

Isoprostaner – nye markører for oksidativt stress

Sammendrag

Bakgrunn. Isoprostaner er biologisk aktive lipider som brukes som markører for oksidativt stress. De dannes ved at frie radikaler peroksidiserer flerumettede fettsyrer.

Materiale og metode. Vi gjennomgår isoprostaneforskningen innen sykdomsområder som hjerte- og karsykdommer, diabetes mellitus og nevrodegenerative lidelser. I tillegg omtales resultater fra egne forskningsarbeider innen preeklampsi og hjerte- og karforskning.

Resultater. Ved siden av å være praktisk anvendelige markører for oksidativt stress har isoprostanene også egen biologisk aktivitet in vitro som gjør dem til interessante aktører ved flere sykdomsprosesser. Isoprostanene kan måles ved flere avanserte og til dels kostbare laboratorieteknikker. Stoffene er foreslått som viktige markører for å velge korrekt antioksidantnivå i kliniske forsøk der oksidativt stress sannsynligvis er involvert.

Fortolkning. Isoprostaner representerer et nytt og spennende forskningsfelt som sannsynligvis vil kunne ha stor klinisk interesse i fremtiden.

Engelsk sammendrag finnes i artikkelen på www.tidsskriftet.no

Anne Cathrine Staff

annetine.staff@ullevaal.no
Kvinnesenteret, Divisjon Kvinne-Barn
Ullevål universitetssykehus
0450 Oslo

Bente Halvorsen

Institutt for indremedisinsk forskning
Rikshospitalet

Oksidativt stress har vært definert som et tap av balansen mellom produksjon av frie radikaler eller reaktive oksygenforbindelser og antioksidantsystemet, med negative effekter på karbohydrater, lipider og proteiner (1). Oksidativt stress er altså en patologisk tilstand der prooksidanter dominerer over antioksidanter.

Frie radikaler dannes kontinuerlig, dels som en «uheldig bivirkning» i normal oksidativ metabolisme, men også som en del av kroppens forsvarssystem. Reaktive oksygenforbindelser (ROS) og frie radikaler er molekyler som har ett fritt, uparet elektron i ytre orbital. Disse stoffene er derfor svært reaktive, i motsetning til stoffer med parede elektroner i ytre orbital. Eksempler på frie radikaler er OH• (hydroksylradikal) og O₂•⁻ (superoksid). Disse reaktive stoffene kan sette i gang kjedereaksjoner og gjøre skade på for eksempel lipider i cellemembraner, med dannelse av lipidperoksider.

Det finnes forsvarssystemer i kroppen som fjerner oksygenradikalene eller reparerer skadene. Antioksidanter defineres som «enhver substans som, når til stede i lave konsentrasjoner sammenliknet med et oksiderbart substrat, signifikant forsinket eller inhiberer oksideringen av substratet». Antioksidanter finnes intracellulært, f.eks. i form av enzymet superoksid-dismutase (SOD) og glutation, og ekstracellulært, som vitaminene C og E (2).

Sannsynligvis spiller oksidativt stress en viktig rolle i utviklingen av mange sykdommer, for eksempel aterosklerose (3), vaskulære komplikasjoner til diabetes mellitus (4), nevrodegenerative sykdommer (5), preeklampsi (6), retinopati hos premature (7) og revmatoid artritt (8).

Markører for oksidativt stress

Peroksidering av lipider er ett av resultatene ved oksidativt stress, og ulike markører for lipidperoksidering (malondialdehyd, lipidhydroperoksider, TBARS (tiobarbitursyre-

Fakta

- Isoprostaner er biologisk aktive lipider som brukes som markører for oksidativt stress
- Isoprostanene har egen biologisk aktivitet in vitro som kanskje kan ha betydning ved flere sykdomsprosesser
- Isoprostaner brukes som markører på oksidativt stress i kliniske intervensjonsstudier med antioksidanter

reaktive substanser)) har vært brukt for kvantifisering. Disse metodene er dels uspesifikke og dels usikre på grunn av stoffenes dannelse ex vivo, deres ustabilitet samt liten spesifisitet (1, 9). I 1990 ble det oppdaget at isoprostanene blir dannet in vivo hos mennesker (10), og isoprostannivået er etter hvert blitt mye brukt som markør for oksidativt stress. Isoprostanene er stabile stoffer og mer spesifikke og sensitive som mål på in vivo-nivå av lipidperoksidering (3, 11).

Hva er isoprostaner?

Isoprostaner er en familie av prostaglandin (PG)-isomerer som dannes ved at frie radikaler katalyserer peroksidering av flerumettede fettsyrer (3).

Vanlige prostaglandiner dannes fra den frie fettsyren arakidonsyre (AA) ved hjelp av enzymet cyklooksygenase (COX). Isoprostaner, derimot, dannes fra arakidonsyre mens arakidonsyren fremdeles er forestret til fosfolipidene i cellemembranene (fig 1). Analoge stoffer til isoprostanene kan dannes fra andre flerumettede fettsyrer (3). Ved siden av fosfolipidene i cellemembraner er også fosfolipidene i LDL (low density lipoprotein) en kilde for isoprostaner. F₂-isoprostaner er isomerer til prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}), som selv er dannet ved hjelp av COX-enzymet. Det er rapportert 64 forskjellige F₂-isomerer, som deles inn i fire strukturelle klasser. Hvilke isomerer som dannes, er avhengig av hvilket av de labile hydrogenatomene på arakidonsyren som først angripes av et fritt radikal.

Frigjøringen av F₂-isoprostanene etter deres in situ-dannelse på vevsfosfolipider er lite kjent, men sannsynligvis skjer den ved hjelp av fosfolipase A₂ (PLA₂) (3). Hvilke faktorer

som regulerer frigjøring av isoprostaner fra cellemembraner og fordeling mellom fri og esterifisert form, er også lite forstått (4). Etter frigjøringen fra fosfolipidene sirkulerer isoprostanene i plasma og utskilles i urinen (3).

Isoprostaner som markører for oksidativt stress

For å måle isoprostannivået hos mennesket er det utviklet spesifikke og sensitive metoder for å måle in vivo-peroksidering (3). Isoprostannivået brukes dermed som et kvantitativt mål på danning av frie radikaler og oksidativt stress. Blant isoprostanene har spesielt 8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$ (8-iso-PGF $_{2\alpha}$, også kalt 8-epi-PGF $_{2\alpha}$ og iPF $_{2\alpha}$ -III, i denne artikkelen forkortet til 8-isoprostan) vært mye studert (fig 1). Økt nivå av 8-isoprostan er vist ved hyperkolesterolemi, diabetes mellitus, hos sigarettrykere (12) samt ved Alzheimers sykdom (5). Imidlertid er det også vist at andre F_2 -isoprostaner (iPF $_{2\alpha}$ -VI, 8,12-iso-iPF $_{2\alpha}$ -VI og 5-epi-8,12-iso-iPF $_{2\alpha}$ -VI) er til stede i høyere konsentrasjoner i urinen enn 8-isoprostan (13), men den biologiske betydning av disse stoffene er lite kjent. Det har i studier vært vist at nivået av isoprostan i urin ikke påvirkes av fettinnholdet i kosten (11). Målinger av malondial-

dehyd, en klassisk markør for lipidperoksidering, varierer derimot med malondialdehydkilder i dietten (14). Det er vist at 8-isoprostan in vitro også kan dannes ved COX-1-aktivitet i blodplater og ved COX-2-aktivitet i monocytter (3). Disse andre bidragene til 8-isoprostandanning er imidlertid minimale (3), slik at 8-isoprostan beholder sin verdi som et mål på oksidativt stress, også ved kliniske tilstander som er assosiert med COX-aktivering.

Isoprostaners biologiske aktivitet

F_2 -isoprostanene har biologiske aktiviteter som muligens spiller en rolle ved sykdomsutvikling assosiert med oksidativt stress. Spesielt har 8-isoprostan vist seg å ha potent biologisk aktivitet in vitro, noe som kan være relevant for flere store sykdomsgrupper som hjerte- og karsykdom og diabetes. 8-isoprostan er en potent vaso- og bronkokonstriktor, induserer proliferasjon av glatte muskelceller og aktiverer blodplater (12). I tillegg reduserer 8-isoprostan antiaggregering og antiadhesive effekter av nitrogenmonoksid, øker plateadhesjon (3) og interfererer med endotelcellenes barrierefunksjon (15). 8-isoprostan er også en kraftig endotelaktivator, med påfølgende økt monocytadhesjon (16).

Vi har vist at 8-isoprostan aktiverer transkripsjonsfaktoren Nf-kappa B i en trofoblastcellelinje (17). Denne transkripsjonsfaktoren reagerer på cellens oksiderbarhetsnivå og regulerer en rekke proinflammatoriske gener. Videre har vi funnet at ekspresjon av TIMP-1, en endogen inhibitor av matriksmetalloproteinaser, er redusert i humane makrofager etter korttids 8-isoprostanstimulering (18). Vi har foreslått at 8-isoprostan kan ha betydning for destabilisering av plakker ved aterosklerotisk sykdom gjennom blant annet økning i interleukin-8 (19).

Det er uavklart om de lokale konsentrasjonene av F_2 -isoprostanene in vivo er tilstrekkelige til at stoffene kan fungere som mediatorer for oksidativt stress in vivo (3, 12). 8-isoprostan virker sannsynligvis via cellereseptorer som er forskjellige fra, men i nær slekt med, tromboksanreseptorene (3), men kan også bindes spesifikt til disse.

Måling av isoprostaner i biologisk materiale

Isoprostaner sirkulerer i blodet og utskilles i urinen (3). I tillegg er også andre kroppsvæsker blitt brukt til å analysere nivået av isoprostaner. Vev er også blitt benyttet for å analysere 8-isoprostannivået, for eksempel hjerte, lever, karvegger og placenta (20–22).

Totalnivået av isoprostaner i biologiske prøver kan måles ved å frigjøre de forestrede isoprostanene (ved kaliumlutiltsetning). Alternativt kan bare de allerede «naturlig» frigjorte isoprostanene måles, ved at prøven ikke hydrolyseres. Gasskromatografi/massespektrometri (GC/MS), væskkromatografi koblet til tandem massespektrometri (LC/MS/MS) og enzymimmunoassay (EIA) er metoder som brukes til å måle 8-isoprostannivået (3).

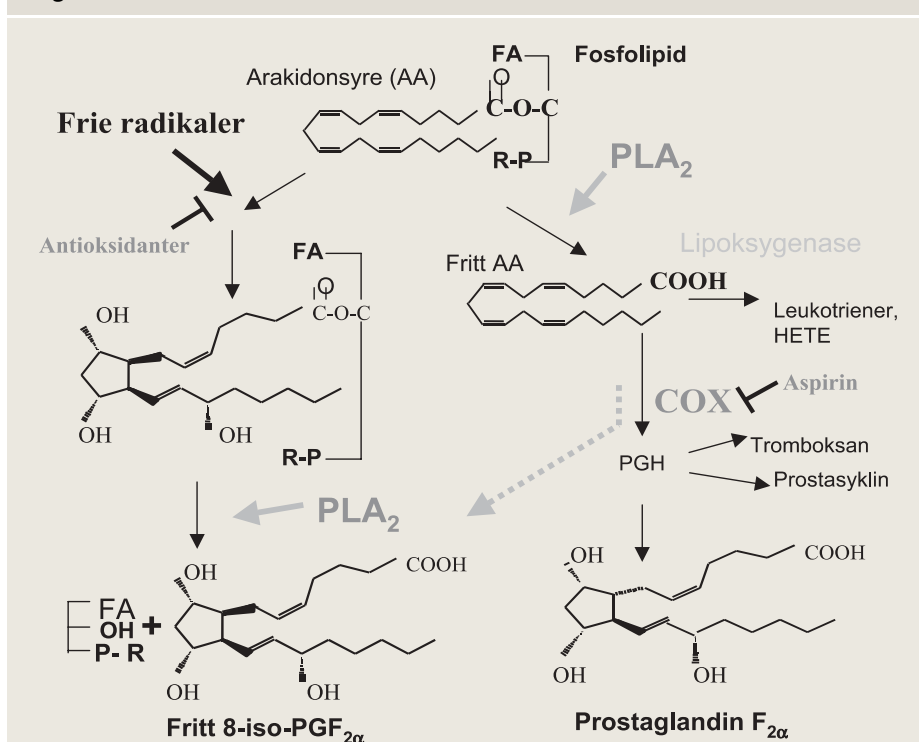
Det er enklere å måle 8-isoprostan i urin enn i plasma, fordi det trengs færre anrikningstrinn. I tillegg er det ikke funnet holdpunkter for ex vivo-danning av isoprostaner under behandling og lagring av urin, i motsetning til ved lagring av plasmaprøver (3), som må kjøles raskt ned, tilsettes antioksidant (for eksempel BHT) og COX-hemmer (23). I tillegg er det anbefalt at plasma- og vevsprøver lagres ved -70°C .

Isoprostaner og kardiovaskulær sykdom

Kjente risikofaktorer for kardiovaskulær sykdom er blitt assosiert med oksidativt stress. Risikofaktorer som sigarettøyking (3, 12), diabetes mellitus (23, 24) og hyperkolesterolemi (3) er assosiert med økte nivåer av 8-isoprostan i urin og plasma. F_2 -isoprostaner er korrelert til homocysteinnivå (25), en kjent risikomarkør for hjerte- og karsykdom, noe som antyder at homocystein er assosiert med in vivo-lipidperoksidering (25).

Det er dokumentert en sammenheng mellom nivå av fritt 8-isoprostan i plasma og plasmanivå av angiotensin II (26). Haas og medarbeidere viste at infusjon av angioten-

Figur 1



Danningen av 8-isoprostan og dens isomer prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$) fra arakidonsyre. 8-isoprostan blir dannet fra arakidonsyre in situ på fosfolipider i cellemembraner, og senere frigjort ved hjelp av enzymet fosfolipase A2 (PLA $_2$). I motsetning til dette blir PGF $_{2\alpha}$ dannet fra arakidonsyre etter frigjøring fra fosfolipidet ved hjelp av PLA $_2$. Arakidonsyre er også felles utgangspunkt for produkter laget av enzymet cyklooksygenase (COX) (som prostaglandiner, tromboksan, prostasyklin) samt stoffer laget av enzymet lipooksygenase (leukotriener, HETE). HETE: 15-hydroksyeikosatetraenoisyre. PGH: prostaglandinendoperoksid

sin II økte plasmakonsentrasjonene av frie isoprostaner. I tillegg korrelerte økningen i isoprostannivå med økningen i arterielt blodtrykk (26).

Nivået av 8-isoprostan i urin er økt etter trombolytisk behandling hos pasienter med akutt hjerteinfarkt (27, 28). Pasienter som har fått utført elektiv koronar bypasskirurgi har også fått påvist en økning av 8-isoprostannivået i urin (27).

Pasienter med ustabil angina pectoris er funnet å ha, ved siden av forhøyede plasmannivåer av lipidperoksid, økte nivåer av 8-isoprostaner i plasma og et redusert antioksidantforsvar (29).

8-isoprostan er brukt som markør på oksidative skader ved en lang rekke forskjellige hjerte- og karsykdommer, som for eksempel ved alvorlig hjertesvikt (30, 31), akutt hjerteinfarkt (27, 28) og carotisstenose (3). Dessuten er PCI (perkutan koronar intervensjon) funnet å gi betydelig oksidativ skade på karvegg og økte nivåer av 8-isoprostan i urin (28). Lokal akkumulering av cytokiner og endret frigjøring av nitrogenmonoksid (NO) er funnet å samvariere med det økte 8-isoprostannivået ved hjertesvikt (32), og inflammasjon er fremsatt som en mulig årsaks mekanisme for økningen av 8-isoprostan. Dessuten er 8-isoprostan rapportert å øke integrinindusert adhesjon av humane polymorfnukleære nøytrofile granulocytter (33).

Diabetes er en velkjent risikofaktor for utvikling av hjerte- og karsykdom. Økt urinutskilling av 8-isoprostan er blitt påvist ved både type 1- og type 2-diabetes mellitus. Samtidig reduseres denne isoprostanutskillingen ved bedret metabolsk kontroll (reduert nivå av Hb A_{1c}) og ved tilskudd av antioksidanter (23, 24).

Oksideringsevnen til LDL, dvs. hvor lett det er å oksidere in vitro, kan brukes som et mål på pasientens nivå av lipidperoksidering og oksidativt stress (34). Det er vist at nivået av F₂-isoprostaner i urin ser ut til å være et bedre mål for lipidperoksidering og oksidativt stress ved diabetes mellitus type 2 enn oksideringsevnen til LDL (35).

Isoprostaner og preeklampsi

Preeklampsi er assosiert med økt dødelighet og sykkelighet for mor og barn (36). I Norge utvikler 4 % av gravide denne svangerskapskomplikasjonen (37).

Ved preeklampsi foreligger det en redusert invasjon av trofoblastceller inn i morens livmorvegg (36), med redusert fysiologisk omdanning av maternelle forsyningskar til placenta (spiralarterier). Dette er sannsynligvis årsak til endret placentasirkulasjon. Endret sirkulasjon fører igjen til danning av blodbårne faktorer som forårsaker den endoteliale dysfunksjonen som kjennetegner preeklampsi, og dermed de maternelle symptomene, inkludert hypertensjon, proteinuri og hyperkoagulabilitet (36).

Oksidativt stress spiller sannsynligvis en sentral rolle i utviklingen av preeklampsi

(6), og nivået av fritt 8-isoprostan i plasma er forhøyet ved forløsningstidspunktet (38). Det er imidlertid ikke påvist forhøyet nivå av totalt 8-isoprostan hos gravide med preeklampsi (38, 39). Etter forløsning (ved in vitro-forsøk) frigjør placentaer fra kvinner med preeklampsi økte mengder av 8-isoprostan sammenliknet med kontrollplacentaer (40).

Staff & Halvorsen har sammen med medarbeidere gjort flere in vitro-studier for å vurdere betydningen av isoprostaner for utvikling av preeklampsi. Vi har vist at nivået av fritt 8-isoprostan ved preeklampsi er forhøyet i livmorslimhinnen bak placenta ved forløsning sammenliknet med situasjonen hos gravide kontrollpersoner (22). Oksiderte lipider fra den uteroplacentære sirkulasjonen kan således være kandidater for blodbårne stoffer som overføres til moren fra det uteroplacentære kretsløp og induserer den endoteliale dysfunksjonen som sees ved preeklampsi (41). Flere studier har vist økte maternelle lipidperoksidnivåer ved preeklampsi (41, 42). I tillegg er det en netto redusert antioksidantkapasitet ved preeklampsi (42). Vi har også sammen med medarbeidere vist at det er et forhøyet nivå av lipidperoksid i decidua ved preeklampsi (41). I tillegg har vi demonstrert at 8-isoprostan reduserer invasjonen av en trofoblastcellelinje (JAR) (43). Vi viste at enzymaktiviteten til de basalmembrannedbrytende enzymene matriksmetalloproteinaserne (MMP) MMP9 og MMP2 ble redusert in vitro med 8-isoprostan (43). Matriksmetalloproteinaserne enzymaktivitet er viktig for cellers invasjonsevne, og er redusert ved preeklampsi, noe man har satt i sammenheng med den reduserte trofoblastinvasjonen (44).

Vi har også sett at 8-isoprostan øker det funksjonelle uttrykket av LOX-1, reseptoren for oksidert LDL, i trofoblastcellelinjen JAR (17). En slik økning av denne type reseptor kan teoretisk være med og forklare noen av de patologiske prosessene som finner sted ved preeklampsi, slik som akutt aterosklerose (lipiddeponering som minner om tidlige aterosklerotiske forandringer) i livmorveggen kar og redusert trofoblastinvasjon. Økt nivå av funksjonell LOX-1-reseptor vil kunne øke lipidopptaket, i hovedsak oksidert LDL, og deponere lipidene i spiralarteriene.

Isoprostaner og nevrologiske sykdommer

Ved Alzheimers sykdom har det vært påvist forhøyede nivåer av isoprostaner i cerebrospinalvæske, plasma og urin (5). F₂-isoprostannivået målt i områder av hjernen assosiert med forandringer ved Alzheimers sykdom, er høyere hos avdøde med sykdommen enn hos kontrollpasienter (45). F₂-nivået korrelerer dessuten med andre kjente biomarkører for Alzheimers sykdom (slik som nivået av tau-protein og amyloid i cerebrospinalvæske), i tillegg til nivå av redusert kognitiv funksjon hos disse pasientene (5). Det er foreslått at isoprostaner kan brukes

som biomarkør for å monitorere utvikling av Alzheimers sykdom, og også for å måle behandlingseffekt (5, 45).

Downs syndrom, trisomi 21, er assosiert med en tidlig demensutvikling av Alzheimer-type. Den kommer i tillegg til den mentale retardasjonen. Disse og andre kliniske symptomer assosiert med Downs syndrom antas å forårsakes av overuttrykk av normale genprodukter som kodes for av ekstra genkopier på overskuddskromosomet 21. Enzymet superoksid-dismutase 1 (SOD1) er et slikt overuttrykt gen hos personer med Downs syndrom. Dette medfører akkumulering av hydrogenperoksider, noe som kan føre til økt oksidativt stress (46). Pratico og medarbeidere fant høyere nivåer av F₂-isoprostaner i urinen hos barn med Downs syndrom enn hos aldersmatchede kontrollpersoner, noe som tyder på at oksidativt stress og lipidperoksidering spiller en rolle i dette syndromet. I tillegg fant de en klar assosiasjon mellom økende alder og økende nivåer av F₂-isoprostaner, noe som ikke var tilfellet hos de friske barna. De postulerte dermed at oksidativt stress hos personer med Downs syndrom øker med alderen. På sikt håper man å kunne teste om antioksidantterapi kan dempe utviklingen av Alzheimer-liknende forandringer i hjernen og dermed redusere økende mental retardasjon hos mennesker med Down syndrom (46).

Isoprostanmålinger i kliniske intervensjonsforsøk

Isoprostannivåer i kroppen har vært brukt for å følge effekt av terapitiltak for forskjellige pasientgrupper, med formålet å påvirke risikofaktorer for sykdom og død. Kosttilskudd med hvitløksekstrakt i 14 dager reduserte plasma- og urinnivå av 8-isoprostan både hos røykere og hos ikke-røykere sammenliknet med placebotilskudd (47). Etter 14 dager uten tilskudd var verdiene av 8-isoprostan i placebo- og tilskuddsgruppene like. Røykerne hadde i utgangspunktet 58 % høyere nivå av 8-isoprostan i plasma og 85 % høyere nivå i urin enn alders- og kjønnsmatchede ikke-røykere (47).

Pratico og medarbeidere viste at urinnivået av F₂-isoprostaner kan brukes som en ikke-invasiv metode i seleksjon og oppfølging av pasienter ved intervensjonsforsøk med antioksidanter. De brukte en dyremodell for hyperkolesterolemi som raskt utviklet aterosklerotiske lesjoner med vanlig diett, samt forhøyede nivåer av F₂-isoprostan i urin, plasma og aortavegg (48). De brukte den dosen vitamin E som var nødvendig for å redusere nivået av F₂-isoprostanet i urin ned til nivået hos de normale musene og viste at denne intervensjonen reduserte nivåene av F₂-isoprostan forestret i LDL og i vaskulært vev. Intervensjonen forsinket også utviklingen av aterosklerose, til tross for persisterende hyperkolesterolemi (48).

En annen intervensjonsstudie viste at langtids oralt tilskudd av vitamin E til friske

menn med hyperkolesterolemi reduserte plasmanivået av 8-isoprostan med 17%, mens vitamin C ikke hadde noen effekt sammenliknet med placebo (49).

For å se om forskjellige antioksidanter kunne redusere noen uheldige cellulære skader ved røyking, ble nivået av 8-isoprostaner i plasma brukt til å vurdere effekten på oksidativt stress (50). Et tilskudd av antioksidanten vitamin C reduserte plasmanivået av 8-isoprostan hos overvektige røykere sammenliknet med placebogruppen (50).

Muskelsmerter og økning i kreatininkinase (CK) er noen bivirkninger som er rapportert ved bruk av statiner (HMGCo-A-reduktasehemmere). Nylig ble det publisert en studie der 8-isoprostaner var funnet forhøyet i plasma hos de pasientene som hadde disse bivirkningene av statiner. Nivået av 8-isoprostan ble redusert med statinbehandling (51).

Konklusjon

Isoprostaner er en klasse av biologisk aktive lipider som har fått økende interesse de siste ti år som mål på oksidativt stress in vivo. In vitro-studier har vist flere interessante biologiske egenskaper ved 8-isoprostan, men det gjenstår fremdeles å vise om disse mekanismene også gjelder in vivo hos mennesker. Isoprostanene representerer et forskningsfelt som sannsynligvis vil kunne få stor klinisk betydning.

Litteratur

Komplett litteraturliste finnes i artikkelen på www.tidsskriftet.no

3. Pratico D. F2-isoprostan: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis* 1999; 147: 1–10.
6. Roberts JM, Hubel CA. Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? *Lancet* 1999; 354: 788–9.
12. Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostan: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2309–15.
17. Halvorsen B, Staff AC, Henriksen T, Sawamura T, Ranheim T. 8-iso-prostaglandin F_{2α} increases expression of LOX-1 in JAR cells. *Hypertension* 2001; 37: 1184–90.
18. Schulz H, Halvorsen B, Hall C. 8-iso-prostaglandin F_{2α} reduces production of TIMP-1 in human macrophages (THP-1). A potential role of 8-isoprostaglandin F_{2α} in plaque rupture. *Circulation* 2001; 104: 67.
19. Schulz H, Yndestad A, Aukrust P, Hall C, Halvorsen B. 8-iso-PGF_{2α} stimulates interleukin-8 expression in human THP-1 derived macrophages. *Scand J Clin Lab Invest* 2002; 62: 50.
22. Staff AC, Halvorsen B, Ranheim T, Henriksen T. Elevated level of free 8-iso-prostaglandin F_{2α} in decidua basalis of women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181: 1211–5.
24. Davi G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S et al. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin F_{2α} and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999; 99: 224–9.
41. Staff AC, Ranheim T, Khoury J, Henriksen T. Increased content of phospholipids, cholesterol and lipid peroxides in decidua basalis in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 587–92.
43. Staff AC, Ranheim T, Henriksen T, Halvorsen B. 8-iso-prostaglandin F_{2α} reduces trophoblast invasion and metalloproteinase activity. *Hypertension* 2000; 35: 1307–13.