

WYKAZ SKRÓTÓW DO TŁUMACZENIA

- ADT - ditiolotion anetolu
AMPA - kwas a-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izooksazolopropionowy
AP-5 - kwas 2-amino-5-fosfonowalerianowy
AP-7 - kwas 2-amino-7-fosfonoheptanowy
BSO - butioninosulfoksyimina
BT - benzotiazyna
c-AMP - cykliczny adenozyntomonofosforan
CGP 37849 - kwas DL-(E)-2-amino-4-metylo-5-fosfono-3-walerianowy
CGP 39551 - ester etylowy kwasu (E)-2-amino-4-metylo-5-fosfono-3-walerianowego
CGS 19755 - kwas cis-4-fosfometylo-2-piperydynowy
CPP - kwas 3-(2-karboksypiperazyno-4-ilo)propylo-1-fosfonowy
Cys - cysteina
Cys-Gly - cysteiny logi icyna
DA - dopamina
DTNB - 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoesowy
DTT - ditiotreitól
Glu-glutaminian
Gly - glicyna
GPx - peroksydaza glutationowa
GR - reduktaza glutationowa
GSH - glutation (forma zredukowana)
GSNO - nitrozoglutation
GSSG - disiarczerek glutationu
γ-Glu-Cys - glutamylcysteina
γ-GT - γ-glutamylotranspeptydaza
H₂O₂ - nadtlenek wodoru
L-DOPA - 3,4-dihydroksyfenylo-L-alanina
MAO - monoaminooksydaza
MK-801 - maleinian 5-metylo-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyklohepteno-5,10-iminy
MPP⁺ - jon 1-metylo-4-fenylpirydynowy
MPTP- 1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyna
NAC - N-acetylocysteina
NADPH - fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NMDA - kwas N-metylo-D-asparaginowy
NO[•] - rodnik tlenku azotu
O₂⁻ - anionrodnik ponadtlenkowy
OH[•] - rodnik hydroksylowy
6-OHDA - 6-hydroksydopamina
ONOO - nadtlendioazotyn
OTC - kwas 2-oksotiazolidyno-4-karboksylowy
RFT - reaktywne formy tlenu
5-S-Cys-DA - 5-S-cysteinyldopamina

5. GLUTATION

Metabolizm i biologiczna rola w o rodkowym układzie nerwowym (OUN)

El bieta Lorenc-Koci

5.1. Wprowadzenie

Stres oksydacyjny jest zjawiskiem polegającym na pojawieniu się w obrębie komórki szeregu cytopatologicznych zmian, będących następstwem kaskady reakcji wolnorodnikowych. Do peroksydatywnych uszkodzeń dochodzi wtedy, gdy procesy generujące reaktywne formy tlenu (RFT) w komórce przeważają nad możliwościami ich usuwania przez system antyoksydacyjnej obrony. Źródłami wolnych rodników w komórkach są procesy metaboliczne, a szczególnie rolę odgrywa mitochondrialny metabolizm oksydacyjny, peroksydacja lipidów, szlaki proteolityczne oraz tlenek azotu [1, 2]. W warunkach fizjologicznych w komórkach panuje stan równowagi pomiędzy powstawaniem wolnych rodników a ich „wymiataniem” przez system obrony antyoksydacyjnej. Przesunięcie stanu równowagi na korzyść procesów oksydacyjnych prowadzi do stresu oksydacyjnego i ma miejsce w pewnych stanach patologicznych. Wśród przyczyn prowadzących do zachwiania równowagi oksydacyjno-redukcyjnej należy wymienić: utratę czynników redukujących [3, 4], obniżenie aktywności enzymów o antyoksydacyjnym działaniu [5, 6] oraz nasilenie produkcji wolnych rodników pod wpływem czynników endo- lub egzogennych [7]. Wolne rodniki mogą uszkadzać DNA [1, 8] oraz enzymy i białka strukturalne [9], wywołują peroksydację lipidów [1, 10] oraz indukować reakcje autooksydacyjne, takie jak np. polimeryzacja katecholamin [11]. Oksydacyjnie zmodyfikowane cząsteczki zaburzają prawidłowe funkcje komórek, co w konsekwencji może prowadzić do ich śmierci na drodze apoptozy lub nekrozy.

Mózg różni się od innych organów ciała pod względem intensywności reakcji generujących oraz usuwających wolne rodniki. W przypadku człowieka mózg, pomimo że stanowi zaledwie 2% wagi ciała, zużywa aż 20% tlenu pobieranego przez cały organizm [12]. Tak wysoki procent zużycia tlenu wskazuje, że mózg jest narządem, w którym produkcja RFT w procesie fosforylacji oksydacyjnej jest niezwykle wysoka. Neurony są komórkami szczególnie wrażliwymi na stres oksydacyjny ze względu na niską aktywność enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza i peroksydaza glutationowa, oraz wysoki poziom aktywności metabolicznej. Neurony są ponadto komórkami niepodlegającymi replikacji, dlatego ich ubytek w mózgu osobników dorosłych nie może być kompensowany [13]. Tkanka mózgowa jest bogata w lipidy zawierające nienasycone kwasy tłuszczowe, łatwo może ulegać uszkodzeniom peroksydacyjnym [1, 14]. Obecność w pewnych komórkach mózgu znacznych ilości jonów metali przejściowych, takich jak żelaza (Fe), miedzi (Cu) i manganu (Mn) może dodatkowo sprzyjać powstawaniu reaktywnych form tlenu. Ko-

mórkowymi markerami stresu oksydacyjnego są: a) obniżony poziom czynników redukcyjnych - glutationu, askorbinianu i α-tokoferolu, b) wzrost poziomu disiaczku glutationu (GSSG), c) wzrost poziomu peroksydacyjnie uszkodzonych cz. steczek lipidów, białek oraz DNA [15].

Dane kliniczne, uzyskane z badań nad ludzkim mózgiem, jak i eksperymentalne z modeli zwierzęcych imitujących niektóre schorzenia neurodegeneracyjne, sugerują, że stres oksydacyjny może być czynnikiem odpowiedzialnym za śmierć pewnych neuronów w chorobie Parkinsona, Alzheimerza oraz w stwardnieniu zanikowym bocznym [2, 16, 17]. Wszystkie te badania wskazują równocześnie, że sprawnie działający system obrony antyoksydacyjnej ma niezwykle ważne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania mózgu w ciągu długich lat życia człowieka. Jednym z najważniejszych antyoksydantów chroniącym komórki mózgu przed atakiem wolnych rodników jest glutation (GSH). Niedobór tego peptydu wywołany u noworodków szczura podaniem nieodwracalnego inhibitora syntetazy γ-glutamylcysteinowej, butioninosulfoksyminy (BSO) prowadzi do uszkodzenia mitochondriów w komórkach kory mózgowej [18]. Ponadto inhibitor ten nasila toksyczne efekty związane z podwyższoną produkcją wolnych rodników np. podczas niedokrwienia [19] lub po podaniu modelowych neurotoksyn, takich jak 1-metylo-4-fenylpirydyny (MPP⁺) [20] lub 6-hydroksydopaminy (6-OHDA) [21]. Działanie powyższych neurotoksyn w warunkach niedoboru GSH może być rozważane w aspekcie patogenezy choroby Parkinsona, w przebiegu której dochodzi do obniżenia stężenia tego peptydu w cz. ci. zbitnej substancji czarnej [3, 4]. Bardziej szczegółowo o tej chorobie będzie mowa później.

W rozdziale tym zostaną kolejno omówione funkcje, lokalizacja, transport i metabolizm GSH w mózgu w warunkach fizjologicznych oraz w schorzeniach neurologicznych, w których dochodzi do zmian w stężeniu lub metabolizmie GSH w różnych obszarach układu nerwowego.

5.2. Glutation w układzie nerwowym

5.2.1. Podstawowe funkcje glutationu

Glutation jest najbardziej rozpowszechnionym niskocząsteczkowym związkiem tiolowym w centralnym układzie nerwowym. Aktualnie dostępne dane literaturowe wskazują, że spośród wielu fizjologicznych funkcji tego peptydu najważniejsze i najlepiej poznane są jego zdolności redukcyjne. Zredukowany glutation (GSH) usuwa wolne rodniki i tym samym chroni błony komórkowe, DNA i białka przed stresem oksydacyjnym, a także przed ksenobiotykami. W komórce GSH jest niezbędny do utrzymywania grup hydrosulfidowych białek w formie zredukowanej, czyli do zachowania tiolowego potencjału redoksowego [22]. Obecność GSH jest konieczna w procesie podziału komórki [23], w regulacji wewnątrzkomórkowego metabolizmu oraz w procesie apoptozy [24, 25]. Badania ostatnich lat wskazują ponadto, że GSH oprócz dobrze znanego działania antyoksydacyjnego [26] może również pełnić w mózgu rolę specyficznego modulatora transmisji glutaminianergicznej oraz nowego neuroprzekaznika [27, 28].

5.2.2. Rozmieszczenie glutationu w tkance nerwowej

GSH występuje zarówno w centralnym, jak i obwodowym systemie nerwowym. Jego stężenie w mózgu człowieka, małpy i szczura jest stosunkowo wysokie i waha się od 2 do 3 mM [29, 30], natomiast w płynie mózgowo-rdzeniowym jest bardzo niskie i wynosi u człowieka około 5 pM [26, 31], a u szczura 0,2 pM [32]. Zredukowany GSH jest postacią dominującą w układzie nerwowym (99,8%), zaś forma utleniona disulfidowa (GSSG) stanowi znikomą jego frakcję (0,2%) [29]. Rozmieszczenie GSH w tkance mózgowej jest bardzo nierównomierne.

Mózg jest wysoce heterogennym organem z dużej ilości różnego typu komórek, zarówno neuronalnych, jak i nieneuronalnych. Komórki mózgu charakteryzują się znacznym morfologicznym zróżnicowaniem, a w pojedynczej komórce istnieje duża biochemiczna kompartmentacja. Badania histochemiczne z użyciem specyficznych barwników fluorescencyjnych, takich jak oranż ortocjowy lub aldehyd ftalowy, ujawniły, że GSH znajduje się głównie w komórkach glejowych oraz w aksonach i w zakończeniach komórek nerwowych [33, 34]. Ciaśła komórek nerwowych pozostawały zwykle niewybarwione, a więc były pozbawione GSH, lub charakteryzowały się słabą barwnością świadcząca o niskiej zawartości tego peptydu. Bardziej selektywne badania immunohistochemiczne z zastosowaniem specyficznego przeciwciała dla GSH potwierdziły powyżej opisaną rozmieszczenie tego peptydu w komórkach układu nerwowego [35]. Na poziomie komórkowym GSH zlokalizowano metodą immunohistochemiczną w cytoplazmie, mitochondriach oraz w jądrze komórkowym w różnych typach komórek mózgu [35].

Ilościowe oznaczenia GSH w tkance nerwowej były prowadzone przy użyciu metody spektrofotometrycznej opartej na reakcji Ellmana lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją elektrochemiczną (HPLC) [36, 37]. Stężenie GSH w neuronach, astrocytach i innych typach komórek glejowych obliczono na podstawie oznaczeń wykonanych na kulturach komórkowych. Badania te jednoznacznie wskazują, że ilość tego peptydu w astrocytach hodowli pierwotnych jest znacznie wyższa niż w neuronach [26, 38, 39]. W astrocytach ilość ta wynosi 30 do 80 nmol/mg białka, co odpowiada stężeniu od 8 do 20 mM, natomiast w neuronach - 1 do 40 nmol/g białka, co odpowiada stężeniu od 0,25 do 10 mM [38, 40]. Istnieje wiele przyczyn tak dalece zróżnicowanego stężenia GSH w neuronach i astrocytach. Jedną z nich wydaje się pochodzenie komórek pobieranych do hodowli. Badania Langevelde i współpracowników [41] wykazują, że neurony kory mózgowej zawierają mniej GSH niż astrocyty pochodzące z tego obszaru mózgu, natomiast zarówno neurony, jak i astrocyty prekoria i ród mózgowia posiadają podobną ilość tego peptydu. Z kolei badania z zastosowaniem techniki podwójnego barwienia GSH i białka hydroksylazy tyrozyny w kulturach komórek ród mózgowia wykazują, że neurony dopaminergiczne charakteryzują się znacznie niższą zawartością tego peptydu niż pozostałe komórki tych hodowli [41]. Niskie stężenie GSH w neuronach dopaminergicznych jest częściowo spowodowane podatnością tych komórek na działanie stresu oksydacyjnego. Metabolizm GSH w hodowanych astrocytach i innych typach komórek glejowych oraz w neuronach będzie omówiony w podrozdziale 5.2.5.

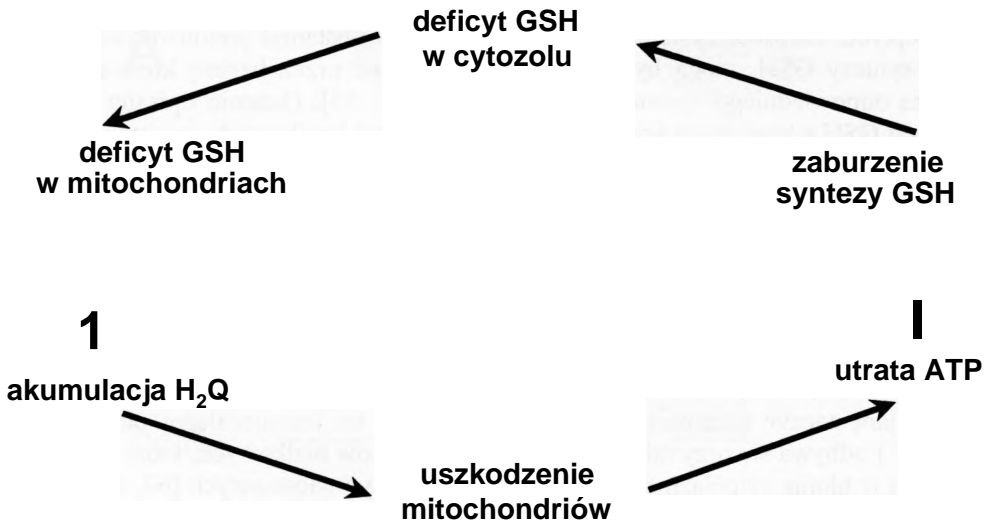
5.2.2.1. Rozmieszczenie glutationu w komórce

GSH znajdujący się w komórce przynależy do dwóch frakcji: cytozolowej (90%) i mitochondrialnej (10%) [42]. W cytozolu komórki znajdują się również enzymy odpowiedzialne za syntezę tego peptydu, których brak jest w mitochondriach. W mitochondriach występuje natomiast peroksydaza i reduktaza glutationowa oraz NADPH, czyli kompletny system enzymatyczny służący do usuwania nadtlenu wodoru (H_2O_2). Peroksydaza glutationowa (GPx) jest głównie zlokalizowana w *matrix* i wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Bardzo niewielka jej ilość znajduje się również w miejscach kontaktu między wewnętrzną a zewnętrzną błoną mitochondrialną [43]. Taka lokalizacja enzymu wskazuje na jego strategiczną rolę w procesie eliminowania nadtlenu wodoru powstającego w wewnętrznej i zewnętrznej błonie oraz wodoronadtlenków lipidów powstających w błonie wewnętrznej podczas peroksydacyjnych uszkodzeń.

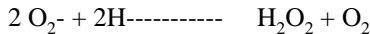
GSH znajdujący się w mitochondriach pochodzi z frakcji cytozolowej komórki [44], a jego translokacja do mitochondriów odbywa się przy udziale specyficznego transportera zależnego od ATP [45]. Dlatego spadek stężenia GSH w cytozolu wywiera bezpośredni wpływ na jego poziom w mitochondriach, co zostało eksperymentalnie udowodnione przez Jaina i współpracowników [18]. Według pewnych autorów, deficyt GSH w mitochondriach ujawnia się dopiero wtedy, gdy spadek w cytozolu dochodzi do stężenia poniżej 50% wartości kontrolnej [18, 46]. Transport GSH z cytozolu do mitochondriów jest bardzo efektywny i następuje przy niskim stężeniu peptydu. Z kolei bardzo wolny wypływ GSH z mitochondriów do cytozolu świadczy o istnieniu mechanizmu zabezpieczającego te organelle przed jego utratą (np. w niekorzystnych warunkach przejściowego deficytu GSH wywołanego działaniem czynników toksycznych). W badaniach histologicznych z zastosowaniem mikroskopu elektronowego wykazano, że spadkowi GSH w komórkach mózgu towarzyszy pęcznienie mitochondriów, nasilona wakuolizacja oraz pęknięcie grzebieni i błon mitochondrialnych [18].

GSH znajdujący się w mitochondriach służy do utrzymywania w zredukowanej postaci grup hydrosulfidowych białek błon mitochondrialnych, co ma bardzo istotne znaczenie dla funkcji mitochondriów. Niedobór GSH w mitochondriach prowadzi do utlenienia tych białek, związania przepuszczalności błon mitochondrialnych dla jonów wapnia [47] oraz zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej [48]. Stopniowo proces ten może prowadzić do całkowitego zahamowania funkcji mitochondriów i śmierci komórek. Ryc. 1 ilustruje powiązania pomiędzy stężeniem GSH, produkcją wolnych rodników i uszkodzeniem mitochondriów.

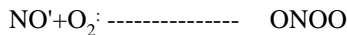
Skutkiem niedoboru GSH w mitochondriach jest nadmierne gromadzenie się w nich nadtlenu wodoru (H_2O_2), który można uznać za produkt uboczny powstający w łańcuchu oddechowym. Dzieje się tak, ponieważ nie wszystkie cząsteczki tlenu ulegają w mitochondriach redukcji do wody i pewna ich część jest przekształcana do H_2O_2 i anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$). Z anionorodnika ponadtlenkowego w reakcji katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD), znajdującej się w mitochondriach mogą powstać następujące cząsteczki nadtlenu wodoru.



Ryc. 1. Cykliczne sprzeczne między deficytem GSH, produkcją reaktywnych form tlenu a uszkodzeniem mitochondriów



W mózgu nadtlenek wodoru może powstawać również pod wpływem monoamino-oksydazy (MAO) znajdującej się w mitochondriach w czasie deaminacji oksydacyjnej monoamin (np. dopaminy). W warunkach niedoboru GSH nadtlenek wodoru nie może być skutecznie usuwany i wtedy w nieenzymatycznej reakcji Fentona, z udziałem jonów metali przejściowych dochodzi do generowania niebezpiecznego rodnika hydroksylowego, którego reaktywność prowadzi do rozległych uszkodzeń mitochondriów. Do uszkodzenia mitochondriów przy niedoborze GSH może również dochodzić pod wpływem nadtlenu azotu (ONOO) powstającego w niezwykle szybkiej reakcji tlenu azotu z anionorodnikiem ponadtlenu [49, 50].



Uszkodzone mitochondria nie są w stanie produkować odpowiedniej ilości energii, a niski poziom ATP ma bezpośredni wpływ na biosyntezę GSH (patrz podrozdział 5.2.5.1). Przedstawiony powyżej w formie schematu zależność między poziomem GSH, produkcją reaktywnych form tlenu i uszkodzeniem mitochondriów, może na rozpatrywać w aspekcie choroby Parkinsona. W schorzeniu tym dochodzi bowiem zarówno do spadku poziomu GSH [3, 4], jak i do zaburzenia funkcji mitochondriów [51, 52].

5.2.3. Transport glutationu przez barier krew-mózg

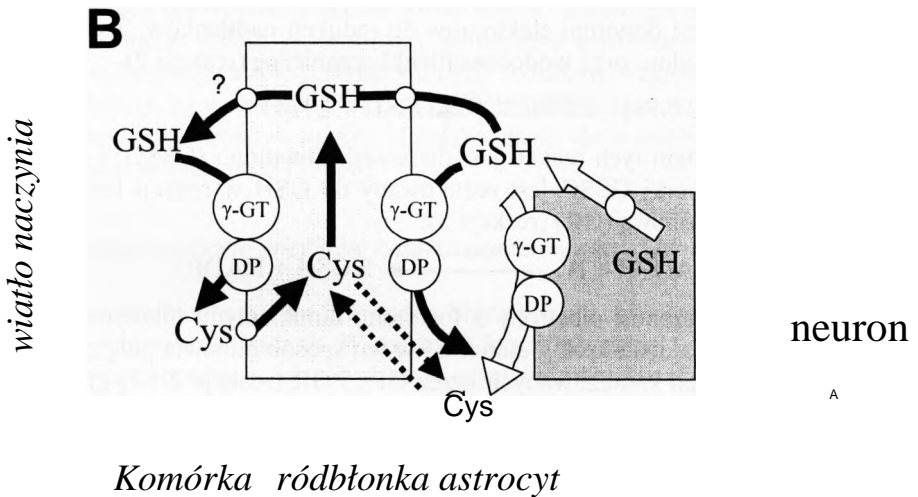
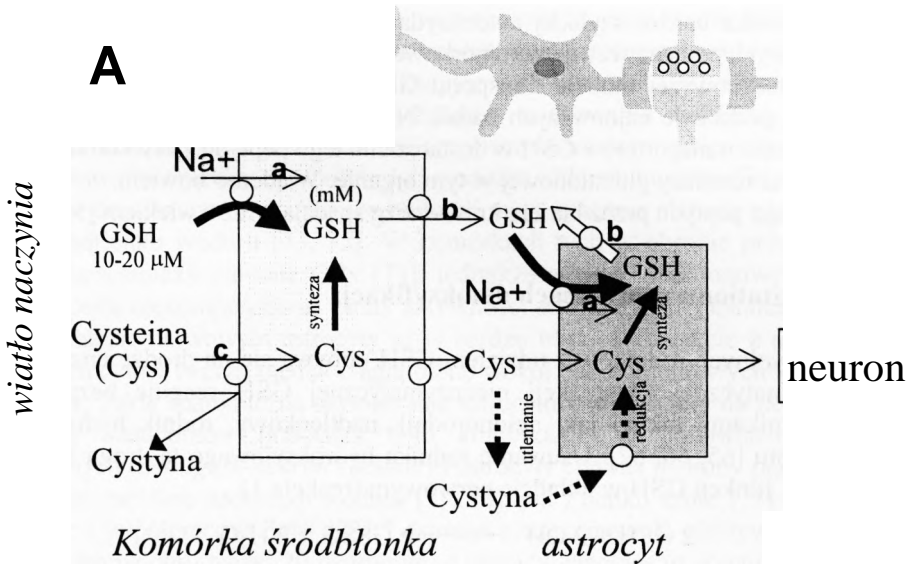
Podczas krótkotrwałego głodzenia organizmu mózg jest chroniony przed utratą glutationu [53]. W warunkach takich homeostaza glutationowa jest przypuszczalnie utrzymywana przez obrót w tkance mózgowej aminokwasów budujących cząsteczkę tego peptydu. Zarówno cysteina, jak i glutamina jako substancje prekursorowe służące do biosyntezy GSH, mogą być aktywnie przenoszone przez barierę krew-mózg za pomocą odpowiedniego systemu transportowego [54, 55]. Ostatnio opisano również wychwytywanie GSH z krwi przez komórki ródobłonek naczyń kapilarnych oraz stwierdzono, że przechodzi on z tych komórek do parenchymy mózgu [56, 57]. Nie jest jednak całkowicie jasne, czy GSH jest transportowany z surowicy krwi w formie całej cząsteczki peptydu, czy też jego wychwytywanie jest związane z biodegradacją GSH przez enzym błonowy, γ -glutamylotranspeptydazę (γ -GT), zlokalizowaną na powierzchni błony cytoplazmatycznej ródobłonek naczyń włosowatych [58, 59]. Ryc. 2 (A, B) przedstawia hipotetyczne drogi transportu GSH przez barierę krew-mózg.

Wyniki najnowszych badań wskazują, że w mózgu podobnie jak w innych organach (jelita, płuca) możliwy jest bezpośredni transport cząsteczek GSH z surowicy krwi przez ścianę naczyń włosowatych (ryc. 2A). Transport ten jest niezależny od aktywności γ -GT i odbywa się przy udziale specjalnych nośników białkowych, które umiejscowione są w błonie cytoplazmatycznej ródobłonek naczyń włosowatych [60, 61]. Przyjmuje się, że istnieje co najmniej dwa rodzaje transporterów przenoszących cząsteczkę GSH ze światła naczyń krwionośnych do tkanki mózgowej. Aktywność jednego z nich jest niezależna od obecności jonów sodu [60, 61]. Transporter GSH zależny od kationów Na^+ znajduje się w błonie cytoplazmatycznej ródobłonek, skierowanej do światła naczynia kapilarnego. Przy jego udziale może dochodzić do gromadzenia się w tych komórkach GSH pobranego z surowicy krwi (model A, ryc. 2). Istnienie transportera sodowozależnego zostało ostatecznie stwierdzone w badaniach *in vitro*, przeprowadzonych na specjalnej linii ludzkich komórek ródobłonek naczyń włosowatych [62]. Kannan i współpracownicy [62] potwierdzili natomiast istnienie transportera sodowozależnego dla GSH również w błonach cytoplazmatycznych astrocytów ludzkich pochodzących z pierwotnych hodowli. Wcześniej transporter sodowozależny został wykryty w błonach astrocytów szczura [63, 64]. Drugi transporter GSH, którego aktywność nie jest zależna od obecności jonów Na^+ , znajduje się w błonie podstawnej komórek ródobłonek naczyń włosowatych oraz w błonie cytoplazmatycznej astrocytów. Transporter ten ułatwia odbywający się zgodnie z gradientem stężenia (wysokie stężenie GSH w komórce, niskie zewnątrzkomórkowo) wypływ GSH z tych komórek (model A, ryc. 2). Schemat A na ryc. 2 przedstawia ponadto transport cysteiny (Cys) i cystyny oraz uwzględnia syntezę GSH w komórkach ródobłonek i astrocytach.

Możliwość bezpośredniego transportu GSH przy udziale nośników nie wyklucza jednak enzymatycznego rozpadu tego peptydu i wychwytywania powstałych aminokwasów przez komórki ródobłonek naczyń włosowatych, w których ponownie dochodzi do biosyntezy GSH (model B, ryc. 2). Zauważono, że wypływ GSH z komórek ródobłonek oraz astrocytów odbywa się w tych samych miejscach błony cytoplazmatycznej, gdzie zlokalizowane są enzymy degradujące ten peptyd, czyli γ -GT i dipeptydaza (DP) (ryc. 2B). To bezpośrednio siedziwo zapewnia dostęp substratu, jakim jest GSH, do aktywnych centrów obu tych enzymów i prowadzi do szybkiego powstania produktów hydrolizy, głównie cysteiny. Szczególnie ważne w tym współdziałaniu transportera

Naczynie włosowate

astrocyt neuropil



Ryc. 2. Hipotetyczne modele transportu GSH w mózgu. Model A - szybki, bezpo redni transport GSH przy udziale no ników: a - transporter Na⁺-zale ny; b - transporter niezale ny od jonów Na⁺; c - transporter aminokwasów. Model B - wolny, zale ny od aktywno ci γ-GT i dipeptydazy (DP) transport aminokwasów uwolnionych podczas rozpadu GSH. Transport cystyny powstaj cej w wyni ku zewn trzkomórkowego utleniania cysteiny (Cys) zaznaczony jest lini przerywan (rycina A) (wg Kannana i wsp. 1998 [75] - zmodyfikowane)

wspomagaj cego wpływ GSH z enzymami katalizuj cymi jego hydroliz jest ci głę uwalnianie cysteiny, która jako jedyny aminokwas siarkowy jest nast pnie pobierana przez neurony. W przeciwie stwie do cysteiny cystyna nie jest pobierana przez neurony. Według Sagara i współpracowników [39], cystyna powstaj ca w przestrzeni mi dzyko-mórkowej w wyniku bardzo szybkiej autooksydacji cysteiny jest wychwytywana przez astrocyty, w których podlega wewn trzkomórkowej redukcji (ryc. 2A).

Przedstawione powy ej modele transportu GSH przez barier krew-mózg zostały opracowane na podstawie najnowszych bada . Nadal jednak pozostaje do wyja nienia, jak du y jest udział transporterów GSH w dostarczaniu tego peptydu z krwi do mózgu i w utrzymaniu homeostazy glutationowej w tym organie. Wiadomo bowiem, e mo liwo-ci transportu tego peptydu przez barier krew-mózg spadaj wraz z wiekiem [56, 60].

5.2.4. Rola glutationu w procesach detoksyfikacji

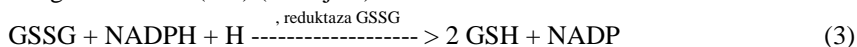
Usuwanie wolnych rodników z udziałem GSH odbywa si na drodze enzymatycznej i nieenzymatycznej. W reakcji nieenzymatycznej GSH reaguje bezpo rednio z wolnymi rodnikami, takimi jak: anionorodnik nadtlenny, rodnik hydroksylowy oraz tlenek azotu [65, 66, 67], Usuwanie rodnika hydroksylowego t drog jest jedn z wa niejszych funkcji GSH w układzie nerwowym (reakcja 1).



W reakcji enzymatycznej, katalizowanej przez peroksydaz glutationow (GPx) [EC 1.11.1.9], GSH jest donorem elektronów do redukcji nadtlennów. T drog usuwany jest nadtlenek wodoru oraz wodoronadtlenki organiczne (reakcja 2).



Ko cowym produktem tych reakcji jest disiarczek glutationu (GSSG) i cz steczka wody. W obr bie komórki GSSG jest redukowany do GSH w reakcji katalizowanej przez reduktaz glutationow (GR) (reakcja 3).



GR [EC 1.6.4.2] przenosi elektrony z fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH) na disiarczek glutationu i w ten sposób odnawia pul zredukowanego GSH. W reakcjach katalizowanych przez GPx i GR (reakcje 2 i 3) glutation nie jest zu ywany, lecz ulega ci głęj regeneracji. Do efektywnej detoksyfikacji nadtlennów z udziałem GPx i GR konieczna jest dost pno i regeneracja NADPH. Podobnie jak w innych tkankach organizmu regeneracja NADPH odbywa si głównie w cyklu pentozofosforanowym, w którym w mózgu ulega przemianie zaledwie od 3 do 5% glukozy. Cykl ten ma jednak bardzo du e znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania mózgu wła nie ze wzgl du na powstaj cy w nim NADPH, który jest niezb dny w usuwaniu nadtlennów. Jak wynika z bada prowadzonych na hodowlach astrocytów, szlak pentozofosforanowy jest bardzo silnie pobudzany podczas detoksyfikacji nadtlenu wodoru [68, 69], Z kolei niedobór glukozy w płynach hodowlanych obni a zdolno ci astrocytów do usuwania nadtlenu wodoru [70] i znacznie wydu a czas usuwania wodoronadtlenków organicznych [71, 72],

Komórki mózgu różni się pod względem możliwości usuwania wolnych rodników. Hodowane astrocyty bardzo efektywnie redukują zarówno nadtlenek wodoru [70, 73], jak i wodoronadtlenki organiczne [71, 72, 74]. W komórkach tych oprócz GPx tak e katalaza [EC 1.11.1.6] jest zaangażowana w usuwanie nadtlenku wodoru [70, 73]. Zahamowanie samej katalazy tylko w nieznacznym stopniu obniża zdolność astrocytów do usuwania nadtlenku wodoru, natomiast równoczesne zahamowanie GPx bardzo silnie ogranicza możliwość detoksyfikacyjną tych komórek [70]. Oznacza to, że GPx w astrocytach może zastąpić funkcję katalazy w usuwaniu nadtlenku wodoru, natomiast katalaza nie może zastąpić GPx w usuwaniu wodoronadtlenków organicznych, takich jak wodoronadtlenek t-butyłu lub wodoronadtlenek kumenu [71, 72]. W przeciwieństwie do astrocytów neurony w hodowli mają znacznie słabszą zdolność detoksyfikacji nadtlenku wodoru [73, 75]. W komórkach tych w obronie przed nadtlenkiem wodoru uczestniczy głównie GPx [73], jednakże system glutationowy neuronów nie może w pełni rekompensować utraty aktywności enzymatycznej katalazy [75].

W układzie nerwowym astrocyty są w bardzo bliskim kontakcie z neuronami. Wypustki astrocytów tworzą niemal ciągłą błonę wokół ciał komórkowych i wypustek neuronalnych. Takie anatomiczne usytuowanie astrocytów w stosunku do neuronów sprzyja wymianie metabolitów pomiędzy tymi komórkami. W hodowlach astrogliono-neuronalnych (*astroglial-neuron coculture*) astrocyty chronią neurony przed szkodliwym działaniem zarówno nadtlenku wodoru [73, 76], jak i tlenu azotu [77]. Według badań Desagher i współpracowników [73] 1 astrocyt może zapewnić efektywną obronę przed nadtlenkiem wodoru nawet 20 neuronom. Astrocyty zapobiegają również uszkodzeniom neuronów przez zewnętrzne wolne rodniki znajdujące się w płynach hodowlanych [78]. Dane te wskazują, że między astrocytami a neuronami istnieje metaboliczna interakcja ograniczająca toksyczność wolnych rodników względem neuronów [79, 80, 81]. W interakcji tej uczestniczy GSH, gdy neuroprotektoryjne działanie astrocytów skierowane przeciw nadtlenkowi wodoru i tlenkowi azotu ulega osłabieniu, gdy poziom GSH w tych komórkach jest niski [77, 80].

5.2.4.1. Rozmieszczenie enzymów katalizujących reakcje detoksyfikacji w mózgu

Właściwości biochemiczne enzymów, biorących udział w procesach detoksyfikacji mózgu, są intensywnie badane. W ostatnich latach poznano 4 izoenzymy GPx zawierające w swoich centrach aktywnych selenocystein [82], jak również zidentyfikowano formę tego enzymu pozbawioną selenu [83]. Enzymatyczna aktywność zarówno GPx, jak i GR, badana w homogenatach tkankowych, jest znacznie niższa w mózgu niż w innych tkankach organizmu. I tak, aktywność formy cytozolowej GPx w mózgu myszy stanowi zaledwie 5% aktywności tego enzymu, jak charakteryzują się komórki nerek i wątroby. Podobnie aktywność GR w mózgu myszy stanowi odpowiednio 32% i 65% aktywności tego enzymu w nerkach i wątrobie [84]. Jak wykazują badania immunohistochemiczne prowadzone na skrawkach mózgu, rozmieszczenie enzymu peroksydazy glutationowej w różnych typach komórek jest silnie różnicowane i zależy zarówno od badanego gatunku, jak i od stanu fizjologicznego mózgu. W pierwszych badaniach tego typu, prowadzonych na skrawkach mózgu szczura, enzym ten znaleziono głównie w neuronach kory, hipokampa i mózku [85]. Przeciwnie, w badaniach wykonanych na skrawkach mózgu szczura w ostatnich latach wykazano obecność tego

enzymu głównie w komórkach mikrogleju, a stosunkowo niewielk jego ilo stwierdzono w neuronach, astrocytach i neuropilu [86]. W mózgu myszy obecno GPx stwierdzono zarówno w neuronach, jak i astrocytach. Wysokie st enie tego enzymu obserwowano w neuronach warstwy II kory mózgowej, w rejonie CA1 hipokampa, w zwoju z batym i w j drze mostu [87]. W przeciwie stwie do gryzoni, w mózgu człowieka Takizawa i współpracownicy [88] opisali bardzo ma ilo GPx zarówno w neuronach, jak i astrocytach, a Damier i współpracownicy [89] wykazali obecno tego enzymu wyłącznie w komórkach glejowych. W stanach patologicznych u człowieka obserwuje si zwi kszon koncentracj GPx w komórkach glejowych s siaduj cych z miejscem zawału mózgu [86], a w przypadku choroby Parkinsona w komórkach glejowych otaczaj cych nieliczne, zachowane neurony dopaminowe w cz ci zbitej istoty czarnej [89]. Lokalizacja GPx w ró nych typach komórek mózgu w chwili obecnej nie jest w pełni wyja niona i wymaga dalszych bada .

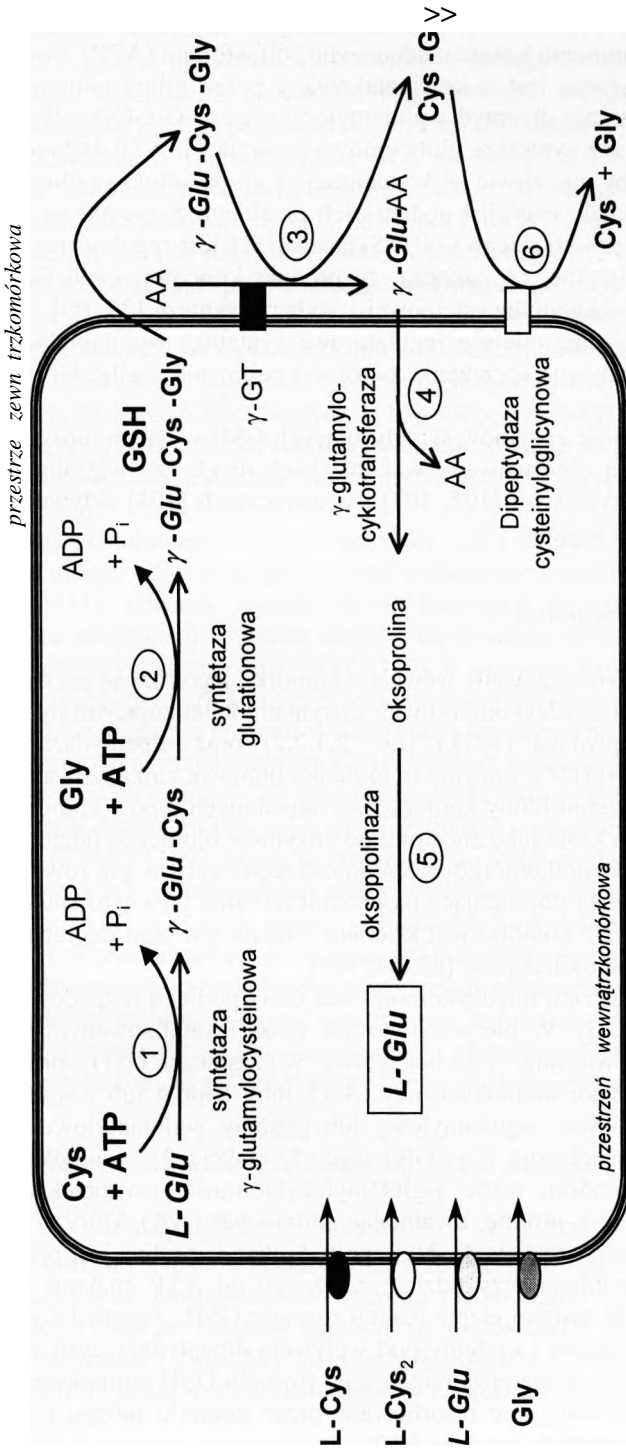
Struktura, funkcja i mechanizm działania reduktazy glutationowej (GR) zostały do kładnie opisane przez Lopez-Barea i współpracowników [90]. Wyst puj ca w mózgu forma tego enzymu jest dimerem zbudowanym z identycznych podjednostek. Masa cz steckowa ka dego monomeru wynosi około 50 kDa, warto stałej Michaelisa K_M wyizolowanego enzymu GR wzgl dem jego substratów, czyli NADPH i GSSG, waha si w granicach mikromolowych [91]. Reduktaz glutationow wykryto na skrawkach mózgu metod immunohistochemiczn głównie w neuronach. Obecno tego enzymu w astrocytach jest znacznie słabiej zaznaczona i w du ym stopniu zale y od badanego gatunku [92]. W hodowanych astrocytach w najlepszym przypadku stwierdzano bardzo niewielk ilo tego enzymu, podczas gdy w hodowanych neuronach, komórkach mikrogleju i oligodendrocytach wysok [91].

W komórkach mózgu zachodz reakcje enzymatyczne, których przebieg mo e prowadzi do wyczerpania si wewn trzkomórkowej puli GSH. W reakcjach tych bior udział S-transferazy glutationowe [EC 2.5.1.18], nale ce do grupy enzymów cytozolo- wych katalizuj cych koniugacj elektrofilowych ksenobiotyków z GSH. Efektem działania tych enzymów jest usuni cie z komórek mózgu nie tylko szkodliwych substancji, ale tak e utrata samego GSH [93]. Wyst puj ce w mózgu izoformy S-transferaz glutationo- wych przynale do trzech ró norodnych klas - a, ji ii [94]. Klasa-a znajduje si w astrocytach, neuronach i komórkach ependymy [95], klasa- w neuronach i astrocytach [95, 96], a klasa-7t wyłącznie w oligodendrocytach [96, 97].

5.2.5. Podstawowy metabolizm glutationu

5.2.5.1. Synteza glutationu

GSH jest peptydem syntetyzowanym we wszystkich typach komórek mózgu [98]. Synteza jego odbywa si w podobny sposób jak w innych tkankach organizmu w cytozolu komórki w dwustopniowej reakcji przebiegaj cej z udziałem zale nych od ATP enzymów: syntetazy γ -glutamylcysteinowej [EC 6.3.2.2] oraz syntetazy glutatio- nowej [EC 6.3.2.3] (ryc. 3). Podstawowymi substratami do syntezy GSH s trzy amino- kwasy: kwas L-glutaminowy, L-cysteina i glicyna. W pierwszym etapie reakcji synte- zy, katalizowanym przez syntetaz γ -glutamylcysteinow , zostaje utworzone wi zanie peptydowe pomi dzy grup γ -karboksylow glutaminianu a grup aminow cyst -



Ryc. 3. Synteza i rozpad GSH. AA - akceptor aminokwasowy; ATP - adenozyno-5'-fosforan; ADP - adenozyno-5'-difosforan; L-Cys - cysteina; Gly - glutaminian; Gly - glicyna; Cys - cystyna; γ -Glu-AA - aminokwas γ -glutamylowy; γ -GT - γ -glutamylotranspeptydaza; P_i - fosforan nieorganiczny

iny (ryc. 3, reakcja 1). Warunkiem utworzenia tego wi zania jest aktywacja grupy y-karboksylovej glutaminianu kosztem adenzozynotrójfosforanu (ATP). Powstały zwi zek po redni acylofosforan jest z kolei atakowany przez grup aminow cysteiny. W wyniku reakcji powstaje dipeptyd y-glutamylcysteina (y-Glu-Cys). W drugim etapie, katalizowanym przez syntetaz glutationow (reakcja 2), ATP atakuje grup karboksylow cysteiny, aby umo liwi jej kondensacj z grup aminow glicyny. Reakcje syntezy wymagaj nakładu energii i podczas ich przebiegu zu ywane s 2 cz steczki ATP na 1 cz steczk powstaj cego GSH. Synteza GSH jest regulowana poprzez negatywne sprz enie zwrotne, co oznacza, e produkt ko cowy, czyli GSH, hamuje aktywno syntetazy y-glutamylcysteinowej i wył cza syntez [25, 99]. Z kolei nadmiar glutaminianu blokuj c miejsce regulatorowe syntetazy y-glutamylcysteinowej, mo e odhamowa negatywne sprz enie zwrotne i ponownie nasili biosyntezy GSH [99].

Specyficzna aktywno enzymów syntetyzuj cych GSH w całym mózgu jest znacznie ni sza ni ta, któr obserwowano w komórkach nerek czy w troby [100, 101]. Jedynie w splocie naczyniastym [102, 103] i w astrocytach [104] aktywno tych enzymów jest szczególnie wysoka.

5.2.5.2. Katabolizm glutationu

Chocia GSH jest syntetyzowany wewn trz komórki, jego rozpad zachodzi poza jej obr bem, w przestrzeni mi dzykomórkowej. Enzymami katalizuj cymi hydroliz GSH s y-glutamylotranspeptydaza (y-GT) [EC 2.3.2.2] oraz dipeptydaza cysteinyloglicynowa [EC 3.4.13.6] (DP). Enzymy te to białka błonowe zlokalizowane wył cznie na zewn trznej powierzchni błony komórkowej okre lonych typów komórek. Oddzielenie błon komórkow GSH jako substratu od enzymów bior cych udział w jego rozpadzie gwarantuje wewn trzkomórkow stabilno tego peptydu, jak równie determinuje okre lony mechanizm pozwalaj cy na przemieszczanie go z cytozolu na zewn trz komórki. Wyptyw GSH z komórki jest krokiem inicjuj cym jego degradacj i obserwowano go w hodowlach astrocytów [63, 64, 105].

Uwolniony do przestrzeni mi dzykomórkowej GSH podlega rozpadowi w dwustopniowej reakcji (ryc. 3). W pierwszym etapie reakcji katalizowanym przez y-GT, enzym ten przerywa wi zanie y-karboksylove w cz steczce GSH i przenosi reszt y-glutamylow na akceptor aminokwasowy (AA), inny peptyd lub cz steczk wody. Powstaje wtedy aminokwas y-glutamylowy lub peptydy y-glutamylowe (y-Glu-AA) oraz dipeptyd cysteinyloglicyna (Cys-Gly) (ryc. 3, reakcja 3). Aminokwas y-glutamylowy wraca do komórki, gdzie y-glutamylcyklotransferaza przekształca reszt y-glutamylow w 5-okso-L-prolin , uwalniaj c aminokwas (AA), który w poprzedniej reakcji był jej akceptorem (reakcja 4). Nast pnie, 5-okso-L-prolina jest przekształcana z powrotem do glutaminianu przy udziale zale nego od ATP enzymu - 5-okso-L-prolinazy (reakcja 5). W drugim etapie reakcji rozpadu GSH, dipeptyd Cys-Gly ulega dalszej degradacji do glicyny i cysteiny pod wptywem dipeptydazy cysteinyloglicynowej (reakcja 6). Powstałe drog enzymatycznego rozpadu GSH aminokwasy (glutaminian, cysteina, glicyna) mog by resorbowane przez komórki mózgu i u ywane do ponownej syntezy tego peptydu (reakcje 1 i 2).

Występowanie peptydów γ -glutamylowych [106, 107] potwierdza obecność w mózgu γ -GT. Enzym ten został wyizolowany z mózgu szczura i opisano kilka jego izoform [108]. Specyficzna aktywność tego enzymu wykazuje duże zmiany w różnych obszarach mózgu, przy czym najwyższą charakteryzuje się spleć naczyński [102, 103]. Komórkowe rozmieszczenie γ -GT w naczyniach kapilarnych mózgu jest przedmiotem kontrowersji. Pewne badania wskazują na obecność tego enzymu w błonie cytoplazmatycznej komórek różniokomórkowe [58, 59], inne natomiast sugerują, że głównym źródłem γ -GT w naczyniach włosowatych mogą być pericyty [109]. Immunohistochemiczne badania porównawcze wykonane na skrawkach pochodzących z mózgu szczura, myszy, małpy i człowieka wskazują na różnice gatunkowe. U szczura obecność γ -GT stwierdzono na powierzchni komórek różniokomórkowej naczyni włosowatej, natomiast u człowieka i myszy na powierzchni astrocytów przylegających do naczyni włosowatej [110]. Obecność γ -GT na wypustkach astrocytów przylegających do naczyni włosowatej, jak również na powierzchni pericytów pokrywających różniokomórkową naczyni włosowatą wskazuje na specyficzną funkcję tego enzymu w mózgu.

Dotychczas postulowano, że zarówno GSH, jak i aktywność γ -GT w naczyniach włosowatych mózgu odgrywają główną rolę w transporcie aminokwasów przez barierę krew-mózg [111]. Obecnie wydaje się, że koncepcja ta nie jest w pełni słuszna i powinna ulec weryfikacji. Ostatnio okazało się bowiem, że nawet transport cystyny, jednego z najlepszych substratów γ -GT [112] z surowicy krwi do komórek naczyni włosowatej przebiega normalnie przy zahamowanej aktywności γ -GT [113]. Dlatego wydaje się, że funkcja tego enzymu w naczyniach kapilarnych mózgu może nie być raczej łączy z naczyniowym metabolizmem GSH. Stąd te koncepcje transportu aminokwasów za pomocą γ -GT zastępuje się obecnie hipotezą uwzględniającą udział tego enzymu w procesach detoksyfikacji mózgu (szlak kwasu merkapturowego) i katabolizmie leukotrienów (LT) C_4 [109]. Mimo to utrzymuje się nadal pogląd, że pewne substancje powstające w cyklu γ -glutamylowym mogą pełnić funkcje regulatorowe w transporcie aminokwasów [114]. Do nich należy aminokwas 5-okso-L-prolina, który powstaje w tym cyklu i aktywuje odpowiednie systemy transportu aminokwasów typu B^{0+} i A w błonie podstawnej komórek różniokomórkowej naczyni włosowatej mózgu [115]. Wewnątrzkomórkowe stężenie 5-okso-L-proliny jest regulowane przez enzym 5-okso-L-prolinazę, który metabolizuje ten aminokwas do glutaminy. Ostatnio enzym ten został również odkryty w komórkach różniokomórkowej i pericytach naczyni włosowatej [116].

5.2.5.3. Hodowle komórkowe jako model do badania metabolizmu glutationu w mózgu

Komórki mózgu różni się między sobą zarówno pod względem morfologicznym, jak i metabolicznym. Dotychczasowe badania metabolizmu GSH w różnych typach komórek mózgu były prowadzone głównie na pierwotnych kulturach zawierających tylko jeden ich rodzaj i dotyczyły zwłaszcza astrocytów. Znacznie mniej jest dostępnych informacji na temat metabolizmu GSH w neuronach, oligodendrocytach i komórkach mikrogleju.

5.2.5.3.I. Astrocyty

Stężenie GSH w hodowanych astrocytach jest stosunkowo wysokie i wynosi od 8 do 20 mM [38, 117]. Może ono jednak ulegać zmianom pod wpływem różnych czynników modulujących (tab. 1).

Stężenie GSH w hodowanych astrocytach obniża się pod wpływem inhibitora syntetazy γ -glutamylcysteinowej butioninosulfoksyminy (BSO) oraz związków reagujących z GSH, takich jak kwas etakrynowy czy dietylmaleinian oraz czynników stresowych, takich jak głodzenie i niedokrwienie. Poziom GSH w astrocytach wzrasta po wprowadzeniu do płynów hodowlanych prekursorów służących do jego syntezy, a także pod wpływem czynników zwiększających wychwytywanie cystyny [63] lub po inkubacji tych komórek z induktorem syntezy tego peptydu - ditiolionem anetolu (ADT) [75].

Astrocyty nie tylko gromadzą duże ilości GSH, ale także aktywnie go syntetyzują [64]. W komórkach tych aktywnie syntetazy γ -glutamylcysteinowej jest znacznie wyższe niż w neuronach [104]. Jak wcześniej wspomniano (podrozdział 5.2.5.1), biosynteza GSH jest regulowana na zasadzie negatywnego sprzężenia zwrotnego, co oznacza, że rozpoczęcie reakcji jest zależne od wewnątrzkomórkowego stężenia tego tripeptydu. Dlatego te badania nad potencjalnymi prekursorami GSH były prowadzone na hodowlach astrocytów, w których głodzeniem wywoływano niedobór tego peptydu [37, 117]. W warunkach takich czynnikiem ograniczającym biosyntezę GSH okazała się dostępność glutamianu. Zamiast glutamianu astrocyty mogą dodatkowo wykorzystywać do biosyntezy GSH również glutamin, asparaginian, asparagin, ornityn lub prolinę jako donory reszty glutaminianowej [37]. Donorem cysteiny, drugiego podstawowego aminokwasu budującego szkielet GSH, może być N-acetylocysteina (NAC), cystationina lub kwas 2-oksotiazolidyno-4-karboksylowy (OTC). Funkcji takiej nie może natomiast pełnić metionina [118]. Jednak najlepszym źródłem cysteiny dla astrocytów wydaje się cystyna [118, 119], natomiast reszta glicynowa może pochodzić z egzogennej glicyny lub seryny [120].

Tabela 1

Czynniki modulujące stężenie GSH w hodowanych astrocytach

Substancja	Efekt	Pi miennictwo
Butioninosulfoksymina (BSO)	4	Barker i współpracownicy [49], Dringen i Hamprecht [70]
Dietylmaleinian	4	Desagher i współpracownicy [73], Juurlink i współpracownicy [123], Yudkoff i współpracownicy [64]
Kwas etakrynowy	4	Huang i Philbert [124]
Alkohol etylowy	4	Montoliu i współpracownicy [125]
Ischemia	4	Juurlink i współpracownicy [126]
Tlenek azotu	4	Garcia-Nogales i współpracownicy [127]
Głodzenie	4	Dringen i Hamprecht [37], Dringen i współpracownicy [75]
ADT	T	Dringen i współpracownicy [75]
L-dopa	T	Han i współpracownicy [128]
γ -Glu-Cys	T	Pileblad i współpracownicy [40]
Glutaminian	T	Dringen i Hamprecht [37]
OTC	T	Aschner i współpracownicy [129]
1,25-dihydroksywitamina D ₃	t	Garcion i współpracownicy [130]

t - wzrost, 4 - spadek

Oprócz aminokwasów komórki astrogleju mogą wykorzystywać również dipeptydy jako prekursorzy do syntezy GSH [117]. Dipeptyd γ -glutamylcysteina (γ -Glu-Cys) jest wychwytywany przez astrocyty w stęgniach milimolowych i służy za bezpośredni substrat dla syntetazy glutationowej. W tym przypadku biosynteza GSH przebiega szybciej, gdy pierwszy etap reakcji z udziałem syntetazy γ -glutamylcysteinowej zostaje pominięty [121]. Drugi dipeptyd, cysteinylglicyna (Cys-Gly), byłby produktem rozpadu GSH pod wpływem γ -GT, może być również wykorzystywany przez astrocyty, nawet wtedy gdy znajduje się w płynach hodowlanych w stęgniach mikromolowych [121]. Za jego wychwyt odpowiedzialny jest transporter peptydowy PepT2 [122]. W cytozolu astrocytów Cys-Gly ulega rozpadowi, a uwolnione aminokwasy są wykorzystywane do resyntezy GSH.

5.2.5.3.2. Neurony

W hodowlach *in vitro* neurony zawierają znacznie mniej GSH niż astrocyty [38, 104, 131]. W tab. 2 przedstawiono wykaz substancji modulujących poziom GSH w neuronach.

Tabela 2

Substancje modulujące stęgnię GSH w hodowanych neuronach

Substancja	Efekt	Piśmiennictwo
Białko β -amyloidu	4	Müller i współpr. [132]
Butioninosuifoksymina (BSO)	4	Wüllner i współpr. [46]
Kwas etakrynowy	4	Wüllner i współpr. [46]
Glutaminian	4	Almeida i współpr. [133]
Haloperidol	4	Sagara [134]
Cys-Gly	t	Dringen i współpr. [135]
Cysteina	t	Sagara i współpr. [136], Kranich i współpr. [119]
γ -Glu-Cys	T	Pileblad i współpr. [40], Dringen i współpr. [135]
NAC	T	Dringen i Hamprecht [137]

t - wzrost, 4 - spadek

Stęgnię cysteiny i jej prekursorów w medium hodowlanym determinuje poziom GSH w tych komórkach. Neurony nie są zdolne do pobierania cystyny obecnej w wiązaniach płynów hodowlanych, są zatem zależne od dostępu cysteiny, która bardzo łatwo ulega utlenieniu do cystyny [119, 136]. Oprócz zredukowanej cysteiny neurony mogą również korzystać z takich prekursorów, jak: cysteinylglicyna (Cys-Gly), γ -glutamylcysteina (γ -Glu-Cys) oraz N-acetylcysteina (NAC) [40, 121, 135, 137]. Obecność OTC i metioniny nie podnosi poziomu GSH w neuronach mózgu [137]. W przeciwieństwie do cysteiny dostęp glutaminianu i glicyny nie ogranicza biosyntezy GSH w neuronach [135]. Stęgnię GSH w hodowanych neuronach ulega obniżeniu pod wpływem BSO, β -amyloidu, agonistów receptorów glutaminianergicznych, kwasu etakrynowego oraz haloperidolu - leku stosowanego w leczeniu schizofrenii (tab. 2).

5.2.5.3.3. Oligodendrocyty

Oligodendrocyty s komórkami zawieraj cymi ma ilo GSH oraz wysokie st e- nie jonów elaza [123, 138] i przypuszczalnie dlatego s bardzo podatne na uszkadzaj ce dzia anie wolnych rodników [139, 140], Komórki te w hodowli prze ywaj tylko w obecno cysteiny lub cystyny, natomiast przy braku tych aminokwasów nast puje spadek poziomu GSH i oligodendrocyty gin . Do mierci tych komórek nie dochodzi w obecno ci zmiataczy wolnych rodników [140, 141] lub donora tlenu azotu o d ugim okresie półtrwania [142]. Toksyczne dzia ania nadtlenu wodoru wzgl dem oligodendrocytów mo e by cz ciowo znoszone podaniami NAC [143], Dane te wskazuj , e udział GSH w detoksyfikacji wolnych rodników ma zasadnicze znaczenie dla prze ywalno ci oligodendrocytów w hodowlach.

5.2.5.3.4. Mikroglej

Komórki mikrogleju s nieod cznym składnikiem hodowli astrocytów, w których stanowi mniejszo . Komórki te charakteryzuj si najwi ksz zawarto ci GSH [144] i spo ród ró nych typów hodowanych komórek glejowych barwi si najbardziej intensywnie na obecno białka reduktazy glutationowej [91], Z pierwotnych kultur astrocytów wyprowadzono hodowle wtórne, w których komórki mikrogleju stanowiły od 80 do 90% wszystkich komórek. Takie specyficzne hodowle komórek mikroglejowych, w porównaniu z hodowlami neuronów i astrocytów, charakteryzowały si wy - sz aktywno ci wła ciw zarówno peroksydazy, jak i reduktazy glutationowej, natomiast ni sz katalazy [145]. Komórki mikrogleju w odpowiedzi na aktywacj uwalniaj anionorodnik ponadtlenu [146] oraz tlenek azotu [147], czyli wykazuj bezpo redni kontakt z tymi reaktywnymi cz steczkami, które same generuj . Dlatego te system glutationowy w komórkach mikrogleju mo e mie zasadnicze znaczenie dla obrony przed tymi wła nie rodnikami. GSH reaguje bowiem bezpo rednio, nieenzymatycznie zarówno z NO, jak i z anionorodnikiem ponadtlenu [65, 66, 67]. Jest on równie , o czym była mowa wcze niej (podrozdział 5.2.2.1 i 5.2.4), donorem elektronów w katalizowanej przez GPx reakcji redukcji nadtlenu wodoru i toksycznego nadtenioazotynu [148], powstaj cego spontanicznie w reakcji NO z anionorodnikiem ponadtlenu.

5.2.5.4. Interakcja metaboliczna mi dzy astrocytami a neuronami

Astrocyty syntetyzuj , gromadz i uwalniaj GSH, dlatego te postuluje si , e s one komórkami dostarczaj cymi ten tripeptyd neuronom [64]. Istnienie metabolicznej interakcji mi dzy neuronami a astrocytami wydaj si potwierdza dane eksperymentalne [81, 135, 149], Te dwa typy komórek nie współzawodnicz o prekursory do syntezy glutationu [119], jednak e dost pno cysteiny ma znacz cy wpływ na st enie tego peptydu w neuronach. Obecno astrocytów utrzymuje [39], a nawet podnosi poziom GSH w hodowanych neuronach, natomiast ich brak prowadzi do spadku jego st enia w tych komórkach [135, 149]. Wyniki te sugeruj , e co najmniej jeden prekursor GSH musi by dostarczany przez astrocyty i ogranicza neuronaln biosyntezy GSH. Uwalnianie cysteiny przez astrocyty znajduj ce si w płynie hodowlanym, za-

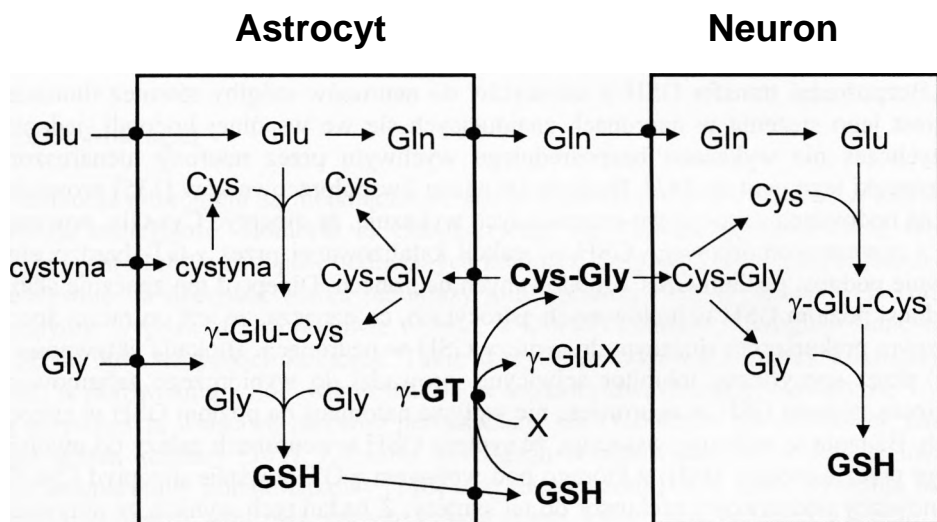
wieraj cym cystyn , zostało opisane przez Sagara i współpracowników [136]. Jednak pochodzenie uwolnionej cysteiny jest wci przedmiotem kontrowersji. Gdyby cysteina pochodziła z cystyny, w wyniku wewn trzkomórkowej redukcji, jak sugeruje Sagara i współpracownicy [136], oznaczałoby to, e proces jej uwalniania przebiega wbrew gradientowi sodowemu. Takie uwalnianie cysteiny zakłócałoby jej naturalny sposób wychwytu z otaczaj cego rodowiska, który w warunkach fizjologicznych odbywa si mi dzy innymi drog kotransportu z kationami sodu przy udziale specyficznych transporterów aminokwasów i dipeptydów, a co za tym idzie uniemo liwałoby wykorzystanie tego aminokwasu w hodowlach w st eniu mikromolowym jako prekursora do syntezy GSH [37]. Dlatego te pojawienie si cysteiny w płynie hodowlanym, w którym utrzymywane s astrocyty, mo na by raczej tłumaczy uwalnianiem i zewn trzkomórkow hydroliz GSH.

Bezpo redni transfer GSH z astrocytów do neuronów mógłby równie tłumaczy wzrost jego st enia w neuronach znajduj cych si we wspólnej hodowli, jednak e dotychczas nie wykazano bezpo redniego wychwytu przez neurony nienaruszonej cz steczki tego peptydu [63]. Badania Dringena i współpracowników [135] prowadzone na hodowlach astrocytowo-neuronalnych wykazuj , e dipeptyd Cys-Gly, powstaj - cy z zewn trzkomórkowego GSH w reakcji katalizowanej przez y-GT, bardzo efektywnie podnosi poziom GSH w hodowanych neuronach. Dipeptyd ten znacznie słabiej podnosi poziom GSH w hodowanych astrocytach, co oznacza, e jest on raczej specyficznym prekursorem słu cym do syntezy GSH w neuronach. Blokada aktywno ci y-GT przez specyficzny inhibitor aciwicyn , prowadzi do wybiórczego zahamowania wzrostu st enia GSH w neuronach, nie wpływa natomiast na poziom GSH w astrocytach. Badania te wyra nie wskazuj , e synteza GSH w neuronach zale y od uwolnionego przez astrocyty GSH, z którego pod wpływem y-GT powstaje dipeptyd Cys-Gly stanowi cy podstawowy prekursor do tej syntezy. Z bada tych wynika, e aktywno y-GT ma decyduj ce znaczenie w regulacji poziomu GSH w neuronach. Mo na zatem przypuszcza , e niska aktywno ci y-GT lub jej zahamowanie przez specyficzne czynniki mo e prowadzi do zubo enia neuronalnej puli GSH, a w dalszej konsekwencji do osłabienia systemu obrony antyoksydacyjnej neuronów. Na ryc. 4 przedstawiono hipotetyczny schemat interakcji mi dzy astrocytem a neuronem w przebiegu metabolizmu GSH.

Nie wiadomo, czy Cys-Gly ulega dalszej zewn trzkomórkowej degradacji do składowych aminokwasów, czy te rozpad zachodzi dopiero po wychwycie tego dipeptydu przez neuron. Drugi produkt hydrolizy GSH, czyli reszta y-glutamylowa, jest przenoszona na akceptor, którym mo e by glutamina dostarczana przez astrocyty [150] lub cz steczka wody. Glutamina jest prekursorem glutaminianu, niezb dnego substratu do syntezy GSH. Tak wi c, astrocyty dostarczaj neuronom oprócz Cys-Gly tak e glutamin , czyli zapewniaj komplet aminokwasów potrzebnych do biosyntezy GSH w neuronach.

Odkrycie interakcji metabolicznej mi dzy astrocytami a neuronami daje teoretyczne podstawy do opracowania metod modulacji st enia GSH w neuronach. Jak wiadomo, st enie GSH w astrocytach determinuje pr dko jego uwalniania [63]. Dlatego te terapie, które prowadziłyby do wzrostu poziomu GSH w astrocytach, równocze nie nasilałyby jego wpływ, a tym samym dost pno prekursorów do syntezy GSH w neuronach. Rola y-GT polega na regulacji zewn trzkomórkowego st enia GSH oraz poziomu Cys-Gly. Ekspresja tego enzymu pozostaje pod kontrol wielu czynni-

ków [151], które w różnych typach komórek nerwowych mogą również ulegać modulacji, np. w astrocytach 1,25-dihydroksywitamina D₃ podnosi aktywność γ -GT [130, 152]. Wzrost aktywności γ -GT może prowadzić do zwiększenia stężenia Cys-Gly, a modulacja nieznanego jeszcze szlaku uwytkowania tego dipeptydu przez neurony mogłaby mieć wpływ na stężenie GSH w neuronach.



Ryc. 4. Hipotetyczny schemat interakcji astrocyt-neuron w przebiegu metabolizmu GSH. Astrocyty używają różnych egzogennych substratów do syntezy GSH. Uwolniony z astrocytu GSH jest substratem dla ektoenzymu γ -GT. Cys-Gly powstaje pod wpływem γ -GT służy jako prekursor neuronalnego GSH. Glutamina (Gln) uwalniana przez astrocyt służy jako prekursor glutaminianu (Glu) potrzebnego do syntezy GSH. Nie wiadomo, czy hydroliza Cys-Gly, która jest przeznaczona do uwytkowania wewnątrzneuronalnego, zachodzi w przestrzeni międzykomórkowej czy po jej wychwycie w neuronie. Gly - glicyna; Cys - cysteina; Cys-Gly - cysteinylglicyna; γ -Glu-Cys - γ -glutamylcysteina (wg Dringena [124] - zmodyfikowane)

5.3. Specyficzne funkcje zewnątrzkomórkowego glutationu w układzie nerwowym

Obecność GSH w mózgu w przestrzeni międzykomórkowej została potwierdzona w badaniach prowadzonych metodą mikrodializy [153, 154]. Jednakże, funkcja zewnątrzkomórkowego GSH nie została jasno określona i wiele jej aspektów pozostaje w sferze domysłów. Dotychczas uważano, że GSH jest przede wszystkim komórkowym antyutleniaczem katalizującym reakcje z udziałem peroksydazy glutationowej.

Oprócz udziału w tej reakcji, w przestrzeni mi dzykomórkowej reaguje on z rodnikami hydroksylowymi i aldehydowymi produktami peroksydacji lipidów, chroni c w ten sposób błony komórkowe przed ich atakiem. Zewn trzkomórkowy GSH jako substrat y-GT prawdopodobnie słu y równie do detoksyfikacji glutaminianu, gdy w warunkach eksperymentalnej ischemii obserwowano wzrost st enia zewn trzkomórkowego y-glutamylglutaminianu oraz innych dipeptydów y-glutamylowych [155].

Badania ostatnich lat prowadzone w trzech niezale nych o rodkach (Japonia, Kanada, Finlandia) przy u yciu ró norodnych technik badawczych, obejmuj cych wi zanie znakowanych ligandów, synaptyczne uwalnianie i wychwyty oraz pomiary elektrofizjologiczne sugeruj , e GSH mo e pełni w mózgu funkcj zarówno neuromodulatora jonotropowych receptorów glutaminianergicznych, jak i nowego neuroprzeka nika [156, 157, 158].

5.3.1. Uwalnianie cysteiny i glutationu w mózgu

W układzie nerwowym przekazywanie sygnałów mi dzy komórkami odbywa si za pomoc specyficznych cz steczek, czyli neuroprzeka ników i neuromodulatorów. S one uwalniane w sposób kontrolowany z wewn trzkomórkowych kompartmentów do przestrzeni mi dzykomórkowych, sk d oddziałuj na s iaduj ce komórki. Po wprowadzeniu do skrawków mózgu jonów potasu w st eniu 50 mM dochodzi do depolaryzacji błon komórkowych i wapniowozale nego uwalniania zwi zków. Uwalnianie takie mo e odbywa si pod wpływem bezpo rednio działaj cego czynnika indukuj -cego depolaryzacji lub w sposób po redni, poprzez neuroaktywne substancje, uwolnione wcze niej na drodze depolaryzacji.

W kontek cie tego rozmowowania wykazano, e GSH wyst puj cy w mózgu w wysokim st eniu od 1 do 3 mM na kilogram mokrej masy i w homogenicie tkankowym znajduje si zarówno we frakcji synaptosomalnej, jak i cytozolowej. Przy czym we frakcji synaptosomalnej około 35% znajduje si tylko w synaptosomach, 41% w mitochondriach, a 21% w mielinie. Wewn trzkomórkowe rozmieszczenie GSH jest wi c zbli one do dystrybucji w komórce pobudzaj cych aminokwasów glutaminianu i asparaginianu [159]. Cysteina uwa ana za prekursora GSH jest uwalniana w ró nych obszarach mózgu, tak jak glutaminian i glicyna, czyli aminokwasy pełni ce funkcje neuroprzeka ników [160]. Podobnie GSH jest uwalniany ze skrawków mózgu pod wpływem depolaryzacji, indukowanej wysokim st eniem potasu, w sposób zale ny od jonów wapnia [161], Mechanizm tego uwalniania jak dotychczas nie został poznany. Fakt, e jest to proces zale ny od obecno ci jonów Ca^{2+} sugeruje, i mo e to by albo typowy mechanizm p cherzykowy, charakterystyczny dla klasycznych neuroprzeka -ników lub te wpływ GSH zachodzi po rednio pod kontrol uwalnianego neuroprzeka nika. W mózgu szczura zarówno cysteina, jak i GSH s najbardziej intensywnie uwalniane w ródmózgowiu, mi dzymózgowiu, korze, hipokampie i pr kowiu, a najslabiej w rdzeniu przedłu onym, mo cie i mó d ku [162], W strukturach tych dochodzi do dwu- i trzykrotnego przekroczenia poziomu wpływu spoczynkowego, który wynosi kilka pikomoli na mg białka na minut .

Badania prowadzone w skrawkach mózgu sugeruj , e komórkami uwalniaj cymi GSH s neurony [161]. Z kolei badania na kulturach komórkowych, jak dotychczas, wskazuj , e komórkami tymi s astrocyty [63, 64, 163], Poziom uwalnianego GSH

przez hodowane astrocyty początkowo szacowano na podstawie jego stężenia w płynie hodowlanym. Oceny te były jednak zaniżone, gdy nie uwzględniały aktywności γ -GT, tj. enzymu odpowiedzialnego za zewnątrzkomórkowy rozpad GSH. Gdy aktywność γ -GT zostaje zahamowana przez specyficzny inhibitor acetylowy, stężenie zewnątrzkomórkowego GSH stopniowo wzrasta. Według obliczeń Dringena [98], wskaźnik uwalniania GSH wynosi 2,1 nmol/(godz. \times mg białka). Jest on zbliżony do wartości 3,2 nmol/(godz. \times mg białka), tj. wskaźnika, który wcześniej obliczono [163] na podstawie kinetyki uwalniania tego peptydu z astrocytów [63]. Hodowane astrocyty uwalniają w ciągu 1 godz. około 10% wewnątrzkomórkowej puli GSH [163]. Równocześnie w komórkach tych odbywa się intensywne syntezy tego peptydu. Biorąc pod uwagę przytoczone powyżej wskaźniki uwalniania GSH, jak i 5-godzinny czas jego półtrwania w astrocytach, należy stwierdzić, że uwalnianie GSH jest procesem zwyczajnie najwzajemniejszą ilości tego peptydu. Tempo uwalniania GSH z astrocytów zależy od jego wewnątrzkomórkowego stężenia i przebiega zgodnie z kinetyką Michaelis-Menten [63]. Jest ono częściowo hamowane przez preparaty przeciwnowotworowe, ale w przeciwieństwie do hepatocytów w trofoblastach nie jest blokowane przez metionin [98]. Wartość stałej K_M dla wypływu GSH z hodowanych astrocytów wynosi 36 mM [63] i jest o rząd wielkości wyższa od tej, jak obliczono dla wypływu GSH z hepatocytów [164]. Dane te wskazują, że w hepatocytach i astrocytach istnieją odmienne mechanizmy uwalniania GSH. Astrocyty uwalniają GSH głównie w formie zredukowanej, nie mogą jednak wykluczyć, że komórki te są także zdolne do uwalniania formy utlenionej, czyli disarczku (GSSG), jak to ma miejsce w przypadku innych tkanek.

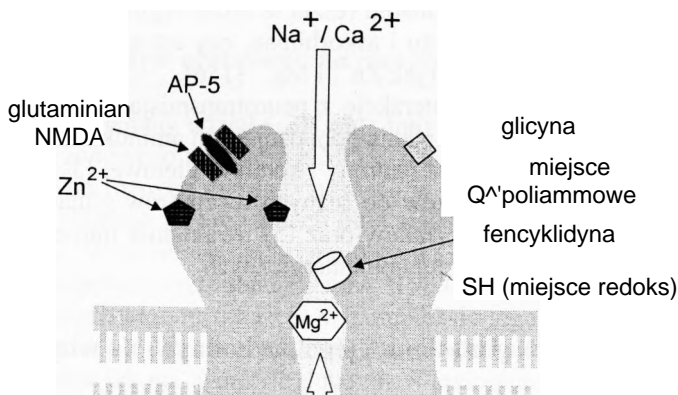
5.3.2. Klasyfikacja receptorów glutaminianergicznych

Przyjmuje się, że receptory glutaminianergiczne (GluRs) odgrywają kluczowe role w mechanizmach leżących u podstaw ważnych fizjologicznych funkcji mózgu, takich jak uczenie i pamięć [165]. Stwierdza się również, że zaburzenia funkcji tych receptorów mogą być związane zarówno z ostrymi zaburzeniami neurologicznymi, takimi jak niedokrwienne uszkodzenie mózgu, jak i z chronicznymi schorzeniami neurodegeneracyjnymi, do których należy zaliczyć epilepsję, chorobę Parkinsona, Huntingtona i stwardnienie zanikowe boczne [16, 166]. Według najbardziej aktualnej klasyfikacji receptory glutaminianergiczne, ze względu na drogę, jak przekazywany jest sygnał w układzie nerwowym, dzielą się na dwie klasy: jonotropowe i metabotropowe [167, 168]. Integralnymi cząstkami jonotropowych receptorów glutaminianergicznych są kationospecyficzne kanały jonowe. Aktywacja tych receptorów prowadzi do otwarcia kanałów jonowych, przez które odbywa się przepływ jonów zgodnie z gradientem stężenia. Farmakologiczny podział receptorów jonotropowych oparty jest na zrobinowanej ich wrażliwości na egzogenne agonisty, kwas N-metylo-D-asparaginowy (NMDA). W klasie jonotropowych receptorów glutaminianergicznych wyróżnia się receptory NMDA wrażliwe na tego agonistę oraz receptory niewrażliwe na NMDA, czyli tak zwane receptory nie-NMDA, do których należy zaliczyć receptory AMPA pobudzane przez kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy (AMPA) i receptory kainowe (KA) pobudzane przez kwas kainowy. Receptory NMDA są przepuszczalne dla jonów Na^+ , Ca^{2+} i K^+ , natomiast AMPA i KA są przepuszczalne dla jonów Na^+ i K^+ , a znacznie słabiej dla jonów Ca^{2+} . Glutaminianergiczne receptory metabotropowe

sprz one z białkami G i funkcjonalnie s zwi zane albo z obrotem fosforanu inozytolu, albo z metabolizmem cyklicznych nukleotydów [168]. W klasie receptorów metabotropowych wyró nia si trzy grupy. Grupa I (mGluR1 i mGluR5) stymuluje powstanie 1,4,5-fosforanu inozytolu i diacyloglicerolu, natomiast grupy II (mGluR2 mGluR3) i III (mGluR4, mGluR6-8) redukuj poziom wewn trzkomórkowego c-AMP i c-GMP.

5.3.3. Budowa receptora NMDA

Receptor NMDA jest kompleksem białkowym, którego integraln cz stanowi kanał jonowy przepuszczalny dla jonów Na^+ , Ca^{2+} i K^+ . Jak wskazuj najnowsze badania, receptor ten jest zbudowany z 4, a nie, jak s dzono wcze niej, 5 podjednostek [169]. W jego skład wchodz dwie podstawowe podjednostki NMDAR1 oraz dwie moduluj ce podjednostki NMDAR2, przy czym podjednostka NMDAR2 zale nie od koduj cego j genu jest zró nicowana na 4 typy (NMDAR2A, NMDAR2B, NMDAR2C, NMDAR2D). W kompleksie receptora NMDA mo na wyró ni kilka miejsc wi cych ligandy: (1) miejsce dla agonistów, takich jak glutaminian, asparaginan, NMDA, oraz antagonistów, takich jak AP-5 (kwas 2-amino-5-fosfonowalerianowy), CGS-19755 (kwas cis-4-fosfonometylo-2-piperydynokarboksylowy), CGP-37849 (kwas DL-(E)-2-amino-4-metylo-5-fosfono-3-walerianowy), AP-7 (kwas 2-amino-7-fosfonoheptanowy), CPP (kwas 3-(2-karboksypiperazyno-4-ilo)propylo-1-fosfonowy); (2) koagonistyczne miejsce wi ce glicyn i seryn; (3) miejsce wi ce Mg^{2+} wewn trz kanału jonowego; (4) miejsce wi ce fencyklidyn (PCP) w kanale jonowym, do którego wi si tak e MK-801 i ketamina - zwi zki o wła ciwo ciach antagonistycznych w stosunku do NMDA; (5) moduluj ce miejsce dla Zn^{2+} ; (6) miejsce poliaminowe oraz (7) miejsce wra liwe na potencjał oksydoredukcyjny. Na ryc. 5 przedstawiony jest schemat budowy receptora NMDA.



Ryc. 5. Schemat receptora NMDA uwzgl dniaj cy miejsca moduluj ce

5.3.4. Dlaczego glutation może być modulatorem neurotransmisji glutaminianergicznej?

W skład cząsteczki GSH wchodzi trzy aminokwasy będące powszechnie znanymi neuroprzekaznikami lub modulatorami transmisji glutaminianergicznej. **Glutaminian** jest agonistą wszystkich klas receptorów glutaminianergicznych, zarówno jonotropowych, jak i metabotropowych. Cząsteczka GSH mimo stosunkowo dużego rozmiaru i ograniczonej elastyczności, to jest właściwości, które mogą ograniczać jej zdolność do interakcji z receptorami lub białkami transporterowymi, wydaje się obiecującym ligandem dla miejsc wiązających glutaminian. Wolna **cysteina** jest neurotoksyną (p. rozdział 2), która może wywoływać nadaktywację receptorów NMDA w wieloraki sposób, między innymi poprzez redukcję funkcjonalnych grup hydrosulfidowych, tworzenie kompleksów z hamującymi jonami Zn^{2+} oraz poprzez podwyższenie poziomu kwasu cysteiniosulfinowego, związku będącego agonistą receptora NMDA [170]. Cysteina jako składnik cząsteczki GSH jest całkowicie nietoksyczna, a co więcej GSH posiada właściwości neuroprotektyjne. Mimo to GSH może nadal wpływać na stan redoks receptora NMDA przez wolne grupy hydrosulfidowe. Z kolei **glicyna**, główny neuroprzekaznik hamujący w rdzeniu kręgowym, jest koagonistą w kompleksie receptora NMDA. Struktura chemiczna GSH wydaje się więc narzucać tej cząsteczce charakter związku neuroaktywnego, który może funkcjonować jako neuromodulator.

Modulowanie neurotransmisji glutaminianergicznej może odbywać się w następujący sposób:

1. Reszta glutamylowa cząsteczki GSH może działać jako agonista lub kompetycyjny antagonist receptorów glutaminianergicznych.

2. Reszta glicynowa może oddziaływać na koagonistyczne miejsce wiązające glicynę w kompleksie receptora NMDA.

3. Reszta cysteinowa może modulować wychwyt lub miejsca wiązające glutaminian na drodze bezpośrednio interakcji z funkcjonalnymi grupami tiolowymi białek transporterowych lub receptorowych. Ponadto reszta ta może regulować poziom związków redoksowych, takich jak tlenek azotu i askorbinian, czy też może tworzyć kompleksy z hamującymi jonami metali, takimi jak Zn^{2+} i Mg^{2+} [156].

Glutation może wchodzić w interakcję z neurotransmisją glutaminianergiczną na następujących jej etapach: (1) uwalniania pobudzających aminokwasów; (2) wychwytu pobudzających aminokwasów przez neurony i komórki glicyjne; (3) wiązania glutaminianu i jego selektywnych analogów do różnych receptorów glutaminianergicznych; (4) generowania wtórnych przekazników oraz (5) uwalniania innych neuroprzekazników drogą aktywacji receptorów glutaminianergicznych.

5.3.5. Modulujący wpływ glutationu i jego pochodnych na wiązanie glutaminianu

Wpływ GSH i jego pochodnych na wiązanie znakowanego glutaminianu [3H]Glu badano *in vitro* w preparatach błon synaptycznych pochodzących z mózgu szczura [28, 156, 171]. Znakowany glutaminian wiąże się z błonami zarówno w obecności, jak i pod nieobecność jonów Na^+ . Zarówno GSH, jak i GSSG hamują sodowo zależne wiązanie [3H]Glu z błonami synaptycznymi w temperaturze 2°C i 30°C. Podobny efekt

hamują cy wywołują dipeptydy glutamylo- γ , np. γ -glutamyl-L-glutamina, γ -glutamyl-L-alanina, γ -glutamylotyrozyna, γ -glutamylhistydyna i inne zawierające w swojej cząsteczce glutaminian jako wolną resztę aminową. Takiego efektu nie wywołują natomiast związki, których grupa α -aminowa glutaminianu nie jest wolna, np. N-karbobenzoksyl-L-glutaminian czy kwas foliowy. Ponadto adenozyna związków zawierających wolne grupy hydrosulfidowe, takich jak 2-merkaptoetanol, ditiotritol (DTT) lub ditioeritrol, nie hamuje sodowego wiązania [^3H]Glu [156]. Badania te wyraźnie wskazują, że obecność wolnej grupy α -aminowej, a nie hydrosulfidowej ma decydujący wpływ na hamowanie sodowego wiązania [^3H]Glu do błon synaptycznych przez te peptydy. Idąc tym samym rozumowaniem, również GSH i GSSG mogą wywoływać swoje efekty hamujące na wiązanie [^3H]Glu poprzez wolną resztę γ -glutamylową, a nie hydrosulfidową.

Wiele dowodów wskazuje, że zależne od Na^+ wiązanie [^3H]Glu odzwierciedla wysoki powinowactwo i sodowe wiązanie transport glutaminianu przez błony synaptyczne [172]. Badania te nasunęły więc przypuszczenie, że obie formy glutationu (GSH i GSSG) mogą modulować transmisję glutaminianergiczną poprzez hamowanie sodowego wychwytu glutaminianu ze szczeliny synaptycznej. Jednakże w warunkach fizjologicznych prawdopodobnie tylko glutation w formie zredukowanej wywiera taki efekt, gdyż stężenie GSSG jest bardzo niskie we wszystkich strukturach mózgu i wynosi mniej niż 1% całkowitej puli GSH. Ponadto, o czym była mowa wcześniej, endogenny GSH jest uwalniany w skrawkach mózgu pod wpływem depolaryzacji wywołanej jonami K^+ na drodze wapniowej, głównie w formie zredukowanej [161]. Stąd możemy sobie wyobrazić, że GSH pochodzi z kompartmentu neuronalnego i jest stymulowany neurotransmisją glutaminianergiczną przez hamowanie wychwytu glutaminianu. Wychwyt neuroprzekazników ze szczeliny synaptycznej uważany jest bowiem za mechanizm inaktywacyjny w mózgu ssaków. Brak jest jednak bezpośrednich dowodów potwierdzających hamujący wpływ GSH na wychwyt glutaminianu.

5.3.6. Modulujący wpływ glutationu na receptor NMDA

Aby ocenić domniemany udział GSH oraz innych związków holowych w procesie otwierania kanału jonowego receptora NMDA, badano ich wpływ na wiązanie znakowanych ligandów do różnych miejsc wiązających w obrębie kompleksu tego receptora. Do wiązania wykonano na preparatach błon synaptycznych pochodzących z mózgu szczura [173, 174]. W stężeniach mikromolowych GSH, jak i GSSG hamują wiązanie znakowanych, kompetycyjnych antagonistów NMDA [^3H]CPP i [^3H]CGP 39653 do miejsc rozpoznających neuroprzekaznik w kompleksie tego receptora [28, 156, 175]. Oprócz glutationu, tak w formie zredukowanej, jak i utlenionej, również jego S-alkylowe pochodne, takie jak np. S-metyloglutation, S-etyloglutation czy S-butyloglutation hamują wiązanie zarówno agonisty (^3H]Glu), jak i antagonisty (^3H]CPP) do miejsc rozpoznających neuroprzekaznik [174]. Wyniki te nasunęły przypuszczenie, że GSH i jego S-alkylowe pochodne wiążą się do tych miejsc w sposób niezależny od reszty hydrosulfidowej.

Wpływ GSH i jego pochodnych na miejsca wiązające fencyklidyn w kanale jonowym receptora NMDA badano przy użyciu [^3H]MK-801, niekompetycyjnego antago-

nisty, który uzyskuje dost p do swojego miejsca wi zania dopiero przy otwartym kanale jonowym. GSH i jego pochodne w st eniach niskich, poni ej 1 pM dawkozale - nie pot guj [174], a w st eniach wysokich obni aj wi zanie $[H^3]MK-801$ do błon synaptycznych [173, 174]. Efekt ten jest wi c dwufazowy. Aktywuj cy wpływ obu form glutationu na wi zanie $[H^3]MK-801$ jest addytywny do efektu wywołanego przez glicyn . Antagoni ci NMDA (CGP 39653, AP-5) oraz antagoni ci miejsca glicynowego (kwas 7-chlorokinurenowy) zapobiegaj aktywuj cemu działaniu GSH na wi zanie $[H^3]MK-801$, natomiast agoni ci NMDA s pozbawieni tego działania. Ani GSH, ani jego pochodne nie pot guj wi zania $[H^3]MK-801$ w obecno ci glutaminianu. GSH wi e si do miejsca w kanale jonowym receptora NMDA, podobnie jak do miejsca dla agonisty w tym receptorze poprzez woln reszt y-glutamylow [28, 176],

Zarówno GSH, jak i GSSG w st eniach powy ej 100 pm wypieraj w niewielkim stopniu znakowan glicyn oraz kwas 5,7-dichlorokinurenowy (antagonista) z wi - cych je miejsc w kompleksie receptora NMDA. Podobnie pochodne S-alkylowe GSH, lecz dopiero w wysokich st eniach (1 mM), hamuj wi zanie znakowanej glicyny do jej miejsca wi cego [174], Poniewa powinowactwo koagonistycznego miejsca glicynowego do GSH i jego pochodnych jest słabo zaznaczone, przypuszcza si , e powy ej opisane efekty nie maj fizjologicznego znaczenia.

Nadal pozostaje przedmiotem dyskusji, czy wpływ glutationu (GSH i GSSG) na kompleks receptora NMDA ma charakter agonistyczny, czy te antagonistyczny [171, 177]. Z jednej strony nasilone pod wpływem GSH wi zanie MK-.801 mo na interpretowa jako potwierdzenie działania agonistycznego tego peptydu [157], gdy podobny efekt wywołuj równie agoni ci NMDA. Z drugiej strony, hamuj cy wpływ GSH w st eniach mikromolowych (od 100 do 300 pM) na indukowany podaniem NMDA napływ jonów wapnia do komórek ziarnistych mózgu, wskazuje na rol antagonistyczn tego peptydu [171], Poniewa wpływ na pr dy wapniowe lepiej odzwierciedla biologiczn funkcj kompleksu receptora NMDA, a fizjologiczne st enie zewn trzkomórkowego GSH waha si w granicach warto ci mikromolowych, Oja i współpracownicy [171] sugeruj , e GSH jest antagonist receptora NMDA. Koncepcja antagonistycznego działania GSH jest ponadto spójna z neuroprotektoryjnym działaniem tego peptydu, zwłaszcza patrz c z punktu widzenia neurotoksyczno ci indukowanej przez NMDA [178].

Receptor NMDA jest wra liwy na zmiany potencjału oksydoredukcyjnego rodo-wiska. Wła ciwo ta jest zwi zana z budow receptora NMDA, gdy białka podjednostek tworz cych kanał jonowy tego receptora zawieraj w swoim składzie cystein , która mo e wchodzi w reakcje z reduktorami komórkowymi, takimi jak GSH czy kwas askorbinowy. Otwieranie kanału jonowego tego receptora jest podwy szone w warunkach redukcji, a zahamowane w warunkach utleniania. Modulacja funkcji receptora NMDA poprzez wpływ na jego stan redoks jest procesem kompleksowym, obejmuj cym co najmniej trzy miejsca zewn trzkomórkowe [179], Naturalny receptor NMDA oscyluje mi dzy stanem pełnej redukcji lub pełnego utlenienia. W warunkach eksperymentalnych disulfidowe substancje redukuj ce, np. ditiotreitrol (DTT), pot guj , podczas gdy tiolowe zwi zki utleniaj ce, np. kwas 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoesowy (DTNB), hamuj funkcje tego receptora. DTT nasila napływ jonów wapnia zainicjowany podaniem zarówno glutaminianu, jak i NMDA. Im wy sze st enie glutaminianu, tym silniejszy wpływ DTT na napływ jonów wapnia [180]. Fakt ten wskazuje, e w aktywowanym kompleksie receptora NMDA miejscem działania DTT jest dost pne

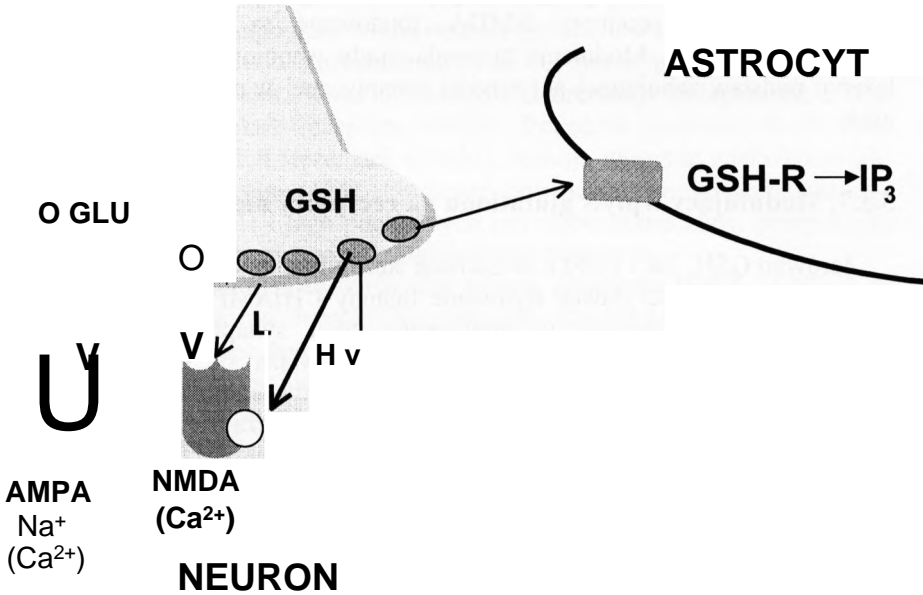
wizanie disiarczkowe znajdujące się poza miejscem wiązania glutaminianu. Obie formy glutationu (GSH, GSSG) oraz ich pochodne nie wpływają na fizjologiczne przepływy wapniowe w hodowanych komórkach ziarnistych mózgu, hamują natomiast napływ jonów wapnia indukowany glutaminianem lub innymi agonistami glutaminianergicznymi [171, 174]. GSH osłabia również napływ jonów wapnia indukowany przez DTT i glutaminian. Takiego efektu nie wywołuje jednak cysteina [177]. Mechanizm działania glutationu różni się od tego, jaki prezentuje DTT i cysteina. Jednakże w zakresie wysokich, milimolowych stężeń również GSH wywołuje aktywację receptora NMDA poprzez zmianę jego stanu redokсового [171]. W stężeniach tych GSH, podobnie jak DTT, potęguje odpowiedź na glutaminian, szczególnie w komórkach, w których receptory NMDA zbudowane są z podjednostek NMDAR1 i NMDAR2A [181]. Modulacja ta nasila przepływy wapniowe, których działanie może polegać na zaburzonej aktywności synaptycznej w pewnych stanach patologicznych.

5.3.7. Modulujący wpływ glutationu na receptory nie-NMDA

Zarówno GSH, jak i GSSG, w zakresie stężeń fizjologicznych, wypierają w sposób zależny od wysokości dawek trytowane ligandy [^3H]AMPA i [^3H]KA związane ze specyficznymi receptorami w preparatach błon synaptycznych, wyizolowanych z mózgu szczura [174]. Obie formy glutationu wiążą się głównie do receptorów AMPA, natomiast ich powinowactwo do receptorów kainowych jest 25-30-krotnie niższe. Również S-alkylowe pochodne glutationu wiążą się z receptorami AMPA z powinowactwem w zakresie niskich wartości mikromolowych. Podobna skuteczność GSH i GSSG w wypieraniu AMPA z wiązania wskazuje, że miejsce redoksove tego receptora nie odgrywa istotnej roli w tym procesie.

Nie jest wiadomo, czy mechanizm wypierania AMPA z wiązania ma charakter kompetycyjny, czy też niekompetycyjny. GSH i jego pochodne mają tendencję do istotnego obniżenia zarówno wartości B_{max} (głównie miejsc wiązania z receptorem), jak i K_d (stała dysocjacji) receptora AMPA. Stąd ten mechanizm hamowania wiązania AMPA przez GSH jest najwyraźniej bardziej złożony i może polegać na allosterycznej modulacji tego receptora. Glutation nie działa jako agonista receptora AMPA, gdyż depolaryzacja wywołana jego podaniem na skrawki korowe mózgu nie jest antagonizowana przez związek 6,7-dinitrochinoksalino-2-3-dion (DNQX), będący antagonistą receptorów nie-NMDA [158]. W świetle tych danych wydaje się, że GSH w stężeniach fizjologicznych wypiera glutaminian głównie z klasy receptorów AMPA w sposób allosteryczny przy udziale reszty γ -glutamylowej. Efekt ten może odgrywać pewną rolę w precyzyjnym regulowaniu transmisji glutaminianergicznej poprzez skracanie czasu trwania przepływów jonowych, w których powstaniu pośredniczy receptor AMPA. Receptory AMPA i NMDA są zlokalizowane w bezporządku w błonach postsynaptycznych i wzajemnie współdziałają. Receptor NMDA ulega aktywacji przez kwas glutaminowy dopiero przy odpowiednio intensywnej stymulacji receptorów AMPA i napływie do wnętrza neuronu pozytywnie naładowanych jonów Na^+ , co niweluje zależny od potencjału blok magnezowy [167]. Stąd ten równoczesne uwalnianie glutaminianu i GSH z zakończeń nerwowych [35] może mieć globalne konsekwencje dla transmisji synaptycznej. Na ryc. 6 przedstawiono hipotetyczny model działania GSH w synapsie zaproponowany przez Janakę i współpracowników [28].

zakoczenie presynaptyczne



Ryc. 6. Hipotetyczny model synaptycznego działania GSH. W czoci presynaptycznej znajduje si glutaminian (GLU) i glutation (GSH). Zakoczenie presynaptyczne jest podzielone, aby zaznaczy, e GSH mo e znajdowa si w tym samym zakoczeniu co Glu lub w odrbnym. W czoci postsynaptycznej znajduj si receptory glutaminianergiczne (NMDA i AMPA), jak równie receptory glutationowe (GSH-R). Strzałki wskazuj kierunki działania uwalnianego Glu (linia przerywana) i GSH (linia ci gła). Glutaminian aktywuje receptory NMDA i AMPA. GSH działa bezpo rednio na własne receptory znajduj ce si na neuronach i astrocytach, jak i na ró ne miejsca wi ce w kompleksie receptora NMDA, w tym tak e na miejsce wra liwe na potencjał oksydoredukcyjny (S-S). Przedstawiony schemat wskazuje na zawiło interakcji pomi dzy neuroprzekaznikami, gdy glutaminian i GSH s lokalnie uwalniane. Dodatkowym czynnikiem wpływaj cym na zło ono tych procesów jest enzymatyczny rozpad GSH w synapsie do składowych aminokwasów (glutaminian, cysteina, glicyna), które indywidualnie mog wpływa na funkcj receptorów glutaminianergicznych. L - niskie st enie GSH, H - wysokie. IP₃ - trójfosforan inozytolu (wg Janaky i wsp. [30], zmodyfikowano)

GSH w st eniach mikromolowych, po wywołaniu depolaryzacji przypuszczalnie drog aktywacji własnych receptorów glutationowych (p. podrozdział 5.3.8), mo e hamowa szybki potencjał depolaryzacyjny wywołany działaniem glutaminianu na receptory AMPA, blokuj c w sposób po redni napi ciowozale ne otwieranie kanału jonowego s siaduj cego receptora NMDA. Równoczesne uwalnianie glutaminianu i GSH zgodnie z hipotez proponowan przez Janaky i współpracowników [28] prowadziłoby zatem do kaskady zdarze , które umo liwiają receptorom harmonijn reaktywacj w krótkim czasie.

5.3.8. Obecno i charakterystyka miejsc wi cych giutation

Badania receptorowe z u yciem trytowanego glutationu [H^3]GSH wykazały istnienie w układzie nerwowym miejsc o wysokim powinowactwie zarówno do glutationu, jak i jego pochodnych [27, 28, 177, 182, 183]. Miejsca te zostały zidentyfikowane po raz pierwszy w błonach synaptycznych pochodz cych z mózgu szczura przez badaczy japo skich Ogita i Yoned w 1987 roku. Od tego momentu coraz wyra niej sugeruje si , e s one odr bnymi typami receptorów, do których GSH wi e si reszt cysteii w st eniach nano- do mikromolowych [28, 176]. Miejsca te s całkowicie odmienne od wszystkich znanych receptorów dla pobudzaj cych aminokwasów, przy czym GSH nie jest z nich wypierany ani przez agonistów, ani antagonistów zarówno jonotropowych, jak i metabotropowych receptorów glutaminianergicznych. Giutation jest natomiast wypierany z tych miejsc w zakresie st e mikromolowych przez zwi ki siarki, takie jak GSSG, S-nitrozoglutation, γ -glutamylcystein , cysteiloglicyn , cystein i nieco mniej efektywnie przez ditioneitol, sulfonian glutationu oraz pochodne S-alkylowe glutationu [28, 177].

Podobnie jak receptor NMDA, miejsca wi ce GSH posiadaj jedno lub wi cej miejsc koagonistycznych do allosterycznej modulacji. Miejsca te wydaj si sprz one z kanałem sodowym, gdy du y, szybki potencjał depolaryzacyjny wywołany podaniem GSH na skrawki korowe zanika, gdy w rodowisku brakuje jonów sodu. Niedobór wapnia, jak równie antagoni ci receptorów NMDA i AMPA nie wpływaj na warto tego potencjału [158]. W układzie nerwowym obecno miejsc wi cych [H^3]GSH wykazano w nast puj cych strukturach: siatkówka, podwzgórze, pr kowie, rdze kr gowy, ród mózgowie, most, hipokamp, mó d ek i kora mózgowa [158]. Cz tych miejsc znajduje si na powierzchni astrocytów, oligodendrocytów oraz komórek mikrogleju. Podanie GSH do płynu hodowlanego, w którym znajduj si astrocyty wywołuje w tych komórkach wzrost wewn trzkomórkowego st enia trifosforanu inozytolu. Fakt ten potwierdza istnienie w błonie komórkowej astrocytów receptorów dla GSH, jak równie sugeruje, e s one sprz one z fosfolipaz C [27, 182]. Ostateczne potwierdzenie istnienia receptora glutationowego b dzie mo liwe w momencie wyizolowania go i sklonowania.

5.3.9. Obecno i rola S-nitrozoglutationu (GSNO) w mózgu

Tlenek azotu odgrywa bardzo wa n rol w wielu fizjologicznych procesach, w tym w regulacji ci nienia krwi, w hamowaniu agregacji płytek krwi oraz w modulowaniu odporno ci i stanów zapalnych. W centralnym układzie nerwowym (CUN) NO działa

jako przekaźnik neuronalny, co ma duże znaczenie dla takich procesów, jak plastyczność neuronalna czy neurotoksyczność [184]. NO nie działa jak konwencjonalny neuroprzekaźnik, gdyż jako gaz łatwo dyfunduje przez błony komórkowe. Nie może być magazynowany w pęcherzykach synaptycznych ani też nie może być uwalniany na drodze egzocytozy. Choć pobudzenie receptora NMDA indukuje uwalnianie NO z komórek korowych, to, jak do tej pory, nie wiadomo, w jakiej formie redoksowej NO jest dostarczany, transportowany, a następnie przechowywany w centralnym systemie nerwowym. NO wykazuje bardzo silną reaktywność w stosunku do tioli komórkowych i tworzy z GSH S-nitrozoglutation (GSNO), a z cysteiną S-nitrozocysteinę. Fizjologiczne stężenie GSNO w mózgu wynosi 6 do 7 pM [185] i jest porównywalne ze stężeniem w surowicy krwi i w drogach oddechowych. Wartość stężenia GSNO w mózgu stanowi zaledwie znikomą część (od 0,3 do 0,6%) tkankowego stężenia GSH w mózgu (1 do 3 mM). Wartość ta jest natomiast zbliżona do zewnątrzkomórkowego stężenia tego peptydu w mózgu (p. podrozdział 5.2.2). Inkubacja skrawków mózgu z NMDA podnosi czterokrotnie poziom GSNO w tkance mózgowej.

Fizjologiczne znaczenie S-nitrozotiole w CUN nie jest znane. GSNO jest zarówno donorem NO, jak i najsilniejszym aktywatorem cyklicznej guanylowej [184]. Nie jest dotychczas wyjaśnione, czy endogenne GSNO *per se* aktywuje cyklazę guanylową, czy też aktywacja tego enzymu odbywa się poprzez uwolnienie z GSNO rodnika tlenu azotu. Obecność specyficznych miejsc wiązających dla znakowanego [³H]GSNO [186] przemawia na korzyść pierwszej możliwości, co oznacza, że endogenne GSNO może wiązać się z błonami komórek docelowych i sam wywołuje aktywację. W odniesieniu do drugiej możliwości, GSNO może być bardziej stabilnym nośnikiem rodnika tlenu azotu, który swobodnie przechodzi przez błony komórkowe i działa aktywująco na cytozolową cyklazę guanylową w komórkach docelowych. GSNO może także brać udział w reakcjach S-nitrozylacji grup hydrosulfidowych białek o kluczowym znaczeniu dla komórki, takich jak różne enzymy czy też receptory [187]. Ostatnio wykazano również, że GSNO ma bardzo silne właściwości antyoksydacyjne [188, 189] (p. rozdział 9).

5.4. Glutation a choroby neurologiczne

5.4.1. Schorzenia neurologiczne związane z glutationem

W piśmiennictwie ostatnich lat coraz więcej danych wskazuje na istnienie pozytywnej korelacji pomiędzy schorzeniami neurologicznymi a zmianami w stężeniu GSH. U pacjentów z wrodzonym deficytem syntetazy glutationowej stwierdzono opóźnienie umysłowe, spastyczny paraliż kończyn i różne formy uszkodzenia mózgu. Z kolei u pacjentów z deficytem syntetazy γ -glutamylcysteinowej obserwowano uszkodzenia mózgu, brak odruchów kołnych oraz ataksję [30]. Badania *post mortem* prowadzone u ludzi ujawniają, że poziom GSH w substancji czarnej spada w przebiegu fizjologicznego procesu starzenia, jednak spadek ten jest najbardziej wyrazisty u pacjentów cierpiących na chorobę Parkinsona [3, 4, 190]. Najnowsze badania sugerują, że niedobór GSH lub zaburzenia jego metabolizmu mają również związek z takimi schorzeniami neurodegeneracyjnymi, jak stwardnienie zanikowe

boczne (ALS - *amyotrophic lateral sclerosis*) i choroba Alzheimerera [16, 191]. Symptomy neuropsychiatryczne zwi zane z nieprawidłowym funkcjonowaniem receptorów glutaminianergicznych mog mie równie co wspólnego z neurologicznymi nieprawidłowo ciami wynikaj cymi ze zmian w poziomie GSH. Ostatnio wykazano, e zaburzenia w schizofrenii mog by zwi zane z niskim st eniem GSH w korze przedczołowej [192].

Poziom GSH ulega drastycznemu obni eniu podczas drgawek w eksperymentalnych modelach epilepsji [193] oraz u genetycznie zmodyfikowanych myszy epileptycznych [194]. Drgawki rozwijaj si równie jako nast pstwo niedoboru GSH u dorosłych szczurów, którym podawano BSO [195],

5.4.2. Rola glutationu w schizofrenii

Schizofrenia jest psychoz endogenn charakteryzuj c si szeregiem symptomów, które klasycznie dzielone s na objawy pozytywne (wytwórcze), takie jak formalne zaburzenia my lenia, deluzje, halucynacje oraz negatywne (deficytowe) obejmuj ce zaburzenia funkcji kognitywnych, socjalnych, motywacyjnych oraz zaburzenia afektu. Schizofrenia jest chorob o nieznannej patofizjologii i etiologii. Podło e biologiczne tego schorzenia próbuje si wyja nia , opieraj c si na dwóch głównych hipotezach - dopaminowej i glutaminianergicznej, z których adna przy obecnym stanie wiedzy nie pozwala w pełni na ustalenie przyczyn tej choroby. Dowody wskazuj ce na dysfunkcyj systemu dopaminowego uwzgl dniaj antypsychotyczne działanie antagonistów dopaminowych oraz indukuj ce psychozy działanie agonistów [196]. Hipoteza hipofunkcji glutaminianergicznej oparta jest na fakcie, e fencyklidyna (PCP) oraz inni niekompetyjni antagoni ci receptora NMDA wywołuj psychozy przypominaj ce schizofreni [197, 198],

Coraz wi cej dowodów wskazuje, e w schizofrenii oprócz zmian w układach neurotransmisyjnych dochodzi równie do zaburze w systemie antyoksydacyjnej obrony i do wzrostu uszkodze wywołanych toksycznym działaniem reaktywnych form tlenu [199]. U nieleczonych pacjentów z pierwszymi epizodami choroby opisano obni on aktywno jednego z głównych enzymów antyoksydacyjnych - dysmutazy ponadtlenkowej - w krwinkach czerwonych [200]. W innych badaniach prowadzonych w grupie pacjentów z pierwszymi objawami psychoz zaobserwowano podwy szony poziom nadtlenków lipidów oraz obni on aktywno peroksydazy glutationowej w osoczu [201]. Ostatnio Do i współpracownicy [192] stwierdzili metodami HPLC i spektrometrii masowej, e poziom GSH w płynie mózgowo-rdzeniowym u nieleczonych pacjentów z objawami schizofrenii jest o 27% ni szy ni w grupie kontrolnej. U tych samych pacjentów równocze nie stwierdzono metod j drowego rezonansu magnetycznego 52% spadek poziomu GSH w korze prefrontalnej. W badaniach przeprowadzonych na innej grupie chorych na schizofreni ci sami autorzy [202] wykazali równie , e poziom dipeptydu γ -glutamylglutaminy (γ -Glu-Gln), który w wi kszoci powstaje z GSH przy udziale γ -GT, jest wyra nie obni ony w płynie mózgowo-rdzeniowym w porównaniu z osobnikami kontrolnymi. Według Do i współpracowników [192], niedobór GSH mo e by przyczyn patofizjologicznych zmian w schizofrenii. Deficyt ten nie jest nast pstwem działania neuroleptyków, gdy badania zostały wykonane u pacjentów, którym wcze niej nie podawano tych leków. Autorzy ci s dz równie , e

jest mało prawdopodobne, aby deficyt GSH był spowodowany niespecyficznymi zmianami neurodegeneracyjnymi, takimi jakimi mają miejsce np. w chorobie Parkinsona lub Alzheimer'a. Wniosek ten wysuwa się z faktu, że spadek w stężeniu GSH w płynie mózgowo-rdzeniowym i korze prefrontalnej nie ma związku ani z długością okresu trwania choroby, ani z wiekiem pacjentów. Deficyt ten mógłby być raczej związany z genetycznie uwarunkowanym brakiem enzymów biorących udział w metabolizmie GSH lub z osłabieniem ich funkcji. Faktycznie u chorych na schizofrenię stwierdzano obniżenie aktywności peroksydazy glutationowej w erytrocytach i płytkach krwi [203].

Powyżej opisane badania stanowią podstawę nowej hipotezy, która usiłuje tłumaczyć zmiany obserwowane w schizofrenii mechanizmem glutationowym [185, 192]. Nadzernym celem tej hipotezy jest połączenie w jedną całość wielu biologicznych aspektów tej choroby. Zgodnie z założeniami tej hipotezy deficyt GSH w pewnych obszarach mózgu prowadzi do czterech istotnych następstw:

1. GSH dzięki obecności aktywnej grupy hydrosulfidowej bierze udział w redukowaniu wolnych rodników powstających między innymi podczas katabolizmu dopaminy [204]. Toksyczność dopaminy została udowodniona eksperymentalnie. Rabinovic i Hastings [205] wykazali, że doprowadzenie dopaminy wywołuje wzrost ilości reaktywnych metabolitów, spadek poziomu endogennego GSH i degenerację zakończeń nerwowych zawierających hydroksylazę tyrozynową. Efekt ten był nasilany, gdy podaniu dopaminy towarzyszyło zahamowanie syntezy GSH, natomiast osłabiany, gdy równocześnie z dopaminą podawano GSH.

Liczne dowody wskazują, że w schizofrenii dochodzi do dysfunkcji kory przedczołowej. Dysfunkcja ta jest prawdopodobnie odpowiedzialna za upośledzone wykonanie przez chorych złożonych zadań psychologicznych, a w szczególności za nieprawidłowe funkcjonowanie procesów pamięci operacyjnej, co przez niektórych badaczy uważane jest za najistotniejszy defekt neuropsychologiczny w tej chorobie [206]. Nasilenie zaburzeń strukturalnych i czynnościowych kory przedczołowej wykazuje związek z objawami negatywnymi schizofrenii [207]. Według Goldman-Rakic i jej współpracowników [208, 209], którzy opisali wyspecjalizowaną, synaptyczną architekturę kory przedczołowej, kolce dendrytyczne neuronów piramidowych są celem zarówno dla oddziaływania dopaminy, jak i glutamianu. Ta synaptyczna organizacja jest niezwykle ważna dla przedstawionych poniżej rozważań.

Deficyt GSH obserwowany w korze przedczołowej u chorych na schizofrenię przyczynia się do osłabienia systemu antyoksydacyjnej obrony i sprzyja uszkodzającym działaniom wolnych rodników. Wydaje się, że toksyczne działanie metabolitów dopaminy może ograniczać się do mikrośrodowiska zakończeń dopaminowych unerwiających korę [206], prowadząc raczej do degeneracji kolców dendrytycznych i dendrytów niż samych neuronów. To założenie hipotezy glutationowej jest zgodne z poprzednimi badaniami histologicznymi kory przedczołowej schizofreników, która ujawniała związek między gęstością neuronów, wskazującą na redukcję neuropilu [210]. W innych badaniach histologicznych faktycznie wykazano, że u chorych na schizofrenię w korach czołowej i skroniowej dochodzi do zmniejszenia się ilości kolców dendrytycznych na neuronach piramidowych [211, 212]. Poza tym indukowany deficytem GSH degeneracja kolców dendrytycznych może tłumaczyć obserwowany w schizofrenii spadek ilości receptorów dopaminowych D₁ [213], które między innymi są tam zlokalizowane.

Hipoteza ta również sugeruje, że niedobór GSH i/lub związek z nim enzymów w czasie rozwoju zarodkowego mógłby stanowić poważny czynnik ryzyka w tej cho-

robie. Deficyt ten poł czony z czynnikami rodowiskowymi, takimi jak np. stres, który indukuje uwalnianie dopaminy, a co za tym idzie nasila produkcj wolnych rodników, mógłby prowadzi zarówno do degeneracji kolców dendrytycznych, jak i do zaburze cytoarchitektonicznych, czyli do powstania nieprawidłowych poł cze mi dzy neuronami. Gdyby zało enie to okazało si słuszne, oznaczałoby, e deficyt GSH ma zwi - zek z zaburzeniami rozwoju mózgu. Zgodnie z neurorozwojow koncepcj schizofrenii, nieprawidłowo ci w ł czno ci mi dzyneuronalnej mog by odpowiedzialne za pewne symptomy tej choroby, takie jak zaburzenia funkcji kognitywnych i percepcyjnych [214],

2. GSH uwalniany do przestrzeni mi dzykomórkowych w korze [161] mo e funkcyjowa , jak wskazuj ostatnie badania, zarówno jako modulator receptorów glutaminianergicznych, jak i neuroprzeka nik działaj cy przez własne receptory [18]. Mo e on pot gowa odpowied receptorów NMDA na glutaminian, działaj c albo na moduluj ce miejsca redoksove [215] lub wi ce cynk (Zn^{+2}) w kanale receptora NMDA. Przy niskim poziomie GSH aktywacja receptorów NMDA mo e nie by dostateczna. Pewne symptomy schizofrenii mo na by wi za z brakiem wła ciwej stymulacji receptorów NMDA, podobnie jak objawy psychotyczne wywoływane podaniem fencyklidyny lub antagonistów receptorów NMDA.

3. Spadek poziomu GSH w korze przedczołowej mo e równie sprzyja neurotoksycznemu działaniu NO, poniewa rodnik ten nie b dzie dostatecznie wychwytywany i magazynowany w formie S-nitrozoglutationu (GSNO) i w reakcji z anionorodnikiem ponadtlkowym ulega b dzie przekształceni w toksyczny jon nadtlenoazotynowy.

4. Obni enie poziomu γ -glutamylglutaminy (γ -Glu-Gln) w płynie mózgowo-rdzeniowym mo na równie wi za z niedoborem GSH. Opisana ostatnio przez Dringena i współpracowników [135] interakcja metaboliczna mi dzy astrocytami a neuronami wskazuje, e astrocyty dostarczaj neuronom Cys-Gly. Dipeptyd ten powstaje w przestrzeni mi dzykomórkowej z GSH przy udziale γ -GT i słu y jako prekursor do syntezy GSH w neuronach. Równocze nie uwolniona podczas rozpadu GSH reszta γ -glutamylowa zostaje przeniesiona na glutamin , do której γ -GT ma bardzo wysokie powinowactwo, i powstaje γ -Glu-Gln. Jednym z mechanizmów spadku poziomu GSH mógłby by wzrost aktywno ci γ -GT. Jednak e obserwowany spadek poziomu γ -Glu-Gln [202] przeczy temu przypuszczeniu.

Podsumowuj c, deficyt GSH i zwi zanych z jego metabolizmem enzymów mo e odgrywa istotn rol w patofizjologii schizofrenii i mo e stanowi powa ny czynnik ryzyka w tym schorzeniu lub w pewnych jego formach.

5.4.3. Zwi zek mi dzy niedoborem glutationu a procesem neurodegeneracyjnym

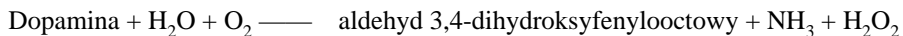
Aby udowodni istnienie zale no ci mi dzy deficytem GSH a procesem neurodegeneracyjnym, przeprowadzono szereg eksperymentów na zwierz tach, u których rodkami farmakologicznymi indukowano niedobór tego peptydu. W badaniach tych wykazano, e zarówno ostre [216, 217], jak i chroniczne [218], dokomorowe podania nieodwracalnego inhibitora syntetazy γ -glutamylcysteinowej - butioninosulfoksyimini (BSO) - obni ały, zale nie od stosowanych dawek, poziom GSH w pr kowiu i substancji czarnej. Jednak e ilo komórek dopaminowych, barwi cych si na obec-

no hydroksylazy tyrozynowej, nie ulegała zmianom pod wpływem 28-dniowych dokomorowych poda tego inhibitora [218]. Wynik ten sugeruje, że sam niedobór GSH nie jest przyczyną uszkodzenia szlaku czarnoprakowego w chorobie Parkinsona, mo że natomiast zwi ksza wra liwo neuronów dopaminowych na działanie endo- lub egzogennych toksyn. I tak wykazano, że BSO nasila neurodegeneracyjn aktywno znanych, modelowych toksyn o proparkinsonowskim profilu działania, takich jak: 1-metylo-4-fenylopirydyny (MPP⁺) [20] oraz 6-hydroksydopaminy [21] w substancji czarnej myszy. Z drugiej strony, w badaniach prowadzonych na myszach transgenicznyc h ze zwi kszon ekspresj ludzkiego genu peroksydazy glutationowej (GPx), wykazano osłabienie neurotoksycznego działania 6-OHDA [219]. Dane te potwierdzaj znacz c rol GSH i zwi zanego z nim enzymu (GPx) w usuwaniu RFT. Badania histologiczne wykazały równie , że deficyt GSH w komórkach jest przyczyną uszkodze mitochondriów [18, 25]. Z kolei wyniki bada na hodowlach neuronalnych sugeruj , że niedobór GSH mo że by czynnikiem indukuj cym mier komórki na drodze apoptozy lub nekrozy [220].

Wszystkie powy ej wspomniane dane eksperymentalne sugeruj istnienie zwi zku przyczynowo-skutkowego mi dzy niedoborem GSH a procesem neurodegeneracyjn ym. Nie s jednak znane zarówno czynniki odpowiedzialne za spadek poziomu GSH w chorobie Parkinsona, jak i mechanizmy prowadz ce do mierci komórek dopaminowych. Aktualne koncepcje patogenezy choroby Parkinsona wi zane s z produkcj wolnych rodników i stresem oksydacyjnym. Hipotetyczny mechanizm prowadz cy do uszkodzenia neuronów dopaminowych w tej chorobie, uwzgl dniaj cy oprócz wolnych rodników tak e udział GSH, zostanie przedstawiony w nast pnych podrozdziałach.

5.4.4. Stres oksydacyjny a choroba Parkinsona

Stres oksydacyjny ł czony jest z patomechanizmem choroby Parkinsona ze wzgl du na wyj tkowe wla ciwo ci neuronów dopaminowych substancji czarnej. Komórki te charakteryzuj si wysokim st eniem dopaminy i znacz n aktywno ci monoamino-oksydazy (MAO). MAO katalizuje oksydacyjn deaminacj dopaminy w ciałach neuronów dopaminowych substancji czarnej oraz w ich zako czeniach wpr kowiu. W procesie tym powstaje aldehyd 3,4-dihydroksyfenylooctowy, amoniak i nadtlenek wodoru (reakcja 1).



Z reakcji tej wynika, że obrót dopaminy zwi zany jest z generowaniem potencjalnej toksyny, czyli nadtlenu wodoru.

Dopamina mo że równie utleniana na drodze nieenzymatycznej reakcji, tzw. autooksydacji, w wyniku której powstaj chinony, semichinony [11] oraz nadtlenek wodoru i rodniki tlenowe. Wszystkie produkty tej reakcji mog by toksyczne dla komórki. Dlatego autooksydacja uwa a si za jeden z mechanizmów mog cych prowadzi do degeneracji neuronów w chorobie Parkinsona. Ponadto komórki dopaminowe gromadz niebezpieczne jony elaza oraz zawieraj neuromelanin powstaj c równie w wyniku autooksydacji dopaminy i stanowi c przypuszczalnie dodatkowe ródo wolnych rodników [15]. Wydaje si , że ka dy z czynników, który prowadzi do zabu-

rzonej równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w komórkach, mo e sprzyja procesowi neurodegeneracyjnemu, jaki zachodzi w przebiegu choroby Parkinsona.

5.4.5. Glutaton w chorobie Parkinsona i jej zwierz cych modelach

Obecnie proponowane s dwie hipotezy wyja niaj ce mechanizm le cy u podstaw neurodegeneracji neuronów dopaminowych istoty czarnej w chorobie Parkinsona. Pierwsza z nich zakłada tworzenie si wysoce reaktywnych form tlenu, które mog prowadzi do uszkodze neuronów w przypadku, gdy równowaga mi dzy procesami oksydacyjno-redukcyjnymi zostaje przesuni ta w kierunku reakcji utleniania (tzw. zjawisko oksydacyjnego stresu) [221], Druga z hipotez - nieco nowsza - przyjmuje, e mechanizmem prowadz cym do neurodegeneracji jest oslabienie aktywno ci mitochondrialnej, której konsekwencj jest zmniejszona produkcja energii i zmiany w metabolizmie neuronalnym [222]. W aspekcie obu tych hipotez mo na rozwa a rol GSH.

W chorobie Parkinsona jedn z bardziej charakterystycznych zmian biochemicznych, oprócz deficytu dopaminy, jest masowa utrata zredukowanego GSH w istocie czarnej [3, 4, 223]. Jak wykazano w porównawczych badaniach biochemicznych, prowadzonych po miertnie na mózgach pacjentów parkinsoników, zmiana w st eniu GSH ograniczona jest tylko do tego rejonu mózgu i nie dotyczy innych struktur dopaminowych [4, 223, 224]. Nie stwierdzono natomiast spadku poziomu GSH w substancji czarnej w takich schorzeniach, jak: zanik wielosystemowy (ang. *multiply system atrophy* - MSA) i pora- enie nadj drowe (ang. *progressive supranuclear palsy* - PSP), w których podobnie jak w chorobie Parkinsona dochodzi do degeneracji neuronów dopaminowych [4, 224]. Wy- daje si bardzo prawdopodobne, e obni enie st enia GSH w substancji czarnej ma miejsce ju we wczesnej fazie rozwoju choroby Parkinsona. Poziom GSH był obni ony w równym stopniu tak w presymptomatycznej chorobie Parkinsona z rozszanymi ciałkami Lewy'ego (ang. *presymptomatic Parkinson 's disease with incidental Lewy bodies*), jak i w zaawansowanym stadium tej choroby [224]. W cytowanych powy ej badaniach, z wyj tkiem wczesnej pracy Perriego i współpracowników [223], nie stwierdzono rów- noczesnego wzrostu poziomu disiarczku glutationu. W chorobie Parkinsona wykazano natomiast zwi kszon aktywno enzymu degraduj cego GSH, czyli γ -glutamyl- lotranspeptydazy [225], Chocia fakty te zostały opisane przed wieloma laty, nadal niewiele jest wiadomo na temat przyczyn i mechanizmów prowadz cych do niedoboru GSH w istocie czarnej w tym schorzeniu.

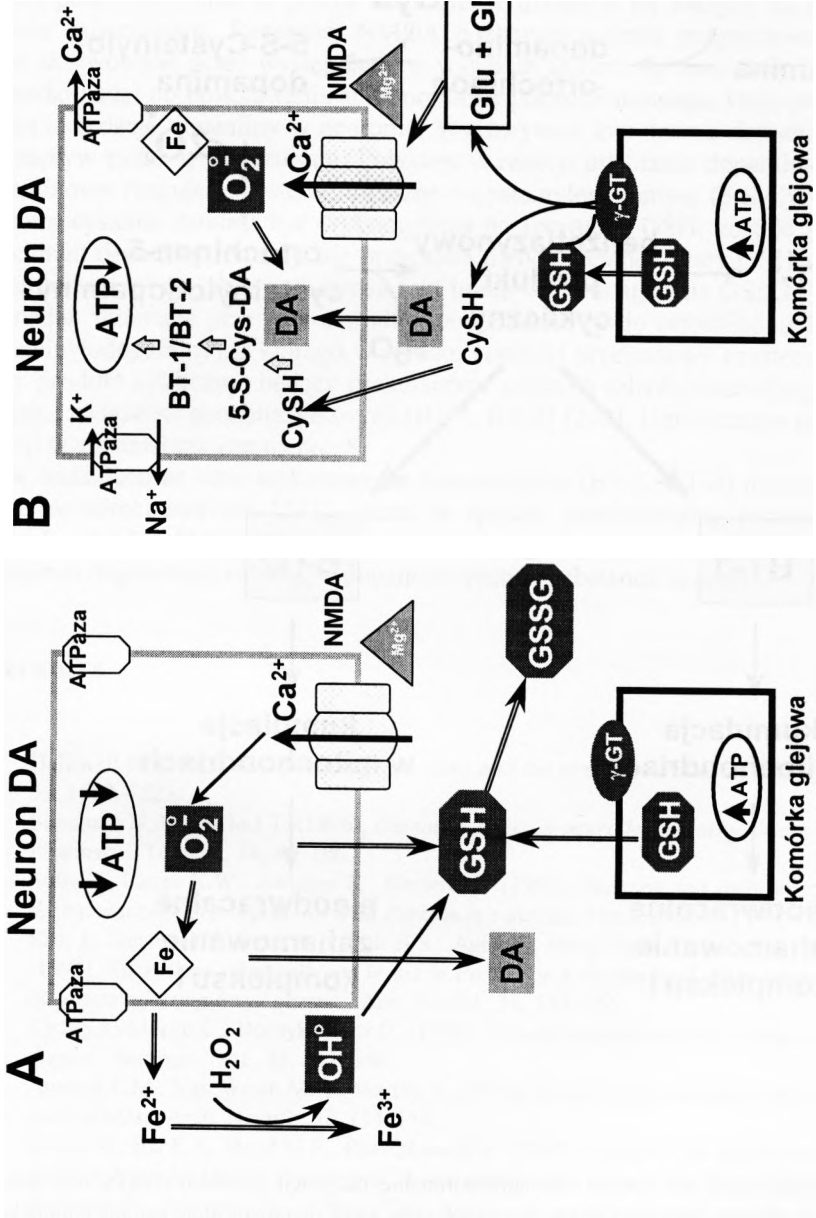
5.4.6. Zwi zek mi dzy deficytem glutationu a toksyczno ci MPTP

Aby wyja ni , czy niedobór GSH ma zwi zek z procesem neurodegeneracyjnym, analogicznym do tego, jaki ma miejsce w przebiegu choroby Parkinsona, podj to bada- nia nad wpływem MPTP (modelowa neurotoksyna o proparkinsonowskim profilu działaniu) na poziom GSH w strukturach dopaminowych mózgu. MPTP/MPP⁺ ju w pojedynczych dawkach szybko i efektywnie obni a poziom GSH przy równocze- snym braku wzrostu GSSG [7, 226]. Wiadomo, e MPTP hamuje transport elektronów przez ła cuch oddechowy na poziomie reduktazy NADH-Q, zwanej tak e dehydroge- naz NADH lub kompleksem mitochondrialnym I [227]. Reakcja ta prowadzi do kry-

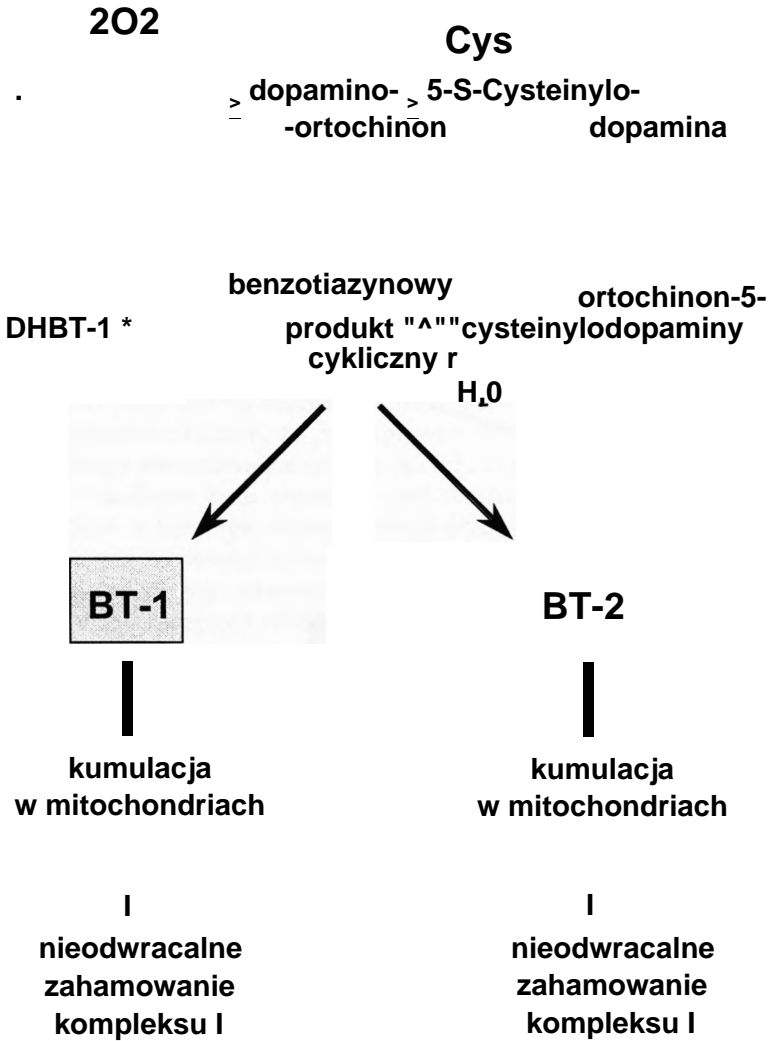
zysu energetycznego, którego skutkiem jest obniżenie syntezy ATP [228] i depolaryzacja błony cytoplazmatycznej [229]. Oba te procesy mogą wpływać na poziom GSH. Niedobór ATP z jednej strony może osłabiać syntezę GSH, gdy reakcja ta wymaga nakładu energii, a z drugiej strony depolaryzacja błony może wywoływać wypływ GSH z komórki [161]. W badaniach prowadzonych przez Hana i współpracowników [230] za pomocą metody mikrodializy stwierdzono, że podczas perfuzji neurotoksycznych stężeń MPP⁺ do prąkowia lub substancji czarnej zewnątrzkomórkowego stężenia GSH i cysteiny pozostawały na poziomie wyjściowym. Jednak w momencie zaprzestania perfuzji obserwowano przejściowy wysoki wzrost pozakomórkowego GSH i opóźniony w czasie wzrost poziomu cysteiny. Analogiczny efekt otrzymano podczas perfuzji do tych samych struktur jonu Fe²⁺. Wyniki te nasunęły przypuszczenie, że uwalnianie, a następnie degradacja GSH przy udziale enzymów γ-GT i dipeptydaz do glutaminianu, glicyny i cysteiny może stanowić czynnik prowadzący do degeneracji neuronów dopaminowych w istocie czarnej. Skłoniło to autorów wspomnianej powyżej pracy do wysunięcia nowej hipotezy na temat mechanizmu neurotoksycznego działania MPTP. Hipotetyczny model toksycznego MPTP przedstawiono na ryc. 7.

Hipoteza ta oparta jest na licznych danych eksperymentalnych. Punktem wyjścia są badania, w których wykazano, że pod wpływem perfuzji MPP⁺ w neuronach dochodzi do bardzo silnego zahamowania syntezy ATP [228], jak i depolaryzacji błony komórkowej [229]. Skutkiem tych procesów jest masowe uwalnianie zarówno dopaminy [231], jak i GSH z komórek dopaminowych (ryc. 7A). Ponadto niedobór ATP przyczynia się również do usunięcia bloku magnezowego z receptora NMDA [232], umożliwiając w ten sposób jego aktywację przez zewnątrzkomórkowy glutaminian. Konsekwencją aktywacji receptora NMDA jest nadmierna produkcja anionorodnika ponadtlenkowego w neuronie [233]. Rodnik ten wchodzi w reakcje z kompleksami białkowymi, zawierającymi elazo, przyczynia się do uwolnienia jonu Fe²⁺ [234, 235], który stanowi czynnik w neurotoksycznym indukowanej przez MPTP [236, 237]. Kolejnym następstwem aktywacji receptora NMDA jest zwiększone stężenie anionorodnika ponadtlenkowego, tak jak w przestrzeni pozakomórkowej [233], co sugeruje, że rodnik ten może przenikać przez błony komórek. Uwolnione z kompleksu białkowego elazo może brać udział w powstawaniu rodnika hydroksylowego w przestrzeni pozakomórkowej [238] i, jak wykazują dane eksperymentalne, w rzeczywistości MPTP/MPP⁺ po redniczy w jego tworzeniu się [239]. Rodnik hydroksylowy powstaje cy podczas silnego niedoboru energetycznego jest utleniany nie tylko przez GSH uwalniany z neuronów dopaminowych, ale także przez GSH pochodzący z komórek glejowych. Wydaje się, że uwalnianie GSH z komórek glejowych może i chroni komórki nerwowe przed toksycznym rodnikiem hydroksylowym [163] (ryc. 7B).

W sytuacji, kiedy perfuzja MPTP do struktur dopaminowych mózgu zostanie przerwana, ustaje tworzenie się rodnika hydroksylowego (ryc. 7B), jak również ustają procesy, w których on powstaje. Następuje wzrost syntezy ATP, powoli rozpoczyna się również wychwyt zwrotny dopaminy, która w reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym tworzy ortochinon dopaminowy [240]. Anionorodnik ponadtlenkowy reagując z dopaminą, przyczynia się do dalszego zahamowania uwalniania jonów elaza z kompleksu białkowego. Po zaprzestaniu perfuzji MPP⁺ zachodzi nadal uwalnianie GSH, przypuszczalnie z komórek glejowych, i wydaje się, że reakcja ta ma służyć odnowieniu neuronalnej puli GSH [163]. Neurony nie mogą jednak bezpośrednio pobierać



Ryc. 7. Hipotetyczny mechanizm neurotoksycznego działania MPP+ uwzględniający przejściowy kryzys energetyczny i jego następstwa (wg Hana i wsp. [42], zmodyfikowano)



Ryc. 8. Proponowany mechanizm wewn trzneuronalnej oksydacji dopaminy (DA) w obecno ci cysteiny (Cys), prowadz cy do powstania endotoksyn, które nieodwracalnie hamuj kompleks I mitochondrialny

zewn trzkomórkowego GSH (p. podrozdział 5.2.5.4). Dlatego peptyd ten musi najpierw ulec enzymatycznej hydrolizie (γ -GT i dipeptydaza) do składowych aminokwasów, pobieranych następnie przez neurony i zużytych do ponownej syntezy GSH. Niski, opóźnień w czasie wzrostu zewn trzkomórkowego stężenia cysteiny, jak również masowe uwalnianie glicyny i glutaminianu [241] wydają się potwierdzać istnienie tych reakcji. Po zaprzestaniu perfuzji MPP⁺, synteza ATP utrzymywana jest nadal na niskim poziomie, mimo i pewne ostre efekty działania tej toksyny są w znacznym stopniu zniwelowane. Receptory NMDA pozbawione bloku magnezowego są nadal silnie aktywowane przez występujący w wysokim stężeniu glutaminian. Aktywacja ta prowadzi nadal do powstawania anionorodnika ponadtlenkowego, który przeprowadza dalszą oksydację dopaminy w neuronie. Wychwytowi zwrotnemu dopaminy towarzyszy napływ cysteiny do neuronu. Powstały w reakcji utleniania dopaminy ortochoinon dopaminowy reaguje z cysteiną, tworząc 5-cysteinyldopamin (5-S-Cys-DA) [240]. A zatem cysteina zamiast być wykorzystana do resyntezy GSH, zostaje zużyta przez ortochoinon dopaminy, co staje się przyczyną nieodwracalnej utraty GSH w neuronach dopaminowych i co tak samo potwierdza fakt braku wzrostu stężenia GSSG. 5-S-Cys-DA jest nadal utleniana przez anionorodnik ponadtlenkowy do ortochoinonu 1 (ortochoinon 5-cysteinyldopaminy), z którego w wyniku szybkiej przebudowy czeczek powstaje nowy produkt cykliczny, będący prekursorem zarówno dihydrobenzotiazyny (DHBT-1), jak i związków benzotiazynowych (BT-1, BT-2) [242]. Uproszczony przebieg tych reakcji przedstawiony jest na ryc. 8.

W badaniach *in vitro* wykazano, że benzotiazyny (BT-1, BT-2) mogą być gromadzone w mitochondriach [243], gdzie w sposób nieodwracalny hamują kompleks I mitochondrialny [244]. Trwałe zahamowanie tego kompleksu jest czynnikiem decydującym o degeneracji neuronów dopaminowych w substancji czarnej.

Literatura

- [1] Halliwell B. (1992), *Reactive oxygen species and the central nervous system*. J. Neurochem., 59, 1609-1623.
- [2] Simonian N.A., Coyle J.T. (1996), *Oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 36, 83-106.
- [3] Sofic E., Lange K.W., Jellinger K., Riederer P. (1992), *Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease*. Neurosci. Lett., 142, 128-130.
- [4] Sian J., Dexter D.T., Lees A.J., Daniel S., Agid Y., Javoy-Agid F., Jenner P., Marsden C.D. (1994), *Alterations of glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia*. Ann. Neurol., 36, 348-355.
- [5] Kish S.J., Morito C., Hornykiewicz O. (1985), *Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease*. Neurosci. Lett., 58, 343-346.
- [6] Ambani L.M., Van Worth M.H., Murthy S. (1975), *Brain peroxidase and catalase in Parkinson's disease*. Arch. Neurol., 32, 114-118.
- [7] Sriram K., Pai K.S., Boyd M.R., Ravindranath V. (1997), *Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies with mice*. Brain Res., 749, 44-52.
- [8] Halliwell B., Aruoma O.J. (1991), *DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems*. FEBS Lett., 281, 9-19.

- [9] Oliver C.N., Starke-Reed P.E., Stadtman E.R., Liu G.J., Carney J.M., Floyd R.A. (1990), Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87,5144-5147.
- [10] Dexter D.T., Carter C.J., Wells F.R., Javoy-Agid F., Agid Y., Lee A., Jenner P., Marsden D. (1989), *Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease*. *J. Neurochem.*, 52, 381-389.
- [11] Graham D.G. (1978), *Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones*. *Mol. Pharmacol.*, 14, 633-643.
- [12] Clarke D.D., Sokoloff L. (1999), *Circulation and energy metabolism of the brain*. W: *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*. Eds. Sigel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Fisher S.K., Uhler M.D., Lippincott-Raven, Philadelphia, 637-669.
- [13] Evans P.H. (1993), *Free radicals in brain metabolism and pathology*. *Br. Med. Bull.*, 49, 577-587.
- [14] Porter N. A. (1984), *Chemistry of lipid peroxidation*. *Meth. Enzymol.*, 105, 273-282.
- [15] Fahn S., Cohen G. (1992), *The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: Evidence supporting it*. *Ann. Neurol.*, 32, 804-812.
- [16] Bains J.S., Shaw C.A. (1997), *Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death*. *Brain Res., Rev.* 25, 335-358.
- [17] Di Monte D.A., Chan P., Sandy M.S. (1992), *Glutathione in Parkinson's disease: A link between oxidative stress and mitochondrial damage?* *Ann. Neurol.*, 32, S11- S15.
- [18] Jain A., Martensson J., Stole E., Auld P.A.M., Meister A. (1991), *Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1913-1917.
- [19] Mizui T., Kinouchi H., Chan P.H. (1992), *Depletion of brain glutathione by buthionine sulfoximine enhances cerebral ischemic injury in rats*. *Am. J. Physiol.*, 262, H313-H317.
- [20] Wiillner U., Loschmann P.A., Schulz J.B., Schmid A., Dringen R., Eblen F., Turski L., Klockgether T. (1996), *Glutathione depletion potentiates MPTP and MPP toxicity in nigral dopaminergic neurons*. *NeuroReport*, 7, 921-923.
- [21] Pileblad E., Magnusson T., Fornstedt B. (1989), *Reduction of brain glutathione by L-buthionine sulfoximine potentiates the dopamine-depleting action of 6-hydroxydopamine in rat striatum*. *J. Neurochem.* 52, 978-980.
- [22] Cotgreave I. A., Gerdes R.G. (1998), *Recent trends in glutathione biochemistry — glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation?* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 242, 1-9.
- [23] Poot M., Teubert H., Rabinovitch P.S., Kavanagh T.J. (1995), *De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle*. *J. Cell Physiol.*, 163, 555-560.
- [24] Ghibelli L., Fanelli C., Rotilio G., Lafavia E., Coppola S., Colussi C., Civitareale P., Ciriolo M.R. (1998), *Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion*. *FASEB J.*, 12, 479-486.
- [25] Hall A.G. (1999), *The role of glutathione in the regulation of apoptosis*. *Eur. J. Clin. Invest.*, 29, 238-245.
- [26] Cooper A.J.L., Kristal B.S. (1997), *Multiple roles of glutathione in the central nervous system*. *Biol. Chem.*, 378, 793-802.
- [27] Guo N., McIntosh C., Shaw C. (1992), *Glutathione: New candidate neuropeptide in the central nervous system*. *Neuroscience*, 51, 835-842.
- [28] Janaky R., Ogita K., Pasqualotto B.A., Bains J.S., Oja S.S., Yoneda Y., Shaw C.A. (1999), *Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS*. *J. Neurochem.*, 73, 889—902.
- [29] Slivka A., Spina M.B., Cohen G. (1987), *Reduced and oxidized glutathione in human and monkey brain*. *Neurosci. Lett.*, 74, 112-118.

- [30] Orłowski M., Karkowsky A. (1976), *Glutathione metabolism and some possible functions of glutathione in the nervous system*. Int. Rev. Neurobiol., 19, 75-121.
- [31] Anderson M.E., Underwood M., Bridges R.J., Meister A. (1989), *Glutathione metabolism at the blood-cerebrospinal fluid barrier*. FASEB J., 3, 2527-2531.
- [32] Baronti F., Davis T.L., Boldry R.C., Mouradian M.M., Chase T.N. (1992), *Deprenyl effects on levodopa pharmacodynamics, mood, and free radical scavenging*. Neurology, 42, 541-544.
- [33] Slivka A., Mytilineou C., Cohen G. (1987), *Histochemical evaluation of glutathione in brain*. Brain Res., 409, 275-284.
- [34] Philbert M.A., Beiswanger C.M., Waters D.K., Reuhl K.R., Lowndes H.E. (1991), *Cellular and regional distribution of reduced glutathione in the nervous system of the rat: histochemical localization by mercury orange and o-phthaldialdehyde-induced histofluorescence*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 107, 215-227.
- [35] Hjelle O.P., Rinvik E., Huster D., Reichelt W., Ottersen O.P. (1998), *Antibodies to glutathione: production, characterization and immunocytochemical application to the central nervous system*. W: *Glutathione in the nervous system*. Eds. Shaw C.A., Taylor and Francis, Washington, 63-88.
- [36] Reed D.J., Babson J.R., Beatty P.W., Brodie A.E., Ellis W.W., Potter D.W. (1980), *High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides*. Anal. Bioch., 106, 55-62.
- [37] Dringen R., Hamprecht B. (1996), *Glutathione content as an indicator for the presence of metabolic pathways of amino acids in astroglial cultures*. J. Neurochem., 67, 1375-1382.
- [38] Raps S.P., Lai J.C.K., Hertz L., Cooper A.J.L. (1989), *Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons*. Brain Res., 493, 398-401.
- [39] Sagara J., Miura K., Bannai S. (1993), *Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and suspension*. J. Neurochem., 61, 1667-1671.
- [40] Pileblad E., Eriksson P.S., Hansson E. (1991), *The presence of glutathione in primary neuronal and astroglial cultures from rat cerebral cortex and brain stem*. J. Neural. Transm., [GenSect], 86, 43-49.
- [41] Langeveld C.H., Schepens E., Jongenelen C.A.M., Stoof J.C., Hjelle O.P., Ottersen O.P., Drukarch B. (1996), *Presence of glutathione immunoreactivity in cultured neurons and astrocytes*. NeuroReport, 7, 1833-1836.
- [42] Reed D.J. (1990), *Glutathione: toxicological implications*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 30, 300-305.
- [43] Panfili E., Sandri G., Ernster L. (1991), *Distribution of glutathione peroxidases and glutathione reductase in rat brain mitochondria*. FEBS Lett., 290, 35-37.
- [44] Griffith O.W., Meister A. (1985), *Origin and turnover of mitochondrial glutathione*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4668-4672.
- [45] Martensson J., Lai J.C.K., Meister A. (1990), *High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 7185-7189.
- [46] Wiillner U., Seyfried J., Groscurth P., Beinroth S., Winter S., Gleichmann M., Heneka M., Loschmann P.A., Schulz J.B., Weller M., Klockgether T. (1999), *Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediate and mitochondrial function*. Brain Res., 826, 53-62.
- [47] Petronilli V., Costantini P., Scorrano L., Colonna R., Passamonti S., Bernardi P. (1994), *The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols: increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents*. J. Biol. Chem., 269, 16638-16642.
- [48] Gunter T.E., Pfeiffer D.R. (1990), *Mechanisms by which mitochondria transport calcium*. Am. J. Physiol., 258, C755-C786.

- [49] Barker J.E., Bolanos J.P., Land J.M., Clark J.B., Heales S.J.R. (1996), *Glutathione protects astrocytes from peroxynitrite-mediated mitochondrial damage: implications for neuronal/astrocytic trafficking and neurodegeneration*. Dev. Neurosci., 18, 391-396.
- [50] Koppenol W.H., Moreno J.J., Pryor W.A., Ischiropoulos H., Beckman J.S. (1992), *Peroxy-nitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide*. Chem. Res. Toxicol., 5, 834-842.
- [51] Mizuno Y., Yoshida H., Ikebe S., Hattori N., Kobayashi T., Shimoda-Matsubayashi S., Matsumine H., Kondo T. (1998), *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. Ann. Neurol., 44 (Suppl. 1), S99-S109.
- [52] Schapira A.H.V. (1999), *Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease*. Parkinsonism and Related Disorders, 5, 139-143.
- [53] Benuck M., Banay-Schwartz M., DeGuzman T., Lajtha A. (1995), *Effect of food deprivation on glutathione and amino acid levels in brain and liver of young and aged rats*. Brain Res., 678, 259-264.
- [54] Wade L.A., Brady H.M. (1981), *Cysteine and cystine transport at the blood-brain barrier*. J. Neurochem., 37, 730-734.
- [55] Ennis S.R., Kawai N., Ren X.D., Abdelkarim G.E., Keep R.F. (1998), *Glutamine uptake at the blood-brain barrier is mediated by N-system transport*. J. Neurochem., 71, 2565-2573.
- [56] Kannan R., Kuhlenkamp J.F., Ookhtens M., Kaplowitz N. (1992), *Transport of glutathione at blood-brain barrier of the rat: inhibition by glutathione analogs and age-dependence*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 263, 964-970.
- [57] Zlokovic B.V., Mackie J.B., McComb J.G., Weiss M.H., Kaplowitz N., Kannan R. (1994), *Evidence for transcapillary transport of reduced glutathione in vascular perfused guinea-pig brain*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 201, 402-408.
- [58] Mischeck U., Meyer J., Galla J., Galla H.J. (1989), *Characterization of γ -glutamyl transpeptidase activity of cultured endothelial cells from porcine brain capillaries*. Cell Tissue Res., 256, 221-226.
- [59] Roux F., Durieu-Trautmann O., Chaverot N., Claire M., Mailly P., Bourre J.M., Strosberg A.D., Courad P.O. (1994), *Regulation of γ -glutamyl transpeptidase and alkaline phosphate activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells*. J. Cell. Physiol., 159, 101 — 113.
- [60] Kannan R., Yi J.R., Tang D.R., Li Y., Zlokovic B.V., Kaplowitz N. (1998), *Carrier-mediated GSH transport at the blood-brain barrier and molecular characterization of novel brain GSH transporters*. W: *Glutathione in the nervous system*. Ed. Shaw C.A., Taylor and Francis, Washington, 45-62.
- [61] Kannan R., Mittur A., Bao Y., Tsuruo T., Kaplowitz N. (1999), *GSH transport in immortalized mouse brain endothelial cells: evidence for apical localization of a sodium-dependent GSH transporter*. J. Neurochem., 73, 390-399.
- [62] Kannan R., Chakrabarti R., Tang D., Kim K.J., Kaplowitz N. (2000), *GSH transport in human cerebrovascular endothelial cells and human astrocytes: evidence for luminal localization of Na⁺ — dependent GSH transport in HCEC*. Brain Res., 852, 374-382.
- [63] Sagara J., Makino N., Bannai S. (1996), *Glutathione efflux from cultured astrocytes*. J. Neurochem., 66, 1876-1881.
- [64] Yudkoff M., Pleasure D., Cregar L., Lin Z.P., Nissim I., Stern J., Nissim I. (1990), *Glutathione turnover in cultured astrocytes: studies with [¹⁵N] glutamate*. J. Neurochem., 55, 137-145.
- [65] Clancy R.M., Levartovsky D., Leszczynska-Piziak J., Yegudin J., Abramson S.B. (1994), *Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediate*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 3680-3684.

- [66] Winterbourn C.C., Metodieva D. (1994), *The reactions of superoxide with reduced glutathione*. Arch. Biochem. Biophys., 314, 284-290.
- [67] Singh S.P., Wishnok J.S., Keshive M., Deen W.M., Tannenbaum S.R. (1996), *The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 14428-14433.
- [68] Ben-Yoseph O., Boxer P.A., Ross B.D. (1994), *Oxidative stress in central nervous system: monitoring the metabolic response using the pentose phosphate pathway*. Dev. Neurosci., 16, 328-336.
- [69] Ben-Yoseph O., Boxer P.A., Ross B.D. (1996), *Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress*. J. Neurochem., 66, 2329-2337.
- [70] Dringen R., Hamprecht B. (1997), *Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells*. Brain Res., 759, 67-75.
- [71] Dringen R., Kussmaul L., Hamprecht B. (1998), *Rapid clearance of tertiary butyl hydroperoxide by cultured astroglial cells via oxidation of glutathione*. Glia, 23, 139-145.
- [72] Kussmaul L., Hamprecht B., Dringen R. (1999), *The detoxification of cumene hydroperoxide by the glutathione system of cultured astroglial cells hinges on hexose availability for the regeneration of NADPH*. J. Neurochem., 73, 1246-1253.
- [73] Desagher S., Glowinski J., Premont J. (1996), *Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity*. J. Neurosci., 16, 2553-2562.
- [74] Dringen R., Kussmaul L., Hamprecht B. (1998), *Detoxification of exogenous hydrogen peroxide and organic hydroperoxides by cultured astroglial cells assessed by a microtiter plate assay*. Brain Res. Protoc., 2, 223-238.
- [75] Dringen R., Hamprecht B., Drukarch B. (1998), *Anethole dithiolethione, a putative neuroprotectant, increases intracellular and extracellular glutathione levels during starvation of cultured astroglial cells*. Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol., 358, 616-622.
- [76] Langeveld C.H., Jongenelen C.A.M., Schepens E., Stoof J.C., Bast A., Drukarch B. (1995), *Cultured rat striatal and cortical astrocytes protect mesencephalic dopaminergic neurons against hydrogen peroxide toxicity independent of their effect on neuronal development*. Neurosci. Lett., 192, 13-16.
- [77] Chen Y., Vartiainen N.E., Ying W., Chan P.H., Koistinaho J., Swanson R.A. (2001), *Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism*. J. Neurochem., 77, 1601-1610.
- [78] Drukarch B., Schepens E., Stoof J.C., Langeveld C.H., Van Muiswinkel F.L. (1998), *Astrocyte-enhanced neuronal survival is mediated by scavenging of extracellular reactive oxygen species*. Free Radic. Biol. Med., 25, 217-220.
- [79] Tanaka J., Toku K., Zhang B., Ishihara K., Sakanaka M., Maeda N. (1999), *Astrocytes prevent neuronal death induced by reactive oxygen and nitrogen species*. Glia, 28, 85-96.
- [80] Drukarch B., Schepens E., Jongenelen C.A.M., Stoof J.C., Langeveld C.H. (1997), *Astrocyte-mediated enhancement of neural survival is abolished by glutathione deficiency*. Brain Res., 770, 123-130.
- [81] Dringen R., Gutterer J.M., Hirrlinger J. (2000), *Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species*. Eur. J. Biochem., 267, 4912-4916.
- [82] Ursini F., Maiorino M., Brigelius-Flohe' R., Aumann K.D., Roveri A., Schomburg D., Flohe' L. (1995), *Diversity of glutathione peroxidases*. Meth. Enzymol., 252, 38-35.
- [83] Vernet P., Rigaudiere N., Ghyselinck N., Dufaure J.P., Drevet J.R. (1996), *In vitro expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage*. Biochem. Cell Biol., 74, 125-131.

- [84] Ho Y.S., Magnenat J.L., Bronson R.T., Cao J., Gargano M., Sugawara M., Funk C.D. (1997), *Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia*. *J. Biol. Chem.*, 272, 16664-16651.
- [85] Ushijima K., Miyazaki H., Morioka T. (1986), *Immunohistochemical localization of glutathione peroxidase in the brain of the rat*. *Resuscitation*, 13, 97-105.
- [86] Lindenau J., Noack H., Asayama K., Wolf G. (1998), *Enhanced cellular glutathione peroxidase immunoreactivity in activated astrocytes and in microglia during excitotoxin induced neurodegeneration*. *Glia*, 24, 252-256.
- [87] Trepanier G., Furling D., Puymirat J., Mirault M.E. (1996), *Immunocytochemical localization of seleno-glutathione peroxidase in the adult mouse brain*. *Neuroscience*, 75, 231-243.
- [88] Takizawa S., Matsushima K., Shinohara Y., Ogawa S., Komatsu N., Utsunomiya H., Watanabe K. (1994), *Immunohistochemical localization of glutathione peroxidase in infarcted human brain*. *J. Neurosci. Sci.*, 122, 66-73.
- [89] Damier P., Hirsch E.C., Zhang P., Agid Y., Javoy-Agid F. (1993), *Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease*. *Neuroscience*, 52, 1-6.
- [90] Lopez-Barea J., Barcena J.A., Bocanegra J.A., Florindo J., Garcia-Alfonso C., Lopez-Ruiz A., Martinez-Galisteo E., Peinado J. (1990), *Structure, mechanism, functions, and regulatory properties of glutathione reductase*. W: *Glutathione: Metabolism and physiological functions*. Ed. Vina J., CRC Press. Boca Raton, FL, USA, 105-116.
- [91] Gutterer J.M., Dringen R., Hirrlinger J., Hamprecht B. (1999), *Purification of glutathione reductase from bovine brain, generation of an antiserum and immunocytochemical localization of the enzyme in neural cells*. *J. Neurochem.*, 73, 1422-1430.
- [92] Knollema S., Hom H.V., Schirmer H., Korf J., Ter Horst G.J. (1996), *Immunolocalization of glutathione reductase in the murine brain*. *J. Comp. Neurol.*, 373, 157-172.
- [93] Salinas A.E., Wong M.G. (1999), *Glutathione S-transferases - a review*. *Curr. Med. Chem.*, 6, 279-309.
- [94] Awasthi Y.C., Sharma R., Singhal S.S. (1994), *Human glutathione S-transferases*. *Int. J. Biochem.*, 26, 295-308.
- [95] Johnson J.A., Barbary A.E., Kornguth S.E., Brugge J.F., Siegel F.L. (1993), *Glutathione S-transferase isoenzymes in rat brain neurons and glia*. *J. Neurosci.*, 13, 2013-2023.
- [96] Philbert M.A., Beiswanger C.M., Manson M.M., Green J.A., Novak R.F., Primiano T., Reuhl K. R., Lowndes H.E. (1995), *Glutathione-S-transferases and γ -glutamyl transpeptidase in the rat nervous system: a basis for differential susceptibility to neurotoxicants*. *Neurotoxicology*, 16, 349-362.
- [97] Tansey F.A., Cammer W. (1991), *A Pi form of glutathione-S-transferase is a myelin- and oligodendrocyte-associated enzyme in mouse brain*. *J. Neurochem.*, 57, 95-102.
- [98] Dringen R. (2000), *Metabolism and functions of glutathione in brain*. *Progr. Neurobiol.*, 62, 649-671.
- [99] Richman P.G., Meister A. (1975), *Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione*. *J. Biol. Chem.*, 250, 1422-1426.
- [100] Sekura R., Meister A. (1977), *γ -glutamylcysteine synthetase: further purification, 'half of the sites' reactivity, subunits, and specificity*. *J. Biol. Chem.*, 252, 2599-2605.
- [101] Oppenheimer L., Wellner V.P., Griffith O.W., Meister A. (1979), *Glutathione synthetase: purification from rat kidney and mapping of substrate binding sites*. *J. Biol. Chem.*, 254, 5184-5190.
- [102] Tate S.S., Ross L.L., Meister A. (1973), *The γ -glutamyl cycle in the choroid plexus: its possible function in amino acid transport*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 1447-1449.
- [103] Okonkwo P.O., Orłowski M., Green J.P. (1974), *Enzymes of the γ -glutamyl cycle in the choroid plexus and brain*. *J. Neurochem.*, 22, 1053-1058.
- [104] Makar T.K., Nedergaard M., Preuss A., Gelbard A.S., Perumal A.S., Cooper A.J.L. (1994), *Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabo-*

- lism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain.* J. Neurochem., 62, 45-53.
- [105] Wallin C., Weber S.G., Sandberg M. (1999), *Glutathione efflux induced by NMDA and kainate: implications in neurotoxicity?* J. Neurochem., 73, 1566-1572.
- [106] Reichelt K.L. (1970), *The isolation of gamma-glutamyl peptides from monkey brain.* J. Neurochem., 17, 19-25.
- [107] Sandberg M., Li X., Folestad S., Weber S.G., Orwar O. (1994), *Liquid chromatographic determination of acidic β -aspartyl and γ -glutamyl peptides in extracts of rat brain.* Anal. Biochem., 217, 48-61.
- [108] Reyes E., Barela T.D. (1980), *Isolation and purification of multiple forms of γ -glutamyl transpeptidase from rat brain.* Neurochem. Res., 5, 159-170.
- [109] Frey A., Meckelein B., Weiler-Güttler H., Möckel B., Flach R., Gassen H.G. (1991), *Pericytes of the brain microvasculature express γ -glutamyl transpeptidase.* Eur. J. Biochem., 202, 421—429.
- [110] Zhang H.F., Ong W.Y., Leong S.K., Laperche Y. (1997), *Species differences in the localization of gamma-glutamyl transpeptidase immunopositive cells at the blood-brain interface.* Brain Res., 38, 323-330.
- [111] Orłowski M., Sessa G., Green J.P. (1974), *γ -glutamyl transpeptidase in brain capillaries: possible site of a blood-brain barrier for amino acids.* Science, 184, 66-68.
- [112] Thompson G.A., Meister A. (1975), *Utilization of L-cystine by the γ -glutamyl transpeptidase - γ -glutamyl cyclotransferase pathway.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1985-1988.
- [113] Wolff J.E.A., Munstermann G., Grebenkämper K., Erben M. (1998), *Gamma-glutamyl transpeptidase does not act as a cystine transporter in brain microvessels.* Neurochem. Res., 23, 1175-1178.
- [114] Vina J.R., Palacin M., Puertes I.R., Hernandez R., Vina J. (1989), *Role of γ -glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation.* Am. J. Physiol., 257, E916-E922.
- [115] Lee W.J., Hawkins R.A., Peterson D.R., Vina J.R. (1996), *Role of oxoproline in the regulation of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier.* J. Biol. Chem., 271, 19129—19133.
- [116] Jäger M., Weber P., Wolf S. (1999), *Immunohistochemical localization of 5-oxo-L-prolinase, an enzyme of the γ -glutamyl cycle, in porcine brain microvessels.* FEBS Lett., 445, 215-217.
- [117] Dringen R., Hamprecht B. (1998), *Glutathione restoration as indicator for cellular metabolism of astroglial cells.* Dev. Neurosci., 20, 401—407.
- [118] Kranich O., Dringen R., Sandberg M., Hamprecht B. (1998), *Utilization of cysteine and cysteine precursors for the synthesis of glutathione in astroglial cultures: preference for cystine.* Glia, 22, 11-18.
- [119] Kranich O., Hamprecht B., Dringen R. (1996), *Different preferences in the utilization of amino acids for glutathione synthesis in cultured neurons and astroglial cells derived from rat brain.* Neurosci. Lett., 219, 211-214.
- [120] Dringen R., Verleysdonk S., Hamprecht B., Willker W., Leibfritz D., Brand A. (1998), *Metabolism of glycine in primary astroglial cells: synthesis of creatine, serine, and glutathione.* J. Neurochem., 70, 835-840.
- [121] Dringen R., Kranich O., Löschmann P.A., Hamprecht B. (1997), *Use of dipeptides for the synthesis of glutathione by astroglia-rich primary cultures.* J. Neurochem., 69, 868-874.
- [122] Dringen R., Hamprecht B., Bröer S. (1998), *The peptide transporter PepT2 mediates the uptake of the glutathione precursor CysGly in astroglia-rich primary cultures.* J. Neurochem., 71, 388-393.
- [123] Juurlink B.H.J., Thorburne S.K., Hertz L. (1998), *Peroxide-scavenging deficit underlies oligodendrocyte susceptibility to oxidative stress.* Glia, 22, 371-378.

- [124] Huang J., Philbert M.A. (1996), *Celullar responses of cultured cerebellar astrocytes to ethacrynic acid-induced perturbation of subcellular glutathione homeostasis*. Brain Res., 711, 184-192.
- [125] Montoliu C., Sancho-Tello M., Azorin L., Bursal M., Vallès S., Renau-Piqueras J., Guerri C. (1995), *Ethanol increases cytochrome P450E1 and induces oxidative stress in astrocytes*. J. Neurochem., 65, 2561-2570.
- [126] Juurlink B.H.J., Schültke E., Hertz L. (1996), *Glutathione release and catabolism during energy substrate restriction in astrocytes*. Brain Res., 710, 229-233.
- [127] Garcia-Nogales P., Almeida A., Fernandez E., Medina J.M., Bolanos J.P. (1999), *Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipopolysaccharide contributes to preventing nitric oxide mediated glutathione depletion in cultured rat astrocytes*. J. Neurochem., 72, 1750—1758.
- [128] Han S.K., Mytilineou C., Cohen G. (1996), *L-DOPA up-regulates glutathione and protects mesencephalic cultures against oxidative stress*. J. Neurochem., 66, 501-510.
- [129] Aschner M., Mullaney K.J., Wagoner D., Lash L.H., Kimmelberg H.K. (1994), *Intracellular glutathione (GSH), levels modulate mercuric chloride (MC) and methylmercuric chloride (MeHgCl)-induced amino acid release from neonatal rat primary astrocytes cultures*. Brain Res., 664, 133-140.
- [130] Garcion E., Sindji L., Leblondel G., Brachet P., Darcy F. (1999), *1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulates γ -glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes*. J. Neurochem., 73, 859-866.
- [131] Dringen R., Kussmaul L., Gutterer J.M., Hirrlinger J., Hamprecht B. (1999), *The glutathione system of peroxidase detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells*. J. Neurochem., 72, 2523-2530.
- [132] Miiller W.E.G., Romero F.J., Perovic S., Pergande G., Pialoglou P. (1997), *Protection of flupirtine on β -amyloid-induced apoptosis in neuronal cells in vitro: prevention of amyloid-induced glutathione depletion*. J. Neurochem., 68, 2371-2377.
- [133] Almeida A., Heales S.J.R., Bolanos J.P., Medina J.M. (1998), *Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion*. Brain Res., 790, 209-216.
- [134] Sagara Y. (1998), *Induction of reactive oxygen species in neurons by haloperidol*. J. Neurochem., 71, 1002-1012.
- [135] Dringen R., Pfeiffer B., Hamprecht B. (1999), *Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione*. J. Neurosci., 19(1), 562-569.
- [136] Sagara J., Miura K., Bannai S. (1993), *Maintenance of neuronal glutathione by glial cells*. I. Neurochem., 61, 1672-1676.
- [137] Dringen R., Hamprecht B. (1999), *N-Acetylcysteine, but not methionine or 2-oxothiazolidine-4-carboxylate, serves as cysteine donor for the synthesis of glutathione in cultured neurons derived from embryonal rat brain*. Neurosci. Lett., 259, 79-82.
- [138] Thomburne S.K., Juurlink B.H.J. (1996), *Low glutathione and high iron govern the susceptibility of oligodendroglial precursors to oxidative stress*. J. Neurochem., 67, 1014—1022.
- [139] Kim J.S., Kim S.U. (1991), *Oligodendroglia, cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase*. J. Neurosci. Res., 29, 100-106.
- [140] Back S.A., Gan X., Li Y., Rosenberg P.A., Volpe J.J. (1998), *Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion*. J. Neurosci., 18, 6241-6253.
- [141] Yonezawa M., Back S.A., Gan X., Rosenberg P.A., Volpe J.J. (1996), *Cystine deprivation induces oligodendroglial death: rescue by free radical scavenger and by a diffusible glial factor*. J. Neurochem., 67, 566-573.

- [142] Rosenberg P.A., Li Y., Ali S., Altiock N., Back S.A., Volpe J.J. (1999), *Intracellular redox state determines whether nitric oxide is toxic or protective to rat oligodendrocytes in culture*. J. Neurochem., 73, 476–484.
- [143] Richter-Landsberg C., Vollgraf U. (1998), *Mode of cell injury and death after hydrogen peroxide exposure in cultured oligodendroglial cells*. Exp. Cell Res., 244, 218-229.
- [144] Chatterjee S., Noack H., Possel H., Keilhoff G., Wolf G. (1999), *Glutathione levels in primary glial cultures: monochlorobimane provides evidence of cell type specific distribution*. Glia, 27, 152-161.
- [145] Hirrlinger J., Gutterer J.M., Kussmaul L., Hamprecht B., Dringen R. (2000), *Microglial cells in culture express a prominent glutathione system for the defense against reactive oxygen species*. Dev. Neurosci., 22, 384-392.
- [146] Sankarapandi S., Zweier J.L., Mukherjee G., Quinn M.T., Haso D.L. (1998), *Measurement and characterization of superoxide generation in microglial cells: evidence for an NADPH oxidase-dependent pathway*. Arch. Biochem. Biophys., 353, 312-321.
- [147] Minghetti L., Levi G. (1998), *Microglia, as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanooids and nitric oxide*. Prog. Neurobiol., 54, 99–125.
- [148] Arteel G.E., Briviba K., Sies H. (1999), *Protection against peroxynitrite*. FEBS Lett., 445, 226-230.
- [149] Bolanos J.P., Heales S.J.R., Peuchen S., Barker J.E., Land J.M., Clark J.B. (1996), *Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role for glutathione*. Free Radic. Biol. Med., 21, 995-1001.
- [150] Hertz L., Dringen R., Schousboe A., Robinson S.R. (1999), *Astrocytes: glutamate producers for neurons*. J. Neurosci. Res., 57, 417-428.
- [151] Taniguchi N., Ikeda Y. (1998), *γ -glutamyl transpeptidase: catalytic mechanism and gene expression*. Adv. Enzymol., 72, 239-278.
- [152] Garcion E., Do Thanh X., Bled F., Teissier E., Dehouck M.P., Rigault F., Brachet P., Girault A., Torpier G., Darcy F. (1996), *1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulates γ -glutamyl transpeptidase activity in rat brain*. Neurosci. Lett., 216, 183-186.
- [153] Yang C.S., Chou S.T., Lin N.N., Liu L., Tsai P.J., Kuo J.S., Lai J.S. (1994), *Determination of extracellular glutathione in rat brain by microdialysis and high-performance liquid chromatography with fluorescent detection*. J. Chromatogr. B. Biomed. Appl., 661, 231-235.
- [154] Lada M.W., Kennedy R.T. (1997), *In vivo monitoring of glutathione and cysteine in rat caudate nucleus using microdialysis on-line with capillary zone electrophoresis-laser induced fluorescence detection*. J. Neurosci. Meth., 72, 153–159.
- [155] Orwar O., Li X., Andine P., Bergstrom C.M., Hagberg H., Folestad S., Sandberg M. (1994), *Increased intra- and extra-cellular concentration of γ -glutamylglutamate and related dipeptides in the ischemic rat striatum: involvement of γ -glutamyl transpeptidase*. J. Neurochem., 63, 1371-1376.
- [156] Janaky R., Varga V., Jenei Z., Saransaari P., Oja S.S. (1998), *Glutathione and glutathione derivatives: Possible modulators of ionotropic glutamate receptors*. W: *Glutathione in the nervous system*. Ed. Shaw C.A., Taylor and Francis, Washington, 163-196.
- [157] Ogita K., Shuto M., Maeda H., Minami T., Yoneda Y. (1998), *Possible modulation by glutathione of glutamatergic neurotransmission*. W: *Glutathione in the nervous system*. Ed. Shaw C.A., Taylor and Francis, Washington, 137-161.
- [158] Pasqualotto B.A., Curry K., Shaw C.A. (1998), *Excitatory actions of GSH on neocortex*. W: *Glutathione in the nervous system*. Ed. Shaw C.A., Taylor and Francis, Washington, 197–227.
- [159] Reichelt K.L., Fonnum F. (1969), *Subcellular localization of N-acetyl-aspartyl-glutamate, N-acetyl-glutamate and glutathione in brain*. J. Neurochem., 16, 1409-1416.
- [160] Keller H.J., Do K.Q., Zollinger M., Winterhalter K.H., Cuenod M. (1989), *Cysteine: Depolarization-induced release from rat brain in vitro*. J. Neurochem., 52, 1801-1806.

- [161] Zangerle G.D., Cuenod M., Winterhalter K.H., Do K.Q. (1992), *Screening of thiol compounds: depolarization-induced release of glutathione and cysteine from rat brain slices*. J. Neurochem., 59, 181-189.
- [162] Andine P., Orwar O., Jacobson I., Sandberg M., Hagberg H. (1991), *Extracellular acidic sulfur-containing amino acids and γ -glutamyl peptides in global ischemia: posts ischemic recovery of neuronal activity is paralleled by a tetrodotoxin-sensitive increase in cysteine sulfinate in the CA1 of the rat hippocampus*. J. Neurochem., 57, 472-478.
- [163] Dringen R., Kranich O., Hamprecht B. (1997), *The γ -glutamyl transpeptidase inhibitor acivicin preserves glutathione released by astroglial cells in culture*. Neurochem., Res. 22, 727-733.
- [164] Aw T.Y., Ookhtens M., Ren C., Kaplowitz N. (1986), *Kinetics of glutathione efflux from isolated hepatocytes*. Am. J. Physiol., 250, G236-G243.
- [165] Collingridge G.L., Singer W. (1990), *Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity*. Trends Pharmacol. Sci., 11, 290-296.
- [166] Lipton S.A., Rosenberg P.A. (1994), *Mechanisms of disease: excitatory amino acids as final common pathway for neurologic disorders*. N. Engl. J. Med., 330, 613-622.
- [167] Seeburg P.H. (1993), *The TINS/TIPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels*. Trends. Neurosci., 16, 359-365.
- [168] Nakanishi S., Mosu M. (1994), *Molecular diversity and functions of glutamate receptors*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 23, 319-348.
- [169] Laube B., Kuhse J., Betz H. (1998), *Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors*. J. Neurosci., 18, 2954-2961.
- [170] Olney J.W., Zorumski C., Price M.T., Labruyere J. (1990), *L-cysteine, a bicarbonate-sensitive endogenous excitotoxin*. Science, 248, 569.
- [171] Oja S.S., Janaky R., Varga V., Saransaari P. (2000), *Modulation of glutamate receptor functions by glutathione*. Neurochem. Int., 37, 299-306.
- [172] Vincent S.R., McGeer E.G. (1980), *A comparison of sodium-dependent glutamate binding with high-affinity glutamate uptake in rat striatum*. Brain Res., 184, 99-108.
- [173] Varga V., Jenei Z., Janaky R., Saransaari P., Oja S.S. (1997), *Glutathione is an endogenous ligand of rat brain N-methyl-D-aspartate (NMDA) and 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-izoxazolepropione (AMPA) receptors*. Neurochem. Res., 22, 1165-1171.
- [174] Jenei Z., Janaky R., Varga V., Saransaari P., Oja S.S. (1998), *Interference of S-alkyl derivatives of glutathione with brain ionotropic glutamate receptors*. Neurochem. Res., 23, 1087-1093.
- [175] Yoneda Y., Ogita K., Kouda T., Ogawa Y. (1990), *Radioligand labeling of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptors by [³H](+)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-l-phosphonic acid in brain synaptic membranes treated with Triton X-100*. Biochem. Pharmacol., 39, 225-228.
- [176] Oja S.S., Janaky R., Saransaari P., Jenei Z., Varga V. (1995), *Interaction of glutathione derivatives with brain 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-izoxazolepropionate (AMPA) receptors*. Proc. West. Pharmacol. Soc., 38, 9-11.
- [177] Janaky R., Shaw C.A., Varga V., Hermann A., Dohovics R., Saransaari P., Oja S.S. (2000), *Specific glutathione binding sites in pig cerebral cortical synaptic membranes*. Neuroscience, 96, 617-624.
- [178] Levy D.I., Sucher N.J., Lipton S.A. (1991), *Glutathione prevents N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity*. Neuroreport, 2, 345-347.
- [179] Gozlan H., Ben-Ari Y. (1995), *NMDA receptor redox sites: are they targets for selective neuronal protection?* TiPS, 16, 368-374.
- [180] Janaky R., Varga V., Saransaari P., Oja S.S. (1993), *Glutathione modulates the N-methyl-D-aspartate receptor-activated calcium influx into cultured rat cerebellar granule cells*. Neurosci. Lett., 156, 153-157.

- [181] Kóhr G., Eckardt S., Liiddens H., Monyer H., Seeburg P.H. (1994), *NMDA receptor channels: subunit-specific potentiation by reducing agents*. *Neuron*, 12, 1031-1040.
- [182] Guo N., Shaw C. (1992), *Characterization and localization of glutathione binding sites on cultured astrocytes*. *Mol. Brain Res.*, 15, 207—215.
- [183] Lanian R.A., Shaw C.A., Wagey R., Krieger C. (1994), *Characterization, distribution, and protein kinase C-mediated regulation of [³⁵S]-glutathione binding sites in mouse and human spinal cord*. *J. Neurochem.*, 63, 155-160.
- [184] Garthwaite J., Boulton C.L. (1995), *Nitric oxide signaling in the central nervous system*. *Annu. Rev. Physiol.*, 57, 683-706.
- [185] Cuenod M., Do K.Q. (1998), *Glutathione release and nitrosoglutathione presence in CNS: implications for schizophrenia*. W: *Glutathione in the nervous system*. Ed. Shaw C.A., 275-285.
- [186] Taguchi I., Ohta H., Talman W.T. (1995), *Identification and pharmacological characterization of an S-nitrosoglutathione binding site in rat brain*. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 21, 626.
- [187] Meffert M.K., Calakos N.C., Scheller R.H., Schulman H. (1996), *Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking/fusion reactions*. *Neuron*, 16, 1229-1236.
- [188] Rauhala P., Mohanakumar P., Sziraki I., Lin A.M., Chiueh C.C. (1996), *S-nitrosothiols and nitric oxide, but not sodium nitroprusside, protect nigrostriatal dopamine neurons against iron-induced oxidative stress in vivo*. *Synapse*, 23, 58-60.
- [189] Rauhala P., Lin A.M., Chiueh C.C. (1998), *Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress*. *FASEB. J.*, 12, 165-173.
- [190] Dexter D.T., Sian J., Rose H., Hindmarsh J.G., Mann V.M., Cooper J.M., Wells F.R., Daniel S.E., Lee A. I., Schapira A.H.V., Jenner P., Marsden C.D. (1994), *Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease*. *Ann. Neurol.*, 35, 38-44.
- [191] Benzi G., Moretti A. (1995), *Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system*. *Free Radic. Biol. Med.*, 19, 77-101.
- [192] Do K.Q., Trabesinger A.Fl., Kristen-Kriiger M., Lauer C.J., Dydak U., Hell D., Holsboer F., Boesinger P., Cuenod M. (2000), *Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo*. *Eur. J. Neurosci.*, 12, 3721-3728.
- [193] Hiramatsu M., Mori A. (1981), *Reduced and oxidized glutathione in brain and convulsions*. *Neurochem. Res.*, 6, 301-306.
- [194] Abbott L.C., Nejad H.H., Bottje W.G., Hassan A.S. (1990), *Glutathione levels in specific brain regions of genetically epileptic (tg/tg) mice*. *Brain Res. Bull.*, 25, 629-631.
- [195] Hu H.L., Bennett N., Holton J.L., Nolan C.C., Lister T., Roy D.E. (1996), *Increased susceptibility of brain to m-dinitrobenzene neurotoxicity by glutathione depletion*. *Hum. Exp. Toxicol.*, 15, 145-155.
- [196] Davis K.L., Kahn R.S., Ko G., Davidson M. (1991), *Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization*. *Am. J. Psychiatry*, 148, 1474-1486.
- [197] Javitt D.C., Zukin S.R. (1991), *Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia*. *Am. J. Psychiatry*, 148, 1301-1308.
- [198] Olney J.W., Farber N.B. (1995), *Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia*. *Arch. Gen. Psychiatry*, 47, 1023-1028.
- [199] Mahadik S.P., Mukherjee S. (1996), *Free radical pathology and antioxidant defense in schizophrenia a review*. *Schizophr. Res.*, 19, 1-17.
- [200] Mukherjee S., Mahadik S.P., Scheffer R., Correnti E.E., Kelkar H. (1996), *Impaired antioxidant defense at the onset of psychosis*. *Schizophr. Res.*, 19, 19-26.
- [201] Mahadik S.P., Mukherjee S., Scheffer R., Correnti E.E., Mahadik J.S. (1998), *Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis*. *Biol. Psychiatry*, 43, 674-679.

- [202] Do K.Q., Lauer C.J., Schreiber W., Zollinger M., Gutteck-Amsler U., Cuenod M., Holsboer F. (1995). *Gamma-glutamylglutamine and taurine concentrations are decreased in the cerebrospinal fluid of drug-naïve patients with schizophrenic disorders*. J. Neurochem., 65, 2652-2662.
- [203] Buckman T.D., Kling A.S., Eiduson S, Sutphin M.S., Steinberg A. (1987), *Glutathione peroxidase and CT scan abnormalities in schizophrenia*. Biol. Psychiatry, 22, 1349-1356.
- [204] Spina M.B., Cohen G. (1989), *Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1398-1400.
- [205] Rabinowic A.D., Hastings T.G. (1998), *Role of endogenous glutathione in the oxidation of dopamine*. J. Neurochem., 71, 2071-2078.
- [206] Goldman-Rakic P.S. (1994), *Working memory dysfunction in schizophrenia*. J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci., 6, 348-357.
- [207] Berman K.F., Weinberger D.R. (1990), *The prefrontal cortex in schizophrenia and other neuro-psychiatric diseases: In vivo physiological correlates of cognitive deficits*. Prog. Brain Res., 85, 521-537.
- [208] Goldman-Rakic P.S., Leranth C., Williams S.M., Mons N., Geffard M. (1989), *Dopamine synaptic complex with pyramidal neurons in primate cerebral cortex*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9015-9019.
- [209] Krimer L.S., Jakab R.L., Goldman-Rakic P.S. (1997), *Quantitative three-dimensional analysis of the catecholaminergic innervation of identified neurons in the macaque prefrontal cortex*. J. Neurosci., 17, 7450-7461.
- [210] Selemon L.D., Rajkowska G., Goldman-Rakic P.S. (1998), *Elevated neuronal density in prefrontal area 46 in brains from schizophrenic patients: application of a three-dimensional, stereologic counting method*. J. Comp. Neurol., 392, 402—412.
- [211] Garey L.J., Ong W.Y., Patel T.S., Kanani A., Mortimer A.M., Barnes T.R.E., Hirsch S.R. (1998), *Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 65, 446-453.
- [212] Harrison P.J. (1999), *The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation*. Brain, 122, 593-624.
- [213] Okubo Y., Suhara T., Suzuki K., Kobayashi K., Inoue O., Terasaki O., Someya Y., Sassa T., Sudo Y., Matsushima E., Iyo M., Tateno Y., Toru M. (1997), *Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by pet*. Nature, 385, 634-636.
- [214] Parnas J., Bovet P., Innocenti G.M. (1996), *Schizophrenic trait features, binding, and cortico-cortical connectivity: a neurodevelopmental pathogenetic hypothesis*. Neurology Psychiatry Brain Res., 4, 185-196.
- [215] Sullivan J.M., Traynelis S.F., Chen H.S., Escobar W., Heinemann S.F., Lipton S.A. (1994), *Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor*. Neuron, 13, 929-936.
- [216] Pileblad E., Magnusson T. (1992), *Increase in rat brain glutathione following intracerebroventricular administration of γ -glutamylcysteine*. Bioch. Pharmacol., 44, 895-903.
- [217] Seaton T.A., Jenner P., Marsden C.D. (1996), *Thioctic acid does not restore glutathione levels or protect against the potentiation of 6-hydroxydopamine toxicity induced by glutathione depletion in rat brain*. J. Neurochem., 103, 315-239.
- [218] Toffa S., Kunikowska G.M., Zeng B.Y., Jenner P., Marsden C.D. (1997), *Glutathione depletion in rat brain does not cause nigrostriatal pathway degeneration*. J. Neural. Transm., 104, 67-75.
- [219] Bensadoun C., Mirochnitchenko O., Inouye M., Aebischer P., Zurn A.D. (1998), *Attenuation of 6-OHDA-induced neurotoxicity in glutathione peroxidase transgenic mice*. Eur. J. Neurosci., 10, 3231-3236.
- [220] Ratan R.R., Murphy T.H., Baraban J.M. (1994), *Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons*. J. Neurochem., 62, 376-379.

- [221] Olanow C.W. (1990), *Oxidation reactions in Parkinson's disease*. Neurology, 40 (suppl. 3), 32-37.
- [222] Di Monte D.A. (1991), *Mitochondrial DNA and Parkinson's disease*. Neurology, 41 (suppl. 2), 38^A12.
- [223] Perry T.L., Yong V.W. (1986), *Idiopathic Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of patients*. Neurosci. Lett., 67, 269-274.
- [224] Jenner P., Dexter D.T., Sian J., Schapira A.H.V., Marsden C.D. (1992), *Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease*. Ann. Neurol., 32, S82-S87.
- [225] Sian J., Dexter D.T., Lees A.I., Daniel S., Jenner P., Marsden C.D. (1994), *Glutathione related enzymes in Parkinson's disease*. Ann. Neurol., 36, 356-361.
- [226] Ferraro T.N., Golden G.T., DeMattei M., Hare T.A., Fariello R.G. (1986), *Effect of 1-methyl 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on level of glutathione in the extrapyramidal system of the mouse*. Neuropharmacology, 25, 1071-1074.
- [227] Ramsay R.R., Dadgar J., Trevor A., Singer T.P. (1986), *Energy driven uptake of N-methyl-4-phenylpyridine by brain mitochondria mediates the neurotoxicity*. Life Sci., 39, 581-588.
- [228] Chan P., Delanney L.E., Irwin I., Langston J.W., Di Monte D. (1991), *Rapid ATP loss caused by MPTP in mouse brain*. J. Neurochem., 57, 348-351.
- [229] Chiueh C.C., Huang S.J. (1991), *MPP⁺ enhances potassium evoked striatal release through a TL-conotoxin-insensitive, tetrodotoxin- and nimodipine-sensitive calcium dependent mechanism*. Ann. NY Acad. Sci., 635, 393-396.
- [230] Han J., Cheng F.C., Yang Z., Dryhurst G. (1999), *Inhibitors of mitochondrial respiration, iron (II), and hydroxyl radical evoke release and extracellular hydrolysis of glutathione in rat striatum and substantia nigra: potential implications to Parkinson's disease*. J. Neurochem., 73, 1683-1695.
- [231] Rollema H., Damsma G., Horn A.S., De Vries J.B., Westerink B.H.C. (1986), *Brain dialysis in conscious rats reveals an instantaneous massive release of striatal dopamine in response to MPP⁺*. Eur. J. Pharmacol., 126, 345-346.
- [232] Zeevalk G.D., Nicklas W.J. (1991), *Mechanisms underlying initiation of excitotoxicity associated with metabolic inhibition*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 257, 870-878.
- [233] Lafon-Cazal M., Pletri S., Culcasi M., Bockaert J. (1993), *NMDA receptor-dependent superoxide production and neurotoxicity*. Nature, 364, 535-537.
- [234] Brieland J.K., Fantone J.C. (1991), *Ferrous iron release from transferrin by human neurotoxicophil-derived superoxide anion: effect of pH and iron saturation*. Arch. Biochem. Biophys., 284, 78-83.
- [235] Yoshida T., Tanaka M., Somomatsu A., Hirai S. (1995), *Activated microglia, cause superoxide-mediated release of iron from ferritin*. Neurosci. Lett., 63, 56-60.
- [236] Lan J., Jiang D.H. (1997), *Desferrioxamine and vitamin E protect against iron and MPTP-induced neurodegeneration in mice*. J. Neural. Transm., 104, 469-481.
- [237] Santiago M., Matarredona E., Granero L., Cano J., Machado A. (1997), *Neuroprotective effects of the iron chelator desferrioxamine against MPP⁺ toxicity on striatal dopaminergic terminals*. J. Neurochem., 68, 732-738.
- [238] Gutteridge J.M.C. (1996), *Hydroxyl radicals, iron, oxidative stress, and neurodegeneration*. Ann. NY Acad. Sci., 738, 201-213.
- [239] Chiueh C.C., Wu R.M., Mohanakumar K.P., Stemberger L.M., Krishna G., Obata T., Murphy D.L. (1994), *In vivo generation of hydroxyl radicals and MPTP-induced dopaminergic toxicity in the basal ganglia*. Ann. NY Acad. Sci., 738, 25-36.
- [240] Spencer J.P.E., Jenner P., Daniel S.E., Lees A.J., Marsden C.D., Halliwell B. (1998), *Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: Possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species*. J. Neurochem., 71, 2112-2122.

- [241] Carboni S., Melis F., Pani L., Hadjiconstantinou M., Rossetti Z.L. (1990), *The non-competitive NMDA-receptor antagonist MK-801 prevents the massive release of glutamate and aspartate from rat striatum induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP)*. *Neurosci. Lett.*, 117, 129-133.
- [242] Shen X.M., Dryhurst G. (1996), *Oxidation chemistry of (-)-norepinephrine in the presence of L-cysteine*. *J. Med. Chem.*, 39, 2019-2029.
- [243] Li H., Dryhurst G. (1997), *Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (DHBT-1): a putative nigral endotoxin of relevance to Parkinson's disease*. *J. Neurochem.*, 69, 1530-1541.
- [244] Li H., Shen X.M., Dryhurst G. (1998), *Brain mitochondria catalyze the oxidation of 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (DHBT-1) to intermediates that irreversibly inhibit complex I and scavenge glutathione: potential relevance to the pathogenesis of Parkinson's disease*. *J. Neurochem.*, 71, 2049-2062.