

**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**

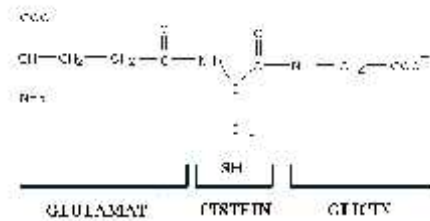
Zagreb, 2011.

# SADRŽAJ

1.	UVOD .....	2
2.	TRANSKRIPCijski FAKTORI I EKSPRESIJA GENA.....	5
2.1.	Nuklearni faktor $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) .....	6
2.2.	Utjecaj glutaciona na NF- $\kappa$ B.....	7
2.3.	Aktivacijski protein-1 (AP-1).....	8
2.4.	Utjecaj glutaciona na AP-1 .....	9
3.	IMUNOLOŠKI ODGOVOR .....	11
3.1.	Citokini .....	11
3.1.1.	$\kappa$ imbenik tumorske nekroze (TNF- $\kappa$ ) .....	12
3.1.2.	Ostali citokini .....	12
3.2.	Utjecaj glutaciona na proizvodnju citokina.....	13
3.3.	Utjecaj glutaciona 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 <sub>4</sub> sintaza (LTC <sub>4</sub> S).....	18
4.3.2.	Mikrosomalna prostaglandin E <sub>2</sub> sintaza-1 (mPGES-1) .....	20
5.	DUŠIKOV (II) OKSID (NO $\cdot$ ).....	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)

Obi no je prisutan u visokim (0,1-10 mM) razinama (Tablica 1.) što ga ini naj eš im stani nim tiolom i najobilnijim niskomolekulskim peptidom. GSH se sintetizira unutar svih stanica (Mårtensson i sur., 1991), posebno u jetri (Perricone i sur., 2009).

**Tablica 1.** Koncentracije unutarstani nog glutationa (GSH) u razli itim 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
Plu na epitelna stanica štakora	18
Endotelna stanica iz pup ane vene 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% stani 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, unato potrošnji citosolnog GSH, mitohondrijski ostaje o uvan (Hanigan i Pitot, 1985). Osim žu i, koja može sadržavati i do 10

mM GSH, izvanstani ne koncentracije GSH relativno su niske (npr. 2-20  $\mu$ M 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 količinama GSH i formira mješovite proteinske disulfide. Oksidirani GSH u obliku GSSG izlazi iz stanice ili se reducira preko NADP-ovisne glutation reduktaze (Hanigan i Pitot, 1985). Zbog količine GSH u stanici, povećanje postotka GSSG u stanici potiče oksidativan unutarstanični okoliš što je pokazatelj oksidacijskog stresa (Andringa i sur., 2006). Stanično redoks stanje je odlučujuće i posrednik u više procesa metabolizma, prijenosa signala (Holmgren i sur., 2005) i ekspresije gena preko redoks osjetljivih transkripcijskih faktora (Lu, 1999). Ravnoteža između GSH i GSSG koristi se kao pokazatelj redoks ravnoteže stanice (Pias i Aw, 2002).

GSH ima bitne uloge kao antioksidans, u metabolizmu i regulaciji staničnih zbivanja (Tablica 2.) uključujući 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 staničnih komponenta od oštećenja uzrokovanih hidroksiperoksidima tijekom normalnog metabolizma (Perricone i sur., 2009). Također služi kao supstrat i kofaktor u metabolizmu mnogih lijekova (Lash, 2005) uključujući i detoksikaciju ksenobiotika kataliziranu glutation S-transferazama (GST) (Meister, 1988). GSH je potreban u metabolizmu prostaglandina i leukotriena (Wu i sur., 2003). Određene koncentracije GSH potrebne su za proliferaciju nekih tipova stanica, uključujući i limfocite (Townsend i Tew, 2003). Nedavno su otkrivene nove uloge GSH u prijenosu signala, ekspresiji gena, apoptozi i metabolizmu dušikova oksida (NO) (Wu i sur., 2003).

U ovom radu obradit će 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 proupalnih posrednika (leukotriena i prostaglandina) i NO. Također će se opisati i međusobni odnosi ovih spojeva pod utjecajem GSH.

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

<b>ANTIOKSIDANS</b>
"Skupljanje" slobodnih radikala i ostalih reaktivnih oblika Uklanjanje vodika i lipidnih molekula Sprječavanje oksidacije biomolekula
<b>METABOLIZAM</b>
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
<b>REGULACIJA</b>
Unutarstanični redoks status Prijenos signala i ekspresija gena Sinteza DNA i proteina te proteoliza Stanična proliferacija i apoptoza Stvaranje citokina i imuni odgovor Glutacionilacija proteina

## 2. TRANSKRIPCijski FAKTORI I EKSPRESIJA GENA

Sposobnost stanice da odgovori na kemijski stres barem se djelomično događa preko aktivacije transkripcijskih faktora. Oni su konstitutivno prisutni u stanici ili se brzo sintetiziraju kada su potrebni i služe u regulaciji proteina uključujući one 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- $\kappa$ B i AP-1 (njihova aktivacija ovisna je o redoks ravnoteži glutaciona) (Rahman 2000; Rahman i MacNee, 2000; Grimble, 2006; Biswas i Rahman, 2009; Chia i sur., 2010), koji različito reguliraju gene za proupalne 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 proupalnih gena (Wu i sur., 2003).

Redoks status regulira aktivnost proteina, sposobnost određenog faktora da se veže na srodnu DNA, prijenos signala, staničnu nekrozu i apoptozu te staničnu proliferaciju (Wu i sur., 2003). Na mehanizam i mjesto na razini/ravnoteži kojom GSH redoks status oblikuje transkripciju gena nisu dobro proučeni (Rahman i MacNee, 2000; Rahman, 2000).

Oksidacijski stres nastao zbog upalnih posrednika može kratkoročno potrošiti GSH tijekom upale i u in vitro stanice osjetljivijima na pojačane upalne reakcije (Rahman, 2005; Grimble, 2006). Razumijevanje regulacijskih mehanizama za indukciju antioksidanata, kao što je GSH, nasuprot proupalnih posrednika na mjestima osjetljivima na oksidacijski stres, može doprinijeti razvitku 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 signala koje su pod utjecajem ROS-a dovelo je do hipoteze da ROS služe kao substancijski glasnik u putevima regulacije gena i prijenosa signala. Također, antioksidansi moduliraju aktivnost mnogih gena (Castro i sur., 2001).

Održavanje visokog omjera (iznad 90%) unutarstaničnog GSH/GSSG smanjuje nakupljanje disulfida i stvara reducirajuće 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- $\kappa$ B i AP-1 (Rahman, 2000).

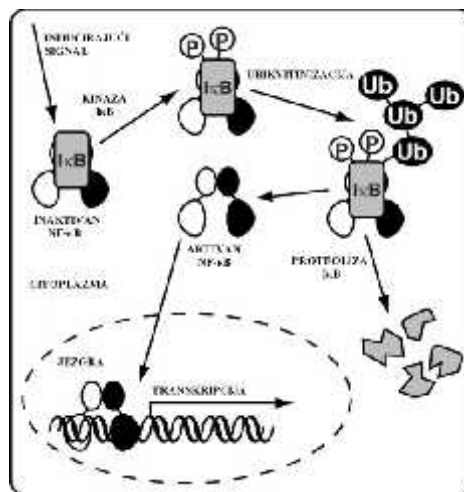
## 2.1. Nuklearni faktor B (NF- B)

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 reduciranog 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 mikroglia 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- B ubikvitinacijom i degradacijom podjedinice I B i prijenos signala. Preuzeto i prilagođeno na temelju <http://www.chemistry.sdsu.edu/faculty/Huxford/>.

## 2.2. Utjecaj glutationa na NF- B

Unutarstani tioli igraju ključnu ulogu u regulaciji aktivnosti NF- B, niske količine tiola potrebne su za aktivaciju, a visoke za inhibiciju (Staal i sur., 1990). S obzirom da je GSH najčešći unutarstani 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- B i ostalih mogućih transkripcijskih faktora (Staal i sur., 1990).

Unutarstani tioli mogu regulirati aktivnost NF- B na više mjesta prijenosa signala. Visoke razine tiola u stanici utječu na smanjenje proteina ili aktivnost i tako blokiraju aktivaciju kinaza koje fosforiliraju kompleks I B/NF- B i oslobađanje aktiviranog NF- B (Staal i sur., 1990). Također, visoke koncentracije tiola mogu direktno ometati fosforilaciju I B ili prijenos aktiviranog NF- 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 tiol oksidira, mogu direktno aktivirati bilo koji enzim uključen u aktivaciju NF- B, visoke koncentracije tiola mogu spriječiti aktivaciju NF- B jednostavno „skupljanjem“ radikala (Staal i sur., 1990). Dakle, razine GSH utječu na ovaj način: ako je prisutan u reduciranom, GSH obliku, tada inhibira aktivnost NF- B i prijenos u jezgru. No, ako je u GSSG obliku, može oblikovati NF- B vezanje na DNA (Perricone i sur., 2009). Određene količine GSSG mogu biti potrebne za aktivaciju NF- B i prijenos u jezgru, no, višak GSSG može inhibirati NF- B na razini vezanja na DNA (Galter i sur., 1994).



Aktivnost NF- B može se pojačati 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.).

Povećanje unutarstani nog GSH može smanjiti količinu otpuštanja citokina i kemokina iz pluća a smanjuju i razinu aktivacije NF- B (Biswas i Rahman, 2009) podupiru i nastanak kompleksa NF- B/disulfid čime se direktno sprječava vezanje na DNA (Haddad i sur., 2001). Ovo podupire teoriju da unutarstani no redoks stanje (omjer GSH/GSSG) ima ključnu ulogu u regulaciji upalnih reakcija u stanicama pluća (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 različitim ksenobiotičima ili faktorima (Watson i sur., 2004). AP-1 nije jedan protein nego dimer sastavljen od aktivatorne (c-Fos i c-Jun) i inhibitorne (Fos-srodan antigen (Fra)-1 i 2) podjedinice (Ji, 2008).

Transkripcijski kompleks AP-1 kao dimer veže se na konzervirane regije TRE (tetradekanoilforbol-13acetat (TPA)-odgovarajući element) i slične regije (Bossis i sur., 2005) prisutne u promotoru mnogih gena uključujući u stanićnu proliferaciju i nastanak tumora. Interakcije između Jun i Fos preko domene leucinskog „zatvarača“ 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, uključujući i faktore c-Fos i c-Jun, jedan je od prvih događaja u jezgri induciranih faktorima rasta koji stimuliraju izvanstanićni signal-regulirane kinaze (ERKs) (Monje i sur., 2005). Aktivnost transkripcije gena AP-1 jako se povećava fosforilacijom c-Jun (Luo i sur., 1999) uz kinaze iz obitelji MAPK (Monje i sur., 2005).

Premještanje AP-1 iz citosola u jezgru također se događa tijekom oksidacijskog stresa (Grimble, 2006). ROS su poznati po indukciji i aktivaciji i sintezi AP-1. AP-1 je regulator mnogih fizioloških procesa kao što su stanićni rast (Karihtala i Soini, 2007), stanićna proliferacija, diferencijacija, organogeneza, apoptoza (Bossis i sur., 2005; Karihtala i Soini, 2007) i odgovora na fizički i kemijski stres (Valko i sur., 2007). Također je i nužan imbenik u mnogim patološkim stanjima, uključujući 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- $\kappa$ B i AP-1 dovodi do koordinirane ekspresije gena za antioksidanse i proupalne gene. Novija istraživanja pokazuju da uloga AP-1 snažno ovisi o signalnim putevima MAPK i NF- $\kappa$ B (Rahman, 2005).

#### 2.4. Utjecaj glutaciona na AP-1

Nekoliko istraživanja pokazalo je da stanični redoks 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 omogućuje oksidaciju podjedinice c-Jun tiolima. Mehanizmi oksidacije uključuju i nastanak disulfida i mjesno-specifičnu S-glutatiolaciju (Rahman, 2000; Rahman i MacNee, 2000) ovisno o prisutnosti cisteinskog ostatka u domeni dimerizacije i domeni za vezanje na DNA koje omogućuje 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- $\kappa$ B *in vivo* (Klatt i Lamas, 2000).

U mnogim vrstama stanica vezanje AP-1 na DNA može biti pojačano uz protein tioredoksin ili uz jezgrični redoks protein (Ref-1), a inhibira ga GSSG jer nastanak disulfidne veze između dva cisteina inhibira vezanje AP-1 na DNA. Trošenje unutarstaničnog GSH koriste i BSO (butionin sulfoksiamin) ili povećanje omjera GSH/GSSG uz diamid može također stimulirati vezanje AP-1. To se može dogoditi ili zbog premještanja GSH u jezgru tijekom ovih procesa uz već 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  $\gamma$ -glutamilcistein sintetaze ( $\gamma$ -GCS), limitirajućeg enzima u *de novo* sintezi GSH. Moguće je da su različite razine GSH u upalnim bolestima pluća 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /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 u incima 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 sepse, što pokreće složeni sustav koagulacije, komplementa i kaskade citokina kao dio obrane protiv navale bakterija (Song i Humes, 2009). ROS signalizacija može biti posredovana citokinima, peptidnim hormonima i imunoregulatorima. Ima je prisutnost u staničnim putevima određena redoks statusom. Također, ROS regulira transkripciju IL-4, IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  preko mehanizma ovisnog o tiolima (Haddad i sur., 2001).

Glutation ima ključnu ulogu u zaštiti kao antioksidans, štiti i 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. Općenito, 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 imunosti; katkad se 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 pri djelovanju jedne stanice na drugu u međustaničnoj komunikaciji. Upalne stanice proizvode mnogo citokina i kemokina (Federico i sur., 2007). Citokini i slobodni radikali imaju mogućnost povećavanja 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). Proupalni citokini utječu na mnoge metaboličke i druge upale. Proupalni citokini su IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ , a njihovi učinci su upala, gubitak apetita, gubitak težine i letargija (Grimble, 2006). Istraživanja govore da proupalni citokini imaju važnu ulogu

u patofiziologiji sranih bolesti (Mariappan i sur., 2010). IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  i ostali citokini smatraju se potentnim posrednicima promjena u funkcijama štitnjače koje se događaju u bolesti (Stoytcheva i Berry, 2009).

### 3.1.1. Timbenik tumorske nekroze (TNF- $\alpha$ )

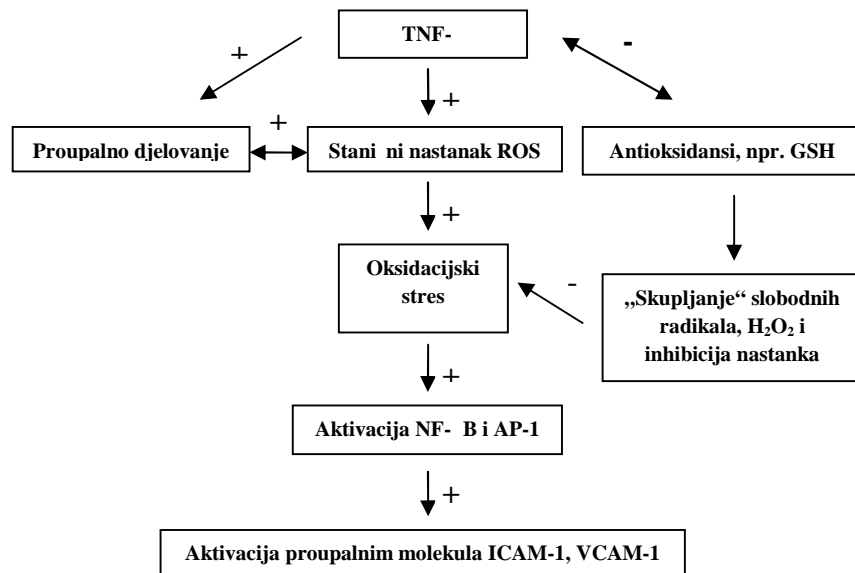
TNF- $\alpha$  je pleiotropni proupalni citokin koji ima ključnu ulogu u imunitetu i patologiji (Fernandez-Checa i Kaplowitz, 2005) preko mnogobrojnih puteva signala uključujući i mitogeni odgovor i apoptozu (Guicciardi i sur., 2006) kao važan posrednik upale u plućima. Inducira kronične upalne promjene povezane s porastom različitih obrambenih mehanizama, uključujući 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 mišića, eozinofili, hondrociti, osteoblasti, mastociti, glija stanice i keratinociti također stvaraju TNF- $\alpha$  nakon stimulacije (Mukhopadhyay i sur., 2006). TNF- $\alpha$  je transmembranski protein veličine 26 kDa koji se aktivira rezanjem na veličinu od 17 kDa (Avogaro i sur., 2005).

Citokini kao što je TNF- $\alpha$  posreduju u aktivaciji NF- $\kappa$ B (Avogaro i sur., 2005) mehanizmima koji uključuju ROS kao sekundarne glasnike, posebno vodikov peroksid (Moran i sur., 2001). Rezultat aktivacije NF- $\kappa$ B preko TNF- $\alpha$  je povećana ekspresija adhezijskih molekula na površini endotelne stanice i stanice glatkih mišića žila (Fernández-Sánchez i sur., 2011) (Slika 3.). Također inhibira prijenos elektrona u mitohondrijima povećavajući interakcije elektrona s O<sub>2</sub> pri čemu nastaje superoksidni anion (O<sub>2</sub><sup>-2</sup>) (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- $\alpha$  stimuliraju nastanak slobodnih radikala kisika, vodikovog peroksida i NO u raznim stanicama, od fagocita do stanica endotela. Također, oksidansi mogu pojačati stvaranje IL-1 i TNF- $\alpha$  preko aktivacije NF- $\kappa$ B (Hunter i Grimble, 1994). Odgovori stanice inducirani IL-1 događaju se preko oblikovanja redoks ravnoteže. (Haddad i sur., 2001).

### 3.1.2. Ostali citokini

Interleukin 6 (IL-6) je proupalni citokin s mnoštvom uloga, od zaštite do upale i oštećenja tkiva. Nastaje u makrofagima i adipocitima te stanicama imunološkog sustava kao i stanicama endotela i skeletnih mišića (Fernández-Sánchez i sur., 2011). Cirkulira u mnogim glikoziliranim formama veličine od 22 do 27 kDa (Avogaro i sur., 2005). Koncentracije IL-6

u vezi su s BMI, otpornosti na inzulin i intolerancijom na ugljikohidrate (Fernández-Sánchez i sur., 2011). IL-6 negativno utječe na funkciju endotela: on je važan medijator povećane propusnosti endotela preko promjena u ultrastrukturnom razmještanju „tjесnih 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 mehanizama djelovanja TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  aktivira nastanak ROS i povećava oksidacijski stres stanica i aktiviraju se proupalni i prooksidacijski transkripcijski faktori NF- $\kappa$ B i AP-1. GSH smanjuje oksidacijski stres i aktivnost NF- $\kappa$ B 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 urojenj i u stečenj imunosti kao proupalni i imunopoticajni citokin te je moguće da je uključen u aterosklerozu. Osim što kao proupalni citokin inducira ekspresiju adhezijskih molekula, također stimulira i stvaranje TNF- $\alpha$  i iNOS (Esposito i sur., 2002).

### 3.2. Utjecaj glutationa na proizvodnju citokina

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

koristiti za liječenje bolesti dišnog sustava, gdje su citokini prepoznati kao glavni imbenici u razvoju bolesti. Trošenje GSH i njegovo snabdijevanje različitno upravljaju proupalnim citokinima djeluju i antagonistički obnavljanjem redoks ravnoteže (Haddad i sur., 2001).

Trošenje krvožilnog i plazmatskog GSH može rezultirati povećanim oksidacijskim stresom što utječe 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 uključeni u puteve citokina povezani s redoks statusom predloženi su zbog nove uloge GSH kao imunofarmakološkog regulatornog faktora (Haddad i sur., 2001).

GSH ima bitnu ulogu u procesima oporavka kao antioksidans i detoksifikacijski agens. Koncentracije jetrenog GSH povećavaju se akcijama citokina u uvjetima fiziološkog stresa. Redukcija tkivnog GSH povezana je s problemima u održavanju imunološkog odgovora (Hunter i Grimble, 1994). Unutarstanični 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 sprječava porast citokina u plazmi induciranog u hiperglicemiji (Esposito i sur., 2002). U staničnoj kulturi pokazano je da porast razine GSH smanjuje stvaranje IL-4. Trošenje GSH sprječava nastanak IL-12. Mogući uzrok ovog obrnutog odnosa su ostali citokini, kao što je IL-18, koji mogu zamijeniti ulogu IL-12 uz dodatnu proizvodnju IFN- $\gamma$  (Peterson i sur., 1998).

### **3.3. Utjecaj glutationa na proliferaciju limfocita T**

Danas mnoga istraživanja naglašavaju važnost unutarstanične koncentracije GSH za održavanje imune funkcije (Wu i sur., 1994). Velike promjene koje trošenje GSH uzrokuje dosljedne su ključnim 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) uključujući 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. čak 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<sup>+</sup>, a limfociti CD4<sup>+</sup> su aktivni (Ashtiani i sur., 2011).

Porast stani nog GSH prati i porast stvaranja IL-2 i proliferacije limfocita kao i smanjenje stvaranja proupalnih posrednika PGE<sub>2</sub> i LTB<sub>4</sub> (Grimble, 2006). GSH može poja ati mitogeni odgovor smanjuju i nastanak suprimiraju ih medijatora (eikosanoidi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>...) 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 dostatnim 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 reduciranog GSH. Postoje i neke neprirodnosti u homeostazi glutaciona 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

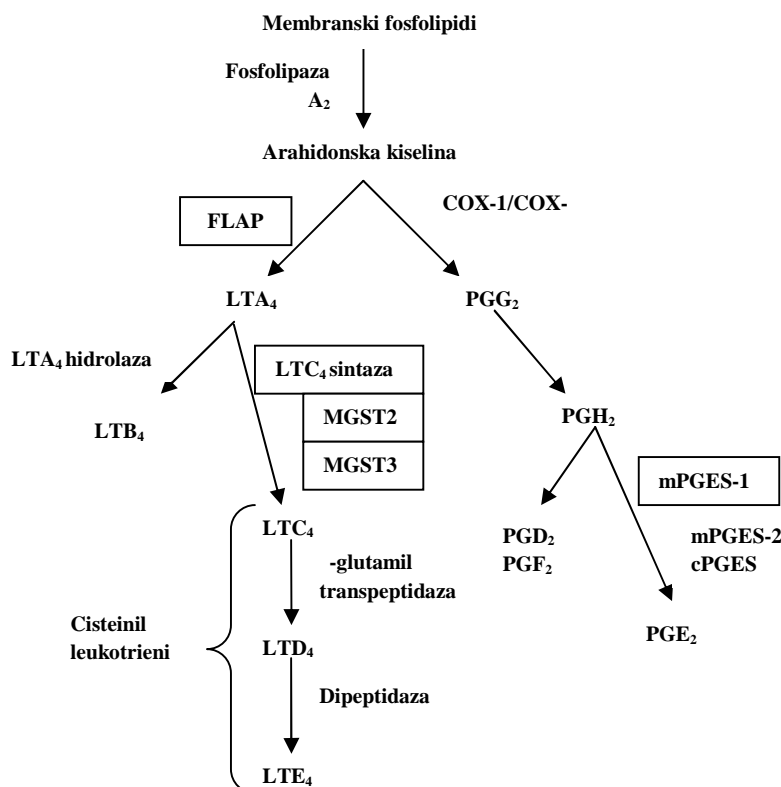
### 4.1. Leukotrieni

Leukotrieni su biološki posrednici koji se formiraju kao odgovor na različite imunološke i upalne stimulacije (Wang i Ballatori, 1998) i funkcioniraju vežući se na receptore posredovane proteinom G ciljnih stanica (Black i sur., 2011). Biosinteza leukotriena je ograničena samo na nekoliko tipova ljudskih stanica uključujući mastocite (Penrose, 1999), eozinofile, bazofile i makrofage (Finkensieper i sur., 2010), no, stvaranje cisteinil leukotriena dokazano je i u moždanom tkivu, posebno u dijelovima hipotalamusa (Mayapatek, 2000), kao i u stanicama pluća, slezene i srca (Wang i Ballatori, 1998). Uloge leukotriena su mnogobrojne, npr. i  $LTB_4$  i cisteinil leukotrieni stimuliraju proizvodnju kemokina i adheziju leukocita i endotelne stanice, a  $LTB_4$  je neutrofilni kemoatraktant (Black i sur., 2011). Leukotrieni su poznati kao potencijalni faktori upale koji uzrokuju edem u bolestima dišnih puteva, ali također imaju i bitnu ulogu u reprodukciji i mogu poticati djelovanje prostaglandina (Korzekwa i sur., 2011).

Biosinteza leukotriena počinje otpuštanjem arahidonske kiseline uz citosolnu fosforilazu  $A_2$  (Kanaoka i sur., 2001; Finkensieper i sur., 2010) i njenom pretvorbom u nestabilni intermedijer, leukotrien  $A_4$  ( $LTA_4$ ). Taj intermedijer može se pretvoriti u  $LTB_4$  hidrolizom ili u  $LTC_4$  konjugacijom s GSH (Samuelsson, 1991; Brock, 2005).

Tijekom konjugacije glutationa s  $LTA_4$  nastaju cisteinil leukotrieni (Rouzer i sur., 1981). Reakcija je katalizirana posebnim oblikom glutation S-transferaze, leukotrien  $C_4$  sintazom ( $LTC_4S$ ) pri čemu nastaje unutarstanični leukotrien  $C_4$  ( $LTC_4$ ) (Duroudier i sur., 2009, Jawien, 2002) dodavanjem GSH na C-6  $LTA_4$  (Rouzer i sur., 1981).  $LTC_4$  sintetiziraju neutrofilni, monociti, makrofagi i eozinofili, a degradiran je izvan stanice ili u jetri, gdje se izlučuje i metabolizira u žuč. Pretvorba  $LTC_4$  događa se uz enzim  $\gamma$ -glutamil transferazu pri čemu nastaje leukotrien  $D_4$  ( $LTD_4$ ), koji je cisteinilglicin konjugat  $LTA_4$ .  $LTD_4$  se može degradirati i do leukotriena  $E_4$  ( $LTE_4$ ) koji je cisteinil konjugat  $LTA_4$  (Lieberman i sur., 1995; Jawien, 2002) (Slika 4.).

Cisteinil leukotrieni ( $LTC_4$  i njegovi metaboliti- $LTD_4$  i  $LTE_4$ ) 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 također 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 doma ina kao i u upali (Sakamoto i sur. 2000). Biološke su uloge prostaglandina u upali, boli, tumorigenezi, krvožilnoj regulaciji, funkcijama neurona, ženskoj reprodukciji, zaštiti želu ane sluznice i radu bubrega (Samuelsson i sur., 2007). Prostaglandini mogu doprinijeti i ozljedama uzrokovanim UVB zra enjem jer štetne doze UVB zra enja poti u nastajanje prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandina F<sub>2</sub> (PGF<sub>2</sub>) i prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) (Black i sur., 2011). Njihovo stvaranje stimulirano je niskom razinom ROS preko aktivacije prostaglandin H sintaze (PGHS) i/ili fosfolipaze A<sub>2</sub> u stanicama (Sakamoto i sur., 2000).

Biosinteza PGD<sub>2</sub> zapo inje osloba anjem arahidonske kiseline iz membrane fosfolipida (Sakamoto i sur., 2000) i uklju uje oksigenaciju i ciklizaciju do nestabilnog endoperoksidnog intermedijera, prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) 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 H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) (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 PGD<sub>2</sub> sintazu (Hsieh i sur., 2001). U prisutnosti reduciranog glutationa (GSH), prostaglandin E sintaza (PGES) pretvara endoperoksidnu skupinu PGH<sub>2</sub> u 9-keto-11-hidroksi skupinu prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (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 strukturnu i evolucijsku vezu (Oakley, 2005). Ova proteinska obitelj uključuje 6 proteina: PGES, LTC<sub>4</sub>S, mikrosomalnu GST 1 (MGST1), 2 (MGST2) i 3 (MGST3), kao i aktiviraju i 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 op u detoksifikacijsku aktivnost (Tablica 4.). S obzirom da su to sve proteini integrirani u membranu, njihova strukturna karakterizacija je polagana i teška (Oakley i sur., 2005).

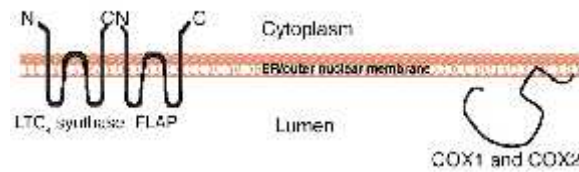
**Tablica 4.** Proteini obitelji MAPEG i njihove aktivnosti. Preuzeto iz Sampey i sur., 2005

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

#### 4.3.1. Leukotrien C<sub>4</sub> sintaza (LTC<sub>4</sub>S)

LTC<sub>4</sub> je integralni membranski enzim veličine 18 kDa, koji je aktivan kao homodimer i pokazuje aktivnost GST koja je izrazito specifična za LTA<sub>4</sub> kao supstrat (Penrose, 1999; Kanaoka i sur., 2001; Ago i sur., 2007). Možda su MGST i LTC<sub>4</sub> nastale konvergentnom evolucijom (Seidegård i Ekström, 1997). Protein FLAP i LTC<sub>4</sub> su strukturno

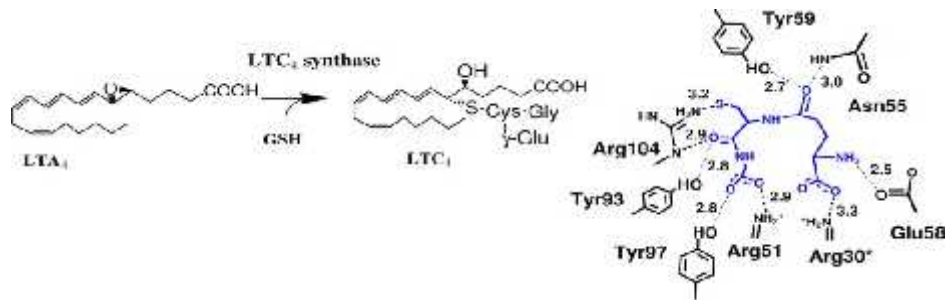
bliski membranski proteini koji mogu postojati kao monomeri ili formirati homodimere, heterodimere ili trimere (Brock, 2005) (Slika 5.).



**Slika 5.** Položaj enzima uključenih u sintezu leukotriena. Aktivna mjesta LTC<sub>4</sub> sintaze, COX-1 i COX-2 i lipidna vezna domena proteina FLAP orijentirane su prema lumenu ER-a i jezrinjoj ovojnici. Preuzeto iz Soberman i Christmas, 2003.

LTC<sub>4</sub> 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 LTA<sub>4</sub> i formirati LTC<sub>4</sub>. 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 LTA<sub>4</sub>, 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 LTC<sub>4</sub> kodira protein od 150 aminokiselina (Kanaoka i sur., 2001). Monomer sadržava 4 transmembranske  $\alpha$ -zavojnice i stvara simetrični dimer kao jedinicu s funkcionalnim domenama preko cijele površine. Struktura enzima je kompleksna, 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). LTA<sub>4</sub> savršeno pripada u to mjesto tako da Arg-104 monomera aktivira GSH (Slika 6.) kako bi omogućio „napad“ tiolnog aniona na C-4 LTA<sub>4</sub> 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 LTC<sub>4</sub> (Ago i sur., 2007). Ovakav mehanizam nastanka LTC<sub>4</sub>, uključujući i vezanje i aktivaciju GSH, mogao bi biti zajednički obiteljni homolognih proteina važnih u upalnim i detoksifikacijskim reakcijama (Martinez Molina i sur., 2007).



**Slika 6.** Lijevo, kataliti ka reakcija LTC<sub>4</sub> sintaze. Desno, aktivacija tiolne skupine GSH pomo u Arg-104. GSH je ozna en plavom bojom. Preuzeto iz Rinaldo-Matthis i sur., 2010.

Ekspresija LTC<sub>4</sub>S ograni ena je na stanice loze koštane srži. Suprotno od drugog enzima sposobnog sintetizirati LTC<sub>4</sub>-MGST2, LTC<sub>4</sub>S ne postoji u stanicama endotela ni u jetri (Sanak i Sampson, 1999). MGST2 i MGST3 konjugiraju GSH ne samo s ksenobioticima nego i s LTA<sub>4</sub> i oni su eksprimirani ak i u stanicama koje nemaju LTA<sub>4</sub>. LTC<sub>4</sub> se može formirati uz me ustani ni metabolizam LTA<sub>4</sub> u stanicama koje eksprimiraju LTC<sub>4</sub>S ili MGST2 (Kanaoka i sur., 2001).

Miševi s inaktiviranim genom za LTC<sub>4</sub>S rastu normalno, ali imaju umanjeni uro eni i ste eni imunološki upalni odgovor (Lam, 2003). Knockout životinje kojima nedostaje gen za LTC<sub>4</sub>S imaju drasti no smanjen vaskularni odgovor koji je ovisan o otpuštanju LTC<sub>4</sub> posredovanom IgE (Soberman i Christmas, 2003).

Nedavno je otkrivena esta genetska varijacija promotora gena za LTC<sub>4</sub> sintazu koja je nadeksprimirana kod populacije koja boluje od astme inducirane aspirinom (AIA). Polimorfizam utje e na transkripcijsku regulaciju ekspresije LTC<sub>4</sub>S zbog ega dolazi do nadekspresije LTC<sub>4</sub>S 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 omogu uje interakciju s mnogim transkripcijskim poja iva ima (Jawien, 2002). Inducibilnost enzima pokazuju razine mRNA koje se mijenjaju u eozinofilima nakon stimulacije pomo u interleukina 5 (IL-5). U bazofilima eksplozija sinteze LTC<sub>4</sub> zahtijeva predinkubaciju s interleukinima 3 (IL-3) i 5 (IL-5) (Sanak i Sampson, 1999).

#### 4.3.2. Mikrosomalna prostaglandin E<sub>2</sub> sintaza-1 (mPGES-1)

Mikrosomalna prostaglandin E<sub>2</sub> 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 PGE<sub>2</sub>, no pokazano je da je povezan

i s COX-1 u bazalnoj sintezi PGE<sub>2</sub> (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 sintezu 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).

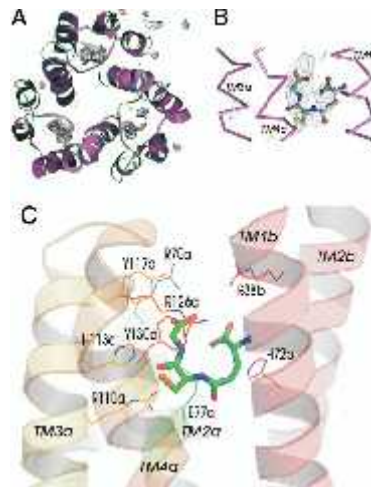
**Tablica 5.** Svojstva enzima PGES. Preuzeto iz Kudo i Murakami, 2005.

ENZIM	STRUKTURA	EKSPRESIJA	SMJEŠTAJ U STANICI	PREDNOST ENZIMA COX	POSEBNE 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 LTC<sub>4</sub>S 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 PGH<sub>2</sub> do PGE<sub>2</sub> 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 opskrbljen pomo u GSH (Samuelsson i sur., 2007) (Slika 7.). Mutacije u Arg-110, ali ne

u Tyr-117 rezultiraju nedostatkom katalitičke aktivnosti enzima mPGES-1. Ove dvije aminokiseline su visokoočuvane 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) Lanci uključeni u stvaranje veznog džepa za GSH. Preuzeto iz Jegershhöld i sur., 2008.

Ključna uloga mPGES-1 u raznim patofiziološkim događajima razriješen je korištenjem knockout miševa (Kudo i Murakami, 2005). Iako je dobro poznato da PGE<sub>2</sub> doprinosi upali, boli, vrućici i tumorigenezi, uloga mPGES-1 u nekim od procesa istraživani su preko knockout miševa. Pokazano je da je enzim mPGES-1 uključen u razvoj reumatoidnog artritisa, akutne boli, hipersenzitivnosti na bol i upali (Giannico i sur., 2004) te da jako doprinosi lokalnom povećanju PGE<sub>2</sub> 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- $\alpha$ , IL-12 i IL-6 (Samuelsson i sur., 2007).

## 5. DUŠIKOV (II) OKSID (NO·)

Dušikov (II) oksid (NO·) je slobodni radikal, što ga čini 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, astroglija 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: živčanom (nNOS), inducibilnom (iNOS) i endotelnom (eNOS) (Valko i sur., 2007), kodiranih trima visokokonzerviranim posebnim genima (Karihtala i Soini, 2007). Razina iNOS u SZS je općenito niska. Porast ekspresije iNOS u astrocitima (Calabrese i sur., 2004) i mikroglia te makrofagima, stanicama glatkih mišića (Mayer i Andrew, 1998) događaju se tijekom upale. Ekspresiju gena za iNOS induciraju endotoksini i citokini (Mayer i Andrew, 1998; Calabrese i sur., 2004) (IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ , lipopolisaharidi). Aktivaciju mogu blokirati protuupalni lijekovi (deksametazon), inhibitorni citokini (IL-1, IL-10), prostaglandin A<sub>2</sub> (PGA<sub>2</sub>), 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<sup>-</sup>). Peroksinitrit je visokoreaktivan spoj s vremenom poluraspada



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). Uključuje se 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 ogranke 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- $\kappa$ B koji pozitivno regulira ekspresiju upalnih posrednika kao što su citokini ili adhezijske molekule (Prasad i sur., 1999).

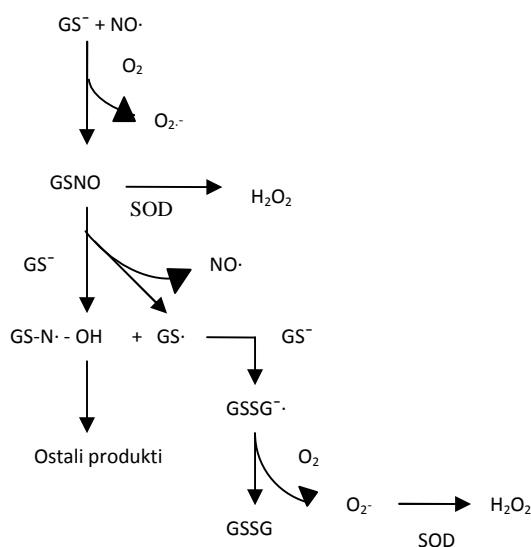
Iako je otkriveno da NO sudjeluje u mnogim fiziološkim ulogama, uočljivo je i dalje prekomjerno nastajanje NO, preko NOS, može biti štetno za osnovne funkcije stanica. Postoje različiti mehanizmi koji objašnjavaju toksičnost posredovanu NO. Unutarstanična koncentracija GSH je bitan faktor koji određuje osjetljivost stanice na NO i njegove derivate (Heales i Bolaños, 2002). GSH ima ključnu ulogu u staničnoj otpornosti na oksidativno i nitrozativno oštećenje „skupljanjem“ NO i oksidantata pružaju i reducirane ekvivalente enzimima uključujući u metabolizam ROS i RNS kao i eliminiraju i potencijalne toksične oksidativne produkte i reduciraju i oksidiranje ili nitroziliranje tiola proteina (Klatt i Lamas, 2000).

### **5.1. Nastanak S-nitrozoglutaciona (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 mišiće stanice krvnih žila i trombocita (Prasad i sur., 1999).

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

Peroksinitrit također može reagirati s GSH, kao i sa ostalim sulfhidrilnim spojevima ako je visoka koncentracija tiola u stanici. Nastali GSNO može zatim glutinolirati proteine (Heales i Bolaños; Hill i Bhatnagar, 2007). No, ova reakcija ovisi o koncentraciji GSH i pH. U toj reakciji se izmijeniti dva elektrona zbog čega 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 obuhvaćati i samo jedan elektron. U tom slučaju stvara se tiolni radikal (GS<sup>•</sup>) koji pokreću lanac reakcija koja ovisi o kisiku, a uključuje stvaranje peroksidnog radikala nakon čega slijedi daljnja potrošnja staninog GSH. (Slika 8.).



**Slika 8.** Reakcije u kojima GSH reagira s NO i nastaje GSNO. GSH, kao tiolat, reagira s NO u prisutnosti O<sub>2</sub> i nastaje GSNO ili može u prisutnosti tiolata stvarati spojeve koji mogu glutationilirati sulfhidrilne skupine proteina. SOD, znak za superoksid dismutazu. Preuzeto i prilagođeno na temelju Lash, 2006.

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

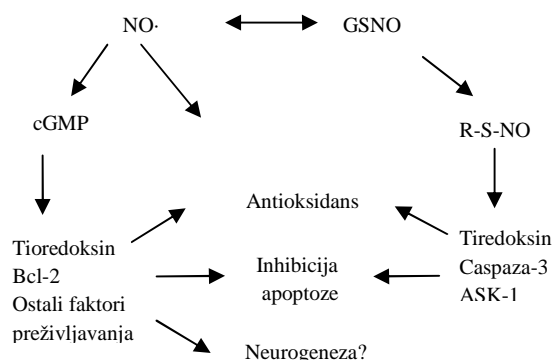
## 5.2. Uloge S-nitrozoglutationa (GSNO)

GSNO, koji nastaje reakcijom NO s GSH, modulator je staninog 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, uključujući i oslobađanje NO, transnitrozilaciju, S-tiolaciju, kao i izravno djelovanje (del Río, 2011). GSNO, kao endogeni S-nitrozilirani reducirani glutation, 100 puta je moćniji od klasičnog 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 nitrozilirajući 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 posttranslacijska modifikacija u animalnim stanicama (del Río, 2011). Nitrozotiol služi za prijenos NO u plazmu povećavajući 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 utječe na smanjenje ekspresije transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B, adhezijskih molekula, citokina i iNOS (Khan i sur., 2011). Nadalje, GSNO inhibira aktivaciju trombocita, smanjuje embolizaciju kod ljudi, inhibira upalne događaje u endotelnim stanicama i limfocitima T. Učeno je i zaštitno djelovanje nitrozilacije u srčanim bolestima. Nedostatak nitrozilacije otkriva 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 živčanog 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. Također, 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 prilagođeno 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 utječe na stanične funkcije stanica krvnih žila (Wassman i sur., 2004). GSNO i NO mogu inducirati apoptozu kod makrofaga, timocita, limfocita i endotelnih stanica preko različitih 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 mišića, jako utječe GSH. Nedostatak GSH u izvanstaničnom 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 povećanu ekspresiju eNOS, limitiraju aktivnost enzima u sintezi GSH, što je u suprotnosti s citotoksičnošću NO. GSNO nije samo skladište lako dostupnog NO, nego i lako dostupnog GSH što postaje ključno u uvjetima kada se GSH potroši tijekom zaštitnih uloga. Naime, postoji ravnoteža između GSH i GSNO te u uvjetima trošenja GSH dolazi do razlaganja GSNO. Ravnotežu određuje NO i to prema citotoksičnosti ili zaštitnoj ulozi od citotoksičnosti. Trošenje GSH pojačava osjetljivost stanice na štetne efekte peroksinitrita što dovodi do apoptoze te se smanjuje opuštenost glatkih mišića kao odgovor na NO dovodeći 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 povećanim oksidacijskim stresom i doprinijeti razvoju ateroskleroze. Reducirani tioli pojačavaju vazodilacijsko 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 stanih procesa te pomaže održavanju homeostaze. Smanjenje omjera GSH/GSSG dovodi do bitnih promjena u stanici pogotovo u uvjetima oksidacijskog stresa. Tako se na više načina postiže proupalno stanje. Aktivacija transkripcijskih faktora NF- $\kappa$ B i AP-1 dovodi do ekspresije gena za proupalne citokine. Zbog utroška GSH na „skupljanje“ ROS, dolazi do povećanog nastanka proupalnih citokina, pogotovo TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1. Uz ovu proupalnu ulogu, određena količina GSH dokazano je potrebna za proliferaciju limfocita T bez kojih ne bi bilo pravog imunološkog odgovora. GSH sudjeluje u sintezi proupalnih medijatora, leukotriena i prostaglandina, kao kofaktor enzima LTC<sub>4</sub>S i mPGES-1, članova 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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 activity sensitizes human breast cancer cells to the toxicity of  $\alpha$ -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<sup>+</sup> 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 inflammation: 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 PGE<sub>2</sub> production is not sufficient for lung tumorigenesis in mice. *Carcinogenesis* **26**, 209-217.

- Bossis G, Malnou CE, Farras 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- $\kappa$ 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. Cysteinyll 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 E<sub>2</sub> 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 C<sub>4</sub> 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 E<sub>2</sub> biosynthesis. *J Biochem Mol Biol* **38**, 633-638.
- Lam BK, 2003. Leukotriene C<sub>4</sub> synthase. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **69**, 111-116.
- Lam BK, Austen KF, 2000. Leukotriene C<sub>4</sub> 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 transport: 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. Intraatrial dopamine injection induced apoptosis through oxidation-involved activation of transcriptional factors AP-1 and NF- $\kappa$ B in rats. *Mol Pharmacol* **56**, 254-264.
- Mariappan N, Elks CM, Sriramula S, Guggilam A, Liu Z, Borkhsenius O, Francis J, 2009. NF- $\kappa$ 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 C<sub>4</sub> 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 C<sub>4</sub> 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 c<sub>4</sub> 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. LTC<sub>4</sub> 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 is 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- $\kappa$ B, aktivator protein-1, and glutathione levels by tumor necrosis factor- $\alpha$  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 C<sub>4</sub> 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 D<sub>2</sub> synthesis. *J Biol Chem* **275**, 40028-40035.
- Sampey AV, Monrad S, Crofford LJ, 2005. Microsomal prostaglandin E synthase-1: the inducible synthase for prostaglandin E<sub>2</sub>. *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 C<sub>4</sub> 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  $\kappa$ 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, Sacconi 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 količinama u svim stanicama sisavaca. Sintetizira se u stanicama svih organa, posebno u jetri. Najveće količine nalaze se u citosolu, mitohondriju i ER. Služi kao antioksidans i detoksifikator u mnogim procesima metabolizma i regulira stanje na zbijanja. Postoji u dva oblika-reduciranom (GSH) koji može oksidirati do disulfida (GSSG), a njihov omjer određuje redoks stanje stanice koje je bitan posrednik u više procesa. U ovom radu obrađuju se uloge GSH kao regulatora stanje 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- $\kappa$ B i AP-1 koji potiču u ekspresiju mnogih proupalnih gena i gena za citokine. U imunološkom sustavu GSH ima dvojaku ulogu: utječe na smanjenje sinteze citokina koji mogu dodatno pojačati oksidacijski stres, a dovoljna količina GSH potrebna je za proliferaciju limfocita T i odgovarajućim imunološkim odgovorom. 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 čemu 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 synthesized 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 explains 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-glutathionylation can modify protein activity and additionally apoptosis inhibition or cell redox state.