

Anna Hallmann

**OCENA CYTOTOKSYCZNEGO DZIAŁANIA
MENADIONU, WODORONADTLENKU
TERT-BUTYLU I NADTLENKU WODORU
W KOMÓRKACH *CHORIOCARCINOMA***

Rozprawa doktorska została wykonana
w Katedrze i Zakładzie Biochemii
Farmaceutycznej Akademii Medycznej
w Gdańsku

Praca dotowana z ST-40 i W-914

Promotor pracy:
Prof. dr hab. Jerzy Klimek

Gdańsk 2008

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	4
1. WSTĘP	7
1.1 REAKTYWNE FORMY TLENU	7
1.1.1 Powstawanie reaktywnych form tlenu i wolnych rodników.....	7
1.1.2 Źródła wolnych rodników.....	8
1.1.3 Efekty działania reaktywnych form tlenu.....	15
1.1.4 Obrona komórek przed RFT.....	21
1.2 DZIAŁANIE MENADIONU, WODORONADTLENKU <i>TERT</i>-BUTYLU I NADTLENKU WODORU	27
1.2.1 Menadion.....	27
1.2.2 Wodoronadtlenek <i>tert</i> -butylu.....	29
1.2.3 Nadtlenek wodoru.....	31
1.3 ROLA REAKTYWNYCH FORM TLENU W PATOLOGII CIĄŻY	32
1.3.1 Budowa i funkcje łożyska.....	32
1.3.2 Łožysko jako źródło wolnych rodników.....	33
2. CEL PRACY	36
3. MATERIAŁY I METODY	37
3.1 Hodowla komórek.....	37
3.2 Protokół postępowania.....	37
3.3 Przeżywalność.....	37
3.3.1. <i>Pomiar uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (LDH)</i>	37
3.3.2 <i>Pomiar poziomu ATP</i>	38
3.3.3 <i>Ocena apoptozy i nekrozy testem Annexin-V FITC Apoptosis Kit</i>	38
3.3.4 <i>Badanie morfometryczne z użyciem mikroskopu konfokalnego</i>	40
3.3.5 <i>Badanie morfometryczne z użyciem mikroskopu elektronowego</i>	40
3.4 Pomiar stresu oksydacyjnego.....	41
3.4.1 <i>Pomiar poziomu wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (RTF) metodą cytometrii przepływowej</i>	41
3.4.2 <i>Pomiar peroksydacji lipidów</i>	42
3.5. Pomiar aktywności enzymatycznej enzymów antyoksydacyjnych i zaangażowanych w metabolizm GSH i ATP.....	43

3.6	Pomiar stężenia GSH.....	45
3.7	Metody statystyczne.....	46
3.8	Odczynniki.....	46
4.	WYNIKI.....	48
4.1	Wpływ menadionu, wodoronadtlenku <i>tert</i> -butylu i nadtlenku wodoru na przeżywalność komórek linii JAR.....	48
4.1.1	<i>Wpływ menadionu, wodoronadtlenku tert-butylu i nadtlenku wodoru na uwalnianie LDH i stężenie ATP w komórkach JAR.....</i>	<i>48</i>
4.1.2	<i>Detekcja apoptozy i nekrozy metodą cytometrii przepływowej w komórkach choriocarcinoma poddanych działaniu menadionu, wodoronadtlenku tert-butylu i nadtlenku wodoru.....</i>	<i>50</i>
4.1.3	<i>Morfometria komórek JAR inkubowanych w obecności menadionu, wodoronadtlenku tert-butylu i nadtlenku wodoru przy użyciu mikroskopii elektronowej.....</i>	<i>54</i>
4.2	Indukcja stresu oksydacyjnego w komórkach <i>choriocarcinoma</i> traktowanych menadionem, wodoronadtlenkiem <i>tert</i> -butylu i nadtlenkiem wodoru.....	60
4.2.1	<i>Wpływ menadionu, wodoronadtlenku tert-butylu i nadtlenku wodoru na produkcję wewnątrzkomórkowych wolnych rodników w komórkach JAR.....</i>	<i>60</i>
4.2.2	<i>Wpływ menadionu, wodoronadtlenku tert-butylu i nadtlenku wodoru na proces peroksydacji lipidów w komórkach JAR.....</i>	<i>62</i>
4.3	Wpływ menadionu, wodoronadtlenku <i>tert</i> -butylu i nadtlenku wodoru na odpowiedź antyoksydacyjną komórek <i>choriocarcinoma</i>	64
4.3.1	<i>Wpływ menadionu, wodoronadtlenku tert-butylu i nadtlenku wodoru na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w komórkach JAR.....</i>	<i>64</i>
4.3.2	<i>Wpływ menadionu, wodoronadtlenku tert-butylu i nadtlenku wodoru na stężenie glutationu w komórkach choriocarcinoma.....</i>	<i>67</i>
4.3.3	<i>Wpływ menadionu, wodoronadtlenku tert-butylu i nadtlenku wodoru na aktywność enzymów: dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w komórkach kosmówczaka.....</i>	<i>69</i>
4.3.4	<i>Morfometria komórek choriocarcinoma poddanych działaniu menadionu, wodoronadtlenku tert-butylu i nadtlenku wodoru przy użyciu mikroskopii konfokalnej... ..</i>	<i>72</i>
4.4	Antyoksydacyjne działanie N-acetylocysteiny w komórkach JAR poddanych działaniu menadionu, wodoronadtlenku <i>tert</i> -butylu i nadtlenku wodoru.....	76
5.	DYSKUSJA.....	79
5.1	Wpływ menadionu na komórki <i>choriocarcinoma</i>	79
5.2	Wpływ wodoronadtlenku <i>tert</i> -butylu na komórki <i>choriocarcinoma</i>	84
5.3	Wpływ nadtlenku wodoru na komórki <i>choriocarcinoma</i>	89
6.	WNIOSKI.....	94
7.	STRESZCZENIE.....	95
8.	PIŚMIENNICTWO.....	96

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

143B – linia komórek *osteosarcoma*

4-HNE - 4-hydroksynonenal

6PGDH - dehydrogenaza 6-fosfoglukonianowa

8-OHdG - 8-hydroksy-deoksyguanozyna

Arp2/3 - białka wspomagające polimeryzację aktyny (ang. *actin-related proteins*)

ATP - adozynotryfosforan

CAT - katalaza

cGPx - cytozolowa peroksydaza glutationowa

CMXRos - chlorometylo-X-rosamina (synonim: Mito Tracker Red), wiąże się z mitochondriami

CYP19 - aromataza

cyt P450 - cytochrom P450

DDSA – bezwodnik kwasu dodecynylobursztynianowego

DMP-30 - 2,4,6-tri(dimetyloaminometylo)-fenol

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy

EDTA - etylenodiaminotetraoctan sodowy

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

EGFR – receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu

FAD - dinukleotyd flawinoadeninowy

FADH₂ - zredukowany dinukleotyd flawinoadeninowy

FITC-Phalloidin – fluoresceinylo-aminometylditylano-falloidyna, wiąże się z F-aktyną

FMN - mononukleotyd flawinoadeninowy

FBS - płodowa surowica bydlęca

GAPDH - dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

G-6-PDH - dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa

GPx - peroksydaza glutationowa

GS[•] - rodnik glutationylowy

GSH - glutation zredukowany

GS-MEN - koniugat glutationu z menadionem

GSSG - glutation utleniony

GSSGH[•] - dimerowy rodnik glutationylowy

GSSOO[•] - rodnik nadtlenku glutationu

GSSOOH - nadtlenek glutationu

GTP - guanozotryfosforan

H₂O₂ - nadtlenek wodoru

HNE-SG - koniugat glutationu z 4-hydroksynonenalem

JAR - linia komórkowa *choriocarcinoma*

j.u. - jednostki umowne

LH - wielonienasycony kwas tłuszczowy

LOOH - nadtlenki (wodoronadtlenki) kwasów tłuszczowych

LC-MS/MS - tandemowy spektrometr masowy połączony z wysokosprawną chromatografią cieczą (ang. *liquid chromatography-mass spectrometry*)

LDH - dehydrogenaza mleczanowa

LOXs - lipooksygenazy

MAPK - kinazy białkowe aktywowane mitogenem (ang. *mitogen-activated protein kinases*)

MDA - dialdehyd malonowy

MEN - menadion

mRNA - matrycowy kwas rybonukleinowy

MRP - transportowe białko oporności wielolekowej (ang. *multidrug-resistance protein*)

NAC - N-acetylocysteina

NADP⁺ - fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (forma utleniona)

NADPH - fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (forma zredukowana)

NFκB - jądrowy czynnik transkrypcyjny κB

NMA - bezwodnik metylonorborneno-2,3-dikarboksylowy

NOS - syntaza tlenu azotu

PI - jodek propidyny

Rac1 - białko należące do rodziny białek Rho wiążących GTP (ang. *ras related C3 botulinum toxin substrate*), zaangażowane między innymi w organizację filamentów aktynowych

ROOH - nadtlenki (wodoronadtlenki) lipidowe

RFT - reaktywne formy tlenu

RFA - reaktywne formy azotu

RPMI-1640 - środowisko do hodowli komórek (ang. *Roswell Park Memorial Institute*)

SD - odchylenie standardowe

-SH - grupy sulfhydrylowe białek

SOD - dysmutaza ponadtlenkowa

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

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

Tris - trihydroksymetyloaminometan

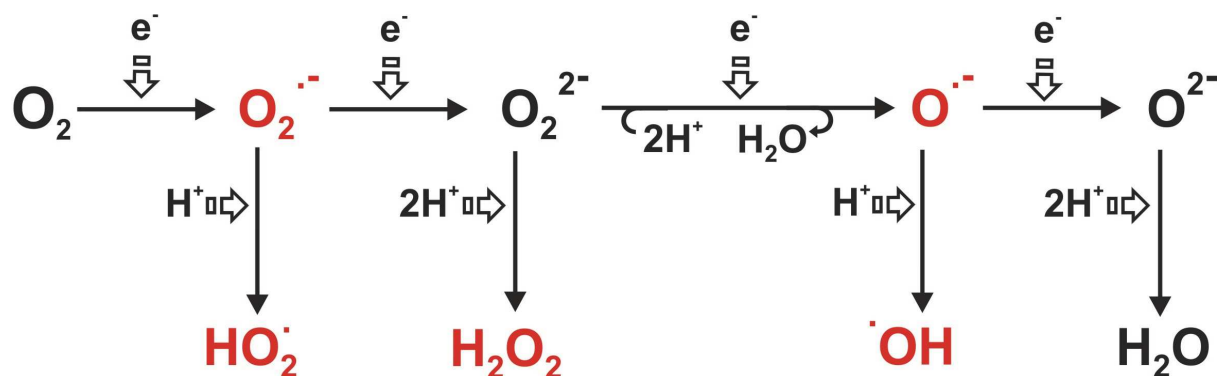
WAVE - białka zaangażowane w adhezję, endocytozę i migrację komórek (ang. *verprolin homologous protein*)

1. WSTĘP

1.1 REAKTYWNE FORMY TLENU (RFT)

1.1.1 Powstawanie reaktywnych form tlenu i wolnych rodników.

Reaktywnymi formami tlenu nazywamy związki tlenu wykazujące większą reaktywność niż tlen cząsteczkowy w stanie trypletowym (podstawowym). Tlen cząsteczkowy ulega redukcji w stopniowym procesie podzielonym na cztery jednoelektronowe etapy. Reaktywne formy tlenu są pośrednimi produktami kolejnych etapów redukcji tlenu (Ryc.1).



Ryc. 1 Etapy powstawania reaktywnych form tlenu. Zastosowane skróty: O_2 – tlen cząsteczkowy, $O_2^{\cdot-}$ - anionorodnik ponadtlenkowy, O_2^{2-} - anion ponadtlenkowy, $O^{\cdot-}$ - rodnik tlenkowy, O^{2-} - anion tlenkowy, H_2O_2 – nadtlenek wodoru, HO_2^{\cdot} – rodnik wodoronadtlenowy, $\cdot OH$ - rodnik wodorotlenowy, H_2O - woda

Do grupy RFT pośredniczących w toksycznym działaniu tlenu należą wolne rodniki tlenowe: $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, HO_2^{\cdot} , tlen singletowy i wolne rodniki azotowe: tlenek azotu NO^{\cdot} , dwutlenek azotu NO_2^{\cdot} , oraz formy o charakterze nierodnikowym: nadtlenek wodoru H_2O_2 , kwas nadtlenoazotawy $OONO$ H, kwas podchlorawy $HOCl$ i podtiocyjanawy HO SCN. Za reaktywne formy tlenu uważa się też kompleksy tlenu i żelaza: rodnik ferrylowy $Fe=O^{2+}$ i rodnik nadferrylowy $Fe=O^{3+}$. Także reakcje RFT ze związkami organicznymi prowadzą do powstania wolnych rodników substancji organicznych. Do tej rodziny rodników zaliczamy między innymi: rodnik alkoksylowy RO^{\cdot} i nadtlenkowy ROO^{\cdot} , rodnik semichinonowy H -Ch $^{\cdot}$ i anionorodnik semichinonowy $Ch^{\cdot-}$ oraz formy pokrewne RFT o charakterze nierodnikowym, takie jak kwas podjodawy IOH , kwas podchlorawy $ClOH$ czy też kwas podbromawy $BrOH$ i inne.

Wolne rodniki powstają na skutek reakcji inicjacji, do których należą jednoelektronowe reakcje redoks oraz homoliza (rozpad homolityczny), jak również radioliza,

fotoliza i sonoliza związków chemicznych. Inny typ reakcji umożliwiający powstawanie wolnych rodników to reakcje prolongacji, gdzie następuje przeniesienie atomu lub grupy atomów i dochodzi do addycji wolnego rodnika do cząsteczki (istotne znaczenie mają reakcje addycji do wiązań podwójnych), czy też następuje β -eliminacja czyli rozerwanie wiązania w położeniu beta względem niesparowanego elektronu w cząsteczce przekształcanej w wolny rodnik. Łańcuch prolongacji reakcji wolnorodnikowych zostaje zakończony w reakcji terminacji, co może prowadzić do powstania nowego wiązania kowalencyjnego pozbawiającego aktywności biologicznej danej cząsteczki. Powstawanie zaś rodników organicznych może zachodzić w wyniku jednoelektronowego utleniania związków chemicznych przez tlen cząsteczkowy, bądź oddziaływania wolnych rodników tlenowych (głównie anionorodnika ponadtlenkowego i rodnika wodorotlenowego) z substancjami organicznymi obecnymi w komórce. Powstałe w ten sposób rodniki białek, lipidów, węglowodanów i kwasów nukleinowych są wysoce i niespecyficznymi reaktywne, przez co zaburzają prawidłowe działanie szlaków metabolicznych w komórce [1].

1.1.2 Źródła wolnych rodników.

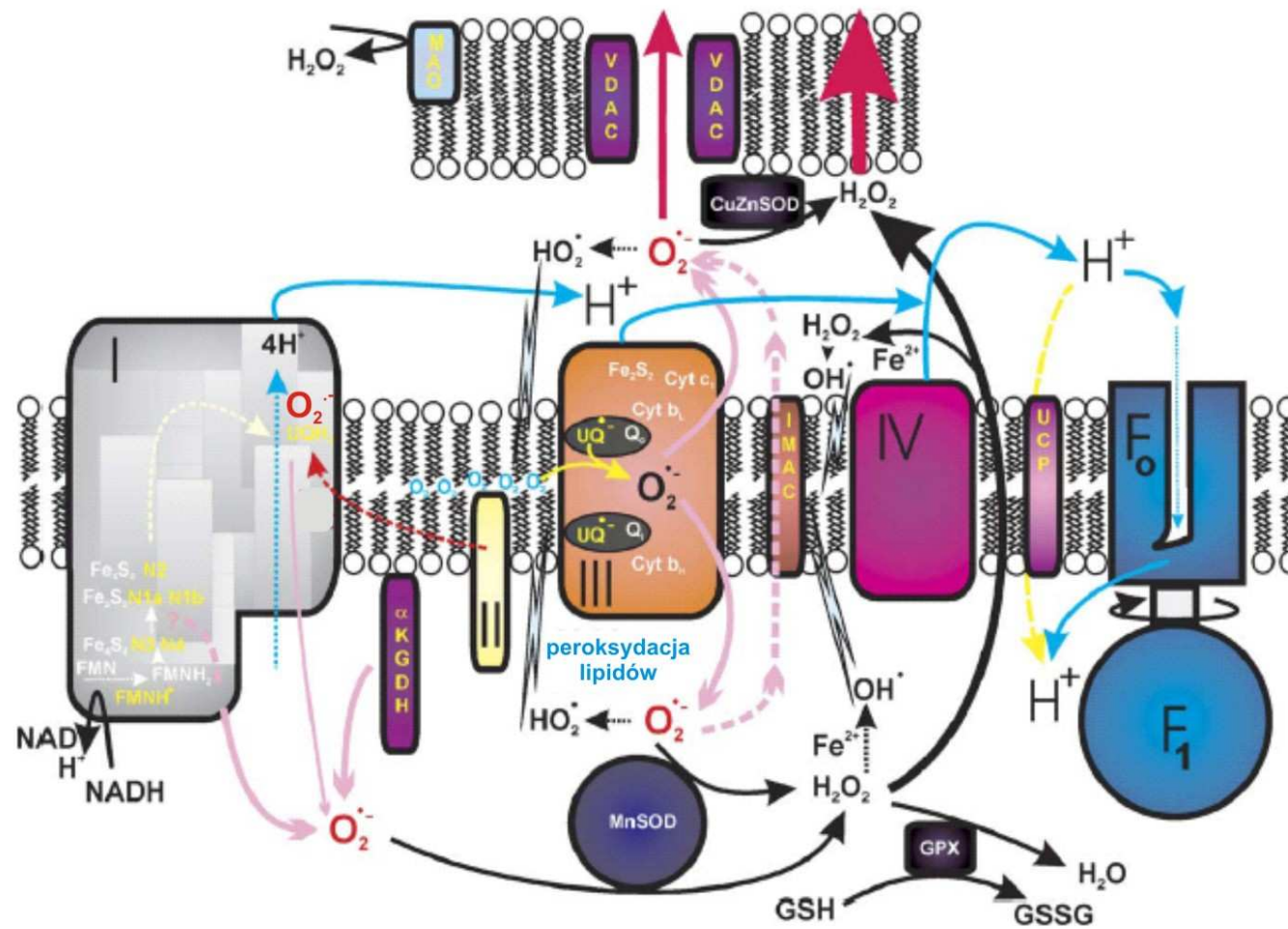
Wolne rodniki i reaktywne formy tlenu mogą powstać na skutek czynników fizycznych, takich jak promieniowanie jonizujące i ultrafioletowe, ultradźwięki czy też kontakt z fotosensybilizatorem. Znacznie istotniejsze są wewnątrzkomórkowe źródła RFT, gdzie wolne rodniki powstają podczas jednoelektronowego utleniania zredukowanych form wielu związków przez tlen cząsteczkowy oraz w wyniku szeregu reakcji enzymatycznych.

Jednym z głównych miejsc powstawania wolnych rodników w komórce jest mitochondrium, a dokładnie mitochondrialny łańcuch oddechowy (Ryc. 2). W trakcie transportu elektronów przez kompleksy białek łańcucha jest stale generowany anionorodnik ponadtlenkowy. Głównymi elementami łańcucha odpowiedzialnymi za „przeciekanie” elektronów i redukcję tlenu są oksydoreduktaza NADH-CoQ (EC 1.6.5.3) i ubichinon. W kompleksie I, RFT mogą powstawać w czasie prawidłowego funkcjonowania łańcucha oddechowego, w czasie inhibicji przez rotenon, jak również podczas odwrotnego transportu elektronów czyli wbrew potencjałowi oksydoredukcyjnemu przenośników elektronów [2]. Kompleks II łańcucha również może produkować anionorodnik ponadtlenkowy ale w warunkach niedotlenienia, kiedy dehydrogenaza bursztynianowa (EC 1.3.5.1) działa jako reduktor i fumaran staje się akceptorem elektronów z ubichinonu. Enzymy mitochondrialne zlokalizowane w matriks mitochondrialnym też są zaangażowane w produkcję RFT: na przykład enzymy kompleksu dehydrogenazy α -ketoglutaranowej: dehydrogenaza liponianowa

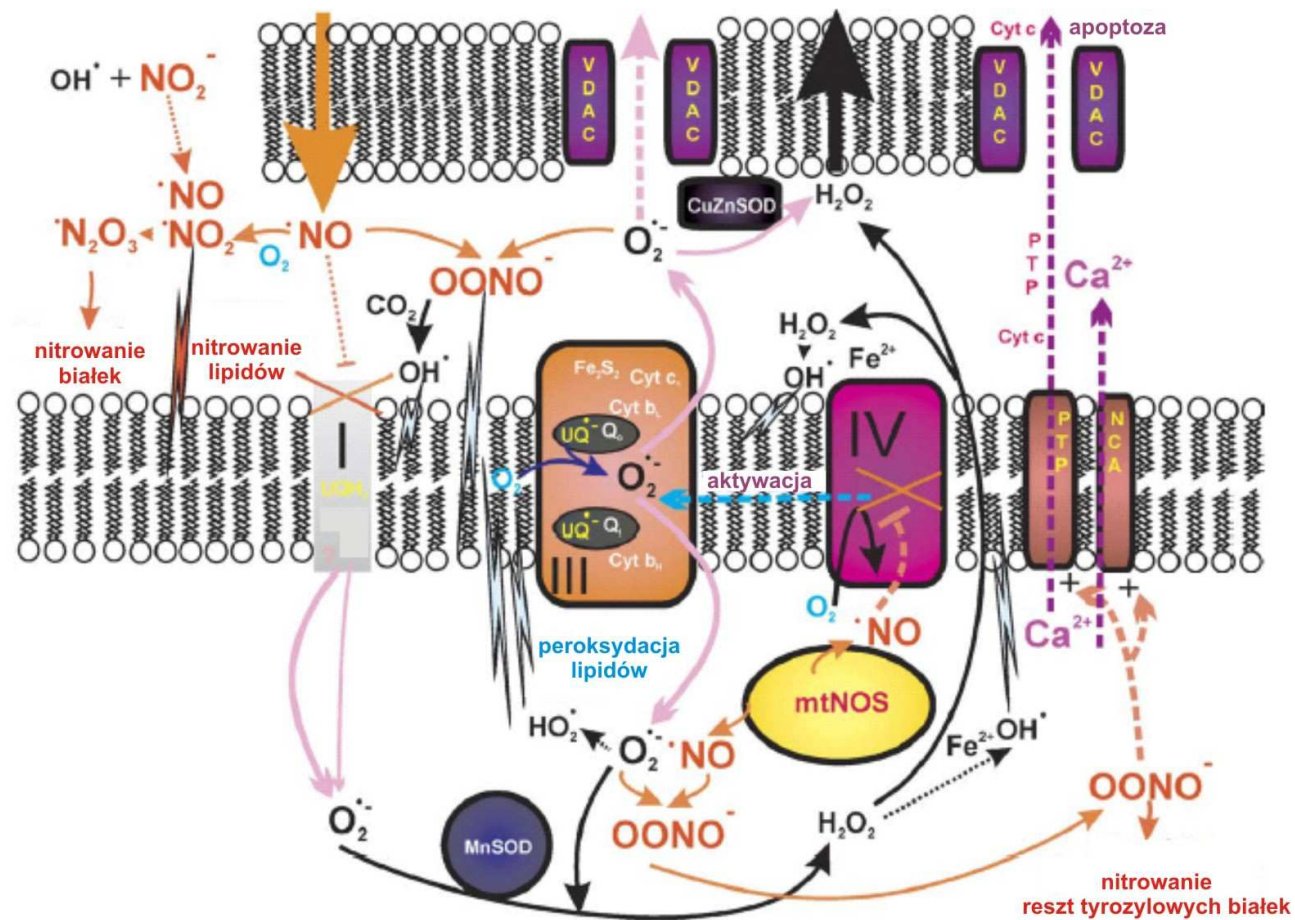
(EC 1.6.4.3) i acetylotransferaza dihydroliponianowa (EC 2.3.1.12) mogą generować duże ilości anionorodnika ponadtlenkowego (Ryc. 2A) [3]. Natomiast akonitaza (EC 4.2.1.3) ulega inaktywacji przez $O_2^{\bullet -}$ w wyniku utlenienia jej żelazo-siarkowego centrum aktywnego. Nieaktywna akonitaza staje się źródłem rodnika wodorotlenowego w tworzeniu którego uczestniczy jon Fe^{2+} . Anionorodnik ponadtlenkowy jest też generowany przez flawoproteinę zakotwiczoną w błonie wewnętrznej mitochondrium, a mianowicie przez dehydrogenazę glicerolo-3-fosforanową (EC 1.1.1.8). Dzięki obecności w mitochondriach manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD, EC 1.15.1.1) generowany przez enzymy łańcucha oddechowego i inne białka anionorodnik ponadtlenkowy ulega dysmutacji do nadtlenu wodoru. Także monoaminooksydaza (MAO EC 1.4.3.4), związana z zewnętrzną błoną mitochondrialną, utleniająca specyficzne neurotransmitery jest potencjalnym źródłem H_2O_2 w mitochondrium (Ryc. 2A).

Biochemicznym paradoksem wydaje się powstawanie reaktywnych form tlenu w mitochondriach w stanie niedotlenienia komórki. Warunki hypoksji mogą powodować sprzężenie zwrotne obniżając tempo przepływu elektronów przez łańcuch oddechowy i prowadząc tym samym do zwiększenia produkcji $O_2^{\bullet -}$, głównie przez kompleks III łańcucha oddechowego. Dodatkowo, podczas warunków niedotlenienia wzrasta aktywność mitochondrialnej syntazy tlenku azotu (mt NOS, EC 1.14.13.39), prowadząc do wzrostu stężenia NO^{\bullet} , który hamuje aktywność oksydazy cytochromowej (EC 1.9.3.1). Ta inhibicja prowadzi do częściowego wzrostu ciśnienia O_2 w środowisku mitochondrialnym i przez to zwiększonej produkcji anionorodnika ponadtlenkowego [3].

Mitochondria stanowią źródło także reaktywnych form azotu i rodników azotowych. Przez wspomnianą już syntazę tlenku azotu jest produkowany tlenek azotu. Tlenek azotu w reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym prowadzi do powstania nadtlenoazotynu ($ONOO^-$). Nadtlenoazotyn jest wysoce reaktywną formą azotu, który z łatwością utlenia glutation, metioninę, askorbinian, puryny i pirymidyny. Ma zdolność inicjowania procesu peroksydacji lipidów, jak również hamuje aktywność I, II i IV kompleksu łańcucha oddechowego. W mitochondriach powstaje też dwutlenek azotu (NO^{\bullet}_2) w reakcji z azotu z rodnikiem wodorotlenowym ($^{\bullet}OH$). Dwutlenek azotu utlenia i nitruje wiele istotnych biomolekół w tym wielonienasycone kwasy tłuszczowe, pojedyncze aminokwasy i całe białka (Ryc. 2B) [3].



Ryc. 2A Główne źródła mitochondrialnych reaktywnych form tlenu. Schemat zaczerpnięto z pracy Jezeka i Hlavaty [3]. Opis ryciny na stronie 12.



Ryc. 2B Główne źródła mitochondrialnych reaktywnych form azotu. Schemat zaczerpnięto z pracy Jezeka i Hlavaty [3]. Opis ryciny na stronie 12.

Ryc. 2A Główne źródła mitochondrialnych reaktywnych form tlenu.

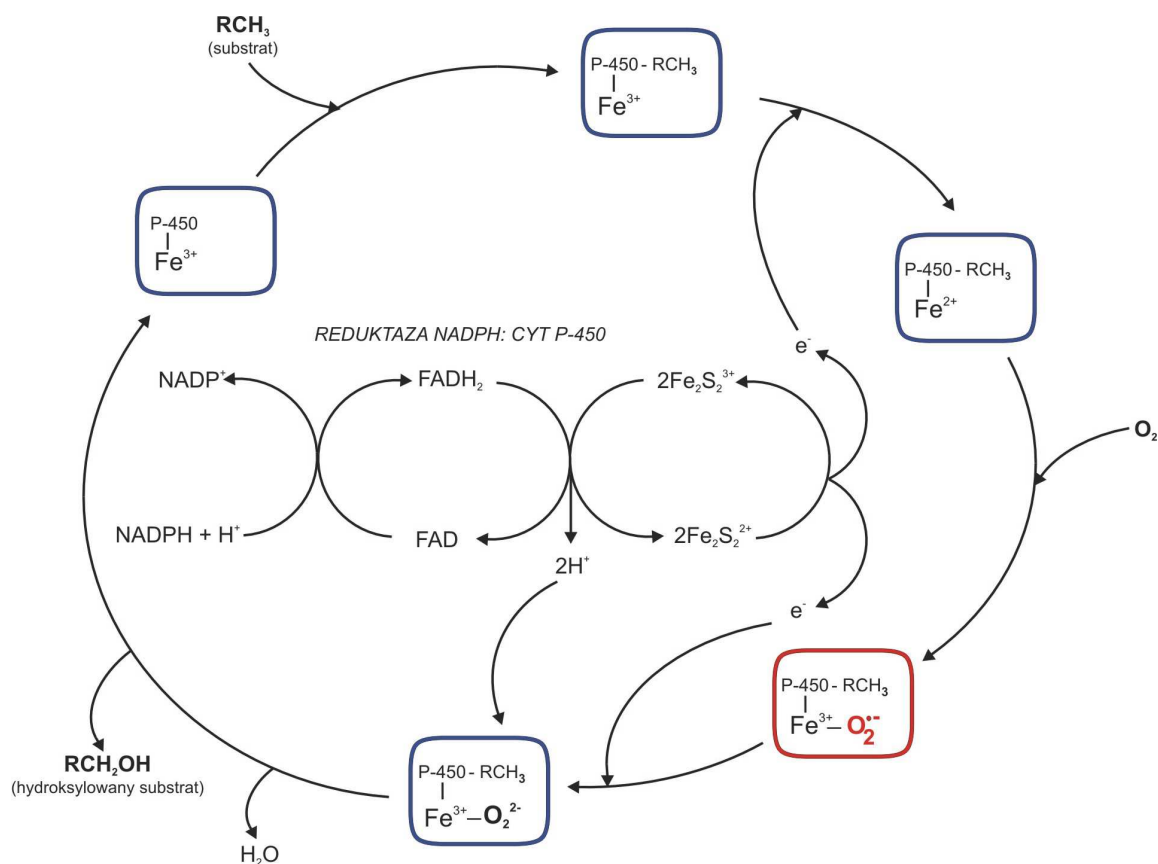
Kompleks I uwalnia do matriks anionorodnik ponadtlenkowy (również w przypadku hypoksji, gdy obserwuje się odwrotny transport elektronów). Kompleks III uwalnia $O_2^{\cdot -}$ zarówno do matriks jak i do przestrzeni międzybłonowej. Również dehydrogenaza α -ketoglutaranowa (α KGDH) jest dawcą $O_2^{\cdot -}$ tworzącego się w macierzy mitochondrialnej. Anionorodnik ponadtlenkowy może przemieszczać się do przestrzeni międzybłonowej poprzez anionowy kanał IMAC (ang. *inner mitochondrial membrane anion channel*). Powstały $O_2^{\cdot -}$ może generować rodnik wodoronadtlenowy ($^{\cdot}HO_2$) a także dysmutować w nadtlenek wodoru w reakcji z dysmutazą ponadtlenkową (MnSOD – zlokalizowana wewnątrz matriks i Cu/ZnSOD – związana z błoną zewnętrzną mitochondrium). Nadtlenek wodoru powstaje także przy udziale monoaminooksydazy (MAO). H_2O_2 jest obojętny elektrycznie i łatwo przenika przez błonę wewnętrzną a w obecności jonów metali ciężkich (głównie Fe^{2+}) ulega reakcji Fentona dając wysoce reaktywny rodnik wodorotlenowy. Oba wolne rodniki $^{\cdot}HO_2$ i OH^{\cdot} reagują z białkami, z mitochondrialnym DNA, ale głównie inicjują proces peroksydacji lipidów. Zmniejszanie ilości anionorodnika ponadtlenkowego następuje w wyniku zmniejszenia jego produkcji przez kompleks III, na skutek aktywnego działania ATP-azy i białka rozprzegającego UCP (ang. *uncoupling protein*). Ważną rolę odgrywa też mitochondrialna peroksydaza glutationu (GPx), która rozkłada nadtlenek wodoru do wody. Mimo częściowej neutralizacji wolnych rodników tlenowych w mitochondrium, część z nich (głównie $O_2^{\cdot -}$) przenika do cytozolu wykorzystując kanał anionowy VDAC (ang. *voltage dependent anion channel*) umieszczony w zewnętrznej błonie mitochondrialnej.

2B Główne źródła mitochondrialnych reaktywnych form azotu.

Tlenek azotu (NO^{\cdot}) powstaje pozamitochondrialnie przy udziale syntazy tlenku azotu (NOS) i ulega dyfuzji do mitochondrium (pomarańczowa strzałka). W matriks zlokalizowana jest mitochondrialna syntaza tlenku azotu (mtNOS) i też produkuje NO^{\cdot} . Tlenek azotu hamuje odwracalnie oksydazę cytochromową (kompleks IV), konkurując o tlen. W wyniku takiego działania dochodzi do zwiększenia ilości $O_2^{\cdot -}$ powstającego przez kompleksy łańcucha oddechowego. Tlenek azotu hamuje również kompleks I i wchodząc w reakcje z tlenem indukuje pojawianie się pochodnych rodników azotowych: nadtlenoazotynu, dwutlenku azotu i nadtlenku azotu. Tlenek azotu w reakcji z $O_2^{\cdot -}$ daje nadtlenoazotyn ($OONO^{\cdot}$), on zaś rozpada się tworząc silnie utleniające produkty: NO_2^{\cdot} i OH^{\cdot} . Nadtlenoazotyn inicjuje peroksydację lipidów, hamuje kompleks I, II i IV łańcucha oddechowego, syntazę ATP, akonitazę, kinazę kreatyniny i MnSOD. Działanie RFT i RFA ma wpływ na homeostazę wapnia, następuje wzmożony wpływ Ca^{2+} z matriks przez megakanał mitochondrialny PTP (ang. *permeability transition pore*). PTP jest także kanałem dla „uciekającego” cytochromu c i innych czynników inicjujących apoptozę. Alternatywnie $OONO^{\cdot}$ może stymulować wpływ wapnia przez antyporter Na^+/Ca^+ .

W mitochondrium produkowane są reaktywne formy tlenu niezależnie od tych powstających w łańcuchu oddechowym. W mitochondrialnej błonie wewnętrznej tkanek steroidogenicznych zlokalizowany jest łańcuch transportu elektronów w formie kompleksu desmolazy cholesterolowej (EC 1.14.15.6). Kompleks ten składa się z reduktazy adrenodoksyny zawierającej FAD, adrenodoksyny i cytochromu P-450, a głównym zadaniem działania kompleksu jest transformacja cholesterolu w pregnenolon. W czasie hydroksylacji cholesterolu tj. w czasie przenoszenia elektronów przez kolejne elementy tego kompleksu zredukowane formy przekaźników mogą reagować bezpośrednio z tlenem prowadząc do wytwarzania anionorodnika nadadtlenkowego [4].

Kolejnym źródłem wolnych rodników w komórce jest mikrosomalny łańcuch transportu elektronów. Odmienny od kompleksu zlokalizowanego w mitochondriach, składa się z NADPH-zależnej reduktazy (EC 1.6.2.4), zawierającej zarówno FAD i FMN, oraz z cytochromu P-450. Funkcją tego kompleksu enzymów jest zarówno synteza hormonów steroidowych i kwasów żółciowych oraz biotransformacja leków, pestycydów i innych ksenobiotyków. Mechanizm działania cytochromu P-450 i miejsce powstawania anionorodnika nadadtlenkowego pokazano na rycinie 3.



Ryc. 3 Mikrosomalny cykl hydroksylacyjny. Podczas przepływu elektronów przez ten łańcuch transportu elektronów wytwarzany jest anionorodnik nadadtlenkowy w wyniku reakcji zredukowanej reduktazy NADPH: cyt P-450 z tlenem.

Źródłem reaktywnych form tlenu w komórce są również peroksysomy obecne w większości komórek eukariotycznych. Zawierają one enzymy wytwarzające głównie nadtlenek wodoru: np. oksydazy acylo-CoA (enzymy zaangażowane w proces β -oksydacji kwasów tłuszczowych), oksydazę D-aminokwasów (EC 1.4.3.3), oksydazę α -hydroksykwasową (EC 1.1.3.15), oksydazę moczanową (EC 1.7.3.3). Ponadto znajduje się tam syntaza tlenku azotu produkująca NO^\bullet i oksydaza ksantynowa (EC 1.17.3.2), która może redukować tlen jedno- i dwuelektronowo, więc oprócz nadtlenku wodoru wytwarza dodatkowo anionorodnik ponadtlenkowy. W błonach peroksysomów znajduje się także łańcuch transportujący elektrony złożony z reduktazy NADH-cytochrom b_5 (EC 1.6.2.2), będący także źródłem $\text{O}_2^{\bullet-}$. Nadmiernemu uwalnianiu z peroksysomów nadtlenku wodoru zapobiega obecność katalazy (EC 1.11.1.6), która go rozkłada [5].

Duża część wolnych rodników powstaje także w wyniku działania oksydazy NAD(P)H (EC 1.6.3.1), multimerycznego kompleksu enzymatycznego białek z rodziny Nox związanego z błoną komórkową [6]. Jej działanie polega na przenoszeniu elektronów z NADPH na tlen przy jednoczesnym wytwarzaniu anionorodnika ponadtlenkowego:



Enzym ten odkryto początkowo w komórkach fagocytyujących, takich jak granulocyty, monocyty i makrofagi, stąd wzięła nazwę rodzina białek phox (ang. *phagocyte oxidase*) wchodzących w skład multimeru [7]. W tego typu komórkach obserwowano tzw. „wybuch oddechowy”, czyli bardzo duże zużycie tlenu, w odpowiedzi na bakterie, wirusy i inne zagrażające komórce czynniki. Zużycie tlenu wiązało się bezpośrednio z pojawianiem się $\text{O}_2^{\bullet-}$, który bardzo szybko dysmutował do nadtlenku wodoru. Dalsze badania potwierdziły istnienie białek Nox (homologicznych do phox), w innych niż fagocytyujące, komórkach [6,8]. Działanie oksydazy NAD(P)H polega na utlenieniu NADPH przez białka Nox zlokalizowane w błonie (inaczej zwane kompleksem cytochromu b_{558}) i następnie przeniesienie elektronów na tlen dając anionorodnik ponadtlenkowy w reakcji jednoelektronowej [9].

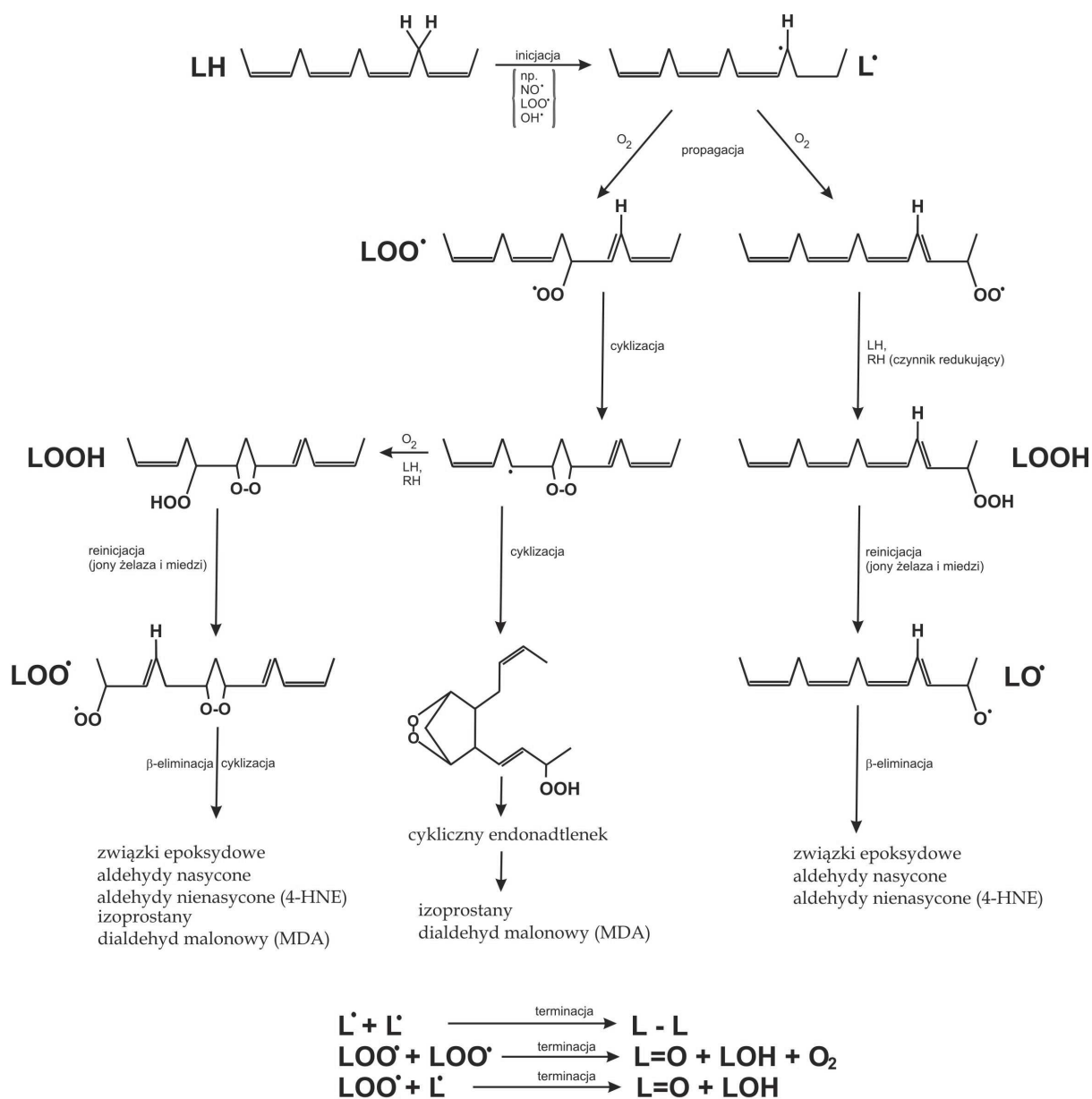
1.1.3 Efekty działania reaktywnych form tlenu:

W wyniku działania RFT dochodzi do uszkodzeń wielu komponentów komórkowych. Pierwszym celem wolnych rodników staje się błona komórkowa i tam właśnie dochodzi do procesu peroksydacji lipidów błonowych. Peroksydacja lipidów polega na utlenianiu reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład fosfolipidów, a proces ten zachodzi zarówno na drodze nieenzymatycznej jak i w wyniku reakcji enzymatycznych.

Nieenzymatyczna peroksydacja lipidów (Ryc. 4).

Proces ten jest kilku etapowy, w fazie inicjacji dochodzi do odłączenia atomu wodoru od cząsteczki wielonienasyconego kwasu tłuszczowego (LH) lub od reszty takiego kwasu wchodzącego w skład fosfolipidów. Peroksydację lipidów mogą inicjować rodniki: wodorotlenowy ($\cdot\text{OH}$), wodoronadtlenkowy ($\text{HO}_2\cdot$) będący uprotonowaną formą $\text{O}_2\cdot$, tlenku azotu ($\text{NO}\cdot$) oraz perferrylowy. Inicjować peroksydację mogą również rodniki lipidowe: nadtlenkowy ($\text{LOO}\cdot$), alkoksylowy ($\text{LO}\cdot$) i alkilowy ($\text{L}\cdot$). Wynikiem inicjacji są wolne rodniki alkilowe, które w reakcjach prolongacji (propagacji) reagują z tlenem tworząc wolne rodniki nadtlenkowe. Rodniki nadtlenkowe zlokalizowane na końcu układu wiązań podwójnych wchodzą w reakcje z kolejnymi cząsteczkami wielonienasyconych kwasów tłuszczowych dając nadtlenki (wodoronadtlenki) kwasów tłuszczowych (LOOH). Tlen singletowy również może tworzyć LOOH , ale w reakcji addycji cząsteczki tlenu do wiązania podwójnego. Powstałe w ten sposób wodoronadtlenki są pierwszymi produktami peroksydacji lipidów charakteryzującymi się względną trwałością w nieobecności jonów metali przejściowych. Następnie reakcje peroksydacji lipidów dążą do terminacji, gdzie powstają produkty reakcji pomiędzy wolnymi rodnikami. Produkty te to dimery kwasów tłuszczowych oraz keto- lub hydroksykwasów tłuszczowych. W procesie peroksydacji lipidów obserwuje się zjawisko reinicjacji polegające na tym, że wodoronadtlenki lipidowe mogą być zredukowane przez jony metali przejściowych do rodników alkoksylowych, które z kolei ulegają β -eliminacji z utworzeniem wielu produktów. Powstają związki epoksydowe (np. 2,3-epoksy-4-hydroksynonenal) oraz aldehydy nasycone (np. heksanal, pentanal) i α,β -nienasycone (np. 4-hydroksynonenal 4-HNE). Jeżeli grupa nadtlenkowa jest umiejscowiona wewnątrz łańcucha kwasu tłuszczowego rodnik ulega cyklizacji do cyklicznego nadtlenku. Cykliczny nadtlenek może przekształcić się w rodnik nadtlenkowy bądź ulec ponownej cyklizacji do bicyklicznego nadtlenku, który po kolejnych reakcjach utleniania i redukcji staje się cyklicznym endonadtlenkiem. Kolejno dochodzi do konwersji bicyklicznej grupy nadtlenkowej i powstają

izoprostany i dialdehyd malonowy (MDA) jako ostateczne produkty peroksydacji lipidów [10].



Ryc. 4 Nieenzymatyczna peroksydacja lipidów (objaśnienia w tekście)

Enzymatyczna peroksydacja lipidów.

Peroksydacja lipidów o charakterze enzymatycznym dotyczy powstawania wodoronadtlenków lipidowych przy udziale enzymów z grupy lipooksygenaz (LOXs). Wolnych kwasów tłuszczowych dostarcza natomiast fosfolipaza A_2 (EC 3.1.1.4). Proces peroksydacji zostaje zainicjowany w momencie aktywacji enzymu a całość obejmuje kilka etapów: usunięcie atomu wodoru z grupy metylenowej łańcucha reszty wielonienasyconych

kwasów tłuszczowych, co prowadzi do wytworzenia rodnika alkilowego (L^\bullet). Następnie kolejne reakcje zmiany lokalizacji elektronu w obrębie łańcucha węglowego kwasu tłuszczowego prowadzą do powstania LOOH. Ostatni etap to wbudowanie cząsteczki tlenu i wytworzenie rodnika nadtlenkowego, który może ulec redukcji do odpowiedniego anionu. Enzymatyczna peroksydacja lipidów tym różni się od nieenzymatycznej, że w trakcie procesu z udziałem enzymów wytworzone rodniki nadtlenkowe lipidów zostają przekształcone w aniony, w wyniku czego dochodzi do wyczerpania substratu zawierającego niesparowany elektron, a tym samym do zahamowania generacji wodoronadtlenków. Enzymatyczna peroksydacja lipidów jest także procesem zapoczątkowującym powstawanie związków biologicznie czynnych, takich jak prostaglandyny, tromboksan i leukotrieny. Natomiast kwas arachidonowy uwolniony przez fosfolipazę A_2 jest związkiem wyjściowym w syntezie zachodzącej z udziałem cyklooksigenaz [11].

Oba procesy peroksydacji lipidów mogą zachodzić w tym samym czasie. Reakcja enzymatyczna rozpoczyna się wtedy, gdy pojawią się w dużej ilości wyprodukowane nadtlenki lipidowe, a z drugiej strony reakcje katalizowane przez lipooksygenazy mogą inicjować proces nieenzymatycznej peroksydacji lipidów. Ponadto wodoronadtlenki lipidów mogą ulec przemianie w reaktywne rodniki nadtlenkowe i alkoksyłowe, które ponownie wezmą udział w procesie peroksydacji lipidów. Końcowe produkty peroksydacji lipidów to α,β -nienasycone aldehydy, które traktuje się jako wtórne przekaźniki peroksydacji lipidów. Produkty te, głównie MDA i 4-hydroksynonenal wchodzi w reakcje z resztami aminokwasowymi białek wytwarzając pochodne karbonyłowe białek [12]. Natomiast w wyniku reakcji produktów peroksydacji lipidów z DNA dochodzi do wielu uszkodzeń łańcucha i co za tym idzie do hamowania replikacji i transkrypcji DNA [12]. Ponadto α,β -nienasycone aldehydy biorą udział we wielu szlakach sygnalizacyjnych, hamując czy też indukując aktywności wielu enzymów. 4-HNE może na przykład indukować aktywność γ -glutamylotranspeptydazy (EC 2.3.2.2), cyklooksigenazy 2 (EC 1.14.99.1), bierze udział również w regulacji rozpręgnięcia mitochondriów i reguluje inne procesy metaboliczne i szlaki sygnalizacyjne [13].

Uszkodzenia białek przez reaktywne formy tlenu.

Przy dużej aktywności wolnych rodników tlenowych i azotowych dochodzi do nagromadzenia utlenionych produktów białkowych. Utlenianie dotyczy łańcucha polipeptydowego jak również reszt aminokwasowych. W przypadku łańcucha polipeptydowego proces peroksydacji przypomina peroksydację lipidów jednakże nie ma charakteru reakcji łańcuchowej. Rodnik hydroksyłowy inicjuje utlenianie łańcucha poprzez

oderwanie atomu wodoru przy węglu α -aminokwasu. Powstaje rodnik alkilowy i w wyniku reakcji z tlenem daje produkt: alkilowodoronadtlenek. Produkt ten może przekształcić się w rodnik alkoksylowy, ten zaś aktywuje fragmentację łańcucha polipeptydowego. Przerwanie łańcucha polipeptydowego może nastąpić również w wyniku wolnorodnikowego utleniania glutaminianu, asparginianu i proliny. W białkach, poza fragmentacją łańcucha, w wyniku działania RTF dochodzi do utleniania wielu reszt aminokwasowych, w tym bardzo wrażliwych reszt aminokwasów aromatycznych. Utlenianie aminokwasów z wolną grupą aminową, amidową lub hydroksylową prowadzi do powstania pochodnych karbonylowych. Również nadtlenoazotyn w reakcjach z białkami prowadzi do tworzenia grup karbonylowych a ponadto ma zdolność utleniania aminokwasów siarkowych i nitrowania aminokwasów aromatycznych. Reakcje wolnych rodników z białkami prowadzą przede wszystkim do utraty aktywności biologicznej białek, stąd wzrost wytwarzania RFT w organizmie odgrywa istotną rolę w procesie starzenia się jak i w patogenezie wielu chorób [14].

Uszkodzenie kwasów nukleinowych i węglowodanów.

Kwasy nukleinowe są bardziej stabilne niż białka i lipidy, dlatego też niełatwo przechodzą w stan wolnorodnikowy (uszkodzenia są z reguły szybko naprawiane, a uszkodzone zasady są wycinane i wydalane z komórek). Reakcje rodnika wodorotlenowego z kwasami nukleinowymi skutkują uszkodzeniem zasad, reszt cukrowych i rozerwaniem wiązań fosfodiesterowych. Podatna na działanie $\cdot\text{OH}$ jest szczególnie tymidyna, z której powstają nadtlenki tymidyny [15]. Natomiast 8-hydrokso-deoksyguanozyna (8-OHdG) jest produktem tlenowego uszkodzenia DNA, za powstawanie 8-OHdG jest odpowiedzialny tlen singletowy i rodnik wodorotlenowy. Obecnie 8-OHdG jest najczęściej stosowanym markerem oceniającym uszkodzenie tlenowe. Wzrost stężenia 8-OHdG wykazano w przebiegu wielu chorób, łącznie z nowotworami, cukrzycą i przewlekłymi stanami zapalnymi [16].

Również węglowodany mogą być uszkodzane przez RFT. W wyniku reakcji RFT ze złożonymi wielocukrami dochodzi do rozrywania wiązań glikozydowych i ich depolimeryzacji. Natomiast uszkodzenia reszt cukrowych glikolipidów i glikoprotein prowadzą do zmian właściwości antygenowych komórek. RFT mogą również uczestniczyć w reakcjach glikacji (glikozylacji) zachodzących pomiędzy cukrami i grupami aminowymi białek. Produkty glikacji AGEs (ang. *advanced glycation end-products*) znaleziono między innymi w kolagenie i α -krystalinie (soczewka oka) a ich kumulacja prowadzi do powikłań cukrzycowych i miażdżycowych. Metyloglioksal (MG) może być utworzony z fosforanu dihydrooctanu, z aldehydu-3-fosfoglicerynowego czy też z hydroksyacetonu. MG i inny produkt glikacji: 3-deoksyglukozon (3-DG) indukują apoptozę w modyfikowanych

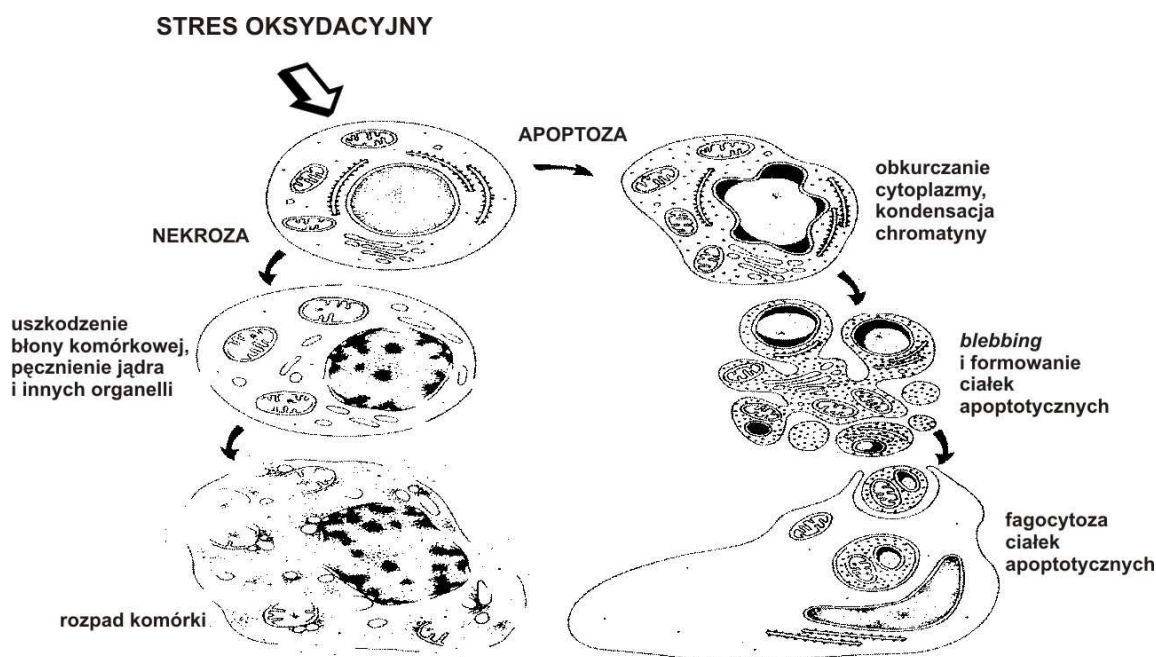
makrofagach linii U937 [17]. Dodatkowo MG wiąże się i modyfikuje argininę, lizynę i cysteinę, przez co wpływa na modyfikacje i inaktywacje enzymów takich jak katalaza, peroksydaza glutationu i dysmutaza ponadtlenkowa [18].

Stres oksydacyjny

W wyniku ataku reaktywnych form tlenu i azotu na lipidy, białka, węglowodany i DNA dochodzi do powstawania nietypowych wolnorodnikowych produktów utleniania, które generują dalsze wolne rodniki oraz wchodzi w reakcje z ważnymi komórkowymi metabolitami. W sytuacji, gdy komórki czy też tkanki narażone są na dodatkowe źródła wolnych rodników, bądź też gdy zwiększa się tempo ich endogennej produkcji mówimy o stanie stresu oksydacyjnego. Z definicji stres oksydacyjny to „zaburzenie równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w kierunku reakcji utleniania” [19] a do metabolicznych następstw stresu oksydacyjnego w komórce zaliczamy:

- obniżenie poziomu ATP. Dochodzi do tego głównie poprzez inaktywację dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (EC 1.2.1.13) co doprowadza do zahamowania glikolizy. Ponadto obserwuje się wzmożony katabolizm nukleotydów adeninowych a także zmniejszenie podaży zredukowanych form dinukleotydów nikotynoadeninowych wskutek ich zużycia do redukcji glutationu i naprawy uszkodzeń DNA.
- zmniejszenie stężenia całkowitego glutationu i obniżenie stosunku stężeń glutationu zredukowanego do glutationu utlenionego (GSH/GSSG). Ponadto tworzą się mieszane disulfidy glutationowo-białkowe i inne koniugaty glutationu z produktami peroksydacji lipidów lub z ksenobiotykami. Zarówno GSSG jak i koniugaty są usuwane na zewnątrz komórki na zasadzie aktywnego transportu co w konsekwencji przyczynia się do zużycia ATP i spadku wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu.
- podwyższenie stężenia wapnia w cytoplazmie poprzez inaktywację pompy wapniowej [20]
- zwiększenie przepuszczalności błony na skutek jej depolaryzacji. Odbywa się to najprawdopodobniej na skutek zahamowania pompy potasowej [21].
- uszkodzenie DNA za pośrednictwem rodnika wodorotlenowego jak również poprzez aktywację nukleaz (w obecności zwiększonej ilości Ca^{2+}). Konsekwencją uszkodzenia DNA jest aktywacja syntetazy poli(ADP-rybozy) (EC 2.4.2.30), co prowadzi do zmniejszenia komórkowej puli NAD^+ i nukleotydów adeninowych [22].

Ostatecznie, postępujący stres oksydacyjny w komórce doprowadza do jej śmierci na drodze apoptozy i nekrozy (Ryc. 5).



Ryc. 5 Obraz morfologiczny komórek umierających na drodze apoptozy i nekrozy.

Proces apoptozy zachodzi według precyzyjnego programu. Jedną z wczesnych faz apoptozy jest odwodnienie, obkurcza się cytoplazma, komórka staje się mniejsza i przybiera nieregularne kształty. Obserwuje się zaburzenie asymetrii fosfolipidów błonowych co prowadzi do ekspozycji fosfatydyloseryny na zewnętrznej powierzchni błony (jest to sygnał dla makrofagów, które szybko rozpoznają i fagocytują komórki apoptotyczne). Następuje kondensacja chromatyny, która najszybciej zaczyna się na obrzeżach jądra. DNA w skondensowanej chromatynie piknotycznego jądra silnie wybarwia się znacznikami fluorescencyjnymi. W miarę progresji zmian postępuje dezintegracja błony jądrowej, proteoliza i fragmentacja jądra. Fragmenty jądra komórkowego otoczone błoną komórkową odrywają się od komórki (ang. *blebbing*) i tworzą ciała apoptotyczne szybko trawione przez komórki fagocytujące.

Nekroza najczęściej występuje pod wpływem gwałtownego lub silnego działania różnorodnych czynników, które prowadzą do natychmiastowego uszkodzenia błony komórkowej. Objawia się to pęcznieniem i nieuporządkowanym rozpadem komórki wraz z jej organellami. Produkty rozpadu uwalniają się na zewnątrz wywołując reakcję zapalną. Zahamowanie stresu oksydacyjnego (i jego następstw czyli śmierci komórki) jest możliwe przy udziale enzymów antyoksydacyjnych i antyoksydantów drobnocząsteczkowych, które neutralizują wolne rodniki.

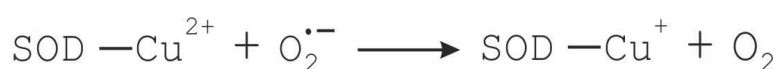
1.1.4 Obrona komórek przed RFT.

Działanie ochronne obejmuje różne procesy zaczynając od niedopuszczenia do zadziałania wolnych rodników poprzez próby zahamowania cyklu reakcji, w których biorą udział, do działań usuwających skutki reakcji RFT z elementami komórki.

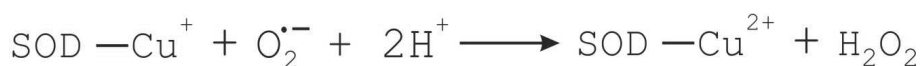
Do głównych enzymów antyoksydacyjnych usuwających RFT należą dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza i peroksydaza glutationowa.

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD EC 1.15.1.1) jest metaloenzymem katalizującym reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego. U człowieka występują trzy rodzaje dysmutaz ponadtlenkowych: miedziowo-cynkowa SOD, manganowa SOD i dysmutaza ponadtlenkowa zewnątrzkomórkowa.

Miedziowo-cynkowa dysmutaza (Cu/ZnSOD, SOD-1) u ssaków jest głównie zlokalizowana w cytozolu oraz w mniejszej ilości w przestrzeni międzybłonowej mitochondrium. Dodatkowo, jej aktywność stwierdzono w jądrze, lizosomach i peroksysomach. Sekwencja i struktura SOD-1 jest wysoce konserwatywna. Białko to jest homodimerem, każda podjednostka składa się z 151 aminokwasów i zawiera atom miedzi i cynku. Atom miedzi ze względu na wysoki potencjał oksydoredukcyjny pełni rolę katalityczną, natomiast cynk stabilizuje strukturę trzeciorzędową białka. Wysoką stabilność enzymu zapewnia obecność w każdym monomerze struktury mostka disulfidowego wiążącego reszty cysteinyłowe [23]. Reakcja dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego przez Cu/ZnSOD przebiega w dwóch etapach. Pierwszy polega na redukcji jonów miedzi w centrum katalitycznym:



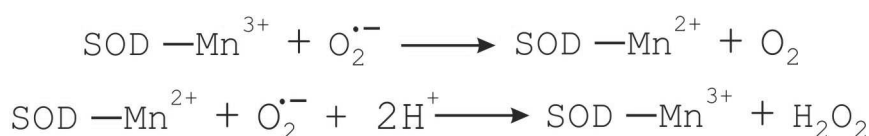
Następnie dochodzi do jednoelektronowego utlenienia jonów miedzi z równoczesnym wytworzeniem nadtlenu wodoru:



Gen kodujący SOD-1 znajduje się na chromosomie 21. Nadekspresja genu *sod-1* u *Drosophila melanogaster* prowadzi do wydłużenia życia tych organizmów, zaś u myszy nadekspresja *sod-1* chroni przed uszkodzeniami związanymi z ischemią i chorobą Parkinsona [24]. U ludzi mutacja genu kodującego SOD-1 ma związek z wzrostem stresu oksydacyjnego we wielu narządach co doprowadza do występowania chorób neurodegeneracyjnych. Mało

wiadomo natomiast o inhibitorach Cu/ZnSOD, stwierdza się, że TNF- α znacznie hamuje aktywność enzymu i zmniejsza jego ekspresję [24].

Manganowa dysmutaza ponadtlenkowa (MnSOD, SOD-2) jest homotetrametrem o masie 22 kDa. W ludzkiej SOD-2 każda podjednostka posiada jeden atom manganu (Mn^{3+}) zlokalizowany w centrum aktywnym, pełni on zarówno funkcję katalityczną jak i stabilizującą enzym. SOD-2 występuje u ssaków we wszystkich komórkach a umiejscowiona jest w mitochondrium jak również może występować w peroksosomach [23]. MnSOD jest kodowana przez 1 do 4 genów jądrowych (zlokalizowanych na 6 chromosomie), przy czym możliwe jest powstawanie różnych transkryptów jednego genu. Powstające różne formy MnSOD posiadają sekwencje sygnałowe i są transportowane do mitochondrium [23]. Reakcja dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego przez MnSOD przebiega podobnie jak dysmutacja przez dysmutazę miedziowo-cynkową i zachodzi na dwóch etapach:



Aktywność SOD-2 może być indukowana przez wiele czynników, w tym przez TNF- α , interleukinę-1 czy też liposacharydy [25,26]. Wzrost aktywności MnSOD chroni komórki przed stresem oksydacyjnym. Badania na myszach z nieczynnym genem *sod-2* pokazały, że myszy te umierają w okresie noworodkowym z powodu następstw chorób neurodegeneracyjnych i kwasicy metabolicznej [27].

Zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa (EC-SOD, SOD-3) jest glikoproteiną o masie 135 kDa i występuje jako dimer, tetrametr jak również może tworzyć multimery. Każda podjednostka ludzkiej EC-SOD zbudowana jest z 222 aminokwasów i zawiera atom cynku i miedzi w centrum katalitycznym, natomiast gen dysmutazy zewnątrzkomórkowej umiejscowiony jest na chromosomie 4 [28]. EC-SOD występuje w tkankach, osoczu krwi i płynach zewnątrzkomórkowych takich jak limfa, maź stawowa i inne. Głównym miejscem występowania tej dysmutazy w tkankach jest macierz pozakomórkowa i powierzchnia komórek. Ludzka SOD-3 w największych ilościach występuje w naczyniach krwionośnych, płucach i łożysku. Funkcją tego enzymu jest usuwanie anionorodnika ponadtlenkowego, a reakcja dysmutacji przebiega identycznie jak reakcja katalizowana przez SOD-1. EC-SOD wykazuje różne powinowactwo do heparyny i w związku z tym dzieli się na 3 klasy: A – cechuje brak powinowactwa do heparyny, B – ma słabe powinowactwo i C – duże powinowactwo do heparyny. U ssaków występuje głównie homotetramer EC-SOD C

i zawiera podjednostki z funkcjonalną domeną wiążącą heparynę (CCCC). W związku z tym zarówno heparyna jak i siarczan heparyny wpływają na ekspresję białka i genu kodującego zewnątrzkomórkową dysmutazę ponadtlenkową [28]. U ludzi mutacja w genie *sod3* zwiększa ryzyko chorób naczyniowych. SOD-3 jest hamowana przez jony cyjankowe, przez dietyloditiokarbaminian i nadtlenek wodoru [29].

Kolejnym ważnym enzymem antyoksydacyjnym jest katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) rozkładająca nadtlenek wodoru. Ludzka katalaza jest homotetramerem zbudowanym z podjednostek o masie cząsteczkowej 60 kDa. Każda podjednostka składa się z czterech domen polipeptydowych. Strukturę pierwszorzędową jednego monomeru tworzy łańcuch polipeptydowy zbudowany z 526 aminokwasów, grupa hemowa i cząsteczka NADPH. Strukturę II-rzędową katalazy stanowią powtarzające się motywy α -helisy i β -kartki. Każda z podjednostek katalazy posiada głęboko osadzony układ hemowy z położonym centralnie atomem żelaza. Hem (protoporfiryna IX) jest wbudowany do wnętrza hydrofobowego kanału, kanał ten jest wąski i nie przepuszcza cząsteczek większych niż główny substrat; nadtlenek wodoru. Każdy monomer przyłącza jedną cząsteczkę NADPH, co stanowi zabezpieczenie katalazy przed toksycznym działaniem H_2O_2 . Uwalnianie NADPH może zaś wpływać na działanie enzymów glutationozależnych, zwiększając aktywność reduktazy glutationowej i w konsekwencji peroksydazy glutationowej [30].

Katalaza jest enzymem o podwójnej aktywności; katalazowej i peroksydazowej. Podstawowa funkcja katalazy to udział w reakcji dysproporcjonowania nadtlenu wodoru. Pierwszy etap reakcji polega na utlenieniu przez nadtlenek wodoru żelaza hemowego katalazy przyczyniając się do powstania rodnika porfiryнового (związek I):



Następnie, związek I zostaje zredukowany przez kolejną cząsteczkę H_2O_2 , w wyniku czego powstaje tlen cząsteczkowy i woda:



Związek I powraca do stanu wyjściowego, w którym żelazo jest na trzecim stopniu utlenienia.

Katalaza posiada również ograniczoną aktywność peroksydazową, gdzie aktywny związek I może utleniać substraty takie jak etanol, metanol, fenol i mrówczan (RCH_2OH):



W komórkach ssaków występują dwa typy katalazy: cytoplazmatyczny (erytrocyty) i peroksysomalny, dodatkowo znaleziono aktywność tego enzymu w jądrze i mitochondrium szczyrch komórek serca [31]. Aktywność katalazy może być hamowana przez wiele związków chemicznych. Inhibitorem niekompetycyjnym katalazy jest siarczan miedzi, natomiast kompetycyjnym cyjanek potasu. Natomiast swoistym inhibitorem katalazy jest 3-aminotriazol. Zahamowanie aktywności katalazy prowadzi do hamowania peroksysomalnej β -oksydacji kwasów tłuszczowych [32], natomiast nadekspresja genu *cat* u myszy transgenicznych powoduje wydłużenie średniej długości życia tych zwierząt [33].

Peroksydaza glutationowa (EC 1.11.1.9) jest kolejnym enzymem antyoksydacyjnym a jej główną funkcją enzymatyczną jest redukcja nadtlenu wodoru i nadtlenków organicznych przy udziale zredukowanego glutationu. Peroksydaza glutationowa jest tetrametrem o masie około 85 kDa, każda jej podjednostka zbudowana jest z 201 aminokwasów i w pozycji 47 zawiera selenocysteinę, czyli analog cysteiny posiadający zamiast atomu siarki atom selenu. Obecność selenocysteiny w centrum aktywnym enzymu umożliwia utlenienie glutationu bez uwalniania wolnego rodnika tiolowego glutationu. Reakcja utlenienia glutationu przebiega w trzech etapach. W pierwszym etapie nadtlenek wodoru utlenia resztę selenocysteiny:



W kolejnym etapie zostaje utleniony glutation i tworzy z enzymem mieszany selenosulfid:



Powstały selenosulfid wchodzi w reakcję z kolejną cząsteczką glutationu regenerując zredukowaną formę selenocysteiny:



Peroksydaza glutationowa u człowieka jest kodowana przez różne geny i z tego wynika różnorodność miejsc występowania wszystkich izoform. GPx występuje w pięciu izoformach: cytozolowej (cGPx, GPx-1), osoczowej (pGPx, GPx-3), jądrowej (snGPx), jelitowo-żołądkowej (giGPx, GPx-2) i jako peroksydaza wodoronadtlenków fosfolipidowych (phGPx, GPx-4) umiejscowiona w mitochondriach i cytoplazmie [34]. Obecność selenu jest niezbędna dla syntezy wszystkich izoform GPx i u człowieka niedobór tego pierwiastka prowadzi do wadliwego działania enzymów selenozależnych, czego konsekwencją może być szereg schorzeń organów wewnętrznych w tym marskość wątroby i choroby serca. Aktywność peroksydazową cytozolowej GPx może hamować tlenek azotu i jego pochodna: S-nitrozo-N-

acetylo-DL-penicillamina (SNAP). Wpływ na działanie tego enzymu mają również produkty peroksydacji lipidów, a szczególnie 4-HNE, który obniża ilość glutationu i inaktywuje cGPx poprzez reakcję z grupami -SH. Także cytostatyki, np. adriamycyna mogą hamować aktywność cGPx [18]. Natomiast wzrost aktywności cGPx obserwuje się w neutrofilach, co sugeruje jej przeciwzapalne działanie. Cytozolowa GPx ma również działanie antyapoptotyczne w komórkach z niedoborem białka Bcl-2. Z drugiej strony zwiększona aktywność peroksydazy glutationowej może przyczyniać się do zwiększenia tempa proliferacji komórek nowotworowych [35]. Z kolei myszy z mutacją w genie kodującym *gpx-1* są zdrowe i rozwijają się prawidłowo, co wskazuje, że peroksydaza glutationowa zaangażowana jest w ochronę antyoksydacyjną tylko podczas wzmożonego stresu oksydacyjnego i nie odgrywa większej roli przy niskim poziomie endogennego nadtlenu wodoru [36].

Do pozostałych enzymów antyoksydacyjnych zaliczamy między innymi hydrolazy epoksydów, obecne w peroksysomach, cytoplazmie i retikulum endoplazmatycznym zaangażowane głównie w detoksykację ksenobiotyków [5]. Kolejnym enzymem antyoksydacyjnym jest peroksyredoksyna (EC 1.11.1.15) posiadająca aktywność peroksydazy tioredoksyno-zależnej. Obecna w peroksysomach w cytoplazmie, mitochondriach i jądrze komórkowym peroksyredoksyna I i II ma zdolność utleniania nadtlenu wodoru i wodoronadtlenków lipidowych jak również neutralizowania nadtlenuoazotynu [37]. Warto wspomnieć jeszcze o peroksysomalnym błonowym białku 20 (PMP 20) posiadającym aktywność tioperoksydazy, które rozkłada H_2O_2 [5]. Inne białka enzymatyczne chroniące pośrednio komórkę przed RFT to ceruloplazmina (EC 1.16.3.1) utleniająca jony żelazawe do żelazowych, DT-diaforaza (EC 1.6.99.2) redukująca dwuelektronowo chinony i aldehydy oraz białka hemowe hamujące tworzenie rodnika wodorotlenowego (hemoglobina i mioglobina w obecności askorbinianu) [38].

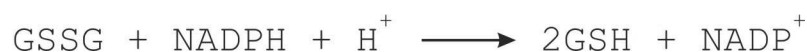
W ochronę komórki przed działaniem wolnych rodników zaangażowane są również białka, które minimalizują dostępność prooksydantów takich jak jony metali przejściowych. Do takich zaliczamy transferynę (transportuje Fe^{2+}), haptoglobinę i hemopeksynę oraz metalotioneinę (bierze udział w metabolizmie metali ciężkich; Cu^{2+} , Zn^{2+}).

Inną grupą przeciwutleniaczy są antyoksydanty niskocząsteczkowe nazywane zmiataczami wolnych rodników. Do najistotniejszych antyoksydantów hydrofilowych zaliczamy glutation i askorbinian.

Glutation (γ -glutamylcysteinylglycyna) jest związkiem występującym w formie zredukowanej jako GSH i utlenionej jako disulfid glutationu GSSG. W komórce jest zlokalizowany przede wszystkim w cytozolu, poza tym w mitochondriach, mikrosomach

i jądrze komórkowym. Działanie antyoksydacyjne glutationu polega na tym, że wchodzi on w reakcje z wolnymi rodnikami (głównie z rodnikiem wodorotlenowym) dzięki reaktywnej grupie – SH. Jeśli czynnikiem utleniającym jest nadtlenek wodoru lub nadtlenki organiczne reakcję utleniania glutationu przyspiesza peroksydaza glutationowa. Główną funkcją glutationu jest utrzymywanie grup tiolowych białek w stanie zredukowanym (w celu zachowania ich aktywności). Redukcja utlenionych grup -SH przez glutation może zachodzić spontanicznie i przy udziale tiolotransferaz glutationowych. Ponadto grupa tiolowa glutationu reaguje z różnymi związkami i tworzą się koniugaty (reakcje tego typu są katalizowane przez transferazy glutationowe w reakcjach detoksykacji) aktywnie usuwane na zewnątrz komórki. Znaczny spadek ilości mitochondrialnego GSH w komórce prowadzi do uszkodzeń mitochondriów, całych organów i prowadzi do śmierci nowonarodzonych zwierząt [39].

W czasie cyklu utleniania i regeneracji glutationu bierze udział reduktaza glutationowa (GR; EC 1.8.1.7), enzym ten odtwarza zredukowaną formę glutationu kosztem utleniania NADPH:



Fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego dostarcza dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G-6-PDH; EC 1.1.1.49), enzym szlaku fosfopentozowego, katalizująca reakcję utlenienia glukozy-6-fosforanu do fosfoglukonolaktanu.

Askorbinian jest również silnym antyoksydantem, reaguje przede wszystkim z nadtlenkiem wodoru, ale neutralizuje też anionorodnik ponadtlenkowy i rodnik wodorotlenowy. Witamina C może przejawiać także aktywność prooksydacyjną w obecności jonów metali przejściowych [40].

Inne niskocząsteczkowe związki syntetyzowane w organizmie mający działanie antyoksydacyjne to bilirubina i produkt jej utleniania – biliwerdyna, zredukowana forma kwasu α -liponowego, α -ketowasy (α -ketoglutaran), kwas moczowy, melatonina, pochodne estronu i estradiolu oraz ubihydrochinon (zredukowany koenzym Q).

Właściwości antyoksydacyjne wykazują też związki dostarczane z pożywieniem: α -tokoferol karotenoidy, ksantofile, flawonoidy i fenole (np. tymol czy kwas fitynowy wiążący jony metali przejściowych).

Silnym antyoksydantem jest N-acetylocysteina (NAC), która wywiera działanie ochronne poprzez dwa mechanizmy; po pierwsze redukuje cystynę do cysteiny, a ta zostaje wykorzystana do syntezy glutationu, po drugie cysteina może powstawać dzięki enzymatycznej deacetylacji samej NAC [38].

Warto wspomnieć również o białkach będących wskaźnikami stresu oksydacyjnego. Jednym z nich jest dehydrogenaza aldehydu-3-fosforanowego; GAPDH. Jest to enzym szlaku glikolizy odgrywający główną rolę w dostarczaniu NADH komórce. Natomiast w warunkach stresu oksydacyjnego obserwuje się wzrost ekspresji genu *gapdh* i przemieszczenie transkryptu do jądra przy użyciu ligazy Siah1 (ang. *E3-ubiquitin ligase*). W jądrze komórkowym GAPDH związana z Siah1 jest aktywowana przez białko p-53 i może inicjować proces apoptozy [41].

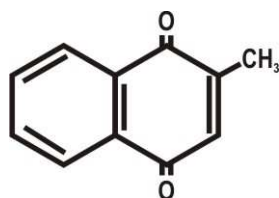
1.2 DZIAŁANIE MENADIONU, WODORONADTLENKU *TERT*-BUTYLU I NADTLENKU WODORU.

W przeprowadzonej pracy zajęto się oceną cytotoksycznego działania menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenku wodoru w komórkach *choriocarcinoma*. Związki te zostały wybrane do indukcji stresu oksydacyjnego ponieważ tworzą one reaktywne formy tlenu [42] i poprzez ich działanie mogą prowadzić do śmierci komórki.

1.2.1 Menadion.

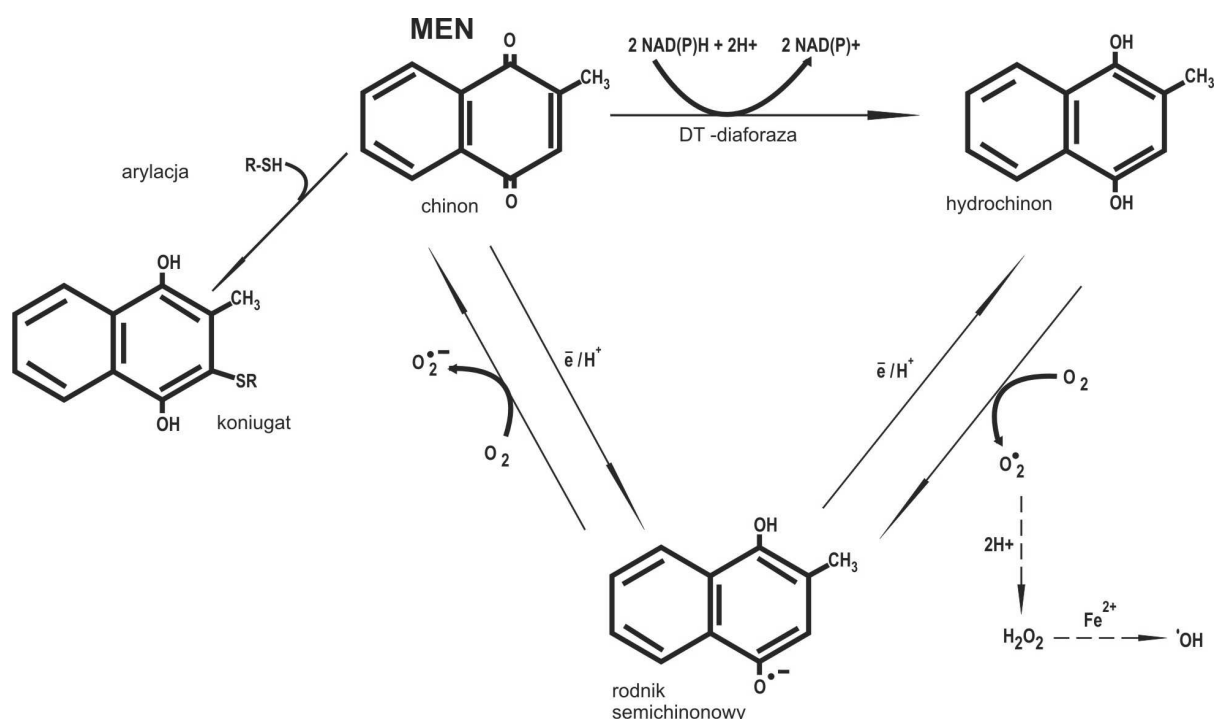
Menadion (MEN) czyli witamina K₃ jest poliizoprenową pochodną naftochinonu. Ten syntetyczny analog działa jako prowitamina, ponieważ po wchłonięciu ulega alkilacji do biologicznie czynnego menachinonu. Jednak ze względu na ograniczoną rozpuszczalność w tłuszczach witamina K₃ nie spełnia wszystkich funkcji naturalnych witamin K.

Witamina K₃ jest wykorzystywana jako efektywny i stosunkowo bezpieczny cytostatyk w leczeniu niektórych typów białaczek [43]. Uważa się, że przeciwnowotworowe działanie menadionu związane jest z obecnością wolnych rodników, powstających w przebiegu jego cyklu redoks.



Ryc. 6 Chemiczny wzór menadionu: 2-metylo-1,4-naftochinon

Metabolizm chinonów może zachodzić jako redukcja jednoelektronowa z wytworzeniem rodnika semichinonowego (Ryc. 7). Rodnik semichinonowy może bezpośrednio reagować ze składnikami komórki prowadząc do jej uszkodzenia lub powrócić do formy utlenionej przez gwałtowną reakcję z tlenem cząsteczkowym. Następnym procesem oksydacji jest powstanie reaktywnych form tlenu takich jak: anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, a w obecności jonów metali rodnik wodorotlenowy [44]. Chinony mogą ulegać również redukcji dwuelektronowej (katalizowanej przez enzym DT-diaforazę) z wytworzeniem hydrochinonu. Reakcja ta jest „bezpieczniejsza” dla organizmu, ponieważ przebiega z pominięciem utworzenia formy semichinonu, co zmniejsza ryzyko wywołania stresu oksydacyjnego. Innym aspektem oksydacyjnego mechanizmu działania menadionu jest bezpośrednia aryłacja tioli w komórkach. Witamina K₃ powoduje obniżenie stężenia glutationu i białek zawierających grupy sulfhydrylowe [45,46]. Aryłacja dotyczy wprowadzenia grup aromatycznych do związków zawierających grupy tiolowe, czego rezultatem jest powstawanie koniugatów GS-MEN [47]. Zmniejszenie ilości grup -SH może być również przyczyną spadku aktywności enzymów, które zawierają takie grupy oraz spadku ilości zredukowanego glutationu (GSH) [48,49].

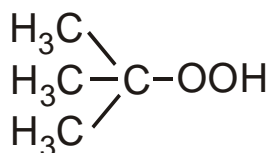


Ryc. 7 Cykl przemian chinonów i powstawanie reaktywnych form tlenu

Nieoksydacyjny mechanizm działania menadionu polega na regulacji ekspresji wielu genów białek zaangażowanych w cykl komórkowy. Między innymi MEN wpływa stymulująco na protoonkogeny takie jak *c-fos*, *c-jun* i *c-myc* czego konsekwencją jest zahamowanie cyklu komórkowego [50]. Podawanie menadionu przyczynia się do śmierci komórki na drodze apoptozy i nekrozy, w zależności od dawki i typu komórek. Stwierdzono, że w niskich dawkach (20µM) indukuje apoptozę, zaś w wysokich (60-150 µM) nekrozę [51-53].

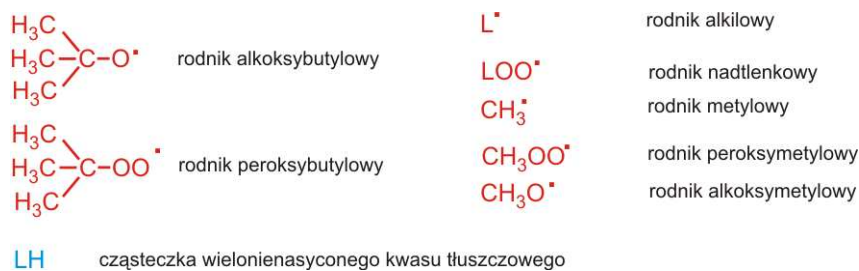
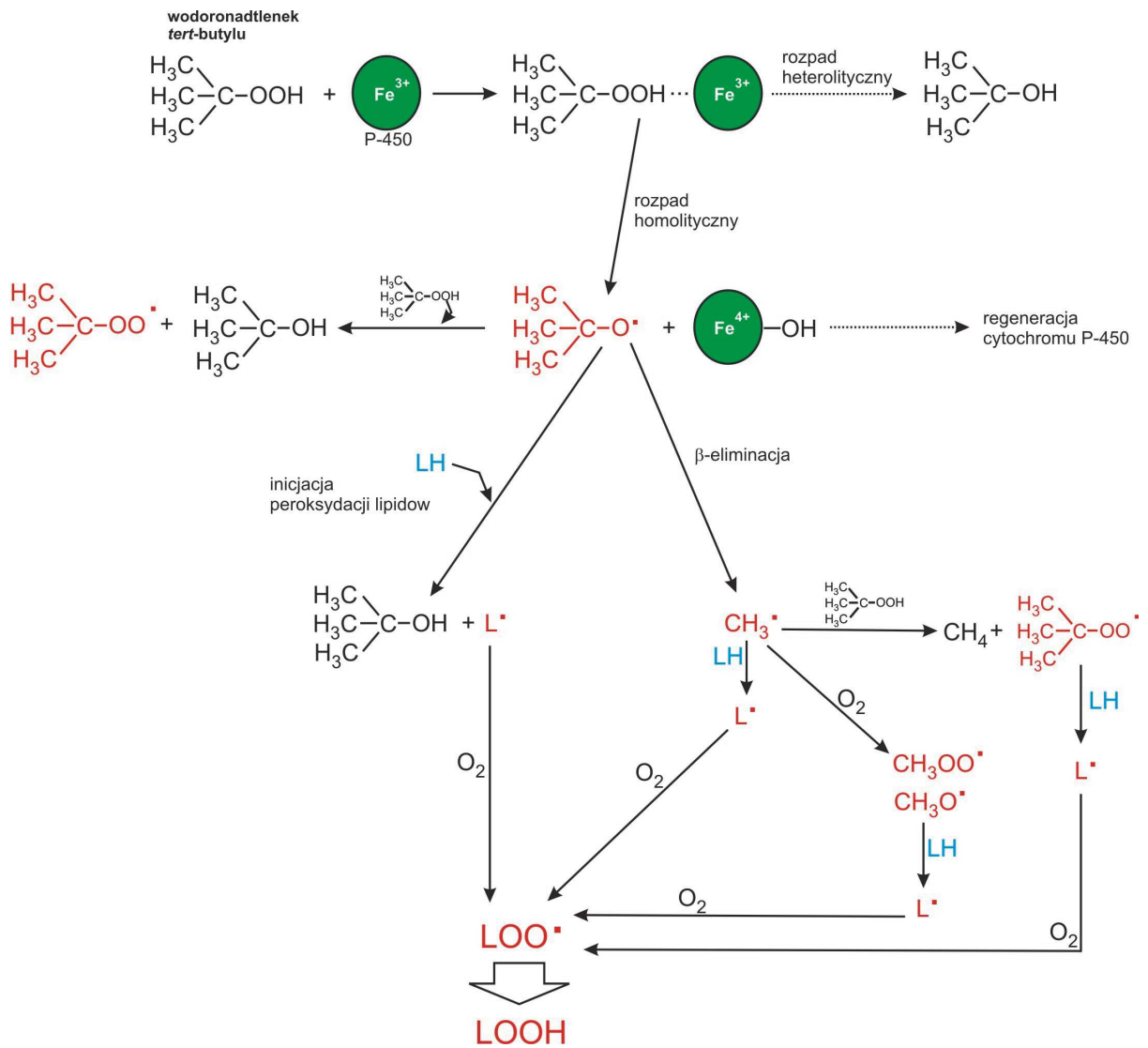
1.2.2 Wodoronadtlenek *tert*-butylu

Wodoronadtlenek *tert*-butylu (*t*BuOOH) jest analogiem krótkołańcuchowych nadtlenków lipidowych:



Ryc. 8 Chemiczny wzór *t*BuOOH

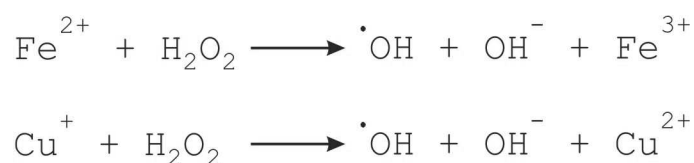
W komórce *t*BuOOH inicjuje proces peroksydacji lipidów i generuje specyficzne rodniki, które przyspieszają peroksydację oraz wchodzi w reakcje z DNA prowadzące do uszkodzenia zasad [54,55]. Aktywacja wolnorodnikowa *t*BuOOH odbywa się przy udziale jonów żelaza Fe^{3+} wchodzących w skład cytochromów P-450 (mitochondrialnych i mikrosomalnych). Na rycinie 9 przedstawiono przypuszczalny mechanizm interakcji wodoronadtlenku *tert*-butylu z cytochromem P-450 oraz wyszczególniono powstające wolne rodniki. Mechanizm działania *t*BuOOH polega również na utlenianiu grup -SH białek i glutationu, z czym związane jest zahamowanie aktywności enzymatycznej białek i spadek ilości GSH [56,57]. Ponadto wodoronadtlenek *tert*-butylu ma wpływ na homeostazę wapnia; hamuje pompę wapniową przez co zwiększa się ilość Ca^{2+} w cytoplazmie [58]. Uważa się, że ważną rolę w śmierci komórki indukowanej *t*BuOOH odgrywają mitochondria. Tam też w wyniku działania tego związku dochodzi do obniżenia syntezy ATP i wzrostu przepuszczalności błon mitochondrialnych. Inne efekty działania wodoronadtlenku *tert*-butylu to aktywacja fosfolipazy A_2 [59] i utlenianie NADPH [60]. Pośrednio *t*BuOOH bierze udział w tworzeniu nadtlenoazotynu [61]. W wyniku działania *t*BuOOH dochodzi do śmierci komórkowej na drodze apoptozy (obserwuje się fragmentację DNA i aktywację kaspaz [62] jak i nekrozy (za pośrednictwem nadtlenoazotynu) [63]. Działanie wodoronadtlenku *tert*-butylu może zostać zahamowane przez TEMPOL (należący do aminoksyli), który także eliminuje anionorodnik ponadtlenkowy [64].



Ryc. 9 Przymierzalny mechanizm interakcji wodoronadtlenku *tert*-butylu z cytochromem P-450 i powstanie pochodnych wolnych rodników *t*BuOOH. W wyniku rozpadu homolitycznego *t*BuOOH powstaje rodnik alkoksybutylowy, który inicjuje proces peroksydacji lipidów. Natomiast w wyniku β -eliminacji powstaje rodnik metylowy, prekursor pozostałych rodników: peroksymetylowego i alkoksymetylowego, które inicjują powstanie kolejnych nadtlenków kwasów tłuszczowych (LOOH). Schemat opracowano na podstawie pracy Weissa i Estabrooka [65].

1.2.3 Nadtlenek wodoru

Nadtlenek wodoru (H_2O_2) jest w komórce bezpośrednim produktem działania oksydoreduktaz takich jak oksydaza ksantynowa, moczanowa, D-aminokwasowa, α -hydroksykwasowa i inne. H_2O_2 może również powstawać w wyniku dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego, produkowanego w łańcuchu oddechowym, w reakcjach detoksykacji ksenobiotyków (i w samym ich cyklu redoks), w wyniku działania oksydazy NADPH i flawoprotein. Ostatnie badania nad tym związkem dowodzą, że może on powstawać na zewnątrz komórki w czasie interakcji ligandów z receptorami, co może świadczyć o jego zaangażowaniu w sygnalizację komórkową [66]. Nadtlenek wodoru jest bardzo dobrym utleniaczem, utlenia grupy indolowe, imidazolowe, fenolowe i tioestrowe ale biologicznie najbardziej istotne jest to, że działa na grupy tiolowe białek. Ponadto w wyniku reakcji utleniania jonów metali przejściowych (reakcje Fentona) przyczynia się do powstania wysoce reaktywnego rodnika wodorotlenowego:



Nadtlenek wodoru jest mało reaktywny, łatwo przenika przez błony komórkowe i pojawia się w różnych przedziałach komórki, tam też może generować $\cdot\text{OH}$. Do innych poznanych działań H_2O_2 należy aktywacja kanałów potasowych, co prowadzi do obniżenia pobudliwości komórek chemoreceptorowych [67], degradacja chromatyny [68] oraz indukcja apoptozy i nekrozy [69,70]. Nadtlenek wodoru i rodnik wodorotlenowy rozszerzają naczynia krwionośne działając bezpośrednio na mięśnie gładkie naczyń, jak też stymulują syntezę i uwalnianie śródbłonkowego czynnika relaksującego EDRF (ang. *endothelial-derived relaxing factor*) [71]. Ostatnie badania pokazują, że nadtlenek wodoru można traktować jako wtórny przekaźnik w sygnalizacji komórkowej. H_2O_2 aktywuje między innymi kinazę ASK-1 (kinaza kinazy fosforylującej MAPK; ang. *apoptosis signal-regulating kinase-1*) poprzez utlenienie tioredoksyny (będącej inhibitorem) i fosforylację aktywnej ASK-1 [72]. Nadtlenek wodoru może inaktywować komórkowe fosfatazy tyrozynowe poprzez utlenianie grup $-\text{SH}$ cysteiny. Inaktywacja fosfatazy prowadzi fosforylacji receptora EGF i jego internalizacji [72,73]. H_2O_2 jest rozkładany przez katalazę i peroksydazę glutationową, jak również może reagować z pirogronianem i α -ketoglutaranem w nieenzymatycznej reakcji opisanej przez Hollemana [74]:



1.3 ROLA REAKTYWNYCH FORM TLENU W PATOLOGII CIĄŻY.

1.3.1 Budowa i funkcje łożyska

Ludzkie łożysko jest wytwarzane przez płód i umiejscowione w błonie doczesnej macicy. Ma złożoną strukturę morfologiczną; głównie składa się z naczyń krwionośnych, przestrzeni naczyniowych i tkanki łącznej. Za tworzenie łożyska odpowiedzialny jest trofoblast, który składa się z komórek grupujących się w części zewnętrznej kosmówki. Początkowo komórki te tworzą jedną warstwę, następnie różnicują się na zewnętrzny syncytiotrofoblast i wewnętrzny cytotrofoblast, w którym tworzą się zawiązki naczyń. Trofoblast zaczyna się kształtować jeszcze przed zagnieżdżeniem się jaja płodowego. Zapłodnione jajo po pierwszych podziałach jako morula przemieszcza się do macicy. Następnie morula traci osłonkę przejrzystą i zaczyna się formować blastula. Komórki ulegają zróżnicowaniu; powstaje zewnętrzna warstwa – trofoektoderma (z niej powstanie trofoblast) i wewnętrzna grupa komórek – węzeł zarodkowy. Ludzkie macierzyste komórki trofoektodermy różnicują w dwa fenotypy komórek. Pierwszy z nich to kosmkowy cytotrofoblast (ang. *villous cytotrophoblast*) o wysokim potencjale proliferacyjnym i fuzjogennym. Drugi fenotyp to inwazyjny zewnątrzkosmkowy cytotrofoblast (ang. *extravillous cytotrophoblast*) tworzący kolumny cytotrofoblastyczne. Komórki kosmkowego cytotrofoblastu uczestniczą w tworzeniu syncytiotrofoblastu. Syncytiotrofoblast (zespólnia) jest wielojądrową tkanką, pokrywającą całą powierzchnię łożyska. Pierwotny syncytiotrofoblast powstaje na skutek łączenia się ze sobą sąsiadujących diploidalnych komórek cytotrofoblastu kosmkowego. Proces ten zostaje zatrzymany, gdy blastocysta całkowicie się zagnieżdży i jest opłaszczona syncytiotrofoblastem. Kolejnym etapem jest zwiększanie masy syncytiotrofoblastu, a zostaje to osiągnięte przez włączanie pojedynczych komórek kosmkowego cytotrofoblastu do istniejącego pierwotnego syncytiotrofoblastu (powstaje tzw. syncytiotrofoblast wtórny). Rozrastający się cyto- i syncytiotrofoblast jest bardzo inwazyjny, głęboko wnika w błonę doczesną macicy tworząc tzw. kolumny trofoblastyczne [75]. W wyniku rozrastania się trofoblastu dochodzi do naciekania maczynych naczyń krwionośnych i uruchamia się proces wymiany gazów, wydzielania hormonów, metabolizmu cholesterolu i kwasów tłuszczowych jak również przenoszenie substancji przez dyfuzję prostą (O_2 , CO_2 , fruktoza, ryboza) ułatwioną (glukoza), transport aktywny (aminokwasy) i endocytozę (np. żelazo).

Powstające łożysko rozwija się wraz z trwaniem ciąży i pod koniec ciąży waży około 0,5-0,6 kg, zaś grubość łożyska zmniejsza się wraz ze wzrostem jego powierzchni. Jego

powierzchnia płodowa jest pokryta przezroczystą owodnią a powierzchnia maczyna jest ściśle zespolona ze ścianą macicy. Od znajdującej się pod powierzchnią płodową płyty kosmkowej odchodzą liczne drzewa kosmkowe, które bezpośrednio stykają się z krwią maczyną. Kosmki omywane przez krew mają łączną powierzchnię około 13-15 m², zaś przestrzenie międzykosmkowe wypełnia około 200 ml maczyny krwi [76].

Wraz z zaawansowaniem ciąży łożysko ludzkie produkuje duże ilości hormonów steroidowych w tym progesteronu i estrogenów. W syncytiotrofoblastie ważną rolę odgrywa receptor estrogenowy, przy pomocy którego estrogeny mogą regulować funkcje fizjologiczne i biochemiczne łożyska, w tym biosyntezę progesteronu, przemianę glikokortykoidów oraz przepływ krwi w krążeniu maczynym i płodowym [77].

Przez łożysko przenikają prawie wszystkie leki, szczególnie łatwo salicylany i antybiotyki. Wiele ksenobiotyków wykorzystuje do transportu obecne w łożysku transportery serotoniny, noradrenaliny i dopaminy. Stężenie leków u płodu jest zwykle wyższe niż we krwi matki ze względu na niedojrzałe płodowe mechanizmy detoksykacji [78].

1.3.2 Łožysko jako źródło wolnych rodników.

Łožysko tworzy swój własny system ukrwienia, który powstaje w wyniku nacieczenia maczynych tętnic spiralnych przez trofoblast. Proces ten prowadzi do przekształcenia tętnic w maciczno-łożyskowe naczynia, które mogą łatwo się rozszerzyć, dostosowując się do zwiększonego napływu krwi maczyny do łożyska. Zwiększenie objętości krwi w krwioobiegu matki przyczynia się do zwiększenia ilości rozprowadzanego tlenu, więc jest to układ idealny do powstawania wolnych rodników tlenowych. Potwierdzone to zostało badaniami Wickensa i wsp. [79] a także Wanga i wsp. [80], w których wykazano między innymi wzrost ilości produktów peroksydacji lipidów w surowicy krwi kobiet ciężarnych. Stwierdzono również wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych (GPx) i antyoksydantów niskocząsteczkowych (α - tokoferol) w maczynie krwi, co może stanowić odpowiedź na generowane wolne rodniki [81].

W łożysku obserwuje się wzmożony proces peroksydacji lipidów, co jest przejawem trofoblastycznego stresu oksydacyjnego. Odpowiedzią na stres jest zwiększenie ilości antyoksydanów (witamina C i E, kwas moczowy, glutation) i aktywności katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy glutationowej i ceruloplazminy [82]. Mechanizmy obrony przed stresem oksydacyjnym w przebiegu procesu ciążyowego działają prawidłowo dopóki nie dochodzi do zaburzeń, związanych głównie z powstawaniem łożyska. U podstaw wielu patologii ciąży takich jak np. nadciśnienie i preeclampsja, cukrzyca insulinozależna,

małowodzie czy też przedwczesne odklejanie się łożyska leży zaburzenie równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej, czego konsekwencją jest chroniczny stres oksydacyjny. W tego typu komplikacjach obserwuje się nasilony proces peroksydacji i obniżenie skuteczności mechanizmów antyoksydacyjnych w porównaniu z ciążą prawidłową [83,84]. Peroksydacja lipidów jest głównie zaznaczona w tych zaburzeniach, a największą rolę odgrywa w preeclampsji.

Preeclampsja określana jako stan przedrzucawkowy występuje z częstością od 0,03 do 2,5% w zależności od kraju, opieki przedporodowej i porodowej. Zaburzenie to zostaje zdiagnozowane zazwyczaj w późnej ciąży a objawia się wzrostem ciśnienia krwi, białkomoczem, trombocytopenią i obrzękami [85]. W preeclampsji dochodzi do dysfunkcji matczynek komórek endotelialnych co prowadzi do komplikacji w kształtowaniu unaczynienia płodu, jak również w jego dalszym rozwoju [86]. W normalnej ciąży stosunek nadtlenków lipidowych do całkowitego poziomu lipidów jest nieznacznie podwyższony, w preeclampsji następuje wysoki wzrost tego stosunku i podniesienie poziomu LOOH w surowicy. Zwiększona produkcja nadtlenków lipidowych może sugerować, że niekontrolowana peroksydacja lipidów odgrywa istotną rolę w patofizjologii preeclampsji [87]. Etiologia tej choroby nie jest dokładnie poznana, nie można jednoznacznie stwierdzić czy peroksydacja jest przyczyną czy następstwem preeclampsji, istnieje jednak ścisła korelacja pomiędzy peroksydacją, a tym zaburzeniem. Walsh [88] uważa, że stan przedrzucawkowy może być wynikiem naruszenia równowagi pomiędzy ilością wolnych rodników a aktywnością systemów antyoksydacyjnych. Zostało to potwierdzone przez Poranena [89], który wykazał, że wzmożonej produkcji nadtlenków lipidowych towarzyszy spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz antyoksydantów nieenzymatycznych zarówno w surowicy jak i w łożysku. Zaobserwowano obniżenie ilości kwasu askorbinowego, α -tokoferolu i β -karotenu u kobiet z preeclampsją [90]. Proces zwiększonej peroksydacji lipidów jest najprawdopodobniej inicjowany przez anionorodnik ponadtlenkowy wytwarzany przez oksydazę NAD(P)H i oksydazę ksantynową, ponieważ oba enzymy ulegają nadekspresji wywołanej niedotlenieniem i ponowną reperfuzją w czasie nieprawidłowego unaczynienia łożyska [83].

W preeclampsji łożysko ludzkie produkuje dwa razy więcej nadtlenków lipidowych i występuje też zwiększona synteza tromboksanu, zaś w normalnej ciąży stosunek prostacyklin do tromboksanu przeważa na korzyść prostacyklin [91], Mechanizmy obronne są w tym schorzeniu obniżone, ujawnia się to po zbadaniu aktywności enzymów. W przypadku dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy glutationowej maleje ona, a aktywność katalazy utrzymuje się na stałym poziomie [92]. Dodatkowo, w łożyskach kobiet z preeclampsją

obserwuje się obniżenie aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej i transferazy glutationowej [93]. Innym aspektem jest niskie stężenie L-argininy w łożysku, co stymuluje syntazę tlenku azotu do preferencyjnego produkowania anionorodnika nadadtlenkowego. Powstający w wyniku reakcji NO^{\bullet} z $\text{O}_2^{\bullet-}$ nadtlenoazotyn przyczynia się do zwiększania naczyniowego stresu oksydacyjnego [85].

Wzrost poziomu nadadtlenków lipidowych i obniżenie ochrony antyoksydacyjnej występujące w preeclampsji jasno pokazują, że w zaburzeniu tym obecny jest silny stres oksydacyjny. Procesy te są również wskaźnikami stresu w ciążach normalnych tylko charakteryzują się mniejszym nasileniem. Na całokształt zmian, jakie zauważa się u matki i płodu w stanie przedrzucawkowym wpływają, niewątpliwie czynniki łożyskowe, czyli wzmożona produkcja RFT i wywoływane przez nie efekty, jak również hiperlipidemia [94] i zwiększone ilości żelaza występujące u matki [92]. To współdziałanie potwierdza się przez fakt, że wkrótce po porodzie symptomy preeclampsji znikają [95].

2. CEL PRACY

Tematyka pracy jest konsekwencją tematyki prac badawczych prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej, gdzie badano wpływ egzogennych wodoronadtlenków lipidowych na procesy syntezy steroidów w ludzim łożysku [96] oraz wykazano udział anionorodnika ponadtlenkowego w inicjacji NADPH-zależnej peroksydacji lipidów we frakcjach mitochondrialnych [97] i mikrosomalnych ludzkiego łożyska [98]. Ocena cytotoksycznego wpływu wybranych prooksydantów na komórki linii nowotworowej JAR (wykazujących wiele podobieństw metabolicznych do komórek trofoblastu) miało na celu wyjaśnienie wpływu stresu oksydacyjnego na procesy zachodzące w komórkach łożyska ludzkiego.

Celem niniejszej pracy było:

- zbadanie mechanizmu działania menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenku wodoru i ich rolę w indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach *choriocarcinoma*,
- poznanie odpowiedzi komórkowej – antyoksydacyjnej na różne typy indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach *choriocarcinoma*,
- wykazanie, czy śmierć komórek *choriocarcinoma* pod wpływem zastosowanych prooksydantów zachodzi na drodze apoptozy czy nekrozy.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Hodowla komórek

Materiał badań stanowiła nowotworowa linia komórkowa JAR (ATCC HTB-144) pochodząca z ludzkiego kosmówczaka (*choriocarcinoma*). Komórki z linii *choriocarcinoma* są morfologicznie komórkami nabłonkowymi cytotrofoblastu. Posiadają zdolność produkcji ludzkiej gonadotropiny łożyskowej (hCG), ludzkiej sommatotropiny łożyskowej (laktogen łożyskowy), progesteronu oraz estrogenu. Hodowlę komórek prowadzono w butelkach o objętości 250 ml (Sarstedt) w określonym środowisku, które stanowiło medium RMPI 1640, zawierającą dodatkowo: 2 mM L-glutaminę, 1,5 g/L wodorowęglan sodu (NaHCO₃), 4,5 g/L glukozy, 10 mM HEPES, 1 mM pirogronian sodowy, 10% inaktywowaną bydlęcą surowicę płodową (FBS) oraz antybiotyki: 100 IU/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny. Komórki rosły w nawilżonym środowisku 5% CO₂ w temperaturze 37°C. Przed każdym eksperymentem komórki pasażowano przy użyciu 0,25% trypsyny (z 0,03% EDTA) oraz hodowano minimum 12 godzin.

3.2 Protokół postępowania

Komórki rosły na płytkach (Sarstedt) do hodowli linii komórkowych o średnicy: 2, 6, 10 i 15 cm osiągając 70% konfluencji. Następnie poddawano je działaniu 100 µM menadionu, 100 µM wodoronadtlenku *tert*-butylu i 1 mM nadttlenku wodoru przez 24 godziny. W czasie trwania eksperymentu (tzn. w określonych odstępach czasu) mierzono przeżywalność, stan energetyczny komórek, stres oksydacyjny - pojawianie się reaktywnych form tlenu, aktywność enzymów antyoksydacyjnych i stężenie antyoksydantów.

3.3 Przeżywalność

3.3.1 Pomiar dehydrogenazy mleczanowej (LDH)

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) jest enzymem cytozolowym, który w warunkach fizjologicznych nie jest uwalniany do środowiska. Uszkodzenie błony plazmatycznej powoduje uwolnienie LDH z komórek do środowiska. Oznaczenie aktywności LDH w środowisku jest miarą toksyczności badanej substancji względem komórek w hodowli.

Komórki JAR inkubowano z związkami generującymi wolne rodniki na sześciostudzienkowych płytkach (6 x Ø 2 cm) w ilości 5 x 10⁵ - 1 x 10⁶ komórek na

studzienkę (co odpowiada ilości 0,2–0,5 mg białka). Następnie ze studzienek pobierano odpowiednią objętość medium, którą przeznaczano do badań, zaś pozostałe komórki lizowano 1% Tritonem X-100. W ten sposób przygotowane próbki odwirowano (300 x g przez 3 minuty) i supernatant również przeznaczono do badań. Analizowaną próbkę dodawano do mieszaniny inkubacyjnej zawierającej 50 mM bufor Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM pirogronian sodu, 0,15 mM NADH i w temperaturze 37°C mierzono spektrofotometrycznie (Beckman DU-68) pomiar spadku absorbancji NADH przy długości fali 340 nm. Wartość procentową całkowitej aktywności LDH stanowiła różnica spadku absorbancji NADH w komórkach lizowanych Tritonem X-100 i spadku absorbancji NADH w próbce medium hodowlanego [99].

3.3.2 Pomiar poziomu ATP

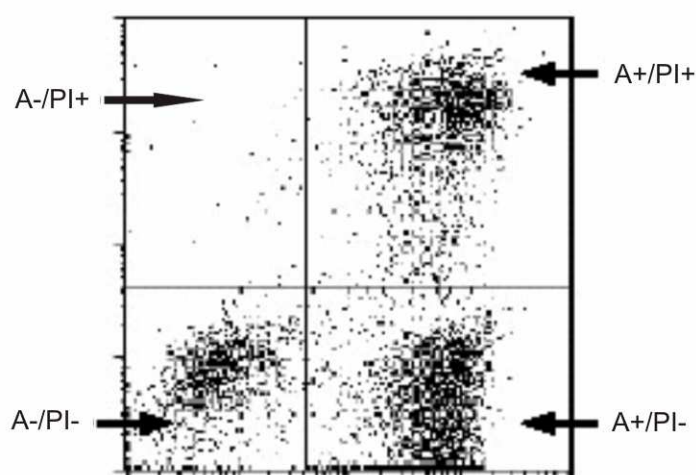
Komórki inkubowano z związkami generującymi wolne rodniki na płytkach (\varnothing 6 cm) w ilości $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ komórek na płytce (co odpowiada ilości 0,5 – 1 mg białka). Po skończonej inkubacji komórki zebrano używając trypsyny, przepłukano PBS-em i odwirowano (300 x g przez 3 minuty). Osad komórkowy umieszczono w 1,4 M HClO₄ i inkubowano w lodzie przez 15 minut w celu ekstrakcji nukleotydów, po czym wirowano przez 5 minut przy 20000 x g, w temperaturze 4°C. W osadzie (rozpuszczonym w 0,5 M NaOH) zmierzono spektrofotometrycznie ilość białka metodą Bradforda (przy długości fali 595 nm) [100]. Supernatant zobojętniono do pH 5-6 przy użyciu 3 M K₃PO₄ i odwirowano (20000 x g przez 5 min, 4°C). Uzyskany ekstrakt przeznaczono do dalszej analizy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Pomiar był wykonywany przy użyciu zestawu chromatograficznego Merck-Hitachi / Hewlett-Packard. Próbkę (20 μ l) rozdzielane były przy użyciu termostатовanej kolumny wysokociśnieniowej, dane chromatograficzne archiwizowano i analizowano przy użyciu programu HPChem firmy Hewlett-Packard. Z chromatogramów odczytywano wartości stężenia ATP (nmol/próbę), które następnie przeliczano na białko i podawano stężenie ATP w nmol/mg białka [101].

3.3.3 Ocena apoptozy i nekrozy, testem Annexin V-FITC Apoptosis Kit.

Jednym z pierwszych etapów programowanej śmierci komórkowej jest przemieszczanie się fosfatydyloseryny na zewnętrzną stronę błony komórkowej. Aneksyna V (Annexin V-FITC) związana chemicznie z tioizocyjaninem wiąże się specyficznie z fosfatydyloseryną i umożliwia detekcję wczesnych etapów apoptozy. Dodanie do

mieszaniny inkubacyjnej jodku propidyny (PI) pozwala jednocześnie badać integralność błony komórkowej. PI wnika do wnętrza komórki, wiąże się z kwasami nukleinowymi i po wzbudzeniu w świetle niebieskim ($\lambda = 420 \text{ nm}$) świeci na czerwono-pomarańczowo. Na podstawie testu [102-104] możemy więc rozróżnić cztery populacje komórek: nie barwiące się żadnym odczynnikiem [żywe (A-/PI-)]; barwiące się jedynie jodkiem propidyny [komórki nekrotyczne i/lub ciała apoptotyczne (A-/PI+)]; barwiące się w różnym stopniu aneksyną V [komórki apoptotyczne we wczesnym stadium apoptozy (A+/PI-)]; komórki barwiące się jednocześnie oboma odczynnikami [komórki w stadium późnej apoptozy i/lub nekrozy (A+/PI+)] (Ryc. 10).

W eksperymentach przedstawionych w niniejszej pracy, komórki *choriocarcinoma* inkubowano z prooksydantami na płytkach o średnicy 6 cm. Po zakończonej inkubacji komórki zebrano przez trypsynizację, odwirowano (300 x g przez 3 min) i przepłukano dwukrotnie PBS-em. Następnie komórki zawieszono w buforze (10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂) i dodano 5 μl Annexin-V FITC i 10 μl Propidium Iodide Buffer. Komórki inkubowano przez 15 minut w ciemności w temp. pokojowej i poddano analizie fluorymetrycznej na cytometrze przepływowym Coulter Elite FACSCAN (Francja) zaopatrzonego w filtry (488 nm ekscytacji i 530 nm emisji) dla stosowanych barwników. Do pomiaru dokonywano zliczeń 10000 komórek, zaś cytometr przepływowy został udostępniony przez Katedrę Histologii i Immunologii i AMG.



Ryc. 10 Wykres punktowy „dot plot” oceniający cytometrycznie przeżywalność komórek (apoptoza, nekroza) barwiących się aneksyną V i/lub jodkiem propidyny. Objasnienia skrótów umieszczono w tekście.

3.3.4 Badanie morfometryczne z użyciem mikroskopu konfokalnego.

Aby umożliwić badanie morfologii organelli, komórki posiano jednowarstwowo na wcześniej sonifikowanych i wyjałowionych szkiełkach nakrywkowych (24 x 24 mm) umieszczonych w 6-studzienkowych płytkach do hodowli. Przygotowane w ten sposób komórki inkubowano z proooksydantami. W celu wizualizacji mitochondriów użyto znacznika fluorescencyjnego Mito Tracker Red; CMXRos, który podano do inkubowanych komórek w stężeniu 100 nM pół godziny przed końcem eksperymentu. Po zakończonej inkubacji szkiełka przepłukano trzykrotnie ciepłym (37°C) PBS-em. Następnie komórki utrwalano przez 30 minut, zalewając studzienki roztworem składającym się z 2% formaldehydu (aldehyd mrówkowy) i 2% glutaraldehydu (aldehyd glutarowy). Po utrwaleniu, studzienki przepłukano 2 razy PBS-em i potraktowano 0,1% Tritonem X-100 przez 10 min. Po tym czasie komórki przepłukano dwukrotnie PBS-em a następnie przez godzinę inkubowano z FITC-Phalloidin, związkiem wybarwiającym filamenty F-aktyny. Po zakończonej inkubacji wyciągnięto szkiełka podstawowe z utrwalonymi komórkami, przepłukano je wodą, wysuszono i utrwalono na szkiełkach podstawowych. Preparaty znakowane fluorescencyjnie [105] analizowano przy użyciu skaningowego mikroskopu konfokalnego (BioRad Laserssharp MRC 1024, UK) w Katedrze i Zakładzie Anatomii i Neurobiologii AMG.

3.3.5 Badanie morfometryczne z użyciem mikroskopu elektronowego.

Komórki inkubowano w obecności proooksydantów na płytkach (\varnothing 15 cm) w ilości 5×10^6 – 10×10^6 komórek na płytce (co odpowiada ilości 2,5 – 5 mg białka). Po zakończonej inkubacji zebrano z płytek medium zawierające pływające komórki, które następnie wirowano przy prędkości 300 x g przez 3 minuty. Na płytki i do probówek z odwirowanymi komórkami dodano utrwalacz składający się z 2% roztworu formaldehydu i 2% roztworu glutaraldehydu w 0,1 M buforze kakodylanu sodu (pH 7,4). Utrwalanie odbywało się w temp. 4°C (płytki i probówki z komórkami równomiernie wytrząsano przy 120 Mot/min) przez godzinę. Po skończonym utrwalaniu, komórki z płytek zeszkrobano (używając plastikowej skrobaczki) i zarówno komórki z płytek jak i komórki z probówek wirowano przy prędkości 300 x g przez 10 minut. Następnie połączono obie partie komórek i zwirowano je przy prędkości 300 x g przez 10 minut. Tak uzyskany osad komórkowy przepłukano 0,1 M buforem kakodylanu sodu (pH 7,4). Następnie komórki umieszczono w tym samym buforze i chłodzono w temp. 4°C przez 1 godzinę. Po odwirowaniu i usunięciu supernatantu komórki zalewano 1 % OsO₄ w 0,1 M buforze kakodylanu sodu (pH 7,4) i pozostawiono w temp. 4°C

przez 8 - 12 godzin. Po zakończonej inkubacji osad komórkowy wirowano przy prędkości 10000 x g przez 5 minut i przepłukano buforem kakodylanowym o pH 7,4. Następnie tak utrwalone komórki odwadniano stosując alkohol etylowy o wzrastającym stężeniu od 25% do 100%, z tym, że pierwsze odwadnianie przeprowadzono w 25% alkoholu etylowym zawierającym 1% octan uranylu. Ostatnim etapem odwadniania było przesylenie komórek tlenkiem propylenu (C_3H_6O), a następnie tlenkiem propylenu domieszkowanym żywicą epoksydową zawierającą: DDSA, NMA, DMP-30 i epoksyd eponu [106]. W ten sposób przygotowane komórki zawieszano w żywicy epoksydowej i umieszczano na 3-4 dni w temp. 60°C. Po wysuszeniu próbek przygotowano preparaty i analizowano przy użyciu mikroskopu elektronowego (Zakład Anatomii i Biologii Komórki, Akademia Medyczna Nagoya, Japonia).

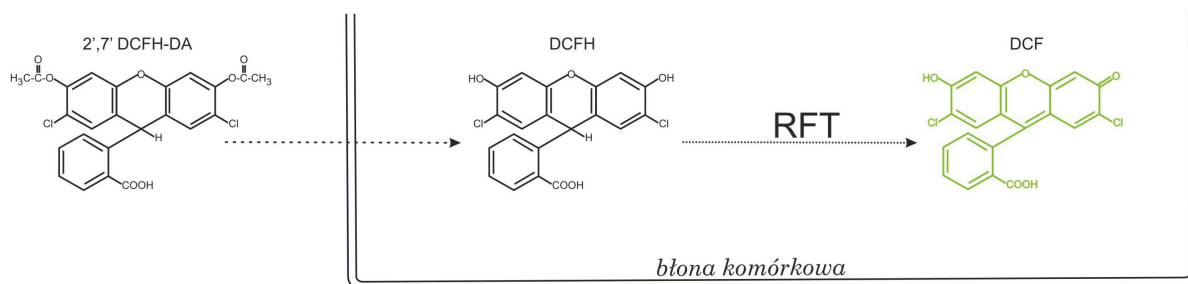
3.4 Pomiar stresu oksydacyjnego

3.4.1 Pomiar poziomu wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (RTF) metodą cytometrii przepływowej:

- **anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$)** został zmierzony przy użyciu dihydroethidium (DHE) [107,108]. Istota pomiaru polega na tym, że zredukowana pochodna etyldyny przechodzi przez błonę komórkową i po utlenieniu silnie wiąże się z DNA. DHE jest utleniany głównie przez anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) i fluoryzuje na czerwono. Intensywność świecenia DHE równa się wobec tego ilości powstającego anionorodnika ponadtlenkowego. Komórki JAR inkubowano z prooksydantami na płytkach o średnicy 6 cm. Pół godziny przed zakończeniem inkubacji do płytki z komórkami dodano 10 μ M DHE. Po zakończonej inkubacji komórki zebrano przez trypsynizację i przepłukano PBS-em. Następnie komórki umieszczono w PBS-ie i natychmiast poddawano analizie na cytometrze przepływowym zaopatrzonego w filtry (518 nm ekscytacji i 605 nm emisji) dla barwnika DHE, przy czym dokonywano zliczeń 10000 komórek.
- pomiaru **pochodnych nadtlenczków** dokonano przy użyciu 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny (2',7'-DCFH-DA) [109,110]. Związek ten jest związkiem lipofilnym i swobodnie przechodzi przez nienaruszoną błonę komórkową. W żywej komórce 2',7'-dioctan dichlorofluoresceiny ulega rozkładowi przez esterazy wewnątrzkomórkowe do dichlorofluoresceiny (DCFH; o właściwościach lipofobowych). DCFH reaguje z nadtlentkiem wodoru, tlenkiem azotu,

nadtlenoazotem i nadtlenkami lipidowymi (LOOH) [108,111,112]. Utleniona dichlorofluoresceina (DCF) fluoryzuje przy 525 maksimum adsorpcji (Ryc. 11) i intensywność jej świecenia służy do wyliczenia ilości powstających RFT.

Komórki *choriocarcinoma* inkubowano z prooksydantami na płytkach o średnicy 6 cm i pół godziny przed zakończeniem eksperymentu do komórek dodano 20 μ M 2',7'-DCFH-DA. Po zakończonej inkubacji komórki zebrano przez trypsynizację i przepłukano PBS-em. Następnie umieszczono komórki w PBS-ie i natychmiast poddano je analizie na cytometrze przepływowym posiadającym filtry (495 nm ekscytacji i 530 nm emisji) dla widma barwnika, przy czym dokonywano zliczeń 10000 komórek.

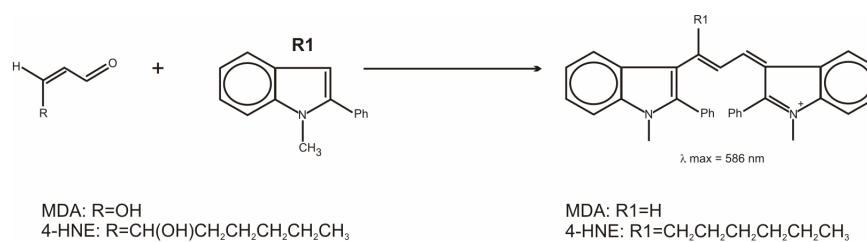


Ryc. 11 Wykrywanie reaktywnych form tlenu metodą fluorescencyjną przy użyciu 2',7'-dioctanu dichlorofluoresceiny. Objaśnienia skrótów w tekście.

3.4.2 Pomiar peroksydacji lipidów.

Komórki inkubowano w obecności związków generujących RTF na płytkach o średnicy 15 cm. Po zakończonej inkubacji komórki zebrano przez zeszkobanie, odwirowano z prędkością 300 x g przez 3 minuty i przepłukano PBS-em. Następnie w osadzie komórkowym oznaczono poziom malondialdehydu (MDA) i 4-hydroksy-2-nonenalu (4-HNE) – głównych produktów peroksydacji lipidów i ilość białka. Powstałe produkty mierzono przy użyciu zestawu do oznaczania produktów peroksydacji lipidów firmy Calbiochem - Lipid Peroxidation Assay Kit.

Reakcja powstałych MDA i 4-HNE z N-metylo-2-fenylindolem (R1) prowadzi do powstania stabilnego produktu – chromoforu, który oznacza się spektrofotometrycznie przy długości fali 586 nm (Ryc. 12). We wszystkich procedurach zastosowano się do instrukcji producenta kitu, zaś ilość MDA i 4-HNE wyrażono w postaci nmoli/mg białka [113].



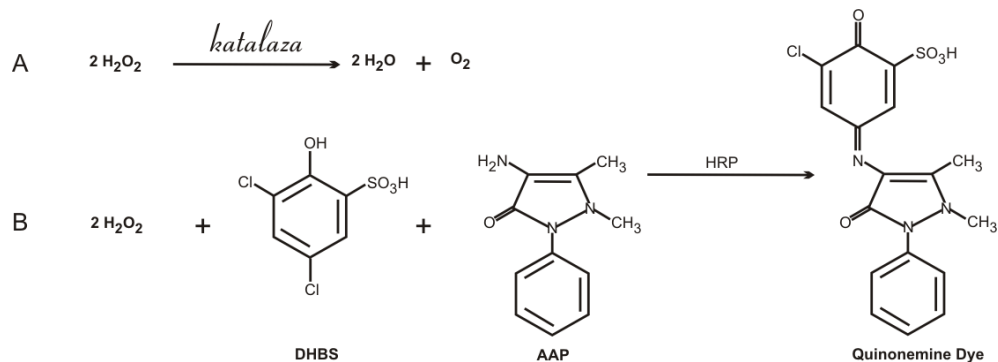
Ryc. 12 Reakcja powstawania chromoforu. Objaśnienia skrótów w tekście.

3.5 Pomiar aktywności enzymatycznej enzymów antyoksydacyjnych i zaangażowanych w metabolizm GSH i ATP.

Komórki JAR inkubowano w obecności prooksydantów na płytkach o średnicy 15 cm. Po zakończonej inkubacji komórki zebrano przez zeszkrobanie z płytki, odwirowano (300 x g przez 3 min) i przepłukano PBS-em. Następnie osad komórkowy umieszczono w objętości 1 ml zimnego (4°C) PBS-u i homogenizowano przez 1 min. używając ręcznego homogenizatora (ang. *pellet pestce motor*). Po odwirowaniu (2100 x g przez 5 min), supernatantu używano do spektrofotometrycznego pomiaru aktywności głównych enzymów antyoksydacyjnych oraz wybranych enzymów glikolizy i szlaku fosfopentozowego, oraz oznaczono stężenie białka (metodą Bradforda).

- **Dysmutazę ponadtlenkową** zmierzono metodą adrenalinową [114] bez rozróżniania aktywności SOD-1 i SOD-2. Do mieszaniny inkubacyjnej (50 mM bufor węglanowy, pH 10,2 zawierający 0,1 mM EDTA; 4mM roztwór adrenaliny w 10 mM HCl) dodawano ekstrakt komórkowy w ilości powodującej przyrost absorbancji nie większy niż o 0,1 w ciągu 1 minuty. Aktywność enzymu mierzono spektrofotometrycznie oznaczając szybkość utleniania adrenaliny w temperaturze 37°C, przy długości fali 325 nm. Aktywność SOD przedstawiono jako ilość nmoli/min/mg białka.
- **Katalaza** została zmierzona przy użyciu zestawu Catalase Assay Kit firmy Calbiochem. Oznaczenie aktywności enzymu odbywało się dwuetapowo. Najpierw wykreślono wzorcową krzywą aktywności katalazy w stosunku do ilości rozłożonego nadtlenku wodoru (Ryc. 14A). Następnie, badany supernatant zawierający katalazę był inkubowany przez 1 minutę w obecności wzorcowego H₂O₂. Reakcja została przerwana poprzez dodanie azydki sodu i zmierzono ilość pozostałego H₂O₂ (reakcja 2; zastosowane skróty: DHBS – kwas 3,5-dichloro-2-hydroksybenzenosulfonowy, AAP – aminoantypiren, HRP – peroksydaza chrzanowa). Powstały związek

Quinonemine Dye (N-(4-antypirylo)-3-chloro-5-sulfono-p-benzochinonemonoimina) (Ryc. 14B) był oznaczany w temperaturze 25°C, spektrofotometrycznie przy długości fali 520 nm [115,116]. Aktywność katalazy przedstawiono jako ilość nmoli/min/mg białka.



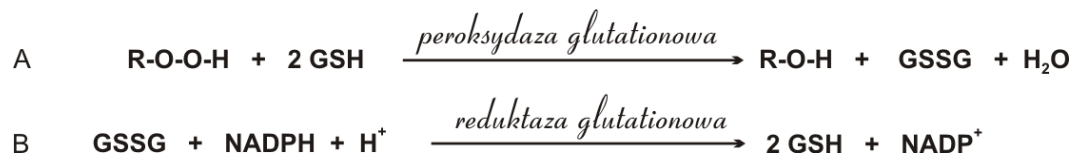
Ryc. 13 Mechanizm działania zestawu do oznaczania katalazy

A. reakcja służąca do wykreślenia krzywej wzorcowej

B. reakcja zasadnicza

Objaśnienia skrótów w tekście.

- **Peroksydazę glutationową** cytozolową (GPx-1) zmierzono używając zestawu Glutathione Peroxidase Assay Kit firmy Calbiochem. W reakcji redukcji organicznego nadtlenku lipidowego ROOH (reakcję indukowano wodoronadtlenkiem *tert*-butylu) przez glutation zredukowany udziałem GPx powstaje glutation utleniony, który jest substratem reduktazy glutationowej (Ryc. 15A). GR (reduktaza glutationowa) redukując GSSG do 2 GSH równocześnie utlenia NADPH do NADP^+ (Ryc. 15B) co wiąże się ze spadkiem absorbancji przy długości fali 340 nm. Aktywność GPx mierzono spektrofotometrycznie oznaczając spadek stężenia NADPH w temperaturze 25°C i przedstawiano w postaci nmoli/min/mg białka.



Ryc. 14 Mechanizm działania zestawu do oznaczania peroksydazy glutationowej

A. reakcja redukcji ROOH, B. reakcja utleniania NADPH. Objasnienia skrótów w tekście.

- **Dehydrogenazę aldehydu-3-fosfoglicerynowego** zmierzono następująco: do mieszaniny inkubacyjnej (10 mM pirofosforan sodu, pH 8,5; 25 mM arsenian sodu; 0,25 mM NAD⁺; 1 mM 3-fosfogliceraldehyd) dodawano ekstrakt komórkowy w ilości powodującej przyrost absorbancji nie większy niż o 0,1 w ciągu 1 minuty. Aktywność enzymu mierzono spektrofotometrycznie oznaczając wzrost stężenia NADH w temperaturze 25°C, przy długości fali 340 nm. Aktywność GAPDH przedstawiono jako ilość nmoli/min/mg białka [117].
- **Dehydrogenaza glukozy-6 fosforanowa:** do mieszaniny inkubacyjnej (50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM 6-fosfoglukonian; 5 mM glukozy-6-fosforan 0,25 mM NADP⁺; 1 mM MnCl₂) dodawano ekstrakt komórkowy. Aktywność mierzono spektrofotometrycznie oznaczając wzrost stężenia NADPH w temperaturze 37°C, przy długości fali 340 nm. Aktywność w badanej próbie jest sumą aktywności dehydrogenazy 6-fosfoglukonianowej (6PGDH) i G-6-PDH. Aktywność G-6-PDH w badanej próbie obliczano odejmując od wartości uzyskanej w wyniku pomiaru, wartość aktywności 6PGDH (aktywność 6PGDH mierzono następująco: do mieszaniny inkubacyjnej: 50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM 6-fosfoglukonian; 0,25 mM NADP⁺; 1 mM MnCl₂ dodawano ekstrakt komórkowy w ilości powodującej przyrost absorbancji nie większy niż o 0,1 w ciągu 1 minuty) w tej samej próbie. Aktywność G-6-PDH przedstawiono jako ilość nmoli/min/mg białka [118].

3.6 Pomiar stężenia GSH.

Komórki *choriocarcinoma* inkubowano z prooksydantami na płytkach o średnicy 6 cm, po zakończonej inkubacji zebrano je przez trypsynizację, odwirowano przy prędkości 300 x g przez 3 minuty i przepłukano PBS-em. Uzyskany osad komórkowy precypitowano w acetonitrylu (CH₃CN), w lodzie przez 15 minut. Następnie precypitant odwirowano (20000 x g przez 5 minut, w temperaturze 4°C). Zebrany supernatant zamrażano w ciekłym azocie i następnie liofilizowano, zaś w osadzie zmierzono ilość białka. Uzyskany liofilizat rozpuszczono w wodzie i przeznaczono do dalszej analizy metodą tandemowej spektrometrii masowej LC-MS/MS. Uzyskane wartości z pomiarów podawano jako ilości nanomoli GSH w miligramie białka [119]. Dokonując pomiaru glutationu przeanalizowano występowanie specyficznego koniugatu GS-MEN [119].

3.7 Metody statystyczne.

Wyniki przedstawiono jako wartości średniej oraz wartości odchylenia standardowego (SD) z minimum trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. Analiza danych została wykonana przy pomocy programu SigmaPlot (Systat software).

3.8 Odczynniki

BioSource Inc. (USA)

zestaw do oznaczania apoptozy i nekrozy: Annexin V-FITC Apoptosis Kit ApoTarget (PHN1010);

Calbiochem (USA)

zestawy do oznaczania enzymów antyoksydacyjnych: CAT: Catalase Assay Kit (Cat. No. 219263); GPx: Glutathione Peroxidase Assay Kit (Cat. No. 354104); produktów peroksydacji lipidów: MDA i 4-HNE: Lipid Peroxidation Assay Kit (Cat. No. 437634);

Gibco (USA)

inaktywowana bydlęca surowica płodowa (FBS);

Merck (Niemcy)

acetonitryl; kwas nadchlorowy; ortofosforan tripotasowy;

Molecular Probes Inc. OR (USA)

2',7'DCFH-DA (2',7'- dioctan dichlorofluoresceiny); DHE (dihydroethidium); CMXRos (Mito Tracker Red);

Polskie Odczynniki Chemiczne (Polska)

99,9% alkohol etylowy; 96% alkohol etylowy; kwas solny; odczynnik Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% alkohol etylenowy, 8,5% kwas fosforanowy); węgiel wapnia

Polysciences, Inc. (USA)

aldehyd glutarowy; aldehyd mrówkowy; DDSA (bezwodnik kwasu dodecynylobursztynianowego); DMP-30 (2,4,6-tri(dimetyloaminometylo)-fenol); epoksyd eponu; kakodylan sodu; NMA (bezwodnik metylonorborno-2,3-dikarboksylowy); octan uranylu; tlenek osmu; tlenek propylenu;

Roche Diagnostics GmbH (Niemcy)

6-fosfoglukonian;

Sigma-Aldrich Co. (USA)

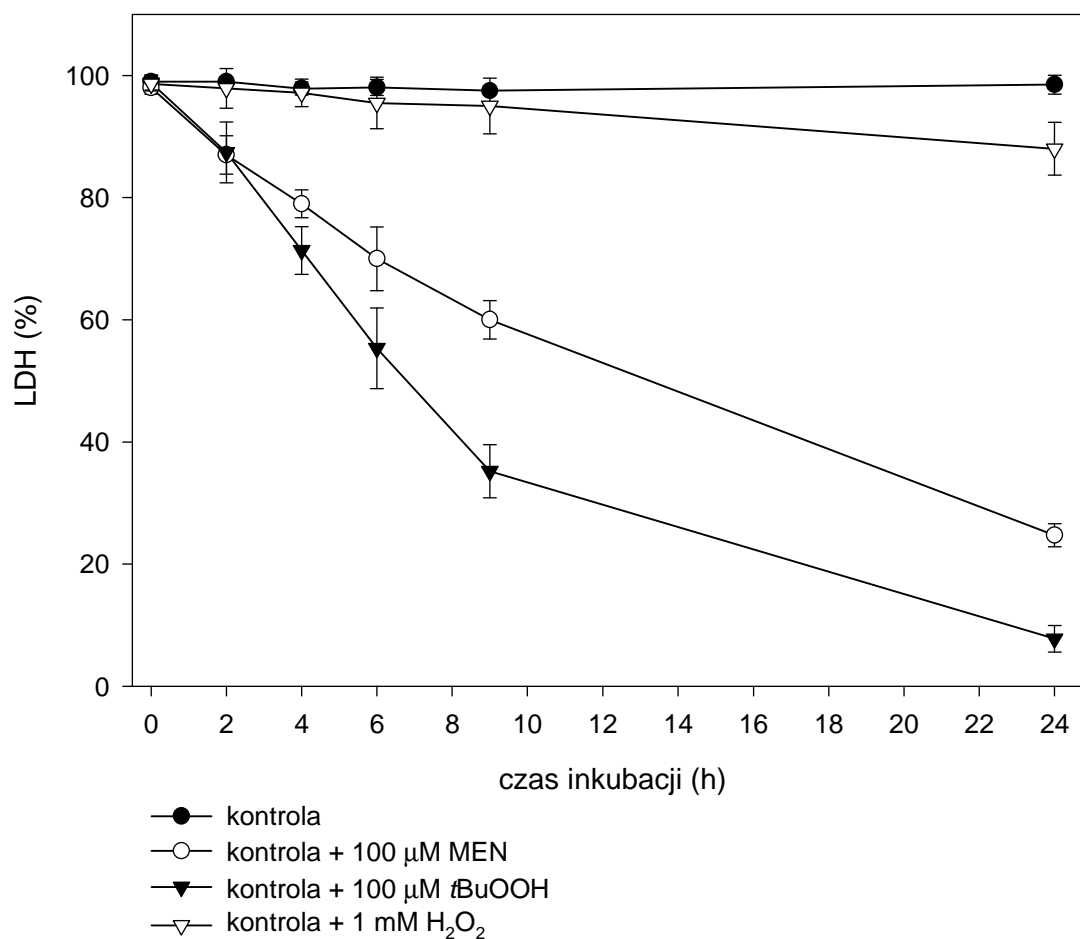
3-fosfogliceraldehyd; albumina, adrenalina; antybiotyki (penicylina, streptomycyna), arsenian sodu; chlorek manganu; chlorowódór; EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy); FITC-falloidyna (FITC-Phalloidin); glukoza; glukozo-6-fosforan; HEPES (kwas N-(2-hydroksyetylo)-piperazyno-N'-etanosulfonowy); L-glutamina; menadion; NAC (N-acetylocysteina); NAD⁺; NADH; nadtlenek wodoru; PBS (bufor potasowo-fosforanowy); pirofosforan sodu; pirogronian sodu; pożywka RMPI 1640; Tris (kwas N-tris(hydroksymetylo)-metylo-2-aminoetylosulfonowy); Triton X-100; trypsyna; wodoronadtlenek sodowy; wodoronadtlenek *tert*-butylu; wodorowęglan sodu.

4. WYNIKI

4.1 Wpływ menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenku wodoru na przeżywalność komórek linii JAR

4.1.1 Wpływ menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenku wodoru na uwalnianie LDH i stężenie ATP w komórkach JAR

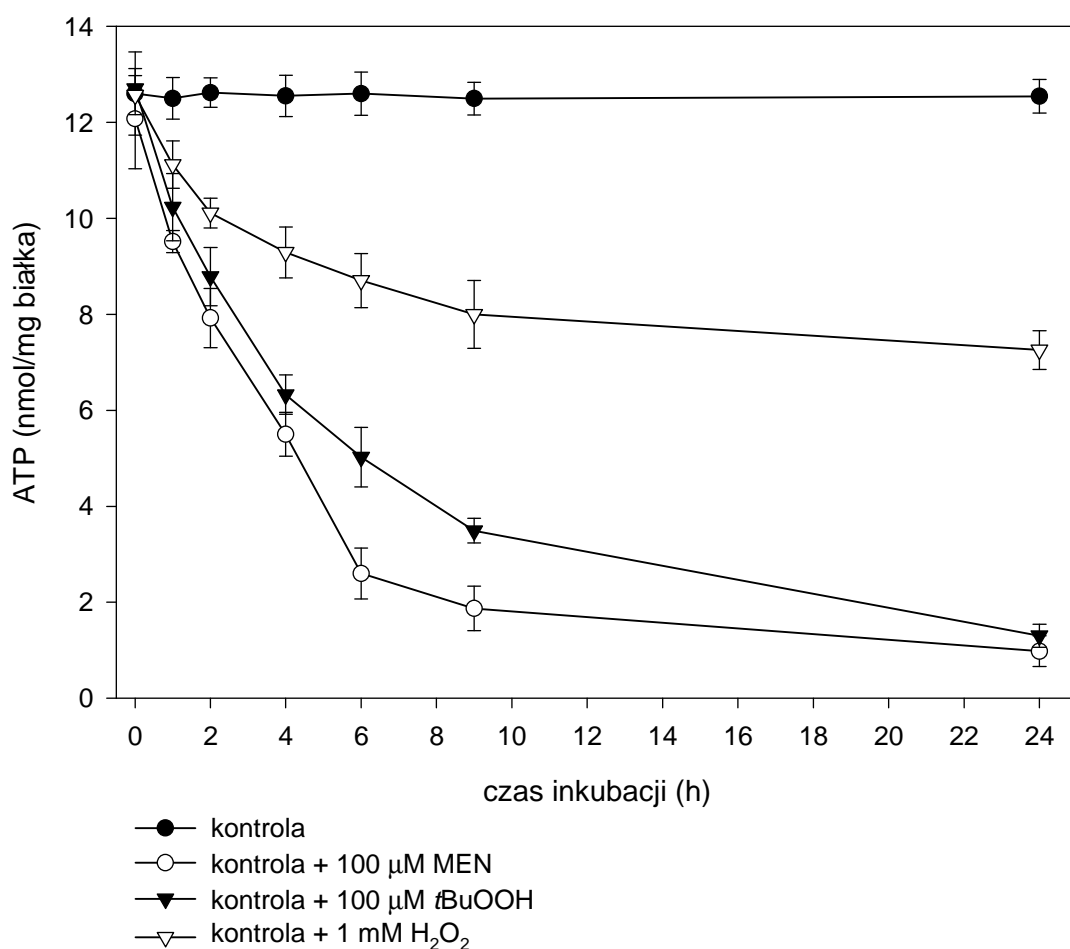
Badana linia komórek kosmówczaka była hodowana w obecności 100 μM MEN, 100 μM *t*BuOOH i 1mM H_2O_2 przez 24 godziny i w tym okresie mierzono przeżywalność komórek oceniając proces uwalniania przez komórki dehydrogenazy mleczanowej (LDH) do środowiska inkubacyjnego (100% LDH oznacza 100% przeżywalności komórek).



Ryc. 15 Wpływ 100 μM MEN, 100 μM *t*BuOOH i 1mM H_2O_2 na uwalnianie LDH w komórkach JAR, kontrola to komórki nie poddawane działaniu prooksydantów. Warunki inkubacji jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD z 5 niezależnych powtórzeń.

Rycina 15 przedstawia spadek przeżywalności komórek JAR traktowanych menadionem, wodoronadtlenkiem *tert*-butylu i nadtlakiem wodoru. W czasie trwania eksperymentu komórki kontrolne wykazywały niewielki spadek przeżywalności (minimalny wpływ LDH do środowiska inkubacyjnego) aż do 24 godzin. Największy spadek w przeżywalności komórek JAR zaobserwowano w czasie inkubacji z wodoronadtlenkiem *tert*-butylu. Po czterech godzinach inkubacji z *t*BuOOH odnotowano śmierć 29% komórek, liczba ta wzrastała w czasie osiągając 92% komórek martwych w 24 godzinie pomiaru LDH. Menadion miał również znaczący wpływ na przeżywalność komórek JAR. Po czterech godzinach inkubacji komórek z MEN oznaczono 21% komórek martwych, ilość ta wzrosła do 75% w 24 godzinie inkubacji. Natomiast nadtlak wodoru nie miał istotnego wpływu na zmniejszenie przeżywalności komórek *choriocarcinoma*. Po 9 godzinach inkubacji z H₂O₂ 95% komórek nadal żyło, dopiero w 24 godzinie pomiaru stwierdzono niewielki 12% spadek przeżywalności komórek.

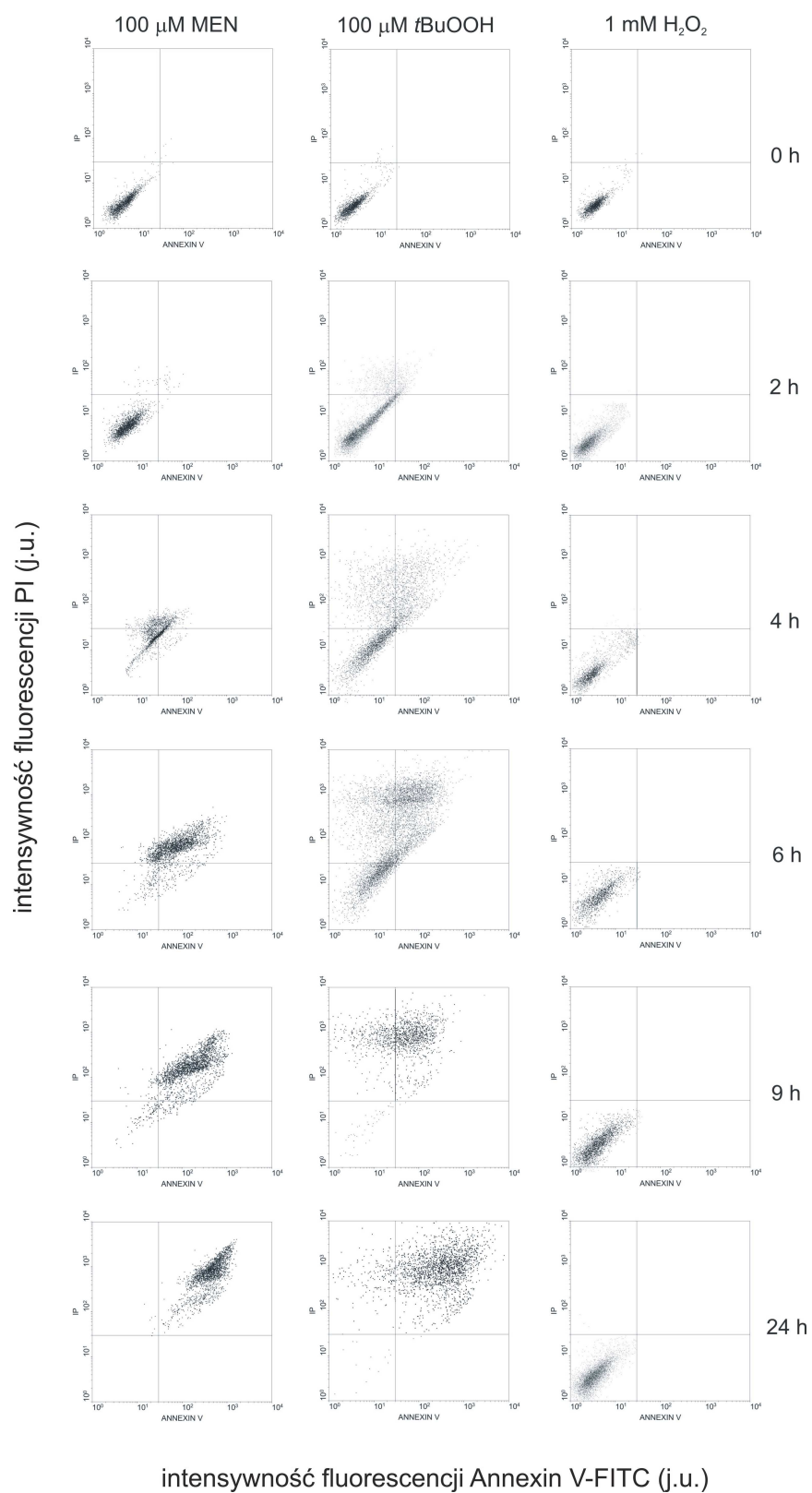
Spadek wewnątrzkomórkowego stężenia ATP wpływa także na przeżywalność komórek, dlatego też zbadano poziom ATP w komórkach *choriocarcinoma* poddanych działaniu wybranych prooksydantów. Linia komórek JAR była inkubowana przez 24 godziny w obecności 100 μM MEN, 100 μM *t*BuOOH i 1mM H₂O₂ i w czasie trwania inkubacji (tzn. w określonych odstępach czasu) mierzono stężenie ATP. Stężenie adenozynotrójfosforu w komórkach nie poddanych działaniu związków generujących reaktywne formy tlenu (czyli w komórkach kontrolnych) było stałe przez 24 godziny inkubacji i wynosiło 12,6 ± 0,87 nmol/mg białka (Ryc. 16). Spadek poziomu ATP był znaczący w czasie inkubacji komórek JAR zarówno z menadionem jak i z wodoronadtlenkiem *tert*-butylu. Po czterech godzinach inkubacji ilość ATP spada 2,3-krotnie w komórkach poddanych działaniu menadionu i 2-krotnie w komórkach traktowanych *t*BuOOH. Po 9 godzinach odnotowano już duży spadek ilości ATP, 7-krotny (w stosunku do kontroli) w komórkach inkubowanych z MEN i 3,5-krotny (w stosunku do kontroli) w komórkach poddanych działaniu wodoronadtlenku *tert*-butylu. Po 24 godzinach inkubacji w komórkach inkubowanych z menadionem i wodoronadtlenkiem *tert*-butylu stężenie ATP stanowiło odpowiednio 7% i 10% stężenia ATP komórek kontrolnych (Ryc. 16). Poddanie komórek JAR działaniu nadtlaku wodoru również wpłynęło na obniżenie stężenia ATP, ale spadek ATP był znacznie mniejszy niż w komórkach traktowanych MEN i *t*BuOOH. W 9 godzinie inkubacji komórek JAR z H₂O₂ zaobserwowano 1,5-krotny spadek stężenia ATP (w stosunku do kontroli) i taki poziom ATP (około 7,5 nmol/mg białka) utrzymywał się do 24 godziny inkubacji (Ryc. 16).



Ryc. 16 Wpływ 100 μ M MEN, 100 μ M *t*BuOOH i 1mM H₂O₂ na stężenie ATP w komórkach JAR, kontrola to komórki nie poddawane działaniu prooksydantów. Warunki inkubacji jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD z 4 niezależnych powtórzeń.

4.1.2 Detekcja apoptozy i nekrozy metodą cytometrii przepływowej w komórkach *choriocarcinoma* poddanych działaniu menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenku wodoru

Wpływ wybranych prooksydantów na przeżywalność komórek JAR oceniono także przy użyciu testu Annexin V-FITC Apoptosis Kit. Komórki kosmówczaka były inkubowane w środowisku zawierającym odpowiednio 100 μ M MEN, 100 μ M *t*BuOOH i 1mM H₂O₂, następnie zostały wybarwione aneksyną V i jodkiem propidyny i umieszczone w cytometrze przepływowym. Metodą cytometrii przepływowej oceniono procent komórek umierających w procesie apoptozy i nekrozy (Ryc. 17).



Ryc. 17 Cytometryczna analiza typu „dot plot” komórek *choriocarcinoma* poddanych działaniu 100 μM MEN, 100 μM tBuOOH i 1mM H_2O_2 wyznaczonych aneksyną V i jodkiem propidyny. Warunki inkubacji jak w Materiałach i Metodach. Wykres stanowi reprezentatywny „dot plot” z trzech niezależnych powtórzeń.

Analiza danych (Ryc. 17) wskazuje, że komórki linii JAR hodowane w środowisku zawierającym menadion umierają głównie w procesie nekrozy zainicjowanej w czwartej godzinie inkubacji. Niewielka część komórek traktowanych menadionem wchodzi na drogę apoptozy, w 4 godzinie pojawiają się pierwsze komórki apoptotyczne [Tab. 1, 4h; (A+/PI-) = 5,97 (\pm 1,1) %], których ilość wzrasta osiągając mniej niż 10% po 9 godzinach inkubacji [Tab. 1, 9h; (A+/PI-) = 8,68 (\pm 2,1) %]. Większość komórek JAR poddanych działaniu menadionu wchodzi na drogę nekrozy, w czwartej godzinie inkubacji procent komórek nekrotycznych wynosi 27 (\pm 2) [Tab. 1, 4h; (A+/PI+) + (A-/PI+)], procent ten w czasie inkubacji zwiększa się osiągając wartość 99,66 (\pm 0,7) po 24 godzinach [Tab. 1, 24h; (A+/PI-) + (A-/PI+)].

100 μ M MEN	A+/PI-	A+/PI+	A-/PI+
czas inkubacji (h)	(%)	(%)	(%)
0h	0,02	0,01	0,06
2h	0,08	0,03	0,16 (\pm 0,1)
4h	5,97 (\pm 1,1)	12,27 (\pm 2,5)	14,78 (\pm 1,6)
6h	6,31 (\pm 1,2)	50,77 (\pm 5,3)	20,44 (\pm 3,1)
9h	8,68 (\pm 2,1)	82,85 (\pm 6,1)	2,47 (\pm 0,7)
24h	0,15 (\pm 0,4)	99,56 (\pm 0,7)	0,1

Tab. 1 Indukowana menadionem apoptoza i nekroza komórek JAR. Warunki inkubacji jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD z 3 niezależnych powtórzeń.

Komórki *choriocarcinoma* poddane działaniu wodoronadtlenku *tert*-butylu umierają śmiercią nekrotyczną (Ryc. 17). Nie obserwuje się procesu wchodzenia komórek na drogę apoptozy, odnotowano zaledwie 1,06% komórek apoptotycznych w 4 godzinie inkubacji (Tab. 2). Proces nekrozy zaczyna się już w drugiej godzinie inkubacji komórek JAR z *t*BuOOH, gdzie zaobserwowano 17,7 (\pm 2) % komórek nekrotycznych [Tab. 2, 2h; (A+/PI+) + (A-/PI+)]. Żywotność komórek JAR szybko zmniejsza się w czasie inkubacji z wodoronadtlenkiem *tert*-butylu, po 6 godzinach ponad połowa komórek jest martwych i stanowi 67,28% komórek nekrotycznych [Tab. 2, 6h; (A+/PI+) + (A-/PI+)].

100 μM tBuOOH			
czas inkubacji (h)	A+/PI- (%)	A+/PI+ (%)	A-/PI+ (%)
0h	0,03	0,01	0,08
2h	1,04 (\pm 0,2)	3,87 (\pm 1,1)	13,87 (\pm 2,7)
4h	1,06 (\pm 0,3)	31,78 (\pm 3,5)	24,31 (\pm 4,2)
6h	0,2	35,77 (\pm 4,7)	31,51 (\pm 5,1)
9h	0,05	56,94 (\pm 3,1)	40,47 (\pm 2,9)
24h	0,12	77,09 (\pm 2,8)	12,53 (\pm 3,3)

Tab. 2 Indukowana wodoronadtlenkiem *tert*-butylu apoptoza i nekroza komórek JAR. Warunki inkubacji jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD z 3 niezależnych powtórzeń.

Nadtlenek wodoru nie wpływa znacząco na żywotność komórek JAR (Ryc. 17). Podczas 24-godzinnej inkubacji z tym prooksydantem większość komórek jest żywych, natomiast komórki apoptotyczne i nekrotyczne stanowią łącznie mniej niż 10% w każdej godzinie pomiaru (Tab. 3).

1 mM H₂O₂			
czas inkubacji (h)	A+/PI- (%)	A+/PI+ (%)	A-/PI+ (%)
0h	0,00	0,00	0,3
2h	0,00	0,00	0,8 (\pm 0,1)
4h	0,2	0,22	2,18 (\pm 0,1)
6h	1,2 (\pm 0,1)	0,09	3,75 (\pm 1,0)
9h	1,4 (\pm 0,4)	0,09	1,98 (\pm 0,2)
24h	2,1 (\pm 0,3)	0,00	4,11 (\pm 1,6)

Tab. 3 Indukowana nadtlenkiem wodoru apoptoza i nekroza komórek JAR. Warunki inkubacji jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD z 4 niezależnych powtórzeń.

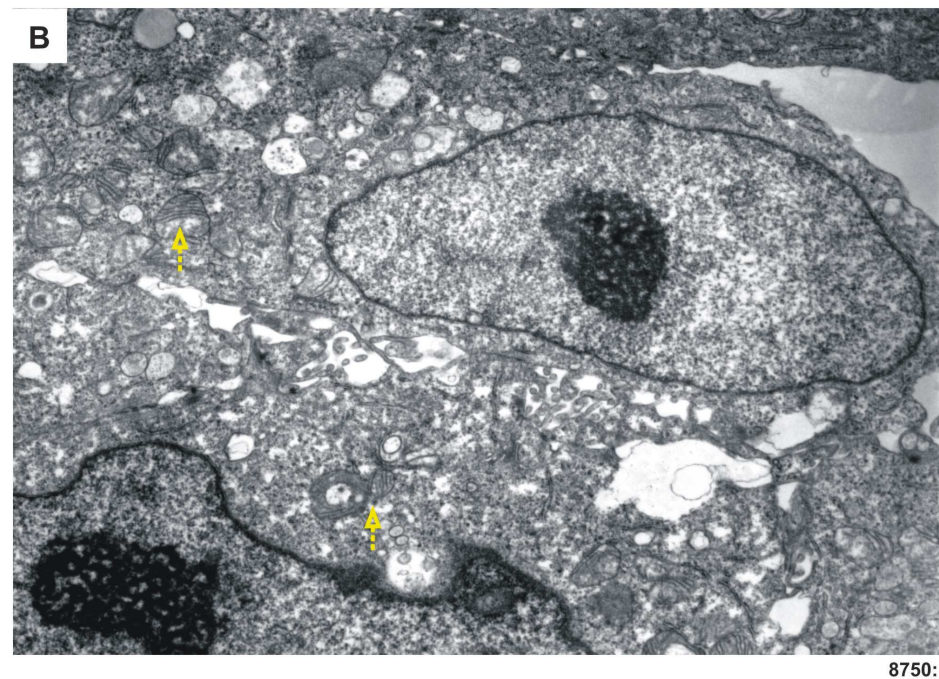
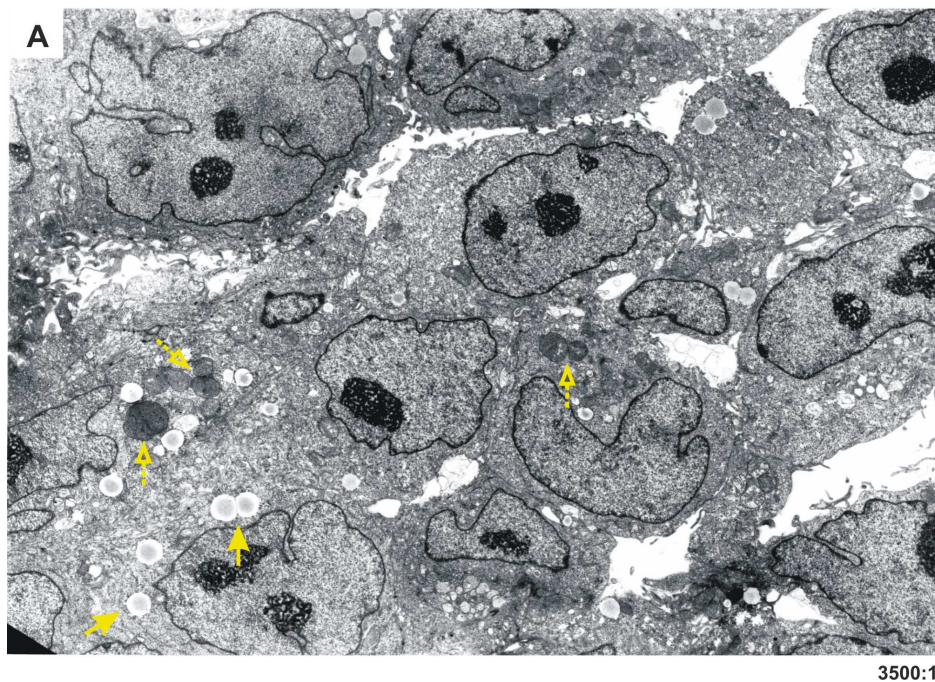
4.1.3 Morfometria komórek JAR inkubowanych w obecności menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenku wodoru przy użyciu mikroskopii elektronowej

Wpływ menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenku wodoru na przeżywalność komórek kosmówczaka przeanalizowano także na poziomie ultrastruktury komórkowej przy użyciu mikroskopii elektronowej. Komórki hodowano w obecności 100 μ M MEN, 100 μ M *t*BuOOH i 1mM H₂O₂ i w wybranych czasach inkubacji sporządzono preparaty komórkowe i przeanalizowano je przy użyciu mikroskopu elektonowego.

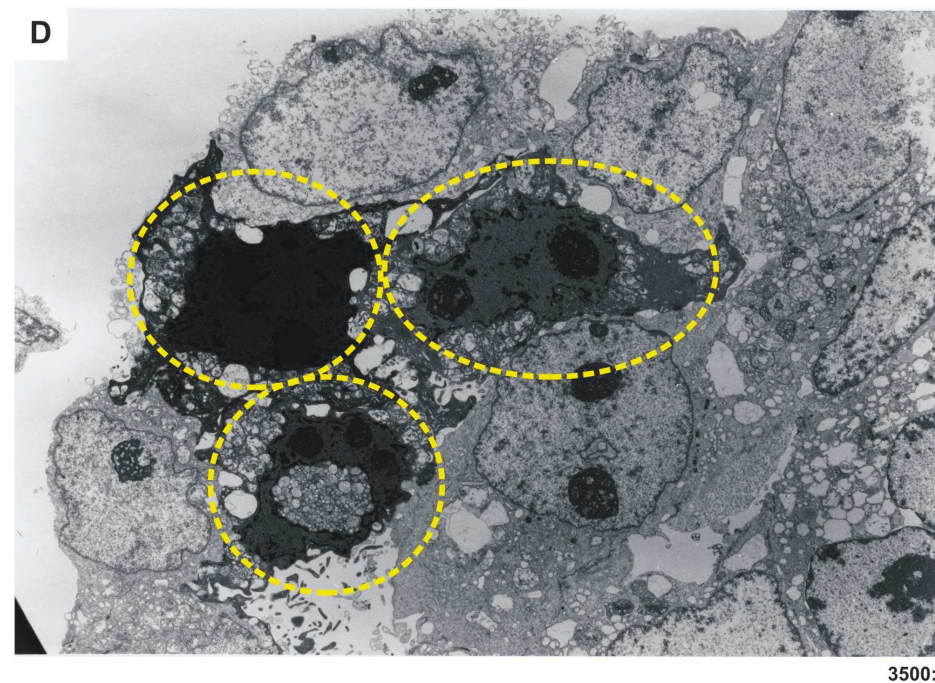
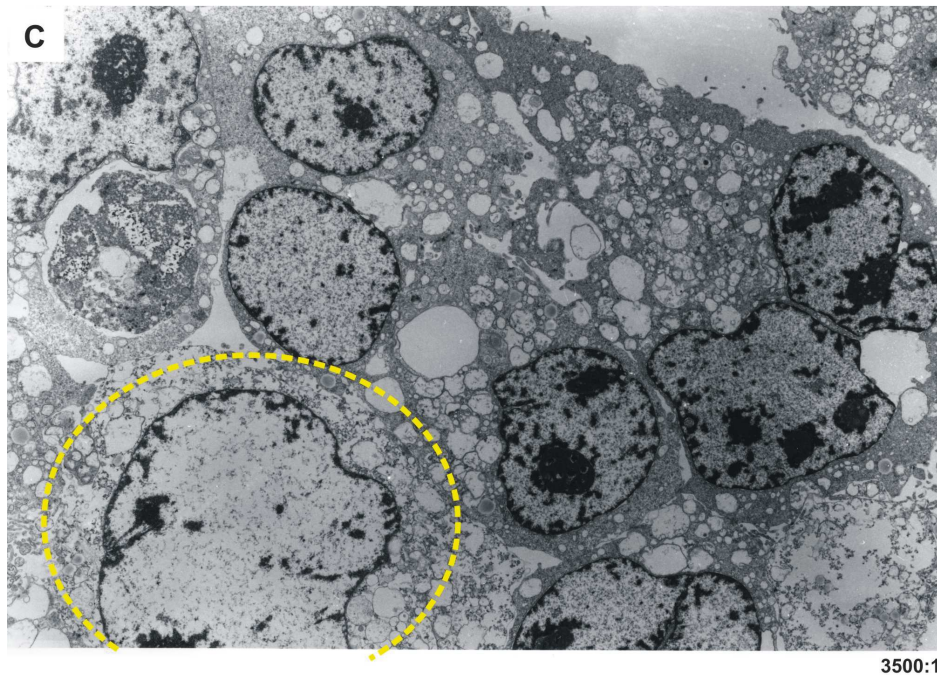
Komórki JAR nie traktowane prooksydantami (kontrolne) mają wielkość od 10 do 15 mikrometrów. Charakteryzują się obecnością jednego jądra o nieregularnym kształcie, z wyraźnie zaznaczonymi jąderkami (Ryc. 18A i 18B). Komórki te cechuje niewielka ilość mitochondriów rozproszonych w cytoplazmie ale o wyraźnie zaznaczonych grzebieniach (Ryc. 18A i 18B). Dodatkowo w komórkach można zaobserwować dobrze widoczne krople lipidowe (Ryc. 18A). Komórki poddane działaniu menadionu umierają głównie w procesie nekrozy. Już po czterech godzinach inkubacji z MEN na preparatach są widoczne pierwsze komórki nekrotyczne. Po 6 godzinach ilość tych komórek zwiększa się. Charakterystyczne dla komórek nekrotycznych jest pęcznienie komórki doprowadzające do utraty funkcjonalności błony. Rycina 18C przedstawia komórki JAR po 6 godzinach inkubacji z menadionem. Zaznaczono spęczniałą komórkę z powiększonym jądrem charakteryzującym się zanikaniem chromatyny. Pozostałe organelle są słabo widoczne, prawdopodobnie uległy spęcznieniu i rozkładowi. Komórki *choriocarcinoma* inkubowane z menadionem wchodzą również w niewielkim stopniu w proces apoptozy. Na rycinie 18D przedstawiono komórki JAR również po 6 godzinach inkubacji z MEN. Na mikrofotografii zaznaczono komórki apoptotyczne, które cechuje charakterystyczna kondensacja cytoplazmy i jądra komórkowego, prowadząca do zmniejszenia rozmiarów komórki. Wodoronadtlenek *tert*-butylu jest bardzo cytotoksyczny dla komórek kosmówczaka. Już po dwóch godzinach inkubacji z tym prooksydantem obserwuje się komórki nekrotyczne, podczas gdy apoptotyczne występują sporadycznie. Rycina 18E przedstawia komórki JAR po 4 godzinach inkubacji z *t*BuOOH. Zaznaczono komórki; apoptotyczną (a) i nekrotyczną (b). Po 9 godzinach poddawania komórek JAR działaniu wodoronadtlenku *tert*-butylu większość komórek to komórki nekrotyczne. Na rycinie 18F zaznaczono komórkę w fazie zaawansowanej nekrozy (a), bardzo spęczniałą, o rozpadającym się jądrze komórkowym. Brak wyraźnych granic komórki świadczy o rozpadzie błony komórkowej, natomiast pozostałe organelle uległy dezintegracji. W preparatach komórek JAR poddanych działaniu *t*BuOOH obserwuje się również komórki typu pośredniego „intermediate cells” (b), komórki

o cechach apoptotycznych łącznie z nekrotycznymi. Komórki typu pośredniego pęcznieją i rozpadają się, ale zachowują obkurczone jądro komórkowe (18F). Najmniej zmian w morfologii komórek *choriocarcinoma* obserwuje się po traktowaniu ich nadtlaniem wodoru. Do 24 godzin od momentu podania H_2O_2 komórki żyją i tylko nieliczne ulegają nekrozie. Rycina 18G przedstawia komórki JAR po 9 godzinach inkubacji z nadtlaniem wodoru, na mikrofotografii nie obserwuje się komórek martwych. Rycina 18H pokazuje komórki po 24 godzinach traktowania komórek H_2O_2 i zaznaczono na niej komórki charakteryzujące się rozproszoną chromatyną, czyli w fazie inicjacji nekrozy.

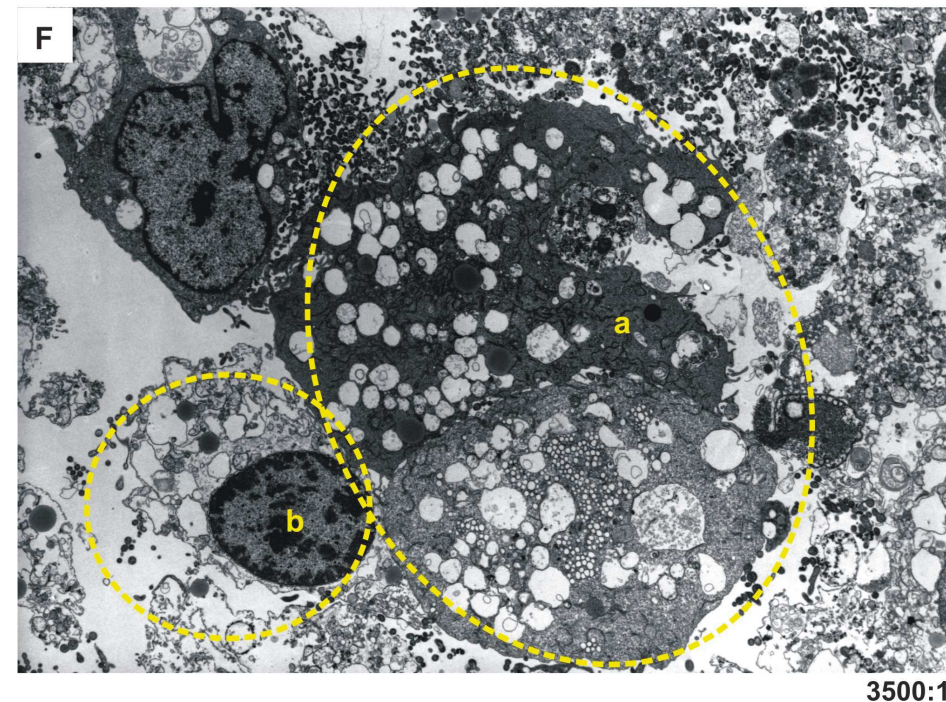
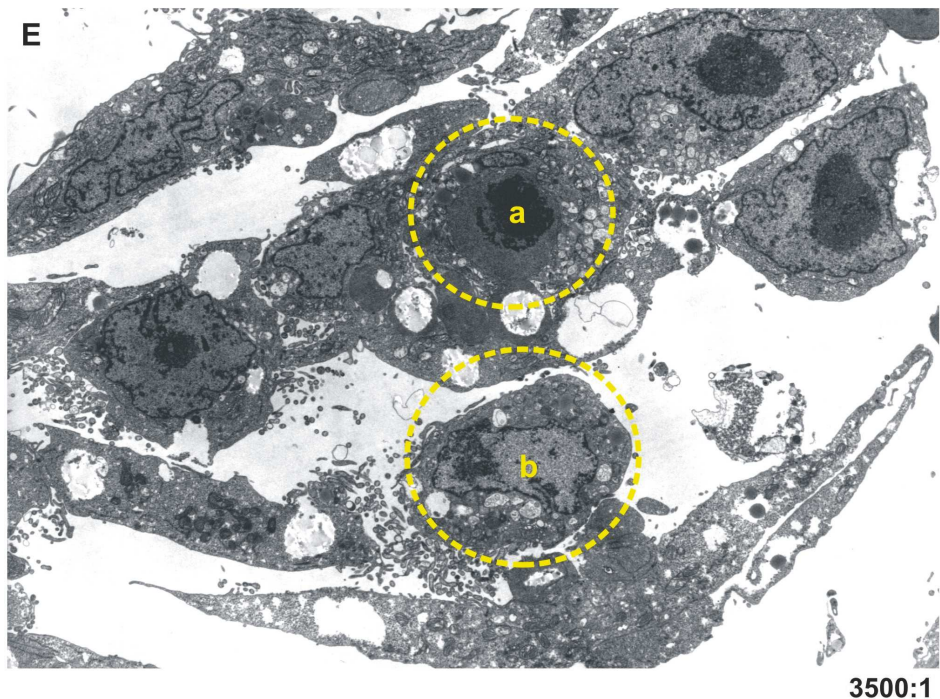
Komórki *choriocarcinoma* poddane działaniu menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenu wodoru wykazują odmienną odpowiedź na cytotoksyczność wybranych prooksydantów. Najszybciej umierają komórki traktowane $100 \mu M$ *t*BuOOH, obserwuje się szybką nekrotyczną śmierć zainicjowaną już w drugiej godzinie inkubacji (Ryc. 17 i Tab. 2). Koreluje to ze spadkiem stężenia ATP i utratą integralności błony komórkowej (Ryc. 16 i 15). Komórki JAR inkubowane z $100 \mu M$ MEN również szybko ulegają nekrozie, ale niewielka część z nich wchodzi na drogę apoptozy (Ryc. 17, 18C i 18D, Tab. 1). W komórkach wchodzących w nekrozę obserwuje się znaczący spadek ilości ATP (Ryc. 16) i uwalnianie wewnątrzkomórkowej LDH do środowiska inkubacyjnego (Ryc. 15). Najmniej wrażliwe okazały się komórki JAR na działanie $1 mM$ nadtlenu wodoru. Przez 24 godziny inkubacji z H_2O_2 zaobserwowano jedynie nieznaczny spadek stężenia ATP (Ryc. 16) i niewielki wpływ LDH do medium (Ryc. 15). Nie uwidoczniono komórek apoptotycznych, zaś nekrotyczne występowały marginalnie (Ryc. 17, 18G i H, Tab. 3).



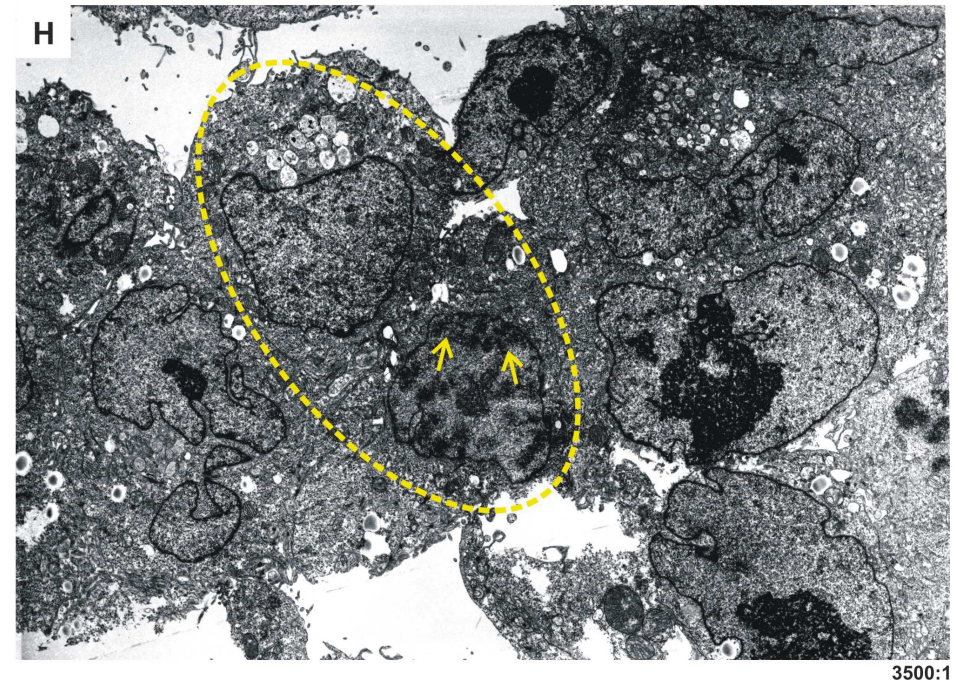
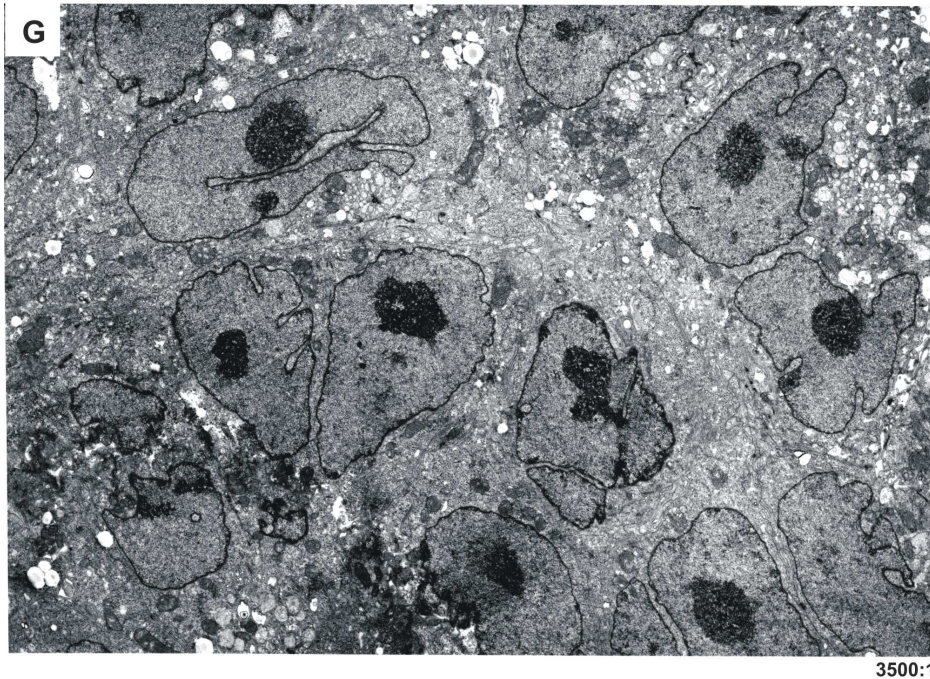
Ryc. 18 A, B. Mikrofotografie komórek JAR nie poddanych działaniu prooksydantów: A – komórki w powiększeniu 3500:1, pełnymi strzałkami zaznaczono krople lipidowe, przerywanymi strzałkami zaznaczono mitochondria; B – komórki w powiększeniu 8750:1, strzałki przerywane wskazują mitochondria. Wybrano reprezentatywne mikrofotografie.



Ryc. 18 C, D. Mikrofotografie komórek JAR poddanych działaniu 100 μ M menadionu: C – komórki po 6 godzinach inkubacji z MEN, zaznaczono nekrotyczną spęczniałą komórkę z powiększonym jądrem; D – komórki po 6 godzinach inkubacji z MEN, zaznaczono komórki apoptotyczne o charakterystycznie skondensowanej cytoplazmie i zmniejszonym jądrze komórkowym. Wybrano reprezentatywne mikrofotografie.



Ryc. 18 E, F. Mikrofotografie komórek JAR poddanych działaniu 100 μ M wodoronadtlenku *tert*-butylu: E – komórki po 4 godzinach inkubacji z *t*BuOOH, a – komórka apoptotyczna, b – komórka nekrotyczna; F – komórki po 9 godzinach inkubacji z *t*BuOOH, a- komórka w fazie zaawansowanej nekrozy, b- komórka stanu pośredniego tzw. „intermediate cell”: z obkurczonym jądrem komórkowym i rozpadającą się cytoplazmą wraz z organellami. Wybrano reprezentatywne mikrofotografie.



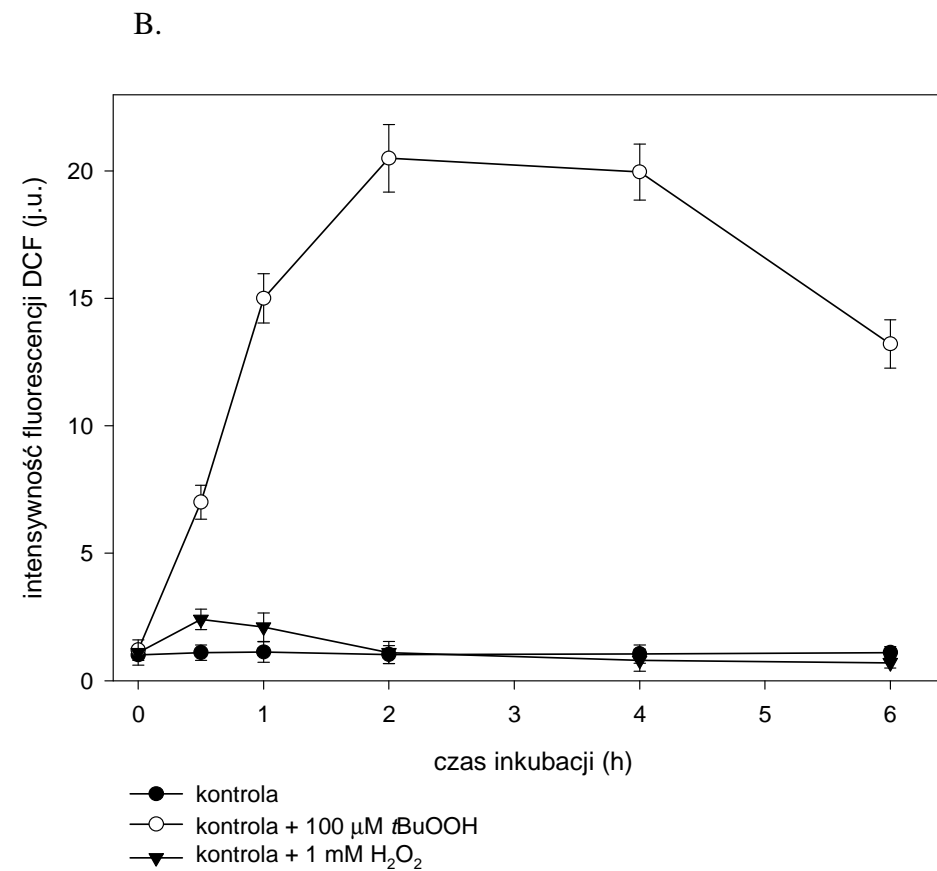
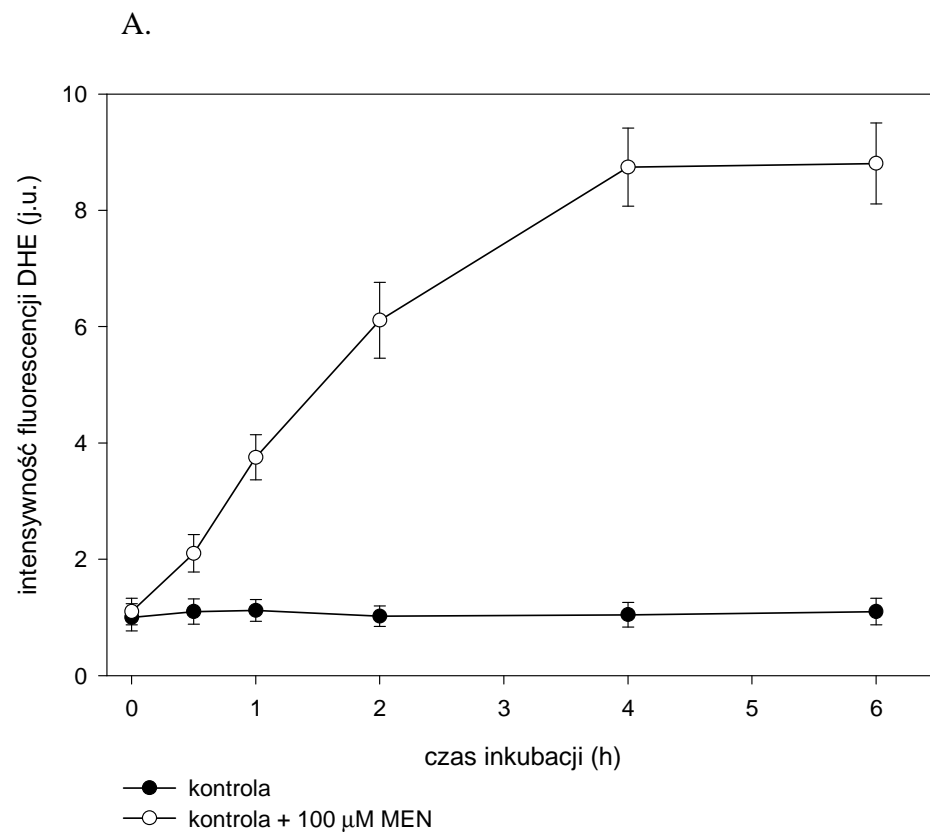
Ryc. 18 G, H. Mikrofotografie komórek JAR poddanych działaniu 1 mM nadtlenku wodoru: G – komórki po 9 godzinach inkubacji z H_2O_2 , wszystkie komórki są żywe; H – komórki po 24 godzinach inkubacji z H_2O_2 , zaznaczono komórki w początkowej fazie nekrozy, strzałki wskazują rozproszoną chromatynę. Wybrano reprezentatywne mikrofotografie.

4.2 Indukcja stresu oksydacyjnego w komórkach *choriocarcinoma* traktowanych menadionem, wodoronadtlenkiem *tert*-butylu i nadtlenkiem wodoru.

4.2.1. Wpływ menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenku wodoru na produkcję wewnątrzkomórkowych wolnych rodników w komórkach JAR.

Testy na przeżywalność wykazały, że komórki *choriocarcinoma* odpowiadają zmniejszeniem żywotności podczas hodowania ich w środowiskach zawierających odpowiednio: 100 μ M wodoronadtlenek *tert*-butylu i 100 μ M menadion. Postanowiono wobec tego zbadać, czy przyczyną śmierci komórek jest stres oksydacyjny. W tym celu zmierzono przy użyciu cytometru przepływowego ilość powstających w komórkach reaktywnych form tlenu. Zmierzono również ilość RFT w komórkach traktowanych nadtlenkiem wodoru, mimo znikomego wpływu H_2O_2 na przeżywalność komórek, co pomogło ustalić, czy nadtlenek wodoru przenika do wnętrza komórek. W związku z tym, że największe zmiany w przeżywalności komórek traktowanych wybranymi prooksydantami obserwowano przez pierwsze 6 godzin (a w kolejnych godzinach proces się nasilał) pomiary stresu oksydacyjnego prowadzono do 6 godziny inkubacji.

Komórki kosmówczaka były inkubowane przez 6 godzin w środowisku zawierającym 100 μ M MEN, 100 μ M *t*BuOOH i 1mM H_2O_2 i w tym czasie mierzono powstające w komórkach reaktywne formy tlenu. W wyniku metabolizmu chinonów, w tym menadionu powstają RFT takie jak anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru i rodnik wodorotlenowy [44]. W wyniku traktowania komórek JAR menadionem zaobserwowano powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego (wzrost intensywności fluorescencji DHE). Po półgodzinnej inkubacji stwierdzono dwukrotnie więcej ilości $O_2^{\cdot-}$ w stosunku do komórek kontrolnych, natomiast maksymalny (8,4-krotny) wzrost ilości anionorodnika ponadtlenkowego nastąpił w 4 godzinie inkubacji komórek z menadionem (Ryc. 19A). Komórki inkubowane z MEN nie wykazały obecności nadtlenku wodoru (brak fluorescencji DCF; dane nie umieszczone w pracy). Natomiast podanie komórkom JAR wodoronadtlenku *tert*-butylu indukowało silny stres oksydacyjny. W wyniku rozpadu homolitycznego *t*BuOOH powstaje rodnik alkoksybutylowy, zaś następstwem β -eliminacji tego rodnika jest powstanie rodnika metylowego i pochodnych (peroksymetylowego i alkoksymetylowego), które następnie generują nadtlenki kwasów tłuszczowych LOOH [65]. LOOH utleniają DCFH [111], dlatego też zmierzono intensywność fluorescencji DCF w komórkach JAR poddanych działaniu wodoronadtlenku *tert*-butylu. Stwierdzono 20-krotny (maksymalny) wzrost RFT po 2 godzinach inkubacji (Ryc. 19B).



Ryc. 19 Wpływ menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenu wodoru na generowanie RFT w komórkach JAR

- A. Wpływ 100 μM MEN na powstawanie $O_2^{\cdot-}$ w komórkach JAR, kontrola to komórki nie poddane działaniu menadionu. Warunki inkubacji jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD z 3 niezależnych powtórzeń.
- B. Wpływ 100 μM *t*BuOOH i 1 mM H₂O₂ na powstawanie RFT w komórkach JAR, kontrola to komórki nie poddane działaniu prooksydantów. Warunki inkubacji jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD z 4 niezależnych powtórzeń.

Natomiast po potraktowaniu komórek kosmówczaka 1 mM H₂O₂ obserwowano niewielki, zaledwie dwukrotny wzrost fluorescencji DCF po 0,5 godzinie inkubacji. Dłuższy czas inkubacji w obecności nadtlenu wodoru prowadził do zaniku fluorescencji DCF (Ryc. 19B).

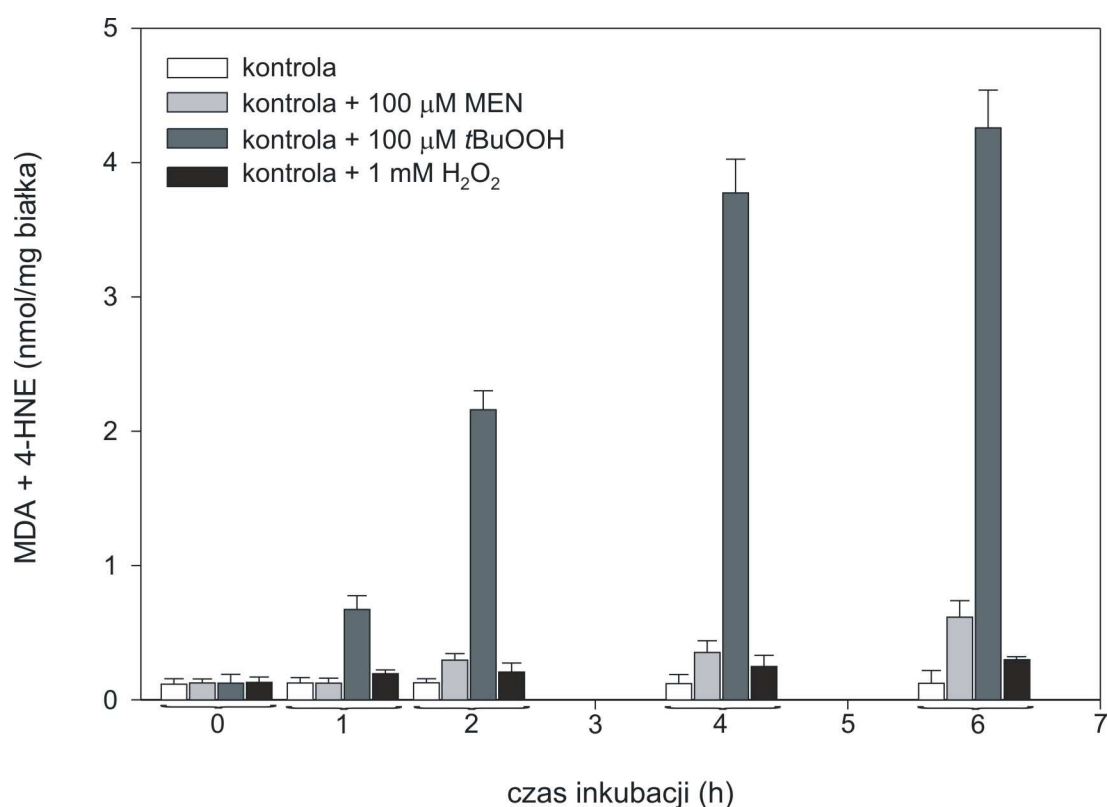
4.2.2 Wpływ menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenu wodoru na proces peroksydacji lipidów w komórkach JAR.

Badania na cytometrze przepływowym wykazały, że w wyniku traktowania komórek *choriocarcinoma* menadionem i wodoronadtlenkiem *tert*-butylu powstają znaczne ilości reaktywnych form tlenu (Ryc. 19A i B). Zbadano więc udział tych powstających RFT w procesie peroksydacji lipidów. Komórki JAR hodowano w obecności 100 μM menadionu i 100 μM wodoronadtlenku *tert*-butylu i następnie zmierzono ilość powstałych produktów peroksydacji lipidów: dialdehydu malonowego i 4-hydroksynonenalu (MDA + 4-HNE). Zbadano także udział 1 mM nadtlenu wodoru w procesie peroksydacji lipidów w komórkach JAR, w celu potwierdzenia uzyskanych wyników z cytometru przepływowego, a mianowicie oczekiwanego nieznacznego wzrostu peroksydacji lipidów wynikającego z małej ilości nadtlenu wodoru obecnego w komórkach. W związku z tym, że indukcja stresu oksydacyjnego była obserwowana przez pierwsze 6 godzin inkubacji komórek JAR traktowanych wybranymi prooksydantami, pomiar produktów peroksydacji lipidów prowadzono również do 6 godziny inkubacji.

Wcześniej wykazano [97,98,120], że anionorodnik ponadtlenkowy uczestniczy w inicjacji peroksydacji lipidów błonowych w mitochondriach i mikrosomach izolowanych z łożyska ludzkiego. Istniała więc możliwość, że anionorodnik ponadtlenkowy wytwarzany w wyniku metabolizmu menadionu może również inicjować peroksydację lipidów w komórkach JAR. Wyniki doświadczeń, w których badano wpływ menadionu na produkcję MDA i 4-HNE wykazały, że w komórkach JAR traktowanych menadionem dochodzi do 5-krotnego (w stosunku do kontroli) wzrostu peroksydacji lipidów w 6 godzinie inkubacji (Ryc. 20). Natomiast wodoronadtlenek *tert*-butylu jest analogiem nadtlenu lipidowych i łatwo ulega przemianie w reaktywne rodniki alkoksybutylowe i peroksybutylowe [65], które inicjują i propagują proces peroksydacji lipidów. *T*BuOOH generuje znaczne ilości RFT w komórkach JAR (Ryc. 19B), które inicjują peroksydację lipidów w tych komórkach. Podczas inkubacji komórek *choriocarcinoma* z wodoronadtlenkiem *tert*-butylu wykazano bardzo duży, znacznie silniejszy niż w obecności menadionu, wzrost peroksydacji lipidów; po godzinie stwierdzono 5-krotny wzrost ilości MDA + 4-HNE w stosunku do kontroli, zaś ilość

produktów peroksydacji lipidów wzrosła 34-krotnie po 6 godzinach inkubacji z *t*BuOOH (Ryc. 20).

W porównaniu z menadionem i *t*BuOOH, wpływ nadtlenu wodoru na proces peroksydacji lipidów w komórkach JAR był nieznaczny. Zaobserwowano tylko 2,3-krotny wzrost (w stosunku do kontroli) ilości produktów peroksydacji lipidów w 6 godzinie inkubacji (Ryc. 20). Taki wynik potwierdza wcześniejsze dane uzyskane z cytometru przepływowego, a mianowicie, w wyniku traktowania komórek JAR 1 mM nadtlaniem wodoru w komórkach stwierdza się niewielką ilość nadtlenu wodoru. W wyniku metabolizmu H_2O_2 mogą powstawać RFT odpowiedzialne za ten niewielki wzrost peroksydacji lipidów.



Ryc. 20 Wpływ 100 μ M menadionu, 100 μ M wodoronadtlenku *tert*-butylu i 1 mM nadtlenu wodoru na peroksydację lipidów w komórkach JAR (kontrola to komórki nie poddane działaniu prooksydantów). Warunki inkubacji jak w Materiałach i Metodach. Wyniki (ilość produktów peroksydacji MDA + 4-HNE) przedstawiono jako średnie \pm SD z 5 niezależnych eksperymentów.

4.3 Wpływ menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenku wodoru na odpowiedź antyoksydacyjną komórek *choriocarcinoma*.

4.3.1 Wpływ menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenku wodoru na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w komórkach JAR.

Przeprowadzone badania wykazały, że menadion zmniejsza przeżywalność komórek JAR, generuje powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego, oraz inicjuje peroksydację lipidów błonowych. Postanowiono więc zbadać wpływ MEN na aktywność wybranych enzymów antyoksydacyjnych.

Komórki JAR inkubowano ze 100 μM menadionem przez 6 godzin, następnie zmierzono w nich aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (mierzone aktywność SOD-1 łącznie z SOD-2), enzymu przeprowadzającego reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenku wodoru. Stwierdzono 43% wzrost aktywności SOD już po godzinnej inkubacji z MEN (Tab. 4). Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej wzrastała 4-krotnie (w stosunku do komórek traktowanych MEN w czasie 0h) po 6 godzinach inkubacji (Tab. 4).

czas inkubacji (h)	SOD (nmol/min/mg białka)
0h	15600 (\pm 1300)
1h	22300 (\pm 1100)
2h	27600 (\pm 3400)
4h	50500 (\pm 6200)
6h	63500 (\pm 5700)

Tab. 4 Wpływ 100 μM MEN na aktywność SOD w komórkach JAR. Warunki inkubacji jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD z 3 niezależnych eksperymentów (kontrola = 0h)

Zwiększająca się pod wpływem menadionu aktywność SOD w komórkach JAR prowadzi do powstawania H_2O_2 . Badania z użyciem cytometrii przepływowej, nie wykazały obecności nadtlenku wodoru w komórkach JAR traktowanych menadionem. Postanowiono zmierzyć więc aktywność enzymów mających zdolność rozkładania nadtlenku wodoru, aby dać odpowiedź na pytanie co stało się z H_2O_2 powstałym w reakcji z udziałem SOD. Komórki

choriocarcinoma zostały poddane działaniu 100 μ M menadionu i zmierzono w nich aktywność katalazy i peroksydazy glutationowej. Komórki JAR poddane działaniu menadionu w czasie 0h, czyli komórki kontrolne, charakteryzowały się wysoką aktywnością katalazy (8700 \pm 1300 nmol/min/mg białka) i niską aktywnością peroksydazy glutationowej (50,72 \pm 2,3 nmol/min/mg białka). Dalsza inkubacja komórek JAR z menadionem obniża nieznacznie aktywność katalazy (aktywność CAT po 6 godzinach inkubacji wynosi 6200 \pm 1700 nmol/min/mg białka), co sugeruje jej udział w usuwaniu nadtlenu wodoru (Tab. 5). Natomiast aktywność peroksydazy glutationowej w komórkach traktowanych menadionem spada gwałtownie o 30% już po półgodzinnej inkubacji i po 2 godzinach nie stwierdza się już aktywności GPx w komórkach (Tab. 5).

czas inkubacji (h)	CAT (nmol/min/mg białka)	GPx (nmol/min/mg białka)
0h	8700 (\pm 1300)	50,72 (\pm 2,3)
0,5h	7500 (\pm 1800)	36,04 (\pm 5,4)
1h	7200 (\pm 1300)	24,13 (\pm 4,3)
2h	6900 (\pm 1400)	0,00
4h	7800 (\pm 1200)	0,00
6h	6200 (\pm 1700)	0,00

Tab. 5 Wpływ 100 μ M MEN na aktywność CAT i GPx w komórkach JAR. Warunki inkubacji jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD z 4 niezależnych eksperymentów (kontrola = 0h)

Wyniki te wskazują, że katalaza jest głównie odpowiedzialna za rozkład H_2O_2 w komórkach *choriocarcinoma* traktowanych menadionem.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że wodoronadtlenek *tert*-butylu również wpływa znacząco na obniżenie przeżywalności komórek JAR (Ryc. 15), generuje powstawanie dużych ilości nadtlenu lipidowych i inicjuje i nasila proces peroksydacji lipidów (Ryc. 19B i 20). Zmierzono wobec tego aktywność peroksydazy glutationowej, enzymu mającego zdolność usuwania nadtlenu lipidowych oraz aktywność katalazy, która może wykazywać nieznaczną aktywność peroksydazową. Komórki *choriocarcinoma* były inkubowane w obecności 100 μ M *t*BuOOH przez 6 godzin. W wybranych odstępach czasu zmierzono aktywności CAT i GPx. W komórkach traktowanych wodoronadtlenu *tert*-butylu stwierdzono 2,5-krotny wzrost aktywności katalazy w 4 godzinie inkubacji (Tab. 6).

Natomiast aktywność peroksydazy glutationowej w komórkach JAR w czasie inkubacji z *t*BuOOH powoli spadała i po 6 godzinach wynosiła 57% aktywności GPx komórek kontrolnych (Tab. 6). Spadek aktywności peroksydazy glutationowej w komórkach JAR hodowanych w obecności 100 μ M *t*BuOOH prowadzi do nieefektywnego usuwania nadtlenu lipidowych, czego rezultatem jest wzmożona peroksydacja lipidów i nagromadzenie produktów tego procesu (MDA + 4-HNE). Ponieważ katalaza wykazuje tylko ograniczoną aktywność peroksydazową, wzrost jej aktywności nie ma istotnego wpływu na peroksydację lipidów.

Uzyskane dane z doświadczeń z użyciem nadtlenu wodoru pokazały, że komórki *choriocarcinoma* są odporne na działanie 1 mM H₂O₂ i wykazują niewielkie zmiany w przeżywalności i produkcji wolnych rodników (Ryc. 15, 19B i 20). Stąd bardzo wskazany byłoby zmierzenie aktywności katalazy i peroksydazy glutationowej, dwóch głównych enzymów usuwających nadtlenek wodoru. Komórki JAR były inkubowane w obecności 1 mM H₂O₂, a następnie zmierzono w nich aktywność CAT i GPx.

czas inkubacji (h)	CAT (nmol/min/mg białka)	GPx (nmol/min/mg białka)
0h	8900 (\pm 1500)	51,67 (\pm 5,3)
1h	10000 (\pm 1400)	49,84 (\pm 2,8)
2h	13500 (\pm 1300)	45,93 (\pm 2,3)
4h	22400 (\pm 1900)	39,70 (\pm 1,4)
6h	16900 (\pm 2500)	29,42 (\pm 2,2)

Tab. 6 Wpływ 100 μ M *t*BuOOH na aktywność GPx i CAT w komórkach JAR. Warunki inkubacji jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD z 3 niezależnych eksperymentów (kontrola = 0h)

W komórkach traktowanych nadtlaniem wodoru zaobserwowano spadek aktywności katalazy (1,5-krotny po 4 godzinach) i wzrost aktywności GPx (o 50% w stosunku do kontroli po 6 godzinach) (Tab. 7). Wysoka aktywność katalazy w komórkach kosmówczaka umożliwia bardzo sprawne usuwanie nadtlenu wodoru w komórkach, stąd nie obserwuje się oznak stresu oksydacyjnego i zmian w żywotności komórek JAR. Natomiast wzrost aktywności peroksydazy glutationowej może w pewnym stopniu wspomagać proces usuwania H₂O₂ z komórek JAR.

czas inkubacji (h)	CAT (nmol/min/mg białka)	GPx (nmol/min/mg białka)
0h	9400 (± 1300)	51,03 (± 4,1)
1h	8700 (± 1100)	55,64 (± 2,1)
2h	7100 (± 1400)	58,54 (± 3,2)
4h	5600 (± 900)	61,55 (± 1,8)
6h	5200 (± 950)	76,55 (± 3,6)

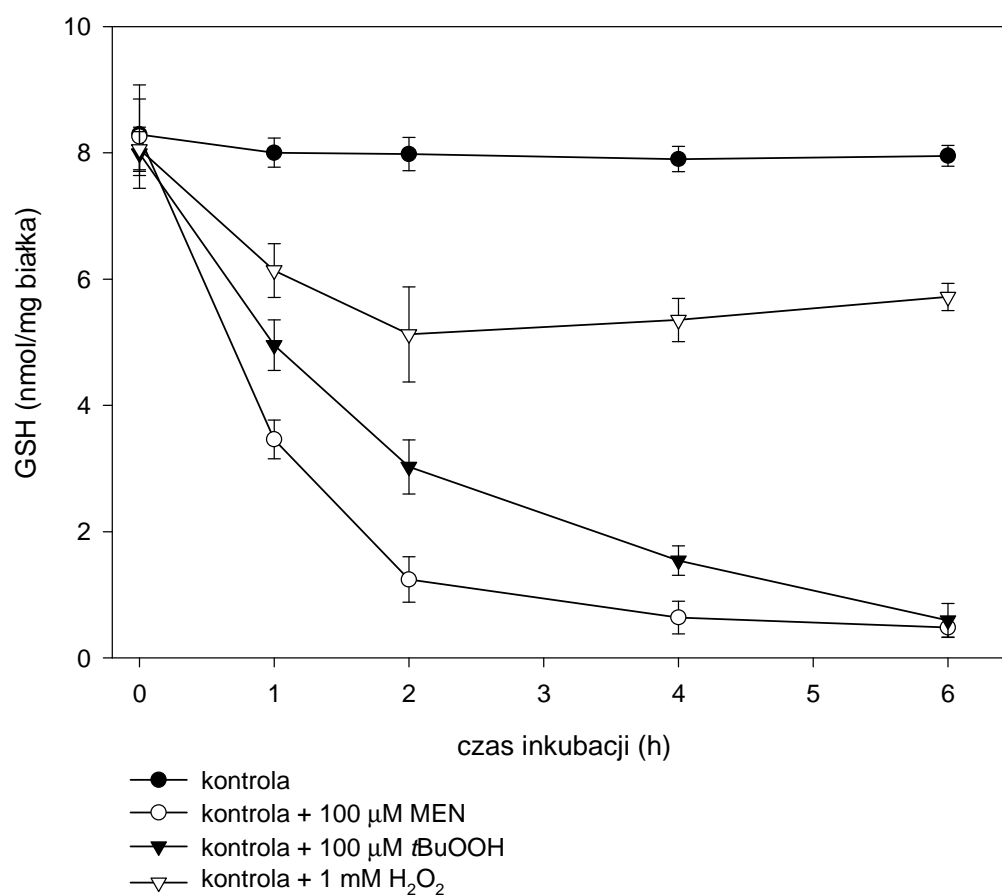
Tab. 7 Wpływ 1 mM H₂O₂ na aktywność CAT i GPx w komórkach JAR. Warunki inkubacji jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD z 4 niezależnych eksperymentów (kontrola = 0h)

4.3.2 Wpływ menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenu wodoru na stężenie glutationu w komórkach *choriocarcinoma*.

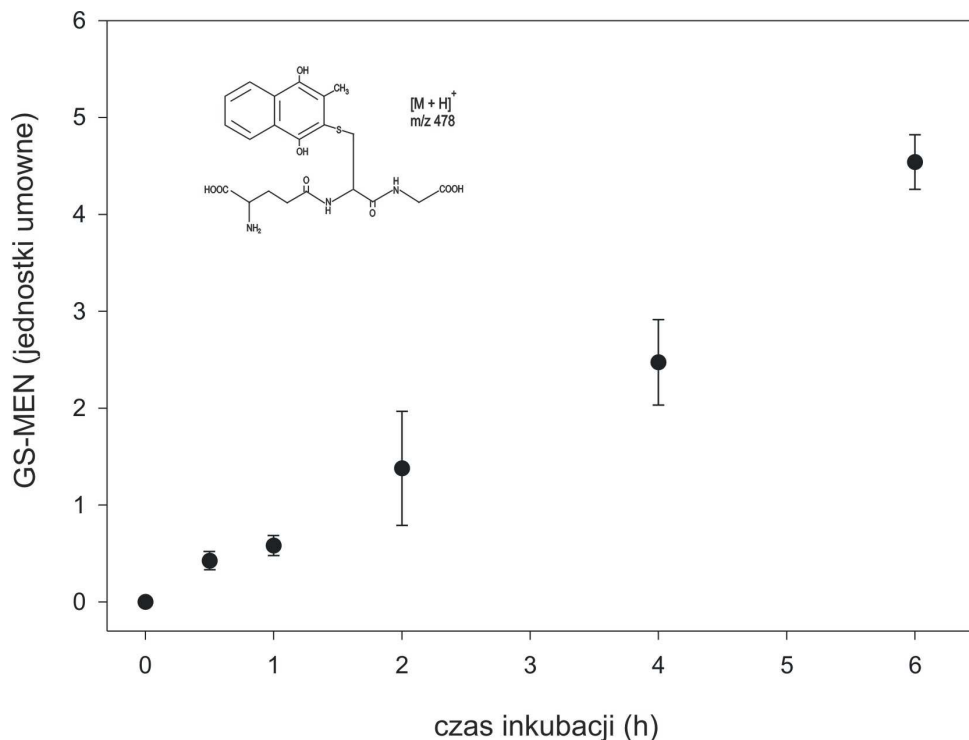
Komórki linii komórkowej JAR inkubowano w obecności 100 µM MEN, 100 µM *t*BuOOH i 1 mM H₂O₂, przez 6 godzin, i w tym okresie mierzono stężenie glutationu zredukowanego (GSH) metodą tandemowej spektrometrii masowej LC-MS/MS. Stężenie glutationu zredukowanego w komórkach nie poddanych działaniu związków generujących RFT było stałe i wynosiło około 8 nanomoli w miligramie białka. Największy spadek ilości GSH odnotowano w komórkach traktowanych menadionem, po 1 godzinie stężenie GSH spada o 50% (2,3-krotnie), po 2 godzinach o 84,5% (6,6-krotnie) i obniża się nadal osiągając w 6 godzinie inkubacji 6% ilości GSH w porównaniu do kontroli (Ryc. 21). Wodoronadtlenek *tert*-butylu również wpływa na zmniejszenie puli glutationu zredukowanego w komórkach JAR, ale działa słabiej od menadionu w pierwszych godzinach inkubacji. Po 2 godzinach inkubacji z *t*BuOOH ilość GSH w komórkach spada o 60% w stosunku do kontroli, po 6 godzinach stanowi zaś 7% wyjściowego stężenia GSH (Ryc. 21). Nadtlenek wodoru również wpływa na zmniejszenie stężenia glutationu zredukowanego w komórkach JAR, ale spadek ten nie jest tak znaczący jak w przypadku działania MEN i *t*BuOOH. Największy spadek (o 23%) ilości GSH obserwuje się po 2 godzinach inkubacji z H₂O₂, w dłuższym czasie inkubacji, do 6 godzin, obserwuje się nieznaczny wzrost stężenia GSH (Ryc. 21).

Reakcjami prowadzącymi do spadku stężenia komórkowego GSH są, oprócz reakcji z RFT również reakcje prowadzące do powstawania S-koniugatów z toksycznymi elektrofilnymi egzo- i endogennymi substancjami (GSX) [121]. Również menadion tworzy

koniugaty z glutationem i może to prowadzić do spadku stężenia GSH w komórce [119]. Doświadczenia z użyciem LC-MS/MS wykazały powstawanie specyficznego koniugatu glutationowego w komórkach JAR hodowanych w obecności menadionu. Po dokonaniu analiz chromatogramów stwierdzono metodą ilościową powstawanie koniugatu GS-MEN o m/z (masie protonu) 478 (Ryc. 22) [119]. GSH może również tworzyć koniugaty z produktami peroksydacji lipidów, takimi jak 4-HNE [122]), jednakże analiza chromatogramów nie wykazała występowania żadnych specyficznych S-koniugatów w komórkach poddanych zarówno działaniu *t*BuOOH (pod jego wpływem powstają duże ilości MDA i 4-HNE) jak i H₂O₂.



Ryc. 21 Wpływ 100 μM MEN, 100 μM *t*BuOOH i 1mM H₂O₂ na stężenie GSH w komórkach JAR, kontrola to komórki nie poddawane działaniu prooksydantów. Warunki inkubacji jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD z 4 niezależnych powtórzeń.



Ryc. 22 Wpływ 100 μM MEN na powstawanie koniugatu GS-MEN w komórkach JAR. Warunki inkubacji jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD z 3 niezależnych eksperymentów.

4.3.3 Wpływ menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenku wodoru na aktywność enzymów: dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w komórkach kosmówczaka.

Otrzymane dotychczas wyniki wskazują, że główną przyczyną śmierci komórek JAR, indukowanej przez menadion i wodoronadtlenek *tert*-butylu jest silny spadek stężenia ATP i GSH. Wiadomo, że aryłacja białek i modyfikacja białek indukowana przez stres oksydacyjny może prowadzić do spadku aktywności kluczowych enzymów tiolowych uczestniczących w metabolizmie ATP i GSH, takich jak dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) i dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G-6-PDH) [123]. Stąd w celu wyjaśnienia mechanizmu prowadzącego do spadku stężenia zarówno ATP jak i GSH w komórkach JAR przeprowadzono eksperymenty, w których zbadano wpływ badanych prooksydantów na aktywność wyżej wymienionych enzymów.

Komórki *choriocarcinoma* inkubowano ze 100 μM menadionem i 100 μM *t*BuOOH przez 6 godzin i w tym czasie mierzono aktywność GAPDH i G-6-PDH (Tab. 8). Ponieważ nadtlenek wodoru wpływał również hamująco (choć nie tak silnie jak menadion i wodoronadtlenek *tert*-butylu) na stężenie ATP i GSH w komórkach JAR, zmierzono

również wpływ 1 mM H₂O₂ na aktywność enzymów GAPDH i G-6-PDH. Komórki traktowane badanymi związkami generującymi RFT w czasie zero (komórki kontrolne), wykazywały aktywność GAPDH około 468 nmoli/min/mg białka natomiast aktywność G-6-PDH około 120 nmoli/min/mg białka (Tab. 8). Aktywność dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego spada gwałtownie podczas inkubacji komórek JAR z menadionem. Po 1 godzinie stanowiła zaledwie 10% aktywności w porównaniu z komórkami kontrolnymi, a po 4 godzinach inkubacji zaledwie 3,7% (Tab. 8). W komórkach poddanych działaniu wodoronadtlenku *tert*-butylu obserwowano również spadek aktywności dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, jednak nie tak gwałtowny jak w przypadku traktowania komórek menadionem. Po 1 godzinie aktywność GAPDH wynosiła 66% aktywności komórek kontrolnych a po 4 godzinach 8,5% (Tab. 8). Dalsze wydłużanie czasu inkubacji (do 6 godzin) w obecności menadionu i wodoronadtlenku *tert*-butylu nie miało już istotnego wpływu na aktywność tego enzymu. Najmniejszy spadek aktywności dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego zaobserwowano podczas hodowania komórek JAR z nadtlenkiem wodoru. Aktywność GAPDH spada o połowę w 1 godzinie inkubacji i w dłuższym czasie inkubacji nie ulega zmianie (Tab. 8).

Z wybranych trzech prooksydantów menadion wykazuje najsilniejsze działanie w kierunku hamowania aktywności dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego.

Menadion wpływa także hamująco na aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w komórkach *choriocarcinoma*. Po godzinnej inkubacji komórek z MEN aktywność G-6-PDH spada o 50%, a po 6 godzinach osiąga 26% wartości kontrolnych (Tab. 8). Wodoronadtlenek *tert*-butylu także hamuje aktywność G-6-PDH w komórkach JAR ale po dłuższej ekspozycji komórek na ten związek. Hamujący efekt działania *t*BuOOH widać dopiero po 2 godzinach, aktywność enzymu w tym czasie osiąga 60% wartości kontrolnych. Dalsza inkubacja silnie hamuje aktywność G-6-PDH (Tab. 8). Nadtlenek wodoru ma najslabszy wpływ na aktywność G-6-PDH w komórkach JAR. Po 2 godzinach inkubacji komórek z H₂O₂ aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej spada o 33% (w stosunku do kontroli) i nie ulega już znacznemu obniżeniu podczas dalszej inkubacji (Tab. 8). Z zastosowanych trzech związków generujących RFT menadion i wodoronadtlenek *tert*-butylu hamuje aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, czym przyczynia się także do zmniejszenia stężenia GSH w komórkach JAR, natomiast nadtlenek wodoru ma znacznie słabsze (w stosunku do MEN i *t*BuOOH) działanie hamujące aktywność G-6-PDH.

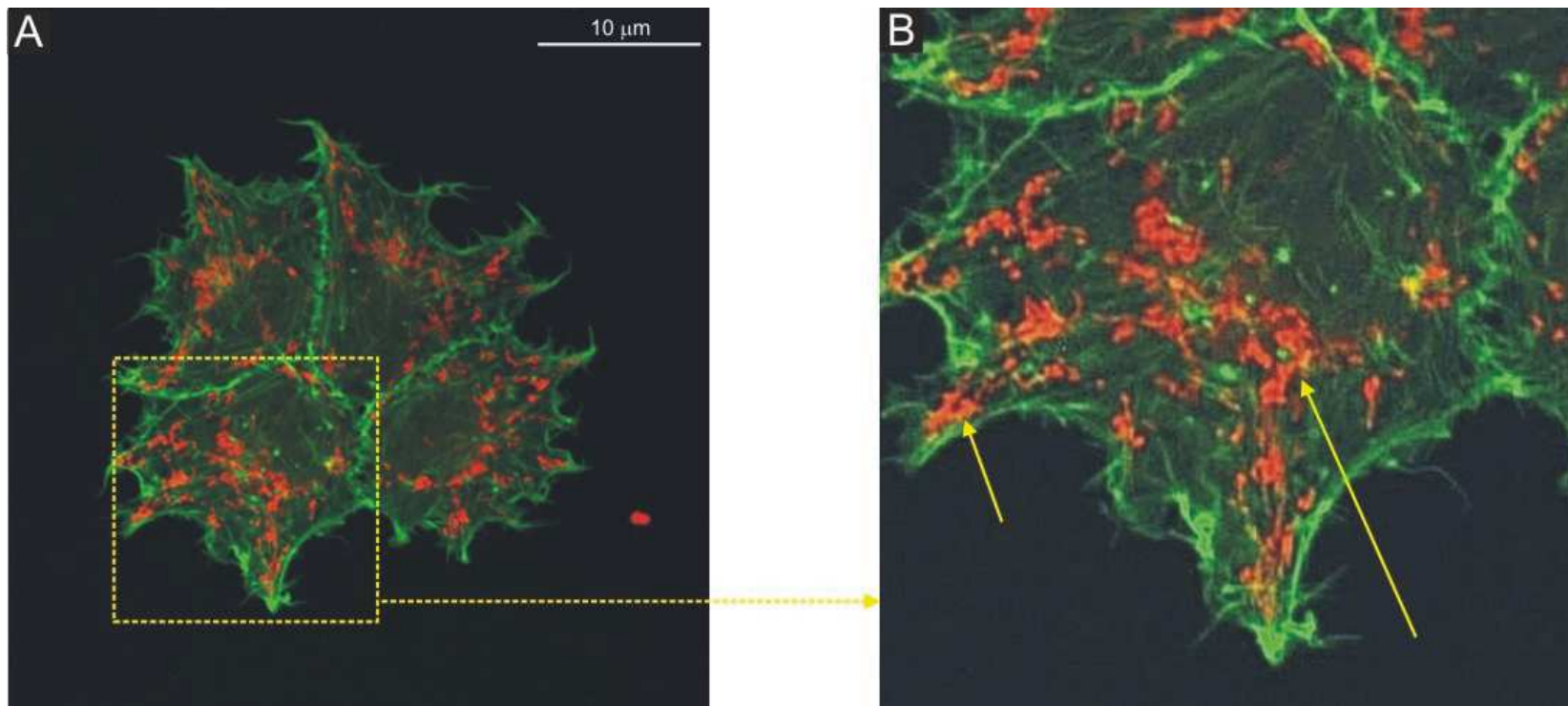
czas inkubacji (h)	GAPDH (nmol/min/mg białka)			G-6-PDH (nmol/min/mg białka)		
	MEN	<i>t</i> BuOOH	H ₂ O ₂	MEN	<i>t</i> BuOOH	H ₂ O ₂
0h	471,38 (± 11,5)	463,86 (± 15,7)	472,05 (± 21,1)	120,25 (± 4,9)	119,26 (± 6,2)	123,35 (± 10,4)
1h	49,66 (± 7,4)	307,33 (± 16,4)	238,95 (± 24,2)	58,96 (± 9,3)	100,88 (± 11,3)	100,74 (± 9,9)
2h	46,11 (± 3,2)	158,46 (± 17,7)	254,02 (± 17,3)	43,34 (± 9,6)	70,85 (± 8,5)	82,18 (± 12,5)
4h	17,41 (± 6,5)	39,34 (± 9,2)	271,54 (± 6,5)	39,42 (± 3,4)	17,68 (± 5,6)	88,13 (± 6,6)
6h	16,01 (± 4,1)	35,47 (± 7,8)	262,66 (± 9,7)	31,2 (± 2,2)	3,15 (± 1,9)	82,08 (± 3,1)

Tab. 8 Wpływ 100 μ M MEN, 100 μ M *t*BuOOH i 1 mM H₂O₂ na aktywność GAPDH i G-6-PDH w komórkach JAR. Warunki inkubacji jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD z 5 niezależnych eksperymentów (kontrola = 0h)

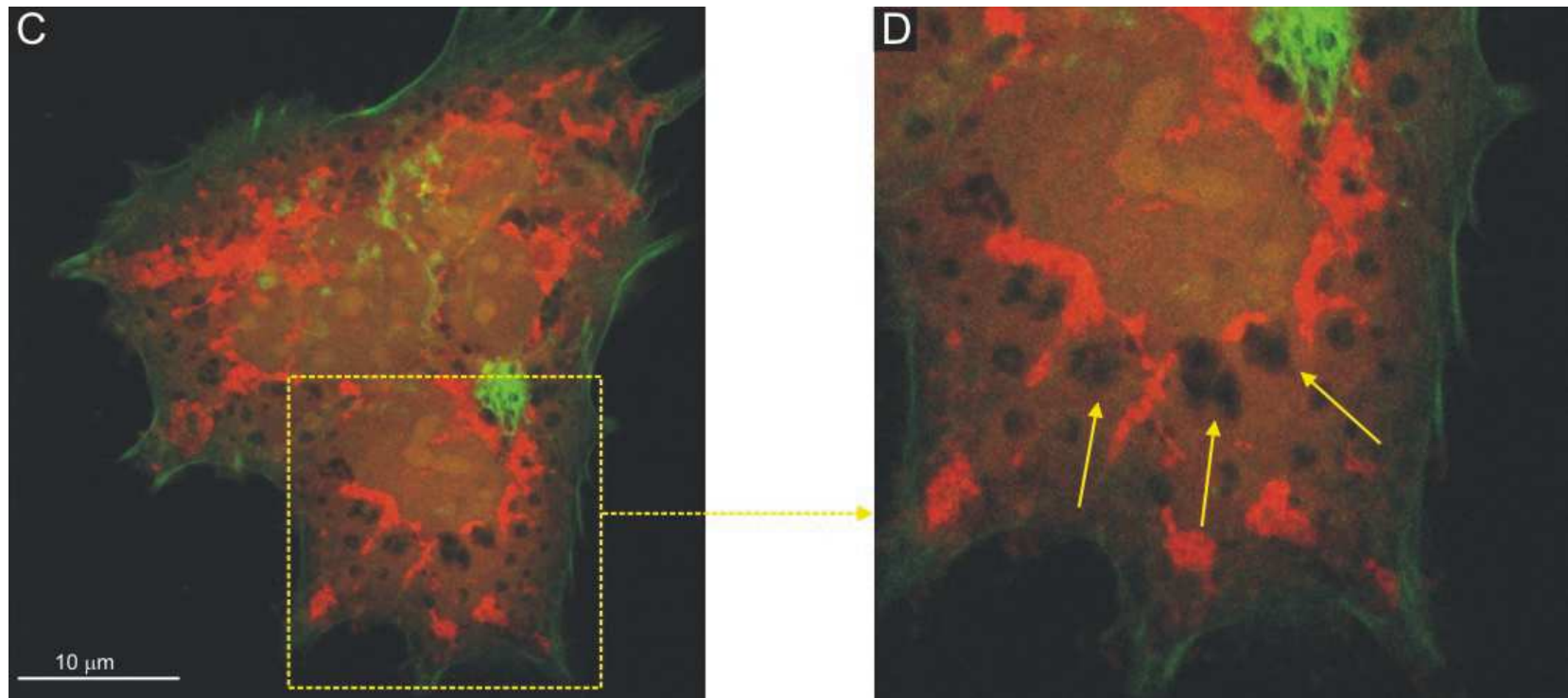
4.3.4 Morfometria komórek *choriocarcinoma* poddanych działaniu menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenku wodoru przy użyciu mikroskopii konfokalnej.

Komórki linii komórkowej JAR inkubowane w obecności 100 μ M menadionu, 100 μ M wodoronadtlenku *tert*-butylu i 1 mM nadtlenku wodoru zostały wybarwione fotostabilnymi znacznikami fluorescencyjnymi, utrwalone aldehydem glutarowym i przeanalizowane przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Falloidyna związana ze znacznikiem FITC wiąże spolimeryzowaną aktynę F co umożliwia wizualizację komórkowych mikrotubul (w mikroskopie konfokalnym fluoryzuje na zielono). Natomiast związek Mito Tracker Red; CMXRos jest specyficznym mitochondrialnym fotosensytyzátorem, wnika do mitochondriów i wiąże się z oksydazą cytochromową, czyli wybarwia aktywne mitochondria (w mikroskopie konfokalnym fluoryzuje na czerwono). Komórki *choriocarcinoma* nie traktowane prooksydantami (kontrolne) posiadają cytoszkielet bogaty w F-aktynę i dużą ilość mitochondriów ułożonych wzdłuż włókien cytoszkieletu (Ryc. 23A i B). Inkubacja komórek JAR ze 100 μ M menadionem prowadzi do znaczących zmian w morfologii tych komórek (Ryc. 23C i D). Po dwóch godzinach inkubacji komórki są większe od komórek kontrolnych, prawdopodobnie na skutek pęcznienia (inicjacji nekrozy). Mitochondria zmieniają lokalizację i przemieszczają się w okolice jądra komórkowego. W cytoszkielecie widać wyraźne ubytki świadczące o utracie przez komórki zdolności adhezyjnych. Z kolei w komórkach JAR inkubowanych przez 2 godziny w obecności 100 μ M wodoronadtlenku *tert*-butylu, stres oksydacyjny wywołany *t*BuOOH prowadzi do dużych zmian w strukturze komórek (Ryc. 23E). Komórki pęcznieją, mają słabo zarysowany swój kształt i kształt organelli. Mitochondria charakteryzują się słabą fluorescencją co świadczy o utracie integralności błon mitochondrialnych. Mikrofotografia przedstawia prawdopodobnie komórki w początkowym stadium nekrozy (Ryc. 23E). Komórki JAR poddane działaniu nadtlenku wodoru wykazują inne zmiany niż komórki poddane działaniu MEN i *t*BuOOH. Po 2 godzinach inkubacji z 1 mM H₂O₂ komórki nie zmieniają swojego kształtu i zachowują fluorescencję mitochondriów (Ryc. 23F). W wyniku traktowania komórek nadtlenkiem wodoru pojawiają się nowe struktury cytoszkieletu, a mianowicie wypustki aktynowe – filopodia, które odpowiedzialne są za migrację komórek (Ryc. 23F).

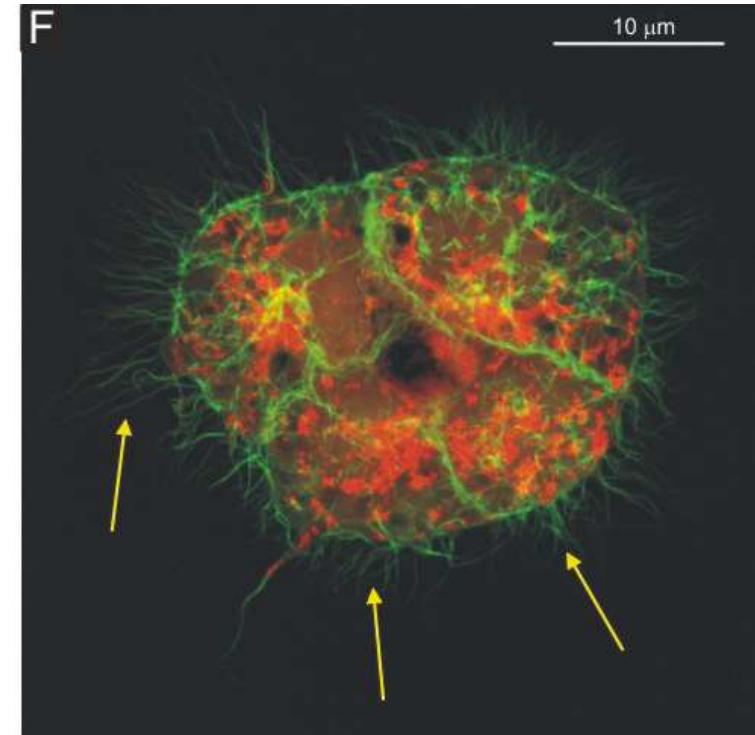
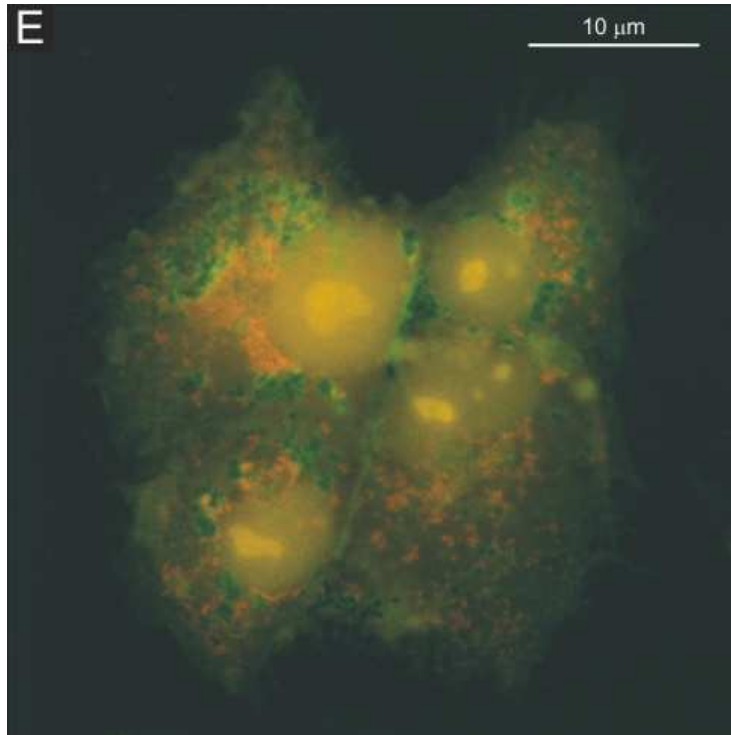
Najbardziej niekorzystne zmiany obserwuje się podczas traktowania komórek JAR wodoronadtlenkiem *tert*-butylu, szybko ulegają one nekrozie. Menadion również jest wpływa cytotoksycznie na komórki JAR, komórki tracą zdolności adhezyjne. Nadtlenek wodoru nie wykazuje działania cytotoksycznego, prawdopodobnie stymuluje komórki JAR do migracji, prowadząc do powstawania filopodii.



Ryc. 23 Komórki JAR nie poddane działaniu prooksydantów (kontrolne), wyznakowano cytoszkielet (na zielono) i mitochondria (na czerwono).
A. cztery przylegające do siebie komórki
B. jedna komórka w powiększeniu, strzałkami zaznaczono mitochondria
Wybrano reprezentatywne mikrografie.



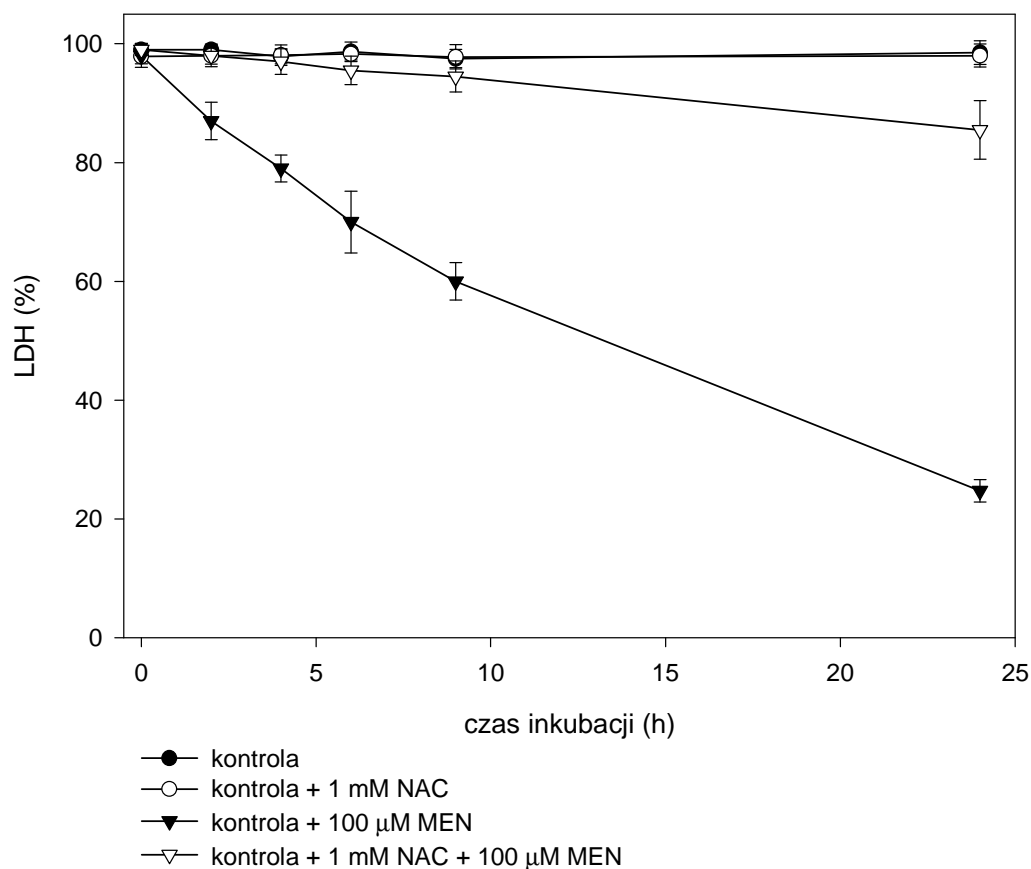
Ryc. 23 Komórki JAR poddane 2-godzinnejmu działaniu 100 μM menadionu, wyznakowano cytoszkielet (na zielono) i mitochondria (na czerwono).
C. traktowanie komórek menadionem prowadzi do zmiany kształtu komórek, mitochondria lokalizują się w pobliżu jądra komórkowego i widać wyraźne ubytki w cytoszkielecie
D. jedna komórka w powiększeniu, strzałkami zaznaczono wyraźne ubytki w cytoszkielecie
Wybrano reprezentatywne mikrografie.



Ryc. 23 Komórki JAR poddane 2-godzinemu działaniu 100 μM wodoronadtlenku *tert*-butylu (E) i 1 mM nadtlenku wodoru (F), wyznakowano cytoszkielet (na zielono) i mitochondria (na czerwono).
E. traktowanie komórek *tBuOOH* prowadzi do zwiększenia rozmiarów komórek, mitochondria słabiej wiążą CMXRos (mniejsza intensywność świecenia) co może świadczyć o ich uszkodzeniu
F. traktowanie komórek H_2O_2 prowadzi do powstawania filopodii (zaznaczono strzałkami)
Wybrano reprezentatywne mikrofotografie.

4.4 Antyoksydacyjne działanie N-acetylocysteiny w komórkach JAR poddanych działaniu menadionu i wodoronadtlenku *tert*-butylu

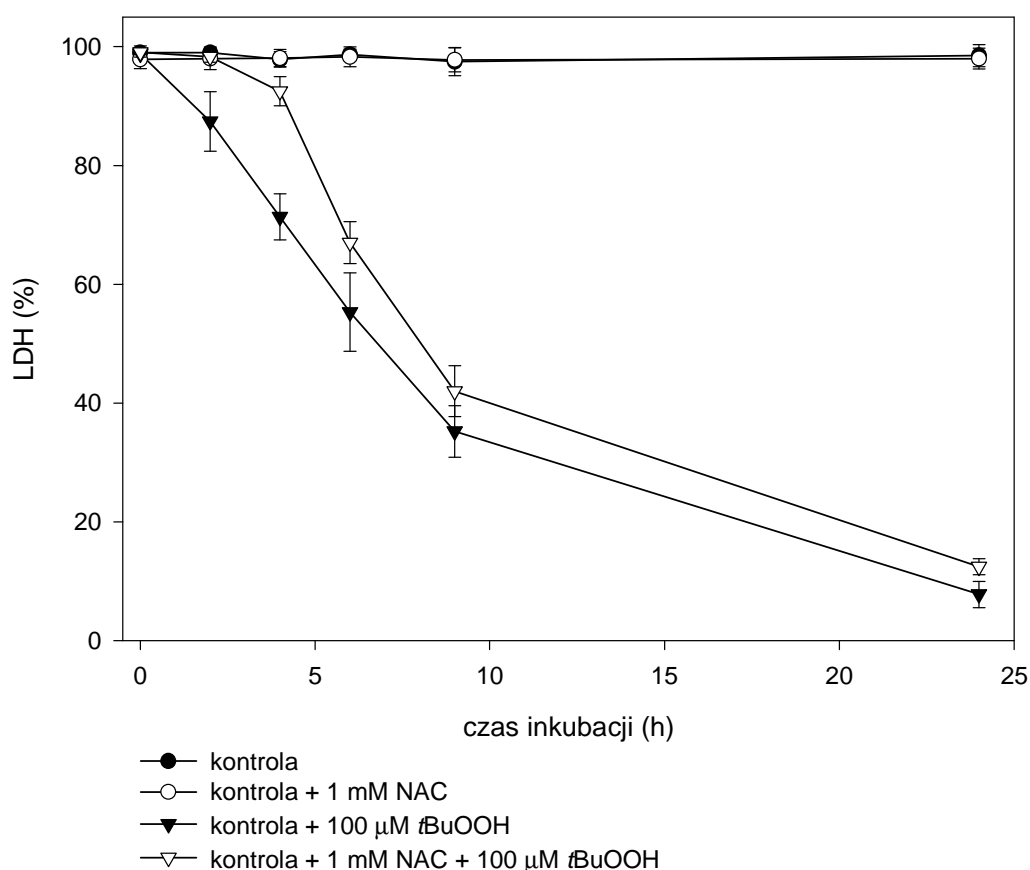
Uzyskane dotychczas wyniki wskazują, iż 100 μ M menadion silnie indukuje stres oksydacyjny w komórkach *choriocarcinoma*, w wyniku którego dochodzi do śmierci komórkowej na drodze nekrozy. Stres oksydacyjny objawia się uszkodzeniem błony komórkowej (zwiększone uwalnianie LDH), szybkim spadkiem ATP, pojawianiem się dużej ilości RFT (anionorodnika ponadtlenkowego) i gwałtownym spadkiem GSH. W wyniku stresu oksydacyjnego spada gwałtownie aktywność dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego i peroksydazy glutationowej. Wykrycie specyficznego koniugatu GS-MEN w komórkach traktowanych menadionem sugeruje, że do stresu oksydacyjnego w tych komórkach dochodzi głównie na skutek koniugacji glutationu przez menadion oraz aryacji białek bogatych w grupy tiolowe takich jak GAPDH i białka cytoszkieletu, prowadzące do ich inaktywacji. W celu podniesienia poziomu GSH, który zapobiega stresowi oksydacyjnemu, komórki *choriocarcinoma* inkubowano w obecności N-acetylocysteiny dostarczającej cysteinę głównie do syntezy glutationu. Komórki JAR poddano godzinnej preinkubacji z 1 mM N-acetylocysteiną (NAC), następnie traktowano je 100 μ M menadionem i badano wpływ NAC na przeżywalność komórek, którego miarą było uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Badanie wykazało zmniejszenie uwalniania LDH w komórkach traktowanych menadionem preinkubowanych z NAC, w stosunku do komórek inkubowanych z samym menadionem. Traktowanie komórek samym menadionem prowadziło do znacznej utraty LDH przez komórki. Po 9 godzinach inkubacji obserwowano 40%, a po 24 godzinach 74% utratę LDH. Preinkubacja z NAC bardzo silnie ograniczała utratę LDH przez komórki. W tych warunkach obserwowano po 9 godzinach tylko 4,5%, a po 24 godzinach 13% utratę LDH (Ryc. 24). Uzyskane dane wskazują, że przyczyną śmierci komórek JAR inkubowanych z menadionem jest stres oksydacyjny wywołany głównie przez spadek ATP i GSH. Menadion jest inhibitorem dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego i przez to zmniejsza się stężenie ATP, natomiast tworząc koniugaty z glutationem prowadzi do spadku stężenia GSH w komórce. Podanie komórkom JAR, traktowanych menadionem, N-acetylocysteiny prowadzi do wprowadzenia do komórek cysteiny, będącej donorem grup tiolowych dla enzymów i glutationu, w konsekwencji zapobiega stresowi oksydacyjnemu i zwiększa przeżywalność komórek.



Ryc. 24 Wpływ 100 μM MEN na uwalnianie LDH w komórkach JAR preinkubowanych z 1 mM N-acetylocysteiny, kontrola to komórki nie poddane działaniu MEN i NAC. Warunki inkubacji jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD z 4 niezależnych powtórzeń.

Otrzymane wyniki pokazują, że 100 μM wodoronadtlenek *tert*-butylu również indukuje silny stres oksydacyjny w komórkach JAR. W wyniku działania tego związku obserwuje się generowanie znacznych ilości reaktywnych form tlenu jak i bardzo znaczny wzrost ilości produktów peroksydacji lipidów. Następuje spadek ATP i zwiększa się uwalnianie LDH, a mikrofotografie konfokalne potwierdzają uszkodzenia błon organelli i błony komórkowej. W wyniku traktowania komórek *t*BuOOH spada znacząco stężenie GSH i zmniejszają się aktywności G-6-PDH i GAPDH oraz aktywność peroksydazy glutationowej. Wszystkie to procesy doprowadzają do śmierci komórkowej komórek JAR na drodze nekrozy. Aby potwierdzić wolnorodnikowy charakter stresu oksydacyjnego w komórkach JAR wynikający głównie z nagromadzenia nadtlenków lipidowych generowanych przez *t*BuOOH, a nie wynikający z utlenienia glutationu przez *t*BuOOH, dostarczono komórkom N-acetylocysteiny, jako dawcę grup –SH dla glutationu. Komórki *choriocarcinoma* preinkubowano w obecności 1 mM N-acetylocysteiny a następnie poddano działaniu 100 μM wodoronadtlenku *tert*-butylu i oceniono uwalnianie LDH do środowiska inkubacyjnego (Ryc. 25). Inkubowanie komórek w obecności wodoronadtlenku *tert*-butylu

proceeding to a significant loss of LDH by the cells. After 4 hours of incubation, 27% was released, and after 9 hours 64% of LDH was released. Preincubation with N-acetylcysteine limited the loss of LDH by the cells only to 4 hours of incubation. Under these conditions, after 4 hours 5.5% of LDH was lost, whereas after 9 hours 57% of LDH was released. Further prolongation of incubation (up to 24 hours) of JAR cells treated with *t*BuOOH in the presence of NAC did not show differences in the amount of LDH released (Fig. 25). The obtained data show that in JAR cells treated with hydrogen peroxide, the addition of N-acetylcysteine does not effectively protect these cells from oxidative stress. Despite the assurance of -SH groups for the reconstruction of glutathione and thiol enzymes, JAR cells incubated in the presence of *t*BuOOH and NAC die, most likely as a result of increased lipid peroxidation and damage to many components of the cell by the products of this peroxidation.



Ryc. 25 Wpływ 100 μM *t*BuOOH na uwalnianie LDH w komórkach JAR preinkubowanych z 1 mM N-acetylocysteiny, kontrola to komórki nie poddane działaniu *t*BuOOH i NAC. Warunki inkubacji jak w Materiałach i Metodach. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD z 4 niezależnych powtórzeń.

In the above experiments, the effect of N-acetylcysteine in the presence of hydrogen peroxide was not studied, because H₂O₂ does not have a significant effect on the viability of choriocarcinoma cells.

5. DYSKUSJA

5.1 Wpływ menadionu na komórki *choriocarcinoma*.

Badania oceniające cytotoksyczność MEN w komórkach JAR jednoznacznie pokazują, że w wyniku działania menadionu powstaje anionorodnik ponadtlenkowy (Ryc. 19A). Jest on głównym (o ile nie jedynym) wolnym rodnikiem powstającym w takich warunkach inkubacji, który inicjuje proces peroksydacji lipidów. Zmierzono ilość MDA i 4-HNE po traktowaniu komórek JAR 100 μM menadionem i wykazano 5-krotny wzrost produktów peroksydacji lipidów po 6 godzinach inkubacji (Ryc. 20). Taki wynik może stanowić potwierdzenie badań Klimka [97,124] oraz Milczarka i wsp. [98] prowadzonych na łożyskowych frakcjach subkomórkowych. Prace te wskazują, że proces peroksydacji lipidów w mitochondriach i mikrosomach izolowanych z ludzkiego łożyska jest inicjowany przez $\text{O}_2^{\cdot-}$ pochodzący z cytochromu P-450. Inne badania na frakcjach komórkowych łożyskowych również wskazują na udział anionorodnika ponadtlenkowego w procesie peroksydacji lipidów, w tym np. $\text{O}_2^{\cdot-}$ generowanego przez monoaminooksydazę [125] czy też oksydazę NAD(P)H [126] i oksydazę ksantynową [127], których aktywność stwierdza się w ludzkim łożysku. Ponadto, uzyskane wyniki potwierdzają wykazany wcześniej udział menadionu jako chinonu w cyklu redoks, w którym wytwarzany $\text{O}_2^{\cdot-}$ stymuluje peroksydację lipidów w mikrosomach izolowanych z łożyska ludzkiego [128].

Anionorodnik ponadtlenkowy pod wpływem dysmutazy ponadtlenkowej szybko dysmutuje do nadtlenku wodoru. Ponieważ w komórkach traktowanych menadionem obserwuje się wzmożony wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, spodziewano się wzrostu poziomu H_2O_2 . Miarą powstającego nadtlenku wodoru w komórkach była intensywność fluorescencji DCF w cytometrze przepływowym. W przeprowadzonym doświadczeniu, wykorzystano różne stężenia menadionu; od 1 μM do 100 μM i różne czasy inkubacji; od 0,5 do 24 godzin (dane nie umieszczone w pracy) i nie stwierdzono wzrostu intensywności świecenia DCF, co świadczy o tym, że w komórkach traktowanych menadionem nie gromadzi się H_2O_2 . W celu wyjaśnienia uzyskanych wyników zbadano wpływ 100 μM menadionu na aktywność enzymów rozkładających nadtlenek wodoru. W komórkach JAR stwierdza się bardzo wysoką aktywność katalazy i traktowanie ich menadionem nie wpływa znacząco na obniżenie aktywności CAT (Tab. 5). Natomiast pod wpływem MEN zaobserwowano gwałtowny spadek aktywności peroksydazy glutationowej (Tab. 5). Te wyniki wskazują na udział katalazy w rozkładaniu nadtlenku wodoru powstałego z $\text{O}_2^{\cdot-}$ generowanego przez menadion i wykluczają udział GPx w usuwaniu H_2O_2 w tych warunkach. Aktywność peroksydazy glutationowej w komórkach JAR jest hamowana przez

menadion, jak również może być hamowana przez anionorodnik ponadtlenkowy [129], zaś przeprowadzone doświadczenia potwierdzają powstawanie $O_2^{\cdot-}$ przy udziale menadionu.

W komórkach *choriocarcinoma* inkubowanych w obecności menadionu stwierdza się gwałtowny spadek stężenia glutationu zredukowanego (Ryc. 21). Przyczyną spadku stężenia GSH w komórkach nie jest utlenianie glutationu przez nadtlenek wodoru, ponieważ nie wykazano obecności H_2O_2 w komórkach traktowanych menadionem. Główną przyczyną spadku stężenia GSH w tych warunkach jest powstawanie koniugatów glutationu z menadionem (GS-MEN) (Ryc. 22). Te specyficzne koniugaty mogą być usuwane na zewnątrz komórki przez białko MRP (ang. *multidrug-resistance protein*) na zasadzie transportu aktywnego [130], co za tym idzie zużywa się ATP. W komórkach JAR inkubowanych z menadionem, ilość ATP spada dość szybko (Ryc. 16), co spowodowane jest głównie spadkiem aktywności GAPDH (Tab. 8), ale może również sugerować występowanie transportu GS-MEN poza komórkę. Potwierdzeniem tej hipotezy jest brak wzrostu stężenia glutationu utlenionego (GSSG) w komórkach JAR poddanych działaniu menadionu (dane nie umieszczone w pracy). GSH reaguje również z wolnymi rodnikami i przekazując im atom wodoru staje się rodnikiem glutationylowym (GS^{\cdot}). Taki rodnik może tworzyć inne rodniki: dimerowy rodnik $GSSGH^{\cdot}$, rodnik nadtlenu glutationu $GSOO^{\cdot}$ i nadtlenek glutationu $GSOOH$ [131]. Na wolne rodniki glutationylove narażone są głównie białka bogate w grupy tiolowe. W wyniku reakcji białkowych grup $-SH$ z rodnikami glutationyłowymi dochodzi do S-glutationylacji, czyli do modyfikacji białek na skutek powstawania mieszanych disiarczków – białko-SS-G. Dla większości białek utworzenie mieszanego disiarczku z glutationem prowadzi do zahamowania aktywności. W komórkach JAR poddanych działaniu menadionu jest generowany anionorodnik ponadtlenkowy, oraz sam menadion może przechodzić w stan rodnika semichinonowego ($H-Ch^{\cdot}$). Zarówno $O_2^{\cdot-}$ jak i $H-Ch^{\cdot}$ mogą brać udział w powstawaniu rodników glutationylowych, a te mogą przyczyniać się za pośrednictwem S-glutationylacji do hamowania aktywności enzymów bogatych w grupy sulfhydrylowe [131]. W komórkach *choriocarcinoma* najbardziej wrażliwe na menadion okazały się enzymy z dużą zawartością grup $-SH$, zaobserwowano inaktywację dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (Tab. 8). Bardzo silne zahamowanie aktywności GAPDH w komórkach JAR traktowanych menadionem i związane z tym znaczne obniżenie stężenia ATP (Ryc. 16) ma istotne znaczenie w zmniejszeniu żywotności komórek. W pracy Verrax i wsp. [132] wykazano również, że menadion może silnie aktywować polimerazę poli(ADP-rybozy), przez co dochodzi do obniżenia stężenia NAD^+ , substratu dla GAPDH.

Spadek stężenia glutationu zredukowanego w komórkach JAR inkubowanych w obecności menadionu może wynikać także z zahamowania aktywności enzymu dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (Tab. 8), który dostarcza NADPH niezbędnego do zredukowania GSSG. Na spadek ilości GSH mogą również wpływać produkty peroksydacji lipidów [133], mianowicie dowiedziono, że 4-HNE inaktywuje glutation tworząc z nim koniugaty [119]. Mimo, że zaobserwowano powstawanie produktów peroksydacji lipidów w komórkach JAR poddanych działaniu menadionu, nie stwierdzono powstawania specyficznych koniugatów HNE-SG.

Spadek glutationu zredukowanego w komórkach kosmówczaka hodowanych w obecności menadionu może przyczyniać się również do zaburzonej deglutationylacji białek, czyli zostaje zahamowane przywracanie grup tiolowych białek do postaci zredukowanej. W linii komórek JAR traktowanych MEN modyfikacjom, polegającym na utlenianiu grup -SH, mogą również ulegać białka cytoszkieletowe. Zaobserwowano, że po 2 godzinach inkubacji z menadionem pojawiają się ubytki w cytoszkielecie (Ryc. 23C i D). Proces ten nasila się wraz z upływem czasu działania menadionu. Fakt, że menadion ma wpływ na reorganizację cytoszkieletu zaobserwowano między innymi w komórkach BPAEC (ang. *bovine pulmonary artery endothelial cells*) [123]. W zacytowanej pracy sugerowano, że MEN hamował aktywność α -kateniny i paksyliny, białek utrzymujących komórki w kontakcie ze sobą i umożliwiającą adhezję do podłoża. Prawdopodobnie taki sam efekt zachodzi w komórkach *choriocarcinoma*, zaś następstwem powstawania uszkodzeń w cytoszkielecie komórek JAR jest utrata ich zdolności do przyczepiania się do podłoża. Autorzy wyżej wymienionej pracy sugerują zaburzony proces transhydrogenacji α -kateniny i paksyliny, uniemożliwiający utrzymanie grup -SH tych białek w stanie zredukowanym.

Przeprowadzone doświadczenia dowiodły, że w komórkach JAR traktowanych 100 μ M menadionem dochodzi do stresu oksydacyjnego prowadzącego do śmierci komórek na drodze nekrozy. Do oceny śmierci komórkowej wykorzystano mikroskopię konfokalną i elektronową w celu pokazania postępujących zmian w strukturach organelli komórkowych pod wpływem stresu oksydacyjnego. Natomiast potwierdzeniem tego typu badań była cytometryczna analiza jednopunktowa typu „dot plot” oraz oznaczenie uwolnionej dehydrogenazy mleczanowej jako miernik uszkodzenia błony komórkowej.

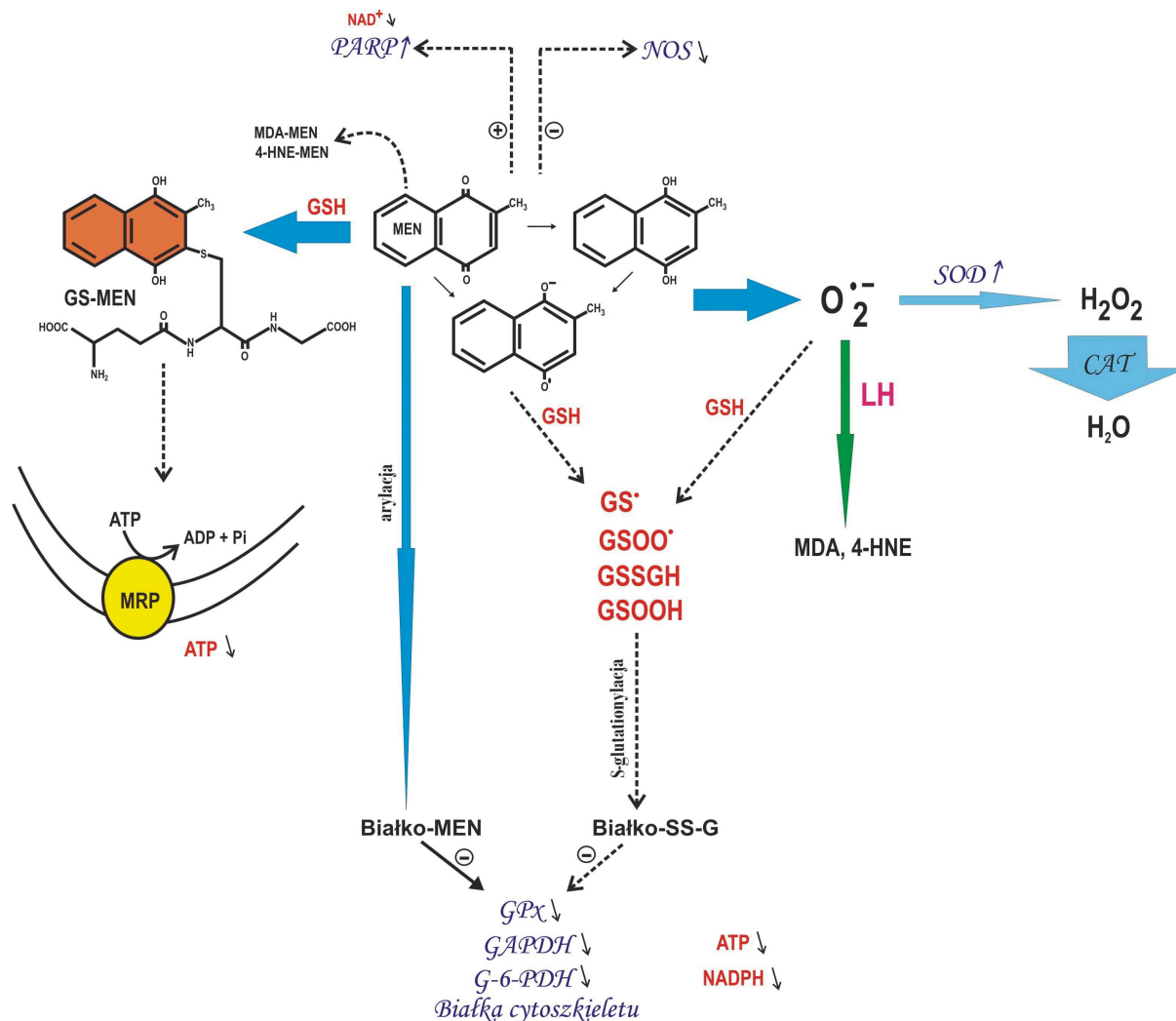
Zmiany w morfologii komórek JAR zaobserwowano po 2 godzinach inkubacji komórek z menadionem. Mikrografie konfokalne przedstawiają zmiany polegające na powstawaniu ubytków w cytoszkielecie oraz charakterystyczną oznakę stresu oksydacyjnego, którą jest przemieszczanie się mitochondriów w kierunku jądra komórkowego (Ryc. 23C i D). Identyfikacyjny efekt dotyczący przemieszczania mitochondriów uzyskano po 2 godzinach

inkubacji komórek JAR z 50 μM menadionem [134]. Za prawidłowe ułożenie organelli w komórce, w tym mitochondriów, odpowiadają białka o właściwościach motorycznych, a mianowicie kinezyzna i dyneina. Kinezyzna oraz dyneina łączą się z mikrotubulami cytoszkieletu i przesuują wzdłuż nich mitochondria [135]. W wyniku działania menadionu dochodzi prawdopodobnie do zahamowania kinezyzny i aktywacji dyneiny, czego efektem może być właśnie przemieszczenie mitochondriów oraz stworzenie charakterystycznej obřęczy wokół jądra komórkowego (ang. *cluster*) [136]. Stres oksydacyjny wywołany w komórkach JAR działaniem menadionu doprowadza je do śmierci nekrotycznej. Analizując mikrofotografie elektronowe po dłuższej ekspozycji komórek *choriocarcinoma* na menadion (Ryc. 18C i D) można rozróżnić zarówno komórki nekrotyczne (w większości) jak i apoptotyczne. Wynik taki jest potwierdzeniem badań Kamińskiego i wsp., gdzie uzyskano populacje komórek zarówno apoptotycznych jak i nekrotycznych w komórkach *osteosarcoma* 143B traktowanych 100 μM menadionem [137]. Dopiero badania na cytometrze przepływowym dały pełen obraz, w jaki sposób umierają komórki JAR po traktowaniu menadionem (Ryc. 17). Analiza „dot plot” wykazała, że komórki apoptotyczne stanowią niewielki procent komórek martwych, zaś większość komórek to komórki nekrotyczne, których ilość wzrasta począwszy od 4 godziny inkubacji (Tab. 1). Taki wynik znajduje potwierdzenie w badaniu przeżywalności (% uwalniania LDH): po 4 godzinach inkubacji komórek JAR z menadionem 21%, zaś po 24 godzinach 75% komórek uwalnia LDH (Ryc. 15).

Ochronę komórek JAR przed cytotoksycznym działaniem menadionu uzyskano poprzez podanie komórkom antyoksydanta, N-acetylocysteiny, której działanie polega głównie na regeneracji GSH. NAC ma również zdolność usuwania anionorodnika ponadtlenkowego generowanego przez menadion [138]. Preinkubacja z 1 mM NAC komórek JAR traktowanych menadionem powoduje znaczne zmniejszenie wypływu LDH z komórek, co jest równoznaczne ze zwiększeniem ich przeżywalności (Ryc. 24).

Mając na uwadze uzyskane wyniki, na rycinie 26, przedstawiono schemat cytotoksycznego działania menadionu w komórkach JAR. Uwzględniono na nim dane uzyskane w tej pracy oraz dane literaturowe. Elementem schematu nie wyjaśnionym dotychczas jest hamowanie przez menadion syntazy tlenu azotu. Dotychczas opisano wpływ MEN na NOS w szczurzych komórkach śródbłonna naczyniowego [139], gdzie 50 μM menadion hamuje całkowicie aktywność endotelialnej syntazy tlenu azotu. Natomiast w pracy Garnera i wsp. 60 μM MEN inaktywuje wszystkie izoformy NOS [140]. Biorąc pod uwagę te wyniki można zasugerować, że podobny proces zachodzi w komórkach *choriocarcinoma*, a mianowicie 100 μM MEN być może inaktywuje syntazę tlenu azotu

utleniając grupy tiolowe w jej centrum aktywnym. W związku z tym prawdopodobnie nie powstaje tlenek azotu i nie może być generowany wysoce reaktywny nadtlenoazotyn.



Ryc. 26 Schemat działania menadionu w komórkach *choriocarcinoma*. W cyklu redoks menadionu jest generowany anionorodnik ponadtlenkowy, który inicjuje peroksydację lipidów, sam zaś ulega dysmutacji do nadtlenuku wodoru. Nadtlenek wodoru zostaje szybko usunięty i nie generuje dalszych wolnych rodników. Menadion ulega aryłacji z glutationem zredukowanym co skutkuje spadkiem ilości GSH i pojawieniem się specyficznych koniugatów. Ponadto MEN hamuje aktywność enzymów: GPx, GAPDH i G-6-PDH oraz aktywuje SOD. Strzałki przerywane pokazują nie zmierzone, ale prawdopodobne, inne drogi działania menadionu: udział rodników glutationylowych w S-glutationyacji enzymów oraz transport koniugatów GS-MEN na zewnątrz komórki. Zastosowane skróty wyjaśniono na str. 4-6.

5.2 Wpływ wodoronadtlenku *tert*-butylu na komórki *choriocarcinoma*.

Wodoronadtlenek *tert*-butylu jest kolejnym związkiem indukującym stres oksydacyjny w komórkach JAR. Mając na uwadze jego właściwości (jest analogiem krótkołańcuchowych nadtlenków lipidowych) spodziewano się uzyskać w komórkach *choriocarcinoma* traktowanych wodoronadtlenkiem *tert*-butylu silny stres oksydacyjny, wyrażony zwiększoną produkcją nadtlenków lipidowych i produktów peroksydacji lipidów. Po inkubacji komórek z 100 μM *t*BuOOH zaobserwowano 20-krotny wzrost ilości nadtlenków lipidowych (oznaczonych z użyciem DCF) w stosunku do komórek nie traktowanych tym prooksydantem (Ryc. 19B). W komórkach JAR traktowanych wodoronadtlenkiem *tert*-butylu stwierdzono również znaczący, 34-krotny wzrost produktów peroksydacji lipidów: dialdehydu malonowego i 4-hydroksynonenalu (Ryc. 20). Główną drogą indukcji peroksydacji lipidów jest oddziaływanie rodnika alkoksybutylowego, powstałego w wyniku rozpadu homolitycznego *t*BuOOH, z cząsteczkami wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Peroksydacja lipidów, wywołana wodoronadtlenkiem *tert*-butylu, wiąże się z potencjalnie łatwym dostępem do żelaza wchodzącego w skład białek rodziny cytochromów P-450. Te monooksygenazy charakteryzują się obecnością żelaza hemowego jako grupy prostetycznej (Ryc. 9). W komórkach JAR stwierdza się wysoką aktywność aromatazy (CYP19) [141] i prawdopodobne jest, że to właśnie aromataza może być donorem żelaza umożliwiającym inicjację i propagację procesu peroksydacji lipidów. Przypuszczalnie, w wyniku interakcji wodoronadtlenku *tert*-butylu z CYP19 dochodzi do utlenienia grupy tiolowej cysteiny i odsłonięcia żelaza hemowego. Uwolnione żelazo może być czynnikiem umożliwiającym rozpad homolityczny *t*BuOOH, co prowadzi do wytwarzania rodnika alkoksybutylowego, ten natomiast jest prekursorem rodnika metylowego i pochodnych (peroksymetylowego i alkoksymetylowego) [65,142], które mogą uczestniczyć w tworzeniu kolejnych LOOH. Potwierdzeniem tych przypuszczeń może być fakt, że w izolowanej z łożyska ludzkiego frakcji mitochondrialnej, analogi wodoronadtlenków lipidowych (w tym *t*BuOOH) zarówno indukują NADPH-zależną peroksydację lipidów jak i hamują syntezę progesteronu poprzez inaktywację cytochromu P-450_{SCC} (ang. *cholesterol side-chain cleavage*) [96].

Wzmocniony proces peroksydacji lipidów w komórkach JAR poddanych działaniu wodoronadtlenku *tert*-butylu prowadzi do uszkodzeń komórek i negatywnie wpływa na ich przeżywalność. Produkty peroksydacji lipidów modyfikują właściwości fizyczne błon komórkowych. Wprowadzenie grup nadtlenkowych i aldehydowych do cząsteczek fosfolipidów błonowych obniża hydrofobowość wnętrza błon komórkowych i zmienia organizację dwuwarstwy. Wynikiem oddziaływań nadtlenków lipidowych i produktów

peroksydacji lipidów z błonami jest zahamowanie aktywności białek błonowych i transportujących co prowadzi do utraty integralności zarówno błon wewnątrzkomórkowych i błony komórkowej. Komórki JAR traktowane wodoronadtlenkiem *tert*-butylu wykazują zmiany w zakresie utraty integralności błony komórkowej, czego skutkiem jest szybka (zainicjowana już w 2 godzinie inkubacji) utrata LDH (Ryc. 15). Analiza mikrofotografii konfokalnych potwierdza wpływ *t*BuOOH na uszkodzenie błon, po 2 godzinach inkubacji obserwuje się komórki o słabo zaznaczonych konturach, co świadczy o uszkodzeniach błony komórkowej (Ryc. 23E). Prawdopodobnie wodoronadtlenek *tert*-butylu wpływa również na utratę integralności błon wewnątrzkomórkowych w komórkach JAR, ponieważ widoczne jest słabsze świecenie mitochondriów i wybarwione jądro komórkowe, co może sugerować, że barwnik mitochondrialny CMXRos wypływa z uszkodzonych mitochondriów i przenika do innych kompartmentów komórkowych. Wzmożony proces peroksydacji lipidów błonowych w komórkach kosmówczaka prowadzi do uszkodzeń błony komórkowej i szybkiej śmierci zainicjowanej już w 2 godzinie inkubacji z 100 μ M *t*BuOOH. Analiza danych z cytometru przepływowego (Ryc. 17, Tab. 2) wykazała, że komórki umierają głównie śmiercią nekrotyczną, natomiast śmierć komórek w procesie apoptozy dotyczy tylko 1% komórek JAR. Na taką samą zależność wskazują mikrofotografie elektronowe. Po 4 godzinach inkubacji komórek JAR z *t*BuOOH w preparatach obserwuje się głównie komórki nekrotyczne i znacznie mniej komórek apoptotycznych (Ryc. 18E), a po 9 godzinach większość komórek jest w fazie zaawansowanej nekrozy (Ryc. 18Fa). Obecność nielicznych komórek apoptotycznych sugeruje, że komórki JAR mogą wchodzić w nekrozę poprzez apoptozę a konkretnie poprzez wchodzenie w fazę komórek pośrednich, „intermediate cells” (Ryc. 18Fb). Tego typu komórki stanu pośredniego były już opisywane w literaturze przez Kamińskiego i wsp. [143] oraz Niemczyk i wsp. [144] a znajdowano je w komórkach *osteosarcoma* traktowanych menadionem. Powołując się na teorię Jamisona i wsp. [145] można przypuszczać, że komórki *choriocarcinoma* poddane działaniu wodoronadtlenku *tert*-butylu umierają poprzez wchodzenie w proces nekrozy zwany „autoschizis” (auto-rozłam). Ten specyficzny rodzaj nekrozy został opisany w komórkach raka pęcherza moczowego poddanych działaniu witaminy C i K [146]. „Autoschizis” jest specyficznym rodzajem nekrozy, bardzo przypomina apoptozę ale różnice są w „blebbing”; w apoptozie „blebbs” czyli odczepiające się fragmenty komórek zawierają organelle, w tym szczątki jądra komórkowego, w „autoschizis” następuje odcinanie (ang. *self-excision*) cytoplazmy i w rezultacie zostaje obkurczone jądro komórkowe z warstwą zdegradowanych organelli opłaszczających jądro. Powołując się także na interpretację Jamisona i wsp. [145] dotyczącą wyników barwienia

komórek aneksyną V-FITC i jodkiem propidyny, można dalej przypuszczać, że komórki JAR umierają w procesie „autoschizis”. Według opisu Jamisona, grupa komórek żywych to nie barwiąca się żadnym znacznikiem (A-/PI-), komórki wiążące aneksynę V to komórki apoptotyczne (A+/PI-), komórki wiążące aneksynę V i jodek propidyny to komórki nekrotyczne (A+/PI+), zaś grupa komórek wybarwiająca się tylko jodkiem propidyny: A-/PI+ to właśnie komórki typu „autoschizis” [145]. W komórkach JAR po traktowaniu *t*BuOOH obserwuje się komórki w fazie (A-/PI+) począwszy od 2 godziny inkubacji (Ryc. 17, Tab. 2). Przyczyną śmierci komórek linii T24 [146] w procesie „autoschizis” jest głównie wzmożony proces peroksydacji lipidów prowadzący do uszkodzeń błony jak i obniżenie stężenia tioli komórkowych (w tym glutationu i enzymów bogatych w grupy –SH), czego skutkiem jest uszkodzenie białek cytoszkieletu. W komórkach kosmówczaka, *t*BuOOH wywołuje wzmożoną peroksydację lipidów, co może sugerować, że po dłuższej ekspozycji komórek na wodoronadtlenek *tert*-butylu umierają one w procesie „autoschizis”.

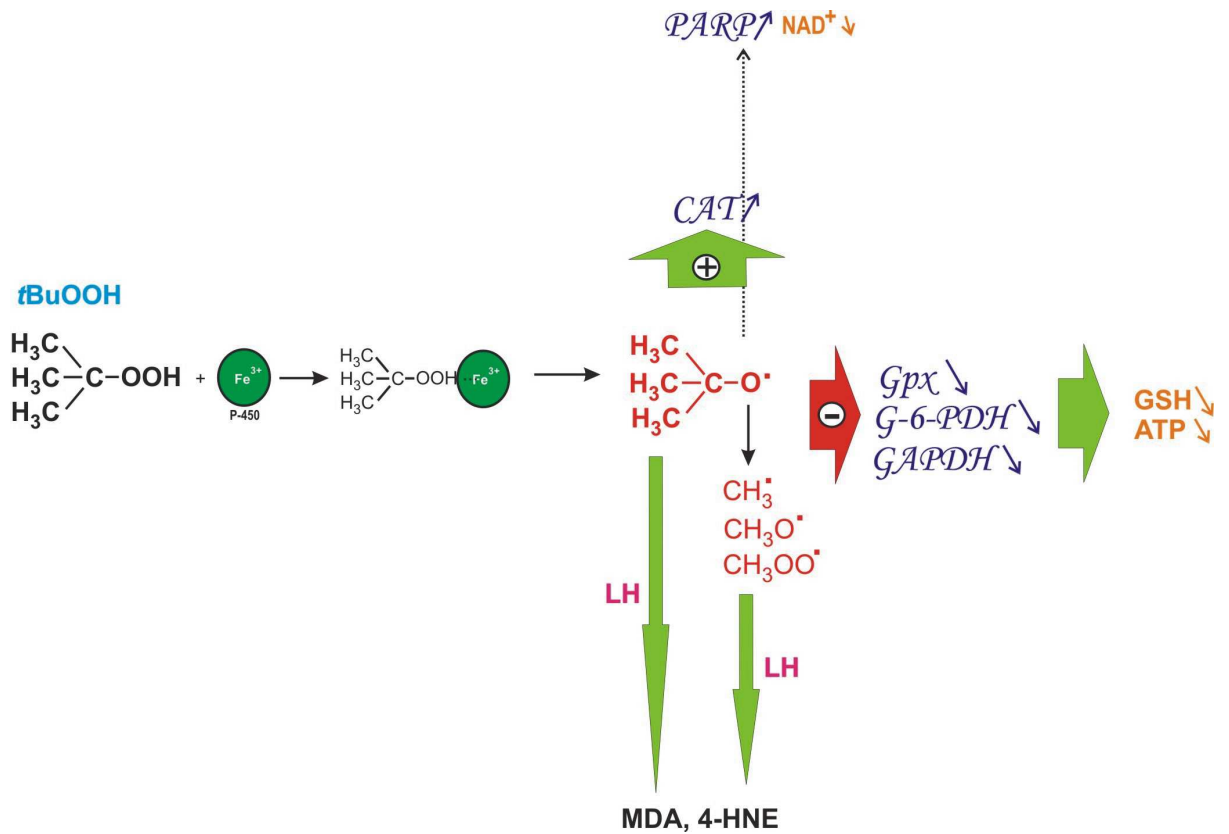
W komórkach JAR poddanych działaniu *t*BuOOH obserwuje się silny spadek ATP (Ryc. 16), a spowodowany jest on zahamowaniem aktywności dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (Tab. 8). W komórkach *choriocarcinoma* traktowanych wodoronadtlenkiem *tert*-butylu spada także stężenie glutationu zredukowanego (Ryc. 21). Może być to spowodowane utlenieniem grup sulfhydrylowych glutationu przez *t*BuOOH, ale nie można też wykluczyć, że glutation może reagować z RFT wytwarzanymi podczas działania wodoronadtlenku *tert*-butylu na błony. W wyniku takich reakcji może dochodzić do powstawania rodników glutationylowych, które uczestniczą w S-glutationylacji białek. W komórkach JAR traktowanych wodoronadtlenkiem *tert*-butylu stwierdzono także spadek aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Obniżenie aktywności G-6-PDH prowadzi do zmniejszenia produkcji NADPH przy udziale tego enzymu, co uniemożliwia redukcję disiarczkowej formy glutationu do formy zredukowanej i w ten sposób przyczynia się również do spadku stężenia GSH w komórkach kosmówczaka. Dodatkowo, badania z użyciem tandemowej spektrometrii masowej nie ujawniły występowania specyficznych koniugatów glutationu ani z *t*BuOOH, ani też z produktami peroksydacji lipidów (HNE-SG).

W komórkach JAR inkubowanych w obecności *t*BuOOH obserwuje się 2,5-krotny wzrost aktywności katalazy (Tab. 6). Wzrost aktywności CAT nie ma większego znaczenia w usuwaniu wodoronadtlenków lipidowych powstałych w komórkach *choriocarcinoma* w wyniku działania *t*BuOOH, ponieważ katalaza ma ograniczone właściwości peroksydazowe. Za wzrost aktywności katalazy mogą odpowiadać produkty peroksydacji lipidów. Stwierdzono, że 4-HNE może aktywować receptory dla peroksysomalnych proliferatorów (PPARs ang. *peroxisomal proliferator-activated receptors*) [147], zaś aktywacja PPAR

(dokładnie PPAR γ) prowadzi do wzrostu ilości mRNA katalazy jak i jej aktywności w szczurzych peroksydomach [148]. Dlatego też, całkiem prawdopodobne jest, że taka regulacja aktywności katalazy może mieć miejsce w komórkach *choriocarcinoma* poddanych działaniu *tBuOOH*.

Wodoronadtlenek *tert*-butylu jest silnie cytotoksyczny dla komórek JAR. Stres oksydacyjny wywołwany *tBuOOH* wynika głównie z intensywnego procesu peroksydacji lipidów i zwiększonej produkcji nadtlenków lipidowych. Na skutek zmian w fosfolipidach błonowych dochodzi do rozszczelnienia błon komórkowych i do śmierci komórek JAR na drodze nekrozy. *tBuOOH* obniża również stężenie GSH w komórkach oraz aktywności enzymów tiolowych. Lecz podanie komórkom JAR traktowanych wodoronadtlenkiem *tert*-butylu, antyoksydanta mającego zdolność regeneracji GSH nie wpływa znacząco na zwiększenie przeżywalności komórek. N-acetylocysteina chroni komórki przed toksycznym działaniem *tBuOOH* tylko w początkowym okresie inkubacji (do 4 godzin, Ryc. 25)

Opierając się na uzyskanych wynikach przedstawiono schemat działania wodoronadtlenku *tert*-butylu w komórkach JAR (Ryc. 27). Na schemacie pokazano zarówno dane uzyskane w niniejszej pracy jak i dane literaturowe. Wodoronadtlenek *tert*-butylu może aktywować polimerazę poli(ADP-rybozy) w komórkach PC12 [61] i w szczurzych hepatocytach [149], zaś zwiększona aktywność tego enzymu prowadzi do spadku NAD⁺ i ATP, uszkodzeń w DNA i przyczynia się do śmierci komórki. Jeżeli w komórkach JAR dochodzi do aktywacji polimerazy poli(ADP-rybozy) przez *tBuOOH* i obniżenia stężenia NAD⁺, może to dodatkowo wyjaśniać szybki spadek ATP prowadzący do śmierci komórek *choriocarcinoma*.



Ryc. 27 Schemat działania wodoronadtlenku *tert*-butylu w komórkach *choriocarcinoma*. *T*BuOOH wchodzi w interakcję z żelazem cytochromu P-450 i powstaje wysoce reaktywny rodnik alkoksybutylowy, który generuje silny stres oksydacyjny i wzmożony proces peroksydacji lipidów. Z wodoronadtlenku *tert*-butylu mogą powstawać inne reaktywne formy tlenu propagujące peroksydację lipidów. Ponadto *t*BuOOH hamuje aktywność enzymów: GAPDH, GPx i G-6-PDH, zaś aktywuje katalazę. Strzałka przerywana pokazuje nie zmierzoną ale prawdopodobną, inną drogę działania *t*BuOOH, czyli aktywację przez *t*BuOOH polimerazy poli(ADP-rybozy). Zastosowane skróty wyjaśniono na str. 4-6.

5.3 Wpływ nadtlenu wodoru na komórki *choriocarcinoma*.

Nadtlenek wodoru podawany do hodowli komórkowych w stężeniu 1mM jest bardzo silnym prooksydantem. Wywołuje stres oksydacyjny i zazwyczaj w niższym stężeniu niż milimolowe doprowadza do śmierci komórek na drodze nekrozy [150]. Natomiast wyniki uzyskane wskutek traktowania komórek *choriocarcinoma* 1mM H₂O₂ pokazują, że związek ten ma niewielki wpływ na zmniejszenie przeżywalności komórek. Zarówno test na uwalnianie LDH jak i test z aneksyną V-FITC i jodkiem propidyny niezbicie pokazują, że przez 24 godziny inkubacji komórek JAR z nadtlaniem wodoru większość komórek to komórki żywe (Ryc. 15 i 17). Brak zmian w przeżywalności komórek JAR poddanych działaniu H₂O₂ potwierdzają mikrofotografie elektronowe (Ryc. 18G i H), gdzie nie obserwuje się zmian w ultrastrukturze komórkowej; jądro komórkowe, mitochondria i inne organelle pozostają niezmienione przez ponad 9 godzin inkubacji z nadtlaniem wodoru (Ryc. 18G). Zmiany w komórkach są dostrzegalne dopiero po 24 godzinach inkubacji z nadtlaniem wodoru i dotyczą niewielkiej liczby komórek: można zaobserwować komórki o jądrach z rozproszoną chromatyną (Ryc. 18H), co może sugerować pierwsze oznaki stresu oksydacyjnego i inicjację nekrozy.

Skoro nie dostrzeżono większych zmian w przeżywalności komórek traktowanych nadtlaniem wodoru zadano sobie pytanie, czy w ogóle wchodzi on do komórki. W tym celu zmierzono ilość komórkowego H₂O₂ przy użyciu 2',7'-diocjanu dichlorofluoresceiny. Dwugodzinna inkubacja komórek JAR z H₂O₂ nie wykazała wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia nadtlenu wodoru. Natomiast pomiar DCF po pół godzinie od momentu podania H₂O₂ do komórek wykazał zaledwie dwukrotny wzrost stężenia H₂O₂ (Ryc. 19B). Szybkie znikanie nadtlenu wodoru w komórkach może oznaczać, że jest on szybko rozkładany przez enzymy antyoksydacyjne. Pomiar enzymów mających zdolność rozkładania nadtlenu wodoru, w komórkach *choriocarcinoma* traktowanych H₂O₂ wykazał wysoką aktywność katalazy i stosunkowo niską aktywnością peroksydazy glutationowej (Tab. 7). Wysoka aktywność katalazy może wpływać na zwiększenie aktywności peroksydazy glutationowej, ponieważ zaobserwowano [151], że w warunkach stresu oksydacyjnego katalaza uwalnia NADPH, co wpływa regulacyjnie na układ enzymów glutationozależnych: peroksydazy glutationowej / reduktazy glutationowej. W komórkach JAR hodowanych w obecności nadtlenu wodoru katalaza ulega nieznacznej degradacji (Tab. 7) i prawdopodobnie uwalnia NADPH, który wpływa pośrednio na zwiększenie aktywności GPx (Tab. 7). Otrzymane w tej pracy wyniki jednoznacznie wskazują, że za usuwanie H₂O₂ w komórkach JAR odpowiada głównie katalaza, natomiast peroksydaza glutationowa może wspomagać ten proces.

W komórkach JAR inkubowanych w obecności H_2O_2 wykazano nieznaczny wzrost produktów peroksydacji lipidów (Ryc. 20). Natomiast w porównaniu do komórek *choriocarcinoma*, w linii komórek *osteosarcoma* 143B, 1 mM nadtlenek wodoru wywoływał silny stres oksydacyjny oraz indukował peroksydację lipidów [152].

W komórkach kosmówczaka poddanych działaniu nadtlenu wodoru stwierdzono 23% obniżenie stężenia glutationu (Ryc. 21), ale taki spadek stężenia GSH nie wpływa znacząco na zwiększenie stresu oksydacyjnego w komórkach JAR. W komórkach poddanych działaniu H_2O_2 zmierzono aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej i po 2 godzinach wykazano 33% obniżenie aktywności G-6-PDH, i taki poziom aktywności utrzymywał się przez następne godziny inkubacji (Tab. 8). Badania Tian WN i wsp. wykazały, że komórki z nadekspresją dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej są odporne na działanie nadtlenu wodoru [153]. W komórkach *choriocarcinoma* traktowanych H_2O_2 aktywność G-6-PDH jest nadal wysoka, więc prawdopodobnie może mieć hamujący wpływ na cytotoksyczne działanie H_2O_2 . Obserwowane obniżenie stężenia ATP (Ryc. 16) w komórkach JAR inkubowanych z H_2O_2 może być spowodowane częściowym zahamowaniem aktywności dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego (Tab. 8). GAPDH jest enzymem bardzo wrażliwym na działanie nadtlenu wodoru, może być skutecznie inaktywowana przez utlenienie cysteiny w centrum aktywnym lub przez S-glutationylację [154]. Mając na uwadze, że po 2 godzinach inkubacji nie obserwuje się zwiększonego stężenia nadtlenu wodoru w komórkach JAR, wydaje się prawdopodobnym, że za dalsze hamujące działanie na GSH, G-6-PDH i GAPDH odpowiadają RFT generowane z H_2O_2 . Hamujący wpływ na cytotoksyczne działanie nadtlenu wodoru w komórkach JAR może mieć także gonadotropina kosmówkowa (hCG). Aris i wsp. wykazali, że zwiększone wydzielanie hCG przez komórki łożyska zapobiega stresowi oksydacyjnemu wywołanemu przez nadtlenek wodoru [155]. Komórki *choriocarcinoma* charakteryzują się podwyższonym wydzielaniem hCG w stosunku do komórek trofoblastu, stąd więc również może wynikać ich odporność na nadtlenek wodoru.

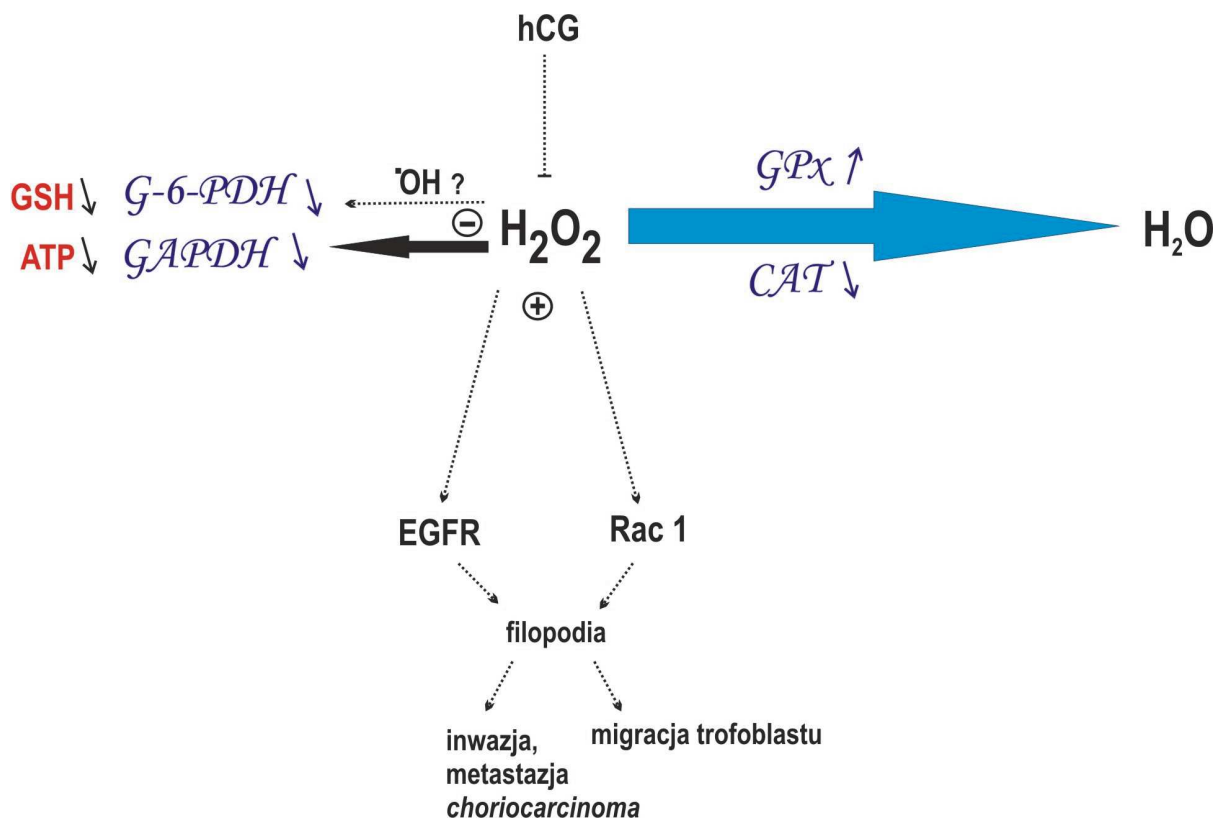
Oceniając działanie nadtlenu wodoru w komórkach *choriocarcinoma* można stwierdzić, że w stężeniu 1 mM nie jest on cytotoksyczny dla tych komórek. Jednak obserwuje się pewne zmiany w cytoszkielecie komórek wystawionych na działanie H_2O_2 . Mianowicie, już po 2 godzinach po podaniu komórkom nadtlenu wodoru widać wyraźne zmiany w ich morfologii (Ryc. 23F). Zmienia się reorganizacja układu mikrofilamentów aktynowych, co prowadzi do powstania filopodii odpowiadających za dynamiczny ruch komórki. Dlatego też wydaje się, że komórki *choriocarcinoma* stymulowane nadtlakiem wodoru zwiększają inwazyjność i metastazję (zdolność do penetracji ścian naczyń

krwionośnych i limfatycznych). Jest to jednak teza oparta tylko na mikrofotografii konfokalnej, sporządzonej na podstawie preparatu komórkowego i wymaga oczywiście potwierdzenia, które może dać zmierzenie białek takich jak integryny (zlokalizowane w filopodiach) czy też kadheryny (wykazujące zmniejszoną ekspresję w komórkach migrujących). Nie byłby to odosobniony przypadek indukcji ruchliwości komórek nowotworowych przy udziale nadtlenu wodoru. W pracy Alexandrowej i wsp. [156] obserwuje się zmiany w morfologii i ruchliwości komórek linii REF52 (transformowane szczurze fibroblasty) po inkubacji z 50 μ M nadlenkiem wodoru. Autorzy tej pracy stwierdzili, że H_2O_2 wpływa na ruchliwość komórek indukując białko Rac1. Dodatkowo, stwierdzono, że do aktywacji ruchliwości komórek dochodzi poprzez zwiększenie aktywności kompleksu WAVE-Arp2/3 umożliwiającego polimeryzację aktyny (WAVE, ang. *verprolin homologous protein* – białka zaangażowane w adhezję, ednocytozę i migrację komórek, Arp2/3, ang. *actin-related proteins*, białka umożliwiające polimeryzację aktyny) [156].

Uzyskany wynik wpływu nadtlenu wodoru na zwiększenie ruchliwości komórek JAR można również zinterpretować inaczej. Komórki JAR są komórkami kosmówczaka, a więc mają morfologię trofoblastu. Trofoblast podczas zagnieżdżania się w ścianie macicy jest bardzo inwazyjny i charakteryzuje się wysoką ekspresją białek z rodziny integryn. Uważa się, że za ruchliwość i zdolność migracji komórek trofoblastu odpowiada wzrost stężenia czynników wzrostu takich jak HGF (ang. *hepatocyte growth factor*) [157] i EGF (ang. *epidermal growth factor*) [158], które wiążąc się z odpowiednim receptorem (c-Met dla HGF i EGFR dla EGF) aktywują kinazę fosfatydyloinozitolową 3 (PI3K) i kinazę Akt, wchodzące w szlak sygnalizacyjny MAPK, co w konsekwencji zwiększa ruchliwość komórek. Stwierdzono, że nadtlenek wodoru może również aktywować sam receptor EGF w linii komórek NR8383 [72,159] oraz w innych ludzkich liniach nowotworowych [160], więc prawdopodobnym wydaje się istnienie takiego mechanizmu w komórkach trofoblastu. Może mieć to odniesienie do warunków mających miejsce w ciąży fizjologicznej. W początkowym stadium ciąży ilość EGF i jego receptora jest znaczna zarówno w cytotrofoblaście jak i w syncytiotrofoblaście, spada w łożysku dopiero w II i III trymestrze [161]. We wczesnej ciąży (I trymestr) stężenie tlenu jest bardzo niskie ponieważ promuje proliferację komórek zaś stężenie tlenu wzrasta stopniowo po zakończonej inwazji trofoblastu [162]. W wyniku hypoksji może dochodzić do zwiększania ilości RFT, a więc powstające reaktywne formy tlenu (w tym H_2O_2) mogłyby aktywować receptory EGF i wpływać na szlak sygnalizacyjny prowadzący do zwiększania ruchliwości komórek trofoblastu i ich migracji.

W komórkach JAR inkubowanych w obecności 1 mM H_2O_2 nie obserwuje się efektu cytotoksycznego, przez 24 godzinny czas inkubacji komórki pozostają żywe

i prawdopodobnie zwiększa się ich ruchliwość i zdolność migracji. Proponowany mechanizm działania nadtlenu wodoru w komórkach *choriocarcinoma* zamieszczono na rycinie 28.



Ryc. 28 Schemat działania nadtlenu wodoru w komórkach *choriocarcinoma*. H_2O_2 wchodzi do komórki i prawdopodobnie zanim zostanie rozłożony przez katalazę, hamuje nieznacznie aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej i dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego, oraz generuje inne RFT (np. rodnik wodorotlenowy) działające również hamująco na te enzymy, co skutkuje obniżonym stężeniem GSH i ATP. H_2O_2 prawdopodobnie aktywuje receptor EGF i białko Rac1 (przerwane strzałki) co prowadzi do zwiększenia ruchliwości komórek. Komórki *choriocarcinoma* produkują duże ilości hCG, która być może hamuje cytotoksyczne działanie nadtlenu wodoru w tych komórkach. Zastosowane skróty wyjaśniono na str. 4-6.

Podsumowując, menadion i wodoronadtlenek *tert*-butylu są związkami cytotoksycznymi dla komórek JAR. Oba wywołują silny stres oksydacyjny w badanych komórkach, jednakże mechanizm ich prooksydacyjnego działania różni się. 100 μ M menadion wywołuje stres oksydacyjny głównie poprzez aryłację grup tiolowych glutationu i enzymów bogatych w grupy sulfhydrylowe. Wywoływany w ten sposób stres oksydacyjny jest dodatkowo stymulowany anionorodnikiem ponadtlenkowym powstającym w cyklu redoks menadionu. 100 μ M wodoronadtlenek *tert*-butylu ma także działanie prooksydacyjne w komórkach *choriocarcinoma*, ponieważ będąc analogiem endogennie występujących wodoronadtlenków lipidowych inicjuje i przyspiesza proces peroksydacji lipidów. Powstałe w wyniku metabolizmu *t*BuOOH nadtlenki lipidowe i produkty peroksydacji lipidów wpływają destrukcyjnie na błonę komórkową i błony organelli badanych komórek, przez co tracą one integralność. Generowane z wodoronadtlenku *tert*-butylu LOOH hamują również aktywność GAPDH i G-6-PDH, co prowadzi do spadku stężenia ATP i GSH. Cytotoksyczne działanie zarówno MEN jak i *t*BuOOH w komórkach JAR prowadzi do śmierci komórek na drodze nekrozy. Natomiast nadtlenek wodoru nie jest cytotoksyczny dla komórek *choriocarcinoma*. W czasie inkubacji komórek z 1 mM H₂O₂ obserwuje się nieznaczne obniżenie aktywności katalazy, dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej a także niewielki spadek stężenia GSH i ATP. Nadtlenek wodoru jest szybko usuwany z komórek przy udziale enzymów antyoksydacyjnych i nie przyczynia się do indukowania peroksydacji lipidów. Komórki JAR traktowane nadtlenkiem wodoru zachowują integralność błony komórkowej i pozostają żywe przez 24 godziny inkubacji z H₂O₂.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań dostarczają nowych informacji dotyczących mechanizmu działania niektórych prooksydantów na komórki łożyska ludzkiego i mogą okazać się użyteczne w wyjaśnieniu procesów patologicznych zachodzących w łożysku ludzkim pod wpływem stresu oksydacyjnego.

6. WNIOSKI

- Menadion jest cytotoksyczny dla komórek *choriocarcinoma*. Indukuje stres oksydacyjny głównie poprzez koniugację glutationu i arylację enzymów tiolowych: GAPDH i G-6-PDH, doprowadzając do znaczącego spadku stężenia GSH i ATP w komórkach. Ponadto w wyniku cyklu redoks menadionu jest generowany anionorodnik ponadtlenkowy, który inicjuje proces peroksydacji lipidów. Indukowany menadionem stres oksydacyjny przyczynia się do śmierci komórek na drodze nekrozy.
- Wodoronadtlenek *tert*-butylu jest również cytotoksyczny dla komórek linii JAR. Główną przyczyną stresu oksydacyjnego są powstające w wyniku metabolizmu wodoronadtlenku *tert*-butylu reaktywne formy tlenu oraz wzmożona peroksydacja lipidów. RFT i produkty peroksydacji lipidów hamują aktywność GAPDH i G-6-PDH, podwyższają aktywność katalazy, oraz wpływają na obniżenie stężenia ATP i GSH. Komórki kosmówczaka inkubowane z *t*BuOOH umierają głównie śmiercią nekrotyczną.
- Nadtlenek wodoru, w odróżnieniu od menadionu i wodoronadtlenku *tert*-butylu, nie jest cytotoksyczny dla komórek *choriocarcinoma*. Brak indukcji stresu oksydacyjnego spowodowany jest głównie wysoką aktywnością katalazy. W komórkach traktowanych H₂O₂ nie stwierdza się wzmożonego procesu peroksydacji lipidów. Nadtlenek wodoru tylko nieznacznie hamuje aktywności badanych enzymów (GAPDH i G-6-PDH) i w niewielkim stopniu obniża stężenie ATP i GSH w komórkach JAR. Komórki hodowane w obecności nadtlenu wodoru przez 24 godziny zachowują integralność błony komórkowej i nie stwierdza się komórek apoptotycznych i nekrotycznych.

7. STRESZCZENIE

Celem pracy było zbadanie cytotoksycznego wpływu menadionu, wodoronadtlenku *tert*-butylu i nadtlenku wodoru na komórki ustabilizowanej linii JAR (ATCC HTB-144) ludzkiego *choriocarcinoma*, posiadającej cechy morfologiczne i biologiczne właściwe dla trofoblastu. Przeprowadzone badania wykazały cytotoksyczne działanie menadionu i wodoronadtlenku *tert*-butylu w komórkach JAR. Menadion wywoływał stres oksydacyjny poprzez obniżenie stężenia glutationu (w wyniku koniugacji) i zahamowania aktywności enzymów bogatych w grupy sylfhydrylowe (GAPDH i G-6-PDH). Generowany przez menadion anionorodnik ponadtlenny inicjował proces peroksydacji lipidów w komórkach JAR. Komórki kosmówczaka traktowane menadionem umierały śmiercią nekrotyczną. Podanie komórkom traktowanych menadionem N-acetylocysteiny zapobiegło stresowi oksydacyjnemu i zwiększyło przeżywalność komórek kosmówczaka. Wodoronadtlenek *tert*-butylu wywoływał stres oksydacyjny w komórkach JAR poprzez produkcję dużej ilości RFT i nasilony proces peroksydacji lipidów. *T*BuOOH dzięki właściwościom utleniającym hamował aktywność zbadanych enzymów (oprócz katalazy) i wpływał na spadek stężenia GSH i ATP przyczyniając się do śmierci komórek na drodze nekrozy. N-acetylocysteina nie chroniła skutecznie komórek kosmówczaka przed stresem generowanym przez *t*BuOOH, mimo regeneracji glutationu i enzymów tiolowych komórki traciły integralność błony komórkowej i zmniejszała się ich przeżywalność. Nadtlenek wodoru nie wpłynął cytotoksycznie na komórki *choriocarcinoma*. W komórkach pod wpływem H₂O₂ spadło nieznacznie stężenie ATP i GSH oraz odnotowano tylko nieznaczne obniżenie aktywności badanych enzymów (GAPDH i G-6-PDH), ale nie miało to wpływu na zmniejszenie przeżywalności komórek JAR. Komórki *choriocarcinoma* inkubowane w obecności nadtlenku wodoru pozostawały żywe w 90% przez 24 godziny inkubacji z tym prooksydantem.

8. PIŚMIENICTWO

1. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; **219**:1-14.
2. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med* 2004; **37**:755-67.
3. 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.
4. Wojczuk B, Gniot-Szulzycka J. [Nongenomic action of aldosterone on cellular metabolism]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2004; **58**:252-8.
5. Schrader M, Fahimi HD. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* 2004; **122**:383-93.
6. Bokoch GM, Knaus UG. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci* 2003; **28**:502-8.
7. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002; **397**:342-4.
8. Sumimoto H, Miyano K, Takeya R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **338**:677-86.
9. Decoursey TE, Ligeti E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci* 2005; **62**:2173-93.
10. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 1990; **15**:129-35.
11. Yamamoto S. "Enzymatic" lipid peroxidation: reactions of mammalian lipoxygenases. *Free Radic Biol Med* 1991; **10**:149-59.
12. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2004; **43**:200-27.
13. Dwivedi S, Sharma A, Patrick B, Sharma R, Awasthi YC. Role of 4-hydroxynonenal and its metabolites in signaling. *Redox Rep* 2007; **12**:4-10.
14. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006; **10**:389-406.
15. Frenkel K. Oxidation of DNA bases by tumor promoter-activated processes. *Environ Health Perspect* 1989; **81**:45-54.
16. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 2004; **567**:1-61.

17. Okado A, Kawasaki Y, Hasuike Y, Takahashi M, Teshima T, Fujii J, Taniguchi N. Induction of apoptotic cell death by methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in macrophage-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **225**:219-24.
18. Miyamoto Y, Koh YH, Park YS, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Ookawara T, Suzuki K, Honke K, Taniguchi N. Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biol Chem* 2003; **384**:567-74.
19. Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985; **311**:617-31.
20. Grover AK, Samson SE. Effect of superoxide radical on Ca²⁺ pumps of coronary artery. *Am J Physiol* 1988; **255**:C297-C303.
21. Nakaya H, Takeda Y, Tohse N, Kanno M. Mechanism of the membrane depolarization induced by oxidative stress in guinea-pig ventricular cells. *J Mol Cell Cardiol* 1992; **24**:523-34.
22. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 1987; **1**:358-64.
23. Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1763**:747-58.
24. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 2007; **74**:324-9.
25. Visner GA, Dougall WC, Wilson JM, Burr IA, Nick HS. Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J Biol Chem* 1990; **265**:2856-64.
26. Wong GH, Goeddel DV. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* 1988; **242**:941-4.
27. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Jr., Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**:9782-7.
28. Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med* 2003; **35**:236-56.
29. Tibell L, Aasa R, Marklund SL. Spectral and physical properties of human extracellular superoxide dismutase: a comparison with CuZn superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1993; **304**:429-33.
30. Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci* 2007; **32**:44-50.
31. Terlecky SR, Koepke JI, Walton PA. Peroxisomes and aging. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1763**:1749-54.
32. Hashimoto F, Hayashi H. Significance of catalase in peroxisomal fatty acyl-CoA beta-oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1987; **921**:142-50.

33. Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 2005; **308**:1909-11.
34. Kuhn H, Borchert A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic Biol Med* 2002; **33**:154-72.
35. Chu FF, Esworthy RS, Doroshow JH. Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med* 2004; **36**:1481-95.
36. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 2005; **70**:200-14.
37. Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 2005; **38**:1543-52.
38. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; **280**:1-8.
39. Meister A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1271**:35-42.
40. Rubinstein B. The action of ascorbate in vesicular systems. *J Bioenerg Biomembr* 1994; **26**:385-92.
41. Chuang DM, Hough C, Senatorov VV. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; **45**:269-90.
42. Chuang YY, Chen Y, Gadiseti, Chandramouli VR, Cook JA, Coffin D, Tsai MH, DeGraff W, Yan H, Zhao S, Russo A, Liu ET, Mitchell JB. Gene expression after treatment with hydrogen peroxide, menadione, or t-butyl hydroperoxide in breast cancer cells. *Cancer Res* 2002; **62**:6246-54.
43. Nutter LM, Cheng AL, Hung HL, Hsieh RK, Ngo EO, Liu TW. Menadione: spectrum of anticancer activity and effects on nucleotide metabolism in human neoplastic cell lines. *Biochem Pharmacol* 1991; **41**:1283-92.
44. Powis G, Svingen BA, Appel P. Quinone-stimulated superoxide formation by subcellular fractions, isolated hepatocytes, and other cells. *Mol Pharmacol* 1981; **20**:387-94.
45. Chiou TJ, Chu ST, Tzeng WF. Protection of cells from menadione-induced apoptosis by inhibition of lipid peroxidation. *Toxicology* 2003; **191**:77-88.
46. Lusini L, Rossi R, Giustarini D, Simplicio PD. The pro-oxidant role of protein SH groups of hemoglobin in rat erythrocytes exposed to menadione. *Chem Biol Interact* 2002; **139**:97-114.
47. Chung JH, Seo DC, Chung SH, Lee JY, Seung SA. Metabolism and cytotoxicity of menadione and its metabolite in rat platelets. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; **142**:378-85.

48. Kim SR, Lee JY, Lee MY, Chung SM, Bae ON, Chung JH. Association of quinone-induced platelet anti-aggregation with cytotoxicity. *Toxicol Sci* 2001; **62**:176-82.
49. Toxopeus C, van H, I, Thuring JW, Blaauboer BJ, Noordhoek J. Cytotoxicity of menadione and related quinones in freshly isolated rat hepatocytes: effects on thiol homeostasis and energy charge. *Arch Toxicol* 1993; **67**:674-9.
50. Lamson DW, Plaza SM. The anticancer effects of vitamin K. *Altern Med Rev* 2003; **8**:303-18.
51. Barros LF, Stutzin A, Calixto A, Catalan M, Castro J, Hetz C, Hermosilla T. Nonselective cation channels as effectors of free radical-induced rat liver cell necrosis. *Hepatology* 2001; **33**:114-22.
52. Caricchio R, Kovalenko D, Kaufmann WK, Cohen PL. Apoptosis provoked by the oxidative stress inducer menadione (Vitamin K(3)) is mediated by the Fas/Fas ligand system. *Clin Immunol* 1999; **93**:65-74.
53. Laux I, Nel A. Evidence that oxidative stress-induced apoptosis by menadione involves Fas-dependent and Fas-independent pathways. *Clin Immunol* 2001; **101**:335-44.
54. Baker MA, He SQ. Elaboration of cellular DNA breaks by hydroperoxides. *Free Radic Biol Med* 1991; **11**:563-72.
55. Iannone A, Bini A, Jin YG, Vannini V, Tomasi A. Tert-butylhydroperoxide bioactivation to methyl radical in rat liver mitochondria and submitochondrial particles. *Free Radic Res Commun* 1993; **19 Suppl 1**:S141-S147.
56. Buc-Calderon P, Latour I, Roberfroid M. Biochemical changes in isolated hepatocytes exposed to tert-butyl hydroperoxide. Implications for its cytotoxicity. *Cell Biol Toxicol* 1991; **7**:129-43.
57. Latour I, De Ros E, Deneff JF, Buc CP. Protein S-thiolation can mediate the inhibition of protein synthesis induced by tert-butyl hydroperoxide in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; **160**:1-9.
58. Nicotera P, McConkey D, Svensson SA, Bellomo G, Orrenius S. Correlation between cytosolic Ca²⁺ concentration and cytotoxicity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicology* 1988; **52**:55-63.
59. Chakraborti S, Michael JR, Gurtner GH, Ghosh SS, Dutta G, Merker A. Role of a membrane-associated serine esterase in the oxidant activation of phospholipase A2 by t-butyl hydroperoxide. *Biochem J* 1993; **292**:585-9.
60. Bellomo G, Martino A, Richelmi P, Moore GA, Jewell SA, Orrenius S. Pyridine-nucleotide oxidation, Ca²⁺ cycling and membrane damage during tert-butyl hydroperoxide metabolism by rat-liver mitochondria. *Eur J Biochem* 1984; **140**:1-6.
61. Palomba L, Guidarelli A, Scovassi AI, Cantoni O. Different effects of tert-butylhydroperoxide-induced peroxynitrite-dependent and -independent DNA single-strand breakage on PC12 cell poly(ADP-ribose) polymerase activity. *Eur J Biochem* 2001; **268**:5223-8.

62. Piret JP, Arnould T, Fuks B, Chatelain P, Remacle J, Michiels C. Mitochondria permeability transition-dependent tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis in hepatoma HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 2004; **67**:611-20.
63. Palomba L, Sestili P, Cantoni O. tert-Butylhydroperoxide induces peroxynitrite-dependent mitochondrial permeability transition leading PC12 cells to necrosis. *J Neurosci Res* 2001; **65**:387-95.
64. Goralska M, Holley B, McGahan MC. The effects of Tempol on ferritin synthesis and Fe metabolism in lens epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1497**:51-60.
65. 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.
66. DeYulia GJ, Jr., Carcamo JM, Borquez-Ojeda O, Shelton CC, Golde DW. Hydrogen peroxide generated extracellularly by receptor-ligand interaction facilitates cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**:5044-9.
67. Wang D, Youngson C, Wong V, Yeger H, Dinauer MC, Vega-Saenz ME, Rudy B, Cutz E. NADPH-oxidase and a hydrogen peroxide-sensitive K⁺ channel may function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**:13182-7.
68. Konat GW. H₂O₂-induced higher order chromatin degradation: a novel mechanism of oxidative genotoxicity. *J Biosci* 2003; **28**:57-60.
69. Teramoto S, Tomita T, Matsui H, Ohga E, Matsuse T, Ouchi Y. Hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis in human lung fibroblasts: protective roles of glutathione. *Jpn J Pharmacol* 1999; **79**:33-40.
70. Xu Y, Bradham C, Brenner DA, Czaja MJ. Hydrogen peroxide-induced liver cell necrosis is dependent on AP-1 activation. *Am J Physiol* 1997; **273**:G795-G803.
71. Rubanyi GM. Vascular effects of oxygen-derived free radicals. *Free Radic Biol Med* 1988; **4**:107-20.
72. Forman HJ. Use and abuse of exogenous H₂O₂ in studies of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2007; **42**:926-32.
73. Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1997; **272**:217-21.
74. Desagher S, Glowinski J, Premont J. Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J Neurosci* 1997; **17**:9060-7.
75. Potgens AJ, Schmitz U, Bose P, Versmold A, Kaufmann P, Frank HG. Mechanisms of syncytial fusion: a review. *Placenta* 2002; **23 Suppl A**:S107-S113.
76. Tanaka C, Kuwabara Y, Sakai T. Structural identification and characterization of arteries and veins in the placental stem villi. *Anat Embryol (Berl)* 1999; **199**:407-18.
77. Kneussl ES, Ances IG, Albrecht ED. A specific cytosolic estrogen receptor in human term placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1982; **144**:803-9.

78. Einarson A, Shuhaiber S, Koren G. Effects of antibacterials on the unborn child: what is known and how should this influence prescribing. *Paediatr Drugs* 2001; **3**:803-16.
79. Wickens D, Wilkins MH, Lunec J, Ball G, Dormandy TL. Free radical oxidation (peroxidation) products in plasma in normal and abnormal pregnancy. *Ann Clin Biochem* 1981; **18**:158-62.
80. Wang YP, Walsh SW, Guo JD, Zhang JY. Maternal levels of prostacyclin, thromboxane, vitamin E, and lipid peroxides throughout normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1991; **165**:1690-4.
81. Uotila J, Tuimala R, Aarnio T, Pyykko K, Ahotupa M. Lipid peroxidation products, selenium-dependent glutathione peroxidase and vitamin E in normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991; **42**:95-100.
82. Wisdom SJ, Wilson R, McKillop JH, Walker JJ. Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 1991; **165**:1701-4.
83. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; **3**:28-35.
84. Wender-Ozegowska E, Kozlik J, Biczysko R, Ozegowski S. Changes of oxidative stress parameters in diabetic pregnancy. *Free Radic Res* 2004; **38**:795-803.
85. Noris M, Perico N, Remuzzi G. Mechanisms of disease: Pre-eclampsia. *Nat Clin Pract Nephrol* 2005; **1**:98-114.
86. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005; **308**:1592-4.
87. Davidge ST, Hubel CA, Brayden RD, Capeless EC, McLaughlin MK. Sera antioxidant activity in uncomplicated and preeclamptic pregnancies. *Obstet Gynecol* 1992; **79**:897-901.
88. Walsh SW. The role of fatty acid peroxidation and antioxidant status in normal pregnancy and in pregnancy complicated by preeclampsia. *World Rev Nutr Diet* 1994; **76**:114-8.
89. Poranen AK, Ekblad U, Uotila P, Ahotupa M. Lipid peroxidation and antioxidants in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Placenta* 1996; **17**:401-5.
90. Mikhail MS, Anyaegbunam A, Garfinkel D, Palan PR, Basu J, Romney SL. Preeclampsia and antioxidant nutrients: decreased plasma levels of reduced ascorbic acid, alpha-tocopherol, and beta-carotene in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1994; **171**:150-7.
91. Wang Y, Walsh SW, Kay HH. Placental lipid peroxides and thromboxane are increased and prostacyclin is decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1992; **167**:946-9.
92. Vaughan JE, Walsh SW. Oxidative stress reproduces placental abnormalities of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2002; **21**:205-23.

93. Poston L, Raijmakers MT. Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome--a review. *Placenta* 2004; **25 Suppl A**:S72-S78.
94. Myatt L. Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine* 2002; **19**:103-11.
95. Mutlu-Turkoglu U, Ademoglu E, Ibrahimoglu L, Aykac-Toker G, Uysal M. Imbalance between lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 1998; **46**:37-40.
96. 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.
97. Klimek J. The involvement of superoxide and iron ions in the NADPH-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1988; **958**:31-9.
98. 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.
99. Cook JA, Mitchell JB. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem* 1989; **179**:1-7.
100. 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.
101. Smolenski RT, Lachno DR, Ledingham SJ, Yacoub MH. Determination of sixteen nucleotides, nucleosides and bases using high-performance liquid chromatography and its application to the study of purine metabolism in hearts for transplantation. *J Chromatogr* 1990; **527**:414-20.
102. Boersma AW, Nooter K, Oostrum RG, Stoter G. Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled annexin V in chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. *Cytometry* 1996; **24**:123-30.
103. Homburg CH, de Haas M, dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 1995; **85**:532-40.
104. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995; **182**:1545-56.
105. Karbowski M, Spodnik JH, Teranishi M, Wozniak M, Nishizawa Y, Usukura J, Wakabayashi T. Opposite effects of microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs on biogenesis of mitochondria in mammalian cells. *J Cell Sci* 2001; **114**:281-91.
106. Karbowski M, Kurono C, Nishizawa Y, Horie Y, Soji T, Wakabayashi T. Induction of megamitochondria by some chemicals inducing oxidative stress in primary cultured rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1349**:242-50.

107. Arnold RE, Weigent DA. The inhibition of superoxide production in EL4 lymphoma cells overexpressing growth hormone. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2003; **25**:159-77.
108. Sharikabad MN, Ostbye KM, Lyberg T, Brors O. Effect of extracellular Mg(2+) on ROS and Ca(2+) accumulation during reoxygenation of rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; **280**:H344-H353.
109. Afri M, Frimer AA, Cohen Y. Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer. Part IV: Locating 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) in the lipid bilayer. *Chem Phys Lipids* 2004; **131**:123-33.
110. Swift LM, Sarvazyan N. Localization of dichlorofluorescein in cardiac myocytes: implications for assessment of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; **278**:H982-H990.
111. Cathcart R, Schwiers E, Ames BN. Detection of picomole levels of lipid hydroperoxides using a dichlorofluorescein fluorescent assay. *Methods Enzymol* 1984; **105**:352-8.
112. Keston AS, Brandt R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal Biochem* 1965; **11**:1-5.
113. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; **11**:81-128.
114. Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem* 1978; **90**:81-9.
115. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; **105**:121-6.
116. Fossati P, Prencipe L, Berti G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clin Chem* 1980; **26**:227-31.
117. Beltran B, Orsi A, Clementi E, Moncada S. Oxidative stress and S-nitrosylation of proteins in cells. *Br J Pharmacol* 2000; **129**:953-60.
118. Tsang WM, Howell MJ, Miller AL. A simple enzymic method for the measurement of magnesium in serum and urine on a centrifugal analyser. *Ann Clin Biochem* 1988; **25**:162-8.
119. Loughlin AF, Skiles GL, Alberts DW, Schaefer WH. An ion exchange liquid chromatography/mass spectrometry method for the determination of reduced and oxidized glutathione and glutathione conjugates in hepatocytes. *J Pharm Biomed Anal* 2001; **26**:131-42.
120. Wang Y, Walsh SW. Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. *Placenta* 2001; **22**:206-12.
121. Bilaska A, Kryczyk A, Wlodek L. [The different aspects of the biological role of glutathione]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007; **61**:438-53.

122. Boon PJ, Marinho HS, Oosting R, Mulder GJ. Glutathione conjugation of 4-hydroxy-trans-2,3-nonenal in the rat in vivo, the isolated perfused liver and erythrocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; **159**:214-23.
123. McAmis WC, Schaeffer RC, Jr., Baynes JW, Wolf MB. Menadione causes endothelial barrier failure by a direct effect on intracellular thiols, independent of reactive oxidant production. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1641**:43-53.
124. Klimek J. Cytochrome P-450 involvement in the NADPH-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1044**:158-64.
125. Volkovitskaia OE, Bochev PG, Ribarev SR, Gorkin VZ, Kagan VE. [Formation of the superoxide anion radical during the oxidation of biogenic amines catalyzed by mitochondrial monoamine oxidase]. *Biull Eksp Biol Med* 1986; **102**:687-9.
126. Raijmakers MT, Peters WH, Steegers EA, Poston L. NAD(P)H oxidase associated superoxide production in human placenta from normotensive and pre-eclamptic women. *Placenta* 2004; **25 Suppl A**:S85-S89.
127. Many A, Westerhausen-Larson A, Kanbour-Shakir A, Roberts JM. Xanthine oxidase/dehydrogenase is present in human placenta. *Placenta* 1996; **17**:361-5.
128. Byczkowski JZ, Kulkarni AP. NADPH-dependent drug redox cycling and lipid peroxidation in microsomes from human term placenta. *Int J Biochem* 1989; **21**:183-90.
129. Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1985; **240**:500-8.
130. Mauzeroll J, Bard AJ. Scanning electrochemical microscopy of menadione-glutathione conjugate export from yeast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**:7862-7.
131. Bartosz G. [Glutathione metabolism]. *Postepy Biochem* 1993; **39**:32-8.
132. Verrax J, Vanbever S, Stockis J, Taper H, Calderon PB. Role of glycolysis inhibition and poly(ADP-ribose) polymerase activation in necrotic-like cell death caused by ascorbate/menadione-induced oxidative stress in K562 human chronic myelogenous leukemic cells. *Int J Cancer* 2007; **120**:1192-7.
133. Spitz DR, Sullivan SJ, Malcolm RR, Roberts RJ. Glutathione dependent metabolism and detoxification of 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radic Biol Med* 1991; **11**:415-23.
134. Hallmann A, Milczarek R, Lipinski M, Kossowska E, Spodnik JH, Wozniak M, Wakabayashi T, Klimek J. Fast perinuclear clustering of mitochondria in oxidatively stressed human choriocarcinoma cells. *Folia Morphol (Warsz)* 2004; **63**:407-12.
135. Mallik R, Gross SP. Molecular motors: strategies to get along. *Curr Biol* 2004; **14**:R971-R982.
136. De Vos K, Goossens V, Boone E, Vercammen D, Vancompernelle K, Vandenaabeele P, Haegeman G, Fiers W, Grooten J. The 55-kDa tumor necrosis factor receptor induces clustering of mitochondria through its membrane-proximal region. *J Biol Chem* 1998; **273**:9673-80.

137. Kaminski M, Karbowski M, Miyazaki Y, Kedzior J, Spodnik JH, Gil A, Wozniak M, Wakabayashi T. Co-existence of apoptotic and necrotic features within one single cell as a result of menadione treatment. *Folia Morphol (Warsz)* 2002; **61**:217-20.
138. De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis* 2001; **22**:999-1013.
139. Lee JY, Bae ON, Chung SM, Lee MY, Chung JH. Menadione induces endothelial dysfunction mediated by oxidative stress and arylation. *Chem Biol Interact* 2001; **137**:169-83.
140. Garner AP, Paine MJ, Rodriguez-Crespo I, Chinje EC, Ortiz DM, Stratford IJ, Tew DG, Wolf CR. Nitric oxide synthases catalyze the activation of redox cycling and bioreductive anticancer agents. *Cancer Res* 1999; **59**:1929-34.
141. Nakanishi T, Kohroki J, Suzuki S, Ishizaki J, Hiromori Y, Takasuga S, Itoh N, Watanabe Y, Utoguchi N, Tanaka K. Trialkyltin compounds enhance human CG secretion and aromatase activity in human placental choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**:2830-7.
142. Davies MJ. Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions. *Biochem J* 1989; **257**:603-6.
143. Kaminski M, Masaoka M, Karbowski M, Kedzior J, Nishizawa Y, Usukura J, Wakabayashi T. Ultrastructural basis for the transition of cell death mode from apoptosis to necrosis in menadione-treated osteosarcoma 143B cells. *J Electron Microscop* (Tokyo) 2003; **52**:313-25.
144. Niemczyk E, Majczak A, Hallmann A, Kedzior J, Wozniak M, Wakabayashi T. A possible involvement of plasma membrane NAD(P)H oxidase in the switch mechanism of the cell death mode from apoptosis to necrosis in menadione-induced cell injury. *Acta Biochim Pol* 2004; **51**:1015-22.
145. Jamison JM, Gilloteaux J, Taper HS, Calderon PB, Summers JL. Autoschizis: a novel cell death. *Biochem Pharmacol* 2002; **63**:1773-83.
146. Jamison JM, Gilloteaux J, Nassiri MR, Venugopal M, Neal DR, Summers JL. Cell cycle arrest and autoschizis in a human bladder carcinoma cell line following Vitamin C and Vitamin K3 treatment. *Biochem Pharmacol* 2004; **67**:337-51.
147. Coleman JD, Prabhu KS, Thompson JT, Reddy PS, Peters JM, Peterson BR, Reddy CC, Vanden Heuvel JP. The oxidative stress mediator 4-hydroxynonenal is an intracellular agonist of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta). *Free Radic Biol Med* 2007; **42**:1155-64.
148. Girmun GD, Domann FE, Moore SA, Robbins ME. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter. *Mol Endocrinol* 2002; **16**:2793-801.
149. Latour I, Leunda-Casi A, Deneff JF, Buc CP. Activation of Poly(ADP-Ribose)Polymerase in rat hepatocytes does not contribute to their cell death by oxidative stress. *Exp Cell Res* 2000; **254**:173-9.

150. Saito Y, Nishio K, Ogawa Y, Kimata J, Kinumi T, Yoshida Y, Noguchi N, Niki E. Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free Radic Res* 2006; **40**:619-30.
151. Mueller S, Riedel HD, Stremmel W. Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂ -removing enzyme in human erythrocytes. *Blood* 1997; **90**:4973-8.
152. Hallmann A, Klimek J, Masaoka M, Kaminski M, Kedzior J, Majczak A, Niemczyk E, Wozniak M, Trzonkowski P, Wakabayashi T. Partial characterization of human choriocarcinoma cell line JAR cells in regard to oxidative stress. *Acta Biochim Pol* 2004; **51**:1023-38.
153. Tian WN, Braunstein LD, Apse K, Pang J, Rose M, Tian X, Stanton RC. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am J Physiol* 1999; **276**:C1121-C1131.
154. Baty JW, Hampton MB, Winterbourn CC. Proteomic detection of hydrogen peroxide-sensitive thiol proteins in Jurkat cells. *Biochem J* 2005; **389**:785-95.
155. Kharfi AA, Leblanc S, Ouellet A, Moutquin JM. Dual action of H₂O₂ on placental hCG secretion: implications for oxidative stress in preeclampsia. *Clin Biochem* 2007; **40**:94-7.
156. Alexandrova AY, Kopnin PB, Vasiliev JM, Kopnin BP. ROS up-regulation mediates Ras-induced changes of cell morphology and motility. *Exp Cell Res* 2006; **312**:2066-73.
157. Knofler M, Sooranna SR, Daoud G, Whitley GS, Markert UR, Xia Y, Cantiello H, Hauguel-de Mouzon S. Trophoblast signalling: knowns and unknowns--a workshop report. *Placenta* 2005; **26 Suppl A**:S49-S51.
158. Qiu Q, Yang M, Tsang BK, Gruslin A. Both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling are required in epidermal growth factor-induced human trophoblast migration. *Mol Hum Reprod* 2004; **10**:677-84.
159. Liu H, Zhang H, Iles KE, Rinna A, Merrill G, Yodoi J, Torres M, Forman HJ. The ADP-stimulated NADPH oxidase activates the ASK-1/MKK4/JNK pathway in alveolar macrophages. *Free Radic Res* 2006; **40**:865-74.
160. Gamou S, Shimizu N. Hydrogen peroxide preferentially enhances the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett* 1995; **357**:161-4.
161. Moll SJ, Jones CJ, Crocker IP, Baker PN, Heazell AE. Epidermal growth factor rescues trophoblast apoptosis induced by reactive oxygen species. *Apoptosis* 2007; **12**:1611-22.
162. Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 2004; **122**:369-82.