

Karol Dziubek

**Wpływ czynników  
chemicznych i fizycznych  
na zawartość  
glutationu zredukowanego (GSH)  
i utlenionego (GSSG)  
w niektórych narządach  
*Rana esculenta* L.  
w okresie zimowania**

Wydawnictwo Naukowe WSP  
Kraków 1998



**Wpływ czynników  
chemicznych i fizycznych  
na zawartość  
glutationu zredukowanego (GSH)  
i utlenionego (GSSG)  
w niektórych narządach  
*Rana esculenta* L.  
w okresie zimowania**

Wyższa Szkoła Pedagogiczna  
im. Komisji Edukacji Narodowej  
w Krakowie  
Prace Monograficzne nr 237

Karol Dziubek

**Wpływ czynników  
chemicznych i fizycznych  
na zawartość  
glutationu zredukowanego (GSH)  
i utlenionego (GSSG)  
w niektórych narządach  
*Rana esculenta* L.  
w okresie zimowania**

Wydawnictwo Naukowe WSP  
Kraków 1998

Recenzenci  
prof. dr hab. BARBARA PŁYTYCZ  
prof. dr hab. ZOFIA WALTER

redaktor Marta Łukaszczyk

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe WSP, Kraków 1998

ISSN 0239-6025  
ISBN 83-87513-19-9

Skład, druk i oprawa Wydawnictwo Naukowe WSP  
31-128 Kraków, ul. Karmelicka 41. Zam. 13/98

# Spis treści

<b>Wstęp</b> .....	7
<b>1. Założenia i cel pracy</b> .....	10
1.1. Temperatura.....	10
1.2. Insulina.....	13
1.3. Ester monoetylowy glutationu.....	14
1.4. Allopuryinol.....	15
1.5. Promieniowanie UVA.....	16
1.6. Długość ciała żab.....	17
1.7. Kwas L-2-oksotiazolidyno-4-karboksyłowy (OTC).....	17
1.8. Witamina E.....	18
1.9. Etanol.....	20
<b>2. Materiał i metody</b> .....	22
2.1. Zwierzęta.....	22
2.2. Narządy.....	23
2.3. Oznaczanie GSH metodą Ellmana (1959).....	23
2.4. Oznaczanie GSH i GSSG metodą Matsumoto i innych (1996).....	24
2.5. Oznaczenie glukozy.....	24
2.6. Analiza wyników.....	25
<b>3. Grupy badawcze – badania wpływu:</b> .....	26
3.1. Temperatury.....	26
3.2. Insuliny.....	26
3.3. Estru monoetylowego glutationu.....	27
3.4. Allopuryinolu.....	27
3.5. Promieniowania UVA.....	28
3.6. Długości ciała żab.....	28
3.7. Kwasu L-2-oksotiazolidyno-4-karboksyłowego.....	29
3.8. Witaminy E.....	29
3.9. Etanolu.....	30

<b>4. Wyniki</b> .....	31
4.1. Wpływ temperatury na zmiany zawartości glukozy, GSH oraz GSSG.....	31
4.2. Wpływ insuliny na zawartość glukozy w surowicy krwi oraz GSH.....	31
4.3. Wpływ estru monoetylowego glutationu na zawartość GSH.....	34
4.4. Wpływ allopurynolu na zawartość GSH.....	36
4.5. Wpływ promieniowania UVA na zawartość GSH.....	38
4.6. Wpływ długości ciała żab na zawartość GSH oraz GSSG.....	39
4.7. Wpływ kwasu L-2-oksotiazolidyno-4-karboksylowego (OTC) na zawartość GSH oraz GSSG.....	43
4.8. Wpływ witaminy E na zawartość GSH i GSSG.....	47
4.9. Wpływ etanolu na zawartość GSH oraz GSSG.....	50
<b>5. Dyskusja</b> .....	54
5.1. Temperatura.....	54
5.2. Insulina.....	55
5.3. Ester monoetylowy glutationu.....	57
5.4. Allopurynol.....	58
5.5. UVA.....	61
5.6. Długość ciała żab.....	63
5.7. Kwas L-2-oksotiazolidyno-4-karboksylowy (OTC).....	67
5.8. Witamina E.....	68
5.9. Etanol.....	70
<b>Podsumowanie i wnioski</b> .....	72
<b>Streszczenie</b> .....	76
<b>Wykaz skrótów</b> .....	78
<b>Literatura</b> .....	79



## Wstęp

Glutation (GSH) jest trójpeptydem powszechnie obecnym w komórkach zwierzęcych. W warunkach fizjologicznych występuje głównie w formie zredukowanej (GSH), (Brigelius 1985). W komórkach tych spełnia wielorakie funkcje, m.in. usuwa ponadtlenki przy udziale seleno-zależnej i seleno-niezależnej peroksydazy glutationowej (EC 1.11.1.9) (GSH-Px), (Flohé 1989; Ketterer i Meyer 1989), redukuje nieenzymatycznie wolne rodniki (Potter i Hinson 1987), a także uczestniczy w enzymatycznych reakcjach koniugacji z egzogennymi i endogennymi reaktywnymi metabolitami (Ketterer i inni 1988). Ma także znaczący udział w utrzymaniu odpowiedniej konformacji białek (Larsson i inni 1983) i w modulowaniu aktywności wielu enzymów, ponieważ jest ich istotnym kofaktorem (Gilbert 1984). Reguluje również metabolizm białek, szczególnie tych w których występują grupy -SH, poprzez tzw. wymianę tiole – dwusiarczki (Irita i inni 1994; Liu i inni 1994). Jest także pojemnym rezerwuarem cysteiny (Tateishi i inni 1977).

Dzięki właściwościom redukującym i nukleofilowym przeciwdziała utlenianiu lipidów, białek i kwasów nukleinowych (Arrick i inni 1982). Słusznie więc pisał Ochi w 1988, że dzięki temu GSH odgrywa istotną rolę w utrzymaniu integralności komórkowej.

Zapobiega również uszkodzeniom wywoływanym przez czynniki alkilujące (Arrick i Nathan 1984), szok cieplny (Mitchell i Russo 1983); ultrafiolet (Tyrrell i Pidoux 1986), promieniowanie X (Midander i inni 1982), a także przez różne oksydanty (Nathan i inni 1981; Arrick i inni 1982).

W tej ochronnej roli GSH nie jest odosobniony, gdyż jest efektywnie wspomagany przez inne składniki ochronnego antyoksydacyjnego systemu komórki, takie jak katalaza (EC 1.11.1.6), GSH-Px, reduktaza GSH (EC 1.6.4.2), dysmutazy ponadtlenkowej (EC 1.15.1.1) (SOD), witamina C, witamina E i kwas moczowy. Istnieją bowiem synergistyczne interakcje pomiędzy wszystkimi składnikami ochronnego antyoksydacyjnego systemu a GSH (Allen i Venkatraj 1992). GSH uczestniczy także w redukcji ponadtlenków i w bezpośrednim zmiataniu rodników wodorotlenowych ( $\bullet\text{OH}$ ) i tlenu singletowego ( $^1\text{O}_2$ ). Poza tym jest komórkowym buforem redoks o dużej pojemności i buforem grup -SH (Meister i Anderson 1984; Meister 1993).

Ilość GSH w komórkach, tempo jego syntezy i rozpadu (metabolizm) są różne w zależności od rodzaju tkanki (Potter i Tran 1992). Jest interesującym faktem, że w reakcjach przeciwdziałających komórkowym uszkodzeniom spada na ogół zawartość wewnątrzkomórkowego GSH, która jednak szybko powraca do normy, kiedy ustanie działanie czynnika obniżającego jego poziom (Ishikawa i Sies 1989). Dlatego też zmiany w zawartości GSH i w tempie jego metabolizmu w różnych tkankach mają wpływ na ich wrażliwość na stres oksydacyjny wywoływany przez wolne rodniki i reaktywne formy tlenu (RFT) (Lautier i inni 1992).

Znane są jednak komórki, które w reakcji na stres oksydacyjny reagują nie spadkiem, lecz przeciwnie, wzrostem ilości GSH. Dla przykładu taką sytuację obserwuje się w hodowlach komórek nabłonkowych z tętnic płucnych bydła (Deneke i Fanburg 1989) i w kulturach komórek V79 chomika chińskiego (Ochi 1988).

Nie bez znaczenia jest również fakt, że antyoksydacyjne właściwości GSH czasami mogą prowadzić do uszkodzenia komórek. Dzieje się tak wtedy, kiedy komórki ekspozycja na długotrwałe działanie  $\text{H}_2\text{O}_2$  i/albo  $\bullet\text{OH}$ . W takiej sytuacji w komórkach dochodzi do akumulacji glutationu utlenionego (GSSG), który może inaktywować niektóre enzymy, np. cyklazę adenylową, poprzez formowanie mieszanych dwusiarczków białkowych. Jest interesującym faktem, że pomimo tego – dwusiarczkom tym przypisuje się także pewną pozytywną rolę w regulowaniu niektórych funkcji komórki, przez ich wpływ na aktywność enzymów. W ten sposób, np. jest regulowana aktywność niektórych hormonów peptydowych, głównie tych, które uczestniczą w ochronie komórki przed stresem oksydacyjnym (Brigelius 1985; Kosower i Kosower 1976; 1978).

GSH ma także odgrywać ważną rolę w funkcjach immunologicznych, np. w aktywacji limfocytów i ich cytotoksyczności (Staal i inni 1993). Sądzi się tak głównie na podstawie wpływu GSH na wirusa HIV. W czasie zakażenia tym wirusem obniża się koncentracja GSH w osoczu krwi (Staal i inni 1990; 1993). Ponieważ grupy -SH glutationu odgrywają ważną rolę w funkcjonowaniu limfocytów i regulacji czynników transkrypcyjnych, takich jak NF<sub>κ</sub>B, to obniżenie się koncentracji grup -SH może przyczynić się do postępu choroby. I rzeczywiście, infekcja HIV w zakażonych komórkach ulega zahamowaniu w warunkach wzrostu koncentracji sulfhydryli (Mihm i inni 1991). Wyraźnie potwierdzają to ostatnie badania Palamara i innych (1996), w których wykazano, że bezpośrednio podanie GSH w pierwszych tygodniach zakażenia wirusem HIV powoduje wyraźny regres choroby. Ponadto badania te sugerują, że obniżenie koncentracji GSH w płynach komórkowych w czasie infekcji HIV jest spowodowane nie przez wzrost utylizacji GSH, lecz raczej przez obniżenie tempa jego syntezy.

Od niedawna nieśmiało mówi się także o roli GSH jako neurotransmitera, dzięki czemu ma on wpływać na neuronalną aktywność mózgu (Shaw i inni 1996).

Koniuganty GSH i GSSG są też ważnymi biomarkerami natury chemicznej. Wskazują one na obecność czynnika toksycznego w organizmie. Mogą także określać naturę interakcji toksykantów z docelowymi strukturami komórkowymi (Smith i inni 1996).

Poza niewątpliwie korzystnym wpływem GSH na organizm, to jednak w niektórych sytuacjach jego wysoki poziom czyni chore tkanki opornymi na leki. Aby więc terapia była skuteczniejsza, celowo obniża się ilość GSH. Obniżenie ilości GSH od 50 do 70% czyni dopiero, np. komórki nowotworowe, bardziej wrażliwymi na podawane leki przeciwnowotworowe, np. cisplatynę (Bier i inni 1996).

# 1. Założenia i cel pracy

Dla porównania, czy antyoksydacyjne funkcje glutationu u płazów, zwierząt poikilotermicznych przebiegają podobnie jak u ssaków, zastosowano niektóre czynniki eksperymentalne (temperaturę, insulinę, ester monoetylowy glutationu, allopurynol, promieniowanie UVA, długość ciała, kwas L-2-oksotiazolidyno-4-karboksyłowy, witaminę E i etanol), które u tych ostatnich zawsze zmieniają poziom GSH i GSSG.

Wydaje się, że rozwiązanie tak postawionego problemu, mianowicie ewentualnych zmian w statusie glutationu, pod wpływem powyższych czynników chemicznych i fizycznych i to w tak ważnych narządach, jak mózg, wątroba, serce lub nerki, które w naturalnych warunkach u płazów funkcjonują także w niskiej temperaturze – może sugerować pewien aspekt praktyczny. Coraz częściej bowiem dokonuje się transplantacji narządów, które przechowuje się w niskiej temperaturze i w mediach o odpowiednim składzie. Do tej pory szuka się najbardziej optymalnego składu tych mediów. Jest to niezwykle ważne, gdyż komórki przeszczepianych narządów, poza składnikami energetycznymi, muszą także mieć zapewnioną efektywną ochronę antyoksydacyjną przeciwdziałającą RFT i w ostateczności minimalizującą stres oksydacyjny (Lemasters i Thurman 1997). Być może w odpowiednio niskich temperaturach zapewnia ją glutation.

## 1.1. Temperatura

Zwierzętom zmiennocieplnym warunki życia dyktuje temperatura otoczenia. Gdy jest wysoka, ich procesy metaboliczne są intensywne,

a obniżają swoje tempo wraz z ochłodzeniem. Zima jest więc dla tych zwierząt najtrudniejszym okresem w ciągu roku. Biologom zajmującym się fizjologią tych zwierząt zawsze nasuwa się pytanie, czy natura pozostawiła je zupełnie bezbronnymi?

Okazuje się, że nie, gdyż gdy temperatura spada poniżej 4°C można je znaleźć na dnie stawów lub rzek, gdzie nie zamarzają. Głęboko pod ziemią zimują ropuchy, salamandry i węże. Niektóre gatunki, np. *R. sylvatica* tolerują nawet zamarzanie. Inne, np. żółw malowany potrafi przeżyć bez wyraźnych oznak oddychania kilka miesięcy. Żyją zatem w głębokim niedotlenieniu. Przyjmuje się powszechnie, że w okresie zimowania, w skrajnych warunkach temperaturowych, płazy przystosowały się do życia w niedotlenieniu, bez składników odżywczych, a także pomimo rosnącego stężenia szkodliwych produktów przemiany materii. Energię niezbędną do podtrzymania swoich procesów życiowych czerpią z fermentacji glikogenu lub glukozy. Gdy temperatura spada poniżej zera, glukoza ma także kontrolować powstawanie kryształków lodu w komórkach. Słusznie sądzi się, że płazy są mistrzami przetrwania.

Z wielu powodów okres zimowy jest szczególnie interesujący w życiu płazów. Jednym z nich jest fakt, że w tym czasie dochodzi do redukcji metabolizmu płazów (Whitford 1969). Redukcja ta jest spowodowana przez:

- zmianę aktywności enzymów/białek w wyniku postranslacyjnych modyfikacji, fosforylacji białek albo reakcji defosforylacyjnych,
- zmianę w subkomórkowej lokalizacji enzymów w wyniku innego związania się ze strukturami komórkowymi,
- zmianę w regulacji tempa glikolizy, kontrolowaną przez fosfofruktokinazę.

Odretwienie zimowe jest interesujące, gdyż pozwala sformułować pytanie o biochemiczny starter inicjujący obniżenie się metabolizmu. Pytanie to pozostaje na razie bez odpowiedzi. Proponuje się, że zmiany pH mogą być tym sygnałem, gdyż obniżonemu metabolizmowi towarzyszy znaczne zakwaszenie płynów ciała (Busa i Nuccitelli 1984; Hochachka i Guppy 1987). Nie wiadomo jednak czy zakwaszenie jest konsekwencją hibernacji czy jej przyczyną. Oeltgen i inni (1982) zaproponowali, że opioidy także mogą być starterem spadku metabolizmu. Ich ilość gwałtownie wzrasta w tym czasie u *Bufo marinus*.

W okresie zimy stwierdza się obniżenie nie tylko aktywności całego organizmu płaza, ale także aktywności wielu narządów. Zmniejsza się np. ciężar przewodu pokarmowego, wątroby i ciał tłuszczowych. Degeneracji ulegają również komórki nabłonkowe przewodu pokarmowego.

W przypadku płazów zimujących w wodzie wymiana gazowa zachodzi wyłącznie przez skórę. Generalnie więc ulegają zahamowaniu wegetatywne funkcje organizmu. Należy podkreślić, że pomimo niskich temperatur w czasie hibernacji następuje jednak ostateczny rozwój narządów generatywnych. U samic dojrzewają oocyty w jajnikach i wzrasta ciężar jajowodów. U samców tworzą się modzele godowe i dojrzewają plemniki.

Temperatura otoczenia jest ważnym czynnikiem, który wpływa na poziom GSH u zwierząt poikilotermicznych. Generalnie u tych zwierząt wzrasta tempo syntezy GSH w wyższej temperaturze. U *R. temporaria* L. wykazano, że ilość GSH osiąga maksymalne wartości w mózgu, wątrobie, nerkach i krwi w okresie życia aktywnego na lądzie, a najniższe w tych narządach w okresie zimowania (Dziubek 1985; 1993). Niski poziom GSH u *R. temporaria* L. w okresie zimowania jest pozytywnie skorelowany z niskim tempem metabolizmu (Dziubek 1987a). Wydaje się więc, że antyoksydacyjna ochrona komórek i tkanek przez GSH jest powiązana z innymi ważnymi fizjologicznymi mechanizmami towarzyszącymi odretwieniu zimowemu. Mechanizmy te przez to, że w niskiej temperaturze obniżają oksydacyjny metabolizm mogą także minimalizować utylizację antyoksydantów i dzięki temu przyczyniać się do utrzymania niezbędnego poziomu GSH w organizmie płaza w tym czasie.

Pomimo wszystko mechanizmy odpowiedzialne za utrzymanie odpowiedniego poziomu GSH u płazów w okresie zimowania nie są znane. Być może, że poza liniową zależnością pomiędzy temperaturą a zawartością GSH (Dziubek 1987b) istnieją jeszcze inne zależności, tak jak w przypadku poziomu witaminy C, której homeostaza, np. u zimujących żółwi w niskich temperaturach, jest regulowana, także przez jej wewnątrzkomórkowe stężenie (Wilson i inni 1990).

Odpowiedni poziom GSH w czasie zimowania żab jest konieczny do usuwania RFT, które pomimo niskiego tempa metabolizmu są generowane w organizmach płazów. RFT muszą być usuwane nie przez enzymy antyoksydacyjne, które są nieaktywne w niskich temperaturach, lecz przez GSH będący nieenzymatycznym antyoksydantem. Dlatego w obec-

nym eksperymencie podjęto próbę określenia zawartości tego trójpeptydu u *R. esculenta* L. w okresie zimy pod wpływem przeniesienia żab do wyższej temperatury wynoszącej 14° C. Obecna praca jest więc kontynuacją wcześniejszych badań przeprowadzonych odnośnie zmian ilości GSH pod wpływem zmian temperatury otoczenia u *R. temporaria* L. (Dziubek 1987; 1993).

Problem ten jest interesujący także i z tego względu, że zawartość GSH i GSSG nie była nigdy badana u *R. esculenta* L. w okresie zimowania.

## 1.2. Insulina

U płazów w okresie jesieni i zimowania obserwuje się wysoki poziom glukozy w porównaniu z okresem życia aktywnego płaza w lecie. Dla przykładu – u żab tolerujących zamarzanie, np. *Rana sylvatica* poziom glukozy w tym okresie waha się od 300-500 mM/l w przeciwieństwie do lata kiedy osiąga wartości 3-5 mM/l. Wartości te są o wiele mniejsze, ale również wysokie u żab nie zamarzających i wahają się od 1-5 mM/l w zimie do 0.2-0.5 mM/l w lecie (Storey i Storey 1985). Tak duży wzrost poziomu glukozy ma chronić narządy płazów przed uszkodzeniami wywołanymi przez powstające kryształki lodu w komórkach i płynach ustrojowych w czasie zamarzania i ma hamować metabolizm w okresie dla nich temperaturowo niekorzystnym, co ułatwia im przetrwanie (Canty i inni 1986; Layne i Romano 1985).

U ssaków z cukrzycą wywołaną eksperymentalnie podaniem streptozotocyny lub alloxanu obserwuje się wzrost ilości wodoronadtlenków lipidowych (Armstrong i Al-Awadi 1991). Ich detoksykacja przebiega przez glutationowy cykl redoksowy. Szybka i skuteczna redukcja tych wodoronadtlenków zależy od skoordynowanego działania peroksydazy glutationowej (GSH-Px), reduktazy disulfidu glutationu (GSSG) i zredukowanego glutationu (GSH), największego reduktanta komórkowego (Chance i inni 1979). Zasadniczym momentem w tym cyklu jest dostępność GSH i jego ciągła regeneracja z GSSG przy udziale NADPH. Reakcję redukcji GSSG przez NADPH katalizuje reduktaza glutationowa. Źródłem NADPH w erytrocytach jest cykl pentozowy, zaś w innych

komórkach, np. hepatocytach dodatkowo reakcja dehydrogenazy izocytrynianowej (Eggleston i Krebs 1974). Na ilość wytwarzanego NADPH ma wpływ koncentracja NADP w komórce, koncentracja dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej i jej aktywność, jak również dostępności glukozy dla komórki. Generalnie od ilości NADPH zależy tempo regeneracji GSH i tym samym tempo eliminacji wodoronadtlenków z organizmu zwierząt dotkniętych cukrzycą (Bousignone i De Flora 1972; Schraufstatter i inni 1985).

Biorąc pod uwagę powyższe dane nasuwa się więc pytanie, czy hiperlikemia poza działaniem ochronnym nie wywołuje dodatkowo w organizmach płazów stresu oksydacyjnego powodowanego przez wodoronadtlenki lipidowe, stresu, który zawsze towarzyszy cukrzycy u ssaków (Kawada 1992). Jeżeli taka sytuacja ma rzeczywiście miejsce u płazów, to powinna się objawiać zmianami w poziomie GSH, głównego antyoksydanta komórkowego. Dlatego też postanowiono określić ilość GSH w mózgu, wątrobie, nerkach i sercu u żaby wodnej, w okresie zimowania w stresie niskiej temperatury i po podaniu insuliny.

### **1.3. Ester monoetylowy glutationu**

Odpowiedni poziom GSH jest bardzo ważny dla komórki, ponieważ od niego zależy jej oporność na stres oksydacyjny (Meister i Anderson 1984; Sies 1993). Podwyższenie stężenia GSH w komórkach zwiększa, a obniżenie zmniejsza ich oporność na działanie wielu ksenobiotyków (Meister i Anderson 1984).

Ilość GSH w komórkach może być doświadczalnie obniżana albo podwyższana przez stosowanie odpowiednich związków chemicznych. I tak synteza GSH jest efektywnie blokowana przez podanie sulfoksyminy butioniny, związku, który selektywnie wiąże się z aktywnym centrum syntetazy  $\gamma$ -glutamylcysteinowej, dzięki czemu blokuje jej aktywność.

Podanie  $\gamma$ -glutamylcysteininy, disulfidu  $\gamma$ -glutamylcysteininy albo  $\gamma$ -glutamylcystyny prowadzi do wzrostu zawartości GSH, głównie jednak w nerkach. Te  $\gamma$ -glutamylaminokwasy są transportowane do wnętrza komórek i tam wykorzystywane do syntezy GSH. Dla wywołania wzrostu ilości GSH podaje się również zredukowany glutation (Meister 1983a).



W tym przypadku wzrost ilości GSH jest jednak nieznaczny. Inna droga prowadząca do efektywnego wzrostu ilości GSH wiedzie przez podanie estrów glutationu (Puri, Meister 1983).

Dotychczasowe badania wpływu estrów glutationu na zawartość GSH prowadzono tylko na ssakach. Dlatego w obecnym eksperymencie postanowiono prześledzić ewentualne zmiany ilości GSH w mózgu, wątrobie, nerkach i sercu u *R. esculenta* L., w okresie zimowania, po podaniu estru monoetylowego glutationu.

## 1.4. Allopurynol

Ekspozycja żab na niskie temperatury otoczenia w okresie zimowania wywołuje spadek aktywności metabolicznej, co wiąże się ze zmniejszonym zapotrzebowaniem organizmów płazów na tlen (Bradford 1983). Przypuszcza się, że pomimo zmniejszonego zapotrzebowania na tlen, tkanki żaby w tym okresie są niedotlenione. To niedotlenienie może być spowodowane zniesieniem wentylacji płuc z powodu wypełnienia dróg oddechowych i pęcherzyków płucnych wodą. Nie jest wykluczone, że niedostateczne zaopatrzenie komórek w tlen może też być spowodowane zahamowaniem wymiany  $O_2$  między pęcherzykami płucnymi a krwią, z powodu zmniejszonej perfuzji włosniczek płucnych lub utrudnienia dyfuzji. Objawia się to redukcją aktywności enzymów mitochondrialnych i w konsekwencji spadkiem syntezy białek (Degani i Meltzer 1988).

Podobna sytuacja ma miejsce u ssaków w okresie ischemii i reperfuzji (Corral-Debrinski i inni 1991). U ssaków w okresie niedotlenienia tkanek i w czasie ponownego ich ukrwienia, czyli w reperfuzji powstają RFT. RFT w początkowym okresie indukują antyoksydacyjne systemy komórki, a także związki je zmiatające. Jeżeli jednak przedłuża się okres ischemii, to po następującej po nim reperfuzji obserwuje się uszkodzenia wywoływane przez RFT, głównie w wątrobie, nerkach i mięśniu sercowym. Bowiem RFT reagują z cząsteczkami komórkowymi, np. lipidami, białkami i kwasami nukleinowymi, powodując ich utlenienie. Ilość generowanych RFT jest skorelowana z występującym zakresem uszkodzeń komórek. Aby przeciwdziałać tym uszkodzeniom, podaje się syntetyczne antyoksydanty (Müller i inni 1985), a także allopurynol (Baker i inni 1985; Stewart i inni 1985; Garcia i inni 1990).

Jeżeli rzeczywiście w okresie zimowania u żaby wodnej występuje niedotlenienie tkanek, pomimo zmniejszonego zapotrzebowania jej organizmu na tlen, to należałoby przypuszczać, że będzie to objawiać się, między innymi spadkiem poziomu GSH, niskocząsteczkowego związku tiolowego zmiatającego wolne rodniki i RFT (Moutiez i inni 1997).

W związku z powyższym wydawało się interesującym zbadanie zawartości GSH u żab przebywających w okresie zimowania oraz po przezwaniu tego okresu stresem podwyższonej temperatury i pod wpływem allopurynolu, inhibitora oksydazy ksantynowej, będącego jednocześnie antyoksydantem (Moorhouse i inni 1987) – w wątrobie, nerkach i mięśni sercowym żaby wodnej. Bowiem w tych narządach w okresie ischemii i reperfuzji obserwuje się u ssaków największe uszkodzenia wywołane przez RFT.

## 1.5. Promieniowanie UVA

GSH jest wciągany w wiele ochronnych funkcji w komórce, między innymi w detoksykację ksenobiotyków i ochronę przed stresem oksydacyjnym (Meister i Andersen 1984; Kraner i inni 1988).

Do początku lat 80. sądzono, że ekspozycja skóry na ultrafiolet A (320-400 nm) nie jest szkodliwa. Między innymi dlatego ten typ promieniowania stosowano w fototerapii. Okazało się jednak, że UVA, podobnie jak UVC i UVB wywołuje reakcje fotochemiczne: utlenianie, redukcję, rozkład i polimeryzację. Co więcej jest absorbowane przez kwasy nukleinowe, wyraźnie zaburza przemianę materii w komórce i może spowodować jej zniszczenie. Ponadto w przeciwieństwie do UVB promieniowanie UVA pokonuje barierę naskórka i przenika głębiej (Peak i Peak 1989; Black 1987).

Ekspozycja organizmu na promieniowanie UV powoduje w początkowym okresie reakcje zapalne, a w dalszej kolejności jest przyczyną powstawania nowotworów skóry (Ruzicka 1988; Punnonen i inni 1987). Sądzi się, że jest to spowodowane przez RFT, które powstają w organizmie pod wpływem promieni UVA. RFT wywołują stres oksydacyjny i uszkodzają lipidy, białka i kwasy nukleinowe komórek. Są one więc bezpośrednią przyczyną powstawania powyższych schorzeń skóry (Danno i inni 1984; Imlay i inni 1988).

Po jednorazowym naświetlaniu ssaków promieniowaniem UV-A i UV-B stwierdzano obniżenie się ilości GSH (Connor i Wheeler 1987; Shindo i inni 1993). Nasuwa się pytanie, czy także u *R. esculenta* L. w okresie zimowania ekspozycja UVA spowoduje wystąpienie stresu oksydacyjnego a w związku z tym spadek ilości GSH i wzrost poziomu GSSG.

## 1.6. Długość ciała żab

Coraz częściej sugeruje się, że zawartość GSH w komórkach ssaków obniża się wraz z wiekiem, podczas kiedy GSSG i/albo stosunek GSSG:GSH wzrasta (Faraooqui i inni 1987; Teramoto i inni 1994; Iantomasi i inni 1993; Sohal i Allen 1990). Uzyskano też dane kontrowersyjne sugerujące, że poziom GSH wzrasta podczas procesów starzenia się (Fischer-Nielsen i inni 1989). Nokata i inni (1996) uważają, że np. u starych myszy obniża się poziom GSH, ale nie zmienia się ilość GSSG.

Jest interesującym faktem, że u *Rana perezi* w wątrobie i nerkach López-Torres (1993a i b) nie wykazała wyraźnej korelacji między ilością GSH a wiekiem żab, który to wiek korelowała z długością ciała.

W związku z powyższym nasuwa się pytanie, czy także u *R. esculenta* L. nie ma podobnej korelacji między statusem glutationu a długością ciała badanych żab w okresie zimowania.

## 1.7. Kwas L-2-oksotiazolidyno-4-karboksyłowy (OTC)

Status GSH w komórce zależy w dużej mierze od dostępności budujących go substratów, głównie cysteiny, która jest aminokwasem limitującym syntezę GSH. Substraty te przenikają do komórek na zasadzie dyfuzji, bądź drogą kotransportu z kationami sodowymi, dzięki specyficznym przenośnikom aminokwasów i dipeptydów (Meister 1984). Dzięki temu u ssaków korzystny status GSH osiągnano przez podawanie prekursora cysteiny kwasu L-2-oksotiazolidyno-4-karboksyłowego. Prekursor ten jest aktywnie transportowany do komórek i tam przekształcany przez

5-oksoprolinazę do cysteiny (Kalyjian i inni 1994). Jest interesującym faktem, że wzrost ten obserwuje się tylko w zdrowych tkankach, nigdy np. nowotworowych (Rush i inni 1971; Rouse i inni 1995). Jest to spowodowane prawdopodobnie tym, że w tkankach nowotworowych jest zahamowana aktywność oksoprolinazy, enzymu przekształcającego OTC do S-carboxy-L-cysteiny (Williamson i Meister 1981).

Do tej pory nie badano wpływu OTC na zmiany ilości GSH i GSSG u płazów. Dlatego też postanowiono takie badania przeprowadzić u *R. esculenta* L. i to w okresie odrętwienia zimowego. *R. esculenta* jest dobrym obiektem do tego typu badań, gdyż w tym okresie nie odżywia się i przebywa w niskiej temperaturze wody. W tej temperaturze otoczenia ulega zahamowaniu aktywność enzymatyczna (Jackson 1978). Zachodzi więc pytanie, czy także aktywność oksoprolinazy, enzymu przekształcającego OTC do S-carboxy-L-cysteiny? Jeżeli tak, to należałoby się spodziewać braku wpływu OTC na poziom GSH i GSSG u *R. esculenta* L. w tym czasie.

## 1.8. Witamina E

W początkowym etapie peroksydacji lipidów powstające wolne rodniki są zmiatane przez witaminę E. Jest to ważne, ponieważ powstające podczas peroksydacji nienasyconych kwasów tłuszczowych toksyczne aldehydy (lipidowe wodoroponadtlenki, LOOH) mogą inicjować zmiany w DNA, głównie w guaninie (Nakayama i inni 1984). Potwierdzeniem tego są między innymi badania Summerfielda i Tappela (1984), którzy wykazali, że jeżeli szczury karmiono pokarmem bogatym w wielonienasycone kwasy tłuszczowe, to duże dawki witaminy E (30 mg/dobę) chroniły ich DNA wątrobowy przed oksydacyjnymi uszkodzeniami.

W badaniach na ssakach wykazano, że bardzo ważny jest odpowiedni poziom witaminy E w mięśni sercowym. Mięsień ten bowiem zawiera lipidy zbudowane z kwasów tłuszczowych o najwyższym poziomie nienasylenia. To wyjaśnia, dlaczego lipidy serca są bardziej wrażliwe na oksydacyjne uszkodzenia niż lipidy mięśni szkieletowych w przypadku niedoboru witaminy E (Salminen i inni 1984). W przypadku niedoboru tej witaminy obserwuje się zaburzeniami rytmu pracy serca (Klein 1995).

Podobnie jak w sercu także w erytrocytach witamina E spełnia ważne funkcje antyoksydacyjne (Burton i Joyce 1983). Erytrocyty są szczególnie wrażliwe na oksydacyjne uszkodzenia, ponieważ stale są ekspozowane na wysokie ciśnienie parcjalne tlenu. Także ich membrany są bogate w wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Ponadto erytrocyty zawierają dużą ilość żelaza, które może inicjować peroksydację lipidów. Braki witaminy E są dodatkową przyczyną odkładania się żelaza w tych komórkach. Sądzi się też, że w takiej sytuacji poza wzrostem ilości żelaza wzrasta ilość hemoglobiny i produktów rozpadu hemu, co powoduje hemolizę krwinek czerwonych (Tappel 1962). Witamina E w krwi zapobiega względnie łagodzi skutki peroksydacji lipidów inicjowane przez atak wolnych rodników.

O ważności witaminy E świadczą także badania Salonena i innych (1985), którzy wykazali, że jeżeli w osoczu występuje mało witaminy E i selenu, to 11-krotnie wzrasta śmiertelność u ludzi z powodu nowotworów. Jest to prawdopodobnie spowodowane tym, że witamina E redukuje produkcję N-nitrozowych pochodnych z nitratów i amidów, pochodnych, które indukują rozwój nowotworów piersi, śledziony, żołądka, trzustki, odbytu i pęcherza moczowego (Knekt i inni 1988, Willett i inni 1984; Tsuda i inni 1994). Są to jednak przypuszczenia, gdyż do tej pory dokładny mechanizm antynowotworowego działania witaminy E nie został poznany. Jedno jest pewne, że spożywanie karotenoidów i witaminy E wyraźnie obniża ryzyko choroby nowotworowej (Steinmetz i Potter 1991).

Witamina E działa nie tylko indywidualnie, ale także w kooperacji z witaminą C i  $\beta$ -karotenem. Z tym, że współdziałanie między witaminą E a  $\beta$ -karotenem nie jest tak ewidentne jak pomiędzy witaminą E i witaminą C (Pappalardo i inni 1996). Wszystkie witaminy są zmiataczami wolnych rodników i tłumią peroksydację lipidów (Niki i inni 1995).

Jest niezwykle interesujące, że u zółwi tolerujących anoksję poziom witaminy C jest o około 100% wyższy niż u ssaków. Zjawisko to jest ciekawe i dlatego, że zółwie w porównaniu z ssakami mają niskie tempo metabolizmu oksydacyjnego. Ma to sugerować, że witamina ta jest istotnym antyoksydantem mózgu (Rice i inni 1995).

Nie ma wielu danych literaturowych odnośnie wpływu witaminy E na status dużego antyoksydanta komórkowego jakim jest GSH. Wiadomo tylko, że witamina E może być regenerowana przez rozpuszczalne antyoksydanty, takie jak witamina C i GSH u ssaków (Reddy i inni 1982; Wefers i Sies 1988).

GSH uczestnicząc w reakcjach detoksykacyjnych wciąga w nie witaminę E. Podczas tych interakcji obniża się szybkość peroksydacji w błonach biologicznych i witamina E jest zmieniana do formy utlenionej. Jest ona jednak na powrót regenerowana do witaminy E, przez tzw. czynnik zależny od GSH (*here after as vitamin E regeneration factor*). Dlatego też przy niedoborze GSH zawartość witaminy E w mikrosomach szybko się obniża i wzrasta tempo powstawania reaktywnych substancji kwasu tiobarbiturowego (Franco i Jenkinson 1986).

Biorąc pod uwagę powyższe dane postanowiono prześledzić wpływ witaminy E na poziom GSH i GSSG w sercu, nerkach i wątrobie u *R. esculenta* L. w okresie zimowania, kiedy u tego gatunku w naturalnych warunkach środowiska, bez ingerencji egzogennej stwierdzono małą ilość GSH.

## 1.9. Etanol

Jednym z ważnych czynników, który wpływa na antyoksydacyjną równowagę w komórkach jest etanol. Przypuszcza się, że pobudza gromadzenie tłuszczów, głównie w wątrobie i że wzrost ten można zahamować przez podanie antyoksydantów. Potwierdzono to wykazując wzrost peroksydacji lipidów w homogenatach wątroby po doustnym podaniu etanolu. W związku z tym przyjmuje się, że etanol, albo jego metabolity ulegają autooksydacji, względnie działają jako prooksydanty, redukując poziom komórkowych antyoksydantów (Di Luzio 1963).

Przeciwnego zdania byli Hashimoto i Recknagel (1968), którzy stwierdzali, że podanie pojedynczej dawki etanolu nie powoduje wzrostu poziomu lipidów w mikrosomach wątroby szczurów. W innych badaniach wykazano, że po chronicznym podawaniu etanolu nie obserwuje się wzrostu ilości reaktywnych substancji kwasu tiobarbiturowego (Reid i Slater 1977; Torrielli i inni 1978).

Z powodu tych sprzecznych danych kwestionowano indukcję peroksydacji lipidów przez etanol. Rozwój nowoczesnych metod analitycznych pozwolił jednak wykazać, że podczas metabolizmu etanolu wzrasta w wątrobie tempo peroksydacji lipidów (Müller i Sies 1987), a także, że etanol pobudza w wątrobie szczura produkcję anionorodnika ponadtl-

kowego (Bautista i Spitzer 1992), nadtlenu wodoru (Ekström i Ingelman-Sundberg 1989) i rodników hydroksylowych (Dicker i Cederbaum 1987).

Zgodnie z powyższymi sugestiami należałoby przypuszczać, że pod wpływem etanolu będzie zmieniał się status największego antyoksydanta komórkowego jakim jest GSH. Dla zweryfikowania tego założenia postanowiono określić poziom GSH i GSSG u *R. esculenta* L. w okresie zimowania.

Generalnie w powyższej pracy chodzi więc o uzyskanie odpowiedzi na pytanie, od jakich czynników zależy poziom GSH i GSSG, a także wielkość stresu oksydacyjnego mierzona wartością stosunku GSSG/GSH u *R. esculenta* L. w okresie zimowania. Czy tylko od temperatury i od braku dostępności substratów budujących cząsteczkę GSH, czy także od poziomu glukozy i innych antyoksydantów, czy może od czynników wywołujących stres oksydacyjny?

## 2. Materiał i metody

### 2.1. Zwierzęta

Badania przeprowadzono na 364 dojrzałych płciowo samcach żaby wodnej *Rana esculenta* L., pochodzących bezpośrednio ze środowiska naturalnego z okresu zimowania (styczeń). Płazy w tym czasie są w stanie przypominającym letarg. Ich temperatura ciała tak jak i metabolizm pasywnie obniżają się wraz z postępującym spadkiem temperatury otoczenia. Płazy bowiem nie regulują temperatury ciała na jakimś określonym (nawet bardzo niskim) poziomie, tak jak zwierzęta stałocieplne poprzez przyspieszanie przemian metabolicznych. Mogą jedynie w pewnym stopniu wpłynąć na swoją temperaturę ciała wybierając jakąś cieplejszą kryjówkę. Łowione płazy do badań pochodziły z temperatury 4°C. Do badań wybrano tylko samce, aby wyeliminować ewentualne różnice płciowe w zawartości GSH. Wydaje się to uzasadnione, gdyż nawet u człowieka takie różnice zostały stwierdzone (Flagg i inni 1993). Samce przeznaczone do badań były dojrzałe płciowo i w poszczególnych grupach badawczych dobierano je według odpowiedniej długości ciała i wagi. Część płazów użyta do badań była w pracowni adaptowana do temperatury 14°C przez okres 9 dni. Po zastosowaniu danego czynnika eksperymentalnego u płazów pochodzących z temperatury 4°C i przed ich dekapitacją, płazy były przetrzymywane w chłodni, także w tej samej temperaturze i w warunkach przypominających warunki zimowania w naturze (obecność roślin wodnych, brak światła). Podobnie postępowano z płazami adaptowanymi do temperatury 14°C.



## 2.2. Narządy

Po zastosowaniu danego czynnika eksperymentalnego, płazy były mierzone, ważone, dekapitowane, a narządy pobierane do badań (mózg, wątroba, nerki, mięsień sercowy i skóra) były dokładnie fragmentowane i płukane w oziębionym płynie fizjologicznym (0.6% roztworze NaCl) w celu wypłukania z nich krwi. Tak przygotowane tkanki były przetrzymywane w temperaturze 4° C. Wszystkie oznaczenia wykonywano w dniu pobrania tkanek.

Do badań wybrano mózg, wątrobę, nerki i serce, a więc narządy charakteryzujące się największym tempem metabolizmu w okresie życia aktywnego płazów w okresie lata. Przy wyborze tych narządów do badań wzięto również pod uwagę fakt, że wątroba jest głównym miejscem syntezy GSH w organizmie i przez to także głównym jego eksporterem do innych tkanek, przede wszystkim do nerek, jak również to, że mózg i serce są narządami o największym stopniu utylizacji tlenu w przeliczeniu na gram tkanki. Są więc potencjalnie ważnym źródłem powstawania RFT w organizmie. W przypadku ekspozycji płazów na promieniowanie UVA oznaczenia GSH wykonano także w skórze, gdyż jest ona bezpośrednio narażona na ten typ promieniowania w warunkach naturalnych.

## 2.3. Oznaczenie GSH metodą Ellmana (1959)

Pobrane tkanki po zważeniu homogenizowano w buforze fosforanowym 0.1 M, o pH 7.4 zawierającym 10 mM EDTA. Homogenaty wirowano w temperaturze 4°C przez 15 minut przy 15 000 obr./ na minutę. Tak uzyskany supernatant odbiałczano dodając do 500 µl supernatantu, 500 µl TCA oraz 500 µl EDTA. Mieszaninę tę wstawiano do lodówki na 10 minut do temperatury 4°C i następnie wirowano przez 5 minut przy 5000 obr./na minutę. Oznaczenie przeprowadzono dodając próbki badanych supernatantów do mieszaniny zawierającej 3.2 M bufor TRIS-HCl o pH 8.1 i 10 mM EDTA. Następnie dodawano kwas 5,5-dwutio-dwu (2-nitrobenzoesowy) (DTNB) w 0.05 mM buforze octanowym o pH 5.0. Po upływie 10 minut odczytywano ekstynkcję przy długości fali 412 nm w porównaniu do próby kontrolnej, którą stanowił roztwór zawierający

10% TCA, 10 mM EDTA i 0.1 M bufor fosforanowy o pH 7.4 w stosunku 1:1:1. DTNB reagując z grupami -SH daje żółte zabarwienie od powstającego kwasu nitrobenzoesowego (TNBA).

## **2.4. Oznaczanie GSH i GSSG metodą Matsumoto i innych (1996)**

Pobrane narządy po zważeniu homogenizowano w temperaturze 0°C przez 1 minutę w 2 ml 0.1 M HCl zawierającego 1 mM BAPS (Bathophenanthroline disulfonic acid). Do homogenatu dodawano 170 µl 9.2 M kwasu nadchlorowego i homogenat wirowano przy 17 000 obr./na minutę w temperaturze 4°C przez 15 minut. Supernatant zubożniano 2 ml 2 M K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> i następnie całość wirowano przy 5000 obr./na minutę przez 5 minut.

Dla określenia ilości glutationu zredukowanego, supernatant rozcieńczano 100 razy 125 mM fosforanem sodu o pH 7.5 zawierającym 6.3 mM EDTA. Do 50 µl rozcieńczonego supernatantu dodawano 1 ml mieszaniny zawierającej 0.21 µM NADPH, 0.6 µM DTNB, 125 µmol fosforanu sodu (pH 7.5) i 6.3 µM EDTA. Ekstynkcję mieszaniny mierzono spektrofotometrem MARCEL przy 412 nm.

Dla określenia ilości GSSG, do 20 µl akrylonitrylu (295 mM) dodawano 50 µl supernatantu nie rozcieńczonego i 125 µM fosforanu sodu (pH 8.0) zawierającego 6.3 µM EDTA do objętości 1 ml. Całość inkubowano w temperaturze 25°C przez 10 minut. Po inkubacji mierzono ekstynkcję przy długości fali 412 nm. W procedurze tej akrylonitryl blokuje tiolowe grupy -SH. Zarówno do oznaczania GSH jak i GSSG stosowano odczynniki firmy SIGMA.

## **2.5. Oznaczenie glukozy**

Do probówki odpipetowano roztwór odbiałczający (kwas nadchlorowy 0.66 M/l) i surowicę krwi w stosunku 10 + 1. Mieszaninę tę wirowano przez 15 minut przy 3000 obr./minutę. Tak uzyskany supernatant używano

do oznaczeń stężenia glukozy. W tym celu do 0.05 ml supernatantu dodawano 2.5 ml roztworu roboczego dostarczanego wraz z zestawem diagnostycznym do oznaczania glukozy BIOCHEMTEST EO (Polskie Odczynniki Chemiczne). Po wymieszaniu i pozostawieniu mieszaniny na 20 minut w temperaturze pokojowej, mierzono absorbancję próby badanej względem próby odczynnikowej zawierającej 2.5 ml roztworu roboczego i 0.05 ml roztworu odbiańczającego przy długości fali  $\lambda = 670-680$  nm w kuwecie o grubości warstwy  $d=1$  cm. Pomiary zawsze wykonywano przed upływem 50 minut od momentu dodania roztworu roboczego. W metodzie tej wykorzystuje się fakt, że glukoza pod wpływem oksydazy glukozowej (EC 1.1. 3.4.) utlenia się do kwasu glukonowego z wytworzeniem nadtlenu wodoru. Reakcja przebiega w obecności peroksydazy (EC 1.11.1.7.) i chromogenu {sól sodowa kwasu 2,2' – azyno-dwu-(3-etylo-benzotiazolino-6-sulfonowego)}. Natężenie powstałego zabarwienia jest proporcjonalne do stężenia glukozy w badanej próbce. Stężenie glukozy w badanej surowicy odczytano ze sporządzonej krzywej kalibracyjnej.

## **2.6. Analiza wyników**

Z uzyskanych danych w poszczególnych grupach badawczych wyliczono średnie arytmetyczne oraz odchylenia standardowe. Dla stwierdzenia, czy uzyskane zmiany zawartości glukozy GSH, GSSG oraz wartości stosunku GSSG/GSH pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi a grupami kontrolnymi w poszczególnych eksperymentach i w poszczególnych narządach są statystycznie istotne zastosowano test „t” Studenta Gosseta. Obliczenia wykonano przy pomocy programu komputerowego Statistica, zaś wykresy wykorzystując program Microcal Origin.

## **3. Grupy badawcze – badania wpływu**

### **3.1. Temperatury**

W przeprowadzonych badaniach wpływu insuliny, estru monoetylowego glutationu, allopurynolu. na zawartość GSH, a także wpływu, kwasu L-2-oksotiazolidyno-4-karboksyowego, witaminy E i etanolu na zmiany ilości GSH i GSSG wyróżniano dwie grupy kontrolne, mianowicie grupę kontrolną I, którą zawsze stanowiły płazy pochodzące z temperatury 4°C oraz grupę kontrolną II, płazów adaptowanych do temperatury 14°C.

### **3.2. Insuliny**

Badania przeprowadzono na 50 samcach żaby wodnej w okresie zimowania. Badane żaby były dojrzałe płciowo, a ich długość wynosiła 8 cm. Żaby podzielono na dwie grupy kontrolne (I i II) i trzy grupy doświadczalne. Kontrolę I stanowiły żaby pochodzące z temperatury 4°C, zaś kontrolę II płazy adaptowane do temperatury 14°C. Każda grupa badawcza zawierała po 10 osobników. Żaby pierwszej, drugiej i trzeciej grupy doświadczalnej otrzymywały w iniekcjach jednorazowych do worków limfatycznych insulinę (Polfa) w ilości 10 j.m. na osobnika. Osobniki pierwszej i drugiej grupy doświadczalnej dekapitowano po 12 godz.,

zaś osobniki trzeciej grupy po 24 godzinach od momentu iniekcji insuliny. Ilość GSH oznaczano w mózgu, wątrobie, nerkach i sercu metodą Ellmana (1959), zaś poziom glukozy w surowicy za pomocą standardowego zestawu enzymatycznego BIOCHEM TEST GLUKOZA EO.

### 3.3. Estru monoetylowego glutationu

Badania przeprowadzono na 70 dojrzałych płciowo samcach *R. esculenta* L. o długości ciała 7 cm. Badane płazy podzielono na dwie grupy kontrolne (A, B) i pięć doświadczalnych (I, II, III, IV i V). Osobniki pierwszej grupy kontrolnej (A) i I grupy doświadczalnej pochodziły z temperatury 4°C, zaś osobniki drugiej grupy kontrolnej (B) i osobniki II, III, IV i V grupy doświadczalnej zaadaptowano do temperatury 14°C. Osobnikom grup doświadczalnych podawano jednorazowo ester monoetylowy glutationu (C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S) (Sigma) w dawce 20 mg na jednego osobnika. U osobników I grupy doświadczalnej oznaczano ilość GSH po 12 godz. Zaś u osobników II, III, IV i V grupy doświadczalnej oznaczano ilość GSH odpowiednio po 4, 12, 24 i 48 godz. według metodyki Ellmana (1959).

### 3.4. Allopurynolu

Badania przeprowadzono na 40 samcach żaby wodnej (*Rana esculenta* L.), o długości ciała 7 cm, które były dojrzałe płciowo i pochodziły z okresu zimowania. W celu przeprowadzenia eksperymentu podzielono je na 4 grupy, w tym dwie grupy kontrolne i dwie grupy doświadczalne, po 10 osobników w każdej grupie. Żaby pierwszej grupy kontrolnej (I) pochodziły z temperatury 4°C (temperatura zimowiska). Żaby drugiej grupy kontrolnej (II) po przewiezieniu z terenu do pracowni adaptowano do temperatury 14°C. Płazy tej grupy umieszczono w małej ilości wody, tak aby nie były całkowicie zanurzone i miały bezpośredni dostęp do powietrza. Płazom I grupy doświadczalnej (I), czyli tym, które przebywały w temperaturze 4°C i osobnikom drugiej grupy doświadczalnej (II) przetrzymywanej w temperaturze 14°C podawano jednorazowo dożołądkowo

allopurynol ( $C_5H_4N_4O$ ) (Sigma) w dawce 300 mg/kg masy ciała. Żaby obydwóch grup doświadczalnych dekapitowano po 12 godzinach od momentu podania allopurynolu. U wszystkich badanych płazów oznaczano zawartość glutation zredukowanego (GSH) w wątrobie, nerkach i mięśniu sercowym metodą Ellmana (1959).

### 3.5. Promieniowania UVA

Badania przeprowadzono na 50 dojrzałych płciowo samcach *R. esculenta* L. pochodzących z okresu zimowania, które przed naświetlaniem UVA adaptowano w laboratorium do temperatury 14°C. Badane płazy podzielono na 1 grupę kontrolną i 4 grupy doświadczalne. Płazy grup doświadczalnych I i II naświetlano jednorazowo promieniami UVA lampą (F20T12BLB Damar) emitującą promieniowanie UVA o maksimum długości fali 365 nm przez 70, zaś grupy doświadczalnej III i IV przez 140 minut. Podczas 70 minut ekspozycji na UVA płazy otrzymywały dawkę 4.305 W/cm<sup>2</sup>, a podczas 140 min 8.610 W/cm<sup>2</sup>. Natężenie promieniowania mierzono radiometrem UVX z sensorem UVA (365 nm, Model UVX-36 UP). Po 12 (gr. I i III) i 48 (gr. II i IV) godzinach od momentu ekspozycji na promieniowanie UVA płazy dekapitowano i oznaczano zawartość GSH w mózgu, wątrobie, nerkach i skórze metodą Ellmana (1959).

### 3.6. Długości ciała żab

Do badań użyto 40 samców *R. esculenta* L. pochodzących z okresu zimowania. Do przeprowadzenia badań wpływu długości ciała żab na zawartość GSH i GSSG wybrano okres odrętwienia zimowego. Okres ten jest najbardziej korzystny, gdyż w tym czasie płazy nie pobierają pokarmu, przez co eliminuje się jego ewentualny wpływ na zmiany zawartości GSH i GSSG. Badane żaby podzielono na 4 grupy. Pierwszą grupę stanowiły żaby o długości 5 cm, drugą 6 cm, trzecią 7 cm i czwartą o długości 8 cm. Grupę osobników, które miały długość 5 cm przyjęto za kontrolną. Osobniki o długości 5 cm były niedojrzałe płciowo. W związku z powyższym przyjęto, że są one młodsze od tych, które miały długość

ciała wynoszącą 8 cm i które były dojrzałe płciowo (López-Torres i inni 1993b). W wątrobie, nerkach i mózgu badanych żab oznaczano zawartość GSH i GSSG według metodyki podanej przez Matsumoto i innych (1996).

### **3.7. Kwasu L-2-oksotiazolidyno-4-karboksyłowego**

Badania przeprowadzono na 42 samcach *R. esculenta* L. pochodzących z okresu zimowania o długości ciała 7 cm, co wskazuje na ich dojrzałość płciową. Płazy podzielono na 6 grup, dwie kontrolne (I, II) i 4 doświadczalne (1, 2, 3 i 4). Żaby doświadczalne otrzymywały jednorazowo, dożołądkowo kwas L-2-oksotiazolidyno-4-karboksyłowy ( $C_4H_5NO_3S$ ) (OTC) (Aldrich Chemical Company) w dawce 10 mM/kg. OTC rozpuszczano w buforze fosforanowym o pH 9.0. Kontrolę I stanowiły żaby pochodzące z temperatury 4°C, zaś kontrolę II żaby adaptowane do temperatury 14°C. Żaby pierwszej i drugiej grupy doświadczalnej pochodziły z temperatury 4°C, zaś trzeciej i czwartej z temperatury 14°C. Płazy pierwszej i trzeciej grupy doświadczalnej były dekapitowane po 6 godz. od momentu podania OTC, zaś drugiej i czwartej po 24 godzinach. Po dekapitacji oznaczano ilość GSH i GSSG w mózgu, wątrobie i nerkach metodą Matsumoto i innych (1996).

### **3.8. Witaminy E**

Badania przeprowadzono na 42 samcach *R. esculenta* L. pochodzących z okresu zimowania o długości ciała 7 cm. Płazy podzielono na 6 grup, dwie grupy kontrolne (I, II) i 4 doświadczalne (1, 2, 3 i 4). Żaby grup doświadczalnych otrzymywały jednorazowo, dożołądkowo witaminę E (DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate) (Sigma) w dawce 50 mg/kg. Grupę kontrolną I stanowiły żaby pochodzące z temperatury 4°C, zaś II żaby adaptowane do temperatury 14°C. Żaby pierwszej grupy doświadczalnej były przetrzymywane w temperaturze 4°C i dekapitowano je po 12 godz. od momentu podania witaminy E. Żaby drugiej grupy doświadczalnej dekapitowano po 12 godz., trzeciej po 24 godz., a czwartej po 48 godzin.

nach od momentu podania witaminy E. Płazy grupy 2, 3 i 4 pochodziły z temperatury 14°C. Po dekapitacji oznaczano ilość GSH i GSSG w sercu, wątrobie i nerkach według metody Matsumoto i innych (1996).

### **3.9. Etanolu**

Badania przeprowadzono na 28 samcach *R. esculenta* L. pochodzących z okresu zimowania, o długości ciała 7 cm. Płazy podzielono na 4 grupy, dwie kontrolne (I i II) i dwie doświadczalne. Żaby grup doświadczalnych otrzymywały jednorazowo, dożołądkowo 40% etanol w dawce 4 g/kg. Grupę kontrolną I stanowiły żaby pochodzące z temperatury 4°C, zaś II żaby adaptowane do temperatury 14°C. Żaby pierwszej grupy doświadczalnej były przetrzymywane w temperaturze 4°C, zaś drugiej w temperaturze 14°C. Płazy grup doświadczalnych były dekapitowane po 12 godz. od momentu podania etanolu. Po dekapitacji oznaczano ilość GSH i GSSG w mózgu, wątrobie i nerkach metodą Matsumoto i innych (1996).



## **4. Wyniki**

### **4.1. Wpływ temperatury na zmiany zawartości glukozy, GSH oraz GSSG**

Wszystkie dane liczbowe dotyczące wpływu zmian temperatury na poziom glukozy w surowicy krwi zestawiono w *Tabeli 2*, na zmiany zawartości GSH i GSSG w *Tabeli 1, 3, 4, 9, 12 i 15*, natomiast wartości stosunku GSSG/GSH w *Tabeli 11, 14 i 17* oraz zilustrowano *Fig. 1, 3, 4* oraz *Fig. 9 - 17*.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że zaadaptowanie badanych żab do wyższej temperatury (14°C) nie wpływa istotnie na zmiany poziomu glukozy w surowicy krwi. Porównując uzyskaną zawartość GSH i GSSG oraz stosunek GSSG/GSH w badanych narządach zawsze wykazywano statystycznie istotny wzrost zawartości GSH u płazów pochodzących z temperatury 14°C, statystycznie istotny spadek ilości GSSG oraz znamienne statystyczny spadek stosunku GSSG/GSH w porównaniu z płazami pochodzącymi z temperatury 4°C.

### **4.2. Wpływ insuliny na zawartość glukozy w surowicy krwi oraz GSH**

Wszystkie dane liczbowe zebrano w *Tabelach 1-2*. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono stosunkowo wysoki poziom glukozy

w surowicy krwi oraz niską zawartość GSH w mózgu (Fig. 1), wątrobie, sercu i nerkach żaby wodnej zimującej w temperaturze 4°C. Po podaniu insuliny płazom w tej grupie doświadczalnej zawartość glukozy oraz GSH w badanych tkankach po 12 godzinach nie uległa wyraźnej zmianie. Natomiast podanie insuliny płazom adaptowanym do temperatury 14°C spowodowało statystycznie istotny spadek zawartości glukozy oraz wzrost zawartości GSH, także po 12 godzinach od momentu iniekcji insuliny. We wszystkich badanych narządach po 24 godzinach od momentu podania insuliny poziom glukozy (Fig. 1) i GSH powrócił do wartości zbliżonych w kontroli.

Tabela 1

Zmiany poziomu glutationu zredukowanego (GSH) w **mózgu, wątrobie, nerkach i sercu** *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego po jednorazowym podaniu insuliny

Grupy badawcze	Tkanki			
	Mózg (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Wątroba (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Nerki (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Serce (GSH w $\mu\text{M/g}$ )
<b>Kontrola I (4°C)</b>	<b>0.8660</b> $\pm 0.0441$	<b>1.0488</b> $\pm 0.0595$	<b>1.1971</b> $\pm 0.0561$	<b>0.4699</b> $\pm 0.0575$
Gr. I (GSH po 12 godz.)	0.8747 $\pm 0.0466$	1.0747 $\pm 0.0966$	1.2354 $\pm 0.0708$	0.4936 $\pm 0.0394$
<b>Kontrola II (14°C)</b>	<b>1.0366</b> $\pm 0.0973^*$	<b>1.2840</b> $\pm 0.0451^*$	<b>1.4366</b> $\pm 0.0446^*$	<b>0.6496</b> $\pm 0.0503^*$
Gr. II (GSH po 12 godz.)	1.5676 $\pm 0.0446^*$	1.5946 $\pm 0.0117^*$	1.7822 $\pm 0.0618^*$	0.9802 $\pm 0.0587^*$
Gr. III (GSH po 24 godz.)	1.1105 $\pm 0.0490$	1.3015 $\pm 0.0164$	1.4116 $\pm 0.0284$	0.7224 $\pm 0.0387$

- \* statystycznie istotne przy  $P. \leq 0.001$  (Porównywano Gr. I z kontrolą I i Gr. II i III z kontrolą II, a także kontrolę II z kontrolą I, każda grupa zawierała po 10 osobników)

Zmiany ilości glukozy w **surowicy krwi** *R. esculenta* L.  
w okresie odrętwienia zimowego po jednorazowym podaniu insuliny

Grupy badawcza	Średnia ilość glukozy w mM/l
<b>Kontrola I (4°C)</b>	<b>4.6805</b> <b>±0.1396</b>
Gr. I (insulina - glukoza po 12 godz.)	4.5701 ±0.0820
<b>Kontrola II (14°C)</b>	<b>4.5763</b> <b>±0.0902</b>
Gr. II (insulina - glukoza po 12 godz.)	2.8304 ±0.0800*
Gr. III (insulina - glukoza po 24 godz.)	4.3438 ±0.1502

\* statystycznie istotne przy  $P \leq 0.001$  (Porównywano Gr. I z kontrolą I i Gr. II i III z kontrolą II, a także kontrolę II z kontrolą I, każda grupa zawierała po 10 osobników)

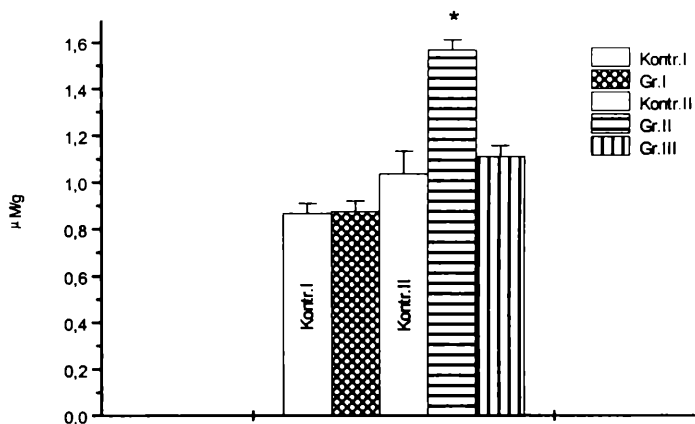


Fig. 1. Zmiany ilości GSH w **mózgu** *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego po podaniu insuliny. Oznaczenia: Kontrola I – płazy z temperatury 4°C, Kontrola II – płazy pochodzący z temperatury 14°C, I i II grupa – podawano jednorazowo insulinę i oznaczano GSH po 12 godz., III grupa – podawano jednorazowo insulinę i oznaczano GSH po 24 godz.

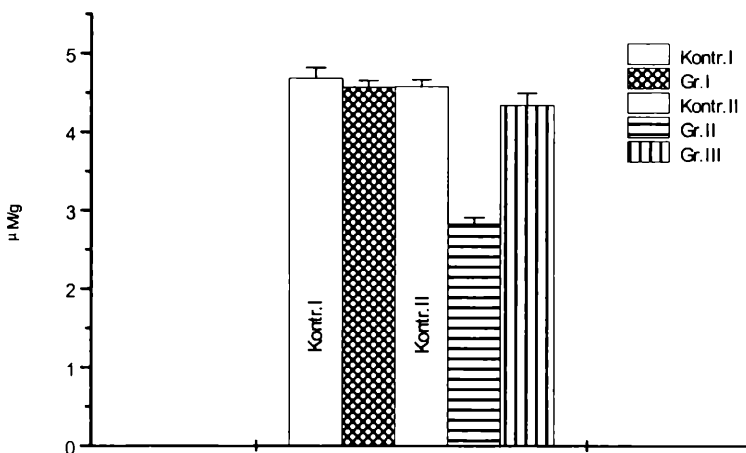


Fig. 2. Zmiany ilości glukozy w surowicy krwi *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego po podaniu insuliny. Oznaczenia jak pod Fig. 1

### 4.3. Wpływ estru monoetylowego glutationu na zawartość GSH

Uzyskane dane przedstawiono w Tabeli 3. U płazów przetrzymywanych w temperaturze 4°C po jednorazowym podaniu estru monoetylowego glutationu nie stwierdzono zmian ilości GSH w w porównaniu z kontrolą. Natomiast u osobników adaptowanych do temperatury 14°C po podaniu estru monoetylowego glutationu stwierdzono statystycznie istotny wzrost zawartości GSH w wątrobie po 12 i 24 godz., nerkach i w sercu po 4, 12 i 24 godz. (Fig. 3), a w mózgu tylko po 12 godz. od momentu podania estru monoetylowego glutationu. We wszystkich badanych narządach w tej temperaturze, stwierdzone zmiany ilości GSH po 48 godzinach od momentu podania estru monoetylowego glutationu powróciły do wartości zbliżonych do kontroli.

Zmiany poziomu glutationu zredukowanego (GSH) w **mózgu, wątrobie, nerkach i sercu** *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego po jednorazowym podaniu estru monoetylowego glutationu

Grupy badawcze	Tkanki			
	Mózg (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Wątroba (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Nerki (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Serce (GSH w $\mu\text{M/g}$ )
<b>Kontrola A (4°C)</b>	<b>0.9460</b> $\pm 0.3111$	<b>1.2996</b> $\pm 0.0769$	<b>1.4435</b> $\pm 0.0322$	<b>0.6609</b> $\pm 0.0406$
Gr. I (GSH po 12 godz.)	1.1515 $\pm 0.1020$	1.3649 $\pm 0.0427$	1.4693 $\pm 0.0427$	0.7328 $\pm 0.0328$
<b>Kontrola B (14°C)</b>	<b>1.4998</b> $\pm 0.0685^*$	<b>1.6143</b> $\pm 0.0466^*$	<b>1.6059</b> $\pm 0.0163^*$	<b>0.8261</b> $\pm 0.0301^*$
Gr. II (GSH po 4 godz.)	1.5745 $\pm 0.0389$	1.6573 $\pm 0.0486$	1.6765 $\pm 0.0344^*$	1.2267 $\pm 0.0372^*$
Gr. III (GSH po 12 godz.)	1.7629 $\pm 0.0570^*$	1.8273 $\pm 0.0472^*$	1.7136 $\pm 0.0236^*$	1.2815 $\pm 0.0370^*$
Gr. IV (GSH po 24 godz.)	1.4805 $\pm 0.0510$	1.8786 $\pm 0.0399^*$	2.1922 $\pm 0.0111^*$	1.4443 $\pm 0.0502^*$
Gr. V (GSH po 48 godz.)	1.4473 $\pm 0.0616$	1.6055 $\pm 0.0304$	1.6037 $\pm 0.0204$	0.8529 $\pm 0.0433$

\* statystycznie istotne przy  $P \leq 0.001$  (Porównywano Gr. I z kontrolą A, Gr. II, III, IV i V z kontrolą B oraz kontrolę B z kontrolą A, każda grupa zawierała po 10 osobników)

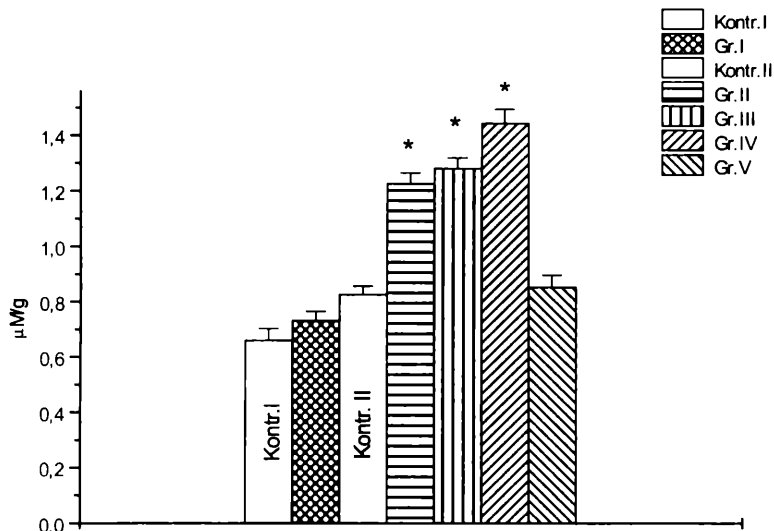


Fig. 3. Zmiany ilości GSH w sercu *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego po podaniu estru monoetylowego glutationu. Oznaczenia: Kontrola A – 4°C, Grupa I – oznaczano GSH po 12 godz., Kontrola B – 14°C, Grupa II – GSH oznaczano po 4 godz., Grupa III – GSH oznaczano po 12 godz., Grupa IV – GSH oznaczano po 24 godz., Grupa V – GSH oznaczano po 48 godz. od podania estru monoetylowego glutationu

#### 4.4. Wpływ allopurynolu na zawartość GSH

Wszystkie dane liczbowe zestawiono w *Tabeli 4*. W wyniku przeprowadzonych badań, stwierdzono statystycznie istotny wzrost zawartości GSH w sercu (*Fig. 4*), wątrobie i nerkach u żab adaptowanych do temperatury 14°C (Kontrola II) w porównaniu z płazami pochodzącymi z temperatury 4°C (Kontrola I). Podanie allopurynolu żabom w okresie odrętwienia zimowego przebywającym w temperaturze 4°C nie wywołało statystycznie istotnego wzrostu ilości GSH w badanych narządach. Odwrotnie podanie allopurynolu żabom zaadaptowanym do temperatury 14°C wywołało wysoce statystycznie istotny wzrost zawartości GSH we wszystkich badanych narządach.

Zmiany poziomu glutationu zredukowanego (GSH) w mózgu, wątrobie, nerkach i sercu *R. esculenta* L. w okresie odretwienia zimowego po jednorazowym podaniu allopurynolu

Grupy badawcze	Tkanki		
	Wątroba (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Nerki (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Serce (GSH w $\mu\text{M/g}$ )
<b>Kontrola I (4°C)</b>	<b>1.2518</b> $\pm 0.0790$	<b>1.5349</b> $\pm 0.0493$	<b>0.7502</b> $\pm 0.0435$
Gr. I (GSH po 12 godz.)	1.3079 $\pm 0.0646$	1.5592 $\pm 0.0389$	0.8050 $\pm 0.0479$
<b>Kontrola II (14°C)</b>	<b>1.5626</b> $\pm 0.0613^*$	<b>1.7231</b> $\pm 0.0346^*$	<b>1.1881</b> $\pm 0.0864^*$
Gr. II (GSH po 12 godz.)	1.9941 $\pm 0.1298^*$	2.3469 $\pm 0.1191^*$	1.4546 $\pm 0.0558^*$

\* statystycznie istotne przy  $P \leq 0.001$  (Porównywano Gr. I z kontrolą A, kontrolę B z kontrolą A i Gr. II z kontrolą B, a także kontrolę B z kontrolą A, każda grupa zawierała po 10 osobników)

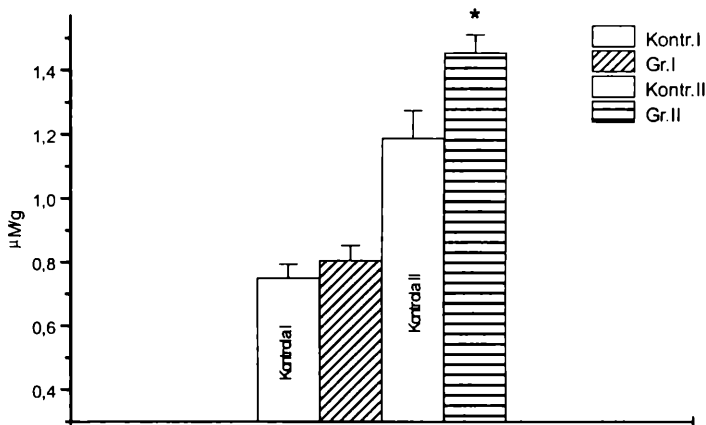


Fig. 4. Zmiany ilości GSH w sercu *R. esculenta* L. w okresie odretwienia: zimowego po podaniu allopurynolu. Oznaczenia: Kontr. I – płazy pochodziły z temperatury 4°C, I gr. – podano allopurynol i GSH oznaczano po 12 godz., Kontr. II – płazy pochodziły z temp. 14°C, II gr. – podano allopurynol i GSH oznaczano po 12 godz.

## 4.5. Wpływ promieniowania UVA na zawartość GSH

Uzyskane dane przedstawiono w *Tabeli 5*. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono znamienne statystyczny spadek ilości GSH w mózgu, nerkach i skórze (*Fig. 5*) w I grupie badawczej, w której płazy były eksponowane na UVA przez 70 min. i u których oznaczano GSH po 12 godz. Dalszy spadek zawartości GSH, ale już we wszystkich badanych narządach, a więc także w wątrobie stwierdzono w III grupie doświadczalnej, w której płazy były eksponowane na UVA przez 140 min. i które także dekapitowano po 12 godz. Zarówno w grupie II jak i IV, a więc po 48 godz. od zakończenia ekspozycji na UVA uzyskane wartości GSH we wszystkich narządach zbliżyły się do wartości kontrolnych.

*Tabela 5*

Zmiany poziomu glutationu zredukowanego (GSH) w **mózgu, wątrobie, nerkach i skórze** *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego pod wpływem promieniowania UVA

Grupy badawcze	Tkanki			
	Mózg (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Wątroba (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Nerki (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Skóra (GSH w $\mu\text{M/g}$ )
<b>Kontrola (14°C)</b>	<b>1.4735</b> $\pm 0.0735$	<b>1.3881</b> $\pm 0.0855$	<b>1.5904</b> $\pm 0.0247$	<b>0.5970</b> $\pm 0.0177$
Gr. I (UVA - 70 min., GSH po 12 godz.)	1.2481 $\pm 0.0706^*$	1.1608 $\pm 0.3087$	1.3845 $\pm 0.0698^*$	0.4939 $\pm 0.0128^*$
Gr. II (UVA - 70 min., GSH po 48 godz.)	1.4444 $\pm 0.0601$	1.3641 $\pm 0.0484$	1.5838 $\pm 0.0630$	0.5965 $\pm 0.0152$
Gr. III (UVA - 140 min., GSH po 12 godz.)	1.1082 $\pm 0.0946^*$	1.0004 $\pm 0.0882^*$	1.1529 $\pm 0.0565^*$	0.3965 $\pm 0.0277^*$
Gr. IV (UVA - 140 min., GSH po 48 godz.)	1.4515 $\pm 0.0536$	1.2342 $\pm 0.0589$	1.5502 $\pm 0.0687$	0.5871 $\pm 0.0303$

\* statystycznie istotne przy  $P \leq 0.001$  (Porównywano Gr. I, II, III i IV z grupą kontrolną, każda grupa zawierała po 10 osobników)



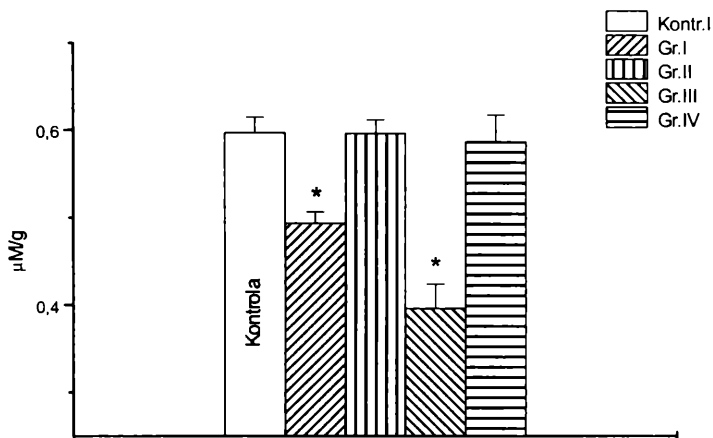


Fig. 5. Zmiany ilości GSH w **skórze** *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego pod wpływem UVA. Oznaczenia: I grupa - UVA przez 70 min. (GSH po 12 godz.), II grupa - UVA przez 70 min. (GSH po 48 godz.), III grupa - UVA przez 140 min. (GSH po 12 godz.), IV grupa - UVA przez 70 min. (GSH po 48 godz.)

#### 4.6. Wpływ długości ciała żab na zawartość GSH oraz GSSG

Uzyskane wyniki przedstawiono w *Tabelach 6-8*. Stwierdzono zmiany ilości GSH i GSSG, a także wartości stosunku GSSG/GSH w mózgu (*Fig. 6-8*), wątrobie i nerkach *R. esculenta* L. w zależności od długości ciała żab. Statystycznie istotny spadek ilości GSH i wzrost zawartości GSSG wykazano w mózgu pomiędzy osobnikami grupy IV, których długość ciała wynosiła 8 cm, a osobnikami przyjętymi za kontrolne o długości ciała 5 cm. W wątrobie zmiany takie uzyskano pomiędzy osobnikami grupy III i IV a grupą kontrolną (5 cm), zaś w nerkach w przypadku GSH pomiędzy osobnikami z grupy II, III i IV, a w przypadku GSSG pomiędzy grupą III i IV a grupą kontrolną.

Porównując zmiany wartości stosunku GSSG/GSH stwierdzono ich statystycznie istotny wzrost we wszystkich badanych narządach w grupie III i IV w porównaniu z grupą kontrolną.

Tabela 6

Zmiany ilości GSH w **mózgu, wątrobie i nerkach** *R. esculenta* L.  
w okresie odrętwienia zimowego w zależności od długości ciała

Grupy badawcze	Tkanki		
	Mózg (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Wątroba (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Nerki (GSH w $\mu\text{M/g}$ )
<b>I gr. (5 cm)</b>	<b>1.3907</b> <b><math>\pm 0.0591</math></b>	<b>1.4372</b> <b><math>\pm 0.0372</math></b>	<b>1.2558</b> <b><math>\pm 0.0686</math></b>
II gr. (6 cm)	1.3121 $\pm 0.0267$	1.3582 $\pm 0.0456$	0.9912 $\pm 0.0831^*$
III gr. (7 cm)	1.1975 $\pm 0.0366$	1.2356 $\pm 0.0373^*$	0.9102 $\pm 0.0206^*$
IV gr. (8 cm)	0.9902 $\pm 0.0584^*$	1.1136 $\pm 0.0194^*$	0.4704 $\pm 0.0639^*$

\* statystycznie istotne przy  $P \leq 0.001$  (Porównywano II, III i IV gr. z I gr. przyjętą za kontrolną, każda grupa badawcza zawierała po 10 osobników).

Tabela 7

Zmiany ilości GSSG w **mózgu** *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego  
w zależności od długości ciała

Grupy badawcze	Tkanki		
	Mózg (GSSG w $\mu\text{M/g}$ )	Wątroba (GSSG w $\mu\text{M/g}$ )	Nerki (GSSG w $\mu\text{M/g}$ )
<b>I gr. (5 cm)</b>	<b>0.0102</b> <b><math>\pm 0.0042</math></b>	<b>0.0122</b> <b><math>\pm 0.013</math></b>	<b>0.0093</b> <b><math>\pm 0.013</math></b>
II gr. (6 cm)	0.0133 $\pm 0.0011$	0.0137 $\pm 0.0005$	0.0113 $\pm 0.0008$
III gr. (7 cm)	0.0169 $\pm 0.0010$	0.0148 $\pm 0.0007^*$	0.0129 $\pm 0.0006^*$
IV gr. (8 cm)	0.0211 $\pm 0.0010^*$	0.0171 $\pm 0.0008^*$	0.0134 $\pm 0.0005^*$

\* statystycznie istotne przy  $P \leq 0.001$  (Porównywano II, III i IV gr. z I gr.)

Zmiany wartości stosunku GSSG/GSH w **mózgu, wątrobie i nerkach** *R. esculenta* L.  
w okresie odrętwienia zimowego w zależności od długości ciała

Grupy badawcze	Mózg GSSG/GSH	Wątroba GSSG/GSH	Nerki GSSG/GSH
I gr. (5 cm)	<b>0.0084</b> <b>±0.0010</b>	<b>0.0085</b> <b>±0.0005</b>	<b>0.0050</b> <b>±0.0008</b>
II gr. (6 cm)	0.0101 ±0.0009	0.0100 ±0.0005	0.0065 ±0.0007
III gr. (7 cm)	0.0141 ±0.0015*	0.0120 ±0.0007*	0.0078 ±0.0002*
IV gr. (8 cm)	0.0211 ±0.0020*	0.0154 ±0.0016*	0.0091 ±0.0006*

\* statystycznie istotne przy  $P \leq 0.001$  (kontrolę stanowiły żaby I gr. o długości 5 cm)

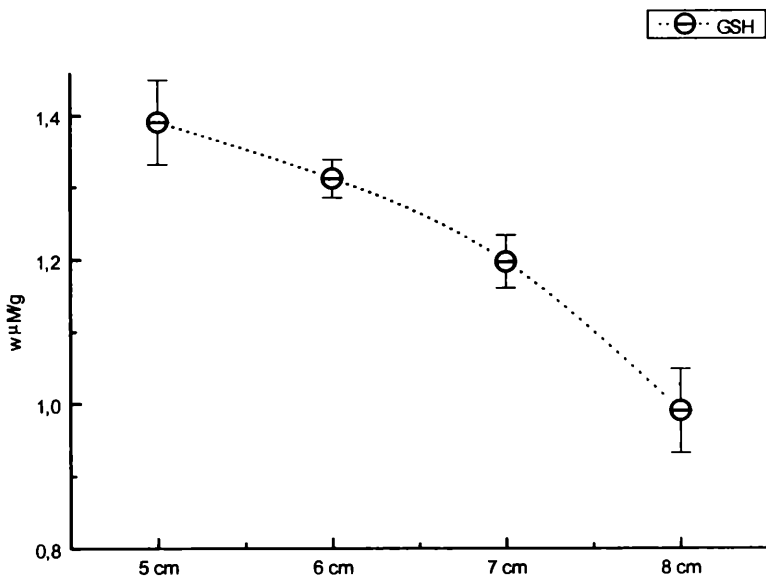


Fig. 6. Zmiany ilości GSH w **mózgu** *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego w zależności od długości ciała

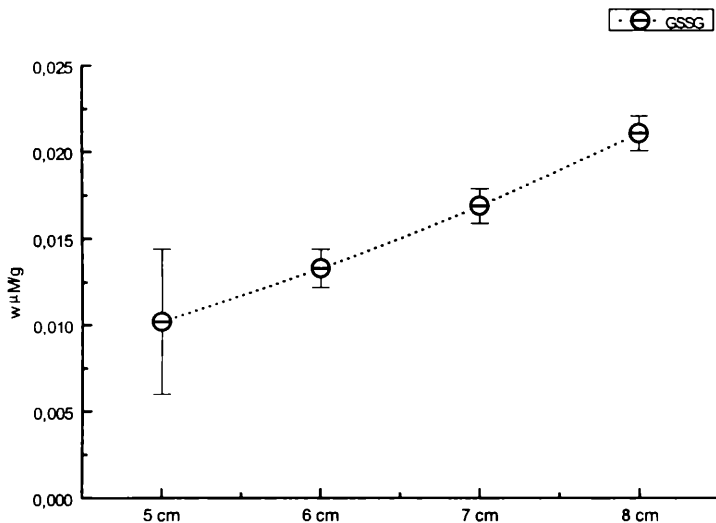


Fig. 7. Zmiany ilości GSSG w mózgu *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego w zależności od długości ciała

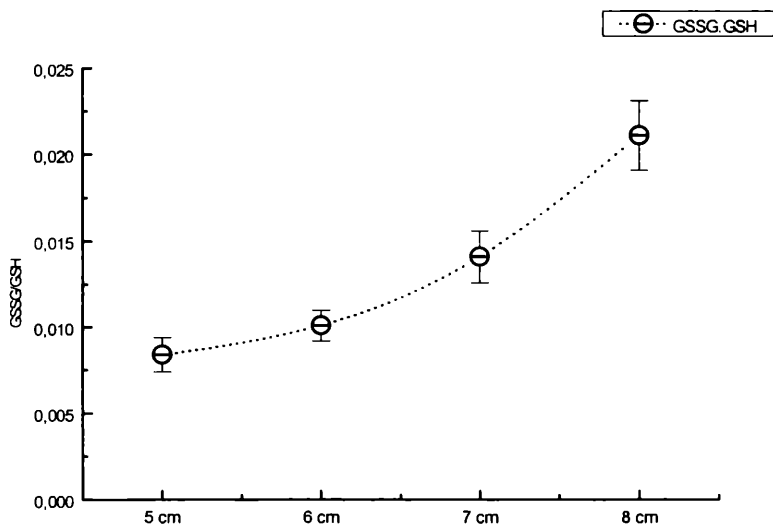


Fig. 8. Zmiany wartości stosunku GSSG/GSH w mózgu *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego w zależności od długości ciała

#### **4.7. Wpływ kwasu L-2-oksotiazolidyno- -4-karboksylowego (OTC) na zawartość GSH oraz GSSG**

Uzyskane wyniki przedstawiono w *Tabelach 9-11*. Podanie OTC płazom pochodzącym z temperatury 4°C nie wpłynęło statystycznie istotnie na zmiany ilości GSH w mózgu, wątrobie i nerkach (*Fig. 9*). Przeciwnie po 6 godz. od momentu podania tego związku płazom adaptowanym do temperatury 14°C stwierdzono statystycznie istotny wzrost ilości GSH we wszystkich badanych narządach. W tej grupie doświadczalnej po 24 godz. od podania OTC uzyskane wartości GSH zbliżyły się do wartości kontrolnych (Kontrola II).

Po 6 godz. od podania OTC płazom pochodzącym z temperatury 4°C stwierdzono znamienne statystyczny spadek ilości GSSG w mózgu i nerkach (*Fig. 10*), podobnie zresztą jak u płazów adaptowanych do temperatury 14°C. U tych płazów stwierdzono także statystycznie istotny spadek ilości GSSG w wątrobie. W obydwóch grupach zwierząt, tj. pochodzących z temperatury 4°C jak i 14°C po 24 godz. od podania OTC wartości GSSG zbliżyły się do wartości uzyskanych u zwierząt kontrolnych.

Podanie OTC spowodowało również spadek wartości stosunku GSSG/GSH we wszystkich badanych narządach (*Fig. 11*) zarówno u zwierząt pochodzących z temperatury 4°C jak i 14°C po 6 godz. od podania OTC.

Tabela 9

Zmiany ilości GSH w **mózgu, wątrobie i nerkach** u *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego po jedorazowym podaniu OTC

Grupy badawcze	Tkanki		
	Mózg (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Wątroba (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Nerki (GSH w $\mu\text{M/g}$ )
<b>Kontrola I (4°C)</b>	<b>0.9985</b> <b><math>\pm 0.0488</math></b>	<b>1.0502</b> <b><math>\pm 0.0401</math></b>	<b>1.2081</b> <b><math>\pm 0.0433</math></b>
Gr. 1 (GSH po 6 godz.)	1.0332 $\pm 0.0704$	1.0830 $\pm 0.0272$	1.2816 $\pm 0.0301$
Gr. 2 (GSH po 24 godz.)	1.0768 $\pm 0.0628$	1.0285 $\pm 0.0653$	1.1656 $\pm 0.0880$
<b>Kontrola II (14°C)</b>	<b>1.5224</b> <b><math>\pm 0.1134^*</math></b>	<b>1.4653</b> <b><math>\pm 0.0731^*</math></b>	<b>1.5519</b> <b><math>\pm 0.0470^*</math></b>
Gr. 3 (GSH po 6 godz.)	2.0757 $\pm 0.0569^*$	1.7587 $\pm 0.0369^*$	2.3193 $\pm 0.1862^*$
Gr. 4 (GSH po 24 godz.)	1.5439 $\pm 0.0675$	1.4432 $\pm 0.0439$	1.5837 $\pm 0.0491$

\* statystycznie istotne przy  $P \leq 0.001$  (Porównywano Gr. 1 i 2 z kontrolą I oraz Gr. 3 i 4 z kontrolą II, a także kontrolę II z kontrolą I, każda grupa badawcza zawierała po 7 osobników)

Tabela 10

Zmiany ilości GSSG w **mózgu, wątrobie i nerkach** u *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego po jedorazowym podaniu OTC

Grupy badawcze	Tkanki		
	Mózg (GSSG w $\mu\text{M/g}$ )	Wątroba (GSSG w $\mu\text{M/g}$ )	Nerki (GSSG w $\mu\text{M/g}$ )
<b>Kontrola I (4° C)</b>	<b>0.0197</b> <b><math>\pm 0.0014</math></b>	<b>0.0124</b> <b><math>\pm 0.0008</math></b>	<b>0.0201</b> <b><math>\pm 0.0010</math></b>
Gr. 1 (GSH po 6 godz.)	0.0137 $\pm 0.0007^*$	0.0114 $\pm 0.0008$	0.0104 $\pm 0.0011^*$
Gr. 2 (GSH po 24 godz.)	0.0188 $\pm 0.0008$	0.0119 $\pm 0.0007$	0.0184 $\pm 0.0009$
<b>Kontrola II (14°C)</b>	<b>0.0145</b> <b><math>\pm 0.0013^*</math></b>	<b>0.0116</b> <b><math>\pm 0.0006</math></b>	<b>0.0123</b> <b><math>\pm 0.0009^*</math></b>
Gr. 3 (GSH po 6 godz.)	0.0098 $\pm 0.00012^*$	0.0101 $\pm 0.0007^*$	0.0086 $\pm 0.0004^*$
Gr. 4 (GSH po 24 godz.)	0.0131 $\pm 0.0005$	0.0112 $\pm 0.0004$	0.0123 $\pm 0.0005$

\* statystycznie istotne przy  $P \leq 0.001$  (Porównywano Gr. 1 i 2 z kontrolą I oraz Gr. 3 i 4 z kontrolą II, a także kontrolę II z kontrolą I, każda grupa zawierała po 7 osobników)

Zmiany wartości stosunku GSSG/GSH w mózgu, wątrobie i nerkach  
*R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego pod wpływem podania OTC

Grupy badawcze	Mózg	Wątroba	Nerki
<b>Kontrola I</b> (4°C)	<b>0.0197</b> <b>±0.0014</b>	<b>0.0118</b> <b>±0.0008</b>	<b>0.0166</b> <b>±0.0013</b>
Gr. 1. OTC (GSH i GSSG po 6 godz.)	0.0132 ±0.0015*	0.0105 ±0.0010*	0.0081 ±0.0009*
Gr. 2. OTC (GSH i GSSG po 24 godz.)	0.0174 ±0.0014	0.0115 ±0.0012	0.0157 ±0.0017
<b>Kontrola II</b> (14°C)	<b>0.0095</b> <b>±0.0008*</b>	<b>0.0079</b> <b>±0.0006*</b>	<b>0.0079</b> <b>±0.0006*</b>
Gr. 3. OTC (GSH i GSSG po 6 godz.)	0.0047 ±0.0008*	0.0057 ±0.0004*	0.0037 ±0.0004*
Gr. 4. OTC (GSH i GSSG po 24 godz.)	0.0084 ±0.0007	0.0077 ±0.0004	0.0077 ±0.0005

\* statystycznie istotne przy  $P. \leq 0.001$  (Porównywano Gr.1 i Gr. 2 z Kontrolą I oraz Gr. 3 i Gr. 4 z kontrolą II, a także kontrolę II z kontrolą I, każda grupa zawierała po 7 osobników)

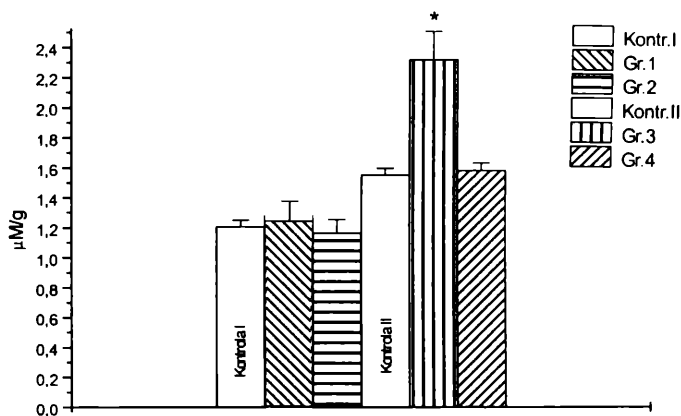


Fig. 9. Zmiany ilości GSH w nerkach *R. esculenta* L. w okresie zimowania pod wpływem podania OTC. Oznaczenia: Kontr. I - płazy pochodzące z temp. 4°C. Gr. 1 - po podaniu OTC oznaczano GSH i GSSG po 6 godz., Gr. 2 - po podaniu OTC oznaczano GSH i GSSG po 24 godz., Kontr. II - płazy adaptowane do temperatury 14°C, Gr. 3 - po podaniu OTC oznaczano GSH i GSSG po 6 godz., Gr. 4 - po podaniu OTC oznaczano GSH i GSSG po 24 godz.

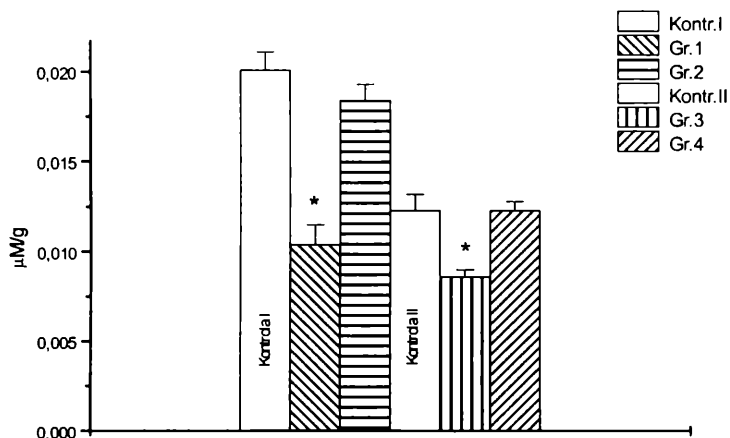


Fig. 10. Zmiany ilości GSSG w **nerkach** *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego po podaniu OTC. Oznaczenia jak pod Fig. 9

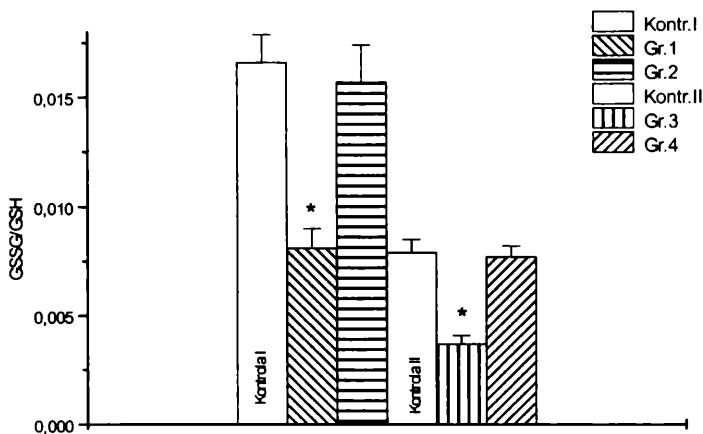


Fig. 11. Zmiany wartości stosunku GSSG/GSH w **nerkach** *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego po podaniu OTC. Oznaczenia jak pod Fig. 9



## 4.8. Wpływ witaminy E na zawartość GSH i GSSG

Zyskane wyniki przedstawiono w *Tabelach 12-14*. W wyniku podania witaminy E płazom pochodzącym z temperatury 4°C nie stwierdzono zmian zawartości GSH w wątrobie (*Fig. 12*), nerkach i mięśniu sercowym. W tej grupie badawczej stwierdzono spadek ilości GSSG w wątrobie (*Fig. 13*) i sercu. Przeciwnie u płazów adaptowanych do temperatury 14°C wykazano, że witamina E powoduje statystycznie istotny wzrost ilości GSH w wątrobie po 12 i 24 godz., zaś w nerkach także po 48 godz. od podania witaminy. W wątrobie i sercu po 48 godz. ilości GSH zbliżyły się do wartości kontrolnych.

Podanie witaminy E płazom adaptowanym do temperatury 14°C poza wzrostem ilości GSH spowodowało statystycznie znamienne spadki ilości GSSG w wątrobie (*Fig. 14*) i sercu po 12 i 24 godz., zaś w nerkach podobnie jak w przypadku GSH także po 48 godz.

Witamina E obniża także wartość tego stosunku GSSG/GSH u zwierząt pochodzących z temperatury 4°C już po 12 godz. we wszystkich badanych narządach. W przypadku zwierząt pochodzących z temperatury 14°C podanie tej witaminy obniżyło wartość tego stosunku w sercu i wątrobie po 12 i 24 godz., zaś w nerkach także jeszcze po 48 godz.

Tabela 12

Zmiany ilości GSH w **wątrobie, nerkach i sercu** *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego po jedorazowym podaniu witaminy E

Grupy badawcze	Tkanki		
	Wątroba (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Nerki (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Serce (GSH w $\mu\text{M/g}$ )
<b>Kontrola I (4°C)</b>	<b>1.3594</b> <b><math>\pm 0.0411</math></b>	<b>1.4093</b> <b><math>\pm 0.0195</math></b>	<b>0.7020</b> <b><math>\pm 0.0175</math></b>
Gr. 1 (GSH po 12 godz.)	1.3789 $\pm 0.0269$	1.4183 $\pm 0.0205$	0.7034 $\pm 0.0260$
<b>Kontrola II (14°C)</b>	<b>1.6354</b> <b><math>\pm 0.0381^*</math></b>	<b>1.6288</b> <b><math>\pm 0.0280^*</math></b>	<b>1.1976</b> <b><math>\pm 0.0398^*</math></b>
Gr. 2 (GSH po 12 godz.)	1.8094 $\pm 0.0232^*$	1.7236 $\pm 0.0207^*$	1.3668 $\pm 0.0353^*$
Gr. 3 (GSH po 24 godz.)	2.1227 $\pm 0.0760^*$	2.1161 $\pm 0.0942^*$	1.4999 $\pm 0.0193^*$
Gr. 4 (GSH po 48 godz.)	1.6242 $\pm 0.0330$	1.7051 $\pm 0.0169$	1.2078 $\pm 0.0320$

\* statystycznie istotne przy  $P \leq 0.001$  (Porównywano Gr. 1 z kontrolą I oraz Gr. 2, 3 i 4 z kontrolą II. Porównano także kontrolę II z kontrolą I, każda grupa zawierała po 7 osobników)

Zmiany ilości GSSG w **wątrobie, nerkach i sercu** *R. esculenta* L.  
w okresie odrętwienia zimowego po jedorazowym podaniu witaminy E

Grupy badawcze	Tkanki		
	Wątroba (GSSG w $\mu\text{M/g}$ )	Nerki (GSSG w $\mu\text{M/g}$ )	Serce (GSSG w $\mu\text{M/g}$ )
<b>Kontrola I (4°C)</b>	<b>0.0292</b> $\pm 0.0015$	<b>0.0215</b> $\pm 0.0014$	<b>0.0250</b> $\pm 0.0012$
Gr. 1 (GSH po 12 godz.)	0.0249 $\pm 0.0016^*$	0.0183 $\pm 0.0014^*$	0.0195 $\pm 0.0011^*$
<b>Kontrola II (14°C)</b>	<b>0.0153</b> $\pm 0.0007^*$	<b>0.0148</b> $\pm 0.0005^*$	<b>0.0164</b> $\pm 0.0009^*$
Gr. 2 (GSH po 12 godz.)	0.0101 $\pm 0.0007^*$	0.0116 $\pm 0.0005^*$	0.0144 $\pm 0.0007$
Gr. 3 (GSH po 24 godz.)	0.0067 $\pm 0.0007^*$	0.0079 $\pm 0.0006^*$	0.0078 $\pm 0.0014^*$
Gr. 4 (GSH po 48 godz.)	0.0152 $\pm 0.0007$	0.0111 $\pm 0.0008^*$	0.0156 $\pm 0.0012$

\* statystycznie istotne przy  $P \leq 0.001$  (Porównywano Gr. 1 z kontrolą I oraz Gr. 2, 3 i 4 z kontrolą II. Porównano także kontrolę II z kontrolą I, każda grupa zawierała po 7 osobników)

Tabela 14

Zmiany wartości stosunku GSSG/GSH w **sercu, wątrobie i nerkach** *R. esculenta* L.  
w okresie odrętwienia zimowego pod wpływem podania witaminy E

Grupy badawcze	Wątroba	Nerki	Serce
<b>Kontrola I 4°C</b>	<b>0.0215</b> $\pm 0.0016$	<b>0.0152</b> $\pm 0.0006$	<b>0.0356</b> $\pm 0.0015$
Gr. 1. Wit. E (GSH i GSSG po 12 godz.)	0.0117 $\pm 0.0008^*$	0.0127 $\pm 0.0007^*$	0.0271 $\pm 0.0022^*$
<b>Kontrola II 14°C</b>	<b>0.0093</b> $\pm 0.0005^*$	<b>0.0091</b> $\pm 0.0001^*$	<b>0.0134</b> $\pm 0.0012^*$
Gr. 2. Wit. E (GSH i GSSG po 12. godz.)	0.0055 $\pm 0.0004^*$	0.0067 $\pm 0.0003^*$	0.0105 $\pm 0.0007^*$
Gr. 3. Wit. E (GSH i GSSG po 24 godz.)	0.0031 $\pm 0.0002^*$	0.0037 $\pm 0.0004^*$	0.0052 $\pm 0.0010^*$
Gr. 4. Wit. E (GSH i GSSG po 48 godz.)	0.0093 $\pm 0.0004$	0.0065 $\pm 0.0005^*$	0.0130 $\pm 0.0009$

\* statystycznie istotne przy  $P \leq 0.001$  (Porównywano Gr. 1 z kontrolą I oraz Gr. 2, 3 i 4 z kontrolą II. Porównano także kontrolę II z kontrolą I, każda grupa zawierała po 7 osobników)

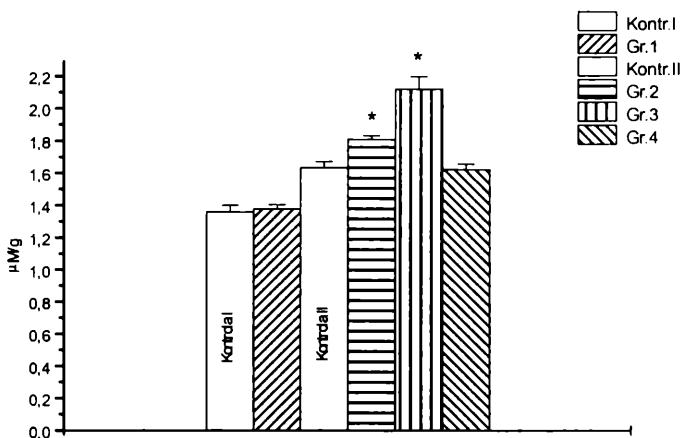


Fig. 12. Zmiany ilości GSH w wątrobie *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego pod wpływem podania witaminy E. Oznaczenia: Kontr. I - płazy pochodziły z temp. 4°C, gr. 1 - płazy dekapitowano po 12 godz., Kontr. II - płazy były adaptowane do temp. 14°C, gr. 2 - płazy dekapitowano po 12 godz., gr. 3 - płazy dekapitowano po 24 godz., gr. 4 - płazy dekapitowano po 48 godz. od momentu podania witaminy E

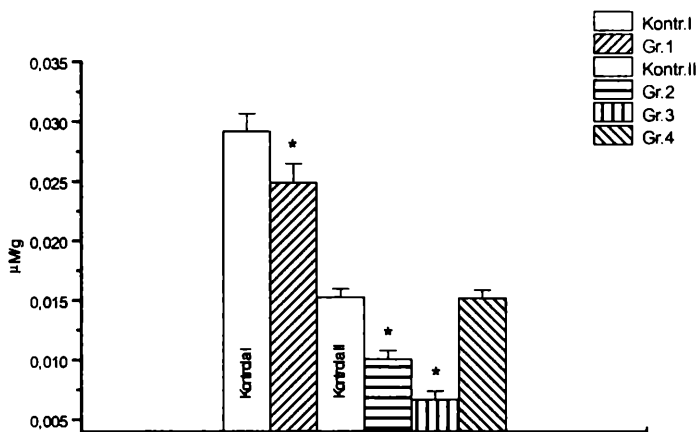


Fig. 13. Zmiany ilości GSSG w wątrobie *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego pod wpływem podania witaminy E. Oznaczenia jak pod Fig. 12

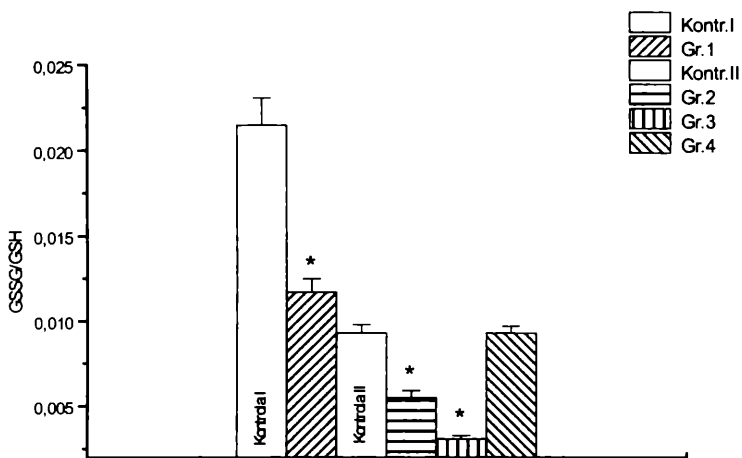


Fig. 14. Zmiany wartości stosunku GSSG/GSH w wątrobie *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego pod wpływem podania witaminy E. Oznaczenia jak pod Fig. 12

## 4. 9. Wpływ etanolu na zawartość GSH oraz GSSG

Uzyskane wyniki przedstawiono w *Tabelach 15-17*. W wyniku przeprowadzonych badań nie stwierdzono wyraźnych zmian zawartości GSH w mózgu, wątrobie (Fig. 15) i nerkach po jednorazowym podaniu etanolu żabom pochodzącym z temperatury 4°C. U tych płazów wykazano natomiast statystycznie znamiennej wzrost ilości GSSG. Przeciwnie u płazów adaptowanych do temperatury 14°C po podaniu etanolu stwierdzono statystycznie istotny spadek ilości GSH w wątrobie (Fig. 16), nerkach i mózgu oraz równoczesny wzrost ilości GSSG we wszystkich badanych narządach.

Zarówno u płazów pochodzących z temperatury 4°C jak i adaptowanych do temperatury 14°C podanie etanolu wywołało statystycznie istotny wzrost wartości stosunku GSSG/GSH w mózgu, wątrobie (Fig. 17) i nerkach *R. esculenta* L.

Zmiany ilości glutationu zredukowanego (GSH) w **mózgu, wątrobie i nerkach**  
*R. esculenta* L. w okresie zimowania po jednorazowym podaniu etanolu

Grupy badawcze	Tkanki		
	Mózg (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Wątroba (GSH w $\mu\text{M/g}$ )	Nerki (GSH w $\mu\text{M/g}$ )
<b>Kontrola I (4°C)</b>	<b>1.0395</b> <b>±0.0622</b>	<b>1.1696</b> <b>±0.0902</b>	<b>1.4656</b> <b>±0.0517</b>
Gr. 1 (GSH po 12 godz.)	1.0624 ±0.0878	1.1163 ±0.0836	1.4396 ±0.0460
<b>Kontrola II (14°C)</b>	<b>1.6402</b> <b>±0.0890*</b>	<b>1.5683</b> <b>±0.0606*</b>	<b>1.7973</b> <b>±0.0550*</b>
Gr. 2 (GSH po 12 godz.)	1.5359 ±0.0228*	1.2440 ±0.0131*	1.5810 ±0.0307*

\* statystycznie istotne przy  $P \leq 0.001$  (Porównywano Gr. 1 z kontrolą I, kontrolę II z kontrolą I oraz Gr. 2 z kontrolą II, każda grupa zawierała po 7 osobników)

Zmiany ilości glutationu utlenionego (GSSG) w **mózgu, wątrobie i nerkach**  
*R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego po jednorazowym podaniu etanolu

Grupy badawcze	Tkanki		
	Mózg (GSSG w $\mu\text{M/g}$ )	Wątroba (GSSG w $\mu\text{M/g}$ )	Nerki (GSSG w $\mu\text{M/g}$ )
<b>Kontrola I (4°C)</b>	<b>0.0212</b> <b>±0.0017</b>	<b>0.0162</b> <b>±0.0021</b>	<b>0.0203</b> <b>±0.0012</b>
Gr. 1 (GSH po 12 godz.)	0.0315 ±0.0017*	0.0295 ±0.0009*	0.0242 ±0.0011*
<b>Kontrola II (14°C)</b>	<b>0.0133</b> <b>±0.0019*</b>	<b>0.0141</b> <b>±0.0011*</b>	<b>0.0139</b> <b>±0.0011*</b>
Gr. 2 (GSH po 12 godz.)	0.0444 ±0.0023*	0.0260 ±0.0012*	1.0270 ±0.0011*

\* statystycznie istotne przy  $P \leq 0.001$  (Porównywano Gr. 1 z kontrolą I, kontrolę II z kontrolą I oraz Gr. 2 z kontrolą II, każda grupa zawierała po 7 osobników)

Zmiany wartości stosunku GSSG/GSH w **mózgu, wątrobie i nerkach** *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego pod wpływem podania etanolu

Grupy badawcze	Mózg	Wątroba	Nerki
<b>Kontrola I</b> (4°C)	<b>0.0204</b> ± 0.0024	<b>0.0137</b> ± 0.0021	<b>0.0138</b> ± 0.0010
Gr. 1 (Etanol - GSH i GSSG po 12 godz.)	0.02986 ± 0.0030*	0.0250 ± 0.0045*	0.0168 ± 0.0011*
<b>Kontrola II</b> (14°C)	<b>0.0081</b> ± 0.0011*	<b>0.0090</b> ± 0.0009*	<b>0.0077</b> ± 0.0006*
Gr. 2 (Etanol - GSH i GSSG po 12 godz.)	0.0289 ± 0.0017*	0.0210 ± 0.0012*	0.0170 ± 0.0008*

\* statystycznie istotne przy  $P \leq 0.001$  (Porównywano Gr. 1 z kontrolą I, kontrolę II z kontrolą I oraz Gr. 2 z kontrolą II, każda grupa zawierała po 7 osobników)

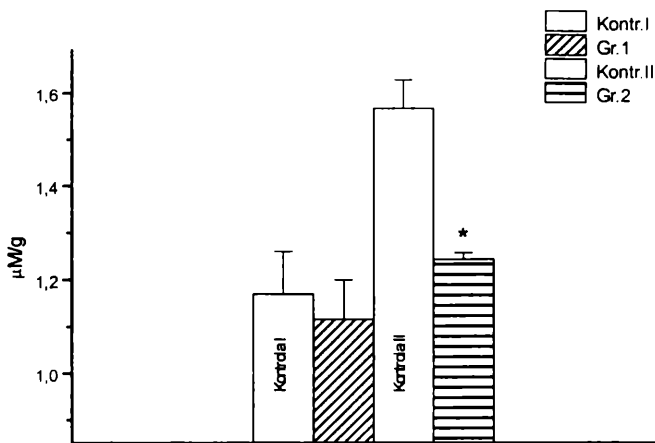


Fig. 15. Zmiany ilości GSH w **wątrobie** *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego pod wpływem podania etanolu. Oznaczenia: Kontr. I - płazy pochodziły z temp. 4°C. Gr. 1 - oznaczano GSH po 12 godz. od momentu podania etanolu, Kontr. II - płazy adaptowano do temp. 14°C, Gr. 2 - oznaczano GSH po 12 godz. od podania etanolu

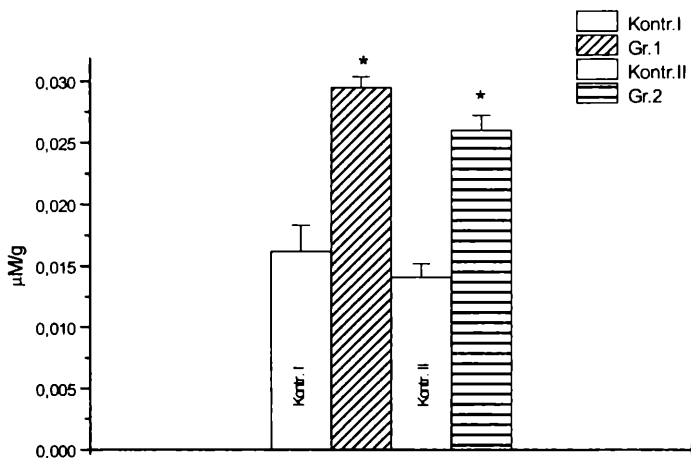


Fig. 16. Zmiany ilości GSSG w **wątrobie** *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego pod wpływem podania etanolu. Oznaczenia jak pod Fig. 15

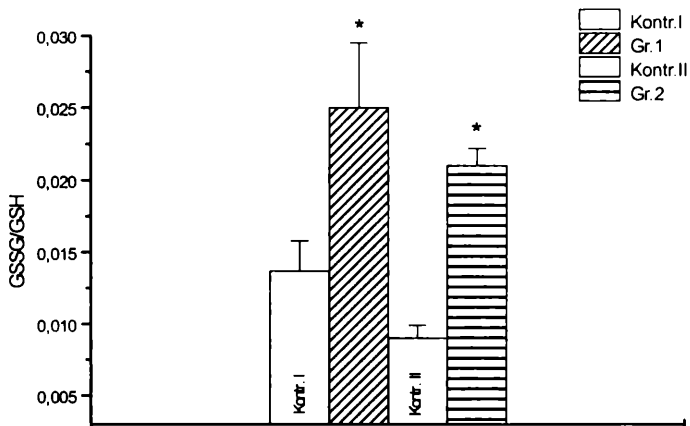


Fig. 17. Zmiany wartości stosunku glutationu utlenionego do zredukowanego w **wątrobie** *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego pod wpływem podania etanolu. Oznaczenia jak pod Fig. 15

## 5. Dyskusja

### 5.1. Temperatura

U *R. esculenta* L. w okresie odrętwienia zimowego stwierdzo korzystny wpływ zaadaptowania żab do wyższej temperatury (14°C) na status GSH we wszystkich badanych narządach. Podniesienie temperatury o 10°C spowodowało także wyraźny spadek ilość GSSG i wartości stosunku GSSG/GSH.

U ssaków uszkodzenia spowodowane przez wzrost temperatury (43-45°C) są podobne do tych, które wywołują ksenobiotyki, ischemia, reperfuzja, głodzenie czy immobilizacja (Farber 1994; Kedderis 1996). Punktem wyjścia do przyjęcia takiego twierdzenia były wcześniejsze badania Skibby i innych (1988), w których wykazano znaczne obniżenie się statusu redokсового w komórkach wątroby psów i ludzi podczas ekspozycji na hipertermię. Takie same uszkodzenia w komórkach wywołuje stres oksydacyjny (Poli 1993). Stres ten manifestuje się znaczną redukcją całkowitej zawartości GSH i wzrostem ilości utlenionej formy glutationu (GSSG) (Skibba i Gwartney 1997).

Organizm płaza jest niezwykle wrażliwy na zmiany temperatury otoczenia. Wrażliwość ta wynika z faktu, że płazy nie potrafią regulować temperatury swojego ciała, tak jak zwierzęta stałocieplne. Pomimo tego te ostatnie, jeżeli są długo ekspozowane na zimno, to adaptują się morfologicznie i funkcjonalnie do niskiej temperatury dopiero po 21 dniach ekspozycji. Wskaźnikiem adaptacji ssaków do długotrwałych zmian tem-



peratury otoczenia zdaniem Spasić i innych (1993) jest wzrost zawartości GSH w tkance brunatnej.

Z powyższych uwag można wnioskować, że uzyskany wzrost ilości GSH i równoczesny spadek ilości GSSG oraz obniżenie wartości stosunku GSSG/GSH u *R. esculenta* L. świadczą o jej adaptacji do zastosowanej temperatury. Uzyskane dane są zgodne z wcześniejszymi badaniami przeprowadzonymi u *R. temporaria* L. (Dziubek 1987; 1993)). Co więcej, jak wykazały obecne badania tylko w podwyższonej temperaturze można dodatkowo podnosić ilość GSH, a także obniżać zawartość GSSG, przez podawanie związków będących pośrednio substratami (ester monoetylowy glutationu, kwas L-2-oksotiazolidyno-4-karboksylowy) wykorzystywanymi do syntezy GSH czy przez podawanie antyoksydantów (allopuryrol, witamina E) wspierających funkcje tego trójpeptydu. Pomimo tego należy pamiętać, że w tej temperaturze badane płazy są bardziej wrażliwe na czynniki (etanol, UVA) wywołujące stres oksydacyjny.

## Konkluzja

**Wzrost temperatury o 10°C w okresie zimowania *R. esculenta* L. jest korzystny dla statusu glutationu.**

## 5.2. Insulina

U żaby wodnej w okresie zimowania stwierdzono wysoki poziom glukozy w surowicy krwi, któremu towarzyszył niski poziom GSH w mózgu, wątrobie, sercu i nerkach. Zaadaptowanie żab do temperatury 14°C i podanie insuliny spowodowało spadek poziomu glukozy i równoczesny wzrost ilości GSH.

W warunkach fizjologicznych dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa uczestniczy w systemie recyklingu glutationu. Aktywność tego enzymu jest indukowana przez odpowiedni poziom glukozy i produkty przemiany glukozy (Tran i inni 1995). Jednak w cukrzycy aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej jest zahamowana i dostępność NADPH jest obniżona, co hamuje tempo redukcji GSSG do GSH (Loven i Oberley 1985). Ponadto glukoza jak i produkty przemiany cukrowców, fosfodihydroksy-aceton, aldehyd 3-fosfoglicerynowy, a także produkty glikacji ulegają

utlenieniu, którego produktami są odpowiedni rodnik 1-hydroksyalkilowy i RFT (Hayakawa i Kuzuya 1990). U ssaków w cukrzycy ilość anionorodnika ponadtlenkowego wytwarzanego wskutek utleniania glukozy i białkowych produktów glikacji wyraźnie wzrasta. Objawia się to ogólnoustrojowym stresem oksydacyjnym. Stres ten powoduje wzrost stężenia dialdehydu malonowego w osoczu krwi oraz obniżenie poziomu antyoksydantów wewnątrzkomórkowych, np. askorbinianu i glutationu (Taniguchi 1990). Wzrost ilości wolnych rodników i obniżenie poziomu antyoksydantów ma swój udział w uszkodzeniach typowych dla cukrzycy (Wolff 1993).

U ssaków, poza obniżeniem ilości GSH obserwuje się również spadek ilości i zahamowanie aktywności Cu/Zn dysmutazy ponadtlenkowej (Crouch i inni 1981). W przypadku GSH obniżenie to jednak nie przekracza pewnej normy i stwierdzony poziom GSH prawdopodobnie wystarcza do utrzymania homeostazy komórek, gdyż w przeciwnym razie następowalaby ich śmierć (apoptoza), w wyniku nadmiernej peroksydacji lipidów i w wyniku obniżenia się ilości tioli białkowych (Reea i Rariss 1984, Mekiňová i inni 1995).

W stanach stresu oksydacyjnego w wyniku wzmożenia reakcji oksydacyjnych dochodzi w komórce do wzrostu stężenia GSSG. Sytuacja ta jest niebezpieczna dla komórki, bowiem GSSG może wchodzić w reakcje z grupami tiolowymi białek i tworzyć mieszane dwusiarczki, co prowadzi do hamowania aktywności enzymów uczestniczących w syntezie DNA, RNA, białek oraz upośledzenia mitochondrialnego oddychania, a także aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (Camporti 1985).

Stwierdzony niski poziom GSH w badanych tkankach w okresie zimowania żaby wodnej świadczy o tym, że także u tego gatunku w hiperglikemii spada ilość wewnątrzkomórkowego GSH. Jest możliwe, że obniżenie się poziomu GSH w tym czasie odzwierciedla tempo utleniania GSH do GSSG i określa wielkość stresu oksydacyjnego. Co więcej, u płazów obserwuje się ciekawe zjawisko, że po okresie zimowej hiperglikemii poziom glukozy obniża się w czasie życia aktywnego w lecie. Wydaje się więc, że wzrost poziomu glukozy w okresie zimy nie jest spowodowany uszkodzeniem komórek  $\beta$ -trzustki, a raczej zahamowaniem syntezy insuliny. W konsekwencji ma to prowadzić do obniżenia metabolizmu płaza w okresie dla niego niekorzystnym (niskie temperatury, brak pożywienia).

Sądzi się, że skutkiem wzrostu poziomu glukozy u płazów w okresie zimy jest zahamowanie metabolizmu. Być może, że generowane rodniki w hiperglikemii mają mniejszy wpływ na poziom GSH, który jest konsumowany w procesach zmiatania rodników (Richter 1995), aniżeli niska temperatura i nie odżywianie się płazów. W takich warunkach obniza się produkcja ATP, którego poziom, poza obecnością substratów, ma istotny wpływ na tempo syntezy GSH. Uzyskane dane i dane literaturowe potwierdzają wcześniejszą sugestię Meister (1983), że metabolizm GSH jest procesem złożonym zależnym od degradacji i *de novo* syntezy GSH, a także od wewnątrzkomórkowej redukcji GSSG do GSH.

## Konkluzja

**Poziom GSH w organizmie w okresie zimowania jest ujemnie skorelowany z poziomem glukozy.**

### 5.3. Ester monoetylowy glutationu

W przeprowadzonym eksperymencie wykazano, że podanie estru monoetylowego glutationu (ester etylowy L- $\gamma$ -glutamylo-L-cysteinyloglicynowy) powoduje znaczny wzrost zawartości GSH w badanych narządach *R. esculenta* L., u zwierząt adaptowanych do temperatury 14°C. Wzrost ten nastąpił stosunkowo szybko w nerkach, co potwierdza wcześniejsze sugestie Meistersa (1984), że właśnie ten narząd charakteryzuje się wysokim tempem cyklu  $\gamma$ -glutamylowego.

Egzogenne podanie glutationu nie jest najlepszą metodą prowadzącą do wzrostu ilości GSH, gdyż nie jest on efektywnie transportowany do wnętrza komórek (Meister 1983). Pomimo tego podczas podania egzogenego GSH, po wcześniejszym jego obniżeniu o około 50% obserwuje się w komórkach wzrost stężenia cysteiny (Fukagawa i inni 1996). Podanie GSH promuje wnikanie cysteiny do wnętrza komórek (Aebi i inni 1991). Aminokwas ten wpływa na syntezę GSH, a sam GSH jest formą magazynu, a także transporterem tego aminokwasu między poszczególnymi narządami (Meister i inni 1986; Tateishi i inni 1977).

Po podaniu estru monoetylowego glutationu grupa karboksylowa glicyny zostaje zestryfikowana i po estryfikacji ester ten jest efektywnie

transportowany do wnętrza komórek i tam szybko ulega deestryfikacji przez wewnątrzkomórkowe esterazy (Puri i Meister 1983). Po deestryfikacji ma miejsce hydroliza estru na aminokwasy składowe, które są wykorzystywane do syntezy cząsteczki GSH, co objawia się wzrostem ilości badanego trójpeptydu (Martensson i Meister 1991). Podanie estru monoetylowego glutationu jest korzystne także i z tego powodu, że komórka w celu jego wykorzystania nie wydatkuje energii, ponieważ wewnątrzkomórkowa hydroliza estru jest egzogeniczna (Meister i Anderson 1984).

Podanie estru monoetylowego glutationu nie wywołało istotnych zmian ilości GSH u osobników pochodzących z temperatury 4°C. Ma na to zapewne wpływ niska temperatura, w której został zahamowany transport zestryfikowanego estru do wnętrza komórek. Wydaje się to prawdopodobne, gdyż jak stwierdzili Lu i inni (1996), także aktywność transporterów GSH (RcGshT i RsGshT) jest zależna od temperatury otoczenia. Niska temperatura z całą pewnością spowodowała również zahamowanie aktywności enzymów uczestniczących w syntezie GSH i aktywności transpeptydazy  $\gamma$ -glutamylowej, enzymu odpowiedzialnego za jego eksport z komórek i obieg w organizmie (Jones i inni 1979; Meister 1985).

## Konkluzja

**Można eksperymentalnie zmieniać poziom GSH u *R. esculenta* L. w okresie zimowania przez podniesienie temperatury i podanie estru monoetylowego glutationu.**

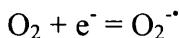
## 5.4. Allopurynol

Uzyskane wyniki wskazują, że samo zaadaptowanie żaby wodnej w zimie do temperatury 14°C już powoduje wzrost zawartość GSH w sercu, wątrobie i nerkach. Co więcej, jeżeli tym żabom podano allopurynol to wykazano dodatkowy wzrost ilości GSH w badanych narządach.

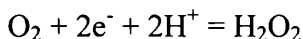
W normalnych warunkach fizjologicznych dehydrogenaza ksantynowa (EC 1.1.1.204) katalizuje utlenianie substratów, które jest sprzężone z redukcją  $\text{NAD}^+$  do NADH, co nie wiąże się z generacją RFT (Babior i inni 1973). Podczas ischemii i reperfuzji hypoksantyna jest utleniana do ksantyny i kwasu moczowego (Saugstad 1975). Utlenianie to jest

katalizowane przez oksydazę ksantynową (EC 1.2.3.2). W reakcji tej dodatkowo powstaje anionorodnik ponadtlenkowy. Allopurynol jest kompetytywnym inhibitorem oksydazy ksantynowej, hamuje więc powstawanie tego anionorodnika. Mówi się, także o innych niespecyficznych działaniach allopurynolu, mianowicie o tym, że ma on pobudzać enzymy antyoksydacyjne i bezpośrednio zmiatać RFT (Stewart i inni 1985).

Oksydaza ksantynowa może redukować cząsteczkę tlenu zarówno jedno- jak i dwuelektronowo. W pierwszym przypadku produktem reakcji jest anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ):



w drugim zaś nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ )



To jaką część tlenu enzym zredukuje jednoelektronowo, a jaką dwuelektronowo zależy od stężenia tlenu w roztworze, od pH, a w mniejszym stopniu także od stężenia substratu. Im wyższe stężenie tlenu i wyższe pH, a niższe stężenie substratu, tym większy jest udział jednoelektronowej redukcji tlenu. W dobrze napowietrzonych roztworach ksantyny, w pH 7.8 około 15% elektronów przekazywanych jest przez enzym szlakiem jednoelektronowym. W roztworze substratu o pH 10.0 zrównoważonym z tlenem znajdującym się pod ciśnieniem 1 atmosfery, szlakiem jednoelektronowym wędruje 100% elektronów. Hamowanie aktywności enzymu przez inhibitory, np. przez kwas moczowy zwiększa wytwarzanie  $O_2^{\cdot-}$  w stosunku do  $H_2O_2$  (Bartosz 1995). Powstałe RFT są silnymi utleniaczami i wywołują stres oksydacyjny w komórce (Chan i inni 1995). Dodatkowym czynnikiem sprzyjającym wytwarzaniu RFT po wznowieniu dopływu tlenu w okresie reperfuzji jest katabolizm ATP zachodzący intensywniej podczas niedotlenienia (niedotlenienie jest również okresem głodu metabolicznego i wzmożonego zapotrzebowania na ATP) (Saugstad i inni 1976). W wielu doświadczeniach badano skutki reperfuzji po niedotlenieniu i zawsze stwierdzano wzrost aktywności oksydazy ksantynowej i wzrost stężenia produktów katabolizmu ATP. Co więcej, przy obniżonej ilości ATP komórki były bardziej wrażliwe na uszkodzenia wywoływane przez hipoksję (Lash i inni 1995).

Do reaktywnych „zmiataczy” RFT są zaliczane związki o różnorodnej budowie i funkcjach. Należą do nich ceruloplazmina (która jest białkiem ostrej fazy i która utlenia jony żelazawe do żelazowych i katalizuje reakcje nie wytwarzające RFT, które są konkurencyjne w stosunku do reakcji generujących  $O_2^{\cdot -}$  i  $H_2O_2$ ), cząsteczki zmiatające zawierające grupy tiolowe, jak glutation i witaminy: kwas askorbinowy (Rice i inni 1995),  $\alpha$ -tokoferol (Burton i inni 1983),  $\beta$ -karoten (Palozza i inni 1995), a także aminokwasy, takie jak metionina, cysteina oraz inne związki, np. kwas moczowy lub mannitol (Becker 1993).

Wśród tzw. zmiataczy RFT kluczową rolę wydaje się odgrywać glutation. Wiadomo, że chroni on komórki przed stresem oksydacyjnym, przez bezpośrednie zmiatanie RFT, albo pośrednio, przez peroksydazę glutationową, reduktazę glutationową lub transferazy S-glutationowe (Meister 1988). W reakcjach katalizowanych przez te enzymy ma miejsce pobieranie GSH. Proponuje się więc, że GSH może być indykatorem uszkodzeń poischemicznych (Paller 1988).

U żaby wodnej w okresie zimowania, w porównaniu z okresem lata (Dziubek 1985), stwierdzono stosunkowo niski poziom GSH, co także częściowo może wiązać się z niedotlenieniem jej tkanek. U ssaków w hipoksji też stwierdzano obniżenie się poziomu GSH (Shan i inni 1992). Obniżenie to może być spowodowane spadkiem syntezy NADPH, substratu potrzebnego do redukcji utlenionego glutationu GSSG do jego zredukowanej formy GSH przez reduktazę glutationową (Tribble i Jones 1990). W hipoksji spada ilość oksydazy cytochromowej, co powoduje hamowanie glikolizy i w konsekwencji obniżenie syntezy NADPH (Aw i Jones 1982).

Stwierdzono także wzrost ilości GSH w grupie osobników, którym przerwano eksperymentalnie okres zimowania, przez przeniesienie żab do wyższej temperatury i umieszczeniu ich w niewielkiej ilości wody, tak aby nie były w niej całkowicie zanurzone. Ten wzrost zawartości GSH w tej grupie badawczej jest związany albo ze wzrostem poziomu syntezy tego trójpeptydu *de novo*, albo ze spadkiem jego konsumpcji w procesach eliminacji RFT powstających w hipoksji.

W przypadku płazów obniżenie ilości GSH jest prawdopodobnie spowodowane tym, że płazy w okresie zimowania nie pobierają pokarmu, a dieta i jej rodzaj, zdaniem Huma i innych (1992), mają znaczny wpływ na zawartość GSH. Również zdaniem Jahoora i innych (1995) dieta nie

tylko wpływa na ilość GSH, ale także na tempo jego syntezy. Mianowicie dieta bogatsza w białko syntezę tę przyspiesza.

Aby wzmocnić endogenne systemy antyoksydacyjne podaje się syntetyczne antyoksydanty naśladujące, np. peroksydazę glutationową, jak ebselen (Müller i inni 1985), lub inhibitory oksydazy ksantynowej. Jednym z takich związków hamujących aktywność oksydazy ksantynowej jest allopuryinol (Klein i inni 1996).

W przeprowadzonym eksperymencie po podaniu allopuryinolu żabom pochodzącym z okresu zimowania i zaadaptowanym do wyższej temperatury, stwierdzono wysoce statystyczny wzrost ilości GSH w badanych tkankach. Podany egzogennie allopuryinol jest metabolizowany do analogu ksantyny oksypurinolu, który jest inhibitorem oksydazy ksantynowej. Poprzez hamowanie aktywności oksydazy ksantynowej allopuryinol przeciwdziała wytwarzaniu RFT. Wyraźny wzrost ilości GSH u badanych płazów, po podaniu allopuryolu i po gwałtownym przerwaniu okresu zimowania przez umieszczenie żab w wyższej temperaturze, świadczy o jego ochronnej roli. Wynika ona głównie z jego funkcji jako zmiatacza rodników tlenowych, a prawdopodobnie w mniejszym stopniu z jego udziału w hamowaniu aktywności oksydazy ksantynowej (Moorhouse i inni 1987).

## Konkluzja

**Obniżenie poziomu GSH w badanych tkankach *R. esculenta* L. w okresie zimowania jest prawdopodobnie spowodowane stresem oksydacyjnym wywołanym przez RFT powstające w niedotlenieniu. Allopuryinol ma korzystny wpływ na poziom glutationu zredukowanego u *Rana esculenta* L.**

## 5.5. UVA

Stwierdzony w obecnym eksperymencie spadek ilości GSH w badanych narządach *R. esculenta* L. sugeruje, że endogenny GSH jest wciągany w ochronę płaza przed promieniowaniem UVA. Podobna sytuacja ma miejsce u ssaków, u których jeżeli obniżono ilość GSH przez podanie np. sulfoksyminy butioniny (BSO), to wzrastała ich wrażliwość na promieniowanie UV (Hanada i inni 1991).

W 1982 Parrish i inni wykazali, że UVA wywołuje różę skóry i uszkadza jej naczynia włosowate. Co więcej UVA może działać synergistycznie z ostrymi i chronicznymi efektami UVB (Forbes 1986). W chwili obecnej wiadomo, że UVA uszkadza komórkowy DNA i, że uszkodzenia te są wyraźnie różne od tych indukowanych przez UVB. UVA poza tworzeniem lezji DNA wyraźnie indukuje tworzenie dimerów pirymidynowych (Enninge i inni 1986).

Ostatnio Robert i inni (1996) wykazali także wyraźny wpływ UVA na mutagenezę komórek ludzkich. Ten typ promieniowania przyspiesza również procesy starzenia się (Bissett i inni 1989), powoduje destrukcję białek w soczewce oka co prowadzi do katarakty (Winetsky i inni 1996) i fotodestrukcję białkowych grup -SH, a także destrukcję histydyny, cysteiny i tryptofanu (Orwerth i inni 1995). Utlenianie tych aminokwasów i grup -SH jest powodowane przez RFT, które są obok dimerów pirymidynowych typowymi fotoproduktami prowadzącymi do objawów fotouszkodzeń (Bhuyan i inni 1992). RFT powstające w wyniku działania UVA indukują również apoptozę w różnych typach komórek, głównie jednak keranocytach epidermy (Godar 1996). Ostatnio Kohno i inni (1996) potwierdzili, że apoptoza tych komórek jest ściśle zależna od generowania RFT i od komórkowych systemów antyoksydacyjnych, głównie od ilości GSH.

Tyrrell i Pidoux już w 1986 wykazali ścisłą ilościową korelację między obniżeniem się zawartości glutationu a wrażliwością na promieniowanie UVA. Między innymi obniżenie poziomu GSH prowadzi do indukcji transkrypcji i poziomu hemowej oksygenazy 1. Stwierdzono, że poziom tego białka zawsze wzrasta po ekspozycji na UVA (Keyse i Tyrrell 1989; Lautier i inni 1992). Protekcyjna rola GSH ma polegać na zmiataniu RFT ( $\cdot\text{OH}$ ,  $^1\text{O}_2$  i  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), powstających pod wpływem UVA (Applegate i Frenk 1995; Linetsky i Ortwerth 1995; Niggli i Applegate 1997) i na jego udziale jako kofaktora enzymów ochronnych – GSH-Px, transhydrogenaz i GSH transferaz (Meister 1983).

Spadek poziomu GSH jest spowodowany przez działanie  $\text{O}_2^{\cdot-}$  na peroksydazę glutationową, sam glutation i katalazę. Zostało udokumentowane, że milimolarna koncentracja ponadtlenku hamuje aktywność tych enzymów i obniża poziom GSH (Pigeolet i inni 1990; Blum i Fridovich 1985). Jeżeli koncentracja tych enzymów ochronnych i GSH obniży się znacznie, to podnosi się poziom nadtlenku wodoru, który hamuje aktyw-



ność dysmutaz ponadtlenkowych (Kono i Fridovich 1982). Załamują się więc mechanizmy antyoksydacyjne komórki.

Bezpośrednie działanie  $O_2^{\cdot -}$  na GSH przy zahamowaniu aktywności enzymów ochronnych może wywołać reakcję łańcuchową, prowadzącą do powstawania utlenionego glutationu (Winterbourn i Metodieva 1994) i mieszanych dwusiarczków (Park i Thomas 1988).

Przy przedłużającej się ekspozycji na promieniowanie UVA powstające RFT hamują w mikrosomach także aktywność  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPazy. Obniżenie się aktywności ATPazy jest głównie spowodowane przez  $O_2^{\cdot -}$ , co po raz pierwszy zaobserwowali Varma i inni (1979) i jest skorelowane z poziomem lipoperoksydacji. Prowadzi to do zmiany integralności błon i zaburzeń w przepuszczalności jonów  $K^+$  i  $Na^+$ , co w konsekwencji zmienia jonową homeostazę komórki (Jamme i inni 1995). W ostateczności taka sytuacja sprzyja powstawaniu schorzeń, głównie skóry, przypisywanych promieniowaniu UVA, a także apoptozie komórek.

Interesujący jest zaobserwowany w obecnym eksperymencie spadek zawartości GSH także w innych narządach poza skórą. Być może, że jest to spowodowane wzmożeniem importu GSH z innych narządów do skóry, która jest bezpośrednio penetrowana przez UVA.

## Konkluzja

**Glutation odgrywa ważną rolę w ochronie komórek przed cytotoxycznością wywołaną przez promieniowanie UVA u *R. esculenta* L.**

### 5.6. Długość ciała żab

Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że glutationowy antyoksydacyjny system ochronny w wątrobie, nerkach i mózgu *R. esculenta* L. jest modyfikowany wraz z długością ciała. Wpływ długości ciała (wieku) na zawartość GSH badano u różnych gatunków ssaków i w różnych tkankach (Farooqui i inni 1987; Lang i inni 1992; Iantomasi i inni 1993). Uzyskane wyniki okazały się jednak rozbieżne, gdyż albo nie wykazywano takich zmian (Barja de Quiroga i inni 1990), albo wykazywano spadek zawarto-

ści GSH u osobników starych (Farooqui i inni 1987). Te rozbieżności zdaniem Christon i innych (1995) mogą zależeć od wieku badanych zwierząt, głównie od wieku zwierząt, które uznawano za młode. Okazuje się bowiem, że uzyskiwano wyniki całkowicie różne, kiedy porównywano stare szczury z „młodymi” 2-miesięcznymi i stare z „młodymi” 6-miesięcznymi (Farooqui i inni 1987; Iantomasi i inni 1993).

Spadek ilości GSH u osobników starych stwierdza się u ssaków, głównie w mózgu (Harding 1970; Benzi i inni 1988; 1991a; 1991b). Ma to niewątpliwie wpływ na efektywność eliminacji nadtlenu wodoru i na przeciwdziałanie uszkodzeniom oksydacyjnym, których ilość wzrasta z wiekiem (Harman 1956; Jamieson i inni 1987).

Nadtlenek wodoru bierze udział w uszkodzeniach komórek, gdyż penetruje poprzez błony biologiczne (Halliwell 1990) i indukuje reakcje wolnorodnikowe (Saran i Bors 1991), a ponadto uczestniczy w powstawaniu wyjątkowo groźnego rodnika hydroksylowego HO<sup>•</sup> (Halliwell i Gutteridge 1986). Nadtlenu ten może także tworzyć addukty z wieloma składnikami komórek (Schubert i Wilmer 1991). Jednym z najczęściej powstających takich adduktów jest addukt z histydyną, który wyraźnie zwiększa transfer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do komórki, przez co wzrasta ilość powstających rodników <sup>•</sup>OH, głównie w obecności metali przejściowych, co objawia się wzrostem aberacji chromosomalnych obserwowanych np. w fibroblastach embrionów ludzkich (Oya i Yamamoto 1988).

W wyniku reakcji rozkładu nadtlenu wodoru przez peroksydazę glutationową, ma miejsce pobieranie GSH. Jeżeli ilość GSH obniży się znacznie, a tak jest u osobników starych co stwierdzono, np. w przypadku badanych płazów, to w obecności jonów Fe<sup>2+</sup> w tzw. reakcji Fentona będzie powstawał rodnik wodorotlenowy:



Rodnik ten jest wyjątkowo niebezpieczny ponieważ działa zarówno na poziomie molekularnym komórki – utlenia białka, powoduje peroksydację lipidów, uszkadza mitochondrialny DNA (Barreau i inni 1996), jak również na poziomie komórkowym – wpływa na transdukcję sygnałów w komórce i na funkcjonowanie błon komórkowych oraz na ekspresję genów (Gille i Sigler 1995).

Wraz z wiekiem obniża się uwalnianie GSH z komórek. Poziom GSH w komórce zależy od tempa syntezy *de novo* i od redukcji GSSG,

katalizowanej przez reduktazę glutationową. Reduktaza ta jest zależna od NADPH wytwarzanego przez glukozo-6-fosforanową dehydrogenazę G6PDH (Meister 1991). Ponieważ aktywność reduktazy glutationowej i G6PDH w wątrobie nie zmienia się wraz z wiekiem (Barja de Quiroga i inni 1990), to dlatego poziom GSH w komórce zależy tylko od jego syntezy *de novo*. Synteza GSH jest katalizowana przez syntetazę  $\gamma$ -glutamylcysteinową. Wiadomo, że aktywność tego kluczowego enzymu w syntezie GSH zależy od dostępności ATP. Jednak produkcja ATP obniża się wraz z wiekiem (Di Monte i inni 1993), co pociąga za sobą spadek aktywności syntetazy  $\gamma$ -glutamylcysteinowej (Deoliveira i Dean-gelis 1996). Komórki otrzymują wtedy mniej aminokwasów niezbędnych do syntezy GSH (Hochwald i inni 1996). Spada więc tempo biosyntezy GSH w komórce, a tym samym obniża się jego koncentracja w narządach.

Innym powodem spadku zawartości GSH u osobników starych jest fakt wzrostu aktywności transferazy S-glutationowej (Iantomasi i inni 1993). To oznacza, że wraz z wiekiem większa ilość GSH jest wciągana w procesy detoksykacji i tworzenia glutationowych S-koniugatów, co objawia się także spadkiem zawartości GSH.

U *Rana perezii* nie wykazano wyraźnego spadku ilości GSH u osobników starych w porównaniu z młodymi (López-Torres 1993a i b). Można zatem przypuszczać, że sytuację taką wywołał fakt, iż badane płazy pochodziły prawdopodobnie z okresu życia aktywnego i rodzaj ich pokarmu mógł zatrzeć te subtelne różnice. W obecnym eksperymencie płazy do badań pochodziły z okresu zimy, nie pobierały więc pokarmu. U tych płazów stwierdzono wzrost koncentracji GSSG i wartości stosunku GSSG/GSH w badanych narządach starych osobników *R. esculenta* L. U osobników starych wzrasta w mitochondriach produkcja reaktywnych form tlenu (Sohal i Allen 1990). W takich warunkach zdolność komórek do redukcji GSSG do GSH obniża się, co objawia się wzrostem akumulacji GSSG i co więcej, wzrostem utleniania tioli białkowych. Dlatego też poziom GSSG jest markerem stresu oksydacyjnego i wskaźnikiem redok-sowego indeksu GSH (Benzi i inni 1988).

Redukcja powstającego disulfidu glutationu (GSSG), powstającego w reakcji rozkładu  $H_2O_2$  dokonuje się przy udziale reduktazy glutationowej z równoczesną konsumpcją  $NADPH + H^+$ . Wzrastająca konsumpcja  $NADPH + H^+$  i GSH przy równoczesnym wzroście aktywności peroksydazy glutationowej prowadzi do wzrostu toksyczności a nie detoksykacji,

gdyż prowadzi to do wzrostu ilości GSSG (Farber i inni 1990). W takiej sytuacji dochodzi do stresu oksydacyjnego i komórka ma zmniejszoną zdolność redukcji GSSG do GSH, co powoduje akumulację GSSG i utlenianie grup tiolowych białek. Podnoszący się poziom GSSG wzmacnia napływ wapnia do cytosolu komórek (Bellomo i inni 1982). Wapń ten powoduje leżę komórek (Thor i inni 1988) i wzrost hydrolizy fosfolipidów i białek (Nicotera i inni 1985), spadek produkcji ATP i w rezultacie apoptozę komórek.

GSSG występujący w cytozolu, jeżeli nie jest efektywnie redukowany do GSH, to jest aktywnie transportowany poza komórki (Sies i Akerboom 1984; Eklöv i inni 1984). Efektywność tego transportu zależy od dostępności ATP. Ponieważ dostępność ATP obniża się wraz z wiekiem, to akumulacja GSSG wzrasta (Kondo i inni 1995). Mitochondria, w których najczęściej powstaje RFT, nie posiadają zdolności do eksportu GSSG (Jocelyn 1975; Ólafsdóttir, Reed 1988; Reed 1990). To sugeruje, że mitochondrialny GSSG musi być redukowany *in situ* i, że mitochondria są bardziej wrażliwe niż reszta komórki na konsekwencje zmian statusu redokсового. Dodatkowo u osobników starych obniża się aktywność reduktazy glutationowej (EC 1.6.4.2), (Stohs i inni 1980; Stohs i inni 1984), co prowadzi do spadku regeneracji GSH z GSSG i do jeszcze większych zaburzeń w statusie redokсовym komórki. Tak więc spadek aktywności reduktazy glutationowej u osobników starych jest również jedną z przyczyn wzrostu ilości GSSG. Także miało to miejsce u badanych płazów.

W związku ze spadkiem ilości GSH u osobników starych uszkodzenia oksydacyjne komórek są akumulowane i przyspieszają proces starzenia się (Matsuo i inni 1992). Ostatnio sugeruje się, że w takiej sytuacji (akumulacji wewnątrzkomórkowego  $\text{Ca}^{2+}$ , spadku produkcji ATP) i przy obniżonej ilości GSH, komórka jest kierowana na drogę śmierci apoptycznej (Slater i inni 1996). Co więcej, czynniki środowiskowe, np. toksyczne związki chemiczne, mogą ten proces indukować oraz w pewnym stopniu decydować o długości życia osobniczego.

## Konkluzja

Ilość GSH u żaby wodnej jest ujemnie skorelowana z długością ciała żab. W związku z powyższym można zakładać, że podobnie jak u ssaków, także u płazów redukcyjne właściwości zależne od GSH w wątrobie, nerkach i mózgu obniżają się wraz z wiekiem. Świadczy o tym spadek koncentracji GSH i wzrost ilości GSSG. Uzyskane wyniki są zgodne z sugestiami wielu autorów o ujemnym wpływie „wieku” na antyoksydacyjny system zależny od GSH.

### 5.7. Kwas L-2-oksotiazolidyno-4-karboksyłowy (OTC)

OTC podany dożołądkowo powoduje wzrost zawartości GSH w mózgu, wątrobie i nerkach u *R. esculenta* L. w okresie zimowania, ale tylko u płazów, które adaptowano do temperatury 14°C. W tej temperaturze w grupie zwierząt kontrolnych (II) stwierdzono bardzo wyraźny spadek ilości GSSG w porównaniu ze zwierzętami zimującymi w temperaturze 4°C (I). W związku z powyższym stosunek GSSG do GSH także obniżył się.

GSH dzięki grupom sulfhydrylowym występującym w cząsteczce cysteiny posiada właściwości zmiatania wolnych rodników. Podanie związków obniżających ilość GSH, np. sulfoksyminy butioniny (BSO) specyficznego inhibitora syntezy  $\gamma$ -glutamylcysteinowej (Griffith 1981) w koncentracji 2 mM obniża o około 50% zawartość wewnątrzkomórkowego GSH (Jurima-Romet i inni 1996). U płazów w okresie hibernacji obserwuje się najniższą zawartość GSH w ciągu roku (Dziubek 1985). Nie ma więc potrzeby stosowania BSO. W wyniku spadku zawartości GSH obserwuje się wzrost oksydacyjnych uszkodzeń komórkowych (Martensson i inni 1993). Aby temu przeciwdziałać, należałoby eksperymentalnie wywołać wzrost syntezy i ilości GSH.

Podanie egzogenego GSH nie powoduje wyraźnego wzrostu jego ilości w komórce, ponieważ GSH nie jest bezpośrednio transportowany przez jej błony komórkowe. Wydawało się, że podanie prekursorów GSH (glutaminianu, glicyny, cysteiny) spowoduje wyraźny wzrost jego ilości w komórce. Okazało się, że z aminokwasów wchodzących w skład jego

cząsteczki jedynie cysteina ma wpływ na tempo syntezy GSH. Podanie egzogennej cysteiny jest niekorzystne, gdyż w trakcie jej utleniania są generowane RFT powodujące nekrozę neuronów, choroby i w końcu śmierć zwierząt laboratoryjnych (Meister 1991).

Propонуje się więc alternatywny mechanizm dostarczania cysteiny do wnętrza komórki w postaci OTC, który jest związkiem nietoksycznym i jest transportowany w postaci niezmienionej do wnętrza komórki. Tam ulega decyklizacji, przy udziale enzymu oksoprolinazy do S-carboxy-L-cysteiny, która jest spontanicznie dekarboksylowana do L-cysteiny (Williamson i Meister 1981).

W tkankach zdrowych podanie OTC wywołuje wzrost ilości GSH i zmniejszenie rozmiaru oksydacyjnych uszkodzeń (Williamson i inni 1982; Taylor i inni 1992). Dobitnie potwierdziły to badania Coopera i Merrilla (1989), w których wykazano, że OTC w śledzienie hamuje powstawanie oksydacyjnych uszkodzeń i równocześnie powoduje wzrost ilości GSH w tym narządzie. Podobny mechanizm działania OTC na wzrost ilości GSH u *R. esculenta* L. jest z całą pewnością taki sam jak u ssaków. Jego wpływ jest jednak w tym przypadku wyraźnie limitowany temperaturą otoczenia.

Dzięki temu, że OTC szybko i skutecznie podnosi poziom GSH w organizmie (Russo i inni 1986; Rouse i inni 1995), to dlatego jest obecnie stosowany jako związek osłony w radioterapii.

## **Konkluzja**

**Podanie OTC w okresie zimowania żab zmniejsza wielkość stresu oksydacyjnego w badanych narządach.**

## **5.8. Witamina E**

Uszkodzenia serca są powodowane przez RFT powstające w naczyniach krwionośnych (przez aktywne neutrofile) albo wewnątrz komórek naczyń krwionośnych (w miocytach, komórkach mięśni gładkich i komórkach nabłonkowych). Uszkodzenia te są wyraźne, kiedy wzrasta jednoelektronowa redukcja  $O_2$  do RFT i kiedy obniża się zdolność ko-

mórkowych mechanizmów neutralizujących ich aktywność. Mięsień serca posiada ochronne mechanizmy, które chronią jego komórki przed cytotoksycznością RFT. W skład tych mechanizmów wchodzi antyoksydacyjne enzymy (SOD, peroksydaza glutationowa, reduktaza glutationowa i katalaza), a także endogenne antyoksydanty (witamina E, witamina C,  $\beta$ -karoteny i GSH) (Thompson i Hessl 1986; Halliwell i inni 1992).

Witamina E redukuje powstawanie uszkodzeń powodowanych przez RFT i poprawia pracę serca (Guarnieri i inni 1978). Antyoksydacyjne efekty witaminy E są bardziej wyraźne, kiedy wiąże się ona z albuminami osocza (Guarnieri i inni 1982). Wykazano, że pochodne tej witaminy chronią miocyty serca, także przed glutationem utlenionym (GSSG) powstającym w wyniku redukcji nadtlenu wodoru przez GSH (Guarnieri i inni 1988).

Witamina E wbudowuje się do wnętrza błon komórkowych lub występuje w pobliżu tych błon i przez to skuteczniej chroni lipidy budujące błony przed atakami wolnych rodników, głównie przed lipoperoksydowym rodnikiem (Burton i Ingold 1986), a także przed anionem nadtlenkowym  $O_2^{\cdot-}$ , tlenem singletowym  $^1O_2$  i rodnikiem wodorotlenowym  $\cdot OH$  (Fukuzawa i Gebicki 1983). Dzięki temu redukuje zmiany w błonach miocytów w czasie niedotlenienia i ponownego dopływu tlenu (ischemii i reperfuzji), (Massey i Burton 1989).

Poprzez tłumienie anionu nadtlenkowego witamina E zapobiega inaktywacji tlenu azotu ( $N=O$ ). NO jest naczyniowym czynnikiem relaksującym i zapobiega ryzyku wystąpienia zawału. Tlenek azotu jest syntetyzowany w komórkach endotelium i rzeczywiście może być inaktywowany przez anion nadtlenkowy (Rubanyi i Vanhoutte 1986). W komórkach endotelium i mięśniach gładkich witamina E jest zlokalizowana w błonach, podobnie jak w erytrocytach, gdzie prawdopodobnie wpływa także na uwalnianie prostacyklin (Kunisaki i inni 1992).

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono wzrost ilości GSH w sercu, wątrobie i nerkach po podaniu witaminy E. Jest to zapewne spowodowane antyoksydacyjnymi właściwościami tej witaminy, które wspomagają homeostazę GSH.

## Konkluzja

**Witamina E redukuje konsumpcję GSH w sercu, hepatocytach i nerkach w okresie zimowania *R. esculenta* L. i korzystnie wpływa na status glutationu w tych narządach. Podobnie jak u ssaków, także u *R. esculenta* L. witamina E obniża wielkość stresu oksydacyjnego w badanych narządach.**

## 5.9. Etanol

Podanie etanolu wywołuje generowanie RFT w mikrosomach wątroby. RFT są generowane przez flawoenzym NADPH reduktazę cytochromu P-450, wytwarzający anionorodnik ponadtlenkowy z którego z kolei może powstawać rodnik wodorotlenowy ( $\cdot\text{OH}$ ) w reakcji Habera-Weissa, katalizowanej przez jon żelaza. Potwierdzeniem tego jest stwierdzona korelacja pomiędzy intensywnością wytwarzania RFT a ilością cytochromu CYP2E1 w mikrosomach wątroby szczurów traktowanych alkoholem (Ekström i Ingelman-Sundberg 1989).

Etanol powoduje także wzrost generowania anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach wątroby (Sinaceur i inni 1985). Podanie etanolu obniża stosunek  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , przez co następuje wzrost przepływu elektronów wzdłuż oddechowego łańcucha transportu elektronów (Kurose i inni 1996). W wyniku tego wzmagają się w mitochondriach generowanie ponadtlenku (Slater i inni 1964). Objawia się to uszkodzeniami struktury mitochondrii. Są też inne dane sugerujące, że chroniczne podawanie etanolu obniża w mitochondriach wątroby produkcję ponadtlenku (Ribiere i inni 1988) i nadtlenu wodoru (Koch i inni 1977).

Podanie produktu utleniania etanolu acetylaldehydu promuje peroksydację lipidów w izolowanych hepatocytach (Stege 1982) i obniża poziom glutationu zredukowanego (Videla i inni 1982). Acetylaldehyd promuje konwersję dehydrogenazy ksantynowej (XD) do oksydazy ksantynowej (XO) enzymu generującego wolne rodniki (Cederbaum i Rubin 1976). Obniża również stosunek  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  w wyniku czego następuje wzrost aktywności XO, gdyż NADH hamuje aktywność XO (Kato i inni 1990). Potwierdza to fakt wyraźnego hamowania peroksyda-



cji lipidów u szczurów po podaniu allopurynolu będącego inhibitorem XO (Park i inni 1988). Po podaniu etanolu wzrasta także poziom hypoksyantyny i ksantyny, produktów degradacji puryn. Wykazują one duże powinowactwo do XO, przez co wzrasta ilość wolnych rodników produkowanych przez XO (Kato i inni 1990).

Oksydacyjny stres wywołany przez powstające pod wpływem etanolu RFT wpływa na integralność komórek (Devi i inni 1996). Dlatego przeprowadzono badania wpływu ostrych i chronicznych dawek etanolu na ilość i aktywność wątrobowych antyoksydantów, powodujących hamowanie łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych. Okazało się, że duże dawki etanolu obniżają aktywność katalazy i Cu, Zn-SOD u gryzoni (Schisler i Singh 1989), a także aktywność glutationowych S-transferaz (Kocak-Toker i inni 1985), lecz nie peroksydazy glutationowej (Antébi i inni 1984).

W przypadku GSH stwierdzano na ogół spadek jego ilości po podaniu etanolu (Devi i inni 1996). Mechanizm tego spadku upatrywano w powstawaniu adduktów pomiędzy acetylaldehydem a glutationem (Vina i inni 1980). Dane uzyskane przez Kurose i inni (1996) sugerują coś przeciwnego, a mianowicie, że etanol powoduje wzrost zawartości GSH w tym narządzie. Te rozbieżności mogą być spowodowane wpływami pokarmu czy zmianami dobowymi.

W przypadku badanych płazów w okresie zimowania stwierdzono spadek poziomu GSH w mózgu, wątrobie i nerkach pod wpływem podaży etanolu. Obniżenie poziomu GSH głównie w wątrobie redukuje zdolności wątroby do detoksykacji reaktywnych metabolitów powstających podczas biotransformacji nie tylko etanolu, ale także wielu ksenobiotyków.

## **Konkluzja**

**Homeostaza GSH u *R. esculenta* L. ulega niekorzystnej zmianie pod wpływem podania etanolu. Po podaniu etanolu ochrona przed stresem oksydacyjnym jest mniej efektywna.**

## Podsumowanie i wnioski

Komórki organizmu zwierzęcego są stale ekspozowane na substancje ksenobiotyczne RFT, a także różnego rodzaju promieniowanie. Nie jest to problemem dopóki organizm jest zdolny do zmiatania powstających wolnych rodników, do detoksykowania ksenobiotyków i usuwania ich z organizmu, a także jak długo nie utraci zdolności regeneracji uszkodzonych składników komórek i tkanek.

Wolne rodniki utleniają lipidy, białka, cząsteczki węglowodanów, uszkadzają błony komórek i DNA, przez co zmieniają ich strukturę i funkcje. Postępujące uszkodzenia mogą prowadzić do nieodwracalnych zmian w komórkach i ostatecznie do ich śmierci.

Uszkodzenia powodowane przez wolne rodniki są jednak kontrolowane przez enzymy antyoksydacyjne i endogenne antyoksydanty. Jeżeli rodniki te występują w dużych ilościach to dochodzi do zaburzeń w tej kontroli i powstaje sytuacja określana mianem stresu oksydacyjnego.

Jednym z mierzalnych indykatorów wielkości stresu oksydacyjnego jest glutation. Trójpeptyd ten w normalnie funkcjonujących komórkach występuje w odpowiednio wysokiej koncentracji. Spełnia w nich ważne funkcje ochronne, między innymi przez to, że działa jako nukleofilowa pułapka elektrofili, jako reduktant i jako kofaktor enzymów antyoksydacyjnych; GSH-Px i transferaz S-glutationowych, które bezpośrednio uczestniczą w usuwaniu nadtlenu wodoru, toksycznych produktów peroksydacji lipidów i ksenobiotyków.

Poziom GSH zależy od dostępności cysteiny, tempa jego syntezy i wewnątrzkomórkowej utylizacji, a także od tempa jego eksportu i importu przez komórki. Jest niezwykle interesujące, że w normalnych warunkach fizjologicznych wzrost ilości generowanych wolnych rodników jest zawsze równoległy do spadku zawartości tego trójpeptydu w komórce. Dlatego też spadek zawartości GSH świadczy o obecności i, co więcej, o wielkości stresu oksydacyjnego. Po ustąpieniu stresu poziom GSH zazwyczaj powraca do normy, gdyż komórki dążą do utrzymania odpowiednio wysokiego i stałego poziomu tego trójpeptydu. Powrót do poziomu fizjologicznego, w sytuacji ustąpienia stresu oksydacyjnego, zależy także od dostępności budujących go substratów, głównie cysteiny i od poziomu ATP. Dlatego też jeżeli poziom ten nie powraca do normy, pomimo obecności odpowiedniej ilości substratów, to świadczy to o niewydolności głównie mitochondrii, które zostały uszkodzone w czasie działania czynników wywołujących stres oksydacyjny.

Można z całą pewnością stwierdzić, że GSH uczestniczy w licznych i istotnych procesach niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Komórki z niską zawartością GSH mają podniesiony poziom RFT. Od jego poziomu zależy nie tylko wielkość stresu oksydacyjnego, ale także błędne odpowiedzi komórek i ich programowana śmierć. Słusznie więc pisali Halliwell i Cros w 1991 roku, że GSH minimalizuje oksydacyjne uszkodzenia i że od jego poziomu zależy oporność komórki na oksydanty.

W przeprowadzonych badaniach u *R. esculenta* L. w okresie zimowania żab wykazano, że:

1. Badane narządy *R. esculenta* L. charakteryzują się stosunkowo niskim poziomem GSH. Poziom ten jest jednak poziomem fizjologicznym i wystarczającym dla ochrony komórek płazów przed wolnymi rodnikami, generowanymi także, choć z odpowiednio mniejszym natężeniem w tym okresie. O tym, że jest to poziom fizjologiczny wydaje się świadczyć fakt, że można go jeszcze obniżyć przez wywołanie silnego stresu oksydacyjnego (podanie etanolu, naświetlanie UVA).

2. Niski poziom GSH w okresie zimowania żaby wodnej świadczy o wyraźnym zahamowaniu metabolizmu płaza. Zahamowanie to jest spowodowane niską temperaturą otoczenia i wysokim poziomem glukozy, które to czynniki u zwierząt poikilotermicznych decydują o ich aktywności metabolicznej. Adaptowanie badanych płazów do temperatury 14°C

powoduje wyraźny wzrost poziomu GSH w badanych narządach. Niski poziom GSH zapewne odzwierciedla niskie tempo wewnątrzkomórkowej oksydacji u płazów w tym okresie.

3. U płazów adaptowanych do wyższej temperatury (14°C) podanie allopurynolu (inhibitor oksydazy ksantynowej, zmiatacz RFT) i witaminy E (zmiatacz RFT) powoduje dodatkowy wzrost ilości GSH w porównaniu z płazami zimującymi w naturalnych warunkach środowiska w temperaturze 4°C. Allopurynol poza tym, że hamuje powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego, to podobnie jak witamina E zmiata powstające RFT. Obydwa te antyoksydanty wspomagają antyoksydacyjne funkcje GSH.

4. Niski poziom GSH u *R. esculenta* L. w okresie zimowania zależy także od niedostatku substratów budujących jego cząsteczkę (płazy nie pobierają pokarmu) i od temperatury otoczenia (4°C), która hamuje aktywność enzymów uczestniczących w jego syntezie. U płazów w tej temperaturze obserwowano wysokie wartości poziomu GSSG. Jest to zapewne spowodowane zahamowaniem aktywności reduktazy glutationowej, która katalizuje cykliczną reakcję redukcji GSSG do GSH.

5. Egzogenne podanie estru monoetylowego glutationu i kwasu L-2-oksoizolidyno-4-karboksylowego związków dostarczających cysteinę niezbędną do syntezy GSH powoduje wzrost poziomu endogennego GSH u płazów adaptowanych do wyższej temperatury (14°C). Wyższa temperatura powoduje wzrast aktywności enzymów uczestniczących w syntezie GSH. W tej temperaturze stwierdzono po podaniu OTC i estru monoetylowego GSH także spadek ilości GSSG w porówniu ze zwierzętami pochodzącymi z temperatury 4°C. Można więc manipulować poziomem GSH i GSSG u płazów przez zmianę temperatury otoczenia lub przez dostarczanie substratów budujących cząsteczkę GSH. Jednak temperatura wydaje się być jednym z najważniejszych czynników decydujących o statusie GSH w mózgu, wątrobie i nerkach *R. esculenta* L. w okresie zimowania.

6. Pośrednim wskaźnikiem wieku płazów jest m. in. długość ciała. Długość ta jest u *R. esculenta* L. ujemnie skorelowana z poziomem GSH i dodatnio z ilością GSSG. Generalnie u osobników o największej długości ciała obserwowano niski poziom GSH i odpowiednio wysoki GSSG we wszystkich badaniach. Podobnie jak u ssaków, starośći płazów towarzyszy wzrost wielkości stresu oksydacyjnego.

7. Etanol u *R. esculenta* L., podobnie jak u ssaków, wywołuje silny stres oksydacyjny. W wyniku tego stresu obniża się ilość GSH i wzrasta poziom GSSH. U badanego gatunku płaza czynniki powodujące wzrost ilości GSH powodują równoczesny spadek ilości GSSG, odwrotnie te które obniżają zawartość GSH stymulują wzrost ilości GSSG.

8. Odpowiedni poziom GSH jest istotny dla funkcjonowania innych ważnych antyoksydacyjnych ochronnych mechanizmów w komórkach u *R. esculenta* L.

9. Można sugerować, że w roztworach, w których przetrzymuje się przeszczepiane narządy ważną antyoksydacyjną rolę może pełnić obok allopurynolu (inhibitor oksydazy ksantynowej) także glutation (zmiatacz wolnych rodników, nieenzymatyczny antyoksydant). Wprawdzie z ostatnich danych wynika, że podjęto próby stosowania tego trójpeptydu przy sporządzaniu np. roztworu Carolina B, stosowanego do przechowywania wątroby czy serca (Lenasters i Thurman 1997), lecz ostatecznie nie rozwiązano problemu optymalnej temperatury roztworu i odpowiedniej ilości GSH w składzie tego medium. Jest to niezwykle ważne, gdyż chodzi o to, aby pobrane narządy mogły być przetrzymywane odpowiednio długo i aby po ich przeszczepieniu nie następowały rozległe uszkodzenia w okresie reperfuzji.

Na podstawie przeprowadzonych badań można sugerować, że u *R. esculenta* L. poziom GSH w okresie zimowania zależy od takich czynników, jak: temperatura, poziom glukozy, dostępność substratów budujących cząsteczkę GSH (głównie cysteiny), od ilości innych antyoksydantów, które chronią pulę glutationu przed utlenianiem (witamina E, allopurynol), dotlenienia organizmu, wieku i czynników bezpośrednio wywołujących stres oksydacyjny. Antyoksydacyjna ochrona komórek i tkanek przez GSH jest powiązana z innymi fizjologicznymi mechanizmami towarzyszącymi zimowaniu. Mechanizmy te w hipotermii obniżają oksydacyjny metabolizm płaza, przez co minimalizują produkcję RFT i utylizację GSH. Dzięki temu pomimo niekorzystnych warunków zewnętrznych utrzymywany jest odpowiedni status glutationu, wystarczający dla antyoksydacyjnej ochrony komórek i tkanek płazów.

## Streszczenie

U dojrzałych płciowo samców *Rana esculenta* L. w okresie zimowania oznaczano poziom GSH w mózgu, sercu, wątrobie, nerkach po podaniu insuliny oraz estru monoetylowego glutationu, a także w sercu, nerkach i wątrobie po podaniu allopurynolu, jak również w mózgu, wątrobie, nerkach i skórze po naświetlaniu UVA.

Podanie insuliny płazom adaptowanym do temperatury 14°C spowodowało wyraźny spadek ilości glukozy w surowicy krwi i równoczesny wzrost zawartości GSH w badanych narządach. Na podstawie uzyskanych wyników sugeruje się, że poziom GSH w badanych narządach w okresie zimowania jest odwrotnie proporcjonalny do poziomowi glukozy.

W tych samych narządach u 70 dojrzałych płciowo samców *R. esculenta* L. również pochodzących z okresu zimowania wykazano, że podanie estru monoetylowego glutationu płazom przebywającym w temperaturze 4°C nie zmieniło poziomu GSH w przeciwieństwie do płazów adaptowanych do temperatury 14°C. U tych ostatnich stwierdzono statystyczny wzrost ilości GSH w mózgu po 12 godz., wątrobie po 12 i 24 godz., nerkach i sercu po 4, 12 i 24 godz. od momentu podania estru monoetylowego glutationu. Po 48 godz. od podania estru monoetylowego glutationu zawartość GSH powróciła do wartości zbliżonych do kontroli. W pracy wykazano, że można manipulować poziomem GSH u badanych płazów w okresie zimowania przez zmianę temperatury i przez podanie substratu GSH.

Zaadaptowanie żab do wyższej temperatury (14°C) w okresie zimowania i podanie allopurynolu spowodowało wzrost zawartości GSH w sercu, nerkach i wątrobie. Nie wykazano takiego wzrostu u płazów przebywających w temperaturze zimowiska (4°C). Na podstawie uzyskanych wyników sądzi się, że allopurynol korzystnie wpływa na zawartość GSH w badanych narządach żaby wodnej.

Również w okresie zimowania badane płazy adaptowano do temperatury 14°C i naświetlano UVA przez 70 min. i 140 min. U badanych płazów oznaczano zawartość GSH w mózgu, wątrobie, nerkach i skórze po upływie 12 i 48 godzin od momentu zakończenia ekspozycji żab na UVA.

Po 12 godzinach w obydwóch grupach eksponowanych na UVA stwierdzono statystyczny spadek zawartości GSH, natomiast po 48 godzinach powrót do wartości zbliżonych do kontrolnych.

Na podobnym materiale i w takich samych warunkach eksperymentalnych oznaczano poziom GSH, a także GSSG w mózgu, wątrobie i nerkach u 40 samców *R. esculenta* L. o różnej długości ciała. Wykazano, że wraz ze wzrostem długości ciała płazów obniża się zawartość GSH i wzrasta poziom GSSG. W związku z powyższym dyskutowany jest problem zmian ilości GSH związanych ze zjawiskiem starzenia się organizmu.

Badano również wpływ prekursora GSH, kwasu L-2-oksotiazolidyno-4-karboksyowego (OTC) na poziom GSH i GSSG w mózgu, wątrobie i nerkach. Podanie OTC spowodowało wzrost ilości GSH tylko u płazów zaadaptowanych do temperatury 14°C i równoczesny spadek ilości GSSG.

W wątrobie, nerkach i sercu samców *R. esculenta* L. oznaczano ilość GSH i GSSG po podaniu witaminy E. Podanie witaminy E płazom przebywającym w temperaturze 4°C nie spowodowało wzrostu zawartości GSH, a tylko statystyczny spadek ilości GSSG. U płazów zaadaptowanych do temperatury 14°C podanie witaminy E spowodowało wzrost ilości GSH i spadek zawartości GSSG, po 12 i 24 godzinach od momentu podania witaminy. Po 48 godzinach uzyskane wartości GSH i GSSG w wątrobie i sercu (z wyjątkiem nerek) zbliżyły się do wartości kontrolnych. W pracy dyskutowana jest ochronna rola witaminy E w organizmie.

Z powodu kontrowersyjnych danych dotyczących wpływu etanolu na status glutationu, badano także jego wpływ na zmiany ilości GSH i GSSG w mózgu, wątrobie i nerkach badanego gatunku płaza w okresie zimowania. Podobnie jak w przypadku podania insuliny, estru monoetylowego glutationu, allopurynolu, kwasu L-2-oksotiazolidyno-4-karboksyowego czy witaminy E badania przeprowadzono w dwóch grupach eksperymentalnych: u płazów pochodzących z temperatury 4°C i takich, które zaadaptowano do temperatury 14°C. Podanie etanolu wywołało spadek ilości GSH w wątrobie i nerkach u zwierząt zaadaptowanych do temperatury 14°C i wzrost ilości GSSG we wszystkich badanych narządach, również w obydwóch grupach doświadczalnych. Uzyskane wyniki sugerują, że etanol obniża status redoksyowy glutationu w komórkach badanych narządów.

## Wykaz skrótów

GSH – glutation zredukowany

GSSG – glutation utleniony

GSH-Px – peroksydaza glutationowa

SOD – dysmutaza ponadtlenkowa

NO – tlenek azotu

$O_2^{\cdot -}$  – anionorodnik ponadtlenkowy

$^{\cdot}OH$  – rodnik wodorotlenowy

RFT – reaktywne formy tlenu

OTC – kwas L-2-oksotiazolidyno-4-karboksyłowy

BSO – butionina sulfoksyniny

XD – dehydrogenaza ksantynowa

XO – oksydaza ksantynowa



## Literatura

- Aebi S., Assereto R., Lauterburg B. H. 1991. *High-dose intravenous glutathione in man. Pharmacokinetics and effects on cyst(e)ine in plasma and urine.* Eur. J. Clin. Invest. 21: 103-110.
- Allen R. G., Venkatraj V. S. 1992. *Oxidants and antioxidants in development and differentiation.* J. Nutr. 122: 631-635.
- Antébi H., Ribière C., Sinaceur J., Abu-Murad C., Nordmann R. 1984. *Involvement of oxygen radicals in ethanol oxidation and in the ethanol-induced decrease in liver glutathione.* In *Oxygen Radicals in Chemistry and Biology* (Bors W., Saran M., Tait D. eds), pp. 757-760. Berlin, Walter de Gruyter and Co.
- Applegate L. A., Frenk E. 1955. *Cellular defence mechanism of the skin against oxidant stress and in particular UVA radiation.* Eur. J. Dermatol. 5: 97-103.
- Armstrong D., Al-Awadi F. 1991. *Lipid peroxidation and retinopathy in streptozocin-induced diabetes.* Free Rad. Biol. Med. 11: 433-436.
- Arrick B. A., Nathan C. F., Griffith O. W., Cohn Z. A. 1982. *Glutathione depletion sensitizes tumor cells to oxidative cytotoxicity.* J. Biol. Chem. 257: 1231-1237.
- Arrick B. A., Nathan C. F. 1984. *Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: A review.* Cancer Res. 44: 4224-4232.
- Aw T. Y., Jones D. P. 1982. *Secondary bioenergetic hypoxia. Inhibition of sulfation and glucuronidation reactions in isolated hepatocytes at low O<sub>2</sub> concentration.* J. Biol. Chem. 257: 8997-9004.
- Babior B. M., Kipnes R. S., Curnutte J. T. 1973. *Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent.* J. Clin. Invest. 52: 741-744.
- Baker G. L., Autor A. P., Corry R. J. 1985. *Effect of allopurinol on kidneys after ischemia and reperfusion.* Curr. Surg. 42: 466-469.
- Barja de Quiroga C., Perez-Campo R., López-Torres M. 1990. *Antioxidant defenses and peroxidation in liver and brain of aged rats.* Biochem. J. 272: 247-250.
- Barreau E., Brossas J. Y., Courtois Y., Treton J. A. 1996. *Accumulation of mitochondrial DNA deletions in human retina during aging.* Invest. Ophthalm. Vis. Sciences 37: 384-391
- Bartosz G. 1995. *Druga twarz tlenu.* PWN Warszawa.
- Bautista A. P., Spitzer J. J. 1992. *Acute ethanol intoxication stimulates superoxide anion production by in situ perfused rat liver.* Hepatology 15: 892-898.

- Becker B. F. 1993. *Towards the physiological function of uric acid*. Free Radic. Biol. Med. 14: 615-631.
- Bellomo G., Jewell S. A., Thor H., Orrenius S. 1982. *Regulation of intracellular calcium compartmentation: Studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79: 6842-6846.
- Benzi G., Pastoris O., Marzatico F., Villa R. F. 1988. *Influence of aging and drug treatment on the cerebral glutathione system*. Neurobiol. Aging 9: 371-375.
- Benzi G., Curti D., Marzatico F., Pastoris O. 1991a. *Age-related acute depletion of cerebral glutathione by peroxidative stress*. J. Neurosci. Res. 29: 527-532.
- Benzi G., Pastoris O., Gorini A., Marzatico F., Villa R. F., Curti D. 1991b. *Influence of aging on the acute depletion or reduced glutathione induced by electrophilic agents*. Neurobiol. Aging 12: 227-231.
- Bhuyan K. C., Bhuyan D. K., Santos O., Podos S. M. 1992. *Antioxidant and anticatarogenic effects of topical captopril in diquat-induced cataract in rabbits*. Free Rad. Biol. Med. 12: 251-261.
- Bier H., Hoffmann T., Eickelmann P., Hafner D. 1996. *Chemosensitivity of head and neck squamous carcinoma cell lines as not primarily correlated with glutathione level but is modified by glutathione depletion*. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122: 653-658.
- Bissett D. L., Hillebrand G. G., Hannon D. P. 1989. *The hairless mouse as a model of skin photoaging: its use to evaluate photoprotective materials*. Photodermatology 6: 228-233.
- Black H. S. 1987. *Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage*. Photochem. Photobiol. 46: 213-221.
- Blum J., Fridovich I. 1985. *Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical*. Arch. Biochem. Biophys. 240: 500-508.
- Bousignone A., De Flora A. 1972. *Regulatory properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase*. Curr. Top. Cell Regul. 6: 21-62.
- Bradford D. F. 1983. *Winterkill, oxygen relations, and energy metabolism of a submerged dormant amphibian, Rana muscosa*. Ecology 64: 1171-1183.
- Brigelius R. 1985. *Mixed disulfides: biological functions and increase in oxidative stress*. In: *Oxidative Stress* (Sies H. ed.) Academic Press, London.
- Burton G. W., Ingold K. U. 1986. *Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function*. Acc. Chem. Res. 19: 194-201.
- Burton G. W., Joyce A., Ingold K. 1983. *Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?* Arch. Biochem. Biophys. 221: 281-290.

- Busa W. B., Nuccitelli R. 1984. *Metabolic regulation via intracellular pH*. American J. Physiol. 246: R409-R438.
- Camporti M. 1985. Biology of disease: *Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury*. Lab. Invest. 53: 599-623.
- Canty A., Driedzic W. R., Storey K. B. 1986. *Freeze tolerance of isolated ventricle strips of the wood frog, Rana sylvatica*. Cryo. Letters. 7: 81-86.
- Cederbaum A. I., Rubin E., 1976. *Protective effect of cysteine on the inhibition of mitochondrial functions by acetylaldehyde*. Biochem. Pharmacol. 25: 963-973.
- Chan P. H., Epstein C. J., Li Y., Huang T. T., Carlson E., Kinouchi H., Yang G., Kammi H., Mikawa S., Kondo T., Copin J. C., Chen S. F., Chan T., Gafni J., Gobbel G., Reola E. 1995. *Transgenic mice and knockout mutants in the study of oxidative stress in brain injury*. J. Neurotrauma 12: 815-824.
- Chance B., Sies H., Boveris A. 1979. *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol. Rev. 59: 527-605.
- Christon R., Haloui R. B., Durand G. 1995. *Dietary polyunsaturated fatty acids and aging modulate glutathione-related antioxidants in rat liver*. J. Nutr. 125: 3062-3070.
- Connor M. J., Wheeler L. A. 1987. *Depletion of cutaneous glutathione by ultraviolet radiation*. Photochem. Photobiol. 46: 239-245.
- Cooper Jr., Merrill W. W. 1989. *Modulation of endoperoxide product levels and cyclophosphamide-induced injury by glutathione repletion*. J. App. Phys. 67: 2316.
- Corral-Debrinski M., Shoffner J. M., Lott M. T., Kanter K., Wallace D. C. 1991. *Hypoxia is associated with mitochondrial DNA damage and gene induction: implications for cardiac disease*. JAMA. 266: 1812-1816.
- Crough R. K., Gandy S. E., Kimsey G., Galbraith R. A., Galbraith G. M. P., Buse M. G. 1981. *The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs*. Diabetes 30: 235-241.
- Danno K., Horio T., Takigawa M., Imamura S. 1984. *Role of oxygen intermediates in UV-induced epidermal cell injury*. J. Invest. Dermatol. 83: 166-168.
- Degani G., Meltzer A. 1988. *Oxygen consumption of a terrestrial toad (Bufo viridis) and semi-aquatic frog (Rana ridibunda)*. Comp. Biochem. Physiol. 89A: 347-349.
- Deneke S. M., Fanburg B. L. 1989. *Regulation of cellular glutathione*. Am. J. Physiol. 257: L136-L173.
- Deoliveira I. M. V., Deangelis R. C. 1996. *Differential effects of protein restriction on gamma – glutamyltranspeptidase (EC 2.3.2.2) activity in young and mature rats*. Braz. J. Med. Biol. Res. 29: 213-217.
- Dethmars J. K., Meister A. 1981. *Glutathione export by human lymphoid cells: depletion of glutathione by inhibition of its synthesis decreases export and increases sensitivity to irradiation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7492-7496.

- Devi B. G., Schenker S., Mazloum B., Henderson G. I. 1996. *Ethanol-induced oxidative stress and enzymatic defenses in cultured fetal rat hepatocytes*. Alcohol 13: 327-332.
- Dicker E., Cederbaum A. I. 1987. *Hydroxyl radical generation by microsomes after chronic ethanol consumption*. Alcohol. Clin. Exp. Res. 11: 309-314.
- Di Luzio N. R. 1963. *Prevention of the acute ethanol-induced fatty liver by antioxidants*. Physiologist 6: 169-173.
- Di Monte D. A., Sandy M. S., DeLanney L. E., Jewell S. A., Chan P., Irwin I., Langston J. W. 1993. *Age-dependent changes in mitochondrial energy production in striatum and cerebellum of the monkey brain*. Neurodegeneration 2: 93-99.
- Dziubek K. 1985. *Różnice w zawartości glutationu w wybranych narządach Rana temporaria L. i Rana esculenta L.* Kieleckie Studia Biologiczne 2. Fizjologiczne i Genetyczne Mechanizmy Adaptacji. Materiały z III Sympozjum Fizjologii Zwierząt. Cedzyna koło Kielc. 29-31 maja 1984. pp. 73-79.
- Dziubek K. 1987a. *Glutathione metabolism in selected organs of Rana temporaria (L.) in annual cycle and under different stresses. Part I. Dehydration effects*. Acta Biol. Cracov. Ser. Zool. 29: 31-53.
- Dziubek K. 1987b. *Glutathione metabolism in selected organs of Rana temporaria (L.) in annual cycle and under different stresses. Part II. Starvation and temperature effects*. Acta Biol. Cracov. Ser. Zool. 29: 55-68.
- Dziubek K. 1993. *Metabolizm glutationu (GSH) w wybranych narządach żaby trawnej (Rana temporaria L.) w cyklu rocznym i w warunkach działania różnych czynników stresotwórczych*. Prace Monograficzne WSP w Krakowie nr 164: 1-89.
- Eggleston L. V., Krebs H. A. 1974. *Regulation of the pentose phosphate cycle*. Biochem J. 138: 425-435.
- Eklów L., Moldéus P., Orrenius S. 1984. *Oxidation of glutathione during hydroperoxide metabolism*. Eur. J. Biochem. 138: 459-463.
- Ekström G., Ingelman-Sundberg M. 1989. *Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450 II E 1)*. Biochem. Pharmacol. 38: 1313-1319.
- Ellman G. L. 1959. *Tissue sulfhydryl groups*. Arch. Biochem. Biophys. 82: 70-77.
- Enninge I. C., Groenendijk R. T. L., Filon A. R., van Zeeland A. A., Simons J. W. I. M. 1986. *The wavelength dependence of UV – induced pyrimidine dimer formation, cell killing and mutation induction in human diploid skin fibroblasts*. Carcinogenesis 7: 1829-1836.
- Farber J.L. 1994. *Mechanisms of cell injury by activated oxygen species*. Environ. Health Perspect. 102 (Supl. 10): 17-24.
- Farber J. L., Kyle M., Coleman J. B. 1990. *Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species*. Lab. Invest. 62: 670-679.

- Farooqui M. H. Y., Day W. W., Zamorano O. M. 1987. *Glutathione and lipid peroxidation in the aging rat*. Comp. Biochem. Physiol. 88B: 177-180.
- Fischer-Nielsen A., Poulsen H. E., Hansen B. A., Tygstrup N., Keiding S. 1989. *Age dependence of rat liver function measurements*. J. Hepat. 9: 190-197.
- Fisher D. B., Kaufman S. 1973. *Tetrahydropterin oxidation without hydroxylation catalyzed by rat liver phenylalanine hydroxylase*. J. Biol. Chem. 248: 4300-4304.
- Flagg E. W., Coates R. J., Jones P., Eley J. W., Gunter E. W., Jackson B., Greenberg R. S. 1993. *Plasma total glutathione in humans and its association with demographic and health-related factors*. Br. J. Nutr. 703: 797-808.
- Flohé L. 1989. *The selenoprotein glutathione peroxidase*. In *Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects* (D. Dolphin, R. Poulson, and O. Avramovic, eds), Vol. 3A, pp. 643-731. Wiley, New York.
- Forbes P. D. 1986. *Relative effectiveness of UVA and UVB for photocarcinogenesis*. In: *The biological effects of UVA radiation* (Urbach F., Gange R.W. eds). New York: Praeger Publishers, USA.
- Franco D. P., Jenkinson S. G. 1986. *Rat lung microsomal lipid peroxidation: effect of vitamin E and reduced glutathione*. J. Appl. Physiol. 61: 785-790.
- Fukagawa N. K., Ajami A. M., Young V. R. 1996. *Plasma methionine and cysteine kinetics in response to an intravenous glutathione infusion in adult humans*. Am. J. Physiol. 270: E209-E213.
- Fukuzawa K., Gebicki J. M. 1983. *Oxidation of  $\alpha$ -tocopherol in micelles and liposomes by the hydroxyl, perhydroxyl and superoxide free radicals*. Arch. Biochem. Biophys. 226: 242-251.
- Garcia J. G., Rollan C. M., Mar E. 1990. *Improved survival in intestinal ischemia by allopurinol not related to xanthine oxidase inhibition*. J. Surg. Res. 48: 144-146.
- Gilbert H. F. 1984. *Redox control of enzyme activities by thio/disulfide exchange*. Meth. Enzymol. 107: 330-351.
- Gille G., Sigler K. 1995. *Oxidative stress and living cells*. Folia Microbiologica 40: 131-152.
- Godar D. E. 1996. *Preprogrammed and programmed cell death mechanisms of apoptosis: UV-induced immediate and delayed apoptosis*. Photochem. Photobiol. 63: 825-830.
- Griffith O. W. 1981. *Depletion of glutathione by inhibition of biosynthesis*. Methods. Enzymol. 77: 59-64.
- Guarnieri C., Ferrari R., Visioli O. 1978. *Effect of  $\alpha$ -tocopherol on hypoxic perfused and reoxygenated rabbit heart muscle*. J. Mol. Cell Cardiol. 10: 893-906.
- Guarnieri C., Flamigni F., Rossoni Calderera C. 1982. *Myocardial mitochondrial functions in  $\alpha$ -tocopherol-deficient and re-fed rabbits*. Adv. Myocardiol. 3: 621-627.

- Guarnieri C., Muscari C., Farticelli A. 1988. *Role of antioxidants in hypoxia-reoxygenation injury in the heart and in cardiac myocytes. In Oxygen Radicals in the Pathophysiology of Heart Disease.* (Signal P.K. ed.), pp. 271-283. Kluwer Academic Publishers.
- Halliwell B. 1990. *How to characterize a biological antioxidant.* Free Radic. Res. Comm. 9: 1-32.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 1986. *Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts.* Arch. Biochem. Biophys. 246: 501-514.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C., Crass C. E. 1992. *Free radicals, antioxidants and human disease: where are now?* J. Lab. Clin. Med. 119: 598-620.
- Hanada K., Gande R. W., Connor M. J. 1991. *Effect of glutathione depletion on sunburn cell formation in the hairless mouse.* J. Invest. Dermatol. 96: 838-840.
- Harding J. 1970. *Free and protein-bound glutathione in normal and cataractous human lenses.* Biochem. J. 117: 957-960.
- Harman D. 1956. *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.* J. Gerontol. 11: 298-300.
- Hashimoto S., Recknagel R. O. 1968. *No chemical evidence of hepatic lipid peroxidation in acute ethanol toxicity.* Exp. Mol. Pathol. 8: 225-242.
- Hayakawa M., Kuzuya F. 1990. *Free radicals and diabetes mellitus.* Nippon Ronen Igakkai Zasshi 27(2): 149-154.
- Hochachka P. W., Guppy M. 1987. *Metabolic Arrest and the Control of Biological Time,* pp. 5-10. Cambridge: Harvard University Press.
- Hum S., Koski K. G., Hoffer L. J. 1992. *Varied protein intake alters glutathione metabolism in rats.* J. Nutr. 122: 2010-2018.
- Iantomasi T., Favilli F., Marraccini P., Stio M., Treves C., Quatrome A., Capaccioli S., Vincenzini M. T. 1993. *Age and GSH metabolism in rat cerebral cortex, as related to oxidative and energy parameters.* Mech. Ageing Dev. 70: 65-82.
- Imlay J. A., Chin S. M., Linn S. 1988. *Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro.* Science 240: 640-642.
- Irita K., Okabe H., Koga A., Kurosawa K., Tagawa K., Yamakawa M., Yoshitake J., Takahashi S. 1994. *Increased sinusoidal efflux of reduced and oxidized glutathione in rats with endotoxin/D-galactosamine hepatitis.* Circ. Shock 42: 115-120.
- Ishikawa T., Sies H. 1989. *Glutathione as an antioxidant: toxicological aspects. In Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects* (Dolphin D., Poulson R., and Avramovic C. eds), Vol. 3B, pp. 85-109. Wiley, New York.
- Jackson D. C. 1978. *Respiratory and CO<sub>2</sub> conductance: Temperature effects in a turtle and a frog.* Respiration Physiol. 33: 103-114.

- Jahoor F., Wykes L. J., Reeds P. J., Henry J. F., Del Rosario M. P., Frazer M. E. 1995. *Protein-deficient pigs cannot maintain reduced glutathione homeostasis when subjected to the stress of inflammation*. *Biochemical and Molecular Roles of Nutrients*. pp. 1462-1472.
- Jamieson D., Kerr D. R., Unsworth B. 1987. *Interaction of N-acetylcystein and bleomycin on hyperbaric oxygen-induced lung damage in mice*. *Lung* 165: 239-247.
- Jamme I., Petit E., Divoux D., Gerbi A., Maixent J. M., Nouvelot A. 1995. *Modulation of mouse cerebral Na<sup>+</sup>, K<sup>-</sup> - ATPase activity by oxygen free radicals*. *NeuroReport* 7: 333-337.
- Jocelyn P. C. 1975. *Some property of mitochondrial glutathione*. *Biochim. Biophys. Acta* 369: 427-436.
- Jones D. P., Moldéus P., Stead H., Ormstad K., Jörnvall H., Orrenius S. 1979. *Metabolism of glutathione and a glutathione conjugate by isolated kidney cells*. *J. Biol. Chem.* 254: 2787-2792.
- Jurima-Romet M., Abbott F. S., Tang W., Huang H. S., Whitehouse L. W. 1996. *Cytotoxicity of unsaturated metabolites of valproic acid and protection by vitamins C and E in glutathione-depleted rat hepatocytes*. *Toxicology* 112: 69-85.
- Kalyjian R. C., Skowron G., Emgushov R., Chance M., Spell S. A., Borum P. R., Webb L. S., Mayer K. H., Jackson J. B., Yen-Lieberman B., Story K. O., Rowe W. B., Thompson K., Goldberg D., Trimbo S., Lederman M. M. 1994. *A phase I/II trial of intravenous L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid (procysteine) in asymptomatic HIV-infected subjects*. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 7: 369.
- Kato S., Kawase T., Alderman J., Inatori N., Lieber C. S. 1990. *Role of xanthine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation*. *Gastroenterology* 98: 203-210.
- Kawada J. 1992. *New hypotheses for the mechanisms of streptozotocin and alloxan inducing diabetes mellitus*. *Yakugaku Zasshi* 112(11) 733-791.
- Kedderis G.L. 1996. *Biochemical basis of hepatocellular injury*. *Toxicol. Pathol.* 4: 77-83.
- Ketterer B., Meyer D. J. 1989. *Glutathione transferases: A possible role in the detoxification of repair of DNA and lipid hydroperoxides*. *Mutat. Res.* 214: 33-40.
- Ketterer B., Meyer D. J., Clark A. G. 1988. *Soluble glutathione transferase isozymes*. In: *Glutathione Conjugation: Mechanisms and Biological Significance* (H. Sies, and B. Ketterer, eds), pp. 73-135. Academic Press, San Diego.
- Keyse S. M., Tyrrell R. M. 1989. *Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide and sodium arsenite*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 99-103.
- Klein H. H. 1995. *Vitamin E cannot protect myocardium against oxidative damage*. *Cardiovasc. Res.* 30: 156-157.

- Klein A. S., Joh J. W., Rangan U., Wang D., Bulkley G. B. 1996. *Allopurinol: discrimination of antioxidant from enzyme inhibitory activities*. Free Rad. Biol. Med. 21: 713-717.
- Knekt P., Aromaa A., Maatala J., Aran R. K., Nikkari T., Hakulinen T., Peto R., Saxen E., Teppo L. 1988. *Serum vitamin E and risk of cancer among Finnish men during a 10-year follow up*. Am. J. Epidemiol. 127: 28-41.
- Kocak-Toker N., Uysal M., Aykac G., Sivas A., Yalcin S., Oz H. 1985. *Influence of acute ethanol administration on hepatic glutathione peroxidase and glutathione transferase activities in the rat*. Pharmacol. Res. Commun. 17: 233-239.
- Koch O. R., Boveris A., Sirotsky de Favelukes S., Schwarcz de Tarlovsky M., Stoppani A. O. M. 1977. *Biochemical lesions of liver mitochondria from rats after chronic alcohol consumption*. Exp. Mol. Pathol. 27: 213-220.
- Kohno T., Yamada Y., Hata T., Mori H., Yamamura M., Tomonaga M., Urata Y., Goto S., Kondo T. 1996. *Relation of oxidative stress and glutathione synthesis to CD95 (Fas/APO-1) – mediated apoptosis of adult T cell leukemia cells*. J. Immunol. 156: 4722-4728.
- Kondo T., Dale G. L., Beutler E. 1995. *Glutathione: Thiol transport from human red blood cells*. Methods Enzymol. 252: 72-82.
- Kono Y., Fridovich I. 1982. *Superoxide radical inhibits catalase*. J. Biol. Chem. 257: 5751-5754.
- Kosower N. S., Kosower E. M. 1976. *Glutathione metabolism and function* (Arias J.M., and Jacoby W.B. eds), pp. 159-174.
- Kosower E. M., Kosower N. S. 1978. *The glutathione status of cells*. Int. Rev. Cytol. 54: 109-160.
- Kraner R. A., Zakher J., Kim G. 1988. *Role of glutathione redox cycle in acquired and de novo multi-drug resistance*. Science 241: 694-697.
- Kunisaki M., Umeda F., Inoguchi T. 1992. *Vitamin E binds to specific binding sites and enhances prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells*. Thromb. Haemost. 68: 744-751.
- Kurose I., Higuchi H., Kato S., Miura S., Ishi H. 1996. *Ethanol-induced oxidative stress in the liver*. Alcohol. Clin. Exp. Res. 20: 77A-85A.
- Lang C. A., Naryshkin S., Schneider D. L., Miles B. J., Lindeman R. D. 1992. *Low blood glutathione levels in healthy aging adults*. Lab. Clin. Med. 120: 720-725.
- Larsson A., Orrenius S., Homgren A., Mannervik B. 1983. *Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects*. Raven Press, New York.
- Lash L. H., Tokarz J. J., Chen Z. F., Pedrosi B. M., Woods E. B. 1995. *ATP depletion by iodoacetate and cyanide in renal distal tubular cells*. J. Pharm. Exp. Ther. 276: 194-205.



- Lautier D., Luscher P., Tyrrell R. M. 1992. *Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UVA radiation/hydrogen peroxide inducible expression of the human heme oxygenase gene*. *Carcinogenesis* 13: 227-232.
- Layne J. R., Romano M. A. 1985. *Critical thermal minima of Hyla chrysoscelis, Hyla cinerea, Hyla gratiosa and natural hybrids H. cinerea x H. gratiosa*. *Herpetologica* 41: 216-221.
- Lemasters J.J., Thurman R.G. 1997. *Reperfusion injury after liver preservation for transplantation*. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 327-338.
- Linetsky M., Ortwerth B. J. 1995. *The generation of hydrogen peroxide by the UVA radiation of a human lens proteins*. *Photochem. Photobiol.* 62: 87-93
- Linetsky M., James H. L., Ortwerth B. J. 1996. *The generation of superoxide anion by the UVA irradiation of human lens proteins*. *Exp. Eye Res.* 63: 67-74.
- Liu P., Fisher M. A., Farhood A., Smith C. W., Jaeschke H. 1994. *Beneficial effects of extracellular glutathione against endotoxin-induced liver injury during ischemia and reperfusion*. *Circ. Shock* 43: 64-70.
- López-Torres M., Perez-Campo R., Rojas C., Cadenas S., Barja G. 1993a. *Simultaneous induction of SOD, glutathione reductase, GSH, and ascorbate in liver and kidney correlates with survival during aging*. *Free Rad. Biol. Med.* 15: 133-142.
- López-Torres M., Perez-Campo R., Fernandez A., Barba C., Barja de Quiroga G. 1993b. *Brain glutathione reductase induction increases early survival and decreases lipofuscin accumulation in aging frogs*. *J. Neurosci. Res.* 34: 234-242.
- Loven D. P., Oberley L. W. 1985. *Free radicals, insulin action and diabetes*. In *Superoxide Dismutase*. (Oberley L.W., ed), pp. 151-190. Disease State. Boca Raton, FL, CRC.
- Lu S. C., Sun W. M., Yi J., Ookhtens M., Sze G., Kaplowitz N. 1996. *Role of two recently cloned rat liver GSH transporters in the ubiquitous transport of GSH in mammalian cells*. *J. Clin. Invest.* 97: 1488-1496.
- Martensson J., Meister A. 1991. *Glutathione deficiency decreases tissue ascorbate levels in newborn rats: ascorbate spares glutathione and protects*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4656-4660
- Martensson J., Han J., Griffith O. W., Meister A. 1993. *Glutathione ester delays the onset of scurvy in ascorbate-deficient guinea pigs*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 317-321.
- Massey K. D., Burton K. P. 1989.  *$\alpha$ -tocopherol attenuates myocardial membrane-related alteration resulting from ischemia and reperfusion*. *Am. J. Physiol.* 256: H192-199.
- Matsumoto S., Teshigawara M., Tsuboi S., Ohmori S. 1996. *Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples using acrylonitrile as a thiol-blocking reagent*. *Analyt. Sciences* 12: 1-9

- Matsuo M., Gomi F., Dooley M. M. 1992. *Age-related alterations in antioxidant capacity and lipid peroxidation in brain, liver, and lung homogenates of normal and vitamin E-deficient rats*. Mech. Ageing Dev. 64: 273-292.
- Meister A. 1983a. *Transport and metabolism of glutathione and gamma-glutamyl amino acids*. Biochem. Soc. Trans. 11: 793-794.
- Meister A. 1983b. *Selective modification of glutathione metabolism*. Science 220: 472-477.
- Meister A. 1984. *New aspects of glutathione biochemistry and transport: selective alteration of glutathione metabolism*. Nutrition Reviews. 42: 3031-3042.
- Meister A. 1985. *The fall and rise of cellular glutathione levels: enzyme-based approaches*. Curr. Top. Cell. Reg. 26: 383-394.
- Meister A. 1988. *Metabolism and function of glutathione. Coenzymes and cofactors*. In: *Glutathione, Chemical, Biochemical, and Medicine Aspects, Part A* (Dolphin, D., Avramovic, O, Poulson R., eds.), vol. 111, pp. 367-474, John Wiley Sons, New York, NY.
- Meister A. 1991. *Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis and its reversal: applications in research and therapy*. Pharmacol. Ther. 51: 155-194.
- Meister A., Anderson M. E. 1984. *Glutathione*. Annu. Rev. Biochem. 52: 711-760.
- Meister A., Anderson M. E., Hwang O. 1986. *Intracellular cysteine and glutathione delivery systems*. J. Am. Coll. Nutr. 5: 137-151.
- Mekiňová D., Chorváthová V., Volkovová A., Staruchová M., Grančičová, Klvanová J. 1995. *Effect of vitamins C, E and  $\beta$ -crotene on the antioxidative status in diabetic rat kidneys*. Biologia, Bratislava 50: 623-627.
- Midander J., Deschavanne P. J., Malaise E. P., Revesz L. 1982. *Survival curves of irradiated glutathione-deficient human fibroblasts: induction of a reduced enhancement of radiosensitivity by oxygen and misonidazole*. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 8: 443-446.
- Mihm S., Ennen J., Pessara V., Kurth R., Droge W. 1991. *Inhibition of HIV-1 replication and NF- $\kappa$ B activity by cysteine and cysteine derivatives*. AIDS 5: 497-503.
- Mitchell J. B., Russo A. 1983. *Thiols, thiol depletion and thermosensitivity*. Radiat. Res. 95: 471-485.
- Moorhouse P. C., Grootveld M., Halliwell B., Quinland J. G., Gutteridge J. M. 1987. *Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers*. FEBS Lett. 213: 23-28
- Moutiez M., Quéméneur E., Sergheraert Ch., Lucas V., Tartar A., Davioud-Charvet E. 1997. *Glutathione-dependent activities of Trypanosoma crucei p52 makes it a new member of the thiol: disulphide oxidoreductase family*. Biochem. J. 322: 43-48.

- Müller A., Gabriel H., Sies H. 1985. *A novel biologically active selenoorganic compound. IV. Protective glutathione-dependent effect of PZ 51 (ebselen) against ADP-Fe induced lipid peroxidation in isolated hepatocytes.* Biochem. Pharmacol. 34: 1185-1189.
- Müller A., Sies H. 1987. *Alcohol, aldehydes and lipid peroxidation: Current notions.* Alcohol Alcohol 1 (Suppl.): 67-74.
- Nakayama T., Kodama M., Nagata C. 1984. *Free radical formation in DNA by lipid peroxidation.* Agric. Biol. Chem. 48: 571-572.
- Nathan C. F., Arrick B. A., Murray H. W., DeSantis N. M., Cohn Z. A. 1981. *Tumor cell antioxidant defenses: inhibition of glutathione redox cycle enhances macrophage-mediated cytotoxicity.* J. Exp. Med. 153: 766-782.
- Niki E., Noguchi N., Tsuchihashi H., Gotoh N. 1995. *Interaction among vitamin C, vitamin E, and  $\beta$ -carotene.* Am. J. Clin. Nutr. 62 (Suppl): 1322S-1326S.
- Nicotera P., Moore M., Mirabelli F., Bellomo G., Orrenius S. 1985. *Inhibition of hepatocyte plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase activity by menadione metabolism and its restoration by thiol.* FEBS Lett. 181: 149-153.
- Nigli H. J., Applegate L. A. 1997. *Glutathione response after UVA irradiation in mitotic and postmitotic human skin fibroblasts and keratinocytes.* Photochem. Photobiol. 65(4): 680-684.
- Nokata K., Kawase M., Ogino S., Kinoshita C., Murata H., Sakaue T., Ogata K., Ohmori S. 1996. *Effects of age on levels of cysteine, glutathione and related enzyme activities in livers of mice and rats and attempt to replenish hepatic glutathione level of mouse with cysteine derivatives.* Mech. Ageing Develop. 90: 195-207.
- Ochi T. 1988. *Effects of glutathione depletion and induction of metallothioneins on the cytotoxicity of an organic hydroperoxide in cultured mammalian cells.* Toxicology 50: 257-268.
- Oeltgen P. R., Walsh J. W., Hamann S. R., Randall D.C., Spurrier W. A., Myers R.D. 1982. *Hibernation „trigger“: opioid-like inhibitory action on brain function of the monkey.* Pharmacol. Biochem. Behav. 17: 1271-1274.
- Olafsdottir K., Reed D. J. 1988. *Toxicological implications.* Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30: 603-631.
- Orwerth B. J., Linetsky M. D., Olsen P. R. 1995. *Ascorbic acid glycation of lens proteins produces UVA sensitizer similar to those in human lens.* Photochem. Photobiol. 62: 454-462.
- Oya Y., Yamamoto K. 1988. *The biological activity of hydrogen peroxide. IV. Enhancement of its elastogenic actions by coadministration of L-histidine.* Mutat. Res. 198: 233-240.

- Palamara A. T., Garaci E., Rotilio G., Ciriolo M. R., Casabianca A., Fraternale A., Rossi L., Schiavano G. F., Chiarantini L., Magnani M. 1996. *Inhibition of murine AIDS by reduced glutathione*. AIDS Res. Human Retrovir. 12: 1373-1381.
- Paller M. S. 1988. *Renal work, glutathione and susceptibility to free radical-mediated postischemic injury*. Kidney Int. 33: 843-849.
- Palozza P., Calviello G., Bartoli G. M. 1995. *Prooxidant activity  $\beta$ -carotene under 100% oxygen pressure in rat liver microsomes*. Free Rad. Biol. Med. 19(6): 887-892.
- Paolicchi A., Pompella A., Tonarelli P., Gadducci A., Genazzani A. R., Zunino F., Pratesi G., Tongiani R. 1996. *Gamma-glutamyltranspeptidase activity in human ovarian carcinoma*. Anticancer Res. 16: 3053-3058.
- Pappalardo G., Guadalaxara A., Maiani G., Illomei G., Trifero M., Frattaroli F. M., Mobarhan S. 1996. *Antioxidant agents and colorectal carcinogenesis: role of  $\beta$ -carotene, vitamin E and vitamin C*. Tumori 82: 6-11.
- Park E. M., Thomas J. A. 1988. *S-thiolation of creatine kinase and glycogen phosphorylase by partially reduced oxygen species*. Biochim. Biophys. Acta. 964: 151-160.
- Park M. K., Rouach H., Orfanelli M. T., Janvier B., Nordmann R. 1988. *Influence of allopurinol and desferrioxamine on the ethanol-induced oxidative stress in rat liver and cerebellum*. In *Alcohol Toxicity and Free Radical Mechanisms* (Nordmann R., Ribière C., Rouach H. eds), Advances in the Biosciences, vol. 71, pp. 135-139. Oxford, Pergamon Press.
- Parrish J. A., Jaenicke K. F., Anderson R. R. 1982. *Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin*. Photochem. Photobiol. 36: 187-191.
- Peak M. J., Peak J. G. 1989. *Solar ultraviolet-light induced damage to DNA*. Photodermatology 6: 1-15.
- Pigeolet E., Corbisier P., Houbion A. 1990. *Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals*. Mech. Ageing Dev. 51: 283-297.
- Poli G. 1993. *Liver damage due to free radicals*. British Medical Bulletin. 49: 604-620.
- Potter D. W., Hinson J. A. 1987. *Mechanisms of acetaminophen oxidation to N-acetyl-p-benzoquinone imine by hemeperoxidase and cytochrome P-450*. J. Biol. Chem. 262: 966-973.
- Potter D. W., Tran T. B. 1992. *Rates of ethyl acrylate binding to glutathione and protein*. Toxicol. Lett. 62: 275-285.
- Punnonen K., Puustinen T., Jansen C. T. 1987. *Ultraviolet B irradiation induces changes in the distribution and release of arachidonic acid, dihomo- $\gamma$ -linolenic acid, and eicosapentaenoic acid in human keratinocytes in culture*. J. Invest. Dermatol. 87: 611-614.

- Puri R. N., Meister A. 1983. *Transport of glutathione as  $\gamma$ -glutamylcysteinylglycyl ester into liver and kidney*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 5258-5260.
- Reddy C. C., Scholz C. E., Thomas C. E., Massaro E. J. 1982. *Vitamin E dependent reduced glutathione inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation*. Life Science. 31: 571-576.
- Reea D. J., Rariss M. 1984. *Glutathione depletion and susceptibility*. Pharmacol. Rev. 36: 255-335.
- Reed D. 1990. *Glutathione: toxicological implications*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30: 603-631.
- Reid A. B., Slater T. B. 1977. *Some effects of ethanol in vivo and in vitro on lipid peroxidation*. Biochem. Soc. Trans. 5: 1292-1294.
- Ribière C., Saffar C., Sabouraukt D., Nordmann R. 1988. *Cerebral and hepatic mitochondrial respiratory functions after chronic ethanol treatment*. Alcohol 23: A71.
- Rice M. E., Lee E. J. K., Choy Y. Y. 1995. *High levels of ascorbic acid, not glutathione, in CNS of anoxia-tolerant reptiles contrasted with levels in anoxia-intolerant species*. J. Neurochem. 64: 1790-1799.
- Richter Ch. 1995. *Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 27: 647-653.
- Robert C., Muel B., Benoit L., Dubertret L., Sarasin A., Stry A. 1996. *Cell survival and shuttle vector mutagenesis induced by ultraviolet A and ultraviolet B radiation in a human cell line*. J. Invest. Dermatol. 106: 721-728.
- Rouse K., Nwokedi E., Woodliff J. E., Epstein J., Klimberg V. S. 1995. *Glutamine enhances selectivity of chemotherapy through changes in glutathione metabolism*. Ann. Surg. 221: 420.
- Rubanyi G. M., Vanhoutte P. M. 1986. *Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor*. Am. J. Physiol. 250: H822-H827.
- Rush E. A., McLaughlin C. L., Solomon A. 1971. *The essentiality of decyclization of pyrrolidonecarboxylic acid prior to utilization in protein biosynthesis*. Cancer Res. 31: 1134.
- Russo A., DeGraff W., Friedman N., Mitchell J. B. 1986. *Selective modulation of glutathione levels in human normal versus tumor cells and subsequent differential response to chemotherapy drugs*. Cancer Res. 46: 2845.
- Ruzicka T. 1988. *The physiology and pathophysiology of eicosanoids in the skin*. Eicosanoids 1: 59-72.
- Salminen A., Kainulainen H., Arstila A. V., Vihko V. 1984. *Vitamin E deficiency and the susceptibility to lipid peroxidation of mouse cardiac and skeletal muscles*. Acta Physiol. Scand. 122: 565-570.

- Salonen J. T., Salonen R., Pappetelainen R., Mäenpää P. H., Alftan G., Puska P. 1985. *Risk of cancer in relation to serum concentrations of selenium and vitamins A and E: matched case-control analysis of prospective data.* Br. Med. J. 290: 417-420.
- Saran M., Bors W. 1991. *Direct and indirect measurements of oxygen radicals.* Klin. Wochenschr. 69: 957-964.
- Saugstad O. D. 1975. *Hypoxanthine as a measurement of hypoxia.* Pediatr. Res. 9: 158-161.
- Saugstad O. D., Schrader H., Aasen A. O. 1976. *Alteration of the hypoxanthine level in cerebrospinal fluid as an indicator of tissue hypoxia.* Brain. Res. 112:188-9
- Schisler N. J., Singh S. M. 1989. *Effect of ethanol in vivo on enzymes which detoxify oxygen free radicals.* Free Radic. Biol. Med. 7: 117-123.
- Schraufstatter I. V., Himshaw D. B., Hyslop P. A., Sprag R. G., Cochrane C. G. 1985. *Glutathione cycle activity and pyridine nucleotide levels in oxidant-induced injury of cells.* J. Clin. Invest. 76: 1131-1139.
- Schubert J., Wilmer J. W. 1991. *Does hydrogen peroxide exist „free” in biological systems?* Free Radic. Biol. Med. 11: 545-555.
- Shan X., Aw T. Y., Smith E. R., Ingelman-Sundberg M., Mannervik B., Iyanagi T., Jones D. P. 1992. *Effect of chronic hypoxia on detoxication enzymes in rat liver.* Biochem. Pharmacol. 43: 2421-2426.
- Shaw C. A., Pasqualotto B. A., Curry K. 1996. *Glutathione-induced sodium currents in neocortex.* Neuro. Report 7: 1149-1152.
- Shindo Y., Witt E., Packer L. 1993. *Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light.* J. Invest. Dermatol. 100: 260-265.
- Sies H. 1993. *Strategies of antioxidant defense.* Eur. J. Biochem 215: 213-219.
- Sies H., Akerboom T. P. M. 1984. *Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues.* Methods Enzymol. 105: 445-451.
- Sinaceur J., Robiére C., Sabourault D., Nordmann R. 1985. *Superoxide formation in liver mitochondria during ethanol intoxication: possible role in alcohol hepatotoxicity.* In: *Free Radicals in Liver Injury* (Poli G., Cheeseman K.H., Dianzani M.U., Slater T.F. eds), pp. 175-177. Oxford, IRL Press.
- Skibba J.L., Gwartney E.A. 1997. *Liver hyperthermia and oxidative stress: role of iron and aldehyde production.* Int. J. Hyperthermia. 13: 215-226.
- Skibba J.L., Powers R.H., Stadnika A., Kalbfleisch J.H. 1988. *The effect of hyperthermia on conversion of rat hepatic xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase.* Biochem. Pharmacol. 37: 4592-4595.
- Slater A. F. G., Stefan C., Nobel I., Vandendobbelsteen D. J., Orrenius S. 1996. *Intracellular redox changes during apoptosis.* Cell Death Diff. 3: 57-62.

- Smith C. V., Jones D. P., Guenther T. M., Lash L. H., Lauterburg B. H. 1996. *Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease*. Toxicol. Applied. Pharm. 140: 1-12.
- Sohal R. S., Allen R. C. 1990. *Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis*. Exp. Gerontol. 25: 499-522.
- Spasić M.B., Saičić Z.S., Buzadžić B., Korać B., Blagojević D., Petrović V.M. 1993. *Effect of long term exposure to cold on the antioxidant defense system in the rat*. Free Rad. Biol. Med. 15: 291-299.
- Staal F. J. T., Roederer M., Herzenberg L. A., Herzenberg L. A. 1990. *Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor KB and transcription of human immunodeficiency virus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 9943-9947.
- Staal F. J. T., Roederer M., Raju P. A., Anderson M. T., Ela S. W., Herzenberg L. A. 1993. *Antioxidants inhibit stimulation of HIV transcription*. Aids Res. Hum. Retrovir. 9: 299-306.
- Stege T. E. 1982. *Acetaldehyde-induced lipid peroxidation in isolated hepatocytes*. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 36: 287-292.
- Steinmetz K. A., Potter J. D. 1991. *Vegetables, fruit and cancer*. I. Epidemiology. Cancer Causes and Control 2: 325-357.
- Stewart J. R., Crute S. L., Loughlin V. 1985. *Prevention of free radical induced myocardial reperfusion injury with allopurinol*. J. Thorac Cardiovasc. Surg. 90: 68-72.
- Stohs S. J., Hassing J. M., Al-Turk W. A., Masoud A. 1980. *Glutathione levels in hepatic and extrahepatic tissues of mice as a function of age*. Age 3: 11-15.
- Stohs S. J., El-Rashidy F. H., Lawson T., Kobayashi R. H., Wulf B. G., Potter J. E. 1984. *Changes in glutathione metabolizing enzymes as a function of age of donor*. Age 7: 3-7.
- Storey J. M., Storey K. B. 1985. *Freeze tolerance in the grey tree frog, Hyla versicolor*. Canadian J. Zool. 63: 49-54.
- Summerfield F. W., Tappel A. L. 1984. *Effects of dietary polyunsaturated fats and vitamin E on aging and peroxidative damage to DNA*. Arch. Biochem. Biophys. 233: 408-416.
- Taniguchi N. 1990. *Superoxide dismutases: significances in aging, diabetes, ischemia and cancer*. Rinsho Byori 38: 876-881.
- Tappel A. L. 1962. *Vitamin E as the biological lipid antioxidant*. Vit. Horm. 20: 493-510.
- Tateishi N., Higashi T., Naruse A., Nakashima K., Shiozaki H., Sakamoto Y. 1977. *Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine*. J. Nutr. 107: 51-60.
- Taylor C. G., Bauman P. F., Sikorski B., Bray T. M. 1992. *Elevation of lung glutathione by oral supplementation of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate protects against oxygen toxicity in protein-energy malnourished rats*. FASEB J. 6: 3101.

- Teramoto S., Fukuchi Y., Vejima Y., Teramoto K., Orimo H. 1994. *Age-related changes in antioxidant screen of distal lung in mice*. Lung 172: 223-230.
- Thompson J. A., Hessel M. L. 1986. *The oxygen free radical system: a fundamental mechanism in the production of myocardial necrosis*. Prog. Cardiovasc Dis. 28: 449-462.
- Thor H., Mirabelli F., Salis A., Cohen G. M., Bellomo G., Orrenius S. 1988. *Alterations in hepatocyte cytoskeleton caused by redox cycling and alkylating quinones*. Arch. Biochem. Biophys. 266: 397-407.
- Torrielli M. V., Gabriel L., Dianzani M. U. 1978. *Ethanol-induced hepatotoxicity; experimental observations on the role of lipid peroxidation*. J. Pathol. 126: 11-25.
- Tran L. T., Miki T., Kamakura M., Izawa S., Tsujimoto Y., Miyabe S., Inoue Y., Kimura A. 1995. *Oxidative stress response in yeast: Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipid hydroperoxide in Hansenula mrakii*. J. Ferment. Bioengi. 80: 606-609.
- Tribble D. L., Jones D. P. 1990. *Oxygen dependence of oxidative stress. Rate of NADPH supply for maintaining the GSH pool during hypoxia*. Biochem. Pharmacol. 39: 729-736.
- Tsuda H., Uehara N., Iwahori Y., Asamoto M., Ligo M., Nagao M., Matsumoto K., Ito M., Hirono I. 1994. *Chemopreventive effects of  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -tocopherol and five naturally occurring antioxidants on initiation of hepatocarcinogenesis by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the rat*. Jpn J. Cancer Res. 85: 1214-1219.
- Tyrell R. M., Pidoux M. 1986. *Endogenous glutathione protects human skin fibroblasts against the cytotoxic action of UVB, UVA and near-visible radiation*. Photochem. Photobiol. 44: 561-564.
- Varma S. D., Kumar S., Richards R. D. 1979. *Light induced damage to ocular lens cation pump. Prevention by vitamin C*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3504-3506.
- Videla L. A., Fernandez V., de Marinis A. 1982. *Liver lipoperoxidative pressure and glutathione status following acetaldehyde and aliphatic alcohols pretreatment of rats*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 104: 965-970.
- Viña J., Estrela J. M., Guerri C., Romero F. J. 1980. *Effect of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes*. Biochem. J. 188: 549-552.
- Wendel A. 1980. *Glutathione peroxidase*. In: *Enzymatic Basis of Detoxication* (Jacoby W. B., Bend J. R., Caldwell J. eds) Academic Press. New York.
- Wefers H., Sies H. 1988. *The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E*. Eur. J. Biochem. 174: 353-357.
- Whitford W. G. 1969. *Heart rate and changes in body fluids in aestivating toads from xeric habitats. In Physiological Systems in Semiarid Environments*, (C. C. Hoff and M.C. Riedesel eds.), pp. 10. Albuquerque: University of New Mexico Press.



- Willett W. C., Polk B. F., Underwood B. A., Stampfer M. J., Pressel S., Rosner B., Taylor J. D., Schneider K., Hames C.G. 1984. *Relation of serum vitamin A and E and carotenoids to the risk of cancer*. New Engl. J. Med. 310: 430-434.
- Williamson J. M., Meister A. 1981. *Stimulation of hepatic glutathione formation by administration of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate, a 5-oxo-L-prolinase substrate*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 936.
- Williamson J. M., Boettcher B., Meister A. 1982. *Intracellular cysteine delivery system that protects against toxicity by promoting glutathione synthesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6246.
- Wilson J. X., Jaworski E. M., Kulaga A., Dixon S. J. 1990. *Substrate regulation of ascorbate transport activity in astrocytes*. Neurochem. Res. 15: 1037-1043.
- Winterbourn C. C., Metodiewa D. 1994. *The reaction of superoxide with reduced glutathione*. Arch. Biochem. Biophys. 314: 284-290.
- Wolff S. P. 1993. *Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications*. Br. Med. Bull. 49: 642-652.





