

Inhibitori P-glikoproteina

Jelavić, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:158281>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-19**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Ivana Jelavić

Inhibitori P-glikoproteina

Završni rad

Mentor: doc.dr.sc. Ana Amić

Osijek, 2021. godina

Sažetak

P-glikoproteini su zanimljiva skupina proteina koja ima pozitivan učinak jer eliminira štetne supstance iz organizma, ali pri tome može eliminirati i lijekove čime smanjuje učinak terapije. U radu je objašnjeno što su P-glikoproteini i koja im je uloga. Također je objašnjeno što su inhibitori P-glikoproteina i kako oni djeluju. Opisani su inhibitori prve generacije, inhibitori druge generacije i inhibitori treće generacije te je objašnjeno zašto imaju više prednosti nego inhibitori prve i druge generacije. Isto tako, navedeni su neki od predstavnika inhibitora treće generacije te su opisane neke njihove karakteristike. Nadalje, opisana je i višestruka otpornost na lijekove i zašto je ona prepreka u uspješnoj terapiji protiv nekih bolesti. Isto tako, pojašnjena je poveznica P-glikoproteina i višestruke otpornosti na lijekove. U radu je objašnjeno kakva je uloga MDR1 (engl. *Multidrug Resistance*) gena u otpornosti na lijekove, njihova ekspresija i modulacija. Opisana je interakcija između aktivnih tvari u bilju i P-glikoproteina, njihova citotoksičnost i kojim metodama su sintetizirani. Nadalje, opisani su i načini na koje medicinska kemija otkriva inhibitore P-glikoproteina.

Ključne riječi: *P-glikoprotein, inhibitori, višestruka otpornost na lijekove*

Abstract

P-glycoproteins are an interesting group of proteins with positive effect since it eliminates harmful substances, but it also may eliminate drugs and reduce the therapy efficiency. This thesis explains what P-glycoproteins are and what their role is. P-glycoprotein inhibitors and how they work is also explained. This work describes first, second and third generation of inhibitors and explains why they have more advantages than first and second generation of inhibitors. Also, some of the representatives of the third generation of inhibitors are listed and some of their characteristics are described. Furthermore, multiple drug resistance and why it is an obstacle in successful therapy against some diseases are described. Also, the link between P-glycoprotein and multiple drug resistance has been elucidated. This thesis explains the role of MDR1 (multidrug resistance) genes in drug resistance, their expression and modulation. The interaction between active substances in plants and P-glycoproteins, their cytotoxicity and the methods by which medical chemistry detects P-glycoprotein inhibitors are described. The plants whose extract are used and explanation why these extracts are suitable in the treatment of cancer are discussed. Furthermore, the ways in which medical chemistry detects P-glycoprotein inhibitors are described, some novel compounds are listed, and also the explanation of mechanism of P-glycoprotein inhibition is given.

Key words: *P-glycoproteins, inhibitors, multiple drug resistance*

Sadržaj

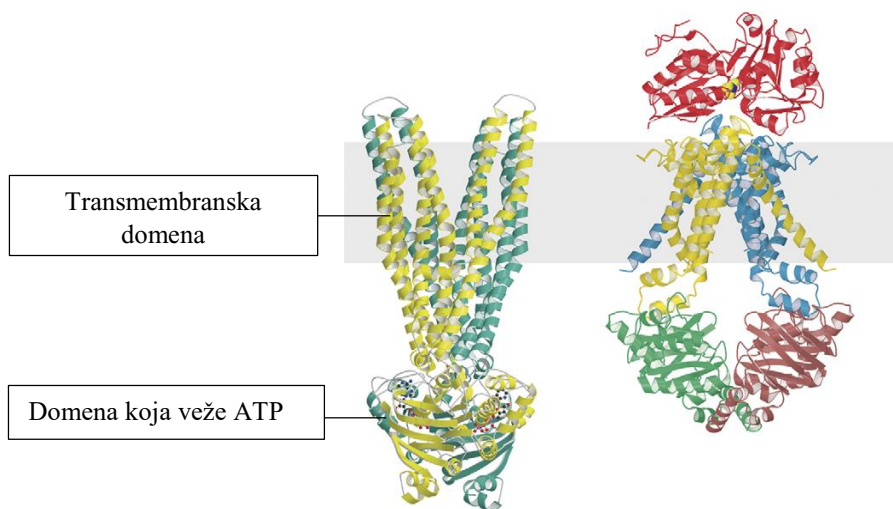
1. Uvod	1
2. ABC transporteri	2
2.1. Mehanizam djelovanja ABC transportera	3
3. Višestruka otpornost na lijekove (engl. <i>Multidrug Resistance</i> , MDR)	4
3.1. Obitelj MDR ₁	4
3.2. Transport i vezivanje lijekova	5
3.3. MDR1 ekspresija	6
4. P-glikoprotein	7
4.1. Kinetika P-glikoproteina	7
5. Inhibitori prve generacije	9
6. Inhibitori druge generacije	11
7. Inhibitori treće generacije	13
7.1. Interakcija aktivnih tvari u bilju i P-glikoproteina	15
7.2. Strategije medicinske kemije za otkrivanje inhibitora P-glikoproteina	17
8. Zaključak	19
9. Literaturna vrela	20

1. Uvod

Cilj ovog rada je pojasniti što su P-glikoproteini, njihova uloga i poveznica s fenomenom višestruke otpornosti na lijekove. Također je cilj rada pojasniti što su inhibitori P-glikoproteina i kako djeluju. U 2. poglavlju su objašnjeni ABC (engl. *ATP-binding cassette*) transporteri i mehanizam njihova djelovanja. Objašnjena je također i razlika u strukturi ABC transportera, koji se sastoje od transmembranske i citoplazmatske domene koja omogućava vezanje i hidrolizu ATP-a. U 3. poglavlju je pojašnjen fenomen višestruke otpornost na lijekove te su prikazani rezultati istraživanja koji su otkrili kako se ona mijenja primjenom ciklosporina i verapamila. Naime, spomenuti spojevi smanjuju otpornost na neke lijekove i tako mogu pomoći u terapiji. Također je u radu objašnjeno i što su MDR1 (engl. *Multidrug resistance*) geni i njihova ekspresija te zašto je za nju potrebno kodiranje MDR1 gena. U 4. poglavlju je objašnjeno što su P-glikoproteini, zašto je utrošak energije potreban za njihovo djelovanje te kako utječu na efikasnost lijekova. Objašnjeno je i što se događa ukoliko dođe do visokog nivoa ekspresije P-glikoproteina i kako to utječe na lijekove. Također, pojašnjena je i kinetika P-glikoproteina. U 5. poglavlju je objašnjeno što su inhibitori prve generacije, navedeni su spojevi koji su inhibitori i zašto je za inhibiciju potrebna visoka koncentracija inhibitora. Isto tako, pojašnjeno je zašto su inhibitori prve generacije toksični. U 6. poglavlju su objašnjeni inhibitori druge generacije, navedeni su spojevi koji čine inhibitore druge generacije i objašnjeno je koji je njihov nedostatak. Nadalje, u 7. poglavlju je objašnjeno zašto inhibitori treće generacije imaju više prednosti nego inhibitori prve i druge generacije. Također je pojašnjena interakcija aktivnih tvari u bilju i P-glikoproteina te kako one utječu na antitumorske lijekove. Također su navedene biljke čiji se ekstrakti koriste za liječenje. Objašnjene su i strategije pomoću kojih medicinska kemija otkriva inhibitore P-glikoproteina, navedeni su noviji spojevi koji utječu na inhibiciju P-glikoproteina te je pojašnjen način na koji oni utječu na njegovu inhibiciju.

2. ABC transporteri

ABC transporteri (engl. *ATP-binding cassette*) su ubikvitirani integralni membranski proteini. Oni omogućavaju prijenos različitih supstrata kroz membranu. Za taj proces im je potrebna energija koju dobivaju hidrolizom ATP-a. Dijele se u tri skupine ovisno o funkciji koju obavljaju. ABC importeri su prisutni u prokariotima, a funkcija im je unos, najčešće hidrofilnih tvari, u stanicu. Također, postoje i ABC eksporter koji su prisutni i u prokariotima i u eukariotima, a funkcija im je izbacivanje štetnih tvari iz stanica. Postoji i treća skupina ABC proteina koja se, osim u funkciji koju obavlja, razlikuje od prethodne dvije skupine u tome što nisu transporteri, već sudjeluju u translaciji i popravku oštećene DNA molekule [1].



Slika 1. Prikaz strukture ABC transportera [1].

ABC transporteri imaju međusobno sličnu strukturu koja se sastoji od dvije transmembranske domene prikazane na slici 1. Transmembranska domena omogućuje prolaz tvari kroz fosfolipidni dvosloj i kroz citoplazmatsku domenu, a upravo citoplazmatska domena omogućava vezanje i hidrolizu ATP-a. Za razliku od citoplazmatske, transmembranska domena je vrlo heterogena u primarnoj i sekundarnoj strukturi, što znači da primarna i sekundarna struktura nemaju ista svojstva, a razlikuju se po u duljini i broju zavojnica kojih može biti 10-20, a najčešće ih je 6 po molekuli transportera [1].

2.1. Mehanizam djelovanja ABC transportera

Za djelovanje ovih transportera, neophodan je utrošak energije. Stoga prvo dolazi do hidrolize ATP-a zbog čega dolazi do konformacijske promjene molekule transportera, a zatim dolazi do prijenosa ATP-a preko domene koja veže ATP na transmembransku domenu nekovalentnim interakcijama. Do konformacijske promjene dolazi zbog približavanja dviju domena koje vežu ATP te dolazi do smanjivanja njihove međusobne udaljenosti za 10-15 Å. Nakon toga, dolazi do mijenjanja konformacije transmembranske domene iz konformacije koja je okrenuta prema unutrašnjosti stanice u onu koja je okrenuta izvan stanice. Te konformacijske promjene su značajne kod eksportera za izbacivanje tvari iz stanice, ali i kod importera za vezanje supstrata s vanjske strane membrane kako bi se unio u stanicu. Zatim, dolazi do otpuštanja ADP-a i anorganskog fosfata prilikom čega dolazi do ponovne konformacijske promjene molekule transportera. Kao rezultat toga, sada je transmembranska domena transportera okrenuta prema unutrašnjosti stanice što je vrlo značajno kod importera jer se time omogućava otpuštanje supstrata u citoplazmu, a eksporterima vezanje novog supstrata za transport izvan stanice [1].

3. Višestruka otpornost na lijekove (engl. *Multidrug Resistance*, MDR)

Bellamy i sur. (1996) su otkrili da se rezistencija na neke lijekove može mijenjati pomoću nekih spojeva kao što su npr. ciklosporin i verapamil (slike 2. i 3.). Navedeni spojevi smanjuju ili eminiraju otpornost na neke lijekove. Trenutno se vrše klinička ispitivanja za mijenjanje aktivnosti P-glikoproteina s ciljem da se utvrdi hoće li strategije uopće biti izvedive. P-glikoprotein je eksprimiran u tumorskim stanicama pacijenta, ali ne toliko eksprimiran da bi izazvao otpornost na lijekove [2].

Krajem 1960.-tih i početkom 1970.-te godine, opisane su stanične linije tumora čija je značajka ekspresija P-glikoproteina. Kod ljudi postoje dva usko povezana gena: MDR₁ i MDR₂ ili MDR₃ (engl. *Multidrug resistance*, geni za rezistenciju na lijekove) Ti geni visoko kodiraju homologne P-glikoproteine. Bitno je naglasiti da je samo MDR₁ gen povezan na fenomen rezistencije na više lijekova [2].

Na kliničkoj razini postoji malo dokaza da su MDR transporteri glavni čimbenici koji određuju rezistenciju na lijekove pa je iz tog razloga najprikladnije ABC transportere smatrati biomarkerima fenotipa rezistencije na stresne podražaje, kao što su kemoterapija i radioterapija. Stanice raka imaju veću rezistenciju na različite stresne podražaje (kemoterapija i radioterapija) ukoliko imaju veću sposobnost prilagodbe tijekom promjenjivih i nepovoljnih uvjeta. Ta sposobnost prilagodbe posljedica potencijalnog reprogramiranja stanica. Hipoksija i izloženost kemoterapeutskim lijekovima induciraju kemorezistenciju koja je ovisna o lizosomu. Također, ukoliko je stanica raka izložena kemoterapeutskim lijekovima, može aktivirati središnji transkripcijski faktor koji povećanjem biogeneze lizosoma omogućava odvajanje lijekova s lizosoma, a to rezultira jakim fenotipom rezistencije na lijekove [3].

3.1. Obitelj MDR₁ gena

Procesom transfekcije DNA, utvrđena je uzročna uloga MDR1 gena u otpornosti na lijekove. Naime, dokazano je da je kodiranje gena MDR1 bilo dovoljno za davanje fenotipa MDR-a, što uključuje ekspresiju P-glikoproteina. Ljudski gen MDR1 se nalazi u 7. kromosomu, a njegov proteinski dio gena sadrži 27 egzona. Naime, 14 egzona kodira lijevu polovicu proteina, a 13 egzona kodiraju desnu polovicu proteina. Također, otkriveno je da postoji više od jednog gena MDR-a kod hrčka, miša, a i čovjeka te da se obitelj gena P-glikoproteina hrčka sastoji od tri člana, a to su: *pgpl*, *pgp2* i *pgp3* [2].

Neki ljudski MDR1 geni odgovaraju genima miševa. Ti geni su *mdrla* i *mdr2a* koji je još poznat i kao *mdr3*. Ipak, dokazano je da *mdr2* gen nije uključen u otpornost na lijekove. Isto tako, dokazano je i da ljudi posjeduju MDR gen koji je također poznat kao MDR2 gen. Primijećeno je da miševi homozigoti imaju jedan poremećaj u *mdr2* genu, koji je analogan ljudskom MDR3 genu, te da se kao posljedica toga javila bolest jetre – nemogućnost jetre da sintetizira fosfolipide. Bellamy i sur. (1996) su utvrdili da je MDR3 gen glavni P-glikoprotein koji je eksprimiran u stanicama endotela kapilara mozga te su u njegovom nedostatku razine lijekova postale povišene [2].

3.2. Transport i vezivanje lijekova

Jedna od ranije uočenih promjena u MDR tumorskim stanicama je to da je došlo do smanjenog nakupljanja lijeka. Dakako, još nije otkriveno točno kojim načinom se uklanja lijek iz stanice. Postoji hipoteza o načinu uklanjanja lijekova iz stanice, a hipoteza glasi da P-glikoprotein funkcionira kao transmembranski protein koji formira pore. Prvotno se smatralo da se lijekovi uklanjaju iz citoplazme na način da prolaze kroz jednu poru koju čini P-glikoprotein. Također, nekoliko vrsta transporta lijekova nije u potpunosti objašnjeno ovim modelom uključujući i široku specifičnost molekule supstrata i nemogućnost koreliranja početne brzine istjecanja lijeka s koncentracijom P-glikoproteina. Kako bi objasnili takve razlike, Gottesman i Higgins (1996) su pretpostavili da MDR prenositelj ima ulogu tzv. „hidrofobnog usisavača.“ On bi djelovao na način da uklanja lijekove iz plazma membrane prije nego što dođu u citoplazmu. Konkretnije, taj model kaže da je primarna odrednica specifičnosti supstrata sposobnost lijeka da stupi u interakciju s lipidnim dvoslojem. Sekundarna odrednica je njezina sposobnost da ostvari interakciju s mjestom vezanja prenositelja. Ali postoji odstupanje u ovom modelu koje se objašnjava činjenicom da se lijekovi prvo umetnu u lipidni dvosloj, a tek onda stupe u interakciju s P-glikoproteinom [2].

Ostvaren je napredak u identificiranju mjesta na koje se vežu lijekovi na P-glikoprotein ispitivanjem proteolitičkih fragmenata fotoafiniteta azidopina koji je označen MDR1 genom. Mjesta vezivanja su lokalizirana u dvije regije. Prva regija je transmembranska domena ili citoplazmatska domena (TM 5 ili 6), a druga regija je područje unutar transmembranske domene 12 ili citoplazmatsko područje koje se nalazi neposredno nakon TM12. Ovakav način označavanja je u skladu s prisutnošću dva različita mjesta na koja se može vezati lijek [5].

3.3. MDR1 ekspresija

P-glikoprotein je izražen u endotelnim stanicama kapilara mozga i testisa. Ekspresija u ovim stanicama je relevantna za pojašnjavanje nastanka barijere krv-mozak i krv-testisi jer utječe na postizanje određene razine lijekova u testisima i središnjem živčanom sustavu. Za održavanje krvno-moždane barijere važne su spomenute endotelne stanice kapilara ali i kontinuirane međustanice kapilara i specifični transportni sustavi na njihovim membranama [6].

Tsuji i sur. (1996) su dokazali da se vinkristin i rodamin (citostatici) aktivno transportiraju iz endotelnih stanica pokazujući na taj način funkcionalnu komponentu ekspresije P-glikoproteina. Cjelokupni mehanizam navedenog fenomena još nije u potpunosti razjašnjen, no znanstvenici smatraju da umetanje P-glikoproteina u plazma membranu utječe na kretanje stanica i na međustaničnu adheziju. Također se smatra da bi to moglo biti uzrok povećanja agresivnosti tumora pomoću P-glikoproteina [7].

4. P-glikoprotein

P-glikoprotein je transmembranski protein koji prenosi strukturno raznovrsne supstrate kroz staničnu membranu. Prijenos se odvija iz unutrašnjosti stanice u ekstracelularni medij. P-glikoprotein pripada skupini ABC transportera koji posreduju u aktivnom transportu supstrata. To se odvija uz utrošak energije koja je oslobođena hidrolizom ATP-a. Utvrđeno je da P-glikoprotein ima mogućnost prijenosa poprilično velikog broja važnih lijekova koji se primjenjuju za liječenje raznih bolesti. Također, P-glikoprotein može utjecati i na efikasnost lijekova. Ukoliko P-glikoprotein ima visoki nivo ekspresije u enterocitima, P-glikoprotein će imati ulogu obrane tkiva od ksenobiotika. Ta činjenica može biti uzrok niske bioraspoloživosti lijekova i njihove ograničene distribucije u neka tkiva [4].

Dakako, pretjerana ekspresija P-glikoproteina u malignim stanicama predstavlja jedan od značajnih mehanizama razvoja otpornosti na antitumorske lijekove. Prepoznavanje utjecaja P-glikoproteina na farmakokinetiku lijekova te poznavanje njegovog značaja u razvoju otpornosti na antineoplastiku (lijekovi koji se koriste za liječenje neoplastičnih bolesti, npr. raka) je neophodno za razmatranje transporta lijek-kandidat pomoću P-glikoproteina. Danas je dostupan veći broj selektivnih inhibitora za koje se očekivalo da će pomoći u liječenju tumora s MDR fenotipom na način da se poveća efikasnost antitumorskih lijekova. Međutim, lijekovi su se pokazali neuspješnima, stoga je bitno kod sinteze novih antitumorskih lijekova da oni ne budu supstrati za P-glikoprotein [4].

4.1 Kinetika P-glikoproteina

Kinetika istjecanja lijeka pomoću P-glikoproteina je opisana jednadžbom (1):

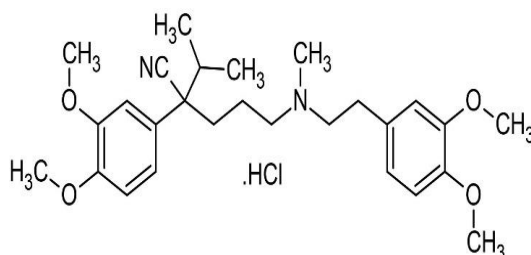
$$J_{pgp} = V_{max} \times C / K_m + C \quad (1)$$

gdje je J_{pgp} istjecanje lijeka pomoću P-glikoproteina, v_{max} je maksimalna brzina P-glikoproteina po jedinici površine, c je koncentracija supstrata, a K_m je konstanta afiniteta.

Reakcija slijedi kinetiku mješovitog reda ili Michaelis-Menten kinetiku te se još zove i nelinearnom kinetikom ovisnoj o dozi. Ukoliko je $K_m \gg c$, a koncentracija lijeka je niska, efluks slijedi kinetiku prvog reda. To znači da je efluks proporcionalan koncentraciji lijeka, stoga se povećava linearno s koncentracijom lijeka. Ukoliko je koncentracija lijeka visoka, $K_m \ll c$, dolazi do zasićenja nosača proteina. Također, dolazi i do istjecanja konstantom brzinom. Efluks slijedi kinetiku nultog reda [5].

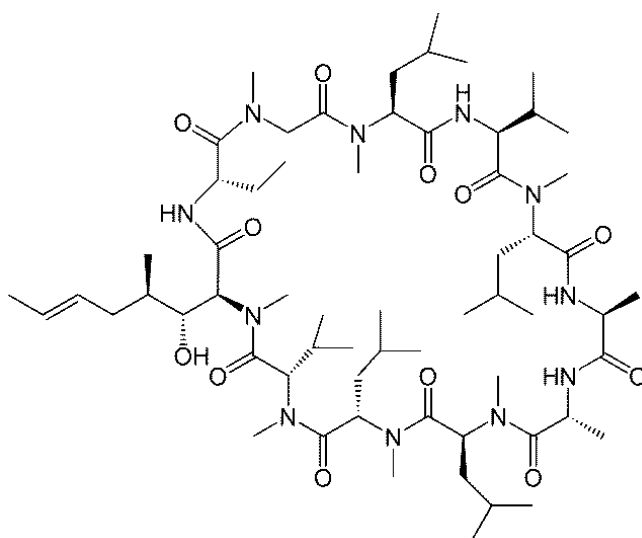
5. Inhibitori prve generacije

Spojevi koji pripadaju prvoj generaciji inhibitora P-glikoproteina su bili razvijeni u neke druge terapijske svrhe. Međutim, pokazali su se vrlo učinkovitim u modulaciji MDR-a kada su primjenjivani u kombinaciji s antitumorskim lijekovima. Primjer jednog od spojeva koji pripada prvoj generaciji P-glikoproteina je verapamil čija je struktura prikazana na slici 2.



Slika 2. Prikaz strukture verapamila [10].

Budući da se radi o kompetitivnoj inhibiciji P-glikoproteina, za inhibiciju je potrebna visoka koncentracija inhibitora s ciljem da se dobije odgovarajuća koncentracija unutar stanice potrebna za istiskivanje antitumorskog lijeka s aktivnog mjesta P-glikoproteina. Visoka koncentracija inhibitora je razlog toksičnosti te su neki od navedenih inhibitora pokazali neželjene efekte u koncentracijama koje su neophodne za inhibiciju P-glikoproteina. Ovoj kategoriji pripadaju: verapamil, ciklosporin (slika 3.), antineoplastični vinkristin i dr. [10].

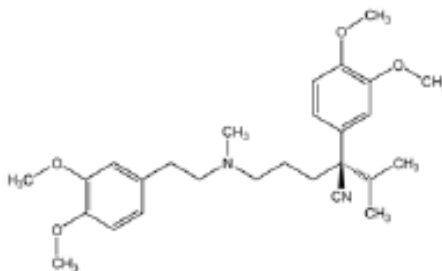


Slika 3. Prikaz strukture ciklosporina A [10].

Inhibitori prve generacije se strukturno razlikuju, kao što se može vidjeti na primjeru verapamil i ciklosporin A, prikazanih na slikama 2. i 3. Smatra se da se inhibitori s različitim strukturama mogu vezati za aktivna mjesta P-glikoproteina, ali na različit način. Također, neki inhibitori prve generacije predstavljaju i supstrate za neke druge transportere te je to razlog nepredvidivih farmakokinetičkih interakcija kada se u njihovoj blizini nalaze kemoterapeutici [10].

6. Inhibitori druge generacije

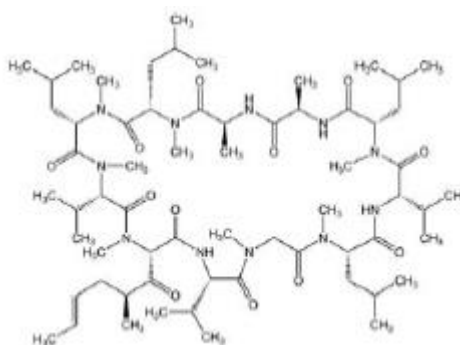
Inhibitorima druge generacije pripadaju modificirani analozi inhibitora P-glikoproteina prve generacije. Neki od njih su: deksniguldipin, valspodar, deksverapamil i birikodar. Za razliku od inhibitora prve generacije, inhibitori druge generacije su aktivniji i manje toksični. Primjer za to je deksverapamil, izomer verapamila čija je struktura prikazana na slici 4 [11].



Slika 4. *Strukturni prikaz deksverapamila.* [11].

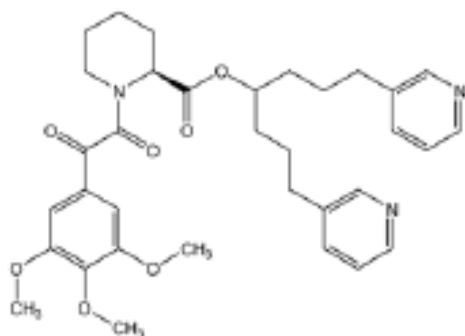
Valspodar je strukturni analog ciklosporina C te je on najviše proučavan od svih inhibitora druge generacije. Valspodar je derivat ciklosporina D. On također inhibira P-glikoprotein na način da pokazuje 20-30 puta veću aktivnost za razliku od ciklosporina A [10, 11].

Nedostatak inhibitora druge generacije je to što nisu dovoljno selektivni, a to za posljedicu ima ograničavanje njihove kliničke upotrebe. Primjerice, valspodar ima sposobnost inhibiranja P-glikoproteina i drugih proteina iz porodice ABC transportera. Specifičnost valspodera je slična kao specifičnost citokroma P-450 [12].



Slika 5. *Strukturni prikaz valspodara* [12].

Naime, enzimi citokroma P-450 su s ABC transporterima uključeni u metabolizam citotoksičnih lijekova. Valspodar ima mogućnost inhibiranja citokroma P-450 te utječe na metabolizam vinblastina i paklitaksela. Budući da valspodar ima utjecaj na metabolizam vinblastina i paklitaksela, dolazi do povećane koncentracije citotoksičnih agensa u citoplazmi koji predstavljaju rizik za pacijente koji su već neko vrijeme izloženi citotoksičnim lijekovima [12].



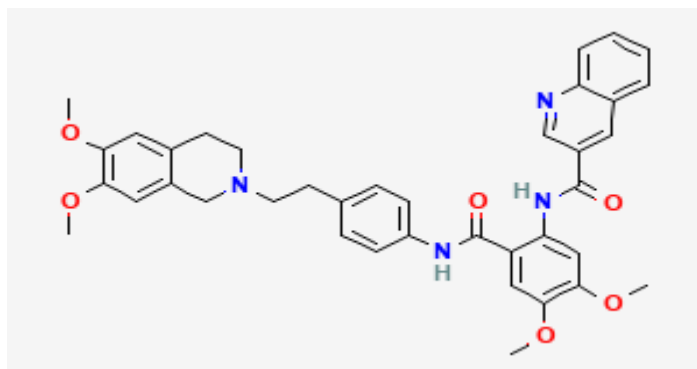
Slika 6. Strukturni prikaz birikodara [12].

Birikodar-citrat je također inhibitor druge generacije. Birikodar-citrat može izbaciti lijekove iz stanice jer ima veliki afinitet vezanja za pumpu P-glikoproteina. Ukoliko se primjenjuje u intravenskoj infuziji, smanjuje se klirens odnosno mjera sposobnosti organizma da eliminiira lijek (npr. paklitaksel). Pretpostavlja se da je navedena interakcija nastala uslijed inhibicije citokroma P-450 te interferencijom u metabolizmu paklitaksela. Farmakokinetička interakcija se može ukloniti tako da se smanji doza citotoksičnih lijekova, što može dovesti do predoziranja kod nekih pacijenata jer su interakcije između inhibitora (birikodar-citrata) i citotoksičnih agenasa nepredvidljive. Nepredvidljivost je razlog zašto se ne može odrediti efektivna doza citotoksičnog lijeka, koja se upotrebljava zajedno s inhibitorom (birikodar-citratom), što ograničava upotrebu inhibitora druge generacije da se koristi u terapiji protiv tumora [12].

7. Inhibitori treće generacije

Inhibitori treće generacije imaju mnogo više prednosti nego inhibitori prve i druge generacije. Naime, inhibitori treće generacije su specifičniji i aktivniji za razliku od inhibitora prve i druge generacije. Također, ne ostvaruju interakcije s citokromom P-450. Inhibitori treće generacije su napravljeni sa svrhom razvoja modulatora koji su specifičniji i aktivniji od inhibitora prve i druge generacije. Klinička istraživanja su dokazala da se neki inhibitori treće generacije mogu primjenjivati u kombinaciji s punim dozama citotoksičnih agenasa zbog minimalne interfencije u farmakokinetici citotoksičnih agenasa [12].

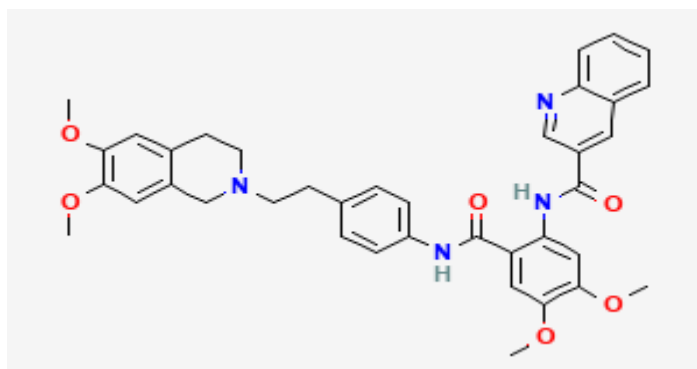
P-glikoprotein ima nekoliko aktivnih mjesta na koja se vežu ligandi. Vezanje liganada se odvija različitim mehanizmom. Postoje razlike u mehanizmu inhibitora druge i inhibitora treće generacije. Naime, inhibitori druge generacije se vežu direktno i kompetitivno za pumpu P-glikoproteina te se natječu sa supstratom za transport. Budući da je vezanje za P-glikoprotein kompetitivno, potrebna je određena koncentracija inhibitora da bi se supstrat mogao istisnuti s mjesta vezanja za transporter. U toj određenoj koncentraciji, inhibitor djeluje nespecifično te potencijalno uzrokuje neželjene reakcije. Inhibitor treće generacije, konkretnije tarikvidar, veže se za alosteričko mjesto na pumpi i to je jedna od karakteristika koja razlikuje inhibitore treće generacije od inhibitora druge generacije [12, 13].



Slika 7. *Strukturna formula tarikvidara [14].*

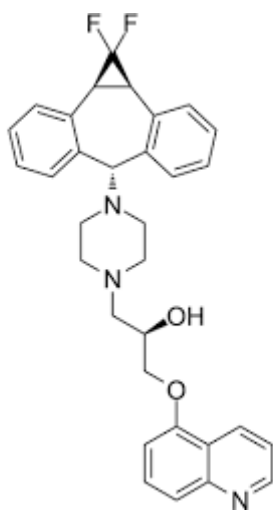
Inhibitori treće generacije su dizajnirani pomoću primjene analize struktura inhibitora prve i druge generacije. Cilj tog dizajniranja je zaobilazanje ograničenja druge generacije modulatora P-glikoproteina. Modulatori treće generacije ne utječu na funkciju citokroma P-450 i smatra se da ne inhibiraju ni neke druge ABC transportere. Utjecaj modulatora treće generacije na ekskreciju kemoterapeutika je smanjen zbog specifičnosti za pumpu P-

glikoproteina. Trenutno su inhibitori treće generacije u fazi kliničkih ispitivanja s ciljem da se istraži pokazuju li predstavnici inhibitora treće generacije promjene u farmakokinetici uz istodobno konzumiranje citotoksičnih lijekova. Neki od inhibitora treće generacije koji su u fazi kliničkih ispitivanja su, osim tarikvidara, zosukvidar, lanikvidar te supstituirani diarilimidazoli. Tarikvidar, čija je struktura prikazana na slici 7., je perspektivan inhibitor P-glikoproteina treće generacije. Tarikvidar se koristio u terapiji čvrstih tumora s kemoterapeuticima [12].



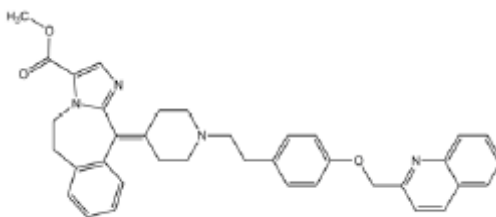
Slika 7. *Strukturna formula tarikvidara* [14].

Zosukvidar je jedan od predstavnika inhibitora treće generacije. Koristi se za liječenje u kombinaciji s terapeutikom kao tarikvidar. Zosukvidar ne pokazuje nikakve farmakokinetičke interakcije s doksorubicinom. Struktura zosukvidara je prikazana na slici 8. [12, 14].



Slika 8. *Strukturna formula zosukvidara* [14].

Lanikvidar je također jedan od predstavnika inhibitora treće generacije čija je struktura prikazana na slici 9.



Slika 9. Strukturni prikaz lanikvidara [12].

Trenutno se nalazi u drugoj fazi kliničkih ispitivanja u terapiji tumora dojke. Očekuje se da će predstavnici inhibitora treće generacije u budućnosti poboljšati liječenje tumora kemoterapijom [12].

7.1. Interakcija aktivnih tvari u bilju i P-glikoproteina

Biljni ekstrakti imaju sposobnost ometanja nekih konvencionalnih lijekova kod pacijenata koji boluju od kroničnih stanja, kao što su dijabetes ili hipertenzija. Naime, uvođenje terapije biljnim ekstraktima može rezultirati nekim nuspojavama koje mogu dovesti do hiperglikemije ili hipoglikemije kod ljudi koji boluju do dijabetesa [15].

Gospina trava (*Hypericum perforatum* L.) je induktor P-450 i induktor P-glikoproteina što znači da inducira njegov transport. Gospina trava inducira P-glikoprotein tako da povećava ekspresiju citokroma P-450 pomoću sastojka hiperforina koji je sastavni dio gospine trave. Budući da povećava ekspresiju citokroma P-450, smatra se najaktivnijim sastojkom gospine trave. Osim hiperforina, gospina trava sadrži razne spojeve poput flavonoida (rutin, kvercetin, hiperozid), hipericin, fenilpropanoidi, fitokemikalije i hiperforin [16].

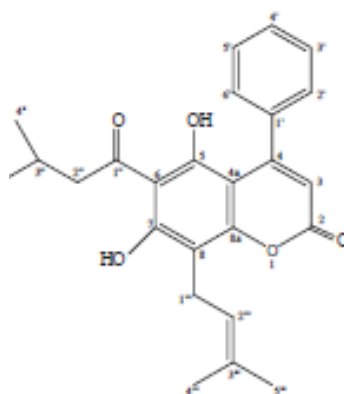
Ehinaceja (*Echinacea purpurea* L.) je biljka čiji se pripravci koriste kao antimikrobno sredstvo i za jačanje imuniteta. Ona sadrži fenilpropanoide, cikloričnu kiselinu, klorogenu kiselinu, flavonoide, polisaharide i sl. Neki od sastojaka, kao što su ciklorična kiselina i alkamidi, su uključeni u inhibiciju citokroma P-450. Hansen i sur. (2009) su proučavali interakcije ehinaceje s P-glikoproteinom i dokazali da utjecaj ekstrakta ehinaceje na P-glikoprotein ovisi o koncentraciji ekstrakta [17].

Također, i češnjak (*Allium sativum* L.) se koristi kao sredstvo za jačanje imuniteta. Sadrži organosumporne spojeve kao što su *S*-alil-cistein, alicin i njihovi derivati. Dakako, ti spojevi sudjeluju i u indukciji citokroma P-450. Ekstrakti ginka (*Ginkgo biloba* L.) sadrže aktivne sastojke kao što su bilobalidi, ginkolipidi i flavonoidi. Upravo ti flavonoidi iz ekstrakta ginka inhibiraju P-glikoprotein. Također, kao biljni lijekovi se koriste i kava (*Piper methysticum* L.) i crni papar (*Piper nigrum* L.) Kava služi za rješavanje tjeskobe, budući da sadrži laktone i inhibira gen citokroma P-450 [17].

Unger i sur. (2006) su istraživali utjecaje kave na P-glikoprotein. Inhibirano je *in-vitro* nekoliko humanih izoenzima citokroma P-450 te je dokazano da kava ima *in-vitro* inhibitorno djelovanje na P-glikoprotein [18].

Biljni lijekovi imaju mogućnost povećanja ili smanjenja biorasploživosti lijekova pomoću P-glikoproteina ili pak putem citokroma P-450. U nekim slučajevima, može doći do kontradiktornih aktivnosti. Na to koji će se mehanizam upotrijebiti u nekom slučaju, utječu količina sastojaka te njihova kvaliteta i upravo je to razlog pojave kontradiktornih aktivnosti. Upravo iz tog razloga, potrebno je adekvatno procijeniti biljne lijekove [15].

Noysang i sur. (2014) su istraživali citotoksičnost ekstrakata jasmína (*Jasminum sambac* L.) i biljke *Mammea siamensis* L., čija je struktura prikazana na slici 9, i način na koji istraživani ekstrakti imaju utjecaj na inhibiciju P-glikoproteina. Međutim, utjecaj ekstrakata nije u potpunosti razjašnjen te je još u fazi istraživanja [19].



Slika 9. Strukturni prikaz *Mammea siamensis* L. [19].

Istraživali su inhibiciju P-glikoproteina u endotelnim stanicama mozga, ali način na koji ekstrakti tajlandskih ljekovitih biljaka utječu na inhibiciju P-glikoproteina nije još poznat. Ovi autori su u tom radu obavili analizu kalcein-acetoksimetilestra i otkrili da kalcein-

acetoksimetilestra utječe na aktivnost P-glikoproteina. Esterske veze kalcein-acetoksimetilestra se unutar stanice brzo cijepaju te nastaje fluorescentni kalcein koji je zarobljen unutar stanice. Budući da su neki ekstrakti povećali fluorescenciju kalceina u stanicama, izgleda da je istjecanje kalcein-acetoksimetilestra spriječeno pomoću P-glikoproteina [19].

Noysang i sur. su istraživali inhibiciju rasta stanica leukemije ispitivanjem u ekstraktima biljaka pomoću diklormetana, metanola, vode i *n*-heksana. Istraživanja su pokazala da postoji citotoksično djelovanje za ekstrakte *n*-heksana i diklormetana. Postavljalo se pitanje imaju li ekstrakti mogućnost moduliranja otpornosti stanica raka protiv antitumorskog lijeka doksorubicina. U istraživanju su koristili verapamil. Istraživanjem je pokazano da su ekstrakti *n*-heksana i diklormetana nekih od ljekovitih biljaka (jasmin) smanjili otpornost doksorubicina u CEM/ADR5000 stanicama leukemije. Također, u CCRF-CEM stanicama leukemije nije primijećen nikakav učinak. Stanice CEM/ADR5000 su 5000 puta više otpornije na doksorubicin za razliku od CCRF-CEM stanica te dodatak verapamila nije preokrenuo otpornost CEM/ADR5000 stanica na doksorubicin na razinu CCRF-CEM stanica [19].

7.2. Strategije medicinske kemije za otkrivanje inhibitora P-glikoproteina

Modulatori P-glikoproteina se mogu podijeliti u četiri vrste. Prva vrsta je izravna interakcija s mjestima vezanja za lijekove na P-glikoproteinu pri tome izazivajući kompetitivnu inhibiciju. Druga vrsta je interakcija s alosteričkim ostatkom za modulaciju aktivne konformacije P-glikoproteina time stvarajući nekompetitivnu inhibiciju, dok je treća vrsta vezanje ATP-a na P-glikoprotein proizvodeći nekompetitivnu inhibiciju. Posljedna, četvrta karakteristika je interakcija s membranskim lipidnim dvoslojem. Ligandi, koji su strukturno različiti pokazali su se učinkovitima kao inhibitori P-glikoproteina te se iz tog razloga inhibitori P-glikoproteina mogu podijeliti u devet kategorija prema njihovim strukturnim značajkama. Neki od inhibitora P-glikoproteina su tetrahidroizokinolin, flavonoidi, aromatični i heterociklički dimeri, steroidi i dr. [20].

Jedan od navedenih spojeva je 6,7-dimetoksi-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin koji ima ključnu ulogu u inhibiciji P-glikoproteina. Kasnije je otkriveno još nekoliko 1,2,3,4-tetrahidroizokinolinskih analoga koji su bili strukturno povezani s prethodnim s 6,7-dimetoksi-1,2,3,4-tetrahidroizokinolinskim dijelom. Ti analozi imaju čak i veću moć u inhibiranju funkcije ili pak ekspresije P-glikoproteina za razliku od inhibitora P-

glikoproteina treće generacije. Dong i sur. (2020) su sintetizirali derivat bifenila s tetrahidroizokinolnim dijelom. Tim istraživanjem, razvili su se dodatni moćni i selektivni modulatori P-glikoproteina te uvedene funkcionalne skupine na različitim položajima bifenilne jezgre. Nadalje, sintetizirane su i različite serije analoga tetrahidrokinolina koji se sastoje od 5-fenil-2-furanskog dijela koji djeluju kao inhibitori P-glikoproteina. Ispostavilo se da je ta serija spojeva imala veću inhibitornu učinkovitost nego druga dva niza spojeva. Ipak, spoj koji sadrži metoksilnu skupinu u *para*-položaju, ima najveću inhibitornu moć koja se pokazala čak i većom od inhibitorne moći ciklosporina A. Također, spoj s najvećom inhibitornom moći je povećao citotoksičnost doksorubicina u nekim stanicama [20].

Nadalje, istraživanje istih autora je pokazala i da su metoksi skupine kritične za njihovu učinkovitost kao inhibitori P-glikoproteina. Dokazano je i da P-glikoprotein učinkovit zbog prisutnosti kovalentne veze. Međutim, ukoliko bi 2,3 dvostruka veza bila odsutna, došlo bi do inhibicije P-glikoproteina što se zapravo i ne poklapa s prethodnim istraživanjima, koja kažu da su metoksi skupine razlog inhibicije P-glikoproteina. Ne poklapa se iz tog razloga što bi se P-glikoproteini i dalje mogli inhibirati neovisno o prisutstvu metoksi skupine, a to onda znači da ona nije presudna za inhibiciju P-glikoproteina [20].

Dong i sur. su sintetizirali šest topljivih konjugata u vodi koji se mogu razgraditi na kvercetin-aminokiseline. Jedan od konjugata se pokazao vrlo učinkovitim te je senzibilizirao stanice tumora na doksorubicin, aktinomycin D i vinblastin. Za razliku od kvercetina, taj je spoj imao bolju topljivost i bolju učinkovitost [20].

Kako bi se dobili jači inhibitori P-glikoproteina, dodatno je istražena učinkovitost odabranih novosintetiziranih spojeva (označenih u radu kao spoj 81 i 82) strategijama za oblikovanje lijekova. Naime, amino-terminalne jedinice tiazola su se zamijenile metoksiliranim arilima jer metoksi skupine imaju sposobnost povećanja selektivnosti za vezanje na P-glikoprotein. Odabrani spojevi pokazali su se kao moćni inhibitor P-glikoproteina jer imaju mogućnost inhibiranja istjecanja kalcein-acetoksimetilestra. Osim navedenog, spoj 82 ima mogućnost i snažne stimulacije aktivnosti ATP-aze P-glikoproteina [20].

Višestruka otpornost na lijekove je i do današnjih dana velika prepreka u kvalitetnom liječenju raka. Uzevši u obzir dominantnu ulogu P-glikoproteina u višestrukoj otpornosti na lijekove, neophodno je razviti specifične, netoksične i učinkovite inhibitore P-glikoproteina [20].

8. Zaključak

P-glikoproteini prenose razne antitumorske lijekove koji se primjenjuju za liječenje raka. Za sprječavanje djelovanja P-glikoproteina, koriste se inhibitori koji se dijele u tri generacije: inhibitori prve, inhibitori druge i inhibitori treće generacije. Iz rada se može zaključiti da je treća generacija P-glikoproteina pogodnija za liječenje nego što su to prva i druga generacija jer su se inhibitori prve i druge generacije pokazali toksičnima. Rezultati pokazuju da se inhibitori treće generacije, poput tariavidara, mogu koristiti u kombinaciji s punim dozama citotoksičnih agenasa te se očekuje da će inhibitori P-glikoproteina treće generacije u budućnosti doprinijeti razvoju i poboljšanju kemoterapije.

Međutim, bitno je napomenuti da treba biti oprezan kod konzumiranja farmakoloških lijekova u kombinaciji s citotoksičnim agensima P-glikoproteina. Potrebno je prije konzumacije detaljno proučiti moguće nuspojave kako bi se poboljšalo zdravstveno stanje pacijenta. Danas veliku važnost imaju i ekstrakti biljaka koji su se pokazali inhibitorima P-glikoproteina jer nisu toksični kao što su primjerice inhibitori prve i druge generacije. Smatra se da će u bliskoj budućnosti biti savladana rezistencija na lijekove koja je izazvana P-glikoproteinom.

9. Literaturna vrela

- [1] K. Hollenstein, R. Dawson, K. P. Locher, *Curr Opin Struct Biol.* **17** (2007), 412-418.
- [2] W.T. Bellamy, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36** (1996), 161-183.
- [3] T.A. Stratulat, M. Pešić, A. Čipak Gašparović, I.P. Trougakos, C. Riganti *Drug Resist Updat.* **46** (2019), 100643.
- [4] M.M. Gottesman, I. Pustan, *Annu Rev Biochem.* **62** (1993), 385-427.
- [5] E.P. Bruggemann, S.J. Currier, M.M. Gottesman, I. Pastan, *J Biol Chem.* **267** (1992), 21020-21026.
- [6] C. Cordon- Cardo, J.P. O' Brien, D. Casals, L. Rittman- Grauer, J.L. Biedler, M.R. Melamed, J.R. Bertino, *Proc Natl Acad Sci USA* **86** (1989), 695-698.
- [7] E.J. Hegmann, H.C. Bauer, R.S. Kerbel, *Cancer Res.* **52** (1992), 6969-6975.
- [8] S. Erić, M. Kalinić, *Arh. Farm.* **65** (2015) 89-114.
- [9] KM.R. Srivalli, P.K. Lakshmi, *Braz. J. Pharm. Sci.* **48** (2012), 353-367.
- [10] D.R. Ferry, H. Traunecker, D.J. Kerr, *Eur J Cancer.* **32A** (1996), 1070-1081.
- [11] P.A.W. te Boekhorst, J. van Kopel, M. Schoester, P. Sonneveld, *Cancer Chemother Pharmacol.* **30** (1992) 238-242.
- [12] S. Erić, K. Ilić, *Arh. farm.* **60** (2010), 271-284.
- [13] L. van Zuylen, K. Nooter, A. Sparreboom, J. Verweij, *Invest New Drugs.* **18** (2000), 205-220.
- [14] L.H. Lê, M.J. Moore, L.L. Siu, A.M. Oza, M. MacLean, B. Fisher, A. Chaudhary, D.P. de. Alwis, C. Slapak, L. Seymour, *Cancer Chemother Pharmacol.* **56** (2005), 154-160.
- [15] E. Attard, *Medical portals Ltd.* **1** (2012), 12-12.
- [16] L. Henderson, Q.Y. Yue, C. Bergquist, B. Gerden, P. Arlett, *Br J Clin Pharmacol.* **54** (2002), 349-356.
- [17] A.A. Izzo, E. Ernst, *Drugs.* **69** (2009) 1777- 1798.
- [18] J. Weiss, A. Sauer, A. Frank, M. Unger, *Drug Metab Dispos.* **33** (2005), 1580-1583.
- [19] C. Noysang, A. Mahringer, M. Zeino, *J. Ethnopharmacol.* **155** (2014), 633-641.
- [20] J. Dong, Z. Qin, W.-D. Zhang, G. Cheng, Y.G. Assaraf, C.R. Ashby Jr., Z.-S. Chen, X.-D. Cheng, J.-J. Qin, *Drug Resist Updat.* **49** (2020), 100681.