

ROLA GLUTATIONU W OPORNOŚCI WIELOLEKOWEJ NOWOTWORÓW

ROLE OF GLUTATHIONE IN THE MULTIDRUG RESISTANCE IN CANCER

Ewa KARWICKA

Narodowy Instytut Leków, Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków, Warszawa

Streszczenie: Zjawisko oporności wielolekowej stanowi główną przeszkodę w skutecznej terapii chorób nowotworowych. Komórki nowotworowe wykorzystują szereg mechanizmów obronnych w celu przetrwania chemioterapii. Spośród poznanych mechanizmów oporności lekowej największe znaczenie ma detoksykacja leku przy udziale enzymów przeciwutleniających II fazy oraz aktywne usuwanie leku z komórki do środowiska zewnętrznego. Komórki lekooporne wykazywać mogą zmniejszoną wrażliwość na sygnały proapoptotyczne, a także charakteryzować się zmienioną dystrybucją wewnątrzkomórkową leku, przez co są bardziej odporne na działanie leków przeciwnowotworowych stosowanych w terapii. Udział glutationu w zjawisku oporności wielolekowej jest przedmiotem zainteresowania badaczy na całym świecie, jednakże zdefiniowanie znaczenia tego związku w poszczególnych procesach warunkujących oporność komórki na terapię wciąż pozostaje wyzwaniem. W niniejszej pracy omówiono rolę i właściwości glutationu oraz jego udział w zjawisku oporności wielolekowej komórek nowotworowych w świetle dotychczasowych doniesień literaturowych.

Słowa kluczowe: glutation, enzymy glutationozależne, transport, MRP, MDR, oporność wielolekowa, lekooporność nowotworów.

Summary: Multidrug resistance is the main problem in anticancer therapy. Cancer cells use many defense strategies in order to survive chemotherapy. Among known multidrug resistance mechanisms the most important are: drug detoxification inside the cell using II phase detoxifying enzymes and active transport of the drug to the extracellular environment. Cancer cells may be also less sensitive to proapoptotic signals and have different intracellular drug distribution, which makes them more resistant to anticancer drugs. Role of glutathione in multidrug resistance is the object of interest of many scientists, however, defining it's function in these processes still remains a challenge. In this paper, properties of glutathione and it's role in multidrug resistance in cancer cells were described.

Keywords: glutathione, multidrug resistance (MDR), multidrug resistance-related protein (MRP), cancer drug resistance.

1. WSTĘP

Pomimo znacznych postępów medycyny oraz zwiększającej się wiedzy na temat chorób nowotworowych, zjawisko oporności wielolekowej – MDR (ang. *multidrug resistance*) wciąż pozostaje główną przeszkodą uniemożliwiającą przeprowadzenie skutecznej terapii. Oporność wielolekowa, zarówno pierwotna – wrodzona, jak i nabyta – wykształcona po rozpoczęciu terapii, jest zjawiskiem uzależnionym od wielu czynników. Oporność wielolekowa wykorzystuje naturalne właściwości komórek w dostosowaniu do obrony przed terapią przeciwnowotworową. Te same funkcje biologiczne, korzystne dla prawidłowych komórek, w przypadku transformacji nowotworowej mogą przyczynić się do powstania oporności lekowej. Zjawisko to stanowi niejako stan metaboliczny komórek nowotworowych, wykorzystujących szereg mechanizmów obronnych w celu przetrwania chemioterapii. Spośród poznanych mechanizmów oporności lekowej największe znaczenie ma detoksykacja leku przy udziale enzymów przeciwutleniających II fazy oraz aktywne usuwanie leku z komórki do środowiska zewnętrznego. Synergiczne współdziałanie tych dwóch mechanizmów przyczynia się do powstania fenotypu MDR w odpowiedzi na działanie wielu chemioterapeutyków [35]. Komórki nowotworowe wykazują ponadto zmniejszoną wrażliwość na stres oksydacyjny i sygnały proapoptotyczne, przez co są bardziej odporne na działanie leków przeciwnowotworowych stosowanych w terapii.

Udział glutationu w zjawisku oporności wielolekowej jest przedmiotem zainteresowania badaczy na całym świecie, jednakże określenie roli tego związku w poszczególnych procesach warunkujących oporność komórki na terapię jest trudne. W niniejszej pracy omówiono podstawowe właściwości fizjologiczne glutationu oraz ich rolę w zjawisku oporności wielolekowej nowotworów na wybranych przykładach.

2. FIZJOLOGICZNE WŁAŚCIWOŚCI GLUTATIONU

Glutation, czyli γ -glutamylcysteinyloglicyna (γ -glu-cys-gly) jest aktywnym biologicznie tripeptydem tiolowym, występującym niemal we wszystkich komórkach prokariotycznych i eukariotycznych. Bierze on udział w podstawowych procesach fizjologicznych, takich jak: obrona przed utlenianiem, reakcje redoks, biosynteza DNA, białek i leukotrienów, a także procesy przewodnictwa nerwowego i neuromodulacji. Ponadto glutation odgrywa ważną rolę w regulacji aktywności szlaków metabolicznych oraz wzrostu i różnicowania komórek.

Szczególnością glutationu jest rozpuszczalność zarówno w wodzie, jak i w tłuszczach, co umożliwia szeroką dystrybucję w organizmie i szeroki zakres działania. Cechą charakterystyczną w strukturze cząsteczki jest występowanie nietypowego wiązania izopeptydowego pomiędzy resztami cysteiny i glutaminianu oraz obecność grupy tiolowej (-SH) należącej do reszty cysteiny, z którą bezpośrednio wiążą się biologiczne funkcje peptydu.

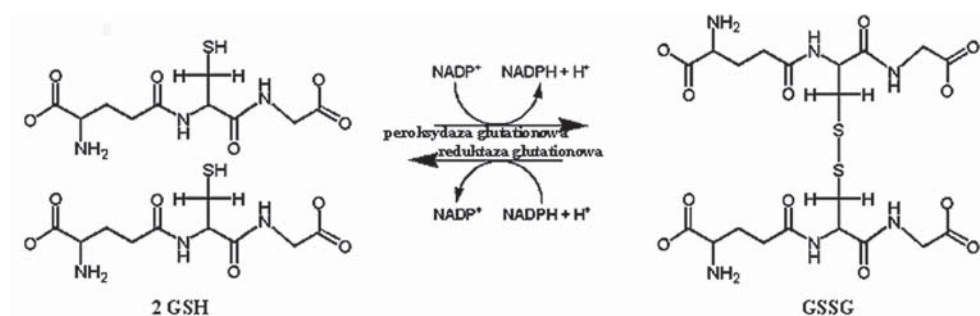
Glutation w komórce występuje w kilku postaciach: zredukowanej (GSH), utlenionej (GSSG), S-nitrozoglutationu (GSNO) oraz mieszanych disiarczków glutationu i białek.

Do utworzenia GSSG dochodzi w wyniku dwuelektronowej reakcji odwodowania grup tiolowych GSH (ryc. 1). Przemiana ta może zachodzić w drodze enzymatycznej z udziałem peroksydazy glutationowej, w obecności NADPH. Reaktywność cząsteczki GSH pozwala również na bezpośrednią, nieenzymatyczną redukcję utlenionych cząsteczek. W warunkach fizjologicznych przywrócenie GSSG do postaci zredukowanej następuje pod wpływem dihydroliponianu lub reduktazy glutationowej, przy udziale NADPH jako koenzymu.

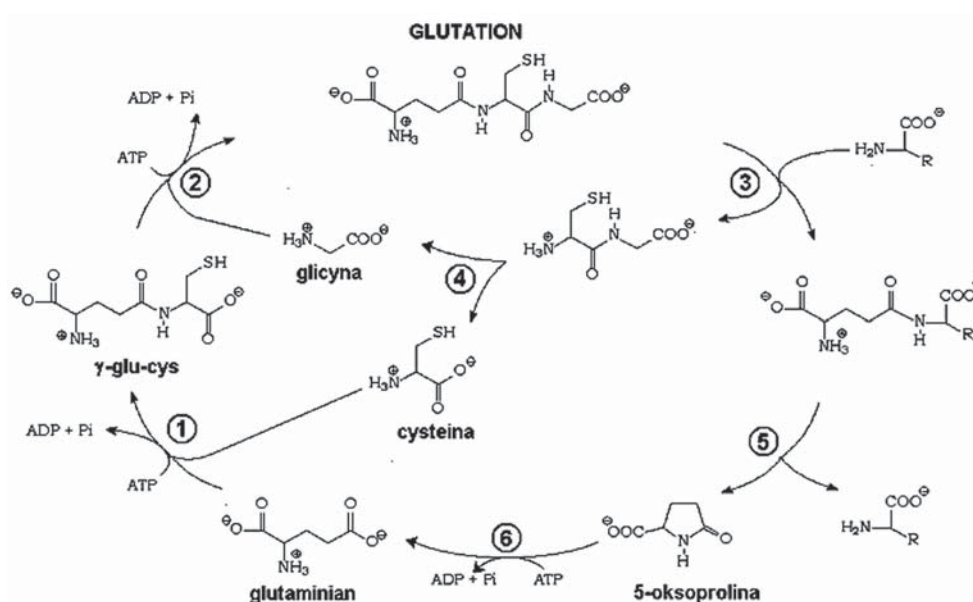
Przeważająca część puli komórkowego glutationu to GSH, podczas gdy forma GSSG stanowi zwykle ok. 1%. Prawie 90% komórkowego GSH znajduje się w cytozolu, natomiast pozostałe 10% – w mitochondriach i w niewielkiej ilości w siateczce endoplazmatycznej. W jej obrębie, ze względu na pełnione funkcje fizjologiczne, glutation utleniony występuje w ilości 30–50% [22].

Glutation funkcjonuje jako bufor tiolowy umożliwiając utrzymanie odpowiedniego stanu oksydoredukcyjnego w komórce. Jego miarą jest stosunek stężeń postaci GSH/GSSG, okreśelany symbolem R. Zwiększona ilość GSSG świadczy o stresie oksydacyjnym, który może być związany z chorobą, stresem psychicznym, starzeniem się organizmu, zwiększonym wysiłkiem fizycznym lub bezpośrednim działaniem związków toksycznych [7, 53, 56, 69]. W warunkach fizjologicznych wartość współczynnika R w komórkach wątroby, wynosi 150–400, natomiast podczas silnego stresu oksydacyjnego może spaść nawet do 2 [22]. Stwierdzono, że stres oksydacyjny i związane z nim uszkodzenia pełnią ważną rolę we wczesnych etapach chorób układu krążenia, neurodegradacyjnych i transformacji nowotworowych [19].

Synteza glutationu zachodzi wyłącznie wewnątrzkomórkowo. Egzogenny glutation nie znajduje zastosowania w leczeniu – nie może być podawany z pożywieniem, gdyż w układzie pokarmowym ulega strawieniu, ponadto praktycznie nie przechodzi



RYCINA 1. Przemiany postaci glutationu
FIGURE 1. Transforming forms of glutathione



RYCINA 2. Schemat cyklu γ -glutamylowego: 1) syntetaza γ -glutamylcysteiny (γ -GCS), 2) syntetaza glutationowa (GS), 3) γ -glutamyltranspeptydaza (γ -GT), 4) wewnątrzkomórkowa peptydaza, 5) cyklotransferaza γ -glutamylowa, 6) 5-oksoprolinaza

FIGURE 2. Scheme of γ -glutamyl cycle: 1) γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS); 2) glutathione synthetase (γ -GS); 3) γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT); 4) intracellular peptidase; 5) γ -glutamyl cyclotransferase; 6) 5-oxoprolinase

przez błony komórkowe oraz słabo przekracza barierę krew-mózg. Monoestry glutationu – metylowy, etylowy i propylowy – ze względu na hydrofobowy charakter są bez trudu transportowane przez błony komórkowe, jednakże stwierdzono działanie nefrotoksyczne tych substancji, uniemożliwiające zastosowanie w leczeniu niedoborów glutationu. Poziom glutationu w komórce można zwiększyć jedynie przez dostarczenie prekursorów budowy. Cysteina, ze względu na obecność atomu siarki, stanowi zwykle czynnik limitujący syntezę. Głównym miejscem syntezy glutationu w organizmie jest wątroba, z uwagi na zdolność hepatocytów do przemiany metioniny w cysteinę w procesie demetylacji. Stosowanie preparatów, zawierających cysteinę lub cysteinę w postaci związanej, jest jednak ograniczone ze względu na silne właściwości neurotoksyczne tego aminokwasu [6].

Biosynteza i biodegradacja glutationu została przedstawiona przez Meistera jako część szlaku metabolicznego określanego jako cykl γ -glutamylowy (ryc. 2). Cząsteczka syntetyzowana wewnątrz komórek ulega degradacji w przestrzeni pozakomórkowej. Stężenie glutationu w komórce jest ok. 500 razy wyższe niż w środowisku zewnętrznym i mieści się najczęściej w zakresie od 0,1 do 10 mM [60].

Biosynteza glutationu przebiega w cytozolu komórek z L- α -glutaminianu (glu), L- α -cysteiny (cys) i glicyny (gly) w dwustopniowej reakcji, przeprowadzanej przez syntetazę γ -glutamylcysteiny (γ -GCS) oraz syntetazę glutationową (γ -GS) [36]. Proces ten nie wymaga udziału matrycy RNA. Tylko niewielkie ilości glutationu

wyodostają się do środowiska zewnętrznego w niezmienionej postaci. Przeważającą część glutationu usuwanego z komórki stanowi glutation utleniony oraz w postaci koniugowanej z innymi cząsteczkami.

Glutation znajdujący się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej nie przechodzi bezpośrednio przez błony komórkowe, lecz rozpada się na poszczególne aminokwasy, które następnie łączą się ponownie wewnątrz komórki [20]. W pierwszym etapie biodegradacji następuje hydroliza wiązania izopeptydowego między grupą γ -karboksylową glutaminianu a grupą aminową cysteiny przy udziale γ -glutamylotransferazy (γ -GT), zwanej też glutationazą. Powstająca cysteinyloglicyna ulega dalszej hydrolizie do glicyny i cysteiny, natomiast reszta γ -glutamylowa jest przenoszona na akceptor aminokwasowy z utworzeniem γ -glutamiloaminokwasu, który powraca do komórki. W następnym etapie γ -glutamiloaminokwas ulega przekształceniu do wolnego aminokwasu i 5-oksoproliny, która z kolei jest przekształcana do glutaminianu. Powstałe w wyniku enzymatycznego rozpadu glutationu aminokwasy mogą być ponownie wykorzystane do biosyntezy nowych cząsteczek. Istotą aktywności enzymu γ -GGT jest przede wszystkim odzysk cysteiny z cząsteczek GSH usuniętych z komórki w celu ponownego wbudowania jej do GSH lub nowo syntetyzowanych białek. Aktywność enzymu podlega ujemnemu sprzężeniu zwrotnemu w odpowiedzi na zmiany poziomu GSH w cytozolu [33].

Kluczowym enzymem, limitującym biosyntezę glutationu jest syntetaza γ -glutamyllocysteiny (γ -GCS), podlegająca ujemnemu sprzężeniu zwrotnemu w odpowiedzi na stężenie peptydu w cytozolu. Aktywność γ -GCS oraz dostępność wewnątrzkomórkowej cysteiny stanowią dwa główne elementy regulujące homeostazę glutationu w komórce. Ponadto poziom glutationu zależy od aktywności jeszcze innych enzymów, takich jak: γ -glutamylotranspeptydaza (γ -GT), transportery aminokwasów, syntetaza glutationowa (GS), peroksydaza glutationowa (GPX) oraz reduktaza glutationowa (GR). Mutacje genów kodujących 5 spośród 6 enzymów szlaku γ -glutamylowego: syntetazy glutationowej, syntetazy γ -glutamyllocysteiny, transpeptydazy γ -glutamylowej, 5-oksoprolinazy i dipeptydazy powodują poważne zaburzenia metabolizmu glutationu, jednak występują u ludzi bardzo rzadko. Wśród powikłań zazwyczaj powiązanych z zaburzeniami metabolizmu glutationu są m.in. anemia hemolityczna, kwasica metaboliczna, 5-oksoprolinuria, uszkodzenia centralnego układu nerwowego oraz przewlekłe infekcje bakteryjne [52].

3. GLUTATION JAKO PRZECIWUTLENIACZ

Utrzymanie fizjologicznej równowagi oksydoredukcyjnej, wyrażanej w komórce przez zmiany aktywności proutleniaczy i przeciwutleniaczy, stanowi kluczowy problem w regulacji fundamentalnych przemian metabolicznych, a także procesów związanych z życiem i proliferacją komórek [2, 36]. Glutation stanowi jeden z najważniejszych składników bariery przeciwutleniającej organizmu. Jego obecność jest konieczna do utrzymania równowagi oksydoredukcyjnej i przeciwdziałania skutkom stresu

oksydacyjnego. GSH stanowi czynnik: redukujący endogennie powstające reaktywne formy tlenu (RFT), chroniący grupy tiolowe białek, biorący udział w procesach naprawczych białek, kwasów nukleinowych i lipidów. Istotną funkcją glutationu jest także zdolność regeneracji innych drobnocząsteczkowych przeciwutleniaczy, takich jak np. askorbinian i tokoferol [44, 57].

Stres oksydacyjny wynika z nagromadzenia się w komórce reaktywnych form tlenu, takich jak: nadtlenek wodoru, anionorodnik ponadtlenkowy i rodnik hydroksylowy, powstających endogennie lub na skutek działania czynników zewnętrznych. Obrona przeciwutleniająca oraz regulacja stanu oksydoredukcyjnego komórki opiera się na ciągłych procesach konwersji postaci glutationu – zredukowanej GSH w utlenioną GSSG i odwrotnie. GSH reaguje z RFT i jest utleniany do GSSG, następnie przywracany do postaci zredukowanej. Ostry stres oksydacyjny może jednak doprowadzić do zmniejszenia zdolności komórki do redukcji GSSG do GSH i w efekcie nagromadzenia GSSG w cytozolu. W celu zachowania równowagi oksydoredukcyjnej, GSSG jest usuwany do środowiska zewnątrzkomórkowego lub może reagować z grupami sulfhydrylowymi białek, prowadząc do utworzenia mieszanych disulfidów białek i glutationu. Oba procesy prowadzą do zmniejszenia puli dostępnego glutationu w komórce i osłabienia jej zdolności obronnych [33].

Poza neutralizacją wolnych rodników tlenowych, glutation odgrywa ważną funkcję ochronną przez zapobieganie lub zmniejszanie toksyczności wielu substancji. Rola glutationu polega przede wszystkim na inaktywacji chemioterapeutyków, zanim dotrą do celu działania oraz udziale w ich transporcie na zewnątrz komórki.

Związanie GSH z ksenobiotykiem lub jego metabolitem prowadzi do utworzenia koniugatów, które następnie są usuwane z komórki. Proces powstawania koniugatów może zachodzić spontanicznie lub jest katalizowany przez komórkowe S-transferazy glutationowe. Podobnie jak w przypadku detoksykacji RFT ilość komórkowego glutationu ulega wówczas zmniejszeniu. Paradoksalnie, w niektórych przypadkach narażenie komórek na stres oksydacyjny wywołuje efekt odwrotny, objawiający się wzrostem stężenia GSH. W doświadczeniach z hepatocytami szczura poddanych działaniu N-nitrozodimetyloaminy (NDMA), butylowanego hydroksyanizolu i nitrofurantoiny zaobserwowano zwiększenie poziomu glutationu w komórkach [16, 25, 58]. Zjawisko zwiększonej syntezy glutationu spowodowane jest stymulacją ekspresji γ -GCS i najprawdopodobniej stanowi adaptacyjny mechanizm obrony przed działaniem reaktywnych form tlenu.

W komórkach nowotworowych opornych na działanie leków również stwierdzono wyższy poziom glutationu w porównaniu z komórkami zdrowymi, co wynika ze zwiększenia ekspresji genu kodującego γ -GCS. GSH bierze udział w procesach detoksykacji m.in. leków zawierających platynę, środków alkilujących (melfalan), antracyklin (doksorubicyna, daunorubicyna) oraz związków arsenu [17, 28]. Zapewnienie środowiska redukującego przez glutation jest również korzystne dla procesów naprawy uszkodzeń DNA wywołanych przez leki. Aktywność GSH pozwala na wielokierunkową, kompleksową ochronę i zwiększenie przeżywalności komórek nowotworowych narażonych na działanie chemioterapeutyków.

3.1. Glutation a przemiany białkowe

Glutation ma zdolność do reagowania z grupami tiolowymi białek komórkowych, w wyniku czego dochodzi do powstania mieszanych disiarczków (białko-S-S-glutation) w procesie określanym jako S-glutationylacja. Reakcja ta zapewnia ochronę przed nieodwracalnym utlenieniem kinaz i fosfataz białkowych, czynników transkrypcyjnych AP-1 i NF- κ B, białek z rodziny „chaperonów” oraz pozakomórkowej hemoglobiny. Zjawisko to ma szczególne znaczenie w przypadku białek regulacyjnych i przeciwutleniających, gdyż pozwala na zachowanie ich biologicznej aktywności w warunkach stresu oksydacyjnego [24].

Glutation poza właściwościami ochronnymi może również uczestniczyć w regulacji aktywności białek, np. receptorów, kinaz białkowych i niektórych czynników transkrypcyjnych, przez oddziaływanie na grupy tiolowe znajdujące się w ich centrach aktywnych. Regulacja białek na skutek S-glutationylacji może być uzależniona od pozycji reszty cysteinowej ulegającej modyfikacji i mieć charakter aktywacji lub hamowania. S-glutationylacja zachodzi również na etapie modyfikacji potranslacyjnych białek, podczas tworzenia struktury III-rzędowej, formowania mostków disiarczkowych i fałdowania białek w obrębie siateczki endoplazmatycznej. W procesach tych GSSG uczestniczy jako utleniacz grup -SH reszt cysteiny. Reakcja, katalizowana przez izomerazę disulfidową (PDI), prowadzi do równoczesnego odtworzenia glutationu w postaci zredukowanej (GSH). Wykazano, że glutation bierze udział w procesach biodegradacji białek zarówno na etapie ubikwitynacji, jak i w związku z aktywnością proteasomu. Przez S-glutationylację glutation pośredniczy w hamowaniu aktywności białek E1 i E2, biorących udział w przyłączaniu cząsteczki ubikwityny do degradowanych białek. Wykazano również, że glutation w stężeniach mikromolowych aktywuje proteasom, natomiast w stężeniach milimolowych może powodować jego hamowanie [14].

4. ENZYMY GLUTATIONO-ZALEŻNE A LEKOOPORNOŚĆ

Zdolność komórek do utrzymania odpowiednio wysokiego poziomu glutationu jest uzależniona od aktywności różnych enzymów i szlaków metabolicznych. Jednocześnie zmiany stężenia GSH mogą równocześnie mieć wpływ na poziom enzymów, dla których działa jako kofaktor. Kooperacja wielu elementów systemu detoksykującego jest potrzebna w celu uzyskania przez komórki nowotworowe fenotypu charakterystycznego dla oporności wielolekowej.

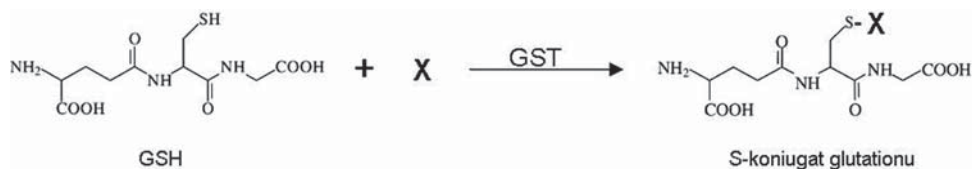
W pierwszych badaniach nad udziałem enzymów glutationo-zależnych w oporności wielolekowej nabytej wykazano, że wytworzenie oporności wielolekowej wiąże się ze znaczącymi zmianami profilu enzymów glutationo-zależnych i w efekcie zmianami poziomu zredukowanego glutationu. W dwóch liniach komórkowych gruczolaka jajnika pobranych od jednej pacjentki: wrażliwej PE01 i po wykształceniu oporności na chlorambucyl, cisplatinę i 5-fluorouracyl – PE04 – zaobserwowano różnice

poziomów enzymów glutationo-zależnych GT, GST i GPX. W linii lekoopornej stwierdzono wyższą aktywność wszystkich 3 enzymów oraz wyższy poziom zredukowanego glutationu w porównaniu z linią wrażliwą [29].

Dalszych informacji na temat aktywności enzymów glutationo-zależnych w komórkach lekoopornych dostarczyły doświadczenia z użyciem czynników hamujących ich aktywność. Obecnie prowadzone są liczne badania na temat możliwości zastosowania inhibitorów enzymów glutationo-zależnych jako modulatorów oporności wielolekowej w ukierunkowanej terapii przeciwnowotworowej.

Sulfoksymina butioniny – BSO (ang. *buthionine sulfoximine*) blokuje aktywność γ -GCS, kluczowego enzymu w biosyntezie glutationu. BSO powoduje nieodwracalne zahamowanie syntezy glutationu i spadek jego poziomu w komórce o 90% w czasie 24 godzin. Doświadczenia przeprowadzone na myszach z użyciem komórek nowotworu jajnika myszy OVCAR-3 poddawanych leczeniu melfalanem wykazały, że przeżywalność myszy poddawanych równocześnie terapii BSO jest wyższa o 72% w porównaniu z grupą kontrolną [43]. W badaniach przeprowadzonych z ludzkimi komórkami nowotworowymi udowodniono, że terapia BSO powoduje odwrócenie fenotypu MDR przez uwrażliwienie komórek nowotworowych na leczenie związkami platyny, związkami alkilującymi, antracyklinami oraz trójtlenkiem arsenu [3, 18, 28, 41]. W badaniach *in vitro* udowodniono, że skuteczność leczenia zwiększa nawet częściowe zahamowanie syntezy GSH [28]. Zastosowanie BSO ma jednak ograniczenia ze względu na efekt cytotoksyczny związku wobec prawidłowych komórek organizmu.

Oporność komórek nowotworowych związana jest również z nadmierną aktywnością S-transferazy glutationowej – GST współdziałającej z GSH [62]. S-transferazy glutationowe są rodziną enzymów katalizujących reakcję koniugacji elektrofilowych substratów z cząsteczkami GSH (ryc. 3). Znanych jest 7 klas cytozolowych białek GST u ssaków, oznaczonych jako α , μ , π , τ , σ , ξ i κ . Szeroki zakres substratowy GST wynika zarówno z silnego polimorfizmu, jak i z niskiej specyficzności tworzonego wiązania [64]. Ta właściwość GST pozwala na metabolizowanie i detoksykację wielu różnych substratów zarówno endogennych produktów peroksydacji lipidów czy nadtlenu DNA, jak również ksenobiotyków: kancerogenów, zanieczyszczeń oraz leków. GST klasy μ i π są jednocześnie zaangażowane w regulację apoptotycznego szlaku kinazy MAP, między innymi przez hamowanie kinazy c-Jun [1].



RYCINA 3. Koniugacja glutationu (GSH) z cząsteczką ksenobiotyku (X) przy udziale S-transferazy glutationowej (GST) (na podstawie [62])

FIGURE 3. Conjugation of glutathione (GSH) with a xenobiotic molecule (X) catalysed by glutathione S-transferase (GST) (according to [62])

Nadekspresja GST, przede wszystkim należących do klasy π została zaobserwowana w komórkach wielu nowotworów i prawdopodobnie może występować również w innych schorzeniach [60]. Udział GST w zjawisku MDR opiera się głównie na procesach detoksykacji, a także hamowaniu szlaku kinazy MAP. Stwierdzono, że enzym ten pośredniczy w detoksykacji produktów stresu oksydacyjnego, takich jak: produkty peroksydacji lipidów, akroleina lub zasady propenalowe, nie zaś jak się wydawało, w detoksykacji samego leku. Wysoki poziom aktywności GST stanowi najprawdopodobniej wynik selekcji komórek w trakcie onkogenezy, nie zaś bezpośrednią przyczynę fenotypu MDR [60]. Eksperymenty z użyciem inhibitora GST – kwasu etakrynowego EA (ang. *ethacrynic acid*) oraz BSO są przeprowadzane w celu sprawdzenia efektów jednoczesnego zablokowania syntezy GSH i aktywności GST. Kwas etakrynowy jest analogiem substratowym dla GST klasy μ , α lub π i tworzy koniugaty z glutationem. Podwójna terapia za pomocą EA i BSO w wielu przypadkach jest stosowana w celu sprawdzenia uwrażliwienia komórek nowotworowych na stosowane leczenie.

O ile GST stanowi główny przedmiot badań dotyczących oporności wielolekowej nowotworów, inne enzymy uczestniczące w syntezie i przemianach GSH również są zaangażowane w odpowiedź komórkową na działanie leków przeciwnowotworowych. W warunkach zwiększonej ekspresji GST zaobserwowano zwiększony poziom aktywności innych enzymów szlaku γ -glutamylowego – GPX i γ -GT. Selenozależna peroksydaza glutationowa GPX, należy do I linii obrony przeciwutleniającej komórki. GPX oraz glutation odgrywają centralną rolę w utrzymaniu równowagi oksydacyjnej podczas leczenia lekami chinonowymi. Stwierdzono, że GPX odpowiada za detoksykację wolnych rodników tlenowych oraz nadtlenków lipidów, generowanych w procesach detoksykacji związków, takich jak: doksorubicyna, daunorubicyna, mitomycyna C, diazochinon oraz menadion. Zmiany poziomu aktywności enzymu mają znaczący wpływ na aktywność oraz toksyczność tych substancji dla komórek [15].

γ -Glutamylotranspeptydaza jest enzymem błonowym zaangażowanym w regulację poziomu komórkowego glutationu przez jego odzyskiwanie z przestrzeni pozakomórkowej. Zwiększenie jego ekspresji zostało zaobserwowane w wielu rodzajach ludzkich nowotworów, jednakże poziom enzymu jest zmienny zarówno w różnych rodzajach nowotworów, jak i wśród różnych komórek tego samego nowotworu [45]. Ekspresja γ -GT nie stanowi głównego mechanizmu warunkującego oporność lekową, jednakże udowodniono udział tego enzymu w utrzymaniu równowagi oksydoredukcyjnej i wykazano jego wpływ na odpowiedź komórkową na leki przeciwnowotworowe, głównie cisplatynę oraz związki alkilujące [12, 48].

5. UDZIAŁ GLUTATIONU W TRANSPORCIE PRZEBŁONOWYM

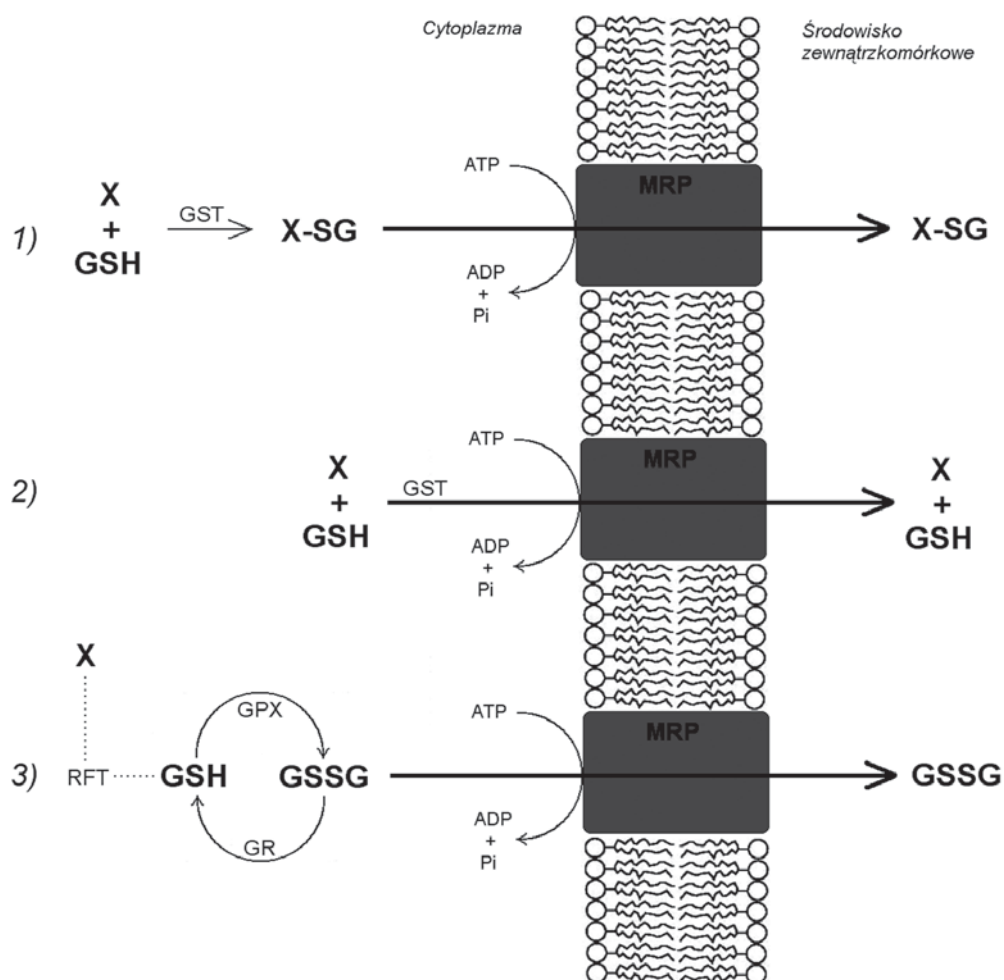
Jednym z podstawowych mechanizmów warunkujących oporność lekową jest transport przezbłonowy związków znajdujących się w cytoplazmie do środowiska zewnątrzkomórkowego. Transport ten odbywa się przy udziale białek należących

do nadrodziny ABC transporterów, których wspólną cechą jest obecność w strukturze domeny wiążącej nukleotydy (ang. *ATP-binding cassette*). Pierwszym poznanym transporterem należącym do rodziny ABC biorącymi udział w oporności wielolekowej była glikoproteina P (P-gp).

Glikoproteina P odkryta została w trakcie badań nad nowotworem jajnika u chomików [23]. P-gp jest białkiem o masie 170 kDa kodowanym przez gen *mdr-1*. Występuje powszechnie w wielu rodzajach tkanek, zabezpieczając je przed działaniem metabolitów komórkowych, substancji egzogennych oraz produktów ich degradacji. P-gp charakteryzuje się bardzo niską specyficnością substratową i preferuje związki o charakterze hydrofobowym, głównie kationy. Początkowo glikoproteina P była jedynym znanym transporterem biorącym udział w zjawisku oporności lekowej. Doświadczenia prowadzone w 1992 roku z lekoopornymi komórkami ludzkiego drobnokomórkowego raka płuc H69AR, w których nie wykryto podwyższonego poziomu białka P-gp, wskazały na istnienie innego białka oporności wielolekowej, oznaczonego kodem MRP (ang. *multidrug resistance-related protein*) [11, 13]. U ludzi zidentyfikowano do tej pory 6 izoform białka MRP, opisanych kolejno jako MRP1 do MRP6 (ABCC1 do ABCC6), a także MRP7 do MRP9 o słabo zbadanych funkcjach biologicznych [59]. MRP1 ma masę ok. 190 kDa, różni się także od P-gp strukturą i mechanizmem działania. Białko MRP1 występuje prawie we wszystkich tkankach organizmu, a jego rola polega na usuwaniu z komórek toksycznych substancji kosztem energii uzyskanej z hydrolizy ATP. Do substratów preferowanych przez białko MRP1 należą związki o charakterze anionów organicznych [10].

Fizjologiczne funkcje MRP1 związane są z procesami detoksykacyjnymi zależnymi od układu GSH/GSSG. Interakcje pomiędzy GSH a MRP1 są jednak skomplikowane. Mechanizm transportu nie jest do końca wyjaśniony pod względem udziału glutationu w tym procesie. MRP1 nie transportuje związków chemicznych w niezmienionej postaci, lecz preferuje ich anionowe pochodne po koniugacji z GSH lub cząsteczkami glukuronianu lub siarczanu. GST katalizujący proces koniugacji najprawdopodobniej działa synergicznie w stosunku do MRP1 [10]. Jednocześnie w niektórych przypadkach próby wykrycia koniugatów leków lub ich metabolitów z GSH zakończyły się niepowodzeniem, co sugeruje, że transport ksenobiotyków za pośrednictwem białka MRP1 może być stymulowany przez GSH również na zasadzie ko-transportu, aktywacji lub ułatwienia wiązania substratu z transporterem [27, 30, 54].

Badania korelacji pomiędzy transportem ksenobiotyków i GSH z komórki nie dają jednoznacznych wyników, pozwalających na opracowanie jednolitego schematu mechanizmu transportu. Zagadnienie, czy glutation stanowi jedynie ligand dla endogennej substancji czy jest transportowany samodzielnie przez MRP, wciąż pozostaje niewyjaśnione. Ze względu na fakt, że GSH wykazuje słabe powinowactwo do transportera, badania potencjalnych zależności są znacznie utrudnione. Wyniki niektórych badań wskazują na prawdopodobieństwo zachodzenia bezpośredniego transportu glutationu za pośrednictwem MRP [50].



RYCINA 4. Hipotezy dotyczące MRP-zależnego transportu leków przy udziale glutationu: 1) transport koniugatów X-SG leku (X) z glutationem (GSH), 2) transport, w którym nie stwierdzono obecności koniugatów X-SG – kotransport leku i glutationu, 3) transport glutationu utlenionego (GSSG) powstającego na skutek redukcji przez GSH reaktywnych form tlenu (RFT), generowanych w wyniku działania leku

FIGURE 4. Hypotheses regarding MRP-dependent transport of drugs with glutathione: 1) transport of X-SG conjugates of drug (X) and glutathione (GSH), 2) transport, in which presence of conjugates X-SG were not proved – cotransport of drug and glutathione, 3) transport of oxidised glutathione (GSSG) formed as a result of reduction of reactive oxygen species (ROS) generated by drug, with glutathione

Wczesne hipotezy dotyczące MRP-zależnego transportu przy udziale glutationu zakładają istnienie 3 mechanizmów (ryc. 4):

- 1 – transport koniugatów z GSH;
- 2 – transport, w którym nie stwierdzono istnienia koniugatów, lecz wykazano, że aktywność GST jest wymagana do prawidłowego transportu za pośrednictwem MRP1;
- 3 – transport GSSG, powstającego z GSH w wyniku enzymatycznej redukcji cząsteczki przy udziale peroksydazy glutationowej.

Wnioski z wielu prac doprowadziły do opracowania teoretycznego modelu pracy transportera MRP1/2, w którym białko miałoby 2 miejsca wiązania: G i D, różniące się powinowactwem do GSH i zdolne do kompetycyjnego wiązania endogenego ligandu [5, 46]. W efekcie, w zależności od proporcji stężeń glutationu i ligandu:

- b) oba miejsca wiązania: G i D mogą być związane z glutationem,
- c) miejsce wiązania G może być związane z glutationem, a miejsce D – z ligandem,
- d) oba miejsca wiązania: G i D mogą być związane z ligandem.

Oba miejsca wiązania GSH ulegałyby jednocześnie wzajemnej aktywacji. Powyższy model wyjaśnia problemy w wykrywaniu koniugatów niektórych substancji z glutationem. Według powyższej teorii miałyby one wykazywać na tyle wysokie powinowactwo do białka MRP1/2, że glutation nie byłby wymagany do stymulacji transportu. Wydaje się, że powinowactwo GSH do MRP wynika również z różnic w budowie poszczególnych białek MRP, wpływających na specyficzność substratową transporterów.

Aktywność transporterów MRP1, MRP2 i MRP3 przyczynia się do wytworzenia oporności komórek nowotworowych na działanie wielu leków.

Nadekspresja MRP1 obserwowana jest w większości nowotworów. Białko to wykazuje zdolność bezpośredniego transportowania takich leków, jak: antracykliny (doksorubicyna, daunorubicyna), alkaloidy barwinka różowego (winkrystyna, winblastyna), etopozyd czy paklitaksel. Podobną zależność zaobserwowano dla naturalnej, niezmodyfikowanej aflatoksyny B₁. Wyniki te potwierdzają doświadczenia, w których badano stopień zahamowania przez te związki transportu leukotrienu LTC₄, naturalnego konkurencyjnego substratu dla MRP1. Pomimo relatywnie niskiego powinowactwa MRP1 do tego typu substancji, ich transport może być zwiększony w warunkach wysokiego stężenia GSH w komórkach [31, 39, 49].

Badania *in vitro* wykazały, że białko MRP2 przyczynia się do oporności na cisplatynę jak również innych leków: CPT-11, pochodnej kamptotecyny SN-38, winkrystyny, winblastyny, etopozydu oraz doksorubicyny [8]. Udało się wykazać również zależność pomiędzy ekspresją białka MRP3 a opornością komórek na doksorubicynę, winkrystynę, etopozyd, cisplatynę oraz tenipozyd [26, 67]. Wszystkie białka MRP1, MRP2 i MRP3 przyczyniają się również do oporności na krótkotrwałą ekspozycję na metotreksat (MTX) [21]. Stopniowe uwrażliwienie komórek wiąże się z powstawaniem i kumulacją w cytoplazmie poliglutaminowanej, toksycznej pochodnej metotreksatu, która nie jest substratem dla MRP.

Procesom eksportu leku poza komórkę towarzyszy jednocześnie nasilony wpływ GSH z komórki [47]. W komórkach pozbawionych zdolności syntezy MRP zaobserwowano podwyższony poziom glutationu w cytoplazmie na skutek kumulacji [4]. Pomimo znacznych strat GSH w komórkach nowotworowych z nadekspresją białka MRP obserwuje się zwiększony poziom glutationu. Zwiększona biosynteza glutationu na skutek nadekspresji γ -GCS zwiększa przeżywalność komórek nowotworowych i chroni je przed apoptozą [34].

Doświadczenia z użyciem BSO wykazały, że w przypadku niektórych leków zahamowanie syntezy glutationu powoduje upośledzenie transportu i akumulację leku w komórce, w wyniku czego zwiększa się ich wrażliwość komórek na leczenie. W komórkach czerniaka niesyntetyzujących GSH zaobserwowano zwiększoną wrażliwość na trójtlenek arsenu [18]. Zaobserwowano, że zastosowanie BSO może zwiększać skuteczność chemioterapii nawet w komórkach z nadekspresją MRP1. Końcowy efekt uzależniony jest jednak od zastosowanej linii komórkowej oraz rodzaju leku. Istnieją dane wskazujące, że efekt wywołany przez BSO jest bezpośrednim wynikiem deplecji GSH, nie zaś działania na białko MRP1 [55]. Dowodów potwierdzających powyższą hipotezę dostarczyły badania, w których stwierdzono, że w komórkach z nadekspresją MRP1, traktowanych BSO, podanie zewnętrznego GSH w postaci estru etylowego, powoduje ponowne zwiększenie transportu daunorubicyny i przywrócenie fenotypu MDR [65].

Udział procesów transportu zależnych od glutationu w zjawisku oporności wielolekowej nowotworów potwierdziły badania z wykorzystaniem wektorów wirusowych. Przeprowadzono transfekcje komórek linii fibroblastów NIH3T3T za pomocą cDNA genów kodujących γ -GCS, GST i MRP. Badanie wykonano w różnych wariantach zarówno transfekcji pojedynczych, jak też w podwójnych i potrójnych kombinacjach. Wykazano, że w procesach oporności na szereg stosowanych leków przeciwnowotworowych produkty wyżej wymienionych genów funkcjonują w sposób skoordynowany [40]. Równoczesna kotransfekcja GST i GCS powodowała zwiększenie oporności na doksorubicynę, etopozyd i winkrystynę w większym stopniu niż przy transfekcji dowolnym pojedynczym genem. Również koekspresja GST łącznie z MRP1 przyczyniła się do zwiększenia oporności na leczenie chlorambucylem, kwasem etakrynowym, etopozydem i winkrystyną. Nadekspresja wszystkich 3 elementów systemu w znacznie większym stopniu zwiększa lekooporność komórek NIH3T3T na leczenie doksorubicyną i etopozydem niż w przypadku nadekspresji 2 dowolnych lub pojedynczych białek [40].

Kombinacja GCS i MRP1 nie miała wpływu na zwiększenie oporności w porównaniu z nadekspresją samego białka MRP1. Oporność komórek na chlorambucyl i kwas etakrynowy była na podobnym poziomie zarówno przy nadekspresji GST pojedynczo, jak i w kombinacjach, co sugeruje, że w przypadku tych leków oporność lekowa jest uwarunkowana innym mechanizmem.

W podobnych doświadczeniach udowodniono, że transfekcja komórek nowotworowych cDNA GCS oraz MRP1 z GCS powoduje zwiększenie oporności komórek na związki metali ciężkich, takie jak: chlorek kadmu, arsenian sodu i winian antymonowo-potasowy [32, 61].

Białka γ -GCS, GST i MRP najprawdopodobniej funkcjonują razem jako skoordynowany system transportu dla wielu leków stosowanych w chemioterapii. Nie wiadomo jednak, czy wszystkie rodzaje lekoopornych nowotworów są zdolne do syntezy enzymów detoksyfikujących II fazy w ilościach umożliwiających unieszkodliwienie ksenobiotyków oraz usuwanie ich z komórki na poziomie warunkującym oporność. Transport naturalnych ksenobiotyków, z wyjątkiem winkrystyny i daunorubicyny, wydaje się zachodzić według innego mechanizmu, niezależnego od enzymów II fazy [68].

6. UDZIAŁ GLUTATIONU W APOPTOZIE

Zjawisko apoptozy bezpośrednio wiąże się z aktywnością białek należących do rodziny Bcl-2, w szczególności samego Bcl-2. Jego rolą jest blokowanie wypływu cytochromu c z mitochondriów, przez co zapobiega apoptozie.

Bufor tiolowy GSH/GSSG stanowi jeden z systemów przeciwutleniających, zapobiegających apoptozie. W warunkach intensywnego transportu błonowego GSH na zewnątrz komórki, w krótkim czasie obserwowano uwolnienie cytochromu c z mitochondriów, poprzedzające indukcję procesów apoptotycznych.

Wykazano, że komórki, które uległy transformacji nowotworowej, charakteryzują się zwiększoną ekspresją Bcl-2, przez co zwiększa się ich oporność na stres oksydacyjny i apoptozę [9]. Zjawisko to stanowi element bardzo złożonej strategii obronnej, polegającej na zaburzeniu równowagi pomiędzy poziomem białek pro- i antyapoptotycznych i odgrywa jedną z ważniejszych ról w procesach warunkujących oporność na leki [51].

Na podstawie wyników badań przeprowadzonych w ostatnich latach wykazano istnienie zależności pomiędzy aktywnością Bcl-2 a wrażliwością komórek na zaburzenia syntezy GSH. Stwierdzono, że komórki produkujące GSH i charakteryzujące się szczególnie wysoką opornością na BSO wykazują jednocześnie zwiększoną ekspresję Bcl-2 [63].

Badania zależności pomiędzy stężeniem białka Bcl-2 a stężeniem komórkowego glutationu wykazały, że przy nadekspresji Bcl-2 obserwuje się niemal 3-krotny wzrost stężenia glutationu. Choć antyapoptotyczne właściwości Bcl-2 prawdopodobnie nie są ściśle uzależnione od ilości GSH w komórce [37], to istnieje prawdopodobieństwo występowania między nimi bezpośrednich lub pośrednich zależności. Podczas terapii komórek z nadekspresją Bcl-2 etopozydem lub pochodną kamptotecyny SN-38 zaobserwowano zwiększenie ich przeżywalności i wytworzenie oporności lekowej, w którą prawdopodobnie zaangażowany jest glutation. W doświadczeniach z użyciem BSO zaobserwowano, że na skutek redukcji poziomu glutationu w komórkach z nadekspresją Bcl-2 nastąpiło całkowite zniesienie oporności na te leki [66]. Deplecja syntezy GSH za pomocą BSO zaburza procesy transportu leków z komórki, co najprawdopodobniej stanowi przyczynę uwrażliwienia komórek. Podejrzewa się również, że BSO może ułatwić kumulację RFT w komórkach, co z kolei zwiększa efekt cytotoksyczny stosowanych leków.

7. KIERUNKI OPRACOWYWANIA STRATEGII ZWALCZAJĄCYCH LEKOOPORNOŚĆ ZWIĄZANĄ Z GLUTATIONEM

Pomimo częstego występowania zjawiska oporności wielolekowej, nie jest ono nieodłącznie związane ze wszystkimi rodzajami nowotworów, niemniej jednak stanowi najpoważniejszą przeszkodę w chemioterapii tych chorób.

Dokładniejsze poznanie mechanizmów regulujących stan oksydoredukcyjny komórki, opierających się na aktywności systemów przeciwutleniających może być przydatne podczas projektowania leków używanych w terapii nowotworowej. Należy przypuszczać, że możliwość precyzyjnego regulowania poziomu glutationu podczas terapii może być istotnym czynnikiem wpływającym na skuteczność leczenia. Wyniki najnowszych badań wskazują również na potencjalny udział leukotrienów w procesach patogenezy nowotworów. Obecnie prowadzone są prace nad ewentualnym leczeniem antyleukotrienowym, które mogłoby wspomagać zarówno terapię chorób układu krążenia, jak i chorób nowotworowych [42].

Istnieje kilka strategii walki z opornością wielolekową związaną z glutationem. Większość opracowywanych metod polega na zahamowaniu ekspresji γ -GCS i zablokowaniu syntezy glutationu. Cel ten można osiągnąć przez:

1) zastosowanie BSO; w wyniku nieodwracalnego zablokowania syntezy glutationu obserwuje się wzrost wrażliwości na związki platyny, związki alkilujące, antracykliny i arsenu trójtlenek; problemem przy zastosowaniu terapii BSO jest ustalenie odpowiedniej dawki, która nie byłaby toksyczna wobec komórek prawidłowych;

2) zastosowanie rybozemu *hammerhead* wobec mRNA γ -GCS i jego hydrolizie; badania *in vitro* wykazały, że metoda ta zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na cytostatyki, najprawdopodobniej poprzez zaburzenia transportu leku zależnego od MRP1;

3) zastosowanie konstruktów anty-c-jun; czynnik transkrypcyjny cJun związany jest z ekspresją GCS i jego zahamowanie powoduje spadek zawartości GCS i w rezultacie obniżenie poziomu glutationu w komórce. Blokada czynnika transkrypcyjnego może jednak spowodować inne, trudne do przewidzenia konsekwencje u ludzi.

W przypadku wielu schorzeń, m.in. w chorobach neurodegeneracyjnych, cukrzycy, AIDS obserwuje się niski poziom GSH, co powoduje osłabienie właściwości obronnych komórek. Dla zwiększenia efektywności leczenia korzystne jest wówczas podniesienie poziomu glutationu. W przebiegu chorób nowotworowych wprost przeciwnie, stwierdzono zwiększone stężenie glutationu w komórkach. W celu osłabienia procesów detoksykacji oraz obrony przeciwutleniającej komórek nowotworowych skuteczne strategie terapeutyczne powinny zatem sprowadzać się do jednoczesnego stosowania leków cytostatycznych oraz inhibitorów biosyntezy glutationu [6]. Optymalna terapia powinna prowadzić jednocześnie do selektywnego podniesienia poziomu GSH w komórkach prawidłowych, przeciwdziałając niepożądanym skutkom radio- i chemioterapii.

LITERATURA

- [1] ADLER V, YIN Z, FUCHS SY, BENEZRA M, ROSARIO L, TEW KD, PINCUS MR, SARDANA M, HENDERSON CJ, WOLF CR, DAVIS RJ, RONAI Z. Regulation of JNK signaling by GSTp. *Embo J* 1999; **18**: 1321–1334.
- [2] ARRIGO AP. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med* 1999; **27**(9–10): 936–944.
- [3] BAILEY HH. L-S,R-buthionine sulfoximine: historical development and clinical issues. *Chem Biol Interact* 1998; **111–112**: 239–254.
- [4] BALLATORI N, KRANCE SM, MARCHAN R, HAMMOND CL. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol Aspects Med* 2009; **30**(1–2): 13–28.
- [5] BALLATORI N, REBBEOR JF. Roles of MRP2 and oatp1 in hepatocellular export of reduced glutathione. *Semin Liver Dis* 1998; **18**(4): 377–387.
- [6] BILSKAA, KRAWCZYK A, WŁODEK L. Różne oblicza biologicznej roli glutationu. *Post Hig Med Dosw* 2007; **61**: 438–453.
- [7] BODA D, NÉMETH I, PINTÉR S. Surface tension, glutathione content and redox ratio of the tracheal aspirate fluid of premature infants with IRDS. *Biol Neonate* 1998; **74**(4): 281–288.
- [8] BORST P, EVERS R, KOOL M, WIJNHOLDS J. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1461**(2): 347–357.
- [9] CAI J, JONES DP. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem* 1998; **273**(19): 11401–11404.
- [10] COLE SP, DEELEY RG. Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* 1998; **20**(11): 931–940.
- [11] COLE SPC, BHARDWAJ G, GERLACH JH, MACKIE JE, GRANT CE, ALMQUIST KC, STEWART AJ, KURZ EU, DUNCAN AMV, DEELEY RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; **258**: 1650–1654.
- [12] DAUBEUF S, LEROY P, PAOLICCHIA, POMPELLAA, WELLMAN M, GALTEAU MM, VISVIKIS A. Enhanced resistance of HeLa cells to cisplatin by overexpression of γ -glutamyltransferase. *Biochem Pharmacol* 2002; **64** (2): 207–216.
- [13] DEELEY RG, COLE SP. Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Lett* 2006; **580**(4): 1103–1111.
- [14] DEMASI M, SHRINGARPURE R, DAVIES KJ. Glutathiolation of the proteasome is enhanced by proteolytic inhibitors. *Arch Biochem Biophys* 2001; **389**(2): 254–263.
- [15] DOROSHOW JH, AKMAN S, CHU FF, ESWORTHY S. Role of the glutathione-glutathione peroxidase cycle in the cytotoxicity of the anticancer quinones. *Pharmacol Ther* 1990; **47**(3): 359–367.
- [16] EATON DL, HAMEL DM. Increase in gamma-glutamylcysteine synthetase activity as a mechanism for butylated hydroxyanisole-mediated elevation of hepatic glutathione. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; **126**(1): 145–149.
- [17] FOJO T, BATES S. Strategies for reversing drug resistance. *Oncogene* 2003; **22**(47): 7512–7523.
- [18] GARTENHAUS RB, PRACHAND SN, PANIAQUA M, LI Y, GORDON LI. Arsenic trioxide cytotoxicity in steroid and chemotherapy-resistant myeloma cell lines: enhancement of apoptosis by manipulation of cellular redox state. *Clin Cancer Res* 2002; **8**(2): 566–572.
- [19] GATÉ L, PAUL J, BA GN, TEW KD, TAPIERO H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother* 1999; **53**(4): 169–180.
- [20] GENDŹWILL A. Reaktywne formy tlenu i hiporeaktywność naczyń we wstrząsie septycznym. Część II. Przeciutleniające i hiporeaktywność naczyń we wstrząsie septycznym. *Pol Merk Lek* 2007; **XXIII**(136): 284–287.
- [21] HIPFNER DR, DEELEY RG, COLE SP. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1461**(2): 359–376.
- [22] HWANG C, SINSKEY AJ, LODISH HF. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 1992; **257**(5076): 1496–1502.
- [23] JULIANO RL, LING VA. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976; **455**: 152–162.
- [24] KLATT P, LAMAS S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* 2000; **267**(16): 4928–4944.
- [25] KLEE S, NÜRNBERGER MC, UNGEMACH FR. The consequences of nitrofurantoin-induced oxidative stress in isolated rat hepatocytes: evaluation of pathobiochemical alterations. *Chem Biol Interact* 1994; **93**(2): 91–102.

- [26] KOOL M, VAB DER LINDEN M, DE HAAS M, SCHEFFER GL, DE VREE JM, SMITH AJ, JANSEN G, PETERS GJ, PONNE N, SCHEPER RJ, ELFERINK RP, BAAS F, BORST P. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Natl Acad Sci USA* 1999; **96**(12): 6914–6919.
- [27] KRUIH GD, BERLINSKY MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 2003; **22**: 7537–7552.
- [28] LAI GM, MOSCOW JA, ALVAREZ MG, FOJO AT, BATES SF. Contribution of glutathione and glutathione-dependent enzymes in the reversal of adriamycin resistance in colon carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1991; **49**(5): 688–695.
- [29] LEWIS AD, HAYES JD, WOLF CR. Glutathione and glutathione-dependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived from a patient before and after the onset of drug resistance: intrinsic differences and cell cycle effects. *Carcinogenesis* 1988; **9**(7): 1283–1287.
- [30] LOE DW, DEELEY RG, COLE SP. Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res* 1998; **58**(22): 5130–5136.
- [31] LOE DW, OLESCHUK CJ, DEELEY RG, COLE SP. Structure-activity studies of verapamil analogs that modulate transport of leukotriene C(4) and reduced glutathione by multidrug resistance protein MRP1. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **275**(3): 795–803.
- [32] LORICO A, BERTOLA A, BAUM C, FODSTAD O, RAPPA G. Role of the Multidrug Resistance Protein 1 in protection from heavy metal oxyanions: investigations *in vitro* and in MRP1-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **291**(3): 617–622.
- [33] LUKASZEWICZ-HUSSAIN A. Rola glutationu i enzymów z nim związanych w procesach antyoksydacyjnych organizmu. *Med Pr* 2003; **54**(5): 473–479.
- [34] MANNA SK, KUO MT, AGGARWAL BB. Overexpression of gamma-glutamylcysteine synthetase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappa B and activator protein-1. *Oncogene* 1999; **18**(30): 4371–4382.
- [35] MEIJERMAN I, BEIJNEN JH, SCHELLENS JHM. Combined action and regulation of phase II enzymes and multidrug resistance proteins in multidrug resistance in cancer. *Cancer Treatment Reviews* 2008; **34**(6): 505–520.
- [36] MEISTER A, ANDERSON ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; **52**: 711–760.
- [37] MEURETTE O, LEFEUVRE-ORFILA L, REBILLARD A, LAGADIC-GOSSMANN D, DIMANCHE-BOITREL MT. Role of intracellular glutathione in cell sensitivity to the apoptosis induced by tumor necrosis factor {alpha}-related apoptosis-inducing ligand/anticancer drug combinations. *Clin Cancer Res* 2005; **11**(8): 3075–3083.
- [38] MORAN LK, GUTTERIDGE JM, QUINLAN GJ. Thiols in cellular redox signalling and control. *Curr Med Chem* 2001; **8**(7): 763–772.
- [39] MULLER M, MEUER C, ZAMAN GJR, BORST P, SCHEPER RJ, MULDER NH, DE VRIES EGE, JANSEN PLM. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 13033–13037.
- [40] O'BRIEN M, KRUIH GD, TEW KD. The influence of coordinate overexpression of glutathione phase II detoxification gene products on drug resistance. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **294**(2): 480–487.
- [41] OGUCHI H, KIKKAWA F, KOJIMAM, MAEDA O, MIZUNO K, SUGANUMAN, KAWAI M, TOMODA Y. Glutathione related enzymes in cis-diamminedichloroplatinum (II)-sensitive and-resistant human ovarian carcinoma cells. *Anticancer Res* 1994; **14**(1A): 193–200.
- [42] OHD JF, NIELSEN CK, CAMPBELL J, LANDBERG G, LÖFBERG H, SJÖLANDER A. Expression of the leukotriene D4 receptor CysLT1, COX-2, and other cell survival factors in colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology* 2003; **124**(1): 57–70.
- [43] OZOLS RF, LOUIE KG, PLOWMAN J, BEHRENS BC, FINE RL, DYKES D, HAMILTON TC. Enhanced melphalan cytotoxicity in human ovarian cancer *in vitro* and in tumor-bearing nude mice by buthionine sulfoximine depletion of glutathione. *Biochem Pharmacol* 1987; **36**(1): 147–153.
- [44] PALMER HJ, PAULSON KE. Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutr Rev* 1997; **55**: 353–361.
- [45] PAOLICCHI A, LORENZINI E, PEREGO P, SUPINO R, ZUNINO F, COMPORTI M, POMPELLA A. Extra-cellular thiol metabolism in clones of human metastatic melanoma with different gamma-glutamyl transpeptidase expression: implications for cell response to platinum-based drugs. *Int J Cancer* 2002; **97**(6): 740–745.

- [46] PAULUSMA CC, VAN GEER MA, EVERS R, HEIJN M, OTTENHOFF R, BORST P, OUDE ELFERINK RP. Canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione. *Biochem J* 1999; **338**(Pt 2): 393–401.
- [47] PAYEN L, COURTOIS A, VERNHET L, GUILLOUZO A, FARDEL O. The multidrug resistance-associated protein (MRP) is over-expressed and functional in rat hepatoma cells. *Int J Cancer* 1999; **81**(3): 479–485.
- [48] POMPELLA A, DE TATA V, PAOLICCHI A, ZUNINO F. Expression of gamma-glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance. *Biochem Pharmacol* 2006; **71**(3): 231–238.
- [49] PRIEBE W, KRAWCZYK M, KUO MT, YAMANE Y, SAVARAJ N, ISHIKAWA T. Doxorubicin- and daunorubicin-glutathione conjugates, but not unconjugated drugs, competitively inhibit leukotriene C4 transport mediated by MRP/GS-X pump. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **247**(3): 859–863.
- [50] REBBEOR JF, CONNOLLY GC, HENSON JH, BOYER JL, BALLATORI N. ATP-dependent GSH and glutathione S-conjugate transport in skate liver: role of an Mrp functional homologue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; **279**(2): G417–G425.
- [51] REED JC. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol* 1997; **34**(4 Suppl 5): 9–19.
- [52] RISTOFF E, LARSSON A. Inborn errors in the metabolism of glutathione. *Orphanet J Rare Dis* 2007; **2**: 16–24.
- [53] RODRIGUEZ JF, CORDERO J, CHANTRY C, GONZÁLEZ S, RIVERA C, FEBO I, COLÓN A, DÍAZ C. Plasma glutathione concentrations in children infected with human immunodeficiency virus. *Pediatr Infect Dis J* 1998; **17**(3): 236–241.
- [54] SALERNO M, LOECHARIYAKUL P, SAENGKHAE C, GARNIER-SUILLEROT A. Relation between the ability of some compounds to modulate the MRP1-mediated efflux of glutathione and to inhibit the MRP1-mediated efflux of daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 2004; **68**(11): 2159–2165.
- [55] SCHNEIDER E, HORTON J, YANG CH, NAKAGAWA M, COWAN KH. Multidrug resistance-associated protein gene overexpression and reduced drug sensitivity of topoisomerase II in a human breast carcinoma MCF-7 cell line selected for etoposide resistance. *Cancer Res* 1994; **54**: 152–158.
- [56] SCHULZ JB, LINDENAU J, SEYFRIED J, DICHGANS J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 2000; **267**(16): 4904–4911.
- [57] SEN CK, PACKER L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 1996; **10**(7): 709–720.
- [58] TANIGUCHI M, YASUTAKE A, TAKEDOMI K, INOUE K. Effects of N-nitrosodimethylamine (NDMA) on the oxidative status of rat liver. *Arch Toxicol* 1999; **73**(3): 141–146.
- [59] TEODORI E, DEI S, SCAPECCHI S, GUALTIERI F. The medicinal chemistry of multidrug resistance (MDR) reversing drugs. *Il Farmaco* 2002; **57**(5): 385–415.
- [60] TEW KD. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res* 1994; **54**: 4313–4320.
- [61] TIPNIS SR, BLAKE DG, SHEPHERD AG, MCLELLAN LI. Overexpression of the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase in HeLa cells increases gamma-glutamylcysteine synthetase activity and confers drug resistance. *Biochem J* 1999; **337**(Pt 3): 559–566.
- [62] TOWNSEND DM, TEW KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 2003; **22**(47): 7369–7375.
- [63] VAHRMEIJER AL, HOETELMANS RW, MULDER GJ, SCHUTRUPS J, VAN VLIERBERGHE RL, VAN DE VELDE CJ, VAN DIERENDONCK JH. Development of resistance to glutathione depletion-induced cell death in CC531 colon carcinoma cells: association with increased expression of bcl-2. *Biochem Pharmacol* 2000; **59**(12): 1557–1562.
- [64] VAN BLADEREN PJ. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem Biol Interact* 2000; **129**: 61–76.
- [65] VERSANTVOORT CH, BROXTERMAN HJ, BAGRIJ T, SCHEPER RJ, TWENTYMAN PR. Regulation by glutathione of drug transport in multidrug-resistant human lung tumour cell lines overexpressing multidrug resistance-associated protein. *Br J Cancer* 1995; **72**(1): 82–89.
- [66] YOSHIDA A, TAKEMURA H, INOUE H, MIYASHITA T, UEDA T. Inhibition of glutathione synthesis overcomes Bcl-2-mediated topoisomerase inhibitor resistance and induces nonapoptotic cell death via mitochondrial-independent pathway. *Cancer Res* 2006; **66**(11): 5772–5780.

- [67] YOUNG LC, CAMPLING BG, VOSKOGLU-NOMIKOS T, COLE SP, DEELEY RG, GERLACH JH. Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response. *Clin Cancer Res* 1999 Mar; **5**(3): 673–680.
- [68] ZAMAN GJ, LANKELMA J, VAN TELLINGEN O, BEIJNEN J, DEKKER H, PAULUSMA C, OUDE ELFERINK RP, BAAS F, BORST P. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**(17): 7690–7694.
- [69] ZEMBRON-ŁACNY A., SZYSZKA K., SOBAŃSKA B., PAKUŁA R. Przemiana glutationu we krwi biegaczy średniodystansowych. *Borgis Nowa Medycyna* 1999; **7**: 20–22.

Redaktor prowadzący – Jan Żeromski

Otrzymano: 07.10. 2009 r.

Przyjęto: 02.11. 2009 r.

mgr Ewa Karwicka

Narodowy Instytut Leków, Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków,

ul. Chelmska 30/34, 00-725 Warszawa

e-mail: ewa@il.waw.pl