

Fiziološke uloge glutatиона u organizmu

Dominko, Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:230878>

Rights / Prava: [In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

FIZIOLOŠKE ULOGE GLUTATIONA U ORGANIZMU

PHYSIOLOGICAL ROLES OF GLUTATHIONE IN ORGANISM

SEMINARSKI RAD

Kristina Dominko

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Domagoj iki

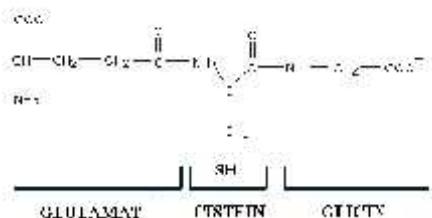
Zagreb, 2011.

SADRŽAJ

1.	UVOD	2
2.	TRANSKRIPCIJSKI FAKTORI I EKSPRESIJA GENA.....	5
2.1.	Nuklearni faktor B (NF- B)	6
2.2.	Utjecaj glutationa na NF- B.....	7
2.3.	Aktivacijski protein-1 (AP-1).....	8
2.4.	Utjecaj glutationa na AP-1	9
3.	IMUNOLOŠKI ODGOVOR	11
3.1.	Citokini	11
3.1.1.	imbenik tumorske nekroze (TNF-)	12
3.1.2.	Ostali citokini	12
3.2.	Utjecaj glutationa na proizvodnju citokina.....	13
3.3.	Utjecaj glutationa na proliferaciju limfocita T	14
4.	PROUPALNI POSREDNICI.....	16
4.1.	Leukotrieni.....	16
4.2.	Prostaglandini	17
4.3.	Proteini obitelji MAPEG	18
4.3.1.	Leukotrien C ₄ sintaza (LTC ₄ S).....	18
4.3.2.	Mikrosomalna prostaglandin E ₂ sintaza-1 (mPGES-1)	20
5.	DUŠIKOV (II) OKSID (NO).....	23
5.1.	Nastanak S-nitrozoglutationa (GSNO)	24
5.2.	Uloge S-nitrozoglutationa (GSNO)	25
6.	ZAKLJU AK	28
7.	LITERATURA	29
8.	SAŽETAK	38
9.	SUMMARY	39

1. UVOD

Glutation (-glutamil-cisteinilglicin, GSH) je tripeptid, prona en u ve ini biljaka, mikroorganizama, životinja i svim tkivima sisavaca (Lu, 1999). Sastoji se od cisteina, glutamata i glicina (Slika 1.), a aktivno mjesto ini tiolna (-SH) grupa cisteina (Perricone i sur., 2009).



Slika 1. Glutation (-glutamil-cisteinilglicin)

Obično je prisutan u visokim (0,1-10 mM) razinama (Tablica 1.) što ga inačici najčešće imaju u nijim i najobilnijim niskomolekulskim peptidom. GSH se sintetizira unutar svih stanica (Mårtensson i sur., 1991), posebno u jetri (Perricone i sur., 2009).

Tablica 1. Koncentracije unutarstaničnog glutationa (GSH) u različitim tipovima stanica. Preuzeto iz Rahman, 2005.

VRSTA STANICE	BAZALNA RAZINA GSH (nmol/mg proteina)
Alveolarna epitelna stanica ovjeka	150
Stanica hepatokarcinoma ovjeka	71
Arterijska endotelna stanica goveda	20
Plućna epitelna stanica štakora	18
Endotelna stanica iz pupanjevene ovjeka	4

U mnogim stanicama GSH sadrži više od 90% ukupnog neproteinskog sumpora (Meister, 1988). Ukupni GSH može biti slobodan ili vezan na proteine (Perricone i sur., 2009). Eukarioti imaju tri glavna spremišta GSH. Skoro 90% stanica nog GSH nalazi se u citosolu, 10% u mitohondriju, a mali postotak nalazi se u endoplazmatskom retikulumu (ER) (Lu, 1999). U hepatocitima ova su spremišta odvojena, unatoč potrošnji citosolnog GSH, mitohondrijski ostaje očuvan (Hanigan i Pitot, 1985). Osim želuca, koja može sadržavati i do 10

mM GSH, izvanstani ne koncentracije GSH relativno su niske (npr. 2-20 μM u plazmi) (Wu i sur., 2003).

U stanicama, tkivima i plazmi, GSH može biti prisutan u nekoliko oblika (Sies, 1999). GSH je reducirani oblik, koji može oksidirati u disulfidni oblik (GSSG) ili može stvarati disulfidne veze s ostalim spojevima koji sadržavaju tiolnu skupinu (GSSR) (Ault i Lawrence, 2002). U endoplazmatskom retikulumu (ER) omjer GSH:GSSG je 3:1, a u citoplazmi i mitohondriju 10:1 (Lu, 1999). Reducirani GSH reducira organske perokside, veže se na elektrofile direktno ili preko enzima glutation S-transferaza (GST), opskrbljuje serum dovoljnim koli inima GSH i formira mješovite proteinske disulfide. Oksidirani GSH u obliku GSSG izlu uje se iz stanice ili se reducira preko NADP-ovisne glutation reduktaze (Hanigan i Pitot, 1985). Zbog koli ine GSH u stanci, pove anje postotka GSSG u stanci poti e oksidativn unutarstani ni okoliš što je pokazatelj oksidacijskog stresa (Andringa i sur., 2006). Stani no redoks stanje je odlu uju i posrednik u više procesa metabolizma, prijenosa signala (Holmgren i sur., 2005) i ekspresije gena preko redoks osjetljivih transkripcijskih faktora (Lu, 1999). Ravnoteža izme u GSH i GSSG koristi se kao pokazatelj redoks ravnoteže stanice (Pias i Aw, 2002).

GSH ima bitne uloge kao antioksidans, u metabolizmu i regulaciji stani nih zbivanja (Tablica 2.) uklju uju i ekspresiju gena, sintezu DNA i proteina, proliferaciju stanica i apoptozu, prijenos signala, proizvodnju citokina i imuni odgovor, kao i glutationilaciju proteina (Wu i sur., 2003). Osnovna uloga GSH je zaštita strani nih komponenata od ošte enja uzrokovanih hidroksiperoksidima tijekom normalnog metabolizma (Perricone i sur., 2009). Tako er služi kao supstrat i kofaktor u metabolizmu mnogih lijekova (Lash, 2005) uklju uju i i detoksifikaciju ksenobiotika kataliziranu glutation S-transferazama (GST) (Meister, 1988). GSH je potreban u metabolizmu prostaglandina i leukotriena (Wu i sur., 2003). Odre ene koncentracije GSH potrebne su za proliferaciju nekih tipova stanica, uklju uju i limfocite (Townsend i Tew, 2003). Nedavno su otkrivene nove uloge GSH u prijenosu signala, ekspresiji gena, apoptosi i metabolizmu dušikova oksida (NO) (Wu i sur., 2003).

U ovom radu obradit e se neke od mnogobrojnih uloga GSH. Cilj je obraditi ulogu GSH kao kofaktora enzima i utjecaj redoks potencijala u ekspresiji transkripcijskih faktora i prijenosu signala, u sintezi citokina i imunom odgovoru što može potaknuti sintezu proučalnih posrednika (leukotriena i prostaglandina) i NO. Tako er e se opisati i me usobni odnosi ovih spojeva pod utjecajem GSH.

Tablica 2. Fiziološke uloge glutationa (GSH) u životinjama. Preuzeto iz Wu i sur., 2003.

ANTIOKSIDANS
"Skupljanje" slobodnih radikala i ostalih reaktivnih oblika
Uklanjanje vodika i lipidnih molekula
Sprje avanje oksidacije biomolekula
METABOLIZAM
Sinteza leukotriena i prostaglandina
Pretvaranje formaldehida do formata
Stvaranje D-laktata iz metilglioksilata
Stvaranje merkapturata iz elektrofila
Stvaranje glutation-NO spojeva
Pohrana i transport cisteina
REGULACIJA
Unutarstani ni redoks status
Prijenos signala i ekspresija gena
Sinteza DNA i proteina te proteoliza
Stani na proliferacija i apoptoza
Stvaranje citokina i imuni odgovor
Glutationilacija proteina

2. TRANSKRIPCIJSKI FAKTORI I EKSPRESIJA GENA

Sposobnost stanice da odgovori na kemijski stres barem se djelomićno događa preko aktivacije transkripcijskih faktora. Oni su konstitutivno prisutni u stanici ili se brzo sintetiziraju kada su potrebni i služe u regulaciji proteina uključnih u obranu stanice ili staničnu smrt (Chia i sur., 2010).

ROS (reaktivni oblici kisika), stvoreni u imunološkom sustavu, mogu aktivirati mnoge puteve preko kinaza i redoks-osjetljivih transkripcijskih faktora kao što su NF- κ B i AP-1 (njihova aktivacija ovisna je o redoks ravnoteži glutationa) (Rahman 2000; Rahman i MacNee, 2000; Grimble, 2006; Biswas i Rahman, 2009; Chia i sur., 2010), koji razlikuju reguliraju gene za proučalne citokine i zaštitne antioksidacijske gene (Biswas i Rahman, 2009). Za njih je pokazano da se aktiviraju u epitelnim i upalnim stanicama tijekom oksidacijskog stresa/upale, što dovodi do regulacije većeg broja proučalnih gena (Wu i sur., 2003).

Redoks status regulira aktivnost proteina, sposobnost određenog faktora da se veže na srodnu DNA, prijenos signalata, staničnu nekrozu i apoptozu te staničnu proliferaciju (Wu i sur., 2003). No, mehanizam i ključna razina/ravnoteža kojom GSH redoks status oblikuje transkripciju gena nisu dobro poznati (Rahman i MacNee, 2000; Rahman, 2000).

Oksidacijski stres nastao zbog upalnih posrednika može kratkotrajno potrošiti GSH tijekom upale i u inicijalnoj stanici osjetljivijima na pojedine upalne reakcije (Rahman, 2005; Grimble, 2006). Razumijevanje regulacijskih mehanizama za indukciju antioksidanata, kao što je GSH, nasuprot proučalnih posrednika na mjestima osjetljivima na oksidacijski stres, može doprinijeti razvitu novih terapija koje mogu dopustiti farmakološku manipulaciju sinteze GSH tijekom upale i ozljeda uslijed oksidacijskog stresa (Biswas i Rahman, 2009). Otkriveni specifični geni i reakcija u prijenosu signalata koje su pod utjecajem ROS-a dovelo je do hipoteze da ROS služe kao substanci koji glasnik u putevima regulacije gena i prijenosa signalata. Također, antioksidansi moduliraju aktivnost mnogih gena (Castro i sur., 2001).

Održavanje visokog omjera (iznad 90%) unutarstaničnog GSH/GSSG smanjuje nakupljenje disulfida i stvara reducirajući okoliš unutar stanice. No, ako oksidacijski stres poremeti ovaj omjer, promjena u GSH/GSSG redoks statusu utječe na mnogobrojne stanične signalne puteve, kao što je aktivacija transkripcijskih faktora NF- κ B i AP-1 (Rahman, 2000).

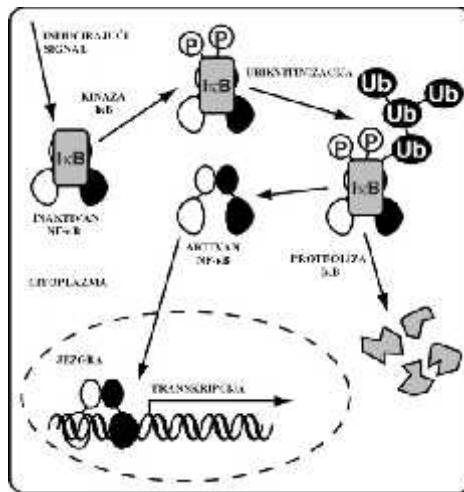
2.1. Nuklearni faktor B (NF- B)

NF- B je transkripcijski faktor osjetljiv na oksidacijski stres (Luo i sur., 1999), prisutan u citosolu stanica sisavaca tipi no u obliku neaktivnog heterodimernog proteina. Protein NF- B prona en je u razli itim tipovima stanica, uklju uju i limfocite T i B, makrofage i monocite (Galter i sur., 1994). Vezanje inhibitorne podjedinice I B odgovorno je za citoplazmatsko zadržavanje i nedostatak aktivnosti NF- B (Castro i sur., 2001). U nestimuliranim stanicama NF- B prona en je u citoplazmi u neaktivnoj formi koja se ne veže na DNA, povezanoj s proteinom I B, koji sprje ava prijenos signala u jezgru i ulazak NF- B u jezgru (Staal i sur., 1990; Rahman i MacNee, 2000; Rahman, 2000; Ji, 2008).

Proupalni citokini (TNF- , IL-1 i IL-6) (Ji, 2008), vodikov peroksid, bakterije, virusi, UV i ioniziraju e zra enje (Castro i sur., 2001) kao i oksidacijski stres uklju uju i produkte lipidne peroksidacije i potrošnju reduciranih GSH i porast citosolnog GSSG kao odgovor na oksidacijski stres, uzrokuju brzu ubikvitinaciju i fosforilaciju kompleksa I B preko kinaze C ili drugih kinaza (Staal i sur., 1990) uzrokuju i otpuštanje inhibitorne podjedinice s heterodimera (podjedinice p50 i p60) NF- B (Galter i sur., 1994) i degradaciju I B što je klju ni korak aktivacije NF- B (Rahman i MacNee, 2000; Castro i sur., 2001; Grimble, 2006).

Nakon degradacije kompleksa I B, aktivirani NF- B putuje u jezgru (Galter i sur., 1994, Castro i sur., 2001), veže se za DNA (Castro i sur., 2001) (Slika 2.) na odgovaraju e elemente u poja iva u i promotoru gena (Grimble, 2006) i aktivira ekspresiju nekoliko ciljnih gena koji kodiraju za proupalne citokine IL-1 , TNF- , IL-6, IL-8, vaskularnu adhezijsku molekulu-1 (VCAM-1), adhezijsku molekulu-1 (ICAM-1), imbenik poticanja granulocitno-makrofagnih kolonija (GM-CSF) (Rahman i MacNee, 2000), proteine akutne faze, inducibilne sintaze dušikova oksida (iNOS), faktore rasta i receptore citokina (Rahman i MacNee; Castro i sur., 2001; Avogaro i sur., 2005).

Aktivacija NF- B u mikroglija stanicama i makrofagima citokinima, bakterijskim endotoksinom ili ostalima olakšava ekspresiju proupalnih proteina, uklju uju i TNF- , ciklooksigenazu-2 (COX-2) i iNOS koji mogu poja ati neurodegeneraciju (Musiek i sur., 2000). Tako er je primije eno da aktivacija NF- B poti e apoptozu, no aktivacija NF- B citokinom TNF- ima ulogu i u preživljavanju stanice (Luo i sur., 1999). Bitna uloga NF- B prepoznata je u nekoliko upalnih bolesti (Grimble, 2006). TNF- poti e transkripciju virusa HIV preko aktivacije NF- B (Staal i sur., 1990). Mnogi produkti gena regulirani NF- B aktiviraju NF- B (npr. TNF-) (Avogaro i sur., 2005).



Slika 2. Aktivacija NF- κ B ubikvitinacijom i degradacijom podjedinice I κ B i prijenos signala. Preuzeto i prilagođeno na temelju <http://www.chemistry.sdsu.edu/faculty/Huxford/>.

2.2. Utjecaj glutationa na NF- κ B

Unutarstani ni tioli igraju ključnu ulogu u regulaciji aktivnosti NF- κ B, niske koncentracije tiola potrebne su za aktivaciju, a visoke za inhibiciju (Staal i sur., 1990). S obzirom da je GSH najmanje i unutarstani ni tiol (Staal i sur., 1990; Mårtensson i sur., 1991), mehanizmi koji kontroliraju razine GSH također kontroliraju i ekspresiju gena koji su pod utjecajem aktivacije NF- κ B i ostalih mogućih transkripcijskih faktora (Staal i sur., 1990).

Unutarstani ni tioli mogu regulirati aktivnost NF- κ B na više mesta prijenosa signala. Visoke razine tiola u stanici utječu na smatanje proteina ili aktivnost i tako blokiraju aktivaciju kinaza koje fosforiliraju kompleks I κ B/NF- κ B i oslobađaju aktiviranog NF- κ B (Staal i sur., 1990). Također, visoke koncentracije tiola mogu direktno ometati fosforilaciju I κ B ili prijenos aktiviranog NF- κ B u jezgru (Staal i sur., 1990; Perricone i sur., 2009). Pokazano je i da redoks stanja cisteinskih ostataka nekoliko transkripcijskih faktora, od kojih je većina smještena u DNA-veznoj domeni, utječu na aktivnost vezanja na DNA preko redoks mehanizama (Ando i sur., 2008).

Nadalje, ako unutarstani ni oksidansi mogu direktno aktivirati bilo koji enzim uključen u aktivaciju NF- κ B, visoke koncentracije tiola mogu sprječiti aktivaciju NF- κ B jednostavno „skupljanjem“ radikala (Staal i sur., 1990). Dakle, razine GSH utječu na ovaj proces: ako je prisutan u reduciranom, GSH obliku, tada inhibira aktivnost NF- κ B i prijenos u jezgru. No, ako je u GSSG obliku, može oblikovati NF- κ B vezanje na DNA (Perricone i sur., 2009). Odmene količine GSSG mogu biti potrebne za aktivaciju NF- κ B i prijenos u jezgru, no, višak GSSG može inhibirati NF- κ B na razini vezanja na DNA (Galter i sur., 1994).

Aktivnost NF- B može se poja ati ili utroškom GSH ili njegovom inhibicijom preko ROS, preko modifikacije cisteina kovalentnim vezanjem na jednu ili više podjedinica NF- B, ili na ostale faktore koji reguliraju NF- B (Chia i sur., 2010) (Tablica 3.).

Pove anje unutarstani nog GSH može smanjiti koli inu otpuštanja citokina i kemokina iz plu a smanjuju i razinu aktivacije NF- B (Biswas i Rahman, 2009) podupiru i nastanak kompleksa NF- B/disulfid ime se direktno sprje ava vezanje na DNA (Haddad i sur., 2001). Ovo podupire teoriju da unutarstani no redoks stanje (omjer GSH/GSSG) ima klju nu ulogu u regulaciji upalnih reakcija u stanicama plu a (Rahman i MacNee, 2000).

2.3. Aktivacijski protein-1 (AP-1)

AP-1 je transkripcijski faktor sastavljen od genskih produkata gena Jun i Fos (Griffith, 1999; Grimble, 2006) koji može biti u obliku homodimera (Jun/Jun) ili heterodimera (Jun/Fos) (Grimble, 1999) te se veže na DNA nakon stimuliranja razli itim ksenobioticima ili faktorima (Watson i sur., 2004). AP-1 nije jedan protein nego dimer sastavljen od aktivatorne (c-Fos i c-Jun) i inhibitorne (Fos-srođan antigen (Fra)-1 i 2) podjedinice (Ji, 2008).

Transkripcijski kompleks AP-1 kao dimer veže se na konzervirane regije TRE (tetradekanoilforbol-13acetat (TPA)-odgovaraju i element) i sli ne regije (Bossis i sur., 2005) prisutne u promotoru mnogih gena uklju enih u stani nu proliferaciju i nastanak tumora. Interakcije izme u Jun i Fos preko domene leucinskog „zatvara a“ potrebna je za vezanje na TRE (Griffith, 1999).

AP-1 regulira transkripciju kao odgovor na poticaj iz okoliša (Watson i sur., 2004). Aktivacija transkripcijskih faktora obitelji AP-1, uklju uju i faktore c-Fos i c-Jun, jedan je od prvih doga aja u jezgri induciranih faktorima rasta koji stimuliraju izvanstani ni signal-regulirane kinaze (ERKs) (Monje i sur., 2005). Aktivnost transkripcije gena AP-1 jako se pove ava fosforilacijom c-Jun (Luo i sur., 1999) uz kinaze iz obitelji MAPK (Monje i sur., 2005).

Premještanje AP-1 iz citosola u jezgru tako er se doga a tijekom oksidacijskog stresa (Grimble, 2006). ROS su poznati po indukciji i aktivacije i sinteze AP-1. AP-1 je regulator mnogih fizioloških procesa kao što su stani ni rast (Karihtala i Soini, 2007), stani na proliferacija, diferencijacija, organogeneza, apoptoza (Bossis i sur., 2005; Karihtala i Soini, 2007) i odgovora na fizi ki i kemijski stres (Valko i sur., 2007). Tako er je i nužan imbenik u mnogim patološkim stanjima, uklju uju i tumorigenezu (Bossis i sur., 2005). Nedavno je pokazano da je fosforilacija podjedinice c-Jun usko povezana s indukcijom apoptoze u

nekoliko sustava. AP-1 fiziološki prenosi signal od bioloških posrednika kao što su citokini, faktori rasta i neurotransmiteri (Luo i sur., 1999). Aktivacija NF- B i AP-1 dovodi do koordinirane ekspresije gena za antioksidante i proučalne gene. Novija istraživanja pokazuju da uloga AP-1 snažno ovisi o signalnim putevima MAPK i NF- B (Rahman, 2005).

2.4. Utjecaj glutationa na AP-1

Nekoliko istraživanja pokazalo je da stani ni tiolni status bitno utječe na aktivaciju AP-1 (Watson i sur., 2004). Novija istraživanja regulacije aktivnosti vezanja podjedinice c-Jun faktora AP-1 na DNA pod utjecajem redoks statusa pokazuju da promjena u omjeru GSH/GSSG omoguće oksidaciju podjedinice c-Jun tiolima. Mehanizmi oksidacije uključuju i nastanak disulfida i mjesno-specifičnu S-glutatiolaciju (Rahman, 2000; Rahman i MacNee, 2000) o uvanog cisteinskog ostatka u domeni dimerizacije i domeni za vezanje na DNA koje omoguće oje odgovor transkripcijskog faktora c-Jun na oksidacijski stres u obliku reverzibilnog gubitka aktivnosti vezanja na DNA (Klatt i Lamas, 2000; Valko i sur., 2007). Ovi zaključci provedeni *in vitro* poklapaju se s opažanjima da smanjenje omjera GSH/GSSG inhibira aktivnost transkripcijskih faktora AP-1 i NF- B *in vivo* (Klatt i Lamas, 2000).

U mnogim vrstama stanica vezanje AP-1 na DNA može biti pojačano uz protein tioredoksin ili uz jezgrin redoks protein (Ref-1), a inhibira ga GSSG jer nastanak disulfidne veze između dva cisteina inhibira vezanje AP-1 na DNA. Trošenje unutarstanih GSH koriste i BSO (butionin sulfoksiamin) ili povećanje omjera GSH/GSSG uz diamin može također stimulirati vezanje AP-1. To se može dogoditi ili zbog premještanja GSH u jezgru tijekom ovih procesa uz velje postojanje Ref-1 i tioredoxina, što dodatno pojačava vezanje AP-1 na DNA (Rahman, 2000; Rahman i MacNee, 2000) (Tablica 3.).

AP-1 također regulira i ekspresiju -glutamilcistein sintetaze (-GCS), limitirajući enzima u *de novo* sintezi GSH. Moguće je da su različite razine GSH u upalnim bolestima pljući rezultat molekularne regulacije GSH sinteze preko aktivacije faktora AP-1 oksidansima, upalnim i protuupalnim agensima (Rahman i MacNee, 2000).

Tablica 3. Dvije razine kontrole transkripcijskih faktora NF- B i AP-1 pomo u redoks sustava i uklju enih posrednika. Preuzeto iz Galter i sur., 1994.

TRANSKRIPCIJSKI FAKTOR	1.razina: modulacija indukcije/aktivacije preko redoks statusa	2.razina: modulacija aktivnosti vezanja na DNA preko redoks statusa
NF- B	Pozitivni posrednik: H ₂ O ₂ /GSSG (oksidacijski inducirana aktivacija NF- B i premještanje u jezgru) Negativni posrednik: reducirani GSH	Negativni posrednik: GSSG (oksidativna inhibicija stvaranjem miješane disulfidne veza na cisteinu u DNA-veznoj regiji osjetljivom na redoks status Pozitivni posrednik: reducirani tioredoksin
AP-1	Pozitivni posrednik: ROS/GSSG (oksidacijska aktivacija AP-1 preko fosforilacije podjedinice Jun)	Negativni posrednik: oksidirani tioredoksin (oksidacija cisteina u DNA-veznoj regiji osjetljivom na redoks status)

3. IMUNOLOŠKI ODGOVOR

Stanice imunološkog sustava sadržavaju veliki udio polinezasi enih masnih kiseline te su stoga podložnije štetnim učinkima produkata reakcija slobodnih radikala (Wu i sur., 1994). Oksidacijski stres nastaje tijekom neravnoteže oksidansa i antioksidansa i pri izlaganju vanjskim oksidansima tijekom upale i bolesti dišnog sustava (Biswas i Rahman, 2009). Pretjerano stvaranje reaktivnih oblika kisika može dovesti do oštećenja tkiva kod sepsa, što pokreće složeni sustav koagulacije, komplementa i kaskade citokina kao dio obrane protiv invazije bakterija (Song i Humes, 2009). ROS signalizacija može biti posredovana citokinima, peptidnim hormonima i imunoregulatorima ija je prisutnost u stanju putem određenog statusa. Također, ROS regulira transkripciju IL-4, IL-6, IL-8 i TNF- preko mehanizma ovisnog o tiolima (Haddad i sur., 2001).

Glutation ima ključnu ulogu u zaštiti kao antioksidans, štiteći tijelo od oksidacijskog stresa tijekom imunološkog odgovora i u podržavanju proliferacije limfocita T (Grimble, 2006). Još jedno svojstvo GSH je regulacija upale i imunološkog odgovora koja se može održavati na različite načine. Osim toga, osnovni mehanizam regulacije je redoks potencijal (Hudson, 2001). GSH je nužan za aktivaciju limfocita T i polimorfonuklearnih leukocita kao i za stvaranje citokina i time za održavanje uspješnog imunog odgovora (Wu i sur., 2004).

GSH kao da ima suprotnu funkciju u imunitetu; kad je označava kao protuupalna jer inhibira nastanak nekoliko upalnih citokina i kemokina i njihovu aktivaciju, ali GSH je također esencijalan za nekoliko imunoloških uloga, uključujući i stvaranje IL-2, aktivaciju IL-1 i aktivnost citotoksičnih limfocita T (Villa i sur., 2002).

3.1. Citokini

Citokini su niskomolekularni glikoproteini koji posreduju pribjelovanju jedne stanice na drugu u međusudjeli nove komunikacije. Upalne stanice proizvode mnogo citokina i kemokina (Federico i sur., 2007). Citokini i slobodni radikali imaju mogućnost povećanja stvaranja samih sebe (Hunter i Grimble, 1994). Stimulacijski efekt slobodnih radikala na stvaranje citokina može biti ograničen antioksidansima kao što su GSH ili vitamini (Staal i sur., 1990; Hunter i Grimble, 1994). Proučeni citokini utječu na mnoge metabolike u inicijalnoj upali. Proučeni citokini su IL-1, IL-6 i TNF-, a njihovi učinci su upala, gubitak apetita, gubitak težine i letargija (Grimble, 2006). Istraživanja govore da proučeni citokini imaju važnu ulogu

u patofiziologiji sr anih bolesti (Mariappan i sur., 2010). IL-1, IL-6, TNF- i ostali citokini smatraju se potentnim posrednicima promjena u funkcijama štitnja e koje se doga aju u bolesti (Stoytcheva i Berry, 2009).

3.1.1. imbenik tumorske nekroze (TNF-)

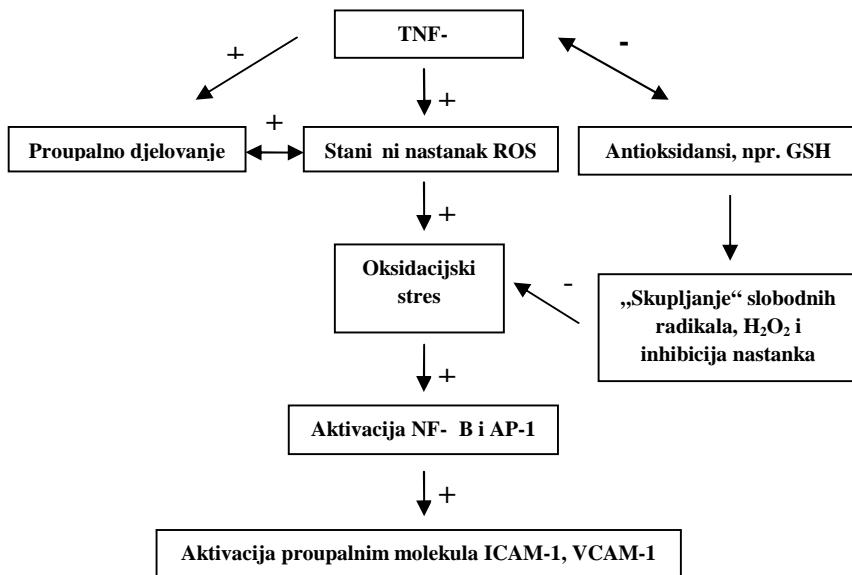
TNF- je pleiotropni prouparalni citokin koji ima klju nu ulogu u imunitetu i patologiji (Fernandez-Checa i Kaplowitz, 2005) preko mnogo stani nih puteva signala uklju uju i mitogeni odgovor i apoptozu (Guicciardi i sur., 2006) kao važan posrednik upale u plu ima. Inducira kroni ne upalne promjene povezane s porastom razli itih obrambenih mehanizama, ulju uju i antioksidanse (Rahman, 2000). Nastaje u mnogim vrstama stanicama. Osnovni izvor *in vivo* su stimulirani monociti, fibroblasti i stanice endotela. Makrofagi, limfociti T, limfociti B, granulociti, stanice glatkih miši a, eozinofili, hondrociti, osteoblasti, mastociti, glijja stanice i keratinociti tako er stvaraju TNF- nakon stimulacije (Mukhopadhyay i sur., 2006). TNF- je transmembranski protein veli ine 26 kDa koji se aktivira rezanjem na veli inu od 17 kDa (Avogaro i sur., 2005).

Citokini kao što je TNF- posreduje u aktivaciji NF-*kB* (Avogaro i sur., 2005) mehanizmima koji uklju uju ROS kao sekundarne glasnike, posebno vodikov peroksid (Moran i sur., 2001). Rezultat aktivacije NF- B preko TNF- je pove ana ekspresija adhezijskih molekula na površni endotelnih stanicama i stanica glatkih miši a žila (Fernández-Sánchez i sur., 2011) (Slika 3.). Tako er inhibira prijenos elektrona u mitohondrijima pove avaju i interakcije elektrona s O₂ pri emu nastaje superoksidni anion (O₂⁻²) (Mariappan i sur., 2010) i vodikov peroksid (Rahman, 2005) što pogoršava patološke procese kao što je aterogeneza (Avogaro i sur., 2005). IL-1 i TNF- stimuliraju nastanak slobodnih radikala kisika, vodikovog peroksida i NO u raznim stanicama, od fagocita do stanica endotela. Tako er, oksidansi mogu poja ati stvaranje IL-1 i TNF- preko aktivacije NF- B (Hunter i Grimble, 1994). Odgovori stanice inducirani IL-1 doga aju se preko oblikovanja redoks ravnoteže. (Haddad i sur., 2001).

3.1.2. Ostali citokini

Interleukin 6 (IL-6) je prouparalni citokin s mnoštvo uloga, od zaštite do upale i ošte enja tkiva. Nastaje u makrofagima i adipocitima te stanicama imunološkog sustava kao i stanicama endotela i skeletnih miši a (Fernández-Sánchez i sur., 2011). Cirkulira u mnogim glikoziliranim formama veli ine od 22 do 27 kDa (Avogaro i sur., 2005). Koncentracije IL-6

u vezi su s BMI, otpornosti na inzulin i intelorerancijom na ugljikohidrate (Fernández-Sánchez i sur., 2011). IL-6 negativno utječe na funkciju endotela: on je važan medijator povećane propusnosti endotela preko promjena u ultrastrukturnalnom razmještaju „tjesnih spojeva“ i morfoloških promjena u stanicama. Protein kinaza C je ključan glasnik u promjenama induciranim preko IL-6 (Avogaro i sur., 2005).



Slika 3. Shematski prikaz mehanizma djelovanja TNF-α. TNF-α aktivira nastanak ROSime se poja avaoksidacijski stres stanica i aktiviraju se proupalni i prooksidacijski transkripcijski faktori NF-κB i AP-1. GSH smanjuje oksidacijski stres i aktivnost NF-κB i AP-1. + označava aktivaciju, a - inhibiciju. Preuzeto i prilagođeno na temelju Mukhopadhyay i sur., 2006.

Interleukin-2 (IL-2) je citokin specifične imunosti koji je nužan za proliferaciju limfocita T (Wu i sur., 1994). Interleukin 18 (IL-18) je važan pleiotropni citokin koji ima ulogu i u urođenom i u stечenom imunitetu kao proupalni i imunopotencijalni citokin te je moguće da je uključen u aterosklerozu. Osim što kao proupalni citokin inducira ekspresiju adhezijskih molekula, takođe stimulira i stvaranje TNF-α i iNOS (Esposito i sur., 2002).

3.2. Utjecaj glutationa na proizvodnju citokina

Antioksidansi (Haddad i sur., 2001; Grimble, 2006) i prekursori GSH negativno reguliraju sintezu i aktivaciju citokina kao i nizvodne procese (Haddad i sur., 2001). Takođe suprimiraju upalne komponente odgovorne za infekciju i traumu, ali počinju komponente odgovorne za imunitet posredovan stanicama (Grimble, 2006). Različito upravljanje homeostazom GSH može antagonisti koji djelovati na proupalni signal, zbog čega se može

koristiti za lije enje bolesti dišnog sustava, gdje su citokini prepoznati kao glavni imbenici u razvoju bolesti. Trošenje GSH i njegovo snabdijevanje razli ito upravlju proupalnim citokinima djeluju i antagonisti ki obnavljanjem redoks ravnoteže (Haddad i sur., 2001).

Trošenje krvožilnog i plazmatskog GSH može rezultirati pove anim oksidacijskim stresom što utje e na razvoj ateroskleroze (Prasad i sur., 1999). Citokini, koji su posrednici oksidacijskog stresa, imaju sposobnost mijenjanja redoks ravnoteže i time utjecati na promjenu omjera GSH/GSSG. Mehanizmi uklju eni u puteve citokina povezani s redoks statusom predloženi su zbog nove uloge GSH kao imunofarmakološkog regulatornog tiola (Haddad i sur., 2001).

GSH ima bitnu ulogu u procesima oporavka kao antioksidans i detoksifikacijski agens. Koncentracije jetrenog GSH pove avaju se akcijama citokina u uvjetima fiziološkog stresa. Redukcija tkivnog GSH povezana je s problemima u održavanju imunološkog odgovora (Hunter i Grimble, 1994). Unutarstani ni GSH ima važnu ulogu u regulaciji transkripcije i replikacije virusa HIV-a preko modulacije prijenosa signala proupalnim citokinima (Staal i sur., 1990).

GSH u potpunosti sprje ava porast citokina u plazmi induciranoj u hiperglicemiji (Esposito i sur., 2002). U stani noj kulturi pokazano je da porast razine GSH smanjuje stvaranje IL-4. Trošenje GSH sprje ava nastanak IL-12. Mogu i uzrok ovog obrnutog odnosa su ostali citokini, kao što je IL-18, koji mogu zamijeniti ulogu IL-12 uz dodatnu proizvodnju IFN- (Peterson i sur., 1998).

3.3. Utjecaj glutationa na proliferaciju limfocita T

Danas mnoga istraživanja naglašavaju važnost unutarstani ne koncentracije GSH za održavanje imune funkcije (Wu i sur., 1994). Velike promjene koje trošenje GSH uzrokuje dosljedne su klju nim ulogama koje GSH ima u fiziologiji. Leukociti su posebno osjetljivi na razinu GSH (Peterson i sur., 1998). Nekoliko funkcije limfocita T osjetljive su na promjene u razini GSH (Fratelli i sur., 2002) uklju uju i vezanje, internalizaciju, degradaciju IL-2 i sintezu DNA (Suthanthiran i sur., 1990).

Primarna uloga GSH u imunološkom sustavu je aktivacija limfocita (Ashtiani i sur., 2011). Mnoga istraživanja isticala su bitnu ulogu GSH u proliferaciji limfocita T (Hadzic i sur., 2005). Limfociti zdrave osobe imaju u prosjeku optimalnu razinu GSH. Imunološki sustav radi najbolje ako limfociti imaju precizno uravnoteženu razinu GSH. ak i umjerene

promjene u unutarstani nom GSH snažno utje u na funkcije limfocita (Dröge i Breitkreutz, 2000).

Važnost GSH u proliferaciji limfocita T istraživana je mijenjanjem razine GSH koriste i spojeve koji ili pove avaju GSH ili smanjuju (kao što je butionin sulfoksiamin (BSO) (Wu i sur., 1994). Trošenje GSH koriste i BSO u ljudskim limfocitima T sprje ava proliferaciju u odgovoru na mitogene lektine, što dokazuje izravnu vezu izme u proliferacije i dostupnosti GSH (Hadzic i sur., 2005). Aktivacija razli ite subpopulacije limfocita ovisi o razli itim koli inama GSH. Nedostatak ili smanjena koli ina GSH inhibira citotoksi ne limfocite T i limfocite CD8⁺, a limfociti CD4⁺ su aktivni (Ashtiani i sur., 2011).

Porast stani nog GSH prati i porast stvaranja IL-2 i proliferacije limfocita kao i smanjenje stvaranja proučalnih posrednika PGE₂ i LTB₄ (Grimble, 2006). GSH može poja ati mitogeni odgovor smanjuju i nastanak suprimiraju ih medijatora (eikosanoidi, H₂O₂...) ili pove avaju i stvaranje posrednika s poja avaju im u inkom (IL-1 i IL-2) (Wu i sur., 1994).

Nekoliko imunoloških funkcija povezano s infekcijom HIV-1 ovisno je o dostačnim koli inama GSH, npr. aktivacija limfocita mitogenima, aktivacija stanica prirodnih ubojica i citotoksi nost posredovana limfocitima T. Nadalje, transkripcija HIV-1 ovisna o TNF- *in vitro* pove ana je zbog trošenja reducirane GSH. Postoje i neke neprirodnosti u homeostazi glutationa tijekom infekcije s HIV-1 *in vivo* (Aukrust i sur., 1995).

Smanjena razina GSH povezana je i još nekoliko stanja sa smanjenim imunim odgovorom, npr., AIDS. Mogu im mehanizmom djelovanja GSH smatra se utjecaj na sintezu eikosanoida (Wu i sur., 1994). Tako er je kod tih pacijenata zabilježena smanjena razina GSH što zna i da bi se dodatak GSH mogao smatrati mogu om farmakološkom strategijom. Kod ovih pacijenata vjerojatni mehanizam smanjenja razine GSH je pove ana glutationilacija proteina primije ena kod limfocita T (Fratelli i sur., 2002).

4. PROUPALNI POSREDNICI

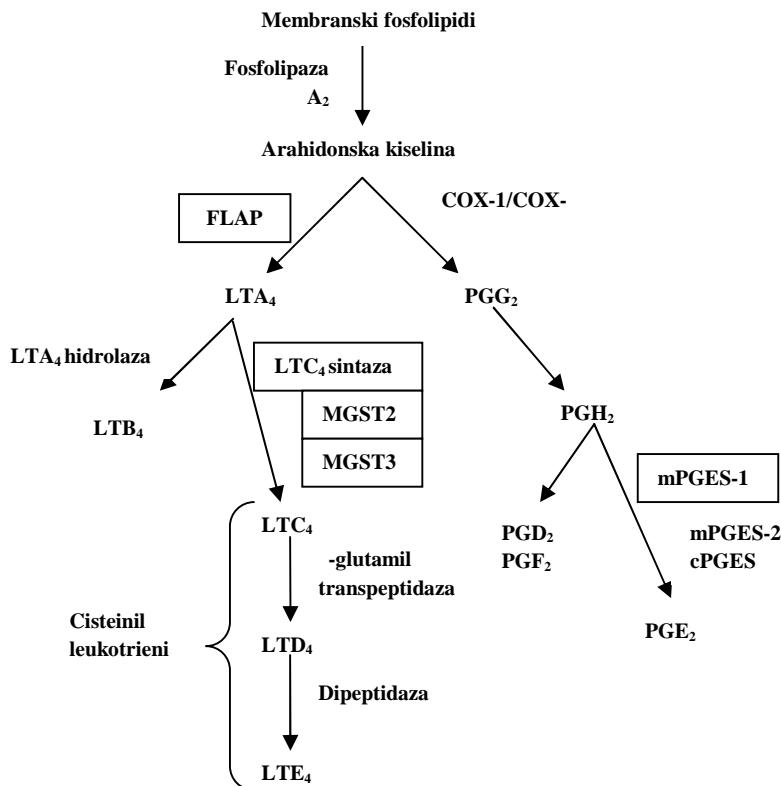
4.1. Leukotrieni

Leukotrieni su biološki posrednici koji se formiraju kao odgovor na različite imunološke i upalne stimulanse (Wang i Ballatori, 1998) i funkcioniraju vežu i se na receptore posredovane proteinom G ciljnih stanica (Black i sur., 2011). Biosinteza leukotriena je ograničena samo na nekoliko tipova ljudskih stanica uključujući i mastocite (Penrose, 1999), eozinofile, bazofile i makrofage (Finkensieper i sur., 2010), no, stvaranje cisteinil leukotriena dokazano je i u moždanom tkivu, posebno u dijelovima hipotalamus (Mayapatek, 2000), kao i u stanicama pluća, slezene i srca (Wang i Ballatori, 1998). Uloge leukotriena su mnogobrojne, npr. i LTB₄ i cisteinil leukotrieni stimuliraju proizvodnju kemokina i adheziju leukocita i endotelne stanice, a LTB₄ je neutrofilni kemoatraktant (Black i sur., 2011). Leukotrieni su poznati kao potencijalni faktori upale koji uzrokuju edem u bolestima dišnih puteva, ali takođe imaju i bitnu ulogu u reprodukciji i mogu poticati djelovanje prostaglandina (Korzekwa i sur., 2011).

Biosinteza leukotriena počinje otpuštanjem arahidonske kiseline uz citosolnu fosforilazu A₂ (Kanaoka i sur., 2001; Finkensieper i sur., 2010) i njenom pretvorbom u nestabilni intermedijer, leukotrien A₄ (LTA₄). Taj intermedijer može se pretvoriti u LTB₄ hidrolizom ili u LTC₄ konjugacijom s GSH (Samuelsson, 1991; Brock, 2005).

Tijekom konjugacije glutationa s LTA₄ nastaju cisteinil leukotrieni (Rouzer i sur., 1981). Reakcija je katalizirana posebnim oblikom glutation S-transferaze, leukotrien C₄ sintazom (LTC₄S) pri čemu nastaje unutarstani ni leukotrien C₄ (LTC₄) (Duroudier i sur., 2009, Jawien, 2002) dodavanjem GSH na C-6 LTA₄ (Rouzer i sur., 1981). LTC₄ sintetiziraju neutrofili, monociti, makrofagi i eozinofili, a degradiran je izvan stanice ili u jetri, gdje se izlučuje i metabolizira u želuću. Pretvorba LTC₄ događa se uz enzim -glutamil transferazu pri čemu nastaje leukotrien D₄ (LTD₄), koji je cisteinilglicin konjugat LTA₄. LTD₄ se može degradirati i do leukotriena E₄ (LTE₄) koji je cisteinil konjugat LTA₄ (Lieberman i sur., 1995; Jawien, 2002) (Slika 4.).

Cisteinil leukotrieni (LTC₄ i njegovi metaboliti-LTD₄ i LTE₄) ključni su posrednici upale i imaju važnu ulogu u akutnim i kroničnim upalnim bolestima kardiovaskularnog i dišnog sustava, posebno u bronhijalnoj astmi (Martinez Molina i sur., 2007) te su takođe uključeni u alergijske reakcije (Elsas i sur., 2008).



Slika 4. Putevi sinteze leukotriena i prostaglandina iz arahidonske kiseline. Uokvireni su proteini iz obitelji MAPEG. Preuzeto i prilagođeno na temelju Babu i Salvi, 2000.

4.2. Prostaglandini

Prostaglandini su biološki aktivni derivati arahidonske kiseline i ostalih polinezasi enih masnih kiselina (Samuelsson i sur., 2007) i važni su posrednici u obrambenim mehanizmima domaćina kao i u upali (Sakamoto i sur. 2000). Biološke su uloge prostaglandina u upali, boli, tumorigenezi, krvožilnoj regulaciji, funkcijama neurona, ženskoj reprodukciji, zaštiti želućane sluznice i radu bubrega (Samuelsson i sur., 2007). Prostaglandini mogu doprinijeti i ozljedama uzrokovanim UVB zrajenjem jer štetne doze UVB zrajenja potiču nastajanje prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina F₂ (PGF₂) i prostaglandina D₂ (PGD₂) (Black i sur., 2011). Njihovo stvaranje stimulirano je niskom razine ROS preko aktivacije prostaglandin H sintaze (PGHS) i/ili fosfolipaze A₂ u stanicama (Sakamoto i sur., 2000).

Biosinteza PGD₂ započinje oslobađanjem arahidonske kiseline iz membrane fosfolipida (Sakamoto i sur., 2000) i uključuje oksigenaciju i ciklizaciju do nestabilnog endoperoksidnog intermedijera, prostaglandina G₂ (PGG₂) uz ciklooksigenazu (COX). COX postoji u dva oblika, kao konstitutivno eksprimirana COX-1 i inducibilna COX-2

(Samuelsson i sur., 2007). Enzim COX-2 može biti induciran u fibroblastima, makrofagima i epitelnim stanicama kao odgovor na IL-1 i TNF- (Thorén i Jakobsson, 2000).

Redukcijom C-15 uz enzim prostaglandin H sintazu (PGHS) nastaje prostaglandin H₂ (PGH₂) (Sakamoto i sur., 2000). Konstitutivno eksprimirana PGHS-1 i inducibilna PGHS-2, kao integralni proteini perinuklearnog prostora i endoplazmatskog retikuluma, stvaraju supstrat za citosolnu, glutation-ovisnu PGD₂ sintazu (Hsieh i sur., 2001). U prisutnosti reduciranog glutationa (GSH), prostaglandin E sintaza (PGES) pretvara endoperoksidnu skupinu PGH₂ u 9-keto-11-hidroksi skupinu prostaglandina E₂ (PGE₂) (Thorén i Jakobsson, 2000) (Slika 4.).

4.3. Proteini obitelji MAPEG

Mikrosomalne GST poznate su pod imenom MAPEG („membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism, tj. membranski proteini u metabolizmu eikosanoida i glutationa). Citosolne i mikrosomalne GST dijele strukturu i evolucijsku vezu (Oakley, 2005). Ova proteinska obitelj uključuje 6 proteina: PGES, LTC₄S, mikrosomalnu GST 1 MGST1), 2 (MGST2) i 3 (MGST3), kao i aktivirajući protein 5-lipoksigenaze (FLAP) (Thorén i Jakobsson, 2000; Samuelsson i sur., 2007; Kanaoka i sur., 2001). Proteini MAPEG imaju proupalne aktivnosti, a neki imaju i opću detoksifikacijsku aktivnost (Tablica 4.). S obzirom da su to sve proteini integrirani u membranu, njihova strukturalna karakterizacija je polagana i teška (Oakley i sur., 2005).

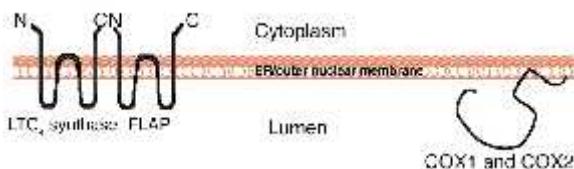
Tablica 4. Proteini obitelji MAPEG i njihove aktivnosti. Preuzeto iz Sampey i sur., 2005

PROTEIN	BIOLOŠKO SVOJSTVO
MGST1	Glutation S-transferaza, glutation peroksidaza
mPGES-1	Glutation-ovisna PGE ₂ sintazna aktivnost
MGST2, MGST3	Glutation S-transferaza, glutation peroksidaza
FLAP	Aktivacija sinteze leukotriena
LTC ₄ S	Glutation S-transferaza specifičnost za LTA ₄

4.3.1. Leukotrien C₄ sintaza (LTC₄S)

LTC₄ je integralni membranebski enzim veličine 18 kDa, koji je aktiviran kao homodimer i pokazuje aktivnost GST koja je izrazito specifična za LTA₄ kao supstrat (Penrose, 1999; Kanaoka i sur., 2001; Ago i sur., 2007). Možda su MGST i LTC₄ nastale konvergentnom evolucijom (Seidegård i Ekström, 1997). Protein FLAP i LTC₄ su strukturalno

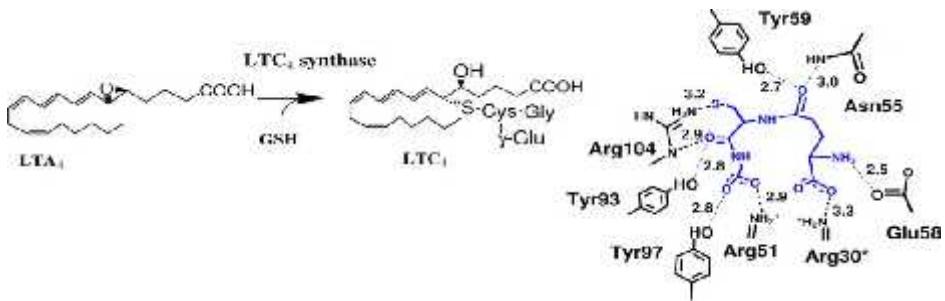
bliski membranski proteini koji mogu postojati kao monomeri ili formirati homodimere, heterodimere ili trimere (Brock, 2005) (Slika 5.).



Slika 5. Položaj enzima uključnih u sintezu leukotriena. Aktivna mjesto LTC₄ sintaze, COX-1 i COX-2 i lipidna vezna domena proteina FLAP orijentirane su prema lumenu ER-a i jezrinoj ovojnici. Preuzeto iz Soberman i Christmas, 2003.

LTC₄ s MGST dijeli 44%, a s proteinom FLAP 31% identičnu aminokiselinsku sekvencu (Kanaoka i sur., 2001; Murakami i sur., 1995). To je jedini enzim u hematopoetskim stanicama sposoban konjugirati GSH s LTA₄ i formirati LTC₄. Razlikuje se od uobičajenih GST po nemogućnosti konjugacije GSH i ksenobiotika (Seidegård i Ekström, 1997; Sanak i Sampson, 1999; Lam i Austen, 2000), selektivnošću prema LTA₄, različitom osjetljivošću na inhibitore, nedostatkom homologije (Penrose, 1999; Lam i Austen, 2000), kao i nemogućnosti imunoprepoznavanja specifičnim protutijelima za MGST (Penrose, 1999).

Ljudska cDNA za LTC₄ kodira protein od 150 aminokiselina (Kanaoka i sur., 2001). Monomer sadržava 4 transmembranske -zavojnice i stvara simetrični dimer kao jedinicu s funkcionalnim domenama preko cijele površine. Struktura enzima je kompleksa, a aktivno mjesto podupire konformaciju GSH u obliku slova U (Ago i sur., 2007) i uspješno smješta tiolnu skupinu za aktivaciju uz pomoć Arg na dodiru enzima i membrane (Martinez Molina i sur., 2007). LTA₄ savršeno pripada u to mjesto tako da Arg-104 monomera aktivira GSH (Slika 6.) kako bi omogućio „napad“ tiolnog aniona na C-4 LTA₄ i nastanak tioesterske veze pri čemu Arg-31 sa susjednog monomera donira proton kako bi nastala hidroksilna skupina na C-5 što dovodi do nastanka LTC₄ (Ago i sur., 2007). Ovakav mehanizam nastanka LTC₄, uključujući i vezanje i aktivaciju GSH, mogao bi biti zajednički obitelji homolognih proteina važnih u upalnim i detoksifikacijskim reakcijama (Martinez Molina i sur., 2007).



Slika 6. Lijevo, katalitička reakcija LTC₄ sintaze. Desno, aktivacija tiolne skupine GSH pomoću Arg-104. GSH je označen plavom bojom. Preuzeto iz Rinaldo-Matthis i sur., 2010.

Ekspresija LTC₄S ograničena je na stanice loze koštane srži. Suprotno od drugog enzima sposobnog sintetizirati LTC₄-MGST2, LTC₄S ne postoji u stanicama endotela ni u jetri (Sanak i Sampson, 1999). MGST2 i MGST3 konjugiraju GSH ne samo s ksenobioticima nego i s LTA₄ i oni su eksprimirani ak i u stanicama koje nemaju LTC₄. LTC₄ se može formirati uz međustanični metabolizam LTA₄ u stanicama koje eksprimiraju LTC₄S ili MGST2 (Kanaoka i sur., 2001).

Miševi s inaktiviranim genom za LTC₄S rastu normalno, ali imaju umanjeni urojeni i stanični imunološki upalni odgovor (Lam, 2003). Knockout životinja kojima nedostaje gen za LTC₄S imaju drastično smanjen vaskularni odgovor koji je ovisan o otpuštanju LTC₄ posredovanom IgE (Soberman i Christmas, 2003).

Nedavno je otkrivena esta genetska varijacija promotora gena za LTC₄ sintazu koja je nadeksprimirana kod populacije koja boluje od astme inducirane aspirinom (AIA). Polimorfizam utječe na transkripciju regulaciju ekspresije LTC₄S zbog čega dolazi do nadekspresije LTC₄S kod pacijenata oboljelih od AIA u odnosu na zdrave pacijente i one oboljele od astme tolerantne na aspirin (ATA) (Sanak i Sampson, 1999). Promotorska regija enzima je složena i omogućuje interakciju s mnogim transkripcionskim pojavama (Jawien, 2002). Inducibilnost enzima pokazuju razine mRNA koje se mijenjaju u eozinofilima nakon stimulacije pomoći u interleukina 5 (IL-5). U bazofilima eksplozija sinteze LTC₄ zahtjeva predinkubaciju s interleukinima 3 (IL-3) i 5 (IL-5) (Sanak i Sampson, 1999).

4.3.2. Mikrosomalna prostaglandin E₂ sintaza-1 (mPGES-1)

Mikrosomalna prostaglandin E₂ sintaza-1 (mPGES-1) je inducibilan enzim iz proteinske obitelji MAPEG (Jakobsson i sur., 1999; Murakami i sur., 2000; Thorén i sur., 2003), glutation-ovisan (Blaine i sur., 2005; Gosset i sur., 2006), vezan na membranu, funkcionalno povezan s COX-2 u zakašnjelom stvaranju PGE₂, no pokazano je da je povezan

i s COX-1 u bazalnoj sintezi PGE₂ (Blaine i sur., 2005). U velikim koli inama prisutan je u mozgu, miši ima, bubregu i jetri (Samuelsson i sur., 2007).

Postoje još 2 oblika identificiranih PGES uklju enih u sintezi istog PG, no nastali su od razli itih predaka. Svaki enzim pokazuje razli ita fiziološka svojstva, regulacijske i kataliti ke mehanizme koji omogu uju istu reakciju druga ije reguliranu (Yamagata i sur., 2001). Citosolna PGES (cPGES) je glutation-ovisan enzim koji je konstitutivno eksprimiran u mnogim tkivima i povezan s COX-1 u trenutnom stvaranju prostaglandina (Murakami i sur., 2002; Blaine i sur., 2005). Mikrosomalna prostaglandin E sintaza tipa 2 (mPGES-2), iako ima identi nu kataliti ku aktivnost kao i mPGES-1, evolucijski je odijeljena i posjeduje topljiv fragment strukturno sli an kao kod cGST (Oakley, 2005) (Tablica 5.). Dokazano je da je neovisna o GSH, za razliku od ostalih PGES (Gudis i sur., 2005).

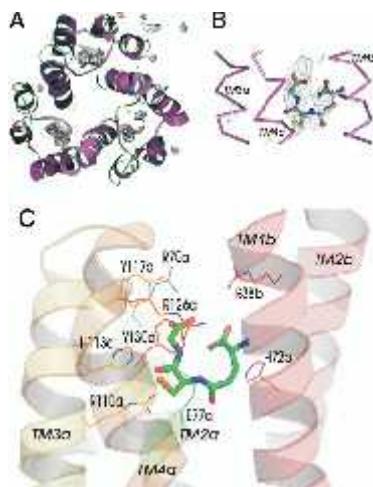
Tablica 5. Svojstva enzima PGES. Preuzeto iz Kudo i Murakami, 2005.

ENZIM	STRUKTURA	EKSPRESIJA	SMJEŠTAJ U STANICI	PREDNOST ENZIMA COX	POSENBE KARAKTERISTIKE	ULOGE IN VIVO
mPGES-1	Obitelj MAPEG	Inducibilna	Perinuklearna membrana	COX-2	Stvaranje trimera	Upala, bol, vru ica, rak
mPGES-2	Domena homologna tioredoksinu	Konstitutivna	Golgijev aparat, citosol	COX-1, COX-2	Odjepljenje N-terminalne hidrofobne regije. Stvaranje dimera	Nepoznata
cPGES	Hsp-90, cochaperon p23	Konstitutivna	Citosol	COX-1, COX-2	Stvaranje kompleksa Hsp-90 i CK2	Nepoznata

Usporedbom triju enzima obitelji MAPEG ustanovljeno je da imaju istu membransku topografiju, iako su na aminokiselinskoj razini sekvence mPGES-1 s proteinom FLAP ili s LTC₄S identi ne u manje od 20% (Jakobsson i sur., 1999). Ovaj enzim je homolog mGST (Yamagata i sur., 2007) jer je prona en i identificiran po etno kao homolog MGST1 s 38% homologije. Iako je MGST1 veoma blizak mPGES-1, ne može katalizirati konverziju PGH₂ do PGE₂ stoga je njihova jedina zna ajka potreba za GSH (Thorén i sur., 2003).

Struktura ljudskog gena *mPGES-1* sastoji se od 3 eksona i 2 introna. Ljudski gen *mPGES-1* homologan je štakorskom 80%. Pro iš eni enzim je veli ine 17,5 kDa (Sampey i sur., 2005). Kvaterna struktura enzima je homotrimerna (Thorén i sur., 2003; Schmidt-Krey i sur., 2004) u dvodimenzionalnim kristalima (Thorén i sur., 2003; Kudo i Murakami, 2005). Trimer se sastoji od 4 snopa zavojnica u kojima hidrofobne zavojnice prolaze kroz membranu (Jakobsson i sur., 1999). Op i prikaz PGES pokazuje da je kod mPGES-1 i cPGES potrebni tiol opskrblijen pomo u GSH (Samuelsson i sur., 2007) (Slika 7.). Mutacije u Arg-110, ali ne

u Tyr-117 rezultiraju nedostatkom kataliti ke aktivnosti enzima mPGES-1. Ove dvije aminokiselina su visoko u obitelji MAPEG (Sampey i sur., 2005)



Slika 7. Prikaz vezanja GSH u mPGES-1. A) Pogled odozgo s citoplazmatske strane na mjesta vezanja GSH na trimer mPGES-1. B) GSH u obliku slova U između transmembranskih zavojnica 1 i 4 (TM1 i TM4) dviju podjedinica. C) Lansi uključeni u stvaranje veznog džepa za GSH. Preuzeto iz Jegershöld i sur., 2008.

Ključan u inak mPGES-1 u raznim patofiziološkim događajima razriješen je korištenjem knockout miševa (Kudo i Murakami, 2005). Iako je dobro poznato da PGE₂ doprinosi upali, boli, vrućici i tumorigenezi, učinki mPGES-1 u nekim od procesa istraživani su preko knockout miševa. Pokazano je da je enzym mPGES-1 uključen u razvoj reumatoидног artritisa, akutne boli, hipersenzitivnosti na bol i upali (Giannico i sur., 2004) te da tako doprinosi lokalnom povraćanju PGE₂ u upalnom artritisu (Sampey i sur., 2005). Daljnja istraživanja na knockout miševima moraju tek pokazati ulogu mPGES-1 u tumorigenezi (Blaine i sur., 2005). Usporedbe divljeg tipa i knockout miša ne pokazuju fenotipske razlike kao ni razlike u razinama TNF-, IL-12 i IL-6 (Samuelsson i sur., 2007).

5. DUŠIKOV (II) OKSID (NO·)

Dušikov (II) oksid (NO·) je slobodni radikal, što ga ima manje stabilnim od ostalih kemijskih spojeva (iako je stabilniji u usporedbi s ostalim slobodnim radikalima) (Martínez-Ruiz i Lamas, 2007). U niskim koncentracijama služi kao signalna molekula sa raznovrsnim regulatornim ulogama u mnogim fiziološkim procesima, no u visokim koncentracijama u upalnim tkivima može oštetiti DNA, RNA, lipide i proteine, što dovodi do porasta mutacija i promijenjene uloge enzima i proteina važnih u procesima karcinogeneze (Li i Wogan, 2005). NO se smatra uobičajenim sekundarnim glasnikom u signalnim putevima pri čemu sudjeluje reverzibilnom koordinacijskom vezom s ciljnom molekulom, topljivom guanilat ciklazom (sGC). Interakcija mijenja konformaciju sGC i aktivira stvaranje cGMP, druge male molekule koja aktivira posebne kinaze (Martínez-Ruiz i Lamas, 2007).

Fiziološki je regulator različitih funkcija u nekoliko vrsta tkiva, uključujući i kardiovaskularno, neuromuskularno, neurološko, genitourinalno, gastrointestinalno i bubrežno (Fernández-Sánchez i sur., 2011). Utjecaj NO kao pleiotropne signalne molekule u regulaciji mnogih fizioloških procesa, kao i u štetnim utjecajima kada je prisutan u velikim količinama tijekom patofizioloških bolesti, potaknulo je zanimanje za kemijska svojstva NO (Yap i sur., 2010).

Stanice endotela, astroglijija i neurona proizvode NO *in vivo* (Yap i sur., 2011). Nastaje katalitičkom pretvorbom iz arginina do citrulina (Calabrese i sur., 2004) uz specifične sintaze dušikova oksida (NOS) koje postoje u tri oblika: životnom (nNOS), inducibilnom (iNOS) i endotelnom (eNOS) (Valko i sur., 2007), kodiranih trima visokokonzerviranim posebnim genima (Karihtala i Soini, 2007). Razina iNOS u SŽS je relativno niska. Porast ekspresije iNOS u astrocitima (Calabrese i sur., 2004) i mikroglija te makrofagima, stanicama glatkih mišića (Mayer i Andrew, 1998) događaju se tijekom upale. Ekspresiju gena za iNOS induciraju endotoksični i citokini (Mayer i Andrew, 1998; Calabrese i sur., 2004) (IL-1, IL-2, TNF-α, lipopolisaharidi). Aktivaciju mogu blokirati protuupalni lijekovi (deksametazon), inhibitorni citokini (IL-1, IL-10), prostaglandin A₂ (PGA₂), tkivni faktori rasta ili inhibitori sinteze proteina (Calabrese i sur., 2004). Makrofagi i monociti aktivirani citokinima stvaraju NO u velikim količinama uz iNOS što pokazuje djelovanje NO kao uspješnog tumor-ubijajućeg citotoksičnog agensa (Karihtala i Soini, 2007).

NO nije ni jaki oksidans ni jaki reducens. Reagira sa superoksidnim anionom pri čemu nastaje peroksinitrit (ONOO⁻). Peroksinitrit je visokoreaktivni spoj s vremenom poluraspađa

manjem od jedne sekunde. Može se uključiti u različite kemijske reakcije ovisno o okolišnim uvjetima i raspoloživim ciljnim molekulama kao što su DNA, proteini i lipidi (Calabrese i sur., 2004). Uključen je u mnoge potencijalno karcinogene reakcije: može pokrenuti lipidnu peroksidaciju, inducirati transverzije i lančane lomove u DNA, ometati lanac prijenosa elektrona u mitohondrijima i utjecati na fosforilaciju proteina (Karihtala i Soini, 2007). Također, NO ili peroksinitrit može nitrozilirati tirozinske ogranice proteina (Rauhala i sur., 2005). Nitrozilirati se mogu i cisteinski ogranci zbog povoljne kinetike reakcije. Cistein ubrzava potrošnju NO u fiziološkim procesima (Calabrese i sur., 2004). Smanjena aktivnost NO pojačava ekspresiju NF- κ B koji pozitivno regulira ekspresiju upalnih posrednika kao što su citokini ili adhezijske molekule (Prasad i sur., 1999).

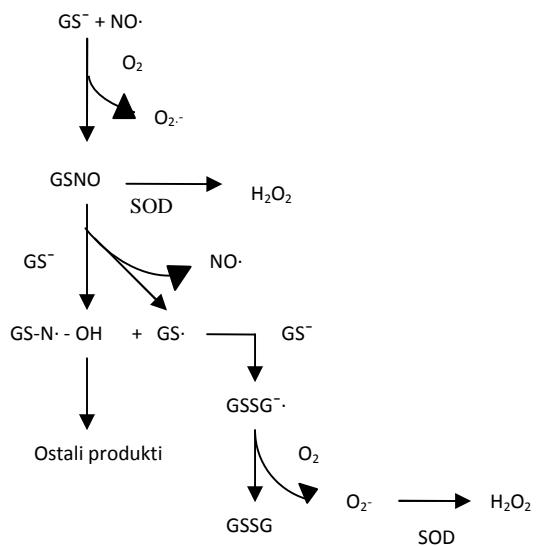
Iako je ovo da NO sudjeluje u mnogim fiziološkim ulogama, uočljivo je i dalje prekomjerno nastajanje NO, preko NOS, može biti štetno za osnovne funkcije stanica. Postoje različiti mehanizmi koji objašnjavaju toxicnost posredovanu NO. Unutarstani na koncentracija GSH je bitan faktor koji određuje osjetljivost stanice na NO i njegove derive (Heales i Bolaños, 2002). GSH ima ključnu ulogu u stanicama u njihovoj otpornosti na oksidativno i nitrozativno oštećenje „skupljanjem“ NO i oksidanata pružajući reducirane ekvivalente enzimima uključujući i metabolizam ROS i RNS kao i eliminirajući potencijalne toksične oksidativne produkte i reducirajući oksidiranje ili nitroziliranje tiola proteina (Klatt i Lamas, 2000).

5.1. Nastanak S-nitrozoglutationa (GSNO)

Endogeni tioli, spojevi sa skupinom $-SH$, stvaraju stabilne, biološki aktivne spojeve s NO u nekoliko ljudskih sustava. Novonastali S-nitrozotioli imaju vrijeme poluraspada dulje nego NO, snažno aktiviraju guanilat ciklazu i predstavljaju važne intermedijere u djelovanju NO. Iako još nisu poznati mehanizmi, zna se da ovi S-nitrozotioli poboljšavaju citoplazmatski i transmembranski prijenos NO iz endotela u glatke mišićne stanice krvnih žila i trombocita (Prasad i sur., 1999).

NO može reagirati s reduciranim glutationom (GSH) i stvara se S-nitrozoglutation (GSNO) (Heales i Bolaños, 2002; Rauhala i sur., 2005; Hill i Bhatnagar, 2007). Osim GSNO, samo je nekoliko nitrozotiola izolirano uključujući i S-nitrozo-acetyl-DL-penicilamin (SNAP) i S-nitrozoalbumin (Feelish, 1998). GSNO može nastati i preko transnitrozilacije između dva tiola, u ovom slučaju, između u nitroziliranog proteina i GSH (Yap i sur., 2010).

Peroksinitrit takođe može reagirati s GSH, kao i sa ostalim sulfihidrilnim spojevima ako je visoka koncentracija tiola u stanici. Nastali GSNO može zatim glutatolirati proteine (Heales i Bolaños; Hill i Bhatnagar, 2007). No, ova reakcija ovisi o koncentraciji GSH i pH. U toj reakciji se izmjeniti dva elektrona zbog čega će nastati GSSG (Fang i sur., 2002; Heales i Bolaños, 2002) koji se može reciklirati uz glutation reduktazu (Fang i sur., 2002; Calabrese i sur., 2004). No, reakcija može obuhvatiti i samo jedan elektron. U tom slučaju stvara se tiilni radikal (GS^\cdot) koji će pokrenuti lanac reakciju koja ovisi o kisiku, a uključuje stvaranje peroksidnog radikala nakon čega će slijediti daljnja potrošnja stanica nog GSH. (Slika 8.).



Slika 8. Reakcije u kojima GSH reagira s NO i nastaje GSNO. GSH, kao tiolat, reagira s NO u prisutnosti O_2 i nastaje GSNO ili može u prisutnosti tiolata stvarati spojeve koji mogu glutatolirati sulfhidrilne skupine proteina. SOD, znak za superoksid dismutazu. Preuzeto i prilagođeno na temelju Lash, 2006.

U fiziološkim uvjetima, GSNO i S-nitrozotiolii prisutni su u krvi i mozgu. Koncentracije GSNO u mozgu odraslog štakora procijenjene su na 6-8 μM što je u opisu 0,3-0,7% razine GSH u tkivu (Khan i sur., 2011).

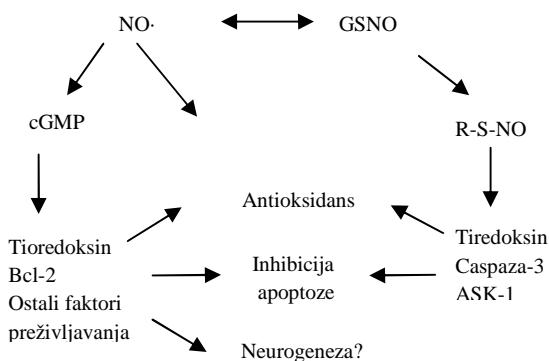
5.2. Uloge S-nitrozoglutationa (GSNO)

GSNO, koji nastaje reakcijom NO s GSH, modulator je stanica nog redoks stanja (Khan i sur., 2011) te se smatra biološki bitnim metabolitom radikala NO zbog sposobnosti moduliranja prijenosa signala posttranslacijskom modifikacijom redoks-osjetljivih proteina, tj.

procesima S-nitrozilacije i ili S-glutationilacije (Martínez-Ruiz i Lamas, 2007; Yap i sur., 2010; del Río, 2011). GSNO sudjeluje u važnim biološkim reakcijama, uklju uju i osloba anje NO, transnitrozilaciju, S-tiolaciju, kao i izravno djelovanje (del Río, 2011). GSNO, kao endogeni S-nitrozilirani reducirani glutation, 100 puta je mo niji od klasi nog antioksidansa GSH (Yap i sur., 2011).

NO i GSNO su antioksidansi koji štite moždano tkivo (Duan i Cheng i sur., 2007). GSNO pokazuje aktivnost antioksidansa modulacijom redoks statusa preko porasta koncentracije GSH, a smanjenja koncentracije peroksinitrita (Khan i sur., 2011) te preko prijenosa signala, kao što je posttranslacijska modifikacija proteina (Yap i sur., 2010). Efikasan je nitroziliraju i agens, a mehanizam nitrozilacije modulira funkciju proteina i u normalnim uvjetima i u bolesti (Khan i sur., 2011). S-nitrozilacija cisteina tiola proteina je važna postranslacijska modifikacija u animalnim stanicama (del Río, 2011). Nitrozotiol služi za prijenos NO u plazmu pove avaju i vrijeme poluraspada pri fiziološkim koncentracijama NO (Duan i Cheng i sur., 2007).

GSNO štiti SŽS od upale i ROS u mnogim ozljedama preko smanjenja apoptoze u moždanim stanicama i inhibira aktivnost kaspaze-3 (Slika 9.). Protuupalnim djelovanjem nakon ozljede utje e na smanjenje ekspresije transkripcijskog faktora NF- B, adhezijskih molekula, citokina i iNOS (Khan i sur., 2011). Nadalje, GSNO inhibira aktivaciju trombocita, smanjuje embolizaciju kod ljudi, inhibira upalne doga aje u endotelnim stanicama i limfocitima T. Uo eno je i zaštitno djelovanje nitrozilacije u sr anim bolestima. Nedostatak nitrozilacije o ituje se kao glavni mehanizam patogeneze (Khan i sur., 2011) te posttranslacijska modifikacija enzima ima veliku ulogu u bolestima, pogotovo kod Alzheimerove bolesti (Martínez-Ruiz i Lamas, 2007; Yap i sur., 2010).



Slika 9. Predloženi mehanizam zaštite središnjeg živ anog sustava preko NO i GSNO. NO dobiven uz NOS može izravno djelovati kao antioksidans ili preko puteva ovisnih o cGMP može imati i antioksidativno i antiapoptotsko djelovanje. Tako er, GSNO može izravno modulirati aktivnost proteina preko S-nitrozilacije (R-

S-NO), inhibiraju i kaspazu-3 i ASK-1 (kinazu koja regulira apoptotski signal-1) i aktiviraju i tioredoksin. Preuzeto i prilago eno na temelju Rauhala i sur., 2005.

Radikal NO je manje reaktivan od kisikovih radikala, npr. hidroksilnog, superoksidnog (Rauhala i sur., 2005). NO brzo reagira s ROS, "skupljaju i" ROS, ali i nastankom drugih radikala utje e na stani ne funkcije stanica krvnih žila (Wassman i sur., 2004). GSNO i NO mogu inducirati apoptozu kod makrofaga, timocita, limfocita i endotelnih stanica preko razli itih signalnih puteva, posebno preko S-nitrozilacije/denitrozilacije kao reverzibilnih procesa (Duan i Cheng i sur., 2007).

Na smanjeno nastajanje NO i dostupnost NO, važnog faktora u prijenosu signala, ubijanju patogena i relaksaciji glatkih miši a, jako utje e GSH. Nedostatak GSH u izvanstani nom prostoru rezultira smanjenim nastankom GSNO (koji nastaje i unutar i izvan stanice), kao važnim izvorom NO (Hudson, 2001). Porast GSH uzrokovan donorima NO je potentni mehanizam zaštite stanica od oksidativnog stresa i upale (Rahman i MacNee, 2000). Nedostatak GSH smanjuje i razinu ekspresije iNOS i GSNO nastalog u stanici, što može biti povezano. NO i GSH reguliraju metabolizam stanice i NO stimulira pove anu ekspresiju - GCS, limitiraju eg enzima u sintezi GSH, što je u suprotnosti s citotoksi nosti NO. GSNO nije samo skladište lako dostupnog NO, nego i lako dostupnog GSH što postaje klju no u uvjetima kada se GSH potroši tijekom zaštitnih uloga. Naime, postoji ravnoteža izme u GSH i GSNO te u uvjetima trošenja GSH dolazi do razlaganja GSNO. Ravnotežu odre uje NO i to prema citotoksi nosti ili zaštitnoj ulozi od citotoksi nosti. Trošenje GSH poja ava osjetljivost stanice na štetne efekte peroksinitrita što dovodi do apoptoze te se smanjuje opuštenost glatkih miši a kao odgovor na NO dovode i do bronhokonstrikcije (Hudson, 2001).

Dok GSH predstavlja glavni izvor tiola unutar stanice, u plazmi su to proteini, posebno albumin. Trošenje plazmatskog i vaskularnog GSH može rezultirati pove anim oksidacijskim stresom i doprinijeti razvoju ateroskleroze. Reducirani tioli poja avaju vazodilatacijsko i anti-trombocitno djelovanje NO tako da dodatak GSH može poboljšati disfunkciju endotela i dostupnost NO kod pacijenata koji boluju od ateroskleroze (Prasad i sur., 1999).

6. ZAKLJUČAK

GSH svojim ulogama sudjeluje u mnogo bitnih stani nih procesa te pomaže održavanju homeostaze. Smanjenje omjera GSH/GSSG dovodi do bitnih promjena u stanici pogotovo u uvjetima oksidacijskog stresa. Tako se na više na ina poti e proučalno stanje. Aktivacija transkripcijskih faktora NF- B i AP-1 dovodi do ekspresije gena za proučalne citokine. Zbog utroška GSH na „skupljanje“ ROS, dolazi do povećanog nastanka proučalnih citokina, pogotovo TNF- , IL-6, IL-1 . Uz ovu proučalnu ulogu, određena količina GSH dokazano je potrebna za proliferaciju limfocita T bez kojih ne bi bilo pravog imunološkog odgovora. GSH sudjeluje u sintezi proučalnih medijatora, leukotriena i prostaglandina, kao kofaktor enzima LTC₄S i mPGES-1, lanova proteinske obitelji MAPEG koja uključuje membranske proteine s aktivnošću GSH S-transferaze. GSNO, nastao reakcijom NO i GSH, osim kao bitan spremnik GSH u stresnim uvjetima, djeluje protuupalno inhibirajući citokine, NF- B i AP-1, apoptozu, iNOS i nastanak adhezijskih molekula.

7. LITERATURA

- Ago H, Kanaoka Y, Irikura D, Lam BK, Shimamura T, Austen KF, Miyano M, 2007. Crystal structure of a human membrane protein involved in cysteinyl leukotriene biosynthesis. *Nature* **448**, 609-612.
- Ahstiani HRA, Bakhshandi AK, Rahbar M, Mirzaei A, Malek pour A, Rastegar H, 2011. Glutathione, cell proliferation and differentiation. *Afr. J. Biotechnol.* **10**, 6348-6363.
- Ando K, Hirao S, Kabe Y, Ogura Y, Sato I, Yamaguchi Y, Wada T, Handa H, 2008. A new ARE/Ref-1-dependent pathway leading to reduction of NF- B and AP-1, and activation of their DNA-binding activity. *Nucl Acid Res* **36**, 4327-4336.
- Andringa KK, Coleman MC, Aykin-Burns N, 2006. Inhibition of glutamate cysteine ligase activita sensitizes human breast cancer cells to the toxicity od a-deoxy-d-glucose. *Cancer Res* **66**, 1605-1610.
- Aukrust P, Svardal AM, Müller F, Lunden B, Berge RK, Ueland PM, Frøland SS, 1995. Increased levels of Oxidized glutathione in CD4⁺ lymphocytes associated with disturbed intracellular redox balance in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Blood* **86**, 258-267.
- Ault JG, Lawrence DA, 2002. Glutathione distribution in normal and oxidatively stressed cells. *Exp Cell Res* **285**, 9-14.
- Avogaro A, Vigili de Kreutzenberg S, 2005. Mechanism of endothelial dysfunction in obesity. *Clin Chim Acta* **360**, 9-26.
- Babu KS, Salvi SS, 2000. Aspirin and asthma. *Chest* **118**, 1470-1476.
- Biswas SK, Rahman I, 2009. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammtion: The role of glutathione. *Mol Asp Med.* **30**, 60-76.
- Black AT, Gordon MK, Heck DE, Gallo MA, Laskin DL, Laskin JD, 2011. UVB light regulates expression of antioxidants and inflammatory mediators in human corneal epithelial cells. *Biochem Pharmacol* **81**, 873-880.
- Blaine SA, Meyer AM, Hurteau G, Wick M, Hankin JA, Murphy RC, Dannenberg AJ, Geraci MW, Subbaramaiah K, Nemenoff RA, 2005. Targeted over-expression of mPGES-1 and elevated PGE₂ production is not sufficient for lung tumorigenesis in mice. *Carcinogenesis* **26**, 209-217.

- Bossis G, Malnou CE, Farris R, Andermarcher E, Hipskind R, Rodriguez M, Schmidt D, Muller S, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M, 2005. Down-regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 dimer activity by sumoylation. *Mol Cell Biol* **25**, 6964-6979.
- Brock TG, 2005. Regulating leukotriene synthesis: the role of nuclear 5-lipoxygenase. *J Cell Biochem* **96**, 1203-1211.
- Calabresse V, Boyd-Kimball D, Scapagnini G, Butterfield DA, 2004. Nitric oxide and cellular response in brain aging and neurodegenerative disorders: the roles of vitagenes. *In vivo* **18**, 245-268.
- Castro L, Freeman BA, 2001. Reactive oxygen species in human health and disease. *J Nutr* **17**, 161-165.
- Chia AJL, Goldring CE, Kitteringham NR, Wong SQ, Morgan P, Park BK, 2010. Differential effect of covalent protein modification and glutathione depletion on the transcriptional response of Nrf2 and NF- B. *Biochem Pharmacol* **80**, 410-421.
- Del Rio LA, 2011. Peroxisomes as a cellular source of reactive nitrogen species signal molecules. *Arch Biochem Biophys* **506**, 1-11.
- Dröge W, Breitkreutz R, 2000. Glutathione and immune function. *Proc Nutr Soc* **59**, 595-600.
- Duan S, Chen C, 2007. S-nitrosylation/denitrosylation and apoptosis of immune cells. *Cell Mol Immunol* **4**, 353-358.
- Duroudier NP, Tulah AS, Sayers I, 2009. Leukotriene pathway genetics and pharmacogenetics in allergy. *Allergy* **64**, 823-839.
- Elsas PX, Queto T, Mendonça-Sales SC, Elsas MIG, Kanaoka Y, Lam BK, 2008. Cyteinyl leukotrienes mediate the enhancing effects of indomethacin and aspirin on eosinophil production in murine bone marrow cultures. *Br J Pharmacol* **153**, 528-535.
- Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliaro L, Ceriello A, Giugliano D, 2002. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* **106**, 2067-2072.
- Fang Y-Z, Yang S, Wu G, 2002. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* **18**, 872– 879.
- Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C, 2007. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int. J. Cancer* **121**, 2381-2386.
- Feelisch M, 1998. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **358**, 113-122.
- Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, 2005. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **204**, 263-273.

- Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA, 2011. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 3117-3132.
- Finkensieper A, Kieser S, Bekhite MM, Richter M, Mueller JP, Graebner R, Figulla H-R, Sauer H, Wartenberg M, 2010. The 5-lipoxygenase pathway regulates vasculogenesis in differentiating mouse embryonic stem cells. *Cardiovasc Res* **86**, 37-44.
- Fratelli M, Demol H, Puype M, Casagrande S, Eberini I, Salmona M, Bonetto V, Mengozzi M, Duffieux F, Miclet E, Bachi A, Vandekerckhove J, Gianazza E, Ghezzi P, 2002. Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *PNAS* **99**, 3503-3510.
- Galter D, Mihm S, Dröge W, 1994. Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factors B and the activator protein-1. *Eur. J. Biochem* **221**, 639-648.
- Giannico G, Mendez M, LaPointe MC, 2004. Regulation of the membrane-localized prostaglandin E synthases mPGES-1 and mPGES-2 in cardiac myocytes and fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, 165-174.
- Gosset M, Berenbaum F, Levy A, Pigenet A, Thirion S, Saffar J-L, Jacques C, 2006. Prostaglandin E₂ synthesis in cartilage explants under compression: mPGES-1 is mechanosensitive gene. *Arth Res Ther* **8**, 135-148.
- Griffith O W, 1999. Biological and pharmacological regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Rad Biol Med* **27**, 922-935.
- Grimble RF, 2006. The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. *J Nutr* **136**, 1660-1665.
- Gudis K, Tatsuguchi A, Wada K, Futagami S, Nagata K, Hiratsuka T, Shinji Y, Miyake K, Tsukui T, Fukuda Y, Sakamoto C, 2005. Microsomal prostaglandin E synthase (mPGES)-1, mPGES-2 and cytosolic PGES expression in human gastritis and gastric ulcer tissue. *Lab Invest* **85**, 225-236.
- Guicciardi ME, Miyoshi H, Brok SF, Gores GJ, 2001. Cathepsin B knockout mice are resistant to tumor necrosis factor- mediated hepatocyte apoptosis and liver injury. *Am J Pathol* **159**, 2045-2054.
- Haddad JJE, Safieh-Garabedian B, Saadé NE, Land SC, 2001. Thiol regulation of pro-inflammatory cytokines reveals a novel immunopharmacological potential of glutathione in the alveolar epithelium. *J Pharmacol Exp Ther* **296**, 996-1005.

- Hadzic T, Li L, Cheng N, Walsh SA, Spitz DR, Knudson CM, 2005. The role of low molecular weight thiols in T lymphocyte proliferation and IL-2 secretion. *J Immunology* **175**, 7965-7972.
- Hanigan MH, Pitot HC, 1985. Gamma-glutamyl transpeptidase – its role in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* **6**, 165-172.
- Heales SJR, Bolaños JP, 2002. Impairment of brain mitochondrial function by reactive nitrogen species: the role of glutathione dictating susceptibility. *Neurochem Int* **40**, 469-474.
- Hill BG, Bhatnagar A, 2007. Role of glutathiolation in preservation, restoration and regulation of protein function. *Life* **59**, 21-26.
- Holmgren A, Johansson C, Berndt C, Lönn ME, Hudemann C, Lillig CH, 2005. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem Soc Trans* **33**, 1375-1377.
- Hsieh FH, Lam BK, Penrose JF, Austen KF, Boyce JA, 2001. *J. Exp. Med.* **193**, 123-133.
- Hudson VM, 2001. Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by CFTR mutation. *Free Rad Biol Med* **30**, 1440-1461.
- Hunter EAL, Grimble RF, 1994. Cysteine and methionine supplementation modulate the effect of tumor necrosis factor on protein synthesis, glutathione and zinc concentration of liver and lung in rats fed a low protein diet. *J Nutr* **124**, 2319-2328.
- Jakobsson P-J, Thorén S, Morgenstern R, Samuelsson B, 1999. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *PNAS* **96**, 7220-7225.
- Jawien J, 2002. A new insight into aspirin-induced asthma. *Eur J Clin Invest* **32**, 134-138.
- Jegerschöld C, Pawelzik S-C, Purhonen P, Bhakat P, Gheorghe KR, Gyobu N, Mitsuoka K, Morgenstern R, Jakobsson P-J, Hebert H, 2008. *PNAS* **105**, 11110-11115.
- Ji LL, 2008. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: role of redox signaling. *Free Rad Biol Med* **44**, 142-152.
- Kanaoka Y, Maekawa A, Penrose JF, Austen KF, Lam BK, 2001. Attenuated zymosan-induced peritoneal vascular permeability and IgE-dependent passive cutaneous anaphylaxis in mice lacking leukotriene C₄ synthase. *J Biol Chem* **276**, 22608-22613.
- Karihtala P, Soini Y, 2007. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* **115**, 81-103.
- Khan M, Sakakima H, Dhammu TS, Shunmugavel A, Im Y-b, Gilg AG, Singh AK, Singh I, 2011. S-nitrosoglutathione reduces oxidative injury and promotes mechanisms neurorepair following traumatic brain injury in rats. *J Neuroinflammation* **8**, 78-134.

- Klatt P, Lamas S, 2000. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* **267**, 4928-4944.
- Korzekwa AJ, Bodek G, Bukowska J, Blitek A, Skarzynski DJ, 2011. Characterization of bovine immortalized luteal endothelial cells: action of cytokines on production and content of arachidonic acid metabolites. *Reprod Biol Endocrinol* **9**, 27-37.
- Kudo I, Murakami M, 2005. Prostaglandin E synthase, a terminal enzyme for prostaglandin E₂ biosynthesis. *J Biochem Mol Biol* **38**, 633-638.
- Lam BK, 2003. Leukotriene C₄ synthase. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **69**, 111-116.
- Lam BK, Austen KF, 2000. Leukotriene C₄ synthase: a pivotal enzyme in the biosynthesis of the cysteinyl leukotrienes. *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 16-19.
- Lash LH, 2005. Role of glutathione transport processes in kidney function. *Toxicol Appl Pharm* **204**, 329-342.
- Lash LH, 2006. Mitochondrial glutathione trasnport: physiological, pathological and toxicological implications. *Chem Biol Interact* **163**, 54-67.
- Li, C-Q, Wogan GN, 2005. Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Lett* **226**, 1-5.
- Lieberman MW, Barrios R, Carter BZ, Habib GM, Lebovitz RM, Rajagopalan S, Sepulveda AR, Shi Z-Z, Wan D-F, 1995. -glutamyl transpeptidase. *Am J Pathology* **147**, 1175-1185.
- Lu SC, 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* **13**, 1169-1183.
- Luo Y, Hattori A, Munoz J, Qin Z-H, Roth GS, 1999. Intrastriatal dopamine injection induced apoptosis through oxidation-involved activation of transcriptional factors AP-1 and NF-B in rats. *Mol Pharmacol* **56**, 254-264.
- Mariappan N, Elks CM, Sriramula S, Guggilam A, Liu Z, Borkhsenious O, Francis J, 2009. NF-B-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II mellitus. *Cardiovasc Res* **85**, 473-483.
- Mårtensson J, Jain A, Stole E, Frayer W, Auld PAM, Meister A, 1991. Inhibition of glutathione synthesis in the newborn rat: A model for endogenously produced oxidative stress. *PNAS* **88**, 9360-9364.
- Martinez Molina D, Wetterholm A, Kohl A, McCarthy AA, Niegowski D, Ohlson E, Hammarberg T, Eshaghi S, Haeggström JZ, Nordlund P, 2007. Structural basis for synthesis of inflammatory mediators by human leukotriene C₄ synthase. *Nature* **448**, 613-616.

- Martínez-Ruiz A, Lamas S, 2007. Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: convergences and divergences. *Cardiovasc Res* **75**, 220-228.
- Mayapatek E, 2000. Leukotriene C₄ synthesis deficiency: a member of a probably underdiagnosed new group of metabolic diseases. *Eur J Pediatr* **158**, 811-818.
- Mayer B, Andrew P, 1998. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **358**, 127-133.
- Meister A, 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* **263**, 17205-17208.
- Monje P, Hernández-Losa J, Lyons RJ, Castellone MD, Gutkind JS, 2005. Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. *J Biol Chem* **280**, 35081-35084.
- Moran LK, Gutteridge JMC, Quinlan GJ, 2001. Thiols in cellular redox signalling and control. *Curr Med Chem* **8**, 763-772.
- Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK, 2006. Role of TNF in pulmonary pathophysiology. *Respir Res* **7**, 125-133.
- Murakami M, Austen KF, Bingham III CO, Friend DS, Penrose JF, Arm JP, 1995. Interleukin-3 regulates development of the 5-lipoxygenase/leukotriene c₄ synthase pathway in mouse mast cells. *J Biol Chem* **270**, 22653-22656.
- Musiek ES, Milne GL, McLaughlin B, Morrow JD, 2005. Cyclopentenone eicosanoids as mediators of neurodegeneration: a pathogenic mechanism of oxidative stress-mediated and cyclooxygenase-mediated neurotoxicity. *Brain Pathol.* **15**, 149-158.
- Oakley AJ, 2005. Glutathione transferases: new functions. *Current Opinion in Structural Biology* **15**, 716-723.
- Penrose, JF, 1999. LTC4 synthase. Enzymology, biochemistry, and molecular characterization. *Clin Rev Allergy Immunol.* **17**, 133-152.
- Perricone C, De Carolis C, Perricone R, 2009. Glutathione: a key player in autoimmunity. *Autoimmun Rev* **8**, 697-701.
- Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C, 1998. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *PNAS* **95**, 3071-3076.
- Pias Ek, Aw TY, 2002. Apoptosis in mitotic competent undifferentiated cells induced by cellular redox imbalance independent of reactive oxygen species. *FASEB J* **16**, 781-790.
- Prasad A, Andrews NP, Padder FA, Husain M, Quyyumi AA, 1999. Glutathione reverses endothelial dysfunction and improves nitric oxide bioavailability. *J Am Coll Cardiol* **34**, 507-514.

- Rahman I, 2000. Regulation of nuclear factor- B, aktivator protein-1, and glutathione levels by tumor necrosis factor- and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Biochem Pharmacol* **60**, 1041-1049.
- Rahman I, 2005. Regulation of glutathione in inflammation and chronic lung diseases. *Mutation Res* **579**, 58-80.
- Rahman I, MacNee W, 2000. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Rad Biol Med* **28**, 1405-1420.
- Rauhala P, Andoh T, Chiueh CC, 2005. Neuroprotective properties of nitric oxide and S-nitrosoglutathione. *Toxicol Appl Pharmacol* **207**, 91-95.
- Rinaldo-Matthis A, Wetterholm A, Martinez Molina D, Holm J, Niegowski D, Ohlson E, Nordlund P, Morgenstern R, Haeggström JZ, 2010. Arginine 104 is a key catalytic residue in leukotriene C₄ synthase. *J Biol Chem* **285**, 40771-40776.
- Rouzer CA, Scott WA, Griffith OW, Hamill AL, Cohn ZA, 1981. Depletion of glutathione selectively inhibits synthesis of leukotriene C by macrophages. *PNAS* **78**, 2532-2536.
- Sakamoto H, Imai H, Nakagawa Y, 2000. Involvement of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the modulation of prostaglandin D₂ synthesis. *J Biol Chem* **275**, 40028-40035.
- Sampey AV, Monrad S, Crofford LJ, 2005. Microsomal prostaglandin E synthase-1: the inducible synthase for prostaglandin E₂. *Arth Res Ther* **7**, 114-117.
- Samuelsson B, 1991. Arachidonic acid metabolism: role in inflammation. *Z Rheumatol* **50**, 3-6.
- Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson P-J, 2007. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev* **59**, 207-224.
- Sanak M, Sampson AP, 1999. Biosynthesis of cysteinyl-leucotrienes in aspirin-intolerant asthma. *Clin Exp All* **29**, 306-313.
- Schmidt-Krey I, Kanaoka Y, Mills DJ, Irikura D, Haase W, Lam BK, Austen KF, Kühlbrandt W, 2004. Human leukotriene C₄ synthase at a 4.5 Å resolution in projection. *Structure* **12**, 2009-2014.
- Seidegård J, Ekström G, 1997. The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect* **105**, 791-799.
- Sies H, 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Rad Biol Med* **27**, 916-921.
- Soberman RJ, Christmas P, 2003. The organization and consequences of eicosanoid signaling. *J Clin. Invest.* **111**, 1107-1113.
- Song JH, Humes HD, 2009. Renal cell therapy and beyond. *Semin Dial* **22**, 603-609.

- Staal FJT, Roederer M, Herzenberg LA, Herzenberg LA, 1990. Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor B and transcription of human immunodeficiency virus. *PNAS* **87**, 9943-9947.
- Stoytcheva ZR, Berry MJ, 2009. Transcriptional regulation of mammalian selenoprotein expression. *Biochim Biophys Acta* **1790**, 1429-1440.
- Suthanthiran M, Anderson ME, Sharma VK, Meister A, 1990. Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens. *PNAS* **87**, 3343-3347.
- Thorén S, Jakobsson P-J, 2000. Coordinate up- and down- regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6428-6434.
- Thorén S, Weinander R, Saha S, Jegerschöld C, Petterson PL, Samuelsson B, Hebert H, Hamberg M, Morgenstern R, Jakobsson P-J, 2003. Human microsomal prostaglandin E synthase-1. *J Biol Chem* **278**, 22199-22209.
- Townsend DM, Tew KD, 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* **22**, 7369-7375.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD; Mazur M, Telser J, 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *IJBCB* **39**, 44-84.
- Villa P, Saccani A, Sica A, Ghezzi P, 2002. Glutathione protects mice from lethal sepsis by limiting inflammation and potentiating host defense. *J Infect Dis* **185**, 1115-1120.
- Wang W, Ballatori N, 1998. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev* **50**, 335-355.
- Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G, 2004. Modulation of oxidant and antioxidant expression and function in vascular cells. *Hypertension* **44**, 381-386.
- Watson WH, Yang X, Choi YE, Jones DP, Kehrer JP, 2004. Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicol Sci* **78**, 3-14.
- Wu D, Meydani SN, Sastre J, Hayek M, Meydani M, 1994. In vitro glutathione supplementation enhances interleukin-2 production and mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells from young and old subjects. *J Nutr* **124**, 655-663.
- Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton JR, Turner ND, 2003. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* **134**, 489-492.
- Yamagata K, Matsumura K, Inoue W, Shiraki T, Suzuki T, Yasuda S, Sugiura H, Cao C, Watanabe Y, Kobayashi S, 2001. Coexpression of microsomal-type prostaglandin E

synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J Neurosci* **21**, 2669-2677.

Yap LP, Sancheti H, Ybanez MD, Garcia J, Enrique C, Han D, 2010. Determination of GSH and GSNO using HPLC with electrochemical detection. *Methods Enzymol* **473**, 137-147.

<http://www.chemistry.sdsu.edu/faculty/Huxford/>.

8. SAŽETAK

Glutation (-glutamil-cisteinilglicin, GSH) je tripeptid prisutan u velikim koli inima u svim stanicama sisavaca. Sintetizira se u stanicama svih organa, posebno u jetri. Najve a koli ina nalazi se u citosolu, mitohondriju i ER. Služi kao antioksidans i detoksifikator u mnogim procesima metabolizma i regulira stani na zbivanja. Postoji u dva oblika-reduciranom (GSH) koji može oksidirati do disulfida (GSSG), a njihov omjer odre uje redoks stanje stanice koje je bitan posrednik u više procesa. U ovom radu obra uju se uloge GSH kao regulatora stani nog redoks statusa u kontroli transkripcijskih faktora i imunološkog odgovora te kao kofaktora u sintezi proupalnih posrednika ili spoja s NO. Smanjenje razine GSH u uvjetima oksidacijskog stresa aktivira transkripcijske faktore NF- B i AP-1 koji poti u ekspresiju mnogih proupalnih gena i gena za citokine. U imunološkom sustavu GSH ima dvojaku ulogu: utje e na smanjenje sinteze citokina koji mogu dodatno poja ati oksidacijski stres, a dovoljna koli ina GSH potrebna je za proliferaciju limfocita T i odgovaraju i imunološki odgovor. GSH služi i kao kofaktor u pojedinim koracima sinteze proupalnih posrednika, leukotriena i prostaglandina, koje kataliziraju membranski enzimi porodice GSH S-transferaza imena MAPEG. NO se može spojiti s GSH pri emu nastaje S-nitrozoglutation (GSNO) koji može posttranslacijskom modifikacijom preko S-tiolacije ili S-glutationilacije utjecati na aktivnost proteina i time inhibirati apoptozu ili utjecati na redoks stanje stanice.

9. SUMMARY

Glutathione (-glutamylcysteinylglycine, GSH) is a tripeptid present in large levels in all mammalian tissues. It is synthetized within the cells of all organs, especially in the liver. The largest levels of GSH are present in cytosol, mitochondria and ER. GSH serves as antioxidant, detoxifying agent in a number of metabolism processes and it modulates cell events. There are two forms of GSH: reduced form (GSH) which can oxidize to disulphide (GSSG), GSH/GSSG ratio determines redox state of cells which is important factor in many processes. This review explaines roles of GSH as a regulator of cellular processes in a modulation of transcriptional factors and immune responses and, also, as a cofactor in pro-inflammatory mediators synthesis and NO-adduct formation. In conditions of oxidative stress, a decrease in GSH levels activates transcriptional factors NF- B i AP-1 which then activate pro-inflammatory genes and cytokine genes expression. GSH has a double role in the immune system: it affects the decrease in cytokine synthesis which can enhance oxidative stress and, also, adequate levels of GSH are essential for T lymphocyte proliferation and successful immune response. In the synthesis of pro-inflammatory mediators, leukotrienes and prostaglandins, GSH serves as a cofactor in some of the steps catalyzed by special GSH-S transferase membrane-bound enzymes called MAPEG. NO can form an adduct with GSH forming S-nitrosoglutathione (GSNO) which by posttranslational modification through S-thiolation and S-glutathionilation can modify protein activity and additionally apoptosis inhibition or cell redox state.