

RYSZARD MILCZAREK<sup>1</sup>, JOANNA RUDA<sup>1</sup>, KRYSZTIAN KALETHA<sup>2</sup>, JERZY KLIMEK<sup>1</sup>

**UDZIAŁ REAKTYWNYCH FORM TLENU W UTLENIANIU I REDUKCJI  
ŻELAZA W MIKROSOMACH ŁOŻYSKA LUDZKIEGO  
I NOWY POTENCJALNY MECHANIZM DZIAŁANIA DYSMUTAZY  
PONADTLENKOWEJ I PEROKSYDAZY GLUTATIONOWEJ**

THE PARTICIPATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN OXIDATION  
AND REDUCTION OF IRON IN HUMAN PLACENTAL MICROSOMES  
AND NEW POTENTIAL MECHANISM OF SUPEROXIDE DISMUTASE  
AND GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTION

<sup>1</sup> Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
kierownik: prof. dr Jerzy Klimek

<sup>2</sup> Zakład Biochemii i Fizjologii Klinicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
kierownik: prof. dr Krystian Kaletha

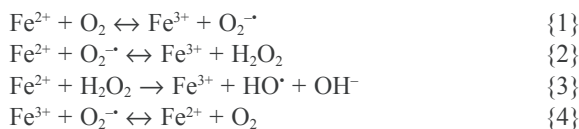
Żelazo jest niezbędnym elementem NADPH–zależnej peroksydacji lipidów, zachodzącej w mikrosomach łożyska ludzkiego. Wzajemna interkonwersja Fe(II) i Fe(III) i stosunek obu form w środowisku odgrywają ważną rolę w mechanizmie tego procesu. Celem pracy było zbadanie, czy i w jaki sposób reaktywne formy tlenu lub enzymy je metabolizujące mogą wpływać na przemiany oksydoredukcyjne żelaza oraz czy wpływ enzymów antyoksydacyjnych na przemiany oksydoredukcyjne może być jednym z istotnych mechanizmów ich antyoksydacyjnego działania.

Przedstawione w pracy fakty pozwalają na stwierdzenie, że dla inicjacji NADPH–zależnej peroksydacji lipidów w mikrosomach łożyska ludzkiego kluczowe znaczenie ma stosunek jonów Fe(III)/Fe(II). W kształtowaniu tego stosunku uczestniczą: anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenuk wodoru i nadtlenuki lipidowe powstające podczas NADPH–zależnej peroksydacji lipidów. Enzymy antyoksydacyjne: dysmutaza ponadtlenkowa oraz peroksydaza glutationowa usuwające anionorodnik ponadtlenkowy i wodoronadtlenki lipidowe mogą hamować NADPH–zależną peroksydację lipidów, zapobiegając zbyt szybkemu utlenianiu jonów żelaza w środowisku komórkowym.

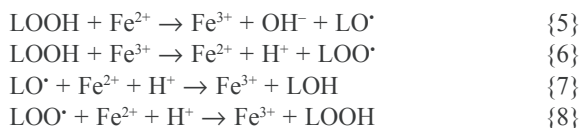
Metabolizm reaktywnych form tlenu (RFT) odgrywa ważną rolę w przebiegu ciąży człowieka. W okresie tym, we krwi matki, obserwuje się podwyższony poziom RFT [19]. Poziom anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ) i wodoronadtlenków lipidowych (LOOH),

wzrasta jeszcze silniej w stanie przedrzucawkowym i gestozach [13,19]. Ustalono, że istotnym źródłem LOOH w czasie ciąży jest łożysko [17,18]. Nasze badania pokazały, że  $O_2^-$  oraz LOOH powstają podczas NADPH-zależnej peroksydacji lipidów w mitochondriach i mikrosomach łożyska ludzkiego [4, 8]. Bezpośrednim skutkiem tego procesu jest zahamowanie aktywności enzymów steroidogenicznych prowadzące do spadku syntezy progesteronu i estrogenów [5,7]. NADPH-zależna peroksydacja lipidów w mitochondriach i w mikrosomach łożyska ludzkiego jest silnie hamowana przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD) [4,8], a spadek aktywności tego enzymu w łożysku jest jedną z przyczyn nadmiernej produkcji RFT w łożysku [16].

Wiadomo, że kluczową rolę w NADPH-zależnej peroksydacji lipidów w mitochondriach i mikrosomach łożyska ludzkiego odgrywiają przemiany oksydoredukcyjne jonów żelaza [4,6,8]. Uważa się, że jony żelaza mogą uczestniczyć w inicjacji jako składniki wolnorodnikowych kompleksów żelazo-tlen lub jako substraty reakcji, w których produktami są RFT [3]. Z udziałem jonów żelaza może powstawać  $O_2^-$  i nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), przy czym w pierwszym wypadku utleniaczem Fe(II) jest tlen cząsteczkowy, a w drugim  $O_2^-$  (reakcje {1} i {2}). Przemiana  $H_2O_2$  w bardzo reaktywny rodnik hydroksylowy ( $HO^{\cdot}$ ) również wymaga obecności żelaza {3}. Reakcja ta nosząca nazwę reakcji Fentona {3} może być stymulowana poprzez redukcję Fe(III) przez  $O_2^-$  (reakcja {4})



Wiadomo również, że w obecności jonów żelaza oraz LOOH może dochodzić do reinicjacji peroksydacji lipidów, w wyniku której powstają produkty wolnorodnikowe oraz zmienia się stopień utlenienia jonów żelaza (reakcje {5} i {6}). Jony żelaza (II) mogą również reagować z wolnorodnikowymi produktami peroksydacji lipidów (reakcje {7} i {8}), prowadząc do utworzenia pochodnych hydroksylowych (LOH) lub LOOH.



W świetle powyższych informacji należy postawić pytanie, czy wpływ na kształtowanie się optymalnego stosunku Fe(III) do Fe(II) nie jest jednym z istotnych mechanizmów działania enzymów antyoksydacyjnych. Trzy zasadnicze enzymy obrony antyoksydacyjnej, czyli dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza i peroksydaza glutationowa ze względu na ich udział w usuwaniu RFT mogą wywierać wpływ na stężenia substratów i produktów w reakcjach przedstawionych powyżej. I tak: SOD poprzez usuwanie  $O_2^-$  i produkcję  $H_2O_2$  może wpływać na kierunek reakcji nr {1} do {4}, katalaza na reakcje {2} i {3} a GPx na {5} do {8}. To w konsekwencji może prowadzić do zmiany długości odcinka czasu potrzebnego do osiągnięcia optymalnego stosunku Fe(III)/Fe(II). Przedstawione w pracy doświadczenia po raz pierwszy dostarczają informacji na temat wpływu RFT na kierunki przemian oksydoredukcyjnych jonów żelaza w mikrosomach łożyska ludzkiego i pozwalają na rozszerzenie wiedzy na temat mechanizmu działania enzymów antyoksydacyjnych w warunkach NADPH-zależnej peroksydacji lipidów.

## CEL PRACY

Żelazo jest istotnym elementem NADPH–zależnej peroksydacji lipidów, zachodzącej w mikrosomach łożyska ludzkiego. Wzajemna interkonwersja Fe(II) i Fe(III) i stosunek obu form w środowisku odgrywają kluczową rolę w mechanizmie tego procesu. Celem pracy było zbadanie, czy i w jaki sposób reaktywne formy tlenu lub enzymy je usuwające mogą wpływać na przemiany oksydoredukcyjne żelaza oraz czy wpływ enzymów antyoksydacyjnych na przemiany oksydoredukcyjne może być jednym z istotnych mechanizmów ich antyoksydacyjnego działania.

## MATERIAŁY I METODY

### Odczynniki

NADP<sup>+</sup>, glukozy-6-fosforan, dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa,  $\alpha$ -tokoferol, butylowany hydroksytoluen (BHT), batofenantrolina, alkohol izoamylový, katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), FeCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, wodoronadtlenek kumenu, EDTA i kwas tiobarbiturowy pochodziły z firmy Sigma. Mannitol otrzymano z firmy Fluka. Pozostałe odczynniki o wysokim stopniu czystości pochodziły z firmy Polskie Odczynniki Chemiczne.

### Izolacja mikrosomów z łożyska ludzkiego

Łożyska pochodzące z prawidłowo przebiegających ciąż otrzymano ze Szpitala Wojewódzkiego w Gdańsku. Mikrosomy z łożyska izolowano, tak jak opisano wcześniej [8].

### Oznaczenie produktów peroksydacji lipidów.

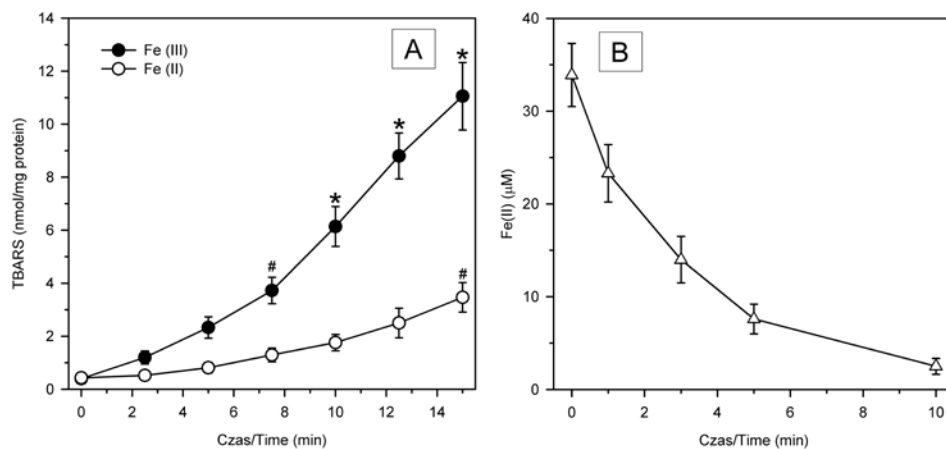
Miarą peroksydacji lipidów była ilość powstałych substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TRABS). Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C, przy stałym wytrząsaniu i dostępie powietrza. Końcowa objętość mieszaniny inkubacyjnej wynosiła 1 ml i zawierała: 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mg białka mikrosomalnego, układ regenerujący NADPH składający się z 3 mM glukozy-6-fosforanu (G-6-P), 1 jednostki dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (dehydrogenazy G-6-P) i 0,5 mM NADP<sup>+</sup> oraz 50  $\mu$ M FeCl<sub>2</sub> lub 50  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>. Inkubację przerywano dodaniem 1,75 ml mieszaniny składającej się z 0,25 ml 5N HCl, 0,5 ml 40% kwasu trójchlorooctowego (TCA) i 1 ml H<sub>2</sub>O. Zawartość próbówki intensywnie mieszano, a następnie dodawano 0,5 ml 2% kwasu tiobarbiturowego oraz etanolowy roztwór butylowanego hydroksytolenu (BHT) tak, aby jego końcowe stężenie w próbówce wynosiło 0,01%, i ponownie mieszano. Próby umieszczano we wrzącej łaźni wodnej na 10 minut, następnie szybko schładzano oraz wirowano przy 600 g przez 10 min. W supernatancie mierzono wartość absorbancji przy  $\lambda=535$  nm i obliczono ilość TBARS ze współczynnika absorbancji molowej  $1,56 \times 10^5$  M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> [2].

## Pomiar Fe(II)

Jony Fe(II) oznaczano jako kompleks barwny z batofenantroliną (współczynnik absorbancji molowej wynosi  $22,14 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  przy  $\lambda=535 \text{ nm}$ ). Próby inkubowano w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ , przy stałym dostępie powietrza i wytrząsaniu. Środowisko inkubacyjne zawierało 20 mM Tris-HCl pH 7,4 i 1 mg białka mikrosomalnego, 3 mM glukozy-6-fosforan (G-6-P), 0,5 mM NADP<sup>+</sup>, 1 j. dehydrogenazy G-6-P. Końcowa objętość mieszaniny inkubacyjnej wynosiła 1 ml. Inkubację rozpoczynano dodaniem 50  $\mu\text{l}$  1 mM roztworu FeCl<sub>2</sub>. Reakcję przerywano dodaniem 2 ml 2 mM roztworu batofenantroliny w alkoholu izoamylowym. Po dodaniu batofenantroliny próbkę intensywnie mieszano przez 1 minutę w celu wyekstrahowania kompleksów Fe(II)-batofenantrolina z mieszaniny inkubacyjnej. Następnie próby wirowano przy 600g przez 10 minut, rozdzielając frakcję wodną i alkoholu izoamylowego. Absorbancję przy  $\lambda=535 \text{ nm}$  mierzono we frakcji alkoholu izoamylowego.

## Przedstawienie i ocena statystyczna wyników badań

Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  S.E.M. Do oceny statystycznej wyników badań stosowano jednoczynnikową analizę wariancji. W przypadku stwierdzenia, że pomiędzy badanymi grupami istnieje statystycznie znamiennej zmienność, istotność różnic pomiędzy poszczególnymi grupami szacowano, stosując a posteriori test Tukeya (metoda T).

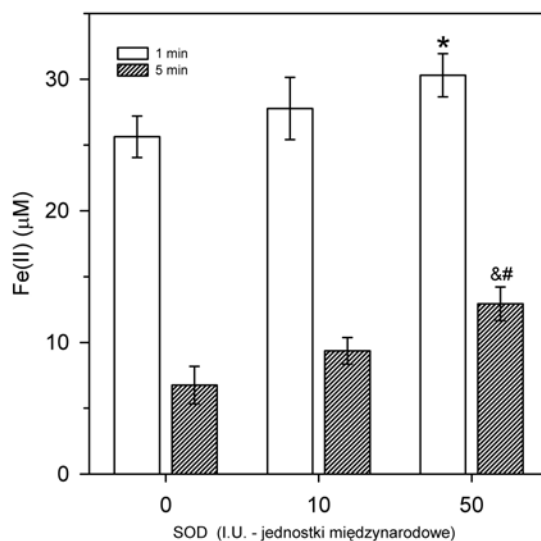


Ryc. 1. A) NADPH-zależna peroksydacja lipidów w mikrosomach łożyska ludzkiego. Warunki inkubacji i postępowanie tak jak opisano w Materiałach i Metodach. Znamienność statystyczna (ANOVA, N=3). (\*)  $p < 0,001$  i (#)  $p < 0,05$  w stosunku do odpowiedniej wartości w czasie 0. B) Utlenianie Fe<sup>2+</sup> w mikrosomach łożyska ludzkiego. Warunki inkubacji i postępowanie jak opisano w Materiałach i metodach

Fig. 1. A) Time course of NADPH-dependent lipid peroxidation in human placental microsomes. The experimental conditions as described In Materials and Methods. Statistical significance (ANOVA, N=3) vs. time 0: (\*)  $p < 0.001$  i (#)  $p < 0.05$ . B) The time dependent effect of placenta microsomes on Fe(II) oxidation. Experimental conditions as described in Materials and Methods

## WYNIKI

Pierwszy eksperyment wykonano w celu sprawdzenia, jaki wpływ na czas inicjacji NADPH-zależnej peroksydacji lipidów w mikrosomach łożyska ludzkiego ma stopień utlenienia danego żelaza. Zastosowano dwie formy żelaza: Fe(III) ( $\text{FeCl}_3$ ) oraz Fe(II) ( $\text{FeCl}_2$ ). Wyniki przedstawiono na ryc. 1 (Panel A). Po dodaniu do mieszaniny inkubacyjnej Fe(III) produkcja TBARS osiągała znaczące wartości po 7,5 minutach inkubacji. Po dodaniu Fe(II) istotny wzrost syntezy TBARS obserwowano dopiero w 15 minucie inkubacji. Ponieważ dodanie bardziej utlenionej formy żelaza (Fe(III)) sprzyjało bardzo szybkiej inicjacji peroksydacji lipidów wyrażanej syntezą TBARS, sprawdziliśmy, czy opóźnienie fazy inicjacji, obserwowane w przypadku dodania Fe(II), nie wynikało z konieczności jego utlenienia do Fe(III). W tym celu wykonaliśmy doświadczenie pozwalające na obserwację utlenienia Fe(II) w identycznych warunkach, w jakich obserwowano produkcję TBARS po dodaniu  $\text{FeCl}_2$ . Oznacza to, że próby zawierały pełny układ regenerujący NADPH. Wyniki tego doświadczenia zostały przedstawione na rycinie 1 (panel B). W zastosowanej metodzie obserwowany na wykresie spadek stężenia Fe(II) jest tożsamy z ich utlenieniem do Fe(III). Jony Fe(II) w takich warunkach ulegają szybkiej autooksydacji i po 10 minutach ilość zmierzonego Fe(II) wynosiła mniej niż 10% jego poziomu wyjściowego.

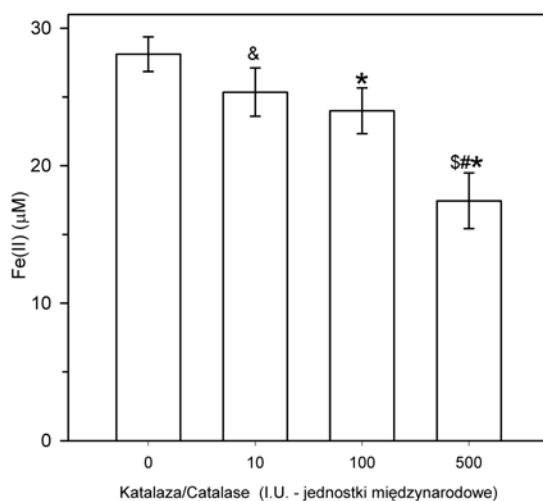


Ryc. 2. Wpływ SOD na utlenianie Fe(II) w mikrosomach łożyska ludzkiego. Warunki doświadczalne i postępowanie jak opisano w Materiałach i Metodach. Czas inkubacji 1 i 5 minut. Znamienność statystyczną (ANOVA,  $N=3$ ) zaznaczono dla prób inkubowanych w jednakowych czasach: (&)  $p < 0,001$  w stosunku do próby nie zawierającej SOD; (#)  $p < 0,005$  w stosunku do próby zawierającej 10 j SOD

Fig. 2. Effect of SOD on Fe(II) oxidation in human placental microsomes. The experimental conditions as described in Materials and Methods. Incubation time 1 or 5 minutes. Statistical significance (ANOVA  $N=3$ ): (\*)  $p < 0.001$  vs. sample without SOD in the same time point; (&)  $p < 0.001$  vs. sample with 10 I.U. of SOD

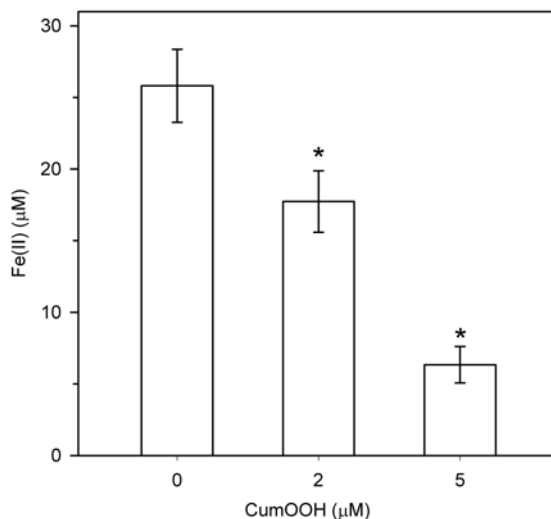
Ponieważ proces nieenzymatycznej autooksydacji Fe(II) wiąże się z produkcją anionorodnika ponadtlenkowego {1} oraz nadtlenu wodoru {2}, sprawdzono, w jaki sposób wpływają na ten proces SOD i katalaza. Wyniki przedstawiono na rycinach 2 i 3. Okazało się, że dysmutaza ponadtlenkowa SOD znacząco zmniejszała szybkość autooksydacji Fe(II). Efekt ten był wyraźny szczególnie w obecności 50 j. SOD chociaż tendencja była już widoczna w obecności 10 j. SOD. W podobnych warunkach katalaza wykazywała działanie przeciwnie, przyspieszając utlenianie Fe(II).

Powstające w procesie peroksydacji lipidów wodoronadtlenki lipidowe, wolne nadtlenkowe rodniki lipidowe oraz rodniki alkoksylowe mogą reagować z jonami żelaza w różny sposób, prowadząc do utlenienia lub redukcji tych jonów. Sprawdzono, w jaki sposób wodoronadtlenki lipidowe mogą wpływać na tempo utleniania żelaza. W tym celu do mikrosomów został dodany wodoronadtlenek kumenu (CumOOH). Jest to związek o dużej lipofilności, wykazujący wiele podobieństw do naturalnie występujących LOOH i często stosowany w układach doświadczalnych jako ich syntetyczny analog. Wyniki eksperymentu przedstawiono na rycinie 4. CumOOH dodany do zawiesiny mikrosomów silnie stymulował utlenianie jonów Fe(II) już w 2  $\mu$ M stężeniu.



Ryc. 3. Wpływ katalazy na utlenianie Fe(II) w mikrosomach łożyska ludzkiego. Warunki doświadczalne i postępowanie jak opisano w Materiałach i metodach. Czas inkubacji 1 minuta. Znamienność statystyczna (ANOVA, N=3): (\*)  $p < 0,001$  w stosunku do próby nie zawierającej katalazy; (&)  $p < 0,002$  w stosunku do próby nie zawierającej katalazy; (#)  $p < 0,001$  w stosunku do próby zawierającej 10 j. katalazy; (\$)  $p < 0,001$  w stosunku do próby zawierającej 100 j katalazy

Fig. 3. Effect of catalase on Fe(II) oxidation in human placental microsomes. The experimental conditions as described in Materials and Methods. Incubation time 1 min. Statistical significance (ANOVA N=3): (\*)  $p < 0.001$  vs. sample without catalase; (#)  $p < 0.001$  vs. sample with 10 I.U. of catalase; (\$)  $p < 0.001$  vs. sample with 100 I.U. of catalase



Ryc. 4. Wpływ wodoronadtlenku kumenu (CumOOH) na utlenianie Fe(II) w mikrosomach łożyska ludzkiego. Inkubacja i postępowanie jak opisano w Materiałach i Metodach. Wodoronadtlenek kumenu jak na osi odciętych. Czas inkubacji 1 minuta. Znamienność statystyczna (ANOVA, N=3): (\*)  $p < 0,001$  w stosunku do próby nie zawierającej CumOOH

Fig. 4. Effect of cumene hydroperoxide (CumOOH) on Fe(II) oxidation in human placental microsomes. The experimental conditions as described in Materials and Methods. Incubation time 1 min. Statistical significance (ANOVA N=3): (\*)  $p < 0,001$  vs. sample without CumOOH

## DYSKUSJA

Otrzymane przez nas wyniki po raz pierwszy uwiocznily, że kluczową rolę w NADPH-zależnej peroksydacji lipidów w mikrosomach łożyska ludzkiego odgrywa odpowiedni stosunek Fe(III)/Fe(II). Na rycinie 1 pokazano, że znacząca produkcja TBARS po dodaniu Fe(II) (ryc. 1) jest widoczna dopiero wówczas, gdy zdecydowana większość dodanego Fe(II) jest utleniona do Fe(III). Otrzymany wynik jest zgodny z obserwacjami uzyskanymi przez innych badaczy [1,9], którzy również uważali, że inicjacja NADPH-zależnej peroksydacji lipidów wymaga odpowiedniego stosunku Fe(III)/Fe(II). Minotti i Aust [9] sugerowali, że utajony okres peroksydacji lipidów jest potrzebny do akumulacji jonów Fe(III) powstających w wyniku utleniania jonów Fe(II) i wytworzenia odpowiedniego stosunku Fe(III)/Fe(II), który według tych autorów wynosił od 7:1 do 1:1. Otrzymany przez nas wynik w świetle istniejących obserwacji jednoznacznie pokazuje, że peroksydacja lipidów rozpoczyna się wtedy, gdy stężenie Fe(II) osiągnie odpowiednio niską wartość i paradoksalnie sugeruje pewne antyoksydacyjne właściwości Fe(II). Znajduje to potwierdzenie we wcześniejszych obserwacjach innych badaczy, którzy wykazali, że istnieje związek pomiędzy stężeniem Fe(II) w środowisku a szybkością inicjacji peroksydacji lipidów w liposomach [14]. Zauważyli, że dodanie mniejszej ilości Fe(II) do układu zawierającego liposomy powoduje skrócenie okresu pomiędzy startem reakcji a pojawieniem się produktów peroksydacji lipidów oraz, że stężenie Fe(II) na końcu utajonej fazy procesu peroksydacji było zawsze takie

same, niezależnie od początkowego stężenia Fe(II). Sugerowano, że odpowiedni stosunek Fe(III)/Fe(II) jest niezbędny do wytworzenia wolnorodnikowych kompleksów żelaza z tlenem, takich jak: rodnik ferrylowy, rodnik nadferrylowy lub kompleks Fe(II)-O-Fe(III) [9].

Podczas inkubacji przy stałej dostępności tlenu atmosferycznego stężenie tlenu w roztworach wodnych pozostaje w granicach od 100 do 300  $\mu\text{M}$ . Stała obecność rozpuszczonego w środowisku tlenu pozostającego w równowadze z tlenem atmosferycznym prowadzi tym samym do silnego przesunięcia równowagi reakcji {1} w prawo, sprzyjając szybkiemu utlenianiu Fe(II) do Fe(III). Uwzględniając jednak wcześniej zaobserwowany przez nas fakt, że zastosowane środowisko oraz obecne w nim składniki układu regenerującego NADPH (bez mikrosomów) tylko nieznacznie przyspieszają proces utleniania Fe(II) [6], nasuwa się jednoznaczny wniosek, że to mikrosomy są czynnikiem silnie przyspieszającym autooksydację żelaza. Wcześniej wykazaliśmy, że również mitochondria izolowane z łożyska ludzkiego silnie stymulowały utlenianie żelaza [6].

Zaobserwowany efekt SOD świadczy najwyraźniej o tym, że w zastosowanych warunkach  $\text{O}_2^-$  odgrywa znaczącą rolę w procesie utleniania Fe(II).  $\text{O}_2^-$ , uczestniczący w utlenianiu Fe(II), może pochodzić z dwóch źródeł. Jednym z nich jest autooksydacja żelaza {1}, a drugim uwalnianie  $\text{O}_2^-$  przez mikrosomalny cytochrom P450. Wiadomo, że w komórkach mogą zachodzić obydwa wymienione mechanizmy produkcji  $\text{O}_2^-$ . [3,8,11]. Można sądzić, że efekt SOD nie wynika z mechanizmu autooksydacji przedstawionego w reakcji {1}, albowiem usuwanie  $\text{O}_2^-$  raczej przesunąłoby równowagę reakcji w prawą stronę i sprzyjałoby utlenianiu Fe(II). Rozsądnym wyjaśnieniem roli  $\text{O}_2^-$  byłby mechanizm przedstawiony w reakcji {2}, w czasie której  $\text{O}_2^-$  jest utleniaczem, a nie reduktorem jonów żelaza. Za tym mechanizmem przemawia również wysoka stała szybkości reakcji {2} [12].

Również efekt działania katalazy odbiegał od powszechnie przyjętego mechanizmu zaproponowanego przez Fentona, w którym jony żelaza mogą być utleniane przez nadtlenek wodoru (reakcja {3}), gdyż w naszych warunkach doświadczalnych usuwanie  $\text{H}_2\text{O}_2$  sprzyjało utlenianiu jonów Fe(II). Obserwacja ta jest natomiast zgodna z mechanizmem przedstawionym w reakcji {2}, w wyniku której  $\text{H}_2\text{O}_2$  jest bezpośrednim produktem. Można przypuszczać, że  $\text{O}_2^-$ , i powstający z niego  $\text{H}_2\text{O}_2$  znajdują się w porównywalnych stężeniach, dlatego usuwanie nadtlenu wodoru może w naszych warunkach doświadczalnych przesunąć równowagę reakcji {2} w prawo, prowadząc do wzrostu szybkości utleniania żelaza.

Efekt obecności CumOOH na szybkość utleniania Fe(II) był nawet silniejszy niż wynikałoby to z prostej stechiometrii reakcji {5}. Wydaje się, że obserwowany w naszych eksperymentach wzrost szybkości utleniania żelaza wynika w znacznym stopniu z propagacji peroksydacji lipidów indukowanej przez CumOOH. W trakcie tego procesu dochodzi do wytworzenia nowych LOOH, które również mogą uczestniczyć w utlenianiu żelaza. Oznacza to, że LOOH mogą wzmacniać peroksydację lipidów, nie tylko poprzez dostarczanie rodników lipidowych, ale również poprzez przyspieszenie utleniania Fe(II), co ułatwia osiągnięcie optymalnego dla inicjacji stosunku Fe(III)/Fe(II). We wspomnianej reakcji produktem końcowym jest rodnik alkoksylowy. Taki rodnik może też reagować z jonami Fe(II) i reakcja ta {7} ma wysoką stałą szybkości równą  $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [14]. Reakcja ta prowadzi do terminacji peroksydacji lipidów, gdyż jej produktem jest pochodna hydroksylowa. Można więc sądzić, że wysoki poziom Fe(II) będzie raczej sprzyjał hamowaniu peroksydacji lipidów niż jej stymulacji. Jony Fe(III) mogą również reagować z nadtlenkowymi rodnikami lipidowymi, choć reakcja ta ma mniejszą stałą szybkości niż poprzednia ( $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) [14].



Enzymem odpowiedzialnym za redukcyjny metabolizm wodoronadtlenków jest peroksydaza glutationowa. Wykorzystany w doświadczeniach CumOOH jest substratem dla peroksydazy glutationowej i jest używany jako modelowy związek do badania jej właściwości kinetycznych [10]. W stanie przedzucawkowym aktywność GPx w łożysku jest niższa niż w ciąży prawidłowej [15]. Dwa z czterech izoenzymów GPx (Gpx 3 i 4) redukują LOOH do LOH. Ponieważ aktywność GPx prowadzi do spadku ilości LOOH, to w świetle przedstawionych tutaj wyników (ryc. 4) powinna ona również, poprzez usuwanie substratów w reakcji {5}, hamować utlenianie Fe(II) do Fe(III). A zatem, w obecności żelaza i struktur fosfolipidowych jak mikrosomy i mitochondria działanie prewentywne GPx może być potęgowane jej wpływem na przemiany oksydoredukcyjne jonów żelaza.

Ciekawą konsekwencją prezentowanych w pracy wyników jest stwierdzenie, że enzymy antyoksydacyjne, takie jak SOD i GPx mogą hamować peroksydację lipidów nie tylko poprzez proste usuwanie RFT inicjujących peroksydację lipidów, ale także przez korzystny wpływ na odpowiednio niski stosunek Fe(III)/Fe(II) promujący terminację peroksydacji lipidów wg mechanizmów opisanych w reakcjach {7} i {8}.

## WNIOSKI

Przedstawione w pracy fakty pozwalają na stwierdzenie, że dla inicjacji NADPH-zależnej peroksydacji lipidów w mikrosomach łożyska ludzkiego kluczowe znaczenie ma stosunek jonów Fe(III)/Fe(II). W kształtowaniu tego stosunku uczestniczą: anionorodnik nadtlenkowy, nadtlenek wodoru i nadtenki lipidowe powstające podczas NADPH-zależnej peroksydacji lipidów. Enzymy antyoksydacyjne: dysmutaza nadtlenkowa oraz peroksydaza glutationowa usuwające anionorodnik nadtlenkowy i wodoronadtlenki lipidowe mogą hamować NADPH-zależną peroksydację lipidów, zapobiegając zbyt szybkiemu utlenianiu jonów żelaza w środowisku komórkowym.

## PIŚMIENNICTWO

1. Braugher J.M., Duncan L.A., Chase R.L.: The involvement of iron in lipid peroxidation. Importance of ferric to ferrous ratios in initiation. *J. Biol. Chem.* 1986, 261, 10282-9. – 2. Buege J.A., Aust S.D.: Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978, 52, 302-10. – 3. Huang X., Dai J., Fournier J., Ali A.M., Zhang Q., Frenkel K.: Ferrous ion autoxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG2 cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2002, 32, 84-92. – 4. 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. – 5. Klimek J.: The influence of NADPH-dependent lipid peroxidation on the progesterone biosynthesis in human placental mitochondria. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1992, 42, 729-36. – 6. Milczarek R., Klimek J., Zelewski L.: The effects of ascorbate and alpha-tocopherol on the NADPH-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria. *Mol. Cell. Biochem.* 2000, 210, 65-73. – 7. Milczarek R., Sokolowska E., Hallmann A., Kaletha K., Klimek J.: NADPH- and iron-dependent lipid peroxidation inhibit aromatase activity in human placental microsomes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2008, 110, 230-5. – 8. 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. – 9. Minotti G., Aust S.D.: Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids* 1992, 27, 219-26. – 10. Pierce S., Tappel A.L.: Glutathione peroxidase activities from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1978, 523, 27-36.

11. Puntarulo S., Cederbaum A.I.: Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* 1998, 24, 1324-30. – 12. Qian S.Y., Buettner G.R.: Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 26, 1447-56. – 13. Sikkema J.M., van Rijn B.B., Franx A., Bruinse H.W., de Roos R., Stroes E.S., van Faassen E.E.: Placental superoxide is increased in pre-eclampsia. *Placenta* 2001, 22, 304-8. – 14. Tang L., Zhang Y., Qian Z., Shen X.: The mechanism of Fe(2+)-initiated lipid peroxidation in liposomes: the dual function of ferrous ions, the roles of the pre-existing lipid peroxides and the lipid peroxy radical. *Biochem. J.* 2000, 352, Pt 1, 27-36. – 15. Vanderlelie J., Venardos K., Clifton V.L., Gude N.M., Clarke F.M., Perkins A.V.: Increased biological oxidation and reduced anti-oxidant enzyme activity in pre-eclamptic placentae. *Placenta* 2005, 26, 53-8. – 16. Vaughan J.E., Walsh S.W.: Oxidative stress reproduces placental abnormalities of preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy* 2002, 21, 205-23. – 17. Walsh S.W., Wang Y.: Secretion of lipid peroxides by the human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1993, 169, 1462-6. – 18. Walsh S.W., Wang Y.: Trophoblast and placental villous core production of lipid peroxides, thromboxane, and prostacyclin in preeclampsia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995, 80, 1888-93. – 19. Walsh S.W., Wang Y., Jesse R.: Placental production of lipid peroxides, thromboxane, and prostacyclin in preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy* 1996, 15, 101-11.

R. Milczarek, J. Ruda, K. Kaletha, J. Klimek

#### THE PARTICIPATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN OXIDATION AND REDUCTION OF IRON IN HUMAN PLACENTAL MICROSOMES AND NEW POTENTIAL MECHANISM OF SOD AND GPX ACTION

##### Summary

Free radicals and reactive oxygen species (ROS) play an important role in the physiology of pregnant women but they can cause some disease states when overproduced. We revealed that endoplasmic reticulum of syncytiotrophoblast may be an important source of lipid peroxides in pregnancy. During NADPH-dependent lipid peroxidation, placental microsomes produce a significant amount of TBARS. Interconversion of Fe(II)↔Fe(III) and Fe(II)/Fe(III) ratio play the key role in the mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. Thus the goal of this study was to examine the participation of ROS in Fe(II)↔Fe(III) interconversion. Presence of NADPH-generating system (NADPH-GS) with Fe(II) or Fe(III) cause together a strong rise in TBARS synthesis in human placental microsomes. When Fe(III) was added to the incubation medium TBARS production was linear during the incubation. If Fe(II) was added to the same medium a lag phase lasting several minutes in TBARS production was observed. It can be explained by the necessity of obtaining a proper Fe(III)/Fe(II) ratio. Thus we measured iron oxidation in the presence of microsomes and NADPH-GS. Fe(II) was oxidized quickly during incubation in the applied conditions. Superoxide dismutase significantly inhibited Fe(II) oxidation. On the other hand catalase strongly accelerated Fe(II) oxidation. The effect of cumene hydroperoxide – an analog of lipid hydroperoxides (which is an excellent substrate for glutathione peroxidase) on Fe(II) oxidation was determined, as well. Cumene hydroperoxide strongly accelerates Fe(II) oxidation. The obtained results allow us to conclude that during NADPH-dependent lipid peroxidation in human placental microsomes reactive oxygen species (like superoxide radical, lipid hydroperoxide) can accelerate Fe(II) oxidation and increase Fe(III)/Fe(II) ratio. Thus, antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and glutathione peroxidase prevent Fe(II) oxidation and in this way they can inhibit lipid peroxidation.

Adres: dr Ryszard Milczarek

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej GUMed

ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

e-mail: [rysmil@gumed.edu.pl](mailto:rysmil@gumed.edu.pl)