoma* potwierdzają, że wodoronadtlenek kumenu jest zdolny również do indukcji znacznej cytotoksyczności i silnego stresu oksydacyjnego w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Wiadomo, że same wodoronadtlenki lipidowe nie wykazują znaczącej cytotoksyczności, a dopiero produkty ich rozpadu prowadzą do uszkodzenia komórki (103). I tak, wcześniej dowiedziono, że wodoronadtlenek kumenu ulega metabolizmowi w hepatocytach szczura (88) w związku z tym sprawdzono, czy obserwowane uszkodzające działanie wodoronadtlenku kumenu wobec komórek JAR, związane jest z podobnym procesem. Ilość pozostającego nierozłożonego wodoronadtlenku określono przez spektrofotometryczną analizę kompleksu tiocyjanianu żelaza (III) przy 490 nm. Kompleks ten powstaje na skutek utlenienia tiocyjanianu żelaza (II) przez wodoronadtlenki. Zbadano, więc szybkość metabolizmu CumOOH w komórkach JAR *choriocarcinoma* i wykazano, że ok. 70 % dodanego CumOOH zostało rozłożone w ciągu 30 min od dodania tego związku do komórek. Metabolizm tego wodoronadtlenku był wolniejszy, niż w hepatocytach, gdzie w ciągu 5 minut następował prawie natychmiastowy rozkład CumOOH (88), niemniej jednak, jak pokazało doświadczenie, komórki *choriocarcinoma* są również zdolne do dekompozycji organicznych wodoronadtlenków. Można przypuszczać, że zwolniony metabolizm CumOOH w komórkach kosmówczaka łożyska jest spowodowany mniejszą aktywnością cytochromu P450 w porównaniu do hepatocytów.

Z wcześniejszych badań wynika, że istnieje związek pomiędzy cytochromem P450, a NADPH-zależną peroksydacją lipidów (92). Ponadto badania dowiodły, że zależny od cytochromu P450 metabolizm wodoronadtlenków przez mikrosomy wątroby szczura znacznie indukuje pobór tlenu i peroksydację lipidów (89). Klimek i wsp. (90) sugerowali, że organiczne (CumOOH) i naturalnie występujące wodoronadtlenki lipidowe, poprzez inaktywację cytochromu P450_{scc} i w konsekwencji hamowanie biosyntezy progesteronu z cholesterolu w łożysku ludzkim, mogą sprzyjać rozwojowi preeclampsii. Inhibitory cytochromu P450: amfenon B i SKF525A, silnie hamowały

zarówno NADPH-zależną peroksydację lipidów, jak i peroksydację zależną od wodoronadtlenku kumenu, co wskazywało na udział cytochromu P450_{scc} w obu tych procesach. Wyniki te potwierdziły udział syntetycznych wodoronadtlenków i naturalnego wodoronadtlenku kwasu arachidonowego w peroksydacyjnej aktywności mitochondrialnego cytochromu P450_{scc} (90). Dalsze badania wykazały, że NADPH-zależna peroksydacja lipidów silnie hamuje biosyntezę estrogenów w ludzkim łożysku. Stwierdzono, że proces peroksydacji lipidów jest przyczyną hamowania aktywności aromatazy w mikrosomach łożyska. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wnioskowano wówczas, że przyczyną hamowania aktywności aromatazy jest degradacja cytochromu P450_{arom} (91). Przemawia za tym fakt, że zawartość cytochromu P450 w mikrosomach spada znacząco pod wpływem peroksydacji lipidów i ten spadek jest silnie skorelowany ze spadkiem aktywności aromatazy. Praktycznie cały cytochrom P450 we frakcji mikrosomalnej stanowi cytochrom P450_{arom}, w związku z tym sugerowano, że degradacja cytochromu P450_{arom} jest bezpośrednią przyczyną hamowania aktywności aromatazy przez peroksydację lipidów w mikrosomach łożyska ludzkiego. Wiadomo również, że cytochrom P450_{arom} jest enzymem szczególnie wrażliwym na peroksydację lipidów, prawdopodobnie bardziej wrażliwym, niż cytochrom P450_{scc} (91). Przeprowadzone w obecnej pracy badania potwierdzają, że jednym z efektów stresu oksydacyjnego indukowanego przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma* jest nasilona peroksydacja lipidów. Z badań przeprowadzonych w obecnej pracy wynika, że proces ten jest również przyczyną hamowania aktywności aromatazy przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR *choriocarcinoma*, potwierdzając tym samym wcześniejsze doniesienia dotyczące destrukcyjnego wpływu tego procesu na cytochrom P450 (90,91).

Wiadomo, że wodoronadtlenki organiczne mogą być metabolizowane przy udziale cytochromu P450. I tak, zależny od aktywności peroksydazowej cytochromu P450, homolityczny rozpad wodoronadtlenku kumenu doprowadza do powstania toksycznych wolnych rodników (89,104-106), które z kolei zwrotnie mogą uszkadzać ten cytochrom (90,91). Aromataza jest enzymem zawierającym w swoim składzie, oprócz reduktazy NADPH-cytochrom P450, cytochrom P450_{arom} (1). W związku z tym przeprowadzone w tej pracy doświadczenia skupiły się na badaniu wpływu wodoronadtlenku kumenu na aktywność aromatazy i tym samym aktywność cytochromu P450_{arom} w komórkach JAR *choriocarcinoma*. W obecnej pracy zbadano więc wpływ

inhibitorów cytochromu P450 (ketokonazol, SKF525A i α -naftoflawon) na stres oksydacyjny i cytotoksyczność indukowaną przez wodoronadtlenek kumenu. Wybrane inhibitory hamują większość cytochromów P450, w tym również cytochrom P450 aromatazy (107-109). Inhibitory te zostały zastosowane w badaniu jako związki blokujące centrum aktywne cytochromu P450, aby zapobiec metabolizmowi CumOOH przez ten cytochrom. Takie zastosowanie tych związków było możliwe, dzięki temu, że wiążą się one w sposób odwracalny z cytochromem P450. Wszystkie użyte inhibitory chroniły przed stresem oksydacyjnym i cytotoksycznością indukowaną przez CumOOH. Działanie inhibitorów cytochromu P450 zapobiegające uszkodzeniu komórek przez wodoronadtlenek kumenu, może sugerować, że znaczący jest udział cytochromu P450 w homolitycznym rozpadzie CumOOH w łożysku ludzkim. Można więc przypuszczać, że cytochrom P450_{arom} będzie również uczestniczył w metabolizmie organicznych wodoronadtlenków i powstawaniu toksycznych wolnych rodników w łożysku. Z literatury wiadomo, że CYP19A1 jest głównym i najobficiej występującym cytochromem P450 w łożysku ludzkim (110,111), a także, że wykazuje on zdolność do metabolizowania pewnych ksenobiotyków (112-114) Łożysko stanowi organ przejściowy pomiędzy krążeniem matki i płodu, który reguluje dwukierunkowy transfer pośrednich metabolitów. Jest to funkcjonalna bariera chroniąca płód przed wpływem leków i ksenobiotyków, przy czym ochrona ta polega m.in. na łożyskowej aktywności enzymów metabolizujących te związki. Wykazano, że CYP19A1 jest głównym enzymem w łożysku ludzkim odpowiedzialnym za metabolizm takich opiatów jak: metadon i buprenorfina. Potwierdza to udział łożyskowego cytochromu P450_{arom} w biotransformacji ksenobiotyków, zwłaszcza, że brak jest w łożysku CYP3A4, który w wątrobie jest odpowiedzialny za detoksykację wielu leków (110). W obecnej pracy wykazano, że aktywność aromatazy jest hamowana przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach *choriocarcinoma*, a zastosowanie inhibitorów cytochromu P450 odwraca hamujący wpływ CumOOH na ten enzym. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że cytochrom P450_{arom} uczestniczy w metabolizmie wodoronadtlenku kumenu i prawdopodobnie wodoronadtlenków lipidowych. Dalszych badań wymaga jednak ocena, jak znaczący jest udział CYP19A1 w, zależnym od cytochromu P450, metabolizmie wodoronadtlenku kumenu w łożysku ludzkim.

Różne cytochromy P450 mogą uwalniać znaczące ilości anionorodnika ponadtlenkowego w obecności NADPH i O₂, jednakże sam anionorodnik nie

uczestniczy bezpośrednio w inicjacji peroksydacji lipidów, a dopiero w kompleksie z jonami żelaza jest zdolny do inicjacji tego procesu, w wyniku którego powstają wolne rodniki lipidowe prowadzące do destrukcji cytochromu P450 (92,115,116). Wykazano również, że rodnik hydroksylowy nie uczestniczy w degradacji cytochromu P450 we frakcji mitochondrialnej i mikrosomalnej łożyska ludzkiego. Obecnie uważa się, że w tym procesie szczególną rolę odgrywają aktywne rodniki lipidowe (alkoksyłowe i nadktlenkowe) powstające wskutek homolitycznego rozpadu wodoronadtlenków lipidowych. Potwierdzają to badania z antyoksydantami, będącymi doskonałymi zmiataczami wolnych rodników lipidowych, takimi jak α -tokoferol, czy BHT (butylowany hydroksytoluen) (91). Klimek i wsp. (90) badając wpływ CumOOH na biosyntezę progesteronu wykazali, że antyoksydanty hamowały powstawanie TBARS wskazując, że mechanizm hamowania biosyntezy progesteronu jest procesem wolnorodnikowym.

Podobne wyniki uzyskałam w swojej pracy, przy zastosowaniu antyoksydantów takich jak BHT i α -tokoferol. Oba związki działają poprzez hamowanie procesów wolnorodnikowych. Tokoferole są głównymi lipofilnymi antyoksydantami w surowicy, LDL i tkankach, które zapobiegają łańcuchowej peroksydacji lipidów (71). BHT natomiast jest syntetycznym fenolowym antyoksydantem powszechnie używanym jako dodatek do żywności, który działa jako antyoksydant i zmiatacz tlenu singletowego (101). W badaniach przeprowadzonych w tej pracy α -tokoferol i BHT niemal całkowicie chronią komórki JAR przed stresem oksydacyjnym i cytotoksycznością indukowaną przez wodoronadtlenek kumenu. Podobny wpływ wykazują również na aktywność aromatazy hamowaną przez ten wodoronadtlenek. Takie działanie antyoksydantów jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi łożyska ludzkiego (90,91). Z przeprowadzonych badań wynika, że zastosowane w tej pracy antyoksydanty neutralizując, zarówno wolne rodniki powstające podczas metabolizmu CumOOH, jak i powstające dalej wolne rodniki lipidowe, hamują peroksydację lipidów i stres oksydacyjny, zapobiegając tym samym hamowaniu aktywności aromatazy.

Wiadomo, że degradacja cytochromu P450 pod wpływem działania wodoronadtlenków lipidowych prowadzi m.in. do uwolnienia żelaza hemowego, które dalej może inicjować peroksydację lipidów (88). W obecnej pracy również zbadano udział jonów żelaza w procesie hamowania aktywności aromatazy przez wodoronadtlenek kumenu i w tym celu zastosowano chelator żelaza - desferoksamine.

Desferoksamina (DFO) jest hydrofilowym związkiem, który wiąże jony żelaza trójwartościowego w stosunku 1:1, przy czym ma wysokie powinowactwo do jonów żelaza, a niskie do innych jonów metali. Jeden mol DFO chelatuje jeden mol żelaza tworząc feroksaminę, która jest wydalana z organizmu i jest znacznie mniej toksyczna niż DFO. Dowiedziono, że działanie DFO nie tylko przerywa toksyczne działanie żelaza, ale powoduje również cofanie się uszkodzeń komórek wywołanych działaniem żelaza. Desferoksamina zmniejsza znacząco aktywność redoks Fe (III) i jest bardzo efektywnym antyoksydantem, dzięki jej zdolności do wiązania żelaza. Zaobserwowano m.in., że DFO hamuje autooksydację Fe (II) (117,118).

W moich badaniach wykazałam, że desferoksamina częściowo chroniła komórki JAR przed stresem oksydacyjnym będącym efektem działania wodoronadtlenku kumenu i zapobiegała również częściowo hamowaniu aktywności aromatazy, natomiast wywierała silne działanie cytoochronne zapobiegając uszkodzeniom komórek powodowanym przez ten wodoronadtlenek. Wcześniej wykazano (88), że w izolowanych hepatocytach szczura niehemowe żelazo odgrywa raczej niewielką rolę w metabolizmie CumOOH, ponieważ chelator Fe (III) - desferoksamina, nie miał wpływu na metabolizm CumOOH, ale wykazywał silne działanie cytoochronne dopiero po tym, jak CumOOH został zmetabolizowany. Istotnie w badaniu tym stwierdzono, że hepatocyty uwalniały żelazo dopiero gdy około 80 % wodoronadtlenku kumenu uległo metabolizmowi. Sugerowano wówczas, że to właśnie żelazo uwolnione na skutek destrukcji hemu cytochromu P450 może mieć wpływ na indukcję peroksydacji lipidów i dodatkowe efekty cytotoksyczne. Tak więc, żelazo uwalniane na skutek metabolicznej aktywacji CumOOH przez cytochrom P450, wspiera cytotoksyczność tego wodoronadtlenku w izolowanych hepatocytach szczura. Wiadomo bowiem, że prawidłowy poziom wolnego wewnątrzkomórkowego żelaza, zwłaszcza jonu Fe (III) są ekstremalnie niskie, ponieważ większość jest zmagazynowana w postaci ferrytyny (88). Podobnie, na podstawie doświadczeń przeprowadzonych w obecnej pracy oraz wcześniejszych doniesień (91) można przypuszczać, że żelazo hemowe uwolnione na skutek destrukcji cytochromu P450_{arom}, będzie nasilać stres oksydacyjny, a przede wszystkim wspierać cytotoksyczność indukowaną przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach *choriocarcinoma*.

Hamowanie aktywności aromatazy w łożysku i tym samym obniżenie poziomu estrogenów w ciąży może prowadzić do licznych niekorzystnych skutków

manifestujących się w przebiegu ciąży. Stwierdzono, że podanie inhibitora aromatazy (fadrozolu) samicom szczura w późnym okresie ciąży, spowodowało uszkodzenie płodu. Sugerowano wówczas, że uszkodzenie mogło wynikać ze zmniejszonej ekspresji metaloproteinazy-1 i oksydazy lizylowej w macicy, które z kolei są niezbędne w tworzeniu wiązań krzyżowych kolagenu. Co ciekawe po uzupełnieniu niedoboru estrogenów u tych szczurów, zaburzenia w macicy cofały się i nie dochodziło do uszkodzenia płodu (33,34).

Jednym ze skutków braku aktywności aromatazy jest prawdopodobnie nadmiar androgenów produkowanych w dużych ilościach przez nadnercza płodu. Badania wykazały, że poziom testosteronu jest wyższy u kobiet z preeclampsją, niż u kobiet z prawidłową ciążą (119), co nasunęło podejrzenia, że w patogenezie preeclampsji mogą odgrywać rolę wysokie poziomy androgenów obserwowane we krwi pacjentek, a pojawiające się na skutek niedoboru aktywności aromatazy (119-124). Przy czym nawet mały spadek aktywności aromatazy powoduje znaczący wzrost poziomu androgenów we krwi (119,121). Brak aktywności aromatazy u ludzi jest stosunkowo rzadki i jest przyczyną braku syntezy estrogenów. Ze względu na to, że siarczan dehydroepiandrosteronu, produkowany przez nadnercza płodu, nie może być przekształcany w estrogeny, jest on przekształcany obwodowo do testosteronu, co w rezultacie doprowadza do wirylizacji, zarówno matki, jak i płodu. W większości przypadków ciężarne matki z niedoborem aromatazy wykazywały zmniejszone stężenia w surowicy estronu, estriolu i estradiolu w porównaniu do matek z prawidłową ciążą, przy czym obserwowano zwiększone poziomy testosteronu, androstendionu i 5 α -dihydrotestosteronu (125).

Wiadomo, że u kobiet z preeclampsją zredukowana jest objętość osocza i w związku z tym zaburzone jest krążenie łożyskowo-płodowe. Sytuacja taka może prowadzić do aktywacji mechanizmów kompensacyjnych. Co więcej łożyskowe estrogeny odgrywają rolę w regulacji objętości osocza, tzn. stymulują syntezę angiotensynogenu i zwiększają produkcję tlenu azotu. Z tego powodu zmiany w stężeniach estrogenów, powodowane zmniejszoną aktywnością aromatazy, mogą mieć wpływ na zmniejszenie objętości osocza u kobiet z preeclampsją. Sugerowano również, że nadmiar progesteronu w stosunku do estradiolu antagonizuje stymulujący wpływ estrogenu na, zależną od endotelium, odpowiedź związaną z produkcją NO. Tak więc można przypuszczać, że zwiększony stosunek progesteronu do estradiolu zaburza

wazodylatację w PE i wydaje się być przyczyną zaburzenia równowagi pomiędzy produkcją tromboksanu i prostacykliny w tym schorzeniu (47,48).

Doświadczenia przeprowadzone w obecnej pracy wykazały, że syntetyczny analog wodoronadtlenków lipidowych, jakim jest wodoronadtlenek kumenu, ulega metabolizmowi do wolnych rodników, które dalej indukują peroksydację lipidów i cytotoksyczność w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Wykazano również, że w metabolizmie wodoronadtlenku kumenu uczestniczy cytochrom P450_{arom}. Stwierdzono, że stres oksydacyjny indukowany przez CumOOH prowadzi do hamowania aktywności aromatazy w tych komórkach, i tym samym prawdopodobnie do destrukcji cytochromu P450_{arom}. Na podstawie uzyskanych wyników można sugerować, że naturalnie występujące wodoronadtlenki lipidowe również będą wspierać proces peroksydacji lipidów oraz stres oksydacyjny i w konsekwencji hamować aktywność aromatazy w łożysku ludzkim. Może to prowadzić do spadku poziomu estrogenów w czasie ciąży, co dalej może odgrywać pewną rolę w patomechanizmie preeclampsii.

6. WNIOSKI

1. Wodoronadtlenek kumenu indukuje stres oksydacyjny i znaczną cytotoksyczność w komórkach JAR *choriocarcinoma*.
2. Metabolizm wodoronadtlenku kumenu, poprzez wytwarzanie wolnych rodników, prowadzi do wzrostu peroksydacji lipidów w tych komórkach.
3. Powstające na skutek metabolizmu wodoronadtlenku kumenu wolne rodniki, jak również, powstające w dalszym etapie, lipidowe rodniki nadtlenkowe, mogą prowadzić do destrukcji cytochromu P450_{arom} i tym samym hamowania aktywności aromatazy.
4. Ochronny wpływ antyoksydantów na stres oksydacyjny indukowany przez wodoronadtlenek kumenu, potwierdza wpływ wolnych rodników na aktywność aromatazy w komórkach JAR *choriocarcinoma*.
5. Jony żelaza uczestniczą w mechanizmie stresu oksydacyjnego indukowanego przez wodoronadtlenek kumenu.
6. Na podstawie otrzymanych wyników można sądzić, że warunki, prowadzące do wzrostu poziomu wolnych rodników lipidowych, mogą być przyczyną zaburzeń we właściwym przebiegu biosyntezy estrogenów w łożysku ludzkim.

7. STRESZCZENIE

Łożysko ludzkie jest istotnym źródłem wodoronadtlenków lipidowych w czasie ciąży. W stanie przedrzucawkowym stres oksydacyjny, a tym samym poziom wodoronadtlenków lipidowych, jest znacznie zwiększony w porównaniu do ciąży prawidłowej.

W obecnej pracy wykazano, że wodoronadtlenek kumenu powoduje silny stres oksydacyjny i peroksydację lipidów w komórkach JAR *choriocarcinoma*. Na skutek destrukcyjnych zmian spowodowanych przez wodoronadtlenek kumenu dochodzi do hamowania aktywności aromatazy w komórkach JAR. Przyczyną spadku aktywności aromatazy w tym przypadku jest hamowanie aktywności cytochromu P450_{arom}, co wykazano przez zastosowanie inhibitorów cytochromu P450 (α -naftoflawon, ketokonazol, SKF525A). Wykazano również, że zablokowanie miejsca aktywnego aromatazy przez te inhibitory zapobiegało metabolizmowi wodoronadtlenku kumenu i chroniło aromatazę przed destrukcyjnym działaniem stresu oksydacyjnego.

Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że mechanizm stresu oksydacyjnego indukowanego przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR ma charakter wolnorodnikowy i zależy od obecności, powstających na skutek metabolizmu CumOOH, wolnych rodników kumoksyłowych oraz metylowych i w dalszym etapie aktywnych rodników nadtlenkowych. Potwierdziły to badania z zastosowaniem antyoksydantów α -tokoferolu i BHT, które wykazywały działanie ochronne i zapobiegały zmianom destrukcyjnym, powstałym na skutek stresu oksydacyjnego, w komórkach *choriocarcinoma*.

Zbadano również, że w mechanizmie stresu oksydacyjnego indukowanego przez wodoronadtlenek kumenu w komórkach JAR, odgrywają rolę jony żelaza uwalniane najprawdopodobniej na skutek destrukcji cytochromu P450_{arom}. Dowiodły tego badania z zastosowaniem chelatora żelaza - desferoksaminy. Chroniła ona komórki *choriocarcinoma* przed cytotoksycznością i częściowo przed stresem oksydacyjnym indukowanym przez CumOOH. Co więcej chelator ten wykazywał również częściowy, ochronny wpływ na aktywność aromatazy hamowaną przez wodoronadtlenek kumenu.

Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że cytochrom P450 aromatazy uczestniczy w metabolizmie naturalnie występujących wodoronadtlenków lipidowych i powstawaniu wolnych rodników, przyczyniając się w ten sposób do

nasilenia stresu oksydacyjnego w łożysku. Uzyskane w tej pracy wyniki pozwalają przypuszczać, że hamowanie aktywności aromatazy i tym samym obniżenie poziomu estrogenów w łożysku ludzkim może odgrywać istotną rolę w rozwoju stanu przedrzucawkowego.

8. PIŚMIENNICTWO

1. Miller WL. Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology* 2005;**146**:2544-50.
2. Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W. X-ray structure of human aromatase reveals an androgen-specific active site. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;**118**:197-202.
3. Hong Y, Li H, Yuan YC, Chen S. Sequence-function correlation of aromatase and its interaction with reductase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;**118**:203-6.
4. Hong Y, Li H, Yuan YC, Chen S. Molecular characterization of aromatase. *Ann N Y Acad Sci* 2009;**1155**:112-20.
5. Brueggemeier RW, Hackett JC, Diaz-Cruz ES. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocr Rev* 2005;**26**:331-45.
6. Bulun SE, Lin Z, Imir G, Amin S, Demura M, Yilmaz B, Martin R, Utsunomiya H, Thung S, Gurates B, Tamura M, Langoi D, Deb S. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacol Rev* 2005;**57**:359-83.
7. Chen D, Reierstad S, Lu M, Lin Z, Ishikawa H, Bulun SE. Regulation of breast cancer-associated aromatase promoters. *Cancer Lett* 2009;**273**:15-27.
8. Simpson ER. Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;**86**:225-30.
9. Sebastian S, Bulun SE. A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**:4600-2.
10. Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C, Jones M. Aromatase--a brief overview. *Annu Rev Physiol* 2002;**64**:93-127.
11. Mendelson CR, Kamat A. Mechanisms in the regulation of aromatase in developing ovary and placenta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;**106**:62-70.
12. Jiang B, Kamat A, Mendelson CR. Hypoxia prevents induction of aromatase expression in human trophoblast cells in culture: potential inhibitory role of the hypoxia-inducible transcription factor Mash-2 (mammalian achaete-scute homologous protein-2). *Mol Endocrinol* 2000;**14**:1661-73.
13. Corbin CJ, Graham-Lorence S, McPhaul M, Mason JJ, Mendelson CR, Simpson ER. Isolation of a full-length cDNA insert encoding human aromatase system cytochrome P-450 and its expression in nonsteroidogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;**85**:8948-52.

14. Jiang B, Mendelson CR. USF1 and USF2 mediate inhibition of human trophoblast differentiation and CYP19 gene expression by Mash-2 and hypoxia. *Mol Cell Biol* 2003;**23**:6117-28.
15. Jiang B, Mendelson CR. O₂ enhancement of human trophoblast differentiation and hCYP19 (aromatase) gene expression are mediated by proteasomal degradation of USF1 and USF2. *Mol Cell Biol* 2005;**25**:8824-33.
16. Imperatore A, Li W, Petraglia F, Challis JR. Urocortin 2 stimulates estradiol secretion from cultured human placental cells: an effect mediated by the type 2 corticotrophin-releasing hormone (CRH) receptor. *Reprod Sci* 2009;**16**:551-8.
17. Cai Z, Kwintkiewicz J, Young ME, Stocco C. Prostaglandin E₂ increases cyp19 expression in rat granulosa cells: implication of GATA-4. *Mol Cell Endocrinol* 2007;**263**:181-9.
18. Attar E, Tokunaga H, Imir G, Yilmaz MB, Redwine D, Putman M, Gurates B, Attar R, Yaegashi N, Hales DB, Bulun SE. Prostaglandin E₂ via Steroidogenic Factor-1 Coordinately Regulates Transcription of Steroidogenic Genes Necessary for Estrogen Synthesis in Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;**94**:623-31.
19. Yanase T, Mu YM, Nishi Y, Goto K, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R, Nawata H. Regulation of aromatase by nuclear receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;**79**:187-92.
20. Nakanishi T, Nishikawa J, Hiromori Y, Yokoyama H, Koyanagi M, Takasuga S, Ishizaki J, Watanabe M, Isa S, Utoguchi N, Itoh N, Kohno Y, Nishihara T, Tanaka K. Trialkyltin compounds bind retinoid X receptor to alter human placental endocrine functions. *Mol Endocrinol* 2005;**19**:2502-16.
21. Hewitt KN, Pratis K, Jones ME, Simpson ER. Estrogen replacement reverses the hepatic steatosis phenotype in the male aromatase knockout mouse. *Endocrinology* 2004;**145**:1842-8.
22. Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Misso ML, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yao S, Simpson ER. Aromatase-deficient (ArKO) mice accumulate excess adipose tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;**79**:3-9.
23. Robertson KM, O'Donnell L, Jones ME, Meachem SJ, Boon WC, Fisher CR, Graves KH, McLachlan RI, Simpson ER. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;**96**:7986-91.
24. Czajka-Oraniec I, Simpson ER. Aromatase research and its clinical significance. *Endokrynol Pol* 2010;**61**:126-34.

25. Van P, I, Goemaere S, Kaufman JM. Bioavailable estradiol and an aromatase gene polymorphism are determinants of bone mineral density changes in men over 70 years of age. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**:3075-81.
26. Li X, Makela S, Streng T, Santti R, Poutanen M. Phenotype characteristics of transgenic male mice expressing human aromatase under ubiquitin C promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;**86**:469-76.
27. Shozu M, Sebastian S, Takayama K, Hsu WT, Schultz RA, Neely K, Bryant M, Bulun SE. Estrogen excess associated with novel gain-of-function mutations affecting the aromatase gene. *N Engl J Med* 2003;**348**:1855-65.
28. Morale MC, L'Episcopo F, Tirollo C, Giaquinta G, Caniglia S, Testa N, Arcieri P, Serra PA, Lupo G, Alberghina M, Harada N, Honda S, Panzica GC, Marchetti B. Loss of aromatase cytochrome P450 function as a risk factor for Parkinson's disease? *Brain Res Rev* 2008;**57**:431-43.
29. Albrecht ED, Pepe GJ. Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocr Rev* 1990;**11**:124-50.
30. Yamada K, Harada N, Honda S, Takagi Y. Regulation of placenta-specific expression of the aromatase cytochrome P-450 gene. Involvement of the trophoblast-specific element binding protein. *J Biol Chem* 1995;**270**:25064-9.
31. Samson M, Labrie F, Luu-The V. Specific estradiol biosynthetic pathway in choriocarcinoma (JEG-3) cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;**116**:154-9.
32. Zhao H, Innes J, Brooks DC, Reierstad S, Yilmaz MB, Lin Z, Bulun SE. A novel promoter controls Cyp19a1 gene expression in mouse adipose tissue. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;**7**:37.
33. Tamada H, Shimizu Y, Inaba T, Kawate N, Sawada T. The effects of the aromatase inhibitor fadrozole hydrochloride on fetuses and uteri in late pregnant rats. *J Endocrinol* 2004;**180**:337-45.
34. Tamada H, Mizuta Y, Kawate N, Inaba T, Sawada T. Delayed implantation induced by fadrozole hydrochloride in rats. *Contraception* 2003;**68**:65-8.
35. Pepe GJ, Albrecht ED. Regulation of functional differentiation of the placental villous syncytiotrophoblast by estrogen during primate pregnancy. *Steroids* 1999;**64**:624-7.
36. Hill M, Parizek A, Jirasek JE, Jirkovska M, Velikova M, Duskova M, Klimkova M, Paskova A, Zizka Z, Germanova A, Koucky M, Kalousova M, Starka L. Is maternal progesterone actually independent of the fetal steroids? *Physiol Res* 2009;**59**:211-24.
37. Thibodeau PA, Kachadourian R, Lemay R, Bisson M, Day BJ, Paquette B. In vitro pro- and antioxidant properties of estrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;**81**:227-36.

38. Ruiz-Larrea MB, Martin C, Martinez R, Navarro R, Lacort M, Miller NJ. Antioxidant activities of estrogens against aqueous and lipophilic radicals; differences between phenol and catechol estrogens. *Chem Phys Lipids* 2000;**105**:179-88.
39. Pedram A, Razandi M, Wallace DC, Levin ER. Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. *Mol Biol Cell* 2006;**17**:2125-37.
40. Reyes MR, Sifuentes-Alvarez A, Lazalde B. Estrogens are potentially the only steroids with an antioxidant role in pregnancy: in vitro evidence. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006;**85**:1090-3.
41. Pepe GJ, Billiar RB, Albrecht ED. Regulation of baboon fetal ovarian folliculogenesis by estrogen. *Mol Cell Endocrinol* 2006;**247**:41-6.
42. Albrecht ED, Pepe GJ. Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy. *Int J Dev Biol* 2009;**54**:397-408.
43. Simpson E, Jones M, Misso M, Hewitt K, Hill R, Maffei L, Carani C, Boon WC. Estrogen, a fundamental player in energy homeostasis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;**95**:3-8.
44. Babischkin JS, Suresch DL, Pepe GJ, Albrecht ED. Differential expression of placental villous angiopoietin-1 and -2 during early, mid and late baboon pregnancy. *Placenta* 2007;**28**:212-8.
45. Albrecht ED, Babischkin JS, Pepe GJ. Regulation of placental villous angiopoietin-1 and -2 expression by estrogen during baboon pregnancy. *Mol Reprod Dev* 2008;**75**:504-11.
46. Bonagura TW, Pepe GJ, Enders AC, Albrecht ED. Suppression of extravillous trophoblast vascular endothelial growth factor expression and uterine spiral artery invasion by estrogen during early baboon pregnancy. *Endocrinology* 2008;**149**:5078-87.
47. Chang K, Lubo Z. Review article: steroid hormones and uterine vascular adaptation to pregnancy. *Reprod Sci* 2008;**15**:336-48.
48. Salas SP, Marshall G, Gutierrez BL, Rosso P. Time course of maternal plasma volume and hormonal changes in women with preeclampsia or fetal growth restriction. *Hypertension* 2006;**47**:203-8.
49. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005;**365**:785-99.
50. Grill S, Rusterholz C, Zanetti-Dallenbach R, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S, Lapaire O. Potential markers of preeclampsia--a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;**7**:70.
51. Mutter WP, Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res* 2008;**75**:1-8.

52. Lyall F, Myatt L. The role of the placenta in pre-eclampsia--a workshop report. *Placenta* 2002;**23**:S142-S145.
53. Roberts JM, Gammill HS. Preeclampsia: recent insights. *Hypertension* 2005;**46**:1243-9.
54. Noris M, Perico N, Remuzzi G. Mechanisms of disease: Pre-eclampsia. *Nat Clin Pract Nephrol* 2005;**1**:98-114.
55. Roberts JM, Hubel CA. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta* 2009;**23**:S32-S37.
56. Mohaupt M. Molecular aspects of preeclampsia. *Mol Aspects Med* 2007;**28**:169-91.
57. Holmes VA, McCance DR. Could antioxidant supplementation prevent pre-eclampsia? *Proc Nutr Soc* 2005;**64**:491-501.
58. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003;**69**:1-7.
59. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005;**308**:1592-4.
60. Cadden KA, Walsh SW. Neutrophils, but not lymphocytes or monocytes, infiltrate maternal systemic vasculature in women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2008;**27**:396-405.
61. Walsh SW. Eicosanoids in preeclampsia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;**70**:223-32.
62. Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab* 2009;**20**:332-40.
63. Jezek P, Hlavata L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;**37**:2478-503.
64. Ullrich R, Hofrichter M. Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cell Mol Life Sci* 2007;**64**:271-93.
65. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;**160**:1-40.
66. Bowen RS, Moodley J, Dutton MF, Theron AJ. Oxidative stress in pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;**80**:719-25.
67. Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids* 2009;**157**:1-11.

68. Niki E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med* 2009;**47**:469-84.
69. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997;**82**:291-5.
70. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr* 1991;**53**:194S-200S.
71. Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res* 1999;**38**:309-36.
72. Darley-Usmar V, Halliwell B. Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharm Res* 1996;**13**:649-62.
73. Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 2006;**1763**:1755-66.
74. Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 2004;**122**:369-82.
75. Webster RP, Roberts VH, Myatt L. Protein nitration in placenta - functional significance. *Placenta* 2008;**29**:985-94.
76. Boutet M, Roland L, Thomas N, Bilodeau JF. Specific systemic antioxidant response to preeclampsia in late pregnancy: the study of intracellular glutathione peroxidases in maternal and fetal blood. *Am J Obstet Gynecol* 2009;**200**:530-7.
77. Poranen AK, Ekblad U, Uotila P, Ahotupa M. Lipid peroxidation and antioxidants in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Placenta* 1996;**17**:401-5.
78. Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reprod Toxicol* 1999;**13**:347-52.
79. Aydin S, Benian A, Madazli R, Uludag S, Uzun H, Kaya S. Plasma malondialdehyde, superoxide dismutase, sE-selectin, fibronectin, endothelin-1 and nitric oxide levels in women with preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;**113**:21-5.
80. Walsh SW, Vaughan JE, Wang Y, Roberts LJ. Placental isoprostane is significantly increased in preeclampsia. *FASEB J* 2000;**14**:1289-96.
81. Atamer Y, Kocyigit Y, Yokus B, Atamer A, Erden AC. Lipid peroxidation, antioxidant defense, status of trace metals and leptin levels in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;**119**:60-6.
82. Sharma JB, Sharma A, Bahadur A, Vimala N, Satyam A, Mittal S. Oxidative stress markers and antioxidant levels in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2006;**94**:23-7.

83. Harma M, Harma M, Erel O. Measurement of the total antioxidant response in preeclampsia with a novel automated method. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;**118**:47-51.
84. Perkins AV. Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006;**46**:77-83.
85. Vaughan JE, Walsh SW. Oxidative stress reproduces placental abnormalities of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2002;**21**:205-23.
86. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;**294**:H541-H550.
87. Hubel CA. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;**222**:222-35.
88. Anari MR, Khan S, O'Brien PJ. The involvement of cytochrome P450 peroxidase in the metabolic bioactivation of cumene hydroperoxide by isolated rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol* 1996;**9**:924-31.
89. Weiss RH, Estabrook RW. The mechanism of cumene hydroperoxide-dependent lipid peroxidation: the function of cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys* 1986;**251**:348-60.
90. Klimek J, Wozniak M, Szymanska G, Zelewski L. Inhibitory effect of free radicals derived from organic hydroperoxide on progesterone synthesis in human term placental mitochondria. *Free Radic Biol Med* 1998;**24**:1168-75.
91. Milczarek R, Sokolowska E, Hallmann A, Kaletha K, Klimek J. NADPH- and iron-dependent lipid peroxidation inhibit aromatase activity in human placental microsomes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;**110**:230-5.
92. Klimek J. Cytochrome P-450 involvement in the NADPH-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1990;**1044**:158-64.
93. Gallo M, Aragno M, Gatto V, Tamagno E, Brignardello E, Manti R, Danni O, Boccuzzi G. Protective effect of dehydroepiandrosterone against lipid peroxidation in a human liver cell line. *Eur J Endocrinol* 1999;**141**:35-9.
94. Jakubowski W, Bartosz G. 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biol Int* 2000;**24**:757-60.
95. Tampo Y, Kotamraju S, Chitambar CR, Kalivendi SV, Keszler A, Joseph J, Kalyanaraman B. 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**:56-63.

96. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in Biology and Medicine. *Oxford University Press, Oxford, New York* 1999.
97. Linden A, Gulden M, Martin HJ, Maser E, Seibert H. Peroxide-induced cell death and lipid peroxidation in C6 glioma cells. *Toxicol In Vitro* 2008;**22**:1371-6.
98. Drenth HJ, Bouwman CA, Seinen W, Van den BM. Effects of some persistent halogenated environmental contaminants on aromatase (CYP19) activity in the human choriocarcinoma cell line JEG-3. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;**148**:50-5.
99. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;**72**:248-54.
100. Fukuzawa K. Dynamics of lipid peroxidation and antioxidion of alpha-tocopherol in membranes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2008;**54**:273-85.
101. Fujisawa S, Kadoma Y, Yokoe I. Radical-scavenging activity of butylated hydroxytoluene (BHT) and its metabolites. *Chem Phys Lipids* 2004;**130**:189-95.
102. Chen HW, Chiang T, Wang CY, Lii CK. Inhibition of tert-butyl hydroperoxide-induced cell membrane bleb formation by alpha-tocopherol and glutathione. *Food Chem Toxicol* 2000;**38**:1089-96.
103. Kaneko T, Baba N, Matsuo M. Cytotoxicity of phosphatidylcholine hydroperoxides is exerted through decomposition of fatty acid hydroperoxide moiety. *Free Radic Biol Med* 1996;**21**:173-9.
104. Barr DP, Martin MV, Guengerich FP, Mason RP. Reaction of cytochrome P450 with cumene hydroperoxide: ESR spin-trapping evidence for the homolytic scission of the peroxide O-O bond by ferric cytochrome P450 1A2. *Chem Res Toxicol* 1996;**9**:318-25.
105. Van der ZJ, Barr DP, Mason RP. ESR spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and tert-Butyl hydroperoxide. *Free Radic Biol Med* 1996;**20**:199-206.
106. Shimizu T, Murakami Y, Hatano M. Glu318 and Thr319 mutations of cytochrome P450 1A2 remarkably enhance homolytic O-O cleavage of alkyl hydroperoxides. An optical absorption spectral study. *J Biol Chem* 1994;**269**:13296-304.
107. France JT, Mason JI, Magness RR, Murry BA, Rosenfeld CR. Ovine placental aromatase: studies of activity levels, kinetic characteristics and effects of aromatase inhibitors. *J Steroid Biochem* 1987;**28**:155-60.

108. Pasanen M. Human placental aromatase activity: use of a C18 reversed-phase cartridge for separation of tritiated water or steroid metabolites in placentas from both smoking and non-smoking mothers in vitro. *Biol Res Pregnancy Perinatol* 1985;**6**:94-9.
109. Pelissero C, Lenczowski MJ, Chinzi D, Davail-Cuisset B, Sumpter JP, Fostier A. Effects of flavonoids on aromatase activity, an in vitro study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996;**57**:215-23.
110. Zharikova OL, Fokina VM, Nanovskaya TN, Hill RA, Mattison DR, Hankins GD, Ahmed MS. Identification of the major human hepatic and placental enzymes responsible for the biotransformation of glyburide. *Biochem Pharmacol* 2009;**78**:1483-90.
111. Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S, Satoh T. Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* 2003;**123**:369-75.
112. Nanovskaya TN, Deshmukh SV, Nekhayeva IA, Zharikova OL, Hankins GD, Ahmed MS. Methadone metabolism by human placenta. *Biochem Pharmacol* 2004;**68**:583-91.
113. Deshmukh SV, Nanovskaya TN, Ahmed MS. Aromatase is the major enzyme metabolizing buprenorphine in human placenta. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;**306**:1099-105.
114. Deshmukh SV, Nanovskaya TN, Hankins GD, Ahmed MS. N-demethylation of levo-alpha-acetylmethadol by human placental aromatase. *Biochem Pharmacol* 2004;**67**:885-92.
115. Milczarek R, Sokolowska E, Hallmann A, Klimek J. The NADPH- and iron-dependent lipid peroxidation in human placental microsomes. *Mol Cell Biochem* 2007;**295**:105-11.
116. Puntarulo S, Cederbaum AI. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic Biol Med* 1998;**24**:1324-30.
117. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005;**12**:1161-208.
118. Dayani PN, Bishop MC, Black K, Zeltzer PM. Desferoxamine (DFO)--mediated iron chelation: rationale for a novel approach to therapy for brain cancer. *J Neurooncol* 2004;**67**:367-77.
119. Acromite MT, Mantzoros CS, Leach RE, Hurwitz J, Dorey LG. Androgens in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999;**180**:60-3.

120. Carlsen SM, Romundstad P, Jacobsen G. Early second-trimester maternal hyperandrogenemia and subsequent preeclampsia: a prospective study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005;**84**:117-21.
121. Troisi R, Potischman N, Roberts JM, Ness R, Crombleholme W, Lykins D, Siiteri P, Hoover RN. Maternal serum oestrogen and androgen concentrations in preeclamptic and uncomplicated pregnancies. *Int J Epidemiol* 2003;**32**:455-60.
122. Atamer Y, Erden AC, Demir B, Kocyigit Y, Atamer A. The relationship between plasma levels of leptin and androgen in healthy and preeclamptic pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;**83**:425-30.
123. Salamalekis E, Bakas P, Vitoratos N, Eleptheriadis M, Creatsas G. Androgen levels in the third trimester of pregnancy in patients with preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;**126**:16-9.
124. Serin IS, Kula M, Basbug M, Unluhizarci K, Gucer S, Tayyar M. Androgen levels of preeclamptic patients in the third trimester of pregnancy and six weeks after delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;**80**:1009-13.
125. Jones ME, Boon WC, McInnes K, Maffei L, Carani C, Simpson ER. Recognizing rare disorders: aromatase deficiency. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007;**3**:414-21.