

Anna Bilska-Wilkosz

**Perspektywy farmakologicznego działania kwasu liponowego
w aspekcie nowych możliwości jego biologicznej aktywności**

Praca doktorska

Katedra Biochemii Lekarskiej

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Promotor

Prof. dr hab. Lidia Włodek

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
UNIwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Kraków 2017

*Gorąco dziękuję Pani Profesor Lidii Włodek
za ciekawy temat pracy, nieocenioną pomoc
i zaangażowanie w jej realizację
oraz niezwykle życzliwość i wyrozumiałość*

*Gorąco dziękuję Pani Profesor Barbarze Filipek
za życzliwość i umożliwienie przeprowadzenia badań
w Katedrze Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum*

*Panu Profesorowi Piotrowi Laidlerowi,
Kierownikowi Katedry Biochemii Lekarskiej
Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum
dziękuję za życzliwość i wsparcie*

*Koleżankom i Kolegom z Katedry Biochemii Lekarskiej
i z Katedry Farmakodynamiki
Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum
składam gorące podziękowanie za pomoc,
wsparcie i życzliwość*

Dziękuję Rodzinie i przyjaciołom

***Praca zrealizowana częściowo z grantu Narodowego Centrum
Nauki w Krakowie (Nr UMO-2011/01/B/NZ4/01675)***

PAMIĘCI OJCA

POŚWIĘCAM

Prace stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej

Bilska-Wilkosz A., Górny M., Dudek M., Nowiński L., Bednarski M., Iciek M., Kowalczyk-Pachel D., Sokołowska-Jeżewicz M., Filipek B., Włodek L.:

Inactivation of aldehyde dehydrogenase by nitroglycerin in the presence and absence of lipoic acid and dihydrolipoic acid. Implications for the problem of differential effects of lipoic acid *in vitro* and *in vivo*. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, 2016, 73 (6), 1531-1538. **IF=0.745; punkty MNiSW=15.**

Bilska-Wilkosz A., Dudek M., Knutelska J., Włodek L.:

The effect of lipoic acid administration on the urinary excretion of thiocyanate in rats exposed to potassium cyanide. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, 2015, 72 (1), 49-52. **IF=0.877; punkty MNiSW=15.**

Bilska-Wilkosz A., Iciek M., Kowalczyk-Pachel D., Górny M., Sokołowska-Jeżewicz M., Włodek L.:

Lipoic Acid as a Possible Pharmacological Source of Hydrogen Sulfide/Sulfane Sulfur. Molecules, 2017, 22(3), 388. doi:10.3390/molecules22030388. **IF=2.861; punkty MNiSW = 30.**

Impact Factor = 4.483

Punkty MNiSW = 60

SPIS TREŚCI

Wykaz najważniejszych skrótów	7
Wstęp	9
Profil biochemiczny - kwas liponowy endogenny	9
Profil biochemiczny - kwas liponowy egzogenny	14
Cel pracy	22
Praca 1	23
Metodyka	24
Wyniki	27
Publikacja	29
Praca 2	37
Metodyka	38
Wyniki	39
Publikacja	40
Praca 3	44
Metodyka	45
Wyniki	47
Publikacja	48
Dyskusja	59
Wnioski i podsumowanie	71
Streszczenie	73
Summary	76
Bibliografia	79

WYKAZ NAJWAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW

AIDS - zespół nabytego upośledzenia odporności (ang. *acquired immunodeficiency syndrome*)

ALDH - dehydrogenaza aldehydowa

ALDH-2 - dehydrogenaza aldehydowa, izoforma mitochondrialna

AMPK - kinaza aktywowana AMP

BCKDH - dehydrogenaza α -ketokwasów rozgałęzionych

CAT – aminotransferaza cysteinowa

CBS - β -syntaza cystationiny

CSE - γ -liaza cystationiny, cystationaza

DHLA - kwas dihydroliponowy

DPT - difosforan tiaminy

DTNB - kwas 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowy

E_0' - standardowy potencjał oksydacyjno-redukcyjny w pH 7

EBM - medycyna oparta na faktach (ang. *Evidence-Based Medicine*)

GCS - kompleks enzymatyczny rozszczepiający glicynę (ang. *glycine cleavage system*)

GSH - glutation zredukowany

GSSG - glutation utleniony

GTN - triazotan glicerolu, nitrogliceryna

ip - podanie dootrzewnowe (łac.

IS - obszar zawału mięśnia sercowego (ang. *infarct size*)

KADH - dehydrogenaza α -ketoadypinianowa

KGDH - dehydrogenaza α -ketoglutaranowa

LA - kwas liponowy

MMSE - skala stosowana do oceny stopnia otępienia (ang. *Mini-Mental State Examination*)

MST - transferaza siarkowa merkaptopirogronianu

mtFASII - mitochondrialny szlak syntezy kwasów tłuszczowych typu II

PDH - dehydrogenaza pirogronianowa

PI3K - kinaza 3-fosfatydyloinozytolu

PIP2 - 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu

PIP3 - 3,4,5-trisfosforan fosfatydyloinozytolu

PKB - kinaza białkowa B (kinaza Akt)

PKG - kinaza białkowa G

PLP - fosforan pirydoksalu

RFS - reaktywne formy siarki

RFT - reaktywne formy tlenu

sc - podanie podskórne (łac. *subcutaneous*)

SD - odchylenie standardowe

SEM - błąd standardowy średniej

THF - tetrahydrofolian

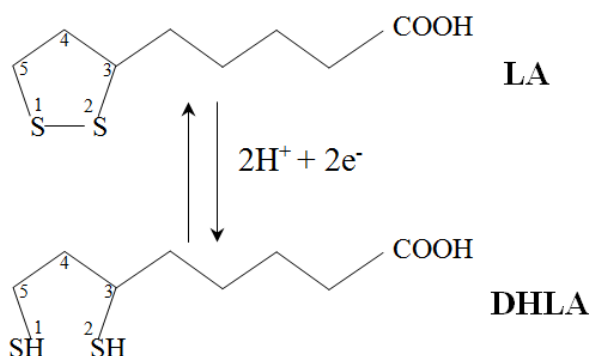
TST - transferaza siarkowa tiosiarczuanu, rodanaza

ΔG^0 - zmiana standardowej energii swobodnej w pH 7

WSTĘP

PROFIL BIOCHEMICZNY – KWAS LIPONOWY ENDOGENNY

Kwas liponowy (LA), inaczej kwas 1,2-ditiolano-3-pentanowy to ośmiowęglowy kwas karboksylowy, posiadający 2 atomy siarki. LA oraz jego zredukowana postać - kwas dihydroliponowy (kwas 6,8-ditiooktanowy; DHLA) występują we wszystkich komórkach prokariotycznych i eukariotycznych. Ustalenie struktury i funkcji LA/DHLA zawdzięczamy pracom prowadzonym w latach pięćdziesiątych XX wieku przez Reeda i wsp. (Reed i wsp., 1951; Reed, 1998).



Rys.1. Struktura LA i DHLA.

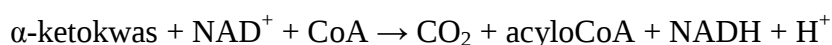
Początkowo LA z uwagi na jego rolę w procesach biochemicznych, zaklasyfikowany został do grupy witamin B (Reed i wsp., 1951; Reed, 1998). Obecnie wiadomo, że - podobnie jak w komórkach roślinnych czy bakteryjnych – jest on syntetyzowany również w organizmach zwierzęcych. Przebiegająca w mitochondriach synteza LA jest procesem wieloetapowym i wymaga udziału dwóch szlaków biochemicznych, to znaczy mitochondrialnego szlaku syntezy kwasów tłuszczowych typu II (mtFASII) oraz syntezy centrów żelazowo-siarkowych (Hiltunen i wsp., 2010; Stehling i wsp., 2014).

Zidentyfikowany związek nazwano „kwasem liponowym”, ponieważ - cytując słowa Reeda - „jest on rozpuszczalny w tłuszczach, ma charakter kwasowy i poprzez oksydacyjną dekarboksylację pirogronianu uczestniczy w tworzeniu acetylo-CoA, który jest prekursorem kwasów tłuszczowych” (*the name of lipoic acid is derived from the fact that compound is*

highly soluble in fat solvent, is acidic, as is involved through oxidative decarboxylation of pyruvate in the formation of acetate, a precursor of fatty acids) (Reed i wsp., 1951).

Obecnie wiadomo, że LA jest koenzymem niezbędnym dla aktywności nie tylko kompleksu multienzymatycznego dehydrogenazy pirogronianowej (EC 1.2.4.1; PDH), ale również kompleksów katalizujących oksydacyjną dekarboksylację innych α -ketokwasów, w tym: α -ketoglutaranu i α -ketoadypinianu oraz α -ketokwasów rozgałęzionych. Każda z dehydrogenaz: pirogronianowa (PDH), α -ketoglutaranowa (EC 1.2.4.2; KGDH), dla której substratem jest również α -ketoadypinian oraz α -ketokwasów rozgałęzionych (EC 1.2.4.4; BCKDH) jest złożona z trzech współdziałających ze sobą podjednostek (E_1 , E_2 i E_3), wykazujących niezależne aktywności katalityczne. Podjednostka E_1 posiadająca aktywność dekarboksylazy α -ketokwasowej wymaga udziału difosforanu tiaminy (DPT). W miejscu aktywnym E_1 α -ketokwas ulega dekarboksylacji, czyli CO_2 zostaje uwolniony jako pierwszy produkt reakcji. Powstająca jednocześnie pochodna hydroksyalkilowa pierścienia tiazolowego DPT jest następnie utleniana do grupy acylowej z jednoczesnym przeniesieniem acylu na lipoamid, stanowiący integralną część podjednostki E_2 o aktywności acylotransferazy dihydroliponianowej. Wiązanie amidowe (lipoamid) tworzy się pomiędzy grupą karboksylową LA a grupą ϵ -aminową łańcucha bocznego reszt lizynowych podjednostki E_2 (Rys. 2). Przeniesienie fragmentu acylowego na atom siarki lipoamidu jest związane z utworzeniem wysokoenergetycznego wiązania tioestrowego. Reszta acylowa jest następnie przenoszona na koenzym A i jako acylo-CoA uwalnia się z kompleksu enzymatycznego do macierzy mitochondrialnej. Towarzyszy temu redukcja LA do DHLA. Utlenienie DHLA z powrotem do LA jest katalizowane przez podjednostkę E_3 o aktywności dehydrogenazy dihydroliponianowej (EC 1.8.1.4), której grupą prostetyczną jest kowalencyjnie przyłączony FAD. Utlenieniu amidu DHLA towarzyszy redukcja FAD do FADH_2 . Ten enzym katalizuje także odtworzenie FAD z jednoczesną redukcją NAD^+ do $\text{NADH} + \text{H}^+$, który odłącza się od kompleksu enzymatycznego i następnie może być utleniany przez łańcuch oddechowy. Dehydrogenaza dihydroliponianowa (podjednostka E_3) jest składnikiem identycznym wszystkich układów wieloenzymatycznych, katalizujących oksydacyjną dekarboksylację α -ketokwasów. Ładunek netto grupy lipoamidowej wynosi podczas całego cyklu reakcji 0, -1 lub -2 w zależności od stopnia jonizacji grup sulfhydrylowych. Taka zmiana ładunku jest czynnikiem dostarczającym odpowiedniej siły, przemieszczającej grupę lipoamidową w żądanym kierunku.

Sumując, reakcje oksydacyjnej dekarboksylacji α -ketokwasów polegają na przekształceniu α -ketokwasów, koenzymu A i NAD^+ w cząsteczki CO_2 , acylo-CoA i $\text{NADH} + \text{H}^+$.

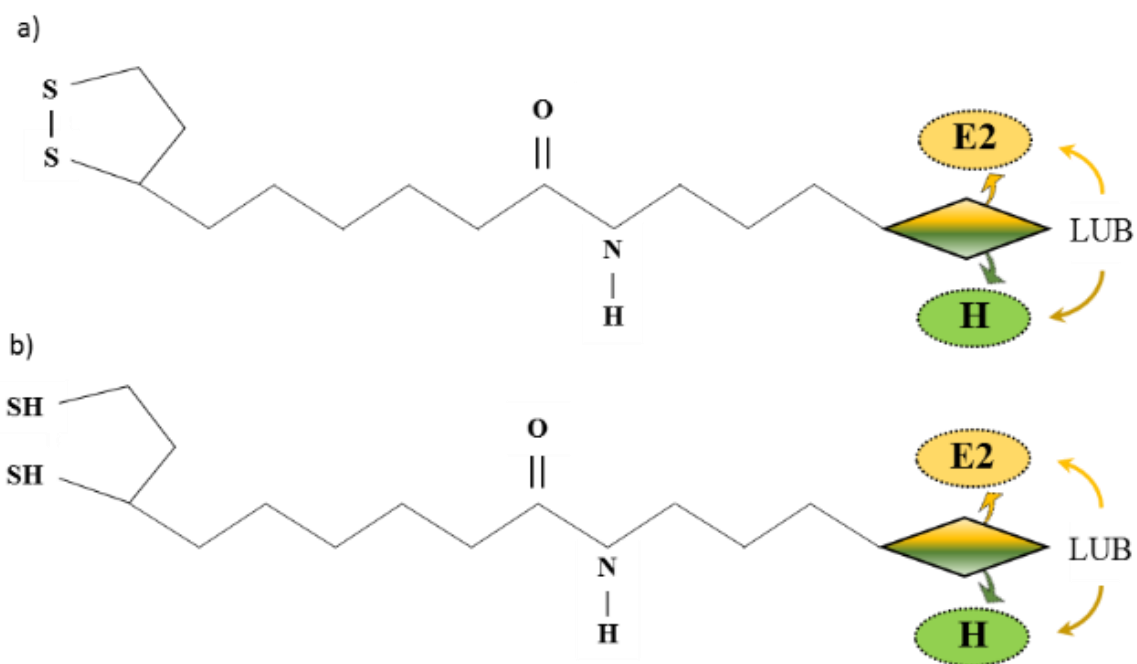


Procesy te są nieodwracalne. Zmiana standardowej biologicznej energii swobodnej ΔG^0 jest tu silnie ujemna i wynosi około -30 kJ/mol, co jest porównywalne z wartością ΔG^0 reakcji hydrolizy ATP.

Proces oksydacyjnej dekarboksylacji α -ketoglutaranu jest integralną częścią cyklu Krebsa, a także istotnym elementem na szlaku przekształceń szkieletów węglowych lizyny do odpowiednich pochodnych acylo-CoA. Degradacja lizyny prowadzi finalnie do acetoacetylo-CoA. Dekarboksylacja oksydacyjna pirogronianu stanowi kluczowe ogniwo łączące glikolizę z dalszymi etapami utleniania glukozy w warunkach tlenowych. Z kolei reakcja katalizowana przez dehydrogenazę α -ketokwasów rozgałęzionych jest istotnym elementem na szlaku przekształceń szkieletów węglowych izoleucyny, leucyny, waliny i lizyny do odpowiednich pochodnych acylo-CoA. Rozkład leucyny prowadzi do acetylo-CoA i acetoacetylo-CoA. Punktem wejścia w cykl Krebsa łańcuchów węglowych waliny i części węgli izoleucyny jest bursztynylo-CoA. Pozostałe węgle izoleucyny są degradowane do acetylo-CoA.

LA jest również koenzymem niezbędnym dla aktywności kompleksu enzymatycznego rozszczepiającego glicynę (GCS; ang. *glycine cleavage system*).

Układ GCS jest zorganizowanym zespołem czterech białek. Białko P o aktywności dehydrogenazy (dekarboksylazy) glicyny (EC 1.4.4.2) współpracuje tu z fosforanem pirydoksalu (PLP). Białko H, zawierające w swojej strukturze LA, połączony wiązaniem amidowym utworzonym pomiędzy grupą karboksylową LA a grupą ϵ -aminową łańcucha bocznego reszt lizynowych białka H. Ta struktura jest analogiczna do lipoamidu utworzonego pomiędzy LA, a podjednostką E_2 w kompleksach katalizujących oksydacyjną dekarboksylację α -ketokwasów (Rys. 2). Białko H nazywane jest białkiem przenoszącym wodór (ang. *hydrogen carrier protein*). Kolejne dwa białka tworzące układ GCS to: białko T o aktywności aminometylotransferazy (EC 2.1.2.10) współpracujące z tetrahydrofolianem (THF) oraz białko L, którego koenzymem jest FAD, posiadające aktywność dehydrogenazy dihydroliponianowej, identyczne z podjednostką E_3 kompleksów katalizujących oksydacyjną dekarboksylację α -ketokwasów.

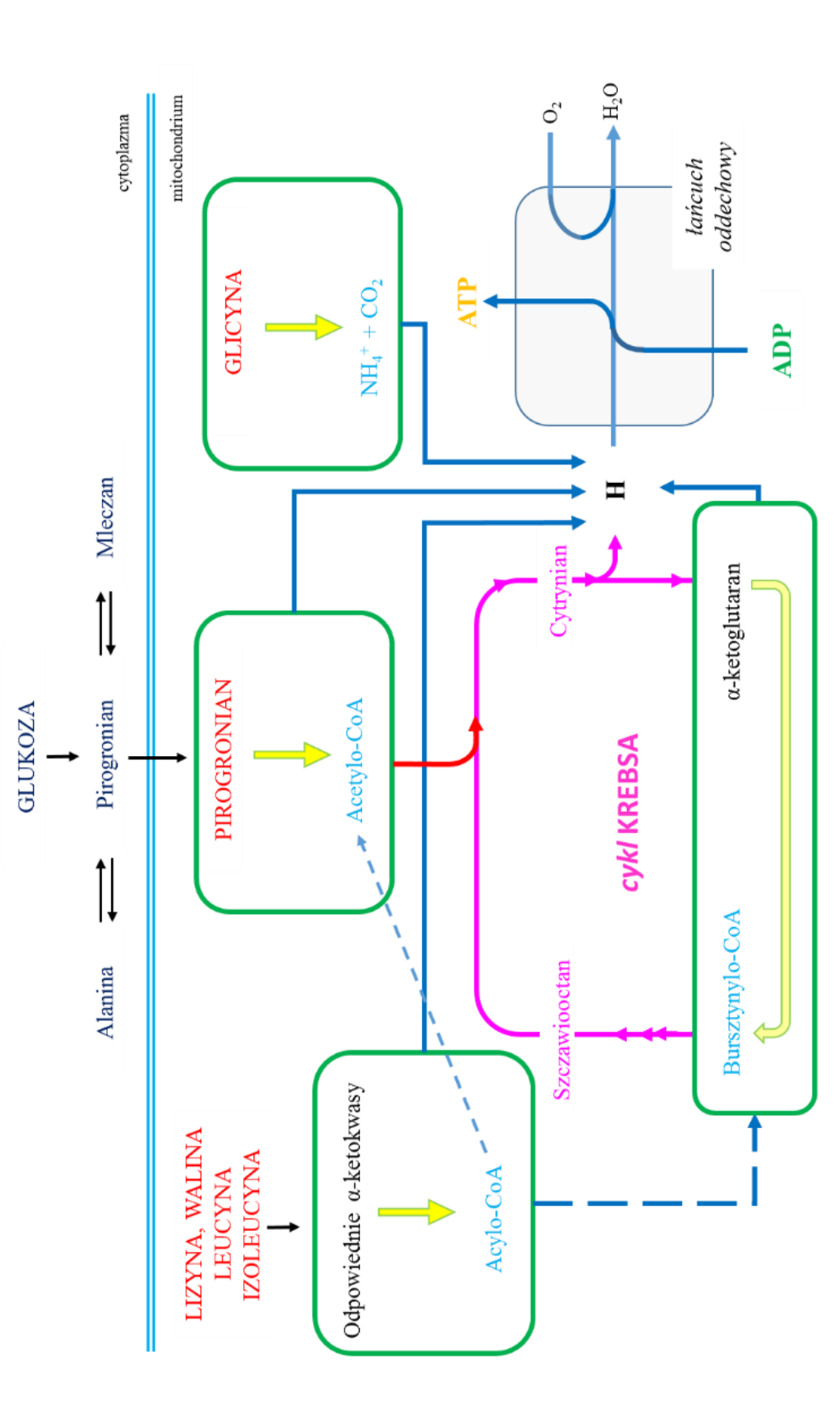


Rys.2. Struktura (a) lipoamidu i (b) dihydrolipoamidu utworzonego pomiędzy grupą karboksylową: (a) LA i (b) DHLA a grupą ϵ -aminową łańcucha bocznego reszt lizynowych podjednostki E₂ w układach enzymatycznych, katalizujących oksydacyjną dekarboksylację α -ketokwasów lub białka H w układzie GCS, katalizującym dekarboksylację glicyny.

Glicyna w reakcji z PLP ulega dekarboksylacji, a grupa aminometylowa zostaje przeniesiona z PLP na disiarczek LA związany z białkiem H (lipoiloproteina), skutkiem czego tworzy się S-aminometylodihydrolipoiloproteina. Oba te procesy katalizowane są przez białko P. Następnie, w reakcji katalizowanej przez białko T z udziałem THF tworzy się N⁵,N¹⁰-metylenoTHF i amoniak z jednoczesną redukcją LA do DHLA (dihydrolipoiloproteina), co oznacza że z białkiem H związany jest teraz DHLA. DHLA jest z powrotem utleniany do LA przez współpracujące z FAD białko L, a powstający FADH₂ jest następnie utleniany przez NAD⁺. Sumując, w złożonej reakcji katalizowanej przez układ GCS glicyna ulega degradacji do CO₂ i NH₃ z jednoczesną redukcją NAD⁺ do NADH + H⁺. Reakcje katalizowane przez GCS są odwracalne.



Tak więc udziału LA/DHLA wymaga 7 reakcji o istotnym, kluczowym niemal znaczeniu dla metabolizmu energetycznego komórki (Rys. 3.).



Rys. 3. Kluczowy udział układu LA/DHLA w metabolizmie energetycznym komórki i procesach tworzenia energii.

PROFIL FARMAKOLOGICZNY – KWAS LIPONOWY EGZOGENNY

Drugim, oprócz syntezy *de novo*, źródłem LA w komórkach ludzi i zwierząt jest pokarm. Z pożywienia LA przyswajany jest przede wszystkim w postaci lipolizyny, która w organizmie jest hydrolizowana przez lipoamidazę (EC 3.5.1.12), uwalniającą LA (Hayakawa i Oizumi, 1988). Aktywność tego enzymu w surowicy człowieka wynosi średnio 1,50 U/l. Największą zawartością lipolizyny charakteryzują się warzywa: brokuły i szpinak, a także podroby (Lodge i wsp., 1997). Ponadto LA stał się obecnie bardzo popularnym składnikiem preparatów multiwitaminowych, suplementów diety, a nawet karmy dla zwierząt domowych (Shay i wsp., 2009). Związek ten jest również obecny w różnego rodzaju kosmetykach przeznaczonych do pielęgnacji skóry: maściach, kremach, balsamach itp.

Przed wszystkim jednak LA jest zarejestrowanym, dopuszczonym do obrotu lekiem, dostępnym jedynie na przepisana przez lekarza receptę. Po raz pierwszy LA jako lek do stosowania u pacjentów z cukrzycą zarejestrowano i dopuszczono do obrotu w 1966 roku w Niemczech. Od kilku lat dożylnie podawany LA klasyfikuje się - w oparciu o procedury EBM (*ang. Evidence-Based Medicine*) - jako lek o udokumentowanym wpływie na mechanizmy patogenetyczne polineuropatii cukrzycowej (Sieradzki, 2015). Jest to najczęstsze odległe powikłanie cukrzycy, istotnie ograniczające jakość i długość życia chorych. Dotyka ono chorych zarówno z cukrzycą typu 1, jak i typu 2, a ryzyko jej wystąpienia wzrasta wraz z czasem trwania cukrzycy i nasileniem hiperglikemii. Po 25 latach trwania cukrzycy, neuropatia cukrzycowa rozwija się u około 50% pacjentów, a według niektórych diabetologów odsetek ten sięga nawet 90% (Szczyrba i wsp., 2010). Do typowych objawów polineuropatii cukrzycowej należą: mrowienia i/lub zaburzenia czucia, przeczulica oraz ból. Ból ten może mieć bardzo różne nasilenie: od zaledwie dyskomfortu odczuwanego jako delikatne klucie do bólu bardzo silnego, uporczywego, głębokiego i w zasadzie nie poddającego się leczeniu. Dworacka i wsp. wykazali w oparciu o 20-stopniową skalę McGilla, że LA zażywany doustnie przez 90 dni znacząco łagodzi ból neuropatyczny u chorych na cukrzycę typu 2 (Dworacka i wsp., 2012).

W niektórych krajach (ale nie w Polsce) wskazaniem rejestracyjnym do stosowania LA są również choroby wątroby. Na uwagę zasługują tu wyniki eksperymentu klinicznego, któremu poddano trzech chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C. W postępowaniu tym pacjenci otrzymywali obok LA, preparaty selenu i lek roślinny pozyskiwany z ostropestu plamistego znany jako sylimarina. Po trwającej rok terapii uzyskano pełną normalizację funkcji wątroby (Berkson, 1999). Mając na uwadze, że

przewlekłe zapalenie wątroby typu C jest schorzeniem, w którym ciągle jeszcze metodą leczenia jest najczęściej transplantacja wątroby, to przytoczone powyżej wyniki postępowania terapeutycznego robią wrażenie i zasługują na głębsze zainteresowanie badaczy. LA jako lekiem interesują się - poza diabetologami i hepatologami - również lekarze innych specjalności, w tym dermatolodzy, neurologi i kardiologowie.

Wyniki randomizowanego, trwającego 12 tygodni badania klinicznego, dotyczącego wpływu kremu kosmetycznego zawierającego LA na skórę twarzy, wykazały w oparciu o 11-stopniową skalę statystycznie istotną poprawę skóry pod wpływem LA (Beitner, 2003).

W opublikowanej w 2002 roku pracy Liu i wsp. (2002) w badaniach na szczurach wykazali, że podawanie LA znacząco skraca czas potrzebny zwierzętom do wydostania się z labiryntu wodnego Morrisa. Skojarzone podawanie kwasu dokozaheksaenowego, kwasu eikozapentaenowego i LA u pacjentów z wyraźnymi oznakami otępienia pozwoliło na istotne statystycznie zmniejszenie jego progresji w porównaniu z placebo, co wykazano w okresie obserwacji 12 miesięcy zarówno w oparciu o skalę diagnostyczną „Mini-Mental” (MMSE, ang. *Mini-Mental State Examination*), jak i w ocenie podstawowych sprawności w zakresie czynności dnia codziennego (Dżumaga, 2017).

Na uwagę zasługują również wyniki badań dotyczących wpływu LA na wielkość strefy zawału mięśnia sercowego prowadzonych na zwierzęcym modelu niedokrwienia/reperfuzji. W eksperymencie tym krążenie krwi w gałęzi międzykomorowej przedniej (część lewej tętnicy wieńcowej; łac. *ramus interventricularis anterior*) przywrócono po 30 minutach niedokrwienia naczynia. Zmierzony po 24 h od przywrócenia krążenia obszar zawału mięśnia sercowego (IS; ang. *infarct size*) wyniósł około 42% powierzchni serca. Natomiast w grupie szczurów, które 30 minut przed okluzją naczynia otrzymały w iniekcji dożylniej LA w dawce 15 mg/kg wagi ciała wielkość IS wyniosła około 27% powierzchni serca (Deng i wsp., 2013).

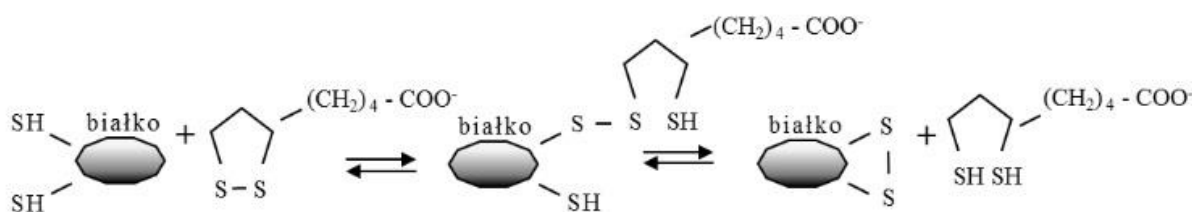
W wielu przeprowadzonych badaniach wykazano, iż LA przeciwdziała aktywacji czynnika NF- κ B (Malińska i Winiarska, 2005; Packer, 1998; Suzuki i wsp., 1992), co mogłoby mieć znaczenie w terapii zespołu nabytego upośledzenia odporności (AIDS, ang. *acquired immunodeficiency syndrome*). Stwierdzono bowiem, że aktywny czynnik NF- κ B ma zdolność do wiązania określonych sekwencji również w DNA prowirusa HIV, co prowadzi do wzmożenia replikacji wirusa w zainfekowanych komórkach limfocytów T_H, a w konsekwencji do ich apoptozy (Pace i Leaf, 1995). Wiadomo również, że czynnik transkrypcyjny NF- κ B odpowiada za proliferacyjne działanie w komórkach nowotworowych (Piotrowska i wsp., 2008; Skórka i Giannopoulos, 2012). W tym kontekście interesujące są badania Kuban-Jankowskiej i wsp. (2017) prowadzone z użyciem linii

komórek nowotworowych piersi MCF-7, które wykazały, że zarówno LA, jak i DHLA znacząco hamują proliferację tych komórek.

Wśród badanych mechanizmów biologicznej aktywności LA wskazuje się również na powiązanie LA ze ścieżką sygnałową kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K, ang. *phosphatidylinositol 3-kinase*) i kinazy białkowej Akt, nazywanej również kinazą białkową B (PKB, ang. *protein kinase B*). Aktywna PI3K fosforyluje 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu (PIP2), w wyniku czego powstaje (3,4,5)-trifosforan fosfatydyloinozytolu (PIP3), będący cząsteczką sygnałową. Zwiększenie poziomu ilości PIP3, wynikające z aktywności kinazy PI3K, prowadzi między innymi do aktywacji Akt. W modelu okluzji-reperfuzji z użyciem izolowanej wątroby szczura wykazano wzrost aktywności Akt pod wpływem LA, co było skorelowane ze znaczącym zmniejszeniem uszkodzeń poreperfuzyjnych, podczas gdy w obecności inhibitora kinazy PI3K, aktywującej Akt hepatoprotekcyjnego działania LA nie obserwowano (Müller i wsp., 2003).

Wykazano również, że LA jest zdolny do hamowania nadmiernej, obserwowanej często w przebiegu nadciśnienia, syntezy endoteliny 1 (Takaoka i wsp., 2001). Innym udokumentowanym działaniem LA jest jego wpływ na hamowanie czynnika transkrypcyjnego AP-1 (dimer białka c-fos i c-jun) (Gorąca i Cieśla, 2008). W badaniach na zwierzętach laboratoryjnych wykazano również, że LA zmniejsza masę ciała i nadwagę u szczurów pozostających na diecie wysokotłuszczowej, co wiąże się z wpływem LA na wzrost aktywności białkowej kinazy AMPK w białej tkance tłuszczowej badanych zwierząt (Prieto-Hontoria i wsp., 2013).

Niektórzy autorzy zwracają uwagę na możliwość uczestniczenia LA w odwracalnych reakcjach S-tiolacji białek (Shay i wsp., 2008). Przyłączenie LA do białka może być przejściowe. Mianowicie, najpierw tworzy się mieszany disiarczek białka i LA, z którego następnie uwalnia się białko z utlenionymi grupami -SH i DHLA (Rys. 4).



Rys. 4. Prawdopodobny przebieg procesu S-tiolacji białka z udziałem LA/DHLA.

Jednak do tej pory nie ma badań jednoznacznie potwierdzających istnienie procesu S-tiolacji białek z udziałem LA/DHLA w organizmach żywych. Wiadomo natomiast, że tego typu procesy w warunkach *in vivo* przebiegają z udziałem glutationu, cysteiny i homocysteiny, czego dowodem jest obecność w komórkach mieszanych disiaczków: białko-S-S-glutation, białko-S-S-cysteina i białko-S-S-homocysteina (Bilska i wsp., 2007; Chai i wsp., 1994a; Chai i wsp., 1994b; Mallis i Thomas, 2000; Włodek i Iciek, 2003). Proces ten postrzegany jest jako molekularny „przełącznik”, decydujący o wewnątrzkomórkowym statusie oksydacyjno-redukcyjnym tioli i kontrolujący szlaki metaboliczne komórek.

Interesujące są również spostrzeżenia tych autorów, którzy zwracają uwagę na zdolność LA i DHLA do wiązania jonów metali (Gorąca i wsp., 2011; Malińska i Winiarska, 2005). W tym kontekście warto przytoczyć badania, w których wykazano że u ludzi wysoki poziom ferrytyny - białka wiążącego jony żelaza Fe^{3+} - w płynie mózgowo-rdzeniowym - jest markerem zwiększonego ryzyka rozwoju choroby Alzheimera (Ayton i wsp. 2015). Jednocześnie wskazuje to na możliwość zwolnienia postępu choroby przez leki usuwające ten pierwiastek z mózgu. Już w latach 90-tych XX wieku wykazano, że długotrwałe podawanie deferoksaminy - związku chelatującego trójwartościowe jony metali - znacząco opóźnia postęp kliniczny demencji u pacjentów z chorobą Alzheimera (McLachlan i wsp., 1991). Suh i wsp. (2005) wykazali, że dieta wzbogacona w LA w ciągu 2 tygodni prowadzi u starych szczurów (24-28 miesięczne) do obniżenia poziomu żelaza w mózgu do poziomu obserwowanego u szczurów młodych (3 miesięczne).

Największa jednak ilość autorów poszukując mechanizmów biologicznej aktywności LA koncentruje się na antyoksydacyjnych właściwościach LA i DHLA, postrzeganych jako zdolność do bezpośredniego zmiatania reaktywnych form tlenu (RFT). Trzeba przypomnieć, że układ LA/DHLA w porównaniu do innych układów biologicznych charakteryzuje się jedną z najniższych wartości standardowego biologicznego potencjału oksydacyjno-redukcyjnego ($E_0' = -0,29V$). DHLA jest więc zdolny nie tylko do redukcji RFT, ale również do redukcji utlenionych form pozostałych antyoksydantów (glutationu, kwasu askorbinowego, tokoferolu) (Tabela 1). Z tego powodu związek ten jest często nazywany antyoksydantem antyoksydantów (Packer i wsp., 1995).

Tabela 1.

**Wartości standardowych biologicznych potencjałów oksydacyjno-redukcyjnych (E_0')
wybranych układów oksydacyjno-redukcyjnych.**

Układ	E_0' (V)
$\text{kwas octowy} + 2e + 2H^+ \rightleftharpoons \text{aldehyd octowy}$	-0,60
$NAD^+ + 2e + 2H^+ \rightleftharpoons NADH + H^+$	-0,32
$\text{liponian} + 2e + 2H^+ \rightleftharpoons \text{dihydroliponian}$	-0,29
$GSSG + 2H^+ + 2e \rightleftharpoons 2GSH$	-0,23
$\text{cystyna} + 2e + 2H^+ \rightleftharpoons 2 \text{ cysteina}$	-0,22
$\text{aldehyd octowy} + 2e + 2H^+ \rightleftharpoons \text{etanol}$	-0,20
$FAD + 2e + 2H \rightleftharpoons FADH_2$	-0,06
$\text{dehydroaskorbinian} + 2e + 2H^+ \rightleftharpoons \text{askorbinian}$	-0,058
$TO^\bullet + H^+ + e \rightleftharpoons TOH$ (chromanoksyłowy rodnik tokoferolu)	0,48
$\frac{1}{2}O_2 + 2e + 2H^+ \rightleftharpoons H_2O$	0,82
$H_2O_2 + 2e + 2H^+ \rightleftharpoons O_2^{\bullet -}$	0,87
$\text{kationorodnik LA} + 1e \rightleftharpoons LA$	1,1
$H_2O_2 + 2e + 2H^+ \rightleftharpoons H_2O + \frac{1}{2}O_2$	1,32
$^\bullet OH + H^+ + e \rightleftharpoons H_2O$	2,31

Reakcje oksydacyjno-redukcyjne są fundamentalnymi procesami podstawowego metabolizmu wszystkich komórek. Zaburzeniem równowagi pro- i antyoksydacyjnej można więc wyjaśnić mechanizm etiopatogenezy i/lub rozwoju wielu, pozornie odległych stanów patologicznych. Stąd też rosnące znaczenie antyoksydantów w medycynie i coraz powszechniejsze stosowanie terminu "stres oksydacyjny" w naukach medycznych. Linus Pauling już kilkadziesiąt lat temu zwracał uwagę na fakt, że o postępie w medycynie zadecyduje tzw. „chemia ortomolekularna”. Koncepcja ta zakłada, że najistotniejszym elementem pomocy medycznej jest ingerencja w metabolizm komórki przy pomocy związków naturalnych, które podane w odpowiednim czasie i w odpowiedniej dawce będą utrzymywać lub przywracać prawidłowe funkcjonowanie organizmu (Pauling, 1968). Biorąc pod uwagę niezliczoną wręcz ilość publikacji poświęconych farmakologii LA można by - w myśl idei Paulinga - sformułować tezę, iż LA okaże się w przyszłości kluczowym

składnikiem wszystkich praktycznie preparatów leczniczych w zakresie proporcjonalnym do roli, jaką odgrywa stres oksydacyjny w etiopatogenezie i przebiegu danego schorzenia.

Z drugiej jednak strony pogląd o uniwersalnym charakterze stresu oksydacyjnego w medycynie, jakkolwiek bardzo atrakcyjny, w kontekście rozwoju nauk medycznych jest mało przydatny. Co więcej, zaczynają pojawiać się prace, w których autorzy kwestionują zdolność LA do bezpośredniego unieszkodliwiania RFT w warunkach *in vivo*, przypominając że większość badań opisujących zdolność LA i DHLA do redukcji RFT (Tabela 1) pochodzi z obserwacji *in vitro*, natomiast efekty biologicznego działania LA w warunkach *in vitro* często różnią się od tych, które obserwujemy w warunkach *in vivo* (Shay i wsp., 2008; Smith i wsp., 2004). Problem ten, jakkolwiek został już dostrzeżony, ciągle jeszcze jest za mało badany i rozpoznany. W mojej opinii jedną z przyczyn zaobserwowanego zjawiska są różne właściwości chemiczno-biologiczne LA i DHLA. W warunkach *in vitro* – w nieobecności tkanek i komórek żywych organizmów nie ma możliwości przekształcenia się formy LA w DHLA. Natomiast w komórkach organizmów żywych występują obie formy. Większe zasługi terapeutyczne przypisuje się formie zredukowanej - DHLA. DHLA - jak już wcześniej wspomniano - jest jednym z najsilniejszych reduktorów występujących w komórkach. Natomiast preparaty obecne na rynkach farmaceutycznych zawierają formę utlenioną - LA, ponieważ forma zredukowana - DHLA jest bardzo niestabilna. Przyjmuje się, że po zaaplikowaniu LA jest on redukowany do DHLA przez zależną od NADH mitochondrialną dehydrogenazę dihydroliponianową oraz przez umiejscowione w cytoplazmie reduktazy: glutationową (EC 1.6.4.2) i tioredoksynową (EC 1.6.4.5) wykorzystujące NADPH (Packer i wsp., 1995). Oznacza to, że efekt leczniczy LA jest uzależniony od dostępności biologicznych systemów redukcyjnych, która to dostępność w warunkach choroby i nasilonego stresu oksydacyjnego jest znacznie ograniczona. Tak więc po podaniu LA ilość powstającego z niego DHLA jest zależna od wielu czynników, w tym od dawki i częstotliwości podawania LA oraz od dostępności i aktywności endogennych systemów antyoksydacyjnych. Sygnalizuje to, że efekt terapeutyczny będzie zależał od działania obu tych związków w zakresie proporcjonalnym do ich stężenia w komórce.

Problem odmiennego działania LA w warunkach *in vitro* i *in vivo* został również poruszony w opublikowanej w 2016 roku na łamach Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research pracy doświadczalnej pt.: „*Inactivation of aldehyde dehydrogenase by nitroglycerin in the presence and absence of lipoic acid and dihydrolipoic acid*”. *Implications for the problem of differential effects of lipoic acid in vitro and in vivo*”, która wchodzi w skład prac stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej. Przedstawione tam wyniki wskazują,

że nitrogliceryna (triazotan glicerolu; GTN) jest silnym inhibitorem aktywności katalitycznej dehydrogenazy aldehydowej (EC 1.2.1.3; ALDH) zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*. LA i DHLA w warunkach *in vitro* chronią enzym przed hamującym wpływem GTN, jak również są zdolne do przywracania już zahamowanej przez GTN aktywności katalitycznej ALDH. Wykazano jednocześnie, że w warunkach *in vivo* LA nie chroni ALDH przed inaktywacją przez GTN (Praca 1). Wzajemne relacje między GTN, ALDH i LA były przedmiotem intensywnych badań prowadzonych w kontekście poszukiwań molekularnych mechanizmów zjawiska tolerancji na GTN (Chen i wsp., 2002). Problematyka ta została szerzej skomentowana w Dyskusji.

Prowadzone w naszym zespole, we współpracy z naukowcami z Katedry Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum badania sugerują natomiast, że jednym z mechanizmów biologicznej aktywności LA w warunkach *in vivo* jest jego wpływ na przemiany związków z siarką sulfanową i siarkowodoru (H_2S). Jest to teza nowa, do tej pory w niewielkim stopniu podnoszona przez innych autorów.

Siarką sulfanową nazywamy labilny, reaktywny atom siarki na 0 lub -1 stopniu utlenienia, związany kowalencyjnie z innym atomem siarki. Przykładami związków z siarką sulfanową są wodoronadszarczki ($R-S-S-H$), poliszarczki ($R-S_n-R$, $n \geq 3$), tioszarczan ($S=SO_3^{2-}$), politioniany ($O_3S-S_n-SO_3^-$), tiosulfoniany ($R-S(O)_2-S-R$) oraz siarka elementarna (S_8). H_2S do niedawna powszechnie traktowany wyłącznie jako toksyczny gaz, obecnie postrzegany jest jako ważny metabolit endogeny, mający znaczenie dla procesów biochemicznych i fizjologicznych, zachodzących w komórkach ludzi i zwierząt. Lawinowy wzrost zainteresowania fizjologiczną rolą H_2S zainicjowały badania Abe i Kimura (1996), które wykazały że H_2S jest syntetyzowany w hipokampie na drodze zależnej od enzymów i doprowadziły do konkluzji, że w ośrodkowym układzie nerwowym pełni on rolę neuroprzekaźnika zaangażowanego w modulowanie aktywności synaptycznej i procesy uczenia asocjacyjnego.

Problem wzajemnych interakcji pomiędzy LA, a przemianami siarki sulfanowej został poruszony w pracach doświadczalnych pt.: „*The effect of lipoic acid administration on the urinary excretion of thiocyanate in rats exposed to potassium cyanide*” i „*Lipoic acid as a possible pharmacological source of hydrogen sulfide/sulfane sulfur*”, które wchodziły w skład prac stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej (Praca 2 i Praca 3). Wyniki te zostały szerzej skomentowane w Dyskusji.

Obecnie w bibliograficznej bazie PubMed znajduje się ponad 5000 pozycji literaturowych dotyczących LA/DHLA. Jednak mimo tak imponującej ilości badań, wskazujących na bardzo szerokie spektrum farmakologicznej aktywności LA/DHLA, mechanizm jego biologicznej aktywności w znacznym stopniu pozostaje nieznany. Przeprowadzone i przedstawione w ramach realizacji niniejszego doktoratu wyniki moich poszukiwań stanowią zatem skromny wkład w badania dotyczące rozpoznania tych mechanizmów, co pozwoliłoby na świadome i odpowiedzialne rozszerzenie obszarów farmakologicznego zastosowania LA w praktycznej medycynie klinicznej.

CEL PRACY

Celem prezentowanej pracy było poszerzenie wiedzy dotyczącej mechanizmów biologicznej aktywności LA ze źródeł egzogennych. Mimo bowiem licznych badań, dokumentujących korzystne działanie tego związku w wielu różnych stanach patologicznych, mechanizmy poprzez które wpływa on na procesy zachodzące w komórkach organizmu żywego pozostają w dużym stopniu nierozpoznane.

Moją uwagę zwróciły badania wskazujące na powiązanie LA i GTN z aktywnością ALDH, stąd celem poszukiwań podjętych w ramach realizacji niniejszej rozprawy było prześledzenie wpływu GTN i LA na aktywność ALDH w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Problematyka ta ściśle łączy się ze zjawiskiem tolerancji na GTN, którego mechanizm wciąż nie jest w pełni wyjaśniony. Ponadto badania te zwracają uwagę na mało jeszcze dostrzegany problem odmiennego działania LA w warunkach *in vitro* i *in vivo*.

W niniejszej pracy podjęto również próbę wykazania, że LA włącza się w przemiany reaktywnych form siarki (RFS), tj. siarki sulfanowej i H_2S . Celem prowadzonych w tym kontekście badań było również sprawdzenie czy LA i DHLA same mogą być źródłem RFS.

Badania te zostały podjęte tak ze względu na interesujący aspekt poznawczy, jak i ze względu na możliwość wykorzystania uzyskanych wyników w praktycznej medycynie klinicznej. Uzyskane wyniki badań niewątpliwie przyczynią się do lepszego poznania mechanizmów farmakologicznej aktywności LA.

PRACA 1

Bilska-Wilkosz A., Górny M. Dudek M., Nowiński L Bednarski M., Iciek M., Kowalczyk-Pachel D., Sokołowska-Jeżewicz M., Filipek B., Włodek L.:

Inactivation of aldehyde dehydrogenase by nitroglycerin in the presence and absence of lipoic acid and dihydrolipoic acid. Implications for the problem of differential effects of lipoic acid *in vitro* and *in vivo*. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, 2016, 73 (6), 1531-1538.

Badania *in vivo* zostały wykonane
w Katedrze Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego UJ CM

METODYKA

Zwierzęta

Badania *in vivo* przeprowadzono na dojrzałych samcach szczurów szczepu Wistar o masie ciała 100-150 g. Szczury umieszczano w klatkach w pomieszczeniu o standardowych warunkach klimatycznych (temperatura $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$), z naturalnym rytmem świetlnym. Zwierzęta otrzymywały paszę standardową i wodę *ad libitum*.

Do badań został użyty lek o nazwie Thiogamma, który jako substancję farmakologicznie aktywną zawiera racemat LA i lek o nazwie Nitracor, który jako substancję farmakologicznie aktywną zawiera GTN. Badania zostały przeprowadzone po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej w Krakowie.

Zwierzęta podzielono na trzy grupy. Każda grupa liczyła 8 szczurów.

Grupy były traktowane w następujący sposób:

Grupa 1: kontrola. Przez 8 dni podawano podskórnie (sc) 0,9% roztwór NaCl (0,6 ml trzy razy dziennie);

Grupa 2: GTN. Przez 8 dni podawano podskórnie (sc) roztwór GTN w jednorazowej dawce 10 mg/kg wagi ciała, trzy razy dziennie;

Grupa 2: GTN + LA. Przez 8 dni podawano podskórnie (sc) roztwór GTN w dawce 10 mg/kg wagi ciała trzy razy dziennie i roztwór LA dootrzewnowo (*ip*) w jednorazowej dawce 50 mg/kg wagi ciała, dwa razy dziennie.

Dziewiątego dnia zwierzęta zabijano przez przerwanie rdzenia kręgowego, pobierano wątroby i zamrażano w ciekłym azocie, po czym przechowywano w temperaturze -76°C do momentu oznaczeń aktywności ALDH.

Przygotowanie homogenatu tkanek

Homogenat tkanek przygotowano przez homogenizację 1 g tkanki w 4 ml 0,1 M buforu fosforanowego pH 7,4 przy użyciu homogenizatora marki IKA-ULTRA-TURRAX T8, stosując 20 tys. obrotów/min. przez 10 minut.

Oznaczanie aktywności ALDH w homogenatach wątroby szczura

W homogenatach wątroby oznaczano aktywność ALDH. Mieszanina reakcyjna oprócz homogenatu zawierała bufor fosforanowy pH 8,2, NAD^+ , EDTA, 4-metylopirazol i rotenon. Reakcję rozpoczęto przez dodanie aldehydu propionowego jako substratu. 4-metylopirazol jest inhibitorem dehydrogenazy alkoholowej. Rotenon jest inhibitorem łańcucha oddechowego. Próba ślepa nie zawierała homogenatu.

Metoda oznaczania aktywności katalitycznej ALDH jest oparta na teście Warburga, wykorzystującym właściwości optyczne dinukleotydów nikotynamidoadeninowych NAD(P)/NAD(P)H . Forma utleniona $[\text{NAD(P)}]$ charakteryzuje się silnym pasmem absorbancji przy 260 nm. Natomiast forma zredukowana $[\text{NAD(P)H}]$ wykazuje dodatkowe pasmo absorbancji przy 340 nm. Zmiana absorbancji przy 340 nm (wzrost lub spadek) jest więc miarą redukcji utlenionego lub utlenienia zredukowanego koenzymu. Ilościowo zależność tę ujmuje molowy współczynnik absorbancji, który dla NAD(P)H wynosi $6,22 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \times \text{dm}^3 \times \text{cm}^{-1}$.

Aktywność ALDH wyrażano jako nmol NADH wytworzonego w ciągu 1 minuty w przeliczeniu na 1 mg białka.

Oznaczanie białka

Metoda oznaczania białka opiera się na reakcji biuretovej pomiędzy wiązaniami peptydowymi, a jonami miedzi w środowisku alkalicznym oraz na reakcji obecnych w białku reszt aminokwasów aromatycznych – tyrozyny i tryptofanu z odczynnikiem Folina-Ciocalteu (mieszaniną kwasu fosfomolibdenowego i fosforowolframowego). Jon miedzi związany z białkiem oraz reszty tyrozyny i tryptofanu redukują powyższe kwasy do odpowiednich tlenków oznaczanych spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda=500 \text{ nm}$.

Wpływ LA, DHLA i GTN na aktywność ALDH w warunkach *in vitro*

Do badań użyto drożdżową ALDH. Finalne stężenie enzymu we wszystkich eksperymentach *in vitro* wynosiło 0,3 mg/ml. Zastosowano 0,1 mM stężenie GTN oraz 1 mM stężenie LA i jego zredukowanej formy - DHLA. Badania aktywności ALDH prowadzono w pH 8,0, w temp. 25°C . Przygotowano dwie serie eksperymentalne.

W I serii eksperymentalnej wykonano 3 mieszaniny reakcyjne:

- (1) ALDH preinkubowano z GTN przez 20 minut;
- (2) ALDH preinkubowano z GTN przez 5 minut, a następnie dodano LA i dalej prowadzono inkubację przez 15 minut;
- (3) ALDH preinkubowano z GTN przez 5 minut, a następnie dodano DHLA i dalej prowadzono inkubację przez 15 minut.

W II serii eksperymentalnej wykonano 3 mieszaniny reakcyjne:

- (1) ALDH preinkubowano z GTN przez 5 minut;
- (2) ALDH preinkubowano z LA przez 15 minut, a następnie dodano GTN i dalej prowadzono inkubację przez 5 minut;
- (3) ALDH preinkubowano z DHLA przez 15 minut, a następnie dodano GTN i dalej prowadzono inkubację przez 5 minut.

We wszystkich mieszaninach reakcyjnych enzym zmierzono aktywność ALDH. W tym celu przygotowano roztwór zawierający bufor fosforanowy pH 8,2, NAD^+ i aldehyd propionowy, będący substratem dla ALDH. Reakcję enzymatyczną rozpoczynano przez dodanie do tego roztworu odpowiedniej mieszaniny reakcyjnej zawierającej enzym. Pomiar absorbancji prowadzono przy długości fali 340 nm przez 2 minuty w temperaturze 25°C. Wyniki podawano jako procent kontroli. Próbką kontrolną, dla której przyjęto aktywność równą 100% zawierała tylko ALDH, bez obecności GTN, LA i DHLA.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA i testu *post-hoc* Tukey'a. Wyniki z badań *in vivo* przedstawiono jako wartość średnią z 8 zwierząt $\pm$ odchylenie standardowe (SD) w każdej grupie. Wyniki z badań *in vitro* przedstawiono jako wartość średnią z trzech niezależnych powtórzeń $\pm$ odchylenie standardowe dla każdej serii badań. Przyjęto kryterium znamienności $p \leq 0,05$.

WYNIKI

Uzyskane wyniki badań *in vivo* wskazują, że po 8 dniach podawania szczurom GTN aktywność ALDH mierzona w homogenacie wątroby wynosi $21,12 \pm 3,87$ U/mg białka, podczas gdy w grupie zwierząt kontrolnych, nie otrzymujących GTN oznaczona w homogenacie wątroby aktywność enzymu wyniosła $45,28 \pm 10,85$ U/mg białka. Oznacza to, że GTN jest bardzo silnym inhibitorem ALDH w wątrobie szczura. Natomiast u zwierząt, które przez 8 dni otrzymywały łącznie GTN i LA zmierzona w homogenacie wątroby aktywność ALDH wyniosła $26,25 \pm 5,38$ U/mg białka. Oznacza to, że podawanie LA nie chroni ALDH przed hamującym wpływem GTN na aktywność ALDH w wątrobie szczura.

Wyniki *in vitro*, uzyskane w I serii eksperymentu wskazują, że po 20-minutowej inkubacji ALDH z GTN aktywność enzymu wynosi 8,2% aktywności w odniesieniu do próby kontrolnej, dla której przyjęta aktywność wynosi 100%. Oznacza to, że warunkach *in vitro* GTN jest silnym inhibitorem aktywności enzymatycznej ALDH. Natomiast po 5 minutowej preinkubacji enzymu z 0,1 mM GTN, a następnie dalszej 15 minutowej inkubacji z 1 mM LA lub DHLA (mieszanina reakcyjna 2 i 3, odpowiednio) aktywność ALDH wynosi odpowiednio 31,6% i 71,9% w porównaniu do kontroli (100%). Oznacza to, że 1 mM LA i DHLA są zdolne do przywrócenia zahamowanej przez GTN aktywności ALDH, przy czym bardziej skuteczny jest tu DHLA.

Wyniki *in vitro*, uzyskane w II serii eksperymentu wskazują, że po 5-minutowej inkubacji ALDH z GTN aktywność enzymu spada do wartości 27% aktywności kontrolnej (100%), co potwierdzają wcześniejsze wyniki, wskazujące na GTN jako inhibitor aktywności katalitycznej ALDH. Natomiast po 15-minutowej preinkubacji enzymu z 1 mM LA lub DHLA, a następnie dalszej 5-minutowej inkubacji z 0,1 mM GTN (mieszanina reakcyjna 2 i 3) aktywność ALDH wynosi odpowiednio 68,1% i 106,9% w porównaniu do kontroli (100%). Oznacza to, że 1 mM LA i DHLA są zdolne do ochrony aktywności ALDH przed hamującym wpływem GTN. LA chroni aktywność enzymu częściowo, podczas gdy w obecności DHLA, GTN praktycznie w ogóle nie hamuje aktywności katalitycznej ALDH.

Reasumując, przeprowadzone badania wykazały, że GTN jest silnym inhibitorem aktywności katalitycznej ALDH zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*. W warunkach *in vitro* zarówno LA, jak i DHLA chronią aktywność ALDH przed hamującym wpływem GTN, jak również są zdolne do przywrócenia już zahamowanej przez GTN aktywności katalitycznej ALDH. W warunkach *in vivo* podawanie szczurom LA nie chroni aktywności wątrobowej ALDH przed hamującym wpływem GTN.

Uzyskane wyniki dodatkowo zwracają uwagę na fakt, iż efekty biologicznego działania LA w warunkach *in vitro* mogą różnić się od tych, które obserwujemy w warunkach *in vivo*. Problem ten, choć ważny, ciągle jeszcze jest za mało poznany i zbadany. Prezentowana praca (Praca 1) jest więc skromnym głosem w toczącej się na ten temat dyskusji.

INACTIVATION OF ALDEHYDE DEHYDROGENASE BY NITROGLYCERIN IN THE PRESENCE AND ABSENCE OF LIPOIC ACID AND DIHYDROLIPOIC ACID. IMPLICATIONS FOR THE PROBLEM OF DIFFERENTIAL EFFECTS OF LIPOIC ACID *IN VITRO* AND *IN VIVO*

ANNA BILSKA-WILKOSZ¹, MAGDALENA GÓRNY¹, MAGDALENA DUDEK²,
LESZEK NOWIŃSKI³, MAREK BEDNARSKI³, MAŁGORZATA ICIEK¹,
DANUTA KOWALCZYK-PACHEL¹, MARIA SOKOŁOWSKA-JEŻEWICZ¹, BARBARA FILIPEK²
and LIDIA WŁODEK^{1*}

¹Chair of Medical Biochemistry, Jagiellonian University, Medical College,
7 Kopernika St., PL 31-034 Kraków, Poland

²Department of Pharmacodynamics, ³Department of Pharmacological Screening, Jagiellonian University,
Medical College, 9 Medyczna St., PL 30-688 Kraków, Poland

Abstract: Lipoic acid (LA-(SS), LA) and its reduced form - dihydrolipoic acid DHLA-(SH)₂, DHLA) are synthesized mainly in the mammalian liver. In this study, we investigated *in vitro* the inactivation of yeast aldehyde dehydrogenase (ALDH) by nitroglycerin (GTN) in the presence and absence of LA and DHLA. *In vivo* studies were performed to answer the question whether LA administered jointly with GTN for 8 days will affect the ALDH activity in the rat liver. The results indicated that *in vitro* both LA and DHLA restored and protected ALDH activity against GTN-induced inactivation, while treatment of rats with LA and GTN in combination did not provide any protection against GTN-induced ALDH inhibition. In summary, the obtained results seem to confirm earlier reports indicating the differential effects of LA *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: lipoic acid, dihydrolipoic acid, nitroglycerin, aldehyde dehydrogenase

Lipoic acid, also known as α -lipoic acid or thioctic acid (LA, LA-(SS), 1,2-dithiolane-3-pentanoic acid) and its reduced form dihydrolipoic acid (DHLA, DHLA-(SH)₂, 6,8-dimercaptooctanoic acid) are present in all prokaryotic and eukaryotic cells. The chemical structures of LA and DHLA are shown in Figure 1. LA is synthesized in mammals in the mitochondria of the liver and other tissues. It is suggested that octanoic acid is the precursor of the eight-carbon fatty acid chain of LA while cysteine is the source of sulfur. Most of LA in the body is found tightly bound to proteins by an amide linkage (lipoamide, lipoyl group) to a lysine residue (lipolysine). This lipoamide bond functions mainly as a cofactor of multienzymatic mitochondrial complexes catalyzing oxidative decarboxylation of α -ketoacids (1, 2). The lipoyl group can be oxidized and reduced by lipoamide dehydrogenase.

Apart from endogenous synthesis, LA is also absorbed from food. LA has been detected in the

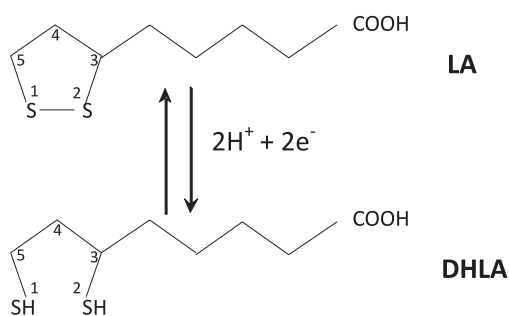


Figure 1. Chemical structures of lipoic acid (LA) and its reduced form dihydrolipoic acid (DHLA)

form of lipolysine in various natural products. The most important dietary sources of it include spinach, broccoli and meat offal (3). Lipolysine absorbed from the diet can be hydrolyzed in blood by lipoamidase. Moreover, LA has now become a common ingredient of different formulas for athletes, anti-

* Corresponding author: e-mail: mbwlodek@cyf-kr.edu.pl; phone: +48 12 4227400; fax: +48 12 4223272

aging supplements and even pet food (4). In recent years, pharmacological properties of exogenously supplemented LA have attracted attention of many researchers. It is suggested that therapeutic effects of LA supplementation can be attributed to the potent antioxidant properties of LA and DHLA. The reductive potential of the LA/DHLA couple has been estimated at -320 mV (1) or -290 mV (5). This means that DHLA is able to reduce not only reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively) but also the oxidized forms of other antioxidants, both hydrophilous, such as glutathione disulfide (GSSG) and dehydroascorbic acid (DHA), and hydrophobic, such as chromanoxyl radical of tocopherol (TOH) (6–10) (Table 1). For this

reason, DHLA is often called the antioxidant of antioxidants or a universal antioxidant (11). The oxidized form, i.e., LA has also been demonstrated to express antioxidant properties (11, 12) (Table 2). Redox reactions are fundamental processes in metabolism of all cells. A disruption of the pro- and antioxidant balance can explain the mechanism of etiopathogenesis and progression of many, apparently distant pathological states. This is the reason for an increasing significance of antioxidants in medicine and more common use of the term “oxidative stress” in medical sciences. However, since the activity of LA and DHLA as direct scavengers of ROS/RNS was confirmed mostly by *in vitro* experimental studies, some authors question the efficacy

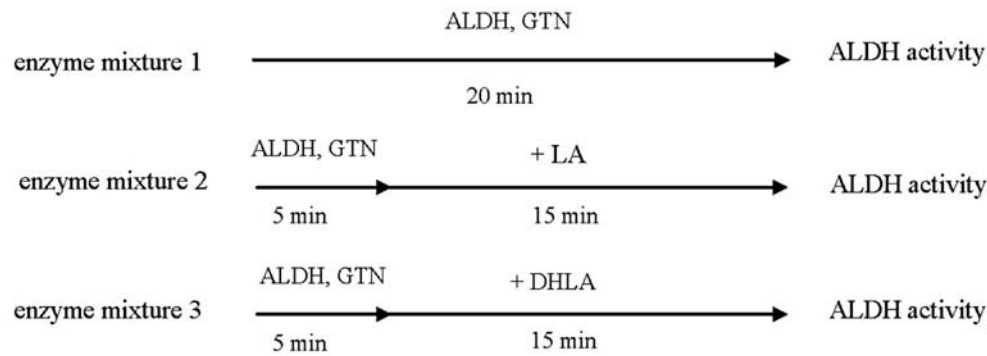
Table 1. The values of standard biological redox potentials (E_0') of selected redox systems

System	E_0' (V)	Reference
Acetic acid/acetaldehyde	-0.60	(11)
Acetylo-CoA/acetaldehyde	-0.41	(11)
NAD/NADH + H ⁺	-0.32	(12, 14)
LA/DHLA	-0.29	(5, 12, 13)
GSSG/GSH	-0.24	(12)
Cystine/cysteine	-0.22	(12, 15)
Acetaldehyde/ethanol	-0.20	(11)
FAD/FADH ₂	-0.06	(11, 14)
Dehydroascorbic acid/ascorbic acid	0.08	(11, 12)
Chromanoxyl radical of tocopherol/tocopherol	0.48	(13, 14)
O ₂ /H ₂ O	0.82	(14)
H ₂ O ₂ /O ₂ ^{•-}	0.87	(14)
NO ⁺ /NO [•]	1.21	(15)
H ₂ O ₂ /H ₂ O	1.32	(14)
ONOO ⁻ /NO ₂ [•]	1.40	(15)
•OH, H ⁺ /H [•] O	2.31	(15)

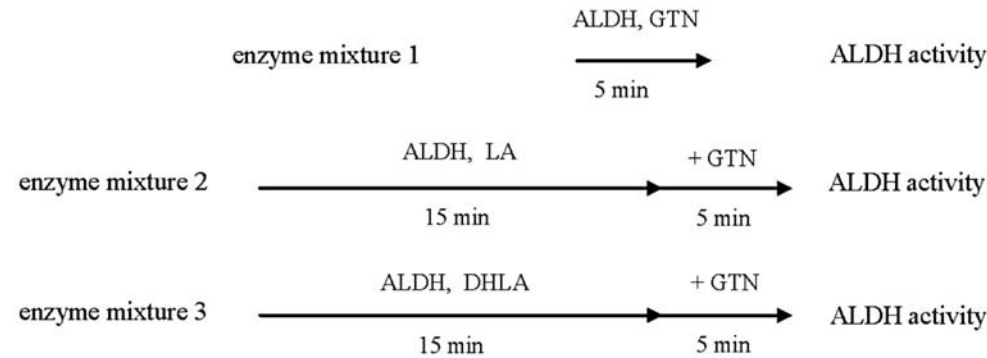
Table 2. The scavenging capacity of LA and DHLA for the selected ROS and RNS.

ROS/RNS	LA	DHLA	Scavenging capacity	Reference
O ₂ ^{•-}	no	yes	-	(11)
	no	no	-	(12)
H ₂ O ₂	yes	yes	LA < DHLA	(11)
	no	yes	-	(12)
•OH	yes	yes	LA < DHLA	(11)
			LA = DHLA	(12)
ONOO ⁻	yes	yes	LA < DHLA	(11, 12)
NO [•]	yes	yes	LA < DHLA	(11, 12)

Series I was prepared as follows:



Series II was prepared as follows:



Scheme 1. Design of the experiment investigating yeast ALDH activity *in vitro*. Two series of enzyme mixtures were prepared. The final concentration of ALDH was 0.3 mg/mL in all experiments. The concentration of thiols (LA and DHLA) in the enzyme mixtures was 1 mM

of the supplemented nonprotein-bound LA as a physiological antioxidant and underline the problem, overlooked until recently, related to the differential effects of LA *in vitro* and *in vivo* (13, 14). Our research paper is a modest contribution to the ongoing discussion on this issue.

In the present study, we investigated *in vitro* the inactivation of yeast aldehyde dehydrogenase (ALDH) by nitroglycerin (glycerol trinitrate; GTN) in the presence and absence of LA and DHLA. Moreover, *in vivo* studies were performed to answer the question whether LA administered jointly with GTN will affect the ALDH activity in the rat liver.

The genes encoding ALDHs were divided into several families and subfamilies. It should be noted that sequence comparison demonstrated that both

yeast and mammalian ALDH isozymes contained -SH groups that could form a wide variety of oxidation products (15).

EXPERIMENTAL

Reagents

In this study, the formulations Thiogamma and Nitracor were used, which contain LA and GTN, respectively, as pharmacologically active substances. Thiogamma was obtained from Hexal® AG, (Holzkirchen, Germany). Nitracor was purchased from LEK S.A. and Pliva Kraków S.A. (Poland). Purified yeast ALDH, as well as DHLA, EDTA, Folin-Ciocalteu reagent, 4-methylpyrazole, NAD, propionaldehyde and rotenone were provided

by Sigma-Aldrich Chemical Company ((Poznań, Poland). All the other reagents were of analytical grade and were obtained from Polish Chemical Reagent Company (POCH, Gliwice, Poland).

Animals

Animal experiments were conducted in accordance with the guidelines for animal experiments of Animal Research Committee and were approved by the Jagiellonian University Ethic Committee. The study was carried out on male Wistar rats using the modified experimental design of Dudek et al. (16, 17). The animals were divided randomly into three groups of 8 animals each. The first group was treated with 0.9% NaCl (0.6 mL, three times a day, *s.c.*)

for 8 days (control group). The second group was treated with GTN (30 mg/kg b.w., *s.c.*, divided into three doses) for 8 days. The third group was treated with GTN and LA jointly for 8 days (GTN 30 mg/kg b.w., *s.c.*, divided into three doses and LA 100 mg/kg b.w., *i.p.*, divided into two doses, respectively).

Animals were sacrificed on the 9th day by cervical dislocation and the livers were excised, washed in 0.9% NaCl, placed in liquid nitrogen and stored at -70°C until ALDH activity test was performed.

Methods

Preparation of liver homogenates

The frozen livers were weighed and homogenates were prepared by homogenization of 1 g of the tissue in 4 mL of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 using an IKA-ULTRA-TURRAX T8 homogenizer.

Determination of ALDH activity in the rat liver homogenate

The assay mixture contained liver homogenate, sodium phosphate buffer (pH 8.2), NAD, EDTA, 4-methylpyrazole and rotenone. The reaction was initiated by the addition of propionaldehyde as a substrate. 4-Methylpyrazole was added to inhibit alcohol dehydrogenase, and rotenone to inhibit mitochondri-

Table 3. The effect of GTN administered in combination with LA for 8 days on the ALDH activity in the rat liver.

Treatment	ALDH [U/mg protein]
Control group	45.28 ± 10.85
GTN group	21.12***± 3.87
GTN + LA group	26.25*** ± 5.38

***Differences significant at $p < 0.001$ in comparison to control value. The activity of ALDH was calculated by using the molar extinction coefficient of reduced NAD of $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 340 nm. Specific activity of the enzyme was expressed as nmol NADH/min (U)/mg protein.

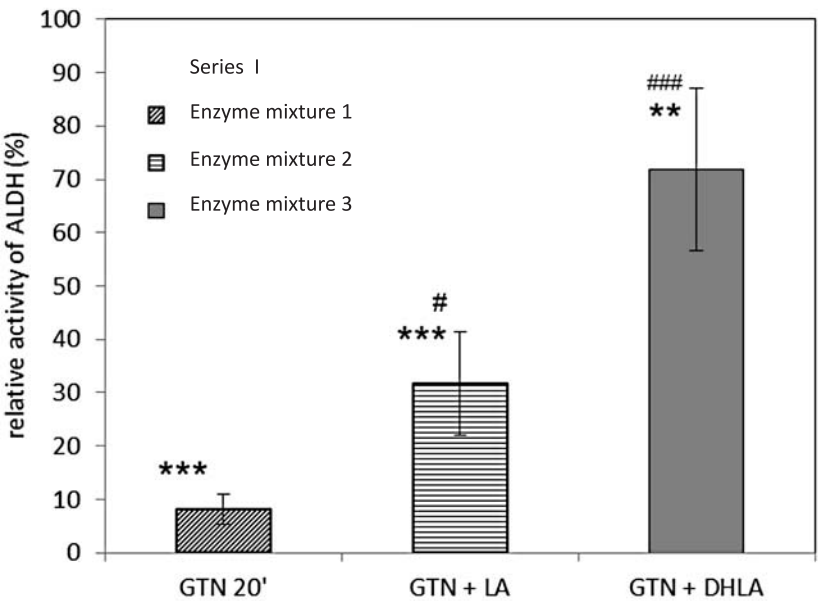


Figure 2. The LA and DHLA-induced restoration of GTN-inhibited ALDH activity *in vitro*. The ALDH activity was assayed with propionaldehyde (8 μM) as a substrate by measuring the reduction of NAD (1 mM) at 340 nm. Data are presented as a percentage relative to the control (100%) (without GTN and thiols). Data are shown as the mean $\pm$ SD. Significant vs. control sample: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Significant vs. GTN sample: # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$

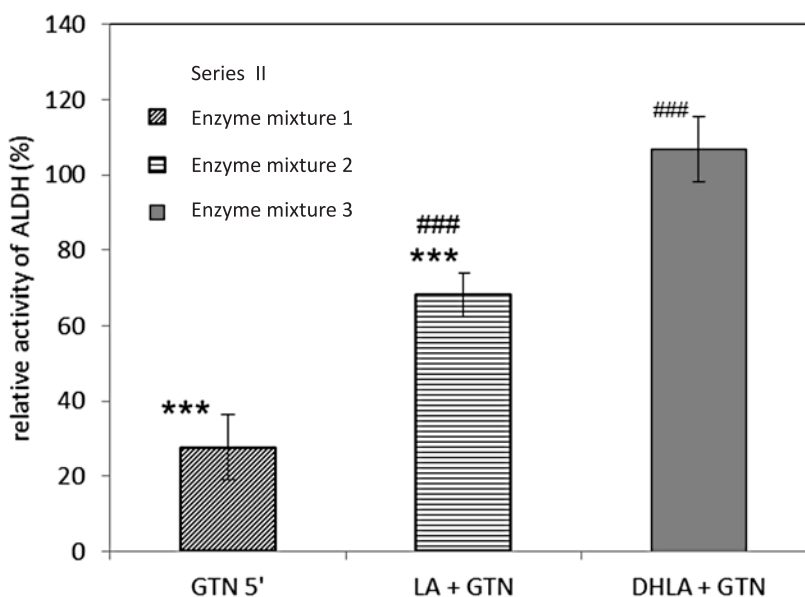


Figure 3. The LA and DHLA-induced prevention of ALDH inactivation by GTN *in vitro*. The ALDH activity was assayed with propionaldehyde (8 μ M) as a substrate by measuring the reduction of NAD (1 mM) at 340 nm. Data are presented as a percentage relative to the control (100%) (without GTN and thiols). Data are shown as the mean $\pm$ SD. Significant vs. control sample: *** $p < 0.001$. Significant vs. GTN sample: ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$.

al NADH oxidase. The blank sample in which the homogenate was omitted was run simultaneously. The activity of ALDH was calculated using the molar extinction coefficient of NADH of 6.22 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 340 nm with the use of a modified protocol published earlier (18, 19). Specific activity of the enzyme was expressed as nmol of NADH produced per 1 mg of protein per 1 min. The protein content was measured using the method of Lowry et al. (20).

Determination of yeast ALDH activity

The final concentration of ALDH was 0.3 mg/mL in all experiments. The concentration of thiols (LA and DHLA) in the enzyme mixtures was 1 mM. Two series of enzyme mixtures were prepared (Scheme 1). All enzyme-containing mixtures were incubated at a temperature of 25°C.

Series I was prepared as follows:

Enzyme mixture 1. ALDH was preincubated with 0.1 mM GTN in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8) for 20 min.

Enzyme mixture 2. ALDH was preincubated with 0.1 mM GTN in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8) for 5 min, then LA was added and the mixture was incubated further for 15 min.

Enzyme mixture 3. ALDH was preincubated with 0.1 mM GTN in 50 mM sodium phosphate

buffer (pH 8) for 5 min, then DHLA was added and the mixture was incubated further for 15 min.

Series II was prepared as follows:

Enzyme mixture 1. ALDH was preincubated with 0.1 mM of GTN in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8) for 5 min.

Enzyme mixture 2. ALDH was preincubated with LA in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8) for 15 min, then 0.1 mM GTN was added and the mixture was incubated further for 5 min.

Enzyme mixture 3. ALDH was preincubated with DHLA in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8) for 15 min, then 0.1 mM GTN was added and the mixture was incubated further for 5 min.

The assay mixture (1 mL) containing sodium phosphate buffer (pH 8.2), propionaldehyde and NAD was pipetted into a cuvette. The reaction was initiated by the addition of the indicated enzyme mixture to the cuvette and absorbance change at 340 nm was monitored for 2 min at 25°C to calculate the rate of NADH production and to compare it with the sample containing only ALDH without GTN (control sample). Data are presented as a percentage relative to control (100%).

Statistical analysis

All statistical calculations were carried out with the STATISTICA 10.0 computer program

using a one-way ANOVA followed by the Tukey *post-hoc* test. Data from *in vitro* studies are presented as the mean $\pm$ SD of 3–4 independent experiments in several repetitions. Data from *in vivo* experiments are given as the mean $\pm$ SD for each group of animals. For all data, the values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

RESULTS

Activity of ALDH in the rat liver homogenates

As shown in Table 3, the activity of ALDH in the rat liver of the second group (GTN) and the third group (GTN + LA) was statistically significantly decreased vs. control group (first group).

Activity of yeast-derived ALDH

The results obtained in series I are presented in Figure 2. The experiment indicated that 20-min incubation with GTN induced a decrease in the ALDH activity to 8.2% (mixture I) as compared to the control (100%). A five-minute preincubation of the enzyme with 0.1 mM GTN and then a 15-min incubation with 1 mM thiols: LA or DHLA (mixture 2 and 3, respectively) caused a decrease in ALDH activity to 31.6% and 71.9%, respectively, compared to the control (100%). This indicates that both 1 mM thiols (LA and DHLA) were able to restore ALDH activity inhibited by GTN, but DHLA was more effective than LA.

The results obtained in series II are presented in Figure 3. The experiment demonstrated that a 5-min incubation with GTN lowered ALDH activity to 27% (mixture 1) compared to the control (100%). When the samples of ALDH were preincubated with 1 mM LA or DHLA (mixture 2 and 3, respectively) for 15 min and then with 0.1 mM GTN for 5 min, the ALDH activity changed to 68.1% and 106.9%, respectively, compared to the control (100%).

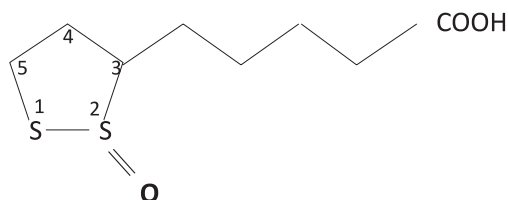


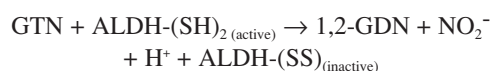
Figure 4. Chemical structure of β -lipoic acid (β -LA). β -LA is a biological oxidation product of LA, which was proven in *in vitro*, but not *in vivo* studies (12, 27).

This indicates that both 1 mM thiols (LA and DHLA) were able to protect ALDH against the inhibitory effect of GTN, but DHLA was more effective than LA.

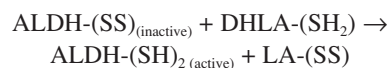
DISCUSSION AND CONCLUSIONS

In line with literature data, the present studies demonstrated that GTN inhibited ALDH activity both *in vivo* and *in vitro*. Already in 1985, Towell et al. (21) observed an 88% inhibition of erythrocytic ALDH in GTN-treated patients. Wenzel et al. (22) indicated that GTN was a potent inhibitor of both purified yeast ALDH as well as ALDH in isolated heart mitochondria from *in vivo* GTN-treated rats. The next study of the same research group demonstrated that GTN inhibited ALDH activity in circulating white blood cells (WBCs) of healthy volunteers (23). The studies of Beretta et al. (24) showed that GTN blocked ALDH activity in isolated rat liver mitochondria, and also of recombinant human ALDH.

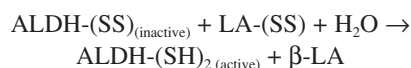
It is currently known that GTN is an inhibitor of ALDH (i.e., causes the loss of dehydrogenase activity) because it serves as a substrate for its reductase activity. This means that ALDH catalyzes the formation of glyceryl dinitrate (GDN) (1,2-GDN/1,3-GDN $\sim$ 8 : 1) and nitrite (NO_2^-) from GTN. The electrons for this reduction are provided by cysteine-thiols at the active site of ALDH that are converted to an intramolecular disulfide bond, which leads to a drop in the catalytic activity of the enzyme (24–26). A simplified scheme of this process can be expressed as:



The present results obtained *in vitro* support the role of DHLA both in the restoration of ALDH activity after inhibition by GTN and in the protection of the enzyme against the inhibitory effect of GTN. ALDH activity was not inhibited by GTN if DHLA was added prior to GTN. Also, DHLA largely restored the inhibited ALDH activity if added after GTN. It was confirmed by studies of other authors. Namely, regeneration of the oxidized $-\text{SH}$ groups of ALDH could be achieved *via* an exchange with $-\text{SH}$ groups of DHLA (22, 24) what, in a simplified way, can be expressed as:



It is interesting and surprising that under *in vitro* conditions also LA prevented inactivation of the enzyme and had an impact on ALDH already inhibited by GTN. Since this is the first study examining the effect of GTN on the ALDH activity in the presence of the oxidized form of DHLA, i.e. LA, this result is difficult to explain because of too few data. *In vitro* studies revealed that LA was capable of scavenging numerous ROS and RNS, which indicated that despite being in its oxidized form LA behaved as a reducing agent (antioxidant). β -Lipoic acid (β -LA) (Fig. 4) is a biological oxidation product of LA, as demonstrated only by *in vitro* studies (12, 27, 28). It means that reduction process of the oxidized –SH groups of ALDH, in a simplified form, can be expressed as:



Is it possible? Further studies are necessary to verify this undoubtedly intriguing hypothesis.-

On the other hand, the *in vivo* experiments indicated that treatment of rats with LA and GTN in combination did not provide any protection against GTN-induced ALDH inhibition. This is in contrast with the results of Wenzel et al. (23), who reported that administration of a single sublingual GTN dose decreased ALDH activity in WBCs in healthy volunteers and that these effects were prevented by oral LA pretreatment 15 min before GTN.

This difference could possibly be due to a number of factors, including different experimental conditions. In our opinion, the level of oxidative stress is the core of the problem since oxidative stress was undoubtedly much lower after GTN administration at a single dose compared with chronic GTN treatment (8 days). The sulfhydryl groups of cysteine residues (Cys-SH) in proteins (P-SH) can form a wide variety of oxidation products, including reversible oxidation states of disulfide bonds (P-SS) and sulfinic acid (P-SOH), and the irreversible higher oxidation states of sulfinic acid (P-SO₂H) and sulfonic acid (P-SO₃H) (15, 29). Thus, the plausible proposal is that under our experimental conditions *in vivo* the sulfhydryl groups of cysteine residues at the active site of ALDH can be irreversibly oxidized to sulfinic acid (P-SO₂H) and sulfonic acid (P-SO₃H) that cannot be reduced by LA and DHLA, but in experimental conditions *in vivo* described in the above-mentioned paper by Wenzel et al. (23) the activity of the enzyme decreased due to reversible oxidation of sulfhydryl groups of cysteine residues in ALDH to disulfide bonds that can be reduced by LA and DHLA.

It should be mentioned that recent experimental and clinical studies indicate a beneficial effect of exogenous LA in many diseases accompanied by oxidative stress (30–36) and simultaneously, the ability of LA and DHLA to function as physiological antioxidants is questioned (13, 14). It means that the mechanism of pharmacological actions of LA *in vivo* still remains undiscovered. This issue definitely requires further studies the more so that searching for the mechanisms of pharmacological actions of LA is important from the point of view of both basic research and its practical applicability.

In summary, the obtained results seem to confirm earlier reports indicating the differential effects of LA *in vitro* and *in vivo*.

Conflict of interest

The authors do not have any conflict of interest regarding this manuscript.

Acknowledgments

The *in vivo* research was supported by statutory funds of the Faculty of Medicine and Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University, Collegium Medicum, Kraków, Poland; the *in vitro* study was supported by the National Science Centre, Kraków, Poland, grant No. 2011/01/B/NZ4/01675. The publication of this paper was financially supported by Leading National Research Centre KNOW, Kraków, Poland.

REFERENCES

1. Reed L.J., DeBusk B.G., Gunsalus I.C., Hornberger C.S.: Science 114, 93 (1951).
2. Reed L.J.: J. Biol. Chem. 276, 38329 (2001).
3. Glade M.J., Smith K.: Ann. Nutr. Disord. Ther. 2, 1 (2015).
4. Shay K.P., Moreau R.F., Smith E.J., Smith A.R., Hagen T.M.: Biochim. Biophys. Acta 1790, 1149 (2009).
5. Stary F.E., Jindal S.J., Murray R.W.: J. Org. Chem. 40, 58 (1975).
6. Zgirski A., Gondko R.: Biochemical calculations (in Polish). PWN, Warszawa 2010.
7. Kohen R., Moor E., Oron M.: in Redox-Genome Interactions in Health and Disease. Oxidative Stress and Disease, Fuchs J., Podda M., Packer L. Eds., p. 13, CRC Press, New York 2003.

8. Malińska D., Winiarska K.: *Postepy Hig. Med. Dosw.* (online) 59, 535 (2005).
9. Bartosz G.: *Second face of oxygen. Free radicals in nature* (in Polish) Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
10. Augusto O., Radi R.: in *Biothiols in Health and Disease*, Packer L., Cadenas E. Eds., p. 83, Marcel Dekker, New York 1995.
11. Packer L., Kraemer K., Rimbach G.: *Nutrition* 17, 888 (2001).
12. Biewenga G.P., Haenen G.R., Bast A.: *Gen. Pharmacol.* 29, 315 (1997).
13. Shay K.P., Moreau R.F., Smith E.J., Hagen T.M.: *IUBMB Life* 60, 362 (2008).
14. Smith A.R., Shenvi S.V., Widlansky M., Suh J.H., Hagen T.M.: *Curr. Med. Chem.* 11, 1135 (2004).
15. DeMaster E.G., Redfern B., Quast B.J., Dahlseid T., Nagasawa H.T.: *Alcohol* 14, 181 (1997).
16. Dudek M., Bednarski M., Bilska A., Iciek M., Sokołowska-Jeżewicz M. et al.: *Eur. J. Pharmacol.* 591, 203 (2008).
17. Dudek M., Bilska A., Bednarski M., Iciek M., Kwiecień I. et al.: *Fundam. Clin. Pharmacol.* 24, 47 (2010).
18. Loomis C.W., Brien J.F.: *Can. J. Physiol. Pharm.* 61, 1025 (1983).
19. Tottmar S.O., Pettersson H., Kiessling K.H.: *Biochem. J.* 135, 577 (1975).
20. Lowry O., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J.: *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
21. Towell J., Garthwaite T., Wang R.: *Alcohol Clin. Exp. Res.* 9, 438 (1985).
22. Wenzel P., Hink U., Oelze M., Schuppan S., Schaeuble K. et al.: *J Biol. Chem.* 282, 792 (2007).
23. Wenzel P., Schulz E., Gori T., Ostad M.A., Mäthner F. et al.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330, 63 (2009).
24. Beretta M., Sottler A., Schmidt K., Mayer B., Gorren A.C.: *J. Biol. Chem.* 283, 30735 (2008).
25. Chen Z., Stamler J.S.: *Trends Cardiovasc. Med.* 16, 259 (2006).
26. Chen Z., Zhang J., Stamler J.S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 8306 (2002).
27. Krishnan C.V., Garnett M.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 6, 3607 (2011).
28. Trujillo M., Radi R.: *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 91 (2002).
29. Lee C.F., Paull T.T., Person M.D.: *J. Proteome Res.* 12, 4302 (2013).
30. Papanas N., Ziegler D.: *Expert Opin. Pharmacother.* 15, 2721 (2014).
31. Iciek M., Marcykiewicz B., Bilska-Wilkosz A., Sokołowska-Jeżewicz M., Kłapcińska J.: *Pharmacol. Rep.* 66, 325 (2014).
32. Dudek M., Knutelska J., Bednarski M., Nowiński L., Zygmunt M. et al.: *Pharmacol Rep.* 66, 499 (2014).
33. Jain A.P., Aggarwal K.K., Zhang P.Y.: *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 19, 441 (2015).
34. Kumar A., Singh A., Ekavali. A.: *Pharmacol. Rep.* 67, 195 (2015).
35. Zygmunt M., Dudek M., Bilska-Wilkosz A., Bednarski M., Mogilski S. et al.: *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* 70, 899 (2013).
36. Bilska-Wilkosz A., Dudek M., Knutelska J., Włodek L.: *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* 72, 49 (2015).

Received: 15. 12. 2015

PRACA 2

Bilska-Wilkosz A., Dudek M., Knutelska J., Włodek L.:

The effect of lipoic acid administration on the urinary excretion of thiocyanate in rats exposed to potassium cyanide. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 2015, 72 (1), 49-52.

Badania *in vivo* zostały wykonane
w Katedrze Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego UJ CM

METODYKA

Zwierzęta

Badania przeprowadzano na dojrzałych samcach szczurów szczepu Wistar o masie ciała 180 - 250 g. Zwierzęta zostały nawodnione przez podanie 7 ml wody sondą dożołądkową. Szczury zostały umieszczone w plastikowych klatkach przystosowanych do pobierania moczu, w pomieszczeniu o standardowych warunkach klimatycznych (temperatura $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$), z naturalnym rytmem świetlnym. Zwierzęta otrzymywały paszę standardową i wodę *ad libitum*.

Do badań został użyty lek o nazwie Thiogamma, który jako substancję farmakologicznie aktywną zawiera racemat LA. Badania zostały przeprowadzone po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej w Krakowie.

Zwierzęta podzielono na dwie grupy. Każda grupa liczyła 6 szczurów.

Grupy były traktowane w następujący sposób:

Grupa 1: KCN (1 mg/kg masy ciała, *ip*);

Grupa 2: KCN (1 mg/kg masy ciała, *ip*) + LA (100 mg/kg masy ciała, *ip*).

Mocz zbierano przez 24h od momentu iniekcji. W zebranych moczu oznaczono poziom rodanku (tiocyjanianu).

Oznaczanie poziomu rodanku w moczu szczurów

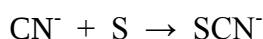
Obecne w moczu rodanki tworzą z jonami Fe^{+3} barwny rodanek żelaza (III) $\text{Fe}(\text{SCN})_3$, oznaczany spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda=450\text{ nm}$. Stężenie rodanków obliczano na podstawie krzywej wzorcowej dla rodanku potasu (KSCN).

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-*Studenta*, porównując wyniki z grupy otrzymującej KCN z grupą otrzymującą KCN i LA. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie dla 6 zwierząt $\pm$ błąd standardowy średniej (SEM). Przyjęto kryterium znamienności na poziomie $p \leq 0.05$.

WYNIKI

Utlenianie cyjanków z udziałem siarki sulfanowej do znacznie mniej toksycznych rodanków (wartość LD₅₀ dla drogi *per os* cyjanku i rodanku wynosi u szczurów 3 i 854 mg/kg masy ciała, odpowiednio) jest najważniejszym procesem w systemie detoksyfikacji cyjanków.



Reakcja ta jest katalizowana przede wszystkim przez transferazę siarkową tiosiarczuanu (EC. 2.8.1.1; rodanaza, TST) i transferazę siarkową 3-merkaptopirogronianu (EC 2.8.1.2; MST). Głównym donorem siarki sulfanowej w reakcjach przekształcenia cyjanków do tiocyjanianów jest tiosiarczan w reakcjach katalizowanych przez TST i 3-merkaptopirogronian w reakcjach katalizowanych przez MST. Produkt reakcji - rodanek (tiocyjanian) jest wydalany z moczem. Oznacza to, że poziom wydalanego z moczem rodanku może być postrzegany, jako wskaźnik skuteczności procesu detoksyfikacji cyjanku.

Otrzymane wyniki wskazują, że u szczurów otrzymujących łącznie KCN i LA poziom rodanków wydanych z moczem w ciągu 24h jest niemal dwukrotnie wyższy w porównaniu do grupy otrzymującej tylko KCN (4,86 $\mu\text{mol}/24\text{h} \pm 0,23$ i 2,5 $\mu\text{mol}/24\text{h} \pm 0,37$, odpowiednio). Oznacza to, że LA zwiększa szybkość detoksyfikacji cyjanku u szczurów.

Możliwe tutaj są dwa zasadnicze mechanizmy działania LA, a mianowicie wpływ na : (1) aktywność siarkotransferaz - TST i MST; (2) podniesienie poziomu siarki sulfanowej, będącej substratem dla TST i MST. Trzeba tutaj przypomnieć, że MST pełni dwie funkcje w organizmach ssaków. Enzym ten katalizuje zarówno te reakcje, które dostarczają siarki sulfanowej niezbędnej do przekształcenia cyjanków do rodanków, jak i te, w których to przekształcenie zachodzi.

Badania dotyczące udziału LA w reakcjach detoksyfikacji cyjanku w warunkach *in vivo* są bardzo interesujące, ponieważ z jednej strony poszerzają naszą wiedzę na temat mechanizmów działania i biologicznej roli siarkotransferaz, jak również wskazują na LA, jako potencjalne antidotum przy zatruciach cyjankami.

Uzyskane wyniki potwierdzają więc, że jednym z mechanizmów biologicznej aktywności LA jest jego wpływ na przemiany związków posiadających siarkę sulfanową. Jest to teza nowa, do tej pory w niewielkim stopniu podnoszona przez innych autorów. Potrzebne są jednak dalsze badania w celu lepszego poznania mechanizmów tego procesu.

DRUG BIOCHEMISTRY

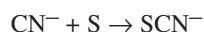
THE EFFECT OF LIPOIC ACID ADMINISTRATION ON THE URINARY
EXCRETION OF THIOCYANATE IN RATS EXPOSED
TO POTASSIUM CYANIDEANNA BILSKA-WILKOSZ¹, MAGDALENA DUDEK², JOANNA KNUTELSKA³
and LIDIA WŁODEK^{1*}¹Chair of Medical Biochemistry, Jagiellonian University, Medical College,
7 Kopernika St., 31-034 Kraków, Poland²Chair of Pharmacodynamics, ³Department of Pharmacological Screening, Chair of Pharmacodynamics,
Jagiellonian University, Medical College, 9 Medyczna St., PL 30-688 Kraków, Poland

Abstract: The oxidation of cyanide (CN⁻) to a much less toxic thiocyanate (SCN⁻) is the main *in vivo* biochemical pathway for CN⁻ detoxification. SCN⁻ is excreted mainly in urine. This study was performed to investigate the effect of lipoic acid (LA) on the urinary excretion of thiocyanate (SCN⁻; rhodanate) in rats. Groups of the animals were treated intraperitoneally (*i.p.*) as follows: group 1: potassium cyanide (KCN) (1 mg/kg); group 2: KCN (1 mg/kg) + LA (100 mg/kg). Urine was collected for 24 h and the pooled samples were examined for SCN⁻ levels. The obtained results indicated that the treatment of animals with potassium cyanide and LA in combination significantly increased the urinary excretion of SCN⁻ in comparison with the respective values in the KCN-alone-treated group. It indicates that LA increased the rate of CN⁻ detoxification in rats.

Keywords: lipoic acid, dihydrolipoic acid, cyanides, thiocyanates (rhodanates), sulfane sulfur

Cyanides (CN⁻), salts of hydrogen cyanide (HCN), and HCN itself have always been feared as poisons because of their toxic properties. Cyanides are synthesized, excreted and degraded in nature by many species of bacteria, plants and insects. Cyanides have also been used for various purposes in industry. Toxic level of cyanides in the body is generated after administration of certain drugs, like laetrile and sodium nitroprusside. Cyanide targets primarily mitochondrial cytochrome oxidase, thereby causing the inhibition of cellular respiration, acceleration of anaerobic glycolysis, and consequent tissue hypoxia and metabolic lactic acidosis.

The oxidation of CN⁻ to a much less toxic thiocyanate (the oral LD₅₀ values of cyanide and thiocyanate in rats are 3 and 854 mg/kg, respectively) (1) is the main *in vivo* biochemical pathway for CN⁻ detoxification according to the following reaction:



The conversion of CN⁻ to SCN⁻ is catalyzed by sulfurtransferases: rhodanese (EC. 2.8.1.1; TST), 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (EC 2.8.1.2; MST) and cystathionine γ-lyase (EC 4.4.1.1; CSE). The role of these enzymes consists in sulfane sulfur transfer to CN⁻.

Sulfane sulfur is a divalent sulfur atom (-S-) covalently bound to another sulfur atom (R-S-S-H). The elemental sulfur (S₈) and outer sulfur atom of thiosulfate (S=SO₃⁻) exhibit also sulfane sulfur properties. The sulfane sulfur-containing compounds are endogenous metabolites formed from cysteine. Cysteine is synthesized from the essential amino acid methionine to a limited extent and for this reason, it is called a semi-essential amino acid. Cysteine and methionine are only two of the twenty amino acids normally present in proteins and belong to the sulfur-containing amino acids (SAA). Thiocyanate is excreted mainly in urine.

* Corresponding author: e-mail: mbwlodek@cyf-kr.edu.pl

Lipoic acid (R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoic acid, LA, $C_8H_{14}O_2S_2$), a naturally occurring dithiol compound, is a cofactor for a number of multienzymatic complexes involved in energy metabolism. Dihydrolipoic acid (6,8-dimercaptooctanoic acid, DHLA, $C_8H_{16}O_2S_2$) is the reduced form of LA. Exogenous LA has been shown to exhibit pharmacological activities (2–6). Literature data indicate that the LA/DHLA system participates also in sulfane sulfur metabolism. Namely, it was shown that DHLA serves as a sulfane sulfur acceptor in the TST- and MST-catalyzed sulfane sulfur transfer. In these reactions DHLA hydropersulfide is formed, from which sulfane sulfur is released in the form of hydrogen sulfide (H_2S) and LA is produced concomitantly (7, 8).

Thus, it can be assumed that LA may be involved in cyanide detoxification reactions in the body. This study was undertaken to investigate for the first time the effect of LA administration on the urinary excretion of SCN^- in rats exposed to CN^- .

EXPERIMENTAL

Animals

The experiments were carried out on male Wistar rats (300–350 g). Animals were housed in metabolic cages for urine collection, in a room at a constant temperature of $20 \pm 2^\circ C$ with a natural light-dark cycle. They had free access to standard pellet diet and water. Groups consisted of 6 animals each. The pharmaceutical with the commercial name Thiogamma, which contains LA as an active substance was used in our experiments as a source of LA. All procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Research in Kraków (license no. 44/2012).

Groups were treated as follows: Group 1: KCN (1 mg/kg b.w., *i.p.*). Group 2: KCN (1 mg/kg b.w.; *i.p.*) + LA (100 mg/kg b.w.; *i.p.*).

Urine was collected for 24 h after drug injection and the pooled samples were examined for SCN^- levels.

Methods

Determination of thiocyanate level in the urine of rats

The content of SCN^- was determined by the method of Goldstein (9). SCN^- present in the urine reacts with Fe^{3+} ions to form the colored compound $Fe(SCN)_3$, the concentration of which is measured spectrophotometrically at a wavelength of $\lambda = 450$ nm. SCN^- concentration is calculated based on a standard curve prepared for potassium thiocyanate (KSCN).

Statistical analysis

Data are presented as the means $\pm$ SEM. The statistical significance of the differences between the means was analyzed using Student's *t*-test. A level of $p \leq 0.001$ was adopted to indicate statistical significance.

RESULTS

The results presented in Table 1 indicated that 24-h urinary excretion of SCN^- was significantly higher in rats which were administered KCN and LA in combination in comparison with the group treated with KCN alone ($4.86 \mu\text{mol}/24 \pm 0.23$ h vs. $2.5 \mu\text{mol}/24 \pm 0.37$ h, respectively).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The obtained results showed that LA increased CN^- detoxification rate in rats, which indicates that this compound can act as a CN^- antidote. It was confirmed also by studies of other authors. Müller and Krieglstein reported that one hour of preincubation with $1 \mu\text{M}$ DHLA reduced damage of neurons from chick embryo telencephalon caused by 1 mM sodium cyanide (10). Abdel-Zaher et al. demonstrated that intraperitoneal injection of KCN into mice produced clonic and tonic seizures. The severity of convulsions was dose-dependent. The ED_{50} value of KCN was 4.8 mg/kg . In contrast, animals administered LA at a dose of 100 mg/kg before KCN injection showed the increase in CN^- ED_{50} values from 4.8 mg/kg to 9.4 mg/kg (10). The same authors also demonstrated that LA (25, 50 and 100 mg/kg) given to mice 15 min before KCN injection increased the CN^- LD_{50} values (based on 24 h mortality) from 6 mg/kg to 6.2, 7.2 and 11.2 mg/kg , respectively (11). It has also been reported that LA protects cholinergic cells against sodium nitroprusside neurotoxicity (12).

Therefore, it is a plausible proposal that LA plays a role in cyanide detoxification process. However, further studies are necessary to explain the mechanisms of these processes. Swenne et al. exposed normal and protein-malnourished rats to the cyanogenic compound acetonitrile (CH_3CN); that study indicated that urinary excretion of SCN^- was lower in rats fed a low-protein diet compared to rats fed a normal-protein diet (13). Analysis of the above data suggests that there may be some analogy with the present results. Namely, when rats are exposed to CN^- the urinary SCN^- excretion is higher in animals, which were fed a normal protein diet and in those which were administered LA. It indicates that

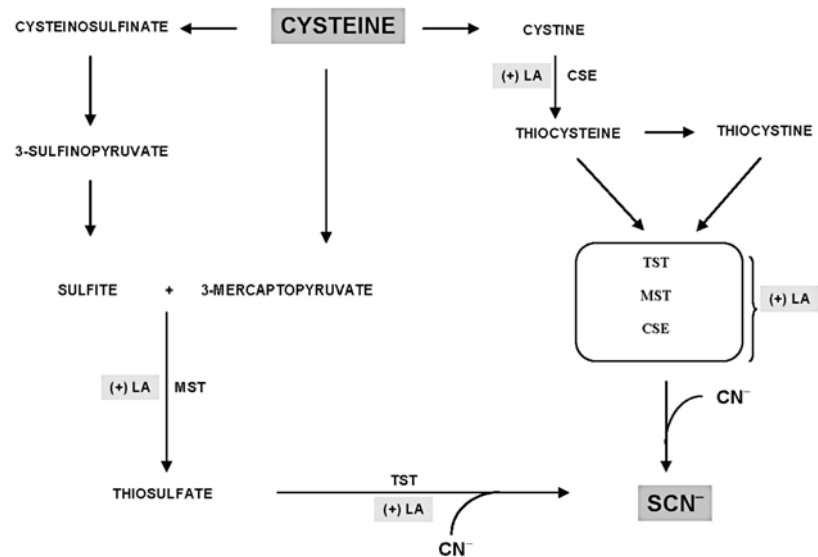


Figure 1. A proposal of the mechanism of LA action in processes leading to the formation of sulfane sulfur compounds: thiosulfate, thio-cysteine and thiocystine, and in the CN^- to SCN^- transformation. TST – thiosulfate: cyanide sulfurtransferase (EC 2.8.1.1; rhodanese). MST – 3-mercaptopyruvate:cyanide sulfurtransferase (EC 2.8.1.2). CSE – cystathionine γ -lyase (EC 4.4.1.1; cystathionase)

Table 1. The urinary excretion of SCN^- in rats treated with KCN in the absence or presence of LA.

Treatment	SCN^- [$\mu\text{mol}/24 \text{ h}$]
KCN	2.50 ± 0.37
KCN + LA	$4.86^a \pm 0.23$

^aStudent's *t*-test, significance $p < 0.001$ in comparison with KCN group

LA acted in that case like a normal-protein diet. The literature data indicate that a low-protein diet increases CN^- toxicity, because the concentrations of sulfane sulfur compounds are dependent on the availability of SAA from dietary protein (14). Tor-Agbidye et al. proposed that SAA deficiency might be a risk factor for human neurological diseases among protein-poor populations subsisting on cassava (*Manihot esculenta*), a cyanophoric plant (15). In 1981, Westley found that purified bovine liver TST had a high turnover rate of almost 20,000/min *in vitro*, which meant that 1 mole of TST could convert 20,000 moles of CN^- to SCN^- per 1 minute. This high turnover rate means that the availability of sulfane sulfur compounds, rather than the TST activity, is the rate limiting factor for CN^- conversion to SCN^- (16).

Therefore, it appears that all the data warrant hypothesis that LA increases CN^- to SCN^- trans-

formation rate by elevation of the level of sulfane sulfur compounds in the body. It was confirmed also by data from Bilska et al. studies, which demonstrated for the first time *in vivo* that the level of sulfane sulfur compounds in the heart, liver and kidney of rats given LA at a dose of 100 mg/kg/24 h for 8 days was significantly higher than in the control LA-free group (17). The same experiments indicated that LA elevated also TST activity in several tissues of rats (17). However, in the light of the present knowledge, LA sulfur is not a sulfane sulfur, and TST does not participate in its formation. However, on the other hand, Frankenberg indicated that the administration of TST together with sulfane sulfur compounds had a good antidotic effect against CN^- poisoning in mice, yet, when sulfane sulfur compounds were given without TST, the antidotic effect was weaker (18).

So, based on literature data, it can be hypothesized that, apart from TST, LA also elevates activity of MST and/or CSE (Fig. 1). It is known that CSE and MST belong to enzymes which are directly involved in the generation of sulfane sulfur compounds. MST is also known to be implicated in the CN^- to SCN^- conversion reaction. As for CSE, *in vivo* studies indicated that the inhibition of this enzyme by L-propargylglycine increased the toxicity of CN^- (19). It can indicate that, like for MST, the CSE-catalyzed reactions lead both to the production of sulfane sulfur compounds, and to CN^- to SCN^-

conversion. Already in the 1960s, it was documented that the products of CSE-catalyzed cleavage of cystine (Cys-S-S-Cys) produced sulfane sulfur donors for TST (20, 21).

In summary, this paper clearly demonstrated that the treatment of rats with KCN and LA in combination significantly increased the urinary excretion of SCN^- in comparison with the respective values in the KCN-alone-treated group, which confirms the hypothesis suggesting that LA plays a role in the CN^- detoxification process. These results suggest that biological activity of LA may be connected with sulfane sulfur metabolism (Fig. 1). It points to potential new pharmacological properties of LA. However, confirmation of this hypothesis requires further studies.

Acknowledgments

This work was supported by statutory funds of the Faculty of Medicine and Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland.

The authors have declared no conflict of interest.

REFERENCES

1. Beasley D.M., Glass W.I.: *Occup. Med.* 48, 427 (1998).
2. Gorąca A., Huk-Kolega H., Piechota A., Kleniewska P., Ciejka E., Skibska B.: *Pharmacol. Rep.* 63, 84 (2011).
3. Lyzogub V.H., Altunina N.V., Bondarchuk O.M.: *Lik. Sprava* 7-8, 20 (2011).
4. Rochette L., Ghibu S., Richard C., Zeller M., Cottin Y., Vergely C.: *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 114 (2013).
5. Sałat K., Moniczewski A., Librowski T.: *Mini Rev. Med. Chem.* 13, 335 (2013).
6. Zygmunt M., Dudek M., Bilska-Wilkosz A., Bednarski M., Mogilski S., Knutelska J., Sapa J.: *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* 70, 899 (2013).
7. Mikami Y., Shibuya N., Kimura Y., Nagahara N., Ogasawara Y., Kimura H.: *Biochem. J.* 439, 485 (2011).
8. Villarejo M., Westley J.: *J. Biol. Chem.* 238, 4016 (1963).
9. Goldstein F.: *J. Biol. Chem.* 187, 523 (1950).
10. Müller U., Kriegelstein J.: *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 624 (1995).
11. Abdel-Zaher A.O., Abdel-Hady R.H., Abdel Moneim W.M. Salim, S.Y.: *Exp. Toxicol. Pathol.* 63, 161 (2011).
12. Bielarczyk H., Gul S., Ronowska A., Bizon-Zygmańska D., Pawełczyk T., Szutowicz A.: *J. Neurochem.* 98, 1242 (2006).
13. Swenne I., Eriksson U.J., Christoffersson R., Kagedal B., Lundquist P., Nilsson L., Tylleskär T., Rosling H.: *Fundam. Appl. Toxicol.* 32, 66 (1996).
14. Cliff J., Lundquist P., Martenson J., Rosling H., Sörbo B.: *Lancet* 2, 1211 (1985).
15. Tor-Agbidye J., Palmer V.S., Lasarev M.R., Craig A.M., Blythe L.L., Sabri M.I., Spencer P.S.: *Toxicol. Sci.* 50, 228 (1999).
16. Westley J.: *Methods Enzymol.* 77, 285 (1981).
17. Bilska A., Dudek M., Iciek M., Kwiecień I., Sokołowska-Jeżewicz M., Filipek B., Włodek L.: *Pharmacol. Rep.* 60, 225 (2008).
18. Frankenberg L.: *Arch. Toxicol.* 45, 315 (1980).
19. Porter D.W., Nealley E.W., Baskin S.I.: *Biochem. Pharmacol.* 52, 941 (1996).
20. Cavallini D., De Marco C., Mondovi B., Mori B.G.: *Enzymologia* 22, 161 (1960).
21. Szczepkowski T.W., Wood J.L.: *Biochim. Biophys. Acta* 139, 469 (1967).

Received: 10. 12. 2013

PRACA 3

Bilska-Wilkosz A., Iciek M., Kowalczyk-Pachel D., Górny M., Sokołowska-Jeżewicz M., Włodek L.:

Lipoic Acid as a Possible Pharmacological Source of Hydrogen Sulfide/Sulfane Sulfur. *Molecules*, 2017, 22(3), 388. doi:10.3390/molecules22030388.

METODYKA

Formowanie H_2S i siarki sulfanowej z LA i DHLA

Badania przeprowadzono *in vitro* w (1) obecności i (2) nieobecności homogenatów tkanek zwierzęcych.

- (1) Homogenaty wątroby i nerek szczura inkubowano w obecności/nieobecności LA lub DHLA przez 30 minut w temperaturze pokojowej, całkowicie chroniąc od światła.
- (2) W badaniach bez użycia homogenatów przygotowane próbki LA pozostawiano w temperaturze pokojowej na okres 3-7 dni, chroniąc/nie chroniąc od światła.

Oznaczanie poziomu siarki sulfanowej

Poziom siarki sulfanowej oznaczano w oparciu o reakcję cyjanolizy, która polega na nukleofilowym ataku cyjanku na związki zawierające siarkę sulfanową. Powstający w tej reakcji rodanek (SCN^-) reaguje z jonami żelaza Fe^{3+} z utworzeniem barwnego rodanku żelaza (III) ($Fe(SCN)_3$) oznaczanego spektrofotometrycznie przy fali o długości 460 nm.

Oznaczanie poziomu H_2S

Poziom H_2S oznaczano, wykorzystując fakt, że w roztworach alkalicznych, równowaga reakcji dysocjacji H_2S jest przesunięta w kierunku tworzenia jonu siarczkowego S^{2-} . Jon ten jest wychwytywany przez octan cynku, a otrzymany związek wchodzi - w obecności jonów Fe^{3+} - w reakcję z p-fenylenodiaminą z utworzeniem fluorescencyjnego produktu - tioniny, który jest oznaczany fluorymetrycznie ($\lambda_{ex} = 600$ nm, $\lambda_{em} = 623$ nm).

W badaniach bez użycia homogenatów poziom H_2S oznaczano dodatkowo metodą dyfuzyjną z wykorzystaniem specjalnych naczynek dyfuzyjnych. Metoda wykorzystuje dyfuzję uwolnionego H_2S do roztworu zawierającego kwas 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowy (DTNB). Zachodzi wówczas reakcja redukcji DTNB przez H_2S do kwasu 2-nitro-5-merkaptobenzoesowego, który jest oznaczany spektrofotometrycznie przy fali o długości 412 nm.

Wszystkie doświadczenia przeprowadzono w trzech lub dwóch niezależnych powtórzeniach.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, porównując odpowiednie wyniki z eksperymentów, w których obecny był LA i/lub DHLA z wynikami badań przeprowadzanych w nieobecności tych związków. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Przyjęto kryterium znamienności $p \leq 0,05$.

WYNIKI

Uzyskane wyniki wskazują, że warunkach *in vitro* w obecności światła i nieobecności enzymów znajdujących się w homogenatach tkankowych LA jest rozkładany z uwolnieniem H_2S i siarki sulfanowej. Natomiast próbki chronione przed światłem zawierają jedynie śladowe ilości H_2S i siarki sulfanowej.

Wyniki eksperymentu wykazały również, że ilość H_2S uwolnionego z LA po siedmiu dniach ekspozycji próbki na światło była niemal dwukrotnie niższa niż w próbce ekspozowanej na światło przez trzy dni. Z kolei ilość siarki sulfanowej uwolnionej z LA po siedmiu dniach ekspozycji na światło była znacznie wyższa niż w próbce, która była ekspozowana na światło przez trzy dni. Sugeruje to, że pierwszym produktem fotochemicznego rozkładu LA jest H_2S , który następnie ulega utlenieniu do siarki sulfanowej.

Dotychczasowe badania dotyczące rozkładu LA pod wpływem światła koncentrowały się głównie na procesach rozszczepiania wiązania disiarczkowego, wytwarzających reaktywne rodniki tyłowe. Natomiast procesy rozpadu wiązania C-S w cząsteczce LA praktycznie nie były badane.

Uzyskane wyniki badań *in vitro* w obecności homogenatów wątroby i nerki szczura wykazały, że w obecności LA i DHLA w badanych tkankach obniża się poziom siarki sulfanowej, czemu towarzyszy wzrost poziomu H_2S . Oznacza to, że w obecności LA i DHLA dochodzi do uwolnienia H_2S z siarki sulfanowej zmagazynowanej w tkankach.

Tak więc w zastosowanych warunkach eksperymentu LA i DHLA nie uwalniają siarki sulfanowej, a jedynie biorą udział w przekształceniach endogennych związków z siarką sulfanową. Oznacza to, że w opisanym układzie doświadczalnym nie udało się udowodnić istnienia w tkankach ssaka enzymu o aktywności desulfurazy, katalizującego proces rozkładu wiązania C-S.

Article

Lipoic Acid as a Possible Pharmacological Source of Hydrogen Sulfide/Sulfane Sulfur

Anna Bil ska-Wilkosz *, Małgorzata Iciek, Danuta Kowalczyk-Pachel, Magdalena Górny, Maria Sokołowska-Jeżewicz and Lidia Włodek

Chair of Medical Biochemistry, Jagiellonian University Collegium Medicum, 7 Kopernika Street, 31-034 Kraków, Poland; miciek@cm-uj.krakow.pl (M.I.); dkowalczyk@cm-uj.krakow.pl (D.K.-P.); mbgorny@cyf-kr.edu.pl (M.G.); marsokol@wp.pl (M.S.-J.); mbwlodek@cyf-kr.edu.pl (L.W.)

* Correspondence: mbbilska@cyf-kr.edu.pl; Tel.: +48-12-4227-400; Fax: +48-12-4223-272

Academic Editor: Noriyuki Nagahara

Received: 16 January 2017; Accepted: 27 February 2017; Published: 2 March 2017

Abstract: The aim of the present study was to verify whether lipoic acid (LA) itself is a source of H₂S and sulfane sulfur. It was investigated in vitro non-enzymatically and enzymatically (in the presence of rat tissue homogenate). The results indicate that both H₂S and sulfane sulfur are formed from LA non-enzymatically in the presence of environmental light. These results suggest that H₂S is the first product of non-enzymatic light-dependent decomposition of LA that is, probably, next oxidized to sulfane sulfur-containing compound(s). The study performed in the presence of rat liver and kidney homogenate revealed an increase of H₂S level in samples containing LA and its reduced form dihydrolipoic acid (DHLA). It was accompanied by a decrease in sulfane sulfur level. It seems that, in these conditions, DHLA acts as a reducing agent that releases H₂S from an endogenous pool of sulfane sulfur compounds present in tissues. Simultaneously, it means that exogenous LA cannot be a direct donor of H₂S/sulfane sulfur in animal tissues. The present study is an initial approach to the question whether LA itself is a donor of H₂S/sulfane sulfur.

Keywords: lipoic acid; dihydrolipoic acid; sulfane sulfur; hydrogen sulfide

1. Introduction

Lipoic acid (LA, 1,2-dithiolane-3-pentanoic acid) was first identified by Reed et al. [1]. In mammals, it is synthesized in very small quantities in the liver and other tissues and is used as a cofactor of mitochondrial complexes catalyzing oxidative decarboxylation of alpha keto acids and glycine cleavage system (GCS) also localized in mitochondria. In these enzymatic complexes, LA is linked by an amide bound to the ϵ -amino group of a lysine residue of the protein.

Apart from endogenous synthesis, LA is also absorbed from exogenous sources and can be reduced enzymatically in the body to dihydrolipoic acid (DHLA, 6,8-dimercaptooctanoic acid). Typical dietary sources of LA include meat offal and vegetables. Moreover, LA has now become a common ingredient of different multivitamin formulas, dietary supplements and even pet food [2]. This compound has also gained the attention of cosmetologists and dermatologists since available data indicate a positive effect of LA-containing preparations (creams, ointments, etc.) on the skin [3]. In the last several years, the interest of researchers has focused mainly on the therapeutic properties of exogenously supplemented LA. In many countries, LA is approved as a drug against diabetic neuropathy and is available by prescription [4]. Our studies have proven a beneficial effect of LA in Parkinson's disease, kidney disease, nitroglycerin tolerance, cyanide and cyanate intoxication [5–9]. Many authors have suggested that therapeutic effects of LA supplementation can be attributed to the potent antioxidant properties of LA and DHLA [10–12]. However, other authors question the efficacy of the supplemented LA as a physiological antioxidant because the action of LA/DHLA as

direct scavengers of reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) was confirmed mostly in in vitro experimental studies [13]. Thus, although therapeutic efficacy of LA, especially in the treatment of diabetes and diabetic neuropathy, is beyond doubt, the cellular and biochemical mechanisms that mediate the pharmacological effects of exogenous LA are yet to be uncovered.

Almost 10 years ago, we hypothesized for the first time that therapeutic effects of LA are due to their involvement in sulfane sulfur metabolism [14]. Iciek et al. indicated that LA supplementation led to augmentation of the sulfane sulfur level in erythrocytes of end-stage renal failure patients treated with peritoneal dialysis [15]. The study in a mouse peritonitis model indicated that LA increased sulfane sulfur level in the peritoneal exudates [16]. The animal studies using glibenclamide, an adenine triphosphate (ATP)-sensitive potassium channel (K_{ATP}) blocker, clearly demonstrated that the anti-inflammatory [17] and cardioprotective [18,19] properties of LA were associated with the action of H_2S .

Therefore, the question arises whether the therapeutic effects observed in vivo after LA administration can be associated with its influence on endogenous H_2S /sulfane sulfur production or whether exogenous LA itself can act as a direct donor of H_2S /sulfane sulfur.

The process of H_2S release from sulfides (RSH) and disulfides (RSSR) has been studied for many years. It is known that the reaction of the hydrated electron with RSH leads to breakdown of C–S bond and formation of H_2S and a carbon-centered radical ($R^\bullet$) whilst disulfides (RSSR) react with the hydrated electron forming sulfur-centered radical species [20,21]. LA is a very unique molecule due to its characteristic five-membered dithiolane ring which, in contrast to linear disulfide in cystine, is unstable under ultraviolet irradiation [22]. Therefore, several in vitro chemical and photochemical studies of LA have focused mainly on the products of cleavage of its disulfide bond, producing reactive thiyl radicals [23–25]. In contrast, processes of breakdown of the C–S bond in the LA molecule have been less studied.

The aim of the present study was to answer the question of whether H_2S /sulfane sulfur can be released from an LA molecule. Non-enzymatic and enzymatic H_2S and sulfur formation from LA was investigated in vitro in the absence of homogenate and in the presence of rat liver or kidney homogenate, respectively.

In in vitro conditions, in the absence of enzymes, only the oxidized form, i.e., LA is stable. The reduced form, i.e., DHLA is, under these conditions, very quickly oxidized to LA. For this reason, the oxidized form, i.e., LA, is administered as a drug. It is assumed that, after administration, LA is reduced in the body to DHLA by three enzymes: dihydrolipoate dehydrogenase, glutathione reductase or thioredoxin reductase [26]. Thus, both forms of this compound—LA and DHLA—are present in vivo while, in vitro, only LA is stable. This is the reason why in the studies conducted in the presence of rat tissue homogenate, both forms LA and DHLA were used, whereas, in the absence of rat tissue homogenate, we applied only LA.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

The drug lipoic acid (Thiogamma® 600) was obtained from Wörlag Pharma Company (Böblingen, Germany). Dihydrolipoic acid, sodium sulfide (Na_2S), *p*-phenylenediamine, potassium cyanide (KCN), 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) and zinc acetate were provided by Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Formaldehyde, ferric chloride ($FeCl_3$) and other chemicals were purchased from the Polish Chemical Reagent Company (P. O. Ch, Gliwice, Poland).

2.2. Animals and Homogenate Preparation

One male Wistar rat was used to obtain liver and kidney homogenate. An animal (weighing approximately 200 g) was kept under standard laboratory conditions and was fed a standard feed. It was sacrificed by decapitation, the liver and the kidneys were isolated, placed in liquid nitrogen and

stored at -76°C until the experiment. The procedure was approved by the Animal Research Ethics Committee in Krakow, Poland (number 153/2012).

The frozen liver or kidneys were weighed and immediately homogenized (1 g of the tissue in 4 mL of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) using an IKA-ULTRA TURRAX T8 homogenizer (IKA Poland Sp. z o.o company, Warsaw, Poland) (6000 rpm for 1 min). Homogenates were kept in ice and used immediately for experiments.

2.3. Hydrogen Sulfide and Sulfane Sulfur Formation from Lipoic Acid

Reactive sulfur species (H_2S and sulfane sulfur) formation from LA was investigated in vitro non-enzymatically (without homogenate). Samples of 10 mM LA in 50 mM phosphate buffer, pH 5.0 and 8.0 were prepared and were left at room temperature for 3 or 7 days protected or unprotected from environmental light. Independently, on the last day of experiment, fresh samples of 10 mM LA in phosphate buffer, pH 5.0 and 8.0 were prepared. Then, both LA samples (“old” and “fresh”) were used for H_2S and sulfane sulfur determination. In some experiments, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was included in the buffer.

Possibilities of H_2S /sulfane sulfur formation from LA/DHLA were also investigated in vitro enzymatically in the presence of fresh rat liver or kidney homogenate (protected from light).

2.4. Methods

2.4.1. Determination of H_2S Level

H_2S level was determined using a modification of the method described by Shen et al. [27]. Briefly, 125 μL of LA samples and 125 μL of water (or 125 μL of LA sample and 125 μL of rat liver homogenate) were mixed with 125 μL of 1% zinc acetate and 125 μL of 50 mM borate buffer, pH 9.0 and the mixture was incubated at 37°C for 10 min. Next, 0.4 mL of 12.5 mM *p*-phenylenediamine and 0.1 mL of 40 mM FeCl_3 in 6 M HCl were added. After a 10 min incubation at room temperature, the samples were centrifuged at $10,000\times g$ for 5 min, and fluorescence was measured at wavelength $\lambda = 600\text{ nm}$ for excitation and $\lambda = 623\text{ nm}$ for emission H_2S concentrations were read from a calibration curve prepared from 10 μM Na_2S and were expressed in nmoles of S^{2-} per 1 mL.

2.4.2. Determination of Sulfane Sulfur

The level of the compounds containing sulfane sulfur was determined by the method of Wood based on cold cyanolysis and colorimetric detection [28].

Initially, 200 μL of LA sample and 620 μL of distilled water (or 200 μL of LA sample, 200 μL of homogenate and 420 μL of distilled water) were mixed with 80 μL of 1 M NH_3 , and 100 μL of 0.5 M KCN. Then, the mixtures were mixed thoroughly and incubated at room temperature for 45 min. Next, 20 μL of 38% formaldehyde solution and 200 μL of the Goldstein reagent containing Fe^{3+} cation were added. The precipitate formed in this reaction was centrifuged at $10,000\times g$ for 10 min. The supernatant was carefully collected and its absorbance was measured at a wavelength $\lambda = 460\text{ nm}$. The whole pool of sulfane sulfur was evaluated from a standard curve prepared for 1 mM KSCN and was expressed in nmoles of KSCN per 1 mL.

2.4.3. Determination of H_2S by Diffusion Assay

H_2S liberated from LA was determined by the modified diffusion assay described by Toohey [29]. Special diffusion chambers contain a space in the middle separated from the sample. The chambers are tightly closed and gas liberated from samples can diffuse and react with the reagents inside the cell. The inner cell of the chamber contained 0.9 mL of 0.3 M Na_2PO_4 and 0.1 mL of 6 mM DTNB, while, to the outer cell of the chamber, 1 mL of LA sample was added. The diffusion chambers were immediately closed and placed on a shaker. The diffusion was carried out for 90 min, and then the absorbance of the solution located in the inner cell was measured spectrophotometrically against the

blank sample containing only DTNB and buffer. H_2S liberated from the outer part of the chamber reacted with DTNB in the inner part to form 2-nitro-5-thiobenzoic acid characterized by intensive yellow color, which shows maximum absorbance at 412 nm. The H_2S level was evaluated from a standard curve prepared for 10 μM Na_2S and was expressed in nmoles per 1 mL.

2.5. Statistical Analysis

All experiments were performed in triplicate or duplicate. Results are presented as the means $\pm$ SD (standard deviation). A statistical analysis of experimental data was performed using a one-way analysis of variance ANOVA. The differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. The statistical analysis was done using STATISTICA 12.0 Software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Results

3.1. Hydrogen Sulfide Formation from Lipoic Acid

Non-enzymatic H_2S formation from LA was investigated in vitro in a buffer environment. LA samples were prepared in phosphate buffer at two pHs: 5.0 and 8.0. Figure 1 demonstrates that freshly prepared LA solution, if protected from light, contained only trace amounts of H_2S independently of pH conditions. However, when LA samples were left for three days at room temperature and unprotected from light, the amount of H_2S strongly increased. These results suggest that, in the presence of light, LA can be decomposed non-enzymatically with H_2S release.

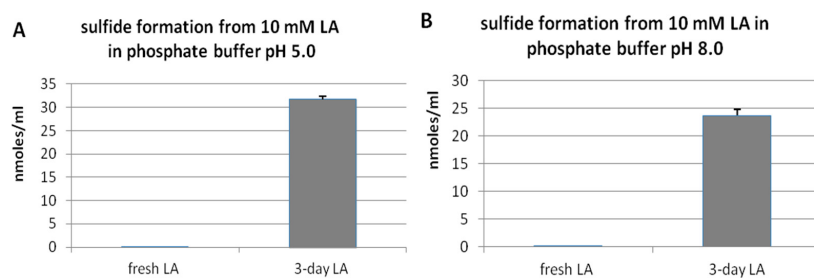


Figure 1. Level of hydrogen sulfide formed in vitro from fresh lipoic acid (LA) or from LA left for three days unprotected from light at pH 5.0 (A) or 8.0 (B). The results are presented as the means $\pm$ SD (standard deviation).

3.2. Sulfane Sulfur Formation from Lipoic Acid

Figure 2 presents non-enzymatic sulfane sulfur formation from LA under in vitro conditions. The fresh LA contained trace amounts of sulfane sulfur; however, after three days, significant amounts of sulfane sulfur were detected in the samples non-protected from light. A slightly higher level of sulfane sulfur was estimated at pH 8.0 (Figure 2A,B). It suggests that sulfane sulfur is formed from LA non-enzymatically in the presence of light.

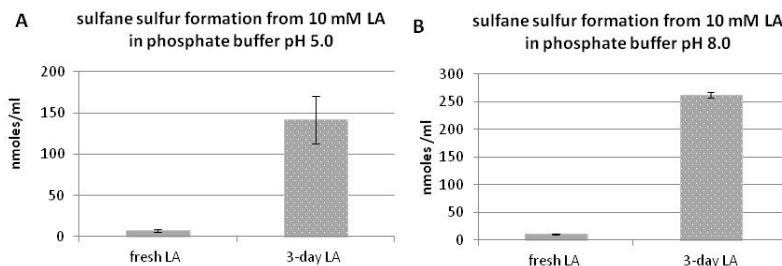


Figure 2. Level of sulfane sulfur formed in vitro from fresh LA or from LA left for three days unprotected from light at pH 5.0 (A) or 8.0 (B). The results are presented as the means $\pm$ SD.

3.3. pH- and Time-Dependent H₂S Formation from Lipoic Acid Detected by Diffusion Assay

Figure 3A,B present the results of non-enzymatic H₂S formation from LA detected by the diffusion assay. Figure 3A represents H₂S formation from LA at pH 8.0 dependent on time and light protection in comparison to the standard solutions of Na₂S. When LA was protected from light all the time (during the diffusion assay also), only trace amounts of H₂S were detected independently of the time (the same level for fresh, three-days and seven-days LA solution). However, when the samples of the same LA solution were not protected from light, significant levels of H₂S were determined after three and seven days at pH 8.0 (Figure 3A) and 5.0 (Figure 3B). Moreover, a noticeable amount of H₂S was detected even from fresh LA, when 90-min diffusion assay was non-protected from light. (Figure 3A). The amounts of H₂S liberated from three-days LA were the highest both at pH 8.0 and 5.0 (Figure 3A,B). Interestingly, the results of this experiment demonstrated that H₂S liberated from seven-days LA left exposed to environmental light was nearly twice the amount lower than three-days LA samples at both pH values.

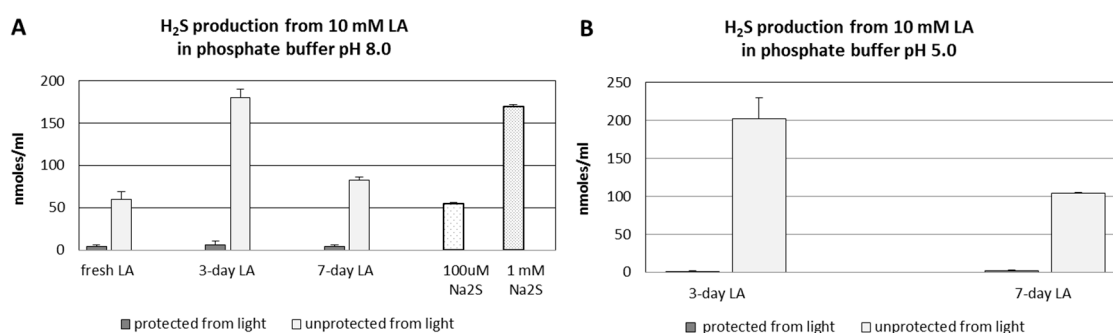


Figure 3. Level of H₂S formed in vitro non-enzymatically from LA protected or non-protected from light detected by diffusion assay. In addition, 10 mM solution of LA in 50 mM phosphate buffer was used fresh as well as after three or seven days left in the presence or absence of environmental light. On the day of the experiment, the LA samples were pipetted into diffusion chambers and the level of H₂S was detected after 90 min of diffusion. (A) the level of H₂S formed at pH 8.0 from fresh LA, three-days LA and seven-days LA as well as from 100 μM and 1 mM Na₂S as the controls; and (B) the level of H₂S formed at pH 5.0 from three-days LA and seven-days LA. The results are presented as the means ± SD from samples run in triplicate.

3.4. Time-Dependent Sulfane Sulfur Formation from Lipoic Acid in the Presence or Absence of EDTA

Figure 4 presents results of sulfane sulfur determination in the samples of LA left for three or seven days protected or non-protected from light in the presence or absence of EDTA.

When samples were protected from light independently of the presence of EDTA, no or only a trace amount of sulfane sulfur was detected after three or seven days, respectively. A significant amount of sulfane sulfur was detected only in samples non-protected from light, especially after seven days. After three days, the level of sulfane sulfur in the samples left unprotected from light was much smaller than after seven days but visibly higher than in samples protected from light. EDTA in three-day LA samples raised subtly the amount of sulfane sulfur, but, in seven-day LA samples, the level of sulfane sulfur was a slightly decreased in EDTA samples (Figure 4). The presence of EDTA had no clear effect on the level of sulfane sulfur.

These results together with the results presented in Figure 3 suggest that H₂S is the first product of non-enzymatic light-dependent decomposition of LA, which then is probably oxidized to sulfane sulfur-containing compounds.

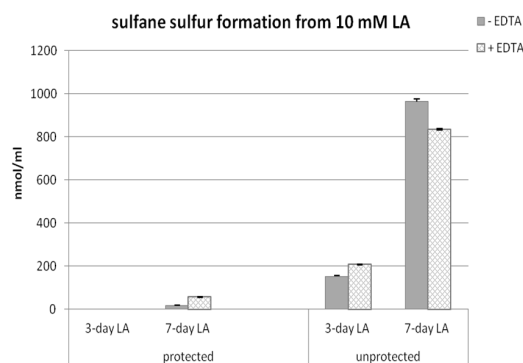


Figure 4. Level of sulfane sulfur formed in vitro non-enzymatically from fresh LA protected from light, and LA left for three or seven days unprotected from light in the presence or absence of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

3.5. H_2S and Sulfane Sulfur Formation from Lipoic Acid or Dihydrolipoic Acid in the Presence of Rat Liver or Kidney Homogenate

The possibilities of enzymatic H_2S formation from LA in the absence of light are presented in Figure 5. To the rat liver or kidney homogenate, freshly prepared LA or DHLA solutions were added and samples were incubated at room temperature for 30 min completely protected from light. Then, H_2S level and sulfane sulfur level were determined and compared to the control homogenate. Figure 5A demonstrates that the amount of H_2S is significantly higher in the samples of rat liver homogenate containing LA or DHLA than in control homogenate. A greater amount of H_2S was formed from the same molar concentration of DHLA than LA in the sample. Similar results were obtained in the experiment performed in the presence of kidney homogenate; however, in this case the amounts of H_2S were lower than in the case of liver homogenate and only DHLA caused a significant increase in H_2S level (Figure 5B).

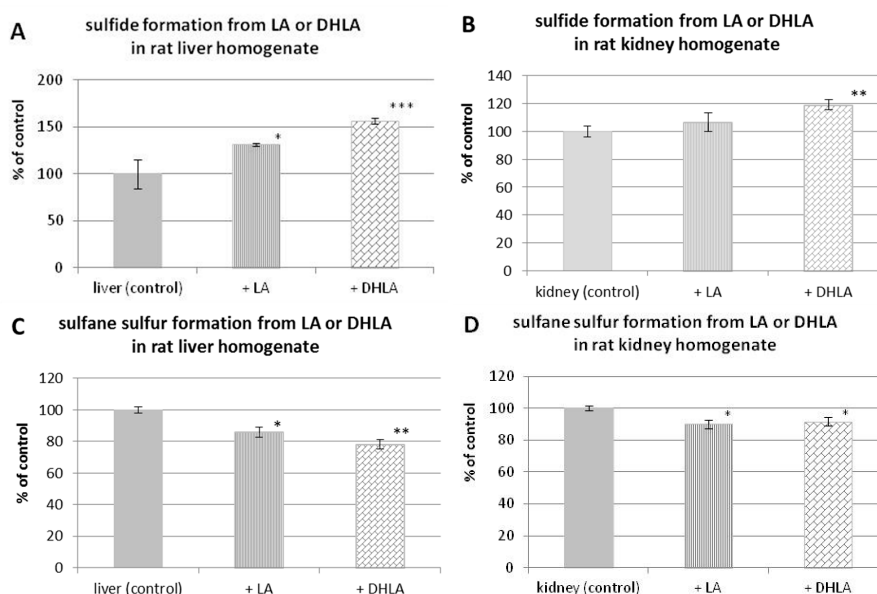


Figure 5. Level of hydrogen sulfide (A,B) and sulfane sulfur (C,D) formed in vitro enzymatically in the presence of rat liver or kidney homogenate from fresh LA or dihydrolipoic acid (DHLA) protected from light compared to endogenous hydrogen sulfide and sulfane sulfur level in homogenates (control). The results are presented as the means $\pm$ SD. Statistical significance compared to the control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

The results obtained from sulfane sulfur determinations in samples containing rat homogenate and LA or DHLA in the absence of light are presented in Figure 5C,D. Interestingly, the levels of sulfane sulfur compounds in control liver or kidney homogenates were higher than in samples containing the same amounts of homogenate and LA or DHLA (Figure 5C,D). Moreover, the greatest decrease in sulfane sulfur level was found after DHLA treatment, where the highest increase in H₂S level was also observed. It means that the increase in H₂S level observed after addition of DHLA/LA is connected with its release from endogenous sulfane sulfur compounds under the influence of DHLA.

4. Discussion

It is known that short-wavelength UV (UVC: 200 nm–280 nm) irradiation facilitates breakage of C–S bond in thiol compounds and H₂S release [30]. LA that is a very unique dithiol molecule [31] has not been studied in this context for a long time, until the study of Bucher et al., who reported, for the first time, that C–S bonds in LA molecules can be broken forming carbon-centered radicals and H₂S under the influence of 266 nm irradiation [32]. The aim of our study was to verify if this process can be initiated by natural sunlight (environmental light) and the obtained results confirmed this possibility. It is commonly known that ground level sunlight is composed of 44% visible light, 3% ultraviolet and the remainder is infrared radiation. The UVC is completely absorbed by the ozone layer and atmosphere. Therefore, 95% or more of UV radiation that reaches the Earth's surface is composed of the longer wavelengths: UVA (315 nm–400 nm) with the small remainder of UVB (280 nm–315 nm). In general, it can be concluded that the UV radiation that reaches the Earth's surface does not contain the UVC component. Moreover, the ordinary window glass blocks over 90% of the radiation below 300 nm.

LA is a very unique molecule due to its characteristic five-membered dithiolane ring which, in contrast to linear disulfide in cystine, is unstable under ultraviolet irradiation [22]. Therefore, several *in vitro* chemical and photochemical studies of LA have focused mainly on the products of cleavage of its disulfide bond, giving reactive thiyl radicals [23–25].

Thus, in this study, H₂S/sulfane sulfur release from LA molecules under the influence of visible light was observed for the first time. We assume that in our experimental conditions the C–S bonds are broken in the LA molecule to yield H₂S. The present results indicate that not only H₂S but also sulfane sulfur is formed from LA non-enzymatically under *in vitro* conditions in the presence of visible light (Figure 2).

H₂S is released from LA molecules in a time- and light-dependent manner. Only trace amounts of H₂S were detected both in freshly prepared LA solution, and in LA samples, which were left three or seven days protected from light (Figure 1, Figure 3). In this context, the results of non-enzymatic H₂S formation from LA detected by diffusion assay are especially interesting as they indicated that H₂S production in seven-day LA samples was much lower than in three-day LA samples (Figure 3). Simultaneously, sulfane sulfur production in seven-days LA samples was much higher compared to sulfane sulfur level detected in three-days LA samples (Figure 4). Therefore, the results shown in Figure 3 together with the results presented in Figure 4 suggest that H₂S is the first product of non-enzymatic light-dependent decomposition of LA, which is, probably, next oxidized to sulfane sulfur-containing compound(s). The limitations of our study result from analytical methods used in this experiment. The colorimetric and fluorimetric methods have poor power, but they still are widely used by laboratories. In order to confirm our hypothesis, using better analytical methods (i.e., high performance liquid chromatography (HPLC), mass spectrometry (MS)) is planned for the future.

H₂S was shown for the first time to play an important role in the regulation of many physiological processes in 1996 [33]. It is synthesized *in vivo* from L-cysteine and/or L-homocysteine by cystathionine β -synthase (EC 4.2.1.22; CBS), cystathionine γ -lyase (EC 4.4.1.1; CSE) and cysteine aminotransferase (EC 2.6.1.3; CAT) in cooperation with 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (EC 2.8.1.2; MST). H₂S can be stored in cells in the form of sulfane sulfur. On the other hand, it can be released from sulfane sulfur-compounds [34–36]. Sulfane sulfur is a labile reactive sulfur atom in the 0 or –1 oxidation state

and does not exist in the free form but is always attached to another sulfur atom. The outer sulfur atom of thiosulfate ($\text{S}=\text{SO}_3^{2-}$) and elemental sulfur (S_8) possess these properties. Among other sulfane-sulfur containing compounds, the following should be mentioned: persulfides ($\text{R}-\text{S}-\text{S}-\text{H}$, HSSH), organic ($\text{R}-\text{S}_n-\text{S}-\text{R}$) and inorganic polysulfides (H_2S_n), polythionates ($^-\text{SO}_3-\text{S}_n-\text{SO}_3^-$) and disulfides in which the C-S bond is adjacent to an unsaturated carbon, such as disulfides of mercaptopyruvate, allyl mercaptan and β -mercaptoketimine [34].

The balneological procedures with the use of sulfide/hydrogen sulfide mineral waters are commonly used in the treatment of a variety of dermatological diseases, including psoriasis, atopic dermatitis, dermatoses with congenital hyperkeratosis and even scleroderma [37]. On the other hand, recent observations documented a beneficial effect of many formulations containing LA on the skin [38]. The comparison of the effects of LA and H_2S /sulfane sulfur on the skin showed striking analogies. Namely, Tsou et al. demonstrated that LA could prove to be an effective treatment in patients with systemic sclerosis (SSc) that is a connective tissue disease characterized by fibrosis of the skin and organs [39]. On the other hand, Wang et al. reported the beneficial effects of H_2S on SSc-associated skin and lung fibrosis [40].

Thus, the hypothesis that beneficial effects observed after treatment with various types of LA-containing cosmetic and dermatological formulations applied topically on the skin result from a direct action of H_2S /sulfane sulfur released in the presence of environmental light from LA contained in these formulations (cream, gel, liniment, balm, lotion, ointment, etc.) seems convincing and certainly deserves further attention. More studies in this direction are needed that will significantly contribute to a better understanding of LA and the mechanisms of its pharmacological activity, thus supporting progress in the treatment of dermatological diseases.

Is LA a molecule which, like thiocysteine, can release H_2S /sulfane sulfur in tissues? The answer to this question seems negative most of all because, in contrast to thiocysteine, LA does not possess sulfane sulfur in its structure. On the other hand, this process would be possible, provided that human body contains an enzyme(s) that extracts sulfane sulfur from thiol compounds. It is known that this kind of enzymes extract sulfane sulfur from cysteine forming alanine and are present in plant and bacterial cells [34]. It should be noted that it has never been studied whether LA is a source of the H_2S and sulfane sulfur in animal tissues. It is known that the LA/DHLA system plays a role in H_2S production with participation of sulfurtransferases, such as MST and thiosulfate:cyanide sulfurtransferase (EC 2.8.1.1; rhodanese, TST). Nagahara et al. demonstrated that cytosolic MST was evolutionarily related to mitochondrial TST [41]. TST- and MST-catalyzed reactions of sulfane sulfur transfer yield an unstable sulfane sulfur-containing persulfide with the -SH group of Cys-247 located in the active center of these enzymes (TST(MST)-Cys₂₄₇-S-SH). Next, DHLA accepts a sulfur atom from TST(MST)-Cys₂₄₇-S-SH what results in formation of DHLA hydropersulfide, from which sulfane sulfur is then released in the form of H_2S , and LA is produced concomitantly. The first papers, in which authors demonstrated that under in vitro conditions (without tissue homogenate) DHLA served as a sulfane sulfur acceptor in TST-catalyzed reactions, were published in the 1960s [42,43]. The next paper addressing this issue was not published until 2011, when authors using the mouse brain homogenate demonstrated that, like for TST, DHLA was also a substrate for MST [44].

Our results indicated that, in the presence of rat liver (Figure 5A) and kidney homogenate (Figure 5B), the level of H_2S in control samples was lower than in samples containing the same amounts of homogenate and LA/DHLA. However, in the case of sulfane sulfur, the relationship was opposite—namely, its level in control homogenates was higher than in the same samples containing LA/DHLA (Figure 5C,D). Thus, the H_2S production is associated with a decrease of endogenous sulfane sulfur under the influence of DHLA.

Based on the above-discussed literature data, it seems that H_2S is released from sulfane sulfur in tissues (liver and kidney) with participation of MST and/or TST in the presence of DHLA. Simultaneously, it means that LA is not a molecule which, like, e.g., the thiocysteine, can release

H₂S/sulfane sulfur in tissues. A putative mechanism of H₂S formation from sulfane sulfur in the liver and kidneys in the presence of DHLA is shown in Figure 6.

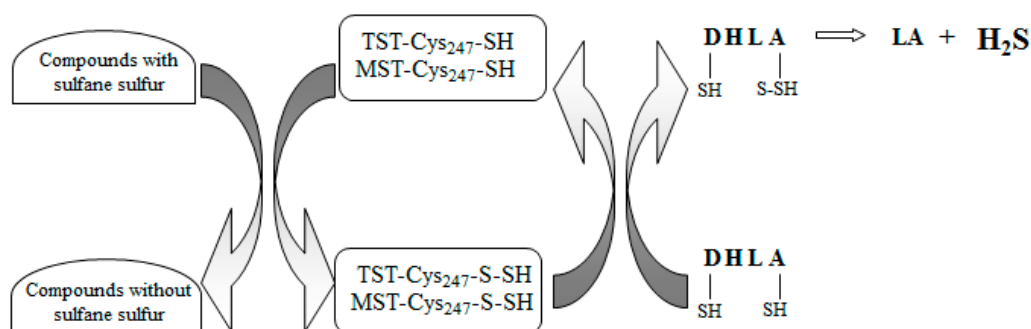


Figure 6. Role of LA/DHLA system in the interconversion of H₂S and sulfane sulfur in the rat liver and kidneys. DHLA accepts sulfur atoms from sulfane sulfur-containing persulfide group of Cys-247, located in the active center of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST) and/or thiosulfate:cyanide sulfurtransferase, rhodanese (TST). In this process, DHLA hydropersulfide is formed from which sulfur is released in the form of H₂S, and LA is produced concomitantly (according to [44], modified).

5. Conclusions

The results indicate that both H₂S and sulfane sulfur are formed from LA non-enzymatically in the presence of environmental light. These results suggest that H₂S is the first product of non-enzymatic light-dependent decomposition of LA that is, probably, next oxidized to sulfane sulfur-containing compound(s).

The study in the presence of tissue homogenates indicated that LA and DHLA are not molecules which can directly release H₂S/sulfane sulfur in tissues. It seems that, in these conditions, DHLA acts as a reducing agent that releases H₂S from sulfane sulfur-compounds.

The same mechanism may occur in *in vivo* processes, which is important for a better understanding of the mechanisms of pharmacological action of LA.

Acknowledgments: The research was supported by funds of the Faculty of Medicine of Jagiellonian University, Collegium Medicum, Kraków, Poland.

Author Contributions: Anna Bilaska-Wilkosz and Małgorzata Iciek conceived and designed the experiments. Anna Bilaska-Wilkosz, Małgorzata Iciek, Danuta Kowalczyk-Pachel and Magdalena Górny performed the experiments. Maria Sokołowska-Jeżewicz assisted in experiments and collected literature for some parts of the paper. Anna Bilaska-Wilkosz and Małgorzata Iciek wrote the paper and collected literature for some parts of the paper. Anna Bilaska-Wilkosz, Małgorzata Iciek and Lidia Włodek supervised the study and reviewed the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Reed, L.J.; DeBusk, B.G.; Gunsalus, I.C.; Hornberger, C.S. Crystalline α -lipoic acid: A catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science* **1951**, *114*, 93–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Petersen Shay, K.; Moreau, R.F.; Smith, E.J.; Smith, A.R.; Hagen, T.M. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1790*, 1149–1160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Beitner, H. Randomized, placebo-controlled, double blind study on the clinical efficacy of a cream containing 5% α -lipoic acid related to photoageing of facial skin. *Br. J. Dermatol.* **2003**, *149*, 841–849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Çakici, N.; Fakkeli, T.M.; van Neck, J.W.; Verhagen, A.P.; Coert, J.H. Systematic review of treatments for diabetic peripheral neuropathy. *Diabet. Med.* **2016**, *33*, 1466–1476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Bilska, A.; Dubiel, M.; Sokołowska-Jeżewicz, M.; Lorenc-Koci, E.; Włodek, L. Alpha-lipoic acid differently affects the reserpine-induced oxidative stress in the striatum and prefrontal cortex of rat brain. *Neuroscience* **2007**, *146*, 1758–1771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Marcykiewicz, B.; Wiśniowski, Z.; Iciek, M.; Bilska-Wilkosz, A.; Kowalczyk-Pachel, D.; Górny, M.; Włodek, L.; Książek, P. The effects of lipoic acid supplementation on the estimated glomerular filtration rate in patients with chronic kidney disease. *Nefrol. Dial. Pol.* **2016**, *20*, 235–238.
7. Dudek, M.; Bednarski, M.; Bilska, A.; Iciek, M.; Sokołowska-Jeżewicz, M.; Filipek, B.; Włodek, L. The role of lipoic acid in prevention of nitroglycerin tolerance. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *591*, 203–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Bilska-Wilkosz, A.; Dudek, M.; Knutelska, J.; Włodek, L. The effect of lipoic acid administration on the urinary excretion of thiocyanate in rats exposed to potassium cyanide. *Acta Pol. Pharm.* **2015**, *72*, 49–52. [[PubMed](#)]
9. Sokołowska, M.; Niedzielska, E.; Iciek, M.; Bilska, A.; Lorenc-Koci, E.; Włodek, L. The effect of the uremic toxin cyanate (CNO^-) on anaerobic cysteine metabolism and oxidative processes in the rat liver: A protective effect of lipoate. *Toxicol. Mech. Methods* **2011**, *21*, 473–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Biewenga, G.P.; Haenen, G.R.; Bast, A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* **1997**, *29*, 315–331. [[CrossRef](#)]
11. Packer, L.; Witt, E.H.; Tritschler, H.J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *19*, 227–250. [[CrossRef](#)]
12. Bilska, A.; Włodek, L. Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacol. Rep.* **2005**, *57*, 570–577. [[PubMed](#)]
13. Petersen Shay, K.; Moreau, R.F.; Smith, E.J.; Hagen, T.M. Is α -lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species in vivo? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity. *IUBMB Life* **2008**, *60*, 362–367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bilska, A.; Dudek, M.; Iciek, M.; Kwiecień, I.; Sokołowska-Jeżewicz, M.; Filipek, B.; Włodek, L. Biological actions of lipoic acid associated with sulfane sulfur metabolism. *Pharmacol. Rep.* **2008**, *60*, 225–232. [[PubMed](#)]
15. Iciek, M.; Marcykiewicz, B.; Bilska-Wilkosz, A.; Sokołowska-Jeżewicz, M.; Kłapcińska, J. The effect of lipoate on anaerobic cysteine metabolism in erythrocytes of patients treated with peritoneal dialysis. *Pharmacol. Rep.* **2014**, *66*, 325–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Zygmunt, M.; Dudek, M.; Bilska-Wilkosz, A.; Bednarski, M.; Mogilski, S.; Knutelska, J.; Sapa, J. Anti-inflammatory activity of lipoic acid in mice peritonitis model. *Acta Pol. Pharm.* **2013**, *70*, 899–904. [[PubMed](#)]
17. Dudek, M.; Bilska-Wilkosz, A.; Knutelska, J.; Mogilski, S.; Bednarski, M.; Zygmunt, M.; Iciek, M.; Sapa, J.; Bugajski, D.; Filipek, B.; Włodek, L. Are anti-inflammatory properties of lipoic acid associated with the formation of hydrogen sulfide? *Pharmacol. Rep.* **2013**, *65*, 1018–1024. [[CrossRef](#)]
18. Dudek, M.; Knutelska, J.; Bednarski, M.; Nowiński, L.; Zygmunt, M.; Bilska-Wilkosz, A.; Iciek, M.; Otto, M.; Żytka, I.; Sapa, J.; et al. Alpha lipoic acid protects the heart against myocardial post ischemia-reperfusion arrhythmias via K_{ATP} channel activation in isolated rat hearts. *Pharmacol. Rep.* **2014**, *66*, 499–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Dudek, M.; Rażny, K.; Bilska-Wilkosz, A.; Iciek, M.; Sapa, J.; Włodek, L.; Filipek, B. Hypotensive effect of alpha-lipoic acid after a single administration in rats. *Anatol. J. Cardiol.* **2016**, *16*, 306–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Hoffman, M.Z.; Hayon, E. One-electron reduction of the disulfide linkage in aqueous solution. Formation, protonation, and decay kinetics of the RSSR-radical. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 7950–7957. [[CrossRef](#)]
21. Mezyk, S.P. Rate constant determination for the reaction of sulfhydryl species with the hydrated electron in aqueous solution. *J. Phys. Chem. A* **1995**, *99*, 13970–13975. [[CrossRef](#)]
22. Brown, P.R.; Edwards, J.O. Effect of solvent on the photolysis of α -lipoic acid. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3131–3135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Matsugo, S.; Han, D.; Tritschler, H.J.; Packer, L. Decomposition of alpha-lipoic acid derivatives by photoirradiation-formation of dihydrolipoic acid from alpha-lipoic acid. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1996**, *38*, 51–59. [[PubMed](#)]
24. Wada, N.; Wakami, H.; Konishi, T.; Matsugo, S. The effect of biothiol on UV irradiated α -lipoic acid. *Biofactors* **2008**, *34*, 285–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Wada, N.; Wakami, H.; Konishi, T.; Matsugo, S. The degradation and regeneration of α -lipoic acid under the irradiation of UV light in the existence of homocysteine. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2009**, *44*, 218–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bast, A.; Haenen, G.R. Lipoic acid: A multifunctional antioxidant. *Biofactors* **2003**, *17*, 207–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Shen, X.; Pattillo, C.B.; Pardue, S.; Bir, S.C.; Wang, R.; Kevil, C.G. Measurement of plasma hydrogen sulfide in vivo and in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *50*, 1021–1031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wood, J.L. Sulfane sulfur. *Methods Enzymol.* **1987**, *143*, 25–29. [[PubMed](#)]
29. Toohey, J.I. Ketomethylthiobutyric acid formation from methylthioadenosine: A diffusion assay. *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, *223*, 533–542. [[CrossRef](#)]
30. Morine, G.H.; Kuntz, R.R. Observations of C-S and S-S bond cleavage in the photolysis of disulfides in solution. *Photochem. Photobiol.* **1981**, *33*, 1–5. [[CrossRef](#)]
31. Krishnan, C.V.; Garnett, M. Electrochemical behavior of the super antioxidant, α -lipoic acid. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2011**, *6*, 3607–3630.
32. Bucher, G.; Lu, C.; Sander, W. The photochemistry of lipoic acid: Photoionization and observation of a triplet excited state of a disulfide. *Chem. Phys. Chem.* **2005**, *6*, 2607–2618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Abe, K.; Kimura, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 1066–1071. [[PubMed](#)]
34. Toohey, J.I. Sulfur signaling: Is the agent sulfide or sulfane? *Anal. Biochem.* **2011**, *413*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Iciek, M.; Kowalczyk-Pachel, D.; Bilska-Wilkosz, A.; Kwiecień, I.; Górny, M.; Włodek, L. S-sulfhydration as a cellular redox regulation. *Biosci. Rep.* **2016**, *36*, e00304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Koike, S.; Ogasawara, Y. Sulfur Atom in its Bound State Is a Unique Element Involved in Physiological Functions in Mammals. *Molecules* **2016**, *21*, 1753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Matz, H.; Orion, E.; Wolf, R. Balneotherapy in dermatology. *Dermatol. Ther.* **2003**, *16*, 132–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. El-Komy, M.; Shalaby, S.; Hegazy, R.; Abdel Hay, R.; Sherif, S.; Bendas, E. Assessment of cubosomal alpha lipoic acid gel efficacy for the aging face: A single-blinded, placebo-controlled, right-left comparative clinical study. *J. Cosmet. Dermatol.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Tsou, P.S.; Balogh, B.; Pinney, A.J.; Zakhem, G.; Lozier, A.; Amin, M.A.; Stinson, W.A.; Schiopu, E.; Khanna, D.; Fox, D.A.; et al. Lipoic acid plays a role in scleroderma: Insights obtained from scleroderma dermal fibroblasts. *Arthritis Res. Ther.* **2014**, *16*, 4225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Wang, Z.; Yin, X.; Gao, L.; Feng, S.; Song, K.; Li, L.; Lu, Y.; Shen, H. The protective effect of hydrogen sulfide on systemic sclerosis associated skin and lung fibrosis in mice model. *SpringerPlus* **2016**, *5*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Nagahara, N.; Okazaki, T.; Nishino, T. Cytosolic mercaptopyruvate sulfurtransferase is evolutionary related to mitochondrial rhodanese. Striking similarity in active site amino acid sequence and the increase in the mercaptopyruvate sulfurtransferase activity of rhodanese by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 16230–16235. [[PubMed](#)]
42. Villarejo, M.; Westley, J. Mechanism of rhodanese catalysis of thiosulfate-lipoate oxidation-reduction. *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 4016–4020. [[PubMed](#)]
43. Volini, M.; Westley, J. The mechanism of the rhodanese-catalyzed thiosulfate-lipoate reaction. Kinetic analysis. *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 5168–5176. [[PubMed](#)]
44. Mikami, Y.; Shibuya, N.; Kimura, Y.; Nagahara, N.; Ogasawara, Y.; Kimura, H. Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide. *Biochem. J.* **2011**, *439*, 479–485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Sample Availability: Not available.



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DYSKUSJA

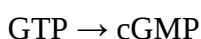
Wyniki prezentowane w pracy wchodzącej w skład prac stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej (Praca 1), zatytułowanej „*Inactivation of aldehyde dehydrogenase by nitroglycerin in the presence and absence of lipoic acid and dihydrolipoic acid*”. Implications for the problem of differential effects of lipoic acid *in vitro* and *in vivo*”, wskazują że GTN jest silnym inhibitorem aktywności katalitycznej ALDH zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*.

Wyniki te są zgodne z obserwacjami innych autorów. Na hamujące aktywność ALDH działanie GTN zwrócono uwagę już w latach osiemdziesiątych XX wieku. Mianowicie w 1985 roku Towell i wsp. wykazali, że u pacjentów przyjmujących GTN dochodzi do niemal 90% zahamowania aktywności ALDH obecnej w erytrocytach (Towell i wsp., 1985). Późniejsze badania wykazały, że GTN jest silnym inhibitorem zarówno drożdżowej ALDH, jak również izoformy mitochondrialnej ALDH, tak zwanej ALDH-2 wyizolowanej z mitochondriów komórek mięśnia sercowego szczurów traktowanych GTN (Wenzel i wsp., 2007). Kolejne badania tych samych autorów wykazały, że GTN hamuje również aktywność ALDH w granulocytach zdrowych ochotników (Wenzel i wsp., 2009). Wiadomo też, że GTN jest inhibitorem ALDH izolowanej z mitochondriów szczurzej wątroby oraz rekombinowanej ludzkiej ALDH-2 (Beretta i wsp., 2008).

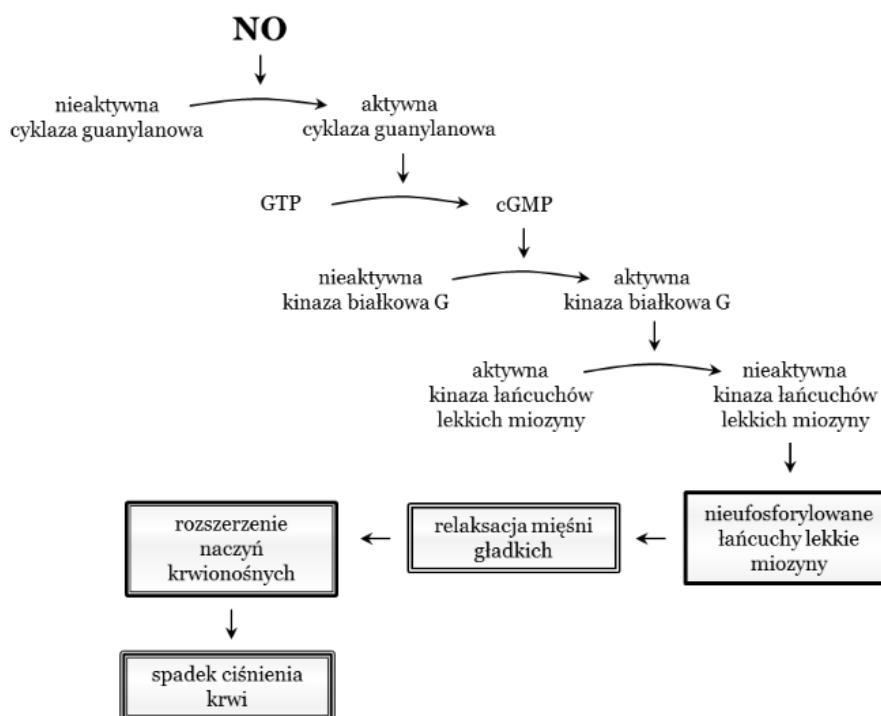
ALDH jest enzymem katalizującym reakcje utlenienia aldehydów do kwasów karboksylowych. Źródłem aldehydów są zarówno procesy biochemiczne zachodzące w toku prawidłowego metabolizmu, jak również w toku biotransformacji ksenobiotyków. ALDH jest enzymem kojarzonym głównie z utlenianiem aldehydu octowego (etanolu), który pojawia się w organizmie w podwyższonych stężeniach wskutek spożycia etanolu. Nagromadzenie etanolu wywołuje uczucie duszności, zaburzenia rytmu serca, nudności i wymioty. Objawy takie obserwuje się również u osób ekspozowanych na działanie alkoholu etylowego w połączeniu z inhibitorami ALDH, wśród których najbardziej znany jest disulfiram. Tak więc w kontekście podanych tutaj informacji oczywistym jest, że zażywanie GTN w połączeniu z etanolem także może prowadzić do nagromadzenia etanolu, co określamy jako zespół disulfiramopodobny (ang. *disulfiram-like reaction*).

Historia GTN jako leku stosowanego w terapii pacjentów z chorobą niedokrwienną serca liczy już blisko 140 lat (Murad, 1999). Obecnie, pomimo pojawienia się nowych generacji leków stosowanych w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych, GTN cieszy się wciąż nie słabnącą popularnością wśród pacjentów i lekarzy, ponieważ wielu specjalistów twierdzi, iż jest ona jednym z najlepszych leków stosowanych w łagodzeniu objawów choroby

niedokrwiennej serca. Podjęzykowe przyjęcie GTN podczas bólu dławicowego prowadzi do jego ustąpienia w ciągu 5 do 10 minut u osób ze stabilną chorobą wieńcową. Warunkiem koniecznym do terapeutycznego działania GTN jest jej redukcyjna biodegradacja prowadząca do utworzenia tlenku azotu (NO). NO jest aktywatorem cytozolowej cyklazy guanylowej (EC 4.6.1.2), enzymu katalizującego reakcję:



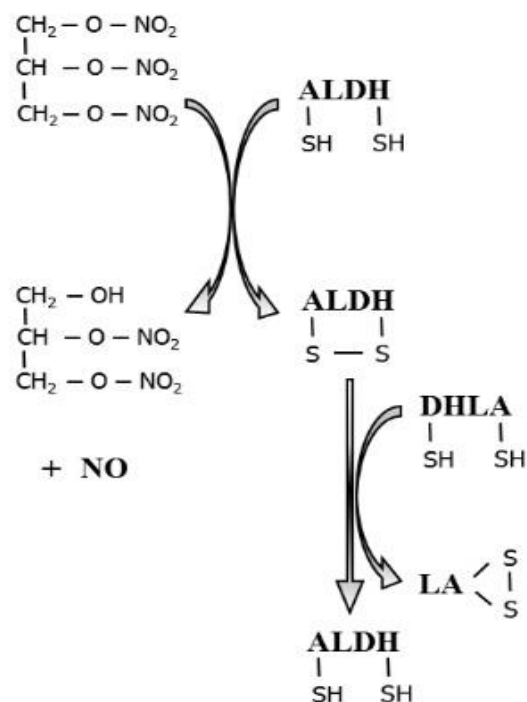
cGMP jako przekaznik II rzędu zapoczątkowuje kaskadę następujących po sobie reakcji, obejmujących aktywację kinazy białkowej G (PKG) (EC 2.7.11.1). Napięcie mięśni gładkich jest spowodowane przez fosforylację łańcucha lekkiego miozyny. Proces ten znajduje się pod kontrolą mechanizmu regulacyjnego zależnego od białka RhoA, które posiada aktywność kinazy fosforylującej łańcuchy lekkie miozyny. NO za pośrednictwem PKG prowadzi do ufosforylowania RhoA, powodując w ten sposób utratę jego aktywności. Ostatecznym wynikiem działania NO jest więc brak fosforylacji łańcucha lekkiego miozyny, a co za tym idzie - rozkurcz mięśni gładkich naczyń krwionośnych i spadek ciśnienia krwi (Kłopotka i Barańska, 2005; Pomorski, 2009; Ścibor i Czeżot, 2005; Zbrojkiewicz i Śliwiński, 2016).



Rys. 5. Mechanizm działania NO prowadzący do braku fosforylacji łańcuchów lekkich miozyny i w konsekwencji relaksacji mięśni gładkich i spadku ciśnienia krwi.

Nie wszystkie jednak aspekty związane z biologicznymi właściwościami GTN są już wyjaśnione. Między innymi nie jest znany mechanizm, poprzez który GTN ulega biodegradacji do farmakologicznie aktywnego NO. Ponadto swoistym fenomenem jest tu pojawianie się tolerancji na GTN, którą definiujemy jako stan zmniejszonej wrażliwości na GTN. Manifestuje się to przede wszystkim brakiem spadku ciśnienia krwi pomimo obecności leku. Warto przypomnieć, że pierwsza praca opisująca zjawisko tolerancji na GTN pochodzi już z roku 1898 (Laws, 1898). Prowadzone na początku XXI wieku badania sugerują, że enzymem odpowiedzialnym zarówno za biodegradację GTN do farmakologicznie aktywnego NO, jak i za pojawianie się zjawiska tolerancji odpowiedzialna jest ALDH-2. Udowodniono mianowicie, że w reakcji tej GTN redukuje się do NO i 1,2-diazotanu glicerolu, a powstający NO jednocześnie hamuje aktywność enzymu (Chen i wsp., 2002). Oznacza to, że spadek aktywności ALDH-2 ogranicza dalsze uwalnianie NO z GTN, co prowadzi do pojawienia się tolerancji manifestującej się obniżeniem wrażliwości organizmu na GTN. Ponieważ ALDH, a w szczególności jej izoforma mitochondrialna - ALDH-2 jest głównym enzymem zaangażowanym w utlenianie aldehydu octowego do kwasu octowego, wielu autorów uważa, że prostym wskaźnikiem potencjalnej tolerancji na GTN może być wywiad nietolerancji etanolu. Powszechnie wiadomo, że w populacjach azjatyckich występuje polimorfizm funkcjonalny (Glu504Lys) ALDH-2. Homozygoty Glu504 (ALDH2*1/1) wykazują prawidłową aktywność enzymatyczną, heterozygoty Glu504/Lys504 (ALDH2*1/2) wykazują około 6% aktywności enzymatycznej, a homozygoty Lys504 (ALDH2*2/2) cechuje całkowity brak aktywności wobec aldehydu octowego. Mutacja ta uważana za czynnik chroniący osoby pochodzenia orientального przed uzależnieniem od alkoholu występuje u 30-50% populacji (Chen i wsp., 2014). Badania Li i wsp. (2006) wykazały, że wśród osób z genotypem ALDH2*1/1 odsetek osób z prawidłową odpowiedzią na GTN wyniósł ponad 80%, podczas gdy u osób z genotypem (ALDH2*1/2) lub (ALDH2*2/2) prawidłowo reagowało na lek tylko 57% badanych.

Katalizowanej przez ALDH-2 reakcji redukcji GTN do NO i 1,2-diazotanu glicerolu towarzyszy utlenienie dwóch reszt cysteinowych i utworzenie wiązań disiarczkowych w centrum aktywnym enzymu (Chen i Stamler, 2006). Badania Wenzla i wsp.(2007) prowadzone w warunkach *in vitro* wskazują, że redukcja tych wiązań jest możliwa tylko w reakcji ze związkami ditiolowymi, takimi jak: ditiotreitól (DDT) oraz jedyny znany biologiczny ditiol - DHLA.



Rys. 6. Sugerowany mechanizm biotransformacji GTN do farmakologicznie aktywnego NO z udziałem ALDH. Rola DHLA w przywracaniu zahamowanej aktywności ALDH.

Badania Beretty i wsp. (2008) również wskazują na DHLA, jako związek zdolny w warunkach *in vitro* do częściowego przywracania zahamowanej przez GTN aktywności ALDH-2.

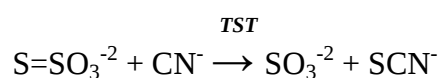
Natomiast wyniki prezentowane w pracy pt.: „*Inactivation of aldehyde dehydrogenase by nitroglycerin in the presence and absence of lipoic acid and dihydrolipoic acid*”. *Implications for the problem of differential effects of lipoic acid in vitro and in vivo*”, która wchodzi w skład prac stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej (Praca 1) wskazują, że w warunkach *in vitro* nie tylko DHLA, ale również LA częściowo przywraca zahamowaną przez GTN aktywność drożdżowej ALDH. Z drugiej strony oznaczona przeze mnie aktywność ALDH w wątrobie szczurów, które przez 8 dni otrzymywały GTN (w dawce dobowej 30 mg/kg wagi ciała; podskórnie) łącznie z LA (w dawce dobowej 100 mg/kg wagi ciała; dootrzewnowo) była na tym samym - niższym w stosunku do kontroli - poziomie, podobnie jak u szczurów które przez 8 dni otrzymywały tylko GTN. Oznacza to, że *in vivo* LA nie ma wpływu na hamujące aktywność ALDH działanie GTN w wątrobie szczura. Jest to tym bardziej zaskakujące, że wyniki badań Dudek i wsp. (2008) prowadzone w oparciu o pomiary skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi wskazują, że u szczurów które przez 8 dni otrzymywały GTN (w dawce dobowej 30 mg/kg wagi ciała; podskórnie) doszło do rozwoju tolerancji na GTN, natomiast u szczurów, które przez 8 dni otrzymywały oprócz

GTN również LA (dawka dobową 100 mg/kg masy ciała; dootrzewnowo) tolerancja nie rozwinęła się. Oznacza to, że w tym zwierzęcym modelu tolerancji na GTN podawanie LA skutecznie przeciwdziała tolerancji, ale - jak na to wskazują wyniki prezentowane w Pracy 1 - mechanizm tego zjawiska nie jest związany z aktywnością ALDH. Wyniki te wydają się więc zaprzeczać kluczowej roli ALDH w biotransformacji GTN i zjawisku tolerancji. Znajduje to potwierdzenie w badaniach innych autorów. Badania Chena i wsp. (2005) udowodniły, że u myszy knock-out, nie wykazujących ekspresji genu ALDH-2 (ALDH-2^{-/-}) nie dochodzi do rozwoju tolerancji na GTN. Warto też w tym kontekście przypomnieć tu - cytowane już wcześniej - badania Li i wsp. (2006). Autorzy zaobserwowali mianowicie, że u osób z nieaktywną formą enzymu (genotyp ALDH2*1/2 lub ALDH2*2/2) prawidłowo reagowało na GTN tylko 57% badanych, podczas gdy u osób z aktywną formą enzymu (genotyp ALDH2*1/1) odsetek ten wyniósł ponad 80%. Ale można przecież na te wyniki spojrzeć inaczej: aż 57% osób prawidłowo reagowało na GTN, pomimo deficytu aktywności ALDH i aż 20% reagowało nieprawidłowo, pomimo prawidłowej aktywności enzymu. Wydaje się, że tocząca się wśród naukowców dyskusja na temat roli ALDH-2 w procesie biotransformacji GTN i pojawianiu się tolerancji na GTN została bardzo trafnie spuentowana przez DiFabio i wsp. (2003), którzy stwierdzili że ALDH-2 wprawdzie jest enzymem biorącym udział w biotransformacji GTN, ale mechanizm tolerancji na GTN nie jest związany ze szlakiem biodegradacji GTN przez ALDH-2.

Tak więc wyniki prezentowane w Pracy 1 z jednej strony wskazują, że w warunkach *in vivo* LA nie ma wpływu na hamujące aktywność ALDH działanie GTN, a jednocześnie zwracają uwagę na fakt, iż efekty biologicznego działania LA w warunkach *in vitro* mogą różnić się od tych, które obserwujemy w warunkach *in vivo*. Ten ostatni aspekt również znajduje potwierdzenie w spostrzeżeniach innych autorów (Shay i wsp., 2008). Prezentowana praca jest więc skromnym głosem w toczącej się na ten temat dyskusji.

Wyniki prezentowane w pracy pt.: „*The effect of lipoic acid administration on the urinary excretion of thiocyanate in rats exposed to potassium cyanide*” (Praca 2) wskazują, że u szczurów które dootrzewnowo otrzymały cyjanek potasu (KCN; 1 mg/kg masy ciała) i LA (100 mg/kg masy ciała), poziom wydalonych w ciągu 24h z moczem rodanków był niemal dwukrotnie wyższy w porównaniu do grupy, która otrzymała tylko KCN. Oznacza to, że LA zwiększa szybkość detoksyfikacji KCN u szczurów. Głównym enzymem kojarzonym z reakcją utleniania cyjanków do rodanków jest TST. TST po raz pierwszy opisana przez Langa (1933) występuje w większości tkanek ssaków, płazów, ptaków, a także w komórkach roślin, owadów i niektórych mikroorganizmów. W organizmie człowieka TST występuje

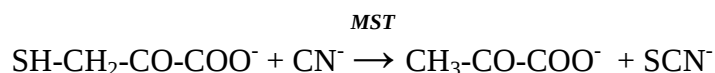
głównie w mitochondriach, a tkanką o największej jej aktywności są wątroba i nerki (Koj i wsp., 1975; Szczepkowski i Wood, 1967). TST katalizuje reakcje transferu siarki sulfanowej z różnych donorów na rozmaite akceptory. Rolę donora siarki sulfanowej w katalizowanych przez TST reakcjach pełnią m.in.: tiosiarczany, tiosulfoniany, organiczne i nieorganiczne nadsiarczki oraz trisiarczki - tiocystyna. Wśród akceptorów przenoszonej przez TST siarki sulfanowej wymienić należy przede wszystkim: cyjanek, siarczan (IV), sulfiniany, a także tiole (Iciek i Włodek, 2001; Toohey, 1989). Uproszczony zapis katalizowanego przez TST procesu przekształcenia toksycznego cyjanku, z użyciem zewnętrznego atomu siarki tiosiarczany, do znacznie mniej toksycznego rodanku pokazano poniżej:



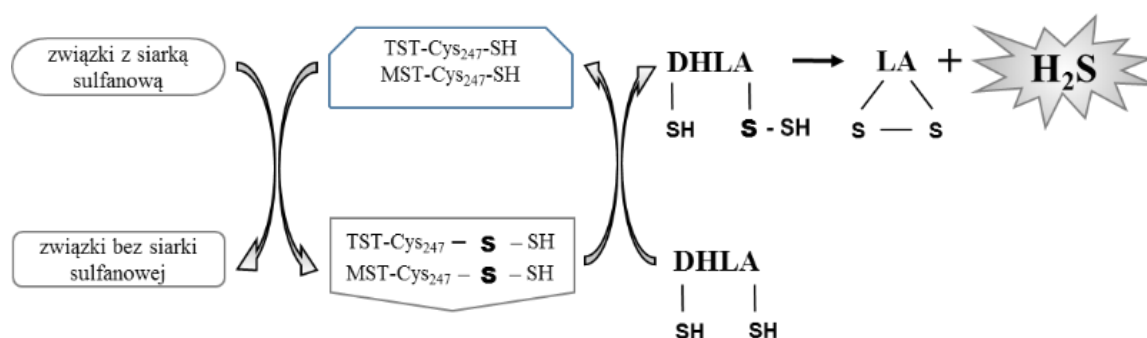
Już ponad 30 lat temu wykazano, że liczba obrotów TST uzyskanej z wątroby psa wynosi 20 000 moli/minutę. Oznacza to, że 20 000 moli cyjanku może zostać przekształconych w rodanek przez 1 cząsteczkę TST w ciągu 1 minuty (Westley, 1981). Tak więc wydaje się, że czynnikiem limitującym szybkość procesu utleniania cyjanków do rodanków jest poziom siarki sulfanowej, a nie aktywność enzymów katalizujących tę reakcję. Z drugiej strony prowadzone badania wykazały, że u myszy intoksykowanych cyjankiem skuteczniejszym antidotum są związki z siarką sulfanową podawane łącznie z TST w porównaniu do samych związków z siarką sulfanową bez TST (Frankenberg, 1980). Tak więc uzyskane przeze mnie wyniki pozwalają przypuszczać, że LA wpływa albo na wzrost poziomu siarki sulfanowej i/lub aktywności TST w tkankach szczura. Hipoteza ta jest spójna z badaniami opublikowanymi w 2008 roku, które wykazały, że dootrzewnowe podawanie szczurom LA w dawce 100 mg/kg masy ciała przez 8 dni prowadzi do znaczącego wzrostu poziomu siarki sulfanowej i aktywności TST w sercu, wątrobie i nerkach szczura (Bilska i wsp., 2008). Wpływ LA na poziom siarki sulfanowej i enzymów zaangażowanych w jej przemiany został dostrzeżony przez wielu autorów. Na zwierzęcym, indukowanym zymosanem modelu zapalenia otrzewnej wykazano, że podawanie zwierzętom LA prowadzi do znacznego wzrostu poziomu siarki sulfanowej w wysiękach pobranych z jamy otrzewnowej w porównaniu do grupy kontrolnej, nie otrzymującej LA (Zygmunt i wsp., 2013). Znaczący wzrost poziomu siarki sulfanowej i aktywności MST zaobserwowano w erytrocytach pacjentów poddanych ciągłej ambulatoryjnej dializie otrzewnowej z powodu schyłkowej niewydolności nerek, którzy przez 30 dni otrzymywali doustnie LA w dawce 600 mg na dobę (Iciek i wsp., 2014). Wykazano również istotny wzrost poziomu siarki sulfanowej w nerkach

szczurów, które otrzymały LA dootrzewnowo, w dawce całkowitej 100 mg/kg masy ciała, w dwóch dawkach podzielonych po 50 mg/kg masy ciała i które były uśmiercane po 90 minutach od podania drugiej dawki LA (Iciek i wsp., 2011). W analogicznych eksperymentach wykazano, że LA podnosi poziom siarki sulfanowej w sercu szczura (Sokołowska i wsp., 2014) oraz aktywność TST w szczurzej wątrobie (Sokołowska i wsp., 2011).

Prezentowane do tej pory rezultaty rodzą więc kolejne pytanie, a mianowicie czy LA „tylko” bierze udział w przemianach związków siarki, czy być może sam jest źródłem siarki sulfanowej w tkankach zwierząt? Wyniki przedstawione w pracy pt.: „*Lipoic Acid as a Possible Pharmacological Source of Hydrogen Sulfide/Sulfane Sulfur*”, która wchodzi w skład prac stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej (Praca 3) wskazują, że zarówno H_2S , jak i siarka sulfanowa są wytwarzane z LA nieenzymatycznie w obecności światła środowiskowego. Natomiast badania przeprowadzone z udziałem homogenatów szczurzej wątroby i nerki wskazują, że pod wpływem LA i DHLA poziom siarki sulfanowej w tych homogenatach jest niższy, a poziom H_2S wyższy w porównaniu do tkanek kontrolnych, inkubowanych bez LA i DHLA. Oznacza to, że w tych warunkach DHLA pełni rolę „tylko” reduktora uwalniającego H_2S z endogennej puli - obecnych w tkankach - związków siarki sulfanowej, sam natomiast nie uwalnia siarki sulfanowej. Znajduje to potwierdzenie w badaniach innych autorów. Już w latach sześćdziesiątych XX wieku wykazano bowiem, że DHLA jest akceptorem siarki sulfanowej pobieranej przez TST z tiosiarczanu w warunkach *in vitro*, bez udziału komórek organizmów żywych. W procesie tym tworzy się przejściowo wodoronadsiarczki DHLA, z którego siarka uwalnia się w postaci H_2S i powstaje LA (Villarejo i Westley, 1963; Volini i Westley, 1966). Warto w tym miejscu zauważyć, że TST i MST są enzymami ewolucyjnie pokrewnymi (Nagahara i wsp., 1995). Jak wiadomo fizjologicznym donorem siarki sulfanowej dla MST jest merkaptopirogronian. Siarka pobrana z merkaptopirogronianu jest przenoszona przez MST na takie akceptory jak: cyjanki, sulfoniany i 2-merkptoetanol, co prowadzi do powstania pirogronianu i odpowiednio: rodanków, tiosulfonianów i/lub tiosiarczanów oraz nadsiarczków merkptoetanolu (Nagahara i wsp., 1999.; Nagahara i wsp. 2004). Tak więc, jak już wcześniej wspomniano jedną z fizjologicznych funkcji MST jest - podobnie jak w przypadku TST - udział w reakcjach detoksyfikacji cyjanków, to znaczy przekształcenie toksycznego cyjanku do znacznie mniej toksycznego rodanku.



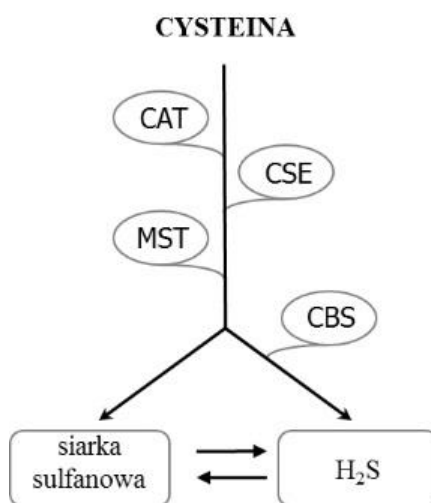
O ewolucyjnym pokrewieństwie TST i MST świadczą nie tylko zbliżone właściwości fizykochemiczne i katalityczne obu białek, ale również podobna struktura centrum aktywnego. Tak więc podczas transferu siarki sulfanowej zarówno przez TST, jak i MST dochodzi przejściowo do utworzenia wodoronadszarczku z grupą -SH reszty cysteiny-247, znajdującej się w centrum aktywnym obu enzymów. Badania Mikami i wsp. (2011) przeprowadzone w izolowanych mózgach myszy wykazały, że MST - w analogiczny sposób jak to udowodniono wcześniej dla TST - uwalnia H₂S w obecności DHLA, jako akceptora siarki sulfanowej.



Rys.7. Mechanizm uwalniania H₂S z centrum aktywnego TST i MST w obecności DHLA.

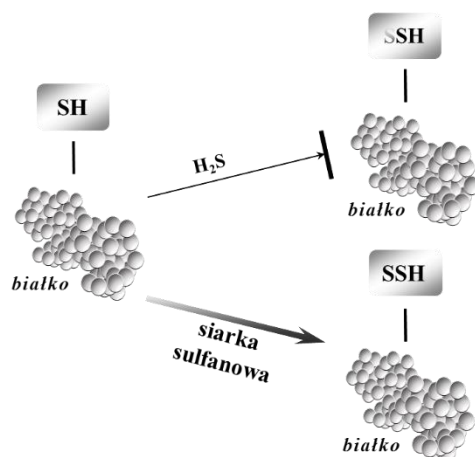
Siarka sulfanowa i H₂S należą do tzw. reaktywnych form siarki (RFS), które powstają w komórkach ssaków w reakcjach desulfuracji cysteiny, katalizowanych głównie przez MST, cystationazę (EC 4.4.1.1; γ -liaza cystationiny; CSE) i β -syntazę cystationiny (EC 4.2.1.22; CBS). Kolejna siarkotransferaza, jaką jest TST nie bierze natomiast bezpośredniego udziału w tworzeniu RFS, ale jest enzymem odpowiedzialnym za ich transport (Iciek i wsp., 2016, Iciek i Włodek, 2001, Kimura, 2011). Aminotransferaza cysteinowa (EC 2.6.1.3; CAT) usuwając grupę aminową z cysteiny prowadzi do powstania kwasu 3-merkaptopirogronowego, będącego substratem dla MST. Obecnie coraz częściej wskazuje się na wzajemne relacje pomiędzy istniejącymi depozytami siarki sulfanowej w komórkach, a produkowanym endogennie H₂S. Tak więc siarka sulfanowa, szczególnie w postaci wodoronadszarczków jest formą magazynowania i transportu H₂S, skąd - w zależności od potrzeb komórki - może być w obecności reduktorów z powrotem uwalniana jako H₂S (Iciek i wsp., 2016, Kimura, 2011). W świetle powyżej prezentowanych informacji widać ponad

wszelką wątpliwość, że rolę takiego fizjologicznego reduktora uwalniającego H_2S ze związków z siarką sulfanową może pełnić DHLA.



Rys. 8. Uproszczony mechanizm syntezy RFS - siarki sulfanowej i H_2S . Siarka sulfanowa, jest formą magazynowania i transportu H_2S , skąd - w zależności od potrzeb komórki - może być z powrotem uwalniana jako H_2S .

RFS poprzez sulfhydrację grup $-\text{SH}$ w białkach przede wszystkim enzymatycznych i receptorowych mogą spełniać w komórkach naturalne funkcje regulacyjne, a wysoki potencjał aktywności RFS i relatywnie krótki, kilkuminutowy okres ich półtrwania nadają im cechy regulatora o dużej precyzji działania (Bełtowski, 2004; Łowicka i Bełtowski, 2007; Włodek, 2003; Wood, 1987). Przyjmuje się, że zachodząca w warunkach fizjologicznych S-sulfhydracja uważana za jedną z potranslacyjnych modyfikacji białek jest bardziej rozpowszechniona niż inne modyfikacje kowalencyjne grup $-\text{SH}$ (np. S-nitrozylacja) (Iciek i wsp., 2016; Iciek i wsp., 2017). Najnowsze badania sugerują, że to raczej siarka sulfanowa, a nie sam H_2S jest cząsteczką sygnałową i odpowiada za obserwowane działanie biologiczne RFS (Toohey, 2011).



Rys. 9. W procesach sulfhydracji białek bierze udział głównie siarka sulfanowa, a nie sam H_2S .

Wyniki prezentowane w Pracy 3 nie potwierdziły naszej hipotezy, że LA sam może być źródłem siarki sulfanowej i H_2S dla komórek organizmu zwierzęcego. Ale jest to dopiero początek badań - zamierzamy je kontynuować z użyciem innych modeli i technik eksperymentalnych. Jest bowiem bardzo prawdopodobne, że w komórkach ssaków znajduje się enzym o aktywności desulfurazy, zdolny do rozrywania wiązania C-S. Do tej pory aktywność takich enzymów potwierdzono w procesach przebiegających jedynie w komórkach bakteryjnych (Mihara i Esaki, 2002) i roślinnych (Papenbrock i wsp., 2011). Zdaniem Tooheya obecna w tkankach zwierząt CBS, katalizująca reakcję syntezy cystationiny z cysteiny i homocysteiny, również ma zdolność do katalizowania procesu desulfuracji cysteiny, prowadzącego do powstania seryny i H_2S (Toohey, 2011). Wykazanie desulfuracyjnej aktywności CBS w stosunku do LA/DHLA wskazywałoby na możliwość bezpośredniego uwalniania siarki sulfanowej/ H_2S z LA i/lub powstającego z niego w warunkach *in vivo* DHLA. Tłumaczyłoby to mechanizm wpływu LA na detoksyfikację cyjanków, co zostało zaprezentowane w Pracy 2. Uzyskane w tym eksperymencie wyniki pozwalają bowiem przypuszczać, że pod wpływem LA zwiększa się w organizmie szczura poziom siarki sulfanowej. Sugeruje to, że LA albo aktywuje enzymy biorące udział w powstawaniu RFS albo sam jest ich donorem.

Tak więc, pomimo potwierdzonego licznymi badaniami potencjału terapeutycznego LA, mechanizm jego działania ciągle jeszcze wymaga badań.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że badanie mechanizmów biologicznej aktywności - pochodzącego ze źródeł zewnętrznych - LA stanowi dla badacza duże wyzwanie. Jednym z problemów wymagających w mojej opinii lepszego rozpoznania jest stereoselektywność enancjomerów LA w procesach biologicznych. Naturalnie występujący LA posiada

konfigurację R i jest prawoskrętny. Natomiast w preparatach leczniczych zarejestrowanych i dopuszczonych do obrotu substancją farmakologicznie czynną jest mieszanina racemiczna LA. Wiadomo powszechnie, że enancjomery tego samego leku mogą mieć (i często mają) zupełnie odrębne właściwości pod względem farmakokinetycznym, farmakodynamicznym czy profilu działań niepożądanych. Udokumentowano między innymi, że dehydrogenaza dihydroliponianowa kilkanaście razy szybciej redukuje R(+)LA niż S(-)LA do odpowiednich enancjomerów DHLA (Pick i wsp., 1995). Takich różnic może być więcej i z punktu widzenia farmakologii LA może okazać się, że są one istotne. Interesującym i wciąż w niewielkim stopniu rozpoznany problem jest tu również biologiczna aktywność metabolitów LA, spośród których najistotniejszym wydaje się być DHLA, a także produkty S-metylacji i/lub β -oksydacji LA: kwas 6,8-bismetylotiooktanowy, kwas 4,6-bismetylotioheksanowy i kwas bisnorliponowy (bisnor-LA) oraz kwas 2,4-bismetylotiobutanowy i kwas tetranorliponowy (tetranor-LA) (Schupke i wsp., 2001; Teichert i wsp., 2003). Powszechnie wiadomo, że w przypadku wielu leków powstające metabolity mogą być farmakologicznie nieaktywne lub mogą tworzyć związki o innym działaniu w stosunku do cząsteczki macierzystej. W przeprowadzonych *in silico* badaniach wykazano, że właściwości oksydacyjno-redukcyjne układów: bisnor-LA/bisnor-DHLA oraz tetranor-LA/tetranor-DHLA są porównywalne z analogicznymi właściwościami układu LA/DHLA (Szela $\acute$ g i wsp., 2012). Kwiecień i wsp. (2013) wykazali, że wartość LD₅₀ dla kwasu bismetylotiobutanowego przy dootrzewnowym podaniu u myszy wynosi ponad 400 mg/kg masy ciała, podczas gdy LD₅₀ dla LA wynosi w analogicznych warunkach 160 mg/kg masy ciała (Biewenga i wsp., 1997). W kontekście „tajemniczej natury” LA interesujące są również badania Dovinowej i wsp. (1999), w których wykazano, że w zależności od dawki efekty działania LA są przeciwstawne. Przy małych stężeniach LA autorzy obserwowali zwiększenie szybkości proliferacji komórek, co oznacza że LA działał tu jak czynnik wzrostowy. Przy stężeniach dużych LA wykazywał wyraźne działanie antyproliferacyjne.

Na „Janusowe oblicze” LA wskazują też - prezentowane w Pracy 1 - wyniki naszych badań, pokazujące iż efekty biologicznego działania LA w warunkach *in vitro* różnią się od tych, które zaobserwowano w warunkach *in vivo*. Tym niemniej pomimo wielu pytań, na które nie udało się znaleźć odpowiedzi, wyniki badań opublikowane w Pracy 2 i 3 jednoznacznie wskazują, że jednym z mechanizmów biologicznej aktywności LA jest jego udział w metabolicznych przemianach RFS. Jest to spostrzeżenie istotne, ponieważ udokumentowane wielokierunkowe działanie regulatorowe siarki sulfanowej i H₂S, manifestujące się poprzez zmianę aktywności wielu białek enzymatycznych i receptorowych

może jednocześnie tłumaczyć skuteczność podawania LA w tak wielu różnych, często odległych stanach patologicznych.

WNIOSKI I PODSUMOWANIE

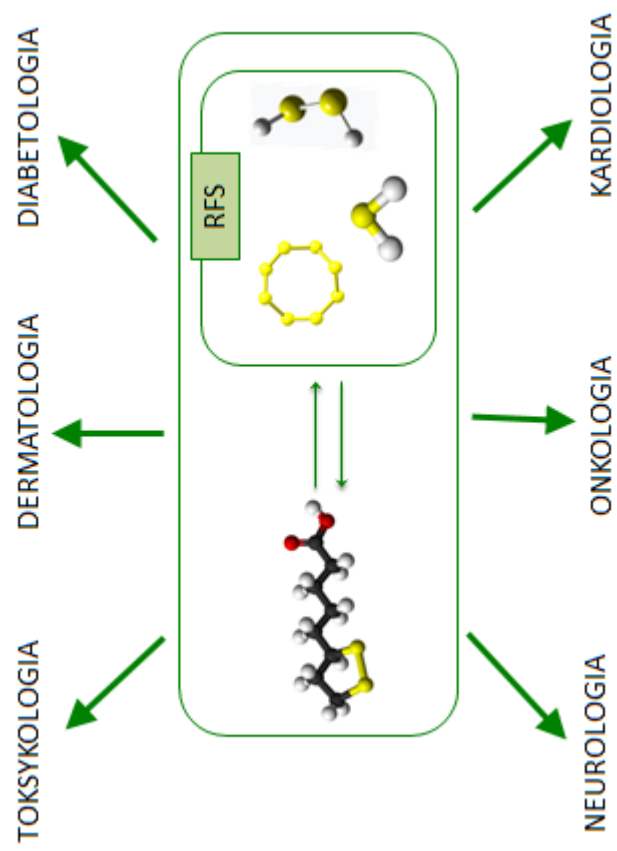
Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że LA:

- wykazuje zróżnicowany wpływ na stopień inaktywacji ALDH przez GTN w warunkach *in vivo* i *in vitro*;
- zwiększa szybkość detoksyfikacji cyjanku u szczurów;
- w warunkach *in vitro*, bez udziału enzymów uwalnia H₂S i siarkę sulfanową;
- w warunkach *in vitro* z udziałem enzymów obecnych w homogenatach nerki i wątroby szczura obniża poziom siarki sulfanowej i podnosi poziom H₂S, co wskazuje że DHLA - utworzony w wyniku enzymatycznej redukcji LA - uwalnia w tych warunkach H₂S zmagazynowany w tkankach w postaci siarki sulfanowej.

Uzyskane w trakcie realizacji niniejszej rozprawy wyniki potwierdzają tezę, iż jedną z trudności w badaniach mechanizmów farmakologicznej aktywności LA jest to, że efekty działania tego związku w warunkach *in vitro* mogą różnić się od tych, które obserwuje się w warunkach *in vivo*.

Rezultaty prezentowanych badań prowadzą do jednoznacznej konkluzji, że jednym z mechanizmów biologicznej aktywności LA jest jego udział w metabolicznych przemianach reaktywnych form siarki, to znaczy siarki sulfanowej i H₂S.

Dalszych badań wymaga weryfikacja tezy, że w warunkach *in vivo* LA sam jest donorem siarki sulfanowej i/lub H₂S.



Rys.10. Potencjał terapeutyczny LA jest związany z przemianami siarki.

STRESZCZENIE

Kwas liponowy (LA) oraz jego zredukowana postać - kwas dihydroliponowy (DHLA) występują we wszystkich komórkach prokariotycznych i eukariotycznych. W organizmach ssaków układ LA/DHLA jest integralną częścią kompleksu enzymatycznego rozszczepiającego glicynę (GCS) oraz kompleksów wieloenzymatycznych, katalizujących oksydacyjną dekarboksylację α -ketokwasów (pirogronianu, α -ketoglutaranu, α -ketoadypinianu oraz α -ketokwasów rozgałęzionych). Początkowo LA ze względu na swoją rolę w procesach biochemicznych zaklasyfikowany został do grupy witamin B. Obecnie wiadomo, że - podobnie jak w komórkach roślinnych, czy bakteryjnych - jest on syntetyzowany również w organizmach zwierzęcych. Przebiegająca w mitochondriach synteza LA jest procesem wieloetapowym i wymaga udziału dwóch szlaków biochemicznych, to znaczy mitochondrialnego szlaku syntezy kwasów tłuszczowych typu II oraz syntezy centrów żelazowo-siarkowych. Drugim, oprócz syntezy *de novo*, źródłem LA w komórkach ludzi i zwierząt jest pokarm. Ponadto LA stał się obecnie bardzo popularnym składnikiem preparatów multiwitaminowych, suplementów diety, a nawet karmy dla zwierząt domowych. Związek ten jest również obecny w różnego rodzaju kosmetykach przeznaczonych do pielęgnacji skóry: maściach, kremach, balsamach itp. Przede wszystkim jednak LA jest zarejestrowanym, dopuszczonym do obrotu lekiem, dostępnym jedynie na przepisana przez lekarza receptę. Od kilku lat dożylnie podawany LA klasyfikuje się - w oparciu o procedury EBM (*ang. Evidence-Based Medicine*) - jako lek o udokumentowanym wpływie na mechanizmy patogenetyczne polineuropatii cukrzycowej.

Intensywnie prowadzone badania tak na poziomie podstawowym, jak i klinicznym wskazują, że LA może znaleźć zastosowanie również w leczeniu innych schorzeń, w tym kardiologicznych, neurologicznych, dermatologicznych, a nawet onkologicznych. Jednak mimo dużej ilości doniesień naukowych potwierdzających tak szeroką aktywność farmakologiczną LA mechanizm jego działania ciągle nie jest dobrze poznany. Dlatego celem prezentowanej pracy było poszerzenie wiedzy dotyczącej mechanizmów biologicznego działania LA, pochodzącego ze źródeł egzogennych.

W badaniach *in vivo* wykorzystano samce szczurów rasy Wistar. Do badań został użyty lek o nazwie Thiogamma, który jako substancję farmakologicznie aktywną zawiera racemat LA. W części badań *in vivo* użyty został również lek o nazwie Nitracor, który jako substancję farmakologicznie aktywną zawiera nitroglicerynę (GTN).

Wyniki prezentowane w pracy pt.: „*Inactivation of aldehyde dehydrogenase by nitroglycerin in the presence and absence of lipoic acid and dihydrolipoic acid*”. Implications for the problem of differential effects of lipoic acid in vitro and in vivo”, która wchodzi w skład prac stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej (Praca 1), wskazują że u szczurów, które przez 8 dni otrzymywały w iniekcji podskórnej GTN doszło do zahamowania aktywności dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) w wątrobie. W grupie szczurów, które przez 8 dni oprócz GTN otrzymywały w iniekcji dootrzewnowej również LA oznaczona aktywność ALDH była na tym samym - niższym w stosunku do kontroli - poziomie, podobnie jak u szczurów które przez 8 dni otrzymywały tylko GTN. Oznacza to, że *in vivo* LA nie miał wpływu na działanie GTN, hamujące aktywność ALDH w wątrobie szczura. Jednocześnie w badaniach *in vitro* z użyciem drożdżowej ALDH zarówno LA, jak DHLA częściowo przywracały zahamowaną przez GTN aktywność enzymu. Tak więc uzyskane wyniki prowadzą do wniosku, że efekty biologicznego działania LA w warunkach *in vitro* mogą różnić się od tych, które obserwujemy w warunkach *in vivo*. Fakt ten został już zauważony przez część badaczy, zajmujących się biologicznymi właściwościami LA. Prezentowana praca jest więc skromnym głosem w toczącej się na ten temat dyskusji.

Wyniki prezentowane w pracy pt.: „*The effect of lipoic acid administration on the urinary excretion of thiocyanate in rats exposed to potassium cyanide*”, która wchodzi w skład prac stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej (Praca 2) wskazują, że u szczurów które dootrzewnowo otrzymały cyjanek potasu i LA poziom wydalonych w ciągu 24h z moczem rodanków był niemal dwukrotnie wyższy w porównaniu do grupy, która otrzymała tylko KCN. Oznacza to, że LA zwiększa szybkość detoksyfikacji KCN u szczurów. Proces przekształcenia toksycznego cyjanku do znacznie mniej toksycznego rodanku jest katalizowany enzymatycznie przez siarkotransferazy i wymaga udziału siarki sulfanowej. Tak więc uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że LA wpływa na wzrost poziomu siarki sulfanowej i/lub aktywności siarkotransferaz w tkankach szczura.

Wyniki przedstawione w pracy pt.: „*Lipoic Acid as a Possible Pharmacological Source of Hydrogen Sulfide/Sulfane Sulfur*”, która wchodzi w skład prac stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej (Praca 3) wskazują, że siarka sulfanowa i H₂S są wytwarzane z LA nieenzymatycznie w obecności światła środowiskowego. Natomiast badania przeprowadzone z udziałem homogenatów szczurzej wątroby i nerki wskazują, że pod wpływem LA i DHLA poziom siarki sulfanowej w tych homogenatach jest niższy, a poziom H₂S wyższy w porównaniu do tkanek kontrolnych, inkubowanych bez LA i DHLA. Oznacza to, że w tych warunkach DHLA pełni rolę reduktora uwalniającego H₂S z endogennej puli -

obecnych w tkankach - związków siarki sulfanowej, sam natomiast jej nie uwalnia. Siarka sulfanowa i H_2S należą do tzw. reaktywnych form siarki (RFS), które powstają w komórkach ssaków w reakcjach desulfuracji cysteiny.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że badanie mechanizmów biologicznej aktywności - pochodzącego ze źródeł zewnętrznych - LA stanowi dla badacza duże wyzwanie. Uzyskane w trakcie realizacji niniejszej rozprawy wyniki potwierdzają tezę, iż jedną z trudności w badaniach mechanizmów farmakologicznej aktywności LA jest to, że efekty działania tego związku w warunkach *in vitro* mogą różnić się od tych, które obserwuje się w warunkach *in vivo*. Tym niemniej pomimo wielu pytań, na które nie udało się znaleźć odpowiedzi, wyniki prezentowanych tu badań jednoznacznie wskazują, że jednym z mechanizmów biologicznej aktywności LA jest jego udział w metabolicznych przemianach RFS. Jest to teza nowa, do tej pory w niewielkim stopniu podnoszona przez innych autorów. W mojej opinii wielokierunkowe działanie regulatorowe RFS manifestujące się poprzez zmianę aktywności wielu białek enzymatycznych i receptorowych może tłumaczyć skuteczność podawania LA w tak wielu różnych, często odległych stanach patologicznych.

Summary

Lipoic acid (LA) and its reduced form dihydrolipoic acid (DHLA) are present in all prokaryotic and eukaryotic cells. In mammals, LA/DHLA system is an integral part of the glycine cleavage system (GCS) and multienzymatic complexes catalyzing oxidative decarboxylation of α -ketoacids (pyruvate, α -ketoglutarate and α -ketoadipate and branched α -ketoacids). Initially, LA, based on its role in biochemical processes, was classified into the vitamin B complex. However, currently it is known that, like in plant and bacterial cells, it is synthesized also in animal cells. LA is synthesized in mitochondria through a multistage process which requires cooperation of two biochemical pathways, namely the mitochondrial pathway for fatty acid synthesis type II and iron-sulfur cluster synthesis pathway. Besides *de novo* synthesis, the diet is the second LA source for human and animal cells. Moreover, LA is now a very popular component of multivitamin preparations, dietary supplements and even pet food. It is also present in different cosmetic skin care products, ointments, creams, lotions, etc. However, most of all LA is a registered prescription drug authorized for marketing. Since several years, based on Evidence-Based Medicine (EBM) procedures, intravenous LA has been classified as a drug with proven efficacy in influencing pathogenic mechanisms of diabetic polyneuropathy.

Intensive both basic and clinical studies indicate that LA can be efficient in treating also other conditions, including cardiologic, neurological, dermatologic and even oncologic diseases. However, in spite of numerous scientific reports confirming such broad pharmacological activity profile of LA, its mechanism of action still is not well understood. Therefore, the aim of the present work was to broaden our knowledge on the biological mechanisms of action of LA from exogenous sources.

In vivo studies were performed on Wistar rats. LA for the studies derived from the drug Thiogamma containing LA racemate as a pharmacologically active substance. Some *in vivo* experiments were performed with the use of the drug Nitracor containing pharmacologically active nitroglycerin (GTN).

The results presented in the paper „*Inactivation of aldehyde dehydrogenase by nitroglycerin in the presence and absence of lipoic acid and dihydrolipoic acid*”. *Implications for the problem of differential effects of lipoic acid in vitro and in vivo*”, that belongs to the papers on which the thesis is based (Paper 1), demonstrated the inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in the liver of rats administered subcutaneously GTN for 8 days. In rats which, in addition to GTN, were given LA intraperitoneally, ALDH activity

was at the same level, i.e. reduced vs. control, as in rats treated with GTN alone for 8 days. It indicates that *in vivo* LA did not affect the inhibitory effect of GTN on ALDH activity in the rat liver. However, in *in vitro* studies with the use of yeast ALDH, both LA and DHLA partly restored ALDH activity inhibited by GTN. Therefore, the obtained results indicate that biological effects of LA *in vitro* can be different from those observed *in vivo*. This fact was already noted earlier by some researchers engaged in studies of biological properties of LA. The present work is a humble contribution to the ongoing discussion on this issue.

The results presented in the paper „*The effect of lipoic acid administration on the urinary excretion of thiocyanate in rats exposed to potassium cyanide*”, which also is appended to the collection of published papers within the thesis (Paper 2) indicate that in rats treated intraperitoneally with potassium cyanide and LA, the level of rhodanates excreted with 24-h urine was almost twice as high as in the KCN alone-treated group. It indicates that LA increases KCN detoxification rate in rats. The transformation process of toxic cyanide to much less toxic rhodanate is catalyzed by sulfurtransferases and requires sulfane sulfur. Thus, based on the obtained results it can be assumed that LA increases sulfane sulfur level and/or sulfurtransferase activities in rat tissues.

The results presented in the paper „*Lipoic Acid as a Possible Pharmacological Source of Hydrogen Sulfide/Sulfane Sulfur*” which is also attached as the basis of the present dissertation (Paper 3) indicate that sulfane sulfur and H₂S are formed from LA nonenzymatically in the presence of environmental light. On the other hand, experiments performed on homogenates of the rat liver and kidney demonstrate that in the presence of LA and DHLA, sulfane sulfur level in homogenates was reduced while H₂S level was elevated compared with control tissues incubated without LA and DHLA. It indicates that under those conditions, DHLA fulfilled the function of a reducer releasing H₂S from the endogenous pool of sulfane sulfur compounds present in tissues but it did not release sulfane sulfur itself. Sulfane sulfur and H₂S belong to the so-called reactive sulfur species (RSS) which are produced in mammalian tissues in cysteine desulfurization reactions.

In conclusion, it can be stated that studying the mechanisms of biological activity of LA from exogenous sources is quite a challenge for an investigator. The results obtained during preparation of this thesis confirm that one of the difficulties encountered in research into the mechanisms of pharmacological activity of LA is related to the fact that the effects of its action *in vitro* differ from those observed *in vivo*. Nevertheless, in spite of many questions which still remain unanswered, the results of the present studies unequivocally point to the involvement of LA in metabolic transformations of reactive sulfur species (RSS) as one of the

mechanisms of biological activity of LA. It is a new hypothesis seldom raised by other authors to date. In my opinion, multidirectional regulatory action of RSS manifested by alteration of activity of many enzymatic and receptor proteins can explain therapeutic efficacy of LA in so many different, often distant pathological states.

BIBLIOGRAFIA

1. Abe K.; Kimura H.: The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.*, **1996**, 16, 1066-1071.
2. Ayton S., Faux N.G., Bush A.I. & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: Ferritin levels in the cerebrospinal fluid predict Alzheimer's disease outcomes and are regulated by APOE. *Nat. Commun.*, **2015**, 6, 6760, doi:10.1038/ncomms7760.
3. Beitner H.: Randomized, placebo-controlled, double blind study on the clinical efficacy of a cream containing 5% α -lipoic acid related to photoageing of facial skin. *Br. J. Dermatol.*, **2003**, 149, 841-849.
4. Bełtowski J.: Siarkowodór jako biologicznie aktywny mediator w układzie krążenia. (Hydrogen sulfide as a biologically active mediator in the cardiovascular system). *Post. Hig.*, **2004**, 58, 285-291.
5. Beretta M., Sottler A., Schmidt K., Mayer B., Gorren A.C.: Partially irreversible inactivation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase by nitroglycerin. *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283, 30735-30744.
6. Berkson B.M.: A conservative triple antioxidant approach to the treatment of hepatitis C. *Med. Klin.*, **1999**, 94, 84-89.
7. Biewenga G.P., Haenen G.R., Bast A.: The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Vascul. Pharmacol.*, **1997**, 29, 315-331.
8. Bilska A., Dudek M., Iciek M., Kwiecień I., Sokołowska-Jeżewicz M., Filipek B., Włodek L.: Biological actions of lipoic acid associated with sulfane sulfur metabolism. *Pharmacol. Rep.*, **2008**, 60, 225-232.
9. Bilska A., Kryczyk A., Włodek L.: Różne oblicza biologicznej roli glutationu. (The different aspects of the biological role of glutathione). *Post. Hig.*, **2007**; 61, 438-453.
10. Chai Y.C., Ashraf S.S., Rokutan K., Johnston R.B., Thomas J. A.: S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1994a**, 310, 273-281.
11. Chai Y.C., Hendrich S., Thomas J.A.: Protein S-thiolation in hepatocytes stimulated by t-butyl hydroperoxide, menadione, and neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1994b**, 310, 264-272.
12. Chen C.H., Ferreira J.C.B., Gross E.R., Mochly-Rosen D.: Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol. Rev.*, **2014**, 94, 1-34.

13. Chen Z., Foster M.W., Zhang J., Mao L., Rockman H.A., Kawamoto T., Kitagawa K., Nakayama K.I., Hess D.T., Stamler J.S: An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, **2005**, 102, 12159-12164.
14. Chen Z., Stamler J. S.: Bioactivation of nitroglycerin by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Trends Cardiovasc. Med.*, **2006**, 16, 259-265.
15. Chen Z., Zhang J., Stamler J.S: Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, 99, 8306-8311.
16. Deng C., Sun Z., Tong G., Yi W., Ma L., Zhao B., Cheng L., Zhang J., Cao F., Yi D.: α -Lipoic acid reduces infarct size and preserves cardiac function in rat myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of PI3K/Akt/Nrf2 pathway. *PLoS ONE*, **2013**, 8, e58371.
17. Difabio J., Yanbi, J.I., Vasilio, V., Thatche, G.R.J., Bennet, B.M.: Role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitrate tolerance. *Mol. Pharmacol.*, **2003**, 64, 1109-1116.
18. Dovinova I., Novotny L., Rauko P., Kvasnicka P.: Combined effect of lipoic acid and doksorubicin in murine. *Neoplasma*, **1999**, 46, 237-241.
19. Dudek M., Bednarski M., Bilska A., Iciek M., Sokołowska-Jeżewicz M., Filipek B., Włodek L.: The role of lipoic acid in prevention of nitroglycerin tolerance. *Eur. J. Pharmacol.*, **2008**, 591, 203-210.
20. Dworacka M., Krzyżagórska E., Zielińska-Kuzemko M., Wesołowska A., Winiarska H.: Skuteczność kwasu α -liponowego w preparacie Neurolipon-MIP 600 w leczeniu neuropatii obwodowej u chorych na cukrzycę typu 2. (The efficacy of α -lipoic acid (Neurolipon-MIP 600) in the management of peripheral neuropathy in type 2 diabetic patients). *Prz. Kardiodiabetol.*, **2012**, 7, 36-43.
21. Dżumaga B.: Liponerv - nowe możliwości pomocy chorym z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi. (Liponerv - new possibilities for helping patients with mild cognitive impairment). *Psychiatr. Psychol. Klin.*, **2017**, 17, 72-78. doi: 10.15557/PiPK.2017.0008.
22. Frankenberg L.: Enzyme therapy in cyanide poisoning: effect of rhodanese and sulfur compounds. *Arch. Toxicol.*, **1980**, 45, 315-323.

23. Gorąca A., Cieśla W.: Ocena ochronnego działania kwasu liponowego w mózgu szczura w czasie stresu oksydacyjnego wywołanego lipopolisacharydem. (Estimation of protective effect of lipoic acid in the brain rats during lipopolysaccharide-induced oxidative stress). *Pol. Merk. Lek.*, **2008**, XXIV, 143, 419-421.
24. Gorąca A., Huk-Kolega H., Piechota A., Kleniewska P., Ciejka E., Skibska B.: Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol. Rep.*, **2011**, 63, 849-858.
25. Hayakawa K., Oizumi J.: Human serum lipoamidase. *Enzyme*, **1988**, 40, 30-36.
26. Hiltunen J.K., Autio K.J., Schonauer M.S., Kursu V.S., Dieckmann C.L., Kastaniotis A.J. Mitochondrial fatty acid synthesis and respiration. *BBA-Bioenergetics*, **2010**, 797, 1195-1202.
27. Iciek M., Bilska A., Lorenc-Koci E., Włodek L.B., Sokołowska M.M.: The effect of uremic toxin cyanate (OCN⁻) on anaerobic sulfur metabolism and prooxidative processes in the rat kidney: A protective role of lipoate. *Hum. Exp. Toxicol.*, **2011**, 30, 1601-1608.
28. Iciek M., Kowalczyk-Pachel D., Bilska-Wilkosz A., Kwiecień I., Górny M., Włodek L.: S-sulphydration as a cellular redox regulation. *Biosci. Rep.*, **2016**, 36, e00304.
29. Iciek M., Marcykiewicz B., Bilska-Wilkosz A., Sokołowska-Jeżewicz M., Kłapcińska J.: The effect of lipoate on anaerobic cysteine metabolism in erythrocytes of patients treated with peritoneal dialysis. *Pharmacol. Rep.*, **2014**, 66, 325-328.
30. Iciek M., Włodek L., Bilska-Wilkosz A., Górny M., Kowalczyk-Pachel D.: Biologiczna rola siarki sulfanowej i siarkowodoru/The biological role of sulfane sulfur and hydrogen sulfide. Abstracts p. 25-27/56-58. Konferencja naukowa pt.: Kwas liponowy - od biochemii do farmakologii i terapii/Lipoic acid - from biochemistry to pharmacology and therapy. Kraków **2017**. ISBN 978-83-946124-0-5.
31. Iciek M., Włodek L.: Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur. *Pol. J. Pharmacol.*, **2001**, 53, 215-225.
32. Kimura H.: Hydrogen sulfide: its production, release and functions. *Amino Acids*, **2011**, 41, 113-121.
33. Kłopocka W., Barańska J.: Rola białek z rodziny Rho w kontroli migracji komórek pełzających. (The role of Rho family proteins in controlling the migration of crawling cells). *Post. Bioch.*, **2005**, 51, 36-43.
34. Koj A., Frendo J., Wojtczak L.: Subcellular distribution and intramitochondrial localization of three sulfurtransferases in rat liver. *FEBS Lett.*, **1975**, 57, 42-46.

35. Kuban-Jankowska A., Górską-Ponikowska M., Woźniak M.: Lipoic Acid Decreases the Viability of Breast Cancer Cells and Activity of PTP1B and SHP2. *Anticancer Res.* **2017**, 37, 2893-2898.
36. Kwiecień B., Dudek M., Bilska-Wilkosz A., Knutelska J., Bednarski M., Kwiecień I., Zygmunt M., Iciek M., Sokołowska-Jeżewicz M., Sapa J., Włodek L.: In Vivo Anti-inflammatory Activity of Lipoic Acid Derivatives in Mice. ((Aktywność przeciwzapalna pochodnych kwasu liponowego w badaniach *in vivo* u myszy). *Post. Hig.*, **2013**, 67, 331-338.
37. Lang K.: Die Rhodanbildung im Tierkörper. *Biochem Z.*, **1933**, 259, 243-256.
38. Laws G.C.: The effect of nitroglycerine on those who manufacture it. *J. Am. Med. Assoc.*, **1898**, 31, 793-794.
39. Li Y., Zhang D., Jin W., Shao C., Yan P., Xu C., Sheng H., Liu Y., Yu J., Xie Y., Zhao Y., Lu D., Nebert D.W., Harrison D.C., Huang W., Jin L: Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) Glu504Lys polymorphism contributes to the variation in efficacy of sublingual nitroglycerin. *J. Clin. Invest.*, **2006**, 116, 506-511.
40. Liu J., Head E., Gharib A.M., Yuan W., Ingersoll R.T., Hagen T.M., Cotman C.W., Ames B.N.: Memory loss in old rats is associated with brain mitochondrial decay and RNA/DNA oxidation: partial reversal by feeding acetyl-L-carnitine and/or R- α -lipoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2002**, 99, 2356-2361.
41. Lodge J.K., Youn H.D., Handelman G.J.: Natural sources of lipoic acid: determination of lipoyllysine released from protease-digested tissues by high performance liquid chromatography incorporating electrochemical detection. *J. Appl. Nutr.*, **1997**, 49, 3-11.
42. Łowicka E., Bełtowski J.: Hydrogen sulfide (H₂S)-the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol. Rep.*, **2007**, 59, 4-24.
43. Malińska D., Winiarska K.: Kwas liponowy - charakterystyka i zastosowanie w terapii. (Lipoic acid: Characteristics and therapeutic application). *Post. Hig.*, **2005**, 59, 535-543.
44. Mallis R.J., Thomas J.A.: Effect of S-nitrosothiols on cellular glutathione and reactive protein sulfhydryls. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2003**, 383, 60-69;
45. McLachlan D.C., Kruck T.P.A., Kalow W., Andrews D.F., Dalton A.J., Bell M.Y., Smith W. L. Intramuscular desferrioxamine in patients with Alzheimer's disease. *Lancet*, **1991**, 337, 1304-1308.

46. Mihara H., Esaki N.: Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2002**, 60, 12-23.
47. Mikami Y., Shibuya N., Kimura Y., Nagahara N., Ogasawara Y., Kimura, H.: Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide. *Biochem. J.*, **2011**, 439, 479-485.
48. Müller C., Dunschede F., Koch E., Vollmar A.M., Kiemer A.K.: Alpha lipoic acid preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury of the rat liver via the PI3-kinase/Akt pathway. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **2003**, 285, G769-G778.
49. Murad F.: Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci. Rep.*, **1999**, 19, 133-154.
50. Nagahara N., Ito T., Minami M.: Mercaptopyruvate sulfurtransferase as a defense against cyanide toxication: molecular properties and mode of detoxication. *Histol. Histopathol.*, **1999**, 14, 1277-1286.
51. Nagahara N., Okazaki T., Nishino T.: Cytosolic mercaptopyruvate sulfurtransferase is evolutionarily related to mitochondrial rhodanese. Striking similarity in active site amino acid sequence and the increase in the mercaptopyruvate sulfurtransferase activity of rhodanese by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 16230-16235.
52. Nagahara N., Sawada N., Nakagawa T.: Affinity labeling of catalytic site, cysteine 247, in rat mercaptopyruvate sulfurtransferase by chloropyruvate as an analog of a substrate. *Biochemistry*, **2004**, 86, 723-729.
53. Pace G.W., Leaf C.D: The role of oxidative stress in HIV disease. *Free Radic Biol Med*, **1995**, 9, 523-528.
54. Packer L., Witt E.H., Tritschler H.J.: alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.*, **1995**, 19, 227-250.
55. Packer L: α -Lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF-kappa B signal transduction and protects oxidative injury. *Drug Metab. Rev.*, **1998**, 30, 245-275.
56. Papenbrock J., Guretzki S., Henne M.: Latest news about the sulfurtransferase protein family of higher plants. *Amino Acids*, **2011**, 41, 43-57.
57. Pauling L.: Orthomolecular psychiatry. Varying the concentrations of substances normally present in the human body may control mental disease. *Science*, **1968**, 160, 265-271.

58. Pick U., Haramaki N., Constantinescu A., Handelman G.J., Tritschler H.J., Packer L.: Glutathione reductase and lipoamide dehydrogenase have opposite stereospecificities for alpha-lipoic acid enantiomers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**, 206, 724-730.
59. Piotrowska A., Iżykowska I., Podhorska-Okołów M., Zabel M., Dzięgiel P. Budowa białek z rodziny NF- κ B i ich rola w procesie apoptozy. (The structure of NF- κ B family proteins and their role in apoptosis). *Post. Hig.*, **2008**, 62, 64-74.
60. Pomorski, P.: Regulacja migracji komórek przez jony wapnia. (Calcium regulation of cell migration). *Post. Bioch.*, **2009**, 55, 163-170.
61. Prieto-Hontoria P.L., Pérez-Matute P., Fernández-Galilea M., Martínez J.A., Moreno-Aliaga M.J. Effects of lipoic acid on AMPK and adiponectin in adipose tissue of low- and high-fat-fed rats. *Eur. J. Nutr.*, **2013**, 52, 779-787.
62. Reed L.J., DeBusk B.G., Gansalus I.C., Hornberger C.S: Crystalline α -lipoic acid: a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science*, **1951**, 114, 93-94.
63. Reed L.J.: From lipoic acid to multi-enzyme complexes. *Protein Sci.*, **1998**, 7, 220-224.
64. Schupke H., Hempel R., Peter G., Hermann R., Wessel K., Engel J., Kronbach T.: New metabolic pathways of alpha-lipoic acid. *Drug. Metab. Dispos.*, **2001**, 29, 855-862.
65. Shay K.P., Moreau R.F., Smith E.J., Smith A.R., Hagen T.M.: Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *BBA - General Subjects*, **2009**, 1790, 1149-1160.
66. Shay P.K., Moreau R.F., Smith E.J., Hagen T.M.: Is α -lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species in vivo? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity. *IUBMB Life*, **2008**, 60, 362-367.
67. Sieradzki J.: Cukrzyca. W: Interna Szczeklika 2015, Medycyna Praktyczna, Kraków **2015**, 1415-1462.
68. Skórka K., Giannopoulos K.: Budowa i funkcje jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF- κ B) oraz jego znaczenie w przewlekłej białaczce limfocytowej. (The structure and the role of NF- κ B proteins and their significance in chronic lymphocytic leukemia). *Acta Haematol. Pol.*, **2012**, 43, 54-62.

69. Smith A.R., Shenvi S.V., Widlansky M., Suh J.H., Hagen T.M.: Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, **2004**, 11, 1135-1146.
70. Sokołowska M., Kostański M., Lorenc-Koci E., Bilska A., Iciek M., Włodek L.: The effect of lipoic acid on cyanate toxicity in the rat heart. *Pharmacol. Rep.*, **2014**, 66, 87-92.
71. Sokołowska M., Niedzielska E., Iciek M., Bilska A., Lorenc-Koci E., Włodek, L.: The effect of the uremic toxin cyanate (CNO⁻) on anaerobic cysteine metabolism and oxidative processes in the rat liver: a protective effect of lipoate. *Toxicol. Mech. Meth.* **2011**, 21, 473-478.
72. Stehling O., Wilbrecht C., Lill R.: Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie*, **2014**, 100, 61-77.
73. Suh J.H., Moreau R., Heath S.H.D., Hagen T.M.: Dietary supplementation with (R)- α -lipoic acid reverses the age-related accumulation of iron and depletion of antioxidants in the rat cerebral cortex. *Redox Rep.*, **2005**, 10, 52-60.
74. Suzuki Y.J., Aggarwal B.B., Packer L.: Alpha-lipoic acid is a potent inhibitor of NF-kappa B activation in human T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1992**, 189, 1709-1715.
75. Szczepkowski T.W, Wood J.L: The cystathionase-rhodanese system. *Biochim. Biophys. Acta*, **1967**, 139, 469-478.
76. Szczyrba S., Kozera, G., Bieniaszewski, L., Nyka, W.M.: Neuropatia cukrzycowa - patogeneza, rozpoznawanie, zapobieganie, leczenie. (Diabetic neuropathy - pathogenesis, diagnostic methods, prevention and treatment). *Forum Med. Rodz.*, **2010**, 4, 339-355.
77. Szeląg M., Mikulski D., Molski M.: Quantum-chemical investigation of the structure and the antioxidant properties of α -lipoic acid and its metabolites. *J. Mol. Model.*, **2012**, 18, 2907-2916.
78. Ścibor D., Czeczot H.: Arginina - metabolizm i funkcje w układzie sercowo-naczyniowym. (Arginine - Metabolism and Functions in Cardiovascular System). *Adv. Clin. Exp. Med.*, **2005**, 5, 1041-1050.
79. Takaoka M., Kobayashi Y., Yuba M., Ohkita M., Matsumura Y.: Effects of alpha-lipoic acid on deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **2001**; 424, 121-129.

80. Teichert J., Hermann R., Ruus P., Preiss R.: Plasma Kinetics, Metabolism, and Urinary Excretion of Alpha-Lipoic Acid following Oral Administration in Healthy Volunteers. *J. Clin. Pharmacol.*, **2003**, 43, 1257-1267.
81. Toohey J.I.: Sulfur signaling: is the agent sulfide or sulfane? *Anal. Biochem.*, **2011**, 413, 1-7.
82. Toohey J.I.: Sulphane sulphur in biological systems: a possible regulatory role. *Biochem J.*, **1989**, 264, 625-632.
83. Towell J., Garthwaite T., Wang R.: Erythrocyte Aldehyde Dehydrogenase and Disulfiram-Like Side Effects of Hypoglycemics and Antianginals. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **1985**, 9, 438-442.
84. Villarejo M., Westley, J.: Mechanism of rhodanese catalysis of thiosulfate-lipoate oxidation-reduction. *J. Biol. Chem.*, **1963**, 238, 4016-4020.
85. Volini M., Westley J.: The Mechanism of the Rhodanese-catalyzed Thiosulfate-Lipoate Reaction. Kinetic Analysis. *J. Biol. Chem.*, **1966**, 241, 5168-5176.
86. Wenzel P., Hink U., Oelze M., Schuppan S., Schaeuble K., Schildknecht S., Ho K.K., Weiner H., Bachschmid M., Münzel T., Daiber A.: Role of reduced lipoic acid in the redox regulation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) activity Implications for mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance. *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 792-799.
87. Wenzel P., Schulz E., Gori T., Ostad M.A., Mäthner F., Schildknecht S., Göbel S., Oelze M., Stalleicken D., Warnholtz A., Münzel T., Daiber A.: Monitoring white blood cell mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: implications for nitrate therapy in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2009**, 330, 63-71.
88. Westley J.: Thiosulfate: Cyanide sulfurtransferase (Rhodanese). *Methods Enzymol.*, **1981**, 77, 285-291.
89. Włodek L., Iciek M.: S-tiolacja białek jako mechanizm antyoksydacyjny i regulacyjny. (Protein S-thiolation as an antioxidative and regulatory mechanism). *Post. Biochem.*, **2000**, 42, 77-83.
90. Włodek L.: Cysteina. W: Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii, red.: L. Włodek. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków **2003**, 35-70.
91. Wood J.L.: Sulfane sulfur. *Meth. Enzymol.*, **1987**, 143, 25-29.

92. Zbrojkiewicz M., Śliwiński L.: Cykliczny guanozynomonofosforan w regulacji czynności komórki. (Cyclic guanosine monophosphate in the regulation of the cell function). *Post. Hig.*, **2016**, 70, 1276-1285.
93. Zygmunt M., Dudek M., Bilska-Wilkosz A., Bednarski M., Mogilski S., Knutelska J., Sapa J.: Anti-inflammatory activity of lipoic acid in mice peritonitis model. *Acta Pol. Pharm.*, **2013**, 70, 899-904.