

Bożena Bukowska

GLUTATION: BIOSYNTETA, CZYNNIKI INDUKUJĄCE ORAZ STĘŻENIE W WYBRANYCH JEDNOSTKACH CHOROBY

GLUTATHIONE: ITS BIOSYNTHESIS, INDUCATION AGENTS AND CONCENTRATIONS IN SELECTED MORBID UNITS

Z Katedry Biofizyki Szkażeń Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego

STRESZCZENIE Glutation pozostaje w stanie równowagi przemian metabolicznych. Jest ciągle aktywnie syntetyzowany i degradowany. W pierwszym etapie syntezy glutationu zredukowanego (GSH) tworzy się wiązanie pomiędzy cysteiną i kwasem glutaminowym katalizowane przez syntezę γ -glutamylcysteiny. Syntetaza GSH katalizuje dalej reakcje pomiędzy grupą aminową glicyny, a grupą karboksylową cysteiny z powstałego dipeptydu i tworzy się glutation zredukowany. GSH jest transportowany na zewnątrz komórki i zostaje dalej rozkładany przez związanie z błonowym enzymem γ GT, który odłącza glutaminian- a następnie działają dipeptydazy, które odłączają glicynę. Glutation powszechnie występuje w tkankach roślinnych i zwierzęcych, a przez to wchodzi w skład diety człowieka. Liponian, witaminy i inne czynniki redukujące wpływają na podwyższenie stężenia GSH w komórkach poprzez podwyższenie stężenia cysteiny zredukowanej. Podejmuje się próby regulowania stężenia GSH w organizmie podając glutation w postaci estrów czy też czynniki redukujące cystynę i powodujące wzrost dostępności tego aminokwasu do syntezy GSH. GSH odgrywa kluczową rolę w mechanizmie śmierci komórki. Komórki rakowe niepoddające się apoptozie mają bardzo wysokie stężenie glutationu. Biorąc pod uwagę liczne choroby indukowane przez reaktywne formy tlenu (RFT) (powoduje obniżenie stężenia GSH) wydaje się, iż dokładne poznanie sposobów manipulowania dostępnością i ilością glutationu za pomocą diety i farmakologicznie może w przyszłości stanowić bardzo istotną formę profilaktyki wielu schorzeń. Med. Pr. 2004; 55 (6): 501–509

SŁOWA KLUCZOWE: metabolizm glutationu, cysteina, liponian, N-acetylocysteina, dieta

ABSTRACT Glutathione (GSH) is in a constant state of metabolic turnover. Because it is actively synthesized, it also must be degraded. In the first step of GSH synthesis, an amide linkage is formed between cysteine and glutamate catalyzed by γ -glutamylcysteine synthetase. GSH synthetase catalyzes the reaction between amine residue of glycine and the cysteine carboxyl from γ -glutamylcysteine dipeptide to form GSH. GSH is transported out of the cell and degraded by the membrane-bound enzyme γ GT, which removes the γ -glutamyl moiety, and by dipeptidases, which remove the glycine moiety. Glutathione is present in most of the plants and animals' tissues that constitute human diet. Thiol redox cycles play central roles in the antioxidant defense network. Liponate and vitamins and other reducing factors affect the increase in glutathione concentrations in cells by their rise of the concentrations of reduced cysteine. The level of GSH in humans may be increased by taking different glutathione monoester (drug) or factors reducing cysteine to cysteine and increasing availability of this aminoacid to GSH synthesis. GSH plays a critical role in cellular mechanisms that lead to cell death. The cancer cells resistant to apoptosis have higher intracellular GSH levels.

The fact that numerous diseases are induced by RFT (that cause glutathione depletion) it seems that an in-depth study of the dietetic and pharmacological manners of manipulation of the GSH amount and availability may become in future a tool of great importance in the prevention of many illnesses. Med Pr 2004; 55 (6): 501–509

KEY WORDS: Glutathione metabolism, cysteine, liponate, N-acetylcysteine, diet

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

Nadesłano: 2.08.2004

Zatwierdzono: 23.10.2004

© 2004, Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi

WSTĘP

Glutation zredukowany (GSH), czyli γ -glutamyl-cysteinyl-glicyna jest głównym niskocząsteczkowym związkami tiolowym, powszechnie występującym we wszystkich komórkach eukariotycznych, roślinnych i zwierzęcych. Należy do najważniejszych przeciwutleniaczy obok askorbinianu, albuminy, cysteiny, kwasu moczowego, kreatyniny, flawonoidów, kwasu fitynowego, melaniny, α -tokoferolu (witamina E), β -karotenu, bilirubiny, biliwerdiny czy koenzymu Q (1).

Stężenie wewnątrzkomórkowego glutationu jest swoiste dla danego typu komórek i waha się w granicach od 5 do 10 mM. 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 mM (2).

Cząsteczka glutationu charakteryzuje się dwiema osobliwościami w strukturze, które wpływają na efektywność jej działania. Po pierwsze, zamiast standardowego wiązania peptydowego między grupą aminową (NH_2 -) cysteiny i grupą α -karboksylową (-COOH) kwasu glutaminowego, tworzy się wiązanie z grupą γ -karboksylową. To wiązanie zabezpiecza

glutation przed naturalną degradacją przez aminopeptydazy. Po drugie zawiera grupę tiolową, należącą do reszty cysteinowej w cząsteczce glutationu, która decyduje o rozlicznych funkcjach tego związku (3).

Glutation reaguje z reaktywnymi formami tlenu (RFT) i chroni w ten sposób grupy tiolowe białek przed nieodwracalną inaktywacją wywołaną przez RFT (4). Ponadto glutation pełni wiele funkcji w naszym organizmie niezwiązanych z obroną antyoksydacyjną. Bierze udział w detoksykacji związków elektrofilowych, w metabolizmie leukotrienów i prostaglandyn, 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).

BIOSYNTETA GLUTATIONU

Biosynteza glutationu, kontrolowana przez układ enzymów z grupy syntetaz, została stwierdzona we wszystkich dotychczas zbadanych tkankach. Zarówno biosynteza glutationu

jak i jego katabolizm zachodzą poprzez cykl γ -glutamylowy. Związki biorące udział w syntezie glutationu przenikają do komórek na drodze dyfuzji ułatwionej lub też z jonami sodowymi, na zasadzie kotransportu. Tempo syntezy GSH jest limitowane obecnością substratów, w szczególności cysteiny. Niedobór tego aminokwasu (toksycznego w stanie wolnym) jest uzupełniany poprzez wykorzystanie cyklu metioninowego. Proces biosyntezy glutationu jest dwustopniowy i zachodzi wewnątrz komórki.

W pierwszym etapie powstaje γ -glutamylcysteina (7). Etap ten katalizowany jest przez syntetazę γ -glutamylcysteiny (EC.6.3.2.2.), heterodimer składający się z podjednostki dużej o masie 73 kDa i podjednostki małej, 28 kDa. Duża podjednostka posiada pełną aktywność enzymatyczną, zaś mniejsza odgrywa funkcję regulatorową i samodzielnie jest nieaktywna. W natywnej cząsteczce enzymu obie podjednostki połączone są mostkiem disiarczkowym (8,9). Aktywność enzymatyczną białka reguluje zasada ujemnego sprzężenia zwrotnego. Aktywność enzymu jest hamowana nieallosterycznie przez GSH. Mechanizm inhibicji polega na konkurencji γ -glutaminianu i GSH o miejsce wiążące w cząsteczce enzymu. Nadmiar glutaminianu znosi inhibicję (7). Specyficznymi inhibitorami syntetazy γ -glutamylcysteiny są propionino-, i butioninosulfoksiminy, a także sulfoksimina metioniny (10). Pierwszy etap syntezy podlega regulacji przez cytokiny, niektóre utleniacze oraz insulinę i glukokortykoidy (11,12). W drugim etapie, katalizowanym przez syntetazę glutationową (EC. 6.3.2.3) powstaje glutation. Następnie GSH jest transportowany na zewnątrz komórki i zostaje rozkładany przez związanie z błonowym enzymem γ GT (γ -glutamylotranspeptydazą). Enzym ten odłącza glutaminian a następnie działają dipeptydazy, które odłączają glicynę (ryc. 1). Powstałe aminokwasy mogą być ponownie resorbowane i używane do biosyntezy GSH (13).

Głównym miejscem syntezy glutationu jest wątroba, skąd wraz z krwią związek ten wędruje do innych tkanek. Komórki zdolne do pobierania GSH posiadają na swojej powierzchni γ -glutamylotranspeptydazę. Pomiary aktywności tego enzymu wskazują, że głównymi konsumentami GSH są: nerki, mózg, czerwone i białe krwinki, płuca, serce, jelita i inten-

sywnie pracujące mięśnie (14-17). Zwiększa to ich ochronę przed stresem oksydacyjnym (ryc. 2) (18,19).

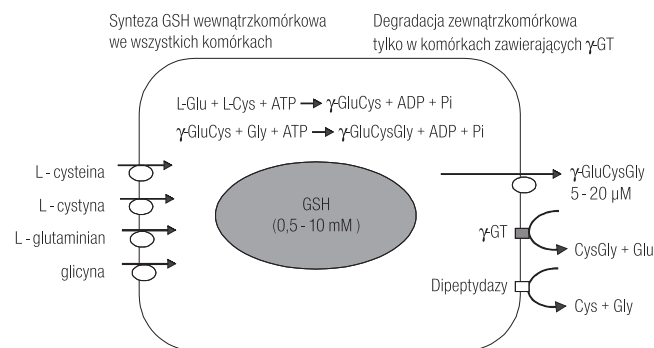
Ilość glutationu w wątrobie wzrasta 3-krotnie przy diecie białkowej, natomiast przy nadczynności tarczycy spada do 40% normy (20). Stężenie glutationu w komórkach serca jest w porównaniu z wątrobą kilkakrotnie niższe, lecz bardziej stabilne, nie ulega zmianom (21). W osoczu krwi stężenie glutationu jest bardzo niskie, około 20 μ M. Krew zawiera dwukrotnie więcej cysteiny niż glutationu, około 240 μ M białkowych grup - SH i różne koniugaty glutationu (22).

Wraz z wiekiem obniża się aktywność syntetazy γ -glutamylcysteiny w nerkach, wątrobie, płucach i krwinkach czerwonych na skutek zmniejszenia się ekspresji kodującej ją genów, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia stężenia GSH w tkankach i komórkach (23).

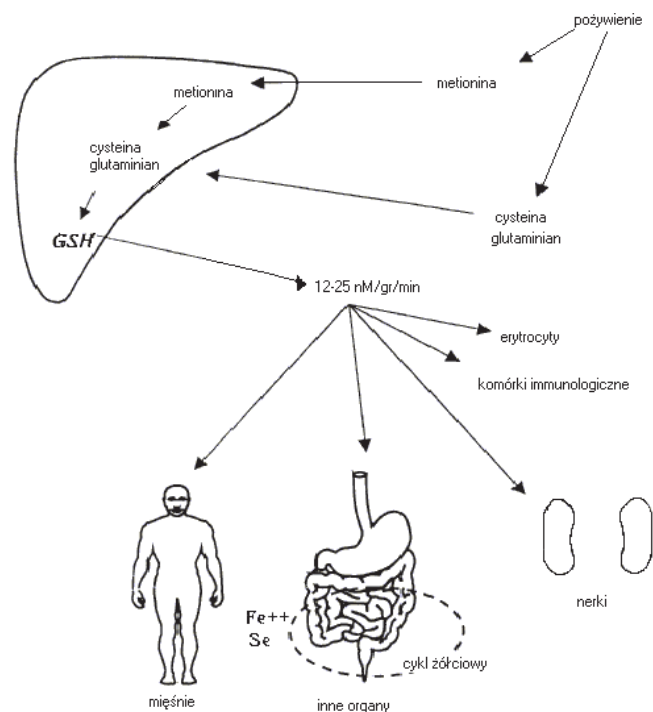
W fizjologicznych warunkach glutation jest syntetyzowany z cysteiny, metioniny i glutaminianu, które dostarczane są wraz z pokarmem. Głównym miejscem syntezy są hepatocyty. W wątrobie glutation jest wydzielany przez błony hepatocytów do żył wrotnych albo przez błony kanalików bezpośrednio do żółci (24). Wątroba może zmieniać stężenie glutationu we krwi wrotnej przed jej wyjściem do układu obwodowego i bardzo szybko dostarczać go do tkanek (25).

Podczas braku pożywienia, w warunkach stresu oksydacyjnego energia potrzebna m.in. do syntezy glutationu uzyskiwana jest z tłuszczów, białek i zapasów glikogenu w mięśniach i jelitach (ryc. 3) (26).

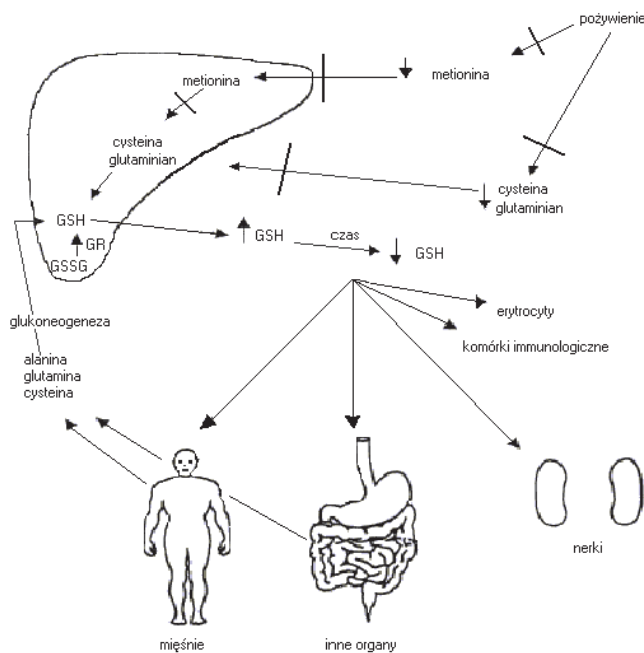
Degradacja glutationu katalizowana jest przez połączone działanie γ -glutamylotranspeptydazy i γ -glutamylotransferazy. Występujące w cząsteczce glutationu wiązanie



Ryc 1. Proces wewnątrzkomórkowej syntezy i zewnątrzkomórkowej degradacji glutationu (13).



Ryc 2. Fizjologiczne szlaki metabolizmu glutationu (18,19).



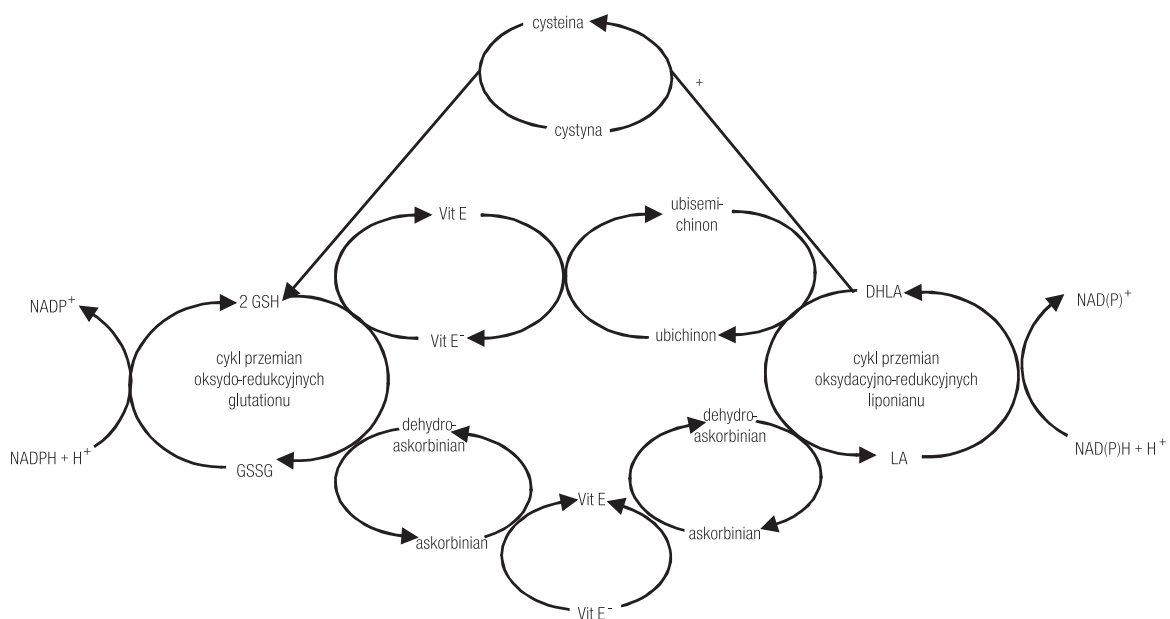
Ryc. 3. Szlaki metabolizmu glutationu podczas stresu oksydacyjnego (26).

γ -glutamylowe pomiędzy grupą γ -karboksylową glutaminianu a grupą aminową cysteiny odporne jest na działanie peptydaz, a jedynie γ -glutamylotranspeptydaza jest jedynym enzymem zdolnym do jego hydrolizy (27). Enzym ten jest kompetycyjnie hamowany przez γ -glutamylotranspeptydazy i α -ketokwasy (28). Katalizuje on reakcję przeniesienia grupy γ -glutamylowej z cząsteczki glutationu na aminokwas akceptorowy (cysteina, cystyna, metionina, glutamina). Natywny enzym γ -glutamylotranspeptydaza jest heterodimerem zbu-

dowanym z podjednostki małej i dużej. Na silnie glikozylowanej małej podjednostce (19,7 kDa) zlokalizowane jest centrum aktywne enzymu (29). N-końcowy fragment podjednostki dużej zakotwiczony jest w błonie komórkowej. Drugi z enzymów, γ -glutamylcyklotransferaza (E.C. 2.3.2.4.) katalizuje powstały dipeptyd uwalnia aminokwas akceptorowy i przekształca resztę glutamylową w 5-oksoprolinę. Cykl γ -glutamylowy zamyka reakcja odtworzenia γ -glutamianu katalizowana przez 5-oksoprolinazę (E.C. 3.5.2.9). Do centrum aktywnego homodimerycznego enzymu przyłącza się 5-oksoprolina, zaś do miejsca wiążącego trifosforany nukleotydów, ATP. Niezależne przyłączenie obu związków przez cząsteczkę enzymu wywołuje zmiany konformacyjne, przestrzennie zbliżające substraty (30).

CZYNNIKI INDUKUJĄCE BIOSYNTEZĘ GSH

Badania Kirlina i wsp. (31) pokazują, iż szczególnie istotne w regulowaniu fizjologicznego stężenia GSH w tkankach są cechy indywidualne, osobnicze, wpływające jednocześnie na aktywność enzymów związanych z syntezą i rolą GSH. Wiadomo także, iż są dwa zasadnicze procesy wpływające na wzrost stężenia tkankowego GSH, jest to neosynteza GSH i regeneracja GSH z GSSG (3). Synteza GSH w komórce jest ograniczana dostępnością aminokwasu cysteiny, która w swojej zredukowanej formie jest niestabilna. W przemianach u człowieka cysteina występuje w ponad 90% w postaci utlenionej cystyny. Na wzrost dostępności zredukowanej formy cysteiny wpływa szereg czynników, m.in. liponian, witamina E, askorbinian i ubichinon, wchodzące w skład dwóch ząbkujących się cykli oksydacyjno-redukcyjnych (ryc. 4). Liponian przenikający do komórek jest natychmiast redukowany



Ryc. 4. Rola cyklu przemian oksydacyjno-redukcyjnych liponianu w metabolizmie glutationu. LA - liponian; DHLA - dehydroliponian; vit. - witamina (32).

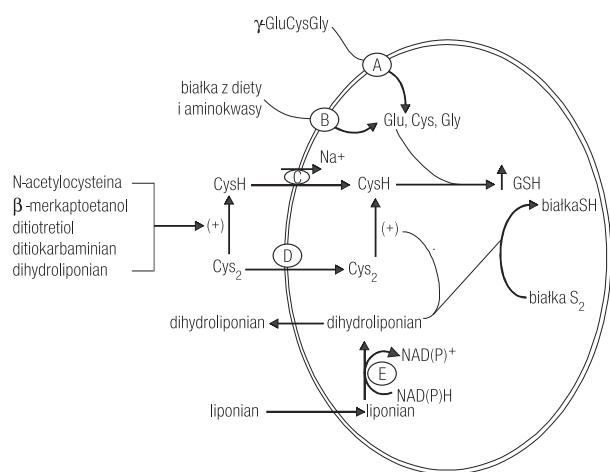
do dihydroliponianu przez odpowiednie enzymy: dehydrogenazę dehydroliponową, reduktazę glutationową i reduktazę tioredoksyny. W komórce dihydroliponian uczestniczy w redukcji cystyny do cysteiny oraz disulfidów białek (32).

Zmiana dostępności cysteiny dla biosyntezy GSH jest najintensywniej studiowaną drogą zwiększenia puli komórkowego GSH. Jedną ze strategii, zwiększających stężenie wewnątrzkomórkowego glutationu, jest zwiększenie dostępności cysteiny, poprzez dodanie czynnika redukującego (cystynę do cysteiny). Takie czynniki redukujące, jak ditiokarbaminiany, β -merkaptioetanol i ditiotretiol mogą również wpływać na podwyższenie stężenia GSH poprzez pozakomórkową redukcję cystyny do cysteiny. N-acetylo- α -cysteina (NAC) i liponian wykazują największy korzystny efekt i już zostały zastosowane w badaniach klinicznych (33–36).

Cystyna jest transportowana do komórki przez transporter D, zaś cysteina zewnątrzkomórkowa jest transportowana do wnętrza komórki przez transporter C. Transport przez C jest 10 razy szybszy niż przez D (37), dlatego w obecności pozakomórkowej cysteiny, dostępność tego aminokwasu w komórce jest podwyższona (ryc. 5).

Druga droga podwyższenia stężenia GSH zakłada wzrost aktywności genów syntetyzujących GSH poprzez transfer genów. Stosuje się już takie doświadczenia na komórkach *Escherichia coli* (38) i komórkach ssaków (39), ale do zastosowania klinicznego jeszcze daleka droga.

Stężenie GSH zależy również od tempa regeneracji z GSSG w komórkach. To zaś zależy od aktywności reduktazy glutationowej i dostępności NADPH, co wiąże się z odpowiednią ilością w tkankach ryboflawiny, czyli witaminy B (40). Zwiększenie stężenia GSH może nastąpić poprzez wprowadzenie zewnątrzkomórkowego glutationu do komórki. Prowadzi się obecnie badania dotyczące zastosowania monoestru glicylowego i dietyloвого estru glutationu (41). Badania dotyczące wpływu monoestru glutationu (42) i monetylowego estru glutationu (43,44) na parametry stresu komórkowego (aktywność



Ryc. 5. Czynniki zwiększające stężenie wewnątrzkomórkowe cysteiny (prekursora GSH) w komórkach. A - γ -glutamylotransferaza; B - glutaminian (Glu), cysteina (CysH), czy glicyna (Gly), C i DX_c system transportu aminokwasów (32).

katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej i stężenie GSH) jednoznacznie udawniają ochronną rolę tychże estrów. GSH jest lipofobową cząsteczką, która nie może przechodzić przez błony komórki natomiast jego estry wykazują właściwości lipofilowe. Są zatem przenośnikami tego peptydu, chociaż użycie tych estrów do zwiększenia tkankowego GSH nie odbywa się bez ograniczeń. Na przykład, zanieczyszczenie monoestru GSH jonem metalu niezwykle obniża zdolność tego związku jako dostarczyciela GSH. Ponadto pewne formy estrowego GSH, jak dimetylowy ester GSH, wykazują się toksycznością w stosunku do myszy (45). Również pewne estry są zhydrolizowane przez esterazy znajdujące się w osoczu i tracą możliwość przechodzenia do wnętrza komórki. Wydaje się, iż jest to słuszna droga badań naukowych, ale nadal jeszcze pozostaje poza kręgiem badań klinicznych.

ROLA DIETY W UTRZYMANIU PRAWIDŁOWEGO STĘŻENIA GSH W KOMÓRKACH

Czynnikiem szczególnie wpływającym na stężenie GSH w komórkach jest odpowiednia dieta. Produkty mleczne, jaja, tłuszcze, oleje, większość napojów i produktów zbożowych posiada niską zawartość glutationu. Natomiast świeże owoce, warzywa i świeżo ugotowane mięsa bogate są w ten niskocząsteczkowy związek. Stężenie GSH w produkcie spożywczym zależy nie tylko od rodzaju pożywienia, ale także od sposobu jego przygotowania i konserwowania. Mrożona żywność ma podobną zawartość glutationu jak żywność świeża, ale inne formy przygotowania i konserwowania powodują znaczną lub całkowitą utratę GSH (tab. 1) (46).

Tabela 1. Całkowita zawartość glutationu zredukowanego w powszechnie spożywanych produktach (46)

Produkt spożywczy	Stężenie GSH mg/100g	GSH mg/srednią porcją
Warzywa		
Szparagi (świeże, gotowane)	28,3 ± 5,4	26,3
Marchew (surowa)	7,9 ± 1,5	5,4
(świeża, gotowana)	5,8 ± 1,5	4,3
(puszkowana, asteryzowana)	0,0	0,0
Ziemniaki (świeże, gotowane)	13,6 ± 2,5	12,7
Owoce		
Pomarańcze (świeże)	7,3 ± 0,8	10,6
Sok pomarańczowy (liofilizowany)	4,2 ± 0,1	7,9
Jabłka (świeże)	3,3 ± 0,5	4,6
Sok jabłkowy (butelkowany)	0,0	0,0
Mięsa		
Szynka (gotowana)	23,3 ± 6,5	13,0
Kurczak (smażony)	13,1 ± 2,8	13,4
Wołowina (mielona, smażona)	17,5 ± 0,8	14,9
Bekon (smażony)	5,0 ± 0,7	0,8
Zboża, ziarna zbóż, rośliny strączkowe		
Masło orzechowe	2,4 ± 0,5	0,4
Chleb (pszenny)	1,2 ± 0,1	0,6
Ryż	1,6 ± 0,1	2,1
Fasola (puszkowana, pasteryzowana)	0,6 ± 0,1	0,9
Nabiał		
Mleko	0,0	0,0
Ser żółty	0,0	0,0

Tabela 2. Zawartość metioniny i cysteiny w wybranych produktach spożywczych (46)

Produkt spożywczy	Cysteina i metionina mg/g białka
Wołowina	40
Kurczak, jaja	57
Mleko krowie	33
Mleko ludzkie	42
Mleko owcze	32
Mleko kozie	35

W regulowaniu ilości dostarczanego wraz z pożywieniem glutationu istotną rolę odgrywa także obecność jego prekursorów, głównie metioniny i cysteiny. Występowanie cysteiny i metioniny w produktach spożywczych jest znacznie większe niż glutationu i bardziej powszechne (tab. 2).

Chociaż GSH jest obecny w pokarmie w bardzo małej ilości i stanowi małą część całkowitej puli aminokwasów siarkowych, to jego spożywanie wiąże się z mierzalnym podwyższeniem jego stężenia w osoczu i różnych tkankach. Wzrost stężenia glutationu pod wpływem diety jest niewielki i krótkotrwały, to jednak może mieć kolosalne znaczenie w detoksykacji wolnych rodników obecnych we krwi oraz ochronie komórek przed stresem oksydacyjnym. Wiadomo, iż dieta bogata w glutation poprawia oczyszczanie metaboliczne i obniża adsorpcję obecnych w pokarmie nadtlenków lipidowych. Pojawiło się nawet jedno doniesienie mówiące o tym, że spożywanie pokarmu o dużej zawartości GSH może być związane ze znaczną redukcją ryzyka wystąpienia nowotworów jamy ustnej i gardła (46).

CHOROBY ZWIĄZANE Z OBNIŻONYM STĘŻENIEM GSH

W ramach badań nad kancerogenezą ujawniono pewną zależność pomiędzy stężeniem glutationu w komórkach nowotworowych a ich opornością na radio- i chemioterapię. Wiadomo, iż komórki rakowe mają znacznie wyższe stężenie glutationu zredukowanego niż komórki prawidłowe. W związku z tym istotnym badaniem zagadnieniem jest znalezienie odpowiedzi jak zmniejszyć stężenie GSH w komórkach rakowych a tym samym uczynić je mniej odpornymi na leki przeciwnowotworowe (nie naruszając przy tym homeostazy normalnych komórek). Ostatnie badania podkreślają ochronną rolę glutationu w procesie apoptozy komórek, zatem komórki rakowe z wyższą ilością GSH są odporne na apoptozę. Zmniejszenie stężenia GSH w komórkach rakowych mogłoby odpowiadać nie tylko za zwiększenie skuteczności chemioterapii, ale także za wzbudzenie szybkiej apoptozy (47,48). Obniżenie stężenia glutationu powoduje apoptozę *in vitro* w immortalizowanych cholangiocytych, komórkach gliomy i liniach komórek nerwowych (49–51), ale nie w liniach komórkowych raka trzustki, liniach komórkowych białaczek czy raka jajnika (52–

–54). Obniżenie stężenia GSH obserwowano także w apoptozie indukowanej reaktywnymi formami tlenu (55,56).

Obniżenie stężenia GSH we krwi stwierdzono u chorych na cukrzycę (57,58) i w chorobie alkoholowej (59), u osób zakażonych wirusem HIV i w limfocytach pacjentów z zaawansowanymi objawami AIDS (60,61). Obniżenie stężenia GSH u osób zakażonych wirusem HIV wiąże się z osłabieniem funkcji komórek T i podwyższeniem ich śmiertelności (62). Sugeruje się, że podanie GSH w pierwszych tygodniach od zakażenia wirusem HIV może spowodować nawet regres choroby (63). Podobna sytuacja ma miejsce przy zastosowaniu N-acetylocysteiny (64). U chorych zakażonych wirusem HIV obserwuje się obniżenie aktywności GSH-Px (bezpośrednio współpracującej z GSH) (65) oraz niskie stężenie jej kofaktora selenu (66). Wskazuje się też na rolę GSH jako neurotransmitera, wpływającego na aktywność mózgu, na aktywację limfocytów i cytotoksyczność (67).

Glutation odgrywa bardzo ważną rolę w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych (68,69). Istotny dowód, potwierdzający wpływ drastycznie obniżonych stężeń glutationu na śmierć komórki nerwowej, pochodzi z badań prowadzonych przez Li i wsp. (70). Używając niedojrzałych korowych neuronów i neuronowej linii komórkowej, autorzy pokazali, że spadek stężenia GSH wywołuje aktywację neuronowej lipoksygenazy 12, która prowadzi do produkcji nadtlenku wodoru, napływu Ca^{2+} do komórki i ostatecznie śmierci neuronu.

Wiele danych podkreśla rolę astrocytów w centralnym układzie nerwowym. Przeciwdziałają one stresowi oksydacyjnemu z powodu ich wyższej zawartości GSH w porównaniu do neuronów (71,72). W sytuacji wystąpienia czynnika stresującego następuje podwyższenie aktywności komórkowej syntetazy γ -glutamylcysteinowej, prawdopodobnie na skutek wzmożonej ekspresji jej genów, czego rezultatem jest wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu w astrocytach. Wzrost wewnątrzkomórkowego glutationu w astrocytach indukuje je do wydajniejszego uwalniania GSH na zewnątrz komórki, to z kolei zwiększa stężenie substratu dla γ -glutamylotranspeptydazy i powstawanie dużych ilości Cys-Gly. Cys-Gly jest, jak wiadomo, prekursorem dla biosyntezy GSH w neuronach. Ponieważ neurony nie wykazywały wzrostu aktywności syntetazy γ -glutamylcysteinowej, uznano, że to astrocyty na skutek zwiększenia substratu dla biosyntezy GSH w neuronach regulują syntezę GSH i obronę przed czynnikami stresującymi np. tlenkiem azotu (73).

Jedną z chorób neurodegeneracyjnych, w których szczególnie istotną rolę pełni glutation, jest choroba Alzheimera. Molekularna przyczyna zmian powodujących chorobę Alzheimera jest wciąż kwestią sporną, ale główną przyczyną jest niewątpliwie powstawanie pewnych form białek skłonnych do tworzenia patologicznych agregatów. Takimi białkami są w $A\beta$ -amyloid (peptyd), tworzący tzw. płytki starcze (74), oraz hiperfosforylowane białka Tau, tworzące zwyrodnienia włóknkowe, tzw. spletki neurofibrylarne (75). Liczne doniesienia podkreślają rolę wolnych rodników w cytotoksyczności tego amyloidu (76–78). Amyloid- $A\beta$ indukuje po-

wstawanie wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (RFT), powoduje utlenianie białek, peroksydację lipidów, wzrost stężenia GSSG i obniżenie aktywności transferazy S-glutationowej (79). Te fakty świadczą o tym, iż mózg osób cierpiących na chorobę Alzheimera jest poddawany dużemu stresowi oksydacyjnemu, a przecież GSH odgrywa kluczową rolę w obronie przed wolnymi rodnikami. Wiele badań wskazuje, że system GSH może zostać aktywowany jako odpowiedź na stres oksydacyjny występujący w tej chorobie (80,81). Całkowita zawartość GSH w mózgu osób chorych na chorobę Alzheimera jest niezmienną, natomiast peroksydaza glutationowa i reduktaza wykazują znaczne podwyższenie aktywności w różnych rejonach mózgu (82,83).

W innej chorobie neurologicznej – chorobie Parkinsona, obserwuje się drastycznie zmniejszone stężenie glutationu w komórkach dopamergicznych. U podłoża choroby Parkinsona leży stopniowe zwyrodnienie i zanik tzw. istoty szarej mózgu. Przekształcanie dopaminy przez oksydazę monoaminową (MAO) i akumulacja nadtlenu wodoru, w tym oksydacyjno-redukcyjnym procesie, odgrywają istotną rolę w degeneracji dopamergicznych neuronów. Zależność między wzrostem stężenia dopaminy, produkcją nadtlenu wodoru i utlenianiem GSH do GSSG została opisana przez Spina i Cohena (84). Nadtlenek wodoru powstający zarówno w wyniku działania MAO czy też w ogólnym stresie oksydacyjnym, jest związany z procesami neurodegeneracyjnymi w chorobie Parkinsona, zmienia stężenie glutationu w mózgu, co w długim okresie przyczynia się do redukcji GSH i koreluje z ostrym parkinsonizmem. Stwierdzono, że u osób chorych na chorobę Parkinsona, stężenie glutationu w komórkach istoty szarej jest nawet o 40% niższe niż u osób zdrowych (82).

INNE CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA OBNIŻENIE STĘŻENIA GSH W ORGANIZMIE

Stężenie glutationu w komórkach nie jest stałe i ulega znacznemu obniżeniu, między innymi w komórkach narządów starzejących się organizmów, na skutek utlenienia do GSSG, wzrostu degradacji i obniżenia syntezy (85,86).

Zdecydowanie niższe stężenie GSH notuje się we krwi u palaczy (87) w porównaniu do osób niepalących. Wiąże się to z detoksykacją dużej liczby ksenobiotyków, wprowadzanych systematycznie z dymem papierosowym. Glutation tworzy z nimi koniugaty, które usuwa na zewnątrz z komórek, dzięki aktywności transferazy glutationowej. Długotrwałe palenie powoduje ciągle zawyżone zapotrzebowanie na ten niskocząsteczkowy antyoksydant i doprowadza ostatecznie do spadku jego stężenia.

Stwierdzono także, iż nadużywanie alkoholu doprowadza do spadku stężenia GSH w komórkach wątroby, na skutek indukcji stresu oksydacyjnego. Badania Baileya i wsp. (88) pokazują, że chroniczne nadużywanie alkoholu powoduje zmiany w systemie antyoksydacyjnym GSH/GSH-Px, co może przyczyniać się do oksydacyjnych modyfikacji białek wątroby.

Chroniczni alkoholicy posiadają obniżone stężenie GSH w osoczu (co jest odbiciem obniżonej zawartości w wątrobie) w porównaniu do grupy kontrolnej, alkoholicy $4,36 \pm 1,89 \mu\text{M}$, grupa kontrolna $8,48 \pm 2,68 \mu\text{M}$. Ma to ogromne znaczenie przy przyjmowaniu różnego rodzaju leków. Badania Lauterburga i Veleza (89) wskazują na ryzyko powstania nekrozy komórek wątroby u alkoholików przyjmujących paracetamol. Obniżone stężenie GSH powoduje, że ksenobiotyki nie mogą być odpowiednio metabolizowane (brak GSH do tworzenia koniugatów) i działają uszkadzająco na komórki wątroby.

Czynnikiem obniżającym stężenie GSH jest promieniowanie rentgenowskie. Badania stężenia GSH we krwi techników radiologicznych wykazało zmniejszenie stężenia GSH pod wpływem ww. promieniowania (90).

Intensywny wysiłek fizyczny zwiększa wymagania pracujących mięśni na antyoksydanty niskocząsteczkowe, do których należy glutation. Potwierdzają to badania przeprowadzone przez Marin i wsp. (91), którzy badając wpływ 30-tygodniowego treningu na aktywność enzymów syntezy glutationu w mięśniach szkieletowych psów i stężenie glutationu w osoczu, zaobserwowali 2 i 3-krotny wzrost aktywności syntetazy glutamylcysteinowej i syntetazy glutationowej w mięśniach szkieletowych oraz wzrost stężenia całkowitego glutationu w osoczu, przy braku zmian stężenia formy utlenionej.

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. Meister A., Anderson M.E.: Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 1983; 52: 711–760.
3. Meister A.: Glutathione ascorbic acid antioxidant system in animals. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 9397–9401.
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; 56: 352–358.
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. Bartosz G.: Glutathione metabolism. *Postępy Biochem.* 1993; 39: 32–38.
8. Tu Z., Anders M.W.: Expression and characterization of human glutamate-cysteine ligase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998; 15: 247–254.
9. Lu S.C.: Regulation of glutathione synthesis. *Curr. Top. Cell. Regul.* 2000; 36, 95–116.
10. Griffith O.W. Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J. Biol. Chem.* 1982; 257: 13704–13712.
11. Brown-Borg H.M., Rakoczy S.G., Romanick M.A., Kennedy M.A. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 on hepatocyte antioxidative enzymes. *Exp. Biol. Med.* 2002; 227: 94–104.
12. Seo J.Y., Kim H., Deo J.T., Kim K.H.: Oxidative stress induced cytokine production in isolated rat pancreatic acinar cells: effects of small-molecule antioxidants. *Pharmacology* 2002; 64: 63–70.

13. Wang W., Ballatori S.: Endogenous glutathione conjugates; Occurrence and Biological Functions. *Pharmacol. Rev.* 1998; 50: 335–356.
14. Halliwell B.: Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end. *Free Radic. Res.* 1999; 31: 261–273.
15. Itoh K., Ishii T., Wakabayashi N., Yamamoto M.: Regulatory mechanism of cellular response to oxidative stress. *Free Radic. Res.* 1999; 31: 319–325.
16. Lash L.H., Jones D.P. Renal glutathione transport. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 14508–14514.
17. Griffith O.W. Novogrodsky A., Meister A. Translocation of glutathione from lymphoid cells that have markedly different γ -glutamyl transpeptidase activities. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76: 2249–2252.
18. Lyons J., Rauh-Pfeiffer A., Yu Y.M., Lu X.M., Zurakowski D., Topkins R.G. i wsp.: Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulphur amino-acid free diet. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 5071–5076.
19. Malmezat T., Breuille D., Capitan P., Mirand P.P., Obled C.: Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *J. Nutri.* 2000; 30: 1239–1246.
20. Morini, P., Casalino, E., Sblano, C. and Landriscina, C.: The response of rat liver lipid peroxidation, antioxidant enzyme activities and glutathione concentration of the thyroid hormone. *Int. J. Biochem.* 1991; 23: 1025–1030.
21. 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.
22. Lash L.H., Jones D.P.: Renal glutathione transport: Characteristics of the sodium - dependent system in the basal - lateral membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* 1986; 247, 120–130.
23. Liu R., Choi J.: Age-associated decline in gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression in rats. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28: 566–574.
24. Valencia E., Marin A., Hardy G.: Glutathione - Nutritional and Pharmacologic Viewpoints: Part III. *Nutrition* 2001; 17: 696–697
25. Valencia E., Marin A., Hardy G.: Glutathione - Nutritional and Pharmacologic Viewpoints: Part V. *Nutrition* 2001; 17: 978.
26. Lauterburg B.H., Adams J.D., Mitchel J.R.: Hepatic GSH homeostasis in the rat: Efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology* 1984; 4: 586–590.
27. Meister A. Selective modifications of glutathione metabolism. *Science* 1984; 220: 472–477.
28. Tate S.S., Meister A.: Interaction of gamma glutamyl transpeptidase with aminoacid, dipeptides and derivatives analogs of glutathione. *J. Biol. Chem.* 1974; 249: 7593–7602.
29. Tong J., Harrison G., Curthoys N.P.: The effect of metabolic acidosis on the synthesis and turnover of rat renal phosphate-dependent glutaminase. *Biochem. J.* 1986; 233: 139–144.
30. Williamson J.M., Meister A.: Effect of sulfhydryl group modification on the activities of 5-oxo-L-prolinase. *J. Biol. Chem.* 1982; 257: 9161–9172.
31. Kirilin W.G., Cai J., Thompson S.A., Diaz D., Kavanagh T.J., Jones D.P.: Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 27: 1208–1218.
32. Sen Ch.K., Packer L.: Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000; 72: 653–669.
33. Aruoma O.I., Halliwell B., Hoey B.M., Butler J.: The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* 1989; 6: 593–597.
34. Packer L, Roy S., Sen C.K.: Alpha-lipoic acid: a metabolic antioxidant and potential redox modulator of transcription. *Adv. Pharmacol.* 1997; 38: 79–101.
35. Gmunder H., Eck H.P., Droge W.: Low membrane transport activity for cystine in resting and mitogenically stimulated human lymphocyte preparations and human T cell clones. *Eur. J. Biochem.* 1991; 201: 113–17.
36. Skrzydlewska E., Farbiszewski R.: Protective effect of N-acetylcysteine on reduced glutathione, reduced glutathione-related enzymes and lipid peroxidation in methanol intoxication. *Drug Alcohol Depend.* 1999; 57, 61–67.
37. Christensen H.N.: Role of amino acid transport and counter transport in nutrition and metabolism. *Physiol. Rev.* 1990; 70, 43–77.
38. Moore W.R., Anderson M.E., Meister A., Murata K., Kimura A.: Increased capacity for glutathione synthesis enhances resistance to radiation in *Escherichia coli*: a possible model for mammalian cell protection. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1989; 86: 1461–1464.
39. Huang C.S., Chang L.S. Anderson M.E., Meister A.: Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 19675–19680.
40. Hunter K.E., Turkki P.R.: Effect of exercise on riboflavin status of rats. *J. Nutr.* 1987; 117: 298–304.
41. Meister A.: Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacol. Ther.* 1991; 51: 155–194.
42. Rajasekaran N.S., Devaraj N.S.: Devaraj H. Modulation of rat erythrocyte antioxidant defence system by buthionine sulfoximine and its reversal by glutathione monoester therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 2004; 1688: 121–129.
43. Anderson M.F., Nilsson M., Sims N.R.: Glutathione monoethyl ester prevents mitochondrial glutathione depletion during focal cerebral ischemia. *Neurochem. Int.* 2004; 44: 153–159.
44. Anderson M.F., Nilsson M., Eriksson P.S., Sims N.R.: Glutathione monoethyl ester provides neuroprotection in a rat model of stroke. *Neurosci. Lett.* 2004; 354: 163–165.
45. Levy E.J., Anderson M.E., Meister A.: Transport of glutathione diethyl ester into human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 9171–9175.
46. Valencia E., Marin A., Hardy G.: Glutathione - Nutritional and Pharmacologic Viewpoints: Part IV. *Nutrition* 2001; 17: 783–784.
47. Tormos C., Javier Chaves F., Garcia M.J, Garrido F, Jover R, O'Connor J.E.: Role of glutathione in the induction of apoptosis and c-fos and c-jun mRNAs by oxidative stress in tumor cells. *Cancer Lett.* 2004; 10: 103–113.
48. Celli A., Que F.G., Gores G.J., LaRusso N.F.: Glutathione depletion is associated with decreased Bcl-2 expression and increased apoptosis in cholangiocytes. *Am. J. Physiol.* 1998; 275: G749–G757.
49. Higuchi Y., Matsukawa S.: Glutathione depletion induces giant DNA and high-molecular-weight DNA fragmentation associated with apoptosis through lipid peroxidation and protein kinase C activation in C6 glioma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999; 363: 33–42.
50. Merad-Boudia M., Nicole A., Santiard-Baron D., Saille C., Ceballos-Picot I. Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis

- induced by glutathione depletion in neuronal cells; relevance to Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.* 1998; 56: 645–655.
51. Schnelldorfer T., Gansauge S., Gansauge F., Schlosser S., Beger H.G., Nussler A.K.: Glutathione depletion causes cell growth inhibition and enhanced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer* 2000; 89: 1440–1447.
52. Wright S.C., Wang H., Wei Q.S., Kinder D.H., Larrick J.W.: Bcl-2-mediated resistance to apoptosis is associated with glutathione-induced inhibition of AP24 activation of nuclear DNA fragmentation. *Cancer Res.* 1998; 58: 5570–5576.
53. Lopez S.G., Luderer U.: Effects of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 36: 1366–1377.
54. Bartosz G.: Rola reaktywnych form tlenu w apoptozie. *Postępy Biochem.* 1998; 44: 22–31.
55. Umansky S.R.: Apoptosis: molecular and cellular mechanisms [A review]. *Mol. Biol.* 1996; 30: 285–295.
56. Pollack M., Leeuwenburgh C.: Apoptosis and Aging: Role of the Mitochondria. *J. Gerontol. Seria A: Biol. Sci. Med. Sci.* 2001; 56: B475–B482.
57. Yu B.P., Chung H.Y.: Oxidative stress and vascular aging. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2001; 54: S73–S80.
58. Samiec P.S., Drews-Botsch C., Flagg E.W., Kurtz J.C., Sternberg P., Reed R.L. I wsp.: Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degradation and diabetes. *Free Radic. Biol.* 1998; 24: 699–704.
59. Albano E.: Free radical mechanisms in immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 15: 110–114.
60. Clarke S.F., Guy P.L., Burritt D.J., Jameson P.E.: Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. *Pysiol. Plant.* 2002; 114, 157–164.
61. Jones D.P., Carlson J.L., Mody V.C., Cai J., Lynn M.J., Sternberg O.: Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28: 625–635.
62. Herzenberg L.A., De Rosa S., Herzenberg L.A.: Low glutathione (GSH) levels in CD4 T cells predicts poor survival in AIDS, N-acetylcysteine (NAC) may improve survival. In: *Oxidative Stress and Redox Regulation: Cellular Signalling AIDS Cancer and OTHER Diseases*. Institut Pasteur, Paris 1996.
63. Palmara A.T., Garaci E., Rotilio G., Ciriolo M.R., Casabianca A., Fraternali A., Rossi L., Schiavano G.F., Chiarantini L., Magnani M.: Inhibition of murine AIDS by reduced glutathione. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1996; 12, 1373–1381.
64. De Roas S.C., Zaretsky M.D., Dubs J.G., Roederer M., Anderson M., Green A.: N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *Eur. J. Clin. Invest.* 2000; 30: 915–29.
65. Gil L., Martinez G., Gonzalez I., Tarinas A., Alvarez A., Giuliani A.: Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. *Pharmacol. Res.* 2003; 47: 217–24.
66. Foster H.D.: How HIV-1 causes AIDS: implications for prevention and treatment. *Med. Hypotheses* 2004; 62: 549–553.
67. Srebro Z., Lach H.: Stres metaboliczny w chorobach neurodegeneracyjnych i psychicznych. *Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków* 2002, ss. 1–92.
68. Droge W.: Free radicals in the physiology control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002; 82, 47–95.
69. Halliwell B.: Role free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drug Aging* 2001; 18: 685–716.
70. Li Y., Maher Schbert D.: A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion, *Neuron* 1997; 19: 453–463.
71. Peuchen S., Bolanos J.P., Heales S.J.R., Almeida A., Duchon M.R., Clark J.B.: Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 1997; 52: 261–281.
72. Dringen R., Gutterer J.M., Hirrlinger J.: Glutathione metabolism in the brain. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267, 4912–1916.
73. Gegg M.F., Beltran B., Salas-Pino S., Bolanos J.P., Clark J.B., Moncada S., Heales S.J.R.: 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.
74. Reyes A.E., Chacon M.A., Dinamarca M.C., Cerpa W., Morgan C, Inestrosa N.C.: Acetylcholinesterase – A beta complexes are more toxic than A beta fibrils in rat hippocampus – Effect on rat beta-amyloid aggregation, laminin expression, reactive astrocytosis, and neuronal cell loss. *Am. J. Pathol.* 2004; 164: 2163–2174.
75. Goedert M.: Tau protein and neurodegeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2004; 15: 45–49.
76. Zhang H.Y., Tang X.C., Huperzine B. A novel acetylcholinesterase inhibitor, attenuates hydrogen peroxide induced injury in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 2000; 292: 41–44.
77. Lorenc-Koci E.: Glutathione. Metabolizm i biologiczna rola w ośrodkowym układzie nerwowym. W: *Wolek L. [red.] Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii*. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2005.
78. Christen Y.: Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000; 71: 621S–629S.
79. Pocernich C.B., La Fontaine M.: In vivo glutathione elevation protects against hydroxyl free radical-induced protein oxidation in rat brain. *Neurochem. Int.* 2000; 36: 185–91.
80. Aksenov M.Y., Markesbery W.R.: Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 2001; 302: 141–145.
81. Adams Jr.J.D., Klaidman L.K., Odunze I.N., Shen H.C., Miller C.A.: Alzheimer's and Parkinson's disease. Brain levels of glutathione, glutathione disulfide, and vitamin E. *Mol. Chem. Neuropathol.* 1991; 14: 213–226.
82. Bains J.S., Shaw C.A.: Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress – mediated neuronal death. *Brain Res. Rev.* 1997; 25: 335–358.
83. Balazs L., Leon M: Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. *Neurochem. Res.* 1994; 19: 1131–1137.
84. Spina M.B., Cohen G.: Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. USA* 1989; 86: 1398–1400.
85. 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.
86. Yu B.P., Chung H.Y.: Oxidative stress and vascular aging. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2001; 54, S73–S80.

-
87. Durak I., Yalçın S., Cimen M.Y.B., Büyükkoçak S., Kaçmaz M., Öztürk H.S.: Effects of smoking on plasma and erythrocyte antioxidant defense system. *J. Toxicol. Environ. Health* 1999; 56: 373-578.
88. Bailey S.M., Patel V.B., Young T.A., Asayama K., Cunningham C.C.: Chronic ethanol consumption alters the glutathione/glutathione peroxidase-1 system and protein oxidation status in rat liver. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2001; 25: 726-33.
89. Lauterburg B.H., Velez M.E.: Glutathione deficiency in alcoholics: risk factor for paracetamol hepatotoxicity. *Gut.* 1988; 29: 1153-1157.
90. Akköse A., Ömer B., Yiğitbaşı A.: DNA damage and glutathione content in radiology technicians. *Clin. Chim. Acta* 2003; 336: 13-18.
91. Marin E., Kretzcher M., Arokoski J., Hanninen O., Klinger W.: Enzymes of glutathione synthesis in dog skeletal muscles and their response to training. *Acta Physiol. Scand.* 1993; 147: 369-373.