

Nitro grubu İçeren Bazı Maddelerin Glutatyon Redüktaz Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkisinin İncelenmesi

Investigation of Inhibition Effect of Nitro Group Containing Substances on Glutathione Reductase Enzyme

Afşin Ahmet KAYA¹, Murat ŞENTÜRK², Elif ÇELENK KAYA³

ÖZ

Glutatyon redüktaz (Glutatyon: NADP⁺ oksidoredüktaz, EC 1.8.1.7; GR) düşük (GSH) veya yüksek molekül ağırlıklı (GSSG) disülfid substratları ile indirgenmiş piridin nükleotidleri (NADPH) arasında elektron transferini katalizler. GR inhibitörleri son zamanlarda anti-sıtma ve kansere karşı faaliyetlerinin keşfedilmesi nedeniyle oldukça popüler hale gelmiştir.

Enzimatik aktivite ölçümü Beutler metodu ve spektrofotometre kullanılarak 25°C'de yapıldı. Ölçüm sistemi 100 mM Tris-HCl tamponunda (pH 8;0), 0,5 mM EDTA, 3,3 mM GSSG ve 0,1 mM NADPH içeriyordu. Nitrobenzen (**1**), 3,5-dinitrosalisilik asit (**2**), (2,4-dinitrofenil) ((4-(prop-1-en-2-yl) sikloheks-1-enil)-metil) sulfan (**3**), ((7,7-dimetilbisiklo [2.2.1] heptan-1-il)metil)-(2,4-dinitrofenil)sulfan (**4**) ve ((2-kloro-7,7-dimetilbisiklo [2.2.1] heptan-1-il)metil)-(2,4-dinitrofenil)sulfan (**5**) maddelerinin GR enzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisi incelendi.

İnhibisyon etkisi gösteren maddeler için % aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC₅₀ değerleri bulunmuştur. Bu maddelerin GR için IC₅₀ değerlerinin mikromolar seviyesinde olduğu gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Kükürt Atomlu Nitroli Bileşik, Glutatyon Redüktaz, İnhibitör.

ABSTRACT

Glutathione reductase (Glutathione: NADP⁺ oxidoreductase, EC 1.8.1.7; GR) catalyzes electron transfer between reduced (GSH) or high molecular weight (GSSG) disulfide substrates and reduced pyridine nucleotides (NADPH). Discovery of glutathione reductase (GR) inhibitors has become very popular recently due to antimalarial and anticancer activities.

Enzymatic activity was measured by Beutler's method with a Spectrophotometer, at 25°C. The assay system contained 100 mM Tris-HCl buffer pH 8.0, including 0.5 mM EDTA, 3.3 mM GSSG and 0.1 mM NADPH. Inhibition effects of Nitrobenzene (**1**), 3,5-Dinitrosalicylic acid (**2**), (2,4-Dinitrophenyl)((4-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-1-enyl)-methyl)sulfane (**3**), ((7,7-dimethylbicyclo[2.2.1]heptan-1-yl)methyl)-(2,4-dinitrophenyl)sulfane (**4**), and ((2-Chloro-7,7-dimethylbicyclo[2.2.1]heptan-1-yl)methyl)-(2,4-dinitrophenyl)sulfane (**5**) compounds on GR have been investigated in vitro.

IC₅₀ values were determined by drawing % activity-[I] graphs for compounds showing inhibition effects. IC₅₀ values of GR for these substances were observed to be at micromolar level.

Keywords: Nitrogen Compounds with Sulfur Atom, Glutathione Reductase, Inhibitor.

*Bu çalışma AİÇÜ BAP projesi ile (ECZF.19.001.) desteklenmiştir.

¹Doç. Dr., Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Acil Yardım ve Afet Yönetimi Bölümü, afsinakaya@gumushane.edu.tr, ORCID: 0000-0003-2082-6478

²Doç. Dr., Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Ağrı, Türkiye, senturkm36@gmail.com, ORCID: 0000-0002-9638-2896

³Doç. Dr., Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, İş Sağlığı ve Güvenliği Bölümü, elifckaya@gumushane.edu.tr, ORCID: 0000-0002-7811-7669

İletişim / Corresponding Author: Afşin Ahmet KAYA
e-posta/e-mail: afsinakaya@gumushane.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 07.11.2019
Kabul Tarihi/Accepted: 25.12.2019

GİRİŞ

Serbest radikaller aerobik organizmalarda solunum sırasında vücuttaki normal reaksiyonlarla üretilir. Biyolojik sistemlerde, süperoksit anyon radikalleri, hidrojen peroksit vb. gibi reaktif oksijen türleri (ROT) şeklinde de üretilebilirler. Sağlıklı bireylerde doğal antioksidan savunma arasında denge vardır. Hem canlı organizmalardan hem de ekzojen kaynaklardan üretilen sistem ve ROT dengededir. Antioksidan-oksidan dengenin bozulması, ROT, yaşa bağlı dejeneratif hastalıklar, kanser, diyabet, artrit ve kardiyovasküler hastalıklara yol açan lipidler, proteinler ve DNA gibi bir hücrenin bileşenlerinde tahrip edici ve geri dönüşümsüz hasara yol açar.¹⁻³

Bir flavoprotein olan Glutasyon redüktaz (GR), hücrede önemli bir enzimdir ve hücre içi türlerin redoks hallerinin sürdürülmesinde, serbest radikallerin ve reaktiflerin temizlenmesinde kritik bir rol oynar. Hemoglobinin yapısında yer alan, hemoglobinin proteinsiz kısmına yani hemoglobin'in oksijen taşıyıcı unsuruna hem denir. Oksijen türleri, hücre içi sinyal iletimi ve yüksek GSH / GSSG oranını koruyarak gen düzenlemesinde etkin rol oynamaktadır.³ Normal koşullar altında, glutasyon esas olarak indirgenmiş formda (GSH) bulunur, bununla birlikte, hücrenin oksidatif stresine tepki olarak hızlı bir şekilde GSSG'ye oksitlenebilir. Buna rağmen, GR, NADPH ile GSSG'yi GSH'ye indirger ve GSH / GSSG'nin hücre içi mol oranını %99'un üzerinde tutar. GSH'nin sayısız hücresel süreçteki kilit işlevi nedeniyle, GSH seviyeleri ve GSH / GSSG oranı, Alzheimer, AIDS, diyabet, kardiyovasküler hastalık ve kanser gibi sayısız insan hastalığı ile ilişkilendirilmiştir.^{3,4} Ayrıca GSH hem'in detoksifikasyonunda kullanılır ve hücre içi GSH miktarındaki artış klorokin direncinin gelişmesinden sorumlu olmuştur.^{4,5} Öte yandan, glutasyon redüktaz inhibitörlerinin sıtma karşıtı ve antikanser aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur.⁶

Grellier ve arkadaşları GR'nin güçlü veya zayıf inhibitörleri olan bir dizi homolog nitroaromatik bileşiğin antiplazmodial aktivitesini göstermiştir.⁷ Başka bir

araştırmada ise geri dönüşü olmayan yeni bir GR inhibitörü 2-asetilamino-3-[4-(2-asetilamino-2-karboksietil sülfanil tiyokarbonil amino) fenil tiokarbamoil sülfanil] propiyonik asidin (2-AAPA) seçildiğini ve GSH seviyesinin azaldığını GSSG seviyesinin ise arttığını gösterdi. Maya GR enzimi ile 2-AAPA molekülü için yapılan bu çalışma sonucunda, NADH/NAD⁺ ve NADPH/NADP⁺ ve antikanser aktivitelerinin oranlarını arttırdığı ve bu enzimi inhibe ettiği gözlenmiştir.⁸ Son zamanlarda, 7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol halka türevlerine dayanan, bazı insan kanser hücre hatlarında etkili olan yeni bir nonpeptidomimetik inhibitör sınıfı tanımlanmıştır.⁹ Bunların arasında, bileşik 6-(7-nitro 2,1,3-benzoksadiazol-4-iltiyo) heksanol (NBDHEX)'in mikromolar veya submikromolar miktarlarda birkaç tümör hücre hattında apoptozu indükleyerek inhibe ettiği gösterilmiştir.⁹⁻¹¹ Ayrıca NBDHEX diğer ilaçlarla kombinasyon halinde, lösemi ve küçük hücreli akciğer kanserlerinde P-glikoprotein ve MRP1 (Multidrug Resistance Protein 1: Çoklu ilaç direnç proteini 1) ile ilişkili direncin üstesinden gelebilir ve ayrıca osteosarkom ile ilişkili sisplatin direncinin üstesinden gelerek birçok kanser türünü tedavi etmek için kullanılabilir.^{11,12} Tang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre, p-nitro kafeik asit fenil esteri (p-NO₂-CAPE)'nin anti-kolon kanseri aktivitesini arttırdığı ve elde edilen verilere göre p-NO₂-CAPE'nin, G₀/G₁ fazında kolon kanseri hücre ölümü, apoptoz ve hücre döngüsü durmasının uyarılmasında CAPE'den daha etkili olduğunu gösterdi. p53 yolundaki (pozitif ve negatif geri beslenme döngüleri) bağlı proteinlerin düzenlenmesi ve tümör büyümesinin inhibe edilmesinde etkilidir. Ayrıca, pNO₂-CAPE, VEGF (vasküler endotel büyüme faktörü) ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir.¹³ Günümüzde, flutamid ve nilutamid, yapılarında nitro grubunu içeren, prostat karsinomunun tedavisinde yaygın olarak kullanılır antiandrojenik ilaçlardır. Total androjen blokajı ile sonuçlanan, luliberin agonistleriyle birlikte kullanılırlar.^{14,15}

Çalışmamızda, yeni GR inhibitörlerinin keşfedilmesine yönelik olarak, bazı nirto grup içeren moleküllerin (1-5) inhibisyon değerlerini belirledik. İnhibisyon değerleri

IC₅₀ olarak rapor edildi ve sonuçlar en az üç bağımsız deneyin ortalaması olarak hesaplandı.

MATERYAL VE METOT

Glutasyon Redüktaz İnhibisyonu

GR aktivitesi, Beutler metoduyla ölçülmüştür.¹⁶ Bir enzim birimi, 25 °C, pH 8,0'da deney koşulu altında dakikada 1 mmol NADPH'ın oksidasyonu olarak tanımlanmaktadır. Farklı inhibitör konsantrasyonları kullanıldı ve tüm bileşikler, kullanılan her konsantrasyonda üç paralel numune halinde test edildi. Kontrol küvetlerinin aktivitesi inhibitör yokluğunda %100 olarak kabul edildi. Her inhibitör için bir Aktivite %-[İnhibitör] grafiği çizildi.

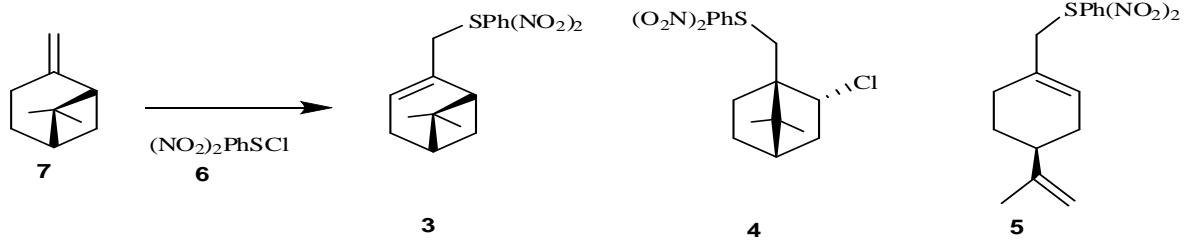
Veri Toplama Araçları ve Yöntem

Yapılan çalışmalarda kullanılan (NADPH), (GSSG), (HCl), (EDTA) protein tahlil reaktifi ve diğer kimyasal maddeler

Sigma Chem'den Sigma Chem. Comp.'den satın alınmıştır. Nitrobenzen (1), 3,5-Dinitrosalisilik asit (2) ve terpenoid türevi bileşiklerinin (3-5) inhibisyon etkisi *in vitro* olarak incelenmiştir.

3-5 Numaralı Bileşiklerin Sentezi

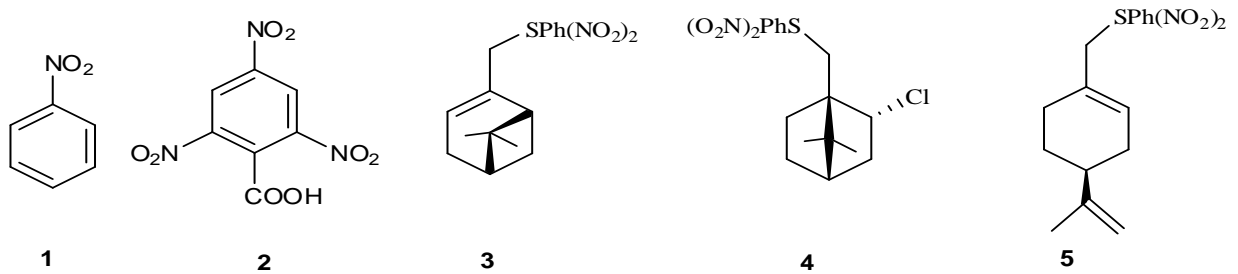
2,4-Dinitrobenzen-sülfenil klorür (6)'nın (2.0 g, 8.4 mmol) dikloroetandaki çözeltisi (100 ml) bir balona (250 ml) konuldu ve buna β-pinen (7)'in (2.32 g, 17 mmol) dikloroetandaki (20 ml) çözeltisi 10 dakikada ilave edildi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 2 gün karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi yardımı ile çıkış bileşikleri tamamen bittiği için reaksiyon sonlandırıldı (Şekil 1). Sonra çözücü evaporatörde uzaklaştırıldı



Şekil 1. 3-5 Numaralı Bileşiklerin Sentezi.

. Ham ürün silika-jel kolondan (100 g) EtOAc/hekzan (1/5) ile saflaştırıldı. Kolondan sırayla 3 tane ürün 3 (%52, 744 mg), 4 (%12, 189 mg) ve 5 (%35, 508 mg) elde edildi.¹⁷ Bu

çalışmada bazı nitrolu moleküllerin (1-5) (Şekil 2) GR inhibisyonu hakkında bilgi verilmektedir.



Şekil 2. Çalışmada Kullanılan Maddeler.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Önceki çalışmalarda GR'nin farklı organizmalardan birçok kez saflaştırıldığı ve çeşitli kimyasalların, pestisitlerin ve ilaçların etkileri üzerindeki etkisi araştırıldığı bilinmektedir.¹⁸⁻²⁰ Bu çalışmada GR enzim aktivitesi Beutler yöntemiyle belirlendi. Ayrıca NADPH ve GSSG substrat olarak kullanıldı ve aynı yöntem kullanılarak enzim inhibisyon çalışmaları yapıldı.¹⁶

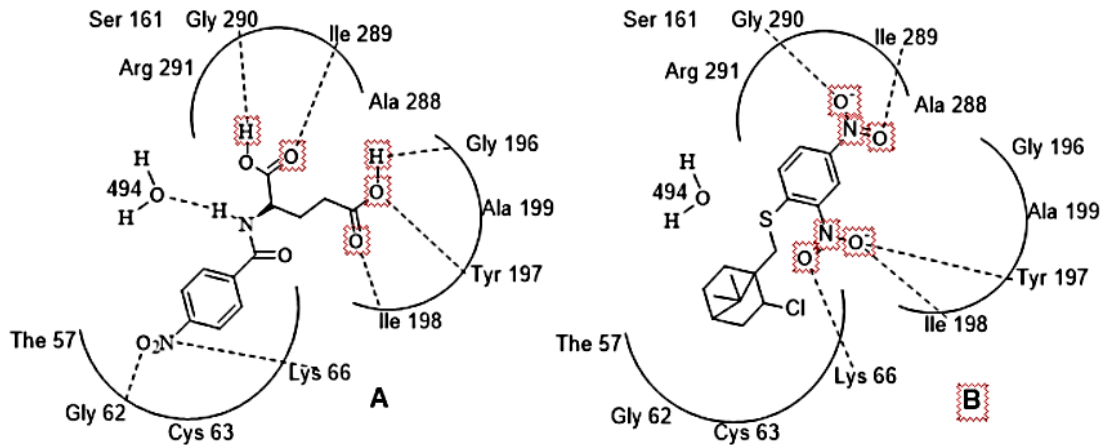
Tablo 1. 1-5 Numaralı Bileşiklerin GR Enzimi İçin IC₅₀ Değerleri. (* Değerler Üç Bağımsız Denemenin Ortalamasıdır. ^A Ref. 21).

İnhibitör	IC ₅₀ değeri (µM)*
1	5876 ± 176,2
2	2394 ± 113
3	1085 ± 107
4	593 ± 21,1
5	897 ± 34,6
N,N-bis(2-kloroetil)-N-nitrosoüre	645 ^a

Tablo 1'deki veriler, GR ile 1-5 bileşiklerinin inhibisyonu ile ilgili sonuçların, N, N-bis (2-kloroetil) -N-nitrosoüre (GR inhibitörü ve antikanser ilacı) ile karşılaştırıldığını göstermektedir.²¹

Yapılan çalışmalarda spesifik bir GR inhibitörü olan N,N-bis(2-kloroetil)-N-nitrosoüre güçlü bir inhibitördür (645 µM). 1-3 numaralı maddeler için IC₅₀ değerleri 1085-5876 µM aralığında çıkmıştır. Bu madde grubu için sonuçlar N,N-bis (2-kloroetil) -N-nitrosoüre ile karşılaştırıldığında orta seviyeli GR inhibitörleri oldukları söylenebilir. 4 ve 5 numaralı bileşiklerle N,N-bis(2-kloroetil)-N-nitrosoüre inhibisyon sonuçları kıyaslandığında güçlü inhibitörler olduğu görülmektedir.

Nitröz bileşiğin (N-p-Nitrobenzoil-L-glutamik asit) GR enzimi ile öngörülen bağlanma şablonu, daha önce insiliko (docking) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.²² Bu çalışmada, 4 numaralı madde için benzer bir bağlama modeli olduğunu öneriyoruz (Şekil 3).



Şekil 3. A: Glutasyon Redüktaz ve N-p-Nitrobenzoil-L-Glutamik Asit Bağlama Modeli.²² **B:** 4 Numaralı Bileşik Ve Glutasyon Redüktazın Tahmini Bağlanma Modeli.

Bu çalışmada, GR enzimi ile ilaçlar veya diğer inhibitör sınıflarına kıyasla farklı bir şekilde etkileşime giren yeni bir verimli GR inhibitörü sınıfı bildirilmiştir. Bu yeni inhibitör sınıfı, Seefeldt, ve arkadaşlarının

yaptığı çalışma ile kıyaslandığında enzim aktif bölge içindeki glutasyon bağlanma bölgesi arasında bulunan diğer tüm GR inhibitörlerinden farklı şekilde bağlandığı düşünülmektedir. Diğer aktif sınıflara kıyasla

GR aktif bölgesindeki amino asit kalıntıları ve su molekülleri ile farklı şekilde etkileşmiştir, yaptığımız bu çalışmadaki sonuçlar klinik

olarak kullanılan inhibitörlere kıyasla daha iyi bir inhibisyon profiline sahip bileşikler tasarlamaya yardımcı olduğu gözlenmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda farklı birçok grup tarafından yapılan çalışmalarda, nitro grubu içeren moleküllerin birçok kanser türüne karşı etkili olduğu belirlenmiştir.⁹⁻¹⁵ Turella ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 6-(7-nitro 2,1,3-benzoksadiazol-4-iltiyo) heksanol (NBDHEX)'in birkaç tümör hücre hattında apoptozu indükleyerek inhibe ettiğini göstermiştir.²³ Tang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise, kafeik asit fenil esteri (CAPE)'nin para nitro türevinin, kolon kanseri hücre ölümü, apoptoz ve hücre döngüsü durmasının uyarılmasında CAPE'den daha etkili olduğunu göstermiştir. Ascione ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise leukemia tedavisinde nitroli bileşiklerin diğer denenen moleküllerden daha etkili olduğu belirlenmiştir.²⁴ GR, yüksek GSH/GSSG

oranını koruyarak tiyol redoks durumu homeostazında kritik bir rol oynar.²⁵ Fizyolojik olarak elzem olmasına rağmen, insan hücreSEL GSH havuzu ayrıca tümör oluşumunu ve antikanser ilaçlara karşı direnci artırabilir.²⁶ Bu yüzden, GR'nin blokajı, çeşitli onkolojik hastalıkları tedavi etmek için atarapik bir yöntem olarak ortaya çıkar. Bulgularımız, 3-5 numaralı bileşiklerin GR'yi inhibe ederek kötü huylu kanser hücrelerinin tedavisinde etkin ilaç hammaddesi olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar özellikle 3-5 numaralı maddelerin kanser tedavisinde kullanılabilme potansiyeli olduğunu göstermektedir, ancak daha kesin sonuçlar için *in vivo* ve/veya klinik çalışmalarla doğrulanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Schirmer, RH, Krauth-Siegel, RL, Schulz, GE, (1989). Glutathione Reductase, John Wiley and Sons, New York, pp. 553-596.
2. Kocaoglu, E, Talaz, O, Cavdar, H, Senturk, M, Supuran, CT, Ekinci, D. (2018). Determination of the inhibitory effects of N-methylpyrrole derivatives on glutathione reductase enzyme. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2018, 34, 51-54.
3. Krauth-Siegel, RL, Bauer, H, Schirmer, RH. (2005). Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. Angewandte Chemie International Edition, 44, 690-715.
4. Pastore, A, Federici, G, Bertini, E, Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. Clinical Chimica Acta, 333, 19-39.
5. Perricone, C, De Carolis, C, Perricone, R. (2009). Glutathione: a key player in autoimmunity. Autoimmunity Reviews, 8, 697-701.
6. Biot, C, Bauer, H, Schirmer, RH, Davioud-Charvet, E. (2004). 5-Substituted tetrazoles as bioisosteres of carboxylic acids. Bioisosterism and mechanistic studies on glutathione reductase inhibitors as antimalarials. Journal of Medicinal Chemistry, 47, 5972-5983.
7. Grellier, P, Sarlauskas, J, Anusevicius, Z, Maroziene, A, Houee-Levin, C, Schrevel, J, et. al. (2001). Antiplasmodial activity of nitroaromatic and quinoidal compounds: Redox potential vs inhibition of erythrocyte glutathione reductase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 393, 199-206.
8. Zhao, Y, Seefeldt, T, Chen, W, Wang, X, Matthees, D, Hub, Y, et. al. (2009). Effects of glutathione reductase inhibition on cellular thiol redox state and related systems. Archives of Biochemistry and Biophysics, 485, 56-62.
9. Ricci, G, De Maria, F, Antonini, G, Turella, P, Bullo, A, Stella, L, et al. (2005). 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatives, a new class of suicide inhibitors for glutathione S-transferases. Mechanism of action of potential anticancer drugs. Journal of Biological Chemistry, 280, 26397-26405.
10. Ascione, A, Cianfriglia, M, Dupuis, ML, Mallano, A, Sau, A, Pellizzari Tregno, F, et al. (2009). The glutathione S-transferase inhibitor 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol overcomes the MDR1P-glycoprotein and MRP1-mediated multidrug resistance in acute myeloid leukemia cells. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 64, 419-424.
11. Pasello, M, Michelacci, F, Scionti, I, Hattinger, CM, Zuntini, M, Caccuri, AM, et al. (2008). Overcoming glutathione S-transferase P1-related cisplatin resistance in osteosarcoma. Cancer Research, 68, 6661-6668.
12. Zhuo, R, Kosak, KM, Sankar, S, Wiles, ET, Sun, Y, Zhang, J, et al. (2014). Targeting Glutathione S-transferase M4 in Ewing sarcoma. Frontiers in Pediatrics, 83, 1-9.
13. Tang, H, Yao, X, Yao, C, Zhao, X, Zuo, H, Li, Z. (2017). Anti-colon cancer effect of caffeic acid p-nitro-phenethyl ester in vitro and in vivo and detection of its metabolites. Scientific Reports, 7, 7599, 1-11.
14. Noguchi, K, Uemura, H, Harada, M, Miura, T, Moriyama, M, Fukuoka, H, et al. (2001). Inhibition of PSA flare in prostate cancer patients by administration of flutamide for 2 weeks before initiation of treatment of slow-releasing LH-RH agonist. International Journal of Clinical Oncology, 6, 29-33.
15. Olender, D, Żwawiak, J, Zaprutko, L. (2018). Multidirectional Efficacy of Biologically Active Nitro Compounds Included in Medicines. Pharmaceuticals, 11, 54, 1-29.
16. Beutler E. (1984). Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods. Orlando: Grune and Stratton Inc. p 134.

17. Ozturk Sarikaya, SB, Kaya, AA, Celenk Kaya, E, Senturk, M. (2015). Synthesis and determination of some biological activities of novel 2,4-dinitrophenyl derivatives. *Archive der Pharmazie, Chemical Life Science*, 348, 214-220
18. Senturk, M, Kufrevioglu, OI, Ciftci, M. (2009). Effects of some analgesic anaesthetic drugs on human erythrocyte glutathione reductase: an in vitro study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24, 420-424.
19. Akkemik, E, Senturk, M, Ozgeris, FB, Taser, P, Ciftci, M. (2011). In vitro effects of some drugs on human erythrocyte glutathione reductase. *Turkish Journal of Medicinal Science*, 41, 235-241.
20. Ekinci, D., Senturk, M. 2013. Assesment of metal inhibition of antioxidant enzyme glutathione reductase from rainbow trout liver. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 28 (1) 11-15.
21. Seefeldt, T, Zhao, Y, Chen, W, Raza, AS, Carlson, L, Herman, J, et. al. (2009). Characterization of a Novel Dithiocarbamate Glutathione Reductase Inhibitor and Its Use as a Tool to Modulate Intracellular Glutathione. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 2729-2737.
22. Cakmak, R, Durdagi, S, Ekinci, D, Senturk, M, Topal, G. (2011). Design, synthesis and biological evaluation of novel nitroaromatic compounds as potent glutathione reductase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 5398-5402.
23. Turella, P, Filomeni, G, Dupuis, ML, Ciriolo, MR, Molinari, A, De Maria, F, et al. (2006). A strong glutathione S-transferase inhibitor overcomes the P-glycoprotein-mediated resistance in tumor cells. 6 (7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio) hexanol (NBDHEX) triggers a caspase-dependent apoptosis in MDR1-expressing leukemia cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 23725-23732.
24. Ascione, A, Cianfriglia, M, Dupuis, ML, Mallano, A, Sau, A, Pellizzari Tregno, F, et al. (2009). The glutathione S-transferase inhibitor 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol overcomes the MDR1-P-glycoprotein and MRP1-mediated multidrug resistance in acute myeloid leukemia cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64, 419-425.
25. Couto, N, Wood, J, Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biological Medicine*. 95, 27-42.
26. Benhar, M, Shytaj, IL, Stamler, JS, Savarino, A. (2016). Dual targeting of the thioredoxin and glutathione systems in cancer and HIV. *Journal of Clinical Investigate*, 126,1630-1639.