

ROLE GLUTATHIONU V KLINICKÉ PRAXI

MUDr. et RNDr. Giovanna De Luca,
endokrinolog, Řím, Itálie

Glutathion (γ -glutamyl-cysteinyl-glycin – GSH) je fyziologicky se vyskytující peptid, jehož molekula se skládá z kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu. Je obsažen ve všech eukaryotických buňkách, kde představuje největší rezervoár neproteinových thiolových skupin, jejichž koncentrace se pohybuje v rozmezí od 0,5 do 10 mM^{1,2}.

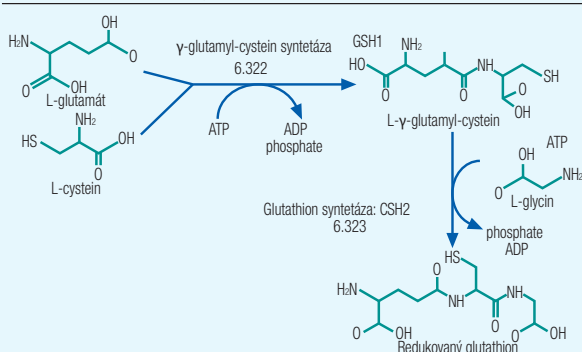
Glutathion je považován za látku nezbytnou pro udržení buněčné homeostázy, přímo či nepřímo zasahuje do různých biologických procesů, jako je např. syntéza proteinů a nukleových kyselin, transport aminokyselin, udržování enzymů v jejich aktivní formě a udržování integrity buněčných membrán^{2,3}.

Je to nejdůležitější nízkomolekulární antioxidant syntetizovaný v buňkách prostřednictvím dvou kroků závislých na adenosintrifosfátu (ATP).

V prvním kroku je syntetizován γ -glutamylcystein z L-glutamátu a cysteinu za účasti enzymu γ -glutamylcystein syntetázy. Rychlost této reakce omezuje syntézu glutathionu.

Ve druhém kroku je glycin připojen k C-konci molekuly γ -glutamylcysteinu pomocí enzymu glutathion syntetázy (Obr. 1)⁴.

Obr. 1 Co je glutathion (GSH): nejsilnější antioxidant a detoxikant (Forman H. J. 2009, mod.).



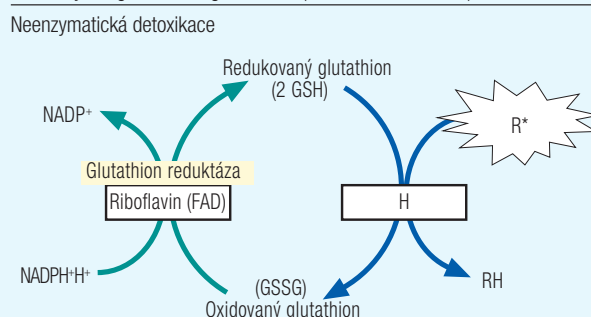
Sulfhydrylová skupina (SH) cysteinu slouží jako dárce protonu a je odpovědná za biologickou aktivitu glutathionu tím, že se podílí na redukčních a konjugačních reakcích, které jsou obvykle považovány za nejdůležitější funkce GSH. Tyto reakce poskytují způsob pro odstranění peroxidů a mnohých xenobiotik⁴.

Glutathion existuje v obou formách – jak v redukované (GSH) tak v oxidované (GSSG) formě⁵. V redukované formě thiolová skupina cysteinu je schopná poskytnout redukční ekvivalent ($H^+ + e^-$) dalším

nestabilním molekulám, jako jsou např. reaktivní sloučeniny kyslíku (ROS). Poskytnutím elektronu se sám glutathion stává reaktivní, ale snadno reaguje s dalším reaktivní molekulou glutathionu za vzniku glutathion disulfidu (GSSG). GSH se pak může regenerovat z GSSG pomocí enzymu glutathion reduktázy (GSR). Ve zdravých buňkách a tkáních je více než 90 % celkového glutathionu přítomno v redukované formě, zbytek ve formě disulfidu⁵.

V reakci na zvýšenou oxidační zátěž glutathion oxiduje na GSSG, který může být zpět redukován na GSH na úkor oxidace NADPH, který se regeneruje prostřednictvím pentózofosfátového cyklu. V cytosolu se poměr redukovaného k oxidovanému GSH pohybuje kolem 100:1. Rozsah oxidace GSH je často používán jako měřítko "oxidačního stresu".

Obr. 2 Fyziologická úloha glutathionu (Exner R. 2000, mod.).



Redukovaná forma zasahuje do detoxikačních procesů jak neenzymatickým, tak i enzymatickým způsobem².

V prvním případě GSH působí jako přímý antioxidant prostřednictvím reakce přenosu vodíkových iontů z volné sulfhydrylové skupiny na molekuly ROS, které jsou tak inaktivovány (Obr. 2)². Ve druhém případě je GSH složkou enzymatického systému, kde GSH peroxidázy (GSH-Px) katalyzují redukcí H_2O_2 a dalších peroxidů oxidací GSH na GSSG, zatímco GSSG reduktáza redukuje GSSG, čímž regeneruje GSH (Obr. 3)².

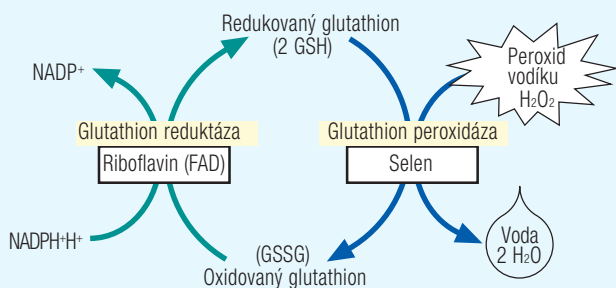
Aby GSH plnil svoji nitrobuňčnou roli, je důležitý enzymatický systém glutathion-S-transferázy (G-ST), která katalyzuje konjugaci GSH s mnoha endogenními a exogenními látkami. G-ST je v největším množství přítomna v hepatocytech, erytrocytech a enterocytech, kde katalyzuje konjugaci GSH s endogenními a exogenními substráty, jako jsou metabolity peroxidace lipidů a volné radikály.

GSH je syntetizován výhradně v cytosolu a distribuován do intracelulárních organel včetně endoplazmatického retikula (ER), jádra a mitochondrií. V buněčném jádru GSH udržuje sulfhydrylové (SH) proteiny, nezbytné pro opravy a expresi DNA⁶, a hraje pomocnou roli při syntéze DNA⁶.

Intracelulárně se GSH vyskytuje především ve své redukované formě – s výjimkou endoplazmatického retikula, kde se vyskytuje hlavně jeho oxidovaná forma – GSSG, která je hlavním zdrojem oxidačních ekvivalentů poskytujících vhodné prostředí pro tvorbu disulfidových vazeb a správnou skladbu syntetizovaných proteinů⁶. V mitochondri-

Obr. 3 Fyziologická úloha glutathionu (Exner R. 2000, mod.).

Enzymatická detoxikace



ích se GSH vyskytuje převážně v redukované podobě a představuje menší část celkových zásob GSH (10-15 %)⁶. Vzhledem k objemu mitochondriální matrix je koncentrace mitochondriálního GSH (mGSH) podobná té, která je v cytosolu (10 až 14 mM)⁶. Mitochondrie jsou typickým příkladem subcelulárních organel, jejichž funkce je úzce spjata s udržením redoxní rovnováhy.

Mitochondrie představují hlavní intracelulární místo spotřeby kyslíku a hlavní zdroj ROS, z nichž většina pochází z mitochondriálního dýchacího řetězce. Následkem této konstantní tvorby ROS jsou mitochondrie zároveň i terčem jejich škodlivých účinků⁶. I za fyziologických podmínek probíhají redukční reakce, které způsobují uvolnění superoxidového aniontu (O₂⁻) a peroxidu vodíku.

Oproti fyziologickému stavu se při patologických stavech nebo intoxikacích, které vedou ke zhoršení mitochondriální funkce, může zvyšovat uvolňování ROS. I když jsou mitochondrie vystaveny působení vytvářených ROS, organela zůstává funkční díky existenci antioxidačního obranného systému, jehož zásadní složkou je mitochondriální GSH (mGSH) a jehož úlohou je zabránit oxidačnímu poškození nebo je napravit, ke kterému dochází během normálního aerobního metabolismu⁶.

Během oxidativního stresu se vytvářejí vysoce reaktivní meziproducty (volné radikály), jako jsou peroxid vodíku, superoxydy a reaktivní sloučeniny dusíku (RNS), které podporují produkci kyslíkových radikálů a které nakonec vedou k poškození buněčné membrány (Tab. I).

Tab. I. Oxidanty a antioxydanty

Nejdůležitější oxidanty	
ROS (reaktivní sloučeniny kyslíku)	RNS (reaktivní sloučeniny dusíku)
O²⁻ superoxid	ONOO⁻ peroxynitrit
OH· hydroxylový radikál	ONOOH kyselina peroxynitridová
H²O² peroxid vodíku	NO² dusitan
	NO oxid dusíku

Nejdůležitější antioxydant

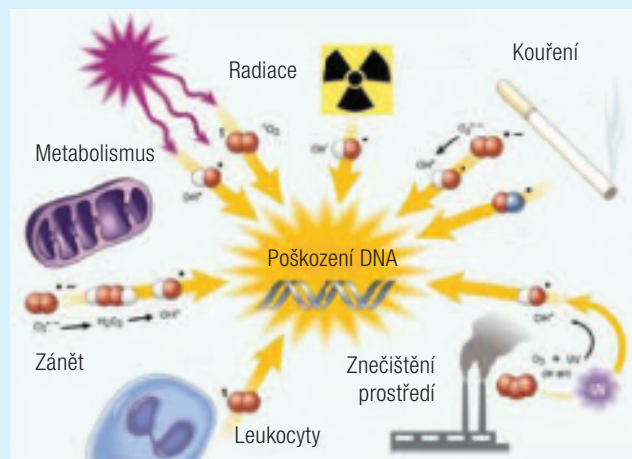
GSH = glutathion

Volné radikály jsou malé, difuzibilní molekuly, které se liší od většiny biologických molekul tím, že obsahují nepárový elektron. Mají tendenci být velmi reaktivní a mohou se podílet na řetězových reakcích, ve kterých může být jediný volný radikál spouštěčem reakcí, které mohou vést k poškození více molekul (Obr. 4,5), 7.

Udržování intracelulární homeostázy glutathionového systému zajišťuje správnou rovnováhu mezi syntézou, degradací, oxidací-redukci a konju-

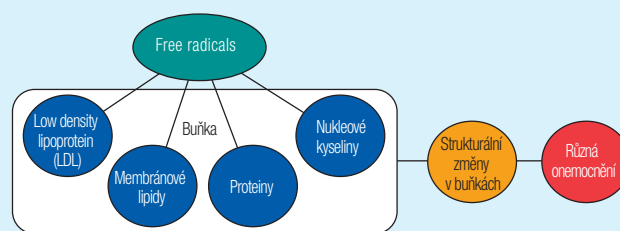
gací s různými elektrofilními substráty a odpovídající rychlostí transportu prekurzorů aminokyselin uvnitř a vně buněk. Tato rovnováha se změní, pokud jsou tkáně vystaveny působení některých léčiv (jako je paracetamol, chemoterapeutika), alkoholu, ionizujícímu záření a dalším dějům, kte-

Obr. 4. Jak se tvoří volné radikály



Obr. 5. Aktivita volných radikálů

Po svém vzniku reagují s jinými molekulami a poškozují hlavní složky buněk:



ré vedou ke snížení koncentrace glutathionu; z toho plynoucí vyčerpání GSH poškozují buněčnou obranyschopnost, což vede k poškození buněk a dokonce i k jejich smrti (Tab. II), 7.

Exogenní podávání GSH může kompenzovat tyto ztráty a umožňuje obnovení ochranných detoxikačních mechanismů. Glutathion není do buněk transportován jako celá molekula; exogenně podaný GSH vede ke zvýšení intracelulární koncentrace prostřednictvím hydrolyzy GSH γ-glutamyl transpeptidázou na aminokyselinové prekurzory, které jsou okamžitě přepravovány do buněk, kde slouží jako substrát pro novou syntézu GSH.

Tab. II. Faktory způsobující vyčerpání glutathionu

Hladinu intracelulárního glutathionu může snížit řada faktorů:

- léčiva, zejména protinádorová chemoterapeutika, paracetamol, antiretrovirotika a další;
- alkohol;
- různé chemické látky;
- podvýživa;
- některé „chronické“ nemoci (nealkoholové poškození jater /NAFLD,NASH/, cystická fibróza, CHOPN a další).

Exogenní podávání GSH tedy zvyšuje tkáňové hladiny GSH prostřednictvím přísunu zdrojových molekul pro syntézu glutathionu „de-novo“.

Glutathion: onemocnění u člověka

Snížené hladiny GSH se vyskytují u mnoha chronických a infekčních nemocí, u kterých oxidativní poškození hraje klíčovou roli i při méně častých patologických stavech, jako je např. hemolytická anémie, aminoacidurie nebo schizofrenie, kde vyčerpání GSH je sekundární díky snížené tvorbě z důvodu polymorfismu s omezenou expresí enzymů potřebných pro syntézu GSH.

Nedostatek GSH je obvykle spojený se stárnutím, cukrovkou, cystickou fibrózou, endotoxemií, cholestázou, chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN), onemocněním jater (steatózou a steatohepatitidou), způsobenými jak alkoholem, tak jinými příčinami, také s virovou hepatitidou.

Dokonce i mírné změny v GSH bez zvýšené produkce ROS nebo sníženého poměru GSH/GSSG mohou ovlivnit citlivé redoxní proteinové thioaly a způsobit výraznější vyčerpání GSH, a to zejména v mitochondriích. V závislosti na rozsahu poškození mitochondrií, inhibici NF- κ B a aktivaci JNK mohou být hepatocyty buď účinněji citlivějšími na podněty buněčné smrti (tj. TNF- α), nebo mohou podstoupit různé formy buněčné smrti (tj. apoptózu nebo nekrózu)⁷.

Apoptóza neboli přirozená smrt buňky se díky vlivu GSH vyznačuje potlačením zánětlivých změn a destrukce tkáně; nekróza za následkem tohoto vlivu indukují zánětlivou odpověď, která může vést k opravě poškozené tkáně.

Naproti tomu vyčerpání mitochondriálního GSH může vytvořit příznivé podmínky pro buněčnou nekrózu, stimulovanou oxidativním stresem, při které dochází k otoku buněk a prasknutí plazmatické membrány. Následné uvolňování buněčných komponent vyvolává zánětlivou reakci zprostředkovanou buňkami vrozené imunity, což přispívá k rozvoji patologických procesů⁷.

Apoptóza neboli přirozená smrt buňky se díky vlivu GSH vyznačuje potlačením zánětlivých změn a destrukce tkáně; nekróza za následkem tohoto vlivu indukují zánětlivou odpověď, která může vést k opravě poškozené tkáně.

Naproti tomu vyčerpání mitochondriálního GSH může vytvořit příznivé podmínky pro buněčnou nekrózu, stimulovanou oxidativním stresem, při které dochází k otoku buněk a prasknutí plazmatické membrány. Následné uvolňování buněčných komponent vyvolává zánětlivou reakci zprostředkovanou buňkami vrozené imunity, což přispívá k rozvoji patologických procesů⁷.

Je také dobře známo, že u pacientů s onkologickým onemocněním je přítomen charakteristický typ oxidativního stresu, při kterém oslabené obranné systémy nejsou schopny se vyrovnat se zvýšenou produkcí oxidantů, což je způsobeno několika různými faktory, mezi kterými hraje klíčovou roli změněný energetický metabolismus, tedy nespecifická chronická aktivace imunitního systému, která vede k nadprodukci prozánětlivých cytokinů, svůj vliv má i prooxidační aktivita protinádorových léčiv.

Několik studií zdokumentovalo navýšení hladiny ROS v krvi, pokles aktivity GPx a zvýšení hladiny prozánětlivých cytokinů u pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním ve srovnání s kontrolní skupinou; tyto výsledky jsou důkazem užitečnosti podávání antioxidantních látek zaměřených na prevenci vzniku a/nebo snížení oxidativního stresu u pacientů s onkologickým onemocněním. Studie Mantovanioho a kol. sledovala schopnost různých antioxidantních látek (α -lipoové kyseliny, soli carboxycystein-lysinu, GSH, amifostinu a vitaminů A+C+E, samostatně nebo v kombinaci) snižovat hladiny ROS, zvyšovat aktivitu GPx a snižovat hladinu prooxidačních cytokinů IL-6 a TNF α v séru u pacientů s pokročilým, různě lokalizovaným onkologickým onemocněním⁸. Pokud se podávaly jednotlivě, byly všechny antioxidanty schopny výrazně snížit hladinu ROS, ale pouze sůl carboxycystein-lysinu, GSH a amifostin byly také schopny výrazně zvýšit aktivitu GPx (Tab. III)⁸.

Pokud byly podávány v kombinaci, sůl carboxycystein-lysinu + α -lipoová kyselina, GSH + amifostin a GSH + α -lipoová kyselina výrazně snížily hladiny ROS, zatímco kombinací α -lipoová kyselina + amifostin, sůl carboxycystein-lysinu + amifostin a GSH + amifostin se podařilo zvýšit aktivitu GPx. Navíc antioxidantní léčba byla schopna snížit hladiny IL-6 a TNF α v séru. GSH a amifostin, pokud byly podány samostatně, byly také schopny výrazně snížit hladinu IL-1, resp. hladinu TNF α .

Pokračování v příštím čísle

Tab. III. Oxidativní stres v oblasti onkologických chorob a dopad různých antioxidantních látek na ROS a antioxidantní enzymy u pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním: Hladiny ROS v krvi a aktivita GPx u onkologických pacientů na začátku studie a po antioxidantním působení různých látek (podle: Mantovani G. 2003; mod.).

	Počet pacientů	Počáteční hladina	ROS „po“	Hodnota p	Počáteční hladina	GPx „po“	Hodnota p
Skupina 1	6	445.2±99.8	347.3±98.3	0.051	6033.8±1040.9	8146.8±2741.1	0.082
Skupina 2	5	330.8±83.4	257.8±46.2	0.018	6412.4±1340.7	9823.6±2363.9	0.005
Skupina 3	7	440.6±87.0	396.3±68.0	0.007	6625.0±1797.2	9160.6±1277.6	0.006
Skupina 4	6	434.8±64.4	382.4±57.7	0.050	6765.0±2288.7	8511.6±2295.6	0.052
Skupina 5	4	401±63.4	34.3±56.0	0.047	9009.8±4689.2	1041.4±3034.2	0.340

Skupina 1: Alfa-lipoová kyselina 200 mg/den perorálně; Skupina 2: N-acetylcystein 1800 mg/den i.v. nebo perorální roztok soli carboxycystein-lysinu 2,7 g/den; Skupina 3: Amifostin 375 mg/den i.v.; Skupina 4: redukovaný glutathion 600 mg/den i.v.; Skupina 5: Vitamin A 30 000 IU + vitamin E 70 mg + vitamin C 500 mg/den orálně. Všechny přípravky byly podávány nepřetržitě v průběhu 10 dnů. Významnost rozdílů mezi hodnotami na počátku studie a po antioxidantní léčbě byla vypočtena párovým Studentovým t-testem. Srovnání relativní účinnosti jednotlivých druhů antioxidantní léčby: Skupina 2 vs 1: ROS p = 0,615; GPx p = 0,508, Skupina 2 vs 3: ROS p = 0,192; GPx p = 0,348, Skupina 2 vs 4: ROS p = 0,303; GPx p = 0,153, Skupina 2 vs 5: ROS p = 0,458; GPx p = 0,164. Skupina 2, která vykázala nejvyšší průměrný rozdíl mezi počátečním stavem a hodnotami po léčbě, byla vybrána jako referenční skupina.