

Received: 2007.02.21
Accepted: 2007.06.26
Published: 2007.07.11

Różne oblicza biologicznej roli glutationu

The different aspects of the biological role of glutathione

Anna Bilaska, Agata Kryczyk, Lidia Włodek

Katedra Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie

Streszczenie

Glutation odgrywa główną rolę w utrzymaniu fizjologicznej równowagi między prooksydantami i antyoksydantami, co decyduje o życiu i śmierci komórek. Glutation występuje w tkankach organizmu ludzkiego w kilku postaciach redoksowych, z których najistotniejsze są: glutation zredukowany (GSH), glutation utleniony (GSSG), S-nitrozoglutation (GSNO) oraz mieszane disiarczki glutationu i białek. Obecność każdej z tych postaci w zależności od rodzaju komórki i jej stanu metabolicznego może być dla organizmu korzystna lub niepożądana. Istnieje wyraźny związek między poziomem różnych postaci redoksowych glutationu a szeroko pojętym problemem redoksowej regulacji metabolizmu komórki. W tej sytuacji możliwość regulowania poziomu glutationu w komórkach może stanowić niezmiernie ważny czynnik wspomagający leczenie. Wzrost poziomu glutationu jest korzystny we wszystkich stanach chorobowych, którym towarzyszy spadek poziomu GSH, natomiast obniżenie poziomu GSH jest wskazane do wywołania krótkotrwałej immunosupresji w powiązaniu z transplantacją narządów, a także w komórkach nowotworowych do selektywnego zwiększania ich wrażliwości na chemo- i radioterapię. Sam GSH nie może być stosowany w celach terapeutycznych ponieważ nie ulega transportowi przez błonę komórkową. Również cysteina – aminokwas limitujący szybkość biosyntezy glutationu nie może być stosowana w terapii z powodu dużej neurotoksyczności. Dlatego obecnie obserwuje się intensywne poszukiwania możliwości modulowania poziomu GSH i cysteiny w komórkach, a problem ten może stanowić przedmiot interdyscyplinarnych badań łączących takie gałęzie nauki, jak biologia, farmakologia, toksykologia i medycyna kliniczna.

Słowa kluczowe: glutation • antyoksydanty • stres oksydacyjny • S-nitrozoglutation • glutationylacja białek

Summary

Glutathione plays a key role in maintaining a physiological balance between prooxidants and antioxidants, crucial for the life and death of a cell. Glutathione occurs in the human body in several redox forms, of which reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), S-nitroso-glutathione (GSNO), and mixed disulfides of glutathione with proteins are the most important. There is a clear relationship between the levels of different redox forms of glutathione and the regulation of cellular metabolism in a broad sense. Therefore, each of these forms of glutathione can be beneficial or harmful to the organism depending on the cell type and its metabolic status. In such a situation, elevation of GSH level can constitute a very important factor aiding treatment. A rise in GSH level is beneficial in all pathological states, accompanied by lowered GSH content, while a lowering of GSH level is an indication to induce short-term immunosuppression required in organ transplantation and in tumor cells to selectively increase their sensitivity to chemo- and radiotherapy. GSH itself cannot be used as a therapeutic since it is not transported through plasma membranes. Cysteine, an amino acid which limits glutathione biosynthesis, also cannot be used in therapy due to its high neurotoxicity. For this reason, there is currently an intensive search for possibilities of modulating cellular glutathione and cysteine levels, and this

problem can be the subject of interdisciplinary studies combining such scientific fields as biology, pharmacology, toxicology, and clinical medicine.

Key words: glutathione • antioxidants • oxidative stress • S-nitrosoglutathione • protein glutathionylation

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10701.pdf

Word count: 6100

Tables: 1

Figures: 10

References: 85

Adres autorki: dr hab. Lidia Włodek, prof. UJ, Katedra Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków; e-mail: mbwlodek@cyf-kr.edu.pl

Wykaz skrótów: **GSH** – glutation; **GSSG** – disulfid glutationu; **GSNO** – S-nitrozoglutation; **γ-GT** – γ-glutamylotranspeptydaza; **DP** – dipeptydaza cysteinylglicynowa; **RG** – reduktaza glutationowa; **STG** – S-transferaza glutationowa; **γ-STC** – syntetaza γ-glutamylcysteinylowa; **SG** – syntetaza glutationowa; **BSO** – butioninosulfoksymina; **RFT** – reaktywne formy tlenu; **RFA** – reaktywne formy azotu; **LA** – liponian; **DHLA** – dihydroliponian.

WPROWADZENIE

Glutation, czyli γ-glutamylcysteinylglicyna (γ-glu-cys-gly) jest najbardziej rozpowszechnionym niskocząsteczkowym związkem tiolowym w przyrodzie (ryc. 1). Występuje we wszystkich komórkach prokariotycznych i eukariotycznych. Związek ten po raz pierwszy został opisany już w 1888 r. przez de Rey-Pailhade'a [62]. Obecnie glutation jest jedną z intensywniej badanych cząsteczek występujących w komórkach organizmu ludzkiego. W poświęconych mu publikacjach naukowych, związek jest przedstawiany jako niezwykle, osobliwy [79]. W opracowaniach popularnonaukowych entuzjazm jest jeszcze większy.

Ta „dobra (naukowa i nienaukowa) prasa” glutationu jest w pełni uzasadniona. Niezwykła i osobliwa jest bowiem i struktura glutationu, jego biosynteza i biodegradacja, jak również pełnione funkcje. Biosynteza glutationu przebiega w cytoplazmie niemal wszystkich komórek z glutaminianu (glu), cysteiny (cys) i glicyny (gly) bez matrycy RNA [64]. Osobliwość struktury polega na tym, że z grupą α-aminową cysteiny wiąże się grupa nie α-, a γ-karboksylowa glutaminianu, tworząc w ten sposób nietypowe wiązanie peptydowe (wiązanie izopeptydowe). Wiązanie to chroni glutation przed wewnątrzkomórkowymi peptydazami. Jedynym enzymem, dla którego wiązanie to nie stanowi przeszkody jest, umiejscowiona po zewnętrznej stronie błony komórkowej, γ-glutamylotransferaza [EC 2.3.2.2], zwana też glutationazą.

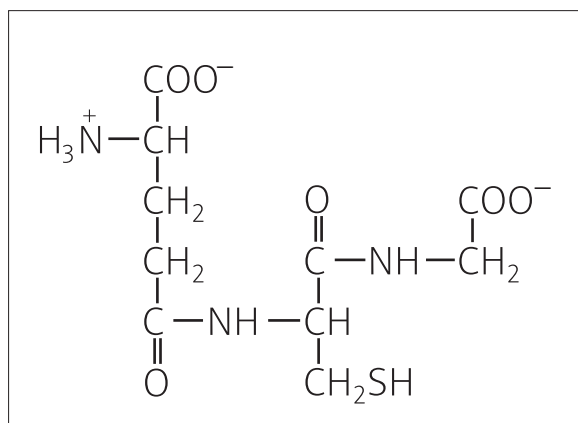
Drugą, oprócz wiązania izopeptydowego, cechą charakterystyczną w strukturze glutationu jest obecność, należącej do reszty cysteiny, grupy tiolowej (–SH), z którą bezpośrednio wiążą się jego biologiczne funkcje. Grupy –SH należą do najbardziej reaktywnych grup chemicznych, jakie występują w komórce [29,54].

Do najważniejszych przemian w układach biologicznych przebiegających z udziałem grup –SH należą:

- Jedno- i dwuelektronowe reakcje odwodorowania z powstawaniem rodników tylowych i disulfidów.
- Reakcje utleniania, w których siarka przechodzi na dodatnie stopnie utlenienia; ostatecznym produktem tego typu przemian są kwasy sulfonowe.
- Dysocjacja kwasowa grup –SH; powstające aniony tiolanowe (–S[–]) są nukleofilami, które reagują z: (1) disiarczki –SS–; prowadzi to do wymiany tiolowodisiarczkiowej, (2) egzo- i endogennymi związkami elektrofilowymi; prowadzi to do utworzenia S-koniugatów, (3) kationem nitrozoniowym NO⁺, jedną z reaktywnych form azotu; prowadzi to do powstania S-nitrotioli.
- Kompleksowanie jonów metali.

Antyoksydacyjne działanie glutationu wiąże się z detoksykacją nadtlenu wodoru, nadtlenuków organicznych i innych reaktywnych form tlenu, a także egzo- i endogennych związków elektrofilnych oraz z możliwością chelatowania niebezpiecznych jonów metali [70,79]. Potencjał redoks układu GSSG/GSH umożliwia również reakcje między glutationem zredukowanym a utlenionymi postaciami innych antyoksydantów (tabela 1).

Jednak w miarę poszerzania się wiedzy o glutationie staje się coraz bardziej oczywiste, że zasięg jego działania w komórce jest znacznie większy. Glutation poza zmiataniem RFT i regeneracją innych antyoksydantów uczestniczy także w odtwarzaniu uszkodzonych składników komórki, głównie białek i lipidów błon komórkowych oraz DNA [70]. Ponadto związek bierze udział w utrzymaniu prawidłowego potencjału redoksowego komórek [20], co ma znaczenie w regulacji wewnątrzkomórkowego metabolizmu [28], w procesach wzrostu i różnicowania się komórek [70,71] i apoptozy [35,36]. Badania ostatnich lat wskazują, że w ośrodkowym układzie nerwowym glutation pełni rolę swoistego neuromodulatora neurotransmisji glutaminianergicznej oraz nowego neuroprzekaznika



Ryc. 1. Glutation

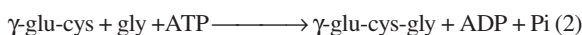
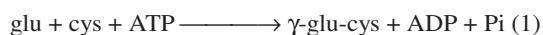
[16,19,33,47,55]. Pojawiają się jednak doniesienia o możliwości niekorzystnego działania glutationu [22,25]. Związek ten budzi więc coraz większe zainteresowanie lekarzy i farmakologów, a liczba ośrodków podejmujących badania poświęcone strategiom selektywnego modulowania poziomu glutationu w komórkach stale rośnie.

PODSTAWOWY METABOLIZM GLUTATIONU

Cykl γ -glutamylowy

Biosynteza i biodegradacja glutationu są częścią procesu metabolicznego przedstawionego przez Meistera, określanego jako cykl γ -glutamylowy (ryc. 2) [61,63]. Cykl γ -glutamylowy jest jednym z ciekawszych odkryć z zakresu biochemii glutationu.

W organizmie człowieka biosynteza glutationu odbywa się w cytoplazmie wszystkich niemal komórek, w dwustopniowej reakcji przebiegającej z udziałem zależnych od ATP enzymów: syntetazy γ -glutamylcysteinylowej [γ SGC; EC 6.3.2.2] oraz syntetazy glutationowej [SG; EC 6.3.2.3]. Podstawowymi substratami w biosyntezie glutationu (γ -glu-cys-gly) są trzy aminokwasy: L- α glutaminian (glu), L- α cysteina (cys) oraz glicyna (gly).



W reakcji pierwszej, katalizowanej przez γ SGC powstaje nietypowe wiązanie peptydowe między grupą γ -karboksylową glutaminianu a grupą aminową cysteiny. Czynnikiem ograniczającym szybkość tej reakcji jest dostępność cysteiny. Z metioniny jako prekursora cysteiny mogą jedynie korzystać te tkanki, w których występuje aktywność enzymów związanych z biodegradacją tego aminokwasu, a więc wątroba oraz w mniejszym stopniu nerki i trzustka [8]. Natomiast dla wszystkich pozostałych tkanek jedynym źródłem cysteiny jest osocze, gdzie cysteina występuje głównie w postaci disiarczku, czyli cystyny (Cys-S-S-Cys). Aktywność γ SGC jest ponadto regulowana na poziomie transkrypcji poprzez szlaki sygnałowe zależne od stanu redoksowego komórek [73,80]. W drugiej reakcji, katalizowanej przez SG powstaje wiązanie peptydowe między grupą karboksylową cysteiny a grupą aminową glicyny.

Tabela. 1. Wartości standardowego biologicznego potencjału redoks (E_0') reakcji jedno- i dwuelektrodowych dla wybranych układów biologicznych

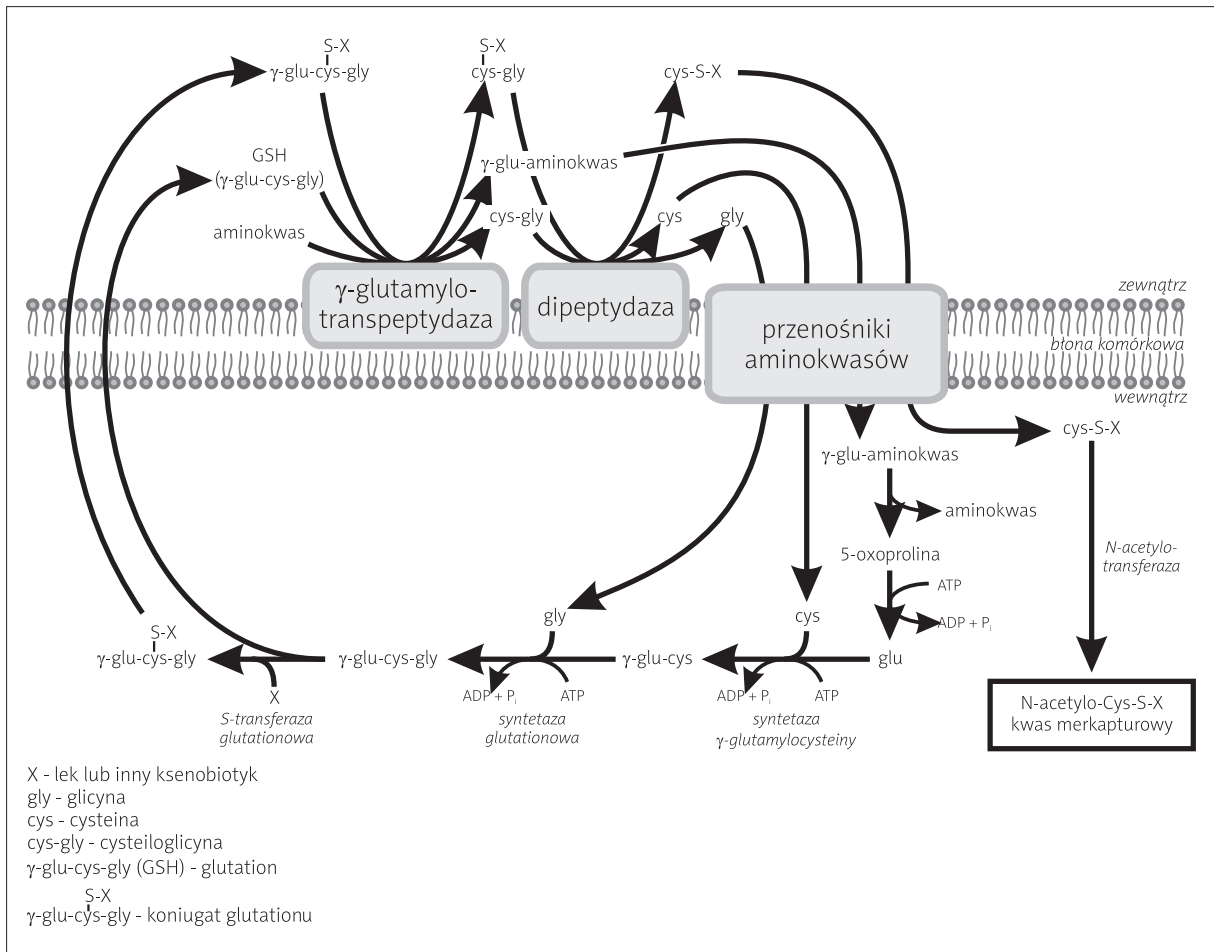
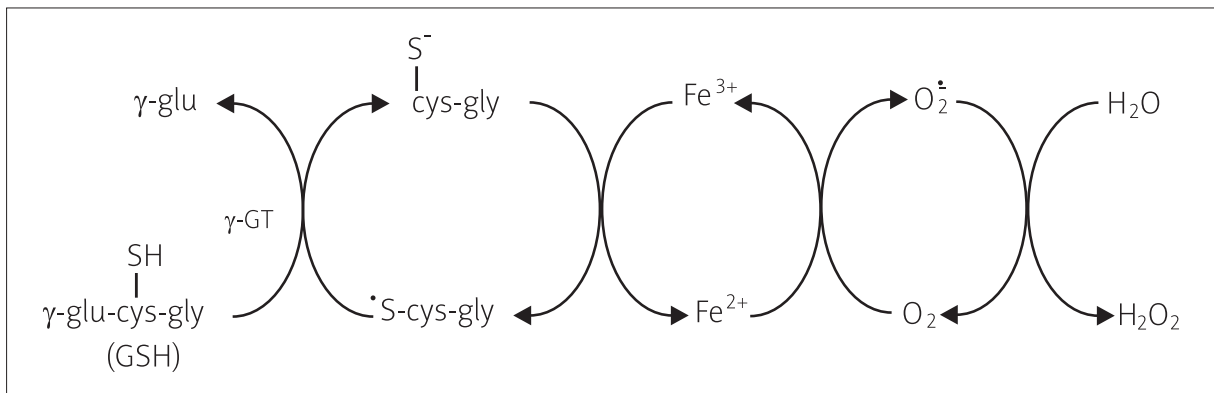
| Układ | E_0' [V] |
|--|------------|
| GSSG/GSSG ⁻ (glutation) | -1,50 |
| Fe ⁺³ /Fe ⁺² | -0,77 |
| O ₂ /O ₂ ⁻ | -0,33 |
| NAD(P) ⁺ /NAD(P)H | -0,32 |
| liponian/dihydroliponian | -0,29 |
| GSSG/GSH (glutation) | -0,23 |
| Cu ⁺² /Cu ⁺ | -0,17 |
| FAD/FADH ₂ | -0,06 |
| ESSE/ESH (ergotioneina) | -0,06 |
| dehydroaskorbinian/askorbinian | -0,058 |
| chromanoksylogowy rodnik tokoferolu/tokoferol | +0,48 |
| O ₂ /H ₂ O | +0,82 |
| H ₂ O ₂ /O ₂ ⁻ | +0,87 |
| ROO [•] /ROOH | +1,00 |
| NO [•] /NO ⁺ | +1,21 |
| GS [•] /GS ⁻ (glutation) | +0,92 |
| H ₂ O ₂ /H ₂ O | +1,32 |
| [•] OH/H ₂ O | +2,31 |

Końcowy produkt reakcji – glutation, hamuje na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego aktywność γ SGC i wyłącza biosyntezę. Z kolei nadmiar glutaminianu poprzez interakcję z miejscem regulatorowym γ SGC może ponownie nasilać biosyntezę glutationu [73].

Glutation, syntetyzowany w cytosolu komórek, jest degradowany w przestrzeni pozakomórkowej. Proces ten, podobnie jak biosynteza, zachodzi dwustopniowo, z udziałem γ -glutamylotranspeptydazy [γ -GT; EC 2.3.2.2] oraz dipeptydazy cysteinylglicynowej [DP; EC 3.4.13.6]. Enzymy te, to białka błonowe, umiejscowione po zewnętrznej powierzchni błony komórkowej.



W pierwszym etapie biodegradacji z udziałem γ GT (reakcja 3) następuje hydroliza nietypowego wiązania peptydowego (izopeptydowego) między grupą γ -karboksylową glutaminianu, a grupą aminową cysteiny. Uwolniona reszta γ -glutamylowa jest przenoszona na akceptor aminokwasowy (aa) z utworzeniem γ -glutamylaminokwasu (γ -glu-aa). Powstający dipeptyd cysteinylglicyna pod wpływem DP (reakcja 4) ulega dalszej hydrolizie do glicyny i cysteiny,

Ryc. 2. Cykl γ -glutamylowy Meistersa (wg [64]; zmodyfikowana)Ryc. 3. Powstawanie reaktywnych form tlenu w wyniku aktywności γ GT

a γ -glu-aa wraca do komórki, gdzie pod wpływem γ -glutamylcyclotransferazy jest przekształcany do wolnego aminokwasu i 5-oksoproliny. Ta ostatnia z udziałem zależnej od ATP oksoprolinazy jest przekształcana do glutaminy. Powstałe w wyniku enzymatycznego rozpadu glutationu aminokwasy (glu, cys, gly) mogą zatem ponownie być wykorzystane do jego biosyntezy. Należy tu wspomnieć, że w warunkach fizjologicznych występuje przewaga anionu tiolanowego dipeptydu cysteinylglicynowego (wartość pKa grupy tiolowej cysteinylglicyny wynosi 7,9; dla przy-

pomnienia wartość pKa grupy tiolowej GSH wynosi 8,8). Anion ten w obecności nawet śladowych ilości jonów Fe^{+3} ulega utlenieniu do rodnika tylowego cysteinylglicyny z jednoczesną redukcją jonów Fe^{+3} do Fe^{+2} . W reakcji Fe^{+2} z tlenem cząsteczkowym powstaje anionorodnik ponadtlenkowy, będący substratem dla dysmutazy ponadtlenkowej, a ostatecznym produktem tych przemian jest nadtlenek wodoru (ryc. 3). Oznacza to, że procesowi zewnątrzkomórkowej hydrolizy GSH towarzyszy stres oksydacyjny, a GSH z antyoksydanta staje się prooksydantem.

BIOCHEMIA UKŁADU OKSYDACYJNO-REDUKCYJNEGO GSSG/GSH

Wartość standardowego potencjału redoks E_0' (tabela 1) dla dwuelektronowej reakcji odwodorowania grupy tiolowej glutationu z utworzeniem disulfidu (GSSG/GSH) wynosi $-0,23$ V [7]. Wartość ta jest niższa od wartości E_0' dla dwuelektronowych reakcji odwodorowania innych biotoli, takich jak cysteina i ergotioneina oraz wielu innych reakcji odwodorowania, natomiast jest wyższa jedynie w stosunku do wartości E_0' dla dwuelektronowej reakcji odwodorowania liponianu [3,7]. Utlenienie glutationu do disulfidu może zachodzić nieenzymatycznie lub – jeżeli czynnikiem utleniającym jest nadtlenek wodoru lub nadtenki organiczne – enzymatycznie z udziałem peroksydazy glutationowej [EC 1.11.1.9]. Disulfid glutationu powstały w procesie redukcji związków utleniających może zostać ponownie bezpośrednio zredukowany przez dihydroliponian lub pod wpływem reduktazy glutationowej [EC 1.6.4.2] z udziałem NADPH jako koenzymu [11,58]. Niezbędny w tej reakcji NADPH powstaje w wyniku działania dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej [EC 1.1.1.49] lub dehydrogenazy izocytrynianowej [EC 1.1.1.42]. Potencjał redoksy glutationu umożliwia również reakcje między glutationem zredukowanym (GSH) a utlenionymi innymi, nietiowymi antyoksydantami (askorbinian, witamina E).

NAJWAŻNIEJSZE BIOLOGICZNE FUNKCJE GLUTATIONU

W typowej komórce eukariotycznej dominuje postać zredukowana glutationu (GSH), postać utleniona (GSSG) stanowi mniej niż 1% całkowitej puli. Glutation występuje w cytoplazmie, mitochondriach i w jądrze w dużych, dochodzących do 10 mM, stężeniach. Jedynie w siateczce endoplazmatycznej jego stężenie jest znacznie mniejsze, sięga tylko 2 mM [45]. Pozakomórkowe stężenia glutationu, z wyjątkiem żółci, która zawiera glutation nawet w stężeniu 10 mM, są znacznie niższe (np. w osoczu krwi stężenie glutationu wynosi około 20 μ M) i dominuje postać utleniona [54].

Glutation jako najważniejszy bufor tiolowy komórek

Stosunek stężeń postaci zredukowanej do utlenionej glutationu $[GSH]/[GSSG]$, jest określane symbolem R i stanowi miarę stanu oksydacyjno-redukcyjnego komórki [29,30]. Wartość R w komórkach wątroby w warunkach fizjologicznych wynosi 300–400, podczas głodu około 150, a pod wpływem silnego stresu oksydacyjnego może spaść nawet do 2.

Reaktywne formy tlenu (RFT) i reaktywne formy azotu (RFA) są cząsteczkami, które oprócz destrukcyjnego działania na składniki komórek, mogą również pełnić pozytywną rolę w procesach transdukcji sygnałów. Wiązanie prozapalnych cytokin przez swoiste receptory błonowe indukuje stres oksydacyjny, który stanowi sygnał przekazywany na czynniki transkrypcyjne aktywujące ekspresję określonych genów [49,50,65]. Pierwszym poznany u *Eukaryota* czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym w odpowiedzi na stres oksydacyjny jest NF- κ B [49,74]. Istotnym było odkrycie, potwierdzone przez cztery niezależne ośrodki, że czynnik transkrypcyjny NF- κ B pod wpływem m.in. takich czynników jak cytostatyki i czynnik nekrozy nowotworu (TNF) ulega aktywacji i w postaci aktywnej może hamować procesy apoptozy w komórkach [9,85]. Jednak wiadomo również,

że aktywny NF- κ B może wykazywać działanie antyapoptotyczne [9]. Wykazano mianowicie, że aktywacja NF- κ B indukuje biosyntezę dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD; EC 1.15.1.1), co zapobiega apoptozie neuronów wywołanej działaniem czynnika TNF- α i ceramidu [60].

Aktywacji NF- κ B przeciwdziałają związki chelatujące jony metali i antyoksydanty, w tym również GSH oraz czynniki powodujące wzrost poziomu GSH w komórkach [41]. Przy fizjologicznym stosunku $[GSH]/[GSSG]$ czynnik NF- κ B pozostaje w cytoplazmie w postaci nieaktywnej [80]. Dokładny mechanizm działania GSH, jako inhibitora aktywacji NF- κ B jest jak dotąd nieznany. Na pewno rola GSH polega tu, podobnie jak i innych antyoksydantów na zmniejszaniu stresu oksydacyjnego. Można jednak przypuszczać, że nie jest to mechanizm jedyny.

S-glutationylacja białek jako mechanizm regulacyjny i antyoksydacyjny

Ostatnio duże zainteresowanie wzbudzają reakcje białek z glutationem, prowadzące do powstawania mieszanych disiarczków (białko-S-S-glutation). Proces ten, nazywany S-glutationylacją, postrzegany jest jako jeden ze sposobów odwracalnej, kowalencyjnej modyfikacji białek o znaczeniu regulacyjnym i antyoksydacyjnym [51]. Największym zagrożeniem dla komórek jest niebezpieczeństwo nieodwracalnego utlenienia grup $-SH$ białek do kwasów sulfinowych ($B-SO_2H$) i sulfonowych ($B-SO_3H$). Antyoksydacyjne działanie tego procesu polega na ochronie grup $-SH$ przed nieodwracalnym utlenianiem, a tym samym przed nieodwracalną utratą biologicznej aktywności. Do utworzenia mieszanych disiarczków białko-S-S-glutation prowadzą dwa mechanizmy: (1) grupy $-SH$ białek, odwracalnie utlenione do rodników tiolowych (S^{\cdot}), kwasów sulfinowych ($-SOH$) lub S-nitrozotiole (SNT) reagują z GSH; (2) różne postaci redoksy glutationu (rodnik tiolowy glutationu $-GS^{\cdot}$; S-nitrozoglutation $-GSNO$; kwas sulfenowy glutationu $-GSOH$) reagują z grupami $-SH$ białek (ryc. 4).

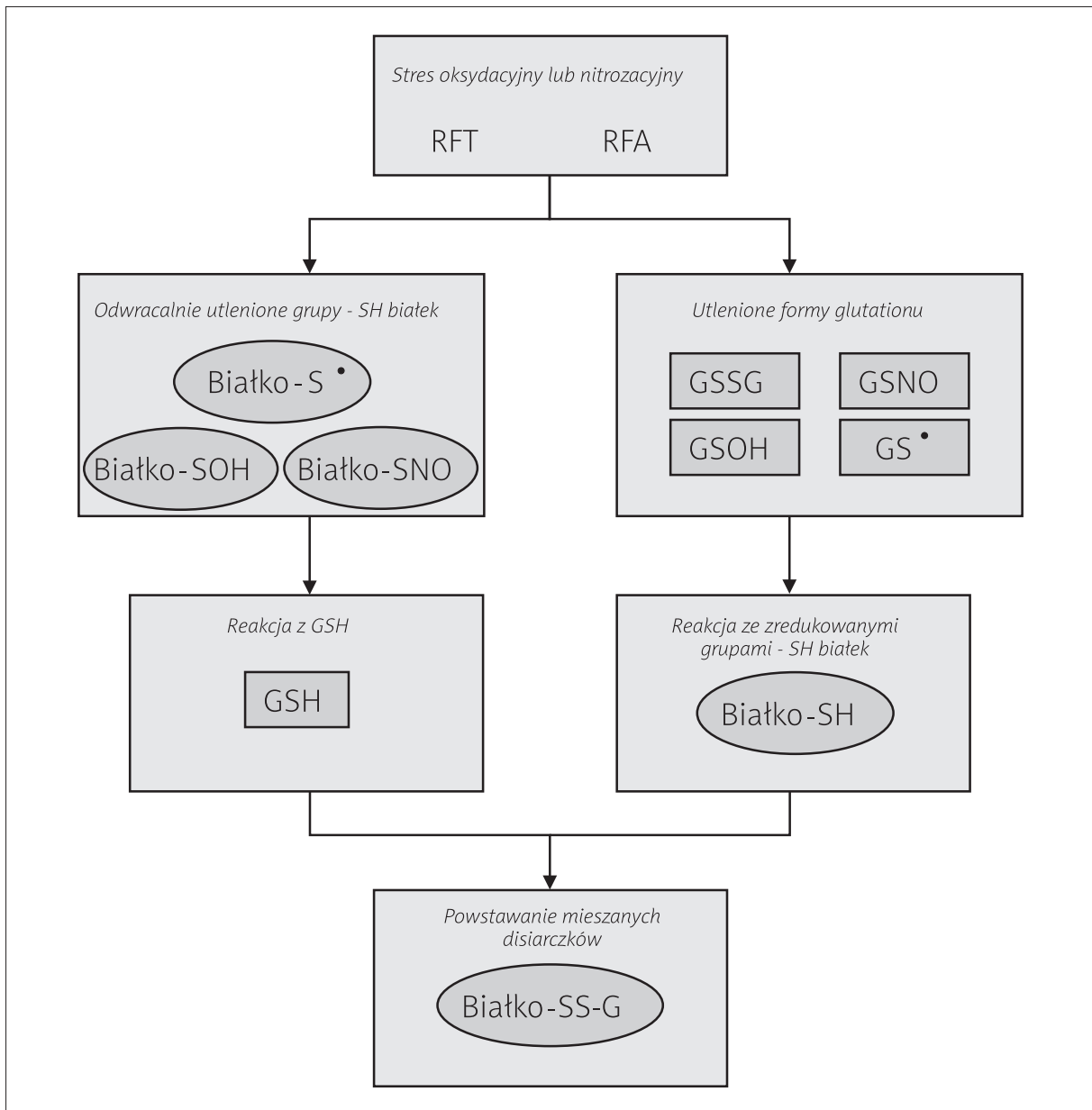
Do powstawania mieszanych disiarczków może również dochodzić w reakcji wymiany tiolowo-disiarczkowej.



Jest to możliwe jednak tylko przy odpowiednio wysokim stężeniu GSSG. W warunkach fizjologicznych, przy panującym w komórkach wysokim stosunku stężeń GSH/GSSG, proces ten jest bardzo ograniczony.

Wykazano, że wśród białek ulegających modyfikacji poprzez S-glutationylację są tak istotne w procesach regulacyjnych enzymy jak m.in.: fosfatazy i kinazy białkowe [17,20,82], czynniki transkrypcyjne AP-1 i NF- κ B [12] oraz białka z rodziny chaperonów [15]. S-glutationylacji ulegają również białka pozakomórkowe np. hemoglobina. Wzrost stężenia S-glutationylowanej hemoglobiny obserwuje się m.in. u osób z cukrzycą typu 1 i 2, hiperlipidemią oraz u pacjentów dializowanych z powodu terminalnej niewydolności nerek [31].

Dla większości białek utworzenie mieszanego disiarczku z glutationem najczęściej prowadzi do zahamowania aktywności. Przykładem białka, które poprzez S-glutationylację



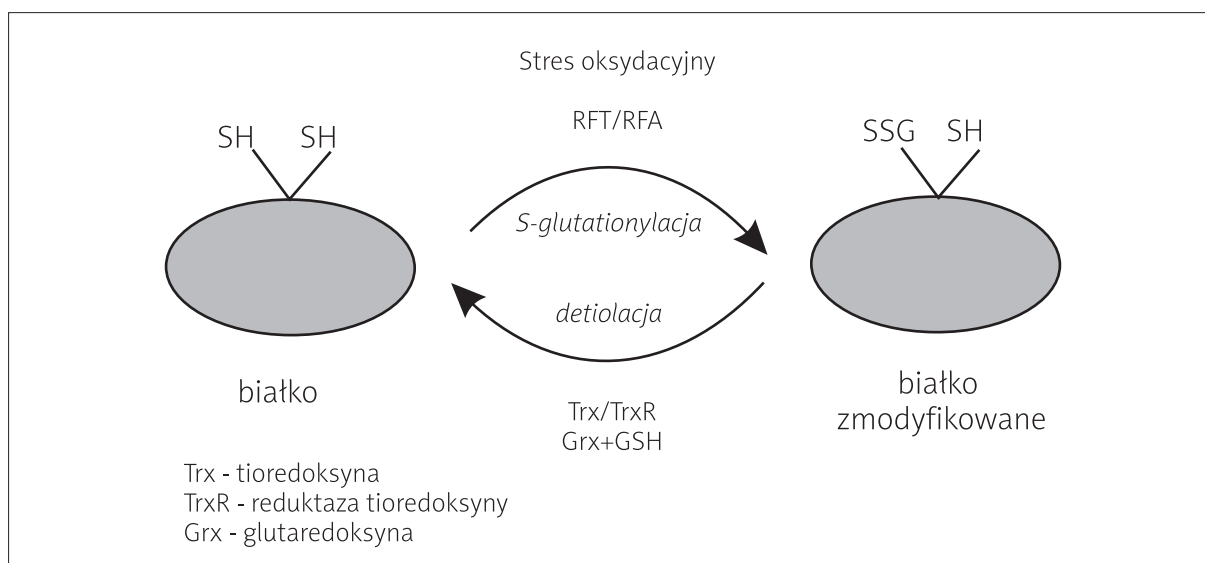
Ryc. 4. S-glutathionylacja, czyli proces powstawania mieszanych disiarczków z białkami

ulega aktywacji jest, związana z detoksykacyjnym działaniem glutationu, S-transferaza glutationowa [82]. Są również i takie białka, dla których zmiana aktywności biologicznej pod wpływem S-glutathionylacji zależy od pozycji reszty cysteinowej ulegającej modyfikacji. Na przykład proteaza ludzkiego wirusa upośledzenia odporności typu 1. Enzym ten jest homodimerem zawierającym dwie, ulegające S-glutathionylacji reszty cysteinowe: Cys67 i -znajdująca się na połączeniu podjednostek – Cys95. S-glutathionylacja Cys67 powoduje wzrost, natomiast S-glutathionylacja Cys95 prowadzi do spadku aktywności enzymu [21].

Udział S-glutathionylacji w potranslacyjnej modyfikacji białek

S-glutathionylacja jest także obecna przy „narodzinach i śmierci białek”. Proces ekspresji genu nie kończy się na

etapie translacji, uwalniany z rybosomu polipeptyd pozostaje nieaktywny, dopóki nie zostanie poddany różnego typu mechanizmom obróbki potranslacyjnej, czyli sfałdowaniu w aktywną biologicznie strukturę. Etapem limitującym szybkość i decydującym o prawidłowym fałdowaniu się białek jest utlenienie grup sulfhydrylowych reszt cysteinowych z powstaniem mostków -SS- stabilizujących strukturę przestrzenną cząsteczki białka [27]. Proces ten przebiega w retikulum endoplazmatycznym (RE), gdzie utleniaczem grup -SH cysteiny w nowo zsyntetyzowanych białkach jest disiarczek glutationu, GSSG. Nic więc dziwnego, że poziom GSSG w tym przedziale komórkowym jest znacznie wyższy niż w pozostałych. Podczas gdy w cytoplazmie stosunek stężeń [GSH]/[GSSG] jest rzędu 100:1, to w RE wartość ta wynosi 3:1–1:1 [45]. Enzymem, który katalizuje zarówno wytwarzanie mostków disiarczkowych, jak i reakcje izomeryzacji grup -SH i -SS- jest białkowa



Ryc. 5. Cykliczność procesu S-glutathionylacji i detiolacji białek z udziałem glutaredoksyny i tioredoksyny

izomeraza disulfidowa, PDI [EC 5.3.4.1]. Jednym z mechanizmów powstawania w białkach disiarczków z udziałem PDI jest przeniesienie reszty glutationowej z GSSG na białko z utworzeniem mieszanego disiarczku (S-glutathionylacja). W następnych reakcjach formują się właściwe wewnątrzcząsteczkowe wiązania disiarczkowe czemu towarzyszy uwolnienie GSH [75].



Badania nad procesem zwijania się białek, oprócz aspektu poznawczego, mogą mieć również charakter aplikacyjny, ponieważ istnieją choroby, których przyczyną są zaburzenia konformacyjne białek (protein conformational disorders – PCDs).

Regulujący wpływ S-glutathionylacji w procesie biodegradacji białek

Oczywistym jest, że proteom komórki zmienia się w czasie, czyli że musi zachodzić nie tylko biosynteza nowych, ale również biodegradacja białek już niepotrzebnych. Proces usuwania białek musi być bardzo selektywny, tak by były degradowane tylko właściwe białka, a jednocześnie wystarczająco szybki, by nadążyć za nagłymi zmianami metabolizmu komórki. W komórkach eukariotycznych podstawowy system kontrolowanej biodegradacji białek jest związany z ubikwitiną i proteasomem. Ubikwityna, białko składające się z 76 aminokwasów, jest przyłączana do reszt lizyny tych białek, które są przeznaczone do biodegradacji. Tylko białka oznakowane ubikwitiną mogą być następnie degradowane w proteasomie [18]. W komórkach eukariotycznych proteasom jest dużym kompleksem, w skład którego wchodzi aż 14 różnych typów podjednostek białkowych [32]. W procesie biodegradacji białek glutation ma swój udział zarówno w reakcjach związanych z ubikwitynylacją, jak i z aktywnością samego proteasomu. Stężenia GSH i GSSG mieszczące się w zakresach mikromolowych aktywują proteasom, natomiast stężenia wyższe, milimolo-

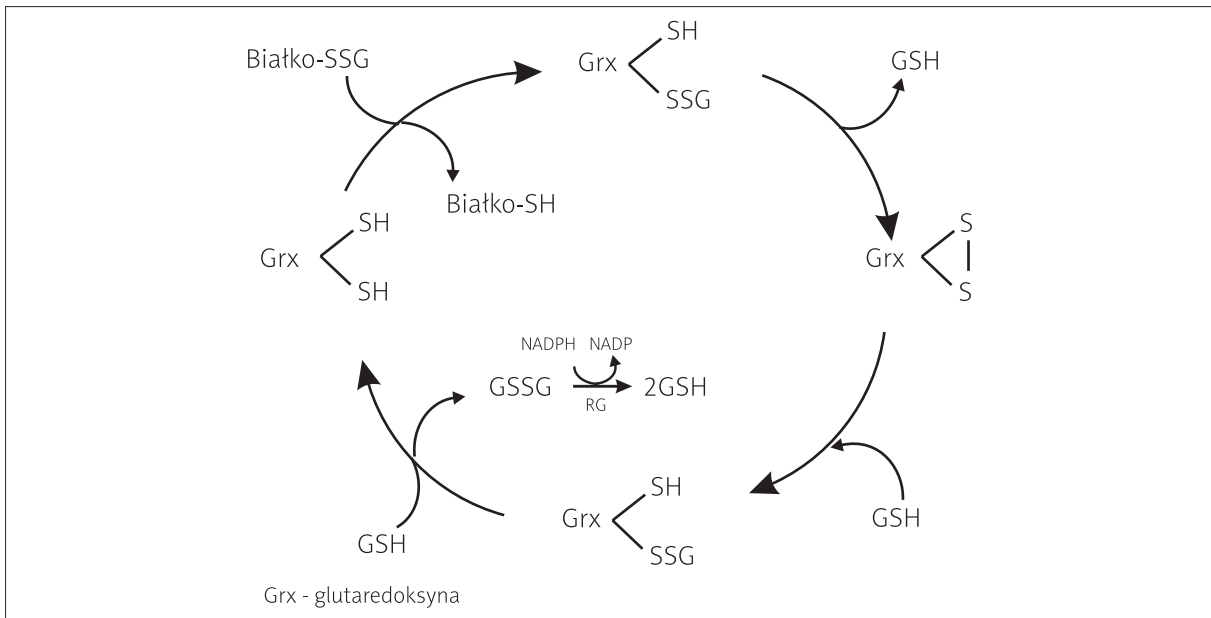
we wpływają hamująco [12,32]. W przyłączeniu ubikwityny do białek uczestniczą trzy enzymy określane jako E1, E2 i E3, a S-glutathionylacja w centrach aktywnych enzymów E1 i E2 prowadzi do zahamowania aktywności [82].

Mechanizmy detiolacji

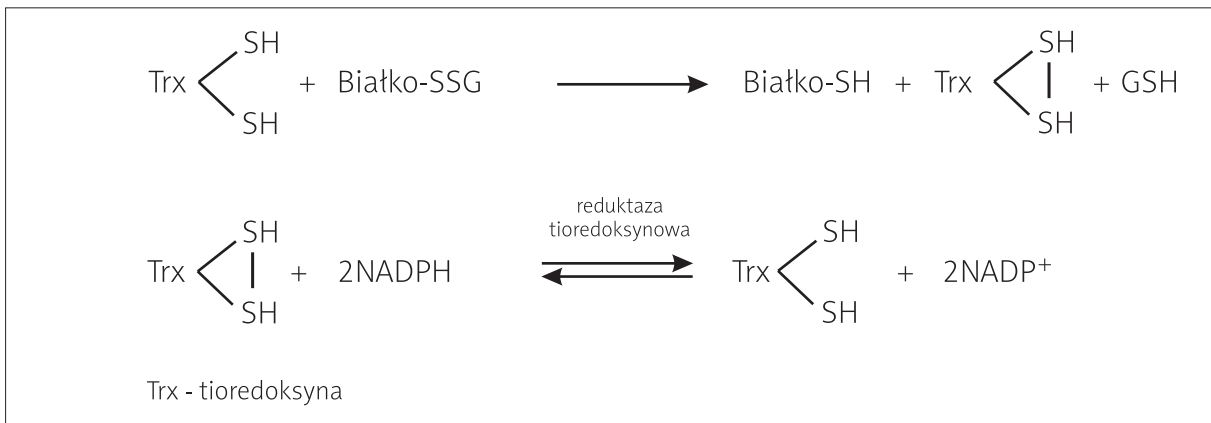
Do tego, żeby proces S-glutathionylacji mógł skutecznie spełniać funkcję regulacyjną i antyoksydacyjną konieczna jest możliwość szybkiego przywracania grup tiolowych białek do postaci zredukowanej. Detiolacja S-glutathionylowanych (deglutathionylacja) białek może przebiegać enzymatycznie i nieenzymatycznie. W większości przypadków szybkość powyższej reakcji zależy od aktywności oksydoreduktaz białkowo-disulfidowych: wspomnianej już - izomerazy białkowo-disulfidowej, glutaredoksyny (Grx), zwanej także tioltransferazą oraz tioredoksyny (Trx) (ryc. 5).

Glutaredoksyna i tioredoksyna są uważane za systemy antyoksydacyjne regulujące homeostazę tiolowo-disiarczkową w komórkach. Enzymy te katalizują redukcję mieszanego disiarczku białek, czemu towarzyszy utlenianie grup -SH w ich miejscach aktywnych z powstawaniem wewnątrzcząsteczkowego mostku disiarczkowego.

Glutaredoksyna ma większą aktywność detiolazową niż Trx i PDI. Badania Holmgrena wykazały, że Grx regeneruje białka zmodyfikowane przez S-glutathionylację z szybkością około 10 razy większą niż pozostałe oksydoreduktazy [43]. Utleniona postać glutaredoksyny jest następnie zredukowana przez GSH (ryc. 6). Stąd redukcyjna aktywność glutaredoksyny wymaga zredukowanych grup -SH w centrum aktywnym, co z kolei zależy od podaży zredukowanego GSH [54]. Dlatego „układ glutaredoksynowy”, oprócz glutaredoksyny i glutationu, wymaga również NADPH i reduktazy glutationowej. Glutaredoksyna, wykorzystuje również zredukowany GSH w reakcji redukcji rybonukleotydów do deoksyrybonukleotydów. Dane dostępne w literaturze wskazują również na możliwość udziału glutaredoksyny w procesie powstawania mostków disiarczkowych w białkach z udziałem PDI w obecności GSSG [56].



Ryc. 6. Mechanizm detiolacji białek z udziałem glutaredoksyny



Ryc. 7. Mechanizm działania tioredoksyny

Układ tioredoksynowy, tak jak i układ glutaredoksynowy, bierze udział w syntezie deoksyrybonukleotydów, a bezpośrednim źródłem wodoru w tym procesie jest NADPH. W przeciwieństwie natomiast do glutaredoksyny, która redukuje tylko mieszane disiarczki zawierające glutation, tioredoksyna redukuje wszystkie białkowe disiarczki (w tym również zawierające glutation) [54] (ryc. 7). W skład tak zwanego „układu tioredoksynowego, oprócz tioredoksyny, wchodzi więc reduktaza tioredoksynowa [EC 1.8.1.9] i NADPH. Poza tioredoksyną substratami reduktazy tioredoksynowej są: nadtlenki kwasów tłuszczowych, witamina K oraz anionorodnik ponadtlenkowy [54].

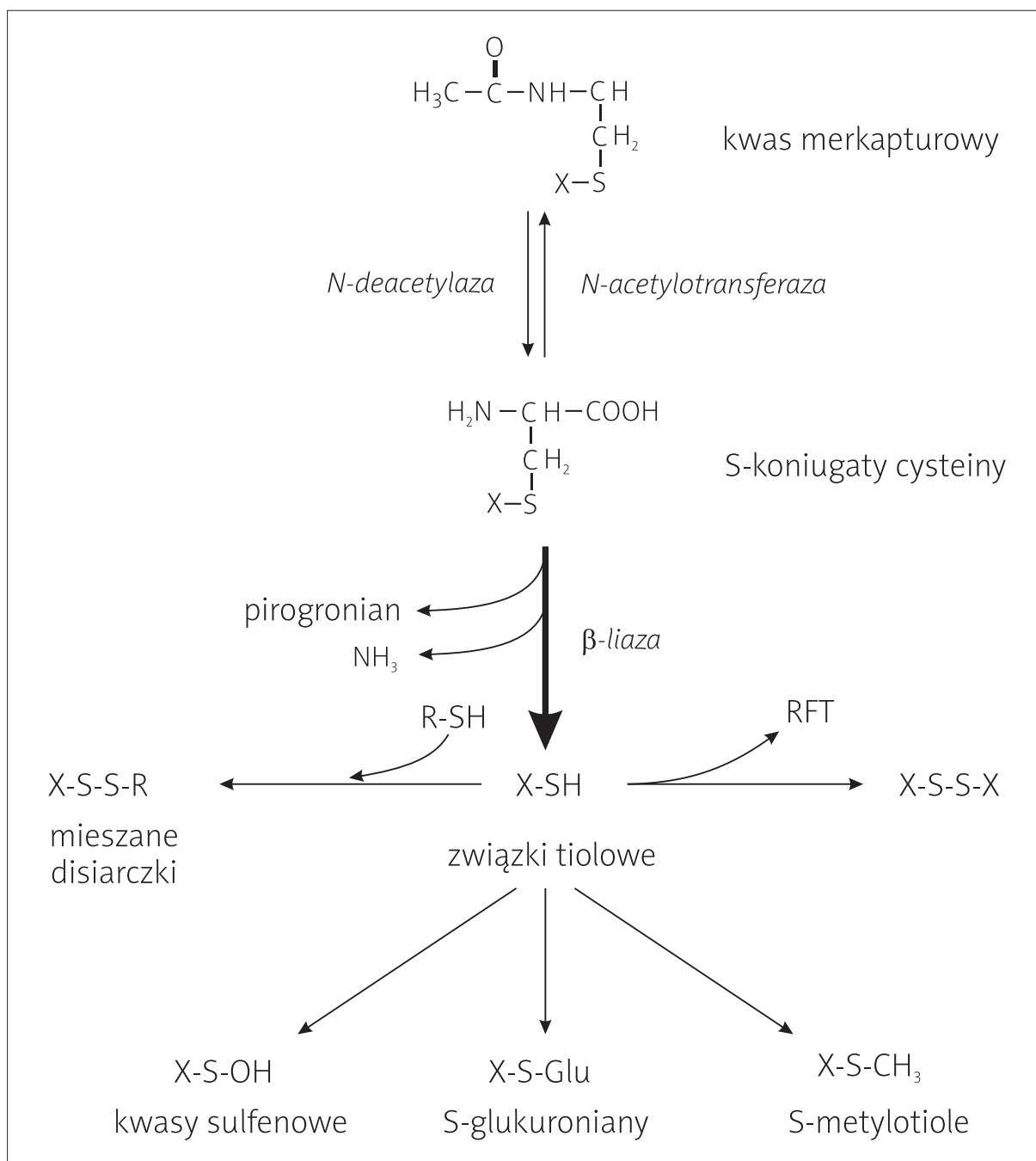
Warto wspomnieć, że utleniona postać tioredoksyny może być bezpośrednio zredukowana, podobnie jak GSSG, przez dihydroliponian (DHLA) [14].

Dobre i złe strony powstawania S-koniugatów glutationu

Reakcjami prowadzącymi do spadku stężenia komórkowego GSH są, oprócz reakcji z RFT, również reakcje po-

wstawiania S-koniugatów z toksycznymi, elektrofilnymi egzo- i endogennymi substancjami (GSX). Proces sprzęgnięcia z glutationem poprzedza mikrosomalna transformacja endo- lub egzogennej cząsteczki (ksenobiotyku) z udziałem cytochromu P-450. Są to tak zwane reakcje I fazy detoksykacji. Reakcje II fazy detoksykacji – to sprzęgnięcie, zmodyfikowanych w I fazie cząsteczek, najczęściej z GSH, a także z aktywnym kwasem glukuronowym (UDPGA), aktywnym kwasem siarkowym (PAPS), aktywnym kwasem octowym (acetylo-CoA), aktywną metioniną (SAM) oraz glicyną. Sens biologiczny tych przemian polega głównie na zwiększeniu hydrofilowości substancji w celu skutecznego wydalenia jej przez nerkę z moczem. Nie zawsze jednak, mimo że procesy te określa się powszechnie jako detoksykację, następuje zmniejszenie toksyczności, czasami nie ulega ona zmianie, a niekiedy może nawet nasilać się.

Reakcja powstawania S-koniugatów glutationu z elektrofilnymi cząsteczkami (GSX) może być nieenzymatyczna, jest jednak znacznie przyspieszana przez S-transferazy glutationowe [80]. Dalsza biodegradacja GSX przebiega, podobnie jak degradacja samego GSH, w cyklu γ -gluta-



Ryc. 8. Udział β -liazy w nefrotoksyczności S-koniugatów cysteiny związanej z uwalnianiem toksycznych tioli

mylowym i prowadzi ostatecznie do S-koniugatów cysteiny (CysSX) (ryc. 2).

Zdecydowana większość S-koniugatów cysteiny ulega następnie reakcji N-acetylowania z udziałem N-acetylotransferazy, przechodząc ostatecznie w nietoksyczne, wydalone z moczem, kwasy merkapturowe. Jednak niektóre S-koniugaty cysteiny, na przykład z chloropuryną, są rozkładane przez β -liazę z uwolnieniem pirogronianu, amoniaku i toksycznych dla komórek tioli (ryc. 8) [80].

Toksyczność ta jest szczególnie nasiloną w nerkach ze względu na dużą, zwłaszcza w kanalikach proksymalnych,

aktywność β -liazy, co prowadzi do uwalniania toksycznych, generujących RFT, tioli (ryc. 8). Opisano zwiększoną zapadalność na nowotwory, umiejscowione właśnie w kanalikach proksymalnych, osób narażonych zawodowo na działanie trichloroetyleny [39]. Nerki mają ponadto aktywność N-deacetylazy, enzymu antagonistycznego do N-acetylotransferazy. Umożliwia to przekształcanie w nerkach, powstających w wątrobie, merkapturanów z powrotem do S-koniugatów cysteiny, będących substratem β -liazy [57]. W tym przypadku, paradoksalnie, utworzenie połączenia ksenobiotyku z glutationem, mało że nie jest korzystne dla komórki, lecz przeciwnie może prowadzić do jej uszkodzenia, a nawet nowotworu. Ponadto prze-

miany tego typu prowadzą nieodwracalnie do utraty reszty cysteiny z glutationu, co pociąga za sobą uszczuplenie komórkowej puli GSH.

Natomiast w przypadku detoksykacji p-acetamidofenolu (popularny APAP), mikrosomalny metabolizm tego leku z udziałem cytochromu P-450 prowadzi do niezwykle toksycznej N-acetylo-p-benzochinonoiminy [80]. Przy niedoborze GSH ten toksyczny metabolit powoduje aryłację DNA i białek, modyfikację komórkowych grup tiolowych, nasilenie reakcji oksydacyjnych i w końcu nekrozy komórek wątroby. Natomiast przy dostatecznej podaży GSH N-acetylo-p-benzochinonoimina ulega sprzężeniu do S-koniugatu, z którego w następnych reakcjach poprzez CysSX i reakcje N-acetylacji powstaje nietoksyczny, wydalany z moczem kwas merkapturowy. W tym przypadku biotransformacja ksenobiotyku z udziałem GSH stanowi rzeczywisty proces detoksykacji. Oprócz opisanych istnieją jeszcze i takie sytuacje, kiedy powstający S-koniugat glutationu i ksenobiotyku wykazuje większą reaktywność i toksyczność niż substancja wyjściowa. Na przykład genotoksyczny, uszkadzający DNA, S-chlorometyloglutation, koniugat glutationu z dichlorometanem [39].

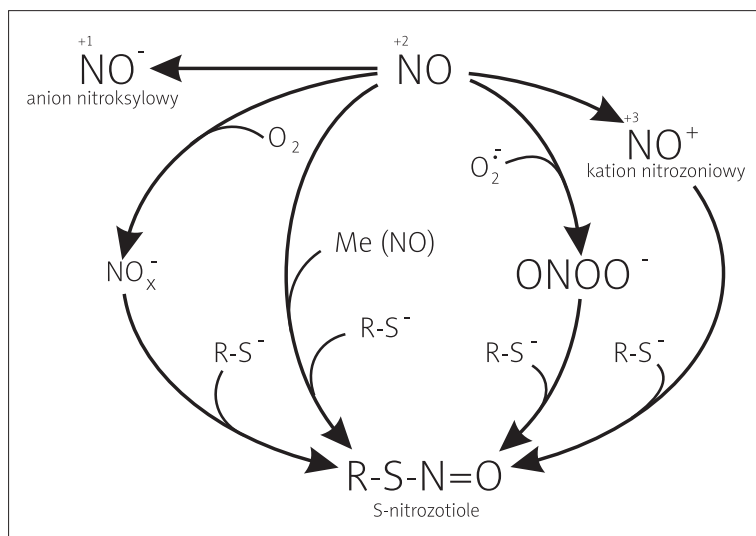
GSH tworzy również, jak już wspomniano, S-koniugaty z elektrofilnymi substancjami endogennymi. Są to głównie 4-hydroksynonenal (4-HNE) i 15-deoksy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandyna J_2 (15d-PGJ₂) – toksyczne i niebezpieczne dla komórki produkty peroksydacji lipidów. Na ogół więc sprzężenie tych związków z glutationem jest dla komórki korzystne. Należy jednak zauważyć, że połączenia te hamują ekspresję genów kodujących białka, które chronią komórkę przed stresem oksydacyjnym. Chodzi tu o geny kontrolowane przez tzw. rejon ARE (antioxidant response element). Niedostatecznie więc chroniona przed reaktywnymi formami tlenu komórka ulega uszkodzeniu i w konsekwencji apoptozie [38]. O ile w przypadku komórek prawidłowych jest to zjawisko dla organizmu niekorzystne, to w przypadku komórek nowotworowych wręcz przeciwnie. Zwiększanie poziomu białkowych i niebiałkowych antyutleniaczy chroniących komórkę przed apoptozą sprzyja transformacji nowotworowej komórek. Wykazano m.in. że dieta bogata w witaminę E sprzyja wzrostowi nowotworów wątroby myszy wywołanych podawaniem diety lornitrozoaminy na skutek zahamowanie apoptozy komórek rakowych [52].

Innym problemem, mającym również pewne odniesienie do chorób nowotworowych, jest powstawanie S-koniugatów GSH ze związkami z grupy glukozylnatów, czyli S-glukozydów pochodzenia roślinnego. Związki te w dużych ilościach występują w roślinach z rodziny *Brassicaceae* (czosnek, rzodkiew, gorczyca, brokuły, kapusta, a także pieprzycza peruwiańska, znana w Polsce jako maca). Związki te są wykorzystywane w ziołarstwie do produkcji leków stosowanych w zaburzeniach trawienia, obniżających ciśnienie krwi, a także bakterio- i grzybobójczych oraz przeciwwirusowych [34]. Glukozylnatom przypisuje się również działanie przeciwnowotworowe, chociaż w literaturze naukowej nie ma do tej pory dobrze udokumentowanych badań dotyczących tego problemu. Z GSH z udziałem S-transferazy glutationowej są sprzężane aglikony (głównie izotiocyjaniany allilu i butylu) glukozylnatów. Powstałe S-koniugaty są następnie z udziałem białek

MRP (multidrug resistant proteine) transportowane poza komórkę. Na zewnątrz komórki dochodzi do ich spontanicznej degradacji z uwolnieniem GSH i izotiocyjanianów. Izotiocyjaniany są ponownie transportowane do komórki i ponownie sprzężane z GSH. Powtarzanie tego cyklu skutkuje uszczupleniem komórkowej puli GSH i wzrostem stężenia toksycznych izotiocyjanianów uszkadzających strukturę i składniki komórki, co prowadzi do jej śmierci [38]. Zjawisko to, na pewno niekorzystne dla komórek prawidłowych, jest co najmniej obiecujące z punktu widzenia terapii nowotworów [59]. Problem ten, jak już wspomniano nie jest w chwili obecnej dobrze naukowo udokumentowany i na pewno wymaga dalszych, szczegółowych badań. Tym bardziej, że w literaturze popularnej i w opracowaniach firm produkujących i rozprowadzających preparaty zawierające glukozylnaty pogląd, że leki te są skuteczne w profilaktyce i leczeniu chorób nowotworowych jest wyrażany z dużą pewnością i zdecydowanie, co nie pozostaje bez wpływu na powszechną świadomość społeczną.

Kolejnym tematem związanym z GSH jest pojawianie się oporności na leki, co jest zjawiskiem zdecydowanie niekorzystnym w przypadku każdej terapii, w tym również w przebiegu leczenia chorób nowotworowych. Jedną z przyczyn pojawiania się w komórkach nowotworowych oporności na leki jest nadmierna aktywność „tandemu” GSH i S-transferazy glutationowa. Dzięki temu tworzące się S-koniugaty cytostatyków z GSH z udziałem S-transferazy glutationowej są szybko usuwane i degradowane, a lek zamiast leczyć jest coraz szybciej wydalany z komórek. Problemy te związane z funkcją GSH w terapii chorób nowotworowych będą omówione dokładniej w dalszej części artykułu.

S-koniugaty glutationu powstają także podczas syntezy leukotrienów cysteinylowych: LTC₄, LTD₄ i LTE₄. Ludzkie eozynofile, bazofile, mastocyty i makrofagi płucne mają zdolność przekształcania prekursorowego leukotrienu LTA₄ w macierzysty leukotrien cysteinylowy LTC₄, co następuje z udziałem LTC₄-syntazy [EC 4.4.1.20], enzymu sprzężającego leukotrien A₄ z glutationem, którego dalsza biodegradacja z udziałem γ GT i DP prowadzi do leukotrienów LTD₄ i LTE₄. Leukotrieny cysteinylowe odgrywają istotną rolę w patologii wielu chorób, a zwłaszcza w etiopatogenezie astmy oskrzelowej. U pacjentów chorych na astmę LTC₄ i LTD₄ są tysiącrotnie silniejszymi czynnikami kurczącymi mięśnie oskrzeli niż histamina [23]. W połowie lat dziewięćdziesiątych ub.w. pojawiły się leki antyleukotrienne, działające jako inhibitory receptorów leukotrienów cysteinylowych. Inhibitory te są do dzisiaj z powodzeniem stosowane w leczeniu osób z astmą oskrzelową. Najnowsze badania wskazują na możliwy udział leukotrienów cysteinylowych i ich receptorów także w patogenezie nowotworów [68]. Udowodniono również, że leukotrieny cysteinylowe zmniejszają przepływ wieńcowy u ludzi i zwierząt, co powoduje skurcz naczyń wieńcowych oraz działają inotropowo ujemnie [77]. Oznacza to, że leczenie antyleukotrienne mogłoby również wspomagać farmakoterapię chorób układu krążenia i chorób nowotworowych. Czy leki stosowane w leczeniu astmy mogłyby znaleźć zastosowanie również w onkologii i kardiologii? Czy może rolę takich leków mogłyby pełnić związki hamujące aktywność LTC₄-syntazy? W tym ostatnim przypadku na długiej li-



Ryc. 9. Powstawanie reaktywnych form azotu i S-nitrozotioili

ście różnorodnych funkcji glutationu, pojawiłaby się kolejna pozycja; wszak leukotrieny są przykładem połączeń powstających endogennie z udziałem GSH. W literaturze brak jest danych na ten temat, a tymczasem wydaje się, że ten kierunek badań wart jest uwagi.

Powstawanie i biodegradacja oraz biologiczna rola S-nitrozoglutationu

Postacią glutationu, która na przestrzeni ostatnich lat stała się interesującym obiektem badań związanych z tlenkiem azotu (NO) jest S-nitrozoglutation (GSNO). Zainteresowanie to zawdzięczamy pionierskim pracom Stamlera, który w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku po raz pierwszy zwrócił uwagę na endogenne S-nitrozotiole (SNT) [78]. S-nitrozotiole powstają w reakcji kationu nitrozowego (NO⁺) i innych reaktywnych form azotu (RFA) z anionami tiolanowymi (RS⁻) (ryc. 9) [1,78,81].

Do naturalnie występujących w komórkach niskocząsteczkowych S-nitrozotioili należą: S-nitrozoglutation, S-nitrozocysteina oraz S-nitrozohomocysteina. Fizjologiczne znaczenie SNT jest nie do końca poznane. Przyjmuje się, że endogennie powstające nisko- i wysokocząsteczkowe SNT, biorące udział w magazynowaniu i transporcie tlenu azotu, stanowią dominującą postać redoksową NO. Poza tym każda z reaktywnych form azotu w zależności od stężenia i stanu metabolicznego komórki może wykazywać działanie pożądane lub niepożądane. Niskocząsteczkowe SNT są substratami m.in. takich enzymów jak: reduktaza tioredoksyny, peroksydaza glutationowa, γ -glutamylotranspeptydaza i oksydaza ksantynowa [13,26]. Powstający endogennie NO może być magazynowany w postaci GSNO, a następnie z udziałem reduktazy tioredoksynowej ulegać homolitycznemu rozszczepieniu do NO i GSH [67].

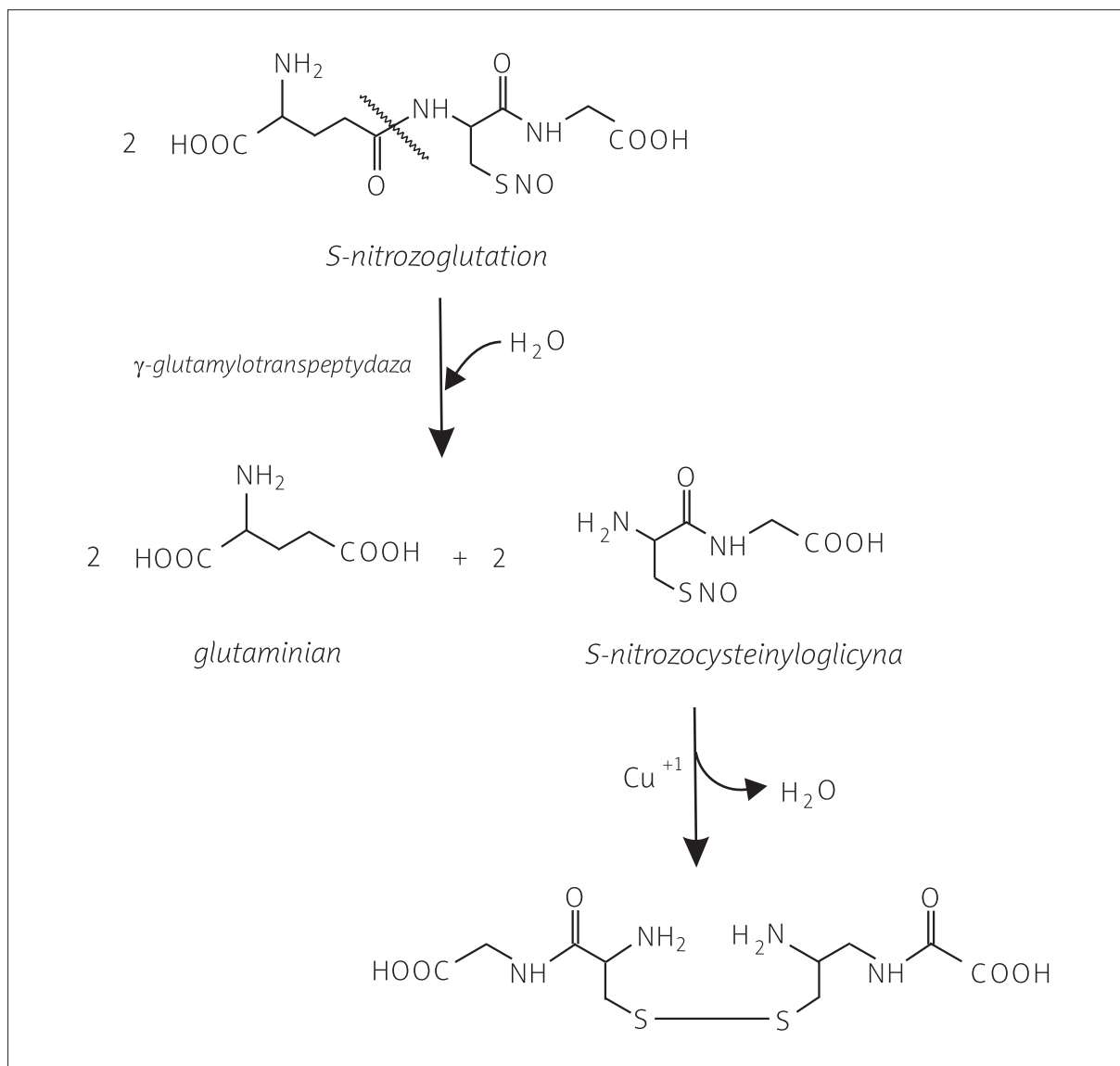


Do uwolnienia się NO z GSNO może również dochodzić pod wpływem peroksydazy glutationowej [44]. GSNO może być również substratem γ -glutamylotranspeptydazy, enzymu umiejscowionego po zewnętrznej stronie błony komórkowej (ryc. 10) [42]. Wykazano, że stała Michaelisa (K_M)

γ -glutamylotranspeptydazy w stosunku do GSNO ma podobną wartość, jak w stosunku do GSH [42]. Co ciekawe, enzymatyczna degradacja GSNO z udziałem błonowych enzymów γ GT i towarzyszącej jej peptydazie (DP) prowadzi do powstawania mało stabilnych SNT, tj. S-nitrozocysteinylicyny i S-nitrozocysteiny (CySNO) (ryc. 10).

Związki te w obecności Cu⁺ mogą łatwo uwalniać NO [1]. Enzym γ GT ma szczególne znaczenie w procesie biodegradacji GSNO w nerkach, ponieważ w tym narządzie jego aktywność jest około 900 razy większa niż w wątrobie [40]. Uwalnianie NO z niskocząsteczkowych SNT może następować również z udziałem dysmutazy ponadtlenkowej (CuZn-SOD) [48]. Możliwość enzymatycznego uwalniania NO z SNT oznacza, że w fizjologicznych warunkach może to następować bez niebezpieczeństwa powstawania rodników tyloowych (–S[•]). GSNO w przeciwieństwie do GSH z łatwością dyfunduje przez błony komórkowe. W związku z tym może być dla komórki zarówno źródłem GSH, jak i NO. GSNO jest postrzegany jako cząsteczka o właściwościach sygnałowych i regulacyjnych [16]. Wynika to głównie stąd, że związek ten należy do najsilniejszych aktywatorów cykazy guanylanowej, enzymu przekształcającego GTP w cGMP [55]. Dotychczas nie wyjaśniono jednak, czy endogenne GSNO per se aktywuje cyklazę guanylanową czy też aktywacja tego enzymu odbywa się poprzez uwalnianie tlenu azotu. Aktywacja cykazy guanylanowej prowadzi do zwiększenia diurezy, zahamowania sekrecji aldosteronu, zmniejszenia agregacji płytek oraz powoduje relaksację mięśni gładkich.

Istnieją również inne, niezależne od cGMP szlaki sygnałowe, poprzez które może GSNO wykazywać swoją aktywność biologiczną. Jednym z nich jest możliwość nitrozylacji grup sulfhydrylowych w białkach. Liczba poznanych białek, u których stwierdzono *in vivo* znitrozylowane reszty cystein wzrasta i już dziś uważa się, że ten rodzaj kowalencyjnej modyfikacji może być równie istotny jak fosforylacja [81]. Wśród białek ulegających S-nitrozylacji w warunkach fizjologicznych należy wymienić hemoglobinę, albuminy, liczne enzymy, czynniki transkrypcyjne, receptory i kanały jonowe [81]. Dla większości białek nitrozylacja grup –SH reszt cysteinowych powoduje zmniejszenie ich aktywno-

Ryc. 10. Udział γ GT i jonów Cu^{+1} w uwalnianiu NO z S-nitrozoglutationu (wg [1], zmodyfikowana)

ści. Inaktywacja za pośrednictwem S-nitrozylacji kaspazy 3 i proteaz cysteinylowych leży u podstaw neuroprotekcynowego działania GSNO [81]. Jednak inaktywacja w wyniku S-nitrozylacji np. enzymów biorących udział w naprawie uszkodzonego DNA może być przykładem niepożądanego działania S-nitrozoglutationu [82]. Ponadto GSNO w warunkach podwyższonego stresu oksydacyjnego nitrozylującego może się stać nośnikiem z cytoplazmy do jądra takich reaktywnych form azotu (RFA), jak NO^{\bullet} , NO^+ , NO^- , $ONOO^-$ i wówczas dodatkowo przyczynia się do wzrostu liczby uszkodzeń DNA [81]. Taka cytotoksyczność w stosunku do komórek nowotworowych byłaby ze wszelkich miar pożądana. Dlatego w tym miejscu należy wspomnieć o apoptozie, procesie w którym rola GSNO jest niejednoznaczna i zależna od stężenia. Zaobserwowano mianowicie, że w hodowli tymocytów GSNO w stężeniach poniżej 0,6 mM indukuje apoptozę komórek, podczas gdy w przedziale stężeń 1–2 mM hamuje apoptozę wywołaną działaniem takich czynników, jak: promieniowanie jonizujące, wysoka temperatura i nadtlenek wodoru [6].

Zaobserwowano również, że S-nitrozylacja białek może być etapem pośrednim w procesie powstawania mieszanych disiarczków białko-glutation (białko-S-S-glutation) ze wszystkimi tego konsekwencjami dla struktury i funkcji tak modyfikowanych białek [81].

S-nitrozoglutation wykazuje również działanie antyoksydacyjne [55]. Stwierdzono, że GSNO podany do substancji czarnej chroni neurony dopaminowe przed toksycznością indukowaną jonami żelaza, ponieważ zapobiega powstawaniu rodnika hydroksylowego i reakcji Fentona [55]. Działanie GSNO jest w tym przypadku 100 razy silniejsze niż działanie GSH [72].

Produktami biodegradacji GSNO w komórkach oprócz RFA (NO^{\bullet} , NO^+ , NO^- , $ONOO^-$) są również, powstające w cyklu γ -glutamylowym z udziałem γ GT i DP, S-nitrozocysteinyloglicyna i S-nitrozocysteina [81]. Każde z tych połączeń charakteryzuje się różnorodnym i szerokim zakresem biologicznej aktywności.

MODULOWANIE POZIOMU GSH W CELACH TERAPEUTYCZNYCH

Procesom patologicznym może towarzyszyć zarówno obniżenie, jak i wzrost stężenia GSH w określonych tkankach. Działanie mające na celu podwyższenie poziomu GSH jest korzystne we wszystkich tych stanach chorobowych, którym towarzyszy spadek stężenia GSH. Natomiast obniżenie poziomu GSH jest wskazane w komórkach nowotworowych w celu zwiększenia ich wrażliwości na chemio- i radioterapię, a także przy transplantacji narządów, w celu wywołania immunosupresji.

Strategie prowadzące do wzrostu poziomu GSH

Obniżenie poziomu GSH stwierdza się w przebiegu wielu schorzeń. Najlepiej udokumentowane obserwacje dotyczą chorób neurodegeneracyjnych (choroba Parkinsona, choroba Alzheimera), cukrzycy i powikłań cukrzycowych oraz chorób spowodowanych niedoborami immunologicznymi (np. AIDS) [84]. Poziom GSH obniża się także u ludzi w procesie starzenia się [4]. Bardzo często przyjmowanie określonych leków staje się również przyczyną spadku poziomu GSH [79]. Udowodniono, że w tych przypadkach działania powodujące wzrost stężenia GSH w komórkach mogą prowadzić do spowolnienia postępu choroby.

Do badanych możliwości podnoszenia poziomu GSH w komórkach należą: podawanie egzogenego GSH i jego pochodnych, nasilenie biosyntezy GSH poprzez podaż nietoksycznych prekursorów cysteiny oraz zwiększenie szybkości procesu redukcji GSSG.

Suplementacja GSH i jego pochodnych

Obecnie zainteresowanie koncernów farmaceutycznych samym glutationem jako lekiem jest nieduże, ponieważ uznaje się, iż doustnie podany GSH jest trawiony w przewodzie pokarmowym człowieka. Wiadomo również, że glutation nie przechodzi przez błony komórkowe oraz słabo przekracza barierę krew-mózg [55,79]. Istnieją jednak doniesienia, że doustne podanie tego peptydu u pacjentów z chorobą Parkinsona poprawiało ich stan [76]. Wykazano również, że doustna suplementacja GSH zapobiega degeneracji komórek jelita czczego oraz zwiększa szybkość usuwania nadtlenu lipidowych w enterocytach [5]. Mniej wątpliwości budzą monoestry glutationu (metylowy, etylowy i propylowy). Związki te ze względu na zwiększony charakter hydrofobowy są bez trudu transportowane przez błony komórkowe [80]. Należy jednak pamiętać, że estry te ulegają w komórkach hydrolizie nie tylko do GSH, ale także do toksycznego alkoholu (metanolu, etanolu, propanolu). Są również doniesienia o ich działaniu nefrotoksycznym [80].

Stymulacja biosyntezy GSH przez podawanie prekursorów cysteiny

Czynnikiem decydującym o szybkości biosyntezy glutationu jest dostępność cysteiny. Jednak ze względu na silne neurotoksyczne działanie, cysteina nie może być bezpośrednio podawana jako lek. Dlatego w celu wzrostu poziomu GSH poszukuje się nietoksycznych prekursorów cysteiny, wśród których najbardziej znanym i sprawdzonym jest N-acetylocysteina [80]. Naturalnym prekursorem cysteiny jest

metionina, której przemiany do cysteiny wymagają jednak udziału ATP. Tymczasem pozyskiwanie cysteiny w sposób energetycznie kosztowny jest dla komórek dotkniętych stanem patologicznym dodatkowo niekorzystne. Jako prekursor cysteiny może być również stosowany kwas 2-okso-tiazolidyno-4-karboksyłowy (OTC), jednak i w tym przypadku enzymatyczne przemiany tego związku do cysteiny wymagają udziału ATP. Ponadto OTC może ulegać przemianie do cysteiny tylko w komórkach zawierających enzym 5-oksoprolinazę [EC 3.5.2.9] [46,80].

Kolejną grupą związków są pochodne cysteiny z zablokowaną grupą karboksylową (amidy i estry), dipetydy cysteiny lub N-alkilowe pochodne tego aminokwasu. Związki te mogą jednak, ze względu na obecność grupy tiolowej, spontanicznie utleniać się do disiarczoków, a to stwarza niebezpieczeństwo generowania RFT i peroksydacyjnych uszkodzeń. Dlatego duże zainteresowanie budzą obecnie, „pozbawione” potencjalnie niebezpiecznej grupy tiolowej, tiazolidynowe pochodne cysteiny. Powstają one w procesie kondensacji cysteiny z różnymi związkami karbonyłowymi. Badania wykazały wzrost poziomu GSH w komórkach wątroby, utrzymujący się powyżej 12 godzin po podaniu produktów kondensacji cysteiny z rybozą, glukozą i pirogronianem [80,83].

Zupełnie inną strategią terapeutyczną mogąą również prowadzić do wzrostu poziomu cysteiny jest zahamowanie biosyntezy białek. Pozwala to na „zaoszczędzenie” cysteiny i skierowanie jej na szlak biosyntezy GSH. Udowodniono, że inhibitory biosyntezy białek, takie jak aktynomycyna i cykloheksimid chronią komórki przed stresem oksydacyjnym wywołanym promieniowaniem jonizującym oraz wykazują działanie antyapoptotyczne [24].

O szybkości biosyntezy GSH decyduje również aktywność enzymów biorących udział w jego biosyntezie. Wykazano, że w procesie starzenia się spadek poziomu GSH w tkankach jest skorelowany z obniżeniem aktywności syntetazy γ -glutamylcysteiny w korze mózgu, sercu, wątrobie i soczewkach badanych zwierząt [4]. Dlatego pierwsze, udane próby zwiększenia aktywności katalitycznej tego enzymu metodą transferu genu, otwierają nowe możliwości leczenia i zapobiegania wielu chorobom [80].

Redukcja GSSG

Obniżenie stężenia GSH może być także wynikiem jego udziału w reakcjach z utleniaczami w sytuacjach nasilonego stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego. W tych warunkach następuje również spadek stężenia antyoksydantów egzogenych, dostarczanych do organizmu z pożywieniem. Wyniki wielu badań wskazują, że podawanie witamin i innych związków o działaniu przeciwutleniającym wspomaga utrzymanie wysokiego stężenia GSH i zwiększa całkowitą moc antyoksydacyjną organizmu. Wykazano m.in., że witaminy C i E oraz β -karoten chronią neurony przed neurotoksycznym działaniem, znanej egzogennej toksyny, MPTP (1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyny) [2]. Udowodniono również, że utleniona postać witaminy C, dehydroaskorbinian podnosi poziom GSH, co najprawdopodobniej następuje poprzez stymulację aktywności enzymów cyklu pentozowego (dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, dehydrogenazy 6-fosfoglukoniano-

wej i transaldolazy), będącego głównym źródłem NADPH, a to umożliwia redukcję GSSG do GSH z udziałem reduktazy glutationowej [7].

W ostatniej dekadzie poważnie wzrosła liczba prac dotyczących antyoksydacyjnych właściwości, endogennego, będącego koenzymem w reakcjach katalizowanych przez dehydrogenazy α -ketokwasów, kwasu 6,8-ditioktanowego, znanego jako kwas α -liponowy (LA). Ze względu na niemal najniższą, wśród biologicznych układów redox, wartość standardowego biologicznego potencjału oksydacyjno-redukcyjnego E_0' układu liponian/dihydroliponian (LA/DHLA) – niższą wartość E_0' ma jedynie układ NAD(P)/NAD(P)H; tabela 1) – DHLA wykazuje możliwość redukcji utlenionych form pozostałych antyoksydantów, w tym również GSSG. Z tego powodu kwas liponowy nazywany jest antyoksydantem antyoksydantów [11,69]. W licznych badaniach podstawowych i klinicznych wykazano korzystny wpływ podawania kwasu liponowego w przebiegu takich schorzeń jak: cukrzyca, neuropatia cukrzycowa, zaćma, miażdżycy i choroby układu krążenia, choroby neurodegeneracyjne, choroby wątroby oraz AIDS [10,11,58,69]. W badaniach zarówno *in vitro* jak i *in vivo* kwas liponowy powoduje wzrost stężenia GSH, witaminy C oraz witaminy E [11,58]. Wykazano również stymulujący wpływ LA na aktywność peroksydazy glutationu, katalazy oraz reduktazy askorbinianowej w soczewce, na zwierzęcym, indukowanym BSO modelem katarakty [11,58]. Stwierdzono również, że zdolność LA i jego zredukowanej postaci – kwasu dihydroliponowego (DHLA) – do reakcji z reaktywnymi formami tlenu – ROS jest porównywalna z glutationem [58].

Strategie prowadzące do obniżania stężenia glutationu w komórkach

Obniżenie stężenia GSH jest wskazane do wywołania krótkotrwałej immunosupresji w powiązaniu z transplantacją narządów, a także w komórkach nowotworowych. Problemem klinicznym związanym z terapią nowotworów jest zbyt mała wrażliwość komórek nowotworowych na radio- i chemioterapię. Natomiast możliwość stosowania wyższych dawek promieniowania i większych dawek leków jest ograniczona ze względu na toksyczność w stosunku do komórek prawidłowych. Jedną z przyczyn oporności komórek nowotworowych na leki i promieniowanie jest to, że komórki te charakteryzują się znacznie wyższym poziomem GSH oraz większą aktywnością γ GT i STG niż komórki prawidłowe [37,66]. Dlatego w celu zwiększenia skuteczności i bezpieczeństwa terapii w chorobach nowotworowych należałoby opracować metody pozwalające, w najbardziej idealnym przypadku, na obniżenie stężenia GSH w komórkach nowotworowych, przy jednoczesnym zwiększeniu jego stężenia w komórkach prawidłowych. Uzyskanie takich efektów jest możliwe przez wykorzystanie istniejących różnic metabolicznych i genetycznych, jakie występują między komórkami prawidłowymi i nowotworowymi. Wśród najbardziej istotnych różnic enzymatycznych wymienia się: całkowity brak lub śladową aktywność w komórkach nowotworowych γ -cystationazy oraz zmniejszoną aktywność dehydrogenaz aldehydowych i 5-okso prolinazy. Wykazano również, że zastosowanie butioninosulfoksiminy (BSO), inhibitora biosyntezy GSH nie prowadzi do zauważalnych następstw fizjologicznych w komórkach zdrowych, natomiast zwiększa wrażliwość na chemio- i ra-

dioterapię komórek nowotworowych. Mechanizm tego zjawiska nie jest jeszcze dokładnie poznany. Wiadomo jednak, że w komórkach prawidłowych wartości stałych Michaelisa (K_M) enzymów zależnych od GSH są bardzo małe (średnio poniżej 1 mM). Dzięki temu nawet w warunkach bardzo znacznego spadku poziomu GSH, dochodzącego nawet do 70%, enzymy te w dalszym ciągu działają z prędkościami zbliżonymi do prędkości maksymalnej [7]. Strategie terapeutyczne w przebiegu nowotworów powinny sprawdzać się więc do jednoczesnego stosowania cytostatyków i inhibitorów biosyntezy glutationu z jednoczesną podażą związków mogących selektywnie podnosić poziom GSH w komórkach prawidłowych. Postępowanie takie miałyby na celu selektywne obniżenie poziomu glutationu w komórkach nowotworowych w celu osłabienia detoksykacji cytostatyków oraz obrony antyoksydacyjnej, a w konsekwencji zwiększenia skuteczności leczenia. Jednoczesny wzrost poziomu glutationu w komórkach prawidłowych pozwoliłby natomiast na zmniejszenie działań niepożądanych radio- i chemioterapii. Po raz pierwszy, próby selektywnego modulowania stężeń glutationu w komórkach z użyciem BSO zostały podjęte ponad 20 lat temu przez Meistera i wsp [63]. Dzisiaj badania kliniczne nad zastosowaniem BSO w terapii pacjentów z chorobami nowotworowymi są prowadzone w bardzo wielu ośrodkach na całym świecie. W badaniach prowadzonych w naszym zespole wykazano selektywny wpływ cystationiny, na metabolizm komórek nowotworowych i zdrowych. Cystationina mianowicie chroni komórki wątroby przed toksycznością cytostatyków, natomiast nie wykazuje takiego działania w komórkach raka wąsiekowego Ehrlicha [53].

Mimo jednak licznych badań i ogromnego zainteresowania możliwościami farmakologicznej regulacji poziomu GSH w komórkach ciągle bardzo trudno na podstawie poznanych mechanizmów regulacji biosyntezy GSH precyzyjnie zaprogramować oczekiwane zmiany w poziomie tego tripeptydu. Trudności te są związane z tym, że do tej pory znacznie mniej poznano mechanizmy regulujące procesy wykorzystywania GSH w komórkach. Ponadto poszczególne tkanki i przestrzenie subkomórkowe charakteryzują się zróżnicowanymi stężeniami tioli, a poszczególne prekursorzy cysteiny i glutationu wykazują różne możliwości transportu przez błony komórkowe i subkomórkowe. Wszystko wskazuje jednak, że prowadzone w tym zakresie badania idą w dobrym kierunku, albowiem każdy dzień przynosi nowe, dające nadzieję informacje.

PODSUMOWANIE

Glutation, tripeptyd zbudowany z glutaminianu, cysteiny i glicyny jest najbardziej rozpowszechnionym niskocząsteczkowym związkiem tiolowym w przyrodzie. W tkankach organizmu ludzkiego glutation występuje w kilku postaciach redoksowych, z których każda charakteryzuje się różnorodnym i szerokim zakresem biologicznej aktywności. Glutation zredukowany jest najważniejszym elementem systemu antyoksydacyjnego chroniącego komórki przed działaniami reaktywnych form tlenu. Jako antyoksydant glutation:

- redukuje RFT w enzymatycznych i nieenzymatycznych reakcjach;
- regeneruje inne, utlenione, drobnocząsteczkowe antyoksydanty, takie m.in. jak witamina C i witamina E;

- bierze udział w naprawie cząsteczek białek, kwasów nukleinowych i lipidów, uszkodzonych w procesie peroksydacyjnych;
- utrzymuje grupy tiolowe białek w stanie zredukowanym.

Ponadto glutation bierze udział w procesach łańdowania i ubikwitynylacji białek, detoksyfikacji ksenobiotyków, w syntezie leukotrienów cysteinylowych oraz w powstawaniu deoksyrybonukleotydów z rybonukleotydów. Glutation odgrywa również istotną rolę w regulacji aktywności szlaków metabolicznych oraz procesów wzrostu i różnicowania komórek, co następuje poprzez:

- redoksowe mechanizmy transdukcji sygnału;

- odwracalną, kowalencyjną modyfikację białek w procesie glutationylacji oraz w procesie S-nitrozylacji.

Obniżenie stężenia glutationu stwierdza się w przebiegu wielu schorzeń. Są to m.in. choroby neurodegeneracyjne, cukrzyca oraz AIDS. Wykazano, że w tych przypadkach leczenie, prowadzące do wzrostu stężenia GSH łagodzi przebieg choroby i spowalnia jej postęp.

Z kolei selektywne obniżenie poziomu GSH jest wskazane w komórkach nowotworowych w celu zwiększenia skuteczności chemio- i radioterapii, a także – w celu wywołania krótkotrwałej immunosupresji – przy transplantacji narządów.

PIŚMIENICTWO

- [1] Al-Sa'doni M., Ferro A.: S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. *Clin. Sci.*, 2000; 98: 507–520
- [2] Antkiewicz-Michaluk L.: Perspektywy badań nad lekami przeciwparkinsonowskimi. W: *Neuropsychofarmakologia. Dziś i jutro*, red.: M. Bijak, W. Lasoń. Instytut Farmakologii PAN, Kraków, 2000; 235–262
- [3] Augusto O., Radi R.: Peroxynitrite reactivity: free radical generation, thiol oxidation and biological significance. W: *Biothiols in health and disease*, red.: L. Packer, Cadenas E. Macel Dekker, New York, Basel, Hong Kong, 1995, 83–116
- [4] Augustyniak A., Skrzydlewska E.: Zdolności antyoksydacyjne w starzejącym się organizmie. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 194–201
- [5] Aw T.Y.: Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005; 204: 320–328
- [6] Bartosz G.: Rola reaktywnych form tlenu w apoptozie. *Post. Biochem.*, 1998; 44: 22–31
- [7] Bartosz G.: *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003
- [8] Beatty P.W., Reed D.J.: Involvement of the cystathionine pathway in the biosynthesis of glutathione by isolated rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1980; 204: 80–87
- [9] Bharti A.C., Aggarwal B.B.: Nuclear factor- κ B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem. Pharmacol.*, 2002; 64: 883–888
- [10] Biewenga G.P., Haenen G.R., Bast A.: The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen. Pharmacol.*, 1997; 29: 315–331
- [11] Biłska A., Włodek L.: Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacol. Rep.*, 2005; 57: 570–577
- [12] Biswas S., Chida A.S., Rahman I.: Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochem. Pharmacol.*, 2006; 71: 551–564
- [13] Broillet M.C.: S-nitrosylation of proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1999; 55: 1036–1042
- [14] Bunik V., Follmann H.: Thioredoxin reduction dependent on α -ketoacid oxidation by α -ketoacid dehydrogenase complexes. *FEBS Lett.*, 1993; 336: 197–200
- [15] Cherian M., Smith J.B., Jiang X.Y., Abraham E.C.: Influence of protein-glutathione mixed disulfide on the chaperone-like function of α -crystallin. *J Biol Chem.*, 1997; 272: 9099–9103
- [16] Chiueh C.C., Rauhala P.: The redox pathway of S-nitrosoglutathione, glutathione and nitric oxide in cell to neuron communications. *Free Radic. Res.*, 1999; 31: 641–650
- [17] Chu F., Ward N.E., O'Brian C.A.: PKC isozyme S-cysteinylation by cystine stimulates the pro-apoptotic isozyme PKC δ and inactivates the oncogenic isozyme PKC epsilon. *Carcinogenesis*, 2003; 24: 317–325
- [18] Ciechanover A.: The ubiquitin proteolytic system and pathogenesis of human diseases: a novel platform for mechanism-based drug targeting. *Biochem. Soc. Trans.*, 2003; 31: 474–481
- [19] Cooper A.J., Kristal B.S.: Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol. Chem.*, 1997; 378: 793–802
- [20] Cotgreave I.A., Gerdes R.G.: Recent trends in glutathione biochemistry – glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998; 242: 1–9
- [21] Davis D.A., Dorsey K., Wingfield P.T., Stahl S.J., Kaufman J., Fales H.M., Levine R.L.: Regulation of HIV-1 protease activity through cysteine modification. *Biochemistry*, 1996; 35: 2482–2488
- [22] del Bello B., Paolicchi A., Comporti M., Pompella A., Maellaro E.: Hydrogen peroxide produced during gamma-glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. *FASEB J.*, 1999; 13: 69–79
- [23] Drazen J.M.: Leukotrienes as mediators of airway obstruction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998; 158: S193–S200
- [24] Ferrer I.: The effect of cycloheximide on natural and X-ray-induced cell death in the developing cerebral cortex. *Brain Res.*, 1992; 588: 351–357
- [25] Fuchs J.A.: Glutathione mutants. *Methods Enzymol.*, 1995; 252: 83–92
- [26] Gaston B.: Nitric oxide and thiol groups. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1411: 323–333
- [27] Gething M.J., Sambrook J.: Protein folding in the cell. *Nature*, 1992; 355: 33–45
- [28] Ghibelli L., Fanelli C., Rotilio G., Lafavia E., Coppola S., Colussi C., Civitareale P., Ciriolo M.R.: Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J.*, 1998; 12: 479–486
- [29] Gilbert H.F.: Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 1990; 63: 69–172
- [30] Gilbert H.F.: Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability. *Methods Enzymol.*, 1995; 251: 8–28
- [31] Giustarini D., Rossi R., Milzani A., Colombo R., Dalle-Donne I.: S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J. Cell Mol. Med.*, 2004; 8: 201–212
- [32] Groll M., Ditzel L., Lowe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H.D., Huber R.: Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, 1997; 386: 463–471
- [33] Guo N., McIntosh C., Shaw C.: Glutathione: new candidate neuropeptide in the central nervous system. *Neuroscience*, 1992; 51: 835–842
- [34] Halkier B.A., Gershenzon J.: Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2006; 57: 303–333
- [35] Hall A.G.: Glutathione and the regulation of cell death. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1999; 457: 199–203
- [36] Hall A.G.: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1999; 29: 238–245
- [37] Hanigan M.H., Gallagher B.C., Townsend D.M., Gabarra V.: γ -glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin *in vivo*. *Carcinogenesis*, 1999; 20: 553–559
- [38] Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R.: Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2005; 45: 51–88
- [39] Henschler D., Vamvakas S., Lammert M., Dekant W., Kraus B., Thomas B., Ulm K.: Increased incidence of renal cell tumors in a cohort of cardboard workers exposed to trichloroethene. *Arch. Toxicol.*, 1995; 69: 291–299
- [40] Hinchman C.A., Ballatori N.: Glutathione-degrading capacities of liver and kidney in different species. *Biochem. Pharmacol.*, 1990; 40: 1131–1135
- [41] Ho E., Chen G., Bray T.M.: Supplementation of N-acetylcysteine inhibits NF κ B activation and protects against alloxan-induced diabetes in CD-1 mice. *FASEB J.*, 1999; 13: 1845–1854

- [42] Hogg N., Singh R.J., Konorev E., Joseph J., Kalyanaraman B.: S-Nitrosogluthatione as a substrate for γ -glutamyl transpeptidase. *Biochem. J.*, 1997; 323: 477–481
- [43] Holmgren A.: Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 13963–13966
- [44] Hou Y., Guo Z., Li J., Wang P.G.: Seleno compounds and glutathione peroxidase catalyzed decomposition of S-nitrosothiols. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1996; 228: 88–93
- [45] Hwang C., Sinskey A.J., Lodish H.F.: Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*, 1992; 257: 1496–1502
- [46] Jain A., Madsen D.C., Auld P.A., Frayer W.W., Schwartz M.K., Meister A., Martensson J.: L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate, a cysteine precursor, stimulates growth and normalizes tissue glutathione concentrations in rats fed a sulfur amino acid-deficient diet. *J. Nutr.*, 1995; 125: 851–856
- [47] Janaky R., Ogita K., Pasqualotto B.A., Bains J.S., Oja S.S., Yoneda Y., Shaw C.A.: Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS. *J. Neurochem.*, 1999; 73: 889–902
- [48] Jourd'heuil D., Laroux F.S., Miles A.M., Wink D.A., Grisham M.B.: Effect of superoxide dismutase on the stability of S-nitrosothiols. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999; 361: 323–330
- [49] Jurgowiak M., Białkowski K., Oliński R.: Reaktywne formy tlenu a regulacja ekspresji genów. *Post. Biochem.*, 1996; 42: 6–13
- [50] Keyse S.M., Emslie E.A.: Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature*, 1992; 359: 644–647
- [51] Klatt P., Lamas S.: Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 4928–4944
- [52] Kolaja K.L., Klaunig J.E.: Vitamin E modulation of hepatic focal lesion growth in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997; 143: 380–387
- [53] Kwiecień I., Michalska M., Włodek L.: The selective effect of cystathionine on doxorubicin hepatotoxicity in tumor-bearing mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 2006; 550: 39–46
- [54] Lenartowicz E., Wudarczyk J., Dębska G.: Regulacja stopnia oksydo-redukcji grup tiolowych w komórkach zwierzęcych. *Post. Biochem.*, 1996; 42: 154–161
- [55] Lorenc E.: Glutation. Metabolizm i biologiczna rola w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). W: *Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii*, red.: L. Włodek. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2003, 163–212
- [56] Lundström-Ljung J., Holmgren A.: Glutaredoxin accelerates glutathione-dependent folding of reduced ribonuclease A together with protein disulfide-isomerase. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 7822–7828
- [57] Luu N.C., Iyer R.A., Anders M.W., Ridge D.P.: Bioactivation mechanisms of haloalkene cysteine S-conjugates modeled by gas-phase, ion-molecule reactions. *Chem. Res. Toxicol.*, 2000; 13: 610–615
- [58] Malińska D., Winiarska K.: Kwas liponowy – charakterystyka i zastosowanie w terapii. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 535–543
- [59] Manesh C., Kuttan G.: Effect of naturally occurring allyl and phenyl isothiocyanates in the inhibition of experimental pulmonary metastasis induced by B16F-10 melanoma cells. *Fitoterapia*, 2003; 74: 355–363
- [60] Mattson M.P., Goodman Y., Luo H., Fu W., Furukawa K.: Activation of NF- κ B protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J. Neurosci. Res.*, 1997; 49: 681–697
- [61] Meister A.: Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacol. Ther.*, 1991; 51: 155–194
- [62] Meister A.: On the discovery of glutathione. *Trends Biochem. Sci.*, 1988; 13: 185–188
- [63] Meister A.: Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 1983; 220: 472–477
- [64] Meister A., Anderson M.E.: Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, 1983; 52: 711–760
- [65] Meyer M., Schreck R., Baeuerle P.A.: H_2O_2 and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.*, 1993; 12: 2005–2015
- [66] Montironi R., Mazzucchelli R., Stramazzotti D., Pomante R., Thompson D., Bartels P.H.: Expression of π -class glutathione S-transferase: two populations of high grade prostatic intraepithelial neoplasia with different relations to carcinoma. *Mol. Pathol.*, 2000; 53: 122–128
- [67] Nikitovic D., Holmgren A.: S-nitrosogluthatione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 19180–19185
- [68] Ohd J.F., Nielsen C.K., Campbell J., Landberg G., Lofberg H., Sjolander A.: Expression of the leukotriene D4 receptor CysLT1, COX-2, and other cell survival factors in colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 2003; 124: 57–70
- [69] Packer L., Witt E.H., Tritschler H.J.: α -Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.*, 1995; 19: 227–250
- [70] Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F.: Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta*, 2003; 333: 19–39
- [71] Poot M., Teubert H., Rabinovitch P.S., Kavanagh T.J.: *De novo* synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. *J. Cell. Physiol.*, 1995; 163: 555–560
- [72] Rauhala P., Mohanakumar K.P., Sziraki I., Lin A.M., Chiueh C.C.: S-nitrosothiols and nitric oxide, but not sodium nitroprusside, protect nigrostriatal dopamine neurons against iron-induced oxidative stress *in vivo*. *Synapse*, 1996; 23: 58–60
- [73] Richman P.G., Meister A.: Regulation of γ -glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.*, 1975; 250: 1422–1426
- [74] Schreck R., Albermann K., Baeuerle P.A.: Nuclear factor κ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic. Res. Commun.*, 1992; 17: 221–237
- [75] Schwaller M., Wilkinson B., Gilbert H.F.: Reduction-reoxidation cycles contribute to catalysis of disulfide isomerization by protein-disulfide isomerase. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 7154–7159
- [76] Sechi G., Deledda M.G., Bua G., Satta W.M., Deiana G.A., Pes G.M., Rosati G.: Reduced intravenous glutathione in the treatment of early Parkinson's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 1996; 20: 1159–1170
- [77] Sokołowska M., Kowalski M.L., Pawliczak R.: Receptory leukotrienu cysteinylowych. *Post. Biochem.*, 2004; 50: 131–143
- [78] Stamler J.S.: S-nitrosothiols and the bioregulatory actions of nitrogen oxides through reactions with thiol groups. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1995; 196: 19–36
- [79] Winiarska K.: Glutation: niezwykle funkcje pospolitego peptydu. *Post. Biochem.*, 2000; 46: 318–326
- [80] Włodek L.: Glutation. Antyoksydacyjne i detoksykacyjne właściwości, biologiczna i farmakologiczna regulacja biosyntezy. W: *Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii*, red.: L. Włodek. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2003, 111–160
- [81] Włodek L.: Udział tioli w biologicznej roli tlenu azotu. W: *Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii*, red.: L. Włodek. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2003, 285–330
- [82] Włodek L., Iciek M.: S-tiolacja białek jako mechanizm antyoksydacyjny i regulacyjny. *Post. Biochem.*, 2003; 49: 77–84
- [83] Włodek L., Rommelspacher H.: 2-Methyl-thiazolidine-2,4-dicarboxylic acid protects against paracetamol induced toxicity in human liver derived HepG2 cells. *Acta Biochim. Pol.*, 1997; 44: 759–766
- [84] Wu G., Fang Y.Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N.D.: Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.*, 2004; 134: 489–492
- [85] Wu H., Lozano G.: NF- κ B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 20067–20074