

BRONISŁAWA MORAWIECKA

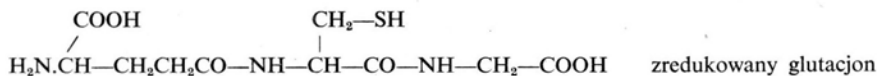
BIOCHEMIA GLUTACJONU

Historia odkrycia glutacjonu wiąże się przede wszystkim z nazwiskiem G. Hopkinsa, mimo że pierwszą wzmiankę o glutacjonie zawdzięczamy De Rey Paillhade'mu z r. 1888. G. Hopkins otrzymał glutacjon w stanie krystalicznym z drożdży piekarskich, wątroby i mięśni ssaków. Opierając się na elementarnej analizie pierwiastków otrzymanego związku autor przypuszczał początkowo, że ma do czynienia z dwupeptydem γ -glutamylu-cysteiny.

Ciekawą własnością tego «dwupeptydu» była obecność γ -peptydowego wiązania w cząsteczce, która została stwierdzona niezależnie od Hopkinsa przez Quastelo i współpracowników (1923). Dalsze badania Hopkinsa (1929 r.), Kendalla, Masona i Mac Kenziego w 1930 r. ustaliły, że jest to peptyd, zbudowany z trzech aminokwasów: kwasu L-glutaminowego, L-cysteiny i glicyny. Wolna grupa α -aminowa pochodzi od kwasu L-glutaminowego, a sulfhydrylowa od cysteiny.

Skład aminokwasowy glutacjonu został potwierdzony również na drodze hydrolizy enzymatycznej przez Grassmanna i współpracowników (1930), którzy wykazali, że glutacjon ulega hydrolizie do 3 aminokwasów pod wpływem karboksypeptydaz i aminopeptydazy drożdżowej.

Budowa tego związku jako γ -L-glutamylu-L-cysteinyloglicyny została ostatecznie ustalona przez porównanie własności fizyko-chemicznych glutacjonu wyizolowanego z tkanki wątrobowej ze związkiem optycznie czynnym, otrzymanym syntetycznie po raz pierwszy przez Haringtona i Meeda w 1935 r. W późniejszych latach du Vigneaud i Miller (1936) oraz Hegedüs (1948) podali inne metody syntezy glutacjonu.



Obecnie glutacjon jest jednym z najlepiej poznanych naturalnych peptydów. Cechuje się on następującymi własnościami fizyko-chemicznymi: potencjał normalny glutationu w $pH = 7$ wynosi $-0,4$ V według C. A. Mawsona (1935).

Bernal (1932) Carawfoot i Hodgkin (1933) podali następujące wymiary elementarnej komórki glutacjonu w satnie suchym:

$$a = 8,74 \qquad b = 5,57 \qquad c = 2,84.$$

Gęstość wynosi 1,46, a ciężar cząsteczkowy 305. Widmo absorpcyjne glutajonu wykazuje maksimum przy długości fali świetlnej 280 m μ , natomiast, jak podaje Patterson i współpr. (1949), kompleks glutajonu z alkoksanem posiada silne maksimum przy 305 m μ .

Skręcalność właściwa 2% wodnych roztworów glutajonu zredukowanego w świetle sodowym $\lambda = 589$ m μ w temp. 27° wynosi — 21,3°, wg Haringtona i współpracowników (1935), a glutajonu utlenionego przy $\lambda = 546$ m μ wynosi — 108° (wg du Vigneaud i współpracowników 1936).

METODY OZNACZANIA GLUTAJONU

Do wydzielania glutajonu z tkanek stosowano początkowo najczęściej kwas trójchlorooctowy i wolframowy, jednakże w roztworach tych kwasów glutajon zredukowany utlenia się (Tunncliffe (1925), King (1930), Pelzweig (1927), Gabbe (1929)).

Woodward i Fry, Fujita i Iwatake wykazali, że kwas sulfosalicylowy lub metafosforowy zapewniają całkowitą ekstrakcję glutajonu, chroniąc go równocześnie przed samoultlenianiem.

Najczęściej stosowaną metodą oznaczania glutajonu jest metoda jodometryczna. Zasada jej oparta jest na ilościowym utlenianiu jodem wolnych grup sulfhydrylowych (Glick, 1955).

Zastosowanie tej metody do wyciągów z tkanek budzi wiele zastrzeżeń, ponieważ podczas miareczkowania jodem oznacza się również wszystkie związki o własnościach redukujących. Ażeby tego uniknąć, wprowadzono szereg modyfikacji. W jednej z nich przed miareczkowaniem wyciągu, wytrąca się glutajon w $pH = 6,5-7,0$ mleczanem kadmu. Wytrącony kompleks odwirowuje się i po rozpuszczeniu w kwasie fosforowym miareczkuje roztworem jodu. Jednakże, jak wykazali, Fujita i Numata (1939) wytrącanie glutajonu w tym pH nie jest kompletne. W $pH = 6,8-7,0$ wytrąca się w tych warunkach 82% glutajonu i 25% cysteiny. Metoda ta była swego czasu bardzo popularna w Europie, natomiast mniej na innych kontynentach.

Inną często stosowaną metodą oznaczania glutajonu w materiale biologicznym jest metoda kolorymetryczna, oparta na barwnej reakcji związków sulfhydrylowych z nitroprusydkiem sodowym (Fujita i współpr. 1938).

Wadą tej metody jest również mała specyficzność w stosunku do innych związków sulfhydrylowych.

Specyficzną metodą oznaczania glutajonu jest metoda glioksalazowa. Glutajon jest koenzymem glioksalazy, która katalizuje powstawanie kwasu mlekowego z metyloglioksalu (Neuberg, 1913; Dakin i współpr. 1955). Przemiana ta w określonych warunkach zależy od stężenia glutajonu. Przebieg reakcji może być mierzony: manometrycznie, przez pomiar dwutlenku węgla, który wyzwala się z dwuwęglanu pod wpływem powstającego kwasu

mlekowego (Glick, 1955), lub miareczkowo przez oznaczanie ubytku metyloglioksalu (Schroeder i współpr. 1939).

Jak wykazały badania Woodwarda (1935) i Behrensa (1941), cysteina, kwas tioglikolowy, siarkowodór, cjanowodór, hydrochinoidyna, cytrynian, kwas askorbinowy, ergotioneina i pirofosforan nie mogą zastąpić glutajonu w tej reakcji. Natomiast aspartion i izoglutajon mogą częściowo, jak wykazały prace Behrensa (1941), Wielanda i współpr. (1956) zastępować glutajon w systemie gliksalazowym. Hamujący wpływ na reakcję gliksalazową wywierają cysteina i cysteinylglicyna. Efekt ten można znieść przez inkubację próbek w atmosferze azotu lub wodoru. W reakcji gliksalazowej przeszkadzają drobne ilości cyjanków, katalizując reakcję Canizzaro pomiędzy cząsteczkami metyloglioksalu (Smythe, 1932).

Ostatnio coraz częściej do wykrywania glutajonu stosuje się metodę alloksanową (Glick, 1955). Podstawą do ilościowej analizy glutajonu jest pomiar ekstynkcji przy $\lambda = 305 \text{ m}\mu$ kompleksu glutajonu z alloksanem. Jednakże dużym ograniczeniem, szczególnie w stosunku do materiału biologicznego i systemów enzymatycznych, badanych *in vitro*, jest obecność cysteiny i kwasu askorbinowego, które reagując z alloksanem dają kompleksy o podobnym maksimum absorpcji (Racker, 1954).

Wyżej wspomnianymi metodami można oznaczać bezpośrednio glutajon zredukowany. Glutajon utleniony natomiast oznacza się pośrednio, jako różnicę pomiędzy glutajonem całkowitym a zredukowanym. Glutajon całkowity oznacza się przez poddanie próbki badanego wyciągu procesowi elektrodukcji, na katodzie rtęciowej (Dohan i współpr. 1939). Elektrodukcję przeprowadza się w roztworze co najmniej 2% roztworu kwasu sulfosalicylowego lub metafosforowego (Battacharya i współpr. 1955).

Półilościową metodą pozwalającą na wykrycie 50 $\text{m}\mu$ glutajonu jest rozdzielcza chromatografia bibułowa. Według Rackera i Krimsky'ego (1952) R_f w fenolu, na bibule Whatman Nr 1, w temperaturze pokojowej dla glutajonu zredukowanego wynosi 0,55, a dla utlenionego 0,12. Hanes, Hird i Isherwood (1952) blokowali grupy sulfhydrylowe N metyloimidem kwasu maleinowego, chroniąc w ten sposób związki tiolowe przed utlenianiem podczas rozdzielania chromatograficznego.

WYSTĘPOWANIE GLUTAJONU W PRZYRODZIE

Glutajon jest związkiem szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie. Jest on przede wszystkim składnikiem ziarnistości wewnątrzkomórkowych. Obecność jego stwierdzono w jądrze komórkowym, w aparacie Golgiego, w mitochondriach, mikrosomach i cytoplazmie (Bricas i współpr. 1953). Glutajon krwi znajduje się prawie wyłącznie w erytrocytach, natomiast

płyn mózgowo-rdzeniowy, tak jak i płyn międzykomórkowy zawierają bardzo małe ilości glutajonu. Stężenie glutajonu jest wyższe w tkankach embrionalnych, regenerujących i roślinnych tkankach merystematycznych niż w pozostałych. Według Tunnicliffe (1925) stężenie glutajonu w świeżych drożdżach waha się od 0,01%—0,03%. W wątrobie i mięśniach ssaków wynosi 0,034%. We krwi poziom glutajonu całkowitego wynosi około 0,043%, a zredukowanego około 0,033% (Illing i współpr. 1951). W nasionach grochu wg Lawrence (1950) stężenie glutajonu wynosi 0,05%, według Proskuriakowa i Mosołowej (1952) około 0,2%.

METABOLIZM GLUTAJONU W ŻYWEJ KOMÓRCIE

W latach 1939—1948 istniały 2 hipotezy o syntezie glutajonu.

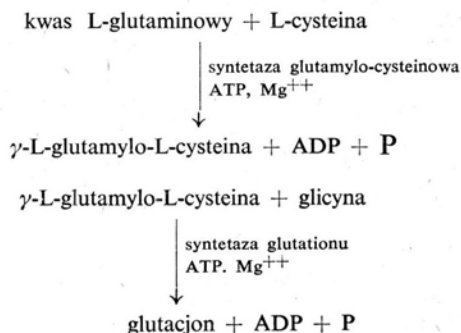
W pierwszej hipotezie zakładano, że glutajon powstaje w komórce z trzech wolnych, budujących jego cząsteczkę aminokwasów. Zwolennicy drugiej hipotezy stali na stanowisku, że glutajon odrywa się od wyższego peptydu lub cząsteczki białkowej.

Pierwsze badania nad przemianą glutajonu pochodzą z pracowni Wael-scha i Rittenberga z 1939 r. Badali oni włączenie znakowanej glicyny N^{15} do glutajonu i białek wątroby szczura. Badania te wykazały, że znakowana glicyna ulegała szybszemu wbudowaniu do glutajonu niż do białek. Badania ze znakowanym kwasem glutaminowym (C^{14}) wykazały, że metabolizm glutajonu jest bardzo szybki, jego półokres trwania w wątrobie wynosi 2—4 godziny.

Eksperymentalnym potwierdzeniem słuszności pierwszej hipotezy były badania Braunsteina i współpr. w 1948 r. Autorzy wykazali syntezę glutajonu z wolnych aminokwasów w oddychających skrawkach wątroby szczura. Bloch (1947, 1949) otrzymał bezkomórkowe ekstrakty enzymów z wątroby gołębia, które miały zdolność prowadzenia syntezy glutajonu z aminokwasów po dodaniu nukleotydu adenozyotrójfosforowego (ATP) i jonu Mg^{++} (60, 61). W tym okresie badań interesujące było zagadnienie, czy kwas glutaminowy, cysteina i glicyna tworzą glutajon w toku jednej reakcji, czy też kilku z udziałem związków pośrednich.

Bloch i współpr. (1947, 1951) stosując znakowaną glicynę na węglu C^{14} wykazali, że synteza glutajonu przebiega w skrawkach wątroby szczura, homogenatach lub wyciągach z proszku acetonowego wątroby gołębia w obecności tlenu i ATP. Inhibitory tlenowej fosforylacji (azydki, 2,4-dwunitro-fenol) hamowały syntezę glutajonu. W r. 1952 Bloch i współpr. wydzielili systemy enzymatyczne prowadząc dwustopniową syntezę glutajonu z wolnych aminokwasów w obecności ATP i jonów Mg^{++} , K^+ .

Schemat biosyntezy glutajonu przedstawia się więc następująco:



Bloch i współpr. (1953, 1955) i Snok (1953) stwierdzili, że istota udziału ATP w tym procesie polega na fosforylacji syntetaz.

Jak wykazał G. Webster w 1953 r. w tkankach roślinnych znajduje się również system enzymatyczny potrzebny do syntezy glutajonu. Następnie autorowi i współpracownikom (1954) udało się 50-krotnie oczyścić enzym syntezujący γ -L-glutamylu-L-cysteinę z kielków pszenicy. Synteza glutajonu prowadzona przez wyciągi z tkanek wyższych roślin wymagała również obecności ATP, Mg^{++} i K^+ .

Najbogatszym źródłem enzymów syntetyzujących glutajon są kielki pszenicy, jednakże kielki grochu, bobu, owsa, korzeni marchwi, bulw ziemniaka i liście szpinaku są zdolne również do syntezy glutajonu z wolnych aminokwasów.

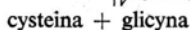
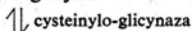
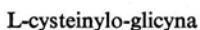
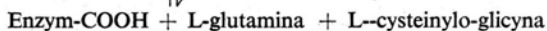
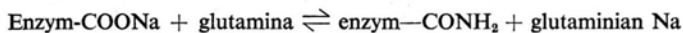
Synteza glutajonu u roślin wyższych przebiega tak samo jak u zwierząt. Doświadczenia powyższe wykazują, że utworzenie wiązania peptydowego podczas biosyntezy glutajonu nie jest prostym odwróceniem hydrolitycznego działania peptydaz. Zjawisko to jest związane z reakcjami wysokoenergetycznymi, przy czym rola oddychania komórkowego sprowadza się do dostarczania ATP drogą tlenowej fosforylacji.

Do niedawna mechanizm syntezy glutajonu był uważany za typowy model powstawania wiązań peptydowych podczas syntezy białek. Obecnie, jak wynika z nowszych badań, synteza wiązań peptydowych odbywa się z udziałem ATP, kwasu rybonukleinowego (RN) lub dezoksyrybonukleinowego (DRN) (Haurowitz 1959).

Problem enzymatycznego rozkładu glutajonu był badany przez Grasmanna i współpracowników (1930). Autorzy stwierdzili rozkład glutajonu pod wpływem proteolitycznych enzymów, takich jak pepsyna, papaina, karboksypeptydaza i drożdżowa aminopeptydaza.

Schroeder i Woodward (1937) wykazali, że krew i wyciągi tkankowe z nerek szczurzych rozkładają glutajon, uwalniając cysteinę. Enzym prowadzący tę reakcję nazwali «antyglioksalazą». Bin kley i współpracownicy (1951) badając różne tkanki zwierzęce na obecność enzymów rozkładających gluta-

cjon, opisali dwa różne enzymy: glutacjonazę (GSH-aza) i cysteinyloglicynazę (CG-aza). Obecność cysteinyloglicynazy w przeciwieństwie do glutacjonazy można było stwierdzić we wszystkich tkankach. Dalsze badania Binkleya i Olsona (1951) wykazały, że glutacjonaza jest aktywowana przez glutaminę, a hamowana przez bromosulfoftaleinę i benzylopenicylinę. Autorzy ci zaproponowali poniżej naszkicowany mechanizm rozkładu glutacjonu z udziałem glutaminy:



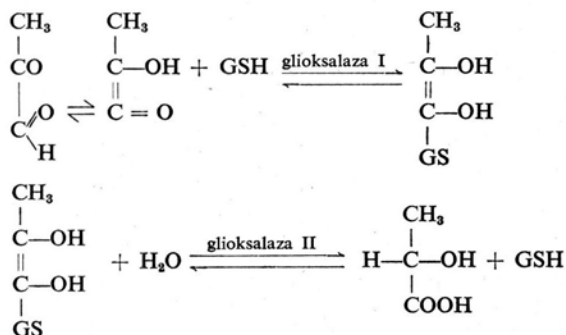
Późniejsze prace Waelscha i współpracowników (1953) wykazały, że aminokwasy przyspieszają również rozkład glutacjonu, prowadzony przez preparaty enzymatyczne z nerek i wątroby szczura. Doświadczenia te są zgodne z wykrytym przez Hanesa, Hirda i Isherwooda w 1950 r. udziałem glutacjonu w reakcjach transpeptydacji. Autorzy w dalszych swoich pracach (1952) wracają do reakcji z udziałem γ -glutamylotranspeptydaz z trzustki i nerek. Enzymy te katalizują bezpośrednie przyłączenie reszty kwasu glutaminowego z glutacjonu do innych aminokwasów lub peptydów. Ponadto cechą charakterystyczną dla reakcji katalizowanych przez transpeptydazy jest udział reszty γ -glutamylowej, a nie α -glutamylowej i ATP. Mechanizm powstawania produktów pośrednich w czasie rozkładu enzymatycznego glutacjonu jest w dalszym ciągu dyskutowany.

GLUTACJON JAKO KOENZYM

Przemiana metylogliksalu w kwas mlekowy w tkankach została spostrzeżona przez Neuberga w 1913 r. Enzym przeprowadzający tę reakcję nazwano gliksalazą (Neuberg 1913, Dakin i współpracownicy 1913). Lohmann w 1932 r. wykazał, że gliksalaza wypreparowana z tkanek zwierzęcych i roślinnych wymaga dla swojej aktywności glutacjonu zredukowanego. Badania Rackera (1951), Hopkinsa, Morgana (1948) i Rose (1957) wyjaśniły mechanizm działania gliksalazy. Autorzy ci wykazali, że gliksalaza składa się z dwóch enzymów, dających się od siebie oddzielić, gliksalazy I i gliksalazy II.

Gliksalaza I katalizuje reakcję kondensacji formy enolowej metylogliksalu z glutacjonem, w efekcie której tworzy się związek pośredni — L-lak-

tylo-glutacjon. Ten ostatni pod wpływem glioksalazy II ulega hydrolitycznemu rozkładowi do kwasu mlekowego i glutacjonu. Rozkład metyloglioksalu w reakcji glioksalazowej z udziałem glutacjonu według Rackera (1951) przedstawia się następująco:



Dalsze prace Wielanda i współpracowników (1956) nad mechanizmem reakcji glioksalazowej wykazały, że glioksalaza II rozkłada 4,5 razy szybciej formę D-S-laktylo-glutacjonu niż formę L tego związku. Naturalnym produktem glioksalazy II jest więc forma D. Glutacjon zredukowany i fosforany działają w tej reakcji jak inhibitory kompetycyjne.

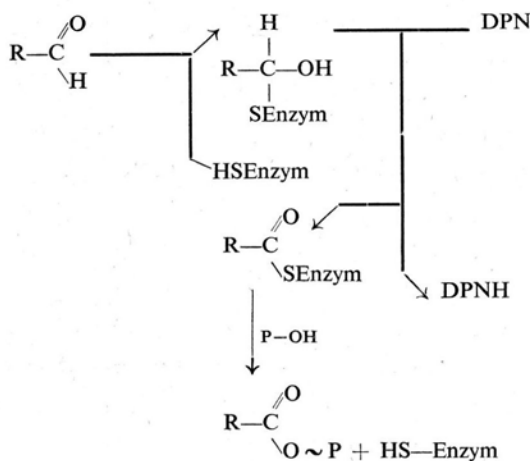
Lohmann (1932) i Woodward (1935) przebadali szereg związków na aktywność koenzymatyczną w systemie glioksalazowym i wykazali, że glutacjon utleniony, kwas tioglikolowy, cysteina, siarkowodór, cyjanki, cytrynian, pirofosforan, tioneina, kwas askorbinowy nie działają jako koenzymy. Natomiast, jak wykazał Behrens i współpracownicy (1941), analogi glutacjonu, takie jak izoglutacjon (α -L-glutamyl-cysteinyl-glicyna) i aspartion (β -aspartyl-cysteinyl-glicyna) mogą zastępować glutacjon zredukowany w reakcji glioksalazowej. Jednakże, jak wykazały pomiary stałych Michaelisa, glutacjon jest najefektywniejszym koenzymem systemu glioksalazowego.

Pozornie aktywujący wpływ na system glioksalazy, którego aktywność mierzy się ubytkiem metyloglioksalu posiadają cyjanki katalizujące reakcję Canizzaro, w której z metyloglioksalu powstaje kwas pirogronowy i aldehyd kwasu mlekowego.

Fizjologiczna rola układu glutacjon-system glioksalazowy polega według Meyerhofa na usuwaniu metyloglioksalu, który jest silnym inhibitorem enzymów tiolowych, biorących udział w cyklu glikolitycznym i oddychaniu komórkowym. Poza tym fizjologiczna funkcja tego systemu nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniona.

Rola glutacjonu jako koenzymu dehydrogenazy aldehydu 3-P-glicerolowego została wyjaśniona przez Krimsky'ego i Rackera w 1952 r. i jest uważana za najistotniejszą funkcję glutacjonu w żywej komórce.

Funkcję tę ilustruje następujący schemat:



Schemat ten pokazuje rozkład acylmerkaptanu na drodze fosforolitycznej. Mechanizm ten został potwierdzony przez Harrisona (1955) w obecności fosforanu — O^{P} . Tlen fosforanu włącza się w całości do grupy karbonylowej bez wymiany z tlenem wody, co wskazuje na to, że jest to reakcja fosforolityczna.

Morgan i Friedmann (cyt. wg Rackera, 1954) odkryli udział glutajonu jako koenzymu w cis-trans-izomerazie kwasu meleilo-aceto-octowego.

Dehydrogenaza formaldehydowa wyizolowana z wątroby wołu wg Strittmattlera i współpracowników (1955) wymaga również katalitycznych ilości glutajonu. Inne związki sulfhydrylowe nie zastępują go.

Heppel i Hilmo (1950) wydzili z wątroby reduktazę nitroglicerynową, w której koenzymatyczną funkcję spełnia glutajon. Mechanizm działania tego enzymu nie został bliżej poznany.

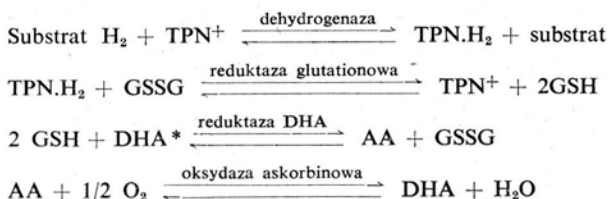
ROLA GLUTACJONU W ODDYCHANIU KOMÓRKOWYM

Hopkins przypuszczał, że biologiczną funkcją glutajonu jest udział jego w procesach oksydo-redukcyjnych komórki. Obserwacje lat późniejszych wykazały, że glutajon utlenia się wolno tlenem atmosferycznym, a zatem należy do tych systemów oksydoredukcyjnych, które nie przenoszą elektronów wprost na tlen atmosferyczny.

Redukcja glutajonu przez tkanki zwierzęce została opisana w r. 1922 przez Hopkinsa i współpracowników. Meldrum i Tarr w 1935 r. wykazali, że krew i wyciągi z drożdży redukują glutajon utleniony w obecności TPN.

W latach 1937—1938 Kohman, Samborn i Ganapathy stwierdzili, że tkanki roślinne są zdolne do redukcji glutacjonu utlenionego. Powstawanie związków sulfhydrylowych w napęczniałych i kiełkujących nasionach grochu opisane przez Firketa, i innych (cyt. wg Mapson, 1951) Hopkinsa i Morgana w 1943 r. przemawia również za istnieniem systemu enzymatycznego redukującego glutacjon utleniony. W 1951 r. Mapson i Goddard, Cohn i Vennesland wyizolowali reduktazę glutacjonową z napęczniałych nasion grochu i kielków pszenicy. Enzym ten wykazywał swoistą aktywność tylko w obecności zredukowanego nukleotydu trójfosforopirydynowego (TPNH) i okazał się bardzo specyficzny dla glutacjonu. Cysteina, homocysteina, γ -L-glutamyl-cysteina i utleniony aspartion nie ulegają oksydoredukacji w obecności reduktazy glutacjonowej.

Znany jest bliski związek glutacjonu z kwasem askorbinowym (AA) w tkankach roślinnych. Szent Györgyi w 1931 r. proponował schemat, w którym te substancje mogłyby działać jako katalizatory oddychania. Następnie Mapson i Goddard (1951), stwierdzając w kiełkujących nasionach grochu obecność szeregu metabolitów z cyklu kwasów trójkarboksylowych, zaproponowali następujący system enzymatyczny, przenoszący elektrony na tlen atmosferyczny;



Warunkiem sprawnego funkcjonowania systemu jest z jednej strony odtwarzanie zredukowanego nukleotydu trójfosforopirydynowego (TPN \cdot H), a z drugiej obecność glutacjonu utlenionego.

Powstawanie więc glutacjonu utlenionego w tkankach roślinnych może odbywać się z udziałem systemu podanego przez Mapson i Goddard lub na innej drodze.

W 1938 r. Snow i Zilvo stwierdzili obecność układu enzymatycznego utleniającego glutacjon w wyciągach z ogórka. Następnie Mapson i Mustafa w 1955 r., badając rolę glutacjonu w oddychaniu roślin, zaobserwowali szybkie utlenianie glutacjonu przez wyciągi z napęczniałych nasion grochu po uprzednim dodaniu do nich pewnych alkoholi (oktan-2-ol, heptan-1-ol). Dodatek alkoholi do wyciągu inicjuje utlenianie kwasów tłuszczowych w reakcji lipooksydazowej, poprzez którą utlenia się glutacjon. Ponieważ wyciągi z sześciodniowych kielków grochu nie wymagały alkoholi do enzymatycznego

* DHA-dehydroaskorbinowy kwas.

utleniania glutacjonu, autorzy przypuszczają, że w trakcie rozwoju pewne enzymy uwalniają kwasy tłuszczowe z nieczynnych kompleksów, które w ten sposób stają się dogodnymi substratami w reakcji lipooksydazowej. Mapson i Moustafa wykazali, że utlenianie glutacjonu może przebiegać na drodze dwóch reakcji enzymatycznych; pierwszej, wrażliwej na cyjanki — z udziałem reduktazy kwasu dehydroaskorbinowego lub oksydazy polifenolowej i drugiej, niewrażliwej na cyjanki — z udziałem systemu lipooksydazy. Można przypuszczać, że system przenoszący elektrony z udziałem glutacjonu i kwasu askorbinowego odgrywa znaczną rolę we wczesnym okresie pęcznienia i kiełkowania roślin. Również we wczesnym okresie rozwoju roślin oksydaza kwasu askorbinowego osiąga maksymalną aktywność i wzrasta stężenie metabolitów cyklu kwasów trójkarboksylowych. Udział systemu Mapsona i Goddarda w całkowitym oddychaniu tkanek roślinnych ilustrują prace Eichenberga i Thimanna (1957). Autorzy ci wykazali, że około 80% oddychania komórkowego normalnej tkanki roślinnej przebiega poprzez układ cytochromowy, a reszta, tj. około 20% może przebiegać przez system «Mapson Goddard».

AKTYWACJA HORMONÓW I ENZYMÓW PRZEZ GLUTACJON

Hopkins wiązał czynność biologiczną glutacjonu z obecnością grupy tiolowej w cząsteczce i przypuszczał, że może on być aktywatorem całego szeregu enzymów i hormonów wymagających dla swej aktywności wolnych grup sulfhydrylowych. Glutacjon wykazuje duże powinowactwo do metali ciężkich, wskutek czego posiada konkurencyjną zdolność wypierania fermentów ze związków kompleksowych z metalami. Barron i Singer (1945) przypuszczają, że glutacjon utrzymuje CoA w formie aktywnej *in vitro* poprzez stałe reaktywowanie sulfhydrylowej grupy tego koenzymu.

Obok aktywującego wpływu glutacjonu na takie enzymy i hormony, które dla swojej aktywności wymagają wolnych grup sulfhydrylowych, znane są przypadki hamującego działania; np. arginaza, peroksydaza tracą swoją aktywność w obecności glutacjonu, który wiąże metale konieczne dla ich aktywacji. Innym przykładem jest inaktywowanie insuliny polegające na redukowaniu dwusiarczkowego mostku przez glutacjon. Udział glutacjonu w aktywowaniu hormonów nie jest funkcją specyficzną i daje się zastąpić przez inne związki sulfhydrylowe.

ROLA GLUTACJONU W PODZIALE I WZROŚCIE KOMÓRKOWYM

Stężenie glutacjonu w komórkach ulega znacznym wahaniom w czasie rozwoju. Rapkin (1931, 1937) zaobserwował, że w zapłodnionych jajach jeżowca morskiego poziom glutacjonu spada bezpośrednio po zapłodnieniu,

osiągając swoje minimum w 30 minucie, następnie wzrasta gwałtownie i już w 45 minucie, to jest tuż przed podziałem komórki, osiąga maksymalny poziom. Stwierdził on również zależność podziału mitotycznego od obecności grup sulfhydrylowych. Dodatek cysteiny, glutacjonu, lub kwasu tioglikolowego znosi zahamowanie mitozy wywołane drobnymi ilościami chlorku rtęciowego.

Pet już w 1936 r. podaje, że podczas kiełkowania bulw ziemniaczanych w temp. 5°C obserwuje się początkowo duży przyrost glutacjonu i kwasu askorbinowego, a następnie spadek obydwu. Hopkins i Morgan (1943) zaobserwowali, że w czasie pęcznienia nasion grochu stężenie glutacjonu szybko wzrasta, a następnie po kilku godzinach maleje. Lawrance w 1950 roku stwierdził, że stężenie glutacjonu podczas pierwszych 6 dni kiełkowania nasion grochu zmienia się od 430 μ g do 690 μ g/g.

Dynamikę glutacjonu w czasie kiełkowania nasion grochu opisali Proskuriakow i Mosołowa w 1952 r. W liścieniach grochu poziom glutacjonu w ciągu pierwszych 8 dni nie ulegał prawie zmianom, a siła redukująca wzrastała dwukrotnie. Natomiast w samych kiełkach grochu w tym okresie poziom glutacjonu wzrastał dwukrotnie, a następnie w dalszych fazach rozwoju spadał. Spadek ten autorzy uważają za względny, ponieważ pomiędzy 13 a 21 dniem rozwoju sucha masa roślin wzrasta 2-, 3-krotnie. Spragg i Yemm w 1954 r. badali równocześnie zmiany poziomu glutacjonu, intensywność oddychania i poziom kwasu askorbinowego u kiełkujących nasion grochu. W ciągu pierwszych sześciu godzin kiełkowania nasion w temp. 22° następuje szybka przemiana glutacjonu utlenionego w zredukowany. Całkowita ilość glutacjonu w tym czasie i przez dalsze 20 godzin pozostaje bez zmiany.

Poziom glutacjonu w czasie 3-tygodniowego rozwoju *Pisum sativum* i *Lupinus luteus* badała Morawiecka (1959). Zaobserwowała, że poziom glutacjonu podczas pęcznienia i kiełkowania nasion łubinu wzrasta gwałtownie z 700 μ g/g suchej masy do dwukrotnie wyższej wartości, osiągając maksimum w okresie całkowitego zazielenienia się liścieni. W dalszych fazach rozwoju łubinu ilość glutacjonu stopniowo obniża się do 26% ilości wyjściowej. Zachowanie się poziomu glutacjonu w grochu ma odmienny charakter niż w łubinie. W początkowym okresie rozwoju ilość glutacjonu obniża się z 1800 μ g/g suchej masy do 54% tej wartości. Różnice te są wywołane odmiennym zachowaniem się glutacjonu w liścieniach grochu i łubinu. Okazało się bowiem, że zmiany glutacjonu w siewkach grochu pozbawionych liścieni są analogiczne do zmian w całych roślinach łubinu. Jest to wyrazem odrębnej funkcji fizjologicznej asymilujących liścieni łubinu i liścieni grochu pełniących raczej funkcję rezerwy materiałów zapasowych.

FUNKCJA BIOLOGICZNA GLUTACJONU A JEGO STRUKTURA

Pomimo wielkiej liczby badań nad glutacjonem rola jego w metabolizmie komórkowym nie jest jeszcze dostatecznie wyjaśniona. Aktywność biologiczna i własności fizykochemiczne glutacjonu wynikają z obecności wolnej grupy sulfhydrylowej i γ -peptydowego wiązania.

Glutacjon dzięki obecności grupy sulfhydrylowej bierze udział jako koenzym w kilku specyficznych reakcjach enzymatycznych szeroko rozpowszechnionych w świecie żywym. Poprzez te reakcje glutacjon może być regulatorem metabolizmu komórkowego, np. w systemie dehydrogenazy aldehydu 3-P-glicerolowego, acylomerkaptan powstały z udziałem glutacjonu rozkłada się na drodze fosforolitycznej dając związek wysokoenergetyczny.

Niespecyficzna funkcja glutacjonu związana z obecnością reaktywnej grupy sulfhydrylowej polega na chronieniu enzymów tiolowych przed szkodliwym wpływem promieniowania jonizującego, ciężkimi metalami i czynnikami utleniającymi.

Biologiczna rola glutacjonu wynikająca z obecności wiązania γ -peptydowego w cząsteczce łączy się z reakcjami transpeptydacji.

Obserwacje Hanesa i wspólr. (1952) nad udziałem glutacjonu w tych reakcjach skłoniły autorów do przyjęcia hipotezy, że glutacjon może być donatorem peptydu lub rezerwy wiązania peptydowego w reakcjach transpeptydacji.

Racker w 1954 r. biorąc pod uwagę specyficzny udział glutacjonu jako koenzymu w kilku znanych reakcjach enzymatycznych porównuje jego funkcję metaboliczną do roli nukleotydów fosfopirydynowych (DPN i TPN), koenzymu A (CoA) i nukleotydów flawinowych (FAP, FMN) w metabolizmie komórkowym.

LITERATURA

- Astrup i Fischer cyt. wg Bricas E. Fromageot Cl., 1953. *Advances in Protein Chemistry* 8, 10—23.
Barron E. S. G., Singer T. P., 1945. *J. Biol. Chem.* 157, 221—253.
Battacharya S. K., Robson S. K., Stewart C. P., 1955. *Biochem. J.*, 60, 696—702.
Bernal J. D. cyt. wg Pirie N. W., 1932. *Biochem. J.*, 26, 75—79.
Bertho H., Grassmann W., 1936. *Biochemisches Practicum*. Berlin und Leipzig.
Binkley F., Nakamura K., 1948. *J. Biol. Chem.*, 173, 411—421.
— Fuji S., Kimmel J. R., 1950. *J. Biol. Chem.*, 186, 159—162.
— Olson C., 1951. *J. Biol. Chem.*, 188, 451.
Bloch A., Anker H. S., 1947. *J. Biol. Chem.*, 169, 765—766.
Braunstein A. E., Szamszykowa T. A., Joffe, 1948. *Biochimia*, 13, 95.
Conn E. E., 1951. *J. Biol. Chem.*, 192, 17.
— Vennesland B., 1951. *Nature*, 167, 976—977.

- Dakin H., Dudley H., 1913. *J. Biol. Chem.*, 14, 1955.
- De Rey Pailhade cyt. wg Dott. Giuseppe Barbaro-Forleo „Il Glutazione“. Tipografia Gia Cooperativa, Pavia 1936.
- cyt. wg Barron E. S. G., 1951. *Advances in Enzymology* 11, 248—260.
- Dohan J. S., Woodward G. E., 1939. *J. Biol. Chem.* 129, 393—399.
- Du Vigneaud V., Miller G. L. 1936. *J. Biol. Chem.*, 116, 496—746.
- Eichenberger E., Thimann K. V., 1957. *Arch. Biochem. Bioph.* 67, 466—478.
- Fruton J. S., Johnston R., Fried M., 1951. *J. Biol. Chem.* 190, 39.
- Fodor P., Miller A., Waelsch H., 1956. *J. Biol. Chem.* 202, 551.
- Fujita A., Iwatake D., 1935. *Biochem.*, 277, 284—292.
- Numata I., 1939. *Biochem.*, 299, 249—273.
- 1939. *Biochem.* 300, 246—263.
- Glick D. 1955. *Methods of Biochemical Analysis* Vol. II. Interscience Publishers INC, New York, 259—278.
- Grassmann W., Dyckerhoff H., Eibeler H., 1930. *Physiol. Chem.* 186, 69—80.
- Hanes G. S., Hird F. J. R., Isherwood F. A., 1950. *Nature* 166, 288—289.
- 1952. *Biochem. J.* 51, 25—35.
- Harington G. R., Mead T. H., 1935. *Biochem. J.* 29, 1602—1611.
- Harrison W. H., Boyer P. D., Falcone A. B., 1955. *J. Biol. Chem.*, 215, 303—317.
- Hastings, cyt. wg Bricas E., Fromageot Cl., *Advances in Protein Chem.* 8, 10—23.
- Haurowitz F., 1959. *Progress in Biochemistry since 1949*, Basel, S. Karger New York.
- Hegedüs B., 1948. *Helv. Chim. Acta*, 31, 737.
- Heppl L. A., Hilmoe R. J., 1950, *J. Biol. Chem.*, 183, 129—138.
- Hopkins F. G., 1921. *Biochem. J.*, 15, 286.
- Dixon M., 1922. *J. Biol. Chem.* 54, 527—563.
- 1929, *J. Biol. Chem.* 84, 269—320.
- Morgan E. J., 1943, *Nature* 152, 288.
- 1948, *Biochem. J.* 42, 23—27.
- Illing E. K. B., Gray C. H., Lawrance R. D., 1951, *Biochem. J.* 48, 637—640.
- Johnston R. B., Bloch K., 1951, *J. Biol. Chem.*, 188, 221.
- Jowett M., Quastel J. H., 1933, *Biochem. J.*, 27, 486—498.
- Kindal E. C., Mason H. L., Mc Kenzie B. F., 1930, *J. Biol. Chem.* 88, 409—423.
- King E. J., Baumgartner L., Page I. H., 1930, *Biochem.* 217, 389—394.
- Kohmann cyt. wg Mapson L. W., Goddard D. R., 1951, *Biochem. J.* 49, 592.
- Krimsky I., Racker E., 1952, *J. Biol. Chem.* 198, 721—729.
- Lawrance J. M., 1950, *Arch. Bioch.* 27, 1—5.
- Lohmann K., 1932, *Biochem.* 254, 332—354.
- Mandeles S., Bloch K., 1955, *J. Biol. Chem.* 214, 639—646.
- Mann M. J. G., 1932, *Biochem. J.* 26, 785—790.
- Mapson L. W., Goddard D. R., 1951, *Nature* 167, 975—976.
- Moustafa E. M., 1955, *Biochem. J.* 60, 71—80.
- Mawson C. A., 1935, *Biochem. J.* 29, 569—579.
- Meldrum N. U., Dixon M., 1930, *Biochem. J.* 24, 472—496.
- Tarr H. L. A., 1935, *Biochem. J.* 29, 108—115.
- Miller G. L., Behrens O. K., du Vigneaud V., 1941, *J. Biol. Chem.* 140, 411—416.
- Morawiecka B., 1959, *Acta Soc. Bot. Pol.* XXVIII(4) 635—651.
- Neuberg C., 1913, *Biochem.* 49, 502—506.
- 1913, *Biochem.* 51, 484—508.
- Nicolet B. H., 1930, *J. Biol. Chem.* 88, 389—393.
- Ochoa S., 1945, *J. Biol. Chem.* 159, 243—244.

- Olson C. K., Binkley F., 1950, *J. Biol. Chem.* 188, 731—735.
- Patterson J. W., Lazarow A., Levey S., 1949, *J. Biol. Chem.* 177, 197—203.
- Pett L. B., 1936, *Biochem. J.*, 30, 1228—1232.
- Proskuriakow N. J., Mosołowa L. M., 1952, *Dokł. A. N. ZSSR LXXXVII.* 465—468.
- Quastel J. H., Stewart C. P., Tunnicliffe H. E., 1923, *Biochem. J.* 17, 586—592.
- Racker E., 1951, *J. Biol. Chem.*, 190, 685.
— 1954, *Glutathione as a Coenzyme in Intermediary Metabolism*, New York.
- Rapkine L., 1931, *Ann. Physiol. physicochem. Biol.* 7, 381.
- Reifer I., 1954, *Postępy Biochemii* 2, 49—58.
- Rose I. A., 1957, *Bioch. Bioph. Acta* 25, 214—215.
- Schroeder E. F., Woodward G. E., 1937, *J. Biol. Chem.* 120, 209—217.
— 1939, *J. Biol. Chem.* 129, 283—296.
- Smythe C. V., 1932, *Berichte der Deutscher Chem. Gesell.* 65 m 819.
- Snoke J. E., Block K., 1952, *J. Biol. Chem.* 199, 407—414.
— 1953, *Am. Soc.* 75, 4872.
- Spragg S. P., Yemm E. W., 1954, *Biochem. J.* 58, XI—XII.
- Strittmatter Ph., Ball E. G., 1955, *J. Biol. Chem.* 213, 445—461.
- Tunnicliffe H. E., 1925, *Biochem. J.* 19, 194—198.
— 1925, *Biochem. J.* 19, 198—206.
- Vennesland B., Gollub M. C., Speck. J., 1949, *J. Biol. Chem.* 178, 301—314.
- Waelsch H., Rittenberg D., 1939, *Science* 90, 423.
— 1941, *J. Biol. Chem.* 139, 761—774.
- Webster G. C., 1953, *Plant Physiol.* 28, 729—731.
— Varner J. E., 1954, *Arch. Biochem. Bioph.* 52, 22—32.
— 1955, *Arch. Biochem. Bioph.* 55, 95—103.
- Wieland Th., Pflleiderer G., Lau H. H., 1956, *Biochem.* 327, 393—406.
— Sandmann B., Pflleiderer G. 1956, *Biochem.* 328, 239—244.
- Woodward G. E., Fry E. G., 1932, *J. Biol. Chem.* 97, 465—482.
— 1935, *J. Biol. Chem.* 109, 1—10.