

Anna Łukaszewicz-Hussain

## ROLA GLUTATIONU I ENZYMÓW Z NIM ZWIĄZANYCH W PROCESACH ANTYOKSYDACYJNYCH ORGANIZMU

THE ROLE OF GLUTATHIONE AND GLUTATHIONE-RELATED ENZYMES IN ANTIOXIDATIVE PROCESSES

Z Zakładu Toksykologii  
Akademii Medycznej w Białymstoku

**STRESZCZENIE** W oparciu o dane z dostępnego piśmiennictwa opisano rolę glutationu zredukowanego i enzymów z nim związanych w procesach antyoksydacyjnych organizmu.

Podczas metabolizmu tlenowego w komórce powstają reaktywne formy tlenu (ROS). ROS są usuwane zarówno przez enzymatyczny jak i nieenzymatyczny układ przeciwutleniający. Kluczową rolę w procesach antyoksydacyjnych w organizmie pełni glutation, tripeptyd zawierający cysteinę, i związane z nim enzymy. Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PDH), enzym cyklu fosforanowo-pentozowego, jest enzymem odpowiedzialnym za regenerację NADPH, głównego komórkowego reduktanta. Ostatnie badania sugerują, że G6PDH odgrywa zasadniczą rolę w kontroli komórkowego potencjału redukcyjnego poprzez zwiększanie wewnątrzkomórkowej zawartości GSH, co z kolei przyczynia się do obniżenia zawartości ROS. Med. Pr. 2003; 54 (5): 473–479

**SŁOWA KLUCZOWE:** glutation, reaktywne formy tlenu, procesy antyoksydacyjne

**ABSTRACT** Reactive oxygen species (ROS) are produced within cells during oxidative metabolism. ROS are scavenged by both enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems. Reduced glutathione, cysteine-containing tripeptide, and glutathione-related enzymes play a key role in antioxidative processes. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), an enzyme of pentose phosphate pathway, is responsible for the regeneration of G6PDH, the main cellular reductant. Recent investigations suggest that G6PDH is essential to control intracellular reductive potential by increasing glutathione intracellular level, which in turn decreases the amount of ROS. Med Pr 2003; 54 (5): 473–479

**KEY WORDS:** glutathione, reactive oxygen species, antioxidative processes

Nadesłano: 2.12.2002

Zatwierdzono: 11.08.2003

Adres autorki: Mickiewicza 2C, 15-222 Białystok, e-mail: toxic@amb.edu.pl

© 2003, Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi

### WSTĘP

Powstawanie pewnych ilości reaktywnych form tlenu jest konsekwencją tlenowego metabolizmu. Produkty pośrednie, które w wyniku tego metabolizmu powstają, takie jak anionorodnik ponadtlenowy, czy nadtlenek wodoru, mogą prowadzić do tworzenia się zwiększonych ilości bardziej reaktywnych rodników, a w efekcie do peroksydacji lipidów i uszkodzenia komórki (1). Zwiększone tworzenie się reaktywnych form tlenu i indukowana przez nie dysfunkcja komórek, jest jedną z przyczyn występowania niektórych chorób. Chorobami tymi są: arytmia, nadciśnienie, uszkodzenie mięśni szkieletowych, uszkodzenie neuronów w chorobie Parkinsona, cukrzyca, choroba Alzheimera (2–6). Reaktywne formy tlenu mogą być także przyczyną uszkodzenia komórek ekspozowanych na niektóre ksenobiotyki. Stąd też rosnące zainteresowanie zarówno reaktywnymi formami tlenu, jak też układami enzymatycznymi i nieenzymatycznymi, zapobiegającymi ich wytwarzaniu i działaniu.

Obronie organizmu przed uszkodzeniem oksydacyjnym komórek służy enzymatyczny i nieenzymatyczny układ przeciwutleniający.

Enzymatyczną barierę przeciwutleniającą tworzą enzymy, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GPx) i reduktaza glutationowa (GR). W warunkach fizjologicznych enzymy te współdziałają ze sobą, z tego też powodu inaktywacja któregośkolwiek z tych enzymów powoduje osłabienie obrony antyoksydacyjnej organizmu (7).

W obronie przed reaktywnymi formami tlenu bierze także udział układ przeciwutleniający, związany z glutationem, powodujący redukcję nadtlenu wodoru kosztem NADPH (8–9). W skład tego układu wchodzi peroksydaza i reduktaza glutationowa.

Glutation, ważny wewnątrzkomórkowy peptyd pełni różnorodne funkcje, od obrony antyoksydacyjnej poczynając na wpływie na procesy komórkowej syntezy DNA kończąc (1).

### GLUTATION

Glutation ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycyna) jest rozpuszczalnym w wodzie tripeptydem zawierającym cysteinę. Występuje w większości organizmów roślinnych, mikroorganizmach i w tkankach wszystkich ssaków. Glutation może występować w formie zredukowanej (GSH) i utlenionej (GSSG). Prawie 90% GSH występuje w cytozolu komórki, około 10% w mitochondriach i niewielki procent w retikulum endoplazmatycznym (1,10). W komórkach glutation występuje przede wszystkim w formie zredukowanej. Stosunek GSH do GSSG w cytozolu i w mitochondriach wynosi 10:1 (1). Półokres trwania GSH w cytozolu wątroby szczura wynosi 2–3 godziny.

Najwyższe stężenie GSH występuje w wątrobie, która pełni wyjątkową rolę w jego syntezie. Ta wyjątkowa rola wątroby polega na tym, że hepatocyty mają zdolność przemiany metioniny w cysteinę na drodze transulfuracji

z jednej strony, z drugiej zaś strony, wielkość syntezy GSH w hepatocytach jest zrównoważona przez wydalanie do krwi i żółci (1). GSH syntetyzowany jest w cytozolu hepatocytu, a stąd transportowany do mitochondriów. Mitochondria bowiem nie mają zdolności syntetyzowania GSH (1,11,12). W przewlekłych zatruciach alkoholem obniżenie stężenia mitochondrialnego GSH, w wyniku zmniejszonego transportu glutationu z cytozolu, leży u podstaw oksydacyjnego uszkodzenia komórek wątroby (12). Glutation syntetyzowany jest z glutaminianu, cysteiny oraz glicyny i, co jest bardzo istotne, może być bardzo szybko transportowany pomiędzy różnymi tkankami (13). Pierwszym etapem syntezy GSH jest konwersja kwasu glutaminowego i cysteiny w  $\gamma$ -glutamylcysteinę. Proces ten jest katalizowany przez syntetazę  $\gamma$ -glutamylcysteiny (GCS) i wymaga ATP. Istnieje sprzężenie zwrotne pomiędzy tym etapem syntezy glutationu a jego stężeniem. Największy wpływ na wielkość syntezy GSH ma dostępność wewnątrzkomórkowej cysteiny i aktywność GCS (1). Drugim etapem syntezy glutationu jest przekształcenie  $\gamma$ -glutamylcysteiny i glicyny w GSH (14). Ten etap katalizowany jest przez syntetazę GSH. W przeciwieństwie do GCS, pomiędzy glutationem i syntetazą GSH nie ma sprzężenia zwrotnego (15). Jednakże niedobór syntetazy glutationu niesie za sobą poważne konsekwencje. Dochodzi bowiem do przemiany zakumulowanej  $\gamma$ -glutamylcysteiny w 5-oksoprolinę, co może prowadzić do ciężkiej kwasicy metabolicznej (16).

Glutation syntetyzowany jest we wszystkich komórkach, jednak najważniejszym miejscem jego syntezy jest wątroba skąd, o czym już wspomniano, uwalniany jest do krwi i do żółci (17–19). Ze względu na niską aktywność  $\gamma$ -glutamyltranspeptydazy (GGT) na powierzchni hepatocytu, uwalnianie glutationu do krwi dominuje nad jego pobraniem przez hepatocyty (18). Natomiast wysoka aktywność tego enzymu na powierzchni komórek trzustki, nerek, czy jelita powoduje, że komórki tych narządów sprawnie wychwytyują glutation z krwi (18).

Jedną z bardzo ważnych funkcji GSH jest jego rola jako magazynu i źródła cysteiny w organizmie. Funkcję taką pozwala spełniać glutationowi cykl  $\gamma$ -glutamylowy. GGT przenosi ugrupowanie  $\gamma$ -glutamylowe z GSH na aminokwas, którym jest cysteina, tworząc w ten sposób aminokwas  $\gamma$ -glutamylowy i cysteinyloglicynę. Aminokwas  $\gamma$ -glutamylowy jest następnie transportowany z powrotem do komórki zamykając cykl (1). Cysteinyloglicyna jest przez dipeptydazy rozkładana do cysteiny i glicyny. Cysteina w komórce jest wbudowywana do GSH lub białek w zależności od zapotrzebowania komórki. Jedną z najważniejszych funkcji cyklu  $\gamma$ -glutamylowego jest zapewnienie komórce stałego źródła cysteiny, która w znacznej części wbudowywana jest do glutationu, ale też wbudowywana jest do nowo syntetyzowanych białek (1).

Obecność GSH w komórce konieczna jest do utrzymania równowagi oksydo-redukcyjnej komórki i przeciwdziałania efektem stresu oksydacyjnego. GSH bierze udział w redukcji endogennie wytwarzanego nadtlenu wodoru. Podczas procesu zmiatania nadtlenu wodoru, GSH jest utleniany do di-

sulfidu glutationu (GSSG) przez peroksydazę glutationową, która katalizuje tę reakcję (14). Glutation zredukowany może też reagować bezpośrednio z anionorodnikiem ponadtlenu i rodnikiem hydroksylowym. Ostry stres oksydacyjny może prowadzić do obniżenia zdolności komórki do redukcji GSSG do GSH, co z kolei prowadzi do nagromadzenia się w cytozolu GSSG. GSSG, aby zachować równowagę w komórce, musi być usuwany poza nią lub też reagować z grupami sulfhydrołowymi białek, tworząc mieszane disulfidy, a zatem stres oksydacyjny prowadzi do obniżenia stężenia wewnątrzkomórkowego GSH (1,12). Badania innych autorów wskazują natomiast, że ekspozycja organizmu na różne czynniki powodujące stres oksydacyjny prowadzi do wzrostu stężenia glutationu zredukowanego w organizmie (20–22). Do wzrostu tego dochodzi w wyniku zwiększenia jego syntezy, poprzez indukcję syntetazy  $\gamma$ -glutamylcysteiny, a mechanizm ten uważany jest za wyraz zmian adaptacyjnych (20). Poziom GSH w tkankach zmienia się zatem po narażeniu na ksenobiotyki. W badaniach Taniguchi i wsp. (20) wykazano wpływ N-nitrozodimetyloaminy (NDMA), związku o działaniu hepatotoksycznym, na stężenie GSH w wątrobie. Stężenie to wzrastało, co prawdopodobnie związane jest ze wzrostem jego syntezy i jest to mechanizm obronny przed działaniem reaktywnych form tlenu. U osób zatrutych lindanem, malationem lub propoksurem – związkami należącymi do różnych grup chemicznych, a stosowanymi jako insektycydy, stwierdzono w limfocytach obniżenie stężenia glutationu zredukowanego, przy równoczesnym wzroście aktywności peroksydazy glutationowej, co sugeruje wykorzystanie glutationu przez ten enzym (23). Również w badaniach prowadzonych *in vitro* na erytrocytach i surowicy krwi ludzkiej, do których dodawano fosfomidon – insektycyd fosforoorganiczny wykazano obniżenie stężenia GSH w surowicy, a wzrost jego stężenia w erytrocytach. Zdaniem autorów takie zachowanie poziomu glutationu w surowicy, przy równoczesnym obniżeniu aktywności GPx i GR, sugeruje mniejsze możliwości adaptacyjne surowicy w ochronie przed stresem oksydacyjnym (24). W badaniach na rybach wykazano także wzrost poziomu glutationu w mózgu, po narażeniu na dichlorfos – insektycyd, z grupy związków fosforoorganicznych (25). Z kolei w badaniach dotyczących hepatotoksycznego działania alkoholu etylowego wykazano obniżenie stężenia glutationu w wątrobie, co zdaniem tychże autorów prowadzi do uszkodzenia tego narządu (12). Również inne ksenobiotyki działające hepatotoksycznie, takie jak acetaminofen (paracetamol), bromobenzen, chloroform, powodowały obniżenie stężenia glutationu w wątrobie (26). Do obniżenia stężenia GSH w wątrobie prowadzi także zatrucie czterochlorkiem węgla, związkiem wykazującym silne hepatotoksyczne działanie. Obniżenie to wynika z utleniania GSH do GSSG (27). Glutation pełni także ważną funkcję w zapobieganiu toksyczności wielu metali. Ma on bowiem zdolność chelatowania metali natychmiast po wnikięciu ich do komórki. Poziom glutationu w zatruciach metalami obniża się, co jest prawdopodobnie związane z jego wy-

korzystywaniem przez peroksydazę glutationową (28,29). Zmiany poziomu glutationu mogą być związane ze stopniem narażenia na metale, wykazano bowiem różnokierunkowe zmiany stężenia GSH. W swoich badaniach Chin i Templeton (30) wykazali wzrost stężenia zredukowanego glutationu w hodowli komórkowej, co jest mechanizmem obronnym przed kadmem występującym w stężeniach takich, jakie mogą wynikać z narażenia środowiskowego i zawodowego. Natomiast duże stężenia kadmu powodują obniżenie poziomu glutationu. Wynika to prawdopodobnie ze wzrostu stężenia reaktywnych form tlenu w stopniu przekraczającym możliwości regeneracji glutationu.

Zmiany stężenia glutationu zredukowanego podczas stresu oksydacyjnego mogą wynikać zatem z modyfikacji jego syntezy i/lub strat glutationu. Mechanizmy odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy glutationu w różnych tkankach są słabo udokumentowane, szczególnie w patologicznych warunkach. Jednakże znaczenie cyklu redoks, w zapobieganiu stresowi oksydacyjnemu, poznane jest dobrze (31–33).

Regeneracja GSH zachodzi w wyniku enzymatycznej redukcji utlenionego glutationu. Redukcja GSSG do GSH katalizowana jest przez reduktazę GSSG, która wykorzystuje redukcyjny potencjał NADPH (13,18). NADPH jest także konieczny do tworzenia aktywnej katalazy – enzymu, który podobnie jak peroksydaza glutationowa, redukuje  $H_2O_2$  do  $H_2O$  i  $O_2$ . Cykl reduktaza GSSG/peroksydaza GSH zachodzi w cytoplazmie. NADPH, który jest konieczny do produkcji zarówno katalazy, jak i GSH, wytwarzany jest na drodze szlaku pentozowego (8).

Enzymem, który generuje powstawanie równoważników redukcyjnych, NADPH, jest dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PDH). Enzym ten jest kluczowym enzymem przemiany glukozy na szlaku pentozowym (8). Jest głównym enzymem biorącym udział w zapobieganiu stresowi oksydacyjnemu w erytrocytach, które pozbawione są innych możliwości wytwarzania NADPH.

Rola glutationu zredukowanego w organizmie nie ogranicza się jedynie do usuwania wolnych rodników (27). Pełni on również ochronną rolę, zapobiegając toksyczności wielu substancji, bądź zmniejszając ich toksyczność, poprzez wiązanie się z ksenobiotykiem lub jego metabolitem (34,35). Wiązaniu ze zredukowanym glutationem ulegają przede wszystkim elektrofilne związki aromatyczne i alifatyczne, jak też epoksydowe związki aromatyczne i alifatyczne (14,27,36). Koniugaty te można podzielić na trzy główne typy. Są to koniugaty aromatycznych wodorowęglanów (np. bromobenzen), koniugaty w których GSH zastępuje grupę nitro- lub sufonoamido- (np. pentachloronitrobenzen) oraz koniugaty aromatycznych lub alifatycznych epoksydów (np. naftalen) (27). W wyniku powstania koniugatów stężenie glutationu obniża się, tak się dzieje na przykład w przypadku narażenia na bromobenzen (26,27). Stężenie glutationu obniża się z jednej strony w wyniku powstania koniugatów z samym bromobenzenem, z drugiej strony z jego aktywnym metabolitem tzn. 3,4-epoksydem bromobenzenu. Powstawanie

koniugatów GSH z ksenobiotykami jest spontaniczne bądź katalizowane przez glutationowe S-transferazy obecne w cytozolu wątroby. Powstałe koniugaty wydalone są z komórki. W przypadku wątroby jest to wydalanie do żółci (1). Enzymami odpowiedzialnymi za metabolizm koniugatów glutationowych do kwasu merkapturowego są glutationazy, peptydazy, acetylazy, obecne tak w nerkach, jak i w wątrobie.

Reakcje tworzenia koniugatów glutationu, przede wszystkim z epoksydami i epoksydowymi diolami policyklicznych aromatycznych wodorowęglanów, uważane były głównie za reakcje detoksykacyjne. Obecnie rozpatruje się jednakże możliwość udziału glutationu w aktywacji związków (27). Powstawanie koniugatów z GSH powoduje obniżenie wewnątrzkomórkowego GSH (1).

Zredukowany glutation bierze także udział w syntezie DNA i białek oraz w syntezie leukotrienów, które są ważnymi mediatorami stanów zapalnych (14,37,38). GSH utrzymuje stan zredukowany grup sulfhydrylowych wielu białek (14,39).

Podwyższony poziom GSH stwierdzano w komórkach nowotworowych pobranych od pacjentów cierpiących na nowotwory klinicznie odporne na chemioterapię. Związane to jest ze zwiększoną aktywnością enzymatyczną GCS w tych komórkach. GCS jest heterodimerem składającym się z podjednostki o właściwościach katalitycznych (ciężka, 73kDa) i regulatorowej (lekkiej, 30kDa). W komórkach nowotworowych lekoopornych stwierdzano zwiększony poziom mRNA, odpowiedzialnego za transkrypcję podjednostki katalitycznej GCS (1).

## PEROKSYDAZA I REDUKTAZA GLUTATIONOWA

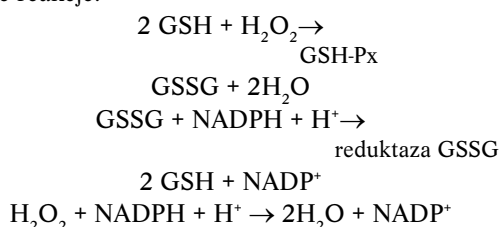
Pierwszym zidentyfikowanym selenoenzymem była peroksydaza glutationowa, katalizująca redukcję nadtlenu wodoru przez GSH, a zatem enzym pełniący rolę ochronną komórek przed stresem oksydacyjnym (40,41). Obecnie znamy co najmniej cztery formy GPx, które różnią się między sobą wieloma właściwościami, włączając w to ich lokalizację, strukturę podjednostek: 1) klasyczna peroksydaza (cGPx), występuje w cytozolu wielu tkanek i komórek krwi, która redukuje nadtlenek wodoru i organiczne wodoronadtlenki, nie może natomiast redukować wodoronadtlenków lipidowych; 2) peroksydaza glutationowa wodoronadtlenków lipidowych (PH-GPx) jest enzymem zdolnym do redukcji wodoronadtlenków fosfolipidowych, zlokalizowana jest w cytozolu i częściowo związana z błonami komórek, 3) peroksydaza glutationowa (eGPx), zwana pozakomórkową peroksydazą, występuje w surowicy i ma zdolność katalizowania zarówno wodoronadtlenków lipidowych jak i nadtlenu wodoru, 4) peroksydaza żołądkowo-jelitowa (GI-GPx) (26,41).

Peroksydaza glutationowa (cGPx) jest tetramerem o masie cząsteczkowej 84 kDa, zbudowanym z czterech podjednostek, a każda z nich zawiera atom selenu, warunkujący jej katalityczne działanie. Atomy selenu połączone są kowalencyjnie z cysteiną (42).

Peroksydaza glutationowa występuje głównie w cytozolu, ale jej obecność stwierdzono również w mitochondriach (20% całkowitej aktywności) i w jądrze komórkowym (10% całkowitej aktywności) (17). Najwyższą aktywność peroksydazy glutationowej wykazano w wątrobie, co związane jest z procesami detoksykacyjnymi, zachodzącymi w tym narządzie, oraz we krwi i w płucach. Najniższą aktywność natomiast wykazano w mózgu i w soczewce oka.

Enzym, aby działał prawidłowo, potrzebuje wolnych grup tiolowych, a ilość ich zmienia się w zależności od stanu funkcjonalnego enzymu i wynosi od trzech do siedmiu na jeden mol białka.

Peroksydaza glutationowa wchodzi w skład enzymatycznego układu związanego z glutationem, w którym uczestniczy obok niej również glutation i reduktaza glutationowa (GR) (42-45). W wyniku działania tego układu glutation pozostaje w cyklu forma utleniona-zredukowana. System ten katalizuje reakcje:



Reduktaza glutationowa (GR) jest enzymem o masie 22 kDa i podobnie jak inne enzymy katalizuje reakcje wzajemnych przemian grup sulfhydrylowych i disiarczków, a jako kofaktora potrzebuje NADPH (42,45). Enzym ten katalizuje redukcję GSSG do GSH (8,42,45). Reduktaza glutationowa odpowiedzialna jest zatem za utrzymanie odpowiedniego poziomu glutathionu zredukowanego. Podczas przebiegu reakcji katalizowanych przez GPx i GR poziom glutationu całkowitego nie zmienia się (46). Kiedy poziom zredukowanego glutationu znacznie obniża się, może dojść do kumulacji nadtlenu w komórce, co prowadzi do jej uszkodzenia. Obniżenie o 80-90% poziomu GSH powoduje nagromadzenie znacznych ilości GSSG, a to w konsekwencji prowadzi do zahamowania peroksydazy glutationowej i wysycenia reduktazy glutationowej (47).

Peroksydaza glutationowa, typu cGPx bierze udział w redukcji nadtlenu wodoru i organicznych wodoronadtlenków, natomiast PHGPx ma zdolność bezpośredniego redukcji utlenionych fosfolipidów i cholesterolu w błonach (40,42).

W reakcji katalizowanej przez peroksydazę glutationową następuje stopniowa redukcja selenu w centrum aktywnym z + 4 do -2 stopnia utlenienia, do czego potrzebne są aż cztery cząsteczki zredukowanego glutationu. Dopiero taka forma enzymu może redukować nadtlenuki. Szczególnie ważna jest rola peroksydazy glutationowej w mitochondriach. Albowiem enzym ten jest w zasadzie jedynym enzymem usuwającym nadtlenuki wodoru tworzony w mitochondriach (40). Katalaza metabolizująca  $\text{H}_2\text{O}_2$ , jest bowiem nieobecna w mitochondriach większości komórek zwierzęcych, a za-

tem kluczową rolę w usuwaniu tej reaktywnej formy tlenu pełni peroksydaza.

Peroksydaza glutationowa poza funkcją ochronną w stosunku do błon komórkowych (chroni przed ich peroksydacyjnym uszkodzeniem), czuwa także nad prawidłowym przebiegiem metabolizmu komórkowego, poprzez udział w regulacji wielu procesów np. cyklu pentozowego. Peroksydaza glutationowa poprzez oddziaływanie na endogeny inhibitor syntezy prostacyklin we krwi uczestniczy w regulacji ich stężenia. Aktywność peroksydazy glutationowej ulega zmianom w zaburzeniach zachodzących w organizmie w wyniku stresu oksydacyjnego. Jak wiadomo, stres oksydacyjny jest przyczyną różnych schorzeń neurologicznych, zarówno o ostrym charakterze jak i przewlekłym, np. choroby Parkinsona. W chorobie Parkinsona obserwuje się obniżenie stężenia glutationu zredukowanego i osłabienie metabolizmu energetycznego w mózgu. Obniżenie stężenia glutationu prowadzi do zmniejszenia aktywności peroksydazy glutationowej, enzymu zależnego od GSH (48). Zmiany aktywności peroksydazy glutationowej obserwowano również u zwierząt doświadczalnych eksponowanych na prooksydacyjnie działające ksenobiotyki. U myszy, którym podano w różnych dawkach dikwat - herbicyd działający prooksydacyjnie, stwierdzono tendencję do obniżania się aktywności GPx w wątrobie przy wzroście dawki. Inni stwierdzali różnokierunkowe zmiany po podaniu gryzoniom prooksydantów (49,50). Taniguchi i wsp. (20) wykazali obniżenie aktywności GPx w wątrobie szczurów po podaniu N-nitrozodimetyloaminy w dawce jednorazowej - 30mg/kg m.c., oraz brak zmian po podaniu tego związku zarówno w dawkach niższych, jak i wyższych. Natomiast w badaniach na szczurach, którym podawano Quinalfos - insektycyd fosforoorganiczny, stwierdzano w wątrobie wzrost aktywności peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej, przy niezmienionym poziomie GSH (51).

## DEHYDROGENAZA GLUKOZO-6-FOSFORANOWA I JEJ ROLA

Do zapewnienia odpowiedniego poziomu GSH, konieczne jest utrzymanie odpowiedniego poziomu równoważników redukcyjnych. Najważniejszym reduktantem wewnątrzkomórkowym jest NADPH, wytwarzany na drodze szlaku pentozowego w cytozolu komórki (8, 52).

Enzymem odpowiedzialnym za utrzymanie właściwego stężenia NADPH jest dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PDH), enzym szlaku pentozowego. Nukleotyd ten, wspólnie z reduktazą glutationową utrzymuje glutation w zredukowanej formie, chroniąc organizm przed stresem oksydacyjnym (53). G6PDH katalizuje pierwszy etap w szlaku fosforanowo-pentozowym, utleniając glukozy-6-fosforan do fosfoglukonianu i redukując przy tym NADP do NADPH (8, 52).

Szlak ten jest uznawany za źródło zdolności redukcyjnych komórki (54,55). Enzym ten pełni rolę ochronną pod-

czas stresu oksydacyjnego, co jest dobrze udokumentowane (54). Salvemini i wsp. (8) sugerują, że poziom G6PDH ma dominującą rolę w utrzymaniu właściwego wewnątrzkomórkowego potencjału redoks.

Na poziom NADPH może wpływać szereg różnych czynników. Zhang i wsp. (52) wykazali, że wzrost stężenia glukozy powoduje zmniejszenie poziomu NADPH w komórkach nabłonka aorty wołu. Zahamowanie obserwowano w ciągu 15 min. Wysokie stężenie glukozy poprzez zwiększenie aktywności cyklazy adenylowej stymulowało wzrost stężenia cAMP. Czynniki, które wpływają na wzrost cAMP powodują zahamowanie aktywności G6PDH poprzez jej fosforylację (53). Śmierć komórki spowodowana stresem oksydacyjnym jest zależna od utrzymania odpowiedniej aktywności tego enzymu (52,54).

Badania LeGranda i wsp. (55) wykazały, że ważnym czynnikiem regulującym wytwarzanie NADPH, w celu regeneracji GSH przez tenże układ redoks jest dostępność glukozy. Przemiany glukozy w szlaku pentozowym są odpowiedzialne za większość produkcji NADPH w erytrocytach. Hydronadtlenki zredukowane są kosztem GSH a regeneracja GSSG przez NADPH utrzymuje równowagę stanu redoks wewnątrzkomórki (55).

Niedobór G6PDH, jest niekorzystny dla organizmu, charakteryzuje się bowiem, zmniejszeniem stężenia NADPH i zwiększoną wrażliwością erytrocytów na utlenienie (56). Początkowo uważano, że ta zwiększona podatność na utlenienie związana jest bezpośrednio ze zmniejszeniem stężenia zredukowanego glutationu. Późniejsze badania wykazały jednak, że związane to jest przede wszystkim z niedoborem NADPH, a nie GSH. Istnieje bezpośrednia korelacja, pomiędzy uszkodzeniem oksydacyjnym erytrocytów a niedoborem NADPH (57). Zjawisko to dotyczy nie tylko erytrocytów, jak jeszcze niedawno sądzono, lecz także i innych typów komórek.

Obniżenie stężenia GSH w komórce prowadzi do szybkiego wzrostu poziomu nadtlenków lipidów (12,57). Jednakże utrzymanie właściwego poziomu zredukowanego glutationu jest zależne od G6PDH. Leki, które powodują obniżenie stężenia GSH (np. diamid) w hodowli ludzkich komórek Hep3B (badania *in vitro*), prowadzą jednocześnie do wzrostu aktywności G6PDH. Kiedy aktywność tego enzymu osiąga maksimum poziom GSH w komórce powraca do wartości kontroli (8).

W badaniach własnych (dane niepublikowane) znaleziono korelację ujemną pomiędzy aktywnością G6PDH a stężeniem dialdehydu malonowego (wskaźnik peroksydacji lipidów) w wątrobach szczurów zatrutowanych chlorfenwinfossem – insektycydem fosforoorganicznym oraz dodatnią korelację pomiędzy aktywnością tego enzymu a stężeniem GSH. Występowanie ujemnej korelacji pomiędzy stężeniem dialdehydu malonowego a aktywnością dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej potwierdza dane innych autorów, że enzym ten odgrywa kluczową rolę w zapobieganiu stresowi oksydacyjnemu.

## PODSUMOWANIE

Zredukowany glutation i enzymy glutationozależne pełnią bardzo ważną rolę w obronie organizmu przed stresem oksydacyjnym. Dane z piśmiennictwa sugerują jednakże, że kluczową rolę w utrzymaniu właściwego poziomu glutationu odgrywa dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa, enzym zapewniający odpowiedni poziom NADPH.

## PIŚMIENNICTWO

1. Lu S.C.: Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* 1999; 13: 1169–1183.
2. Downey A.K.: Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. *Ann. Rev. Physiol.* 1990; 52: 487–504.
3. Ueda K., Shinohara S., Yagami T., Asakura K., Kawasaki K.: Amyloid b protein potentiates Ca<sup>2+</sup> influx through L-type voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels: possible involvement of free radicals. *J. Neurochem.* 1997; 68: 265–271.
4. Cohen M.V.: Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this the time for clinical trials? *Ann. Intern. Med.* 1989; 111: 918–931.
5. Nazaki M., Kakei M., Koriyama N., Tanaka H.: Involvement of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in free radical-mediated inhibition of insulin secretion in rat pancreatic b-cells. *Diabetes* 1995; 44: 878–883.
6. Kourie J.I.: Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am. J. Physiol.* 1998; 275: C1–C24.
7. Jakoby W.B., Ziegler D.M.: The enzymes of detoxication. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 29715–29718.
8. Salvemini F., Franze A., Iervolino A., Filosa S., Salzano S., Ursini M.V.: Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 2750–2757.
9. Pietarinen-Runiti P., Lakari E., Raivio K.O., Kinnula V.L.: Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000; 278: C118–C125.
10. Deleve L., Kaplovitz N.: Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 1991; 52: 287–305.
11. 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<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase (IDPm). *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 16168–16176.
12. Adachii M., Ishii H.: Role of mitochondria in alcoholic liver injury. *Free Rad. Biol. Med.* 2002; 32: 487–491.
13. Guillemette J., Marion M., Denizeau F.: Characterization of the *in vivo* hepatocyte model for toxicological evaluation: repeated growth stimulation and glutathione response. *Biochem. Cell. Biol.* 1993; 71: 7–13.
14. Malmezat T., Breuille D., Capitan P., Mirand P.P., Oblad Ch.: Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *J. Nutr.* 2000; 130: 1239–1246.
15. Grant C.M., MacIver F.H., Dawcs I.W.: Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide g-glutamylcysteine. *Mol. Biol. Cell.* 1997; 8: 1699–1707.
16. Huang C.S., He W., Meister A., Anderson M.E.: Amino acid sequence of rat kidney glutathione synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 1232–1236.

17. Lenartowicz E., Wudarczyk J., Dębska G.: Regulacja stopnia oksydoredukcji grup tiolowych w komórkach zwierzęcych. *Post. Biochem.* 1996; 42: 154–161.
18. Bartosz G.: Metabolizm glutationu. *Post. Biochem.* 1993; 39: 32–38.
19. Sansinea A.S., Cerone S.I., Streitenberger S.A., Garcia C., Auza N.: Superoxide dismutase activity and reduced glutathione levels in Cu-overload liver from sheep. *Nutr. Res.* 1997; 17: 115–123.
20. Taniguchi M., Yasutake A., Takedomi K., Inoue K.: Effects of N-nitrosodimethylamine (NDMA) on the oxidative status of rat liver. *Arch. Toxicol.* 1999; 73: 141–146.
21. Eaton D.L., Hamel D.M.: Increase in g-glutamylcysteine synthetase activity as a mechanism for butylated hydroxyanisole-mediated elevation of hepatic glutathione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1994; 126: 145–149.
22. Klee S., Nurnberger M.C., Ungemach F.R.: The consequences of nitrofurantoin-induced oxidative stress in isolated rat hepatocytes: evaluation of pathobiochemical alterations. *Chem. Biol. Interac.* 1994; 93: 91–102.
23. Banerjee B.D., Seth V., Bhattacharya A., Pasha S.T., Chakraborty A.K.: Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol. Lett.* 1999; 107: 33–47.
24. Datta C., Gupta J., Sarkar A., Sengupta D.: Effects of organophosphorus insecticide phosphomidon on antioxidant defence components of human erythrocyte and plasma. *Indian J. Exp. Biol.* 1992; 30: 65–67.
25. Hai D.Q., Varga Sz.I., Matcovics B.: Organophosphate effects on antioxidant system of Carp (*Cyprinus Carpio*) and Catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 1997; 117C: 83–88.
26. Jaeschke H., Gores G.J., Cederbaum A.I., Hinson J.A., Pessayre D., Lemasters J.J.: Mechanism of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 2002; 65: 166–176.
27. Parke D.V., Piotrowski J.K.: Glutathione: its role in detoxication of reactive oxygen and environmental chemicals. *Acta Pol. Toxicol.* 1996; 4: 1–14.
28. Stohs S.J., Bagchi D.: Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.* 1995; 18: 321–326.
29. Freedman J.H., Ciriolo M.R., Peisach J.: The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 5598–5605.
30. Chin T.A., Templeton D.M.: protective elevation of glutathione and metallothionein in cadmium-exposed mesangial cells. *Toxicol.* 1993; 77: 145–156.
31. Gaetani G.F., Galiano S., Canepa L., Ferraris A.M., Kirkman H.N.: Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* 1989; 73: 334–339.
32. Spolarics Z., Wu J.X.: Role of glutathione and catalase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in LPS-activated hepatic endothelial and Kupffer cells. *Gastrointest. Liver Physiol.* 1997; 273: G1304–G1311.
33. Kaplovitz N., Tsukamoto H.: Oxidative stress and liver disease. *Prog. Liver Dis.* 1996; 14: 131–159.
34. Parke D.V.: Nutritional requirements for detoxication of environmental chemicals. *Food Add. Contam.* 1991; 8: 381–396.
35. Pessayre D., Dolder A., Artigon A.Y., Wandscheer J.C., Descatoire V., Degott C. i wsp.: Effect of fasting on metabolite mediated hepatotoxicity in the rat. *Gastroenterology* 1979; 77: 264–271.
36. Beutler E.: Nutritional and metabolic aspects of glutathione. *Ann. Rev. Nutr.* 1989; 9: 287–302.
37. Suthanthiran M., Anderson M.E., Sharma V.K., Meister A.: Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 3343–3347.
38. Rouzer C.A., Scott W.A., Hamill A.L., Liu F.T., Katz D.H., Cohn Z.A.: Secretion of leukotriene C and other arachidonic acid metabolites by macrophages challenged with immunoglobulin E immune complexes. *J. Exp. Med.* 1982; 156: 1077–1086.
39. Gerard-Monier D., Chaudiere J.: Metabolism and antioxidant function of glutathione. *Pathol. Biol.* 1996; 44: E209–E214.
40. Arai M., Imai H., Koumura T., Yoshida M., Emoto K., Umeda M. i wsp.: Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 4924–4933.
41. Saito Y., Hayashi T., Tanaka A., Watanabe Y., Suzuki M., Saito E. i wsp.: Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein P. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 2866–2871.
42. Flohe L.: Glutathione peroxidase. *Basic Life Sci.* 1988; 49: 663–668.
43. Cohen H.J., Avissar N.: Molecular and biochemical aspects of selenium metabolism and deficiency. *Progress Clin. Biol. Res.* 1993; 380: 191–202.
44. Stadtman T.C.: Selenium biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* 1990; 59: 111–127.
45. Burk R.F.: Protection against free radical injury by selenoenzymes. *Pharmacol. Therap.* 1990; 45: 383–385.
46. Dringer A.: Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiol.* 2000; 62: 649–671.
47. Martin M., Macias M., Escames G., Leon J., Acuna-Castroviejo D.: Melatonin but not vitamin C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J.* 2000; 14 (12): 1677–1679.
48. Merad-Saidoune M., Boitier E., Marsac A.N., Martnou J.C., Sola B., Sinet P.M. i wsp.: Overproduction of Cu/Zn-superoxide dismutase or Bcl-2 prevents the brain mitochondrial respiratory dysfunction induced glutathione depletion. *Exp. Neurol.* 1999; 158: 428–436.
49. de Haan J.B., Bladier C., Griffiths P., Kelmer M., O’Shea R.D., Cheung N.S. i wsp.: Mice with homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, GPX1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 22528–22536.
50. Garberg P., Thulberg M.: Decreased glutathione peroxidase activity in mice in response to nafenopin is caused by changes in selenium metabolism. *Chem. Biol. Interact.* 1996; 99: 165–177.
51. Divedi P.D., Das M., Khanna S.K.: Role of cytochrome P-450 in quinalphos toxicity: effect on hepatic and brain antioxidant enzymes in rats. *Food Chem. Toxicol.* 1998; 36: 437–444.
52. Zhang Z., Apse K., Pang Ji., Stanton R.C.: High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase via cAMP in aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 40042–40047.
53. Leite A.A., de O.Barretto O.C.: Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase activity assay and affinity for its substrate under „physiological” conditions. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1998; 31: 1533–1535.

- 
54. Slekár K.H., Kosman D.J., Cizewski Culotta V.: The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 28831–28836.
  55. LeGrand T.S., Aw T.Y.: Chronic hypoxia alters glucose utilization during GSH-dependent detoxication in rat small intestine. *Am. J. Physiol.* 1998; 274: G376–G384.
  56. Scott M.D., Zuo L., Lubin B.H., Chiu D.T.: NADPH, not glutathione, status modulates oxidant sensitivity in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes. *Blood* 1991; 77: 2059–2064.
  57. Ikedami K., Lalonde C., Youn Y.K., Picard L., Demling R.: Comparison of plasma reduced glutathione and oxidized glutathione with lung and liver tissue oxidant and antioxidant activity during acute inflammation. *Shock* 1994; 1: 307–314.