

*Dagmara Kurpios-Piec, Emilia Grosicka-Maciąg, Hanna Czczot, Maria Szumiło,
Tomasz Grzela¹⁾ Iwonna Rahden-Staroń*

OCHRONNY WPŁYW *N*-ACETYLOCYSTEINY
NA PROOKSYDACYJNE I PROAPOPTOTYCZNE
DZIAŁANIE TIURAMU W KOMÓRKACH V79
CHOMIKA CHIŃSKIEGO*

Katedra i Zakład Biochemii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik Katedry: prof. dr hab. *A. Barańczyk-Kuźma*

¹⁾ Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Centrum Biostruktury
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik Katedry: prof. dr hab. *J. Malejczyk*

*Badano wpływ *N*-acetylocysteiny w komórkach V79 chomika chińskiego narażonych na działanie tiuramu. Zaobserwowane zmiany poziomu glutationu (GSH i GSSG), białkowych grup karbonylowych (PC), peroksydacji lipidów (TBARS), aktywności enzymów GSH-zależnych (reduktazy i peroksydazy glutationowej) i katalazy oraz kaspaz wskazują na prooksydacyjne i proapoptotyczne działanie tiuramu.*

Hasła kluczowe: tiuram, stres oksydacyjny, glutation, peroksydacja lipidów, grupy karbonylowe, enzymy antyoksydacyjne, apoptoza.

Key words: thiram, oxidative stress, glutathione, lipid peroxidation, carbonyl groups, antioxidative enzymes, apoptosis.

Tiuram (disiarczek czterometylo-*bis*-tio-karbamylu) należy do grupy ditiokarbaminianów. Jest związkiem powszechnie stosowanym w rolnictwie jako fungicyd, w medycynie jako lek przeciwświerzbowy, a także w kosmetologii jako filtr przeciwsłoneczny i środek przeciwgrzybiczny w mydłach. W przemyśle gumowym jest używany jako przyspieszacz wulkanizacji. Tiuram jest związkiem o stosunkowo niskiej toksyczności (LD₅₀ dla tiuramu u szczura wynosi 560–1900 mg/kg m.c.). Wykazuje rakotwórcze, gonadotoksyczne oraz teratogenne działanie. Zaburza hemopoezę, uszkadza trzustkę, wątrobę, nerki oraz układ nerwowy. W organizmie jest metabolizowany do kwasu dimetyloditiokarbaminowego i disiarczku węgla (1, 2, 3, 4).

Tiuram reaguje z białkowymi i niebiałkowymi grupami tiolowymi oraz silnie wiąże jony metali. Jego cytotoksyczność wiązana jest ze zmianami poziomu zredukowanego glutationu (GSH), zaburzeniami równowagi stanu oksydoredukcyjnego

* Praca została wykonana w ramach tematów projektów badawczych WUM: 1WK/N/2009. Autorzy dziękują za pomoc techniczną pani *J. Surdyk*.

oraz indukcją stresu oksydacyjnego w komórce (5, 6). Jednak, pomimo licznych badań *in vitro* i *in vivo*, mechanizm cytotoksycznego działania tiuramu nie został w pełni wyjaśniony.

W komórkach istnieje równowaga pomiędzy powstawaniem reaktywnych form tlenu (RFT), a ich usuwaniem przez enzymatyczne i nieenzymatyczne systemy antyoksydacyjne. Podstawowym zadaniem systemów antyoksydacyjnych jest ochrona komórki przed toksycznym działaniem RFT poprzez ich neutralizację oraz hamowanie wolnorodnikowych reakcji łańcuchowych. Niekontrolowany wzrost stężenia RFT może powodować trwałe zmiany w strukturze DNA, RNA, w białkach, lipidach oraz cukrach i może skutkować zaburzeniami ich biologicznych funkcji (7, 8, 9).

Enzymami uczestniczącymi w obronie antyoksydacyjnej komórki są m.in. dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydazy glutationowe: selenozależna (Se-GPx) i selenoniezależna (non Se-GPx), a także reduktaza glutationowa (GR). SOD bierze udział w unieczynnianiu anionorodnika ponadtlenkowego, który jest w komórkach prekursorem reaktywnych i toksycznych pochodnych tlenu i azotu (nadtlenku wodoru, rodnika hydroksylowego czy nadtlenoazotynu). Powstający w wyniku działania SOD nadtlenek wodoru (H_2O_2) rozkładany jest przez katalazę. Również peroksydaza glutationowa jest enzymem redukującym H_2O_2 , ponadto redukuje ona nadtlenki organiczne, w tym nadtlenki lipidowe, zużywając GSH. Jej aktywność w dużym stopniu zależy od aktywności reduktazy glutationowej, która w obecności NADPH regeneruje zredukowany glutation (10, 11, 12).

Kluczową rolę w utrzymywaniu równowagi redox w komórce pełni nieenzymatyczny system antyoksydacyjny, w którym najważniejszym składnikiem jest zredukowana forma glutationu (GSH). Jest on głównym wewnątrzkomórkowym antyoksydantem odpowiedzialnym za utrzymywanie integralności błon i pełniącym istotną rolę w licznych procesach komórkowych. Najważniejszą funkcją glutationu i współdziałających z nim enzymów (GPx i GR) jest zdolność do obrony komórki przed skutkami stresu oksydacyjnego (13, 14, 15).

Wewnątrzkomórkowe stężenie GSH (5–10 mmol/dm³) jest precyzyjnie regulowane (14). Spadek poziomu GSH wskazuje na osłabienie w komórce antyoksydacyjnych mechanizmów obronnych i prowadzi do peroksydacji lipidów oraz oksydacyjnych zmian białek, co obserwuje się w wielu stanach patologicznych takich, jak: stany zapalne, zmiany nowotworowe, cukrzyca czy choroby neurodegeneracyjne (9, 16). Obniżenie poziomu GSH w wielu liniach komórkowych prowadzi również do apoptozy (15, 17, 18).

Wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego GSH następuje w wyniku syntezy *de novo* i regeneracji GSH z jego utlenionej formy (GSSG). Jednym z egzogennych związków podwyższających *de novo* poziom GSH w komórce jest *N*-acetylocysteina (NAC). NAC jest związkiem często wykorzystywanym w badaniach stanu redox komórek (19, 20, 21, 22).

Celem badań było określenie wpływu *N*-acetylocysteiny na cytotoksyczne działanie tiuramu oraz na indukcję stresu oksydacyjnego i apoptozy w hodowli komórek V79 fibroblastów płuca chomika chińskiego preinkubowanych z NAC, a następnie poddanych działaniu tiuramu.

MATERIAŁ I METODY

Odczynniki chemiczne: Antybiotyki (penicylina G, streptomycyna), dimetylosulfotlenek (DMSO), *N*-acetylocysteina (NAC), wyposażenie plastikowe użyte do hodowli komórkowej pochodziły z firmy Sigma Chemicals Co (St. Louis, MO, USA). Ham's F-10 Medium, trypsyna-EDTA, surowica cielęca (NCS-newborn calf serum) pochodziły z firmy Gibco BRL. Tiuram (Cas no. 137-26-8) (99,8%) z firmy MP Biomedicals (Niemcy).

Odczynniki użyte w badaniach biochemicznych pochodziły z następujących źródeł: kwas tiobarbiturowy, kwas sulfosalicylowy, nadtlenuk wodoru, nadtlenuk kumenu, reduktaza glutationowa, Tris base z firmy Sigma; NADPH z firmy MP Biomedicals, LCC. Chlorek guanidyny z firmy Fluka. Zestaw Bioxytech GSH/GSSG-412 do oznaczania GSH/GSSGTM pochodził z firmy OxisResearch. Test na kaspazy (ApoFluor Green Caspase Assay), inhibitor kaspaz (FAM-VAD-FMK) pochodziły z firmy Enzyme Systems Products (Livermore, CA, USA).

Wszystkie sole nieorganiczne i pozostałe odczynniki wykorzystane w doświadczeniach pochodziły z firmy POCH (Polskie Odczynniki Chemiczne) Gliwice (Polska).

Warunki hodowli fibroblastów i schemat eksperymentów. Badania prowadzono *in vitro* na hodowli fibroblastów płuca chomika chińskiego V79. Komórki pochodziły od prof. *M.Z. Zdzienickiej* (Leiden University Medical Center, Leiden, Holandia). Hodowlę prowadzono na plastikowych płytkach Petriego do 80 – 90% konfluencji w medium Ham's F10 (bez hipoksantyny i tymidyny) wzbogaconym 15% surowicą cielęcą z dodatkiem penicyliny/streptomycyny (100 U/cm³, 100 µg/cm³), w temp. 37°C, przy 5% nasyceniu CO₂.

Komórki inkubowano z tiuramem (100 µmol/dm³) przez 1 godz. Tiuram był rozpuszczony w DMSO. Końcowe stężenie DMSO w hodowli nie przekraczało 0,1%.

W celu zbadania wpływu NAC (5 mmol/dm³) komórki preinkubowano przez 24 godz., a następnie poddawano je działaniu tiuramu. Komórki kontrolne były ekspozowane na równoważne stężenie rozpuszczalnika.

Oznaczenia biochemiczne. Stężenie GSH, PC, TBARS oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych oznaczano w lizatach komórkowych otrzymanych z komórek homogenizowanych i poddanych trzykrotnemu cyklowi: szybkiego zamrażania (–80°C) i rozmrażania (37°C). Lizaty wirowano przez 10 min. przy 900 × g. W supernatancie oznaczano stężenie białka całkowitego metodą *Bradford* (23).

Stężenie zredukowanego (GSH) i utlenionego glutationu (GSSG) oznaczano metodą opisaną przez *Tietze* (24) za pomocą zestawu Bioxytech GSH/GSSG-412TM z firmy OxisResearch. Całkowity zredukowany glutation (GSH_c) reaguje z DTNB (kwas 5,5'-ditiio-2-nitrobenzenowy) i tworzy barwny produkt, który oznaczano spektrofotometrycznie przy dł. fali 412 nm. Stężenie GSH_c i GSSG wyrażono w µg/mg białka.

Stężenie białkowych grup karbonylowych (PC) oznaczono metodą opisaną przez *Reznick'a* i *Packer'a* (25), wykorzystując reakcję z DNPH (dinitrofenylohydrazyna) i wyrażono w pracy w nmol PC/mg białka.

Poziom peroksydacji lipidów oznaczono wykorzystując reakcję produktów peroksydacji lipidów z kwasem tiobarbiturowym (TBA) wg metody *Micelego* i in.

(26). Wyniki przedstawiono jako ilość związków reagujących z TBA, TBA-reactive substances (TBARS) w nmol TBARS/100 mg białka.

Aktywność enzymów antyoksydacyjnych. Aktywność katalazy (CAT) oznaczano metodą *Góth'a* (27) polegającą na pomiarze szybkości rozkładu H_2O_2 . Jedna jednostka aktywności (U) katalazy jest to taka ilość enzymu, która rozkłada 1 $\mu\text{mol } H_2O_2/\text{min.}$ w temp. 37°C.

Aktywność selenozależnej peroksydazy glutationowej (Se-GPx) i selenoniezależnej peroksydazy glutationowej (non Se-GPx) oznaczono wg metody *Wendel'a* (28). Całkowitą aktywność Se-GPx oznaczono stosując nadtlenek wodoru jako substrat, natomiast aktywność non Se-GPx badano stosując nadtlenek kumenu jako substrat. Jedna jednostka aktywności (U) wyrażona jest jako $\mu\text{mole NADP}^+/\text{min.}$

Aktywność reduktazy glutationowej (GR) oznaczano metodą opisaną przez *Goldberg'a* i *Spooner'a* (29). Substrat – GSSG zredukowany był przez GR w obecności NADPH. Jedna jednostka aktywności (U) wyrażona jest w $\mu\text{molach NADP}^+/\text{min.}$ Aktywność badanych enzymów wyrażono w U/mg białka.

Indukcja apoptozy. Analizę indukcji apoptozy prowadzono w hodowli komórek V79 poddanych działaniu tiuramu bez i po preinkubacji z 5 mmol/dm^3 NAC przez 24 godz. Indukcję apoptozy analizowano oznaczając aktywność kaspaz stosując test ApoFluor®Green Caspase Assay (Enzyme Systems Products). Zasada testu polega na pomiarze ilości nieodwracalnie związanej z aktywną formą kaspaz fluorogenego inhibitora FAM-VAD-FMK. Komórki inkubowano z 100 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ tiuramem przez 3 godz., a następnie przez 1 godz. z inhibitorem kaspaz (FAM-VAD-FMK). Komórki przemywano dwukrotnie buforem „Wash buffer” i utrwalano 1% paraformaldehydem, a następnie analizowano w cytometrze przepływowym FACSCalibur z oprogramowaniem CellQuest przy dł. fali 488 i 520 nm. Mierzono współczynnik intensywności fluorescencji (MFI) badanych komórek i porównywano do komórek kontrolnych. Analizę wyników wykonano w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury, WUM.

Analiza statystyczna. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej testem *t-Studenta* z wykorzystaniem programu Statistica 6.0 StatStof. Inc. (St. Tulsa, USA). W ocenie istotności statystycznej różnic pomiędzy badanymi grupami przyjęto $p < 0,05$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wartość wewnątrzkomórkowego stężenia GSH i GSSG jest ważnym markerem stresu oksydacyjnego i miarą stanu oksydoredukcyjnego komórki. W tab. I przedstawiono zmiany poziomu całkowitego glutationu (GSH_c) i jego utlenionej formy (GSSG) w komórkach narażonych na działanie 100 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ tiuramu w układzie bez i po preinkubacji z *N*-acetylocysteiną (NAC). W komórkach V79 inkubowanych z NAC, prekursorem syntezy glutationu, stwierdzono ~ 2-krotny wzrost stężenia GSH_c i ponad 1,5-krotny wzrost stężenia GSSG w porównaniu do komórek kontrolnych. Równocześnie wykazano istotne różnice w stężeniu GSH_c i GSSG pomiędzy układem kontrolnym, a komórkami poddanymi jednogodzinnej inkubacji z tiuramem bez i po preinkubacji z NAC. W komórkach eksponowanych na tiuram zaobserwo-

wano istotny statystycznie spadek stężenia GSH_c w porównaniu do wartości kontrolnych ($p < 0,05$). Świadczy to o indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach. Natomiast w komórkach preinkubowanych z NAC, a następnie poddanych działaniu tiuramu, spadek GSH był znacząco niższy, co wskazuje na ochronne działanie NAC.

Tab e l a I. Wpływ tiuramu na poziom GSH i GSSG w komórkach V79 bez i po preinkubacji z NAC

Tab l e I. Effect of thiram on GSH and GSSG levels in V79 cells without or with NAC pretreatment

Związek	GSH _c μg/mg białka	GSSG μg/mg białka
Kontrola	5,675 ± 1,188	0,056 ± 0,044
NAC	10,505 ± 0,595*	0,092 ± 0,055
Tiuram	2,730 ± 0,385*	0,025 ± 0,017
NAC + tiuram	4,324 ± 0,128	0,034 ± 0,005

Wyniki są średnią ± SD z 6 niezależnych doświadczeń. Oznaczenia wykonano w 2 powtórzeniach. Wartość * $p < 0,05$ liczono wobec kontroli.

W warunkach stresu oksydacyjnego zarówno białka komórkowe, jak i lipidy błon ulegają oksydacyjnym uszkodzeniom. Stwierdzono, że inkubacja komórek V79 z tiuramem powoduje prawie 2-krotny wzrost poziomu zarówno białkowych grup karbonylowych (PC), jak i peroksydacji lipidów (TBARS) w porównaniu z kontrolą (tab. II). Zmian takich nie obserwowano w komórkach preinkubowanych z NAC i następnie narażonych na działanie tiuramu. Sugeruje to, że obserwowane zmiany oksydacyjne białek i lipidów są spowodowane wywołanym przez tiuram spadkiem poziomu GSH w badanych komórkach.

Tab e l a II. Wpływ tiuramu na poziom PC i TBARS w komórkach V79 bez i po preinkubacji z NAC

Tab l e II. Effect of thiram on PC and TBARS level in V79 cells without or with NAC pretreatment

Związek	PC nmol/mg białka		TBARS nmol/100 mg białka	
	-NAC	+NAC	-NAC	+NAC
Kontrola	2,608±0,67	2,094±0,25	67±8	69±4
Tiuram	5,113±1,80*	2,059±0,38*	114±21*	66±6

Wyniki są średnią ± SD z 5 doświadczeń. Oznaczenia wykonano w 2 powtórzeniach. Wartości * $p < 0,05$ liczono wobec komórek kontrolnych bez preinkubacji z NAC.

Poziom wewnątrzkomórkowego stężenia GSH i GSSG jest precyzyjnie regulowany przez układy enzymatyczne. Reduktaza glutationowa (GR) oraz peroksydazy glutationowe (GPx) są jego kluczowymi elementami. W tab. III przedstawiono zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych w komórkach poddanych działaniu tiuramu bez i po preinkubacji z NAC. Nie zaobserwowano istotnych zmian aktywności GR w komórkach narażonych na działanie tiuramu bez i po preinkubacji z NAC w porównaniu do wartości kontrolnych. Podobnie aktywność selenozależnej peroksydazy glutationowej (Se-GPx) nie zmieniła się w komórkach narażonych na działanie tiuramu. Natomiast stwierdzono spadek jej aktywności w komórkach

poddanych działaniu tiuramu po preinkubacji z NAC. Aktywność selenoniezależnej peroksydazy glutationowej (non-Se GPx), katalizującej redukcję głównie nadtlenków lipidowych, wykazywała odmienną odpowiedź komórek na działanie tiuramu. Tiuram powodował zahamowanie jej aktywności o 29% w porównaniu do komórek kontrolnych, natomiast po preinkubacji z NAC aktywność enzymu utrzymywała się na poziomie kontroli, co wskazuje na ochronne działanie tego związku. Podobny efekt preinkubacji komórek z NAC obserwowano w przypadku aktywności katalazy (CAT), której aktywność utrzymywała się na poziomie kontroli.

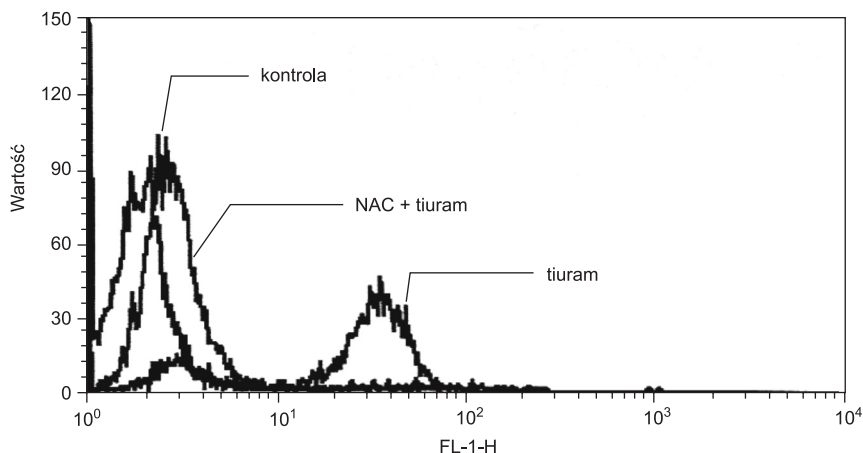
Tabela III. Wpływ tiuramu na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w komórkach V79 bez i po preinkubacji z NAC

Table III. Effect of thiram on the activity of antioxidant enzymes in V79 cells without or with NAC pretreatment

Związek	CAT U/mg białka		Se-GPx U/mg białka		Non-Se-GPx U/mg białka		GR U/mg białka	
	-NAC	+ NAC	-NAC	+ NAC	-NAC	+ NAC	-NAC	+ NAC
Kontrola	100±12	101±4	26±0,9	24±2,4	32 ±6	36 ±10	38±6	29 ±9
Tiuram	77±2,3*	118±13	23±5,7	19±1*	23±5,7*	31±6	36±10	25±9

Wyniki są średnią ± SD z 5 niezależnych doświadczeń. Oznaczenia wykonano w 2 powtórzeniach. Wartości * $p < 0,05$ liczono wobec komórek kontrolnych bez preinkubacji z NAC.

Stres oksydacyjny może prowadzić do śmierci komórki na drodze apoptozy. W celu zbadania wpływu *N*-acetylocysteiny na proapoptotyczne właściwości tiuramu wykonano test z kaspazami. Kaspazy są enzymami proteolitycznymi odgrywającymi kluczową rolę w procesie apoptozy. W komórkach V79 poddanych preinkubacji z NAC, a następnie eksponowanych na działanie tiuramu zbadano aktywność kaspaz wykorzystując cytometrię przepływową i mierząc średnią wartość intensywności fluorescencji pochodzącej od inhibitora kaspaz FAM-VAD-FMK znakowanego fluoresceiną, nieodwracalnie wiążącego się z aktywnym enzymem. Na ryc.1



Ryc. 1. Wpływ tiuramu na aktywność kaspaz w komórkach V79 bez i po preinkubacji z NAC.

Fig. 1. Effect of thiram on the activity of caspases in V79 cells without or with NAC pretreatment.

przedstawiono histogram ilustrujący aktywację kaspaz w komórkach pod wpływem tiuramu (20-krotny wzrost intensywność fluorescencji w porównaniu do komórek kontrolnych) i ochronne działanie preinkubacji z NAC na komórki V79. Wartość fluorescencji w komórkach preinkubowanych z NAC, a następnie traktowanych tiuramem była porównywalna do wartości fluorescencji w układzie kontrolnym.

W pracy wykazano jednoznacznie, że w komórkach V79 chomika chińskiego w wyniku działania tiuramu dochodzi do obniżenia stężenia GSH i GSSG, podwyższenia poziomu białkowych grup karbonylowych (PC) oraz peroksydacji lipidów (TBARS), zmian aktywności enzymów antyoksydacyjnych i aktywacji kaspaz.

Zaobserwowane zmiany wskazują na zaburzenie równowagi redox, indukcję stresu oksydacyjnego i apoptozę. Równocześnie stwierdzono, że preinkubacja komórek z *N*-acetylocysteiną – prekursorem syntezy GSH cofa zmiany wywołane działaniem tiuramu. Wskazuje to na ochronne działanie tego związku.

D. Kurpios-Piec, E. Grosicka-Maciąg, H. Czczot, M. Szumiło,
T. Grzela, I. Rahden-Staroń

PROTECTIVE EFFECT OF N-ACETYL-CYSTEINE ON PROOXIDATIVE
AND PROAPOPTOTIC PROPERTIES OF THIRAM
IN V79 CHINESE HAMSTER CELLS

Summary

This work investigated the effect of N-acetylcysteine (NAC) on the thiram induced oxidative stress in V79 Chinese hamster cells. An increase in oxidative stress induced by thiram is evidenced by decreased GSH and GSSG levels, elevated total protein carbonyls (PC) content and lipid peroxidation (measured as TBARS). Analysis of GSH related enzymes showed that thiram did not change GR and Se-GPx activity, but decreased non-Se-GPx and CAT activity. Thiram shows also proapoptotic activity measured as induction of caspases activity. NAC alone did not produce any significant changes, except for increase of GSH level, in any of the variables measured. NAC pre-treatment restores protein carbonyls content and lipid peroxidation to the control value and prevents antioxidant enzymes activity changes as well as apoptosis. The results show that oxidative properties are at least partially attributable to cytotoxic effects of thiram under tested conditions. Pre-incubation with NAC reversed changes occurring via a shift in the intracellular redox state.

PIŚMIENNICTWO

1. Extension Toxicology Network: Pesticide Information Profiles <http://extoxnet.orst.edu/> - 2. *Elskens M.T., Penninckx M.J.*: Thiram and dimethyldithiocarbamic acid interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*: a possible metabolic pathway under the control of the glutathione redox cycle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997; 63: 2857-2862. - 3. *Cereser C., Boget S., Parvaz P., Revol A.*: Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death. *Toxicology*, 2001; 163(2-3): 153-162. - 4. *Struciński P.*: Tiuram – pył. Dokumentacja dopuszczalnego narażenia zawodowego. *Principl. Methods Assess Walk Environ.*, 2006; 213(49): 145-180. - 5. *Abdollahi M., Ranjbar A., Shadnia A., Nikfar S., Rezale A.*: Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monit.*, 2004; 10(6): RA141-147. - 6. *Bjorling-Poulsen M., Andersen H.R., Grandjean P.*: Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environ. Health*, 2008; 7: 50-66. - 7. *Zablocka A., Janusz M.*: Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 118-124. - 8. *Rahman K.*: Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging*, 2007; 2: 219-236. - 9. *Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J.*: Free radical and an-

tioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007; 39(1): 44-84. – 10. *Hades J.D., Flanagan J.U., Jowesey I.R.*: Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2005, 45: 51-88.

11. *Terada T.*: Role of glutathione S-transferase in lens under oxidative stress. *J. Health Sci.*, 2005; 51(3): 263-272. – 12. *Yang M.S., Chan H.W., Yu L.C.*: Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology*, 2006; 226: 126-130. – 13. *Maher P.*: The effect of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res. Rev.*, 2005; 4(2): 288-314. – 14. *Bukowska B.*: Glutathione: Biosynteza, czynniki indukujące oraz stężenie w wybranych jednostkach chorobowych. *Medycyna Pracy*, 2004; 55(6): 501-509. – 15. *Bliska A., Krypczyk A., Włodek L.*: Różne oblicza biologicznej roli glutationu. *Post. Hig. Med. Dosw.*, 2007; 61: 438-453. – 16. *Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H.*: The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.*, 2003; 57: 145-155. – 17. *Tormos C., Javie Chaves F., Garcia M.J., Garrido F., Jover R., O'Connor J.E.*: Role of glutathione in the induction of apoptosis and c-fos and c-jun mRNAs by oxidative stress in tumor cells. *Cancer Lett.*, 2004; 10: 103-113. – 18. *Schnellendorfer T., Gansauge S., Gansauge F., Schlosser S., Berger H.G., Nussler A.K.*: Glutathione depletion causes cell growth inhibition and enhanced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer*, 2000; 89: 1440-1447. – 19. *Dekhuijzen P.N.R.*: Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.*, 2004; 23: 629-636. – 20. *Victor V.M., Rocha M., De La Fuente M.*: N-acetylcysteine protects mice from lethal endotoxemia by regulating the redox state of immune cells. *Free Rad. Res.*, 2003; 37: 919-929.

21. *Grinberg L., Filbach E., Amer J., Atlas D.*: N-acetylcysteine amide, a novel cell-permeating thiol, restores cellular glutathione and protects human red blood cells from oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 2005; 38: 136-145. – 22. *Zafarullah M., Li W.Q., Sylwester J., Ahmad M.*: Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2003; 60: 6-20. – 23. *Bradford M.*: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976; 72: 248-254. – 24. *Tietze F.*: Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem.*, 1969; 27: 502-520. – 25. *Reznick A.Z., Packer L.*: Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.*, 1994; 233: 357-363. – 26. *Miceli M.V., Liles M.R., Newsome A.*: Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis. *Exp. Cell Res.*, 1994; 44: 276-287. – 27. *Göth L.*: A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin. Chim. Acta.*, 1991; 196: 143-151. – 28. *Wendel A.*: Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, 1981; 77: 325-333. – 29. *Goldberg D.M., Spooner R.J.*: Glutathione reductase.; w: *Methods of Enzymatic Analysis*, ed. H.U. Bergmayer, Verlag-Chemie, 1992; 3: 258-265. – 30. *Grosicka E., Czebot H., Skrzycki M., Szumilo M., Podsiad M., Rahden-Staroń I.*: Wpływ tiuramu i disulfiram na stan redox w komórkach fibroblastów płuca chomika chińskiego. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2006; 39(4): 383-390.

Adres: 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1.