

HOOFSTUK 1

GENEESMIDDEL WEERSTANDBIEDENDHEID

1.1. Inleiding

Die ontwikkeling van weerstandbiedendheid teen geneesmiddels is een van die grootste oorsake waarom die behandeling van baie siektes soms nog deesdae misluk. Na ongeveer 'n eeu van moderne geneesmiddels, is siektes wat deur mikro-organismes en parasiete veroorsaak word nog nie heeltemal uitgeroei nie. Die vernaamste rede hiervoor is dat alle vorme van lewe die vermoë besit om by veranderde (soms baie ongunstige) omstandighede aan te pas om te oorleef. Weerstandbiedende stamme kom voortdurend te voorskyn. Dit vereis 'n voortdurende soektog na nuwe, meer effektiewe chemoterapeutiese geneesmiddels en antibiotikums. Geneesmiddel weerstandbiedendheid speel ook 'n baie belangrike en beperkende rol in die doeltreffende chemoterapeutiese behandeling van kanker. Kanker selle pas, net soos ander lewende organismes, ook by veranderde omstandighede aan, om te oorleef [Kellen, 1994].

Daar word jaarliks ongeveer 1 miljoen nuwe kanker gevalle wêreldwyd gediagnoseer. In ongeveer die helfte van hierdie gevalle is die tumore nog tot die gebied van oorsprong beperk en kan dit met behulp van chirurgie en bestraling genees word. Daarenteen is die enigste hoop op genesing van pasiente met kankers, soos leukemieë en limfome, chemoterapeutiese behandelings. Chemoterapeutiese geneesmiddels word ook in die behandeling van tumore wat deur metastase versprei het, gebruik [Gottesman & Pastan, 1993]. Kankers wat suksesvol met chemoterapeutiese geneesmiddels behandel kan word, sluit onder andere akute limfoblastiese leukemieë by kinders, Hodgkin se siekte, Burkitt se limfoom, Ewing se sarkoom ('n tipe beenkanker), Wilm se tumor ('n nier-kanker by kinders), rhabdomiosarkoom ('n kanker van die spierweefsel), choriokarsinoom ('n kankeragtige plasentale trofoblast), testikulêre kanker, sekere ovarium kankers en osteogeniese sarkoom in [Pratt *et al*, 1994a]. Ongelukkig veroorsaak die huidige beskikbare chemoterapeutiese behandelings slegs lang-termyn oorlewing in 'n klein gedeelte (5% - 10%) van die gevalle. In die meeste gevalle is hierdie kankers reeds metastaties tydens diagnose en/of toon dit kliniese

weerstandbiedendheid teen chemoterapeutiese geneesmiddels [**Gottesman & Pastan, 1993**].

Kliniese, sellulêre geneesmiddel weerstandbiedendheid word gedefinieer as die toestand waar 'n populasie kanker selle onsensitief is of verlaagde sensitiwiteit teen anti-kanker geneesmiddels, by 'n konsentrasies wat normaalweg seldoding sou veroorsaak, toon. Sellulêre weerstandbiedendheid in kanker kan in twee hoof groepe verdeel word, naamlik intrinsieke (primêre) geneesmiddel weerstandbiedendheid en verworwe (geïnduseerde) geneesmiddel weerstandbiedendheid [**Kellen, 1994**].

1.2. Intrinsieke vs verworwe weerstandbiedendheid

1.2.1. Intrinsieke weerstandbiedendheid

'n Populasie kanker selle is intrinsiek weerstandbiedend indien dit nie op inisiële chemoterapie met 'n anti-kanker geneesmiddel of 'n kombinasie van anti-kanker geneesmiddels reageer nie [**Pratt et al, 1994b**]. Kankers wat gewoonlik met intrinsieke weerstandbiedendheid geassosieer word sluit soliede tumore, soos nie-klein-sel long kanker, kolorektale kanker en ander kankers met hul oorsprong in die gastro-intestinale- en urinêre kanaal, kanker van die lewer, melanome sowel as tumore van die brein en sentrale senuwee stelsel, soos glioblastoom, in [**Lum et al, 1993**]. Alhoewel intrinsiek weerstandbiedende tumore nie van 'n spesifieke karakteristieke sellulêre oorsprong afkomstig is nie, ontstaan hierdie kankers in baie gevalle vanuit selle wat die vervoer-kanale, bloedare en uitskeidingsorgane uitvoer [**Fojo et al, 1987**]. Die normale fisiologiese funksie van hierdie selle is die vervoer, detoksifisering en uitskeiding van 'n verskeidenheid toksiese verbindings waaraan die liggaam blootgestel word. Die kanker selle behou waarskynlik hierdie normale fisiologiese funksie en lei gevolglik tot die detoksifikasie, uitskeiding en eliminering van die chemoterapeutiese geneesmiddels vanuit die selle [**Young, 1989**].

1.2.2. Verworwe weerstandbiedendheid

Sekere kanker-selle reageer aanvanklik goed op behandeling met anti-kanker

geneesmiddels, maar ontwikkel tydens verloop van die chemoterapeutiese behandeling weerstandbiedendheid teen die geneesmiddels waarteen dit aanvanklik sensitief was. Hierdie weerstandbiedendheid staan as verworwe geneesmiddel weerstandbiedendheid bekend [Pratt *et al*, 1994b]. Verworwe geneesmiddel weerstandbiedendheid kan in twee subklasse verdeel word. Eerstens kan die selle spesifieke weerstandbiedendheid teen slegs een klas van geneesmiddels, soos metotreksaat, ontwikkel [Nunberg *et al*, 1978]. Tweedens is verworwe geneesmiddel weerstandbiedendheid wat by sommige selle voorkom nie tot een spesifieke klas van geneesmiddels beperk nie, maar is die selle teen 'n groot verskeidenheid onverwante geneesmiddels kruis-weerstandbiedend. Hierdie tipe weerstandbiedendheid staan as veelvuldige geneesmiddel of pleiotropiese geneesmiddel weerstandbiedendheid bekend [Ling & Thompson, 1974; Fojo *et al*, 1985].

Kanker tipes wat gewoonlik met verworwe geneesmiddel weerstandbiedendheid geassosieer word, sluit sekere akute leukemieë, groot sel limfome, Hodgkin se siekte, testikulêre kanker, klein-sel long kanker, ovarium karsinoom en metastatiese bors kanker in. Tydens metastatiese bors kanker toon die pasiente aanvanklik 'n dramatiese respons op die chemoterapeutiese behandeling, maar weerstandbiedendheid ontwikkel onder die oorblywende (residuele) kankerselle en het tot gevolg dat baie min pasiente genees word [Lum *et al*, 1993].

1.3. Veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid (“multidrug resistance”; MDR)

Verskeie navorsers het gevind dat indien sommige weefselkultuur-selle *in vitro* vir weerstandbiedendheid teen 'n enkele geneesmiddel geselekteer word, die selle terselfdertyd kruis-weerstandbiedendheid teen verskeie ander lipofiliese, natuurlike produk geneesmiddels toon [Kessel *et al*, 1968; Biedler *et al*, 1975; Gottesman & Pastan, 1993; Lum *et al*, 1993; Sikic *et al*, 1997; Pallares-Trujillo *et al*, 2000] (Tabel 1.1).

Tabel 1.1: Chemoterapeutiese Geneesmiddels wat met MDR geassosieer word.

Geneesmiddels wat met MDR geassosieer word	
Antrasikliene	DNA Interkaleerders
Daunorubisien	Etidium Bromied
Doksorubisien	
Epirubisien	Toksiese Peptiede
Idarubisien	Valinomisien
	Gramisidien
Epipodofillotoksiene	D,N-asetiel-leusiel-norleusinal (ALLN)
Etoposied	
Teniposied	Proteïen sintese inhibeerders
	Puromisien
Vinka Alkaloïede	
Vinblatien	Taksane
Vinkristien	Paklitaksel
Vinorelbien	Dokseltaksel
Antibiotikums	Ander
Aktinomisien D	Daktinomisien
	Plikamisien (mithramisien)
Anti-mikrotubulêre geneesmiddels	Amsakrien
Colchisien	Taksol
Podofillotoksiene	Mitomisien C
	Trimetreksaan
	Topotekan
	Mitramisien

Hierdie tipe weerstandbiedendheid staan as veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid (“multidrug resistance”; MDR) bekend [Endicott & Ling, 1989; Gottesman & Pastan, 1993]. Die anti-kanker geneesmiddels waarteen die MDR selle kruis-weerstandbiedendheid toon, verskil in ‘n groot mate ten opsigte van hul chemiese strukture sowel as hul meganismes van werking van mekaar [Lum *et al*, 1993]. Die enigste strukturele kenmerke wat hierdie geneesmiddels met mekaar deel, is dat hulle almal amfipatie, lipofiliese verbindings is wat in die meeste gevalle ‘n hidrofobiese aromatiese ring en ‘n positiewe lading by ‘n neutrale pH besit [Lum *et al*, 1993; Borst, 1984].

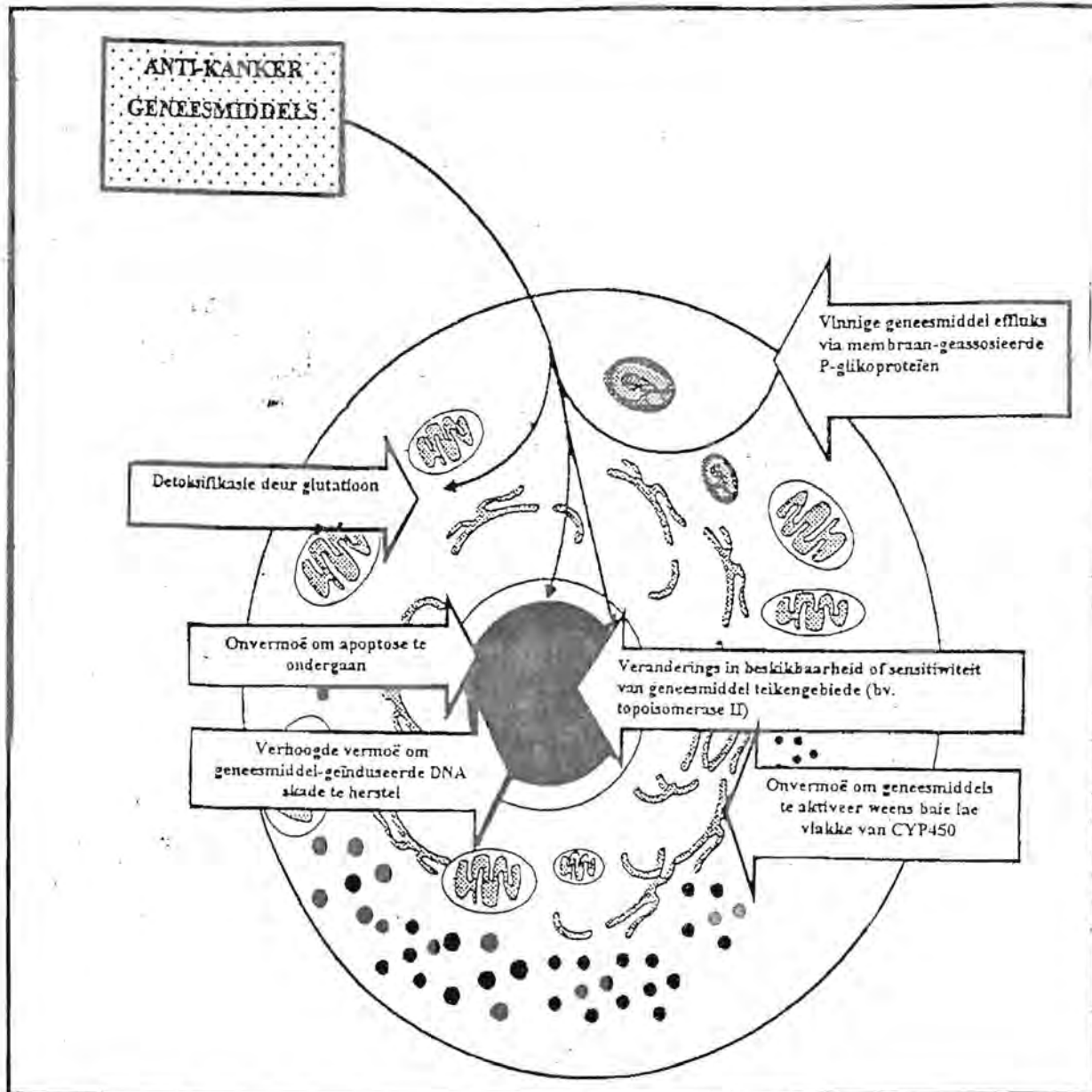
1.4. Meganismes betrokke by geneesmiddel weerstandbiedendheid

Daar is verskeie meganismes by die ontwikkeling van geneesmiddel weerstandbiedendheid in kanker selle betrokke. Dit is nodig om hierdie meganismes te verstaan sodat dit voorkom kan word sowel as meer effektiewe anti-kanker geneesmiddels ontwikkel kan word. Meer effektiewe anti-kanker geneesmiddels kan tot ‘n verbetering in die prognose van baie kankers lei. Die meganismes wat by geneesmiddel weerstandbiedendheid in kanker betrokke is, vind hoofsaaklik op sellulêre vlak plaas. Die spesifieke meganismes wat by elke kanker tipe betrokke is, hang van verskeie veranderlikes, soos die immuun respons van die gasheer, die tumor tipe en die geneesmiddels wat gebruik word, af [Kellen, 1994].

Die groot verskeidenheid sellulêre meganismes wat tot geneesmiddel weerstandbiedendheid kan lei, word in Figuur 1.1 opgesom [Harrison, 1995; Stavrovskaya, 2000]. Die verskillende meganismes word vervolgens kortliks bespreek.

1.4.1. Veranderinge in die geneesmiddel teiken

Die teikengebied van ‘n spesifieke anti-kanker geneesmiddel mag tydens die differensiasie en verdeling van kanker selle veranderinge ondergaan. Voorbeelde van geneesmiddel weerstandbiedendheid wat deur hierdie meganisme van werking veroorsaak word, sluit geneesmiddel weerstandbiedendheid teen metotreksaat as gevolg die oormatige produksie van die dihidrofolaat reductase



Figuur 1.1: 'n Skematiese voorstelling van die molekulêre meganismes van geneesmiddel weerstandbiedendheid in 'n kankersel.

ensiem in die kanker selle, asook die geneesmiddel weerstandbiedendheid teen 5-fluorourasiel as gevolg van die oormatige uitdrukking van die produksie van timidilaat ensiem in kanker selle, in [Berger *et al*, 1985; Pratt *et al*, 1994b]. Die oormatige uitdrukking van hierdie ensieme stel die kanker selle in staat om in die teenwoordigheid van anti-kanker geneesmiddels te oorleef.

1.4.2. Mislukking van pro-geneesmiddel aktivering

'n Tweede meganisme van werking wat vir die ontwikkeling van geneesmiddel weerstandbiedendheid verantwoordelik kan wees, is die onvermoë van die tumor sel om pro-geneesmiddels, soos siklofosfamied, te aktiveer. Metaboliese aktiveringsreaksies wat vir die aktivering van pro-geneesmiddels verantwoordelik is, is grootliks van die werking van lede van die sitochroom P450 geen superfamilie afhanklik [Nebert *et al*, 1991]. Die pro-geneesmiddel, siklofosfamied, word byvoorbeeld hoofsaaklik deur die sitochroom P450 ensiem, CYP2B6, metabolies geaktiveer. 'n Verlaging in die CYP2B6 vlakke lei gevolglik tot die ondoeltreffende bio-aktivering van geneesmiddels, soos siklofosfamied. Die maksimale biologiese aktiwiteit van die geneesmiddel word dus nooit bereik nie [Harrison, 1995].

1.4.3. Verhoogde detoksifikasie

'n Derde meganisme van werking wat by geneesmiddel weerstandbiedendheid betrokke mag wees, behels verhoogde detoksifikasie van chemoterapeutiese geneesmiddels vanuit die teikenselle. Die oormatige teenwoordigheid van glutatioon S-transferase-, glutatioon- sowel as glukuronsuur vlakke kan byvoorbeeld geneesmiddel weerstandbiedendheid tot gevolg hê, aangesien hierdie ensieme en verbindings die detoksifikasie en uitskeiding van geneesmiddels vanuit die kanker selle versnel [Morrow & Cowan, 1990; Harrison, 1995; Stavrovskaya, 2000].

1.4.4. Verandering in DNA herstel

Sommige anti-kanker geneesmiddels, soos stikstof mostert en nitroso-urease, vorm kovalente bindings met DNA [Pratt *et al*, 1994b]. Hierdie kovalente bindings kan

deur DNA herstel sisteme, soos die uitsnyding van die DNA/geneesmiddel komplekse, uit die DNA van die soogdier selle verwyder word [Ewig & Kohn, 1977]. Indien hierdie DNA herstel sisteme nie doeltreffend funksioneer nie, kan dit tot geneesmiddel weerstandbiedendheid aanleiding gee.

Die vermoë van die sel om DNA wanparing te herstel, speel ook 'n belangrike rol in die instandhouding van die genomiese stabiliteit van die sel. DNA wanparings-herstel sisteme in 'n sel dien as 'n aanduiding van die teenwoordigheid van DNA skade in 'n sel. Indien die DNA wanparings-herstel sisteme in 'n sel nie doeltreffend funksioneer nie, is dit nie in staat om onder andere geneesmiddel-geïnduseerde DNA skade te herken nie. Die sel is gevolglik nie in staat om apoptose te induseer nie. Laasgenoemde kan tot geneesmiddel weerstandbiedendheid lei [Fink *et al*, 1998].

1.4.5. Onvermoë om apoptose te induseer

'n Ander moontlike meganisme wat vir die ontwikkeling van geneesmiddel weerstandbiedendheid in kanker selle verantwoordelik mag wees, is die onvermoë van die kanker selle om apoptose te induseer [Stavrovskaya, 2000]. Die teenwoordigheid of afwesigheid van sekere onkogene in kanker selle kan 'n belangrike rol in die induksie van apoptose in die selle speel. So byvoorbeeld verhoed die oormatige uitdrukking van die *bcl2* onkogene in kanker selle, dat die selle apoptose ondergaan, selfs nadat geneesmiddel-geïnduseerde skade aan die selle aangerig is [Harrison, 1995; Reed, 1995; Piché *et al*, 1998]. Die oormatige produksie van die *bcl2* gekodeerde proteïen lei dus tot geneesmiddel weerstandbiedendheid. In teenstelling met *bcl2*, induseer die onkogene, p53, apoptose in selle [Clarke *et al*, 1993]. Die afwesigheid van p53 in muis timosiete het byvoorbeeld tot sellulêre weerstandbiedendheid teen die topoisomerase II inhibeerder, etoposied, in hierdie selle gelei. Baie menslike tumore het die funksie van p53 deur middel van mutasies of delesies verloor. Iwadata *et al* (1998) het getoon dat mutasies van die p53 geen in menslike astrosietiese tumore tot weerstandbiedendheid teen anti-kanker geneesmiddels wat DNA skade veroorsaak, aanleiding gee. Hierdie geen speel daarom moontlik 'n baie belangrike rol in kliniese

geneesmiddel weerstandbiedendheid [Harrison, 1995; Iwadata *et al*, 1998].

1.4.6. Uitsluiting of sekwestrasie van geneesmiddels

Een van die vernaamste meganismes van werking wat vir die ontwikkeling van MDR verantwoordelik is, is die aktiewe uitsluiting of sekwestrasie van chemoterapeutiese geneesmiddels uit die tumor selle. Die oormatige uitdrukking van 'n 170 kDa proteïen, die P-glikoproteïen (P-gp) is in die meeste gevalle vir die aktiewe uitsluiting van chemoterapeutiese geneesmiddels vanuit die selle verantwoordelik. P-gp staan ook as 'n energie-afhanklike "geneesmiddel uitwaartse vloei pomp" bekend [Harrison, 1995; Bolhuis *et al*, 1997; Sharom *et al*, 1999]. Die rol van P-gp in MDR sal in die Hoofstuk 2 meer volledig bespreek word.

Sommige weefselkultuur sellyne toon wel kruis-weerstanstambiedendheid teen 'n verskeidenheid anti-kanker geneesmiddels, maar druk nie P-gp oormatig op hul sel-oppervlaktes uit nie [Kellen, 1994]. Ander proteïene wat met hierdie tipe weerstandbiedendheid geassosieer word, sluit onder andere die veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende proteïen (MRP) en die long weerstandbiedende proteïen (LRP) in [Marsh *et al*, 1986; Scheper *et al*, 1996; Bolhuis *et al*, 1997; Twentyman, 1997; Den Boer *et al*, 1998; Hipfner *et al*, 1999; Scagliotti *et al*, 1999].

HOOFSTUK 2

P-GLIKOPROTEÏEN EN MDR

2.1. Ontdekking van P-glikoproteïen

Veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid (MDR) is in die laat 1960's vir die eerste keer waargeneem [Kessel *et al*, 1968; Ling & Thompson, 1974; Biedler *et al*, 1975]. Kessel *et al* het in 1968 getoon dat indien 'n P388 leukemie sellyn *in vitro* vir weerstandbiedendheid teen vinblastien geselekteer word, hierdie selle kruisweerstandbiedendheid teen verskeie ander anti-kanker geneesmiddels, soos daktinomisien, vinkristien en daunorubisien, toon. Biedler *et al* (1975) het hierdie waarneming bevestig deur aan te toon dat die inisiële seleksie van Chinese hamster ovarium (CHO) selle vir weerstandbiedendheid teen daktinomisien, tot kruisweerstandbiedend teen verskeie ander lipofiliese natuurlike produk geneesmiddels, soos mithramisien, mitomisien C, daunorubisien en die vinka alkaloiëde, gelei het.

'n Verlaging in die intrasellulêre akkumulering van anti-kanker geneesmiddels is in die meeste MDR selle wat die 170 kDa membraan glikoproteïen, P-gp, oormatig op hul seloppervlaktes uitdruk, waargeneem. Die afname in geneesmiddel akkumulering in die MDR selle, is aan die teenwoordigheid en werking van hierdie P-gp toegeskryf [Ling & Thompson, 1974; Juliano & Ling, 1976]. P-gp tree as 'n energie-afhanklike uitwaartse vloeipomp op wat verbindingsaktief uit die MDR selle pomp [Dano, 1973; Skovsgaard, 1978a; Skovsgaard, 1978b]. Hierdie P-gp-bemiddelde verlaging in geneesmiddel akkumulering het tot gevolg dat die anti-kanker geneesmiddels minder sitotoksies vir die selle is.

Die mate van P-gp uitdrukking in die selmembraan korreleer met die graad van geneesmiddel weerstandbiedendheid [Juliano & Ling, 1976]. Hierdie direkte verband tussen die mate van P-gp uitdrukking in MDR selle en die graad van MDR in die selle, is in 'n reeks sub-populasies van 'n MDR menslike limfoïede sellyn (CEM/VLB₁₀₀), getoon. Die CEM/VLB₁₀₀ sellyn is vanuit die oorspronklike geneesmiddel-sensitiewe CCRF/CEM sellyn ontwikkel en toon weerstandbiedendheid teen vinblastien by 'n konsentrasie van 100

ng/ml. Sub-populasies met 'n hoër mate van weerstandbiedendheid is geselekteer deur die selle aan toenemende konsentrasies (100, 200, 300, 500, 1000, 1800 en 2000 ng/ml) van vinblastien bloot te stel. Die mate van P-gp uitdrukking het in hierdie reeks sellyne toegeneem soos die graad van geneesmiddel weerstandbiedendheid in die selle verhoog het. 'n Soortgelyke verwantskap is ook tussen die relatiewe toename in P-gp uitdrukking en toename in weerstandbiedendheid vir aktinomisien D in MDR Chinese hamster long sellyne, waargeneem [Gerlach, 1989]. Mechetner *et al* (1998) het 'n sterk korrelasie tussen die mate van P-gp uitdrukking en die graad van *in vitro* weerstandbiedendheid teen taksol sowel as doksorubisien in kanker selle wat uit biopsies van borskankers geïsoleer is, waargeneem.

2.2. Strukturele eienskappe van P-gp

Verskeie molekulêre biologiese metodes is gebruik om die gene wat by veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid betrokke is, te identifiseer, te kloneer en te karakteriseer [Schoenlein, 1994]. Dit het tot die isolering van vol-lengte cDNA's wat vir P-gp kodeer, gelei [Croop, 1994]. Die bestudering van die nukleïensuur volgordes van hierdie geïsoleerder *mdr* cDNA's, sowel as immunositochemiese lokaliserings-studies met monoklonale teenliggame wat teen P-gp gerig is, het getoon dat die grootste gedeelte van die P-gp molekule in die selmembraan geleë is [Riordan & Ling, 1979; Croop, 1994]. Slegs 'n klein gedeelte van die P-gp molekule word aan die ekstrasellulêre kant van die selmembraan aangetref [Riordan & Ling, 1979].

Die molekulêre massa van P-gp molekules in die onderskeie soogdier spesies wissel tussen 130 en 180 kDa. Die molekulêre massa van P-gp wat in menslike selle uitgedruk word, is ongeveer 140 kDa [Croop, 1994; Sharom *et al*, 1999]. Ongeveer 10 tot 15 kDa van die waargeneemde molekulêre massa van P-gp kan aan N-gekoppelde glikolisering toegeskryf word [Greenberger *et al*, 1988].

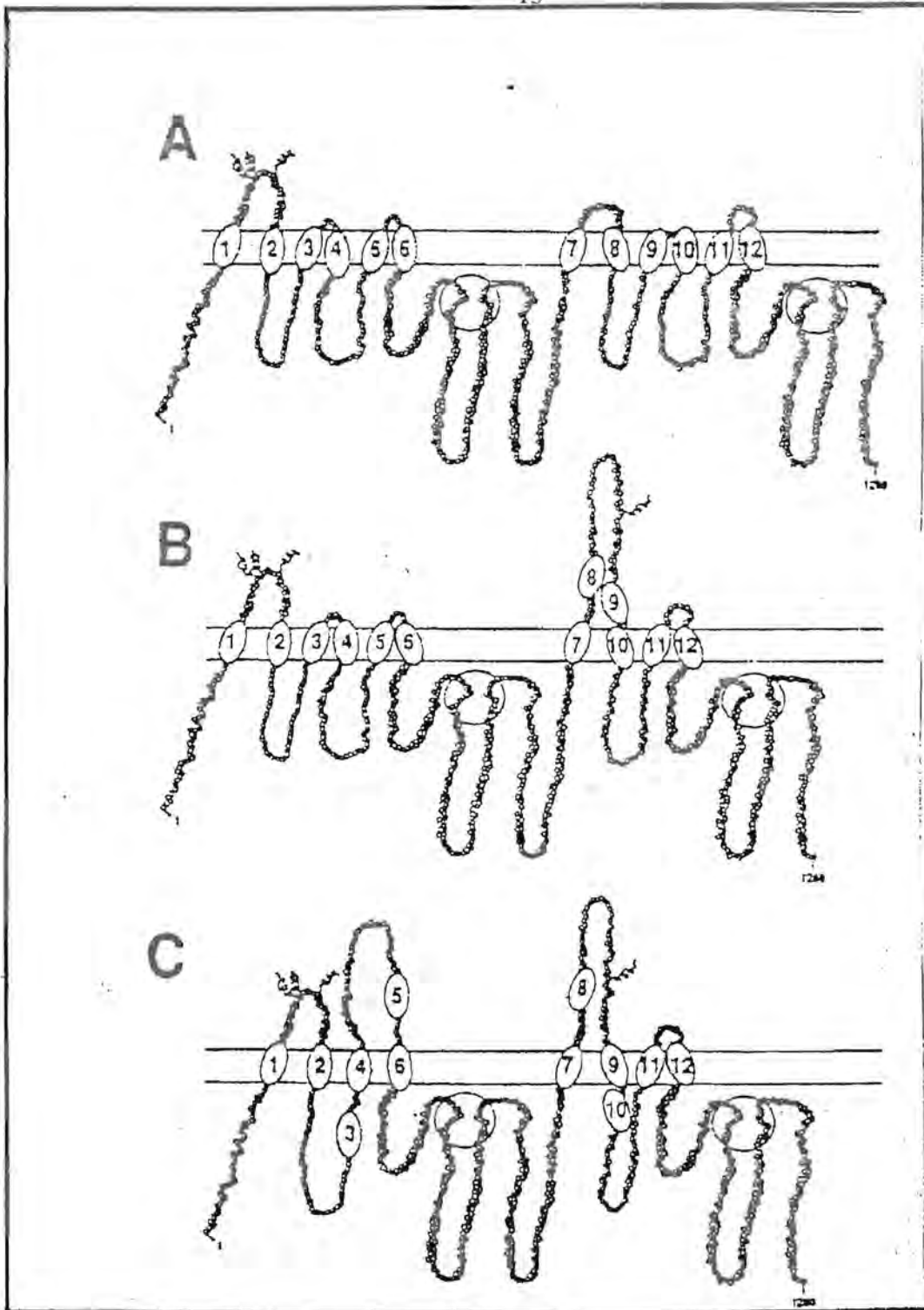
Verskeie strukturele eienskappe van P-gp is tydens die bestudering van die aminosuur volgordes van hierdie proteïen, geïdentifiseer [Croop, 1994]. Dit het tot die voorstelling van 'n algemeen aanvaarde model vir die struktuur van P-gp gelei. Volgens hierdie model

deurkruis die P-gp molekule die selmembraan 12 keer (Figuur 2.1A) [Chen *et al*, 1986; Gros *et al*, 1986]. Die P-gp molekule bestaan uit twee homoloë helftes wat onderskeidelik as die karboksi- en amino-helftes bekend staan. Elke helfte is uit drie transmembraan lusse saamgestel [Gerlach *et al*, 1986a; Gerlach, 1989]. Die eerte drie transmembraan lusse word deur 'n kort, hoogs gelaaiede sitoplasmiese gebied vooraf gegaan, terwyl die laaste drie transmembraan lusse deur 'n groot, gelaaiede sitoplasmiese gedeelte gevolg word. 'n Groep glikoliseringsgebiede word op die eerste eksterne lus van die P-gp molekule aangetref [Croop, 1994].

'n Groot sitoplasmiese gebied word tussen die twee helftes van die P-gp molekule aangetref (Figuur 2.1A) [Croop, 1994]. Hierdie sitoplasmiese gebied, sowel as die sitoplasmiese gebied wat na die laaste drie transmembraan lusse voorkom, bevat elk 'n gepaarde konsensus volgorde wat deur ongeveer 120 aminosure van mekaar geskei word om 'n ATP-bindingsvou te vorm [Walker *et al*, 1982; Croop, 1994]. Hierdie vou is in staat om ATP te bind en te hidroliseer [Ambudkar *et al*, 1992; Sarkadi *et al*, 1992].

Indien die twee helftes van die P-gp molekule teenoor mekaar gerig word, word 'n kort gedeelte wat nie met 'n ooreenstemmende gebied op die ander helfte ooreenstem nie, waargeneem [Van der Blik *et al*, 1987]. Hierdie gebied tree as brug tussen die amino- en karboksi-helftes van die P-gp molekule op en staan as die koppelingsgebied bekend [Van der Blik *et al*, 1987; Croop, 1994].

Die karboksi- en amino-helftes van 'n P-gp molekule stem in 'n groot mate (ongeveer 40%) met mekaar ooreen. Die grootste mate van aminosuur bewaring (ongeveer 60%) tussen die twee helftes word in die nukleotied bindingsvoue aangetref [Croop, 1994]. Aanvanklik is gedink dat 'n duplikasie gebeurtenis in die verlede tot die struktuur van P-gp aanleiding gegee het, maar die verlies aan homoloë plasing van intronne stel egter voor dat die twee helftes van die molekule óf onafhanklik van mekaar ontwikkel het óf dat 'n groot intron beweging na 'n duplisering gebeurtenis in die *mdr* geen plaasgevind het [Raymond & Gros, 1989; Chen *et al*, 1990; Gottesman & Pastan, 1993; Croop, 1994].



Figuur 2.1: Alternatiewe topologiese modelle vir die menslike veelvuldige geneesmiddel transporter.

- A: 'n 12-Transmembraan model. Die moontlike transmembraan gebiede word met genommere ovale aangedui. Die twee ATP-bindingsgebiede is omkring. Moontlike N-gekoppelde koolhidrate word deur die gekrulde lyne aangedui.
- B: 'n Alternatiewe 10-transmembraan model.
- C: 'n Alternatiewe 8-transmembraan model.

Die voorgestelde 12 transmembraan struktuur van P-gp, is die minimum vereistes waaraan die P-gp molekule moet voldoen om funksioneel te wees. Daar is aanvanklik aangeneem dat P-gp hoofsaaklik in hierdie monomeriese toestand funksioneer. Sommige navorsers het egter in teenstelling met hierdie stelling voorgestel dat P-gp as dimeer, of selfs as 'n oligomeer funksioneer [Germann, 1994]. Verskeie navorsers het getoon dat intramembraan partikels, met molekulêre massas wat tussen 250 kDa en 340 kDa wissel, in die selmembrane van MDR sellyne, voorkom [Sehested *et al*, 1989; Boscoboinik *et al*, 1990]. Hierdie molekulêre massa is ongeveer twee keer meer as die voorgestelde grootte van 'n monomeriese P-gp molekule [Boscoboinik *et al*, 1990]. Verskeie subeenhede van P-gp mag dus moontlik aan mekaar bind om 'n funksionele proteïen kompleks te vorm [Wright *et al*, 1985; Arsenaault *et al*, 1988]. Chemiese kruis-bindingstudies het die idee van 'n funksionele, aktiewe P-gp dimeer en/of oligomeer ondersteun [Naito & Tsuruo, 1992; Germann, 1994]. *In situ* behandeling van selle met 'n reagens wat kruis-bindings veroorsaak, het byvoorbeeld tot die identifisering van P-gp oligomere gelei. Die vorming en dissosiering van P-gp oligomere kan moontlik tot die doeltreffende funksionering van P-gp bydra. Hierdie hipotese moet egter nog eksperimenteel bevestig word, aangesien detergent-opgeloste P-gp wat vanuit plasmamembrane van MDR KB-V1 selle geïsoleer is, hoofsaaklik in die monomeriese vorm voorgekom het [Germann, 1994].

Verskeie navorsers het deur middel van gekoppelde transkripsie-translasie-translokasie bepalinge getoon dat alternatiewe topologiese vorme van P-gp ook moontlik mag bestaan [Zhang & Ling, 1991; Skach *et al*, 1993; Zhang *et al*, 1993]. Skach *et al* (1993) het getoon dat 'n menslike P-gp variant wat uit slegs 10 transmembraan gebiede bestaan, in menslike selle voorkom (Figuur 2.1B). Die struktuur van die eerste vier transmembraan gebiede van hierdie 10-transmembraan struktuur stem met dié van die oorspronklike 12-transmembraan model (Figuur 2.1A en B) ooreen [Germann, 1994]. In hierdie 10-transmembraan struktuur-model word die sitoplasmiese lus tussen die agste en negende transmembraan gebiede, in teenstelling met die oorspronklike 12-transmembraan struktuur-model, aan die ekstrasellulêre kant van die selmembraan aangetref (Figuur 2.1B) [Skach *et al*, 1993; Croop, 1994].

Zhang en Ling (1991) het 'n 8-transmembraan struktuur-model vir P-gp voorgestel (Figuur 2.1C). Hierdie navorsers het deur van 'n *in vitro* translasië bepaling gebruik te maak, bevestig dat 'n ekstrasellulêre gebied tussen die voorgestelde agste en negende transmembraan domeine, voorkom [**Zhang & Ling, 1991**]. Die amino-helfte van die 8-transmembraan P-gp bestaan egter slegs uit vier transmembraan segmente (Figuur 2.1C) [**Zhang et al, 1993**].

Die belangrikste verskil tussen die twee unieke 10- en 8-transmembraan P-gp struktuur modelle en die aanvanklik voorgestelde 12-transmembraan struktuur model, is die aantal hidrofobiese gebiede wat aan die ekstrasellulêre kant van die selmembraan voorkom. Hierdie verskille ten opsigte van die hoeveelheid ekstrasellulêre, hidrofobiese gebiede van P-gp, speel moontlik 'n rol tydens die herkenning, binding en vrystelling van anti-kanker geneesmiddel substrate deur P-gp. Dit is ook moontlik dat die binding en hidrolise van ATP die topologie van P-gp mag verander. Hierdie veranderde topologie is moontlik noodsaaklik vir die effektiewe meganisme van werking waartydens die geneesmiddel deur middel van die P-gp uitgepomp word. 'n Ander moontlikheid is dat die hidrofobiese gebiede 'n belangrike rol tydens proteïen-proteïen interaksies, soos tydens multimeer-vorming, mag speel. Dit is huidiglik onbekend of hierdie alternatiewe topologiese vorme van P-gp op funksionele bemiddelaars van verskillende funksionele fenotipes dui [**Germann, 1994**].

In beginsel word al drie hipotetiese modelle (agt-, tien- en twaalf- transmembraan gebiede) deur die bestaande data wat vanaf immunositochemiese lokaliseringstudies verkry is, ondersteun. Die monoklonale teenliggame wat in hierdie studies gebruik is, erken onder andere spesifiek die amino- en karboksi-terminale eindes, die twee ATP-bindings gebiede en die eerste en vierde ekstrasellulêre lus van die P-gp molekule. Die ligging van hierdie gebiede is dieselfde in al drie struktuurmodelle. Om meer duidelikheid te verkry oor watter topologiese vorm hoofsaaklik in soogdier selle voorkom, sal teenliggame wat spesifiek vir die polipeptied gebied wat aan verskillende kante van die plasma-membraan in die drie verskillende modelle voorkom, geproduseer moet word [**Germann, 1994**].

2.2.1. Homologie van P-gp met ander transport proteïene

Die bestudering van die cDNA's en genomiese klone wat vir verskeie ander transport proteïene in prokariotiese en eukariotiese selle kodeer, het getoon dat 'n hoë vlak van aminosuur ooreenstemming en strukturele bewaring tussen die verskillende transport proteïene, insluitend P-gp, oor die spesie-grense voorkom [Croop, 1994]. Hierdie hoë mate van ooreenstemming in die nukleïensuur en aminosuur volgordes van die verskillende transport proteïene het tot 'n hoë mate van strukturele bewaring tussen hierdie transport proteïene gelei [Gottesman, 1993; Croop, 1994]. Hierdie strukturele bewaring tussen die onderskeie transport proteïene van die verskillende spesies, stel 'n evolusionêre verwantskap tussen die proteïene voor [Gerlach *et al*, 1986b].

Die ATP-bindingsgebiede in die P-gp molekule korreleer tot 'n groot mate met die nukleïensuur volgordes van die nukleotied-bindingsvoue van die ander transport proteïene [Walker *et al*, 1982; Gottesman & Pastan, 1993; Gerlach, 1989]. Hierdie hoë mate van strukturele bewaring tussen die nukleotied bindingsvoue van die verskillende transport proteïene het daartoe gelei dat hierdie familie van proteïene as die ATP-bindingskasset (ABC) proteïen familie of vervoer ATPases bekend staan [Ames, 1986; Gottesman & Pastan, 1993]. Voorbeelde van ABC transport proteïene sluit proteïene wat in staat is om onder andere maltose, hemolisien B, β -hemolisien, leukotoksien, histidien, peptiede, polisakkariede en geneesmiddels in prokariotiese organismes te vervoer, in [Gerlach, 1989; Gottesman & Pastan, 1993]. Voorbeelde van ABC transport proteïene in eukariotiese selle sluit 'n pigment transporter in *Drosophila melanogaster*, 'n proteïen pomp wat chloroquine weerstandbiedendheid in *Plasmodium falciparum* bemiddel, die STE6 transporter wat die "a" peptied paringsfaktor in gis vervoer, die produk van die sistiese fibrose geen (CFTR), 'n peroksimale pomp wat indien dit muteer tot fatale serebro-hepato-renale disfunksie lei, asook twee gekoppelde gene, naamlik Tap-1 en Tap-2, wat met die vervoer van antigeniese peptiede tydens klas I antigeen presentering in die endoplasmiese retikulum, geassosieer word, in [Gottesman & Pastan, 1993].

2.3. Uitdrukking van P-gp in kanker sellyne en tumore

P-gp word veral teen hoë vlakke in MDR weefselkultuur sellyne en in sommige maligne weefsel uitgedruk [Croop, 1994]. Daar word drie *mdr* geen klasse in soogdiere aangetref [Gerlach, 1989]. Slegs die klas I en klas II *mdr* gene is in staat om veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid te veroorsaak [Gottesman & Pastan, 1988]. Sommige hoogs veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende sellyne druk beide die klas I en die klas II *mdr* gene terselfdertyd op hul sel-oppervlaktes uit. In ander MDR sellyne word slegs een van hierdie twee *mdr* geen klasse deur die selle uitgedruk. Die bydrae wat elk van hierdie klasse tot die weerstandbiedendheid lewer, is van die mate van selektiewe druk wat toegepas word, afhanklik. Die uitdrukking van die klas III P-gp varieer in 'n groot mate en korreleer nie met die graad van geneesmiddel weerstandbiedendheid nie [Croop, 1994].

Klas I en II P-gpe word ook gereeld in soogdier tumore uitgedruk, terwyl die klas III isovorm daarenteen in baie min soogdier tumore waargeneem word [Raymond *et al*, 1990; Nooter & Herweijer, 1991; Gottesman & Pastan, 1993; Croop, 1994; Chan *et al*, 1995]. Die uitdrukking van die klas III isovorm is hoofsaaklik tot sekere B-sel maligneiteite beperk. Die funksionele rol van die klas III P-gp in hierdie tipe kanker is nog onbekend [Nooter & Herweijer, 1991; Gottesman & Pastan, 1993].

P-gp word in beide intrinsieke sowel as verworwe geneesmiddel weerstandbiedende tumore uitgedruk [Lum *et al*, 1993]. In meeste van die intrinsiek weerstandbiedende kankers is die uitdrukking van P-gp 'n inhirente eienskap van die neoplasma, aangesien die tumor uit selle wat onder normale omstandighede lae vlakke van P-gp uitdruk, ontwikkel het [Schoenlein, 1994]. Hierdie inhirent weerstandbiedende tumore druk hoë vlakke van P-gp uit, al is die pasient nie voorheen aan chemoterapie blootgestel nie [Lum *et al*, 1993]. Voorbeelde van sulke kankers, is kankers wat hul oorsprong vanuit onder andere adrenale kortikale selle, renale proksimale tubulêre epiteel, biliêre hepatosiete, mukosale selle van die dun- en dikderm, asook kappilêre endoteel selle van die testis en die brein het [Schoenlein, 1994]. Ander P-gp-positiewe kankers wat ook onder die inhirente veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende fenotipe geklassifiseer kan word,

sluit eiland-sel karsinoom, karsinoïediese tumore, nie-klein sel long kanker met neuroendokrien kenmerke, adenokarsinoom, kankers van die maag en bors, chroniese leukemieë, non-Hodgkin se limfoom, chroniese mielogeneuse leukemie in blast krisis, sarkoom, astrositoom sowel as neuroblastoom in [Gottesman & Pastan, 1993; Lum *et al*, 1993]. In die geval van renale sel kanker, toon die meer gedifferensieërde tumore 'n hoër mate van P-gp uitdrukking. Dit wil daarom blyk asof die stadium van differensiasie in hierdie tumore 'n invloed op die mate van uitdrukking van P-gp uit oefen [Gottesman & Pastan, 1993]. Tishler *et al* (1992) het gevind dat 40% van nuut gediagnoseerde pediatriese primitiewe neuroektodermale tumore P-gp uitdruk. Hierdie tumore is hoogs weerstandbiedend teen chemoterapie [Lum *et al*, 1993]. Nabors *et al* (1991) het gevind dat 75% van gliomas, sowel as 25% van meningiomas by tye van diagnose P-gp uitdruk.

Sommige tumore, wat hul oorsprong uit weefsel het wat onder normale omstandighede nie P-gp uitdruk nie, druk wel P-gp uit [Gottesman & Pastan, 1993; Schoenlein, 1994]. P-gp word teen baie lae vlakke in hierdie tumore aangetref en kan selfs in sommige van hierdie kankers nie waargeneem word nie [Gottesman & Pastan, 1993; Lum *et al*, 1993; Ford & Hait, 1994]. Hierdie kankers sluit akute leukemieë, limfome, ovarium-, bors, gastriese- en long kankers, prostaat karsinome, klein sel long kankers en chroniese meïeloïede leukemieë (CML) in [Gottesman & Pastan, 1993; Lum *et al*, 1993; Ford & Hait, 1994]. 'n Hoogs betekenisvolle korrelasie is tussen die afwesigheid van waarneembare P-gp uitdrukking in ovarium en klein sel long kanker en die gunstige respons op chemoterapie waargeneem [Holzmayer *et al*, 1992]. Schwartzmann *et al* (1989) het gevind dat 83% van vel-biopsies van onbehandelde pasiente met Kaposi se sarkoom, P-gp uitdruk. Hierdie teenwoordigheid van P-gp uitdrukking het 'n negatiewe invloed op die behandeling van pasiente met Kaposi se sarkoom gehad [Schwartzmann *et al*, 1989].

Die hoë mate van P-gp uitdrukking in pediatriese neuroblastoom, korreleer met die onvermoë van hierdie kankers om op chemoterapeutiese behandeling te reageer [Gottesman & Pastan, 1993; Ford & Hait, 1994]. Byna alle pasiente met rhabdomiosarkoom en ongedifferensieerde sarkoom reageer aanvanklik goed op behandeling. Die teenwoordigheid of afwesigheid van P-gp uitdrukking in hierdie kankers

is daarom nie 'n aanduiding van die aanvanklike respons van hierdie pasiente op behandeling nie. Die mate van P-gp uitdrukking was egter 'n hoogs betekenisvolle voorspeller van lang terugval vrye periodes, sowel as algehele oorlewing in hierdie pasiente [Chan *et al*, 1990]. Die uitdrukking van P-gp voor behandeling is 'n prognostiese aanduiding van die sukses of mislukking van die behandeling van hierdie tipe kankers by kinders [Ford & Hait, 1994].

Baie kankers reageer aanvanklik goed op behandeling, maar die kanker keer dan op 'n latere stadium weer terug. Die uitdrukking van P-gp neem tydens hierdie terugval ("relapse") gebeurtenisse toe [Lum *et al*, 1993]. Kankers wat met verhoogde P-gp uitdrukking na 'n terugval geassosieer word, is onder andere akute nonlimfoblastiese leukemie (ANLL), pediatriese akute limfoblastiese leukemie (ALL), bors-kanker, veelvoudige mieloma, ovarium kanker, limfoom, rhabdomïeosarkoom sowel as neuroblastoom [Goldstein *et al*, 1989; Lum *et al*, 1993; Ford & Hait, 1994]. Daar was waarskynlik 'n klein aantal MDR-positiewe selle voor terapie in hierdie pasiente teenwoordig. Hierdie sel-populasie is in staat om die chemoterapeutiese behandeling te oorleef en is vir die terugval van die kanker verantwoordelik. 'n Ander moontlikheid is dat die chemoterapie die uitdrukking van die *mdr1* geen induseer [Gottesman & Pastan, 1993].

Verhoogde P-gp uitdrukking is in pasiente met verskeie hematologiese kankers, soos onder andere akute meïeloïede leukemie (AML), akute limfositiese leukemie (ALL) en kroniese meïeloïede leukemie (CML) in blast krisis waargeneem [Marie *et al*, 1991; Van den Heuvel-Eibrink *et al*, 2000]. Die mate van P-gp uitdrukking het na 'n terugval van een van bogenoemde kankers toegeneem. Daar was 'n betekenisvolle afname in die waarskynlikheid om 'n volledige respons in die teenwoordigheid van verhoogde P-gp uitdrukking te verkry [Marie *et al*, 1991]. Verhoogde P-gp uitdrukking is veral 'n ongunstige prognostiese faktor in AML [Rischin & Ling, 1993; Marie & Legrand, 1999]. Pirker *et al* (1991) het die P-gp vlakke in pasiente met onbehandelde *de novo* AML ondersoek en gevind dat 53% van die pasiente met waarneembare P-gp uitdrukking 'n volledige respons teenoor 'n antrasiklien-bevattende induksie protokol getoon het. In die

monsters wat nie waarneembare P-gp vlakke het nie, het 89% volledig op die behandeling gereageer [Pirker *et al*, 1991]. Siekte vrye asook algehele oorlewing was ook betekenisvol beter in die P-gp-negatiewe groep [Schoenlein, 1994].

Die uitdrukking van P-gp in ALL is tot 'n mindere mate ondersoek as wat die geval vir AML is. P-gp word minder algemeen in ALL as in AML uitgedruk [Schoenlein, 1994]. Die uitdrukking van P-gp is, net soos in AML, 'n negatiewe prognostiewe faktor in pasiente met *de novo* ALL [Goasguen *et al*, 1993]. 'n Statisties betekenisvolle verskil is in die induksie van remissie, gebeurtenis-vrye oorlewing asook betekenisvolle volledige respons na 'n terugval in pasiente waarvan minder as 1% van die leukemiese selle P-gp uitdruk, waargeneem [Ford & Hait, 1994].

2.4. Die uitdrukking en funksie van P-gp in normale weefsel

Verskeie normale, “gesonde” selle druk ook P-gp op hul sel-oppervlak uit. Die mate van P-gp uitdrukking in hierdie selle is merkbaar laer as in veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende kanker selle [Kellen, 1994]. Die bestudering van die verspreiding van P-gp in normale menslike weefsel, het tot die identifisering van verskeie moontlike fisiologiese funksies vir hierdie proteïen gelei [Ford & Hait, 1994]. Die fisiologiese rol van P-gp in normale selle is waarskynlik om die liggaam teen endogene sowel as eksogene sitotoksiese verbindings te beskerm [Loo & Clarke, 1999].

Volwasse epiteel weefsels in die lewer, ingewande, nier, pankreas, kolon, vel, kappilêre bloedvate, gal, bronchiale mukosa, ovarium follikels, prostaat, bloed- brein en bloed-testikulêre skans druk P-gp uit [Kellen, 1994; Sikic *et al*, 1997]. P-gp word ook in die volwasse hormoon sekreterende organe, soos die adrenale korteks, uterus, endometriale selle en die plasentale trofoblaste uitgedruk [Arceci *et al*, 1988; Sugawara *et al*, 1988; Kellen, 1994]. Die maag, longe, oesofagus, bors, spier en blaas, sowel as haemopoïetiese voorloper selle in die beenmurg druk ook P-gp uit [Chin *et al*, 1989, Kellen, 1994; Sikic *et al*, 1997]. Die mees algemene isovorm wat in bogenoemde normale weefsel uitgedruk word, is MDR1 [Chin *et al*, 1989]. Die *mdr3* geen is huidiglik slegs in normale lewer, niere, adrenale kliere en milt waargeneem [Van der Bliek *et al*, 1988; Chin *et al*, 1989].

P-gp word reeds vroeg (vanaf die sewende week van swangerskap) in sekere weefsels van die fetus uitgedruk. Die verspreidingspatroon van P-gp uitdrukking in die fetus verskil van die P-gp verspreidingspatroon wat in volwasse weefsel waargeneem word. P-gp word byvoorbeeld nie in die selle van die fetale sone van die adrenale korteks uitgedruk nie, maar neem wel in die definitiewe sone van die fetale adrenale korteks toe, soos die swangerskap vorder. In teenstelling met die uitdrukking van P-gp in die volwasse ingewande, druk die pre-natale ingewande van die fetus nie P-gp uit nie. Die respiratoriese epiteel van die hoof bronchi en farinks, wat gewoonlik by volwassenes nie P-gp uitdruk nie, druk in die fetus wel P-gp uit. Hierdie uitdrukking van P-gp is vanaf die sesde maand van 'n swangerskap waarneembaar. Die nier en die lewer van die fetus druk P-gp reeds vroeg in die fetale stadium uit [Kellen, 1994].

P-gp speel waarskynlik 'n belangrike rol in die vervoer van steroïede in die adrenale kliere, uterus en plasenta [Ueda *et al*, 1992]. Hierdie stelling is deur waarnemings dat verbindings wat in staat is om die werking van P-gp te inhibeer, die uitskeiding van

steroïede in muis adrenale Y1 selle blokkeer, ondersteun [Chin *et al*, 1992]. Hierdie funksie van P-gp in die hormoon-sekretierende organe word ook verder deur die waarnemings dat sommige van die hormone wat deur hierdie weefsels uitgeskei word as substrate vir P-gp kan optree, ondersteun. Estradiool, kortisol en aldosteroon kan as substrate vir P-gp optree [Ueda *et al*, 1992; Germann, 1994]. Die steroïede, kortikosteroon, deoksikortikosteroon en progesteron kan daarenteen nie as substrate vir P-gp optree nie [Germann, 1994]. Wolf en Horwitz (1992) het wel getoon dat sommige van die hidrofobiese steroïede, soos kortikosteroon en progesteron, met muis P-gp interreageer. Die P-gp molekules beskerm moontlik die membrane van die hormoon-sekretierende organe teen die toksiese effekte van die opgeloste steroïede, deur die steroïede uit die selle van hierdie organe te vervoer [Germann, 1994]. Bradley *et al* (1990) het gevind dat P-gp teen hoë vlakke in slegs die adrenale korteks van manlike hamsters uitgedruk word. P-gp is daarom moontlik ook by die vervoer van geslag-spesifieke hormone betrokke [Bradley *et al*, 1990].

Die apikale plasmamembrane van die dunderm mukosa selle, die jejunale- sowel as die

ileale borsel grens (“brush border”) membraan vesikels druk ook P-gp uit. Hierdie gebiede is direk aan toksiese en karsinogeniese verbindings blootgestel. Die uitdrukking van P-gp is moontlik een van die detoksifiseringsmeganismes wat in hierdie gebiede voorkom en beskerm waarskynlik hierdie gebiede teen moontlike skadelike eksogene verbindings [Kellen, 1994; Schinkel, 1997; Sikic *et al*, 1997]. Schinkel (1998) het gevind dat intestinale P-gp ’n belangrike rol in die verwydering van toksiese verbindings (insluitend geneesmiddels) vanuit die bloed speel. Die P-gp molekules in die lumen voorkom ook dat toksiese verbindings in die lumen weer deur die bloedstroom opgeneem word [Schinkel, 1998].

Die brein en kappilêre endoteel selle druk ook P-gp in hul selmembrane uit. P-gp speel daarom moontlik ook ’n rol in die uitsluiting van xenobiotikums vanuit die sentrale senuwee stelsel [Kellen, 1994; Schinkel, 1997; Sikic *et al*, 1997; Schinkel, 1998].

P-gp word ook in die selmembrane van veral CD34-positiewe stamselle uitgedruk [Chaudhary & Roninson, 1991; Kellen, 1994]. Die stamselle verloor tydens die differensiasie proses stelselmatig die uitdrukking van die CD34-molekule. Terselfdertyd druk dit ook al laer vlakke van P-gp uit [Kellen, 1994]. Dit verklaar moontlik waarom haemopoïetiese stamselle weerstandbiedend teen anti-kanker geneesmiddels is [Chaudhary & Roninson, 1991]. Drach *et al* (1992) het gevind dat rooibloedsel voorlopers sowel as monositiese voorloper selle (CD33⁺/CD34⁻) nie P-gp uitdruk nie. Die vroeë mieloïede voorloper selle (CD33⁺/CD34⁺), mieloïede selle (CD33⁺/CD34⁻) asook vroeë (CD10⁺/CD19⁺) en volwasse (CD10⁻/CD19⁺) B-selle in die beenmurg druk wel P-gp uit [Drach *et al*, 1992]. P-gp speel moontlik ’n fisiologiese rol in die beskerming van stamselle teen skadelike verbindings [Kellen, 1994]. Chaudhary en Roninson (1991) het voorgestel dat die uitdrukking van P-gp in haematopoïetiese stamselle ook ’n rol tydens regulering van molekules wat by die differensiering en prolifisering van die selle is, mag speel. Hierdie transport aktiwiteit moet nog eksperimenteel bewys word.

Drach *et al* (1992) het gevind dat normale sirkulerende granuloseite ook P-gp op hul seloppervlakte uitdruk. Monosiete druk daarenteen nie P-gp uit nie [Drach *et al*, 1992].

Verskeie teenstrydige resultate is egter vir die uitdrukking van P-gp in hierdie selle geraporteer. **Gruber et al (1992)** het onder meer geraporteer dat 50% van monosiete wel waarneembare vlakke van *mdr1* mRNA besit. Hierdie navorsers kon geen uitdrukking van P-gp in granulose selle aantoon nie [**Gruber et al, 1992**]. Die rol van P-gp in granulose selle is nog onbekend.

Sirkulerende limfiese selle druk ook P-gp uit [**Chaudhary et al, 1992**]. 'n Hiërargie is in die mate waarteen sirkulerende limfiese selle P-gp uitdruk waargeneem. Die volgorde van die mate waarteen P-gp in hierdie selle uitgedruk word, is as volg: Sitotoksiese/suppressor T-selle (CD8) > T-helper selle (CD4) > B-selle (CD20). Die hoogste mate van P-gp uitdrukking word dus in die sitotoksiese/suppressor T-selle aangetref, terwyl die B-selle die laagste vlakke van P-gp uitdrukking toon [**Drach et al, 1992; Kellen, 1994; Ludescher et al, 1998**]. Hoër vlakke van P-gp uitdrukking is in naïewe T-selle (CD45RA-positief) as in geheue (“memory”) T-selle (CD45RO-positief) waargeneem [**Ludescher et al, 1998**]. Die rol van P-gp uitdrukking in sirkulerende limfiese selle is nog nie heeltemal bekend nie. **Schluesener et al (1992)** het voorgestel dat 'n P-gp transport sisteem in normale limfiese selle teenwoordig is. Hierdie sisteem beskerm die selle waarskynlik teen toksiese verbindings.

Natuurlike doderselle druk ook P-gp uit [**Drach et al, 1992; Kellen, 1994; Sikic et al, 1997; Ludescher et al, 1998**]. *In vitro* eksperimente met P-gp positiewe natuurlike doderselle het getoon dat behandeling van hierdie selle met chemosensitiseringsmiddels, soos verapamil, die sel-bemiddelde sitotoksiese aktiwiteit van natuurlike doderselle teen teikenselle inhibeer [**Ford & Hait, 1994**]. Die effektor- tot teiken-sel aktiwiteit word nie beïnvloed nie [**Chong et al, 1993**]. Hierdie resultate stel voor dat P-gp 'n aktiewe rol in die funksionering van perifere bloed limfiese selle mag speel, deur sitotoksiese sowel as sitoliseerders wat by natuurlike dodersel-bemiddelde sitotoksiese betrokke is, te vervoer [**Ford & Hait, 1994**]. Dit is moontlik dat natuurlike dodersel-bemiddelde sitotoksiese die uitdrukking van P-gp benodig [**Kellen, 1994**].

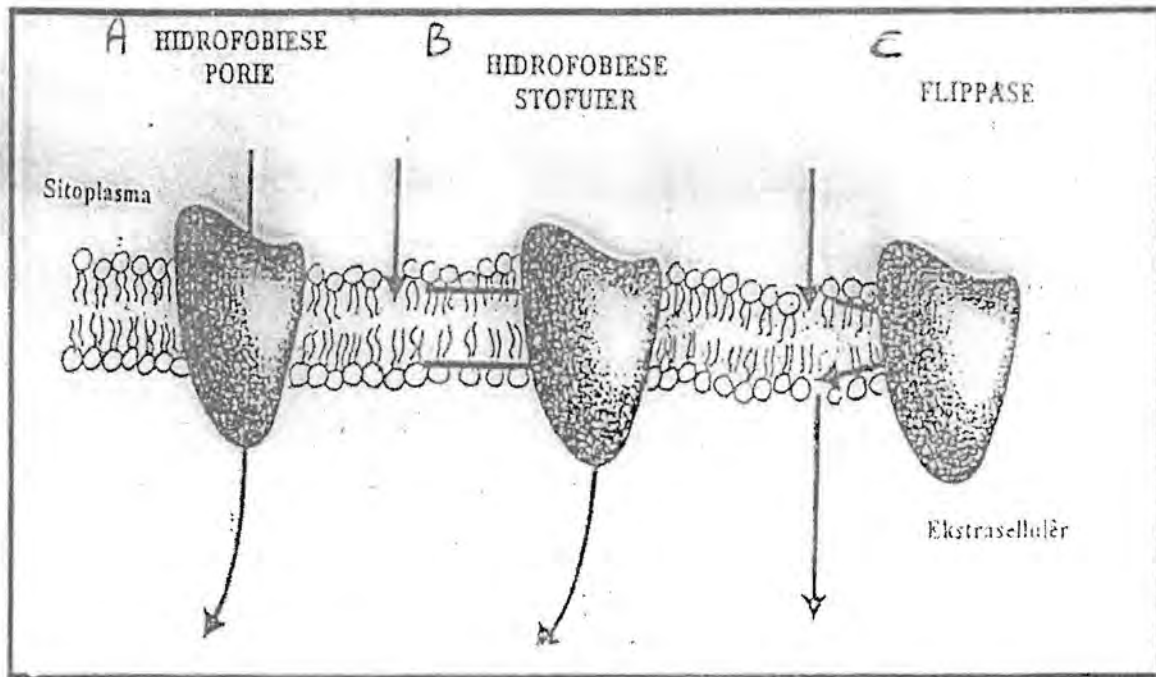
Die oormatige uitdrukking van P-gp in normale weefsel kan in sommige gevalle aan minimale weefsel beskadiging van die selle toegeskryf word [**Kellen, 1994**]. P-gp mag ook

moontlik by verskeie ander funksies betrokke wees. **Gosland *et al* (1993)** het byvoorbeeld voorgestel dat P-gp by die uitskeiding van bilirubien betrokke is. Die assosiering van P-gp in die Golgi apparaat van persone met die bloed tipe A, stel voor dat P-gp moontlik 'n rol in die prosessering en vervoer van spesifieke bloedgroep antigene speel [**Kellen, 1994**].

Die uitdrukking van P-gp is nie net ekstrasellulêr op die selmembraan waargeneem nie, maar is ook in die membrane van sitoplasmiese organelle waargeneem [**Labroille *et al*, 1998; Malorni *et al*, 1998; Shapiro *et al*, 1998**]. Die funksie van die intrasellulêre uitdrukking van P-gp is nog nie heeltemal duidelik nie. **Labroille *et al* (1998)** het voorgestel dat die sitoplasmiese P-gp as reservoir dien om 'n konstante vlak van P-gp uitdrukking op die sel-oppervlakte in stand te hou.

2.5. Meganisme van werking van P-gp

Verskeie modelle is vir die werking van P-gp tydens veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid voorgestel [**Roepe, 1995; Gottesman *et al*, 1996; Wadkins & Roepe, 1997**]. Hierdie modelle kan breedweg in twee kategorieë verdeel word, naamlik die modelle waarin P-gp direk die anti-kanker geneesmiddels uit die MDR selle verwyder sowel as die modelle waar P-gp indirek tot die verlaging in die intrasellulêre akkumulering van die anti-kanker geneesmiddels in MDR selle, lei [**Wadkins & Roepe, 1997**]. Die modelle waarin P-gp 'n direkte rol in die uitsluiting van anti-kanker geneesmiddels uit die MDR selle speel, sluit die “aktiewe geneesmiddel pomp” model, die “hidrofobiese stofsuiwer” model sowel as die “flippase” model, in (Figuur 2.2) [**Gottesman *et al*, 1996; Wadkins & Roepe, 1997**]. Die “veranderde partisie” model is as model voorgestel waar P-gp 'n indirekte rol in die verdeling en retensie van anti-kanker geneesmiddels in MDR speel, deurdat die oormatige uitdrukking van P-gp tot veranderings in die intrasellulêre pH, membraan potensiaal sowel as ander biochemiese/biofisiese veranderings in die MDR selle veroorsaak [**Roepe, 1995; Gottesman *et al*, 1996**].



Figuur 2.2: Moontlike roetes van P-glikoproteïen-bemiddelde geneesmiddel transport.

2.5.1. Direkte transport modelle

2.5.1.1. Modelle waarin P-gp die geneesmiddels vanuit die sitoplasma verwyder

2.5.1.1.1. Die “aktiewe geneesmiddel pomp” model

Die aktiewe uitwaartse geneesmiddel pomp model word deur die meeste navorsers wat op die gebied van MDR werksaam is, ondersteun. Hierdie model stel voor dat P-gp as ‘n aktiewe transportproteïen in die selmembrane van MDR selle funksioneer. Die P-gp-bemiddelde uitwaartse transport (“pomp”) van anti-kanker geneesmiddels, lei tot ‘n verlaging in die intrasellulêre konsentrasies van hierdie geneesmiddels in MDR selle (Figuur 2.2 A). Die intrasellulêre anti-kanker geneesmiddel konsentrasies word tot so ‘n mate deur P-gp in MDR selle verlaag, dat dit nie meer toksies vir die selle is nie [Higgins & Gottesman, 1992]. Die kanker selle toon gevolglik sellulêre weerstandbiedendheid teen die anti-kanker geneesmiddels. Data wat hierdie model ondersteun, is onder andere vanuit geneesmiddel bindingstudies, foto-affiniteitsmerking eksperimente, studies wat van diskrete aminosuur substitusies in P-gp gebruik gemaak het, sowel as waarnemings dat P-gp ATPase aktiwiteit besit en dat hierdie ATPase aktiwiteit deur die geneesmiddels wat deur P-gp vervoer word, gestimuleer word, verkry [Gottesman *et al*, 1996].

Die presiese wyse waarop hierdie P-gp-bemiddelde pomp proses plaasvind, is nog nie heeltemal duidelik nie. Die meganisme van werking van die uitwaartse pomp-aksie van P-gp word huidiglik op veral drie aannames gebaseer. Volgens die eerste aanname word die substraat-spesifisiteit van P-gp, deur ‘n ensiem-agtige substraat herkenningsgebied op die P-gp molekule bepaal [Higgins & Gottesman, 1992]. Die MDR-geassosieerde sitotoksiese geneesmiddels bind waarskynlik intrasellulêr direk aan die spesifieke geneesmiddel bindingsgebiede op die P-gp molekules [Ford, Yang & Hait, 1996]. Na binding van die sitotoksiese geneesmiddels aan P-gp, ondergaan P-gp moontlik ‘n energie-afhanklike konformasie verandering wat toelaat dat die geneesmiddel aan die ekstrasellulêre kant

van die selmembraan vrygestel word [Roepe, 1995; Ford, Yang & Hait, 1996].

P-gp is baie minder selektief ten opsigte van substrate as enige ander biologiese draer molekule. Die identifisering en karakterisering van gebiede op die P-gp molekule wat vir die herkenning en binding van geneesmiddels aan P-gp verantwoordelik is, het getoon dat P-gp verskeie nie-oorvleulende of gedeeltelik oorvleulende geneesmiddel-bindings-gebiede besit [Ford, Yang & Hait, 1996]. Hierdie bindingsgebiede word tussen die vyfde en sesde sowel as die elfde en twaalfde transmembraan segmente van die P-gp molekule aangetref [Gottesman *et al*, 1996]. Elk van hierdie bindingsgebiede besit 'n unieke, spesifieke bindings-affiniteit vir verskillende geneesmiddels of klasse van geneesmiddels [Ford, Yang & Hait, 1996]. Die binding en transport van MDR-geassosieerde geneesmiddels deur P-gp, is onder andere deur van radio-aktief gemerkte MDR geneesmiddels (veral ^3H -vinblastien) gebruik te maak, bestudeer. Daar is gevind dat die P-gp-bemiddelde transport van die radio-aktief gemerkte anti-kanker geneesmiddels deur die teenwoordigheid van 'n oormaat (koue) vinblastien sowel as ander geneesmiddels wat met MDR geassosieer word (soos vinkristien, daunorubisien, aktinomsien D en colchicien), geïnhibeer word. Verbindings, soos verapamil, wat in staat is om MDR om te keer, was ook in staat om die binding en transport van radio-aktief gemerkte geneesmiddels deur P-gp te inhibeer [Germann, 1994]. Uit bogenoemde waarnemings is afgelei dat die MDR-geassosieerde geneesmiddels, sowel as die verbindings wat in staat is om MDR om te keer, moontlik met mekaar om dieselfde en/of oorvleulende bindingsplekke op die P-gp molekule, kompeteer [Roepe, 1995]. Verskeie resultate dui egter daarop dat daar 'n meer komplekse verhouding tussen die omkeringsvermoë van verbindings en die vermoë van hierdie verbindings om vir die geneesmiddel bindingsgebiede op die P-gp te kompeteer, bestaan [Gerlach, 1989]. Gerlach *et al* (1986b) het voorgestel dat die

geneesmiddels deur middel van 'n hidrofobiese draer molekule wat nie-spesifiek aan P-gp bind, vervoer word. Daar is egter geen bewys dat so 'n draer molekule bestaan nie [Gerlach, 1989].

Foto-affiniteitsbindingstudies met radio-aktief gemerkte geneesmiddels in MDR selle, is deur verskeie navorsers gekritiseer. Die meeste foto-affiniteits studies is in MDR selle of MDR selmembraan fraksies met 'n baie hoë vlak van P-gp uitdrukking, uitgevoer. Baie min van hierdie studies is in selle of membraan fraksies met fisiologiese P-gp vlakke uitgevoer, aangesien dit baie moeilik of selfs onmoontlik is om hierdie studies in hierdie selle of membraan fraksies uit te voer. Die resultate wat vanuit die foto-affiniteits bindingstudies verkry is, is moontlik die gevolg van 'n statisties meer waarskynlike gebeurtenis. Met hierdie gebeurtenis word bedoel dat die oormatige uitdrukking van P-gp in die selmembraan, die waarskynlikheid dat 'n geneesmiddel of verbinding eerder in kontak met P-gp as enige ander proteïen in die selmembrane van MDR selle sal kom, tot 'n groot mate statisties verhoog. Die interaksie tussen P-gp en die anti-kanker geneesmiddels is daarom nie noodwendig 'n ensiem-substraat interaksie nie [Roepe, 1995].

Dit is ook moeilik om die substraat-spesifisiteit van P-gp bevredigend met behulp van die P-gp uitwaartse pomp model te verklaar. 'n Wye reeks chemiese onverwante verbindings is in staat om as substrate vir P-gp op te tree. Dit is moeilik om 'n ensiem-agtige substraat-bindingsgebied met hoë affiniteit vir 'n groot verskeidendheid verbindings, soos die antrasikliene, vinka alkaloidede, aktinomsien D, sikliese en linieëre peptiede en verskeie ander hidrofobiese en amfipatiese verbindings, maar met baie min of geen bindings-affiniteit vir die meeste normale sellulêre komponente, biologies te verklaar. Daar is aanvanklik voorgestel dat die MDR-geassosieerde verbindings moontlik chemiese modifikasies ondergaan (byvoorbeeld deur glutatioon konjugasie), voordat dit deur P-gp herken word. Hierdie

chemiese modifikasies lei moontlik tot groter chemiese ooreenstemming tussen die verskillende verbindings wat as substrate vir P-gp optree. Dit is nou duidelik dat baie van hierdie verbindings selfs in die afwesigheid van chemiese modifisering deur P-gp vervoer kan word [**Higgins & Gottesman, 1992**].

Die tweede aanname wat in die P-gp uitwaartse geneesmiddel pomp model gemaak word, is dat P-gp as 'n uitwaartse pomp funksioneer deur die anti-kanker geneesmiddels direk vanuit die sitoplasma van MDR selle te verwyder en dit in die waterige ekstrasellulêre omgewing van die selle vry te stel [**Higgins & Gottesman, 1992**]. Die tempo waarteen P-gp die geneesmiddels uit die selle uitpomp, hang van nie-versadigde toestande van die substraat konsentrasie in die sitoplasma af. Gevolglik word geïmpliseer dat die verwydering van geneesmiddels vanuit die sitoplasma slegs die effluks tempo beïnvloed, terwyl die passiewe influks van die geneesmiddels nie geaffekteer word nie [**Bolhuis et al, 1997**]. Hierdie hipotese is onder andere deur studies wat getoon het dat die tempo van uitwaartse transport van sekere anti-kanker geneesmiddels vinniger in MDR selle as in geneesmiddel-sensitiewe selle plaasvind, ondersteun [**Sirotnak et al, 1986**]. Daar is ook waargeneem dat P-gp tot veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid in selle bydra, deur 'n 1000-voudige toename in die ekstrasellulêre konsentrasie van sekere chemoterapeutiese geneesmiddels te veroorsaak. Dit is egter interessant om daarop te let dat die intrasellulêre konsentrasie van hierdie chemoterapeutiese geneesmiddels terselfdertyd slegs 5- tot 10-voudig afgeneem het. Verskillende uiteenlopende standpunte in die literatuur dui egter daarop dat P-gp nie soos 'n tipiese uitwaartse pomp optree nie [**Gottesman et al, 1996**]. **Sirotnak et al (1986)** het onder andere getoon dat die tempo van inwaartse vloei van $^3\text{[H]}$ -vinblastien 24-voudig stadiger in MDR selle as in geneesmiddel-sensitiewe selle plaasvind. Ander navorsers het weer getoon dat intrasellulêre binding van chemoterapeutiese geneesmiddels 40-voudig minder effektief in MDR selle

as in geneesmiddel-sensitiewe selle plaasvind [Sirotnak *et al*, 1986]. Sekere MDR selle het op dieselfde tydstip, beide 'n afname in die inwaartse vloei van anti-kanker geneesmiddels sowel as 'n toename in die uitwaartse vloei van hierdie geneesmiddels getoon. Dit is vanuit bogenoemde waarnemings duidelik dat die verlaging in die intrasellulêre anti-kanker geneesmiddel konsentrasie in MDR selle, nie net aan 'n verhoogde aktiewe uitwaartse transport van anti-kanker geneesmiddels toegeskryf kan word nie, maar dat ander faktore soos 'n verlaging in die tempo van geneesmiddel opname sowel as 'n afname in die MDR sel se vermoë om die anti-kanker geneesmiddels doeltreffend te bind, ook vir die verlaging in die intrasellulêre akkumulering van die geneesmiddels verantwoordelik kan wees [Sirotnak *et al*, 1986; Roepe, 1995].

P-gp is in staat om $^3\text{[H]}$ -vinblastien, teen 'n konsentrasie gradient, oor die selmembrane van MDR selle te vervoer. Hierdie transport proses is osmoties sensitief en is grootliks van die beskikbaarheid van 'n konstante, hidroliseerbare energiebron afhanklik. Die energiebron kan ATP of GTP wees. Die nie-hidroliseerbare analoë, naamlik ADP, AMP, CTP, UTP, ITP, NAD^+ , NADH, NADP^+ en NADPH, kan nie as energiebronne vir die P-gp-bemiddelde transport proses optree nie. 'n Soortgelyke transport proses is nie in selmembraan vesikels wat vanuit die geneesmiddel-sensitiewe selle voorberei is, waargeneem nie [Germann, 1994].

Verskeie studies het bevestig dat P-gp die hidrolise van ATP benodig om die anti-kanker geneesmiddels wat met MDR geassosieer word, doeltreffend uit die MDR selle uit te pomp [Germann, 1994; Roepe, 1995]. Daar is gevind dat indien die ATP voorsiening van MDR selle uitgeput word, deur byvoorbeeld die glukose en fosfate uit die omringende medium te verwyder en inhibeerders van energie produksie (soos 2-deoksi-glukose, azied, sianied, dinitrofenol en iodo-asetaat) by die medium te voeg, P-gp nie meer in staat is om te kan funksioneer nie [Gerlach, 1989]. Die

netto akkumulering van die intrasellulêre geneesmiddels het, in hierdie energie-uitgeputte, P-gp-positiewe MDR selle, tot soorgelyke geneesmiddel vlakke as wat in geneesmiddel-sensitiewe selle aangetref word, toegeneem [Germann, 1994; Roepe, 1995]. Die uitputting van die hidroliseerbare energiebron van die selle het 'n baie groter invloed op die geneesmiddel akkumulering in MDR selle as in geneesmiddel-sensitiewe selle gehad [Gerlach, 1989]. Indien die inhibeerders van energie produksie uit die medium verwyder is en die medium weer met glukose gesuplementeer is, is P-gp weer geaktiveer en was dit weer in staat om normaal te funksioneer. Die geneesmiddels wat in die energie-uitgeputte MDR selle geakkumuleer het, is deur hierdie hergeaktiveerde P-gp tot vlakke wat normaalweg met MDR selle geassosieer is, uitgedomp [Germann, 1994; Kellen, 1994]. Dit is vanuit bogenoemde waarnemings duidelik dat intrasellulêre ATP vlakke die doeltreffendheid van P-gp beïnvloed [Germann, 1994].

Die ATPase aktiwiteit van P-gp word slegs in die teenwoordigheid van MDR-geassosieerde anti-kanker geneesmiddels geaktiveer [Germann, 1994]. Die MDR-geassosieerde geneesmiddels kan volgens die invloed wat dit op die ATPase aktiwiteit van P-gp uitoefen, in drie verskillende klasse ingedeel word. Die eerste klas geneesmiddels sluit verbindings soos vinblastien, verapamil en taksol in. Hierdie verbindings stimuleer die ATPase aktiwiteit by lae konsentrasies, maar hoë konsentrasies van hierdie verbindings lei tot die inhibisie van die ATPase aktiwiteit. Die tweede klas verbindings stimuleer die ATPase aktiwiteit op 'n dosis-afhanklike wyse, sonder om op enige stadium en/of wyse die ATPase aktiwiteit van P-gp te inhibeer. Hierdie verbindings sluit bisantreen, valinomisien en diltiazem in. Die derde klas van verbindings sluit verbindings soos siklosporien A en rapamisien in en is in staat om die basale en verapamil-geaktiveerde ATPase aktiwiteit van P-gp te inhibeer [Gottesman *et al*, 1996].

Die grootste kritiek teen die P-gp geneesmiddel uitwaartse pomp model, is

die onvermoë om bepaling van die stoichiometrie van ATP hidrolise tydens die werking van P-gp, altyd betroubaar met die mate van P-gp-bemiddelde geneesmiddel uitwaartse transport te korreleer [Gottesman *et al*, 1996]. Verskeie teenstrydige resultate is tydens die bepaling van die stoichiometrie van P-gp-geassosieerde ATP hidrolise, verkry. Aanvanklike pogings om P-gp deur middel van affiniteitschromatografie te suiwer, het tot proteïen preparate met 'n lae mate van ATPase aktiwiteit (1-3 nmol ATP/min/mg) gelei. Die aktiwiteit van hierdie geïsoleerde ATPase ensiem was nie van die teenwoordigheid van MDR-geassosieerde anti-kanker geneesmiddels afhanklik nie en kon nie die hoë vlakke van ATP verbruiking tydens die geneesmiddel transport in MDR selle verklaar nie. In teenstelling hiermee is ongeveer 'n 1000-voudige hoër spesifieke ATPase aktiwiteit (3-5 μ mol ATP/min/mg) vir rekombinante P-gp, wat oormatig in insek selle uitgedruk is, waargeneem [Germann, 1994]. Verdere pogings om die stoichiometrie van ATP hidrolise met behulp van gedeeltelik of homogeen gesuiwerde P-gp in 'n gerekonstitueerde sisteem te bepaal, het aangedui dat 10^4 tot 10^2 ATP molekules vir elke substraat molekule wat deur P-gp vervoer word, gehidroliseer word [Wadkins & Roepe, 1997]. Hierdie waarde was te hoog en het nie met die waargeneemde vlakke van geneesmiddel weerstandbiedendheid in die selle gekorreleer nie [Gottesman *et al*, 1996]. Bogenoemde waargeneemde stoichiometrie is teenstrydig met die stoichiometrie wat vir ander ATP-aangedrewe pompe waargeneem is (tussen 1:1 en 1:3; ATP hidrolise: geneesmiddel molekules vervoer) [Wadkins & Roepe, 1997]. Eytan *et al* (1996) het deur van 'n indirekte metode gebruik te maak, getoon dat 0.5 - 0.8 valinomsien- $^{86}\text{Rb}^+$ kompleks molekules vir elke ATP molekule wat gehidroliseer is, vervoer word. Die resultate van die metode wat deur Eytan *et al* (1996) gevolg is, moet egter met groot versigtigheid geïnterpreteer word, aangesien 'n oormaat valinomsien in hierdie studie gebruik is. Dit is daarom moontlik dat sommige van die valinomsien molekules wat deur P-gp vervoer is, nie met $^{86}\text{Rb}^+$ komplekse gevorm het nie. Die meetbare en weergegeede aantal

valinomisien molekules wat deur P-gp vervoer is, is daarom nie noodwendig 'n akurate weerspieëling van die werklike aantal valinomisien molekules wat deur P-gp vervoer is nie [Gottesman *et al*, 1996].

Die derde aanname wat in die P-gp geneesmiddel uitwaartse pomp model gemaak word, is dat die transmembraan domeine van P-gp, porie-agtige strukture in die selmembrane van MDR selle vorm. Hierdie porie-agtige strukture skep 'n diskrete, definitiewe hidrofobiese weg in die selmembrane van MDR selle, waardeur die substrate van P-gp kan beweeg, sonder om noodwendig in kontak met die lipied van die selmembrane te kom. Die porie-agtige strukture van die P-gp molekules verhoed dus dat die P-gp substrate direk in kontak met die hidrofobiese omgewing (lipied-lae) van die selmembraan, kom [Higgins & Gottesman, 1992].

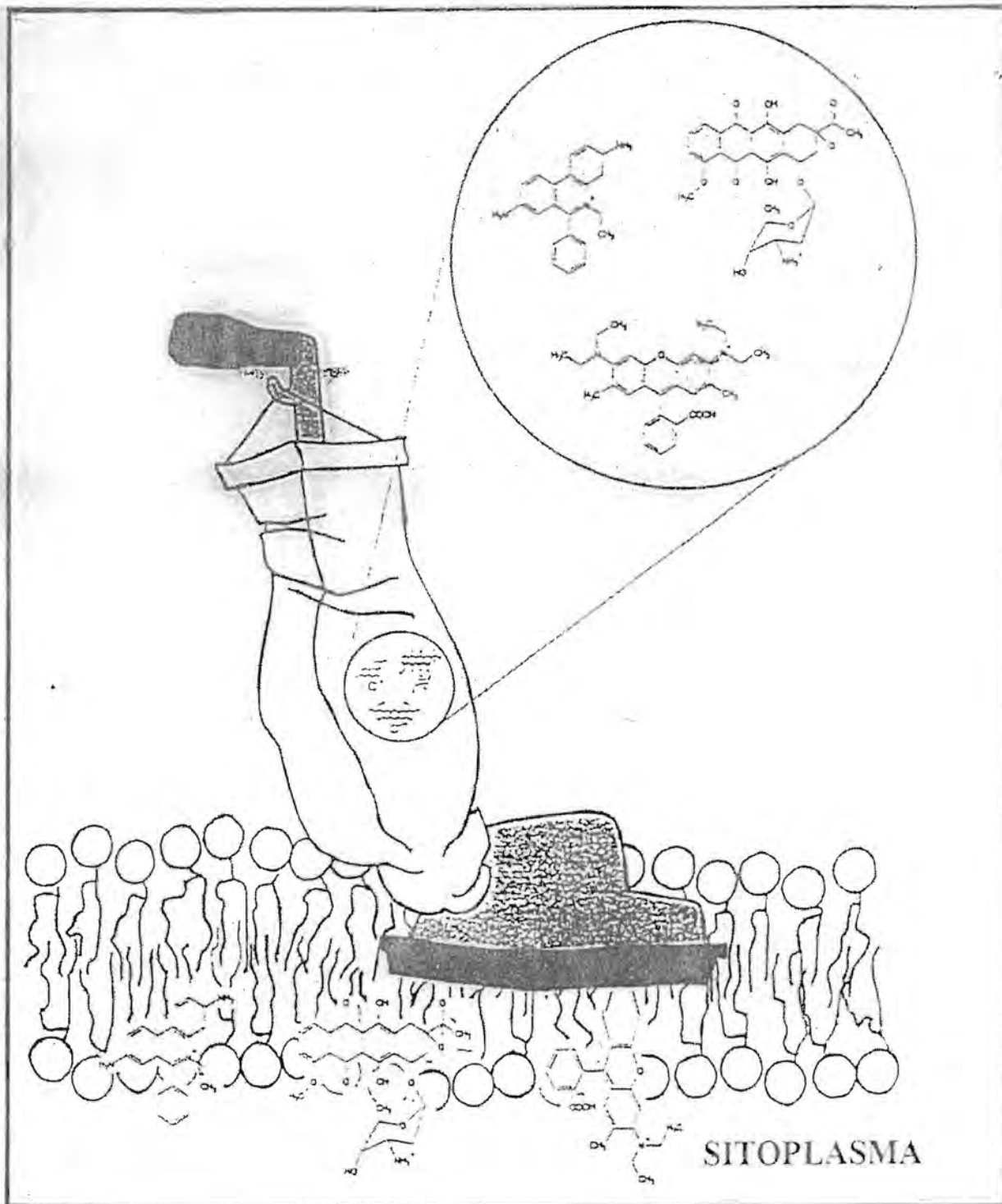
Kinetiese studies van die transport van MDR-geassosieerde geneesmiddels in P-gp-positiewe MDR selle het verskeie diverse en teenstrydige resultate opgelewer, wat daarop dui dat P-gp nie soos 'n tipiese uitwaartse proteïen pomp optree nie [Roepe, 1995]. Hierdie ongewone kinetika het tot 'n alternatiewe hipotese vir die werking van P-gp gelei. Volgens hierdie hipotese herken P-gp die anti-kanker geneesmiddels direk in die selmembrane van MDR selle en verwyder P-gp hierdie geneesmiddels uit die selle nog voordat dit die sitoplasma bereik. Vanuit waarnemings wat hierdie alternatiewe hipotese ondersteun het, is twee alternatiewe modelle vir die meganisme van werking van die P-gp pomp voorgestel. Hierdie twee modelle staan onderskeidelik as die "hidrofobiese stofsuiër" model en die "flippase" model bekend [Gottesman *et al*, 1996; Roepe, 1995]. Beide hierdie modelle stel voor dat P-gp die anti-kanker geneesmiddels direk in die lipiedlaag van die selmembrane van MDR selle waarneem en uit die MDR selle verwyder [Gottesman *et al*, 1996].

2.5.1.2. Modelle waarin P-gp die geneesmiddels vanuit die selmembraan verwyder

Soos reeds genoem, is anti-kanker geneesmiddels, wat in staat is om as substrate vir P-gp op te tree, hoofsaaklik kationiese, lipied oplosbare, planêre verbindings. Hierdie anti-kanker geneesmiddel molekules interkalleer, as gevolg van hul chemiese samestelling, maklik in die dubbel lipiedlae van selmembrane. Die interkallering van die anti-kanker geneesmiddels in die lipiedfases van die selmembrane, is feitlik 'n voorvereiste vir die geneesmiddel om sy intrasellulêre teikengebied te bereik. Op grond van hierdie affiniteit van anti-kanker geneesmiddels om met die selmembrane te interreageer, is twee verdere modelle vir die werking van P-gp voorgestel. In hierdie twee modelle bind die anti-kanker geneesmiddels direk aan P-gp in die selmembraan en word dan aktief deur die P-gp molekules uit die selmembrane verwyder. Hierdie twee modelle staan onderskeidelik as die “hidrofobiese stofsuiers” model sowel as die “flippase” model bekend (Figuur 2.2B en C). Die primêre interaksie in die “hidrofobiese stofsuiers” model sowel as die “flippase” model vind dus nie tussen die anti-kanker geneesmiddels en P-gp plaas nie, maar tussen die anti-kanker geneesmiddels en die selmembrane van die teikenselle [Higgins & Gottesman, 1992; Bolhuis *et al*, 1997]. In hierdie twee modelle interreageer P-gp met die MDR-geassosieerde anti-kanker geneesmiddels, nadat hierdie anti-kanker geneesmiddels in die selmembrane van MDR selle ingebed is en verwyder sodoende die geneesmiddels direk vanuit die selmembrane van MDR selle nog voordat dit die sitoplasma van die MDR selle kan bereik. Hiermee word nie geïmpliseer dat P-gp glad nie geneesmiddels vanuit die sitoplasma van MDR selle kan verwyder nie.

2.5.1.2.1. Die hidrofobiese stofsuiers model

In hierdie model tree P-gp as 'n “hidrofobiese stofsuiers” in die selmembrane van MDR selle op deur anti-kanker geneesmiddels direk vanuit die binneste en/of buitenste lipiedlae van selmembrane van MDR selle “op te suig” en na die ekstrasellulêre medium te verwyder (Figuur 2.2B; Figuur 2.3) [Higgins & Gottesman, 1992; Bolhuis *et al*, 1997]. P-gp verhoed sodoende dat anti-



Figuur 2.3: Hidrofobiese stofsuiër model. Tydens hierdie model word hidrofobiese geneesmiddels vanuit die binneste lipiedlaag van die fosfolipied dubbellaag verwyder.

kanker geneesmiddels intrasellulêr in MDR selle akkumuleer [Raviv *et al*, 1990; Higgins & Gottesman, 1992]. Hierdie model is deur twee onafhanklike studies ondersteun [Raviv *et al*, 1990; Homolya *et al*, 1993].

Iodonaftaleen-1-azied (INA) is 'n lipofiliese verbinding wat in staat is om aan membraan proteïene wat in die lipiedfase van selmembrane ingebed is, te bind [Higgins & Gottesman, 1992]. [¹²⁵I] INA word deur 'n spesifieke energie oordragsproses, wat as fotosensitiserings bekend staan, gefoto-aktiveer. 'n Groot verskeidenheid chromofore, insluitend doksorubisien en rodamiën 123, kan as foto-sensitiseerders vir hierdie proses optree. Deur van spesifieke chromofore gebruik te maak, kan hierdie tegniek (foto-ge-sensitiseerde [¹²⁵I]INA merking) gebruik word om spesifieke chromofoor-bevattende proteïene in selmembrane te merk [Raviv *et al*, 1990]. Dieselfde outeurs het ook gevind dat doksorubisien-bemiddelde foto-aktivering van [¹²⁵I]INA tot die spesifieke merking van P-gp in die selmembrane van MDR selle, lei. Verskeie membraan proteïene is daarenteen nie-spesifiek deur die foto-geaktiveerde INA in geneesmiddel-sensitiewe selle gemerk [Raviv *et al*, 1990].

Die mate waarteen die doksorubisien-geïnduseerde [¹²⁵I]INA merking van P-gp in MDR selle plaasvind, is merkwaardig spesifiek (ongeveer 70%). 'n Moontlike verduideliking van hierdie hoë spesifieke geneesmiddel-geïnduseerde merking van P-gp deur INA, is dat die MDR-geassosieerde geneesmiddels, soos doksorubisien, feitlik altyd met die mees hidrofobiese gedeeltes van selmembrane assosieer. Dit is bekend dat die grootste gedeelte van die P-gp molekule hidrofobies is en in die lipied fase van die selmembraan ingebed is. Die geneesmiddel bindings-gebiede van P-gp besit ook 'n hoë bindingsaffiniteit vir hidrofobiese geneesmiddels. Hierdie hoë bindingsaffiniteit van P-gp vir hidrofobiese geneesmiddels veroorsaak dat die hidrofobiese anti-kanker geneesmiddels eerder aan P-gp as aan ander gebiede in die selmembraan, bind. Na binding van die geneesmiddels aan P-gp, verwyder die P-gp molekules die anti-kanker geneesmiddels uit die

selmembraan voordat dit die sitoplasma van die sel kan bereik. Laasgenoemde stelling is deur die waarneming dat verapamil, 'n MDR omkerings verbinding, in staat is om die geneesmiddel-spesifieke INA merking van P-gp te inhibeer, bevestig. P-gp tree dus as 'n "stofsuiër" in die selmembrane van MDR selle op, deurdat dit die hidrofobiese molekules direk vanuit die selmembrane van MDR selle verwyder. Die gevolg van hierdie "stofsuiër" werking van P-gp is dat baie lae vlakke van die anti-kanker geneesmiddels, soos doksorubisien, in die sitoplasma van MDR selle aangetref word [Raviv *et al*, 1990].

Homolya *et al* (1993) het die opname van die fluoësserende kleurstowwe, Fura-2 sowel as bis(karboksi-etiel)karboksiefluoëssien (BCECF), deur MDR selle ondersoek. Fura-2 sowel as BCECF is lipofiliese kleurstowwe en in staat om maklik oor die selmembraan tot in die sitoplasma van selle te diffundeer, waar dit deur esterases tot ge-esterifiseerde derivate omgeskakel word. Hierdie ge-esterifiseerde verbindings besit groot elektriese ladings en diffundeer, as gevolg van hierdie ladings, baie moeilik terug oor die selmembraan. Die tempo waarteen hierdie ge-esterifiseerde derivate passief uit die selle diffundeer is byna dieselfde vir MDR sowel as geneesmiddel-sensitiewe selle. Die tempo van intrasellulêre akkumulering van die ge-esterifiseerde derivate is daarenteen, ten spyte van bogenoemde waarnemings, noemenswaardig laer in MDR as in die geneesmiddel-sensitiewe selle. 'n Moontlike verklaring vir hierdie waarneming is dat P-gp 'n groot bindingsaffiniteit vir hierdie lipofiliese kleurstowwe besit. Die kleurstowwe bind daarom moontlik direk aan die P-gp molekules in die selmembraan en word sodoende deur P-gp uit die selmembrane van MDR selle verwyder voordat dit die sitoplasma van die selle kan bereik. Verapamil was in hierdie studie in staat om die vermoë van MDR selle om die ge-esterifiseerde derivate intrasellulêr te akkumuleer, te herstel [Homolya *et al*, 1993].

2.5.1.2.2. Die flippase model

In die "flippase" model word die aanname gemaak dat die spontane beweging

van molekules en membraan lipiede, van die een lipiedlaag na die ander lipiedlaag in die selmembraan (“flipping”), baie stadig plaasvind. Dit is ook heel waarskynlik die geval, aangesien dit bekend is dat die uitruiling van fosfolipiede en ander gelaaide molekules tussen die twee lipiedlae van selmembrane ‘n stadige proses is, met halfleef-tye in die orde van ure of selfs dae. Indien die tempo waarmee die geneesmiddels spontaan van die een lipiedlaag na die ander lipiedlaag beweeg stadig plaasvind en die anti-kanker geneesmiddels wat in elke lipiedlaag ingebed is, in ewilibrum met die naasliggende (ooreenstemmende) waterige fase van die lipiedlaag is, sal die netto resultaat van die P-gp-bemiddelde vervoer (“flipping”) van geneesmiddels van die binneste na die buitenste lipiedlaag van MDR selmembrane, ‘n verlaging van die intrasellulêre konsentrasie van die anti-kanker geneesmiddel in MDR selle tot gevolg hê. Hierdie verlaging in die intrasellulêre konsentrasie van die anti-kanker geneesmiddels lei gevolglik tot ‘n toename in die anti-kanker geneesmiddel konsentrasie in die eksterne medium [**Higgins & Gottesman, 1992**].

Daar is verskeie eksperimentele data wat die stelling dat anti-kanker geneesmiddels direk vanuit die lipiedfase van selmembrane met P-gp kan interreageer, ondersteun. Die data wat tot die “hidrofobiese stofsuier” model aanleiding gegee het, ondersteun onder andere ook hierdie stelling. Buiten die data wat tot die “hidrofobiese stofsuier” model aanleiding gegee het, het verskeie ander studies ook die “flippase” model as ‘n moontlike verklaring van die werking van P-gp, ondersteun. **Shapiro & Ling (1995)** het gevind dat fluoresserende MDR substrate, soos Hoechst 33342, aktief deur P-gp uit proteoliposomale membrane, wat gesuiwerde P-gp bevat, verwyder word. Hoechst 13342 bind spesifiek aan die fosfolipied dubbellaag van selmembrane [**Bolhuis et al, 1997**].

Daar is ook gevind dat dat verbindings, soos rhodamien 123 en daunorubisien, meestal in die lipiedfase van selmembrane van geneesmiddel-sensitiewe selle

aangetref word. In teenstelling hiermee word hierdie verbindings hoofsaaklik in die ekstrasellulêre waterige omgewing van die MDR selle aangetref. P-gp kan ook direk met hidrofobiese verbindings, soos radio-aktiewe forskolien, gemerk word. Weens forskolien se hoë mate van lipofilisiteit, los hierdie verbinding maklik in die lipiede van selmembrane op en is dit 'n effektiewe merker van die geneesmiddel bindingsgebiede op die P-gp molekule. Verder is gevind dat derivate van forskolien, met 'n hoër graad van lipofilisiteit, in staat is om baie meer effektief aan P-gp te bind [**Higgins & Gottesman, 1992**]. Die “flippase” model is ook deur 'n onlangse bevinding dat die MDR2 geen produk, 'n fosfatidielcholien translokase (flippase) is, ondersteun. Hierdie fosfatidielcholien translokase is noodsaaklik vir die uitskeiding van fosfatidielcholien vanuit die hepatiese selmembraan in die gal [**Gottesman et al, 1996**].

Die mees oortuigende bewyse dat die geneesmiddels direk vanuit die selmembrane deur MDR transporters, soos P-gp, verwyder word, is deur **Bolhuis et al (1996a,b)** verskaf. Hierdie navorsers het getoon dat die laktokokkale MDR transporters, Lmr A sowel as Lmr P, die hoogs hidrofobiese, kationiese, fluoresserende membraan merkers, 1-[4-(trimetielamino)feniel]-6-fenielheksa-1,3,5-trien (TMA-DPH) sowel as N-*p*-{6-feniel-[1,3,5-heksatrieniel(feniel-propiel)]}trimetielamonium (TMAP-DPH), direk vanuit die binneste lipiedlaag na die eksterne medium verwyder. Die neutrale difenielheksatrien (DPH) verbinding, 1-[4-dimetielamino)feniel]-6-fenielheksa-1,3,5-trien) (DMA-DPH) sowel as die anioniese DPH derivaat 1,6-difenielheksa-1,3,5-trien karbosielsuur (CA-DPH), is egter nie deur die MDR transporters uit die selmembraan verwyder nie [**Bolhuis et al, 1997**].

Die ongewone groot verskeidenheid substrate wat in staat is om spesifiek aan P-gp te bind, kan moontlik deur die “flippase” model verklaar word. Volgens hierdie model is die primêre bepalende faktor vir P-gp substraat spesifisiteit, die vermoë van die substraat om genoegsaam in die lipied dubbellaag van

selymembrane te interkaleer. Tweedens is die interaksie van die substraat met die substraat-bindingsgebiede op P-gp, ook 'n belangrike bepalende faktor vir die substraat spesifisiteit van P-gp. Hierdie tweeledige herkenningse meganisme stel die substraat bindingsgebiede op P-gp in staat om relatief nie-spesifiek te wees, aangesien toegang tot die geneesmiddel bindingsgebied van P-gp tot substrate wat in staat is om genoegsaam in die lipied dubbelle van selymembrane te interkaleer, beperk sal wees [**Higgins & Gottesman, 1992**].

Die “flippase” model kan moontlik ook die ongewone kinetika van geneesmiddel transport in P-gp-positiewe MDR selle verklaar. Indien die anti-kanker geneesmiddels direk vanuit die selymembrane van MDR selle deur P-gp verwyder word, is die werklike konsentrasie van die anti-kanker geneesmiddels wat deur P-gp waargeneem word onbekend, aangesien die aantal anti-kanker geneesmiddel molekules wat in die selymembrane van MDR selle opgelos is en gevolglik deur P-gp vervoer kan word, van die konsentrasie van die anti-kanker geneesmiddel wat ekstern toegedien is, sal verskil. Die komplekse ewilibria wat tussen geneesmiddels in die waterige fases (beide intra-sowel as ekstrasellulêr) en geneesmiddels in die lipied fase voorkom, lei tot komplekse kinetiese parameters. Hierdie komplekse kinetiese parameters bemoeilik die interpretasie van data wat vanaf P-gp-bemiddelde geneesmiddel transport studies verkry is. 'n Voorbeeld hiervan is dat, indien twee anti-kanker geneesmiddels se graad van lipied oplosbaarheid van mekaar verskil, die relatiewe konsentrasies van die onderskeie anti-kanker geneesmiddels wat by 'n toets sisteem gevoeg is nie noodwendig die relatiewe konsentrasie soos deur die P-gp waargeneem word, weergee nie. Verskille in die vermoë van anti-kanker geneesmiddels om in die lipiedlae van die selymembrane te akkumuleer, mag moontlik die verskille in weerstandbiedende profiele wat vir P-gp-bemiddelde MDR in verskillende selyne waargeneem is, verklaar. Die rede hiervoor is dat die lipied samestelling van selymembrane tussen die verskillende sel tipes, varieer. Die lipied samestelling van selymembrane speel ook 'n rol in die mate van akkumulering van verbindings in die selymembrane. Verder bepaal

die lipied samestelling van die selmembrane ook die spesifieke aktiwiteit van P-gp. Indien menslike P-gp in inekselle, waarvan die membraan lipied samestelling van diè van soogdier selle verskil, uitgedruk word, kan P-gp nog steeds deur [³H]azidopien gemerk word, maar is die relatiewe vermoë van vinblastien en daunorubisien om vir die binding aan P-gp te kompeteer, omgekeerd as wat in menslike selle waargeneem is [Higgins & Gottesman, 1992].

Kritiek teen die “flippase” model is dat die oktanol/water partissie koëffisiënte, dit wil sê die lipofilisiteit van die anti-kanker geneesmiddels wat aktief deur P-gp uit die selle verwyder word, gewoonlik baie hoog is. Termodinamika van hierdie hoogs lipofiliese geneesmiddel-transport in MDR selle begunstig daarom eerder die terugwaartse beweging van die anti-kanker geneesmiddels, wat deur P-gp na die buitenste lipiedlaag van die selmembraan vervoer is, terug na die binneste lipiedlaag van die selmembraan eerder as die uitwaartse beweging van hierdie geneesmiddels na die ekstrasellulêre omgewing van die sel. 'n Verdere faktor wat hierdie terugwaartse beweging van die anti-kanker geneesmiddels na die intrasellulêre omgewing van die sel bevoordeel, is die feit dat die anti-kanker geneesmiddel konsentrasie waarskynlik hoër buite die sel as in die sel is [Roepe, 1995]. Die natuurlike neiging, tydens die beweging van verbindings, is om eerder van die hoër konsentrasie na die laer konsentrasie te beweeg.

2.5.2. Indirekte transport modelle

2.5.2.1. Die “veranderde partissie” model

Sommige navorsers het waargeneem dat die oormatige uitdrukking van P-gp in MDR selle, tot veranderings in die intrasellulêre pH en/of membraan potensiaal van hierdie selle lei. Hierdie waarnemings het tot die “veranderde partissie” model as meganisme van werking van P-gpe, aanleiding gegee [Roepe, 1995; Gottesman *et al*, 1996]. Volgens hierdie model beïnvloed die P-gp-geïnduseerde veranderings in die membraan potensiaal en/of intrasellulêre pH, die sellulêre

verdeling van die anti-kanker geneesmiddels in MDR selle. P-gp veroorsaak dus op 'n indirekte wyse 'n verlaging in die intrasellulêre akkumulering van anti-kanker geneesmiddels in MDR selle [**Gottesman *et al*, 1996**].

Sommige P-gp-positiewe geneesmiddel weerstandbiedende tumor selle (soos menslike long tumor selle), besit verhoogde intrasellulêre pH vlakke indien dit met die intrasellulêre pH vlakke van die geneesmiddel-sensitiewe selle vergelyk word. Die graad van MDR sowel as die mate van P-gp uitdrukking korreleer met hierdie relatiewe alkalinisering van MDR selle. Daar is voorgestel dat die oormatige uitdrukking van P-gp in MDR selle vir die verhoging in die intrasellulêre pH in die MDR selle verantwoordelik is, deurdat die P-gp molekules 'n indirekte of direkte rol tydens die regulering van die intrasellulêre pH van die MDR, speel. Navorsers het onder andere voorgestel dat P-gp 'n onbekende, geprotoneerde, endogene substraat oor die selmembrane van MDR selle vervoer. Hierdie P-gp-bemiddelde aktiewe uitwaartse transport van die endogene substraat uit die MDR selle, lei tot 'n netto uitvloei van H^+ ione uit die selle, wat tot die intrasellulêre alkalinisering van die P-gp-positiewe MDR selle lei [**Roepe, 1995**].

'n Verhoogde intrasellulêre pH is egter nie in alle MDR selle waargeneem nie. Daar is ook gevind dat die intrasellulêre pH van sommige MDR selle verlaag is, indien dit met die intrasellulêre pH van die ooreenstemmende geneesmiddel-sensitiewe selle vergelyk word. In ander MDR sellyne is daar weer geen noemenswaardige verskille tussen die intrasellulêre pH van die MDR selle en geneesmiddel-sensitiewe selle waargeneem nie. Hierdie waarnemings stel voor dat sommige kanker selle, sonder enige veranderinge in hul intrasellulêre pH, veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid kan ontwikkel [**Roepe, 1995**].

Hasmann *et al* (1989) het gevind dat die membraan potensiale van geneesmiddel-sensitiewe en MDR selle van mekaar verskil. Die membraan potensiale van MDR selle was oor die algemeen laer as die membraan potensiale wat in geneesmiddel-

sensitiewe selle waargeneem is [**Hasmann *et al*, 1989; Roepe, 1995**]. Hierdie verlaging van die membraan potensiale van MDR selle korreleer met die graad van P-gp uitdrukking in hierdie selle. Eksperimente met MDR getransfekteerde selle, wat nie voorheen aan anti-kanker geneesmiddels blootgestel is nie, het getoon dat die verlaagde membraan potensiale van MDR selle, direk aan die oormatige uitdrukking van P-gp in die selmembrane van hierdie selle te danke is [**Roepe, 1995**].

Die verband wat tussen die verhoogde uitdrukking van P-gp en die verlaging in die membraan potensiaal van MDR selle waargeneem is, kan as volg verklaar word [**Hasmann *et al*, 1989**]. Dit is bekend dat die selektiewe deurlaatbaarheid van eukariotiese selle vir kalium ione een van die vernaamste faktore in die handhawing van die membraan potensiaal oor die selmembrane van eukariotiese selle is [**Hasmann *et al*, 1989; Rabinovitch & June, 1990**]. Dit is ook goed bekend dat 'n hoë intrasellulêre kalium konsentrasie tot 'n verlaging in die membraan potensiaal van eukariotiese selle lei. Dit is gevolglik moontlik dat die oormatige uitdrukking van P-gp in die selmembrane van P-gp-positiewe MDR selle tot 'n veranderde deurlaatbaarheid vir kalium ione in hierdie selle lei, wat weer tot die veranderings in die membraan potensiale van hierdie selle kan lei [**Hasmann *et al*, 1989**].

Die meganisme wat vir die P-gp-bemiddelde veranderings in die intrasellulêre pH en/of membraan potensiaal van MDR selle verantwoordelik is, is nog nie heeltemal duidelik nie. Die oormatige uitdrukking van P-gp kan op verskeie wyses tot veranderings in die biofisiese/biochemiese eienskappe van selle lei. Hierdie meganismes sluit direkte ioon transport deur P-gp, regulering van ioon transport deur P-gp, die betrokkenheid van P-gp in 'n outokriene pad wat die transport van ATP benodig en/of selfs lipied transport, in [**Wadkins & Roepe, 1997**].

Meeste van die verskeidenheid waarnemings wat tot die verskillende modelle

aanleiding gegee het, kan verklaar word indien P-gp meer as een meganisme van werking besit [Wadkins & Roepe, 1997]. Gill *et al* (1992) het getoon dat P-gp chloried-kanaal aktiwiteit besit. Verhoogde geleiding van chloried ione, kan ook tot 'n verlaging in die membraan potensiaal van selle lei. Die verband wat tussen die verlaging in die membraan potensiaal in MDR selle en die oormatige uitdrukking van P-gp in hierdie selle waargeneem is, kan daarom ook moontlik aan die chloried kanaal aktiwiteit van P-gp toegeskryf word. Daar is ook gevind dat die relatiewe Cl⁻ spesifieke intrasellulêre pH regulerende meganismes in MDR selle van die ooreenstemmende Cl⁻ spesifieke intrasellulêre pH regulerende meganismes in geneesmiddel-sensitiewe selle verskil. Die omvang van hierdie verskille tussen die Cl⁻ spesifieke intrasellulêre pH regulerende meganismes van geneesmiddel-sensitiewe en MDR selle, het met die verskil in intrasellulêre pH wat tussen hierdie twee seltepes waargeneem is, gekorreleer. 'n Ander interessante waarneming wat in MDR selle gemaak is, is dat anioon uitruilers, soos Cl⁻/HCO₃⁻, teen hoër vlakke in MDR selle as in geneesmiddel-sensitiewe selle uitgedruk word. Anioon uitruilers lei tot 'n verlaging in die intrasellulêre pH van selle [Roepe, 1995].

Baie anti-kanker geneesmiddels tree as hidrofobiese, kationiese swak basisse op. Dit is bekend dat die sellulêre verdeling en verspreiding van hidrofobiese, gelaaide swak basisse grootliks deur veranderings in die membraan potensiaal sowel as intrasellulêre pH van selle, beïnvloed word [Roepe, 1995]. Speeg *et al* (1992) het die intrasellulêre akkumulering van verskeie organiese katione in CHRC5 MDR selle ondersoek en gevind dat die organiese kationiese verbindings, soos proka-uramid, teen hoër vlakke in die geneesmiddel-sensitiewe selle as in MDR selle akkumuleer. Hierdie verskil in die intrasellulêre akkumulering tussen die geneesmiddel-sensitiewe en MDR selle is aan die hoër intrasellulêre pH van die MDR selle toegeskryf. In sommige gevalle kan veranderings in die intrasellulêre pH ook die hoeveelheid beskikbare teikengebiede waaraan anti-kanker geneesmiddels in die MDR selle bind, beïnvloed. Veranderings in oppervlak potensiale beïnvloed ook die tempo van binding van anti-kanker

geneesmiddels aan die selmembrane van teikenselle sowel as die diffusie van hierdie anti-kanker geneesmiddels oor die selmembrane [Roepe, 1995]. Die rede hiervoor is dat die elektries, negatiewe membraan potensiaal van eukariotiese MDR selle as dryfkrag vir die aantrekking en retensie van sekere lipofiliese, positief-gelaaide anti-kanker geneesmiddels in MDR selle, dien [Hasmann *et al*, 1989; Roepe, 1995]. Dit is dus moontlik dat veranderinge in die membraan potensiaal en/of intrasellulêre pH van MDR selle tot 'n verlaging in die akkumulering van positief-gelaaide geneesmiddels in MDR selle kan lei [Hasmann *et al*, 1989].

Al bogenoemde waarnemings het tot die “veranderde partissie” model, as alternatief vir die P-gp “geneesmiddel uitwaartse pomp” model, aanleiding gegee. Hierdie model argumenteer dat die P-gp “geneesmiddel uitwaartse pomp” model eerder 'n ooreenvoudiging, as 'n werklike fisiese verduideliking, van die meganisme van werking van P-gp is. Die oormatige uitdrukking van P-gp lei, volgens die “veranderde partissie” model, hoofsaaklik tot veranderinge in die membraan potensiaal en/of intrasellulêre pH van die P-gp-positiewe MDR selle. Hierdie veranderinge in die membraan potensiaal en/of intrasellulêre pH kan die intrasellulêre akkumulering van anti-kanker geneesmiddels in MDR selle op verskeie wyses beïnvloed. Dit kan tot (1) 'n toename in die tempo van uitwaartse transport van anti-kanker geneesmiddels lei, (2) veranderinge in die karakter-eienskappe van die selmembraan (soos verspreiding van lipiede in die selmembraan) veroorsaak, (3) die ewilibrum betrokke by die sellulêre verdeling en verspreiding van swak basis geneesmiddels in die selmembraan verander sowel as (4) 'n invloed op die hoeveelheid beskikbare anti-kanker geneesmiddel teikengebiede waaraan die anti-kanker geneesmiddels kan bind, hê. Veranderinge in die membraan potensiaal kan byvoorbeeld die organisering van tubulien naby die oppervlak van die selmembraan beïnvloed. Hierdie veranderinge in tubulien organisering kan die intrasellulêre akkumulering van anti-mitotiese geneesmiddels, soos colchisien en vinblastien, beïnvloed. Die netto resultaat van 'n kombinasie van hierdie gebeurtenisse in MDR selle, is 'n betekenisvolle

afname in die intrasellulêre akkumulering van anti-kanker geneesmiddels in die MDR selle. P-gp beïnvloed, dus volgens hierdie model, die transport van die anti-kanker geneesmiddels oor die selmembrane van MDR selle indirek, maar pomp nie die anti-kanker geneesmiddels direk uit die MDR selle uit nie [Roepe, 1995].

Verskille in geneesmiddel weerstandbiedende profiele in verskillende MDR sellyne kan moontlik deur die “veranderde partissie” model verklaar word. Veronderstel dat by ‘n gegewe graad van wilde-tipe P-gp uitdrukking in ‘n sekere MDR sel tipe die selmembraan met 15 mV depolariseer, dit wil sê die membraan potensiaal met 15 mV verlaag word. Terselfdertyd word die intrasellulêre pH in hierdie MDR selle met 0.15 pH eenhede verhoog. Daarenteen beïnvloed die oormatige uitdrukking van mutante P-gp hierdie parameters teen onderskeidelik 10 mV en 0.05 pH eenhede in ‘n ander MDR sel tipe. Die graad van uitdrukking van die mutante P-gp is dieselfde as die uitdrukking van die wilde-tipe P-gp in die onderskeie sellyne. Dit is bekend dat veranderinge in onderskeidelik die membraan potensiaal en intrasellulêre pH verskillende invloede op die transport van anti-kanker geneesmiddels oor selmembrane uitoefen. Veranderinge in die membraan potensiaal het byvoorbeeld ‘n groter uitwerking op die vervoer van vinka alkaloiëde as antrasikliene oor die selmembrane van MDR selle. Daarenteen het veranderinge in die intrasellulêre pH van selle weer ‘n groter invloed op die sellulêre verdeling van antrasikliene as vinka alkaloiëde in MDR selle. Indien veranderinge in beide die intrasellulêre pH en membraan potensiaal van selle tot geneesmiddel weerstandbiedendheid bydra, kan die verskillende invloede wat P-gp molekules op hierdie parameters (intrasellulêre pH en membraan potensiaal) uitoefen, tot verskillende geneesmiddel weerstandbiedende profiele in die verskillende tipes MDR sellyne lei [Roepe, 1995].

Soos reeds genoem, is P-gp-geïnduseerde veranderinge in die membraan potensiaal en/of intrasellulêre pH van MDR selle nie in alle MDR selle waargeneem nie. Dit is een van die vernaamste redes waarom navorsers die “veranderde partissie” model nie so goed soos die “geneesmiddel uitwaarde

pomp” model as meganisme van werking van P-gp, ondersteun nie. ‘n Ander rede waarom die “veranderde partissie” model minder gewild as die “geneesmiddel uitwaartse pomp” model is, is die waarneming dat die mate van intrasellulêre pH en/of membraan potensiaal veranderings in die MDR selle nie groot genoeg is om die graad van geneesmiddel weerstandbiedendheid in sommige van hierdie MDR selle te verklaar nie [Gottesman *et al*, 1996]. Daar is ook waargeneem dat MDR chemosensitiseerders geen invloed op die veranderings in die intrasellulêre pH wat in sommige MDR selle waargeneem is, het nie. Daar kan ook nie huidiglik met sekerheid gesê word dat die veranderings in die intrasellulêre pH van MDR selle, aan die oormatige uitdrukking van P-gp toegeskryf kan word nie [Roepe, 1995]. Die veranderings in die membraan potensiaal en die intrasellulêre pH van MDR selle mag moontlik die gevolg van die verlengde seleksie van die selle in die teenwoordigheid van sitotoksiese geneesmiddels wees [Gottesman *et al*, 1996]. Die veranderings in die intrasellulêre pH van MDR selle het dus nie noodwendig iets met die voorkoms van geneesmiddel weerstandbiedendheid in die MDR selle te doen nie [Roepe, 1995]. Die moontlikheid dat pH en membraan potensiaal veranderings in sommige selle wel tot MDR bydra kan egter nie heeltemal uitgesluit word nie [Gottesman *et al*, 1996].

HOOFSTUK 3

FARMAKOLOGIESE OMKERING VAN MDR

3.1. Inleiding

MDR is 'n groot en belangrike struikelblok in die doeltreffende behandeling van kanker pasiente. Een van die vernaamste doelwitte tydens die bestudering van P-gp-bemiddelde MDR is om 'n spesifieke manier te vind om MDR te voorkom of te oorkom [Ford & Hait, 1994; Sonneveld & Wiemer, 1997]. Een so 'n wyse wat aktief nagevors word, is die farmakologiese omkering van MDR. Die ideale behandelingsprotokol vir kanker pasiente sal uit standaard chemoterapeutiese geneesmiddels sowel as geneesmiddels wat in staat is om MDR om te keer, bestaan [Fan *et al*, 1994; Sikic *et al*, 1997; Sonneveld & Wiemer, 1997]. Daar word daarom voortdurend gepoog om die bestaande chemoterapeutiese behandelingsprotokolle wat tydens die behandeling van kankers gebruik word, te verbeter.

Die ideale chemosensiteerder moet in staat wees om die sitotoksiteit van chemoterapeutiese geneesmiddels selektief vir die weerstandbiedende tumor selle te verbeter, sonder om die gasheer nadelig te beïnvloed. Verder sal 'n chemosensitiseerder slegs klinies bruikbaar wees indien dit MDR effektief by klinies haalbare konsentrasies kan omkeer. Dit is ook belangrik dat die chemosensitiseerder-bemiddelde verhoogde toksisiteit van anti-kanker geneesmiddels, nie met 'n soortgelyke verhoging in geneesmiddel toksisiteit vir normale selle gepaard gaan nie [Ford, 1995].

Die eerste stap in die ontwikkeling van geneesmiddels wat in staat is om MDR farmakologies om te keer, is die *in vitro* toetsing van potensiële verbindings deur van weerstandbiedende weefselkultuur sellyne gebruik te maak [Lum *et al*, 1993; Ford, 1995]. Indien die *in vitro* studies belowende resultate oplewer, word voort gegaan om die verbinding *in vivo* te toets. Die *in vivo* studies behels hoofsaaklik eksperimente met dierlike tumor modelle sowel as kliniese proewe met kanker pasiente. Die *in vivo* toetsing van verbindings verskaf meer inligting oor belangrike farmakologiese aspekte van die verbindings [Ford, 1995]. Die meeste farmakokinetiese eienskappe kan nie akkuraat in *in vitro* eksperimente ondersoek word nie. Hierdie farmakologiese aspekte behels onder

andere die bio-beskikbaarheid, die verspreiding, die plasma konsentrasie, die metabolisme, die uitskeiding en die toksokologiese spektrum van die verbinding. Farmakologiese faktore moet veral tydens die ekstrapolering van *in vitro* resultate na *in vivo* omstandigheide in ag geneem word [Lum *et al*, 1993].

Tsuruo en medewerkers (1981) was die eerste groep navorsers wat aangetoon het dat MDR *in vitro* farmakologies omgekeer kan word. Hierdie navorsers het gerapporteer dat die geneesmiddels, verapamil en trifluoperasien, die intrasellulêre akkumulering van vinkristien in 'n MDR muis leukemie sellyn verhoog. Die toename in die intrasellulêre akkumulering van vinkristien het daartoe bygedra dat die anti-proliferatiewe aktiwiteit van vinkristien in hierdie selle toegeneem het [Tsuruo *et al*, 1981; Ford & Hait, 1994]. Verapamil bly vandag steeds 'n belangrike standaard verbinding waarteen die doeltreffendheid van ander chemosensitiseerders asook die meganisme van werking van die ander chemosensitiseerders vergelyk kan word [Ford, Yang & Hait, 1996]. Sedert die waarneming deur Tsuruo *et al* (1981) is verskeie farmakologiese verbindings wat in staat is om MDR *in vitro* om te keer, geïdentifiseer [Ford & Hait, 1994; Sonneveld & Wiemer, 1997]. Hierdie verbindings staan ook as chemosensitiseerders of MDR moduleerders bekend [Ford, Yang & Hait, 1996]. Die meeste chemosensitiseerders is *in vitro* geïdentifiseer en kan breedweg in sewe kategorieë verdeel word. Hierdie kategorieë is: (a) kalsium kanaal blokkeerders, (b) kalmodulin antagonist, (c) nie-sitotoksiese antrasiklien en vinka alkaloid analoë, (d) steroïede en hormonale antagonist, (e) siklosporiene, (f) dipiridamol en (g) verskeie ander hidrofobiese, kationiese verbindings [Ford & Hait, 1994; Sonneveld & Wiemer, 1997]. Al hierdie chemosensitiseerders is lipofiliese verbindings en baie van hierdie verbindings is heterosikliese, positief gelaaiete verbindings by 'n neutrale pH [Ford, Yang & Hait, 1996]. Meeste van hierdie chemosensitiseerders verhoog die intrasellulêre akkumulering van die anti-kanker geneesmiddels in MDR selle, maar het min of geen effek op die intrasellulêre akkumulering van anti-kanker geneesmiddels in geneesmiddel-sensitiewe selle nie [Ford, 1995].

Die identifisering van farmakologiese verbindings wat in staat is om MDR *in vitro* om te

keer, het die hoop tussen navorsers en geneeshere laat opvlam dat kliniese weerstandbiedendheid in menslike tumore moontlik oorkom kan word deur die chemosensitiseerders saam met die standaard chemoterapeutiese geneesmiddels aan pasiente toe te dien [Ford, 1995]. Verapamil was die eerste MDR moduleerder wat klinies bestudeer is [Lum *et al*, 1993]. Verskeie ander chemosensitiseerders is ook daarna klinies vir hul vermoë om MDR in weerstandbiedende pasiente om te keer, bestudeer [Tsuruo, 1989; Fan *et al*, 1994]. Hierdie verbindings sluit dexverapamil, diltiazem, amiodaroon, quinidien, quiniën, trifluoperasien, prohorperasien, steroïede, tamoksifen, toremifeen en siklosporiene, in [Lum *et al*, 1993; Ford & Hait, 1994; Ford, Yang & Hait, 1996; Sonneveld & Wiemer, 1997].

Hierdie chemosensitiseerders is met gemengde sukses in kliniese proewe getoets [Ford, 1995; Sonneveld & Wiemer, 1997]. Daar bestaan hoofsaaklik twee redes vir die teleurstellende resultate wat *in vivo* verkry is. Eerstens kan die farmakokinetiese eienskappe van 'n verbinding nie in *in vitro* bepalings ondersoek word nie. Farmakokinetiese eienskappe kan tot groot verskille tussen *in vitro* en *in vivo* resultate lei. Die mate waarteen die chemosensitiseerders aan proteïene in die serum bind, speel byvoorbeeld 'n belangrike rol in die bio-beskikbaarheid van die chemosensitiseerders vir die teiken-sel. Weefselkultuur-media in *in vitro* eksperimente bevat gewoonlik geen of relatiewe lae (10% - 20% volume/volume) serum proteïen konsentrasies. Chemosensitiseerders, wat 'n lae graad van proteïen binding in menslike plasma toon, sal *in vitro* sowel as in *in vivo* omstandighede min of meer dieselfde mate van MDR omkerings aktiwiteit toon. Die rede hiervoor is dat verbindings wat 'n lae mate van proteïen binding toon in toestande waar geen serum aanwesig is nie, sowel as in 'n omgewing met 'n hoë serum konsentrasie, beskikbaar is om vrylik oor die selmembraan na die intrasellulêre omgewing van die sel te diffundeer. Hierdie geneesmiddels is ook vry om met P-gp in die selmembraan van MDR selle, te interreageer. Daarenteen is slegs 5 - 10 % van verbindings wat teen 'n hoë mate (90% of meer) aan die proteïene in die serum bind, by 'n hoë serum proteïen konsentrasie (*in vivo* omstandighede) beskikbaar om intrasellulêr te diffundeer en gevolglik aan P-gp in die selmembraan te bind. Verapamil en amiodaroon is voorbeelde van verbindings wat 'n hoë affiniteit vir serum proteïene besit.

Hierdie verbindings toon gewoonlik in *in vivo* omstandighede 'n afname in hul vermoë om MDR om te keer indien dit met resultate wat *in vitro* verkry is, vergelyk word [Lum *et al*, 1993].

Verapamil en amiodaroon veroorsaak in die teenwoordigheid van standaard weefselkultuur medium ('n lae serum proteïen konsentrasie), 'n 50% groter toename in die intrasellulêre akkumulering van doksorubisien in 'n rot MDR sellyn, in vergelyking met die toename in intrasellulêre akkumulering van doksorubisien wat tydens die behandeling met quinien of kinokonien verkry is. Indien hierdie weefselkultuur selle in rot serum geïnkubeer is, het die behandeling van die selle met quinien of kinokonien geen noemenswaardige invloed op die intrasellulêre akkumulering van doksorubisien in die selle gehad nie. Die intrasellulêre akkumulering van doksorubisien het daarenteen, na behandeling met verapamil of amiodaroon in rot serum, met tussen 25% en 66% afgeneem. Die teenwoordigheid van serum proteïene het dus 'n betekenisvolle invloed op die MDR omkerings aktiwiteit van verapamil en analoë daarvan gehad [Lum *et al*, 1993].

Tweedens is die chemosensitiseerder-bemiddelde verhoging in die sitotoksiese aktiwiteit van die chemoterapeutiese geneesmiddels in die meeste gevalle nie spesifiek vir die tumor nie, maar lei ook tot verhoogde sitotoksiteit van die chemoterapeutiese geneesmiddels vir normale weefsel [Ford, 1995]. Verskeie dosis-beperkende newe-effekte is vir verapamil en die ander chemosensiteerders tydens die toediening daarvan aan kanker pasiente, ondervind [Tsuruo, 1989]. Hierdie dosis-beperkende newe-effekte verhoed dat die chemosensitiseerder teen hoog genoeg dosisse aan die pasiente toegedien kan word. Die laer dosisse van die chemosensitiseerder lei tot onvoldoende serum konsentrasie van die chemosensitiseerder [Lum *et al*, 1993]. Die ideaal is dat konsentrasies wat in staat is om MDR doeltreffend *in vitro* om te keer, in die serum van kanker pasiente bereik sal word [Fan *et al*, 1994].

Ernstige, dosis-beperkende kardiaale newe-effekte, soos die blokkering van die antrioventrikulêre node, volledige hartblokkering en kongestiewe hartversaking, het tydens die toediening van verapamil aan kanker pasiente voorgekom [Lum *et al*, 1993]. Ander

neue-effekte wat tydens die gebruik van MDR chemosensitiseerders *in vivo* voorgekom het, sluit neurologiese neue-effekte, perifere edeem, vloeistof retensie, spierpyn, braking, naarheid, slaperigheid, kinavergiftiging, verlies van hare (alopesie), slymvliesontsteking (mukositis), beenmurg-onderdrukking, omkeerbare hipotensie, omkeerbare aritmie (ritme stoornis), gehoorverlies, suising in die ore (*idem*), duiseligheid, supraventikulêre hartslagversnelling (tagikardiale hartslag), stadige hartklop (bradikardie), droë mond, rusteloosheid, omkeerbare hiperbilirubinemia, 'n matige omkeerbare nefropatie, ernstige nefrotoksisiteit, krampe en hardlywigheid, in [Lum *et al*, 1993; Ford & Hait, 1994; Ford, Yang & Hait, 1996].

Daar bestaan moontlik 'n verband tussen die toename in serum bilirubien in kanker pasiente en die serum konsentrasie van die MDR chemosensitiseerder, siklosporien A, wat tot bogenoemde neue-effek aanleiding gegee het. Bilirubien kan as 'n substraat vir P-gp optree [Ford & Hait, 1994]. Die toename in serum bilirubien kan daarom moontlik aan siklosporien A-geïnduseerde inhibisie van bilirubien transport deur P-gp, toegeskryf word. Hiperbilirubinemia is daarom moontlik 'n fisiologiese merker vir *in vivo* omkering van MDR. Die onvermoë om voldoende serum konsentrasies te bereik, is moontlik die rede waarom hierdie neue-effek nie tydens kliniese studies met ander chemosensitiseerders waargeneem is nie. Dit is ook moontlik dat verskeie ander faktore ook tot die siklosporien A-geïnduseerde hiperbilirubinemia bygedra het en dat hierdie effek nie slegs aan die werking van siklosporien A op die P-gp-bemiddelde transport toegeskryf kan word nie [Ford & Hait, 1994].

3.2. Struktuur-aktiwiteit verwantskappe van MDR chemosensitiseerders

Soos reeds genoem is 'n groot verskeidenheid chemiese verbindings in staat om MDR om te keer. Elkeen van die klasse van MDR omkerings verbindings is vir 'n unieke, spesifieke sellulêre effek verantwoordelik [Ford & Hait, 1994]. Hierdie sellulêre effekte wat die verskillende klasse van MDR chemosensitiseerders op MDR selle uitoefen, kan grootliks van mekaar verskil. Die sellulêre teikengebiede van hierdie verbindings verskil ook in 'n groot mate van mekaar [Ford & Hait, 1994; Ford, Yang & Hait, 1996]. Sommige MDR chemosensitiseerders interreageer byvoorbeeld nie met P-gp nie, maar met ander gebiede

van die MDR sel. Ten spyte van bogenoemde waarnemings stel die meerderheid data voor dat meeste MDR chemosensitiseerders 'n gemene teiken-gebied in die MDR sel, tydens hul meganismes van werking in die omkering van MDR, met mekaar deel [Ford & Hait, 1994]. 'n Mens sou verwag dat sekere gemene strukturele eienskappe wat vir die MDR omkeringsaktiwiteit van die verbindings verantwoordelik is, tussen die chemosensitiseerders wat dieselfde teiken-gebied op MDR selle met mekaar deel, sal voorkom [Ford & Hait, 1994; Ford, Yang & Hait, 1996]. Hierdie hipotese het daartoe gelei dat verskeie navorsers gepoog het om die chemiese strukturele eienskappe van chemosensitiseerders wat vir die omkeringsaktiwiteit van hierdie verbindings verantwoordelik is, te identifiseer [Lum *et al*, 1993]. Daar is gehoop dat die identifisering van hierdie gemene chemiese strukturele eienskappe van die MDR omkeringsverbindings, tot die ontwikkeling van meer doeltreffende chemosensitiseerders sal lei [Lum *et al*, 1993; Ford & Hait, 1994].

Die struktuur-aktiwiteit verwantskappe wat vir die MDR omkeringsaktiwiteit van verbindings verantwoordelik is, kan as volg opgesom word. Verbindings met tersiêre, kationiese amino-groepe wat in 'n sikliese struktuur met 'n spesifieke ruimtelike oriëntering geïnkorporeer is en wat 'n afstand van ten minste drie koolstowwe vanaf 'n hidrofobiese gekonjugeerde ring geleë is, besit optimale MDR omkerings aktiwiteit [Ford & Hait, 1994]. Die lipied oplosbaarheid, kationiese lading en molekulêre volume van chemosensitiseerders speel ook 'n belangrike rol in die mate van MDR omkeringsaktiwiteit wat die verbindings besit [Lum *et al*, 1993]. Alle chemosensitiseerders is lipofiliese verbindings en baie van die chemosensitiseerders is heterosikliese, positief gelaaiete verbindings [Ford, Yang & Hait, 1996].

3.3. Meganismes betrokke by die farmakologiese omkering van MDR

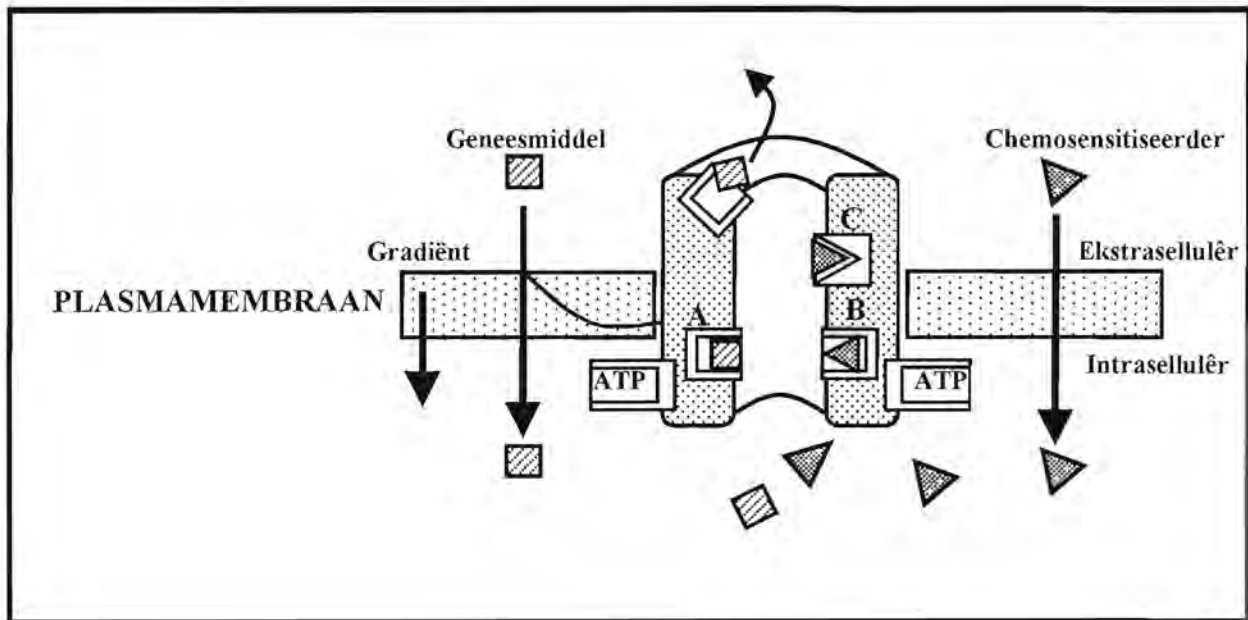
Die sellulêre teikengebiede van die groot verskeidenheid verbindings wat in staat is om MDR *in vitro* farmakologies om te keer, verskil onderlings grootliks van mekaar [Ford, Yang & Hait, 1996]. Die presiese meganisme van werking betrokke by die farmakologiese omkering van MDR is nog tot 'n groot mate onbekend en word tans aktief deur verskeie navorsers bestudeer. Daar word gehoop dat die identifisering van die presiese meganisme

van werking van MDR chemosensitiseerders, tot die ontwikkeling en identifisering van nuwe, meer doeltreffende chemosensitiseerders sal lei.

Verskeie meganismes is vir die werking van MDR chemosensitiseerders voorgestel. Die primêre meganisme wat vir die farmakologiese omkering van MDR voorgestel is, behels die direkte inhibisie van die P-gp-bemiddelde uitwaartse transport van anti-kanker geneesmiddels uit MDR selle uit deur MDR chemosensitiseerders. 'n Vereenvoudigde model is vir hierdie moontlike meganisme van werking van MDR chemosensitiseerders, word in Figuur 3.1 aangetoon. Die MDR chemosensitiseerders inhibeer die uitwaartse transport van anti-kanker geneesmiddels uit die MDR selle, deur op 'n spesifieke en versadigbare wyse aan P-gp te bind. Sommige MDR chemosensitiseerders keer dus MDR moontlik om deur met die anti-kanker geneesmiddels om dieselfde geneesmiddel bindingsgebied op die P-gp molekule te kompeteer en verhoed sodoende dat die anti-kanker geneesmiddels aan P-gp bind. Hierdie direkte inhibisie van die P-gp-bemiddelde uitwaartse transport van anti-kanker geneesmiddels, lei tot die herstel van die intrasellulêre akkumulering van anti-kanker geneesmiddels in die selle. Die anti-kanker geneesmiddels kan dus weer sitotoksiese konsentrasies binne die selle bereik, wat tot seldoding lei [Ford, Yang & Hait, 1996].

Hierdie model as meganisme van werking van MDR chemosensitiseerders is deur 'n groot verskeidenheid geneesmiddel bindingstudies, ondersteun. In geneesmiddel bindingstudies met radio-aktief gemerkte MDR chemosensitiseerders, is getoon dat verskeie MDR chemosensitiseerders in staat is om as substrate vir P-gp op te tree. Daar is byvoorbeeld waargeneem dat sekere MDR chemosensitiseerders, soos verapamil, transfluopentiksol en siklosporien A, net soos sekere anti-kanker geneesmiddels, teen laer vlakke intrasellulêr in MDR selle as in die geneesmiddel-sensitiewe selle akkumuleer [Ford, Yang & Hait, 1996].

Dit is moontlik dat daar meer as een geneesmiddel bindingsgebied vir MDR chemosensitiseerders en anti-kanker geneesmiddels op die P-gp molekules kan voorkom, aangesien elke klas van MDR chemosensitiseerders moontlik unieke strukturele vereistes



Figuur 3.1: 'n Funksionele voorstelling van P-glikoproteïen. Die model verteenwoordig 'n transmembraan proteïen wat ATP energie gebruik om die geneesmiddels aktief oor die selmembraan te vervoer (A). Die chemosensitiseerder mag as 'n kompetiewe inhibeerder optree deur die geneesmiddel bindingsgebied te beset (B) of as 'n nie-kompetiewe inhibeerder te funksioneer deur 'n chemosensitiseerder bindingsgebied te beset (C).

vir doeltreffende binding aan P-gp besit [Ford, Yang & Hait, 1996; Garrigos *et al*, 1997]. Die binding van MDR chemosensitiseerders aan oorvleulende of afsonderlike geneesmiddel-spesifieke bindingsgebiede op P-gp, kan tot allosteriese veranderings op die P-gp molekule lei. Hierdie allosteriese veranderings kan verhoed dat die anti-kanker geneesmiddels aan P-gp bind en sodoende tot die direkte inhibering van die P-gp-bemiddelde uitwaartse transport van anti-kanker geneesmiddels, lei [Ford, Yang & Hait, 1996].

Die hipotese dat daar moontlik meer as een geneesmiddel bindingsgebied vir MDR chemosensitiseerders op die P-gp molekule mag voorkom, is deur verskeie waarnemings ondersteun. Daar is onder andere waargeneem dat die substitusie van 'n serien residue in die elfde transmembraan gebied van muis P-gp met enige van die ander ses aminosure, die omkeringsaktiwiteit van verskeie MDR chemosensitiseerders kan beïnvloed. Die bestudering van die binding van die radio-aktief gemerkte MDR chemosensitiseerder, azidopien, aan P-gp, het ook tot die identifisering van twee afsonderlike geneesmiddel bindingsgebiede op die P-gp molekule gelei. Die een bindingsgebied kom in die amino-helfte van die P-gp molekule voor, terwyl die tweede bindingsgebied in die karboksi-helfte van die proteïen voorkom [Ford, Yang & Hait, 1996]. Garrigos *et al* (1997) het verder gevind dat verapamil en vinblastien met mekaar kompeteer om aan dieselfde of oorvleulende bindingsgebiede op die P-gp molekule te bind, terwyl progesteron nie met hierdie twee verbindings om dieselfde bindingsgebied kompeteer om aan P-gp te bind nie. Dit dui daarop dat die bindingsgebied op P-gp vir progesteron waarskynlik heeltemal apart van die bindingsgebiede vir vinblastien of verapamil op die P-gp molekule voorkom. Vinblastien en verapamil bind waarskynlik op twee oorvleulende gebiede aan P-gp, aangesien hierdie twee geneesmiddels verskillende invloede op die basale ATPase aktiwiteit van P-gp uitoefen [Garrigos *et al*, 1997].

Daar bestaan egter nog groot onsekerhede oor verskeie aspekte van bogenoemde meganisme van werking van MDR chemosensitiseerders. Dit is byvoorbeeld onduidelik of die verskillende klasse van MDR chemosensitiseerders almal as inhibeerders van die uitwaartse transport van anti-kanker geneesmiddels optree, hoeveel bindingsgebiede vir

MDR chemosensitiseerders op P-gp voorkom en waar hulle op die P-gp molekule geleë is, en of alle MDR chemosensitiseerders bindingsgebiede met anti-kanker geneesmiddels op P-gp molekules deel [Ford, Yang & Hait, 1996].

Sommige MDR chemosensitiseerders kompeteer, ten spyte van hul vermoë om as substrate vir P-gp op te tree, nie met die anti-kanker geneesmiddels om aan P-gp te bind nie. Sommige weerstandbiedende sellyne toon ook geen korrelasie tussen die toename in MDR en die mate van P-gp uitdrukking van die selle nie. Hierdie waarnemings het tot die hipotese gelei dat die MDR chemosensitiseerders die werking van P-gp moontlik direk of indirek inhibeer deur nie direk met P-gp te interreageer nie, maar eerder nie-spesifiek met die selmembrane van die MDR selle te interreageer [Pajeva *et al*, 1996].

Baie MDR chemosensitiseerders is kationiese, lipofiliese verbindings [Kellen, 1994]. Meeste MDR chemosensitiseerders is weens hul chemiese samestelling, net soos anti-kanker geneesmiddels, in staat om in selmembrane te interkalleer en sodoende die karaktereienskappe van die selmembrane te beïnvloed en te verander [Kellen, 1994; Pajeva *et al*, 1996]. Die interkallering van MDR chemosensitiseerders kan onder andere die omset en vervoer van fosfolipiede in die selmembraan beïnvloed en verander [Kellen, 1994]. Daar is ook verder waargeneem dat die fosfolipied samestelling van die selmembrane van verskeie weerstandbiedende selle van die fosfolipied samestelling van die selmembrane van die ooreenstemmende geneesmiddel-sensitiewe selle, verskil [Bergelson *et al*, 1970; Pajeva *et al*, 1996]. Die unieke karakter-eienskappe van selmembraan fosfolipiede speel 'n belangrike rol in die regulering van die doeltreffende funksionering van die meganisme van werking van proteïene in die selmembraan, soos proteïen kinase C (PKC) en P-gp [Kellen, 1994; Ferte, 2000]. Sinicrope *et al* (1992) het byvoorbeeld getoon dat veranderings in die lipied vloeibaarheid die P-gp-bemiddelde transport in lewer kanalikulêre membraan vesikels, beïnvloed. Daar is ook gevind dat MDR chemosensitiseerder-geïnduseerde veranderings in die membraan vloeibaarheid van MDR selle, met die vermoë van hierdie MDR chemosensitiseerders om MDR om te keer, korreleer [Pajeva *et al*, 1996]. Die fosfolipied samestelling van MDR selle speel ook 'n belangrike rol in die katalitiese aktiwiteit van die ATPase gebiede van P-gp.

Fosfatidieletanolamien is byvoorbeeld in staat om die P-gp ATPase aktiwiteit te aktiveer en P-gp teen termiese inaktivering te beskerm [Doige *et al*, 1993]. MDR chemosensitiseerders kan deur in die selmembrane van MDR selle te interkalleer, nie-spesifieke veranderings in die fosfolipied samestelling van MDR selle veroorsaak. Hierdie MDR chemosensitiseerder-bemiddelde veranderings in die fosfolipied samestelling van MDR selle kan verhoed dat proteïene in die selmembraan, soos P-gp, optimaal funksioneer deur byvoorbeeld die ATPase aktiwiteit van P-gp konformasioneel te inhibeer [Kellen, 1994]. Veranderings in die konformasie en funksionering van membraan-geassosieerde proteïene, soos P-gp, as gevolg van veranderings in die strukturele organisering van die lipied dubbellaes van selmembrane, kan dus direk tot die omkering van MDR lei [Pajeva *et al*, 1996].

Geneesmiddel/membraan interaksies kan ook indirek tot die omkering van MDR lei. Hierdie indirekte meganisme is op die rol wat proteïen kinases, veral PKC, in die regulering van MDR speel, gebaseer. Die kalsium-geaktiveerde, fosfatidielserien-afhanklike PKC is vir die fosforilering van P-gp verantwoordelik. Hierdie PKC-bemiddelde fosforilering van P-gp speel 'n belangrike rol in die aktiwiteit van hierdie proteïen. Inhibeerders van PKC is daarom in staat om die funksie van P-gp in weerstandbiedende sellyne te verander [Pajeva *et al*, 1996]. Baie MDR chemosensitiseerders is in staat om as inhibeerders van PKC op te tree [Ford, Yang & Hait, 1996]. Sommige MDR chemosensitiseerders inhibeer daarom moontlik die werking van P-gp indirek, deur PKC te inhibeer en sodoende die fosforileringspatroon van P-gp te verander [Ford, Yang & Hait, 1996; Pajeva *et al*, 1996].

Hierdie hipotese vir die meganisme van werking van MDR chemosensitiseerders is deur 'n studie met katamfiliese verbindings, soos flupentiksol, ondersteun. Flupentiksol is in staat om MDR om te keer. Hierdie verbinding word by fisiologiese pH gedeeltelik geprotoneer. Positief gelaaiete flupentiksol verbindings is in staat om sterk met asidiese (suur) membraan fosfolipiede, soos fosfatidielserien en fosfatidielcholien te interreageer, aangesien die fosfaat- en karboksilaat groepe van asidiese fosfolipiede, soos fosfatidielserien, 'n negatiewe lading by fisiologiese pH besit. Buiten die ioniese

interaksies tussen flupentiksole en die asidiese membraan fosfolipiede, kan die ongelaaiede fraksies van die katamfiliese verbindings ook deur middel van hidrofobiese kragte aan selmembrane bind. Die katamfiliese verbindings is in staat om deur middel van hierdie interaksies met membraan fosfolipiede, soos fosfatidielserien, veranderings in die strukturele organisering van fosfolipiede, in die lipied dubbellaë te veroorsaak. Hierdie geneesmiddel-geïnduseerde veranderings in die fosfolipied samestelling van selmembrane het met die MDR omkeringsaktiwiteit van die katamfiliese verbindings, sowel as met die vermoë van hierdie verbindings om PKC te inhibeer, gekorreleer. Die geneesmiddel/fosfolipied interaksies beïnvloed die herverdeling van fosfatidielserien molekules in die selmembraan. Die herverdeling van fosfatidielserien molekules in die lipied dubbellaë van selmembrane is noodsaaklik vir die aktivering van PKC. Die interaksie van flupentiksole met die membraan fosfolipiede kan konformasionele veranderings in die proteïene wat in die selmembraan ingebed is, soos PKC en P-gp, veroorsaak. Soos reeds genoem, is PKC vir die fosforilering van P-gp verantwoordelik. MDR chemosensitiseerder-bemiddelde inhibisie van PKC kan dus tot veranderings in die fosforileringspatroon en gevolglik die aktiwiteit van P-gp lei. Die MDR chemosensitiseerders, trans- en cis-flupentiksol, is nie in staat om die binding van [³H]azidopien aan P-gp te inhibeer nie. Sommige MDR chemosensitiseerders inhibeer dus moontlik die P-gp-bemiddelde uitwaartse transport van anti-kanker geneesmiddels deur met die membraan fosfolipiede in die selmembrane van MDR selle te interreageer [Pajeva *et al*, 1996].

HOOFSTUK 4

RIMINOFENASIEN VERBINDINGS

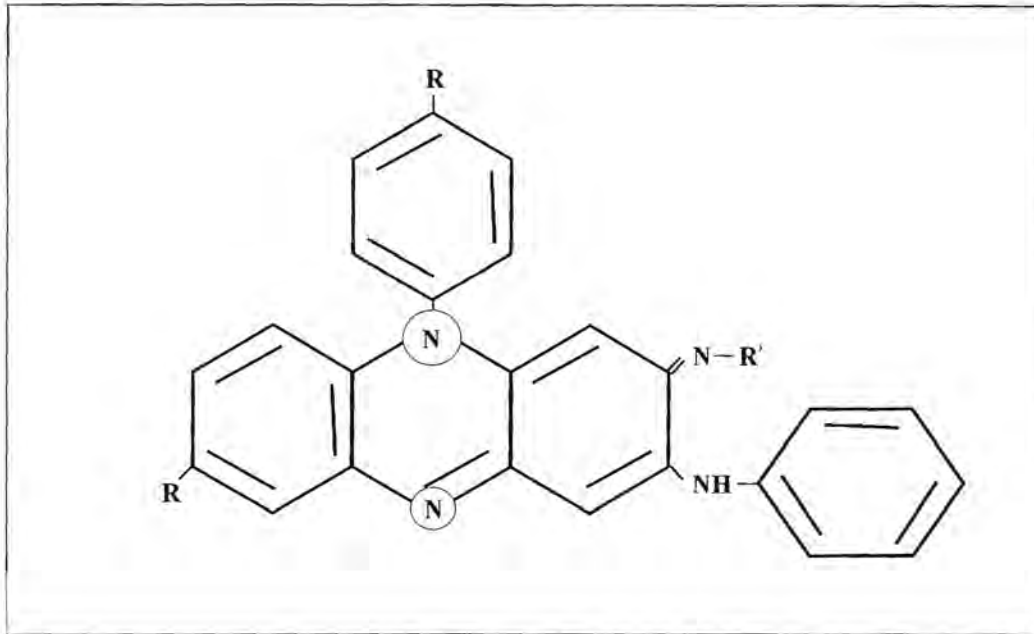
4.1. Inleiding

In die 1940's is 'n chemoterapie eenheid deur die Ierse Mediese Navorsingsraad op die been gebring. Die doel van hierdie eenheid was om 'n chemiese behandeling vir tuberkulose te vind. Een van die resultate wat die navorsing van hierdie eenheid opgelewer het, was die ontwikkeling van verskeie riminofenasien verbindings. Die basiese struktuur van die riminofenasien verbindings word in Figuur 4.1 getoon. Die bekendste van hierdie riminofenasien verbindings, is klofasimien [Durandt, 1994; O'Connor *et al*, 1995].

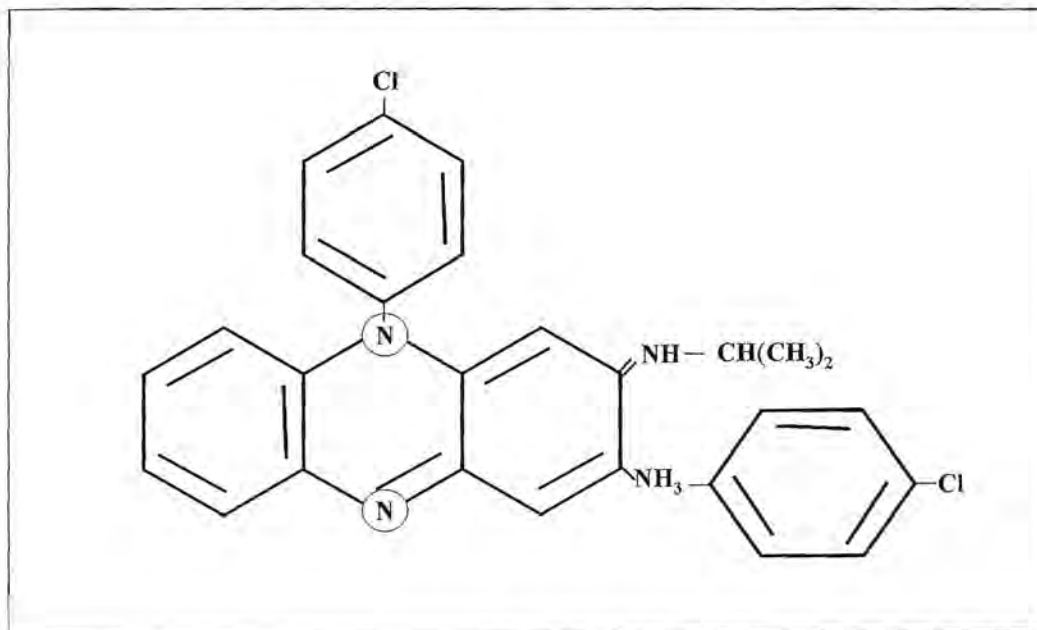
Klofasimien (B663) het *in vitro*, sowel as in eksperimentele muise, biologiese aktiwiteit teen tuberkulose getoon. Teleurstellende resultate is egter tydens die behandeling van tuberkulose in die aap en die mens met klofasimien, verkry [Barry & Conalty, 1965]. Die soeke na beter, meer effektiewe middels teen tuberkulose in die mens het gevolglik voortgeduur. In hierdie volgehoue poging in die soeke na nuwe anti-tuberkulose geneesmiddels, is verskeie ander, nuwe riminofenasien verbindings ook geïdentifiseer [O'Connor R, Dublin City University, Ierland, persoonlike kommunikasie].

4.2. Algemene kenmerke van klofasimien

Klofasimien(B663;3-[p-chloroanilino]-10-[p-chlorofeniel]-2,10-dihidro-2-[isopropielimino]fenasien) is huidiglik die enigste riminofenasien verbinding wat kommersieël beskikbaar is. Die chemiese struktuur van hierdie verbinding word in Figuur 4.2 getoon. Dit word deur die maatskappy, NOVARTIS Ltd, onder die handelsnaam Lamprene, bemark [Yawalkar & Vischer, 1979]. Hierdie middel word huidiglik primêr as 'n anti-leprose middel, hoofsaaklik as deel van kombinasie terapie, in die behandeling van leprose pasiente gebruik [World Health Organisation, 1987]. Klofasimien word ook suksesvol in die behandeling van ander mikobakteriële infeksies, soos *M. avium* kompleks, aangewend [Agins *et al*, 1989]. Klofasimien is 'n rooi riminofenasien kleurstof met 'n molekulêre massa van 473 g/mol. Dit is 'n hoogs lipofiliese verbinding en slegs oplosbaar in organiese oplosmiddels soos etanol, benseen en dimetiel sulfoksied (DMSO) [Garrelts,



Figuur 4.1: Basiese struktuur van riminofenasien verbindings



Figuur 4.2: Die chemiese struktuur van klofasimien (B663).

1991]. Verder besit klofasimien 'n redoks potensiaal van -0.18 V by pH 7.0 [Barry *et al*, 1957]. Hierdie verbinding kan dus maklik geoksideer word.

4.3. Die biologiese aktiwiteite van riminofenasien verbindings

Riminofenasien verbindings besit buiten anti-mikobakteriële aktiwiteit ook verskeie ander biologiese aktiwiteite. Hierdie biologiese aktiwiteite sluit onder andere anti-mikrobakteriële aktiwiteit, pro-oksidatiewe aktiwiteit, immuun-onderdrukkende aktiwiteit en anti-kanker aktiwiteit in [Durandt, 1994; Durandt *et al*, 1996].

4.3.1. Die anti-tumor aktiwiteit van riminofenasien verbindings

Riminofenasien verbindings besit indirekte, sowel as direkte anti-tumor aktiwiteit [Anderson *et al*, 1988; Van Rensburg *et al*, 1993a; Van Rensburg *et al*, 1993b; Durandt *et al*, 1996].

4.3.1.1. Indirekte anti-tumor aktiwiteit van riminofenasien verbindings

Riminofenasien verbindings prikkel polimorfonukleêre leukosiete (PMNL) in die teenwoordigheid van verskeie stimuli, tot verhoogde vrystelling van reaktiewe oksidante, deur met die membraan-geassosieerde suurstof-afhanklike sisteme van PMNL te interreageer [Savage *et al*, 1989; Durandt, 1994; Durandt *et al*, 1996]. Hierdie riminofenasien-bemiddelde verhoging in reaktiewe oksidant produksie deur die PMNL, is dosis-afhanklik [Mascellino *et al*, 1991; Durandt, 1994; Durandt *et al*, 1996]. Die reaktiewe oksidante besit sitotoksiese aktiwiteit en dra tot die indirekte anti-tumor aktiwiteit van die riminofenasien verbindings by [Van Rensburg *et al*, 1993a; Durandt *et al*, 1996].

4.3.1.2. Direkte anti-tumor aktiwiteit van riminofenasien verbindings

Riminofenasien verbindings is ook in staat om die proliferering van verskeie weefselkultuur-sellyne *in vitro* direk te inhibeer [Van Rensburg *et al*, 1993a; Van Rensburg *et al*, 1993b; Durandt *et al*, 1996; Van Rensburg *et al*, 1996]. Hierdie direkte sitotoksiese aktiwiteit van die riminofenasien verbindings kom by fisiologies relevante konsentrasies (0.25 µg/ml - 4.00 µg/ml) van die

riminofenasien verbindings voor [Van Rensburg *et al*, 1993a]. Van Rensburg *et al* (1996) het gevind dat die riminofenasien verbindings selfs in staat is om die groei van verskeie inhirente veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedende weefselkultuur sellyne *in vitro* direk te inhibeer.

Die riminofenasien verbindings, klofasimien en B669, besit ook *in vivo* direkte anti-tumor aktiwiteit [Van Rensburg *et al*, 1993b; Durandt *et al*, 1996]. Muise met plaveisel karsinoom en rotte met borskanker is met riminofenasien verbindings behandel. Behandeling van die eksperimentele muise voor die verskyning van die tumore, het geen effek op die tumor lading gehad nie [Van Rensburg *et al*, 1993b]. Dit is waarskynlik aan die immuun-onderdrukkende eienskappe van klofasimien en B669 te danke [Zeis & Anderson, 1986]. Behandeling van die diere direk nadat die eerste tumore verskyn het, het egter getoon dat beide hierdie riminofenasien verbindings tumor groei effektief *in vivo* onderdruk. Die riminofenasien verbindings het ook 'n verlenging in die gemiddelde oorlewingstyd van die diere veroorsaak. Van die muise onder behandeling, het 90% - 100% na tien weke nog geleef. Daarenteen het slegs 50% van die onbehandelde, kontrole muise na tien weke nog geleef [Van Rensburg *et al*, 1993b].

Ruff *et al* (1998) het in 'n fase II kliniese studie getoon dat klofasimien die oorlewingstydperk van pasiente met hepatosellulêre karsinoom verleng. Die prognose van hepatosellulêre karsinoom is baie swak, met 'n gemiddelde oorlewingstydperk van 6-8 weke [Okuda *et al*, 1984]. Dertig pasiente met hepatosellulêre karsinoom is met 600 mg klofasimien daaglik mondelings vir twee weke behandel, waarna dit met 'n dosis van 400 mg daaglik tot met dood opgevolg is. Die klofasimien behandeling het die siekte-toestand in dertien pasiente vir so lank as 25 maande gestabiliseer en 'n gemiddelde oorlewingstydperk van 14 weke is waargeneem [Ruff *et al*, 1998].

Uit bogenoemde waarnemings kan afgelei word dat die riminofenasien

verbinding nie net anti-tumor aktiwiteit teen 'n spesifieke tumor-model toon nie. Hierdie middels het in beide eksperimentele dierlike tumor modelle wat *in vivo* ondersoek is, sowel as in verskeie weefselkultuur sellyne wat *in vitro* getoets is, anti-tumor aktiwiteit getoon [Van Rensburg *et al*, 1993a; Van Rensburg *et al*, 1993b; Durandt *et al*, 1996; Van Rensburg *et al*, 1996].

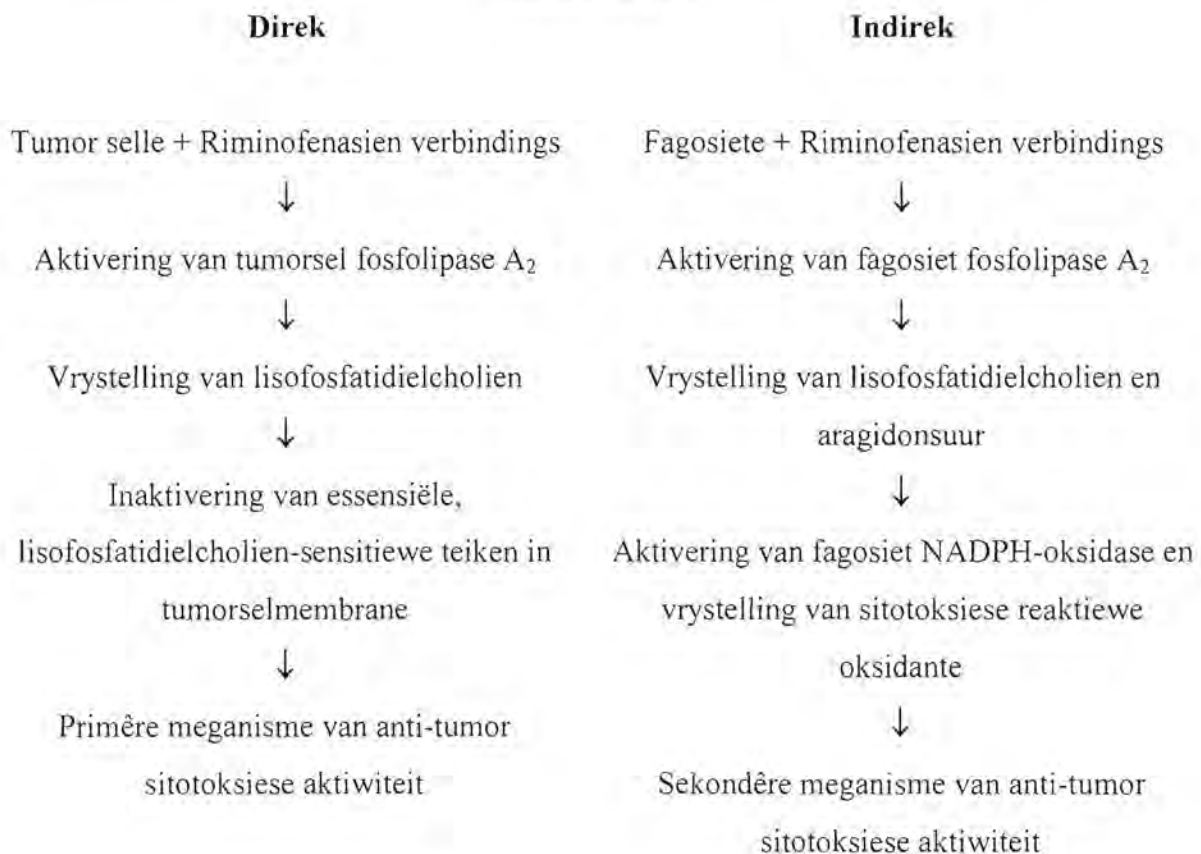
Die direkte riminofenasien-bemiddelde inhibering van die prolifisering van die verskeie tumor sellyne *in vitro*, vind deur middel van 'n unieke twee-ledige meganisme van werking plaas. Hierdie unieke twee-ledige meganisme van werking behels onderskeidelik 'n fosfolipase A₂-afhanklike oksidatiewe en nie-oksidatiewe meganisme en word in Figuur 4.3 opgesom [Van Rensburg *et al*, 1993a].

Die pro-oksidatiewe meganisme is sekondêr en indirek. Dit behels 'n riminofenasien-bemiddelde aktivering van die fosfolipase A₂ ensiem in

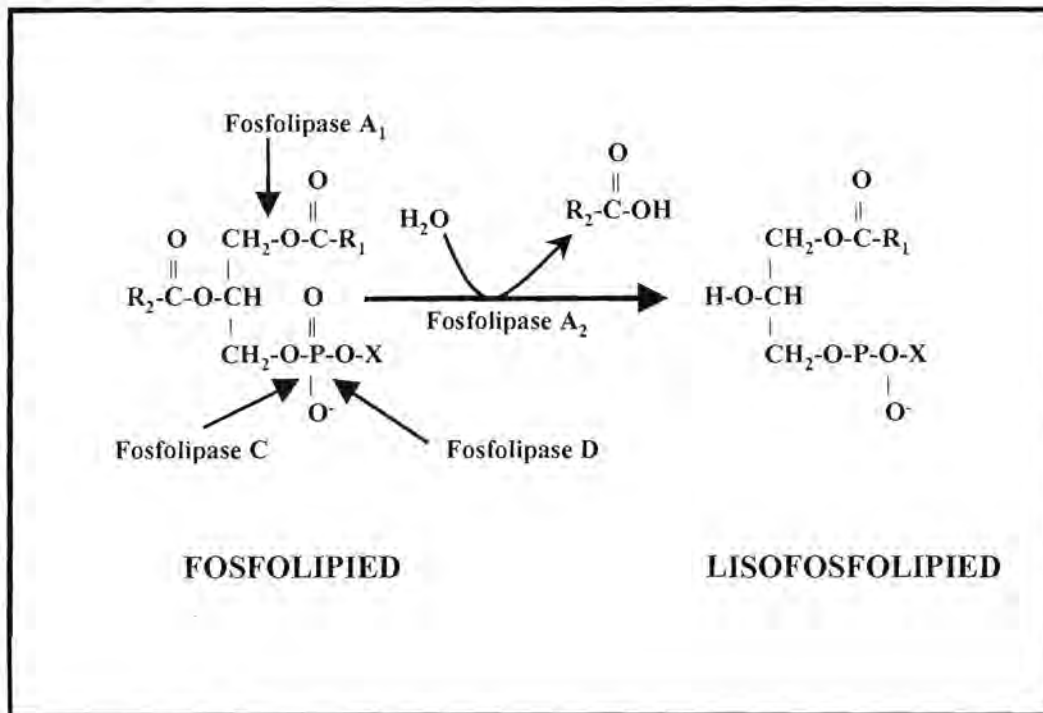
fagositiese selle [Krajewska & Anderson, 1993]. Fosfolipase A₂ kloop die vetsuur op koolstof 2 van fosfolipiede in die selmembraan met die gevolglike vrystelling van 'n vrye vetsuur en 'n lisofosfolipied (Figuur 4.4) [Voet & Voet, 1995a]. Aragidonsuur is een van die vernaamste vetsure wat tydens hierdie reaksie, vrygestel word. Lisofosfatidielcholien (LPC) is daarenteen een van die vernaamste lisofosfolipiede wat tydens die reaksie vrygestel word (Figuur 4.4) [Voet & Voet, 1995a]. Beide aragidonsuur en LPC is in staat om die superoksied-genererende ensiem, NADPH oksidase, te aktiveer [McPhail *et al*, 1984; Oishi *et al*, 1988]. Hierdie fosfolipase A₂-bemiddelde aktivering van NADPH oksidase, lei tot die verhoogde generering van reaktiewe oksidante [Weiss & Slivka, 1982]. Soos reeds genoem is reaktiewe oksidante sitotoksies en kan dit indirek tot die anti-tumor aktiwiteit van verbinding lei [Anderson *et al*, 1988; Savage *et al*, 1989; Durandt *et al*, 1996].

Lisofosfatidielcholien is 'n baie doeltreffende detergent en membraan-destabiliseringsmiddel. Daar is aanvanklik gedink dat die direkte anti-

MEGANISME VAN RIMINOFENASIEN-BEMIDDELDE ANTI-TUMOR AKTIWITEIT



Figuur 4.3: Fosfolipase A₂-afhanklike, direkte nie-oksidatiewe sowel as indirekte oksidatiewe meganismes van riminofenasien-bemiddelde doding van tumorselle.



Figuur 4.4: Fosfolipase A₂ kloff die C2 vetsuur vanaf die triasiel gliserol en gee sodoende oorsprong aan 'n fosfolipied

proliferatiewe effek van die riminofenasien verbindings aan nie-spesifieke membraan skade, wat tydens die aktivering van fosfolipase A₂ deur die riminofenasien verbindings ontstaan het, en/of aan die detergent werking van lisofosfolipiede, toegeskryf kan word [Van Rensburg *et al*, 1993a]. Dit is moontlik dat bogenoemde meganisme van werking wel tydens die vinnige blootstelling van die tumor selle aan hoë konsentrasies van die riminofenasien verbindings mag voorkom. Dit is egter nou bekend dat by laer konsentrasies van riminofenasien verbindings, veranderings in die aktiwiteit van die membraan-geassosieerde Na⁺,K⁺-ATPase ensiem, seldoding vooraf gaan [Van Rensburg *et al*, 1996; Van Rensburg *et al*, 1997]. LPC is in staat om die werking van die membraan-geassosieerde Na⁺,K⁺ATPase te inhibeer. Hierdie LPC-bemiddelde inhibisie van Na⁺,K⁺ATPase is gevolglik vir die anti-proliferatiewe eienskappe van nie-litiese konsentrasies van LPC verantwoordelik [Anderson & Smit, 1993].

Die lipied-oplosbare anti-oksidadant, α -tokoferol, is in staat om weefselkultuur-selle teen die direkte sitotoksiese effek van die riminofenasien verbindings te beskerm [Van Rensburg *et al*, 1993a]. Hierdie inhibisie van die riminofenasien-bemiddelde sitotoksiese aktiwiteit deur α -tokoferol, hou nie met die klassieke oksidadant-opruimings eienskappe van hierdie middel verband nie. Geen kompleks vorming kom ook tussen riminofenasien verbindings en α -tokoferol voor nie [Krajewska & Anderson, 1993]. α -Tokoferol is wel in staat om komplekse met lisofosfolipiede te vorm en is dus in staat om LPC te neutraliseer [Kagan, 1989].

Lisofosfolipase is ook in staat om die anti-proliferatiewe effek van die riminofenasien verbindings op kanker-selle, op te hef [Van Rensburg *et al*, 1993a]. Lisofosfolipase neutraliseer lisofosfolipiede deur dit verder af te breek tot gliserofosfochloliën en 'n vetsuur. Dit is uit bogenoemde waarnemings duidelik dat LPC die vernaamste bemiddelaar van die direkte sitotoksies aktiwiteit van riminofenasien verbindings is [Durandt, 1994].

4.3.2. MDR omkerings aktiwiteit van riminofenasien verbindings

Van Rensburg *et al* (1994) het *in vitro* getoon dat die riminofenasien verbindings, klofasimien en B669, in staat is om MDR in 'n MDR, P-gp-positiewe klein sel long kanker karsinoom sellyn (H69P/LX4) om te keer, deur die intrasellulêre akkumulering van anti-kanker geneesmiddels, soos vinblastien en doksorubisien, in hierdie MDR sellyn te verhoog. Hierdie MDR omkeringsaktiwiteit van die riminofenasien verbindings is deur **Myer en Van Rensburg (1996)** in 'n MDR, P-gp-positiewe chroniese mïeloïede K562 leukemie sellyn bevestig.

4.4. Struktuur-aktiwiteit verwantskappe van riminofenasien verbindings as MDR chemosensitiseerders

Die meeste riminofenasien verbindings is lipofiliese van aard [**Garrelts, 1991**]. Riminofenasien verbindings deel ook ander basiese strukturele eienskappe met verbindings wat bekend is om MDR om te keer. Hierdie strukturele kenmerke sluit 'n basiese stikstof en een of meer planêre, aromatiese ringe in [**Van Rensburg *et al*, 1994**]. Daar is getoon dat die tetrametielpiperidien (TMP)-gesubstitueerde fenasiene MDR beter omkeer as riminofenasien verbindings, soos B663 en B669, wat nie die TMP groepe besit nie. Alhoewel ongechlorineerde TMP-gesubstitueerde molekules meer sitotoksies as die gechlorineerde verbindings is, is die gechlorineerde TMP-gesubstitueerde fenasiene (veral die verbindings met chloried atome op posisie 2 van die anilien en feniel ringe) beter MDR omkeringsverbindings as die ongechlorineerde verbindings [**Van Rensburg *et al*, 1997**]. Baie riminofenasien verbindings besit dus die minimum stel strukturele en konformasionele vereistes wat deur verbindings benodig word, om MDR om te keer [**Pearson & Cunningham, 1993; Van Rensburg *et al*, 1997**]. Riminofenasien verbindings is verder ook relatiewe nie-toksiese, nie-karsinogeniese en nie-beenmurg onderdrukkende verbindings [**Moore, 1983; Van Rensburg *et al*, 1993b**]. Bogenoemde eienskappe tesame met die waarneming dat riminofenasien verbindings MDR by klinies haalbare konsentrasies kan omkeer, maak hierdie verbindings belowende verbindings vir evaluering as MDR omkeringsmiddels in eksperimentele dierlike tumor modelle, sowel as kliniese onkologie.

HOOFSTUK 5

DIE ROL VAN DIE SELMEMBRAAN TYDENS GENEESMIDDEL TRANSPORT

5.1. Inleiding

Daar is verskeie strukturele-funksionele studies uitgevoer in 'n poging om die meganisme van werking van P-gp beter te verstaan. Dit is vanuit hierdie studies duidelik dat die selmembraan 'n baie belangrike rol tydens die transport van geneesmiddels na die teiken-gebiede in die selle en gevolglik ook tydens die funksionering van P-gp speel [Kellen, 1994; Bolhuis *et al*, 1997].

5.2. Samestelling van die selmembraan

Alle eukariotiese selle word deur 'n selmembraan omring. Die selmembraan dien as 'n hidrofobiese, selektief deurlaatbare skeiding en is hoofsaaklik uit amfipatiëse fosfolipiede, amfipatiëse proteïene en cholesterol saamgestel [Becker & Deamer, 1991a]. Die benaderde samestelling van selmembrane is as volg: 55% proteïene, 25% fosfolipiede, 13% cholesterol, 4% ander lipiede en 3% koolhidrate [Guyton & Hall, 1996a].

Verskeie membraan proteïene is in die selmembraan ingebed of word daarmee geassosieer. Hierdie membraan-geassosieerde proteïene kan verskeie funksies in die selmembrane verrig. Sommige membraan proteïene tree as transport molekules in die selmembraan op en/of speel 'n belangrike rol in die regulering van die beweging van verbindings en ione oor die selmembrane. Hierdie membraan-geassosieerde transport proteïene vervoer spesifieke verbindings oor 'n grootliks ondeurlaatbare membraan [Becker & Deamer, 1991b]. Voorbeelde van sulke membraan-geassosieerde proteïene, sluit P-gp in die selmembrane van veelvuldige weerstandbiedende kanker selle sowel as Na^+ , K^+ ATPases in die selmembrane van meeste eukariotiese selle, in [Becker & Deamer, 1991c; Croop, 1994].

Fosfolipiede is die vernaamste komponent van alle biologiese membrane [Voet & Voet, 1995b]. Die fosfolipiede bestaan uit 'n gliserol ruggraat waaraan vetsure op posisies C1 en C2 geësterifiseer is. 'n Fosfaatgroep, waaraan 'n hidrofiliese alkohol-groep gekoppel

is, kom op posisie C3 voor. Die alkohol-groep is gewoonlik serien, etanolamien, cholien of inositol. Membraan fosfolipiede is dus amfipatiëse verbindings, dit wil sê bestaan uit polêre en nie-polêre gedeeltes [Becker & Deamer, 1991b]. Die vetsuur kettings van die fosfolipied molekule, vorm die nie-polêre gedeelte van die membraan fosfolipied molekules. Die primêre funksie van hierdie nie-polêre gedeeltes van die fosfolipiede in die selmembraan, is die vorming van 'n lipied dubbellaag. Die lipied dubbellaag vorm die basiese struktuur van alle biologiese membrane [Becker & Deamer, 1991b; Voet & Voet, 1995b]. Die funksie van die polêre gedeeltes van die fosfolipiede, naamlik die negatief gelaaië fosfaat-groep en die positief gelaaië amien-groep van die alkohol, is grootliks nog onbekend. Sommige polêre gedeeltes van die membraan fosfolipiede, soos inositol, is onder andere by die geleiding van intrasellulêre seine in die sel betrokke [Becker & Deamer, 1991c].

5.3. Funksies van die selmembraan

Selmembrane verrig verskeie verwante, maar tog baie spesifieke funksies in die sel. Die volgende funksies word onder meer deur die membrane van 'n sel verrig: (1) Dit definieer en onderverdeel die sel, (2) dit dien as die gebied (lokus) waar verskeie spesifieke sellulêre funksies uitgevoer word, (3) dit reguleer die beweging van verbindings in en uit die sel en sy kompartemente en (4) dit speel 'n rol in sel-tot-sel kommunikasie en die waarneming van ekstrasellulêre seine [Becker & Deamer, 1991c].

5.4. Membraan transport

Die beweging van molekules en ione oor die selmembraan, is krities vir die doeltreffende funksionering van die sel. Hierdie selektiewe beweging van verbindings en ione oor die selmembrane, sodat uitruiling tussen die sel se intrasellulêre inhoud en die ekstrasellulêre omgewing kan plaasvind, staan as membraan transport bekend [Becker & Deamer, 1991d]. Membraan transport kan op grond van verskeie faktore, in verskillende kategorieë verdeel word. Hierdie faktore behels onder meer die betrokkenheid van 'n sekondêre molekule wat die vervoer van die verbindings en ione oor die membraan fassiliteer, asook die energie vereistes van die transport prosesse [Becker & Deamer, 1991d; Voet & Voet, 1995c].

5.4.1. Passiewe transport

Passiewe transport behels die spontane, lukrake molekulêre beweging van verbindings en ione, molekule vir molekule, oor die selmembraan. Hierdie tipe transport vind hoofsaaklik op drie wyses plaas. Eerstens kan die verbindings spontaan deur die intermolekulêre spasies in die selmembraan beweeg. Hierdie tipe passiewe transport staan as eenvoudige diffusie bekend [Guyton & Hall, 1996b]. Klein ongelaaiide molekules, gasse en water beweeg gewoonlik deur middel van eenvoudige diffusie oor die selmembraan [Becker & Deamer, 1991d]. Tweedens kan verbindings in kombinasie met 'n draer proteïen passief oor die selmembraan beweeg. Hierdie passiewe transport proses staan as gefassiliteerde diffusie bekend. Die lipied dubbellaag van selmembrane is grootliks ondeurlaatbaar vir groot molekules. Daarom maak groter molekules hoofsaaklik van gefassiliteerde diffusie gebruik om oor die selmembraan te beweeg. Derdens beweeg ione hoofsaaklik deur kanale, wat deur proteïene in die selmembraan gevorm word, oor die selmembraan [Guyton & Hall, 1996b]. Al bogenoemde passiewe transport prosesse benodig nie energie nie, aangesien dit die resultaat is van 'n spontane geneigdheid van molekules en ione, om van 'n hoër konsentrasie na 'n laer konsentrasie te beweeg in 'n poging om die ewewig tussen die twee konsentrasies te herstel [Becker & Deamer, 1991d; Voet & Voet, 1995c].

Passiewe transport vind nie net in een rigting oor die selmembraan plaas nie. Dit is belangrik om daarop te let dat verbindings en ione wat vanaf die ekstrasellulêre inhoud van die sel na die intrasellulêre omgewing van die sel diffundeer, ook in staat is om in die teenoorgestelde rigting, te diffundeer. Die netto tempo van diffusie van ione is daarom vir die sel belangrik, aangesien dit die oorheersende rigting waarin die onderskeie ione en/of molekules oor die selmembraan beweeg, bepaal [Guyton & Hall, 1996b].

Baie geneesmiddels is slegs in staat om deur middel van passiewe diffusie oor die selmembraan van die teikensel te beweeg [Tillement *et al*, 1984]. Hierdie passiewe

beweging van geneesmiddels oor die selmembraan van die teikensel word veral deur faktore, soos die lipofilisiteit van die geneesmiddel, die mate van proteïenbinding en die membraan potensiaal van die teikensel beïnvloed.

5.4.1.1. Die invloed van die lipofilisiteit van verbindings op hul passiewe diffusie oor die selmembraan

Een van die vernaamste faktore wat die tempo van beweging van verbindings oor die lipied dubbellaag bepaal, is die graad van lipied oplosbaarheid van die betrokke verbinding. Die tempo van diffusie van verbindings oor die selmembraan, is direk proporsioneel aan die oplosbaarheid van die verbindings in die lipiede van die selmembraan [Guyton & Hall, 1996b]. Hoe groter die mate van oplosbaarheid van die verbindings in die selmembraan, hoe meer is die betrokke verbinding in staat om passief oor die selmembraan te diffundeer [Chen *et al*, 1996]. Lipofiliese verbindings is tot 'n groter mate as hidrofiliese verbindings in staat om in die lipiede van die selmembraan op te los en diffundeer gevolglik vinniger as die hidrofiliese verbindings oor die selmembraan [Hudgins *et al*, 1995; Guyton & Hall, 1996b].

Hudgins *et al* (1995) het gevind dat daar 'n goeie korrelasie tussen die anti-tumor aktiwiteit van geneesmiddels en die mate van lipofilisiteit van hierdie verbindings bestaan. Lipofiliese antrasikliene toon onder andere 'n hoër mate van anti-tumor aktiwiteit as die meer hidrofiliese antrasikliene [Friche *et al*, 1993; Chen *et al*, 1996]. Rivory *et al* (1996) het byvoorbeeld waargeneem dat die relatief hidrofiliese antrasiklien, doksorubisien, swak deur tumore opgeneem word indien dit intra-peritoneaal toegedien word. Hierdie swak opname van doksorubisien deur die tumore, kan aan die onvermoë van hierdie hidrofiliese verbinding om met die selmembraan te interreageer en/of om passief oor die selmembraan te diffundeer, toegeskryf word [Chen *et al*, 1996].

5.4.1.2. Die invloed van proteïenbinding op die passiewe transport van verbindings oor die selmembraan

Interaksie tussen serum-proteïene en die geneesmiddel is een van die belangrikste gebeurtenisse wat in die sel plaasvind, nadat 'n geneesmiddel die liggaam binne gegaan het. Hierdie geneesmiddel-proteïen interaksies het belangrike implikasies vir die opname en verspreiding van geneesmiddels in die liggaam [Tillement *et al*, 1984].

Die binding van verbindings aan serumproteïene vertraag byvoorbeeld die passiewe diffusie van die verbindings oor die selmembrane, aangesien die komplekse wat tussen die verbindings en die serumproteïene vorm te groot is om gemaklik oor die selmembrane te beweeg. Slegs die vrye verbinding, dit wil sê die fraksie van die verbindings wat nie aan die plasmaproteïene bind nie, is in staat om passief oor die selmembraan te diffundeer.

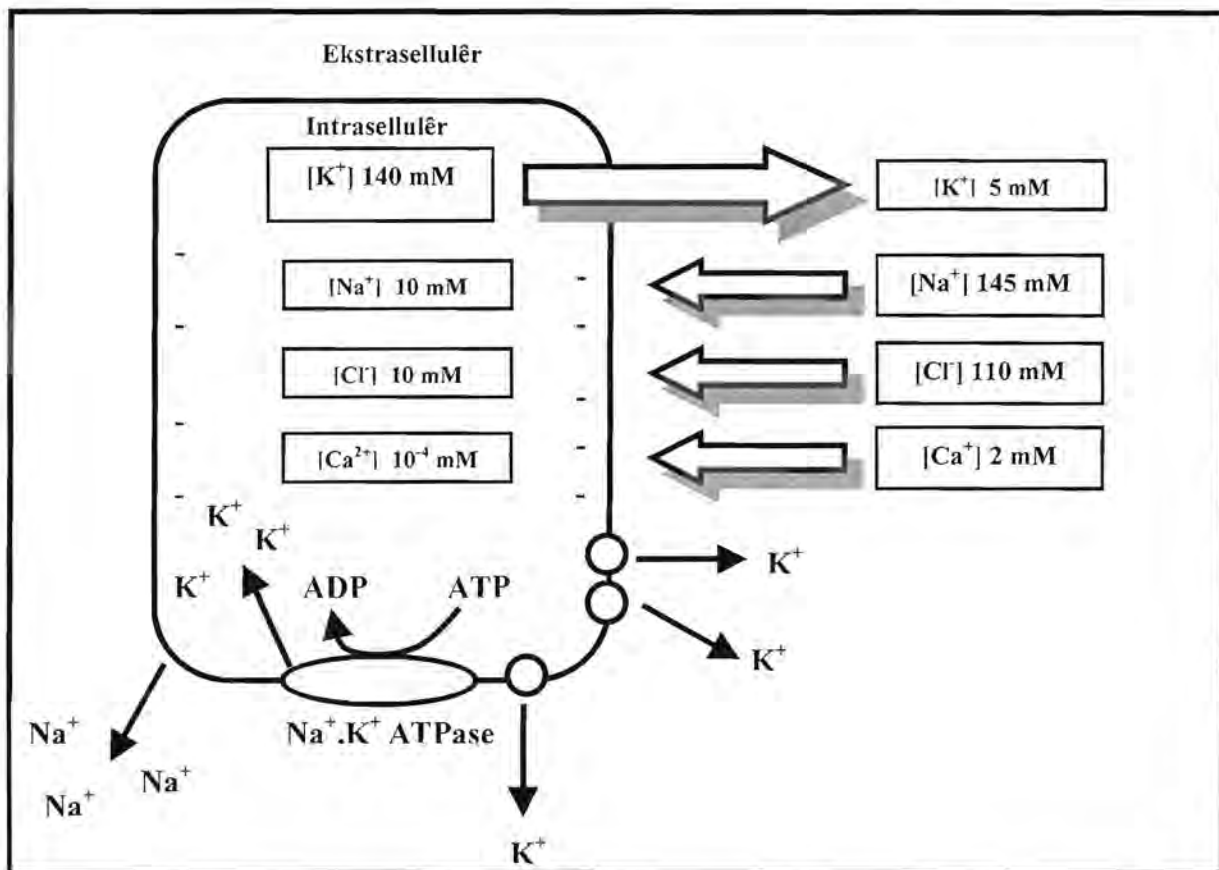
Daar bestaan ook 'n verband tussen die graad van lipofilisiteit van 'n verbinding en die mate waarmee die verbinding aan die plasmaproteïene bind. Lipofiliese verbindings is geneig om tot 'n groter mate as hidrofiliese verbindings aan die plasmaproteïene te bind [Tillement *et al*, 1984]. Rivory *et al* (1996) het getoon dat die lipofiliese antrasiklien, iododoksorubisien, in die afwesigheid van serum, baie vinniger deur selle opgeneem word, as die meer hidrofiliese antrasiklien, doksorubisien. In die afwesigheid van serum het die selle na 30 minute steeds doksorubisien opgeneem, terwyl die opname van iododoksorubisien na 2 minute voltooi was [Rivory *et al*, 1996]. Die teenwoordigheid van 4% bees serum albumien (BSA) in die inkubasie-medium het die opname van beide iododoksorubisien en doksorubisien verlaag. Die opname van die lipofiliese antrasiklien, iododoksorubisien, is egter tot 'n groter mate deur die teenwoordigheid van die proteïene in die inkubasie-medium, beïnvloed. Dit wil daarom voorkom asof die grootste beperkende faktor vir doksorubisien opname membraan deurlaatbaarheid is, terwyl die grootste beperkende faktor vir iododoksorubisien opname proteïenbinding is [Rivory *et al*, 1996]. Dit is dus

nodig om tydens die ontwikkeling van nuwe geneesmiddels 'n balans tussen die lipofiliese karakter-eienskappe van die geneesmiddel en die mate waarmee die geneesmiddel met serumproteïene interreageer te vind.

Geneesmiddel retensie, dit wil sê die terughouding van geneesmiddels deur die proteïene in die plasma of weefsel van die pasient, speel ook 'n baie belangrike rol in die farmakologiese aktiwiteit van die geneesmiddels. Die geneesmiddel word in die plasma terug gehou (plasma retensie), indien die geneesmiddel bindings-affiniteit van die serumproteïene hoër is as die bindings-affiniteit van die proteïene in die weefsel vir die geneesmiddel. Die geneesmiddel word daarenteen in die weefsel terug gehou (weefsel retensie), indien die affiniteit van die serumproteïene om die geneesmiddel te bind laer is as die geneesmiddel bindings-affiniteit van die proteïene in die weefsel. Geneesmiddels kan ook selektief deur sekere organe terug gehou word. Indien die plasma retensie van 'n geneesmiddel oor die algemeen hoër is as die bindings-affiniteit van die proteïene in die meeste organe, akkumuleer die geneesmiddel in dié organe wat 'n hoër bindings-affiniteit vir die geneesmiddel as die serumproteïene besit. Propranolol is so 'n verbinding wat selektief in sekere organe akkumuleer [Tillement *et al*, 1984].

5.4.1.3. Die invloed van die membraan potensiaal op die passiewe transport van ione oor die selmembraan

Biologiese membrane is selektief deurlaatbaar vir verskeie nutriente, molekules en ione, soos H^+ , Na^+ , K^+ , Cl^- en Ca^{2+} . Die beweging van hierdie molekules en ione oor die selmembraan word deur spesifieke transport sisteme in die selmembraan gereguleer (Sien Figuur 5.1) [Becker & Deamer, 1991d; Voet & Voet, 1995c; Guyton & Hall, 1996b; Tanner & Welhausen, 1998]. Hierdie transport sisteme het tot gevolg dat meeste van die ione oneweredig in die intrasellulêre en ekstrasellulêre omgewing van rustende selle versprei is [Voet & Voet, 1995c; Guyton & Hall, 1996b]. Die oneweredige verspreiding van ione het tot gevolg dat groot gradient verskille tussen die intrasellulêre en ekstraselullêre konsentrasies van die verskillende ione oor die selmembrane van die selle,



Figuur 5.1: Kragte betrokke by die generering en instandhouding van die membraan potensiaal. Benaderde intrasellulêre en ekstrasellulêre ion konsentrasies van soogdierselle word in die blokke aangedui. Die wit pyle toon die rigting en sterkte van die elektrochemiese gradiënte van elke ion aan. Die negatiewe tekens verteenwoordig die lading van die selmembraan

voorkom. Die gevolg van die verskille in ioon konsentrasies oor die selmembrane, is 'n verskil in elektriese lading oor die selmembrane [**Rabinovitch & June, 1990; Roepe, 1995**]. Hierdie verskil in elektriese lading staan as die membraan potensiaal van die sel bekend [**Voet & Voet, 1995c**]. Die grootte en karakter van die membraan potensiaal hang van die grootte van die konsentrasie verskille van die verskillende ione af [**Roepe, 1995**].

Beide die passiewe en aktiewe transport van ione oor die selmembraan, speel 'n belangrike rol in die handhawing van die membraan potensiaal oor selmembrane [**Becker & Deamer, 1991d; Voet & Voet, 1995c; Tanner & Welhausen, 1998**]. Natrium- en kalium ione is van die vernaamste ione wat 'n rol in die ontwikkeling en instandhouding van die membraan potensiaal oor eukariotiese selmembrane speel [**Guyton & Hall, 1996b**].

Eukariotiese selmembrane is baie meer deurlaatbaar vir K^+ ione as vir enige ander ioon [**Rabinovitch & June, 1990; Roepe, 1995**]. Verder is die intrasellulêre kalium konsentrasie van 'n sel, groter as die kalium konsentrasie wat ekstrasellulêr in die omringende omgewing van die sel voorkom [**Guyton & Hall, 1996b**]. Hierdie oneweredige verspreiding van kalium ione oor die selmembraan, die selektiewe deurlaatbaarheid van die membrane vir kalium ione, sowel as die handhawing van die konsentrasie gradient deur middel van eletrogeniese pompe, dra in 'n groot mate tot die instandhouding van die membraan potensiaal by [**Shapiro, 1990; Becker & Deamer, 1991d**]. Buiten die kalium ione, speel die oneweredige verspreiding van natrium ione oor die selmembraan ook 'n belangrike rol in die ontwikkeling en handhawing van 'n membraan potensiaal oor die selmembraan [**Guyton & Hall, 1996b**]. Die somtotaal van die passiewe diffusie van die kalium- en natrium ione dra daartoe by dat 'n netto negatiewe membraan potensiaal oor die selmembrane van soogdier selle gehandhaaf word [**Rabinovitch & June, 1990**]. Die meeste rustende eukariotiese selle handhaaf 'n negatiewe membraan potensiaal van tussen 10 en 90 mV oor hul selmembrane [**Shapiro, 1990; Becker & Deamer, 1991d**].

Baie van die anti-kanker geneesmiddels waarteen MDR selle weerstandbiedend is, is kationiese, hidrofobiese swak basisse. Dit is bekend dat die beweging van hidrofobiese, kationiese verbindings oor die selmembraan, sensitief vir verandering in die membraan potensiaal van die selle is. Die grootte van die verandering in die membraan potensiaal, het 'n groot invloed op die verspreiding van hierdie hidrofobiese ione oor die selmembrane. 'n Laer membraan potensiaal kan byvoorbeeld tot 'n afname in die akkumulering tempo van MDR-geassosieerde geneesmiddels lei. Die grootte en karakter van die membraan potensiaal beïnvloed dus die relatiewe akkumulering, retensie en partisie (verdeling) van chemoterapeutiese geneesmiddels in MDR selle. Hierdie parameters speel waarskynlik ook 'n belangrike rol tydens die transport van MDR-geassosieerde geneesmiddels oor die selmembrane van MDR selle [Roepe, 1995].

5.4.2. Aktiewe transport

Dit is in sommige gevalle noodsaaklik dat 'n hoë konsentrasie van 'n sekere ioon in die intrasellulêre inhoud van die sel gehandhaaf word, selfs al bevat die ekstrasellulêre omgewing van die sel baie min van hierdie ioon en is die natuurlike neiging, die passiewe diffusie van die ioon vanuit die omgewing met die hoë konsentrasie na die omgewing met die laer konsentrasie. Byvoorbeeld, sonder die handhawing van 'n hoë kalium konsentrasie in die intrasellulêre inhoud van eukariotiese selle, sal die selle nie doeltreffend kan funksioneer nie. Die teenoorgestelde is ook waar. Dit is byvoorbeeld noodsaaklik dat 'n baie lae konsentrasie van natrium ione in die intrasellulêre inhoud van eukariotiese selle gehandhaaf moet word, ten spyte van die hoë konsentrasie van hierdie ione wat in die ekstrasellulêre omgewing van die selle aangetref word. Beide hierdie vereistes kan nie deur eenvoudige diffusie gehandhaaf word nie. Verbindings is dus nie in staat om passief teen 'n konsentrasie gradient oor die selmembrane te diffundeer nie [Guyton & Hall, 1996b]. Indien molekules of ione teen die konsentrasie gradient van die spesifieke molekules of ione vervoer word, staan dit as aktiewe transport bekend [Becker & Deamer, 1991d; Guyton & Hall, 1996b].

Verskeie tipes aktiewe transport prosesse kom voor. Die meganisme betrokke by hierdie onderskeie aktiewe transport prosesse word grootliks deur die verbinding en/of ioon wat vervoer word, sowel as die bron van energie wat tydens die aktiewe transport proses benodig word, beïnvloed [Becker & Deamer, 1991d]. In die meeste aktiewe transport prosesse is die energie direk vanaf die afbraak (hidrolise) van adenosien trifosfaat (ATP) of 'n ander hoë-energie fosfaat verbinding, afkomstig [Becker & Deamer, 1991d; Guyton & Hall, 1996b].

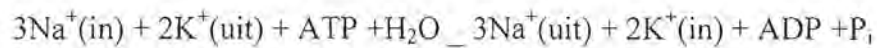
Tydens die meeste aktiewe transport prosesse, bemiddel 'n draer proteïen gewoonlik die transport van die verbindings en/of ione oor die selmembraan. Hierdie draer proteïen tree as 'n gespesialiseerde membraan-geassosieerde ensiem op, wat die beweging van die verbinding en/of ione oor die selmembraan kataliseer. Hierdie ensieme staan ook as proteïen "pompe" bekend. Die natrium-kalium pomp is huidiglik die aktiewe transport sisteem wat die beste verstaan word [Becker & Deamer, 1991d].

5.4.2.1. Die natrium-kalium ATPase pomp

Een van die kenmerkendste eienskappe van meeste eukariotiese selle is, soos reeds genoem, die handhawing van 'n hoë intrasellulêre kalium ioon konsentrasie (100 - 150 mM) en 'n lae intrasellulêre natrium ioon konsentrasie in die selle. Die handhawing van hierdie eienskappe is noodsaaklik vir die doeltreffende funksionering van die sel, aangesien kalium vir verskeie sellulêre lewensproesse (soos ribosoom funksie en die aktivering van verskeie ensieme) benodig word [Becker & Deamer, 1991d]. Die natrium-kalium pomp is vir die handhawing van die kalium sowel as natrium ioon konsentrasies in die eukariotiese selle verantwoordelik. Hierdie pomp speel ook 'n belangrike rol in die instandhouding van die negatiewe membraan potensiaal van eukariotiese selle [Guyton & Hall, 1996b].

Die natrium-kalium pomp kom in alle soogdier selle voor en is huidiglik die aktiewe transport sisteem wat die beste verstaan word. Die natrium-kalium pomp

besit 'n vasgestelde inhirente rigting van werking, aangesien dit slegs in staat is om kalium ione in die sel in te pomp en natrium ione uit die sel uit te pomp. Beide die inwaartse pomp van die kalium ione sowel as die uitwaartse pomp van natrium ione is energie-vereisende prosesse en benodig die hidrolise van ATP om doeltreffend te kan funksioneer [Becker & Deamer, 1991d]. Die algehele stoichiometrie van die Na⁺,K⁺-ATPase reaksie is:



Die werking van die Na⁺,K⁺-ATPase pomp lei daartoe dat drie positiewe ladings die sel verlaat, vir elke twee positiewe ladings wat die sel binne kom. Hierdie netto uitdrywing van Na⁺ ione stel die soogdier selle onder andere in staat om hul water inhoud osmoties te reguleer (Figuur 5.1) [Voet & Voet, 1995c; Tanner & Welhausen, 1998].

Kardiese glikosiede het grootliks tot die bestudering van die Na⁺,K⁺ATPase bygedra [Voet & Voet, 1995c]. Die kardiese glikosiede, soos ouabain, is natuurlike toksiese produkte wat van plante afkomstig is. Ouabain is in staat om die Na⁺,K⁺ATPase aktiwiteit te inhibeer, deur aan die ekstrasellulêre kant van die ensiem te bind en sodoende die defosforileringsreaksie tydens die werking van Na⁺,K⁺ATPase te inhibeer [Becker & Deamer, 1991d; Voet & Voet, 1995c].

HOOFSTUK 6

DOELWITTE

Die drie hoofdoelwitte van hierdie tesis was:

- 1) **Om die membraan potensiaal en Na^+ , K^+ -ATPase aktiwiteit van 'n P-gp positiewe en negatiewe klein sel long kanker selyn, sowel as 'n moontlike onderlinge verwantskap tussen hierdie sellyne, te bepaal.** Vir hierdie deel van die studie is van H69/P, en 'n P-gp-positiewe sublyn, H69/LX4, gebruik gemaak.

- 2) **Om die meganisme waarop die riminofenasien verbindings veelvuldige geneesmiddel weerstandbiedendheid omkeer, te ondersoek.** Na aanleiding van 'n langtermyn siftingsprogram van nuwe riminofenasien verbindings in die Departement Immunologie is verskeie verbindings geïdentifiseer wat of uitsonderlike direkte anti-tumor aktiwiteit of chemosensitiserings-eienskappe besit. Die meganisme waarop hierdie verbindings veelvoudige geneesmiddelbestandheid omkeer, was egter nooit ondersoek nie. Vir hierdie studie is 4 verbindings (Figuur 7.1) gesellekteer, naamlik:
 - a) B663, die oorspronklike verbinding wat minder effektief is as beide sitotoksiese middel sowel as chemosensitiseerder,
 - b) B3962, die TMP-gesubstitueerde fenasiene sonder halogene wat veral sitotoksies is, maar minder doeltreffend is as chemosensitiseerder,
 - c) B4100 en B4121, gehalogineerde TMP-gesubstitueerde fenasiene wat effektiewe chemosensitiseerders is, maar minder sitotoksies is.

Om te bepaal of die chemosensitiserings-eienskappe van die riminofenasien verbindings te wyte is aan nie-spesifieke interaksies met die selmembrane van MDR selle is die volgende bepalinge gedoen:

- i) die lipofilisiteit van die verbindings,
- ii) die sensitiwiteit van rooibloedselmembrane vir die verbindings,
- iii) die effek van die verbindings op die membraan potensiaal,

- iv) die akkumulاسie van die verbindings in die selle,
- v) die invloed van die verbindings op membraan Na^+, K^+ ATPase.

3) Om die verspreiding van die vier riminofenasien verbindings in verskillende weefsels van Sprague-Dawley rotte, met of sonder DMBA-geïnduseerde veelvuldige mamma-karsinome te ondersoek.