

Kanser Kemoterapisinde Terapötik Hedef Olarak Glutatyon S-Transferazlar

Geliş Tarihi : 15.05.2007
Düzelme Tarihi : 10.12.2007
Kabul Tarihi : 17.12.2007

Birsen Tozkoparan*o, Sevim Peri Aytaç*

Giriş

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, invazif nitelik kazanması ve metastaz yapması ile kendini gösteren ve halen gelişmiş ülkelerin ölüm istatistiklerinde kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan öldürücü bir hastalıktır. Genel olarak bakıldığında erişkin kanser hastalarında sağkalım 1960'larda %39 iken bu oran 1990'larda %60'a ulaşmıştır. Sağkalım oranlarında görülen bu artış, kombine tedavi yaklaşımının bir sonucudur. Günümüzde kanser tedavisi cerrahi, kemoterapi ve radyoterapinin kombinasyonu şeklinde uygulanmaktadır. İlkinde amaç tümörlü doku veya organın uzaklaştırılması, son ikisinde ise kanser hücrelerinin öldürülmesidir^{1, 2}.

Antikanser ilaçların çoğu sitotoksik etkileri ile malign hücrelerin büyüme ve çoğalmalarını önlerler ve onların ölümüne yol açarlar. Radikal bir tedavi vücutta tek bir malign hücre kalmaksızın tüm hücrelerin yok edilmesi ile mümkündür. Ancak böyle bir durum az sayıdaki istisnalar dışında halen varolan ilaçlarla sağlanamamaktadır. Antineoplastik ilacın terapötik etkinliğini kısıtlayan önemli bir faktör, tümör hücrelerinin ilaca azalmış hassasiyeti, bir başka deyişle ilaca karşı direnç gelişimidir. Bu durum bazı kanser türünde kendiliğinden olabildiği gibi (doğal veya primer rezistans), kemoterapiden sonra da gelişebilir (kazanılmış veya sekonder rezistans)².

* Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı 06100 Sıhhiye/Ankara

o Corresponding Author: E-mail: tbirsen@hacettepe.edu.tr. Tel: +90 312 305 30 20 Fax: +90 312 311 47 77

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, tümör büyümesinin başlangıçtan sonraki dönemlerinde klonal homojenliğini sürdürmediği gösterilmiştir. Michael M. Gottesman³, Tolstoy'un Anna Karenina eserinde söylediği "mutlu aileler birbirlerine benzerler, mutsuzların herbirinin sebebi başkadır" sözünü kanser olgusuna uyarlayarak "normal hücrelerin hepsi ilaçlara benzer şekilde cevap verirler; oysa kanser hücrelerinin her biri kendilerine özgü şekilde cevap verirler" diyor. Bu yaklaşımda da ifade edilmeye çalışıldığı gibi, görünüm olarak benzer olan, aynı malign hücreden gelişen kanser hücreleri biyokimyasal, morfolojik ve ilaca yanıt verme karakteristikleri bakımından farklılık gösterirler. Sözü edilen heterojenlik esas olarak başlangıçtaki tümör hücresi klonunun tekrarlanan bölünmeler sırasında mutasyona uğraması ile ilişkilendirilmiştir. Kanser hücrelerinde kemoterapötik ilaca direnç gelişimi, azalmış ilaç birikimi, artmış ilaç metabolizması ve ilaç etkinliğindeki değişiklikler gibi pek çok faktörle ilişkili olabilir (Tablo I)¹⁻⁴.

TABLO I

Antikanser ilaçlara direnç gelişiminin olası mekanizmaları

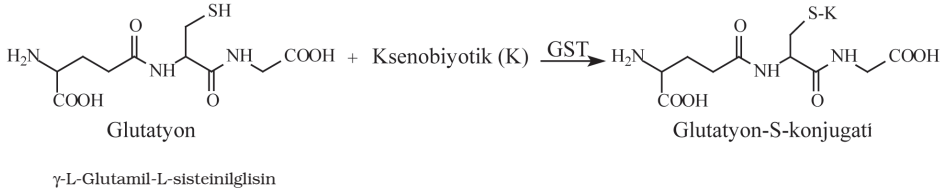
<p>Azalmış İlaç Birikimi Membran lipitlerinde değişiklik Hücre yüzeyinde ilacın spesifik olduğu reseptörlerin veya taşıyıcılarının kaybı İlacın hücre dışına atılmasını sağlayan taşıyıcıların etkisinde artış (170 kDa P-glikoprotein, P-gp) ve çoklu ilaç direnci proteininin (multidrug resistance protein, MRP) aşırı ekspresyonu).</p> <p>İlaç Metabolizmasındaki Değişiklikler İlacın biyoaktivasyonunda azalma Metabolik enzimlerin fazla salgılanması sonucu ilacın inaktivasyonunda artma Yükselmiş hücre içi γ-L-glutamil-L-sisteinilglisin (glutatyon, GSH) konsantrasyonu</p> <p>İlacın Etkinliğinde Değişiklikler Hücresel hedeflerdeki değişiklikler İlaçla oluşan hasarın iyileşmesinde artış veya tolerans gelişmesi</p>

Yukarıda belirtilen ve kanser hücresinin biyokimyası ile ilgili direnç mekanizmalarından başka hücrenin çoğalma (proliferasyon) kinetiği, ilacın tümör içerisindeki kapillerlerden kapiller çevresindeki hücreler içerisine yayılmasının kısıtlılığı ve ayrıca tümörün vaskülarizasyon durumu ile ilgili direnç mekanizmaları da vardır¹.

Kanser tedavisinde kullanılan en önemli ilaç gruplarından biri alkilleyici bileşiklerdir. Bu grup bileşiklere direnç gelişmesi, ilaca

karşı permeabilitenin değişmesi ve hücrede GSH ve glutatyon transferaz (GT) seviyelerinin artması ile ilişkilendirilmiştir. Hücrede bol miktarda bulunan GSH, tiyol içeren bir tripeptittir. Vücutta, 30 μM 'dan (plazmada) 3.0 mM'lara kadar (böbrek proksimal tübüllerinde) değişen konsantrasyonlarda bulunur. Bu miktarların çeşitli organların tümörlerinde 10 mM'a kadar eriştiği bildirilmiştir⁵⁻⁷.

Glutatyon transferazlar, tanımlandığından beri kullanılan ismiyle glutatyon S-transferazlar, endojen ve ekzojen kaynaklı, elektrofilik ve hidrofobik bileşiklerin glutatyon ile konjugasyonunu sağlayarak, genellikle daha kolay atılabilen ve daha az toksik metabolitlere dönüşümünü katalizleyen Faz-II detoksifikasyon enzim ailesidir (Şekil-1) (Tablo II)⁸⁻¹⁴.



Şekil 1

Glutatyonun (GSH) ksenobiyotiklere glutatyon transferaz (GST) katalizli reaksiyonu

TABLO II

GST'lerin Substratları

Endojen Substratlar
Kateşolaminler ve dopaminin O-kinonları (μGST)
Prostaglandinler (mikrozomal GSTs, αGSTs , μGSTs)
Reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulan lipid peroksidasyon ürünleri (αGSTs , μGSTs)
Eksojen Substratlar
Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (μGSTs)
α,β -Doymamış aldehytler (πGSTs)
Epoksit içeren bileşikler (θGSTs)
Kemoterapötik bileşikler (πGSTs , αGSTs)

Tabiatta glutatyon transferaz aktivitesi gösteren enzimler, sitosolik, mitokondriyal ve mikrozomal (membran bağlı-MAPEG) olmak üzere üç alt gruptan oluşmaktadır¹⁵⁻¹⁷. Memelilerde sitosolik GST'lar, kimyasal

özellikleri, immünolojik reaktiviteleri ve amino asit diziliş benzerliklerine göre alfa (α), pi (π), mü (μ), teta (θ), sigma (σ), zeta (ζ) ve omega (ω) olarak 7 gruba ayrılırlar^{13, 18-23}. Sitosolik GST'lar her bir alt ünitesi yaklaşık 25 kD ağırlığında bulunan, dimerik proteinlerdir. Her bir alt ünite, iki farklı fonksiyonel bölgeden oluşan bir aktif konuma sahiptir. Bu fonksiyonel bölgeler, fizyolojik substratı (GSH) bağlayan hidrofilik G bölgesi ile yapısal olarak farklı elektrofilik substratları bağlayan hidrofobik H bölgesidir. GST izozimlerinin, hidrofobik H-bölgesindeki aminoasit kompozisyonunun farklılık göstermesi, enzim ailesinin substrat çeşitliliğinin nedenidir¹³.

GST izozimlerinden GSTP1-1'in çok farklı insan kaynaklı tümörde (akciğer, kolon, böbrek, over, ösefagus ve mide) fazla miktarda salgılandığı bildirilmiştir^{7, 24-30}. Artmış GSH/GST seviyelerinin kemoterapi tedavisinde bu sistemle metabolize olan pek çok ilacın (adriamisin, klorambusil, melfalan ve diğer nitrojen mustard vs.) metabolizmasını hızlandırarak; ilaçla hedeflenen etkiye ulaşamamasına, bir başka deyişle ilaca kazanılmış direnç gelişimine sebep olduğu gösterilmiştir^{31, 32}.

Bu bilgilere ilave olarak son yıllarda yapılan çalışmalar, π ve μ sınıf GST'ların, hücresel yaşam ve ölüm sinyal iletimine katılan, mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (mitogen-activated protein kinase-MAP kinase) yolağındaki düzenleyici rolünün de kemoterapötik ilaçlara direnç gelişmesinde etkili olduğunu göstermiştir. GSTP'nin MAP kinazlardan biri olan ve istemli hücre ölümü yolağında anahtar enzim olan JNK ile (c-Jun N-terminal kinase 1) JNK-GSTP kompleksi oluşturarak JNK'ı inhibe ettiği ve böylece nihai etkisi istemli hücre ölümü olan JNK'nın etkisini ortadan kaldırdığı bildirilmiştir³³⁻³⁷. Pekçok antikanser bileşik, MAP-kinaz yollarını, özellikle JNK ve p38 yollarını, aktive ederek istemli hücre ölümüne sebep olmaktadır^{38, 39}.

Bu nedenle kemoterapide, geleneksel elektrofilik kanser ilaçlarının (alkilleyici bileşiklerin) etkinliğinin düzenlenmesinde, GST inhibitörlerinin kullanımının faydalı olabileceği düşüncesi doğmuştur. Bu amaçla bu sistemi hedef alan çeşitli bileşikler geliştirilmiş ve hem deneysel olarak hem de klinikte denenmiştir^{37, 40, 41}.

Kemoterapötik bileşiklere gelişen direncin ortadan kaldırılmasındaki yeni tedavi yaklaşımlarından bir diğeri de, tümör hücrelerinde yükselmiş seviyelerde salgılandığı bildirilen GST enziminden (özellikle GSTP) terapötik amaçla yararlanmaktır. Bu yaklaşım kendisi inaktif olan ve

tümör hücrelerinde yükselmiş seviyelerde bulunan enzimler ile tercihan ve spesifik olarak toksinlerine dönüşen ön ilaçların uygulanmasıdır. Bu strateji bileşiğin normal dokulara toksisitesini azaltırken aktif bileşiğin tümör dokusuna artmış miktarda taşınmasını da mümkün kılmaktadır^{37, 40, 41}.

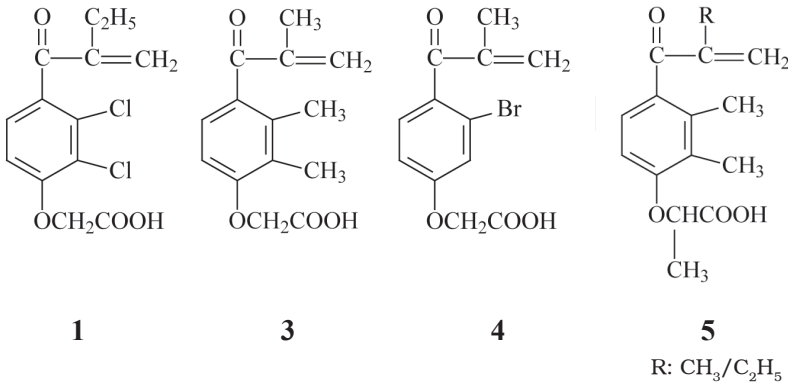
Bu derleme kapsamında geleneksel antikanser ilaçlarla kullanımda faydalı olabileceği düşünülen, toksik olmayan GSTP inhibitörleri ve GSTP enzimi ile parçalanarak toksik metabolitlerine dönüşen ön ilaçlar hakkında bilgi verilecektir.

1. GST inhibitörleri

1a. Etakrinik Asit ve Türevleri:

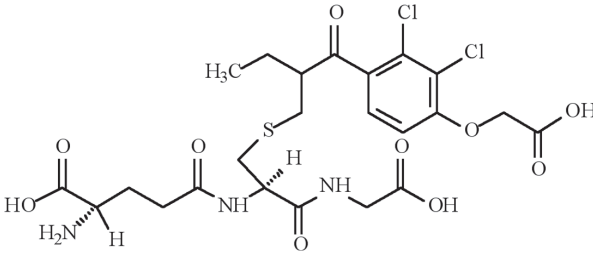
Yıllardır diüretik olarak kullanılan etakrinik asit (**1**) GST inhibitörü olarak incelenen ilk bileşiktir. Bileşik ve glutatyon konjugatının (EA-GSH) (**2**), GST izozimlerinin (α , μ ve π) geri dönüşlü kompetitif inhibitörü olduğu^{42,43}, memeli kanser hücre hatlarının etakrinik asitle önceden muamele edilmesiyle mitomisin, klorombusilin ve melfalanın sitotoksitesini arttığı gösterilmiştir⁴³⁻⁴⁵. Bu in vitro gözlemler etakrinik asidin kemoterapötik ilaçlarla kombine kullanımda faydalı olabileceğini düşündürmüş olmasına rağmen, bileşiğin klinik yararı hem diüretik etkisinin olması hem de izozim spesifik olmaması nedeniyle kısıtlı kalmıştır.

Daha sonraki yıllarda Zhao ve arkadaşları⁴⁶ tarafından etakrinik asit analogları (**3-5**) tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Bileşiklerin insan lösemi hücrelerinin lizatında (HL-60 hücreleri) GSTP üzerindeki etkisi etakrinik

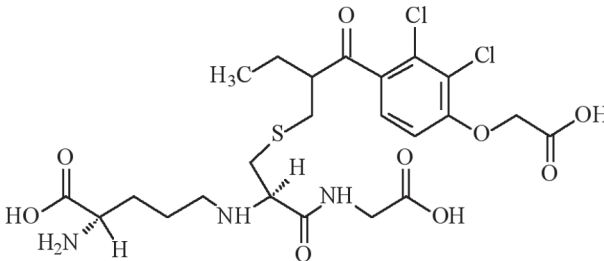


asit referans alınarak incelenmiştir. Etakrinik asitin 3' konumundaki klor yerine metil, brom ve fluor taşıyan bileşiklerde de GSTP1-1 enzim inhibisyonu aktivitenin devam etmesi, bu konumun sübstitüsyonunun aktivite için önemli olduğunu düşündürmüştür.

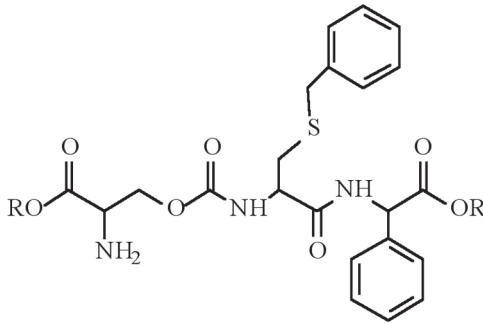
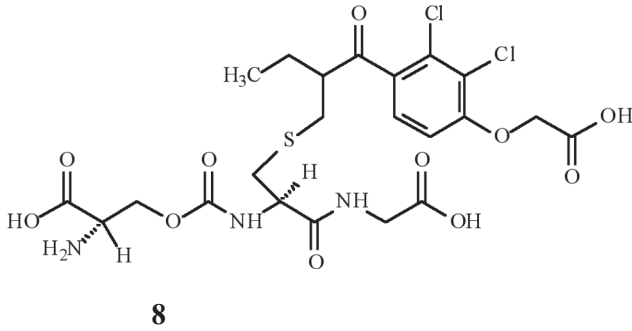
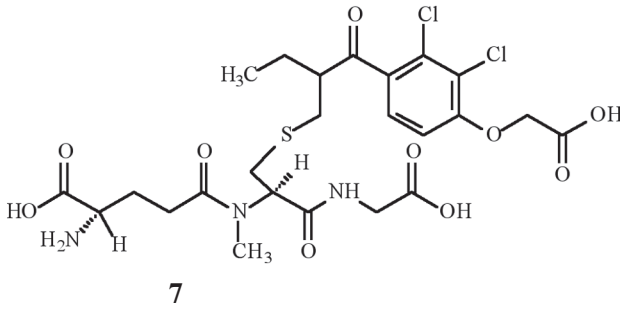
Etakrinik asidin glutatyon konjugatının (**2**), GST izozimlerinin güçlü inhibitörü olması^{47, 48} ancak γ -glutamil-transpeptidaz enzimi ile parçalanması nedeniyle in vivo ortamda dayanıklılığının olmaması yeni peptid yapısında glutatyon analoglarının sentezine sebep olmuştur. Burg ve arkadaşları⁴⁹ molekülün peptid kısmında yaptıkları moleküler değişikliklerle EA-GSH bileşiğine göre γ -glutamil-transpeptidaz enzimine daha dayanıklı bileşikler geliştirmişlerdir (**6-8**). Bileşikler arasında azalmış peptid özelliğine sahip olan bileşik **6**, sıçan karaciğer sitosolik GST'larına karşı en dikkat çekici inhibitör etkiyi göstermiştir. Sentezlenen bileşiklerde in vitro izozim seçicilik sağlanamamış olması, araştırmacıları bu grup üzerinde GSTP enzimini seçici olarak inhibe edebilecek moleküler değişiklikler yapmaya yönlendirmiştir. Şimdiye kadar sentezlenen bileşikler arasında GSTP'ye en seçici olan TLK 199 bileşiğinin yapısı esas alınarak, glutamik asit kısmında üretan analogu taşıyan bileşik **9** ve etil esteri (**10**) sentez edilmiştir⁵⁰. Bileşiğin etil esterinin, meme kanser hücrelerinde tiyotepa, sisplatin ve doksorubisine karşı gelişen direnci geri çevirdiği gözlenmiştir⁵⁰.



2



6



9 R: -H

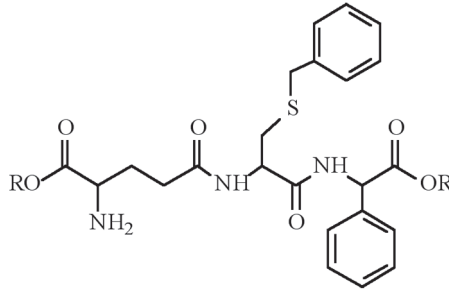
10 R: -C₂H₅

1b. Glutasyon Benzeri Bileşikler

GST'ın, GSH ve türevlerine güçlü ve seçici etki göstermesi, glutasyon benzeri peptid yapısında (peptidomimetik), enzim seçiciliği yüksek ve klinik olarak uygulanabilir bileşiklerin sentezinde çıkış noktası olmuştur. Bunlardan en önemlisi γ -glutamil-S-(benzil)-sisteinil-R(-)-fenilglisil dietil ester (TER 199, TLK 199) (**11**) yapısındaki bileşiktir. Bileşiğin hücre

içerisine girdikten sonra intraselüler esteraazlar tarafından hidroliz edilerek aktive edildiği ve aktif formunda (TLK 117) (**12**) GSTP1-1'i inhibe ettiği; bu enzimi fazla salgıladığı bildirilen pekçok hücre hattında alkilleyici ilaçların etkinliğini artırdığı bildirilmiştir⁵¹⁻⁵³. TLK 199'un çoklu ilaç direnci proteininin de (MRP-1) inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Sitotoksite deneylerinde, çoklu ilaç direnç protein geni ile genetiği değiştirilmiş (transfekte edilmiş) NIH3T3 hücrelerinde TLK 199'un, vinkristin, doksorubisin, etoposid ve mitoksantrona gelişen direnci geri çevirdiği bulunmuştur⁵³. Şu anda TLK 199, kemik iliği işlevini artırıcı (miyeloproliferatif) bileşik olarak araştırma altındadır. Kemik iliğinin normal fonksiyon yapamadığı ve yeterince normal kan hücresinin yapılamadığı hastalıklarda (miyelodisplastik sendromlu hastalarda), bileşiğin hidroklorür tuzunun enjektabl liposomlarının faz I/II çalışmaları devam etmektedir⁵⁴. TLK 199'un GST-JNK kompleksini de bozduğu bildirilmiştir³⁷.

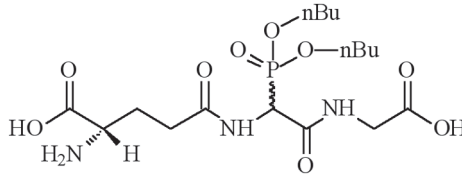
Bu grupta sentezlenen diğer türevler, GST'ların iyi inhibitörü olmalarına rağmen, kanser hücrelerinde etkili bulunmamışlardır. Bu durum türevlerin, çoklu ilaç direnci proteini gibi spesifik taşıyıcı pompalar ile hücreden atılması ve hücre içerisinde yeterli konsantrasyona ulaşamaması ile ilişkilendirilmiştir.



TLK 199 (**11**) R: -C₂H₅

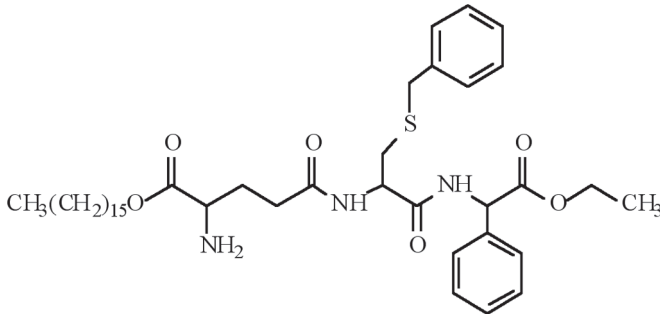
TLK 117 (**12**) R: -H

Kunze^{55, 56}, glutatyondaki tiyol grubunu, fosfonik asit esterleri [O = P(OR)₂] ile yer değiştirerek sentezlediği (S)-γ-glutamil-(2RS)-(±)-2-amino-(dialkoksifosfinil)-asetilglisin yapısındaki bir grup bileşik arasında, di-n-butil esterinin (**13**) en dikkat çekici inhibitor etkiyi gösterdiğini bildirmiştir. Bileşiğin, glutamil peptidaz enzimine dayanıklı olduğu ve insan rekombinant GSTM izozimine (IC₅₀: 4.7± 1.6 µM), GSTP'ye (IC₅₀: 15± 4 µM) göre daha fazla selektivite gösterdiği gözlenmiştir (54).



13

Nakajima ve arkadaşları⁵⁷, TLK 199'un N terminalindeki alkil esterin karbon zincirini uzatarak yeni bir grup bileşik sentezlemişlerdir. Sentezlenen bileşiklerden *O*¹-heksadesil- γ -glutamil-*S*-benzilsisteinil-*D*-fenilglisin etil esterin (**14**), kemoterapiye dirençli insan kolanjiyokarsinoma hücre hatlarında (HuCCT1) yapılan sitotoksisite deneylerinde, doza bağlı olarak adriamisin (ADR) ve 4-hidroksiperoksisiklofosamidin (4-HC) IC₅₀ değerlerini azalttığı bildirilmiştir. Bu bileşik ile kombine tedavinin, bir ksenograft modelinde ADR veya siklofosamidin antitümör aktivitesini artırdığının gözlenmesi üzerine bileşiğin dirence karşı güçlü etkili, spesifik GSTP1-1 inhibitörü olduğu bildirilmiştir.



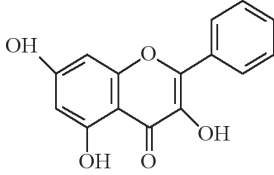
14

1c. Bitkisel Polifenolik Bileşikler:

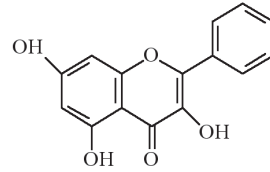
Galangin (**15**), kemferol (**16**), eriyodiktiyol (**17**) ve kersetin (**18**) gibi bazı flavonoidlerin GSTP1 geni ilave edilerek genetiği değiştirilmiş meme kanser hücrelerinde (pMTG5) yapılan deneylerde GSTP1-1 aktivitesini inhibe ettikleri bildirilmiştir. Yapılan çalışmada GSTP inhibisyonu için yapısal bir özellik belirlenememiştir. Bileşikler içerisinde özellikle galanginin 25 μ M konsantrasyonda hemen hemen tüm hücrel GSTP1-1 aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir⁵⁸. Galanginin 2 numaralı konumdaki fenil yerine 3,4-dihidroksifenil taşıyan kersetinin de önemli

bir GSTP1-1 inhibitörü bileşik olduğu bildirilmiştir^{59, 60}. Kersetinin, 100 μM konsantrasyonu ile 1 saat; 25 μM konsantrasyonu ile 2 saat inkübe edilmesi ile GSTP1-1'nin aktivitesinin tamamen inhibe olduğu gözlenmiştir. Enzimin mutant formlarıyla (C47S, C101S ve çifte mutant C47S/C101S) yapılan deneylerin sonuçlarında kersetinin, GSTP1-1'nin 47 numaralı konumdaki sistein ile bağlanan, spesifik aktif bölge inhibitörü olduğu bildirilmiştir⁶¹. Yapılan faz I klinik çalışmaları, kersetinin 1400 mg/m² dozda i.v. olarak güvenle uygulanabileceğini göstermiştir. Enjeksiyondan hemen sonra plazma düzeyinin 400 μM ; 4 saat sonra ise 1 μM 'a indiği belirtilmiştir. 1700 mg/m² dozda doz kısıtlayıcı nefrotoksisite görülmüş, ancak kemik iliği baskılanması meydana gelmemiştir⁶².

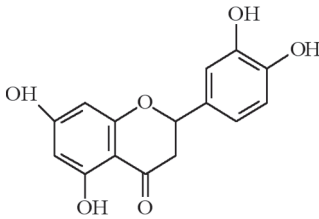
Son yıllarda yaptıkları bir çalışmada Hayeshi ve arkadaşları⁶³, polifenolik yapıda olan ve besin maddelerimizin içerisinde bulunan elajik asit (**19**) ve kurkuminin (**20**), insan rekombinant GST'larını (GSTA1-1, A2-2, M1-M1, M2-2 ve P1-1) 0.04 ila 5 μM 'a değişen konsantrasyonlarda inhibe ettiğini göstermişlerdir.



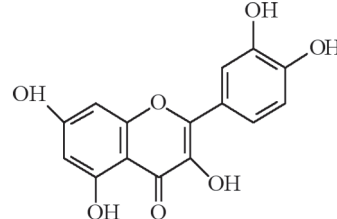
15



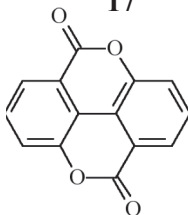
16



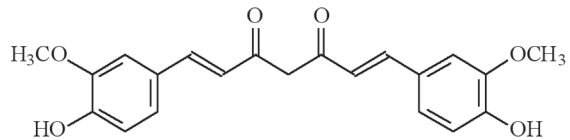
17



18



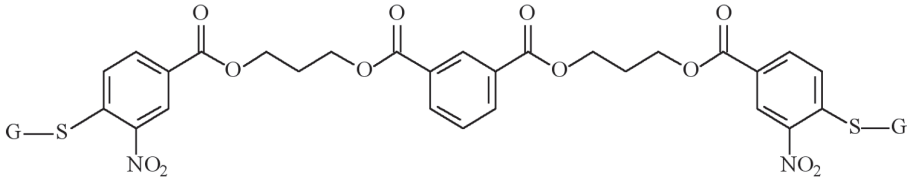
19



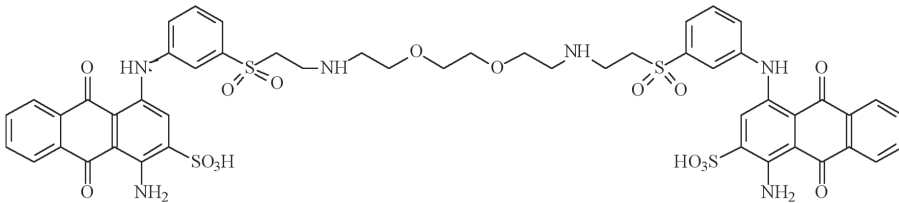
20

1d. Bifonksiyonel İnhibitörler:

Dimerik GST enzimlerinin kristal yapıları iki monomer yapı arasında çözücünün ulaşabildiği bir yarık olduğunu göstermektedir. Farklı GST izoformlarında bu bölgeyi çevreleyen grupların özelliği farklıdır. Buna ilaveten her bir alt ünite de bulunan aktif bölgeler arasındaki mesafe de farklıdır. Daha izozim seçici GST inhibitörlerinin tasarımı amacıyla enzimin kuaterner yapısındaki bu farklılıktan yararlanılmıştır. Lyon ve arkadaşları⁶⁴, bağlayıcı grupları değiştirerek her bir GST monomerindeki aktif bölge ile etkileşebilecek, simetrik, bifonksiyonlu biri bis-glutatyon konjugatı (**21**), diğeri bis-uniblue A bileşiği (**22**) yapısında iki grup bileşiğin sentezini yapmışlardır. Bileşiklerin etkinliği hazırlanan monofonksiyonel analogları ile karşılaştırılmıştır. Her iki seride de en güçlü inhibitör etkili bileşiğin referans bileşikten iki kat daha düşük IC_{50} değerine sahip olduğu bildirilmiştir. Bis glutatyon türevi bileşiğin, π isoformuna α izoformuna göre 10 kat daha fazla selektif olduğu gözlenmiştir.



21

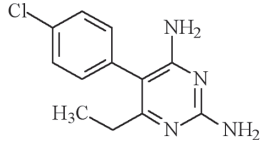


22

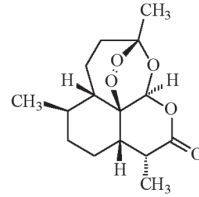
1e. Antimalaryal İlaçlar:

Pirimetamin (**23**), artemisinin (**24**), kinin (**25**), kinidin (**26**) ve tetrasiklin (**27**) gibi bazı antimalaryal bileşiklerin insan rekombinant GST'leri üzerinde inhibitör aktivite gösterdikleri bildirilmiştir. Yapılan çalışmada GSTP1-1'in, pirimetamin (**23**), artemisinin (**24**), kinin (**25**), kinidin (**26**) ve tetrasiklin (**27**) ile inhibisyona sırasıyla 1, 2, 4, 1 ve 13 μM IC_{50} değerleri ile en hassas enzim olduğu bildirilmiştir. Kinin ve kinidinin

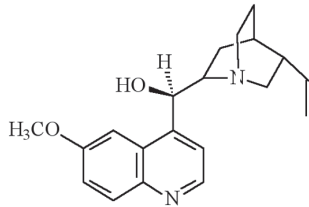
GSTM1-1 ve P1-1 için; artemisininin GSTA1-1 ve P1-1 için, tetrasiklinin GSTM3-3'e, primetaminin ise GSTP1-1'e spesifik olduğu bildirilmiştir (65). Bu grup bileşikler rasyonel inhibitör tasarımı için güçlü adaylar olarak değerlendirilmişlerdir.



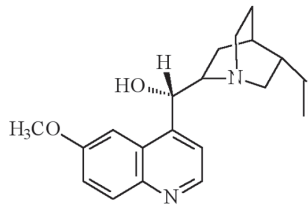
23



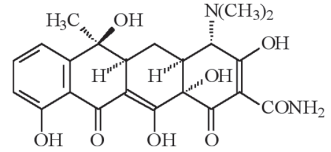
24



25



26



27

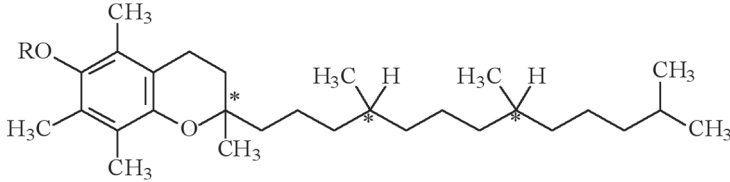
1f. Tokoferoller (E vitamini):

Reaktif oksijen türleri ve çeşitli elektrofillerin kanserden kalp hastalıklarına, solunum sistemi bozuklarına kadar çok çeşitli sistem hastalıklarının etiolojisinde rol oynadığı bilinmektedir. İnsan vücudu, çok çeşitli mekanizmalarla bu bileşiklerin zarar verici etkilerine karşı korunmaktadır. Glutatyona bağlı enzim sistemi vücudun antioksidan savunma sisteminde önemli bir grubu oluşturmaktadır. Yağda çözünen vitaminlerden biri olan, tokoferol ve tokotrienollerin karışımından oluşan E vitamini, bu sistemde rolü olan bir diğer bileşiktir.

Diyetimizin bir bileşeni olan ve son yıllarda antioksidan etkisi ile dikkat çeken E vitamininin antioksidan sistemde rolü olan, insan glutasyon S-transferazların etkisine pozitif veya negatif etkileri olduğunu bildiren değişik çalışmalar vardır. 1989 yılında Chen ve Shiau⁶⁶, E vitamini ile muamelenin GST aktivitesinde bir artışa sebep olduğunu; 1990 yılında Tampo ve Yonaha⁶⁷ ise E vitamini yokluğunun mikrozomlarda GST enzimlerinin yapısında hasara sebep olduğunu bildirmişlerdir. Bu

iki çalışmanın aksine, α -tokoferolun 2*R*,4*R*,8*R*- izomerinin (**28**) GSTP1-1 aktivitesini nonkompetitif bir şekilde inhibe ettiği (IC_{50} : $0,7 \pm 0,3 \mu M$) gösterilmiştir. Bileşiğin insan karaciğer sitosolleri ve eritrositlerinin lizatından izole edilen GSTM and GSTA'ı da konsantrasyona bağlı olarak inhibe ettiği gözlenmiştir⁶⁸⁻⁷⁰. Her iki durumda da GSTP'nin diğer izozimlerle karşılaştırıldığında en yüksek etki ile inhibe edildiği bildirilmiştir.

Esterleştirilmiş tokoferollerin (**29**) ve α -tokoferol kinonun da $10 \mu M$ 'dan düşük IC_{50} değerlerinde GSTP1-1 aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur⁶⁹. Bu bilgilerin ışığında *R,R,R*- α -tokoferolun yeni GST inhibitörlerinin geliştirilmesi için öncü bir bileşik olabileceği düşünülmektedir.

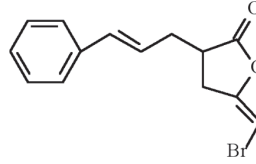


28 R: -H

29 R: -COCH₃

1g. Haloenol laktonlar:

Haloenol lakton yapısında bir grup bileşik mekanizmaya bağlı GST inhibitörü (mechanism-based inhibitors) olarak bildirilmişlerdir. Bu grup bileşiklerin enzimin normal katalitik mekanizması ile esansiyel amino asitlere kovalan bağlanarak enzimi inaktive eden reaktif elektrofillere dönüşen substrata benzer bileşikler olduğu bildirilmiştir. 3-Sinnamil-5(*E*)-bromometilidentetrahidro-2-furanon yapısındaki bileşiğin (HEL, **30**) GSTP izozimini seçici ve zamana bağlı olarak geri dönüşümsüz inhibe ettiği; *in vitro* GSTP izozimi salgılayan böbrek kanser hücrelerinde (UOK130) sisplatinin sitotoksitesini güçlendirici etki gösterdiği bulunmuştur⁷¹⁻⁷³. Öncü bileşik üzerinde yapılan moleküler değişiklikler ile daha güçlü ve daha seçici GSTP inhibitörleri için yapısal gereksinimler ortaya konmuştur. Enol lakton halojeninin ve doyurulmamış aromatik halkanın enzim inaktivasyonu açısından önemli olduğu, lipofilisitenin ise GST inaktivasyonu için bir zorunluluk olmadığı belirtilmiştir^{73, 74}.

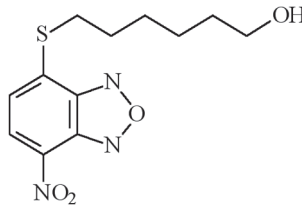


HEL (30)

Bileşik **30** ile hGSTP enziminin inaktivasyon mekanizmasında, 47 numaralı konumunda bulunan sistein amino asidi (Cys-47) ile lakton halkasının hidrolizinin, enzimin inaktivasyonu ile sonuçlanan GSTP1'nin kimyasal değişikliğinin ilk basamağı olabileceği ileri sürülmüştür. Bu hipotez, 47 numaralı konumda alanin içeren mutant hGSTP enzimi ile yapılan deneylerde bileşiğin mutant GSTP'ye karşı etki göstermemesi ile doğrulanmıştır⁷⁴.

1h. 7-Nitro-2,1,3-Benzoksadiazol Türevleri

GSH türevi peptit benzeri bileşiklerin çoklu ilaç direnci proteini gibi spesifik taşıyıcı pompalar ile hücreden atılması ve hücre içerisinde yeterli konsantrasyona ulaşamadıkları için etkisiz kalmaları nedeniyle; GSH benzeri olmayan, lipofilik özellikleri nedeniyle hücre membranını geçebilen ve GST'lar ile etkin bir şekilde bağlanabilen yeni inhibitör bileşikler tasarlanmıştır. Bu amaçla, 7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol (NBD) yapısında bir grup bileşik sentezlenmiştir^{75, 76}. Sentezlenen bileşikler arasında 6-(7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol-4-iltiyo)heksanol (NBDHEX, **31**) GSTP1-1'e karşı en güçlü inhibisyonu (IC_{50} : 0.8 μ M) göstermiştir. Lösemik hücre hatlarında (CCRF-CEM ve K562) yapılan deneylerin sonucunda bileşiğin etkisini, JNK-GSTP kompleksini bozarak JNK-aracılığıyla gelişen hücre ölüm yolağını (apoptosis) aktive ederek gösterdiği bildirilmiştir⁷⁵. Aynı yıl yapılan bir başka çalışmada, NBD tiyoeterlerinin enzimin hidrofobik özellikteki substrat bağlanma bölgesine (H bölgesi) bağlandıktan sonra, benzoksadiazol halkasının 4 numaralı konumundan GSH ile konjuge olarak bir σ kompleksi oluşturduğu, böylece GST'ların intihar inhibitörü gibi (suicide inhibitor) davrandığı gösterilmiştir⁷⁶.



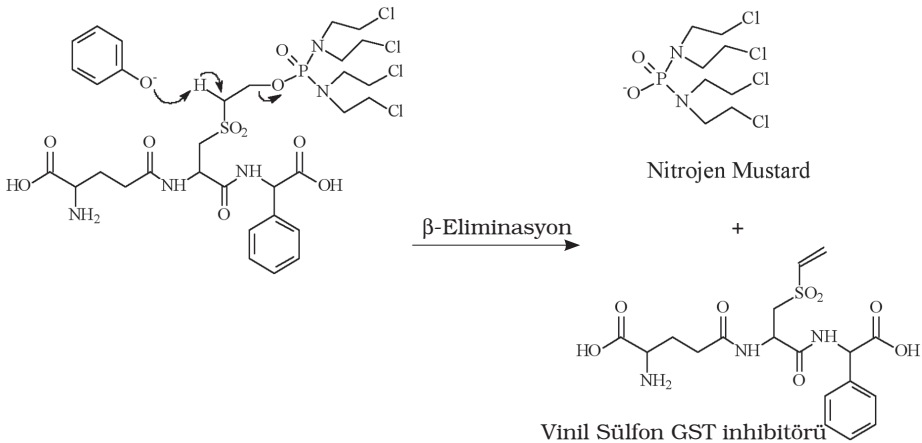
NBDHEX (31)

2. GST ile Aktive Edilen Ön İlaçlar

Geleneksel kemoterapötikler hızla bölünen hücreleri hedef alan sitotoksinlerdir. Bu nedenle kendini çabuk yenileyen kemik iliği, gastrointestinal mukoza, saç folikülleri gibi normal dokular da, ilaçların terapötik indeksinde, tümör hücreleriyle aynı derecede ilaca maruz kaldıkları için zarar görürler. Bu durum tedaviye gölge düşürmektedir. Kemoterapötik ilaçların sistemik toksisitesini azaltmak için kullanılan yeni bir yaklaşım ön ilaç tasarımıdır. Antikanser ilaçlarla tedavide, özellikle tümör hücrelerinde yükselmiş seviyelerde salgılandığı bildirilen GST enziminden (özellikle GSTP) kaynaklanan dezavantajı avantaja dönüştürmek için, kendisi inaktif olan ve tümör hücrelerinde yükselmiş seviyelerde bulunan GSTP ile tercihan ve spesifik olarak sitotoksik metabolitlerine dönüşen ön ilaçlar tasarlanmıştır. Bu strateji, bileşiğin normal dokulara toksisitesini azaltırken, aktif bileşiğin tümör dokusuna artmış miktarda taşınmasını mümkün kılar. Normal hücreler -enzim seviyesi normal düzeyde bulunacağından-, ilaçtan fazla etkilenmeyecektir.

2a. TLK 286

Bu yaklaşımın en güzel örneği, yapısında fosforamidatsülfonil artığı taşıyan, glutatyon benzeri bileşik olan TLK 286 (**32**) (γ -glutamil- α -amino- β -[(2-etil-N,N,N',N'-tetrakis(2-kloroetil)fosforodiamidat)sulfonil]propionil-(R)-(-)fenil glisin) dir. Bir alkilleyici bileşik ön ilacı olan TLK 286, kanser hücrelerinde GSTP1-1 tarafından aktive edilen yeni bir grup latent ilacın



Şekil 2

TLK 286'nın (**32**) GSTP1-1 ile aktivasyon mekanizması

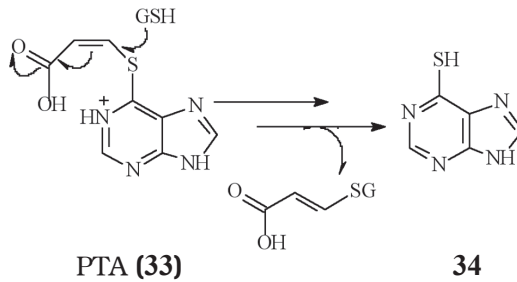
öncüsüdür^{77,78}. Bileşik, fizyolojik ısı ve pH da GSTP1-1'nin aktif bölgesinde yer alan tirozin-7 amino asidinin başlattığı, β -eliminasyon reaksiyonu ile, bir GSH analogu (vinil sülfon türevi) ve hücresele nükleofilleri alkilleme özelliği taşıyan nitrojen mustarda (fosforodiaminidat) parçalanır (Şekil-2).

İlaça hassasiyet hem hücre kültürü, hem de hayvan modellerinde GSTP1-1 salgılanması ile ilişkili bulunmuştur^{79,80}. Faz I klinik denemelerde yorgunluk, mide bulantısı, kusma ve kümülatif toksisitesi belli olmayan hematüri gibi minör yan etkilerin varlığı saptanmıştır. Toksik etkilerin hiçbiri 4. seviyede değildir ve ileri klinik denemeleri sınırlandıracak ciddiyette bir belirti yoktur. Faz II klinik denemelerinde platine dirençli küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde, platine dirençli over kanserinde ve 5-FU, leukovorin, irinotekan'a dirençli kolon kanserinde, ilerlemiş metastatik meme kanserinde tek bileşenli yararı bildirilmiştir^{37, 41, 81}.

Platine dirençli küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve over kanserinde diğer ilaçlarla kombine kullanımı Faz 1-2a klinik denemelerindedir^{37, 41}.

2b. Pürin Analogları

Yapısal olarak azatiyopürine benzeyen PTA (**33**) (*cis*-3-(9*H*-pürin-6-iltiy)akrilik asit) bir antimetabolit olan 6-merkaptopürinin (**34**) ön ilacı olarak hazırlanmıştır. Yükselmiş seviyelerde GST ve GSH salgılayan tümör hücrelerini hedefleyen bileşiğin, *in vitro* ortamda GSH ile bağlanarak *S*-(9*H*-pürin-6-iltiy)glutasyonu (**35**) ve iki farklı mekanizma ile 6-merkaptopürini oluşturduğu bildirilmiştir⁸². PTA'dan GST'lerin etkisi ile direkt olarak 6-

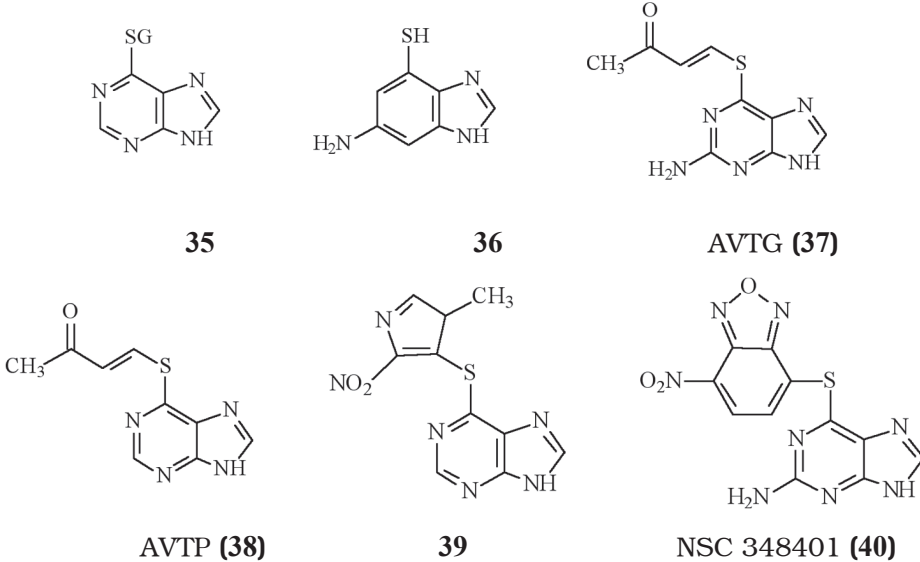


Şekil 3

PTA'nın (**33**) GSH/GST katalizli aktivasyonu

merkaptopürin oluşabildiği gibi (Şekil-3); pürin-6-il-glutatyon da böbrekte selektif olarak 6-merkaptopürine dönüşebilmektedir⁸². PTA'dan in vitro ortamda ağırlıklı olarak pürin-6-il-glutatyonun oluşması ve bununda böbrekte 6-merkaptopürine dönüşmesi, PTA'nın böbreğe selektif bir ön ilaç olabileceğini düşündürmüştür.

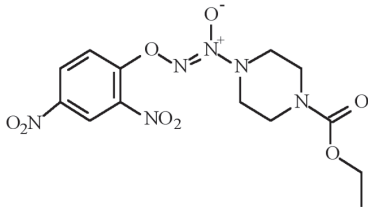
Bileşiğin fizyolojik pH'da iyonize olduğu, bu nedenle de GSH'a reaktivitesinin düşük olduğunun gözlenmesinden sonra, PTA'ya yapısal olarak benzeyen, iyonize karboksil grubu yerine butenon grubu taşıyan, GSH ile bir katım-eliminasyon reaksiyonu sonucunda 6-tiyoguanin (**36**) ve 6-merkaptopürine (**34**) dönüşerek etki göstermesi beklenen *trans*-6-(2-asetilviniltiy)guanin (*trans*-AVTG, **37**) ve *cis*-6-(2-asetilviniltiy)pürin (*cis*-AVTP, **38**) yapısında bileşikler sentezlenmiştir^{83,84}. Yapılan in vitro ve in vivo deneylerin sonucunda, söz konusu bileşiklerin, ana tiyopürinlerin sitotoksitesini korurken, onlar gibi kemik iliği toksisitesi göstermedikleri, bu nedenle de GSH/GST seviyeleri yüksek tümörlerde güçlü etkili kemoterapötikler olarak kullanılabilirler bildirilmiştir.



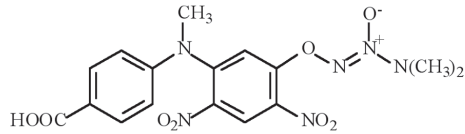
Azatiyopürin (**39**), 6-merkaptopürinin klinikte kullanılan ön ilacıdır. NSC 348401 (**40**) sitotoksite profili *cis*-AVTP'ye benzeyen merkaptopürinin heterosiklik tiyoguanin konjugatıdır. Bileşiğin *cis*-AVTP veya *trans*-AVTG'e gibi GSH ile reaksiyona girerek aktive edilen bir tiyopürin ön ilacı olup olmadığının belirlenmesi için yapılan çalışmalar devam etmektedir⁸⁴.

2c. Nitrik Oksit Donörleri:

Bu gruptaki bileşikler, GST'ların katalizlediği bir reaksiyonla GSH ile bağlanarak aktive edilen diazonyum diolat nitrik oksit (NO) donörleridir. Grubun ilk örneği insan lösemi hücreleri (HL-60) ve prostat kanser (PPC-1) ksenograflarında kanser gelişimini baskıladığı bildirilen JS-K kodlu **(41)** [O²-(2,4-dinitrofenil)-1-[(4-etoksikarbonil)piperazin-1-il]diazen-1-iyum-1,2-diolat] bileşiktir. Bileşiğin GSTP'den daha hızlı GSTA ve -M ile katalizlenerek NO ürettiği bildirilmiştir⁸⁵. Bileşiğin hücrel hemostazı sağlamak için gerekli olan ve normal dokularda yoğun olarak bulunan α -izoform ile metabolize olmasından kaynaklanan ikincil hasarını önlemek amacıyla izozim seçici yeni bileşikler tasarlanmıştır. Bu çabalar sırasında sentezlenen O²-[2,4-dinitro-5-(N-metil-N-4-karboksifenilamino) fenil] -1-N, N - dimetilamino diazen -1- iyum-1, 2 - diolat (PABA/NO, **(42)**) molekülü GSTA'dan daha çok GSTP ile metabolize olarak NO üreten ön ilaç olarak dikkat çekmiştir. Çalışmada, GSTP geni eksik fare embriyo fibroblast hücrelerinde (MEFs) yapılan deneylerde, GSTP yokluğunun PABA/NO'ya sensitiviteyi azalttığı gösterilmiştir. PABA/NO'nun sitotoksitesi, GSTP ve/veya γ -glutamil sistein sentaz ve çoklu ilaç direnç geni ile genetiği değiştirilmiş fare deri fibroblast hücrelerinde de (NIH3T3) denenmiş ve MRP1'nin çok salgılandığı hücrelerde ilaca direnç geliştiği gözlenmiştir. In vitro çalışmalar, direncin PABA/NO'nun GSTP ile aktive edilen metabolitinin GSH'na bağımlı tarzda, MRP ile hücre dışına atılması ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür⁸⁶.



JS-K **(41)**



PABA/NO **(42)**

Sonuç

Kemoterapide başarıya ulaşmada ilaca direnç gelişimi tedaviyi kısıtlayan önemli bir sorundur. Antikanser ilaçların inaktivasyonunda birinci derecede sorumlu enzim olduğu bilinen glutatyon S-transferazların (özellikle GSTP) kemoterapötik bileşiklere direnç gelişmiş pekçok kanser

türünde fazla salgılandığı bildirilmiştir. Enzimin GSH konjugasyonu ile kemoterapötik bileşiklerin metabolizmasını artırarak, etki yöresinde ilacın etkili konsantrasyona ulaşamaması sonucu, ilaca direnç gelişimine sebep olduğu düşünülmektedir. Bu durum, bu enzim grubu ile metabolize olan kemoterapötik bileşiklere karşı gelişen direnci ortadan kaldırmak için selektif GSTP inhibitörlerinin tasarımının gereğesi olmuştur. Birinci jenerasyon inhibitör grubunu oluşturan etakrinik asit, in vitro ümit verici etkiye sahip olmasına rağmen, bileşiğin klinik yararı hem diüretik etkisinin olması hem de izozim seçici olmaması nedeniyle kısıtlı kalmıştır. Bu nedenle yan etki ve toksisitesi minimuma indirilmiş, izozim seçici yeni bileşiklerin geliştirilmesi çalışmaları devam etmiştir. Bu gruplar içerisinde en dikkat çekici izozim seçici aktiviteyi GSH benzeri yapıya sahip TLK-199 (11) göstermiştir. Bileşik günümüzde kemik iliğinin normal fonksiyon yapamadığı ve yeterince normal kan hücresinin yapılamadığı hastalarda (miyelodisplastik sendromlu hastalarda) faz II deneme çalışması altındadır.

Günümüzde, enzimin substratı ve inhibitörleriyle etkileşme mekanizmalarını açıklamaya yönelik çok sayıda çalışma olmasına rağmen seçici ve güçlü inhibitörlerin rasyonel tasarımını sağlayacak genel kurallar hala ortaya konulamamıştır.

Antineoplastik ilaçların kanser hücresine karşı olan seçicilikleri azdır. Çünkü malign hücre ile normal insan hücresi arasında kalitatif bakımdan fazla fark yoktur. Tümör hücrelerinde yükselmiş seviyelerde bulunan GSTP ile tercihan ve spesifik olarak sitotoksik metabolitlerine dönüşen ön ilaçların uygulanmasıyla daha az toksik, daha spesifik antikanser bileşiklere ulaşılmaya çalışılmıştır. Bu strateji bileşiğin normal dokulara toksisitesini azaltırken aktif bileşiğin tümör dokusuna artmış miktarda taşınmasını mümkün hale getirir. Bu çalışmalar sırasında en dikkat çekici sonuç, bir alkilleyici bileşik ön ilacı olan TLK 286 (32) ile elde edilmiştir. Bileşiğin etkinliği, klinik önceki deneyler ve Faz-I denemelerinde gösterilmiş, kemoterapide kullanılan diğer ilaçlara göre kabul edilebilir kemik iliği toksisitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Ancak, GST ile aktive edilen ön ilaçlar tasarlanırken, aktivasyon sırasında, GST substratı olabilecek elektrofilik türlerin oluştuğu ve oluşan bu maddelerin GST enzimini inhibe ederek ön ilacın aktivasyonunu önleyebileceği gerçeği göz ardı edilmiştir.

İnhibitörler ve GST enzimiyle aktive edilen ön ilaçlar arasında ümit verici bileşiklere ulaşılması nedeniyle bu konu üzerindeki çalışmalar günümüzde artarak devam etmektedir.

*Özet***Kanser Kemoterapisinde Terapötik Hedef Olarak Glutasyon S-Transferazlar**

Kanser tedavisinde ilaca direnç gelişimi tedaviyi etkileyen önemli bir unsurdur. Tedavide kullanılan ilaçlardan önemli bir grubu oluşturan alkilleyici bileşikler söz konusu olduğunda, ilaç direnci, hücrede glutasyon (GSH) ve glutasyon S-transferaz (GST) seviyelerinin artması ile ilişkilendirilmiştir. Bu mekanizma ile gelişen direncin ortadan kaldırılmasında ilk başlardaki yaklaşım GST'lar ile detoksifiye edilen geleneksel antikanser ilaçlarla kullanımda faydalı olabilecek toksik olmayan GST inhibitörlerinin kullanılmasıydı. Alternatif yeni bir tedavi yaklaşımı ise, tümör hücrelerinde yükselmiş seviyelerde salgılandığı bildirilen GST enziminden (özellikle GSTP) terapötik amaçla yararlanmaktır. Bu yaklaşım kendisi inaktif olan ve tümör hücrelerinde yükselmiş seviyelerde bulunan GSTP ile tercihan ve spesifik olarak toksinlerine dönüşen ön ilaçların uygulanmasıdır. Bu strateji bileşiğin normal dokulara toksisitesini azaltırken aktif bileşiğin tümör dokusuna artmış miktarda taşınmasını mümkün kılar.

Bu derleme kapsamında kısaca GST enzimlerinin kemoterapötik ilaçlara direnç gelişmesindeki rolü incelendikten sonra, geleneksel antikanser ilaçlarla kullanımda faydalı olabilecek GSTP inhibitörleri ve GSTP enzimi ile parçalanarak toksik metabolitlerine dönüşen ön ilaçlar hakkında bilgi verilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Glutasyon S-transferazlar, glutasyon S-transferaz P inhibitörleri, glutasyon S-transferaz P ile aktive edilen ön ilaçlar.

*Summary***Glutathione S-Transferases in Cancer Chemotherapy as a Therapeutic Target**

Drug resistance is emerging as a serious clinical obstacle to effective use of chemotherapy. It has been found that glutathione (GSH) and glutathione S-transferase (GST) is over-expressed in many cancer cells, especially in those which are resistant to chemotherapeutic agents. GST is known to be one of major metabolizing enzymes responsible

for inactivation of anticancer drugs. One approach to overcome the drug resistance by over-expression of GST is to develop selective GST inhibitors. Another effective way to combat GST-induced drug resistance is to develop prodrugs activated by GST. This allows chemotherapeutic agents to be delivered selectively to tumor cells with over-expression of GST. In this review, briefly introducing the role of GSTs in resistance to chemotherapeutic agents, GST inhibitors used as potentiating agents of conventional anticancer drugs and prodrugs activated by GST are summarized.

Key Words: Glutathione S-transferases, glutathione S-transferase P inhibitors, prodrugs activated by glutathione S-transferase P inhibitors.

KAYNAKLAR

1. Türker, F.A., Kayaalp, S.O., "Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar", Kayaalp, S.O. (Eds), Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Ankara, Feryal Matbaacılık, (2002), s. 380-415.
2. Gate, L., Tew, K.D.: Glutathione S-transferases as emerging targets, *Expert Opin. Ther. Targets*, 5(4), 477-489 (2001)
3. Gottesman, M.M.: Mechanism of Cancer Drug Resistance, *Annu. Rev. Med.* 53, 615-627 (2002)
4. Stavrovskayai, A.A.: Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells, *Biochemistry*, 65(1), 95-106 (2000)
5. Meister, A., Anderson, M.E.: Glutathione, *Annu. Rev. Biochem.*, 52, 711-760 (1983).
6. Batist, G., Behrens, B.C., Makuch, R., Hamilton, T.C., Katki, A.G., Louie, K.G., Myers, C.E., Ozols, R.F.: Serial determinations of glutathione levels and glutathione-related enzyme activities in human tumor cells in vitro, *Biochem. Pharmacol.*, 35(13), 2257-2259 (1986)
7. Tew, K.D.: Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance, *Cancer Res.*, 54, 4313-4320 (1994)
8. Armstrong, R.N.: Enzyme-catalyzed detoxification reactions, mechanisms and stereochemistry, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 22, 39-88 (1987)
9. Mannervik, B., Danielson, U.H.: Glutathione transferases-structure and catalytic activity, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 23, 283-337 (1988)
10. Pickett, C.B., Lu, A.Y.H.: Glutathione S-transferase: gene structure, regulation and biological function, *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 743-764 (1989)
11. Armstrong, R.N.: Glutathione S-transferase: reaction mechanism, structure and function, *Chem. Res.*, 4, 131-140 (1991)
12. Waxman, D.J.: Glutathione S-transferase: role in alkylating agent resistance and possible target for modulation chemotherapy-a review, *Cancer Res.*, 50, 6449-6454 (1990).
13. Armstrong, R.N.: Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases, *Chem. Res. Toxicol.*, 10(1), 2-18 (1997)

14. Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R.: Glutathione transferases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 51-88 (2005)
15. Jakobsson, P-J, Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., Persson, B.: Common structural features of MAPEG-a wide spread super family of associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism, *Protein Sci.*, 8, 689-692 (1999)
16. Robinson, A., Huttley, G.A., Booth, H.S., Board, P.G.: Modelling and bioinformatics studies of the human Kappa-class glutathione transferase predict a novel third glutathione transferase family with similarity to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases, *Biochem. J.*, 379, 541-552 (2004)
17. Ladner, J.E., Parsons, J.F., Rife, C.L., Gilliland, G.L., Armstrong, R.N.: Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1, *Biochemistry*, 43(2), 352-361 (2004)
18. Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M. K., Warholm, M., Jornvall, H.: Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82, 7202-7206 (1985)
19. Meyer, D. J., Coles, B., Pemble, S. E., Gilmore, K. S., Fraser, G. M., Ketter, B.: Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man, *Biochem. J.*, 274, 409-414 (1991)
20. Hayes, J.D., Pulford, D.J.: The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30(6), 445-600 (1995)
21. Board, P. G., Baker, R. T., Chelvanayagam, G., Jermiin, L. S.: Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to human, *Biochem. J.*, 328, 929-935 (1997)
22. Hayes, J.D., McLellan, L.I.: Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress, *Free Radic. Res.*, 31(4), 273-300 (1999)
23. Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Eastal, S., Jermiin, L. S., Schulte, C. K., Danley, D. E., Hoth, L. R., Griffor, M. C., Kamath, A. V., Rosner, M. H., Chrnyk, B. A., Perregaux, D. E., Gabel, C. A., Georghegan, K. F., and Pandit, J.: Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases, *J. Biol. Chem.*, 275, 24798-24806 (2000)
24. Harrison, D.J., Kharbanda, R., Bishop, D., McLelland, L.I., Hayes, J.D.: Glutathione S-transferases isoenzymes in human renal carcinoma demonstrated by immunohistochemistry, *Carcinogenesis*, 10, 1257-1260 (1989)
25. Tidefelt, U., Elmhorn-Rosenborg, A., Paul, C., Hao, X.Y., Mannervik, B., Eriksson, L.C.: Expression of Glutathione S-transferase-pi as a predictor for treatment results at different stages of acute nonlymphoblastic leukemia, *Cancer Res.*, 52, 3281-3285 (1992).
26. Green, J.A., Robertson, L.J., Clark, A.H.: Glutathione S-transferase expression in benign and malignant ovarian tumors, *Br. J. Cancer*, 68, 235-239 (1993)
27. Gilbert, L., Elwood, L.J., Merino, M., Masood, S., Barnes, R., Steinberg, S.M., Lazarous, D.F., Pierce, L., d'Angelo, T., Moscow, J.A.: A pilot study of pi-class glutathione S-transferase expression in breast cancer: correlation with estrogen receptor expression and prognosis in node-negative breast cancer, *J. Clin. Oncol.*, 11, 49-58 (1993)
28. Grignon, D.J., Abdel-Malak, M., Mertens, W.C., Sakr, W.A., Shepherd, R.R.: Glutathione S-transferase expression in renal cell carcinoma: a new marker of differentiation, *Mod. Pathol.*, 7, 186-189 (1994)

29. Hamada, S.I., Kamada, M., Furumoto, H., Hirao, T., Aono, T.: Expression of Glutathione S-transferase-pi in human ovarian cancer as an indicator of resistance to chemotherapy, *Gynecol. Oncol.*, 52, 313-319 (1994)
30. Yang, P., Ebbert, J.O., Sun, Z., Weinshilboum, R.M.: Role of glutathione metabolic pathway in lung cancer treatment and prognosis: A review, *J. of Clin. Oncology*, 24(11), 1761-1769 (2006)
31. O'Brien, M.L., Tew, K.D.: Glutathione and related enzymes in multidrug resistance, *Eur. J. Cancer*, 6, 967-978 (1996)
32. Tew, K.D., Dutta, S., Schultz, M.: Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 26, 91-104 (1997)
33. Adler, V., Yin, Z., Fuchs, S.Y., Benerza, M., Rosario, L., Tew, K.D., Pincus, M.R., Sardana, M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Davis, R.J., Ronai, Z.: Regulation of JNK signaling by GSTp, *EMBO J.*, 18, 1321-1334 (1999)
34. Yin, Z., Ivanov, V.N., Habelhah, H., Tew, K.D., Ronai, Z.: Glutathione S-transferase p elicits protection against H₂O₂-induced cell death via co-ordinated regulation of stress kinases, *Cancer Res. (Adv. Brief)*, 60, 4053-4057 (2000)
35. Wang, J., Arifoglu, P., Ronai, Z., Tew, K.D.: Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun NH₂ terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the carboxyl terminus, *J. Biol. Chem.*, 276, 20999-21003 (2001)
36. Cho, S.G., Lee, Y.H., Park, H.S., Ryoo, K., Kang, K.W., Park, J., Eom, S.J., Kim, M.J., Chang, T.S., Choi, S.Y., Shim, J., Kim, Y., Dong, M.S., Lee, M.J., Kim, S.G., Ichijo, H., Choi, E.J.: Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1, *J. Biol. Chem.*, 276(16), 12749-12755 (2001)
37. Townsend, D.M., Tew, K.D.: The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance, *Oncogene*, 22, 7369-7375 (2003)
38. Davis, R.J.: Signal transduction by the JNK group of MAP kinases, *Cell*, 103, 239-252 (2000)
39. Ono, K., Han, J.: The p38 signal transduction pathway: activation and function, *Cell Signal.*, 12, 1-13 (2000).
40. Mahajan, S., Atkins, W.M.: The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases, *Cell. Mol. Life Sci.*, 62(11), 1221-1233 (2005)
41. Zhao, G., Wang, X.: Advance in Antitumor Agents Targeting Glutathione-S-Transferase, *Curr. Med. Chem.*, 13, 1461-1471 (2006)
42. Tew, K.D., Bomber, A.M., Hoffman, S.J.: Ethacrynic acid and piriprost as enhancers of cytotoxicity in drug resistant and sensitive cell lines, *Cancer Res.*, 48, 3622-3625 (1988)
43. Clapper, M.L., Hoffman, S.J., Tew, K.D.: Sensitization of human colon tumor xenografts to L-phenylalanine mustard using ethacrynic acid, *J. Cell. Pharmacol.*, 1, 71-78 (1990)
44. O'Dwyer, P.J., LaCreta, F., Nash, S., Tinsley, P.W., Schilder, R., Clapper, M.L., Tew, K.D., Panting, L., Litwin, S., Comis, R.L., Ozols, R.F.: Phase I study of thiotepa in combination with the glutathione transferase inhibitor ethacrynic acid, *Cancer Res.*, 51 (22), 6059-6065 (1991)
45. Petrini, M., Conte, A., Caracciolo, F., Sabbatini, A., Grassi, B., Ronca, G.: Reversing of chlorambucil resistance by ethacrynic acid in a B-CLL patient, *Br. J. Haematol.*, 85(2), 409-410 (1993)
46. Zhao, G., Yu, T., Wang, R., Wang, X., Jing, Y.: Synthesis and structure-activity relationship of ethacrynic acid analogues on glutathione-s-transferase P1-1 activity inhibition, *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 4056-4062 (2005).

47. Ploemen, J.H., van Ommen, B., van Bladeren, P.J.: Inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by ethacrynic acid and its glutathione conjugate, *Biochem. Pharmacol.*, 40, 1631-1635 (1990)
48. Awasthi, S., Srivastava, S.K., Ahmad, F., Ahmad, H., Ansari, G.A.: Interactions of glutathione S-transferase-pi with ethacrynic acid and its glutathione conjugate, *Biochim. Biophys. Acta*, 1164, 173-178 (1993)
49. Burg, D., Filippov, D.V., Hermanns, R., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., Mulder, G.J.: Peptidomimetic glutathione analogues as novel gamma GT stable GST inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, 10, 195-205 (2002)
50. Burg, D., Riepsaame, J., Pont, C., Mulder, G., van de Water, B.: Peptide-bond modified glutathione conjugate analogs modulate GSTpi function in GSH-conjugation, drug sensitivity and JNK signaling, *Biochem. Pharmacol.* 71(3), 268-77 (2006)
51. Flatgaard, J.E., Bauer, K.E., Kauvar, L.M.: Isozyme specificity of novel glutathione-S-transferase inhibitors, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 33, 63-70 (1993)
52. Lyttle, M.H., Hocker, M.D., Hui, H.C., Caldwell, C.G., Aaron, D.T., Engqvist-Goldstein, A., Flagggaard, J.E., Bauer, K.E.: Isozyme-specific glutathione-S-transferase inhibitors: design and synthesis, *J. Med. Chem.* 37, 189-194 (1994)
53. O'Brien, M.L., Vulevic, B., Freer, S., Boyd, J., Shen, H., Tew, K.D.: Glutathione peptidomimetic drug modulator of multidrug resistance-associated protein, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 291, 1348-1355 (1999)
54. <http://www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00035867>.
55. Kunze T.: Phosphono analogues of glutathione as new inhibitors of glutathione S-transferases, *Arch Pharm (Weinheim)*, 329(11), 503-509 (1996)
56. Kunze, T., Heps, S.: Phosphono analogs of glutathione: inhibition of glutathione transferases, metabolic stability, and uptake by cancer cells, *Biochem. Pharmacol.*, 59(8), 973-981 (2000)
57. Nakajima, T., Takayama, T., Miyanishi, K., Nobuoka, A., Hayashi, T., Abe, T., Kato, J., Sakon, K., Naniwa, Y., Tanabe, H., Niitsu, Y.: Reversal of multiple drug resistance in cholangiocarcinoma by the glutathione S-transferase-pi-specific inhibitor O1-hexadecyl-gamma-glutamyl-S-benzylcysteinyl-D-phenylglycine ethylester, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 306(3), 861-869 (2003)
58. van Zanden, J.J., Geraets, L., Wortelboer, H.M., van Bladeren, P.J., Rietjens, I.M., Cnubben, N.H.: Structural requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancer cells, *Biochem. Pharmacol.*, 67, 1607-1617 (2004)
59. Kurata, M., Suzuki, M., Takeda, K.: Effects of phenol compounds, glutathione analogues and a diuretic drug on glutathione S-transferase, glutathione reductase and glutathione peroxidase from canine erythrocytes, *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 103, 863-867 (1992)
60. Zhang, K., Das, N.P.: Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferases, *Biochem. Pharmacol.*, 47, 2063-2068 (1994)
61. van Zanden, J.J., Ben Hamman, O., van Iersel, M.L., Boeren, S., Cnubben, N.H., Lo Bello, M., Vervoort, J., van Bladeren, P.J., Rietjens, I.M.: Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by the flavonoid quercetin, *Chem. Biol. Interact.*, 145, 139-148 (2003)
62. Ferry, D.R., Smith, A., Malkhandi, J., Fyfe, D.W., deTakats, P.G., Anderson, D., Baker, J., Kerr, D.J.: Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition, *Clin. Cancer Res.*, 2, 659-668 (1996).
63. Hayeshi, R., Mutingwende, I., Mavengere, W., Masiyanise, V., Mukanganyama, S.: The inhibition of human glutathione S-transferases activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin, *Food Chem. Toxicol.*, 45(2), 286-295 (2007)

64. Lyon, R.P., Hill, J.J., Atkins, W.M.: Novel Class of Bivalent Glutathione S-Transferase Inhibitors, *Biochemistry*, 42, 10418-10428 (2003)
65. Mukanganyama, S., Widersten, M., Naik, Y.S., Mannervik, B., Hasler, J.A.: Inhibition of glutathione S-transferases by antimalarial drugs. Possible implications for circumventing anticancer drug resistance, *Int. J. Cancer.*, 97, 700-705 (2002)
66. Chen, L.H., Shiau, C.C.: Induction of glutathione S-transferase activity by antioxidants in hepatocyte culture, *Anticancer Res.*, 9(4), 1069-1072 (1989)
67. Tampo, Y., Yonaha, M.: Vitamin E and glutathione are required for preservation of microsomal glutathione S-transferase from oxidative stress in microsomes, *Pharmacol. Toxicol.*, 66(4), 259-265 (1990)
68. van Haafden, R.I., Evelo, C.T., Haenen, G.R., Bast, A.: alpha-Tocopherol inhibits human glutathione S-transferase pi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280, 631-633 (2001)
69. van Haafden, R.I., Evelo, C.T., Penders, J., Eijnwachter, M.P., Haenen, G.R., Bast, A.: Inhibitor of human glutathione S-transferase P1-1 by tocopherols and alpha-tocopherol derivatives, *Biochim. Biophys. Acta*, 1548(1), 23-28 (2001)
70. van Haafden, R.I., Haenen, G.R., van Bladeren, P.J., Bogaards, J.J., Evelo, C.T., Bast, A.: Inhibition of various glutathione S-transferase isoenzymes by RRR-alpha-tocopherol, *Toxicol In Vitro*, 17(3), 245-251 (2003)
71. Zheng, J., Mitchell, A.E., Jones, A.D., Hammock, B.D.: Haloenol lactone is a new isozyme-selective and active site-directed inactivator of glutathione S-transferase, *J. Biol. Chem.*, 271(34), 20421-20425 (1996)
72. Mitchell, A.E., Zheng, J., Hammock, B.D., Lo Bello, M., Jones, A.D.: Structural and functional consequences of haloenol lactone inactivation of murine and human glutathione S-transferase; *Biochemistry*, 37(19), 6752-6759 (1998)
73. Wu, Z., Minhas, G.S., Wen, D., Jiang, H., Chen, K., Zimniak, P., Zheng, J.: Design, synthesis and structure-activity relationships of haloenol lactones: site-directed and isozyme-selective glutathione S-transferase inhibitors, *J. Med. Chem.*, 47(12), 3282-3294 (2004)
74. Zheng, J., Liu, G., Tozkoparan, B., Wen, D.: Mechanistic studies of inactivation of glutathione S-transferase Pi isozyme by a haloenol lactone derivative, *Med. Chem.*, 1(2), 191-198 (2005)
75. Turella, P., Cerella, C., Filomeni, G., Bullo, A., De Maria, F., Ghibelli, L., Ciriolo, M.R., Cianfriglia, M., Mattei, M., Federici, G., Ricci, G., Caccuri, A.M.: Proapoptotic activity of new glutathione S-transferase inhibitors, *Cancer Res.*, 65, 3751-3761 (2005)
76. Ricci, G., De Maria, F., Antonini, G., Turella, P., Bullo, A., Stella, L., Filomeni, G., Federici, G., Caccuri, A.M.: 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatives, a New Class of suicide inhibitors for glutathione S-transferase; *J. Biol. Chem.*, 280, 26397-26405 (2005)
77. Lyttle, M.H., Satyam, A., Hocker, M.D., Bauer, K.E., Caldwell, C.G., Hui, H.C., Morgan, A.S., Mergia, A., Kauvar, L.M.: Glutathione S-transferase activates novel alkylating agents, *J. Med. Chem.*, 37 (10), 1501-1507 (1994)
78. Satyam, A., Hocker, M.D., Kane-Maguire, K.A., Morgan, A.S., Villar, H.O., Lyttle, M.H.: Design, synthesis and evaluation of latent agents activated by glutathione S-transferase, *J. Med. Chem.*, 39(8), 1736-1747 (1996).
79. Morgan, A.S., Sanderson, P.E., Borch, R.F., Tew, K.D., Niitsu, Y., Takayana, T., Von Hoff, D.D., Ízbicka, E., Mangold, G., Paul, C., Broberg, U., Mannervik, B., Henner, W.D., Kauvar, L.M.: Tumor efficacy and bone marrow-sparing properties of TER286, a cytotoxin activated by glutathione S-transferase, *Cancer Res.*, 58, 2568-2575 (1998)
80. Rosario, L.A., O'Brien, M.L., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Tew, K.D.: Cellular response to a glutathione S-transferase P1-1 activated prodrug, *Mol. Pharmacol.*, 58(1), 167-174 (2000)

81. Rosen, L.S., Brown, J., Laxa, B., Boulos, L., Reiswig, L., Henner, W.D., Lum, R.T., Schow, S.R., Maaack, C.A., Keck, J.G., Mascavage, J.C., Dombroski, J.A., Gomez, R.F., Brown, G.L.: Phase I study of TLK286 (glutathione S-transferase P1-1 activated glutathione analogue) in advanced refractory solid malignancies, *Clin. Cancer Res.*, 9(5), 1628-1638 (2003)
82. Gunnarsdottir, S., Elfarra, A.A.: Glutathione-dependent metabolism of cis-3-(9H-purin-6-ylthio)acrylic acid to yield the chemotherapeutic drug 6-mercaptopurine: evidence for two distinct mechanism in rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 290(3), 950-957 (1999)
83. Gunnarsdottir, S., Rucki, M., Elfarra, A.A.: Novel glutathione-dependent thiopurine prodrugs: evidence for enhanced cytotoxicity in tumor cells and for decreased bone marrow toxicity in mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 301(1), 77-86 (2002)
84. Gunnarsdottir, S., Elfarra, A.A.: Cytotoxicity of the novel glutathione-activated thiopurine prodrugs cis-AVTP [cis-6-(2-acetylvinylthio)purine] and trans-AVTG [trans-6-(2-acetylvinylthio)guanine] results from the National Cancer Institute's anticancer drug screen, *Drug Metab. Dispos.*, 32(3), 321-327 (2004)
85. Shami, P.J., Saavedra, J.E., Wang, L.Y., Bonifant, C.L., Diwan, B.A., Singh, S.V., Gu, Y., Fox, S.D., Buzard, G.S., Citro, M.L., Waterhouse, D.J., Davies, K.M., Ji, X., Keefer, L.K.: JS-K, a glutathione/glutathione S-transferase-activated nitric oxide donor of the diazeniumdiolate class with potent antineoplastic activity, *Mol. Cancer Ther.*, 2(4), 409-417 (2003)
86. Findlay, V.J., Townsend, D.M., Saavedra, J.E., Buzard, G.S., Citro, M.L., Keefer, L.K., Ji, X., Tew, K.D.: Tumor cell responses to a novel glutathione S-transferase-activated nitric oxide-releasing prodrug, *Mol. Pharmacol.*, 65(5), 1070-1079 (2004)