

УДК 577.15

¹Макух Є.М., к. б. н., доцент, ¹Вигнан Д.С., к. б. н., доцент,
¹Красневич А.Я., к. б. н., доцент, ²Вигнан Т.Л., лікар-лаборант,
³Головацький І.Д. д.б.н., професор ©

¹ Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С.З. Гжицького

² Львівська обласна клінічна лікарня

³ Львівське наукове товариство імені Т.Г.Шевченка (НТШ)

КЛІТИННІ СІРКОВМІСНІ МЕТАБОЛІТИ

В огляді узагальнено літературні дані стосовно окремих сірковмісних сполук, цистеїну, глутатіону та тіоредоксину. Розглянуто окремі сторони регуляції біосинтезу глутатіону, його роль у захисті клітини, вплив окремих метаболітів та факторів довкілля на вміст відновленого глутатіону у клітині, а також деякі функції тіоредоксину.

Ключові слова: відновлений глутатіон, окиснений глутатіон, тіоредоксин, гідропероксиди, кон'югати глутатіону.

Вступ. Сірковмісні метаболіти відіграють визначальну роль у багатьох біохімічних процесах. Дисульфідні зв'язки (-S – S-) беруть участь у формуванні та стабілізації третинної структури поліпептидів та білків. Молекули глутатіону та тіоредоксину, які у своєму складі містять відповідно один і два залишки цистеїну, функціонують завдяки наявності сульфгідрильних груп - SH, що проявляють особливі хімічні властивості. Відомо, що – SH групи вільного цистеїну за хімічною активністю є дещо відмінні від таких, які знаходяться у структурі глутатіону і тіоредоксину. Так, наприклад, при фізіологічних значеннях рН цистеїн безпосередньо не взаємодіє з гідропероксидами. Крім того, у багатьох лікарських препаратах залишок амінокислоти цистеїну є важливим компонентом реактивного центру, що визначає їх ефективність. Молекули, які у своєму складі містять залишок цистеїну є найбільш метаболічно активними. Вони легко окиснюються, зокрема металами, беруть участь у тіол-дисульфідному обміні.

Відновлений глутатіон є найбільш поширеною сірковмісною сполукою, яка у більшості клітин міститься у значних кількостях. При фізіологічних значеннях рН має дві негативно заряджені карбоксильні групи та позитивно заряджену аміногрупу. Наявність особливого γ -глутамільного зв'язку (на відміну від типового пептидного зв'язку в α -положенні), захищає глутатіон від гідролітичного розпаду під дією внутрішньоклітинних дипептидаз. Сульфгідрильна група цистеїну є донором електронів, внаслідок чого глутатіон є відновником, у тому числі вільних радикалів.

Тіоредоксин є найменшим в сімействі протеїнів білком (12 кДа), котрий містить так звану "тіоредоксинову складку". Остання має важливе значення для

антиоксидантного захисту клітин, фолдингу білків та трансдукції сигналів. Для тіоредоксинів характерною ознакою є наявність консервативного активного центру, який складається з Cys-Gly-Pro-Cys. Окиснений тіоредоксин при передачі відновних еквівалентів на свої субстрати відновлюється за допомогою тіоредоксинредуктази (1). Хоча редокс-системи тіоредоксину та глутатіону між собою не обмінюються відновними еквівалентами у функціональному відношенні, вони у значній мірі дублюють один одного (2,3), що має важливе значення для функціонування клітини при нестачі однієї з систем.

У відповідь на дію стресових факторів у клітині часто включаються механізми, які змінюють вміст тіолових компонентів. Вони є першими елементами захисту клітин від шкідливих чинників. Крім того, порушення кількісного співвідношення сірковмісних сполук, так і їх метаболізму мають надзвичайно важливий вплив на сигнальні шляхи клітин та редокс-систему організму. Оскільки відновлений глутатіон (GSH) є найбільш поширеною і важливою сірковмісною сполукою, даний огляд присвячений розгляду окремих сторін регуляції біосинтезу глутатіону, його ролі у захисті клітини, системі сигнальних шляхів клітини, впливу деяких метаболітів та факторів довкілля на вміст GSH у клітині.

Біосинтез GSH. Біосинтез GSH з глутамату, цистеїну та гліцину послідовно каталізується двома АТФ-залежними цитозольними ензимами: γ -глутамілцистеїнсинтазою (ГЦС) та глутатіонсинтазою (ГЛС). Незважаючи на те, що цей процес проходить фактично у всіх типах клітин, у гепатоцитах він найбільш інтенсивний, тому печінка є органом-експортером GSH.

Під дією ГЛС γ -карбоксільна група глутамату взаємодіє з аміногрупою цистеїну утворюючи γ -пептидний зв'язок який, як було зазначено вище, захищає GSH від гідролізу внутрішньоклітинними дипептидазами. Хоча γ -глутамілцистеїн може бути субстратом для іншого ферменту γ -глутамілциклотрансферази, синтез глутатіону у клітинах переважає, оскільки ГЛС має вищу спорідненість та є більш активна ніж γ -глутамілциклотрансфераза (4).

ГЦС ссавців є гетеродимерним білком і складається з каталітично активної, важкої субодиниці (СО, м.м. 73 кДа) та легкої (регуляторної) СО з м.м. 31 кДа (5,6). Важка СО містить сайти для зв'язування субстратів. Легка СО є мономерним білком, позбавлена каталітичних властивостей, однак проявляє модуляторний або регуляторний вплив при асоціації важкої та легкої СО. Цей зв'язок, очевидно, необхідний для біосинтезу GSH при нормальних фізіологічних концентраціях глутамату та GSH. K_m ГЦС ссавців для глутамату та цистеїну становить 1,7 та 0,15 ммоль / л відповідно, що відповідає внутрішньоклітинній концентрації глутамату (2-4 ммоль / л) та цистеїну (0,15-0,25 ммоль / л) у печінці щурів (4). Активність ензиму регулюється за принципом зворотного зв'язку, тобто гальмується GSH та залежить від впливу багатьох факторів, зокрема S-нітрозування (7), фосфорилування, дефосфорилування (8), оксидування (9). Проте встановлено, що у більшості випадків зростання активності цього ензиму обумовлене посиленням процесів транскрипції, тобто підвищенням синтезу холоензиму. γ -

глутамілцистеїнсинтаза є лімітуючим ензимом, який визначає швидкість біосинтезу GSH de novo (5).

ГлС ссавців є гетеродимерним білком з м.м. 104-118 кДа і є алостеричним ензимом з кооперативним зв'язуванням для γ -глутамільних субстратів (10). Каталізує приєднання гліцину до дипептиду γ -глутамілцистеїну з утворенням трипептиду- γ -глутамілцистеїнілгліцину, глутатіону. Км ГлС ссавців для АТФ та гліцину становить 0,04 та 0,9 ммоль / л відповідно, але є нижчою, ніж внутрішньоклітинна концентрація АТФ (2-4 ммоль / л)та гліцину (1,5-2.0 ммоль/л) у печінці щурів. Обидві СО ГЦС та ГлС клоновано, визначено їх амінокислотну послідовність (4), що полегшує вивчення біосинтезу GSH на молекулярному рівні.

Відомості відносно синтезу GSH in vivo, не дивлячись на тривалі та численні дослідження, вивчені недостатньо. Це обумовлено, зокрема, складною компартменталізацією субстратів та їх метаболізмом як на органному, так і субклітинному рівні. Зокрема, синтез GSH у печінці переважно проходить у перивенозних і меншою мірою у перипортальних гепатоцитах (11). Таким чином, зміни у плазмі крові вмісту GSH, не обов'язково відображають порушення його біосинтезу у специфічних типах клітин. Однак, недавні дослідження проведені з використанням стабільних ізотопів внесли нові дані у розуміння метаболізму GSH (5, 11). Наприклад, у здорових дорослих людей "зникнення" GSH становить 25 мкмоль/кг/год (13), що складає приблизно 65% усього цистеїну, який поступає в організм (38,3 мкмоль / кг / год. Ці дослідження ще раз підтверджують думку про те, що GSH є основною транспортною формою цистеїну в організмі. На основі розрахунків кількості цистеїну, який надходить з їжею (9 мкмоль/кг/год) у здорових дорослих людей (13) встановлено, що пул цистеїну, використаного для біосинтезу GSH, поповнюється розпадом внутрішньоклітинних білків або ендегенним синтезом. Цікаво, що порівняно з гепатоцитами еритроцити мають більш інтенсивний кругообіг глутатіону. Наприклад, у крові здорових дорослих людей біосинтез GSH складає 65% (13), а це означає, що він повністю обмінюється протягом 36 год, тобто ці значення еквівалентні 3 мкмоль / кг/ год. Отже, кров (головним чином еритроцити) є джерелом 10% усього GSH, що синтезується у цілому організмі (12, 13, 14).

Регуляція біосинтезу GSH з участю ГлС. На процеси біосинтезу GSH у живих організмах впливає цілий ряд чинників, зокрема, оксидативний та нітрозний стреси, онкологічні захворювання, протипухлинна терапія, запальні процеси, іонізуюча радіація та тепловий шок, які гальмують активність ГлС. Виснажує вміст GSH також інтенсивне утворення кон'югатів. Простагландин A_2 , важкі метали, антиоксиданти, інсулін підвищують транскрипцію гену ГлС або її активність у різних клітинах (5,15). У той же час недостатній вміст білка у раціоні, деякі лікарські препарати, наприклад, дексаметазон, еритропоетин, а також пухлинний фактор росту β , гіперглікемія, фосфорилування, знижують транскрипцію гену / генів ГлС, які кодують її синтез або активність. NF κ B опосередковує регуляцію експресії ГлС у відповідь на дію оксидативного стресу та бутіонін-сульфоксिमін індукованого виснаження GSH (5,15). S-

нітрозування ГлС NO, донорами якого можуть бути, наприклад, S-нітрозо-L-цистеїн та S-нітрозо-L-цистеїнілгліцин знижують активність цього ензиму (5), а це вказує на взаємозв'язок між NO (метаболіт аргініну) та метаболізмом GSH. Дійсно, зростання вмісту NO спричинене індукцією NO-синтази внаслідок інгібування активності ГлС та виснаження вмісту GSH у цитокинін активованих макрофагах та нейронах (16). У цьому відношенні глюкозамін, 3 п поліненасичені високомолекулярні жирні кислоти, фітоестрогени, поліфеноли, каротиноїди та цинк, які інгібують експресію індукцибельної NO-синтази та продукцію NO (17), можуть запобігати або послаблювати виснаження GSH у клітині. У той час як дієта з високим вмістом жирів, насичені високомолекулярні жирні кислоти, ліпопротеїни низької щільності, лінолева кислота та залізо посилюючи експресію індукцибельної NO-синтази та продукцію NO (17), поглиблюють зниження вмісту GSH у клітині.

Субстратна регуляція біосинтезу GSH. Амінокислота цистеїн є незамінною амінокислотою у передчасно народжених дітей, новонароджених немовлят та суб'єктів, які піддаються стресам внаслідок захворювань (18). Як зазначено вище, внутрішньоклітинний пул цистеїну є відносно низьким, порівняно з набагато вищим і часто метаболічно активнішим пулом GSH у клітині (19). Недавно проведені дослідження переконливо підтвердили, що цистеїн взагалі є лімітованою амінокислотою для біосинтезу у людей, щурів, свиней та курчат (13,18,19). Інсулін та фактор росту, які стимулюють поглинання цистеїну та цистину клітинами, підвищують внутрішньоклітинний вміст GSH (5). І насамкінець, посилене постачання цистеїну або його попередників, таких як цистину, N-ацетилцистеїну та L-2-оксотіазолідин-4-карбоксилату орально або внутрішньовенно підвищує синтез GSH та запобігає його виснаженню у людини та тварин під дією різноманітних факторів живлення або патологічних умов (включаючи білкову голодування, недоїдання, дистресовий респіраторний синдром, HIV, AIDS) (15). Крім того, цистеїн може утворюватись з метіоніну шляхом транссульфування (переважно у гепатоцитах) та використовуватись як субстрат для біосинтезу GSH, тобто метіонін раціону може замінити цистеїн для підтримання синтезу GSH.

Цистеїн легко окиснюється та перетворюється у цистин в насичених киснем екстрацелюлярних рідинах. Отже, у плазмі крові вміст цистеїну є низьким та складає 10-25 мкмоль / л, порівняно з кількістю цистину-50-150 мкмоль / л. Цистеїн та цистин через цитоплазматичну мембрану переносяться окремими носіями ефективніше, ніж інші амінокислоти (5). Цікаво, що деякі типи клітин, наприклад, гепатоцити мають меншу, або не мають здатності до безпосереднього транспорту цистеїну (5). Однак, GSH, що синтезується у гепатоцитах, може відновлювати цистин до цистеїну на зовнішньому боці мембрани клітини, що сприяє поглинанню цистеїну гепатоцитами. Інші типи клітин, наприклад, ендотеліальні, можуть захоплювати цистин та у клітині ферментативно відновлювати його до цистеїну, підтримуючи певний рівень цієї амінокислоти.

Внутрішньоклітинні та позаклітинні системи забезпечують утворення глутамату, який використовується для біосинтезу GSH (20). Зокрема, харчовий

глутамат завжди повністю використовується тонкою кишкою (20). Глутамат плазми синтезується *de novo*, а також є продуктом розпаду білків. Фосфат-залежна глутаміназа, глутаматдегідрогеназа, піролін-5-карбоксилатдегідрогеназа, та глутамін: фруктозо-6-фосфат трансаміназа можуть каталізувати утворення глутамату, але відносна важливість цих ензимів серед різних типів клітин та тканин є різною. Оскільки, еритроцити щурів не здатні поглинати або звільняти глутамат (21) та глутамін, амінокислоти з розгалуженим ланцюгом можуть бути попередниками глутамату у цих клітинах. Дійсно, глутамін є ефективним попередником глутамату для біосинтезу GSH у багатьох типах клітин, включаючи ентероцити, нервові клітини та лімфоцити (22). Отже, додаткове введення глутаміну до загального парентерального живлення, підтримує тканинний пул GSH та покращує виживання після оперативного втручання, ішемії, токсикозу при вживанні ацетамінофенону, хіміотерапії, стресу, викликаного запальним процесом та трансплантацією кісткового мозку (23).

Глутамат відіграє регуляторну роль у біосинтезі GSH з участю двох механізмів: підвищуючи вміст цистину та запобігаючи гальмуванню активності ГлЦ-синтази. Глутамат та цистин є компонентами транспортної системи амінокислот (5). При високому внутрішньоклітинному вмісті глутамату, наприклад, у пацієнтів з прогресуючими формами онкозахворювань, HIV-інфекції, пошкодженні спинного або головного мозку, так само як і у культурі клітин з високим вмістом глутамату, зростання кількості цистину гальмується глутаматом, в результаті чого знижується синтез GSH (24). GSH є неалостеричним інгібітором ГлЦ-синтази, який діє за принципом зворотного зв'язку, але його зв'язування з ензимом є конкурентним по відношенню до глутамату. При значній концентрації глутамату, як наприклад, в еритроцитах собаки, біосинтез GSH посилюється і його концентрація є особливо високою (4).

Вміст гліцину в організмі зменшується при білковому недоїданні (голодуванні), сепсисі, запальних процесах (25, 26). Зростання окиснення гліцину у печінці є відповіддю організму на підвищений рівень глюкозону або при діабеті (27). Ця заміна амінокислота, як виявилось, може бути лімітуючим фактором при біосинтезі GSH в еритроцитах пацієнтів з опіками (14) та у дітей, які видужують після тривалого голодування (24). Очевидним є те, що баланс амінокислот раціону має важливий вплив на білкове живлення і, таким чином, на гомеостаз GSH (5). Зокрема, адекватне забезпечення сірковмісними амінокислотами, так само як і глутаматом (глутаміном або амінокислотами з розгалуженим ланцюгом) та гліцином (або серином) є вирішальним фактором для зростання біосинтезу GSH. Так, в еритроцитах дітей з набряковим протеїн-енергетичним недоїданням і свинок з дефіцитом білка у раціоні, біосинтез GSH може бути порушений, що призводить до його недостатності (28). Підвищення вмісту у сечі 5-оксипроліну, проміжного продукту, γ -глутамільного, циклу, використовують як індикатор для виявлення зниженої кількості цистеїну або гліцину, які використовуються для біосинтезу GSH *in vivo* (14, 25).

Генетична регуляція біосинтезу GSH. Кожен з ензимів, які беруть участь у синтезі GSH у гаплоїдному геномі людини кодується одним геном. Для генів ГЦС та ГлС одержано кДНК, встановлено їх нуклеотидну послідовність (29-31). Клоновано також і 5' нетранслюючу ділянку цього гену, визначено її нуклеотидну послідовність та встановлено регуляторні елементи, які можуть бути посередниками транскрипції при дії певних факторів (32-34). Проте спроба клонувати 5' нетранслюючу ділянку гену ГлС виявилась невдалою. Це не дало можливості визначити його кінцеву нуклеотидну послідовність, в результаті чого регуляторні елементи гена ГлС залишаються невідомими.

Надзвичайно велика кількість метаболітів, включаючи і глутатіонові кон'югати, а також реактивні форми кисню, індукують біосинтез GSH, посилюючи процеси транскрипції гену ГЦС (35). На основі встановленої нуклеотидної послідовності, а також експериментального дослідження щодо 5' нетранслюючої послідовності генів важкої та легкої СО ГЦС, автори припускають існування декількох посилюючих факторів. Вони можуть бути посередниками, окремо або разом, індукуючи процеси транскрипції, у відповідь на зв'язування факторів транскрипції, активність яких у свою чергу зростає при посиленні сигналів деякими метаболітами. Встановлено, що промотор гену каталітичної СО ГЦС містить значну кількість цис-діючих елементів, включаючи сайти для зв'язування цілого ряду активаторів, ядерного фактора каппа В та електрофільних елементів. Ген модуляторної СО ГЦС містить багато таких елементів, які наявні також у промоторі каталітичної СО, за винятком ядерного фактора (34).

Міжорганний транспорт глутатіону. Глутатіон переноситься з клітини у клітину за допомогою спеціальних переносників з полегшеним механізмом (15). GSH плазми крові має первинне печінкове походження, хоча деяка кількість GSH раціону або кишківника може бути у портальній венозній плазмі (5). Молекула GSH покидає печінку або цілий трипептид γ -глутамілцистеїн γ -Glu-(Cys)₂, завдяки γ -глутамілтрансферазі, яка локалізована на зовнішній цитоплазматичній мембрані (36). Незвичайний концентраційний градієнт по різні боки плазматичної мембрани робить транспорт позаклітинного GSH або GSSG у клітину термодинамічно несприятливим. Однак залишок γ -Glu-(Cys)₂ посилює синтез GSH у багатьох типах клітин, за винятком гепатоцитів. Нирки, легені та кишківник потребують значної кількості GSH синтезованого у печінці. Міжорганний метаболізм GSH функціонує як транспортна форма цистеїну у нетоксичному вигляді між тканинами, що також допомагає підтримувати внутрішньоклітинний пул GSH та редокс потенціал клітини (5).

Вплив факторів довкілля та деяких метаболітів на вміст GSH. Вміст внутрішньоклітинного GSH залежить від впливу багатьох чинників, зокрема важких металів (37), високого рівня глюкози в організмі (38) та навіть теплового шоку (39). Дія активних форм кисню, включаючи H₂O₂ (40), оксид азоту (41) або систем, які генерують реактивні форми, зокрема 2,3-диметокси-1,4-нафтохінон (42), менадіон (40,43) трет-бутил-гідрохінон (42,44),

піролідиндитіокарбамат (45), нафтфлавоон (46), та інші біологічно активні метаболіти, зокрема деякі простагландини (47). Окиснені ліпопротеїни низької щільності (48) та 4-гідрокси-2-ноненаль, один з кінцевих продуктів ліпопероксидації (49-51) підвищують вміст GSH у клітині, індукуючи процеси його біосинтезу.

Рівень внутрішньоклітинного GSH залежить від співвідношення процесів його біосинтезу та інтенсивності використання. Виснаження вмісту GSH проходить по-перше, при утворенні значної кількості кон'югатів у глутатіонтрансферазній (ГлТ) реакції (це фактично незворотні втрати), а по-друге, утворення GSSG при окисненні GSH збільшенням продукції H_2O_2 з участю глутатіонпероксидази (ГлП). Ці ензими виконують захисні функції для клітини, оскільки знешкоджують токсичні для її функціонування метаболіти. Для цих процесів використовується GSH, який синтезується *de novo* або регенерується з дисульфідної форми ферментом глутатіонредуктазою (ГлР).

Оскільки активність ГЦС гальмується за принципом зворотнього зв'язку, то виснаження вмісту GSH веде до короточасного зростання його концентрації. Це є наслідком відсутності гальмування процесу біосинтезу кінцевим продуктом. До деякої міри певне зниження рівня GSH може бути причиною стрибкоподібного зростання активності ензиму ГЦС, яка функціонує в умовах, при яких відсутнє гальмування GSH, а це у свою чергу може бути наслідком короткотермінового зростання кількості GSH у клітині (52). Таким чином, активація процесів біосинтезу GSH *de novo*, обумовлена головним чином посиленням синтезу СО ГЦС з одночасним зростанням процесів транскрипції та підвищенням стабільності відповідних mРНК (49,53,54). Дослідження механізмів, за допомогою яких проходить регуляція кількості клітинного GSH показали, що вони регулюються на генетичному рівні та зв'язані з індукцією гена ГЦС (35) з незалежною регуляцією транскрипції її СО (55), а також доступністю субстратів, тобто амінокислот-цистеїну, глутамату та гліцину.

Глутатіон як захисний фактор. Вміст GSH у клітині кількісно переважає інші небілкові сірковмісні сполуки_цистеїну та його окисленої форми-цистину, а також тіоредоксину. Для GSH характерний широкий спектр біологічної дії. Після тривалих досліджень встановлено, що -SH група GSH є важливим елементом антиоксидантного захисту клітини, відіграє суттєву роль у метаболізмі ксенобіотиків, ейкозаноїдів, лейкотрієнів, простагландинів, регуляції клітинного циклу, експресії генів та сигнальної трансдукції (4, 56-61). Цей перелік для GSH далеко не повний. Хоча GSH, як і цистеїн, безпосередньо не взаємодіє з гідропероксидами, які утворюються в процесі обміну, він використовується як субстрат для ГлП реакції. Цей механізм є домінуючим для знешкодження неорганічних та органічних пероксидів. ГлП належить до сімейства складних-гомотетрамерних білків селенопротеїнів, які в активному центрі містять селен. Для цього ензиму характерна широка субстратна специфічність. З різною швидкістю він відновлює неорганічні та органічні пероксиди- H_2O_2 , кумолу, т-бутилу, поліненасичених жирних кислот, простагландинів (62, 63).

Зовсім недавно виявлено сімейство білків, зараз відоме як пероксиредоксини. Встановлено їх роль у знешкодженні H_2O_2 за участю GSH або іншої сірковмісної сполуки, причому, якщо цистеїн в активному центрі перебуває у тіолатній формі, його ефективність вища, ніж з селеном. GSSG, який утворюється у цих реакціях, ферментом глутатіонредуктазою (ГлР) відновлюється до GSH. Як кофермент ензим використовує НАДФН+ H^+ , який утворюється в окислювальних реакціях пентозофосфатного шляху (ПФШ), або НАДФ-залежній ізоцитратдегідрогеназній (ІцДГ) реакції циклу Кребса. Слід зазначити, що тільки в еритроцитах, дегідрогенази ПФШ повністю покривають потребу у відновлених еквівалентах для ГлР (64), тоді як у тканинах більш потужним джерелом відновленої форми НАДФ є ІцДГ реакція ЦТК(65, 66).

Вміст GSSG у тканинах, за даними різних авторів, незначний та складає від 1% до 2-3% від загальної кількості. Зростання його вмісту спостерігається під впливом багатьох чинників, зокрема оксидативного стресу, але під впливом ГлР він швидко регенерує до редукованої форми, тобто GSH. Крім того, GSSG, взаємодіючи з сульфгідрильними групами білків, утворює змішані протеїн-глутатіон дисульфідів (67). Період напіврозпаду змішаних дисульфідів (білок-глутатіон) є тривалішим, ніж GSSG. Можливо це обумовлено способом складання білкової молекули та базальним рівнем цих компонентів у клітині (68). Ці реакції є важливим механізмом реалізації функції GSH як посередника у складній системі сигнальних шляхів клітини. АТФ-залежний процес виходу GSSG з клітини є одним з механізмів, який забезпечує підтримання його вмісту у клітині (69).

Встановлено, що GSH неензиматичним шляхом утворює кон'югати з численною групою електрофільних сполук, оскільки останні дуже активні. Але ці речовини взаємодіють також з GSH ензиматичним шляхом за участю ферменту глутатіонтрансферази (ГлТ). Процеси кон'югації з участю GSH є важливим елементом у знешкодженні токсичних для організму ксенобіотиків та нормальним захисним фізіологічним процесом(70-75). Утворення значної кількості кон'югатів ензиматичним або неензиматичним шляхом у кінцевому результаті спричиняє виснаження вмісту GSH. Глутатіонові кон'югати - молекули невеликих розмірів виводяться з клітини (36). Цей феномен слід розглядати як один з елементів детоксикаційного процесу, хоча окремі з них, наприклад, гексахлорбутадієн токсичний для нирок (76). У нирках з метаболізмом глутатіонових кон'югатів тісно пов'язаний високоактивний, порівняно з іншими тканинами, ензим γ -глутамілтранспептидаза. Вона каталізує перетворення кон'югатів глутатіону до меркаптурових кислот, які швидко виводяться з організму. Цей механізм є одним з важливих компонентів захисної системи організму проти токсичної дії ксенобіотиків (72).

Хоча GSH неензиматичним шляхом безпосередньо не взаємодіє з H_2O_2 вважають, що його роль в антиоксидантному захисті залежить від здатності взаємодіяти з атомом вуглецю, який розміщений у центрі радикала (77). У цій гіпотезі, яка одержала назву "пастки вільних радикалів," GSH діє синергічно з супероксиддисмутазою, запобігаючи оксидативному пошкодженню клітини. Вирішальна роль GSH у захисті клітини, очевидно, пов'язана із значною

кількість реакцій, у яких він приймає участь. В результаті цього шкідливі молекули виводяться або нейтралізуються організмом. Незважаючи на те, що перетворення GSSG у GSH у клітині легко проходить з участю високо специфічної ГлР, виснаження GSH через утворення значної кількості кон'югатів, або незворотні втрати GSSG шляхом екскреції потребують його постійного поновлення. Хоча більшість тканин здатні синтезувати GSH de novo, в організмі домінують процеси спрямовані на його збереження.

Глютатіон у системі сигнальних шляхів. Співвідношення відновленої та окисненої форм глютатіону GSH / GSSG має важливе значення не тільки для підтримання окисно-відновного стану клітини, але відіграє певну роль у системі сигнальних шляхів клітин. Правда, не зовсім зрозуміло, яким чином співвідношення метаболітів трансформується у хімічний окисно-відновний сигнал. Мабуть, правдоподібною є гіпотеза дисульфідного обміну між GSSG та SH-групами білків. Але тут виникає інше питання: як тіоли білків, які широко представлені різноманітними функціями необхідні для специфічних сигнальних процесів не беруть участі у цих реакціях. В ендоплазматичному ретикулумі, де виявлено низьке співвідношення GSH / GSSG, утворюються змішані дисульфіди, а дисульфідний обмін є важливим компонентом фолдингу білків. Відомо, що сильний оксидативний стрес спричиняє зростання рівня GSSG через активацію ГлП реакції з одночасним використанням GSH. Нормальний вміст GSSG у клітині, як зазначено вище, складає 1-3% загальної кількості глютатіону. В умовах оксидативного стресу одночасно зростає кількість змішаних дисульфідів та GSSG. Встановлено, що значна кількість сірковмісних білків включена у сигнальні процеси, зокрема рецепторні білки, а деякі протеїнкінази та фактори транскрипції можуть змінювати свої функції в результаті утворення змішаних дисульфідів з GSSG: білок- S-S-G. Оксидативний стрес викликає інтенсивну метаболічну відповідь, що в свою чергу впливає на обмін GSH, очевидно, швидше, ніж проходження специфічного сигналу. Ці зміни складають важливий патофізіологічний аспект, а можливо і тригерну адаптивну відповідь, коли стрес не веде до летального закінчення. У цьому відношенні GSSG проявляє дію як неспецифічна сигнальна молекула. Однак у нормальних фізіологічних умовах GSH теж може функціонувати як сигнальна молекула, хоча правдоподібно H_2O_2 у цьому відношенні є прямим сигнальним агентом окисно-відновного стану, не дивлячись на те, що швидко знешкоджується під дією ензимів ГлП та каталази. Слід зазначити, що специфічність молекули H_2O_2 у сигнальних процесах, очевидно, включає різні метаболічні зміни залучаючи GSH перш ніж H_2O_2 буде знешкоджена ензиматичним або неензиматичним шляхом, металами змінної валентності, які здатні окислювати H_2O_2 . Відомо, що пероксид водню неензиматичним шляхом не взаємодіє з тіолами. При взаємодії H_2O_2 (в присутності металів або пероксинітритів) з тіолами утворюються сульфенова ($-SO_2H$) або сульфонова ($-SO_3H$) кислоти, які важко відновлюються. При низьких концентраціях H_2O_2 спонтанно взаємодіє з тіолат аніоном, в результаті чого утворюється сульфенова кислота. У клітині тіолати, на відміну від цистеїну, мають значно вищу фізіологічної норми рКа. Вони виявлені в

активних сайтах багатьох білків, таких як пероксиредоксини, протеїнтирозинфосфатази і сімейство білків тіоредоксинів. Активні сайти цих білків створюють незвичайне мікрооточення, у якому цистеїн дисоціює до тіолатної форми. Тіолати є важливими для функціональної активності цих білків, а в реакціях з участю H_2O_2 забезпечують механізми включення H_2O_2 у сигнальні процеси з такими молекулами як тіоредоксин та протеїнтирозинфосфатази, які є елементами сигнального шляху (78-81). Зниження активності протеїнтирозин - фосфатази *in vitro* може означати непрямі докази участі H_2O_2 у сигнальних шляхах (79,82). Очевидно, це є той процес де GSH може приймати безпосередню участь. Сульфенова кислота легко відновлюється з участю GSH, запобігаючи зниженню активності протеїн - тирозинфосфатази. Зворотність є важливим моментом функціонування сигнальних потоків у клітині. Каталітичний сайт сімейства тіоредоксинових білків містить тіолат, який може перетворитись у сульфенову кислоту і, взаємодіючи з цистеїном, утворює внутрішньомолекулярний дисульфідний зв'язок, який не відновлюється з участю GSH, а тільки ензиматичним шляхом тіоредоксинредуктазою з використанням відновленої форми НАДФ. Вважають, що тіоредоксин є одним з компонентів сигнальних шляхів з участю H_2O_2 через утворення сульфенової кислоти.

Висновки. Глютатіон і тіоредоксин є надзвичайно важливими компонентами захисної системи клітини проти токсичної дії ксенобіотиків та активних форм кисню. Вивчення сигнальних шляхів, які ведуть до зміни метаболізму тіолів, є вирішальним для розуміння механізмів і застосування відповідних заходів для знешкодження токсикантів різної природи. Багато токсикантів проявляють свій ушкоджуючий вплив прямо або опосередковано на окисно-відновний статус клітини через дію на метаболізм тіолів, і, в першу чергу, на систему глютатіону.

Література

1. Amer E.S.J., Holmgren A. // *Eur. J. Biochem.* – 2000. - V. 267. - P. 6102-6109.
2. Carmel-Harel O., Storz G. // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2000. - V. 54. - P. 439-461.
3. Potamitou A., Holmgren A., Vlamis-Gardicas A. // *J. Biol. Chem.* – 2002. - V. 277. - P. 18561-18567.
4. Griffith O.W. // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – V. 27. – 922-935.
5. Lu S.C. // *Curr. Top. Cell. Regul.* -2000. – V. 36. –P. 95-116.
6. Seelig G.F., Meister A. // *Methods Enzymol.* – 1985. – V. 113. – P. 379-390.
7. Griffith O.W. // *Radic. Biol. Med.* – 1999. – V. 27. - P. 922-935.
8. Sun W-M., Huang Z-Z., Lu S.C. // *Biochem. J.* – 1996.- V. 320. - P. 321-328.
9. Ochi T. // *Arch. Toxicol.* – 1995. - V. 70. - P. 96-103.
10. Njaisson R., Norgren S., Larsson A. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2001. - V. 289. – P. 80-84.
11. Bella D.L., Hirschberger L.L., Kwon L.L. et al. // *Amino Acids.* – 2002. - V. 23. - P.453-458.
12. Reid M., Badaloo A., Forrester T. et al. // *Am. J. Physiol.* – 2000. – V. 278. - P. E405-E412.

13. Lyons J., Pauh-Pfeiffer A., Yu Y. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. -2000. – V. 97. – P. 5071-5076.
14. Yu Y. M., Ryan C. V., Fei Z. V. et al. // Am. J. Physiol. – 2002. – V. 282. – P. E247-E258.
15. Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H. // Biomed. Pharmacol. - 2003.- V.57.- P. 145-155.
16. Canais S., Casarejos M. J., de Bemardo S. et al. // J. Biol. Chem. - 2003. – V. 278. – P. 21542-21549.
- 17.. Wu G., Fang Y-Z. Yang S. et al. // J. Nutr.- 2004. – V. 134. – P. 489-492.
- 18.. Jahoor F., Jackson A., Gazzard B. et al. // Am. J. Physiol. – 1999. – V. 276. – P. E205-E211.
19. Chung T.K., Funk M.A., Baker D. H. // J. Nutr.- 1990. – V. 120. – P. 158-165.
20. Reeds P.J., Burrin D.G., Stoll B. et al. // Am. J. Physiol. – 1997. – V. 273. – P. E408-E415.
21. Watford M. // J. Nutr. - 2002. - V. 132. – P. 952-956.
22. Johnson A. T., Kauffman Y.C., Luo S. et al. // J. Surg. Res. – 2003. –V. 111. - P. 222-228.
23. Oehler R., Roth E. // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. - 2003. – V. 6. – P. 277-282.
24. Tapiero H., Mathe G., Couvreur P. et al. // Biomed. Pharmacother. – 2002. – V. 56. – P.446-457.
25. Persaud C., Forrester N., Jackson A. // J. Nutr. – 1996. – V.126. – P. 2823-2830.
26. Grimble R. E., Jackson A. F., Persaud C. // J. Nutr. – 1992. – V.122. – P. 2066-2073
- 27.Mabrouk G. M., Jois M., Brosnan J. T. // Biochem J. – 1998. – V. 330. – P. 759-763.
28. Badaloo A., Reid M., Forrester T. et al. // Am. J. Clin. Nutr. – 2002. – V. 76. - P. 646-652.
29. Gipp J.J., Chiang C., Mulcahy R.T. // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1992. - V. 185. – P. 29-35.
30. Gipp J.J., Bailey H.H., Mulcahy R.T. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1995. - V. 206. – P .584-589.
31. Gali R.R., Board P.G. // Biochem. J. – 1995. - V. 310. - P. 353-3588.
32. Mulcahy R.T., Gipp J.J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1995. - V. 209. - P. 227-233.
33. Mulcahy R.T., Wartman M.A., Bailey H.H. et al. // J. Biol. Chem. – 1997. - V. 272. - P. 7445-7454.
34. Moynova H.R., Mulcahy R.T. // J. Biol. Chem. – 1998. – V. 273. - P. 14683-14689.
35. Wild A.C., Mulcahy R.T. // Free Radic. Res. – 2000. - V. 32. - P. 281-301.
36. Макух Є. М., Оліярник О.Д., Вигнан Д.С., Красневич А.Я. // Наук.вісник. ЛНАВМ імені С.З. Гжицького. – 2005. – Т. 7. – С. 100-118.
37. Woods J.S., Ellis M.E. // Biochem. Pharmacol. – 1995. - V. 50. - P. 1719-1724.
38. Urata Y., Yamamoto H.,Goto S. et al. // J. Biol. Chem. – 1996. - V. 271. - P. 15146-15152

39. Kondo T., Yoshida K., Urata Y. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1993. - V. 268. - P. 20366-20372.
40. Rahman I., Bel A., Mulier B. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. - V. 229. - P. 832-837.
41. Moellering D., Mc Andrew J., Patel R.P. et al. // *FEBS Lett.* - 1999. - V. 448. - P. 292-296.
42. Liu R.M., Hu H., Robison T.W. et al. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* - 1996. - V. 4. - P. 186-191.
43. Shi M.M., Iwamoto T., Forman H.J. // *Am. J. Physiol.* - 1994. - V. 267. - P. L414-L421.
44. Galloway D.C., McLellan L.I. // *Biochem. J.* - 1998. - V. 336. - P. 535-539.
45. Wild A.C., Mulcahy R.T. // *Biochem. J.* – 1999. - V. 338. - P. 659-665.
46. Mulcahy R.T., Wartman M.A., Bailey H.H. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1997. - V. 272. - P. 7445-7454.
47. Levonen A-L., Dickinson D.A., Moellering D.R. et al. // *Thromb. Vasc. Biol.* – 2001. – V. 21. - P. 1846-1851.
48. Moellering D.R., Patel R.P., Dickinson D.A. et al. // *Biochem. J.* – 2002. –V. 362. – P. 51-59.
49. Liu R-M., Gao L., Choi J. et al. // *Am. J. Physiol.* – 1998. – V. 275. - P. L861-L869
50. Liu R-M., Borok Z., Forman H.J. // *J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 2001. – V. 24. – P. 499-505.
51. Dickinson D.A., Forman H. J. // *Biochem. Pharmacol.* – 2002. – V. 64. – P. 1019-1026.
52. Richman P.G., Meister A. // *J. Biol. Chem.* – 1975. - V. 250. - P. 1422-1426.
53. Yao K.S., Godwin A.K., Johnson S.W. et al. // *Cancer. Res.* – 1995. - V. 55. - P. 4367-4374.
54. Gomi A., Masuzawa T., Ishikawa T. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1997. –V. 239. – P. 51-56.
55. Dahl E.L., Mulcahy R. // *Toxicol. Sci.* – 2001. - V. 61. - P. 265-272.
56. Ketterer B. // *Drug Metab. Rev.*- 1982. – V.- 13. - P. 161-187.
57. Meister A. // *Science.* -1983. – V. 220. - P. 472-477.
58. Ziegler D.M. // *Annu. Rev. Biochem.*- 1985. – V. 54. – P. 305-329.
59. Reed D.J., Fariss M.W. // *Pharmacol. Rev.*- 1984. – V.36. – P. 25S-33S.
60. Arrigo A.P. // *Free Radic. Biol. Med.*- 1999. – V.27. – P. 936-944.
61. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. // *Успехи совр. биол.* – 1990. - Т. 110. – С. 20-33.
62. Cohen G., Hochstein P. // *Biochemistry.*- 1963. - V. 2. – P. 1420-1428.
63. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. // *Успехи совр. биол.* – 1993. - Т. 113. – С. 107-121.
64. Макух Є., Головацький І. // *Вісник Львівського ун-ту. Серія біол.* – 2002. – Вип.. 31. - С. 34-38.
65. Головацький І.Д. // *Биохимия животных и человека.* - 1978. - Вып. 2. – С. 39-46.
66. Reed D.J. // *Biochem. Pharmacol.* – 1986. - V. 35. - P. 7-13.

67. Brigelius R., Muckel C., Akerboom T.P.M. et al. // *Biochem. Pharmacol.* – 1983. – V. 32. – P. 2529-2534.
68. Loeb G.A., Skelton D.C., Forman H.J. // *Biochem. Pharmacol.* – 1989. – V. 38. – P. 3119-3121.
69. Sharma R., Gupta S., Ahmad H. et al. // *Appl. Pharmacol.* - 1990. – V. 104. – P. 421-428.
70. Strange R.C., Jones P.W., Fryer A.A. // *Toxicol. Lett.* - 2000. – V. 112/113. - P. 357-363.
71. Eaton D.L., Bammler T.K. // *Toxicol. Sci.* – 1999. – V.49. – P. 156-164.
72. Commandeur J.N.M., Stijntjies G.J., Vermeulen N.P.E. // *Pharm. Rev.* – 1995. - V. 47. - P. 273-330.
73. Ketterer B., Coles B., Meuer D.J. // *Enviroment. Health Perspectives.* – 1983. – V. 49. – P. 59-69.
74. Pickett C. B., Lu A. Y. H. // *Annu. Rev. Biochem.* – 1989. - V. 58. - P. 743-764.
75. Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2005. – V. 45. - P. 51-88.
76. Dekant W, Vamvakas S, Anders M.W. // *Food Chem. Toxicol.* - 1990. - V. 28. – P. 285-293.
77. Winterboum C.C. // *Free Radic. Biol. Med.* - 1993. – V. 14. – P. 85-90.
78. Holmgren A. // *Structure.* - 1995.- V. 3. - P. 239-243.
79. Denu J.M., Tanner K.G. // *Biochemistry.* – 1998. - V. 37. - P. 5633-5642.
80. Claiborne A., Yen J.L., Mallett T.C. et al. // *Biochemistry.* - 1999. - V. 38. - P. 15407-15416.
81. Kim J.R., Yoon H.W., Kwon K.S. et al. // *Anal. Biochem.* – 2000. - V. 283. - P. 214-221.
82. Lee S.R., Kwon K.S, Kim S.K. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1998. - V. 273. - P. 15366-15372.

Summary

Makukh Ye. M., Vygnan D.S., Krasnevych A. Ya. Vygnan T.L., Golovatskyi I.D.
CELLULAR THIOL-CONTAINING METABOLITES

The literary data about cellular thiol-containing metabolites glutathione and thioredoxin have been summarized. It was shown some aspects the regulation of GSH biosynthesis, their roles as a protective agent and roles of thiols as signaling molecules.

Key words: *glutathione reduced, glutathione oxidized, thioredoxin, hydrogen peroxide, glutathione-conjugate.*

Стаття надійшла до редакції 16.03.2010