

APAP - paracetamol  
APS - kwas adenylosiarkowy  
CSN - centralny system nerwowy  
CST -  $\gamma$ -cystationaza  
CySNO - S-nitrozocysteina  
CysSO<sub>3</sub>H - kwas cysteinosulfonowy  
Cy-S-X - S-koniugaty cysteiny  
GSH - zredukowany glutation  
GSX - S-koniugaty glutationu  
 $\gamma$ -GT -  $\gamma$ -glutamylotranspeptydaza  
MPST - siarkotransferaza-3-merkaptopirogronianowa  
NMDA - receptory N-metylo-D-asparaginianowe  
NAC - N-acetylocysteina  
NAPQI - para-benzochinono-imina  
OTC - kwas 2-okso-tiazolidyno-4-karboksylowy  
PAPS - kwas 3'-fosfoadenylosiarkowy  
RFT - reaktywne formy tlenu  
RSSH - wodoronadsiarczki  
RS' - rodnik tiylowy  
RSS' - rodnik nadtylowy  
5-S-Cys-DA - 5-S-cysteinyldopamina



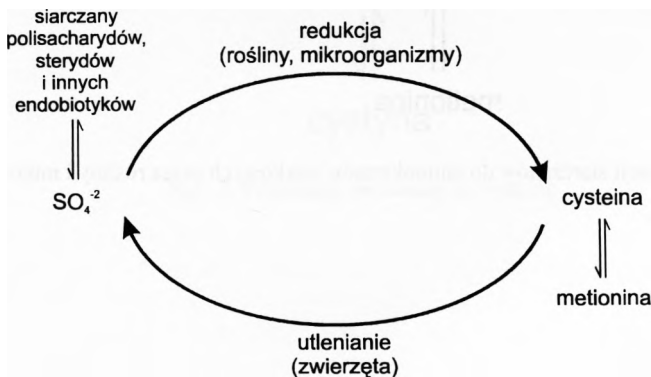
## 2. CYSTEINA

### Metabolizm, biologiczna rola i przyczyny toksyczności

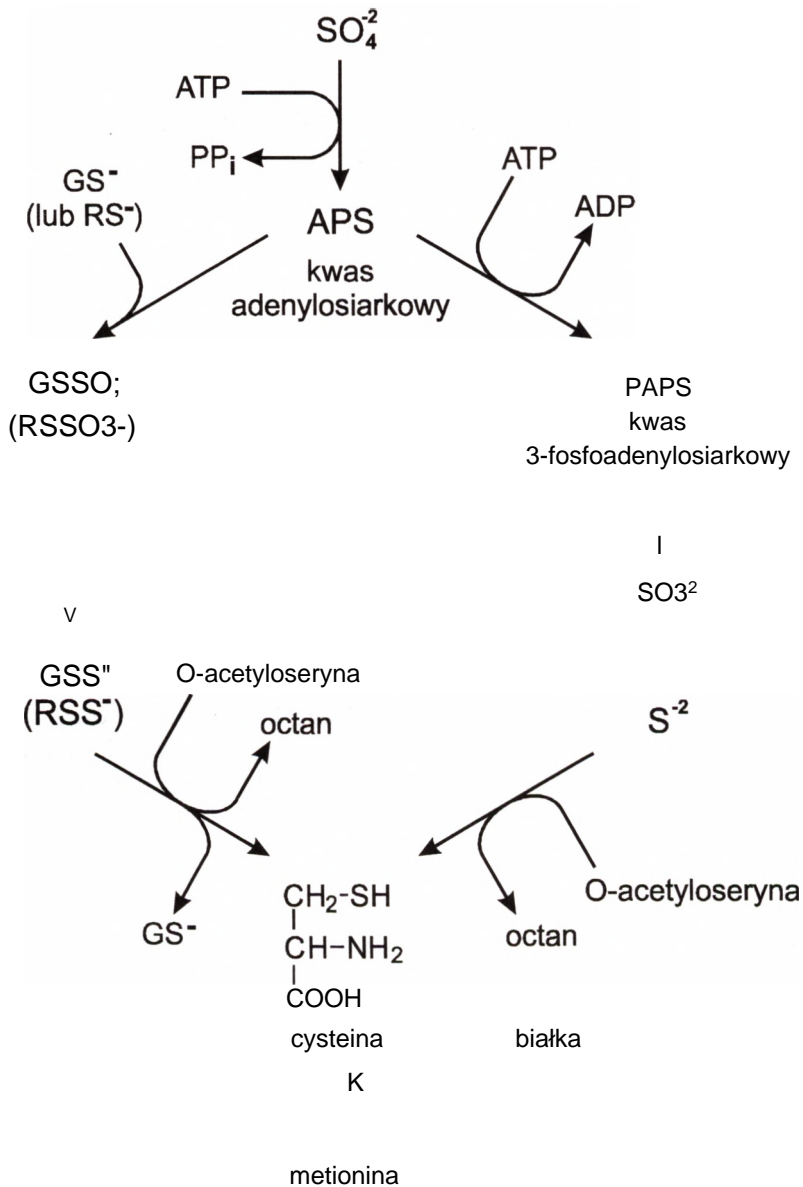
Lidia Włodek, Małgorzata Iciek

#### 2.1. Wprowadzenie

W przyrodzie spotykamy się, podobnie jak z obiegiem azotu i węgla, również z obiegiem siarki. Rośliny i liczne mikroorganizmy wykazują zdolność redukccyjnej asymilacji siarczanów z powstawaniem aminokwasów siarkowych - metioniny i cysteiny, które następnie w organizmach zwierząt ulegają tlenowej biodegradacji ponownie do siarczanów (ryc. 1) [prace przeglądowe: 1, 2], Biosynteza cysteiny z siarczanów może przebiegać dwoma szlakami enzymatycznymi, tj. poprzez kwas adenylosiarkowy (APS) oraz poprzez kwas 3-fosfoadenylosiarkowy (PAPS) (ryc. 2) [2], Na drodze pierwszej powstaje APS reaguje z tiolami (RSH) do tiosulfonianów ( $\text{RSSO}_3^-$ ) redukowanych następnie do nadsiarczków  $\text{RSS}^-$ , których reakcja z O-acetyloseryną prowadzi do cysteiny [3]. Droga druga, przebiegająca poprzez PAPS, obejmuje kolejne reakcje redukcji siarczanów do siarczynów, redukowanych następnie do siarczków, których reakcja z O-acetyloseryną prowadzi do powstania cysteiny [1, 2], Istnieją mikroorganizmy wykazujące możliwość redukcji siarczanów jedynie do siarczków ( $-\text{S}^-$ ) [2], W przewodzie pokarmowym ssaków zwierząt siarki ulegają absorpcji wyłącznie w postaci aminokwasów, takich jak metionina, cysteina i odpowiadający jej disiarczek cystyna, oraz pod postacią różnych tioeterów, najczęściej pochodzenia roślinnego. Metionina w komórkach ssaków może być źródłem cysteiny, dlatego przy jej dostatecznej ilości w diecie cysteina przestaje być aminokwasem niezbędnym (ryc. 3).



Ryc. 1. Obieg siarki w przyrodzie



Ryc. 2. Drogi asymilacji siarczanów do aminokwasów siarkowych przez rośliny i mikroorganizmy

## białka

## metionina

&lt;-----ATP

-----&gt;PP + P,

## S-adenozylometionina

&lt;----- X-H

-----&gt;X-CH,

## S-adenozylhomocysteina

----- adozyna

v

## homocysteina

-----seryna

## cystationina

----- a-ketoma lan

## cysteina

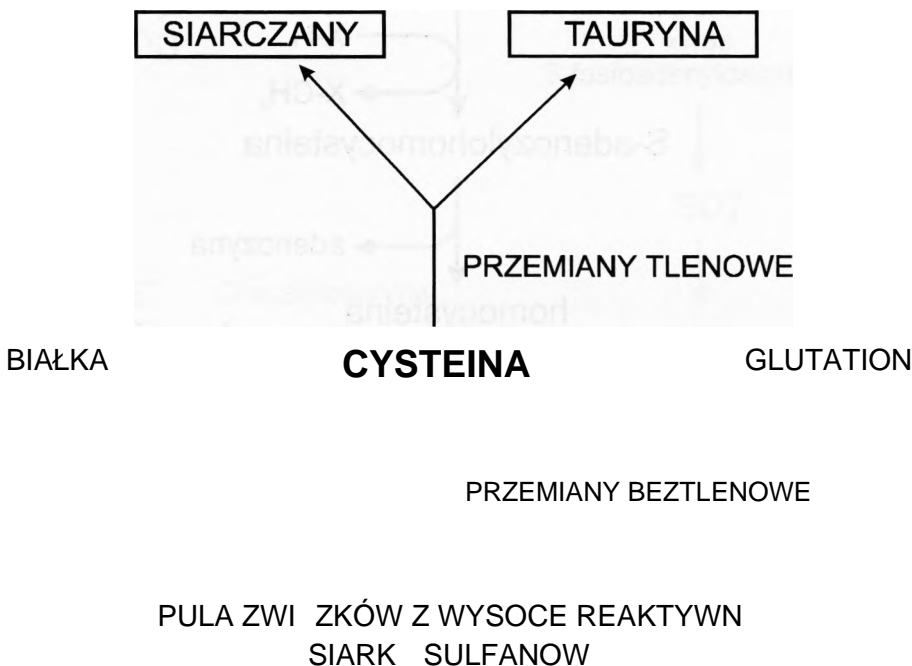
k

N

## cystyna

Ryc. 3. Przemiany metioniny w cystein

Cysteina pełni bardzo ważną rolę w organizmach zwierzęcych, ulega wbudowywaniu w białka, w tripeptyd glutation, jest także prekursorem koenzymu A. Tlenowa biodegradacja cysteiny prowadzi do siarczanów i tauryny, natomiast w beztlenowych przemianach jest przekształcana do puli związków z siarką siarczanów [1] (ryc. 4). Cysteina w komórkach występuje na bardzo niskim poziomie [4], co jest mechanizmem obronnym przed jej toksycznością, szczególnie niebezpieczną w stosunku do centralnego systemu nerwowego (CSN). Utrzymanie fizjologicznie niskiego stężenia cysteiny w komórkach jest regulowane reakcjami wbudowywania w białka i w peptydy, a także poprzez tlenowe i beztlenowe przemiany.



Ryc. 4. Drogi przemian cysteiny w komórkach ssaków

## 2.2. Dlaczego cysteina jest aminokwasem neurotoksycznym?

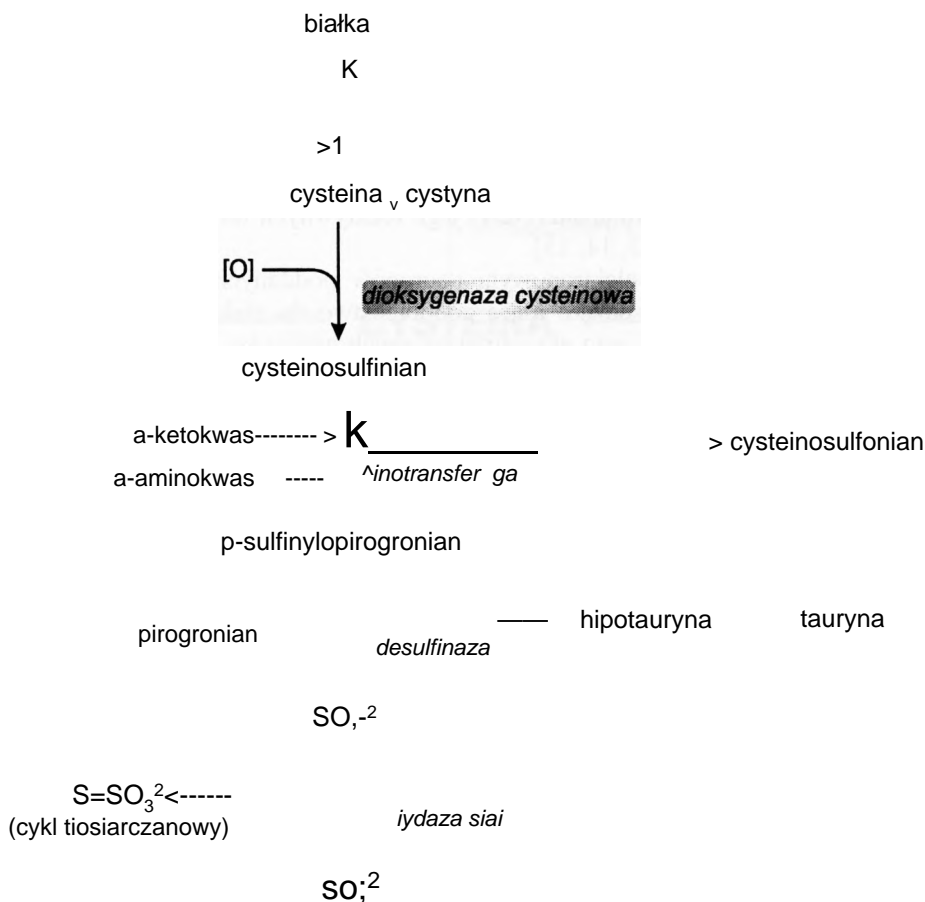
Cysteina w swej zredukowanej postaci jest tiolem wysoce toksycznym w stosunku do CSN, wywołuje spadek poziomu GSH i ATP w komórkach i prowadzi do zmian neurodegeneracyjnych [5], Cysteina powoduje uszkodzenia neuronalne poprzez różnego typu mechanizmy wywołujące neurotoksycznie [6], Aminokwas ten jest wyjątkowo neurotoksyczny, ponieważ nie posiada charakterystycznej dla wszystkich ekscytotoksycznych aminokwasów drugiej grupy karboksylowej.

Aktywacja receptorów N-metylo-D-asparaginianowych (NMDA) jest związana z procesami uczenia się i pamięci i powoduje napływ jonów  $Ca^{+2}$  przez związane z nimi jonofory [7] (p. rozdział 5). Natomiast nadmierna ekscytacja receptorów NMDA i związane z tym nadmierne napływy i akumulacja jonów  $Ca^{+2}$  jest główną przyczyną toksycznego cię glutamianu i śmierci neuronalnej [8], Gwałtowny napływ  $Ca^{+2}$  przez otwarte kanały prowadzi do zgonu dla komórek metabolicznej kaskady, w której następuje aktywacja lipaz i proteaz oraz nadmierne generowanie reaktywnych form tlenu (RFT) prowadzi do uszkodzenia błon komórkowych [8, 9, 10], Towarzyszy temu depolaryzacja błony plazmatycznej oraz pasywny napływ kationów  $Na^{+}$  i wody, co ostatecznie prowadzi do lizy osmotycznej [11, 12], Na skutek aktywacji receptorów NMDA napływające kationy  $Ca^{+2}$  aktywują również syntazę NO (NOS), co wywołuje nadmierne generowanie tlenku azotu (NO) i jego reaktywnych form, a to prowadzi do degeneracyjnego działania [13, 14, 15],

Badania w mikroskopie elektronowym neuronów poddanych neurotoksycznemu działaniu cysteiny wykazują daleko idące podobieństwo do efektów wywołanych nadmiarem glutamianu lub jego ekscytotoksycznych analogów [16], Kompetycyjny antagonistą receptorów NMDA - kwas D-2-amino-5-fosfonowalerianowy (AP5) - zapobiega zarówno neurotoksycznemu działaniu cysteiny, jak i związanemu napływowi  $Ca^{+2}$  do komórek [16], Dlatego uważa się, że receptory NMDA są miejscem działania cysteiny zarówno jako neuromodulatora, jak i neurotoksyny. Co ciekawe, wysokie, doustne dawki cysteiny powodują uszkodzenia neuronalne pojawiające się już po 2-3 godz., natomiast niskie dawki cysteiny wywołują toksyczne podobieństwo w czasie (po 4-6 godz.), a obserwowane uszkodzenia są bardziej rozległe i następują w licznych regionach mózgu [16]. Oznacza to, że w obu tych przypadkach toksyczne działanie cysteiny jest związane z różnymi mechanizmami. Potwierdza to fakt, że AP5 (antagonista NMDA) blokuje neurotoksyczne działanie niskich dawek, podczas gdy antagonistą receptorów nie-NMDA-6-ciano-7-nitrochinaksoolino-2,3-dion (CNQX) zapobiega toksycznemu działaniu wysokich dawek.

Toksyczne działanie cysteiny może być również związane ze wzrostem poziomu glutamianu, co może być następstwem zarówno nasilonego uwalniania, jak i zahamowania metabolizmu tego aminokwasu [17, 18, 19], Za przyczynę toksycznego działania cysteiny uważa się również produkty jej tlenowego katabolizmu, tj. kwas cysteinosulfonowy (CysSCoH) i kwas cysteinosulfonowy (CysSO<sub>3</sub>H) [16, 20, 21] (ryc. 5). Związki te są zaliczane do ekscytotoksyn działających synergistycznie do asparagianu i glutamianu. W tym jednak przypadku obserwuje się podobieństwo w strukturze pomiędzy CysSO<sub>2</sub>H a CysSO<sub>3</sub>H a asparagianem i glutamianem, ponieważ wszystkie te połączenia charakteryzuje obecność 2 grup o charakterze kwasylnym. W warunkach niedokrwienia mózgu następuje gwałtowny wzrost poziomu wolnej, zredukowanej

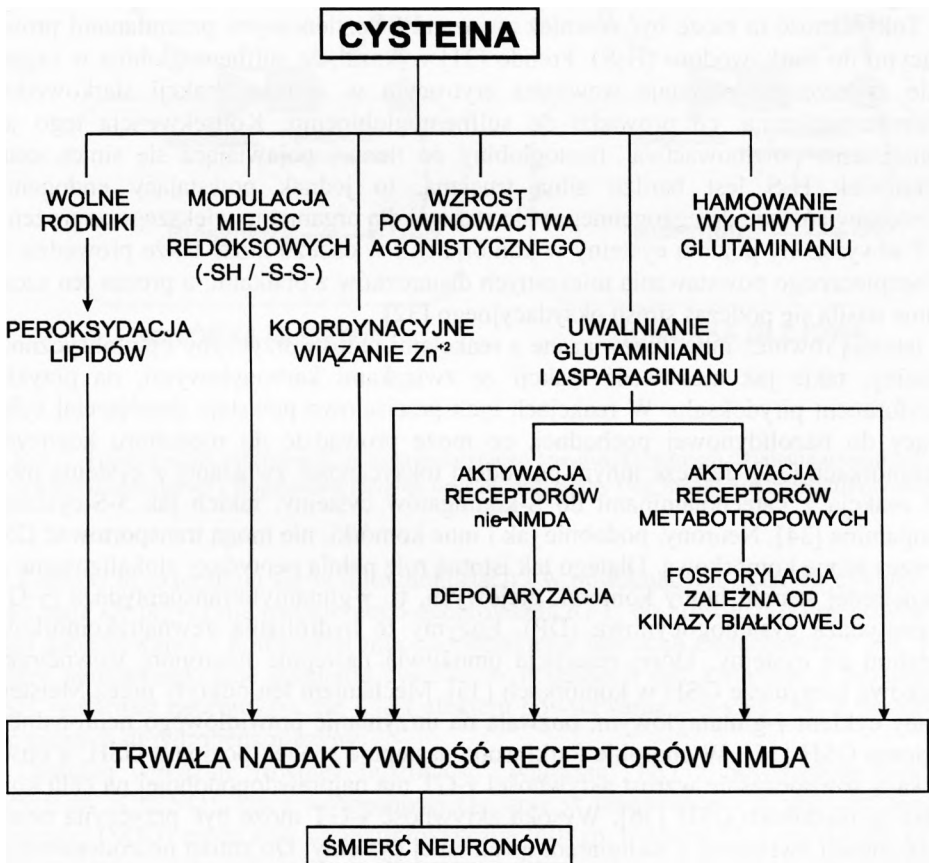
cysteiny [22]. Dlatego podczas reperfuzji może dochodzić do nasilonego utleniania się cysteiny do  $\text{CysSO}_2\text{H}$  oraz  $\text{CysSO}^-\text{H}$  i związanych z tym neuronalnych uszkodzeń [23]. Co jednak ciekawe, sama cysteina jest dwukrotnie bardziej toksyczna od  $\text{CysSO}_3\text{H}$ , co potwierdza, że jako aminokwas dysponuje w większym spektrum możliwości toksycznego działania [16]. Toksyczność cysteiny wzrasta w obecności wodorowglianu i jest związana z powstawaniem karbaminianu cysteiny - ekscytotoksycznego analogu NMDA [16, 24]. Mechanizmy toksyczności  $\text{CysSO}_3\text{H}$  i karbaminianu cysteiny nie wykluczają się wzajemnie i mogą działać niezależnie. Przy niedoborze aktywności oksydazy siarczynowej (ryc. 5) dochodzi do pojawiania się S-sulfocysteiny, pochodnej również wykazującej ekscytotoksyczne właściwości [16].



Ryc. 5. Tlenowy metabolizm cysteiny, prowadzący poprzez cysteiniosulfinian i cysteiniosulfonian do siarczanów ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) i tauryny

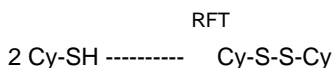


Swoje neurotoksyczne działanie cysteina może również wywierać poprzez mo liwo kompleksowego wiązania kationu  $Zn^{2+}$ . Prowadzi to do odblokowania kanału kationowego receptora NMDA [16, 23], wzrostu poziomu glutaminianu, napływu kationów  $Ca^{+2}$  i związanej z tym neurotoksyczności. Za prawdopodobny przyczyn neurotoksycznego działania niskich dawek cysteiny przyjmuje się raczej jej mo liwo kompleksowego wiązania  $Zn^{+2}$ , niż jej redukcję w celu wiązania czy też mo liwo utleniania się do  $CysSO_3H$  [23, 25]. Toksyczność cysteiny jest również związana z mo liwo ci bezpo redniej interakcji z grupami SH/-S-S- miejsc redokso wych receptorów NMDA [14, 25, 26]. Prowadzi to do nasilenia działania ekscytotoksycznych aminokwasów na receptory NMDA. Zatem ekscytotoksyczne uszkodzenia i śmierć neuronalna mogą być wynikiem różnego typu interakcji pomiędzy cysteiną a receptorami NMDA, co przedstawia ryc. 6.

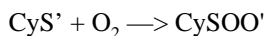


Ryc. 6. Prawdopodobne mechanizmy neurotoksyczności cysteiny związane z nadmierną aktywacją receptorów NMDA (wg Janaky [6] zmodyfikowana)

Przyczyny toksyczności cysteiny w komórkach są również związane z grupami hydro-sulfidowymi (-SH) i możliwością spontanicznego utleniania się do disiarczku - cystyny [27].



Z reakcjami utleniania tioli do disiarczków jest zawsze związane powstawanie rodników tylowych i reaktywnych form tlenu (RFT) ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [27, 28]. Rodnik tyłowy cysteiny może również w reakcji z tlenem prowadzić do powstawania niebezpiecznego rodnika nadtlenkowego cysteiny [29, 30].

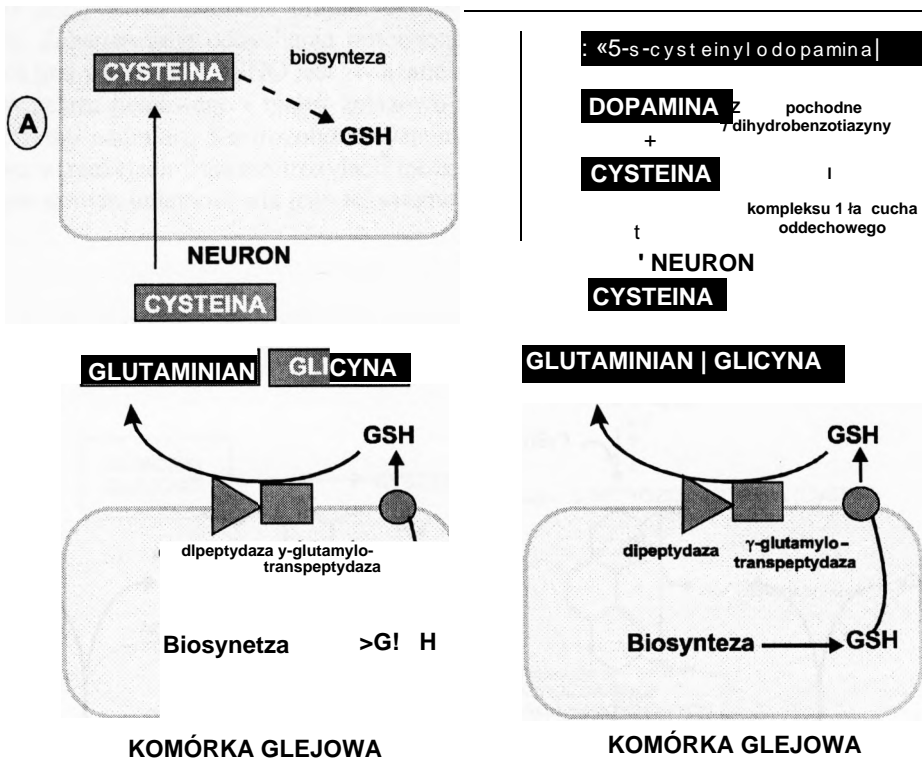


Toksyczność cysteiny, podobnie jak innych tioli, związana z grupami -SH staje się szczególnie niebezpieczna w obecności ładów jonów metali [30] (p. rozdział 1).

Toksyczność ta może być również związana z beztlenowymi przemianami prowadzonymi do siarkowodoru ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Frenko [31] wykazał, że sulfhemoglobina w organizmie zwierzęcym powstaje wewnątrz erythrocytu w wyniku reakcji siarkowodoru z oksyhemoglobinem, co prowadzi do sulfhemoglobinemii. Konsekwencją tego jest zmniejszenie powinowactwa hemoglobiny do tlenu i pojawiająca się sinica szara. Jakkolwiek  $\text{H}_2\text{S}$  jest bardzo silnym trucizną, to jednak powstaje endogennie (w przeciwieństwie do egzogennej) nie stanowi dla organizmu większego zagrożenia.

Podwyższony poziom cysteiny w komórkach i w osoczu może tak samo prowadzić do niebezpiecznego powstawania mieszanych disiarczków z białkami, a proces ten szczególnie nasila się podczas stresu oksydacyjnego [32].

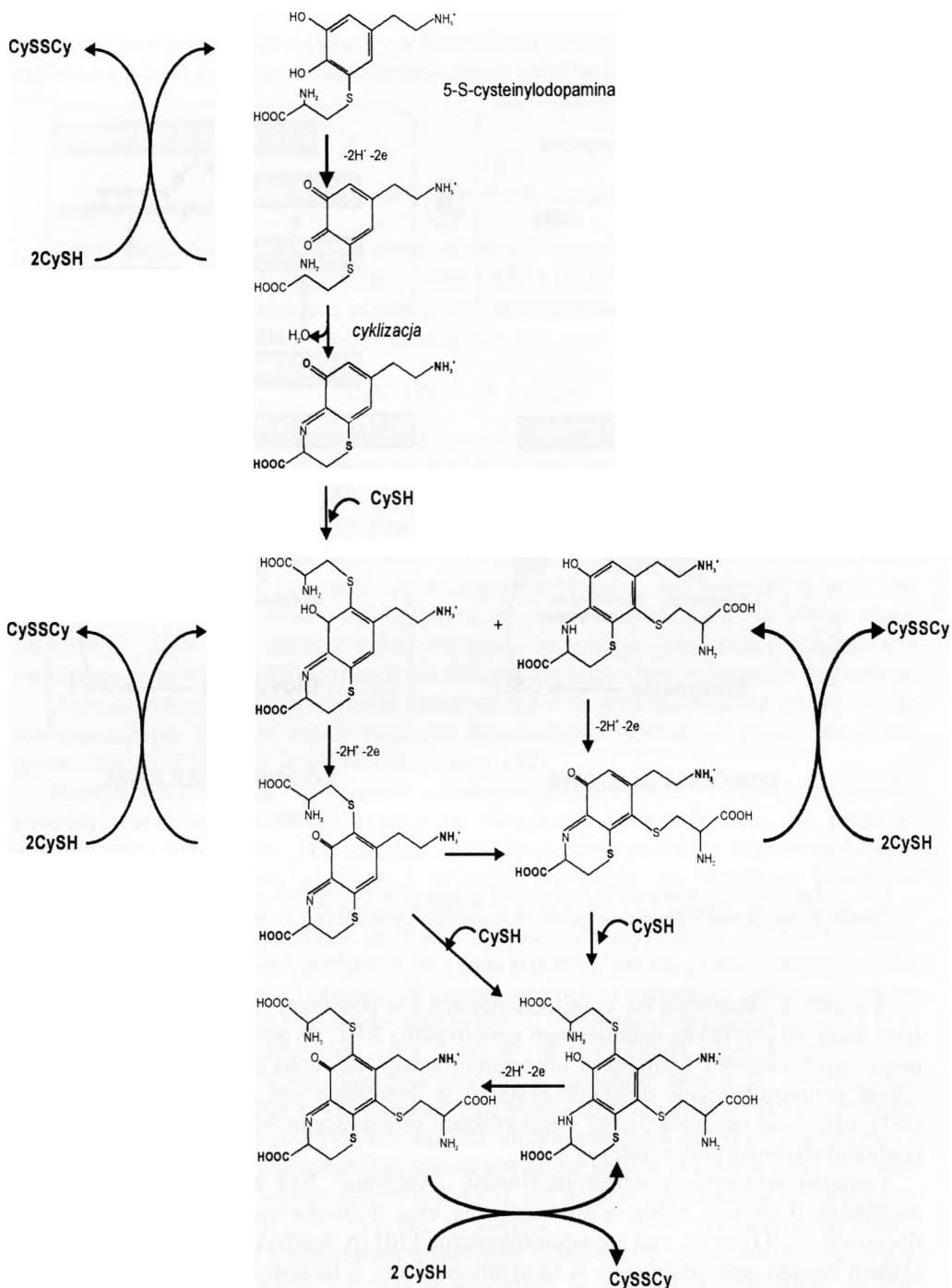
Istnieją również inne, niezwiązane z reakcjami redoks przyczyny cytotoksyczności cysteiny, takie jak możliwość reakcji ze związkami karbonyłowymi, na przykład z fosforanem pirydoksalu. W reakcjach tych przejściowo powstaje tiopółoacetal cykliczujący do tiazolidynowej pochodnej, co może prowadzić do niedoboru koenzymu w komórkach [33]. Jeszcze innym powodem toksyczności związanej z cysteiną może być reakcja z katecholaminami do S-koniugatów cysteiny, takich jak 5-S-cysteinylo-dopamina [34]. Neurony, podobnie jak i inne komórki, nie mogą transportować GSH poprzez błony komórkowe. Dlatego tak istotną rolę pełni peptydazy zlokalizowane po zewnętrznej stronie błony komórek glejowych, tj.  $\gamma$ -glutamylotranspeptydaza ( $\gamma$ -GT) i dipeptydaza cysteiloglicynowa (DP). Enzymy te hydrolizują zewnątrzkomórkowy glutation do cysteiny, której resorpcja umożliwia następnie neuronom wewnątrzkomórkową biosyntezę GSH w komórkach [35]. Mechanizm ten odkryty przez Meistera, zwany cyklem  $\gamma$ -glutamylowym, pozwala na utrzymanie prawidłowego neuronalnego poziomu GSH [35]. W chorobie Parkinsona następuje spadek poziomu GSH, a obserwowany równocześnie wzrost aktywności  $\gamma$ -GT ma najprawdopodobniej na celu kompensację niedoboru GSH [36]. Wysoka aktywność  $\gamma$ -GT może być przyczyną neurotoksyczności związanej z nadmiarem uwalnianej cysteiny. Do zmian neurodegeneracyjnych dochodzi wtedy, kiedy cysteina w neuronach przestaje być substratem do biosyntezy GSH, lecz w reakcji z orto-chinonem dopaminy bierze udział w przekształceniu do 5-S-cysteinylo-dopaminy (5-S-Cys-DA) [34] (ryc. 7). Powstaje 5-S-Cys-DA może w obecności cysteiny ulegać przekształceniu do niebezpiecznych S-koniugatów dihydrobenzotiazyny (ryc. 8) [37],



Ryc. 7. Hipotetyczny mechanizm neuroprotekcynowego i neurotoksycznego działania uwalnianej zewn trzkomórkowo z dopaminergicznych neuronów cysteiny (wg Janaky [6] zmodyfikowana)

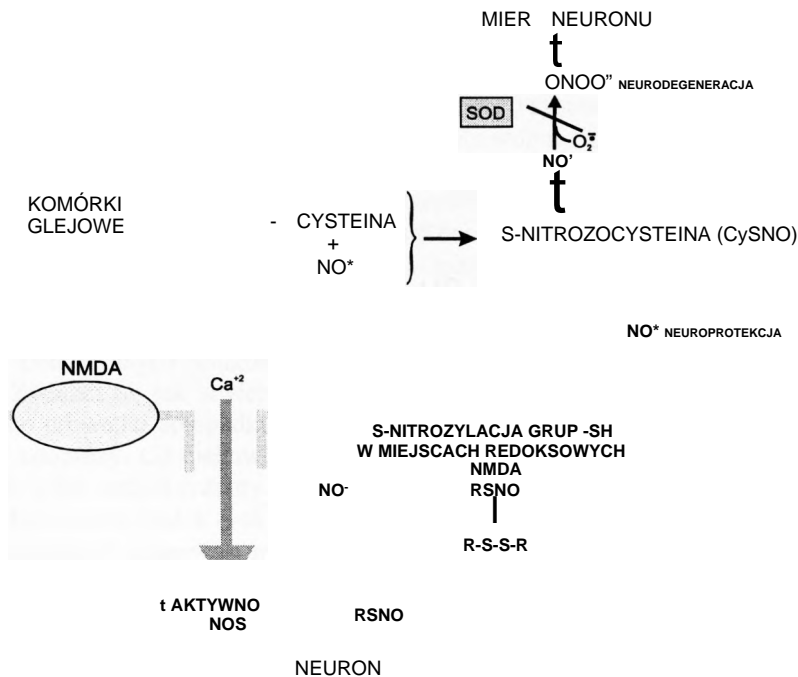
Związki te akumulują się w mitochondriach i w powstających licznych cyklach redoks stają się przyczyną nadmiernego generowania RFT, co prowadzi do nieodwracalnego zahamowania I kompleksu mitochondrialnego łańcucha oddechowego [38, 39]. Zatem neuroprotekcynowe działanie cysteiny w neuronach jest związane z biosyntezą GSH, natomiast neurotoksyczne - jest efektem powstawania 5-S-Cys-DA, a następnie pochodnych dihydrobenzotiazyny.

Cysteina wykazuje również możliwość „wizania” NO z powstaniem S-nitrozocysteiny (CySNO), która w obecności  $O_2$  oraz w nieobecności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) może stać się neurotoksyczna [40] (p. rozdział 9). CySNO jest przykładem bardzo mało stabilnego S-nitrozotiołu, który z łatwością na drodze homolitycznej uwalnia tlenek azotu NO, mogący w reakcji z  $O_2$  przechodzić w toksyczny nadtlenoazotyn (ONOO $\cdot$ ) [41] (ryc. 9). CySNO może również ulegać heterolitycznemu rozpadowi do kationu nitrozoniowego (NO $^+$ ) i powodować w miejscach redoksowych NMDA S-transnitrozylację grup -SH, prowadząc ostatecznie do powstania wiązania



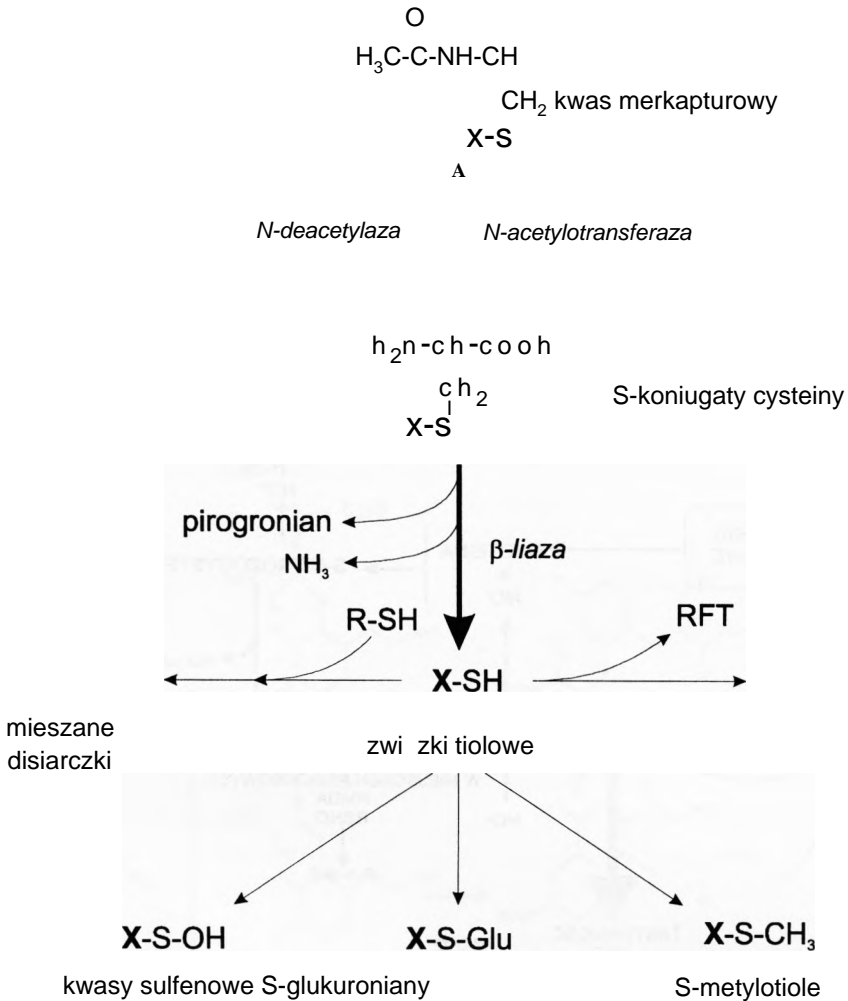
Ryc. 8. Przekształcanie 5-S-cysteinylodopamina do pochodnych dihydrobenzotiazyny oraz możliwości powstawania z udziałem cysteiny licznych generacji RFT cykli redoksowych (wg Zhanga i Dryhursta [37] zmodyfikowana)

disiarczkowych [42]. W tym przypadku prowadzi to do neuroprotekcji na skutek obniżenia aktywności receptorów NMDA. Toksyczne działanie CySNO w hodowli neuronów przypomina działanie oligomycyny - inhibitora mitochondrialnej syntazy ATP [43], Zahamowanie oddychania mitochondrialnego i spadku poziomu ATP w neuronach pod wpływem CySNO jest związane z uwalnianiem się z NO i nitrozylacją kationów elaza hemowego i białek elazowo-siarkowych [44], Zauważono, że neurotoksycznie nadmiar S-nitrozohomocysteiny może zapobiegać innym, np. cysteina, która w reakcjach S-transnitrozytacji może przejmować na siebie uwalniane NO, a tym samym unieważnia jego toksyczne działanie [45].



Ryc. 9. Neuroprotekcjne i neurotoksyczne działanie S-nitrozocysteiny (wg Liptona i Stamlera [42] zmodyfikowana)

Detoksykacja elektrofilnych ksenobiotyków w organizmach zwierzęcych przebiega z udziałem S-transferazy glutationowej i prowadzi do powstania S-koniugatów glutationu (GSX) [46]. Dalsza biodegradacja GSX zachodzi w cyklu  $\gamma$ -glutamyłowym i ostatecznie prowadzi do S-koniugatów cysteiny, które w reakcji N-acetylowania przechodzą w nietoksyczne, wydalone następnie z moczem kwasy merkapturowe (p. rozdział 4). Okazuje się, że istnieje możliwość pojawiania się toksycznie, szczególnie niebezpiecznej dla nerek, związanej z niektórymi S-koniugatami cysteiny białymi substratami [3-liazy, enzymu występującego w nerkach [47, 48]. Pod wpływem tego enzymu może nastąpić w tioeterze cysteiny (Cy-S-X) rozbitcie wiązania pomiędzy atomem węgla i siarką z powstaniem pirogronianu, amoniaku i białych przyczyn nefrotoksycznie reaktywnych tioli (ryc. 10). We wszystkich przypadkach, kiedy pod



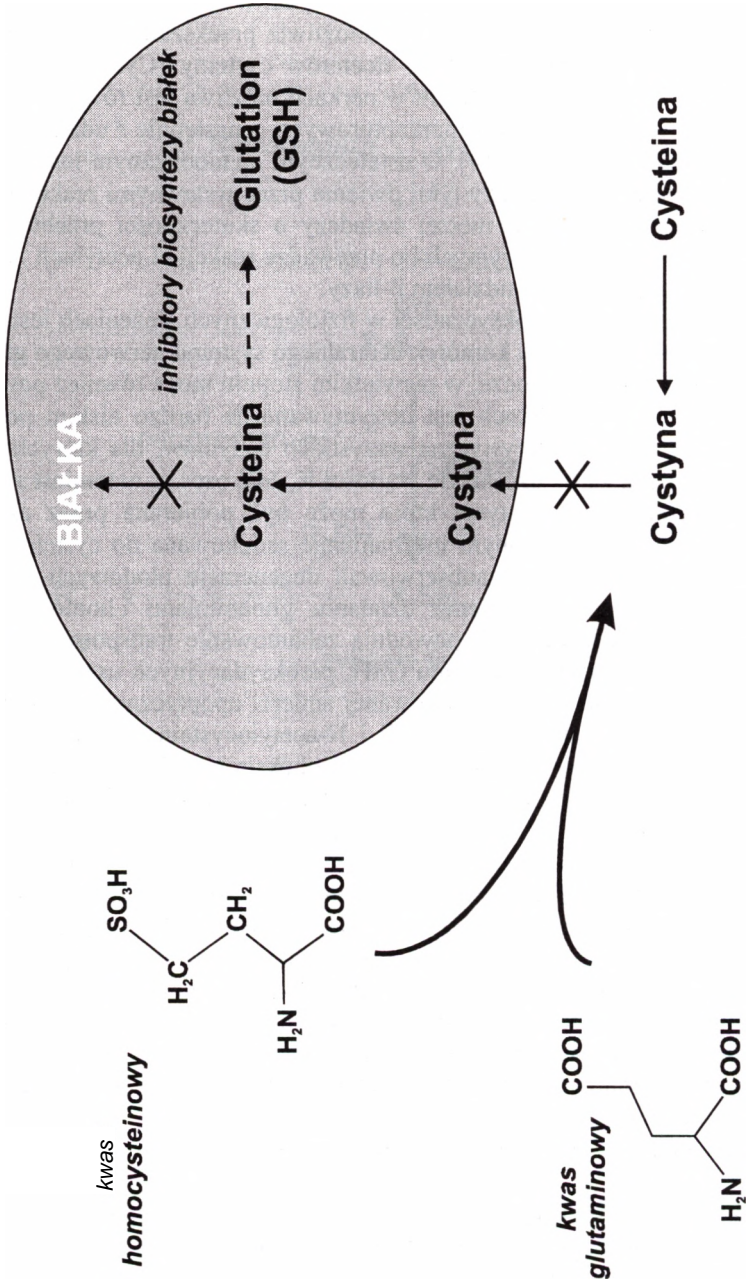
Ryc. 10. Udział P-liazy w nefrotoksyczności S-koniugatów cysteiny związanej z powstawaniem toksycznych tioli

wpływem Cy-S-X pojawia się nefrotoksyczność, to jest ona najczęściej związana z aktywnością P-liazy i uwalnianiem się toksycznych tioli [48, 49]. Na przykład, chloropuryna ulega reakcji koniugacji z GSH, do S-koniugatu cysteiny (Cy-S-X), który pod wpływem p-liazy jest przekształcany do tiolu - merkaptopuryny [50]. Powstawanie tioli zawsze niesie z sobą niebezpieczeństwo peroksydacyjnych uszkodzeń (p. rozdział 1), które bodziec tym wiążąc, im niższa jest wartość pK grupy -SH uwalnianego tiolu. Również tiole o wysokich wartościach pK. mogą w reakcjach S-oksydacji przechodzić w toksyczne kwasy sulfenowe, których reakcja z tiolami prowadzi do powstawania disiarczków. Zauważono, że robotnicy narażeni na trichloroetylen bardzo często zap-

dali na nowotwory nerek, zlokalizowane najcz.iej w kanalikach proksymalnych, czyli tam, gdzie mog. nast. powa. uszkodzenia zwi. zane z aktywno. ci. [3-liazy [51, 52], Nerki ponadto posiadaj. aktywno. N-deacetylazy, enzymu antagonistycznego w stosunku do N-acetylotransferazy [53], co umo.liwia przekszta.lenie powstaj. cych w w. trobie merkapturanów na powrót do tioeterów cysteiny (Cys-S-X), b. d. cych substratami dla p-liazy [47, 48, 50]. Zatem w nerkach mo.liwa jest równie. regeneracja Cys-S-X z ju. powstałych kwasów merkapturowych, a nast. pnie z udziałem P-liazy bioaktywacja do toksycznych tioli [54], O ostatecznym metabolicznym losie Cys-S-X decyduje zatem równowaga pomi. dzy tymi dwiema przeciwnymi reakcjami. Wysoka zawarto. merkapturanów w moczu wiadczy o skuteczno. ci. przebiegaj. cych w organizmie procesów detoksykacyjnych i o przewadze reakcji N-acetylacji nad reakcji p-eliminacji przebiegaj. cych z udziałem p-liazy.

Cysteina pomimo swej neurotoksyczno. ci. w fizjologicznych st. eniach jest komórkom bezwzgl. dnie konieczna. Dla komórek centralnego systemu nerwowego głównym ródłem tego aminokwasu jest osocze, w niewielkim stopniu mo.e równie. powstawa z metioniny. Cysteina w komórkach jest utrzymywana na bardzo niskim poziomie, w zwi. zku z tym cech. charakterystyczn. wszystkich enzymów, dla których aminokwas ten jest substratem, s. bardzo niskie warto. ci.  $K_m$ . W osoczu natomiast zdecydowanie przewa. a disiarczeczek - cystyna, która mo.e by. pobierana przez astrocyty, a nast. pnie w nie do ko. ca. poznanym mechanizmie redukowana do cysteiny. Rotan i wsp. [55] w badaniach zn. *in vitro* zaobserwowali degeneracj. płodowych neuronów korowych poddawanych długotrwałemu działaniu glutaminianu i homocysteinianu (ryc. 11). Zwi. zki te, jak stwierdzili, powoduj. zahamowanie transportu cystyny do komórek, co prowadzi do spadku poziomu GSH, peroksydacyjnych uszkodze. i ostatecznie do apoptozy. Co ciekawe, obserwowanej. mierni apoptycznej komórek zapobiegaj. nie tylko antyoksydanty [witamina E i N-acetylocysteina (NAC)], ale tak e inhibitory biosyntezy białek - aktynomycyna i cykloheksimid. We wszystkich powy. szych przypadkach obserwowane protekcyjne działanie znosi inhibitor biosyntezy GSH - butioninosulfoksymina (BSO). Oznacza to, e supresja biosyntezy białek w komórkach stanowi sposób „oszcz. dzania” cysteiny i kierowanie jej na szlak biosyntezy GSH. Wskazuje to, jak niezwykle wa. n. rol. w komórkach odgrywa GSH oraz jak istotn. spraw. jest dost. pno. cysteiny dla jego syntezy [56], Spostrze. enie to wyja. nia ponadto obserwowane ju. wcze. niej przypadki hamowania biosyntezy białek w komórkach na skutek infekcji wirusowych czy w szoku temperaturowym [57, 58], Pozwoliło równie. zrozumie. , dlaczego inhibitory biosyntezy białek mog. chroni. przed promieniowaniem jonizuj. cym [59]. Zjawiska hamowania biosyntezy białek pod wpływem czynników proapoptycznych były dot. d. interpretowane jako jedna z oznak toksyczno. ci. Tymczasem zahamowanie biosyntezy białek mo.e w pewnych warunkach sta. si. endogennym mechanizmem obronnym opó. niaj. cym mier. w wyniku apoptozy.

Cysteina jako zwi. zek tiolowy w porównaniu z tiolowym tripeptydem glutationem jest nie tylko mniej skutecznym antyoksydantem, lecz równocze. nie o wiele bardziej niebezpiecznym prooksydantem. Wprawdzie za antyoksydacyjnym działaniem cysteiny przemawia mo.liwo. kompleksowego wi. zania jonów metali, co oznacza ochron. przed niebezpieczn. reakcj. Fentona (p. rozdział 1). Cysteina mo.e równie. jako zwi. zek tiolowy działa. radioprotekcyjne [60] oraz chroni. limfocyty przed aberracj. chromosomów [61]. Jednak ze wzgl. du. na swoj. neurotoksyczno. aminokwas ten



Ryc. 11. Hamuj cy wpływ kwasu glutaminowego i kwasu homocysteinowego na transport cystyny (wg Rotana i wsp. [55])



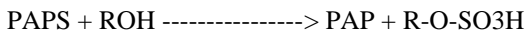
w adnym wypadku nie mo e by stosowany jako lek. Równie podawanie GSH w celach terapeutycznych jest znacznie ograniczone, poniewa nie ulega on transportowi poprzez błony komórkowe [62]. Z tych powodów w celu podnoszenia poziomu GSH w komórkach zalecane jest stosowanie nietoksycznych prekursorów cysteiny, takich jak: N-acetylocysteina [63], kwas 2-oksotiazolidyno-4-karboksyłowy [64] i tiazolidynowe pochodne [65]. Ze zwi zków tych cysteina mo e by stopniowo uwalniana w komórkach w wyniku enzymatycznych lub nieenzymatycznych reakcji (p. rozdział 4).

### 2.3. Tlenowy metabolizm cysteiny - detoksykacja ksenobiotyków (leków) z udziałem „aktywnego siarczanu”

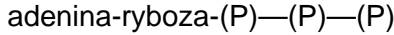
Pierwsza reakcja utleniania cysteiny z udziałem dioksygenazy cysteinowej prowadzi do kwasu cysteiniosulfinoowego, przekształcanego następnie do siarczanów i tauryny (ryc. 5). Poziom siarczanów i tauryny w moczu pozwala ocenić natęenie utleniającego szlaku metabolizmu siarki [1]. Natomiast związkami wydalonymi z moczem, w których siarka występuje w postaci zredukowanej S-koniugaty ksenobiotyków oraz produkty ich dalszej biodegradacji, tj. kwasy merkapturowe (p. rozdział 4).

Nieorganiczne siarczany należą do 4 najważniejszych anionów osocza i są nie tylko głównym produktem metabolizmu wydalonym z moczem, lecz odgrywają również ważną rolę w procesach anabolicznych oraz w biodegradacji ksenobiotyków i niektórych endobiotyków. W tym celu nieorganiczny siarczan z udziałem ATP ulega aktywacji do tzw. „aktywnego siarczanu”, tj. kwasu 3'-fosfoadenylosiarkowego (PAPS) [66] (ryc. 12). Następnie z udziałem sulfotransferaz może nastąpić estryfikacja różnych ksenobiotyków, na przykład paracetamolu [67], a powstają one siarczany są mniej toksyczne, lepiej rozpuszczalne i łatwiej wydalane z moczem.

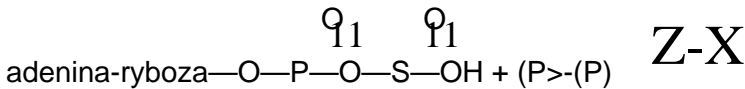
sulfotransferaza



Równie biodegradacja endobiotyków, takich jak: hormony tarczycy, sterydy, katecholaminy i kwasy tłuszczowe, jest związana z powstawaniem estrów siarczanowych [68]. Siarczany są również bezwzględnie konieczne w biosyntezie glikozaminoglikanów, dawniej zwanych mukopolisacharydami, zawierających grupy siarczanowe w postaci O-estrowej (R-O-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) lub N-siarczanowej (R-NH-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (jak w heparynie i siarczanie heparanu). W centralnym systemie nerwowym reakcje sulfatacji odgrywają ważną rolę w biosyntezie siarczanów proteoglikanów biorących udział w interakcji komórek w rozwijającej się tkance nerwowej. Stwierdzono, że u pacjentów z chorobą Alzheimera zmienia się poziom siarczanu heparanu, występującego w okołonaczyniowej błonie podstawnej [69] oraz dochodzi do jego akumulacji w mózgu [70]. Ostatnio uzyskano dowody na istnienie specyficznego transportera siarczanów w mózgu ssaków [71].



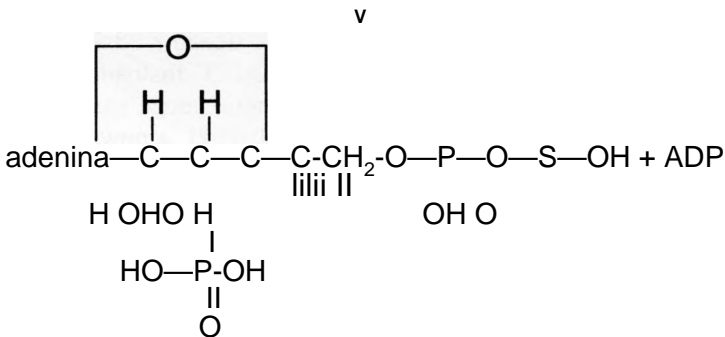
*adenylotransferaza siarczanowa*



kwas adenylosiarkowy



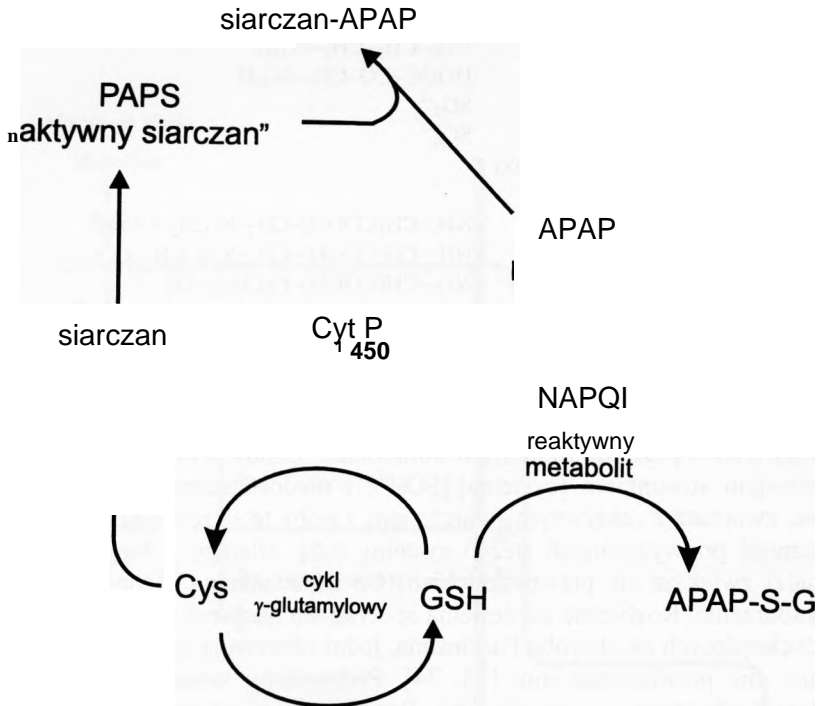
*kinaza adenylosiarczanowa*



Kwas 3'-fosfoadenylosiarkowy „aktywny siarczan”

Ryc. 12. Powstawanie „aktywnego siarczanu”

Biodegradacja paracetamolu to zarówno koniugacja powstajacego „reaktywnego” metabolitu, p-benzochinono-iminy (NAPQI) z GSH, jak rownie powstawanie estrów siarczanowych tego leku (ryc. 13). Zatem z udzialem zwi zków siarki mog w komórkach przebiega równolegle dwa mechanizmy detoksykacji, w pierwszym przypadku b d brały udział grupy -SH reszty cysteiny, w drugim produkty ich utleniania - nieorganiczne siarczany [68] (ryc. 14).



Ryc. 13. Drogi detoksykacji paracetamolu (APAP)

Nazwy i wzory najwa niejszych zarówno pod wzgl dem fizjologicznym, jak i farmakologicznym zwi zków siarki zostały umieszczone w tab. 1.

Tabela 1

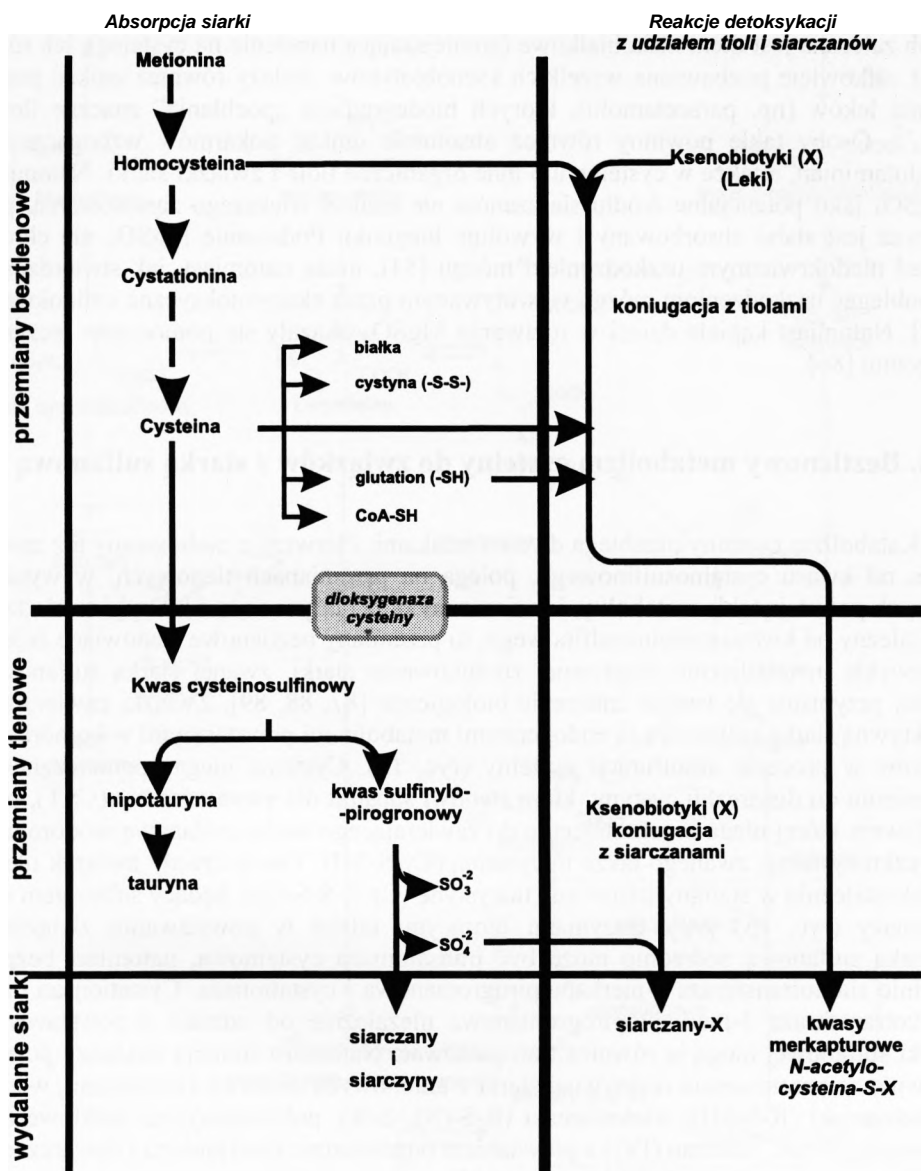
Najwa niejsze fizjologiczne i farmakologiczne zwi zki siarki

1. Aminokwasy siarkowe i produkty przemian	
1.1. Tiole, etery i disiarczki	
Metionina	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3$
Homocysteina	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$
Cystationina	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-NH}_2$
Cysteina	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-SH}$
Cystyna	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-NH}_2$
Glutation	y-glutamylcysteinylglycyna (tripeptyd)
Cysteamina	$\text{n h}_2\text{-c h}_2\text{-c h}_2\text{-s h}$
Cystamina	$\text{n h}_2\text{-c h}_2\text{-c h}_2\text{-s-s-c h}_2\text{-c h}_2\text{-n h}_2$
Merkaptopirogronian	$\text{HOOC-CO-CH}_2\text{-SH}$
1.2. Sulfmiany, sulfoniany i siarczany	
Kwas cysteinosulfinowy	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{H}$
Kwas cysteinosulfonowy	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-SO}_3\text{H}$

Hipotauryna	$\text{nh}_2\text{-c h}_2\text{-c h}_2\text{-s o}_2\text{h}$
Tauryna	$\text{nh}_2\text{-c h}_2\text{-c h}_2\text{-s o}_3\text{h}$
Sulfmylopirogonian	$\text{h o o c -c o -c h}_2\text{-s o}_2\text{h}$
Siarczany (IV)	$\text{SO}_3^{2-}$
Siarczany (VI)	$\text{SO}_4^{2-}$
2. Farmakologicznie ważne związki siarki	
(pochodne cysteiny)	
S-karboxymetylo-L-cysteina	$\text{NH}_2\text{-CH(COOH)-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-COOH}$
Karboxymetylotio-L-cysteina	$\text{NH}_2\text{-CH(COOH)-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-COOH}$
Penicylamina	$\text{NH}_2\text{-CH(COOH)-C(CH}_3)_2\text{-SH}$
N-acetylo-L-cysteina (NAC)	$\text{CH}_3\text{-CO-NH-CH(COOH)-CH}_2\text{-SH}$

Efektem upośledzenia tlenowych przemian siarki cysteiny do  $\text{SO}_4^{2-}$  jest pojawianie się nietolerancji na leki. Stwierdzono, że istnieje subpopulacja ludzi, u której na skutek wadliwego utleniania siarki cysteiny występuje niedobór  $\text{SO}_4^{2-}$ , czemu równocześnie towarzyszy wzrost poziomu cysteiny w komórkach. Osoby te charakteryzują się zatem podwyższonym stosunkiem  $[\text{cysteina}]/[\text{SO}_4^{2-}]$  i niedostateczną detoksykacją ksenobiotyków, związaną z „aktywnym” siarczanem. Osoby te są również narażone na neurotoksycznie podwyższonych stężeń cysteiny [68]. Dlatego z biegiem czasu u tej grupy ludzi zwiększa się prawdopodobieństwo zapadania na różnego typu neurologiczne zaburzenia. Rozbieżne doniesienia spotyka się na temat poziomu  $\text{SO}_4^{2-}$  w osoczu osób cierpiących na chorobę Parkinsona, jedni obserwują spadek [72], czego równocześnie nie potwierdzają inni [73, 74]. Podniesiony stosunek wolnej  $[\text{cysteiny}]/[\text{SO}_4^{2-}]$  jest obserwowany w chorobie Parkinsona, w chorobie Alzheimera [72], w autyzmie [75, 76] oraz w zaburzeniach immunologicznych [77, 78]. Testem pozwalającym na stwierdzenie defektu metabolicznego związku związanego z niedoborem  $\text{SO}_4^{2-}$  jest obniżenie powstawania siarczanu paracetamolu w stosunku do glukuronidacji tego leku. Na przykład, w moczu dzieci autystycznych po podaniu paracetamolu stwierdza się obniżony stosunek stężeń siarczanu paracetamolu w stosunku do glukuronianu paracetamolu [75, 76]. Takie przesunięcie w kierunku zmniejszenia glukuronidacji może w konsekwencji prowadzić do zmian w farmakokinetyce i farmakodynamice różnych leków.

Efekty neurotoksycznego działania zarówno podwyższonego poziomu cysteiny, jak i niedoboru  $\text{SO}_4^{2-}$  będą dodatkowo wzrastały w sytuacji, kiedy organizm będzie narażony na synergistyczne działanie różnych egzogennych toksyn, w tym także leków. Dlatego wszelkie ksenobiotyki, leki, konserwanty, sztuczne barwniki czy związki pochodzące z zanieczyszczenia środowiska stanowią szczególnie duże zagrożenie dla subpopulacji ludzi z niedoborem siarczanów. Niebezpieczne w tym przypadku będzie również podawanie salicylanów, które dodatkowo stymulują nerkowe wydalanie siarczanów, czym jeszcze bardziej pogłębi ich niedobór w organizmie [79]. Dla tej grupy osób potencjalnie niebezpieczne może być również podawanie leków będących prekursorami cysteiny, jak np. N-acetylocysteiny, pomimo ich udokumentowanego neuroprotekcijnego [80] i immunostymulującego działania [81].



Ryc. 14. Reakcje detoksykacji z udziałem grup hydrosulfidowych (-SH) reszt cysteiny oraz produktów ich utleniania - siarczanów

Niedobór siarczanów to również upośledzony metabolizm endobiotyków, jak: sterydy, kwasy ółciowe, katecholaminy. Upośledzone powstawanie siarczanów kwasów ółciowych prowadzi do marskości w przebiegu [82], a glikozyloaminoglikanów do reumatoidalnego zapalenia stawów [83]. Dlatego z tych wszystkich powodów u tej grupy osób zalecana jest dieta niskobiałkowa (zmniejszając narazie na cysteinę), jak również całkowicie pozbawiona wszelkich ksenobiotyków. Należy również unikać podawania leków (np. paracetamolu), których biodegradacja „pochłania” znaczne ilości  $\text{SO}_4^{2-}$ . Osoby takie powinny również absolutnie unikać pokarmów wzbogacanych w glutaminian, a także w cysteinę lub inne organiczne źródła i związki siarki. Natomiast  $\text{MgSO}_4$  jako potencjalne źródło siarczanów nie znalazł w żadnym zastosowaniu, ponieważ jest słabo absorbowany i wywołuje biegunki. Podawanie  $\text{MgSO}_4$  nie chroni przed niedokrwiennym uszkodzeniem mózgu [84], mo jest natomiast, jak stwierdzono, zapobiega uszkodzeniom mózgu wywoływanych przez ekscytotoksyczne aminokwasy [85]. Natomiast kąpiele dzieci w roztworze  $\text{MgSO}_4$  okazały się pomocne w leczeniu autyzmu [86],

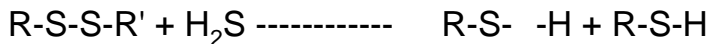
## 2.4. Beztlenowy metabolizm cysteiny do związków z siarką - sulfanów

Katabolizm cysteiny przebiega dwoma szlakami. Pierwszy z nich, zwany zależnym od kwasu cysteiniosulfonowego, polega na przemianach tlenowych, w wyniku których powstają takie metabolity, jak siarczany oraz tauryna (ryc. 5). Drugi szlak, tzw. niezależny od kwasu cysteiniosulfonowego, to przemiany beztlenowe stanowiące źródło niezwykle metabolicznie reaktywnej zredukowanej siarki, zwanej siarką sulfanową, której przypisuje się istotne znaczenie biologiczne [87, 88, 89]. Związki zawierające reaktywną siarkę sulfanową z endogennymi metabolitami powstają w komórkach ssaków w procesie desulfuracji cysteiny (ryc. 15). Cysteina ulega spontanicznemu utlenieniu do disiarczku cystyny, która stanowi substrat dla  $\gamma$ -cystationazy (CST), pod wpływem której ulega przekształceniu do zawierającego siarkę sulfanową wodoronadsiarczku cysteiny, zwanego także tiocysteiną (Cy-S-SH). Ten nietrwały związek ulega przekształceniu w stabilny trisiarczek tiocystyn (Cy-S-S-S-Cy), będący substratem dla rodanazy (ryc. 15) [90]. Enzymami biorącymi udział w powstawaniu związków z siarką sulfanową pośrednio może być transaminaza cysteinowa, natomiast bezpośrednio siarkotransferaza 3-merkaptopirogronianowa i cystationaza. Cystationaza oraz siarkotransferaza 3-merkaptopirogronianowa niezależnie od udziału w powstawaniu siarki sulfanowej mogą również transportować. Natomiast funkcja rodanazy polega głównie na przenoszeniu reaktywnej siarki z anionowych donorów (tiosiarczan, wodoronadsiarczki (R-S-SH), wielosiarczki (R-S-(S)<sub>n</sub>-S-R), politioniany) na tiofilowe akceptory (cyjanek, siarczany (IV)) z powstaniem odpowiednio tiocyjanianu i tiosiarczanu, a także na białka elazowo-siarkowe (ryc. 15).

Do białek transportujących siarkę sulfanową w postaci nadsiarczków należą także albuminy osocza [91, 92]. Owa jej rola albuminy w tym względzie świadczy fakt obecności siarki sulfanowej w sercu i płucach, a także w narządach, w których aktywność enzymów związanych z biosyntezą siarki sulfanowej jest znikoma [93]. Oznacza to, że albumina osocza może być w krwiobiegu specyficznym nośnikiem siarki sulfanowej z wątroby i nerek do innych narządów.



W procesie desulfuracji cysteiny z udziałem cystationazy, a także w katabolizmie innego aminokwasu siarkowego, tj. metioniny, powstają jony wodorosiarczkowe, które mogą reagować z grupami disiarczkowymi białek z powstaniem zawierających siarko-sulfanów wodoronadsiarczków białek [87, 94],



Proces powstawania siarkowodoru z metioniny nie został jeszcze dokładnie poznany. Wiadomo tylko, że metionina może być przekształcana bezpośrednio w reakcji transaminacji lub też pośrednio poprzez 5'-metylotioadenozyn do kwasu 2-keto-4-metylotiomasłowego [95, 96, 97]. Badania w wądrobie szczura wykazały, że kwas 2-keto-4-metylotiomasłowy ulega dekarboksylacji do 3-metylotiopropionianu, z którego następnie powstaje metylotiol ( $CH_3SH$ ) [98, 99], uważany za prekursora powstającego z metioniny siarkowodoru w komórkach ssaków [99]. Zarówno metylotiol, jak i jego disiarczki zostały zidentyfikowane jako naturalne składniki ludzkiego oddechu i moczu [100, 101],

Przemiany tlenowe i beztlenowe cysteiny wiążą się z sobą poprzez powstawanie i biodegradację tiosiarczanu (ryc. 15). Wyniki badań Skarżyńskiego i współpracowników [102, 103] wykazały, że kładzie z atomów siarki w cząsteczce tiosiarczanu ulega odmiennym losom metabolicznym oraz zwróciły uwagę na istotną rolę, jaką związanie ten odgrywa w metabolizmie siarki. Z kolei badania Kojima i współpracowników [104] nad utlenianiem tiosiarczanu w mitochondriach w wądrobie szczura wykazały istnienie cyklu tiosiarczanowego (ryc. 15). W przemianach tych powstający z tiosiarczanu siarczyny jest utleniany do siarczanu, natomiast siarczki ( $\sim S\sim$ ) jest ponownie przekształcany w tiosiarczan. Biologiczne znaczenie tego cyklu prawdopodobnie polega na opóźnieniu nieodwracalnego procesu utleniania siarczku i siarczyny do siarczanu.

Jak wykazali Wróbel i współpracownicy [105], natomiast przemiany L-cysteiny związane z jej desulfuracją i tworzeniem związków z puli siarki sulfanowej zależą od różnorodnych endogennych i egzogennych czynników, takich jak: płę zwierzęcia [105], aktywność tarczycy [106], aktywność metabolizmu tlenowego [107] oraz dostępnosć odpowiednich substratów [108, 109].

#### 2.4.1. Charakterystyka związków z siarko-sulfanów

Związki z siarko-sulfanów zawierają labilny, niezwykle reaktywny atom siarki, występujący na 0 lub -1 stopniu utlenienia, związany kowalencyjnie z innym atomem siarki. Siarka o takich właściwościach łatwo opuszcza strukturę związku, przechodząc na różnorodne akceptory, jak np.: siarczany (IV) ( $SO_3^{2-}$ ), sulfoniany ( $R-SO_2-H$ ) czy cyjanek ( $CN\sim$ ). Ze względu na ten ostatni akceptor bywa też często nazywana siarko-cyjanolizujcą. Przykładami związków z fizjologicznej puli siarki sulfanowej są: nadsiarczki ( $R-S-S-H$ ), wielosiarczki ( $R-S_n-R$ , gdzie  $n > 3$ ) oraz politioniany ("ChS-Sn-SCh"). Właściwość siarki sulfanowej posiada również zewnętrzny atom siarki tiosiarczanu ( $S=SO_3^{2-}$ ), a także siarka elementarna (Sg) [87, 88, 89, 93].



Inn klas połączeń związanych z siarką sulfanową są disiarczki zawierające ponadto w swej cząsteczce wiązanie podwójne, grup karbonylowe lub enole ( $R-S-S-CH_2-CH=CH-R$ ;  $R-S-S-CH_2-CO-CO_2H$  i  $R-S-S-CH_2-COH$  lub  $R-S-S-CH_2-CH=CH-OH$ ), co umożliwia tautomerizację do zawierających siarkę sulfanową tiosulfoksydów. Tiosulfoksydowe tautomery disiarczków allilowych mogą być źródłem labilnej siarki, jak to ma miejsce np. w przypadku pochodzącego z czosnku disiarczku allilowego [87].



Podobny mechanizm zachodzi w disiarczках z grup karbonylowych lub enolowych, których obecność, tak jak w przypadku nienasyconego rodnika allilowego, umożliwia „labilizację” siadujących wiązania C-S i promuje tautomerizację disiarczków do tiosulfoksydów. Na tej drodze związki tego typu stają się istotnym źródłem labilnej siarki sulfanowej [87].

## 2.4.2. Biologiczne właściwości związków z siarką sulfanową

Siarka sulfanowa odgrywa istotną rolę w procesie detoksykacji cyjanokwów [110, 111] oraz w powstawaniu białek siarko-siarkowych [112, 113], a także może pełnić funkcję regulatorów w komórkach [87].

### 2.4.2.1. Regulacyjny wpływ związków z siarką sulfanową na aktywność enzymów

Właściwości regulacyjne związków z siarką sulfanową są związane z możliwością kowalencyjnej modyfikacji grup -SH białek receptorowych i enzymatycznych, związanej z powstaniem wodorodysiarczków lub trysiarczków, co bezpośrednio może wpływać na ich aktywność biologiczną [87]. Zatem z udziałem transferaz siarkowych i siarki sulfanowej może dochodzić do aktywacji jednych, a inaktywacji innych enzymów. Do enzymów, których aktywność wzrasta pod wpływem siarki sulfanowej, należą oksydoreduktazy zawierające azo lub molibden, jak oksydaza ksantynowa [114], oksydaza aldehydowa [115] oraz dehydrogenaza maleinianowa [116]. Również synteza 5-aminolewulinianowa jest aktywowana przez cystyn wraz z cystationazą [117, 118]. Ponadto takie disiarczki, jak cystamina czy disiarczek 2-merkaptoetanolu, stymulują aktywność fruktozo-1,6-bisfosfatazy [119]. W przypadku tego ostatniego disiarczku dla labilizacji siarki konieczne jest utlenienie do dialdehydu.

Związki z siarką sulfanową mogą również wywierać hamujący wpływ na aktywność niektórych enzymów, jak zaobserwowano w przypadku dehydratazy serynowej [120, 121]. Do zahamowania aktywności tego enzymu dochodzi podczas inkubacji z cystyną i cystationazą lub z elementarną siarką. Do enzymów inaktywowanych przez siarkę sulfanową należą także: kinaza adenylanowa [122, 123], aminotransferaza tyrozynowa [124], dekarboksylaza ornitynowa [125]. Inhibicja tych enzymów następuje

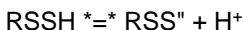
poprzez tworzenie wodoronadsiarczków i jest odwracalna pod wpływem działania tioli (np. GSH lub ditiotretolu) [87],

Co ciekawe, zarówno hamowanie, jak i aktywacja enzymów *in vitro* przez systemy mogące wytwarzać i transportować siarko-sulfanowców następuje przy jej bardzo niskim i w tym zakresie stężeniu [87, 91]. Zatem udział związków z siarko-sulfanowców umożliwia kolejny mechanizm kowalencyjnej modyfikacji grup -SH, bądź cy alternatywnym w stosunku do reakcji S-tiolacji czy S-nitrozytacji (p. rozdział 9).

#### 2.4.2.2. Antyoksydacyjne właściwości związków z siarko-sulfanowców

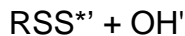
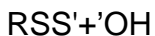
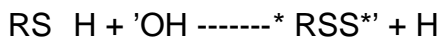
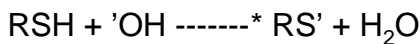
Związki z siarko-sulfanowców nie tylko biorą udział w regulacji aktywności białek, ale wykazują także właściwości antyoksydacyjne i protekcyjne. Oznacza to, że mogą zarówno „zmiatać” wolne rodniki [126], jak i podnosić aktywność takich enzymów antyoksydacyjnych, jak: peroksydaza glutationowa, reduktaza glutationowa czy dysmutaza ponadtlenkowa [126, 127, 128].

Nadsiarczki mogą zmiatać wolne rodniki zarówno poprzez transfer atomu wodoru, jak i elektronu, zale nie od natury wolnych rodników [129, 130]. W fizjologicznym pH równowaga kwasowo-zasadowa reakcji dysocjacji wodoronadsiarczków jest przesunięta w kierunku anionu nadsiarczkowego.



Wodoronadsiarczki (RSSH), w porównaniu z grupami sulfhydrylowymi (-SH), są bardziej skutecznymi donorami wodoru, a jako aniony nadsiarczkowe (RSS<sup>-</sup>) donorami elektronów, co czyni je niezwykle skutecznymi antyoksydantami.

Tiole zmiatają niezwykle niebezpieczne rodniki hydroksylowe (<sup>•</sup>OH) z powstaniem rodników tylowych (RS<sup>•</sup>), podczas gdy wodoronadsiarczki (RSSH) i aniony nadtiołanowe (RSS<sup>-</sup>) z utworzeniem rodników nadtiołowych (RSS<sup>•</sup>). Te ostatnie (RSS<sup>•</sup>) są bardziej stabilne i w rezultacie mniej reaktywne, a w konsekwencji mniej toksyczne niż rodniki tyłowe (RS<sup>•</sup>) [130],



Występuje w ekstraktach czosnku disiarczek allilu hamuje peroksydację lipidów [126]. Wszystko to razem pozwala uważać związek z reaktywnych siarko-sulfanów za jeden z ważnych elementów obrony antyoksydacyjnej komórek [129],

#### 2.4.2.3. Związki z siarko-sulfanów w procesach nowotworowych

Cechą charakterystyczną komórek nowotworowych jest całkowity brak aktywności γ-cystationazy, natomiast aktywności aminotransferazy cysteinowej, siarkotransferazy 3-merkaptopirogronianowej i rodanazy są zaledwie ładowe [131]. Konsekwencją tego jest brak w tych komórkach biosyntezy i transportu związków z puli siarki sulfanowej. Toohey sugeruje, że niekontrolowana proliferacja komórek nowotworowych jest właśnie następstwem niedoboru siarki sulfanowej i nadmiernej aktywności tych enzymów, które w prawidłowych komórkach byłyby inaktywowane przez te reaktywne formy siarki [87]. Potwierdzeniem tego jest remisja transplantowanych nowotworów u myszy [132, 133] oraz zahamowanie indukcji nowotworów przez kancerogeny pod wpływem różnych prekursorów siarki sulfanowej [134, 135],

Obecnie coraz częściej pojawiają się doniesienia o korzystnym antyproliferacyjnym działaniu związków z siarko-sulfanów lub ich prekursorów na komórki nowotworowe. Obecny w ekstraktach czosnku disiarczek allilu, stanowi około 60% siarki obecnej w oleju otrzymanym z bulwy tej rośliny, hamuje rozwój nowotworów u zwierząt i zmniejsza uszkodzenia spowodowane naświetaniem promieniami gamma [136, 137, 138, 139]. Ponadto badania epidemiologiczne wskazują, że dieta bogata w czosnek znacznie obniża ryzyko zachorowania na nowotwory [140, 141]. Disiarczek allilu efektywnie hamuje *in vitro* proliferację wielu komórek nowotworowych [142, 143, 144, 145].

Z drugiej jednak strony stwierdzono, że proliferacja *in vitro* żywych komórek limfoidalnych jest całkowicie zależna od obecności siarki sulfanowej i komórki te, aby móc normalnie proliferować, wymagają dostarczenia ródki tej siarki. Stymulujący efekt siarki sulfanowej zaobserwowano także w przypadku normalnych komórek szpiku kostnego [89],

Wszelkie próby indukowania aktywności enzymów związanych z powstawaniem siarki sulfanowej poprzez podawanie odpowiednich substratów w komórkach nowotworowych nie powiodły się [146]. Dlatego dalsze badania powinny się raczej koncentrować na próbach bezpośredniego wprowadzania do komórek nowotworowych odpowiednich systemów generujących siarko-sulfanów.

Równocześnie nie stwierdzono, że w wrotkach myszy obciążonych nowotworem rakowym Ehrlicha (EATC) aktywność MPST, jak i CST jest znacznie obniżona w porównaniu z wrotkami zwierząt zdrowych [146]. Oznacza to, że konsekwencją rozwijającego się nowotworu jest drastyczny spadek w wrotkach aktywności enzymów związanych z wytwarzaniem siarki sulfanowej. Stwierdzono także, że białce prekursorami cysteiny pochodne tiazolidynowe, takie jak kwas 2-metylotiazolidyno-2,4-dikarboksylowy, podnoszą aktywność MPST i CST w wrotkach myszy z nowotworem o wiele skuteczniej niż aminokwasy siarkowe (cysteina, metionina) [146]. Sugeruje to, że istnieje możliwość korygowania zaburzonego metabolizmu związanego z wytwarzaniem siarki sulfanowej w wrotkach zwierząt obciążonych nowotworem.

Interesująca jest również możliwość modulowania poziomu grup -SH, jak również aktywności enzymów związanych z beztlenowymi przemianami cysteiny przez donory NO oraz inhibitory syntazy NO [147],

#### 2.4.2.4. Inne biologiczne właściwości związków z siarką sulfanów

Siarka sulfanowa bierze także udział w procesie sulfuracji tRNA, co stanowi posttranskrypcyjną modyfikację tRNA. Stwierdzono, że atom siarki jest przenoszony na tRNA z udziałem MPST z 3-merkaptopirogronianu - produktu transaminacji cysteiny [87, 148, 149, 150]. Merkaptopirogronian wprawdzie nie posiada siarki sulfanowej w jej klasycznej definicji, jednak obecność grupy karbonylowej znacznie zwiększa jej reaktywność w porównaniu z siarką cysteiny. Nie można na również w tym przypadku wykluczyć utlenienia do odpowiedniego disiarczku i tautomerizacji do tiosulfoksydu. Tiopirymidyny i metylotiopuryny są normalnymi składnikami tRNA i odgrywają ważną rolę w procesie translacji. Tak więc, chociaż beztlenowe przemiany cysteiny dostarczają związków z siarką sulfanową, niezbędnych dla procesu posttranskrypcyjnej modyfikacji tRNA.

Wykazano również wpływ związków z siarką sulfanową na aktywność komórek związanych z systemem odpornościowym organizmu [87, 89]. W hodowli komórek układu immunologicznego *in vitro*, ze względu na możliwość znacznej stymulacji proliferacji, od dawna powszechnie stosowany jest 2-merkaptoetanol lub I-tioglicerol. Może to być następstwem redukcyjnych właściwości tych tioli, ale może to być także wynikiem z faktu, iż związki te *in situ* mogą być przekształcane do disiarczku z grupami karbonylowymi, co umożliwia ich tautomerizację do związków zawierających siarkę sulfanową. Stosowany w leczeniu AIDS immunotiol (dietyloditiokarbaminian) podnosi *in vivo* odporność organizmu u ludzi i myszy [151, 152, 153]. Związek ten metabolizowany jest do disiarczku węgla, który następnie ulega przekształceniu do związku zawierającego reaktywną siarkę.



Zawierające siarkę sulfanową trisiarczki - tiocystyna (Cys-S-S-S-Cys) oraz elementarna siarka (S<sub>8</sub>) katalizują nieenzymatyczną redukcję cytochromu c przez glutation (GSH) [154, 155].

Ostatnio zaobserwowano również znamienne obniżenie poziomu siarki sulfanowej w osoczu pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek, a proces hemodializy dodatkowo obniża jej poziom w porównaniu z osoczem osób zdrowych [156],

W chwili obecnej niewyjaśnione pozostają także pomiary obecności w mózgu ssaków bogatych w siarkę siarkowodorkową a przemianami związanymi z siarką sulfanową [157].

#### 2.4.2.5. Systemy generuj ce siark sulfanow

Trudno ci , na któr zwraca uwag Toohey jest fakt, e zwi zki zawieraj ce siark sulfanow nie mog by stosowane w wi kszo ci systemów biologicznych, poniewa w fizjologicznym pH s szybko rozkładane i „nie maj czasu” sta si efektywne [87]. Dlatego autor ten proponuje ró nego typu systemy generuj ce siark sulfanow , jak wspomniane wy ej disiarczki z grup allilow karbonylow lub enolow [87, 91, 93]. Jednym z takich systemów mo e by fosforan pirydoksalu i cystyna. Pirydoksal katalizuje nieenzymatyczn reakcj P-eliminacji cystyny, w wyniku której powstaje m.in. wodoronadsiarcezek cysteiny zawieraj cy siark sulfanow (R-S-S\*-H) [87, 93], Innym systemem generuj cym siark sulfanow w hodowli komórkowej mo e by cystamina, której utlenienie przez obecn w surowicy oksydaz diaminow prowadzi do powstania aldehydu, którego izomer zawiera siark sulfanow [87]. Równie disiarczki 2-merkptoetanolu, b d cy substratem dla dehydrogenaz alkoholowych, ulega przekształceniu w disiarczki aldehydowy, którego odpowiedni izomer zawiera siark sulfanow [91, 92, 158], Stabilnym i nietoksycznym źródłem siarki sulfanowej mog by tak e traktowane siarczkami białka (np. nadsiarzki albuminy osocza lub nadsiarzki globuliny jaja kurzego) [89, 91, 92, 94, 96], Z drugiej jednak strony, systemy generuj ce siark sulfanow podane w st eniach wi kszych od optymalnych mog sta si toksyczne i przyczyni si do tworzenia tzw. gigantycznych komórek [87, 91],

Podsumowuj c, siarka sulfanowa powstaje w toku znanych szlaków metabolicznych (ryc. 15), a białka no nikowe, które j stabilizuj i transportuj s szeroko rozpowszechnione. Zwi zki z siark sulfanow skutecznie reguluj *in vitro* aktywno wielu enzymów, a tak e wykazuj wła ciwo ci antyoksydacyjne. Ponadto istnieje zwi zek pomi dzy zaburzonym beztlenowym metabolizmem siarki a procesami nowotworami i infekcjami wirusowymi oraz niedoborami immunologicznymi. Wszystko to razem sugeruje, e siarka sulfanowa poprzez kowalencyjne modyfikacje grup -SH mo e spełnia w komórkach naturalne funkcje regulacyjne, a jej wysoki potencjał aktywno ci i krótki okres półtrwania nadaj jej cechy regulatora o du ej precyzji działania.

### 2.4.3. Metody oznaczania siarki sulfanowej

Dla pełnego poznania biologicznej roli zwi zków z siark sulfanow konieczne jest dysponowanie odpowiednio czułymi metodami oznaczania jej poziomu w materiale biologicznym. Jak ju wspomniano, zwi zki z siark sulfanow łatwo reaguj z cyjankiem z powstaniem tiocyjanianu (rodanku), który reaguje z jonami elaza  $Fe^{3+}$ , daj c czerwony kompleks. Reakcja ta stanowi podstaw najpopularniejszej spektrofotometrycznej metody oznaczania poziomu siarki sulfanowej, po raz pierwszy opisanej przez Wooda [89]. Niestety, metoda ta i jej modyfikacje odznaczaj si ograniczon czułości i specyficzno ci i z tego wzgl du nie nadaj si do oznaczania ladowych ilo ci siarki sulfanowej w materiale biologicznym.

Dlatego te w ostatnich latach trwaj poszukiwania nowych metod umo liwiaj cych precyzyjne oznaczanie zredukowanej siarki sulfanowej. Sórbo i współpracownicy opisali metod chromatografii gazowej do oznaczania siarki sulfanowej zwi zanej z białkami [159], Metoda ta, jakkolwiek dosy precyzyjna, nie pozwala oznacza nie-

białkowych form siarki sulfanowej. Westley i Westley z kolei opracowali metodę z użyciem polarografii, polegającą na przekształceniu siarki sulfanowej (nazywanej przez nich siarko reagującą z cyjankiem) do tiocyjanianu przy użyciu rodanazy jako katalizatora, cyjanku jako akceptora oraz glutationu jako kofaktora [88, 89]. Metoda ta jest czulsza od metody kolorymetrycznej, jednak nie jest dośy pracochłonna i uciążliwa ze względu na skomplikowany system detekcji.



Poszukując nowych metod oznaczania związków z siarko sulfanow, Ogasawara i współpracownicy odkryli, że siarka sulfanowa związana z normalnym ludzkim surowcem może być uwalniana jako siarczek przez redukcję ditiotreitolem [113, 160]. Uwolniony siarczek może być przekształcony w reakcji z p-fenylenodiaminą i jonami elaza  $\text{Fe}^{3+}$  we fluorozującą pochodną - tionin, którą można oznaczyć fluorometrycznie przez HPLC w kombinacji z dializacją gazową [161, 162]. Siarko uwolniony przez redukcję ditiotreitolem Ogasawara nazwał „siarko związany” (*bound sulfur*). Metoda ta odznacza się wysoką czułością i specyficznością, jednak za jej pomocą nie mogą być oznaczane zawierające siarko sulfanow tiosulfoniany i tiosiarczany, ponieważ nie ulegają one redukcji ditiotreitolem [160]. „Siarka związana” (*bound sulfur*) stanowi więc, według Ogasawary, pewną frakcję siarki sulfanowej. Autor ten wprowadził także pojęcie „kwaśnej-labilnej siarki” dla określenia siarki uwolnionej w formie  $\text{H}_2\text{S}$  z białek elazowo-siarkowych pod wpływem kwasu solnego. Ten rodzaj siarki był zlokalizowany głównie w frakcji mitochondrialnej, w przeciwieństwie do „siarki związanej” znalezionej w frakcjach cytozolowych [95]. Te obserwacje są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami o lokalizacji klastrów elazowo-siarkowych w frakcjach mitochondrialnych [163].

Wykorzystując właściwość uwalniania siarki sulfanowej w postaci siarczku poprzez redukcję ditiotreitolem, Toohey oznaczał poziom siarki sulfanowej metodą dyfuzyjną [164]. Uwolniony siarczek dyfunduje w postaci  $\text{H}_2\text{S}$  w szczelnie zamkniętym naczynku dyfuzyjnym i jest wychwytywany przez znajdujący się w środkowej komorze kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy) (DTNB). Tworzący się wtedy produkt reakcji jest oznaczany spektrofotometrycznie.

Każda z metod oznaczania siarki sulfanowej dotyczy innego rodzaju związków zawierających te reaktywne formy siarki. Pojęcie „siarka sulfanowa” odnosi się do całej puli związków zawierających zredukowany atom siarki związany kowalencyjnie z innym atomem siarki, natomiast określenie „siarka związana z białkami”, „siarka związana - uwalniana przez redukcję ditiotreitolem” (*bound sulfur*) oraz „kwaśna-labilna siarka” odnoszą się do poszczególnych klas związków z siarko sulfanow i nie należy używać tych pojęć zamiennie.

## Literatura

- [1] Cooper A.J.L. (1983), *Biochemistry of sulfur containing amino acids*. Ann. Rev. Biochem., 52, 187-222.
- [2] Hell R. (1997), *Molecular physiology of plant sulfur metabolism*. Planta, 202, 138-148.
- [3] Saito K. (2000), *Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino-acid*. Curr. Opin. Plant. Biol., 3, 188-195.
- [4] Gaitonde M.K. (1967), *A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acid*. Biochem. J., 104, 627-633.
- [5] Puka Sundvall M., Eriksson P., Nilsson M., Saudberg M., Lehmann A. (1995), *Neurotoxicity of cysteine: interaction with glutamate*. Brain Res., 705, 65-70.
- [6] Janaky R., Varga V., Hermann A., Saransari P., Oja S.S. (2000), *Mechanism of L-cysteine neurotoxicity*. Neurochem. Res., 25, 1397-1405.
- [7] Madison D.V., Malenka R.C., Nicoll R.A. (1991), *Mechanisms underlying long-term potentiation of synaptic transmission*. Annu. Rev. Neurosci., 14, 379-397.
- [8] Balazs R. (1988), *Metabolic imbalance and nerve cell damage in the brain*. Prog. Brain Res., 73, 447-461.
- [9] Choi D.W., Rothman S.M. (1990), *The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death*. Annu. Rev. Neurosci., 13, 171-181.
- [10] Jesberger J.A., Richardson J.S. (1991), *Oxygen free radicals and brain dysfunction*. Int. J. Neurosci., 57, 1-17.
- [11] Rothman S.M., Olney J.W. (1987), *Excitotoxicity and the NMDA receptor*. Trends. Neurosci., 10, 299-302.
- [12] Choi D.W. (1988), *Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system*. Neuron, 1, 623-634.
- [13] Garthwaite J., Charles S.L., Chess W.R. (1988), *Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain*. Nature, 336, 385-388.
- [14] Lipton S.A., Stamler J.S. (1994), *Actions of redox-related congeners of nitric oxide at the NMDA receptor*. Neuropharmacology, 33, 1229-1233.
- [15] Bredt D.S., Hwang P.M., Snyder S.H. (1990), *Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide*. Nature, 347, 768—770.
- [16] Olney J.W., Zorumski C., Price M.T., Labruyere J. (1990), *L-cysteine, a bicarbonate-sensitive endogenous excitotoxin*. Science, 248, 596-599.
- [17] Ferkany J., Coyle J.T. (1986), *Heterogeneity of sodium dependent excitatory amino acid uptake mechanisms in rat brain*. J. Neurosci. Res., 16, 491-503.
- [18] Volterra A., Trotti D., Tromba C., Floridi S., Rocagni G. (1994), *Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes*. J. Neurosci., 14, 2924-2932.
- [19] Taberner P.V., Pearce M.J., Watkins J.C. (1977), *Inhibition of mouse brain glutamate decarboxylase by some structural analogues of L-glutamic acid*. Biochem. Pharmacol., 26, 345-349.
- [20] Lehmann A., Hagberg H., Orwar O., Sandberg M. (1993), *Cysteine, sulphinate and cysteate: mediators of cysteine toxicity in the neonatal rat brain?* Eur. J. Neurosci., 5, 1398-1412.
- [21] Olney J.W., Ho O.L., Rhee V. (1971), *Cytotoxic effects of acidic and sulfur-containing amino acids on the important mouse central nervous system*. Exp. Brain Res., 14, 61-76.
- [22] Slivka A., Cohen A. (1993), *Brain ischemia markedly elevates levels of the neurotoxic amino acid cysteine*. Brain. Res., 608, 33-37.
- [23] Li X., Wallin C., Weber S.G., Sanberg M. (1999), *Net efflux of cysteine, glutathione and related metabolites from rat hippocampal slices during oxygen/glucose deprivation*. Brain Res., 815, 81-88.

- [24] Eimerl S., Schramm M. (1992), *An endogenous metal appears to regulate NMDA receptor mediated  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx and toxicity in cultured cerebellar granule cells.* Neurosci. Lett., 137, 198—202.
- [25] Aizenman E., Lipton S.A., Loring R.H. (1989), *Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation.* Neuron, 2, 1257-1263.
- [26] Chai Y.B., Lipton S.A. (2000), *Redox modulation of the NMDA receptors.* Cell Mol. Life Sc., 57, 1535-1541.
- [27] Mezyk S.P. (1996), *Determination of the rate constant for the reaction of hydroxyl and oxide radicals with cysteine and aqueous solution.* Radiation Res., 145, 102-106.
- [28] Misra H.P. (1974), *Generation of superoxide free radical during the autooxidation of thiols.* J. Biol. Chem., 249, 2151-2155.
- [29] Wang X.F., Cynader M.S. (2001), *Pyruvate released by astrocytes protects neurons from copper-catalyzed cysteine neurotoxicity.* J. Neurosci., 21, 3322-3331.
- [30] Schoneich C. (1995), *Thiyl radicals, perthiyl radicals and oxidative reactions.* W: *Biothiols in Health and Disease*, Ed. Parcker L., Cadenas E., 21—47.
- [31] Frendo J. (1969), *The role of elementary sulphur and erythrocyte glutathione in the formation of sulphaemoglobin.* Clin. Chim. Acta, 24, 1-4.
- [32] 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.
- [33] Schonbeck N.D., Skalski M., Schafer J.A. (1975), *Reaction of pyridoxal 5'-phosphate, 6-aminocaproic acid, cysteine and penicillamine.* J. Biol. Chem., 250, 5343-5351.
- [34] Cheng F.C., Kuo J.S., Chia L.G., Dryhurst G. (1996), *Elevated 5-S-cysteinyldopamine/homovanillic acid ratio and reduced homovanillic acid in cerebrospinal fluid: possible markers for and potential insight into the pathoetiology of Parkinson s disease.* J. Neural. Transm., 103, 433-446.
- [35] Griffith O.W., Bridges R.J., Meister A. (1978), *Evidence that  $\gamma$ -glutamyl cycle functions in vivo using intracellular glutathione effects of amino acids and selective inhibition of the enzymes.* Proc. Natl. Acad., Sc. USA 75, 5405-5408.
- [36] Schulz J., Lindenau J., Seyfried J., Dichgans J. (2000), *Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration.* Eur. J. Biochem., 267, 4904-4911.
- [37] Zhang F., Dryhurst G. (1994), *Effects of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: New reaction pathways of potential relevance to idiopathic Parkinson s disease.* J. Med. Chem., 37, 1084-1098.
- [38] Li H., Shen X.M., Dryhurst G. (1998), *Brain mitochondria catalyze the oxidation of 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (DHBT-1) to intermediates that irreversibly inhibit complex and scavenge glutathione: potential relevance to the pathogenesis of Parkinson's disease.* J. Neurochem., 71, 2049-2062.
- [39] Zhana F., Dryhurst G. (1993), *Oxidation chemistry of dopamine: Possible insights into the age-dependent loss of dopaminergic nigrostriatal neurons.* Bioorg. Chem., 21, 392-410.
- [40] Hogg N. (2000), *Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols.* Free Rad. Biol. Med., 28, 1478-1480.
- [41] Qujano C., Alvarez B., Gatti R.H., Augusto O., Radi R. (1997), *Pathways of peroxynitrite oxidation of thiols groups.* Biochem. J., 322, 167-173.
- [42] Lipton S.A., Stamler J.S. (1994), *Action of redox-related congeners of nitric oxide at the NMDA receptor.* Neuropharmacology, 33, 1229-1233.
- [43] Brorson J.R., Zhong H. (1997), *Disruptetd ( $\text{Ca}^{2+}$ ) homeostasis contributes to the toxicity of nitric oxide in cultured hippocampal neurons.* J. Neurochem., 69, 1882-1889.
- [44] Bonfoco E., Krainc D., Ankarcrona M., Nicotera P., Lipton S.A. (1995), *Apoptosis and necrosis: two distinct events induces respectively by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 7162-7166.
- [45] D'Emilia D.M., Lipton S.A. (1999), *Ratio of S-nitrosohomocysteine to homocysteine or other thiols determines neurotoxicity in rat cerebrocortical cultures.* Neurosci. Lett., 265, 103-106.



- [46] Strange R.C., Jones P.W., Fryer A.A. (2000), *Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology*. Toxicol. Lett., 112, 357-363.
- [47] Cooper A. J. (1998), *Mechanisms of cysteine-S-conjugates of S-(N-acetyl)-L-cysteine formed during the detoxication of xenobiotics and during the metabolism of such endogenous agents as estrogens and leukotriens*. Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol., 72, 199-238.
- [48] Włodek P., Smole ski O. (2001), *Dlaczego ksenobiotyki (leki) mog by nefrotoksyczne?* Nefrol. Dial. Pol., 5, 12-15.
- [49] Kharasch E.D., Hoffman G.M., Thorning D. (1998), *Role of renal cysteine conjugate fi-lyases*. Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol. Ed. Purich D.L., 72, 199.
- [50] Hwang J.Y., Elfarrar A.A. (1993), *Detection and mechanisms of formation of S-(6-purinyl) glutathione and 6-mercaptapurine in rat given 6-chloro-purine*. J. Pharmacol. Expt. Ther., 264, 41-52.
- [51] Birner G., Werner M., Rosner E. et al. (1998), *Biotransformation excretion and nephrotoxicity of the hexachlorobutadiene sulfoxide*. Chem. Res. Toxicol., 11, P750.
- [52] Henschler D., Vamvakas S., Lammer M. (1995), *Increase incidente of renal tumors in cardboard workers exposed to trichloroethene*. Arch. Toxicol., 69, 291.
- [53] Soleo L., Strzelczyk R. (1999), *Xenobiotici e glutatione*. Ital. Med. Lav. Erg., 21, 302-308.
- [54] Luu N.C., Iyer R.A., Anders M.W., Ridge D.P. (2000), *Bioactivation mechanism of haloalkene cysteine S-conjugates modeled by gas-phase ion-molecule reactions*. Chem. Res. Toxicol., 13, 610-615.
- [55] Rotan R.R., Murphy T.H., Baraban J.M. (1994), *Macromolecular synthesis inhibitors prevent oxidative stress induced apoptosis in embryonic cortical neurons by shunting cysteine from protein synthesis to glutathione*. J. Neurosci., 14, 4385—4392.
- [56] Coppola S., Ghibelli L. (2000), *GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptic signal*. Biochem. Soc. Trans., 28, 56-61.
- [57] Huang J., Schneider R. (1990), *Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis is prevented by the drug 2-aminopurine*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87, 7115-7119.
- [58] Duncan R., Hershey J. (1984), *Heat shock-induced transitional alteration in Hela cells*. J. Biol. Chem., 259, 11882-11889.
- [59] Ferrer I. (1992), *The effect of cykloheximide on natural and X-ray-induced cell death in the developing cerebral cortex*. Brain. Res., 588, 351-357.
- [60] Roberts J.C. (1992), *Amino acids and their derivatives as radioprotective agents*. Amino Acid, 3, 25-52.
- [61] Virsik R.P., Harder D. (1982), *Effect on the dose-effect relationship for chromosome alterations in irradiation human lymphocytes*. Int. J. Radial. Biol., 53, 272-281.
- [62] Hahn R., Wendel A., Flahe L. (1978), *The fate of extracellular glutathione in rat*. Biochim. Biophys. Acta, 529, 324-337.
- [63] Kelly G.S. (1998), *Clinical applications of N-acetylcysteine*. Altern. Med. Rev., 3, 114-127.
- [64] Jain A., Madsen D.C., Auld P.A., Frayer W.W., Schwartz M.K., Meister A., Martensson J. (1995), *L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate, a cysteine precursors stimulates growth and normalises tissue glutathione concentrations in rats on sulfur amino acid-deficiency diet*. Nutr., 125, 851-856.
- [65] Włodek L., Rommelspacher H. (1997), *2-methyl-thiazolidine-2m4-dicarboxylic acid protect against paracetamol induced toxicity in human liver HepG2 cells*. Acta Biochim. Pol., 44, 759-766.
- [66] Xu Z., Wood T.C., Adjei A. A., Weinshilboum R.M. (2001), *Human 3'-phosphoadenosine 5' -phosphosulfate synthase: radiochemical enzymatic assay biochemical properties and hepatic variation*. Drug. Metab. Dispos., 29, 172-178.
- [67] Boobis A.R., Fawthrop D.J., Seddom C.E., Speirs C.J., Davies D.S. (1992), *Variability in the pharmacokinetics and metabolism of acetaminophen*. W: Kalow W. ed. Pharmacogenetics of Drug Metabolism 32, Pergamon Press. New York, 791-812.

- [68] Fadden S. A. (1996), *Phenotypic variation in xenobiotic metabolism and adverse environmental response: focus on sulfur-dependent detoxification pathways*. Toxicology, 111, 43-65.
- [69] Berzin T.M., Zipser B.D., Rafli M.S., Kuo-Leblac V., Joncopoulos G.D., Glass D.J., Fallon J.R., Stopa E.G. (2000), *Agtrin and microvascular damage in Alzheimer's disease*. Neurobiol. Aging, 21,349-355.
- [70] David G., Wassely P., de Waal R.M. (1999), *Agtrin is a major heparan sulfate proteoglycan accumulating in Alzheimer disease brain*. Amer. J. Pathol., 155,2115-2125.
- [71] Lee A., Beck L., Brown R.J., Markovich D. (1999), *Identification of a mammalian brain sulfate transporter*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 263, 123-129.
- [72] Heafield M.T., Fearn S., Steventon G.B., Waring R.H., Wiliamns A.C., Sturman S.G. (1990), *Plasma cysteine and sulphate levels in patients with motor neurone, Parkinson's and Alzheimer's disease*. Neurosci. Lett., 110, 216-220.
- [73] Jimenez-Jimenez F.J., Molina J.A., Aguilar M.V., Jorge-Santamaria A., Mateos-Vega C.J., Gonzales-Munoz M.J., Cabrera-Valdivia F., Ayuso-Peraita L. et al. (1995), *Plasma levels of inorganic sulfates in patient with Parkinson's disease*. Acta Neurol. Scand., 92, 369-371.
- [74] Allain P., Le-Bonil A., Cordiliet E., Le-Quay L., Bagheri H., Montastruc LL'. (1995), *Sulfate and cysteine levels in the plasma of patients with Parkinson's disease*. Neurotoxicology, 16, 527-529.
- [75] O'Reilly B.A., Waring R.H. (1993), *Enzyme and sulphur oxidation deficiencies in autistic children with known food/chemical intolerances*. J. Orthomol. Med., 8, 198-200.
- [76] Waring R.H., Ngong J.M. (1993), *Sulphate metabolism in allergy-induced autism: relevance to the disease aetiology*. W: *Biological Perspectives in Autism*. Ed. The Autism Research Unit, University of Sunderland, 25-33.
- [77] Davies M.H., Klovzra L., Waring R.H., Elias E. (1994), *Plasma cysteine and sulphate levels in patients with cirrhosis of the liver*. Clin. Sci., 87, 357-367.
- [78] Bradley H., Gough A., Sokhi R.S., Hassel A., Waring R., Emery P. (1994), *Sulfate metabolism is abnormal in patients with rheumatoid arthritis. Confirmation by in vivo biochemical findings*. J. Rheumatol., 21, 1192-1196.
- [79] Darling J.M., Mammarella M.L., Chen Q., Morris M.E. (1994), *Salicylate inhibits the renal transport of inorganic sulfate in rat membrane vesicle preparations*. Drug Metabol. Dispos., 22, 318-323.
- [80] Olivieri G., Baysang G., Meier F., Muller-Spahn E., Stahelin H.B., Brockmans M., Brock C. (2001), *N-acetyl-L-cysteine protects SHSY5Y neuroblastoma cells from oxidative stress and cell cytotoxicity*. J. Neurochem., 76, 224-233.
- [81] Droge W., Breitkreutz R. (1999), *N-acetyl-cysteine in the therapy of HIV-positive patients*. Opn. Nutr. Metab., Care 2, 493—498. *Role of cysteine and glutathione in HIV infection and cancer cachexia: therapeutic intervention*. W: *N-acetylcysteine*. Adv. Pharmacol., 38, 581-600.
- [82] Elias E., Waring R.H. (1989), *Impaired sulfoxidation in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 10, 1027.
- [83] Emery P., Salmon M., Bradley H., Wordworth P., Tunn E., Bacon P.A., Waring R. (1992), *Genetically determined factors as predictors of a radiological change in patients with early symmetrical arthritis*. Br. Med. J., 305, 1387-1389.
- [84] Greenwood K., Cox P., Mehmet H., Penrice J., Amess P.N., Cady E.B., Wyatt J.S., Edwards A.D. (2000), *Magnesium sulfate treatment after transparent hypoxia-ischemia in the newborn piglet does not protect against cerebral damage*. Pediatric. Res.. 48, 346-350.
- [85] Hallak M., Hositya J.W., Custodio D., Kruger M.L. (2000), *Magnesium prevents seizure-induced reduction in excitatory amino acid receptor (kainate-4-propionic acid) binding in pregnant rat brain*. Am. J. Obstet. Gynecol., 183, 793-798.
- [86] AJA-USA (1995), *Autism, intolerance and Allergy Network-USA*. Contact: D. Tritschler, 5605 Dutchman D., Raleigh NC 27606.

- [87] Toohey JI. (1989), *Sulfane sulphur in biological systems: a possible regulatory role*. Biochem. J., 264, 625-632.
- [88] Westley A.M., Westley JI. (1991), *Biological sulfane sulfur*. Anal. Biochem., 195, 63-67.
- [89] Wood J.L. (1987), *Sulfane sulfur*. Meth. Enzymol., 143, 25-29.
- [90] Szczepkowski T.W., Wood J.L. (1967), *The cystathionase-rhodanase system*. Biochim. Biophys. Acta, 139, 469—478.
- [91] Toohey JI. (1986), *Persulfide sulfur is a growth factor for cells defective in sulfur metabolism*. Biochem. Cell Biol., 64, 758-765.
- [92] Westley J.A.H., Westley L.N.C. (1983), *The sulfurtransferases*. Fundam. Appl. Toxicol., 3, 377-382.
- [93] Ogasawara Y., Isoda S., Tanabe S. (1994), *Tissue and subcellular distribution of bound and acid-labile sulfur, and the enzymic capacity for sulfide production in the rat*. Biol. Pharm. Bull., 17, 1535-1542.
- [94] Cavallini D., Federici G., Barboni E. (1970), *Interaction of proteins with sulfide*. Eur. J. Biochem., 14, 169-174.
- [95] Benevenga N.J. (1984), *Evidence for alternative pathways of methionine catabolism*. Adv. Nutr. Res., 6, 1-18.
- [96] Ricci G., Nardini M., Federici G., Cavallini D. (1986), *The transamination of L-cystathionine, L-cystine and related compounds by a bovine kidney transaminase*. Eur. J. Biochem., 157, 57—63.
- [97] Backlund P.S., Smith R.A. (1981), *Methionine synthesis from 5'-methylthioadenosine in rat liver*. J. Biol. Chem., 256, 1533-1535.
- [98] Blom H.J., van den Elzen J.P., Yap S.H., Tangerman A. (1988), *Methanethiol and dimethylsulfide formation from 3-methylthiopropionate in human and rat hepatocytes*. Biochim. Biophys. Acta, 972, 131-136.
- [99] Valentine W.N., Toohey JI., Paglia D.E., Nakatani M., Brockway R.A. (1987), *Modification of erythrocyte enzyme activities by persulfides and methanethiol: possible regulatory role*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1394^1398.
- [100] Chen S., Zieve L., Mahadevan V. (1970), *Mercaptans and dimethyl sulfide in the breath of patients with cirrhosis of the liver. Effect of feeding methionine*. J. Lab. Clin. Med., 75, 628-635.
- [101] Matsumoto K.E., Partridge D.H., Robinson A.B., Pauling L., Flath R.A., Mon T.R., Teranishi R. (1973), *The identification of volatile compounds in human urine*. J. Chromatogr., 85, 31-34.
- [102] Skar y ski B., Szczepkowski T.W., Weber M. (1960), *Investigation on the oxidation of thiosulfate in the animals organisms*. Acta Biochim. Pol., 7, 105.
- [103] Skar y ski B., Szczepkowski T.W., Weber M. (1961), *The metabolic state of thiosulfate*. Nature, 189, 1007-1008.
- [104] Koj A., Frendo J., Janik Z. (1967), *[<sup>35</sup>S] Thiosulfate oxidation by rat liver mitochondria in the presence of glutathione*. Biochem. J., 103, 791-759.
- [105] Wróbel M., Frendo J., Cannella C. (1992), *Seasonal changes in the activity of rhodanase in frog (Rana temporaria) liver*. Comp. Biochem. Physiol., 103B, 469-472.
- [106] Wróbel M., Ubuka T., Yao W.B., Abe T. (2000), *Effects of thyroxine on L-cysteine desulfuration in mouse liver*. Acta Med. Okayama, 54, 9-14.
- [107] Wróbel M. (2001), *Sulftransferase activity and sulfur compound content in Rana temporaria brain following hibernation*. Acta Neurobiol. Exp., 61, 69-72.
- [108] Wróbel M., Sura P., Srebro Z. (2000), *Sulftransferases and the content of cysteine, glutathione and sulfane sulfur in tissues of the frog Rana temporaria*. Comp. Biochem. Physiol., 125B, 211—217.
- [109] Wróbel M., Frendo J. (1992), *The effects of cAMP and some sulfur compounds upon the activity of mercaptopyruvate sulphurtransferase and rhodanase in mouse liver*. Folia Biológica, 40, 11-14.

- [110] Buzaleh A.M., Vazquez E.S., Batlle A.M. (1989), *Cyanide intoxication-I. An oral chronic animal model*. Gen Pharmac., 20, 323–327.
- [111] Porter D.W., Nealley E.W., Baskin S.I. (1996), *In vivo detoxification of cyanide by cystathionase  $\gamma$ -lyase*. Biochem. Pharmacol., 52, 941-944.
- [112] Taniguchi T., Kimura T. (1974), *Role of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the formation of the iron-sulfur chromophore of adrenal ferredoxin*. Biochim. Biophys. Acta, 364, 284-295.
- [113] Ogasawara Y., Isoda S., Tanabe S. (1995), *Reconstitution of an iron-sulfur cluster with bound sulfur: a possible source of acid-labile sulfur in biological systems*. Biol. Pharm. Bull., 18, 1045-1048.
- [114] Massey V., Edmondson D. (1970), *On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide*. J. Biol. Chem., 245, 6595-6598.
- [115] Branzoli U., Massey V. (1974), *Evidence for an active site persulfide residue in rabbit liver aldehyde oxidase*. J. Biol. Chem., 249, 4346-4349.
- [116] Agro A.F., Mavelli I., Cannella C., Federici G. (1976), *Activation of porcine heart mitochondrial malate dehydrogenase by zero valence sulfur and rhodanese*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 68, 553-560.
- [117] Sandy J.D., Davies R.C., Neuberger A. (1975), *Control of 5-aminolevulinic acid synthetase activity in Rhodospirillum rubrum*. Biochem. J., 150, 245-257.
- [US] Yamanishi T., Tuboi S. (1981), *The mechanism of the L-cystine cleavage reaction catalyzed by rat liver gamma-cystathionase*. J. Biochem., 89, 1913-1921.
- [119] Pontremoli S., Traniello S., Enser M., Shapiro S., Horecker B.L. (1967), *Regulation of fructose diphosphatase activity by disulfide exchange*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 58, 286-293.
- [120] Kato A., Ogura M., Suda M. (1966), *Control mechanism in the rat liver enzyme system converting L-methionine to L-cystine. 3. Noncompetitive inhibition of cystathionine synthetase-serine dehydratase by elemental sulfur and competitive inhibition of cystathionase-homoserine dehydratase by L-cysteine and L-cystine*. J. Biochem., 59, 40-48.
- [121] Pestaña A., Sols A. (1970), *Reversible inactivation by elemental sulfur and mercurials of rat liver serine dehydratase and certain sulfhydryl enzymes*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 39, 522-529.
- [122] Conner J., Russell P.I. (1983), *Elemental sulfur: a novel inhibitor of adenylate kinase*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 113, 348-352.
- [123] Russell P.J., Conner J., Sisson S. (1984), *Sulfur specifically inhibits adenylate kinase in assays for creatine kinase*. Clin. Chem., 30, 1555-1557.
- [124] Hargrove J.L., Wichman R.D. (1987), *A cystine-dependent inactivator of tyrosine aminotransferase co-purifies with gamma-cystathionase (cystine desulfurase)*. J. Biol. Chem., 262, 7351–7357.
- [125] Murakami Y., Kameji T., Hayashi S. (1984), *Cysteine-dependent inactivation of hepatic ornithine decarboxylase*. Biochem. J., 217, 573-580.
- [126] Fanelli S.L., Castro G.D., de Toranzo E.G.D., Castro J.A. (1998), *Mechanisms of the preventive properties of some garlic components in the carbon tetrachloride-promoted oxidative stress. Diallyl sulfide: diallyl disulfide: allyl mercaptan and allyl methyl sulfide*. Res. Commun. Mol. Pathology Pharmacol., 102, 163-174.
- [127] Sheen L.Y., Chen H.W., Kung Y.L., Liu C.T., Lii C.K. (1999), *Effects of garlic oil and its organosulfur compounds on the activities of hepatic drug-metabolizing and antioxidant enzymes in rats fed high- and low-fat diets*. Nutr. Cancer, 35, 160-166.
- [128] Perchellet J.P., Perchellet E.M., Abney N.L., Zirnstein J.A., Belman S. (1986), *Effects of garlic and onion oils on glutathione peroxidase activity, the ratio of reduced/oxidized glutathione and ornithine decarboxylase induction in isolated mouse epidermal cells treated with tumor promoters*. Cancer Biochem. Biophys., 8, 299-312.
- [129] Everett S.A., Folkes L.K., Wardman P. (1994), *Free-radical repair by a novel perthiol: reversible hydrogen transfer and perthyl radical formation*. Free Rad. Res., 20, 387-400.

- [130] Everett S.A. (1995), *Antioxidant drug design: a comparison of thiol and prooxidant reaction mechanisms*. W: *Biothiols in Health and Disease*. Ed. Packer L. and Cadenas E., New York, 49-64.
- [131] Włodek L., Wróbel M., Czubak J. (1993), *Transamination and transsulphuration of L-cysteine in Ehrlich ascites tumor cells and mouse liver. The nonenzymatic reaction of L-cysteine with pyruvate*. *Int. J. Biochem.*, 25, 107-112.
- [132] Apple M.A., Greenberg D.M. (1969), *Inhibitory effect of DL-2-mercapto-3-hydroxypropanal on growth of transplantable cancers in mice*. *Cancer Chem. Reports*, 53, 195-198.
- [133] Apffel C.A., Walker J.E., Issarescu S. (1975), *Tumor rejection in experimental animals treated with radioprotective thiols*. *Cancer Res.*, 35, 429-437.
- [134] Tatsuta M., Iishi H., Yamamura H., Baba M., Mikuni T., Tanigushi H. (1988), *Inhibitory effect of prolonged administration of cysteamine on experimental carcinogenesis in rat stomach induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine*. *Int. J. Cancer*, 41, 423-426.
- [135] Marquardt H., Sapozink M.D., Zedeck M.S. (1974), *Inhibition by cysteamine-HCl of oncogenesis induced by 7,12-dimethylbenz(alpha)anthracene without affecting toxicity*. *Cancer Res.*, 34, 3387-3390.
- [136] Dausch J.G., Nixon D.W. (1990), *Garlic: A review of its relationship to malignant disease*. *Prev. Med.*, 19, 346-361.
- [137] Agarwal K.C. (1996), *Therapeutic actions of garlic constituents*. *Med. Res. Rev.*, 16, 111-124.
- [138] Fukushima S., Takada N., Hori T., Wanibuchi H. (1997), *Cancer prevention by organosulfur compounds from garlic and onion*. .1. *Cell. Biochem. Suppl.*, 27, 100-105.
- [139] Singh S.P., Abraham S.K., Kesavan P.C. (1995), *In vivo radioprotection with garlic extract*. *Mutation Res.*, 345, 147-153.
- [140] You W.C., Blot W.J., Chang Y.S., Ershow A., Yang Z.T., Henderson B.E., Fraumeni J.F., Wang T.G. (1989), *Allium vegetables and reduced risk of stomach cancer*. *J. Natl. Cancer Inst.*, 81, 162-164.
- [141] Dorant E., van den Brandt P.A., Goldbohm R.A. (1996), *A prospective cohort study on the relationship between onion and leek consumption, garlic supplement use and the risk of colorectal carcinoma in The Netherlands*. *Carcinogenesis*, 17, 477-484.
- [142] Knowles L.M., Milner J.A. (1998), *Depressed p34<sup>cdc2</sup> kinase activity and G<sub>2</sub>M phase arrest induced by diallyl disulfide in HCT-15 cells*. *Nutr. Cancer*, 30, 169-174.
- [143] Pinto J.T., Qiao C., Xing J., Rivlin R.S., Protomastro M.L., Weissler M.L., Tao Y., Thaler H., Heston W.D.W. (1997), *Effect of garlic thioallyl derivatives on growth, glutathione concentration, and polyamine formation of human prostate carcinoma cells in culture*. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66, 398-405.
- [144] Sundaram S.G., Milner J.A. (1996), *Diallyl disulfide inhibits the proliferation of human tumor cells in culture*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1315, 15-20.
- [145] Iciek M., Rokita A., Włodek L. (2001), *Effects of diallyl disulfide and other donors of sulfane sulfur on the proliferation of human hepatoma cell line (HepG2)*. *Neoplasma*, 48, 307-312.
- [146] Wróbel M., Włodek L. (1997), *Effects of thiazolidine-4(R)-carboxylates and other low-molecular-weight sulfur compounds on the activity of mercaptopyruvate sulfurtransferase, rhodanase and cystathionase in Ehrlich ascites tumor cells and tumor-bearing mouse liver*. *Amino Acids*, 12, 309-314.
- [147] Stamler J.S. (1995), *S-nitrosothiols and the bioregulatory actions of nitrogen oxides through reactions with thiol groups*. *Current Top. Microbiol. Immunol.*, 196, 19-36.
- [148] Ajitkumar P., Cherayil J.D. (1988), *Thionucleosides in transfer ribonucleic acid: diversity, structure, biosynthesis, and function*. *Microbiological Rev.*, 52, 103-113.
- [149] Wong T.W., Harris M.A., Jankowicz C.A. (1974), *Transfer ribonucleic acid sulfurtransferase isolated from rat cerebral hemispheres*. *Biochemistry*, 13, 2805-2812.
- [150] Wong T.W., Harris M.A., Morris H.P. (1975), *The presence of an inhibitor of RNA sulfurtransferase in Morris hepatomas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65, 1137-1145.

- [151] Renoux G., Renoux M. (1977), *Thymus-like activities of sulphur derivatives on T-cell differentiation*. J. Exp. Med., 145, 466-471.
- [152] Pompidou A., Delsaux M.C., Telve L., Mace B., Coutance F., Falkenrodt A., Lang J.M. (1985), *Isopropinosine and imuthiol, two potentially active compounds in patients with AIDS-related complex symptoms*. Cancer Res., 45, 4671-4673.
- [153] Lang J.M., Touraine J.L., Trepo C., Choutet P., Kirstetter M., Falkenrodt A., Herviou L., Livrozet J.M., Retornaz G., Touraine F. (1988), *Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of ditiocarb sodium ('Imuthiol) in human immunodeficiency virus infection*. Lancet, 2, 702—706.
- [154] Massey V., Williams C.H., Palmer G. (1971), *The presence of S degrees-containing impurities in commercial samples of oxidized glutathione and their catalytic effect on the reduction of cytochrome c*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, 730-738.
- [155] Prutz W.A. (1993), *Sulfane-activated reduction of cytochrome c by glutathione*. Free Rad. Res. Commun., 18, 159-165.
- [156] Włodek P.J., Iciek M.B., Milkowski A., Smole ski O.B. (2001), *Various forms of plasma cysteine and its metabolites in patients undergoing hemodialysis*. Clin. Chim. Acta, 304, 9-18.
- [157] Srebro Z., Lach H. (1972), *X-ray- and UV-induced increase in number of cysteine-rich periventricular glial cells in the brains of rats and mice*. Acta Biol. Sci. Hung., 23, 145-151.
- [158] Geren C.R., Olomon C.M., Jones T.T., Ebner D.E. (1977), *2-Mercaptoethanol as a substrate for liver alcohol dehydrogenase*. Arch. Biochem. Biophys., 179, 415—419.
- [159] Hannestad U., Margheri S., Sorbo B. (1989), *A sensitive gas chromatographic method for determination of protein-associated sulfur*. Anal. Biochem., 178, 394—398.
- [160] Ogasawara Y., Ishii K., Togawa T., Tanabe S. (1993), *Determination of bound sulfur in serum by gas dialysis/high-performance liquid chromatography*. Anal. Biochem., 215, 73—81.
- [161] Ogasawara Y., Ishii K., Togawa T., Tanabe S. (1991), *Determination of trace amounts of sulphide in human red blood cells by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection after derivatization with p-phenylenediamine and iron (III)*. Analyst, 116, 1359—1363.
- [162] Togawa T., Ogawa M., Nawata M., Ogasawara Y., Kawanabe K., Tanabe S. (1992), *High performance liquid chromatographic determination of bound sulfide and thiosulfate at their low levels in human serum by pre-column fluorescence derivatization with monobromobimane*. Chem. Pharm. Bull., 40, 3000-3004.
- [163] Miller R.W. (1970), *Estimation of labile sulfide content of cellular components*. Anal. Biochem., 35, 181-192.
- [164] Toohey J.I. (1983), *Ketomethylthiobutyric acid formation from methylthioadenosine: a diffusion assay*. Arch. Biochem. Biophys., 223, 533-542.