

Bożena Bukowska

FUNKCJE GLUTATIONU ORAZ CZYNNIKI ZMNIEJSZAJĄCE JEGO STĘŻENIE

GLUTATHIONE FUNCTIONS AND FACTORS DECREASING ITS CONCENTRATION

Z Katedry Biofizyki Skażeń Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego**STRESZCZENIE**

Glutation jest głównym komórkowym tiolem uczestniczącym w komórkowych reakcjach redoks. Artykuł odpowiada na pytanie: Co to jest GSH? Jakie ma zadania? Jakże są formy GSH i jaka jest ich rola w komórkach i organizmach. Jaki wpływ na stężenie GSH mają wybrane ksenobiotyki. Med. Pr., 2005;56(1):69–80

Słowa kluczowe: glutation, formy GSH, ksenobiotyki

ABSTRACT

Glutathione (GSH) is the major cellular thiol participating in cellular redox reactions. This paper answers two questions: GSH – what is it? What does it do? It also describes its forms, the role it plays in cells and organisms, and the effect of xenobiotics on GSH concentration. Med Pr 2005;56(1):69–80

Key words: glutathione, GSH forms, xenobiotics

Adres autorki: St. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, e-mail:bukow@biol.uni.lodz.pl

Nadesłano: 29.10.2004

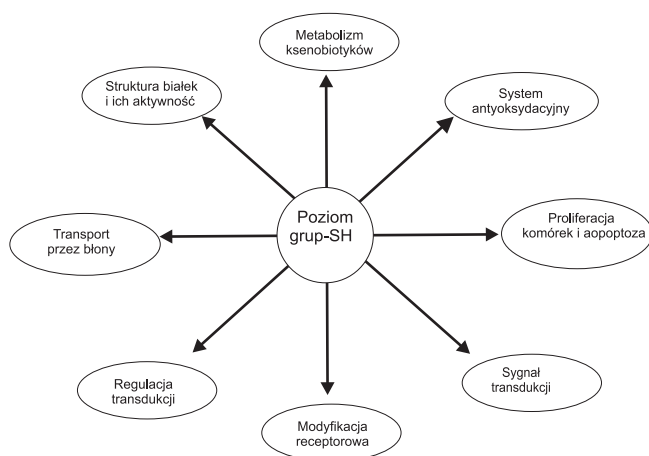
Zatwierdzono: 7.01.2005

© 2005, Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi

WSTĘP

Przez pojęcie antyoksydacji (przeciwtleniania) rozumie się opóźnienie lub hamowanie reakcji utleniania jakiegoś związku przez czynniki występujące w niskim stężeniu, w porównaniu z substancją utlenianą. Do najważniejszych przeciwtleniaczy ustrojowych należą: glutation (GSH) i askorbinian, a także albumina, cysteina, kwas moczowy, karnozyna, kreatynina, flawonoidy, kwas fitynowy, melaniny, α -tokoferol (witamina E), β -karoten, bilirubina, biliwerdyna, ksantofile czy koenzym Q (1). Szczególną rolę w ochronie antyoksydacyjnej odgrywają grupy $-SH$ (2,3) (ryc. 1). Reaktywne grupy $-SH$ obecne są w białkach składnikach wielu struktur komórkowych, a także występują jako elementy niskocząsteczkowych związków, takich jak: glutation, cysteina, homocysteina, koenzym Q, WS-coenzym A.

W grupie drobnocząsteczkowych hydrofilowych antyoksydantów na szczególną uwagę zasługuje glutation ze względu na swoją wielofunkcyjność. Glutation unieszkodliwia reaktywne formy tlenu (RFT), chroni grupy tiolowe białek przed nieodwracalną inaktywacją wywołaną przez RFT (4). Ponadto glutation pełni wiele funkcji w naszym organizmie, m.in. niezwiązanych z obroną antyoksydacyjną. Bierze udział w detoksykacji związków elektrofilowych, w metabolizmie leukotrienów i prostaglandyn, re-



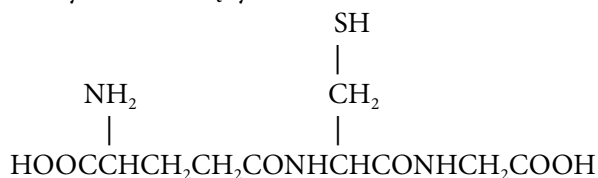
Ryc. 1. Znaczenie grup $-SH$ w metabolizmie komórkowym (3).

dukuje kwas dehydroaskorbinowy do kwasu askorbinowego, uczestniczy w redukcji methemoglobiny, jest formą transportu cysteiny, wpływa na aktywność enzymów glikolizy. GSH może być ważny w procesie wchłaniania żelaza (5) i mikroelementów, takich jak selen (6).

BUDOWA I FORMY GLUTATIONU

Glutation zredukowany jest głównym, niskocząsteczkowym związkiem tiolowym, powszechnie występu-

jącym we wszystkich komórkach eukariotycznych roślinnych i zwierzęcych.



Glutation zredukowany

(γ -glutamyl-cysteinyl-glicyna, -GSH)

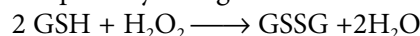
Glutation po raz pierwszy został odkryty przez de Rey-Pailhadé'a w 1888 r. (7) i początkowo nazwany filotionem ze względu na powinowactwo do grup tiolowych (*philo* = kochać i *thion* = grupy tiolowe w języku greckim). Następnie Hopkins stwierdził obecność filotionu w mięśniach i wątrobie oraz wykazał, że składa się on z cysteiny i kwasu glutaminowego (8). Pod koniec 1921 r. Hopkins zmienił nazwę filotionu na glutation. Kilka lat później w 1929 r. Hopkins i Kendall (9,10) odkryli, że glutation jest trójaminokwasowym peptydem i zawiera jeszcze glicynę (Glu-Cys-Gly).

Stężenie wewnątrzkomórkowego glutationu jest swoiste dla danego typu komórek i waha się w granicach od 5 do 10 mmol/l. W typowej komórce glutation występuje w cytoplazmie, mitochondriach i jądrze w wysokich stężeniach, jedynie w siateczce śródplazmatycznej stężenie jego jest znacznie niższe, osiąga tylko 2 mmol/l (11).

Cząsteczka glutationu charakteryzuje się dwoma osobliwościami w strukturze, które wpływają na efektywność jej działania. Po pierwsze, zamiast typowego wiązania peptydowego między grupą aminową ($-\text{NH}_2$) cysteiny i grupą α -karboksylową ($-\text{COOH}$) kwasu glutaminowego, tworzy się wiązanie pseudo-peptydowe z grupą γ -karboksylową. To wiązanie zabezpiecza glutation przed naturalną „degradacją-trawieniem” przez aminopeptydazy.

Po drugie szczególnie istotne znaczenie ma obecność grupy tiolowej, należącej do reszty cysteinowej w cząsteczce glutationu, która decyduje o wielu funkcjach tego związku (12). Dzięki obecności wolnych grup karboksylowych oraz grupy aminowej i tiolowej, które w warunkach fizjologicznego pH posiadają ładunek, związek ten jest bardzo dobrze rozpuszczalny w wodzie. Glutation uważany jest za najważniejszy komórkowy „bufor tiolowy”, a stosunek stężeń jego formy zredukowanej do utlenionej (GSH/GSSG), określany jest miarą stanu oksydoredukcji środowiska komórkowego. W komórkach glutation występuje w różnych formach. W warunkach fizjologicznych ponad 98% glutationu stanowi GSH zredukowany, jednak grupa tiolowa ($-\text{SH}$) zredukowanego glutationu może szybko ulec utlenieniu, czego rezultatem jest powstanie disulfidu glutationu (GSSG).

peroksydaza glutationowa

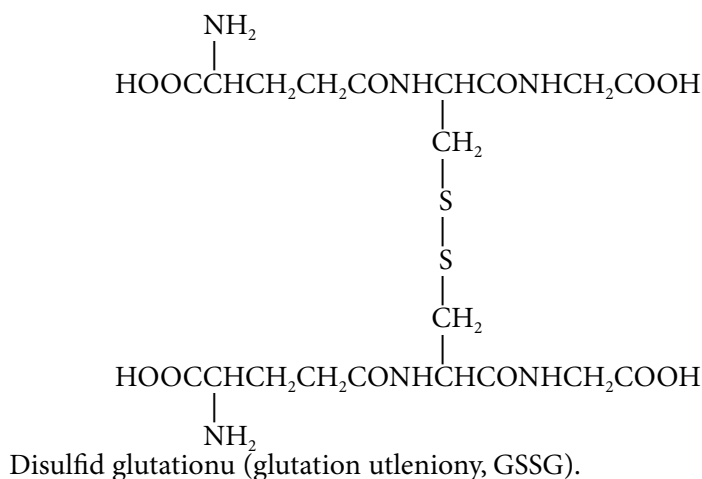


Reakcję powyższą katalizuje peroksydaza glutationowa (GSH-Px), która redukuje H_2O_2 lub nadtlenuki organiczne (4).

Disulfid glutationu może wpływać bezpośrednio na nieenzymatyczną wymianę grup $[-\text{SH}/-\text{SS}-]$ w białkach (13). Jeśli mamy monotiole w białku (PrSH), to reakcja prowadzi do wytworzenia disulfidów mieszanych (PrSSG).

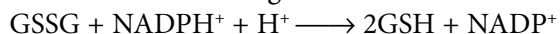
Natomiast w przypadku grup ditiolowych w białku ($\text{Pr}(\text{SH})_2$), występujących częściej niż monotiole, reakcja wymiany z glutationem prowadzi do powstania wewnątrzcząsteczkowych mostków disulfidowych. Mieszane disulfidy tworzą się np. w wątrobie głównie z anhidrazą III zaś w sercu z fosforylazą b i kinazą kreatynową (14).

Utlenianie komórkowego glutationu aktywuje glukozo-6-fosfatazę, frukozo-1,6-difosfatazę, dehydro-



genazę glukozy-6-fosforanu, kinazę C, transporter glukozy. Hamuje natomiast syntetazę glikogenu, heksokinazę, kinazę pirogronianową, fosfofruktokinazę, dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego i syntetazy kwasów tłuszczowych (15). Ponieważ disulfid (w większości) jest związkiem niebezpiecznym (tworzy disiarczki z białkami zawierającymi grupy tiolowe i utlenia je), organizm przeprowadza go w formę zredukowaną za pomocą reduktazy glutationowej (2).

reduktaza glutationowa



Stosunek stężeń frakcji GSH/GSSG jest miarą stanu oksydoredukcji środowiska komórkowego (4,16).

PRZEMIANY I REAKCJE ENZYMATYCZNE Z UDZIAŁEM GLUTATIONU – UTRZYMANIE GRUP TIOLOWYCH W FORMIE ZREDUKOWANEJ

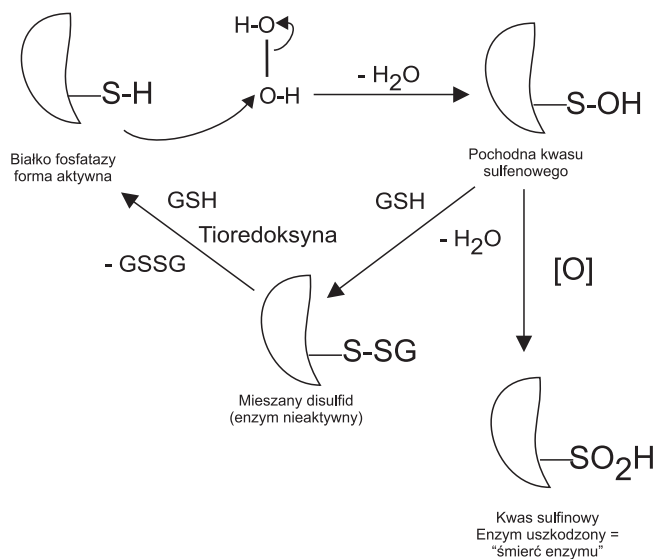
Najważniejszą funkcją glutationu jest utrzymanie grup tiolowych w formie zredukowanej, co jest warunkiem ich aktywności funkcjonalnej. Reakcje redukcji utlenionych grup tiolowych mogą zachodzić nieenzymatycznie, bądź z udziałem enzymów, dla których glutation jest substratem. Wzrost stężenia anionorodnika ponadtlenkowego lub nadtlenu wodoru może prowadzić, m.in. do nieodwracalnego utleniania grup -SH w białkach i do peroksydacji lipidów, a w konsekwencji do trwałego uszkodzenia komórki. Glutation dzięki zdolności do redukcji nadtlenu oraz utrzymywania odpowiedniego poziomu grup -SH w białkach, jest jednym z ważniejszych elementów antyoksydacyjnego systemu obrony komórki (17). Glutation pełni funkcję wewnątrzkomórkowego buforu redoks o dużej pojemności i rolę „zmiatacza” reaktywnych związków elektrofilowych. Dzięki tym cechom glutation stanowi główny element obrony przed stresem oksydacyjnym, będąc jednocześnie „magazynem” reszt cysteinowych, odgrywa też znaczącą rolę w detoksykacji ksenobiotyków, pestycydów, jonów metali ciężkich, w przemianach wielu związków endogennych i w regulacji aktywności wielu enzymów. Uważa się, że związek ten, poprzez reakcje transhydrogenacji zabezpiecza biologicznie aktywne białka przed destrukcją oraz reaktywuje nieaktywne enzymy (powstałe w wyniku utleniania ich grup tiolowych). Fakt ten ma podstawowe znaczenie dla zachowania funkcji wieku białek enzymatycznych i ekspresji genów. Glutation odgrywa istotną rolę w transdukcji sygnałowej, ekspresji genów oraz apoptozie (18–20). Istnieją powiązania między statusem tiolowym redox (procesami

redukcyjno-oksydacyjnymi związanymi z grupami -SH), interakcjami glutation-białko, oraz proliferacją komórek (21,22). Dowodzi to, iż glutamylacja białek (kowalencyjne wiązanie glutationu z białkami) może pełnić istotną rolę w kontroli tych procesów, np. fosforylaza, kinaza kreatyninowa, anhydraza węglanowa, transferaza glutationowa oraz inne białka ulegają glutationylowaniu (23,24). Proteaza wirusa HIV-1 jest regulowana przez modyfikację cysteiny i przypuszcza się, że istnieją powiązania pomiędzy stężeniem GSH a zachorowalnością u pacjentów zakażonych wirusem (25).

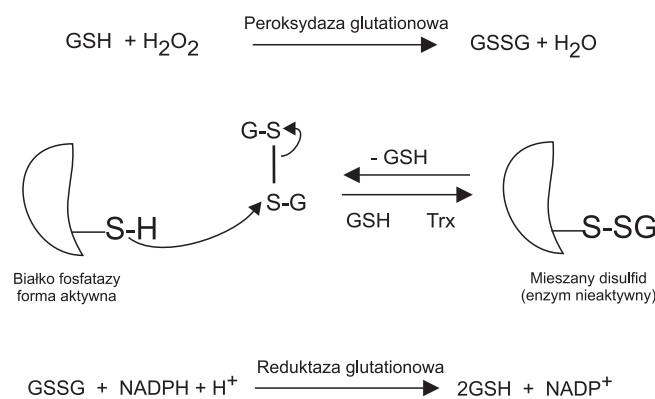
Badania prowadzone w ostatnich latach zwróciły uwagę na rolę fosfolipidów w procesach przekazywania informacji w komórce. Przeniesienie sygnału przez błonę komórkową zachodzi na drodze aktywacji fosfolipaz, które hydrolizując fosfolipidy prowadzą do powstania i uwolnienia do wnętrza komórki wtórnych przekaźników sygnałów. Fosforylacja białek odgrywa zatem kluczową rolę w regulowaniu wielu komórkowych procesów u Eukariota. Szczególnie dotyczy to białek uczestniczących w przekazywaniu bodźców transdukcji. Należą do nich kinaza (PK) i fosfataza (PP) a od ich aktywności zależy mitogeneza komórek (zwiększenie liczby komórek naprawczych), adhezja, proliferacja, transformacja nowotworowa i apoptoza. Wiadomo, iż w wielu komórkach stymulowanych do apoptozy różnymi czynnikami obserwuje się wzrost ekspresji genów kodujących kinazy cykliczne jak też ich aktywatory, lub wzrost aktywności produktów białkowych ich genów. Współdziałanie enzymów hydrolizujących fosfolipidy – fosfataz, może w efekcie prowadzić do wzmocnienia lub osłabienia sygnału transdukcji.

Uznaje się, iż glutation odgrywa istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu fosfataz. Istnieją tutaj dwie teorie. Zgodnie z pierwszą z nich nadtlenu wodoru bezpośrednio inaktywuje białko fosfatazy. Powstaje kwas sulfenowy, pośrednia forma ataku nadtlenu wodoru na grupę -SH białka. Ostatecznie powstaje zmieszany disulfid w formie adduktu glutationylowego. Wewnątrzkomórkowy glutation i tioredoksyna powodują odzyskanie aktywnej formy białka fosfatazy, ze zredukowaną grupą -SH (ryc. 2) (20).

Druga teoria zakłada glutationylację i inaktywację białkowych fosfataz związaną z GSH i wzrostem stężenia GSSG proporcjonalnym do ilości nadtlenu (26). W pierwszym etapie tej reakcji dochodzi do utlenienia puli GSH do GSSG przez nadtlenu wodoru i peroksydazę glutationową (GSH-Px). Następnie zachodzi



Ryc. 2. Bezpośrednia inaktywacja fosfataz przez nadtlenek wodoru (20).



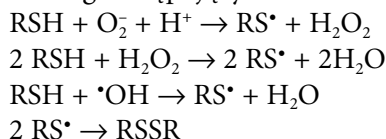
Ryc. 3. Pośrednia inaktywacja fosfataz przez disulfid glutationu powstający pod wpływem nadtlenku wodoru (20).

interakcja pomiędzy wolnymi grupami -SH cysteiny w aktywnej fosfatazie (PTP) a GSSG, prowadząca do utworzenia mieszanego disulfidu i inaktywacji enzymu. Po czym zachodzi redukcja disulfidu glutationu przez tioredoksynę lub reduktazę glutationową (ryc. 3) (27,28,29).

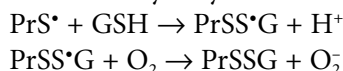
NEUTRALIZACJA WOLNYCH RODNIKÓW

W warunkach stresu oksydacyjnego dochodzi do utlenienia bezpośrednio przez reaktywne formy tlenu komórkowych grup -SH. Grupa tiolowa może reagować z anionorodnikiem ponadtlenkowym, rodnikiem wodorotlenkowym, jak również nadtlenkiem wodoru (który nie jest wolnym rodnikiem, ale wykazuje silne właściwości utleniające) (4). Produktami utleniania grup -SH są wówczas rodniki tiylowe -S[•], które ule-

gają dimeryzacji do disulfidów. Reakcje te zachodzą według następujących schematów;



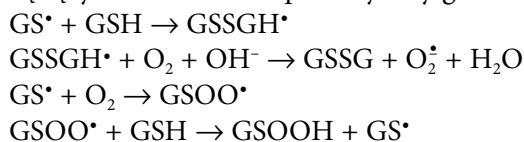
Glutation chroni komórki przed oksydacyjnymi uszkodzeniami grup -SH białek (Pr) poprzez tiolację rodników tiylowych -S[•].



Ze względu na tę rolę ochronną glutationu uszkodzenie białek przez reaktywne formy tlenu jest szczególnie niebezpieczne przy obniżonym poziomie GSH (23).

W wyniku reakcji z wolnymi rodnikami organicznymi, GSH przekazuje atom wodoru na rodnik, powodując tym samym jego neutralizację. Powstały w ten sposób rodnik glutationylowy (GS[•]), ze względu na niższą reaktywność, jest mniej szkodliwy dla komórek. R[•] + GSH → RH + GS[•]

Rodnik glutationylowy (GS[•]) może dimeryzować tworząc disiarczek glutationu. Reaguje także z GSH i O₂, tworząc rodnik (GSSGH[•]), rodnik nadtlenku glutationu (GSOO[•]), czy nadtlenek glutationu (GSOOH), będący substratem dla peroksydazy glutationowej:



W warunkach stresu oksydacyjnego stężenie GSSG ulega znacznemu podwyższeniu. Jest to wynik reakcji GSH z reaktywnymi formami tlenu a także aktywności peroksydazy glutationowej. Sytuacja taka jest niebezpieczna dla komórek, gdyż GSSG może reagować z grupami tiolowymi białek. Produktami tych reakcji są mieszane disulfidy glutationowo-białkowe. Zmiany konformacyjne, jakie dokonują się w białkach pod wpływem GSSG, w konsekwencji prowadzą do upośledzenia ich funkcji. Dlatego też, w sytuacji, gdy regeneracja powstającego GSSG przekracza możliwości redukcyjne komórki, związek ten jest aktywnie transportowany na zewnątrz komórki z udziałem białek transbłonowych MRP1 bądź MRP2 (30,31). Współpraca białek MRP i glutationu nie ogranicza się jednak tylko do eksportu jego utlenionej formy w warunkach stresu oksydacyjnego. Nabycie oporności na szereg leków przez komórki z nadekspresją MRP, spowodowane jest aktywnym transportem tych związków do środowiska zewnątrzkomórkowego (32). Wiele związków

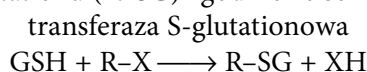
pochodzenia organicznego transportowanych jest na zasadzie kotransportu z glutationem lub w formie skoniugowanej z tym niskocząsteczkowym antyoksydantem (33).

NAPRAWA USZKODZONYCH KOMÓREK

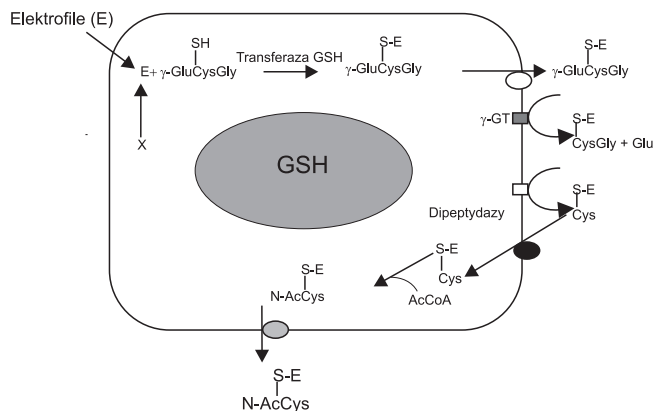
GSH bierze też udział w procesach naprawy uszkodzonych składników komórki (trzecia linia obrony). Glutation jest źródłem protonów dla reduktazy rybonukleotydowej (enzymu odpowiedzialnego za redukcję grupy hydroksylowej przy węglu 2' rybozy nukleotydów wchodzących w skład DNA), a przez to pośrednio zaangażowany jest w proces replikacji DNA (34,35).

TWORZENIE KONIUIGATÓW Z KSENOBIOTYKAMI

Grupy tiolowe glutationu mogą reagować z różnymi substancjami elektrofilowymi, np. z ksenobiotykami; toksynami, nadtlenkami organicznymi, nadtlenkiem wodoru, wolnymi rodnikami (36). W wątrobie GSH detoksykuje toksyny i wolne rodniki (37,38). Sprzęga ksenobiotyki z glutationem, przy udziale transferazy S-glutationowej, powoduje powstawanie S-koniugatów glutationu, które usuwane są na zewnątrz komórek (detoksykacja). Tworzenie koniuigatów glutationowych może zachodzić spontanicznie, ale zazwyczaj wymaga obecności transferaz S-glutationowych, których szczególnie wysoką aktywność wykazują komórki wątroby (28,39). Enzymy te katalizują reakcję sprzęgania glutationu ze znaczną liczbą związków farmakologicznie aktywnych i wielu czynników alkilujących, co chroni komórkę przed ich potencjalną toksycznością. Enzymy GST katalizują reakcję z takimi związkami, w których grupy -SH glutationu neutralizują centrum elektrofilowe. Dzięki temu produkty reakcji stają się łatwiej rozpuszczalne w wodzie. Powstałe koniuigaty GSH mogą być eksportowane z komórek zwierzęcych przez pompę sodowo-potasową, sprzężoną z ATP-azą (40), po czym są one dalej metabolizowane w różnych procesach detoksykacji GST. Reakcja sprzęgania wywołana przez GST jest prostym mechanizmem przemieszczenia (41), w której aktywowana grupa tiolowa glutationu przeprowadza nukleofilowy atak na elektrofilowe centra związku (RX) (42), wytwarzając koniuigaty glutationu (R-SG) zgodnie ze schematem:



Koniugaty GSH tworzone są wewnątrzkomórkowo, potem transportowane na zewnątrz komórek, gdzie są metabolizowane przez te same degradujące enzymy,



Ryc. 4. Metabolizm i etapy transportu w biosyntezie kwasu merkapturowego (43).

które uczestniczą w metabolizmie samego glutationu, takie jak γ -glutamylotranspeptydazę (γ GT) i peptydazy. Koniugaty glutationu są metabolizowane przez oderwanie reszt kwasu glutaminowego i glicyny, a następnie utworzone S-koniugaty cysteiny, wracają do komórki i są N-acetylowane do kwasu merkapturowego (43).

Glutaminian i glicyna mogą być użyte do biosyntezy GSH, podczas gdy S-koniugaty mogą być acetylowane przez wewnątrzkomórkowe N-acetylotransferazy do kwasu merkapturowego (S-koniugaty N-acetylocysteiny) (ryc. 4). Kwas merkapturowy uwalniany jest do żółci, część ewentualnie wydzielana jest z moczem, a część może ulegać dalszemu metabolizmowi (44).

Ksenobiotyki poprzez koniuigację z GSH, całkowicie lub częściowo tracą swoje właściwości toksyczne. Jednak w przypadku niektórych związków, np. hydrochinonów czy aminofenoli, sprzęganie z glutationem prowadzi do nasilenia ich właściwości cytotoksycznych (45). S-koniugaty glutationu lub produkty ich przemian wyłapywane są z krwiobiegu przez nerki i przekształcane w pochodne, a następnie wydalone z organizmu (4).

TWORZENIE KONIUIGATÓW GLUTATIONU Z ENDOGENNYMI SUBSTANCJAMI

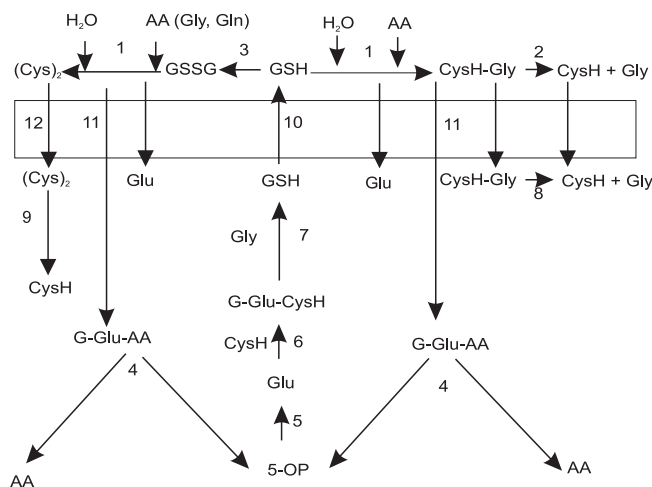
Nukleofilowy charakter glutationu sprawia, że szczególnie łatwo reaguje on zarówno z endo- jak i egzogennymi związkami elektrofilowymi. Ostatnio coraz większe zainteresowanie towarzyszy endogennym koniuigatom glutationowym. Glutation może je tworzyć z prostaglandynami, leukotrienami, dopaminą, koenzymem A, tlenkiem azotu i witaminą K. Biologiczne funkcje koniuigatów glutationowych obejmują, m.in.,

inaktywację lub regulację aktywności potencjalnie toksycznych związków, udział w przekazywaniu sygnałów oraz usprawnianie transportu związków przez błony komórkowe (46,47). Stwierdzono, iż z wiekiem wzrasta aktywność GST, co wiąże się ze wzrostem stężenia organicznych nadtlenków i epoksydów, które są naturalnymi substratami dla GST (48).

UDZIAŁ W TRANSPORCIE AMINOKWASÓW

Synteza GSH jest wewnątrzkomórkowa i ma miejsce we wszystkich komórkach, natomiast degradacja zewnątrzkomórkowa zachodzi tylko w tych komórkach, które posiadają enzym γ -glutamylotranspeptydazę (γ GT) (49). W pierwszym etapie syntezy GSH tworzy się wiązanie pomiędzy cysteiną i kwasem glutaminowym, katalizowane przez syntetazę γ -glutamylcysteinową. Syntetaza glutationu katalizuje dalej reakcje pomiędzy grupą $-\text{NH}_2$ glicyny i $-\text{COOH}$ cysteiny, a z powstałego wcześniej diaminokwasu powstaje trójaminokwasowy glutation zredukowany. GSH jest transportowany na zewnątrz komórki i zostaje dalej rozkładany przez wiązanie z błonowym enzymem γ GT, który odłącza glutaminian, a następnie działają dipeptydazy, które odłączają glicynę. Powstałe aminokwasy mogą ponownie być resorbowane i używane do biosyntezy GSH.

Komórkowa przemiana glutationu związana jest z jego transportem w formie GSH na zewnątrz komór-



Ryc. 5. Cykl γ -glutamylowy. 1. Transpeptydaza γ -glutamylowa, 2. Dipeptydaza (błonowa); 3. Peroksydaza; 4. Cyklotransferaza γ -glutamylowa; 5. 5-oxoprolinaza; 6. Syntetaza γ -glutamylcysteinowej; 7. Syntetaza glutationu; 8. Dipeptydaza (cytoplazmatyczna); 9. Połączona z GSH reduktaza; 10. Transport GSH; 11. Transport glutamylowych γ -aminokwasów; 12. Transport cysteiny; AA aminokwasy; (Cys)₂ – cystyna; CysH – cysteina; Glu – glutaminian; Gly – glicyna; 5-OP 5-oksoprolina (50).

ki. Proces, w którym GSH jest transportowany, obejmuje formułowanie się wiązania błonowego pomiędzy γ -glutamylotranspeptydazą a γ -glutamylaminokwasem, co może stanowić jeden ze sposobów transportu aminokwasów (głównie glicyny i glutaminianu) na zewnątrz komórki (ryc. 5).

POZIOM GSH A FUNKCJONOWANIE WYBRANYCH STRUKTUR KOMÓRKOWYCH

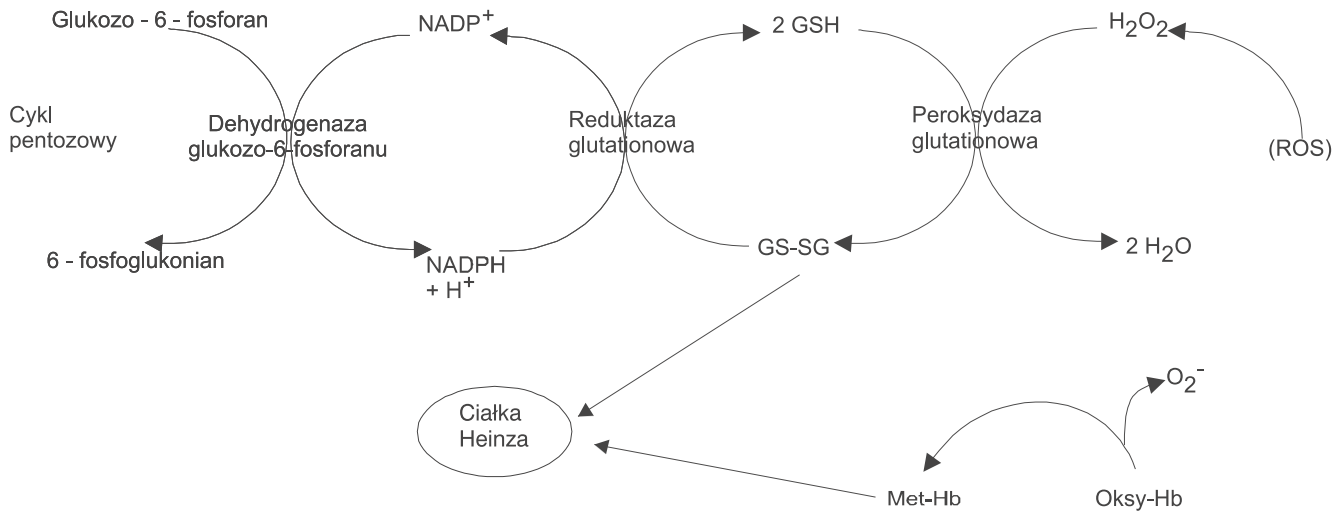
Błony komórkowe

Największym zagrożeniem dla życia komórek, w środowisku związków utleniających, jest utlenienie białkowych grup $-\text{SH}$ w błonach. Może ono prowadzić do dezintegracji błon i zwiększenia ich przepuszczalności dla białek. Utlenienie to jest na ogół związane z działaniem rodnika nadtlenkowego (LOO^\bullet), powstającego przy peroksydacji fosfolipidów błonowych (51). Wytwarzanie disulfidów białkowych podczas stresu oksydacyjnego w hydrofobowym wnętrzu błony jest szczególnie szkodliwe, ponieważ mogą one być zredukowane jedynie przez tioredoksynę, która występuje głównie we frakcjach rozpuszczalnych (52). We frakcjach hydrofilowych białkowe grupy $-\text{SH}$ ochraniają się głównie przez GSH. Są one bardziej narażone na utlenianie przy obniżonym poziomie GSH (w obecności inhibitorów jego syntezy), natomiast wzrost stężenia GSH (w obecności jego egzogennych prekursorów) podwyższa ich zawartość (53). Jest to związane z usuwaniem nadtlenków przez peroksydazę glutationową i tiolację rodników tylowych (RS^\bullet) przez GSH (4). Ponadto glutation wytwarzając mieszane disulfidy z monotioli białkowymi pozwala na ich regenerację przez glutaredoksynę po powrocie do normalnych warunków fizjologicznych (23).

Mitochondria

W uszkodzeniach komórki szczególną rolę odgrywają mitochondria. Mogą one być uszkodzone na skutek osłabienia procesów fosforylacji oksydacyjnej (co wiąże się ze spadkiem stężenia ATP) i toksycznego działania RFT. Mitochondria są jednym z głównych źródeł reaktywnych form tlenu i jednocześnie są bardzo wrażliwe na uszkodzenia oksydacyjne. RFT mogą bezpośrednio uszkadzać enzymy mitochondrialne, jak również powodować mutacje w mitochondrialnym DNA. Mogą także zmieniać potencjał międzybłonowy mitochondriów, który jest wskaźnikiem integralności błon mitochondrialnych (54).

Produkcja RFT w mitochondriach jest regulowana przez enzymy antyoksydacyjne, takie jak: MnSOD,



Ryc. 6. Rola GSH w prawidłowym funkcjonowaniu erytrocytów.

peroksydazę glutationową wodoronadtlenków lipidów i klasyczną peroksydazę glutationową (GSH-Px). GSH-Px jest w zasadzie jedynym enzymem usuwającym nadtlenuk wodoru tworzony w mitochondriach (55). Katalaza rozkładająca H₂O₂ jest nieobecna w mitochondriach większości komórek zwierzęcych, stąd wynika kluczowa rola GSH-Px w usuwaniu tego utleniającego związku. Glutation, jako kofaktor potrzebny do działania mitochondrialnej peroksydazy glutationowej (mGSH-Px), jest niezbędny do obrony mitochondriów przed nadtlaniem wodoru. GSH jest syntetyzowany w cytozolu, skąd jest transportowany do mitochondriów. Natomiast powstający w mitochondriach GSSG z GSH nie może być transportowany do cytosolu. Niezbędna jest, zatem regeneracja GSH z GSSG na terenie mitochondriów. Odbywa się to za pomocą NADPH + H⁺ i katalizowane jest przez enzym dehydrogenazę izocytrynianową (56). W mitochondriach brak jest dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, kluczowego enzymu zapewniającego odpowiedni poziom NADPH + H⁺.

SZCZEGÓLNA ROLA GSH W ERYTROCYTACH

Występowanie glutationu w fizjologicznej ilości oraz prawidłowa aktywność GSH-Px stanowią pierwszą linię obrony antyoksydacyjnej w erytrocytach, a ich obniżenie wiąże się ze wzrostem oksydacyjnych modyfikacji w lipidach i białkach błony, co prowadzi do destabilizacji cytoszkieletu i zmniejszenia przeżywalności komórek erytrocytarnych (57). W badaniach Dumaswala i wsp. (57) dotyczących wpływu czasu przechowywania erytrocytów w różnych mediach na ich

kondycję stwierdzono, iż katalaza i NADPH + H⁺ chronią erytrocyty przed wysokimi stężeniami nadtlenu wodoru, natomiast glutation jest potrzebny do ochrony przy niskich stężeniach RFT. Dojrzałe krwinki nie posiadają mitochondriów, a ich antyoksydacyjne działanie, związane z reduktazą glutationową, zależy od skuteczności regeneracji GSH z GSSG poprzez ten enzym współpracujący z NADPH + H⁺. Proces redukcji jest zasocjowany z cyklem pentozowym lub cyklem Krebsa (brak w erytrocytach), które są źródłem NADPH, będącego donorem protonów (58). Ponadto glutation jest niezbędny do utrzymania prawidłowej struktury erytrocytów i stabilizacji hemoglobiny w stanie zredukowanym i zdolnym do wiązania tlenu przez Hb-Fe²⁺. Szczególnym problemem jest poziom glutationu zredukowanego we krwi osób z deficytem dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Osoby takie nie mogą produkować wystarczającej ilości GSH, aby chronić się przed RFT (wytwarzają za mało NADPH + H⁺ do regeneracji GSSG i methemoglobiny, ryc. 6), wskutek tego w ich czerwonych krwinkach powstaje niekontrolowane usieciowanie białek, prowadzące do powstania tzw. ciałek Heintza (strąków białkowych) (59).

Zmiany glutationu całkowitego i zredukowanego w pełnej krwi dotyczą głównie krwinek czerwonych, gdyż zawierają one ponad 98% glutationu obecnego we krwi. O stężeniu glutationu w erytrocytach decyduje nie tylko natężenie przemian oksydacyjnych wewnątrz krwinek, ale również udział glutationu w ochronie lipidów i białek szkieletu błonowego krwinki przed działaniem RFT oraz udział krwinek w międzytkankowej dystrybucji glutationu (60).

Krwinki czerwone z powodu dużej zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych (głównie kwasu arachidonowego) w wewnętrznej monowarstwie błony są predysponowane do uszkodzeń ze strony RFT (61).

WYBRANE KSENOBIOTYKI I ICH WPŁYW NA PUŁĘ GLUTATIONU ZREDUKOWANEGO W KOMÓRKACH

W ostatnim czasie wiele badań dotyczy wpływu tlenu azotu na stres oksydacyjny, a w tym na stężenie GSH w komórkach. S-Nitroglutation (GSNO) uznany został za związek przechowujący oraz formę przekaźnikową tlenu azotu (62,63). Dringen i wsp. (64) wskazali, że GSH odgrywa istotną rolę w obronie antyoksydacyjnej mózgu. Gegg i wsp. (65) zbadali wpływ tlenu azotu (NO) na poziom GSH w kulturach komórek szczura – astrocytach i neuronach. Stwierdzili, że w astrocytach, pod wpływem tlenu azotu, następuje podwyższenie aktywności komórkowej syntetazy γ -glutamylcysteinowej, w wyniku wzmożonej ekspresji jej genów, czego rezultatem jest wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu. To może chronić astrocyty przed uszkodzeniami indukowanymi przez tlenek azotu (np. uszkodzenia enzymów mitochondrialnego łańcucha oddechowego) (66,67). Wzrost wewnątrzkomórkowego glutationu w astrocytach indukował je, jak twierdzą autorzy, do wydajniejszego uwalniania GSH na zewnątrz komórki. To z kolei zwiększało stężenie substratu dla γ -glutamylotranspeptydazy i powstawanie dużych ilości Cys-Gly. Cys-Gly jest, jak wiadomo, prekursorem dla biosyntezy GSH w neuronach (64). Ponieważ neurony nie wykazywały wzrostu aktywności syntetazy γ -glutamylcysteinowej, uznano, że to astrocyty na skutek zwiększenia stężenia substratu dla biosyntezy

GSH w neuronach, regulują syntezę GSH i wykazują obronę przed tlenkiem azotu (ryc. 7).

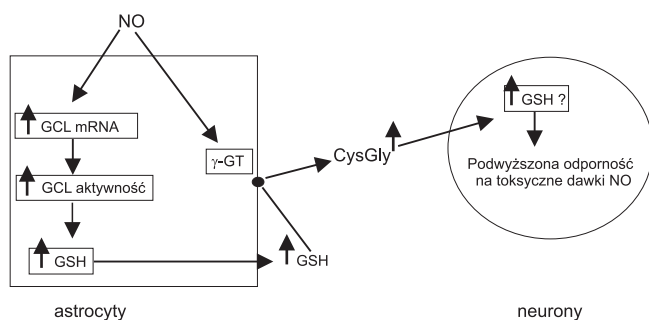
Szczególnie toksyczne efekty notowano w badaniach dotyczących wpływu trichlorofenolu, 3-dimetyloaminofenolu i katecholu na stężenie GSH w erytrocytach człowieka (69,70,71). Wszystkie ww. związki wykazywały bardzo silne utleniające właściwości. Mechanizm toksycznego działania fenoli i ich pochodnych wynika z powstawania wolnych rodników semichinonów. Rodniki semichinonowe szybko reagują z tlenem generując anionorodniki ponadtlenkowe, które są prekursorami innych toksycznych form tlenu. Semichinony mogą przyłączać się do grup nukleofilowych –SH lub –NH₂ białek, glutationu i kwasów nukleinowych. W wyniku tego przyłączenia makrocząsteczki ulegają inaktywacji (71).

Również związki, takie jak bromobenzen, 1,2-dibromobenzen i 1,3-dibromobenzen zmniejszają stężenie glutationu w komórkach wątroby myszy o ponad 60% (73).

Ciekawym ksenobiotykiem reagującym z glutationem jest aktywny metabolit leku paracetamolu (N-acetylo-p-benzenochinoniminy). Jeśli w miejscu aktywacji paracetamolu występują dostateczne ilości glutationu, związek ten wiąże aktywny metabolit i nie dochodzi do uszkodzenia tkanki. Przy niedostatecznych ilościach glutationu aktywny metabolit wiąże się kowalencyjnie z białkami tkankowymi i wywołuje martwicę wątroby. Badania Lauterburga i Veleza (73) wskazują, np. na ryzyko powstania nekrozy komórek wątroby u alkoholików, przyjmujących paracetamol.

WARUNKI PRACY A STĘŻENIE GLUTATIONU ZREDUKOWANEGO

Istotną rolę odgrywa glutation w obronie organizmu przed niekorzystnymi czynnikami będącymi w środowisku życia i pracy. Wydaje się, iż szczególnie narażeni na znaczne spadki stężenia glutationu są osoby pracujące przy produkcji i stosowaniu pestycydów, na co wskazują badania laboratoryjne. Parakwat (jon 1,1'-dimetylo-4,4'bipirydylowy), silnie stymulujący powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego (74), czy też herbicydy fenoksyoctowe w dużych dawkach, zmniejszają poziom GSH w erytrocytach człowieka (*in vitro*) i hepatocytach szczurów (68,75,76). Również pod wpływem pestycydu chloroorganicznego – endryny (77) i pestycydu fosforoorganicznego (RPR-V) (78), stwierdzono, zależne od czasu i dawki, obniżenie stężenia GSH w nerkach i płucach szczurów.



Ryc. 7. Proponowany mechanizm obrony neuronów przez astrocyty (poprzez podwyższenie wewnątrzkomórkowego stężenia CysGly, prekursora syntezy GSH) przed działaniem tlenu azotu. GCL mRNA dla syntetazy γ -glutamylcysteinowej; GCL – aktywność syntetazy γ -glutamylcysteinowej, γ -GT – transpeptydaza γ -glutamylowa (68).

Badania Grajedy i wsp. (79), dotyczące wpływu cypermetryny (pestycydu pyretroidowego) na metabolizm glutationu, w komórkach wątrobowych szczura wykazały, że aktywność enzymu GST wzrastała, detoksykacja cypermetryny podniosła się przez tworzenie kompleksu z GSH i w konsekwencji stężenie GSH spadło. Dodatkowo związek ten uszkadzał transferazę γ -glutamylową, która w razie potrzeby zwiększa stężenie GSH. Grajeda i wsp., zbadali dodatkowo wpływ witaminy C (kwas askorbinowy) na zmniejszenie toksycznych efektów działania cypermetryny. W obecności kwasu askorbinowego, występowało zmniejszone zapotrzebowanie dla syntezy GSH. Obserwowano niższy wzrost w aktywności γ -GT i zmniejszenie transportu aminokwasów do komórki, w porównaniu do komórek potraktowanych tylko cypermetryną. Witamina C działa jako dawca elektronu i/albo dawca atomu wodoru. Ta właściwość czyni go potężnym antyutleniaczem. Ponieważ kwas askorbinowy jest bardziej reaktywny niż wielonienasycone kwasy tłuszczowe około 103 razy, to współzawodniczy z wielonienasyconymi lipidami o reakcję z rodnikami peroksyłowymi.

Najczęściej stosowany obecnie herbicyd – glifosat nie powoduje żadnych znaczących zmian w stężeniu GSH w erytrocytach człowieka (*in vitro*) nawet przy dawkach wielokrotnie przekraczających możliwości jego akumulacji (80).

Grupą pracowniczą narażoną na stres oksydacyjny i zmniejszenie stężenia GSH są hutnicy pracujący w hutach metali m.in. w hucie niklu. Sidhu i wsp. (81) badał ochronną rolę cynku w łagodzeniu toksyczności wywołanej przez siarczan niklu w wątrobie szczura. Wiadomo, że nikiel obniża stężenie GSH, a podwyższa aktywność GSH-Px i GST w wątrobie szczura, co może prowadzić do zmniejszonej wydajności detoksykacji wątroby. Następnie autorzy obserwowali normalizację stężenia GSH i aktywności GST po podaniu Zn. Taka reakcja może wynikać z podwyższenia aktywności metalotioneiny, zmiatacza wolnych rodników, albo jego pośredniego działania w zmniejszaniu stężenia wolnych rodników.

Jednym z negatywnych czynników oddziałujących na człowieka jest hałas. Wywołuje on ubytek w słyszalności i jest jedną z powszechnych przyczyn kalectwa słyszenia. Broń palna i przemysłowe urządzenia mogą wygenerować bardzo wysokie poziomy dźwięku impulsowego, który może obniżyć próg słyszalności. Szczególnie narażeni na działanie ciągłego uszkadzającego dźwięku są tkaczkzi, hutnicy, drukarze, stocznioicy itp. Ciekawe badania przedstawił Yamasoba i wsp. (82) dotyczące ochronnej roli glutationu przed hała-

sem. Zastosował on inhibitor syntezy glutationu – butionino-1[S,R]-sulfoksyiminę i stwierdził, że znacząco podwyższył się próg graniczny słyszalności, wywołany przez ciągłe narażenie na dźwięk. Zastosowanie zaś czynnika pobudzającego syntezę GSH – karboksylatu 4-oksotiazolidyny, znacząco zmniejszało zmianę progu słyszalności, wywołaną przez ciągłe narażenie na dźwięk. Sugeruje to, że GSH pełni ochronną rolę przeciw ciągłemu narażeniu na dźwięk. Potwierdzają to badania Duana i wsp. (83), którzy badali wpływ N-acetylocysteiny na działanie hałasu. Stwierdzili oni, że zwierzęta wystawione na bodziec hałasu, miały podwyższony próg dla zakresu słyszalności w zakresie częstotliwości 4–40 kHz w porównaniu do zwierząt z zaaplikowaną N-acetylocysteiną.

Znaczne obniżenie stężenia glutationu zredukowanego zanotowano w komórkach wątroby szczurów, potraktowanych toksyną sinicową – mikrocytyną LR. Toksyny sinicowe stanowią globalny problem, występują bowiem powszechnie w wodach, w tym pitnych podczas zakwitu i rozpadu sinic. Mogą przedostawać się do organizmu człowieka z wodą albo z żywnością. Zwierzęta, takie jak małże, skorupiaki, ryby czy ptaki wodne, żywiące się planktonem, mogą także akumulować toksyny i w ten sposób „przenosić je” w wyniku łańcucha pokarmowego do innych organizmów wyższych, w tym i do człowieka (84). Takenaka (85) stwierdza, iż mikrocytyna LR łączy się kowalencyjnie z grupami – SH związków, takich jak L-cysteina i zredukowany glutation. W organizmie szczurów obserwowano ten proces dopiero po dłuższym czasie (48 godzin) działania mikrocytyny LR, natomiast w pierwszych godzinach następował wzrost stężenia GSH (zwiększona synteza na skutek wystąpienia stresu oksydacyjnego) (36).

Biorąc pod uwagę przedstawione powyżej niezwykle liczne i ważne funkcje glutationu, jak również mnogość związków obniżających jego stężenie, wydaje się niezwykle ważne prewencyjne uzupełnianie ilości GSH w diecie, bądź w określonych jednostkach chorobowych, przyjmowanie preparatów leczniczych, np. N-acetylocysteiny (86).

PIŚMIENNICTWO

1. Prior R.L., Cao G.: *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999;27:1173–1181
2. Saydam N., Kirb A., Hazan E., Saydam O., Güner G.: Determination of glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase levels in human lung cancer tissues. *Cancer Lett.*, 1997;119: 3–19

3. Sen C.K.: Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *J. Nutr. Biochem.*, 1997;8:660–672
4. Bartosz G.: *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie.* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003, ss. 186–189
5. Kapsokefalou M., Miller D.D.: Effect of meat and selected food components on the valence of nonheme iron during *in vitro* digestion. *J. Food Sci.*, 1991;6:52–355
6. Scharrer E., Senn E., Wolfram S.: Stimulation of mucosal uptake of selenium from selenite by some thiols at various sites of rat intestine. *Biol. Trace Elem. Res.*, 1992;33:109–120
7. De Rey-Pailhade J.: Sur un corps d'origine organique hydrogéné le soufre a froid. (On a body of organic origin hydrogenated cold sulfur.) *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, 1988;106:1683–1684
8. Hopkins F.G.: On an autoxidisable constituent of the cell. *Biochem. J.*, 1921;15:286–305
9. Hopkins F.G.: On glutathione: a reinvestigation. *J. Biol. Chem.*, 1929;84:269–320
10. Kendall E.C., McKenzie B.F., Mason H.L., A study of glutathione. I. Its preparation in crystalline form and its identification. *J. Biol. Chem.*, 1929;84:657–674
11. Meister A.: Selective modifications of glutathione metabolism. *Science*, 1984;220:472–477
12. Meister A.: Glutathione Ascorbic Acid Antioxidant System in Animals. *J. Biol. Chem.*, 1994;269: 397–9401
13. Lenartowicz E., Wudarczyk J., Dębska G.: Regulacja stopnia oksydoredukcji grup tiolowych w komórkach zwierzęcych. *Postępy Biochem.*, 1996;42:154–161
14. Chai S.S., Ashraf K., Rokutan R.B., Johnston Jr., Thomas J.A.: S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: Evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994;310:264–272
15. Bartosz G.: Glutathione metabolism. *Postępy Biochem.*, 1993;39:32–38
16. Navarro J., Obrador E., Pellicer J.A., Asensi M., Vina J., Estrela J.M.: Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans. *Free Radic. Biol. Med.*, 1997;22:1203–1209
17. Itoh K., Ishii T., Wakabayashi N., Yamamoto M.: Regulatory mechanism of cellular response to oxidative stress. *Free Radic. Res.*, 1999;31:319–325
18. Arrigo A.P.: Gene expression and thiol redox state. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999;27:936–944
19. Voehringer D.: BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999;27:945–951
20. Gabbita S.P., Robinson K.A., Stewart C.A., Floyd R.A., Hensley K.: Redox Regulatory Mechanisms of Cellular Signal Transduction. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000;376:1–13
21. 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
22. Blackburn E.H.: Telomere states and cell fates. *Nature*, 2000;408:53–56
23. Thomas J.A., Poland B., Honzatko R.: Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995;319:1–9
24. Sies H., Dafre A.L., Ji Y., Akerboom T.P.M.: Protein S-thiolation and redox regulation of membrane-bound glutathione transferase. *Chem. Biol. Interact.*, 1998;111/112:177–185
25. Davis D.A., Dorsey K., Wingfield P.T., Stahl S.J., Kaufman J., Fales H.M. i wsp.: Regulation of HIV-1 protease activity through cysteine modification. *Biochemistry*, 1996;35:2482–2488
26. Cotton N.J.H., Stoddard B., Parson W.W.: Oxidative inhibition of human soluble catechol-O-methyltransferase *J. Biol. Chem.*, 2004;279:23710–23718
27. Arner E.S., Holmgren A.: Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.*, 2000;267:96102–6109
28. Lee S.R., Kwon K.S., Kim S.R., Rhee S.G.: Reversible Inactivation of Protein-tyrosine Phosphatase 1B in A431 Cells Stimulated with Epidermal Growth Factor. *J. Biol. Chem.*, 1998;273:15366–15372
29. Sundaresan M., Yu Z.X., Ferrans V.J., Irani K., Finkel T.: Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, 1995;270:296–299
30. Hirrlinger J., König J., Keppler D., Lindnau J., Dringen R.: The multidrug resistance protein MRP1 mediates the release of glutathione disulfide from rat astrocytes during oxidative stress. *J. Neurochem.*, 2001;76:627–636
31. Balcerczyk A.: Rola białka MRP1 w indukowaniu oporności na stres oksydacyjny [praca magisterska]. Uniwersytet Łódzki, 2001.
32. Cole S.P.C., Bhardwaj G., Gerlach J.H., Mackie J.E., Grant C.E., Almquist K.C. i wsp.: Overexpression of a transporter gene in a multidrug resistance human lung cancer cell line. *Science*, 1992;258:1650–1654
33. Rappa G., Lorico A., Flavell R.A., Sartorelli A.C.: Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural product toxins. *Cancer Res.*, 1997;57:5235–5237
34. Reichard P.: From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science*, 1993;260:1773–1777
35. Marnett L. J., Riggins J.N., West J.D.: Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J. Clin. Invest.*, 2003;111:583–593
36. Bouaïcha N., Maatouk I.: Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.*, 2004;148:53–63
37. Bartoli G.M., Sies H.: Reduced and oxidized glutathione efflux from liver. *FEBS Lett.*, 1978;86:89–92
38. Ookhtens M., Lyon I., Fernandez-Checa J., Kaplowitz N.: Inhibition of glutathione efflux in the perfused rat liver and isolated hepatocytes by organic anions and bilirubin. Kinetics, sidedness, and molecular form. *J. Clin. Invest.*, 1988;82:608–616
39. Nokata K., Kawase M., Ogino S., Kinoshita C., Murata H., Sakae T. i wsp.: Effect of age on levels of cysteine, glutathione and related enzyme activities in livers of mice and rats and at-

- tempt to replenish hepatic glutathione level of mouse with cysteine derivatives. *Mech. Ageing Dev.*, 1996;90:195–207
40. Ishikawa T., Sies H.: Cardiac transport of glutathione disulfide and S-conjugate. Studies with isolated perfused rat heart during hydroperoxide metabolism. *J. Biol. Chem.*, 1984;259:3838–3843
41. Mangold J.B., Abdel-Monem M.M.: Stereochemical aspects of conjugation reactions catalysed by rat liver glutathione S-transferase isozymes. *J. Med. Chem.*, 1983;26:66–71
42. Keen J.H., Jakoby W.B.: Glutathione transferases catalysis of nucleophilic reactions of glutathione. *J. Biol. Chem.*, 1978;253: 654–657
43. Hinchman C.A., Ballatori N.: Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1994; 1:387–409
44. Hinchman C.A., Matsumoto H., Simmons T.W., Ballatori N.: Intrahepatic conversion of a glutathione conjugate to its mercapturic acid; Metabolism of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in isolated perfused rat and guinea pig livers. *J. Biol. Chem.*, 1991;266:22179–22185
45. Koob M., Dekant W.: Bioactivation of xenobiotics by formation of toxic glutathione conjugates. *Chem-Biol. Interact.*, 1991;77:107–136
46. Buzard G.S., Kasprzak K.S.: Possible role of nitric oxide and redox signaling in metal – induced toxicity and carcinogenesis: a review. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 2000;19: 79–199
47. Sies H.: Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999;27:916–921
48. Öztürk O., Gümüşlü S.: Changes in glucose-6phosphate dehydrogenase, copper, zinc-superoxide dismutase and catalase activities, glutathione and its metabolizing enzymes, and lipid peroxidation in rat erythrocytes with age. *Exp. Gerontol.*, 2004;39:211–216
49. Wang W., Ballatori A.: Endogenous glutathione conjugates; Occurrence and Biological Functions. *Pharmacol. Rev.*, 1998;50:335–356
50. Lauterburg B.H., Adams J.D., Mitchel J.R.: Hepatic glutathione homeostasis in rats: efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology*, 1984;4:586–590
51. Pompella A., Romani A., Benedetti A., Comporti M.: Loss of membrane protein thiols and lipid peroxidation in allyl alcohol hepatotoxicity. *Biochem. Pharmacol.*, 1991;41:1255–1259
52. Holmgren A., Luthman M.: Tissue distribution and subcellular localization of bovine thioredoxin determined by radioimmunoassay. *Biochemistry*, 1978;17:4071–4077
53. Christie N.A., Slutsky A.S., Freeman B.A., Tanswell A.K.: A critical role for thiol, but not ATP, depletion in 95% O₂-mediated injury of preterm pneumocytes in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994;313:131–138
54. Łukasiewicz-Hussain B.: Uszkodzenie komórki – rola mitochondriów. *Postępy Biochem.*, 2003;49:250–256
55. Adachii M., Ishii H.: Role of mitochondria in alcoholic liver injury. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002;32:487–494
56. Jo S.H., Son M.K., Koh H.J., Lee S.M., Song I.H., Kim Y.O. i wsp.: Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺ – dependent isocitrate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 2001;276:16168–16176
57. Dumaswala U.J., Zhuo L., Jacobsen D.W., Sushil K. J. Sukalski K.A.: Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999;27:1041–1049
58. De Leve L.D., Kaplovitz N.: Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmac. Ther.*, 1991;52:287–305
59. Giardina B, Messina I, Scatena R, Castagnola M.: The multiple functions of hemoglobin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1995;30:165–196
60. Dass P.D., Bermes E.W. Jr., Holmes E.W.: Renal and hepatic output of glutathione in plasma and whole blood. *Biochem Biophys. Acta*, 1992;156:99–102
61. Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Wyd. 2. Clarendon Press, Oxford 1989
62. Akerboom Ji. Y., Sies T.P.M., Thomas J.A.: S-Nitrosylation and S-glutathiolation of protein sulfhydryls by S-nitroso glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999;362:67–78
63. Hauslanden A., Stamler J.S.: Nitrosative stress. *Meth. Enzymol.*, 1999;300:389–395
64. Dringen R., Gutterer J.M., Hirrlinger J.: Synthesis of the antioxidant glutathione in neurones: Supply by astrocytes of Cys-Gly as precursor for neuronal glutathione. *Eur. J. Biochem.*, 2000;267:4912–1916
65. Gegg M.F., Beltran B., Salas-Pino S., Bolanos J.P., Clark J.B. i wsp.: Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: implications for neuroprotection/ neurodegeneration? *J. Neurochem.*, 2003;1046:1–10
66. Murphy R.T., Yu J., Ng R., Johnson D.A., Shen H., Honey C.R. i wsp.: Preferential expression of antioxidant response element mediated gene expression in astrocytes. *J. Neurochem.*, 2001; 6:1670–1678
67. Stewart V.C., Stone R., Gegg M.E., Sharpe M.A., Hurst R.D., Clark J.B. i wsp.: Preservation of extracellular glutathione by an astrocyte derived factor with properties comparable to extracellular superoxide dismutase. *Neurochem.*, 2002;83:984–991
68. Palmeira C.M., Moreno A.J., Madeira V.M.C.: Thiols metabolism is altered by the herbicides paraquat, dinoseb and 2,4-D: A study in isolated hepatocytes. *Toxicol. Lett.*, 1995;81: 15–123
69. Bukowska B.: 2,4,5-T and 2,4,5-TCP induce oxidative damage in human erythrocytes: role of glutathione. *Cell Biol. Int.*, 2004;28:557–563
70. Bukowska B., Duda W.: 3-Dimethylaminophenol induced oxidative change in human red blood cells. *Current Topics in Biophysics.*, 2000;22:3–13
71. Bukowska B., Kowalska S.: Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicol. Lett.*, 2004;152:73–84
72. Szymańska J.A.: Hepatotoxicity of brominated benzenes: relationship between chemical structure and hepatotoxic effects in acute intoxication of mice. *Arch. Toxicol.*, 1998;72:97–103
73. Lauterburg B.H., Velez M.E.: Glutathione deficiency in alcoholics: risk factor for paracetamol hepatotoxicity. *Gut.*, 1988;29:1153–1157

74. Adams J.D., Lauterberg B.H., Mitchell J.R.: Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat; regulation and response to oxidative stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1983;227:749–754
75. Bukowska B.: Effects of 2,4-D and its metabolite 2,4-dichlorophenol on antioxidant enzymes and level of glutathione in human erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.*, 2003;135(4):435–441
76. Bukowska B., Goszczyńska K., Duda W.: Effect of 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA) and 2,4-dimethylphenol (2,4-DMP) on human erythrocytes. *Pest. Biochem. Physiol.*, 2003;77:92–98
77. Numan I.T., Hassan M.Q., Stohs S.J.: Endrin-induced depletion of glutathione and inhibition of glutathione peroxidase activity in rats. *Gen. Pharmacol.*, 1990;21:625–628
78. Mahbob M., Kaleem M., Siddiqui J.: Effects of a novel organophosphorus pesticide (RPR-V) on extra hepatic detoxifying enzymes after repeated oral doses in rats. *Toxicology*, 2004;202:159–164
79. Grajeda-Cota P., Ramirez-Mares M.V., Gonzalez de Mejia E.: Vitamin C protects against in vitro cytotoxicity of cypermethrin in rat hepatocytes. *Toxicol. in Vitro*, 2004;18:13–19
80. Pieniążek D., Bukowska B., Duda W.: Comparison of the effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. *Pest. Biochem. Physiol.*, 2004;79:58–63
81. Sidhu P., Garg M.L., Dhawan D.K.: Protective role of zinc in nickel induced hepatotoxicity in rats. *Chem. Biol. Interac.*, 2004;150:199–209
82. Yamasoba T., Nuttall A.L., Harris C., Raphael Y., Miller J.M.: Role of glutathione in protection against noise-induced hearing loss. *Brain Res.*, 1998;16:82–90
83. Duan M., Qiu J., Laurell G., Olofsson A., Counter S.A., Borg E.: Dose and time-dependent protection of the antioxidant N-L-acetylcysteine against impulse noise trauma. *Hearing Res.*, 2004;192:1–9
84. Sicińska P., Bukowska B., Pieniążek D., Duda W.: Sinice występujące w jeziorach Tucholskiego Parku Krajobrazowego i ich wpływ na aktywność katalazy i utlenianie hemoglobiny w erytrocytach człowieka. W: Borsuk S. [red.]. *Diagnozowanie stanu środowiska. Metody badawcze – prognozy*. Bydgoskie Towarzystwo Naukowe, 2004.
85. Takenaka S.: Covalent glutathione conjugation to cyanobacterial hepatotoxin microcystin LR by F344 rat cytosolic and microsomal glutathione S-transferases. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2001;9:135–139
86. Bukowska B.: Glutation: biosynteza, czynniki ją indukujące i stężenie w wybranych jednostkach chorobowych. *Med. Pr.* 2004;6:501–509