

Oporność wielolekowa związana z glutationem

Multidrug resistance associated with glutathione

Michał P. Budzik^{1,2}, Anna M. Badowska-Kozakiewicz¹

¹Zakład Biofizyki i Fizjologii Człowieka, Warszawski Uniwersytet Medyczny;
kierownik Zakładu: prof. dr hab. Jacek Przybylski

²Studenckie Towarzystwo Naukowe Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Przeгляд Menopauzalny 2013; 5: 399-403

Streszczenie

Jedną z głównych przyczyn niepowodzeń w terapii cytostaticznej nowotworów jest występowanie zjawiska oporności wielolekowej (*multidrug resistance* – MDR), które znacznie ogranicza skuteczność chemioterapii. Niektóre z nowotworów wykazują pierwotną oporność na stosowane cytostatyki, inne natomiast, początkowo wrażliwe, nabywają cechę lekooporności w trakcie stosowanej chemioterapii. Głównymi przyczynami MDR są mechanizmy tłumiące indukcję apoptozy komórki nowotworowej oraz zaburzające akumulację wewnątrzkomórkową leków cytostaticznych i ich metabolizm. Najwcześniej poznany mechanizm MDR jest nadekspresja genu *mdr-1* i związanej z nim glikoproteiny P (P-gp) pełniącej funkcję pompy błonowej, która może katalizować wypływ wielu strukturalnie niepowiązanych leków z komórek zmienionych nowotworowo. Innym z mechanizmów chroniących oporną na leczenie komórkę nowotworową przed zwiększającym się stężeniem cytostatyków w jej wnętrzu jest zwiększona zdolność do przekształcania leku w formy nietoksyczne. Zwiększona aktywność enzymów detoksykujących, m.in. transferaz glutationowych, peroksydazy glutationowej czy dysmutazy ponadtlenkowej, prowadzi do neutralizacji produktów powstających również w wyniku przemian metabolicznych leków.

Ostatnie wyniki badań nad rakiem jajnika dowodzą, że czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia tego nowotworu jest obecność i ekspresja polimorfizmów genu kodującego ludzką transferazę S-glutationu. Duże stężenie transferazy S-glutationu jest złym czynnikiem prognostycznym w raku jajnika, a także innych nowotworach, np. raku jelita grubego, niedrobnokomórkowym raku płuc, raku żołądka, przewlekłej białaczce limfatycznej i glejakach.

Słowa kluczowe: oporność wielolekowa, nowotwory, glikoproteina P, glutation, rak jajnika.

Summary

Multidrug resistance of cancer cells is one of the most serious barriers to success in cancer disease therapy. Multidrug resistance, i.e. the principal mechanism via which many cancers develop resistance to chemotherapy drugs, is a major factor in the failure of many forms of chemotherapy. The best known mechanism is often attributed to the function of drug transporter proteins in the plasma membrane, which actively remove drugs from neoplastic cells. Abnormal overexpression of these proteins is the most frequently described factor connected with resistance to cytostatics. Among cellular transporter proteins, glycoprotein P (P-gp) plays the most important role. An increased level of this protein is considered a poor prognostic factor in many tumors. Clinical significance of other multidrug resistance proteins remains the subject of intensive studies. Another mechanism to protect the refractory cancer cell against an increasing concentration of cytostatic agents inside the cell is the increased ability to convert the drug into a non-toxic form. An increased activity of detoxifying enzymes such as glutathione transferase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase leads to neutralization of the products formed by metabolism of drugs. Recent results of research on ovarian cancer have shown that the factor increasing the risk of this cancer is the presence and expression of the human gene polymorphisms of glutathione S-transferase. High concentrations of glutathione S-transferase is a poor prognostic factor in ovarian cancer and other cancers such as colorectal cancer, lung cancer, stomach cancer, chronic lymphocytic leukemia and gliomas.

Key words: multidrug resistance (MDR), neoplasms, glycoprotein-P, glutathione S-transferase, ovarian cancer.

Adres do korespondencji:

Anna M. Badowska-Kozakiewicz, Zakład Biofizyki i Fizjologii Człowieka, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chatubińskiego 5, 02-004 Warszawa, e-mail: abadowska@wum.edu.pl

Zjawisko oporności wielolekowej

Jedną z głównych przyczyn niepowodzeń w terapii cytostaticznej nowotworów jest występowanie zjawiska oporności wielolekowej (*multidrug resistance* – MDR), które znacznie ogranicza skuteczność chemioterapii. Można o nim mówić wówczas, gdy komórki poddawane działaniu jednego leku stają się na niego odporne oraz inne, zarówno strukturalnie, jak i funkcjonalnie podobne, ale także te zupełnie odmienne leki [1]. Niektóre z nowotworów wykazują pierwotną oporność na stosowane cytostatyki, inne natomiast, początkowo wrażliwe, nabywają cechę lekooporności w trakcie stosowanej chemioterapii [2]. Głównymi przyczynami MDR są mechanizmy tłumiące indukcję apoptozy komórki nowotworowej oraz zaburzające akumulację wewnątrzkomórkową leków cytostaticznych i ich metabolizm [3, 4]. Najwcześniej poznany mechanizm MDR jest nadekspresja genu *mdr-1* i związanej z nim glikoproteiny P (P-gp) pełniącej funkcję pompy błonowej, która może katalizować wypływ wielu strukturalnie niepowiązanych leków z komórek zmienionych nowotworowo.

Białko to należy do transporterów ABC (*ATP-binding cassettes*), które do pompowania substancji z wnętrza komórki, w tym leków chemioterapeutycznych, wykorzystują energię z hydrolizy adenozyntroójfosforanu (ATP). Wyniki ostatnich badań nad mechanizmami MDR wskazują nadmierną ekspresję P-gp jako główną przyczynę prowadzącą do transformacji nowotworowej oraz dowodzą, że zwiększona ekspresja P-gp źle rokuje w wielu rodzajach nowotworów [5, 6]. Glikoproteina P występuje jednak nie tylko w komórkach zmienionych przez proces nowotworowy, jej obecność wykazano także w prawidłowych komórkach narządów pełniących funkcje wydzielnicze: korze nadnerczy, wątrobie, nerkach, łożysku, trzustce, jelitach i komórkach wydzielniczych jajników oraz w tworzeniu bariery krew–mózg [7].

Fenotyp MDR może charakteryzować się również obecnością innych białek transbłonowych z nadrodziny ABC, do których zalicza się przede wszystkim białko oporności wielolekowej MRP1 (*multidrug resistance protein 1*) oraz białko oporności raka sutka BCRP (*breast cancer resistance protein*), które usuwa aktywnie z komórki: mitoksantron, deksorubicynę, daunorubicynę, metotreksat, SN-38 i topoteksan [8].

Do wykształcenia zjawiska MDR mogą przyczyniać się także: zwiększenie aktywności enzymów naprawy DNA, zmiana aktywności topoizomerazy I i II, zmniejszenie transportu leków do wnętrza komórki poprzez zmiany strukturalne błony komórkowej oraz brak aktywności prawidłowego białka p53, które w zdrowych komórkach hamuje nadekspresję genu *mdr-1* [9].

Innym z mechanizmów chroniących oporną na leczenie komórkę nowotworową przed zwiększającym się stężeniem cytostatyków w jej wnętrzu jest zwiększona zdolność do przekształcania leku w formy nietoksyczne

[10]. Zwiększona aktywność enzymów detoksykujących, m.in. transferaz glutationowych, peroksydazy glutationowej czy dysmutazy ponadtlenkowej, prowadzi do neutralizacji produktów powstających również w wyniku przemian metabolicznych leków [11].

Biologiczna rola glutationu

Glutation może występować w formie zredukowanej (GSH) oraz utlenionej (GSSG). Glutation zredukowany został po raz pierwszy opisany w 1888 r. przez de Rey-Pailhade'a [12]. Jest tripeptydem złożonym z glutaminianu, cysteiny i glicyny. Jest związkiem tiolowym występującym powszechnie w komórkach eukariotycznych, a także prokariotycznych. Biosynteza glutationu odbywa się w niemal każdym rodzaju komórek, choć najintensywniej zachodzi w hepatocytach i zależy głównie od obecności cysteiny. Związek ten słabo przechodzi przez błonę komórkową i w znikomym stopniu przekracza barierę krew–mózg [13]. Powstaje w cytosolu w dwustopniowej reakcji katalizowanej przez enzymy z grupy ligaz: syntetazę γ -glutamylcysteinyową [EC 6.3.2.2] oraz syntetazę glutationową [EC 6.3.2.3]. W pierwszym etapie powstaje γ -glutamylcysteina, druga reakcja polega na przyłączeniu glicyny do powstałego wcześniej dipeptydu. Na taki sposób syntezy tego związku wpływa fakt, iż nie następuje ona na matrycy mRNA [14]. Degradacja glutationu następuje w przestrzeni pozakomórkowej, również dwustopniowo, dzięki obecności γ -glutamylotransferazy [EC 2.3.2.2] i dipeptydazy cysteinyloglicynowej [EC 3.4.13.6]. Obecnie prowadzonych jest wiele badań dotyczących glutationu, któremu przypisuje się wiele funkcji na poziomie komórkowym. Osobliwą cechą cząsteczki jest nietypowe wiązanie peptydowe (izopeptydowe) pomiędzy glutaminianem a cysteiną, w którego tworzenie zaangażowana jest grupa γ -karboksylowa glutaminianu (a nie α -karboksylowa, jak to ma miejsce w typowych peptydach). Dzięki tej różnicy GSH jest odporny na działanie peptydaz hydrolizujących wiązania peptydowe. Jedynym poznany enzymem katalizującym rozpad tego wiązania jest wspomniana γ -glutamylotransferaza występująca po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Ważną cechą GSH jest również występowanie bardzo reaktywnej grupy sulfhydrylowej cysteiny, która nadaje tej cząsteczce szereg funkcji biologicznych, przede wszystkim czyniąc ją głównym przeciwutleniaczem komórkowym.

Glutation odgrywa także rolę kofaktora enzymów antyoksydacyjnych oraz uczestniczy w odtwarzaniu uszkodzonych białek, fosfolipidów błon komórkowych oraz DNA [15]. W typowej komórce występuje w dużych stężeniach wynoszących ok. 10 mM w cytoplazmie, mitochondriach i jądrze komórkowym, natomiast najmniejsze stężenia wynoszące tylko 2 mM osiąga w siateczce śródplazmatycznej [16, 17]. Wszyscy badacze są zgodni, że forma zredukowana stanowi 95–99% puli całego glu-

tationu w komórce [18]. Glutation w formie zredukowanej jest związkem rozpuszczalnym zarówno w wodzie, jak i tłuszczach, co umożliwia mu szeroki zakres działania.

Forma utleniona przyjmuje postać dwóch cząsteczek glutationu połączonych mostkiem disiarczkowym wytworzonym pomiędzy wspomnianymi wcześniej grupami sulfhydrylowymi cystein. Powstaje na skutek działania czynników szkodliwych, toksycznych, w tym również leków cytostatycznych. Zwiększony udział formy GSSG jest zatem przejawem poddawania komórki działaniu stresu oksydacyjnego. Stosunek stężeń postaci zredukowanej do utlenionej glutationu stanowi wyznacznik stanu oksydacyjno-redukcyjnego komórki i jest oznaczany symbolem R. W fizjologicznych warunkach w komórkach wątroby R wynosi 300–400, choć w przypadku poddawania komórek działaniu silnego stresu oksydacyjnego może spaść do wartości o wiele niższych, w skrajnych warunkach wynoszących nawet 2 [19]. W fazie rozwojowej młode komórki mają dużo zredukowanego glutationu, starzeniu się towarzyszy utlenianie, co powoduje zwiększenie stężenia formy utlenionej i znaczne obniżenie wartości współczynnika R [20]. Enzymem ściśle powiązany z przemianami glutationu w komórce jest ludzka transferaza S-glutatio-nowa [GST, EC 2.5.1.18] uczestnicząca w biotransformacji ksenobiotyków, metabolizmie leków oraz pełniąc funkcję ochronną dla lipidów i kwasów nukleinowych przed szkodliwym działaniem nadtlenu. Transferaza S-glutatio-nowa katalizuje reakcję sprzęgania ksenobiotyków ze zredukowanym glutationem. Powstałe w ten sposób metabolity są usuwane aktywnie z komórki, trafiają do krwi i są ostatecznie wydalane z moczem [21].

W niezmiennych nowotworowo komórkach GST jest zlokalizowana w cytoplazmie, natomiast zwiększoną ekspresję jej izozymu π – GST π , o lokalizacji jądrowej, wykryto w komórkach nowotworowych. Ludzka transferaza S-glutatio-nowa π uważana jest za jeden z markerów nowotworowych w raku szyjki macicy [22] i raku jajnika [23]. Jej duże stężenie w raku jajnika jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym. W tego rodzaju nowotworze często stosowanym cytostatykiem jest cisplatyna. Koordynuje ona z DNA, co skutkuje lokalnym zaburzeniem jego dwuniciowej helisy i w efekcie zaburzeniem replikacji DNA komórek nowotworowych [24]. Wykazano liniową zależność pomiędzy stężeniem glutationu a opornością na cisplatynę zarówno na liniach komórkowych raka jajnika, jak i w badaniach na biopatchach guzów od chorych na raka jajnika [25].

Szczególną cechą komórek nowotworowych jest zahamowanie procesu apoptozy. Ważną rolę w tym mechanizmie odgrywa zwiększone stężenie GSH stanowiące ochronę przed utlenianiem komórkowym prowadzącym pośrednio do śmierci komórki. Istotnym elementem zapobiegającym zniszczeniu komórki jest również aktywność białka Bcl-2 z rodziny o tej samej nazwie. Jego funkcją jest hamowanie uwalniania z mitochondriów cy-

tochromu c oraz czynnika indukującego apoptozę (*apoptosis inducing factor* – AIF). Czynniki te są odpowiedzialne za aktywację enzymów proteolitycznych z grupy kaspaz, których aktywność prowadzi do apoptozy [26].

Zmniejszenie stężenia GSH stwarza nadzieję na sprowadzenie komórek nowotworowych na drogę apoptozy. Dotychczasowe badania dowiodły jednak, że zmniejszenie jego stężenia nie powoduje apoptozy *in vitro* w liniach komórkowych raka jajnika, co wskazuje, że indukcja śmierci komórki zależy od znacznie bardziej skomplikowanych procesów [27].

Ocena aktywności glutationu w komórkach nowotworowych

Glutation jest składnikiem wielu enzymów, z których każdy odgrywa istotną rolę w systemie obronnym organizmu. Na szczególną uwagę zasługuje enzym – transferaza S-glutationu typu M1 (GSTM1), którego synteza jest kodowana przez określony gen. Co druga osoba dziedziczy dwie wadliwe kopie genu kodującego GSTM1, a ok. 25% przypadków nowotworów pęcherza moczowego można przypisać nieprawidłowemu funkcjonowaniu tego genu. W badaniach u mężczyzn chorych na nowotwór prostaty lub też ze stanem przedrakowym prostaty nieobecny jest prawie inny enzym zawierający glutation – S-transferaza glutationu typu P1. Zauważono również związek pomiędzy brakiem innych enzymów zawierających glutation a rozwojem raka piersi i płuc.

W wielu rodzajach nowotworów stwierdza się duże stężenie glutationu – czynnika, który decyduje o ich oporności na chemio- i radioterapię. Należy jednak wspomnieć, że komórki nowotworowe utraciły zdolność regulacji namnażania się i kontroli innych mechanizmów na poziomie komórki, w tym metabolizmu glutationu. Pod wpływem obecności dużej ilości prekursorów glutationu komórki nowotworowe utraciły zdolność jego wytwarzania. Jest to zjawisko hamowania zwrotnego charakterystyczne dla komórek nowotworowych. Stosując odpowiednie prekursory glutationu, można kontrolować stężenie glutationu na terenie komórek, czyli zwiększać stężenie glutationu w komórkach prawidłowych, a zmniejszać w komórkach nowotworowych. Zmniejszenie stężenia glutationu w komórkach nowotworowych wiąże się ze zwiększeniem ich wrażliwości na chemio- i radioterapię, a zwiększenie stężenia glutationu w komórkach niezmiennych nowotworowo zwiększa ich wytrzymałość na efekty uboczne takiego leczenia.

Przykładem jednego z najbardziej opornych na chemioterapię nowotworów jest rak nerki. W nowotworach wywodzących się z tego narządu wykształca się szereg czynników warunkujących MDR. Wykształcenie cech lekooporności jest tu łatwiejsze, gdyż komórki nerki są naturalnie przystosowane do oczyszczania organizmu ze szkodliwych substancji. Należy wspomnieć, że w prawidłowych komórkach występuje P-gp. Nowotwór

ten wykazuje oporność na cytostatyki już przy pierwszej ekspozycji, jest to tzw. oporność pierwotna – wewnętrzna [28]. W komórkach raka nerki wykazano pozytywną korelację między stężeniem GSH a opornością na cisplatynę, karboplatinę i doksorubicynę. Nie stwierdzono natomiast zależności między aktywnością GST a opornością na cisplatynę, doksorubicynę i winblastynę [29].

Ocena aktywności glutationu i związek z opornością wielolekową w raku jajnika

Rak jajnika jest nowotworem złośliwym wywodzącym się z komórek nabłonkowych. Występuje przeważnie u kobiet w okresie około- i pomenopauzalnym. Zapadalność na ten rodzaj nowotworu wynosi w Polsce 11/100 000 kobiet. Cechą szczególną tego nowotworu jest pierwotna wrażliwość na stosowane cytostatyki. Oporność na chemioterapię wykształca się jednak w nawrocie choroby i jest trudna do pokonania, towarzyszy jej również utrata zdolności indukowania apoptozy.

Ostatnie wyniki badań nad rakiem jajnika dowodzą, że czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia tego nowotworu jest obecność i ekspresja polimorfizmów genu kodującego ludzką transferazę S-glutationu (badano formy GSTM1, GSTT1 i GSTP1) [30]. Duże stężenie transferazy S-glutationu jest złym czynnikiem prognostycznym w raku jajnika, a także innych nowotworach, np. raku jelita grubego, niedrobnokomórkowym raku płuc, raku żołądka, przewlekłej białaczce limfatycznej i glejakach. W badaniach wykazano zależność pomiędzy stężeniem glutationu a opornością na cisplatynę zarówno na liniach komórkowych raka jajnika, jak i w badaniach na biopatach guzów od chorych na raka jajnika. Nadal trwają badania nad stosowaniem w raku jajnika substancji hamujących S-transferazę glutationu [25]. Istnieją jednak dowody na to, że forma enzymu kodowanego przez gen *GSTM1* nie wpływa na detoksykację czynników kancerogennych raka jajnika oraz nie ma związku z rozwinięciem oporności na chemioterapię w tym nowotworze [31]. Rozwojowi nowotworu można by zapobiec mając możliwość ścisłej regulacji zawartości GSH w komórkach jajnika. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych na szczurach wykazały, że w niezmiennych nowotworowo komórkach jajnika stężenie glutationu zmniejszyło podanie sulfoksyminy butioniny (BSO), a zastosowanie gonadotropiny prowadziło do jego zwiększenia. Nie wiadomo jednak, jak oddziaływałyby te substancje w ludzkich komórkach rakowych. Obecny stan wiedzy nie pozwala również na pełne określenie skutków ubocznych takiej regulacji stężenia GSH w komórkach.

Strategie przełamania oporności wielolekowej związanej z glutationem

Wiele badań potwierdza, że komórki nowotworowe cechuje większe stężenie zredukowanego glutationu

w porównaniu z komórkami prawidłowymi pochodzącymi z tych samych tkanek. Powoduje to intensywniejszą detoksykację cytostatyków celujących w komórki rakowe. Celem chemioterapii jest również uszkodzenie materiału genetycznego komórek nowotworowych – tu działanie GSH polega na stworzeniu wewnątrzkomórkowego środowiska umożliwiającego efektywniejszą naprawę powstających przez leki uszkodzeń DNA. Naturalnym następstwem tego zjawiska i szansą na lepsze efekty leczenia jest zatem próba zmniejszenia stężenia GSH w tych komórkach przy jednoczesnym podawaniu leków cytostatycznych. Można to osiągnąć poprzez zahamowanie syntezy glutationu lub przyspieszając jego degradację. Druga z możliwości jest jednak o tyle mniej korzystna, że i tak przeciążona nadmiernym metabolizmem komórka nowotworowa traciłaby dodatkową energię na wcześniejszą jego syntezę, dlatego najlepszym rozwiązaniem wydaje się inhibicja syntezy glutationu. Od dawna są znane specyficzne inhibitory syntetazy γ -lutamylocysteinylowej, której zahamowanie umożliwiłoby zmniejszenie stężenia GSH w komórkach rakowych. Należą do nich propionino- i butionino-sulfoksyminy oraz sulfoksymina metioniny [32]. Ważne jest skierowanie działania tych inhibitorów jedynie na komórki zajęte procesem nowotworowym. Stanowi to główną przeszkodę w stosowaniu tego rodzaju leczenia. Należy bowiem pamiętać, że w komórkach niezmiennych glutation pełni funkcje ochronne przed ksenobiotykami oraz możliwymi działaniami niepożądanymi innych metod leczenia stosowanych w terapii nowotworów.

Piśmiennictwo

1. Grzelakowska-Sztabert B. Oporność wielolekowa komórek nowotworowych – fakty i hipotezy. *Postępy Biochemii* 1989; 35: 513-41.
2. Lenart K, Szyda A, Kiełbasiński M. Kliniczne skutki oporności wielolekowej w nowotworach. *Onkol Prakt Klin* 2005; 1: 18-26.
3. Chybicka A, Sawicz-Birkowska K. *Onkologia i hematologia dziecięca*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008.
4. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
5. Yague E, Arance A, Kubitz L. Ability to acquire drug resistance arises early during the tumorigenesis process. *Cancer Res* 2007; 67: 1130-7.
6. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2008; 2: 48-58.
7. Sarokin D, Duś D. Rola P-gp i innych białek transportowych w oporności wielolekowej. *Nowotwory* 1999; 49: 576-84.
8. Thomas H, Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer Control* 2003; 10: 159-65.
9. Orzechowska-Juzwenko K. *Zarys chemioterapii nowotworów narządowych i układowych*. Volumed, Wrocław 2000.
10. Gruber BM. Udział czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w zjawisku oporności wielolekowej w wybranych komórkach ludzkich nowotworów wrażliwych i opornych na działanie cytostatyków. *Rozprawa habilitacyjna WUM, Warszawa* 2008.
11. Nowak R, Tarasiuk J. The inhibition of apoptosis in cancer cells resistant to anticancer drugs. *Postępy Biochemii* 2004; 50: 330-41.
12. Meister A. On the discovery of glutathione. *Trends Biochem Sci* 1988; 13: 185-8.
13. Lorenc E. *Glutation. Metabolizm i biologiczna rola w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN)*. W: Włodek L (red.). *Biotiole w warunkach fizjo-*

- logicznych, patologicznych i terapii. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2003.
14. Mister A, Andersen ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 711-60.
 15. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003; 333: 19-39.
 16. Bukowska B. Glutathione: biosynteza, czynniki indukujące oraz stężenie w wybranych jednostkach chorobowych. *Medycyna Pracy* 2004; 55: 501-9.
 17. Hwang C, Sinsky AJ, Lodish HF. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 1992; 257: 1496-502.
 18. Kamińska A, Kumański K. Alkohol a glutathione. *Kosmos – Problemy Nauk Biologicznych* 2012; 294: 105-20.
 19. Bliska A, Kryczyk A, Włodek L. Różne oblicza biologicznej roli glutathionu. *Postęp Hig Med Dosw* 2007; 61: 438-53.
 20. Puzanowska-Tarasiewicz H, Kuźmicka L, Tarasiewicz M. Wpływ reaktywnych form azotu i tlenu na organizm człowieka. *Pol Merk Lek* 2009; 27: 496-8.
 21. Gajewska B, Usarek E, Kaźmierczak B. Ekspresja izoenzymów transferazy S-glutationowej w płaskonabłonkowym raku języka i dna jamy ustnej. *Pol Merk Lek* 2007; 23: 196-9.
 22. Goto S, Ihara Y, Urata Y. Doxorubicin-induced DNA intercalation and scavenging by nuclear glutathione S-transferase pi. *FASEB J* 2001; 15: 2702-14.
 23. Henderson CJ, McLaren AW, Moffat GJ, et al. Pi-class glutathione S-transferase: regulation and function. *Chem Biol Interact* 1998; 24: 111-2.
 24. Malinowska K, Modranka R, Kędziora J. Leki przeciwnowotworowe stosowane w leczeniu oraz będące w fazie badań klinicznych. *Pol Merk Lek* 2007; 23: 165-9.
 25. Miedzińska-Maciejewska M, Wcisło G, Bodnar L. Modulacje oporności wielolekowej u chorych na raka jajnika. *Współczesna Onkol* 2004; 8: 457-65.
 26. Smolewski P, Grzybowiska O. Regulacja procesu apoptozy komórek w celach terapeutycznych – dotychczasowe doświadczenia i perspektywy rozwoju. *Acta Haematologica Polonica* 2002; 33: 393-401.
 27. Lopez SG, Luderer U. Effects of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1366-77.
 28. Badowska-Kozakiewicz AM. Zjawisko oporności wielolekowej w nowotworach – rola glikoproteiny P. *Życie Weterynaryjne* 2011; 86: 211-4.
 29. Szejnach J, Cieślak A. Molekularne mechanizmy chemooporności w raku nerki. *Współczesna Onkol* 2005; 9: 123-8.
 30. Oliveira C, Lourenço GJ, Sagarra RA. Polymorphisms of glutathione S-transferase Mu 1 (GSTM1), Theta 1 (GSTT1), and Pi 1 (GSTP1) genes and epithelial ovarian cancer risk. *Dis Markers* 2012; 33: 155-9.
 31. Lallas TA, McClain SK, Shahin MS. The glutathione S-transferase M1 genotype in ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 587-90.
 32. Griffith OW. Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem* 1982; 257: 13704-12.