

dc\_350\_11

## MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**Membrán transzporterek mint a gyógyszerek,  
növényi hatóanyagok és környezetszennyező  
anyagok ADMETox tulajdonságainak meghatározói**



**Krajcsi Péter, PhD**

**Budaörs, 2012**

## Tartalomjegyzék

1	Rövid összefoglalás.....	5
1.1	Absztrakt.....	5
1.2	Közlemények .....	6
1.2.1	A dolgozat alapját képező <i>in extenso</i> közlemények .....	6
1.2.2	A kandidátusi disszertációban nem szereplő további <i>in extenso</i> közlemények.....	8
1.2.3	Releváns szabadalmak.....	10
1.3	Scientometriai adatok .....	11
1.4	A dolgozatban használt rövidítések összefoglalása.....	12
2	Bevezetés, irodalmi áttekintés .....	17
2.1	Az ADMETox és jelentősége .....	17
2.2	Biológiai membránok – passzív permeabilitás és transzport folyamatok.....	19
2.3	Humán efflux transzporterek szerkezete, nomenklatúrája és működése .....	22
2.4	Humán influx transzporterek szerkezete, nomenklatúrája és működése.....	28
2.5	Efflux és influx transzporterek a farmakológiai szempontból jelentős fiziológiás membránokban .....	32
2.6	Mérési módszerek xenobiotikumok permeabilitásának és transzporterekkel való kölcsönhatásának meghatározására .....	35
2.6.1	<i>In vitro</i> módszerek .....	36
2.6.2	<i>In vivo</i> módszerek.....	38
2.7	Transzporterek jelentősége a gyógyszerek ADMETox sajátágaiban.....	39
2.7.1	Transzporter polimorfizmusok .....	40
2.7.2	Gyógyszerkölcsönhatások .....	42
2.8	Transzporterek és növényi hatóanyagok .....	46
2.9	Transzporterek toxikológiai relevanciája .....	47
3	Célkitűzések.....	49
3.1	Expressziós rendszerek optimalizálása gyógyszer – transzporter kölcsönhatások vizsgálatára.....	49
3.2	Tesztrendszerek korrelációs analízise, valamint transzporter szubsztrát próbák és referencia inhibitorok validálása <i>in vitro</i> ADME vizsgálatok céljára.....	49

3.3	<i>In vitro</i> esszérendszerek alkalmazása transzporter – gyógyszer kölcsönhatások kinetikai jellemzésére. ....	50
3.4	<i>In vitro</i> esszérendszerek alkalmazása növényi hatóanyagok és környezetszennyező anyagok transzporterekkel való kölcsönhatásának azonosítására és jellemzésére.....	50
3.5	<i>In vitro</i> vizsgálatok <i>in vivo</i> relevanciájának bemutatása. <i>In vitro</i> – <i>in vivo</i> korrelációs és fajspecifitász vizsgálatok. ....	50
4	Anyagok és módszerek.....	52
4.1	Anyagok.....	52
4.2	Sejtvonalak, tranziensen transzfektált sejtek és primer sejtenyészetek.....	52
4.3	A logP és logD <sub>7,4</sub> számítása.....	54
4.4	Fehérjetartalom meghatározása.....	55
4.5	Western blot.....	55
4.6	Membrán esszék.....	55
4.7	Sejtes esszék.....	60
4.8	<i>In vivo</i> esszék.....	65
5	Eredmények.....	69
5.1	Expressziós rendszerek optimalizálása gyógyszer – transzporter kölcsönhatások vizsgálatára.....	69
5.1.1	A membrán–koleszterin tartalom hatása ABCG2 fehérje aktivitására.....	70
5.1.2	A membrán–koleszterin tartalom hatása ABCB11 fehérje aktivitására.....	73
5.2	Transzporter szubsztrát próbák és referencia inhibitorok validálása <i>in vitro</i> ADME vizsgálatok céljára.....	80
5.2.1	ABCG2 szubsztrát próbák validálása.....	81
5.2.2	A calcein-AM mint fluoreszcens ABCB1 szubsztrát próba membrán és sejtes tesztekben.....	86
5.2.3	A CDCF mint fluoreszcens ABCC2 szubsztrát próba.....	90
5.3	<i>In vitro</i> esszérendszerek alkalmazása transzporter – gyógyszer kölcsönhatások kinetikai jellemzésére.....	91
5.3.1	A seliciclib egy specifikus ABCB1 szubsztrát – következményei a seliciclib ADME sajátságaira, és citotoxicitására.....	91
5.3.2	Az ivermectin kölcsönhatása ABC transzporterekkel.....	93
5.3.3	A sulfasalazin ABCG2 szubsztrát – a kölcsönhatás jellemzése.....	95
5.4	<i>In vitro</i> esszérendszerek alkalmazása növényi hatóanyagok és környezetszennyező anyagok transzporterekkel való kölcsönhatásának azonosítására és jellemzésére.....	96
5.4.1	A baicalein és a baicalein konjugátumok transzportja enterocytákban és hepatocytákban.....	96
5.4.2	A hesperetin-glükuronidok kölcsönhatása enterocytá ABC transzporterekkel.....	100

## dc\_350\_11

5.4.3	A hidroxifahéjsavak kölcsönhatása renális anion és ABC transzporterekkel .....	101
5.4.4	Klóracetanilid herbicidek kölcsönhatása ABC transzporterekkel .....	105
5.5	<i>In vitro</i> vizsgálatok <i>in vivo</i> relevanciájának bemutatása. <i>In vitro</i> – <i>in vivo</i> korrelációs és fajspecifitász vizsgálatok .....	108
5.5.1	Az ABCC2 transzporterén mért ösztradiol-17 $\beta$ -glükuronid transzportjának potencírozása membrán, sejtes és <i>in vivo</i> rendszereken.....	108
5.5.2	A quinidin és PSC833 mint szubsztrát próba és referencia inhibitor alkalmazása vér-agy gát ABCB1/Abcb1a funkció vizsgálatára.....	112
6	Következtetések, új megállapítások.....	116
7	Megbeszélés.....	119
8	Köszönetnyilvánítás.....	133
9	Referenciák.....	135

# 1 Rövid összefoglalás

## 1.1 Absztrakt

Az ADMETox a xenobiotikumok abszorpcióját (Absorption), disztribúcióját (Distribution), metabolizmusát (Metabolism), exkrécióját (Excretion) és toxicitását (Toxicity) tanulmányozó tudományterület. A terület fejlődésében a gyógyszeripari alkalmazások a meghatározók. Elsősorban az *in vitro* módszertan fejlődése valamint az *in vitro* – *in vivo* extrapoláció következtében a 80-90-es években mintegy ötödére csökkent a gyógyszerjelöltek klinikai fázisban történő lemorzsolódása (attrition).

Munkánkat három fő irányvonal köré lehet csoportosítani: (i) új esszék/tesztrendszerek fejlesztése, mely magában foglalja az expressziós rendszer optimalizálását, szubsztrát próbák és referencia inhibitorok jellemzését, és az esszék felhasználhatósági korlátainak tanulmányozását, (ii) annak megmutatása, hogy az esszék használhatók különböző típusú xenobiotikumok (gyógyszermolekulák, növényi hatóanyagok, környezetszennyező anyagok) transzporterekkel való kölcsönhatásának jellemzésére, és ADMETox sajátosságainak megértésére, (iii) valamint fajspecifitás és *in vitro* – *in vivo* korrelációs vizsgálatok végzése.

Legfontosabb új eredményeink:

- Megmutattuk, hogy az apikálisan expresszázó efflux transzporterek aktivitása jelentősen függ az expressziós rendszer membrán koleszterin tartalmától. Kifejlesztettünk és szabadalmaztattunk egy új teszt-reagens sorozatot, a koleszterinnel feltöltött rovarsejt membránokat (High-Activity-Membrane (HAM)).
- Megmutattuk, hogy a molekulák lipophilicitása, valamint sejtes vizsgálatok esetében a transzporter expresszió fontos determinánsai a membrán és sejtes esszékben mért IC<sub>50</sub> adatoknak. Mindez felveti a barrier specifikus sejtvonalak, primer kultúrák használatának szükségességét.
- Megmutattuk, hogy a chlorothiazid és a teriflunomid szelektív ABCG2 szubsztrátok használhatók különböző *in vitro* tesztekben, és feltételezzük, hogy klinikai szubsztrát próbaként is alkalmazhatók.

- Kidolgoztunk és szabadalmaztattunk egy fluoreszcens VT esszét ABCB1 transzporter gátlásának vizsgálatára. Igazoltuk, hogy a CDCF alkalmas ABCC2 szubsztrát próbaként való alkalmazásra nagy áteresztőképességű vezikuláris transzport metodikájú szűőtesztekben.
- Megmutattuk, hogy membrán és sejtes tesztrendszerek alkalmasak növényi hatóanyagok valamint környezeti szennyezőanyagok és konjugátumaik transzportfolyamatainak vizsgálatára. Az így kapott mechanisztikus adatok felvetik a lehetőségét a fejlesztések racionalizálásának illetve biztonságosabb peszticidek előállításának.
- Igazoltuk, hogy különböző komplexitású módszerek „barrier”-specifikus integrációjával gyógyszerek hepatikus exkréciójának és vér-agy gát penetrációjának vizsgálatával mechanisztikus és relevancia adatok egyaránt nyerhetők.

Összefoglalva, vizsgálatainkat több mint két tucat szakkikkben publikáltuk. Munkánk további eredménye két szabadalom és egy arra épülő terméklánc valamint számos új módszer.

## 1.2 Közlemények

### 1.2.1 A dolgozat alapját képező *in extenso* közlemények

Kis E, Ioja E, Rajnai Z, Jani M, Méhn D, Herédi-Szabó K, **Krajcsi P**  
BSEP inhibition - In vitro screens to assess cholestatic potential of drugs.  
TOXICOLOGY IN VITRO (2012)  
IF: [2.546]  
In Press

Zhang L, Li CR, Lin G, **Krajcsi P**, Zuo Z  
Hepatic Metabolism and Disposition of Baicalein via the Coupling of Conjugation Enzymes and Transporters-In Vitro and In Vivo Evidences.  
AAPS JOURNAL 13:(3) pp. 378-389. (2011)  
IF: 3.942

Wong CC, Barron D, Orfila C, Dionisi F, **Krajcsi P**, Williamson G  
Interaction of hydroxycinnamic acids and their conjugates with organic anion transporters and ATP-binding cassette transporters.  
MOLECULAR NUTRITION & FOOD RESEARCH 55:(7) pp. 979-988. (2011)  
IF: 4.713

Sziraki I, Erdo F, Beery E, Molnar PM, Fazakas C, Wilhelm I, Makai I, Kis E, Heredi-Szabo K, Abonyi T, Krizbai I, Toth GK, **Krajcsi P**  
Quinidine as an ABCB1 Probe for Testing Drug Interactions at the Blood-Brain Barrier: An In Vitro In Vivo Correlation Study.  
JOURNAL OF BIOMOLECULAR SCREENING 16:(8) pp. 886-894. (2011)  
IF: 2.500

- Szeremy P, Pal A, Mehn D, Toth B, Fulop F, **Krajcsi P**, Heredi-Szabo K  
Comparison of 3 Assay Systems Using a Common Probe Substrate, Calcein AM, for Studying P-gp Using a Selected Set of Compounds.  
JOURNAL OF BIOMOLECULAR SCREENING 16:(1) pp. 112-119. (2011)  
IF: 2.500
- Jani M, Makai I, Kis E, Szabo P, Nagy T, **Krajcsi P**, Lespine A  
Ivermectin Interacts With Human ABCG2.  
JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 100:(1) pp. 94-97. (2011)  
IF: 3.031
- Glavinas H, von Richter O, Vojnits K, Mehn D, Wilhelm I, Nagy T, Janossy J, Krizbai I, Couraud P, **Krajcsi P**  
Calcein assay: a high-throughput method to assess P-gp inhibition.  
XENOBIOTICA 41:(8) pp. 712-719. (2011)  
IF: 2.707
- Erzsébet Beéry, Zsuzsanna Rajnai, Tibor Abonyi, Ildikó Makai, Száva Bánsághy, Franciska Erdő, István Sziráki, Krisztina Herédi-Szabó, Emese Kis, Márton Jani, János Márki-Zay, Gábor Tóth, **Péter Krajcsi**  
ABCG2 modulates chlorothiazide permeability in vitro – characterization of the interaction.  
DRUG METABOLISM AND PHARMACOKINETICS Paper in press. (2011)  
IF: 2.558
- Brand W, Oosterhuis B, **Krajcsi P**, Barron D, Dionisi F, Van Bladeren P J, Rietjens I M C M, Williamson G  
Interaction of hesperetin glucuronide conjugates with human BCRP, MRP2 and MRP3 as detected in membrane vesicles of overexpressing baculovirus-infected Sf9 cells.  
BIOPHARMACEUTICS & DRUG DISPOSITION 32:(9) pp. 530-535. (2011)  
IF: 1.394
- Rajnai Z, Méhn D, Beéry E, Okyar A, Jani M, Tóth G K, Fülöp F, Lévi F, **Krajcsi P**  
ATP-binding cassette B1 transports seliciclib (R-roscovitine), a cyclin-dependent kinase inhibitor.  
DRUG METABOLISM AND DISPOSITION 38:(11) pp. 2000-2006. (2010)  
IF: 3.716
- Jemnitz K, Herédi-Szabo K, Jánossy J, Iojá E, Vereczkey L, **Krajcsi P**  
ABCC2/Abcc2: a multispecific transporter with dominant excretory functions.  
DRUG METABOLISM REVIEWS 42:(3) pp. 402-436. (2010)  
IF: 6.263
- Lespine A, Dupuy J, Alvinerie M, Comera C, Nagy T, **Krajcsi P**, Orłowski S  
Interaction of Macrocyclic Lactones with the Multidrug Transporters: The Bases of the Pharmacokinetics of Lipid-Like Drugs.  
CURRENT DRUG METABOLISM 10:(3) pp. 272-288. (2009)  
IF: 3.989
- Kis E, Rajnai Z, Iojá E, Szabo KH, Nagy T, Mehn D, **Krajcsi P**  
Mouse Bsep ATPase Assay: A Nonradioactive Tool for Assessment of the Cholestatic Potential of Drugs.  
JOURNAL OF BIOMOLECULAR SCREENING 14:(1) pp. 10-15. (2009)  
IF: 2.395
- Kis E, Nagy T, Jani M, Molnár E, Janossy J, Ujhellyi O, Nemet K, Heredi-Szabo K, **Krajcsi P**  
Leflunomide and its metabolite A771726 are high affinity substrates of BCRP: implications for drug resistance.  
ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES 68:(7) pp. 1201-1207. (2009)  
IF: 8.111
- Kis E, Iojá E, Nagy T, Szenté L, Heredi-Szabo K, **Krajcsi P**  
Effect of Membrane Cholesterol on BSEP/Bsep Activity: Species Specificity Studies for Substrates and Inhibitors.  
DRUG METABOLISM AND DISPOSITION 37:(9) pp. 1878-1886. (2009)  
IF: 3.743
- Jani M, Szabó P, Kis E, Molnár É, Glavinas H, **Krajcsi P**  
Kinetic characterization of sulfasalazine transport by human ATP-binding cassette G2.  
BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN 32:(3) pp. 497-499. (2009)  
IF: 1.810
- Herédi-Szabó K, Jemnitz K, Kis E, Iojá E, Jánossy J, Vereczkey L, **Krajcsi P**  
Potentiation of MRP2/Mrp2-mediated estradiol-17 beta-glucuronide transport by drugs - A concise review.  
CHEMISTRY & BIODIVERSITY 6:(11) pp. 1970-1974. (2009)  
IF: 1.926
- Herédi-Szabó K, Glavinas H, Kis E, Méhn D, Báthori G, Veres Z, Kóbori L, von Richter O, Jemnitz K, **Krajcsi P**  
Multidrug resistance protein 2-mediated estradiol-17-beta-D-glucuronide transport Potentiation: in vitro-in vivo correlation and species specificity.  
DRUG METABOLISM AND DISPOSITION 37:(4) pp. 794-801. (2009)  
IF: 3.743

- Oosterhuis B, Vukman K, Vági E, Glavinas H, Jablonkai I, **Kraicsi P**  
Specific interactions of chloroacetanilide herbicides with human ABC transporter proteins.  
TOXICOLOGY 248:(1) pp. 45-51. (2008)  
IF: 2.836
- Heredi-Szabo K, Kis E, Molnar E, Gyorfı A, **Kraicsi P**  
Characterization of 5(6)-carboxy-2', 7 '-dichlorofluorescein transport by MRP2 and utilization of this substrate as a fluorescent surrogate for LTC4.  
JOURNAL OF BIOMOLECULAR SCREENING 13:(4) pp. 295-301. (2008)  
IF: 2.365
- Glavinas H, Mehn D, Jani M, Oosterhuis B, Heredi-Szabo K, **Kraicsi P**  
Utilization of membrane vesicle preparations to study drug-ABC transporter interactions.  
EXPERT OPINION ON DRUG METABOLISM & TOXICOLOGY 4:(6) pp. 721-732. (2008)  
IF: 3.069
- Zhang L, Lin G, Kovacs B, Jani M, **Kraicsi P**, Zuo Z  
Mechanistic study on the intestinal absorption and disposition of baicalein.  
EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 31:(3-4) pp. 221-231. (2007)  
IF: 3.127
- Pal A, Mehn D, Molnar E, Gedey S, Meszaros P, Nagy T, Glavinas H, Janaky T, von Richter O, Bathori G, Szente L, **Kraicsi P**  
Cholesterol potentiates ABCG2 activity in a heterologous expression system: Improved in vitro model to study function of human ABCG2.  
JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS 321:(3) pp. 1085-1094. (2007)  
IF: 4.003
- Pal A, Kis E, Mehn D, Glavinas H, Nagy T, Meszaros P, Bathori G, **Kraicsi P**, Falkay G  
[In vitro methods suitable for the prediction of drug and ABC transporter, especially ABCG2 interactions].  
ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA 77:(4) pp. 205-216. (2007)  
TT: ABC szallitokulonos tekintettel az ABCG2-re-es gyógyszerjelolt molekulak: kolcsonhasanak predikciojara alkalmas in vitro modszerek.
- Glavinas H, Kis E, Pál A, Kovács R, Jani M, Vági E, Molnár E, Bánsághi S, Kele Z, Janáky T, Báthori G, von Richter O, Koomen GJ, **Kraicsi P**  
ABCG2 (BCRP/MXR) ATPase assay - a useful tool to detect drug - transporter interactions.  
DRUG METABOLISM AND DISPOSITION 35: pp. 1533-1542. (2007)  
IF: 3.907
- Lespine A, Dupuy J, Orlowski S, Nagy T, Glavinas H, **Kraicsi P**, Alvinerie M  
Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3).  
CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS 159:(3) pp. 169-179. (2006)  
IF: 1.800
- 1.2.2 A kandidátusi disszertációban nem szereplő további *in extenso* közlemények**
- von Richter O, Glavinas H, **Kraicsi P**, Liehner S, Siewert B, Zech K  
A novel screening strategy to identify ABCB1 substrates and inhibitors.  
NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 379:(1) pp. 11-26. (2009)  
IF: 2.631
- Lengyel GY, Veres ZS, Tugyi R, Vereczkey L, Molnár T, Glavinas H, **Kraicsi P**, Jemnitz K  
Modulation of sinusoidal and canalicular elimination of bilirubin-glucuronides by rifampicin and other cholestatic drugs in a sandwich culture of rat hepatocytes.  
HEPATOLOGY RESEARCH 38:(3) pp. 300-309. (2008)  
IF: 1.562
- Williamson G, Aeberli I, Miguet L, Zhang Z, Sanchez MB, Crespy V, Barron D, Needs P, Kroon PA, Glavinas H, **Kraicsi P**, Grigorov M  
Interaction of positional isomers of quercetin glucuronides with the transporter ABCC2 (cMOAT, MRP2).  
DRUG METABOLISM AND DISPOSITION 35:(8) pp. 1262-1268. (2007)  
IF: 3.907
- Thomas M A, Lichtenstein D L, **Kraicsi P**, Wold W S  
A real-time PCR method to rapidly titer adenovirus stocks.  
METHODS IN MOLECULAR MEDICINE 130: pp. 185-192. (2007)



45. Schmitt U, Abou El-Ela A, Guo LJ, Glavinás H, **Krajcsi P**, Baron JM, Tillmann C, Hiemke C, Langguth P, Hartter S  
Cyclosporine A (CsA) affects the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the atypical antipsychotic amisulpride probably  
via inhibition of P-glycoprotein (P-gp).

JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION 113:(7) pp. 787-801. (2006)  
IF: 2.938

Dorman G, **Krajcsi P**, Puskás L, Kovári Z, Lőrincz Z, Üрге L, Darvas F  
Recent Advances in Chemical Genomics.  
FRONTIERS IN MEDICINAL CHEMISTRY 3: pp. 503-550. (2006)

Ying BL, **Krajcsi P**, Tollefson AE, Spencer JF, Doronin K, Lichtenstein DL, Wold WSM  
Replication-competent oncolytic adenovirus vectors that express TRAIL and over-express ADP.  
MOLECULAR THERAPY 9:(S1) pp. S170-S171. (2004) SU: Suppl. 1

Toth K, Djeha H, Ying BL, Tollefson AE, Kuppuswamy M, Doronin K, **Krajcsi P**, Lipinski K, Wrighton CJ, Wold WSM  
An oncolytic adenovirus vector combining enhanced cell-to-cell spreading, mediated by the ADP cytolytic protein, with selective  
replication in cancer cells with deregulated Wnt signaling.

CANCER RESEARCH 64:(10) pp. 3638-3644. (2004)  
IF: 7.690

GLAVINÁS H, **KRAJCSI P**, CSEREPES J, SARKADI B  
The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity.  
CURRENT DRUG DELIVERY 1: pp. 27-42. (2004)

Darvas F, Dorman G, **Krajcsi P**, Puskas L G, Kovari Z, Lorincz Z, Urge L  
Recent advances in chemical genomics.  
CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 11: pp. 3119-3145. (2004)  
IF: 4.382

Doronin K, Toth K, Kuppuswamy M, **Krajcsi P**, Tollefson AE, Wold WSM  
Overexpression of the ADP (E3-11.6K) protein increases cell lysis and spread of adenovirus.  
VIROLOGY 305:(2) pp. 378-387. (2003)  
IF: 3.391

Visy J, Fitos I, Mády GY, Üрге L, **Krajcsi P**, Simonyi M  
Enantioselective plasma protein binding of bimocloamol.  
CHIRALITY 14: pp. 638-642. (2002)  
IF: 1.575

Lichtenstein DL, **Krajcsi P**, Esteban DJ, Tollefson AE, Wold WSM  
Adenovirus RID beta subunit contains a tyrosine residue that is critical for RID-mediated receptor internalization and inhibition of  
Fas- and TRAIL-induced apoptosis.  
JOURNAL OF VIROLOGY 76:(22) pp. 11329-11342. (2002)  
IF: 5.241

Habib NA, Mitry R, Seth P, Kuppuswamy M, Doronin K, Toth K, **Krajcsi P**, Tollefson AE, Wold WSM  
Adenovirus replication-competent vectors (KD1, KD3) complement the cytotoxicity and transgene expression from replication-  
defective vectors (Ad-GFP, Ad-Luc).  
CANCER GENE THERAPY 9:(8) pp. 651-654. (2002)  
IF: 2.929

Dorman G, **Krajcsi P**, Üрге L, Darvas F  
Novel Chemical Genomics Approaches to One-Step Hit Discovery and Target Identification/Validation.  
PHARMACHEM 1: pp. 13-16. (2002)

Denes L, Jednakovits A, Hargitai J, Penzes Z, Balla A, Talosi L, **Krajcsi P**, Csermely P  
Pharmacologically activated migration of aortic endothelial cells is mediated through p38 SAPK.  
BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY 136: pp. 597-603. (2002)  
IF: 3.450

Darvas F, Szabo I, Karancsi T, Slegel P, Dorman G, Urge L, **Krajcsi P**  
Tutorial: Dual uses of in silico and in vitro metabolism data in lead discovery - ComGenex' MAID: A metabolism-alerting system  
for early-phase discovery research.  
GENETIC ENGINEERING NEWS 22: pp. 32-34. (2002)  
IF: 0.114

Darvas F, Keseru GM, Papp A, Dorman G, Üрге L, **Krajcsi P**  
In Silico and Ex Silico ADME Approaches for Drug Discovery.  
CURRENT TOPICS IN MEDICINAL CHEMISTRY 2:(12) pp. 1287-1304. (2002)

Darvas F, Dorman G, **Krajcsi P**, Üрге L  
Chemical Library Approaches to Target Validation in the Post-Genomic Era.  
GLOBAL OUTSOURCING REVIEW 4: pp. 37-41. (2002)

Darvas F, Dorman G, **Krajcsi P**, Urge L  
A photoactivatable library approach for target identification and

validation.: Abstracts of Papers of the American Chemical Society.  
 ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 223: p. B139. (2002)

Doronin K, Kuppuswamy M, Toth K, Tollefson AE, **Kraicsi P**, Krougliak V, Wold WSM  
 Tissue-specific, tumor-selective, replication-competent adenovirus vector for cancer gene therapy.  
 JOURNAL OF VIROLOGY 75:(7) pp. 3314-3324. (2001)  
 IF: 5.622

Dorman G, **Kraicsi P**, Darvas F  
 Chemical Library Approaches to Target Validation in the Post-Genomic Era.  
 CURRENT DRUG DISCOVERY -: pp. 21-24. (2001)

Balla A, Toth B, Timar G, Bak J, **Kraicsi P**  
 Molecular targets for pharmacological cytoprotection.  
 BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY 61:(7) pp. 769-777. (2001)

Mihalik R, Bauer P, Petak I, **Kraicsi P**, Marton A, Kun E, Kopper L  
 Interaction of cytotoxic drugs and the inhibition of caspase-3 by 3-nitrosobenzamide.  
 INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER 82: pp. 875-879. (1999)  
 IF: 3.545

**Kraicsi P**, Wold WSM  
 Viral proteins that regulate cellular signalling.  
 JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 79: pp. 1323-1335. (1998)  
 IF: 2.645

**Kraicsi P**, Wold WSM  
 Inhibition of tumor necrosis factor and interferon triggered responses by DNA viruses.  
 SEMINARS IN CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY 9:(3) pp. 351-358. (1998)  
 IF: 2.392

Marton A, Mihalik R, Bratincsak A, Adleff V, Petak I, Vegh M, Bauer PI, **Kraicsi P**  
 Apoptotic cell death induced by inhibitors of energy conservation Bcl-2 inhibits apoptosis downstream of a fall of ATP level.  
 EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY 250:(2) pp. 467-475. (1997)  
 IF: 3.136

Dimitrov T, **Kraicsi P**, Hermiston TW, Tollefson AE, Hannink M, Wold WSM  
 Adenovirus E3-10.4K/14.5K protein complex inhibits tumor necrosis factor-induced translocation of cytosolic phospholipase A(2) to membranes.  
 JOURNAL OF VIROLOGY 71:(4) pp. 2830-2837. (1997)  
 IF: 5.821

**Kraicsi P**, Dimitrov T, Hermiston TW, Tollefson AE, Ranheim TS, VandePol SB, Stephenson AH, Wold WSM  
 The adenovirus E3-14.7K protein and the E3-10.4K/14.5K complex of proteins, which independently inhibit tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis, also independently inhibit TNF-induced release of arachidonic acid.  
 JOURNAL OF VIROLOGY 70:(8) pp. 4904-4913. (1996)  
 IF: 6.194

Stewart AR, Tollefson AE, **Kraicsi P**, Yei SP, Wold WSM  
 The Adenovirus E3 10.4K and 14.5K proteins, which function to prevent cytolysis by tumor-necrosis-factor and to down-regulate the epidermal growth-factor receptor, are localized in the plasma membrane.  
 JOURNAL OF VIROLOGY 69:(1) pp. 172-181. (1995)  
 IF: 6.033

**Kraicsi Péter**  
 Vírusstratégikák a gazdaszervezet immunrendszerének szuppresszáására.  
 BOKÉMIA 19: pp. 111-118. (1995)

### 1.2.3 Releváns szabadalmak

Bathori G., Méhn D., Pál Á., **Kraicsi P**., Szente L., Fenyvesi É., Telbisz Á., Sarkadi B., Váradí A., Gedey Sz., Glavinás H.  
 Test systems for transporter proteins  
 P0600408  
 PCT/HU07/00041  
 12 May, 2006

Pál Á., Glavinás H., Herédi Szabó K., Kis E., **Kraicsi P**, Mehn D., Nagy T.  
 New vesicular transporter assay and reagent kit for the evaluation of transporter-test substance  
 P0800306  
 9 May, 2008

## 1.3 Scientometriai adatok

MTMT tudományometriai táblázat  
Krajcsi Péter tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása  
MTA V. Orvostudományi Osztály (2012.03.21.)

Közlemény típusok	Száma		Hivatkozások	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
<b>I. Tudományos folyóiratcikk</b>	65	---	---	---
teljes cikk, nemzetközi folyóiratban	---	61	721	1032
teljes cikk, hazai idegen nyelvű folyóiratban	---	3	10	14
teljes cikk, hazai magyar nyelvű folyóiratban	---	1	0	0
cikk, tudományos levélként	---	0	0	0
<b>II. Könyvek</b>	0	---	---	---
<b>a) Szakkönyv</b>	0	---	---	---
Szakkönyv, kézikönyv, idegen nyelvű	---	0	0	0
Szakkönyv, kézikönyv, magyar nyelvű	---	0	0	0
Tankönyv	---	0	0	0
<b>b) Szerkesztett könyv</b>	0	---	---	---
Szerkesztett könyv, idegen nyelvű	---	0	---	---
Szerkesztett könyv, magyar nyelvű	---	0	---	---
Szerkesztett tankönyv	---	0	---	---
<b>III. Könyvfejezet</b>	2	---	---	---
Könyvfejezet, idegen nyelvű	---	1	0	0
Könyvfejezet, magyar nyelvű	---	1	0	0
Tankönyvekbe írt fejezetek	---	0	0	0
<b>IV. Proceedings</b>	1	---	0	0
<b>V. Multicentrikus vizsgálat</b>	0	---	---	---
<b>a) Szerző</b>	---	0	0	0
<b>b) Szereplő</b>	---	0	---	---
Oktatási közlemények összesen (II-III)	---	0	0	0
<b>Tudományos közlemények összesen (I-V.)</b>	<b>68</b>	<b>---</b>	<b>731</b>	<b>1046</b>
<b>VI. Egyéb tudományos</b>	7	---	---	---
Egyéb tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is	---	5	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	2	17	17
<b>VII. Absztrakt</b>	28	---	24	33
<b>Összesített impakt faktor</b>	195,72	---	---	---
<b>Idézettség száma</b>	---	---	772	1096
<b>Hirsch index</b>	20	---	---	---

Speciális tudománymetriai adatok	Adat
Első szerzős folyóiratcikkek száma (az összes %-ban)	9 (13,85%)
Utolsó szerzős tudományos cikkek száma (az összes %-ban)	20 (30,77%)
Első és utolsó szerzőségű folyóiratcikkek impakt faktorai	94,98
Az utolsó tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (1998 - ) tudományos folyóiratcikkek összegzett impakt faktora és száma (zárójelben)	136,71 (46)
Magyar nyelven megjelent tudományos teljes folyóiratcikkek száma	1
Az utolsó 10 év (2002-2012) tudományos teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	42
összesített impakt faktora	122,50
hivatkozások száma	444
A legmagasabb idézettségű közlemény idézettsége (az összes idézettség százalékában)	95 (8,67%)
Folyóiratcikkek, 15-nél több szerzővel (nem multicentrikus)	0

**Megjegyzések:**

Az MTMT nem tudja szolgáltatni a kérelmezőnek kizárólag külföldi intézményből publikált folyóiratcikkeinek számát, összesített impakt faktorát és független hivatkozásainak számát, valamint az ilyen közlemények első és utolsó szerzőre vonatkozó impaktfaktor összeget. Ezeket az adatokat a pályázónak kell összegyűjtenie és feltöltenie a Doktori Tanács elektronikus rendszerébe.

Az utolsó 10 évet összegző adatoknál a tárgyév + a megelőző 10 év adatai találhatóak.

#### 1.4 A dolgozatban használt rövidítések összefoglalása

ABC: ATP Binding Cassette (ATP-kötő kazetta)

ABCB1: ABC subfamily B member 1 (ABC B alcsalád 1. tag, azonos az MDR1 illetve P-gp fehérjével)

ABCG2: ABC subfamily G member 2 (ABC G alcsalád 2. tag azonos az MXR illetve BCRP fehérjével)

ADME: Absorption-Distribution-Metabolism-Excretion (abszorpció-disztribúció-metabolizmus-exkréción)

AUC: Area Under the Curve (görbe alatti terület)

BBB: Blood – Brain Barrier (vér-agy gát)

BCA: Bicinchoninic Acid (bicinkoninsav)

BCRP: Breast Cancer Resistance Protein (emlőtumor rezisztencia fehérje)

BCS: Biopharmaceutics Classification System (Biomolekula Klasszifikációs Rendszer)

B-GS: Bimane-Glutathione (bimán-glutation)

BRICII: Benign Recurrent Intrahepatic Cholestasis II (II-es típusú benignus recurrens cholestasis)

BSEP: Bile Salt Export Pump (epesó export pumpa)

BZB: Benzbromarone (benzbromaron)

calcein-AM: calcein-Acetoxy-Methylester (calcein-acetoximetilészter)

cAMP: Cyclic Adenosine Monophosphate (ciklikus adenzin-monofoszfát)

CDCF: Carboxy-Dichloro-Fluoreszcein (karboxi-dikloro-fluoreszcein)

cGMP: Cyclic Guanosine Monophosphate (ciklikus guanozin-monofoszfát)

CHO: Chinese Hamster Ovary (kinai hörcsög ovárium)

CLL: Chronic Lymphocytic Leukemia (krónikus limfoid leukémia)

CNS: Central Nervous System (központi idegrendszer)

CsA: Cyclosporine A (cyclosporin A)

CSF: Cerebrospinal Fluid (cerebrospinális folyadék)

DHEAS: Dehydroepiandrosterone Sulfate (dehidroepiandroszteron-3-szulfát)

DMARD: Disease Modifying Antirheumatic Drugs (Rheumatoid Arthritis Betegségmódosító Szerek)

DMSO: Dimethyl Sulfoxide (dimetil-szulfoxid)

E2-17 $\beta$ G: Estradiol-17 $\beta$ -Glucuronide (ösztradiol-17  $\beta$  -glükuronid)

E3S: Estrone-3-Sulfate (ösztron-3-szulfát)

EMA: European Medicines Agency (Európai Gyógyszerhatóság)

ER: Efflux Ratio (efflux arány)

FDA: Food and Drug Administration (Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerhatóság)

GC: Glycocholate (glikokolát)

GCDC: Glycochenodeoxycholate (glikokenodeoxikolát)

GlpT: Glycerol-3-Phosphate Transporter (glicerol-3-foszfát transzporter)

GSH: Glutathione (redukált glutation)

GSSG: Glutathione Disulfide (oxidált glutation)

HBSS: Hank's Buffered Salt Solution (Hanks puffer)

IVIVC: *In vitro* – *In vivo* Correlation (*in vitro* - *in vivo* korreláció)

LTC4: Leukotriene C4 (leukotrién C4)

LY: Lucifer Yellow (Lucifer sárga)

MATE1: Multidrug and Toxin Extrusion Protein 1 (multidrog és toxin extrúzió fehérje)

MDCKII-BCRP: BCRP transfected Madin-Darby Canine Kidney cell line (BCRP transzfektált Madin-Darby kutya vese sejtvonala)

MDCKII-MDR1: MDR1 transfected Madin-Darby Canine Kidney cell line (MDR1 transzfektált Madin-Darby kutya vese sejtvonala)

MDR: Multidrug Resistance (multidrog rezisztencia)

MDR1: Multidrug Resistance Protein 1 (multidrog rezisztencia fehérje 1)

MSD: Mass Single Quad Detector (egyszeres quadropole rendszerű tömegspektrométer detektor)

MTX: Methotrexate (metotrexát)

MXR: Mitoxantrone Resistance Protein (mitoxantron rezisztencia fehérje)

NaDC3: Sodium-dependent high affinity Dicarboxylate transporter (Nátrium függő dikarboxilát transzporter)

Na/K ATPáz: sodium-potassium-ATPase (Na/K ATP-áz / Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP-áz)

NBD: Nucleotide Binding Domain (nukleotid-kötő domén)

NEM-GS: N-Ethyl-Maleimide-Glutathione (N-etil-maleinimid-glutathion)

NHE: Sodium-proton Exchanger (Nátrium hidrogén „exchanger”)

NMQ: N-Methyl-Quinidine (N-metil-quinidin)

OCT: Organic Cation Transporter (szerves kation transzporter)

OAT: Organic Anion Transporter (szerves anion transzporter)

OATP: Organic Anion Transporting Polypeptide (szerves anion transzportáló polipeptid)

PAH: Para-Amino-Hyppuric Acid (para-amino-hippursav)

PAMPA: Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (parallel mesterséges membrán permeabilitás esszé)

PBS: Phosphate Buffered Saline (fiziológiás foszfát puffer)

PEPT: Peptide Transporter (peptid transzporter)

PFICII: Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis (II-es típusú progresszív familiális cholestais)

PGE2: Prostaglandin E2 (prostaglandin E2)

PGF2: Prostaglandin F2 (prostaglandin F2)

P-gp: Permeability-glycoprotein (permeabilitás-glikoprotein)

Pi: Inorganic Phosphate (szervetlen foszfát)

POP: Persistent Organic Pollutants (perzisztáló szerves szennyezőanyagok)

PPF: Peripheral Fluid (perifériás folyadék)

## dc\_350\_11

PT: Proximal Tubule (proximális tubulus)

RBEC: Rat Brain Endothelial Culture (patkány agyi endothel kultúra)

Sf9: Spodoptera frugiperda 9 cell line(Spodoptera frugiperda 9 sejtvonala)

SLC: Solute Carriers (oldott anyag transzporterek azonosak az influx transzporterekkel)

SLCO: Solute Carrier OATP (OATP oldott anyag transzporter)

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (egy pontos nukleotid polimorfizmus)

SULT: Sulfotransferase

TC: Taurocholate (taurokolát)

TCDC: Taurochenodeoxycholate (taurokenodeoxikolát)

TEER: Transepithelial Electrical Resistance (transzepitélialis elektromos ellenállás)

TMD: Transmembrane Domain (transzmembrán domén)

Tox: Toxicity (toxicitás)

UCP: Uncoupling Protein (szétkapcsoló fehérje)

Ver: Verapamil (verapamil)

VT: Vesicular Transport (vezikuláris transzport)



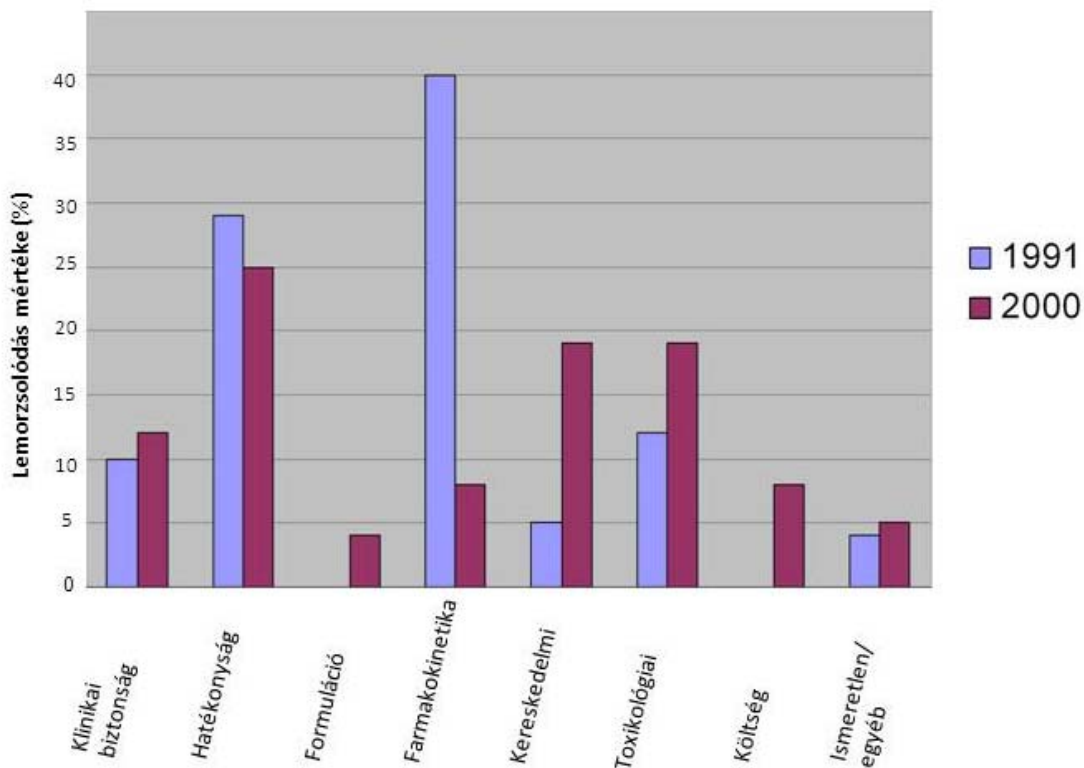
## 2 Bevezetés, irodalmi áttekintés

A Bevezetés, irodalmi áttekintés fejezet célja a disszertáció által lefedett terület háttéroidalmának a tárgyalása, és legfőképpen a disszertációban tárgyalt kísérleti adatok és eredmények pozicionálása. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények kísérletes anyaga fél tucat efflux és fél tucat influx transzportert foglal magában, melyek különböző transzporter családok tagjai. A Bevezetés, irodalmi áttekintés fejezetben elsősorban ezek kerülnek bemutatásra. A tesztelt gyógyszerek, növényi hatóanyagok és környezetszennyező anyagok, valamint az alkalmazott szubsztrát próbák és gátlószerek száma is jelentős. A kísérletes részben azoknak a vegyületeknek a bemutatására kerül sor, amelyek esetében szerkezet-hatás összefüggések tárgyalásra kerülnek. A Bevezetés, irodalmi áttekintés fejezetben az alapelveket, a szemléletmódot és a legfontosabb kutatási irányokat, kísérleti megközelítéseket igyekeztem kifejtetni. Ahol az információ mennyisége megkövetelte, a tételes szakmai anyagot, példákat táblázatokba rendezve mutatom be.

### 2.1 Az ADMETox és jelentősége

A gyógyszerkutatás és gyógyszerfejlesztés hosszadalmas és igen drága folyamat. A 90-es évekbeli statisztikák alapján a fejlesztések alatt álló hatóanyagok késői, klinikai fázisban történő lemorzsolódásának egyik fő oka (39%) a hatóanyag nem megfelelő farmakokinetikai paramétereiben keresendő (1. ábra). A farmakokinetikai sajátságok magukban foglalják azokat a tulajdonságokat, amelyek meghatározzák a gyógyszerek abszorpcióját (felszívódását/Absorption), disztribúcióját (megoszlását/Distribution), metabolizmusát (metabolizmus/Metabolism) és exkrécióját (kiválasztását/Excretion) (ADME). A disszertációban ezekre a fogalmakra a magyar szakmai nyelvben is elterjedt latin eredetű elnevezést használom, tudniillik ebben a nevezéktanban a képzett formák (pl. abszorptív, exkretórikus, stb.) egyértelműbbek. A '80-as, '90-es években végzett kutatások eredményeképpen olyan *in vitro* vizsgálatok kerültek kifejlesztésre, amelyek humán fehérjéket expresszáló transzfektánsok, humán szövetekből származó membrán preparátumok valamint primer, immortalizált, esetleg daganatos sejtvonalak segítségével

pontosabb előrejelzéseket tudtak készíteni a gyógyszerjelöltek várható humán ADME sajátságairól. Ennek következtében a 90-es években az előnytelen ADME miatt történő lemorzsolódás jelentősen, mintegy 8%-ra csökkent. Az említett *in vitro* eszköz elsősorban a vegyületek metabolizmusát vizsgálták, de 1989-ben leírták a Caco-2 coloncarcinóma sejtvonalat, amely megőrizte az enterocyták differenciálódott, polarizált sajátságait, és forradalmasította az abszorpció *in vitro* predikcióját. A molekulák toxicitásának (Tox) *in vitro* vizsgálata szintén sokat fejlődött. Bár a toxicitásból fakadó lemorzsolódás növekedni látszik, ez valószínűleg a kifinomultabb toxicitás vizsgálatok, a szigorodó biztonsági előírások, és talán az *in vitro* ADME és hatékonysági vizsgálatok még gyorsabb fejlődése miatt van így (1. ábra).



1. ábra A gyógyszerfejlesztés késői fázisaiban bekövetkező lemorzsolódás okai

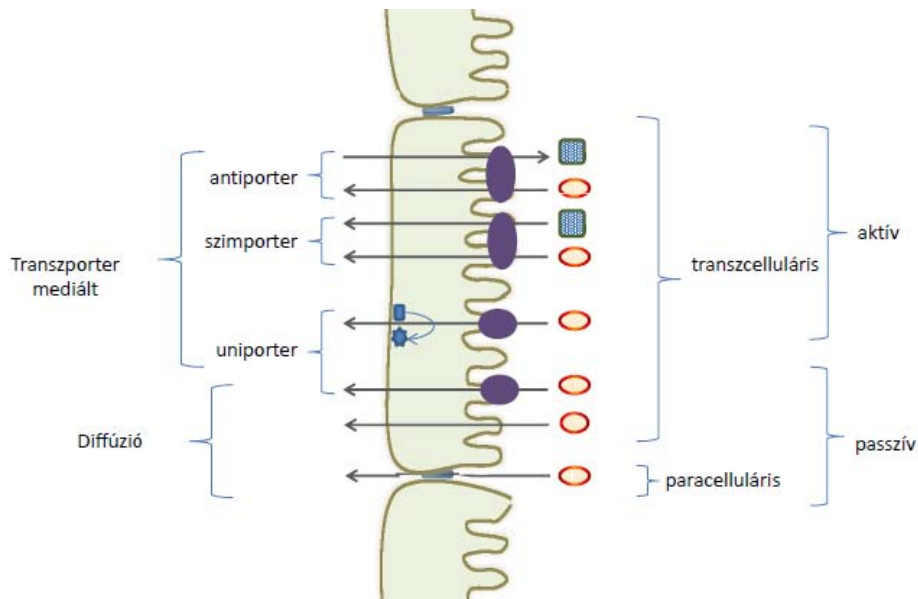
A növényi hatóanyagok, és bizonyos környezeti szennyezők a gyógyszerekkel részben átfedő kémiai teret foglalnak el (Eberhardt 2011). Bár jelentős időbeli lemaradással, de ezeknek az anyagoknak a tesztelése is követi a gyógyszerkutatásban megfigyelhető trendeket úgy az *in vitro* mint az *in silico*

megközelítésekben. Jól kifejezi az átfedéseket, hogy a gyógyszer – étel kölcsönhatások az ADME területén már a jogi szabályozás szintjén is megjelennek.

## **2.2 Biológiai membránok – passzív permeabilitás és transzport folyamatok**

Az ADME szempontból legfontosabb sejtek a polarizált epithel és endothel sejtípusok. Az endobiotikumok és xenobiotikumok ezen sejtrétegeken való átjutása lehet paracelluláris vagy transzcelluláris. A paracelluláris útvonal szoros kapcsolatokkal rendelkező sejtek esetében kisméretű molekulák számára áll rendelkezésre. Enterocyták esetében a 200-250 Da moltömeg a felső határ.

A transzcelluláris transzport kismolekulák esetében lehet passzív és aktív (2. ábra). A passzív transzport kétféle mechanizmus szerint valósulhat meg. A transzporter-mediált transzport a facilitált diffúzió, míg a nem fehérje mediált transzport a passzív diffúzió. A passzív diffúziót a gyógyszerkutatók általában passzív permeabilitásnak nevezik, ezért én ezt a kifejezést használom. A passzív transzport folyamatok a koncentrációgradiens mentén, a nagyobb koncentrációjú helyről a kisebb koncentrációjú hely felé történnek. Az aktív transzport folyamatok hajtóereje az ATP hidrolízis, amely lehetővé teszi a koncentráció gradienssel szembeni transzportot is. Amennyiben a transzporter maga rendelkezik ATPáz aktivitással, elsődleges aktív transzportról beszélünk. Ha az ATP hidrolízis a transzporttal funkcionálisan kapcsolt, de egy másik fehérje által mediált folyamatban történik, akkor másodlagos aktív transzportról beszélünk. A nemzetközi irodalomban több példa van arra, hogy azt a transzportot, ahol az ATP-áz és a primer transzport folyamat között egy további transzport folyamat létesít kapcsolatot, harmadlagos aktív transzportnak nevezik (Pritchard and Miller 1993; Shikano 2004; Baird 2009).



**2. ábra** Transzport mechanizmusok ■ = ATP, ★ = ADP + Pi

A gyógyszerkutatók egyik leggyakrabban vitatott kérdése a passzív permeabilitás és a transzporter-mediált folyamatok súlya a gyógyszermolekulák transzportjában (Dobson and Kell 2008; Dobson 2009; Sugano 2010). Hőmérséklet-függést mindkét folyamat mutat, és az aktiválási energia értékek néhány molekula esetében a passzív és aktív transzport folyamatokra hasonlóak lehetnek (Tanaka 1978; Lei 2000). Viszont –a klasszikus elmélet szerint– a transzporter-mediált folyamatok telíthetők, gátolhatók, sztereospecifikusak és sejtspecifikusak, szemben a passzív permeabilitással (Sugano 2010). Kell és munkatársai szerint azonban a passzív permeabilitásnak tekintett folyamatok legtöbbszörre nincs kellő bizonyíték. Még a neutrális molekulák esetében is feltételezhető, hogy a lineáris koncentrációfüggés több transzport fehérje hozzájárulásának az eredménye, míg molekulaszéleségtől adódó specifitás hiánya a transzporterek széles és átfedő szubsztrátspecifitásából eredeztethető (Dobson and Kell 2008). A szerzők rámutattak arra, hogy a molekulák szélesebb csoportjának a Caco-2 polarizált coloncarcinoma sejtvonalon és a passzív permeabilitást meghatározó PAMPA rendszerben mért permeabilitás értékei nagyon különböznek még a magas passzív permeabilitású molekulákra is (Dobson and Kell 2008). Elméletüket azzal is alátámasztják, hogy a sejtmembránok fehérjetartalma magas (30-70%), és ezek egy részét az emberi genomban kódolt közel 1000 transzporter adja ki. Utóbbi szerzők kivételként említik az altatókat, ahol a hatékonyság és a szerkezet között nincsenek összefüggések, viszont a hatékonyság

és a lipofilitás között igen. Mindez a szerzők szerint is arra mutat, hogy a hatékonyság ezen molekulák biológiai membránokban való, a megoszlási hányados által definiált felhalmozódásával arányos (Seeman 1972; Dobson and Kell 2008).

Ez a kérdés messze túlmutat egy elméleti vitán. Ha a passzív permeabilitás a transzport meghatározó eleme, akkor fizikokémiai jellemzők optimalizálásával javíthatók a molekulák permeabilitása (Fujikawa 2005; Vastag and Keseru 2009; Muehlbacher 2011; Borbely 2012). A magas passzív permeabilitású, lipofil anyagok fejlesztése dominálja ma a gyógyszerkutatókat. A jelenleg fejlesztés alatt álló molekulák mintegy 70%-a a Biomolekula Klasszifikációs Rendszer (Biopharmaceutics Classification System (BCS)) II osztályába, a magas permeabilitással és alacsony oldhatósággal jellemzett csoportba sorolható (Haus 2007). Jelentős erőfeszítések történtek a transzporter-mediált gyógyszer transzport *in silico* előrejelzésére is (Chang 2006). Az egér ABCB1 transzporter kristályosítása és térszerkezetének meghatározása (Aller 2009) új lendületet adott az *in silico* próbálkozásoknak (Bikadi 2011). A transzporter kölcsönhatásokra való optimalizálás számos lehetőséget is kínál. A abszorpció javítását lehet elérni olyan prodrug alkalmazásával, melyek az enterocyták apikális influx transzportereinek szubsztrátjai (Varma 2010). További transzporter-mediált célzott szöveti felvételre példák a HMG-CoA-reduktáz inhibitor statinok, melyek a hepatocyták influx transzporterein keresztül kerülnek a célsejtekbe. Ennek a transzporter-mediált szöveti célbajuttatásnak további előnye, hogy csökken a toxicitás és a káros mellékhatások esélye. De a transzporter kölcsönhatások kihasználásának ragyogó példája a hisztamin H<sub>2</sub> antagonisták esete, ahol a második- és harmadik-generációs molekulák ABCB1 szubsztrátok. Az ABCB1 magasan expresszálódik a vér-agy gát apikális/lumenális membránjában megakadályozva a szubsztrát hisztamin H<sub>2</sub> antagonisták agyba való bejutását és nem kívánt idegrendszeri mellékhatásait (Mahar Doan 2004).

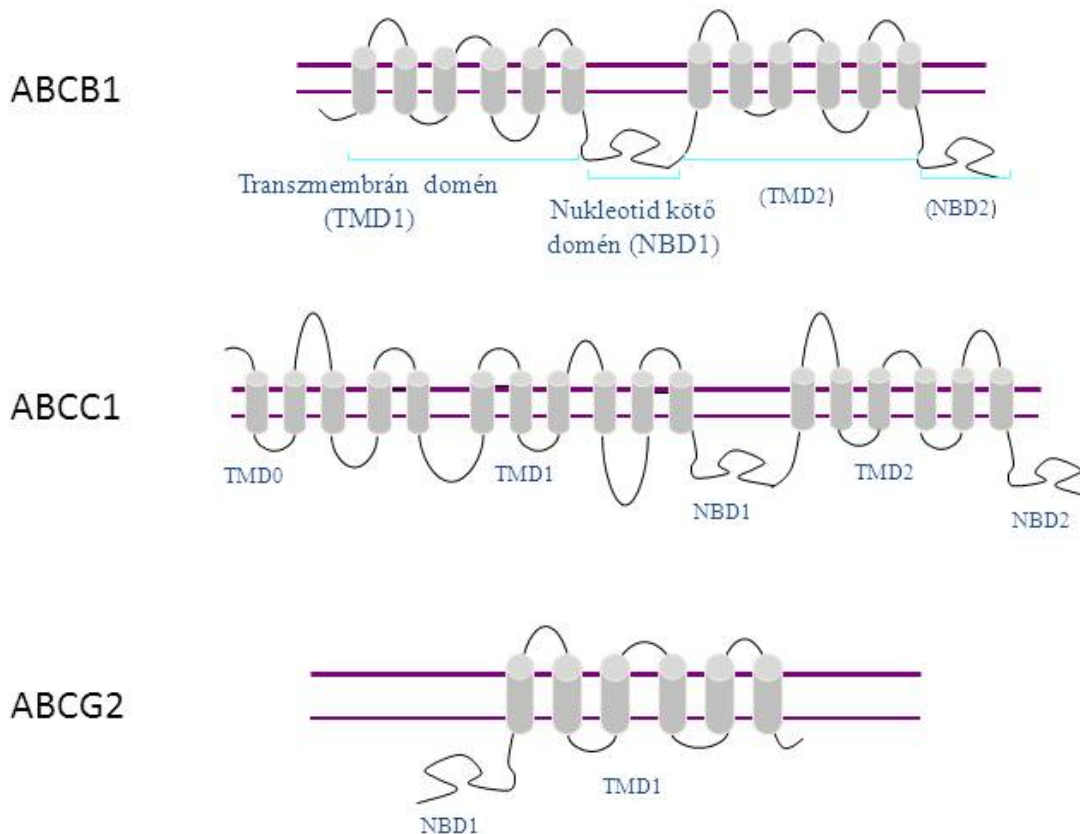
A fentieket összegezve a molekulák legnagyobb részénél, a közepes passzív permeabilitásúakat is ide értve, a transzporter-mediált membrán permeáció valószínűleg jelentős. Ezt egy közelmúltbeli tanulmány is megerősíti 16 diverz szerkezetű gyógyszer hepatocytákba történő felvételének vizsgálatával (Yabe 2011).

### 2.3 Humán efflux transzporterek szerkezete, nomenklatúrája és működése

Az eukariota sejtekben az efflux transzporterek a szubsztrátok citoplazmából történő eltávolítását végzik (Dean 2001). A legtöbb efflux funkciót ellátó transzporter az ABC szuperfamilia tagja. A 49 ismert humán ABC transzportert 7 alcsaládba (ABCA-G) sorolják (<http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>). A transzporterek nomenklatúrájában a szisztematikus angol elnevezést használom. A szisztematikus név mellett a régebben felfedezett transzportereknek egy hagyományos elnevezése is létezik, amit – különösen a gyógyszeriparban - továbbra is használnak. Ezek a nevek is előfordulnak a disszertációban publikált ábrákban, valamint reagens elnevezésekben.

Az ABC transzporterek szerkezetének legfontosabb elemei a ABC (ATP Binding Cassette) modul(ok), amely(ek) magukban foglalják az NBD (Nucleotide Binding Domain) domén(ek)t és a TMD (Transmembrane Domain) domén(ek). Az NBD domének elemei az egymástól 90-120 aminosav távolságra lévő Walker A és Walker B motívumok, valamint a Walker B motívum előtt elhelyezkedő signature (C) motívum. Míg a Walker A és B motívumok minden humán ATP-kötő fehérjében megtalálhatók, addig a signature motívum kizárólag erre a szuperfamilia tagjára jellemző. Az NBD domének részei az D, H, Q és a nemrég felfedezett A hurkok (Sauna and Ambudkar 2007). A transzmembrán domének a membránokat átszelő hélixekből és az azokat összekötő hurkokból állnak. A struktúra alapján fél és teljes transzportereket különböztethetünk meg. A teljes transzporterek két NBD doménből és általában két hozzájuk kapcsolódó, egyenként 6 transzmembrán hélixből álló transzmembrán doménből állnak. Az ABCC család néhány tagja (ABCC1,2,3,6,8,9) egy további, N-terminális transzmembrán domént is tartalmaz. A fél transzporterek egy NBD domént és egy transzmembrán domént tartalmaznak. Ezen belül az ABCG alcsaládban az ABC transzporterek között egyedülálló módon az NBD domén a transzmembrán doménhez képest N-terminálisan helyezkedik el (Deeley 2006). A xenobiotikumok transzportjában résztvevő ABC transzporterek jellemző doménszerkezetét a 3. ábra jeleníti meg. Általánosan elfogadott, hogy a féltranszporterek oligomer struktúrában funkcióképesek, tehát minimum 2 transzmembrán domén kell a transzport kompetenciához.

dc\_350\_11



**3. ábra** A xenobiotikumok transzportjában részt vevő ABC transzporterek tipikus doménstruktúrája

Az NBD domének az enzimatikus aktivitásért felelősek és az itt bekövetkező mutációk sokszor a fehérje funkcióvesztését okozzák. A transzmembrán domének a szubsztrát kötésért felelősek, és az itt bekövetkező aminosavcserék a fehérjék szubsztrát-specifitását változtathatják meg (Dean and Allikmets 2001).

A géneket a génstruktúra (fél illetve teljes transzporter), a domének sorrendje és az NBD és transzmembrán domének szekvenciája alapján soroljuk a különböző alcsoportokba (Dean 2001). Az ABCA, ABCB, ABCC és ABCG alcsoportok diverz funkciójú tagokból állnak, melyek a leggyakrabban a plazma membránban találhatóak. Az ABCD alcsoport a peroxisómákban található féltranszportereket tartalmaz, melyek funkciója a nagyon hosszú szénláncú zsírsavak transzportja. Az ABCE és ABCF alcsoport tagjai nem tartalmaznak transzmembrán doméneket és eddigi ismereteink szerint membrán transzport folyamatokban nem vesznek részt. Az ABCB1, ABCC1 és ABCG2 fehérjék kapcsolatba hozhatók a klinikai multidrog

rezisztencia (Multidrug Resistance (MDR)) jelenségével, ezért ezeket a transzportereket MDR-ABC transzportereknek is nevezik. Az egyes transzporterek nevét az alcsalád nevéből képzik egy a transzportert definiáló szám hozzáadásával.

A transzporterek pontos struktúrájának és működésének megértéséhez nagyban hozzájárult az egér ABCB1 fehérje kristályosítása és szerkezetének röntgendiffrakciós meghatározása (Aller 2009). Az Apo fehérje és az inhibitorokkal komplexált fehérje nagy szubsztrátkötő helyet tartalmaz, amely nyitott a citoplazma és a membrán citoplazmás lemeze felé. Az NBD domének szeparáltak, egymástól mintegy 30 angström távolságban találhatók. Ez az elrendezés az ún. „open inward” formára jellemző. A szubsztrát kötőhely elsősorban hidrofób és aromás oldalláncú aminosavakat tartalmaz, bár a szerkezeten alapuló további modellek negatív töltésű oldalláncokat is definiálnak (Ravna 2009). A szubsztrátkötés elsősorban az indukált illeszkedés (induced fit) mechanizmusnak felel meg.

A jelen értekezésben az ABCB1 fehérje mellett másik, központi helyet elfoglaló ABC transzporternek, az ABCG2-nek több homológia modellje készült (Li 2007), jelentős részben magyar kutatók műhelyében (Hazai and Bikadi 2008; Ni 2010; Rosenberg 2010; Ni 2011). A Hazai és munkatársai által készített tanulmány szerint, amely a transzporter dimer extracelluláris tér felé nyitott szerkezetét reprezentálja, az egyik alegység 1 és 2-es transzmembrán hélixe (H1, H2) és a másik alegység 5 és 6-os transzmembrán hélixe (H5, H6) alkotják a szubsztrátkötő helyet. A dokkolási kísérletek három régiót állapítottak meg, melyek affinitása más a különböző szubsztrátokhoz. A rhodamine 123-t kötő régió, egy a citoplazmához közelebbi felszínen található. A másik régióba dokkolt a daunomycin mellett a doxorubicin és a Hoechst33342. A porfirin a prazosinnal azonos régióhoz kötődött. Ez a profil összhangban van kísérleti adatokkal, mégha azok a fehérje R482G mutánsával készültek is (Clark 2006), míg a modell a vad típusú fehérjére készült. A mutáció érinti a szubsztrátspecifitást (Honjo 2001; Ozvegy-Laczka 2005), bár az adatok sokszor nem egyértelműek. Az alkalmazott gyógyszerek közül a daunomycin és a doxorubicin esetében is egyaránt vannak az ABCG2-mediált transzportot elvető (Honjo 2001; Robey 2003) és támogató (Tamura 2007; Calcagno 2008; Schneiderman 2010) adatok. A modell jelentős előrelépés volt, és ezt követően kidolgozásra került a fehérje 2D kristályszerkezetén alapuló modell is. Ez a citoplazma felé nyitott és zárt szerkezet, ami az üres és a szubsztrát-kötött



konformációt reprezentálja (Rosenberg 2010). Az ezen szerkezet felhasználásával készült mutáció analízis az 1-es és 6-os hélixekben található poláros aminosavak jelentőségét igazolja a hélix interakcióban és a szubsztrát felismerésben (Ni 2010). A 3-as hélix 482-es pozíciójában lévő arginin (Honjo 2001; Miwa 2003; Ozvegy-Laczka 2005) valamint a 2-es hélixben lévő K452, K453, R465 és H457 aminosav oldalláncok (Cai 2010) mutációja mind hatással volt a fehérje aktivitására. Az utóbbi tanulmány során végzett modellezési és dokkolási kísérletek szerint az R465 és a H457-es aminosavak a szubsztrát kötésben közvetlenül is részt vehetnek. Összességében biztosnak vehető a pozitív töltésű oldalláncok fontossága a szubsztrát kötésben és transzportban. A legújabb tanulmány a 392-es és 485-ös prolin oldalláncok szubsztrátkötésben való részvételét igazolja (Ni 2011). A homológia modell alapján a P485-nek szerepe lehet a fehérje konformációs flexibilitásában, míg a P392 a TMD és az NBD közötti kommunikációt biztosíthatja.

Az ABCC fehérjék többségére készült teljes vagy részleges homológia modell (Campbell 2004; Williamson 2007; Ravna 2009). Általában elmondható, hogy a feltételezett szubsztrátkötő helyek a transzmembrán régióban, illetve a membránnal szomszédos citoplazma régióban található. Pozitív töltésű vagy hidrofil, illetve apoláros aminosav oldalláncok is részt vesznek a szubsztrát kötésben és transzportban. Érdekes módon a szintén elsősorban anion transzporter ABCC4 fehérje homológia modelljének szubsztrátkötő zsebe a pozitív töltésű régiók mellett kisebb negatív töltésű foltokat is tartalmaz (Ravna 2009). Fotoaffinitás jelöléssel (Deeley 2006) valamint mutagenézissel (Zhang 2006) elsősorban az ABCC1 (Deeley 2006; He 2011), az ABCC2 (Hirouchi 2004; Hulot 2005; Letourneau 2007), és az ABCC4 fehérjék (El-Sheikh 2008) szubsztrátkötésben részt vevő aminosav oldalláncait azonosították. Általánosságban elmondható, hogy egy adott oldallánc hatása szubsztrát-függő. Ez is igazolja több különböző vagy egy nagyobb szubsztrátkötő hely létezését.

Kísérleti munkánkban szintén hangsúlyos szerepet kapó, a konjugált epesók canaliculáris transzportját végző ABCB11 fehérje szerkezete kevésbé ismert. Jelenlegi tudásunk szerint klasszikus egész transzporter. Sem röntgenkristallográfiás, sem homológia modellezésen alapuló szerkezete nem került leírásra. Mivel kevés ismert gyógyszer szubsztrátja van, így a kötőhely szerkezetéről farmakofór modell sem készült. A szubsztrát transzportban résztvevő hélixek és

aminosavak azonosítását az segíti, hogy az ABCB11 mutánsait és polimorf változatainak jelentős részét hordozó emberekben epepangás (cholestasis) alakul ki. Ez annak a következménye, hogy az ABCB11 fehérje funkcióvesztése a szubsztrát epesók epébe történő kiválasztódásának csökkenésével jár. A nem-szinonim mutációk és illetve polimorfizmusok nagyobb része a fehérje stabilitásának, illetve plazma membránba történő transzportjának csökkenéséhez vezet, így szerkezet – hatás összefüggések megtételére nem alkalmasak. Van azonban néhány olyan SNP, amely a fehérje stabilitását és transzportját nem befolyásolja jelentékenyen, mégis funkcióvesztéssel jár. Ezen módosulatok közül a D482G az 1-es nukleotidkötő doménben található, az E297G egy intracelluláris hurokban, míg az R1050C a 2-es nukleotidkötő domén membrán horgonyában. Mivel az ezekkel a módosulatokkal kapott adatok fajfüggőek, részvételük a szubsztrát kötésben/transzportban kérdéses (Kagawa 2008; Stieger 2011). A legtöbb lehetőség az inhibitor kötőhely(ek) szerkezetének meghatározására nyílik az ismert inhibitorok nagy száma miatt (Saito 2009).

Az NBD domén funkció és a transzport kapcsolódására több modell is létezik. Ezek a modellek tartalmazzák a következő lépéseket: 1., transzport iniciálás az ATP és/vagy szubsztrát kötődésével, 2., az ATP kötődés és/vagy hidrolízis hatására konformációs változás az NBD doménben, 3., az NBD domén és a transzmembrán domének kapcsolódásán keresztül konformáció változás közvetítése a szubsztrátkötő helyre és ott a nagy-affinitású konformáció – kis-affinitású konformáció váltás megtörténte és a szubsztrát disszociációja, 4. a szubsztrát és ATP kötésre kompetens konformáció visszaállítása (Sauna and Ambudkar 2007). Az ATP hidrolízis és transzport pontos sztöchiometriájára sok adat látott napvilágot az 1-50 mol ATP hidrolízis / mol transzportált szubsztrát tartományban (Shapiro and Ling 1998; Sauna and Ambudkar 2007).

Az ABC transzporterek jelentős részének széles a szubsztrátspecifitása. A xenobiotikumok mellett a legtöbb transzporternek ismertek fiziológiás szubsztrátjai is. Elmondható, hogy a kritikus élettani funkciókat ellátó transzporterek (pld. epesó transzporterek) szubsztrátspecifitása szűkebb, míg az elsősorban védelmi funkciót ellátó transzportereké (pl. ABCB1, ABCG2) szélesebb. A disszertációban szereplő, xenobiotikumok és endobiotikumok transzportjában legjelentősebb szerepet játszó ABC transzporterek legfontosabb funkcionális jellemzőit az 1. táblázat tartalmazza. A

transzporterek szervezeten belüli lokalizációját a 2.5 és xenobiotikumok ADMETox sajátosságaira kifejtett hatását a 2.7 fejezet taglalja.

**1. táblázat** A disszertációban szereplő, xenobiotikumok és endobiotikumok transzportjában legjelentősebb szerepet játszó ABC transzporterek legfontosabb funkcionális jellemzői

Transzporter	Domén szerkezet	Sövetspecifititás / lokalizáció	Endobiotikum szubsztrátok	Xenobiotikum szubsztrátok	Kapcsolódó öröklődő betegség/hajlam
ABCB1/ P-gp / MDR1	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2	enterocyt / apikális, hepatocyt / apikális, vese PT epithel / apikális, endothel / apikális, ependyma / apikális, őssejt	szterolok, szteroid hormonok, peptidek	pozitív töltésű, apoláros, amfipatikus molekulák	
ABCB11 / BSEP	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2	hepatocyt / apikális	epesók	pravastatin, bosentan, darusentan	II-es típusú progresszív familiális cholestais (PFICII); II-es típusú benignus recurrens cholestais (BRICII)
ABCC1/ MRP1	TMD0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2	enterocyt / basolaterális, vese PT epithel / basolaterális, endothel / ?, ependyma / basolaterális	szteroid-konjugátumok, leukotriénC4 (LTC4), redukált glutation (GSH), oxidált glutation (GSSG)	HIV proteáz inhibitorok, antracyclinek, epipodofilotoxinok, vinca alkaloidok, folátok	
ABCC2 / MRP2	TMD0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2	enterocyt / apikális, hepatocyt / apikális, vese PT epithel / apikális, endothel / apikális	bilirubin-glükuronidok, szteroid-konjugátumok, szulfatált epesók, leukotrién-C4, GSH, GSSG	HIV proteáz inhibitorok, antraciklinek, epipodofilotoxinok, vinca alkaloidok, ciszplatín, folátok, arzénátok, antimonátok	Dubin-Johnson szindróma (konjugált-hiperbilirubinémia)
ABCC3 / MRP3	TMD0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2	enterocyt / basolaterális, hepatocyt / basolaterális, vese PT epithel / basolaterális	bilirubin-glükuronidok, epesók, szulfatált epesók, epesavak, szteroid-konjugátumok, LTC4	epipodofilotoxinok, vinca alkaloidok, methotrexát	
ABCC4 / MRP4	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2	enterocyt / apikális(?) hepatocyt / basolaterális, vese PT epithel / apikális, endothel / apikális, ependyma / apikális	ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP), ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP), kolát, prosztoglandinok, szteroid konjugátumok,	cefalosporinok, furosemid, hydrochlorothiazid, methotrexát, topotecan	
ABCG2 / BCRP / MXR	NBD1-TMD1	enterocyt / apikális, hepatocyt / apikális, vese PT epithel / apikális, endothel / apikális, ependyma / apikális, őssejt	szteroid-konjugátumok, epesók, szulfatált epesók, protoporphyrinek, hem, GSH, urát	negatív és pozitív töltésű molekulák, amfipatikus vegyületek, konjugátumok	hiperurikémia

P-gp: Permeability glycoprotein (permeabilitás glikoprotein); MDR1: Multidrug Resistance Protein 1 (multidrog rezisztencia protein 1); BSEP: Bile Salt Export Pump (epesó export pumpa); MRP1: Multidrug Resistance Associated protein 1); BCRP: Breast Cancer Resistance Protein (emlőtumor rezisztencia fehérje); MXR: Mitoxantrone Resistance protein (mitoxantron rezisztencia fehérje)

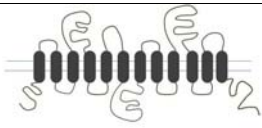

## 2.4 Humán influx transzporterek szerkezete, nomenklatúrája és működése

Emberben a „Solute Carriers” (SLC; oldott anyag transzporterek / influx transzporterek) szupercsalád tagjai alkotják a transzporterek legnagyobb csoportját. Az ADMETox vizsgálatokban elsősorban azok az SLC transzporterek szerepelnek, melyek a gyógyszermolekulák sejtekbe történő felvételét végzik, ezért dolgozatomban a nemzetközi szaknyelvben is elfogadott influx transzporter kifejezést használom.

A transzporterek nomenklatúrájában a szisztematikus angol elnevezést használom. A szisztematikus név mellett a régebben felfedezett transzportereknek egy hagyományos elnevezése is létezik, amit – különösen a gyógyszeriparban - továbbra is használnak. Ezek a nevek is előfordulnak a disszertációban publikált ábrákban, valamint reagens elnevezésekben.

Az influx transzporterek pontos számáról és evolúciós rokonságukról eltérő adatok láttak napvilágot (Fredriksson 2008; He 2009). Két folyamatosan frissített adatbázis (<http://www.bioparadigms.org/slc/menu.asp> ; <http://www.genenames.org/genefamilies/SLC>) 51 családot listáz. Bár különbség itt is található, a xenobiotikumok transzportjában résztvevő legfontosabb családokban konszenzus van a különböző adatbázisokban. A kísérletes munkában érintett, xenobiotikumok transzportjában résztvevő jelentősebb influx transzporterek legfontosabb jellemzőit a 2. táblázat tartalmazza.

**2. táblázat** A kísérletes munkában érintett, xenobiotikumok transzportjában résztvevő legfontosabb influx transzporterek legfontosabb jellemzői

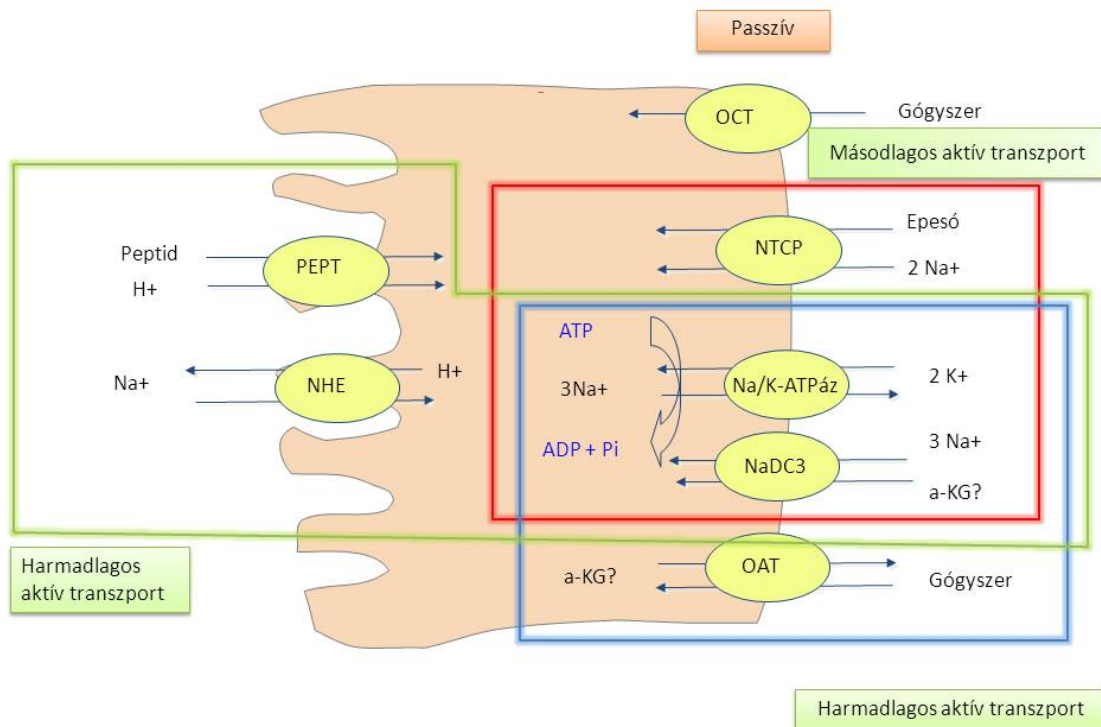
Transzporter	Topológia	Szövetspecifititás és lokalizáció	Endobiotikum szubsztrátok	Xenobiotikum szubsztrátok	Kapcsolódó öröklődő betegség / hajlam
SLCO1B1 / OATP1B1 / OATP-C		hepatocytá / basolaterális	dehidroepiandroszteron-3-szulfát (DHEAS), konjugált bilirubin, ösztromon 3-szulfát (E3S), ösztrodial-17-glükuronid (E2-17βG), taurokolát, thyroxin, trijodothyronin	benzylpenicillin, bosentan, bromoszulfoftalein, methotrexat (MTX), statinok	Rotor szindróma (konjugált hiperbilirubinémia) az SLCO1B1 és SLCO1B3 kombinált defektusa esetén
SLCO1B3 / OATP1B3 / OATP8		hepatocytá / basolaterális	GSH, konjugált bilirubin, E3S, E2-17βG, thyroxin, trijodothyronin	bromoszulfoftalein, digoxin, docetaxel, fexofenadin, MTX, paclitaxel, statinok	Rotor szindróma (konjugált hiperbilirubinémia) az SLCO1B1 és SLCO1B3 kombinált defektusa esetén
SLCO2B1 / OATP2B1 / OATP-B		hepatocytá / basolaterális, kapilláris endothel, kisartériák, vénák, ciliáris test epithel, enterocyták / apikális	Prostaglandin E2 (PGE2), ösztromon-3-szulfát, DHEAS	benzylpenicillin, bosentan, bromoszulfoftalein, fexofenadin, glibenclamid, statinok	
SLC22A6 / OAT1		vese proximális tubulus (PT) epithel / basolaterális	cAMP és cGMP, indoxyl szulfát, ketoglutarát, PGE2 és PGF2, urát	acetylsalicilat, p-aminohippurat, cephaloridin, cimetidin, edaravon szulfát, furosemid, indomethacin, MTX, nucleosid/nucleotid analógok, ochratoxin A, penicillin G, tetracyclin	
SLC22A7 / OAT2		hepatocytá / basolaterális, vesé(PT) epithel / basolaterális	PGF2α	MTX, zidovudin	
SLC22A8 / OAT3		vese PT epithel, kapilláris endothel / basolaterális	DHEAS, epesók glutarát, glutation, indoxyl szulfát, karnitin, ösztromon-3-szulfát, PGE2 és PGF2, urát	allopurinol, p-aminohippurat (PAH), bázis analógok, benzylpenicillin, cephalosporinok, cimetidine, cortisol, edaravon szulfát, famotidine, 5-fluorouracil, MTX, 6-mercaptopurin, nucleozid analógok, ochratoxin A, statinok, tetracyclin	
SLC22A11 / OAT4		vese PT epithel / apikális, syncytiotrophoblast / basolaterális	α-keto-glutarát, ösztromon-3-szulfát, DHEAS, urát, PGE2, PGF2α	bumetanide, hydrochlorothiazid, torasemid, tetraciklin, zidovudin, MTX	

OAT: Organic Anion Transporter (szerves anion transzporter); OATP: Organic Anion Transporting Polypeptide (szerves anion transzpotálól polipeptid); SLC: Solute Carrier (oldott anyag transzporter azonos az influx transzporterrel); SLCO: Solute Carrier OATP (oldott anyag transzporter OATP)

A gyógyszerek, növényi hatóanyagok és környezetszennyező anyagok transzportjában résztvevő legfontosabb fehérjék az SLC10, SLC15, SLC16, SLCO, SLC22, SLC28, SLC29, SLC47 családokba tartoznak. A jelen disszertáció tárgyát képező, az SLCO és SLC22 családokba tartozó transzporterekre 12 transzmembrán hélixet jósolnak a modellek (Fredriksson 2008). A fehérjék pontos topológiája és az azon alapuló működési mechanizmusok a röntgenkristallográfiás szerkezetmeghatározás segítségével lesznek hozzáférhetőek. Kristályszerkezeti adatok hiányában a homológia modellezéssel kapcsolt helyspecifikus mutagenesiszolgáltatta a legtöbb hiteles információt. A human SLC22A6 fehérje modelljét egy másik, a Major Facilitator szupercsaládba tartozó fehérje, az *Escherichia coli* glicerín-3-foszfát transzporter (glycerol-3-phosphate transporter (GlpT)) alapján készítették el (Perry 2006). A tanulmány azt találta, hogy az 5, 7, 8, 10 és 11-es hélixek fognak közre egy elektronegatív aktív helyet, ami a citoplazma felé nyitott. A mutagenesisvizsgálatok az 5-ös számú hélixben a Y230, míg a 10-es számú hélixben a K431 és F438 aminosavak szerepét igazolták. Az SLC22A6 egy anion „exchanger”, és általánosan elfogadott az az elmélet, hogy az influxra kerülő anionnal szemben alfa-keto-glutarát effluxálódik. Rizwan és munkatársai (Rizwan 2007) egy elegáns tanulmányban megmutatták, hogy a glutamát kötésben nélkülözhetetlen a 11-es hélixben található R466. Az SLC22A8 fehérjében intracellulárisan a 6-os és 7-es hélixek közötti hurokban található két a transzportban szerepet játszó aminosav (R277, F305) (Erdman 2006). Egy részletes mutagenesis tanulmány az extracelluláris régióban (R57, K361), a 11-es transzmembrán hélixben (R580) és intracelluláris doménekben (K90, H92, R93) is talált a szubsztrát transzportban szerepet játszó aminosav oldalláncokat (Weaver and Hagenbuch 2010). Külön érdekessége a tanulmánynak, hogy az extracelluláris aminosavak mutációja a  $K_m$  értékeket, tehát a szubsztrát kötését határozták meg, addig a citoplazmás oldalláncok a maximális transzport sebességre ( $V_{max}$ ) voltak hatással. A transzmembrán oldallánc mindkét kinetikai paraméterre hatással volt. A homológ SLCO1B3 fehérjében talált, transzportban szerepet játszó aminosav oldalláncok esetében ezt a szereposztást a vizsgálatok nem tudták igazolni (Gui and Hagenbuch 2008; Glaeser 2010). Az viszont elmondható, hogy az anion transzporterek 5-ös, 10-es és 11-es számú transzmembrán hélicei képezik a szubsztrát transzlokációt szolgáló csatornát. Továbbá az azonosított aminosavak között sok bázikus található az extracelluláris, transzmembrán és intracelluláris doménekben is. Emellett számos poláros, de

elsősorban nagyméretű apoláros aminosavak transzportban való részvétele volt megfigyelhető. Mindez korrelációban van az SLCO1B1 fehérjére készült farmakofór modellel, ami szerint szubsztrátkötő helye legalább két hidrogén-kötés akceptort és egy nagy hidrofób felszín tartalmaz (Chang 2005). Az SLCO2B1 fehérjére vonatkozóan nincs adat, azon túlmenően, hogy egy predikció szerint az SLCO2-es családban 579-es pozícióban lévő histidin része a szubsztrátkötő helynek (Meier-Abt 2005), és az extracellulárisan található S486 aminosav oldallánc (Nozawa 2002) a transzport  $V_{max}$  értékre volt hatással.

Az SLC fehérjék által mediált transzportfolyamatok mechanizmusa sokféle (Kusuhara and Sugiyama 2009). Passzív (SLC22A1/OCT1; SLC22A2/OCT2; SLC29A1-4), és másodlagosan aktív (SLC10A1-2; SLC28A1-3) illetve harmadlagosan aktív (SLC15A1-2; SLC22A6,8) transzporterek is találhatók közöttük. A disszertáció kísérletes részében érintett SLCO transzporterek transzport mechanizmusáról keveset tudunk. Felmerült, hogy az influx hidrokarbonát (Satlin 1997) illetve glutation (Li 2000) anionok effluxával jár együtt. Az utóbbi mechanizmus azonban a közelmúltban elvetésre került (Mahagita 2007). A transzportfolyamatok és transzporterek legfontosabb sajátosságai fel vannak tüntetve a 4. ábrán.



**4. ábra** Az SLC transzporterek transzport mechanizmusai. NaDC3: sodium-dependent high affinity dicarboxylate transporter (nátrium-függő dikarboxylát transzporter), NHE: sodium-proton exchanger (nátrium-proton „exchanger”), Na/K ATPáz: nátrium-kálium ATPáz ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPáz), OCT: Organic Cation Transporter (szerves kation transzporter), PEPT: Peptide Transporter (peptid transzporter)

## 2.5 Efflux és influx transzporterek a farmakológiai szempontból jelentős fiziológiai membránokban

A xenobiotikumok abszorpciójának legfontosabb portálja a gasztrointesztinális traktus. Ezért az egyik legfontosabb barriert az enterocyták jelentik. Az itt felszívódott anyagok/molekulák a portális keringéssel a májba kerülnek. Függetlenül a máj, az adott molekulára jellemző extrakciós hányadosától a molekulák a hepatocytába kerülnek, ahol metabolizálódhatnak és/vagy kiválasztódnak az epébe. A metabolitok útja nem egyértelműen a biliáris kiválasztódás. Jelentős mennyiségű metabolit végül a



vesében választódik ki. A vesében a szekréció szempontjából legfontosabb sejttípust a proximális tubulusok (PT) epithel sejtjei alkotják. Kivételes helyet foglal el még a központi idegrendszert védő vér-agy gát (blood–brain barrier (BBB)), a neurotoxicitás kivételesen veszélyes jellege és következményei miatt. A vér-agy gátban a rendkívül szoros sejt - sejt közötti kapcsolatokkal és magas efflux transzporter aktivitással rendelkező endothel biztosítja a védelmet. A farmakológiai szempontokból legfontosabb barrier sejttípusok tehát: enterocyták, hepatocyták, PT epithel és BBB endothel.

A négy barrier a transzport folyamatok szemszögéből funkcionálisan különböző feladatokat lát el. Az enterocyták szerepe a abszorpcióban vagy annak korlátozásában van. De szerepet játszhatnak bizonyos xenobiotikumok esetében az exkrécióban is (Westphal 2000). A hepatocyták szerepe elsősorban az exkrécióban van. Mivel sok gyógyszer molekuláris támadáspontja is a hepatocytákban található, így a hepatocyták a disztribúcióban is fontos szerepet játszanak. Ugyanez érvényes a PT epithelre is. Mivel a gyógyszer toxicitás két fontos fajtája a hepatotoxicitás és a nephrotoxicitás, így az ezen sejtekben való felhalmozódást meghatározó transzporterek toxikológiai jelentősége nagy. A BBB endothel egyértelműen az disztribúcióban, és elsősorban annak limitálásában játszik szerepet.

A négy barrierben expresszáldó és a xenobiotikumok és fiziológias szubsztrátok transzportjában szerepet játszó legfontosabb humán transzporterek az 5. ábrán vannak feltüntetve (Giacomini 2010). A gyógyszerkutatói szempontból legfontosabb transzportereket az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerhatósága (Food and Drug Administration (FDA)) szerzői által is jegyzett „white paper” (Giacomini 2010) valamint Európa megfelelő hatósága (European Medicines Agency (EMA) ajánlása (EMA-Guidance 2010) definiálta. Az FDA listán két efflux transzporter az ABCB1 és az ABCG2 szerepel az öt influx transzporter (SLCO1B1, SLCO1B3, SLC22A2, SLC22A6, SLC22A8) mellett. Az EMA listán két további transzporter (ABCB11, SLC22A1) lett megnevezve. Ez a transzporter választás utal az egyes barrierék legfontosabb funkciójára. Az enterocyták és a BBB endothel elsősorban védő funkciót lát el, ezért ott az ABCB1 és az ABCG2 fehérvérnek van kiemelt fontosságuk. A hepatocytáknak és a PT epithelnek a exkrécióban van fontos szerepe, ezért ott a exkrécióban sokszor sebességmeghatározó szerepet játszó specifikusan májban expresszáldó SLCO1B1, SLCO1B3 anion transzporterek,

valamint a vesében magasan expresszáldó kation (SLC22A2) és anion (SLC22A6, SLC22A8) transzporterek bírnak nagy jelentőséggel. Az EMA listán szereplő két extra transzporter „kakukktójás”. Az SLC22A1 a hepatocyták kation influx transzportere, melynek fontosságát a metformin hepatociták általi felvételében játszott szerepe jelzi állatkísérletben (Wang 2002) és klinikailag (Shu 2007) egyaránt. Az ABCB11 –ahogy korábban már tárgyalásra került- toxikológiai szempontból fontos (Kis 2011). A gyógyszerhatóságok egyértelműen egy kezelhető szinten szeretnék volna tartani a tesztelésre ajánlott transzporterek számát, ezért egyes barrierekből fontos transzporterek lemaradtak a listáról. Ilyen a enterocytákban a SLC15A1, ami nemcsak azért fontos, mert a peptidkötést tartalmazó molekulák (pl. béta-laktám antibiotikumok), peptidomimetikumok abszorpciójáért felelős, de fontos célpontja az alacsony permeabilitású gyógyszerek célzott felvételét hasznosító prophacon („prodrug”) stratégiának. Ezekben az esetekben a prophacon az enterocyták lumenális membránjában expresszáldó egyik influx transzporter (pld. SLC15A1) szubsztátja, növelve ezzel az abszorpciót. A farmakológiai aktív hatóanyag az enterocytákban, vérben illetve a szövetekben, elsősorban a májszövetben szabadul fel (Han and Amidon 2000; Varma 2010).

Az ABCC4 transzporter közel olyan fontos a BBB endothelben mint a szintén anion effluxban kiemelt szerepet játszó ABCG2 (Decleves 2011), míg a PT epithelben fontosabb is az ABCG2-nél (Hasegawa 2007; Mizuno 2007). Úgyszintén lemaradt a listáról az ABCC2, ami a hepatocitákban a fázis II xenobiotikum és endobiotikum (bilirubin) konjugátumok epébe történő ürítését végzi, így exkréciós és toxikológiai szempontból is igen fontos. A hepatocyták és PT epithel apikális membránjában kifejeződő SLC47A1 (Multidrug And Toxin Extrusion protein 1 (MATE1)) valamint a specifikusan a vesében expresszáldó SLC47A2 (MATE-2K) is legalább olyan fontos kation transzporternek tűnik a fenti membránokban, mint az ott szintén expresszáldó, kationokat is transzportáló ABCB1.



az állatkísérletekkel összehasonlítva jobban kontrollálhatóak (Glavinas 2008; Kis 2010).

### 2.6.1 *In vitro* módszerek

Az *in vitro* rendszerek két típusát különböztetjük meg: a vizsgálatok történhetnek primer vagy az adott transzportert stabilan esetleg tranziensen expresszáló sejtekkel, vagy pedig a kívánt transzporter fehérjét kifejező sejtekből készült membrán preparátumokon. Az utóbbi módszer elsősorban ABC transzporterek vizsgálatokor használatos. A módszer alapulhat az ATP hidrolízisének, vagy pedig a szubsztrát transzportjának a mérésén, ez esetben vizsgálhatjuk közvetlenül az adott molekula ABC fehérje általi transzportját vagy pedig egy jól ismert, ún. riporter szubsztrát transzportjára való hatását. Az előbbi módszer a gyógyszerjelölt és a transzporter közötti kölcsönhatás jellemzésére, az utóbbi pedig az inhibitor molekulák detektálására alkalmas. Az *in vitro* tesztek legfontosabb jellemzői a 3. táblázatban míg a működési elvet ábrázoló rajzok a 6. ábrán láthatók.

#### 2.6.1.1 Membrán vezikula alapú vizsgálatok

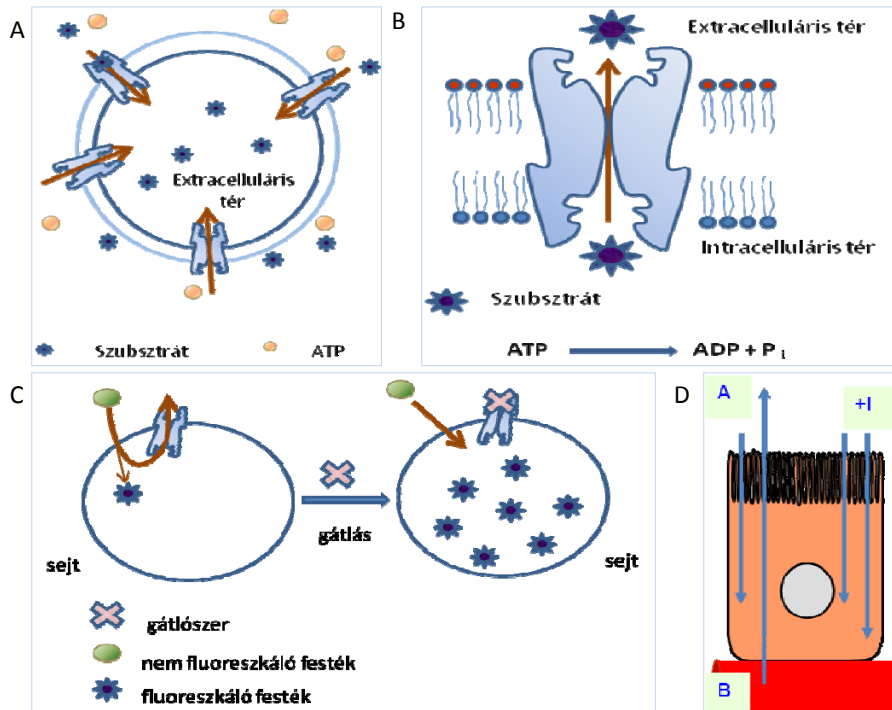
ABC transzporterek vizsgálatára alkalmas membrán preparátum készíthető olyan sejtekből, melyek elegendően magas szinten expresszálják a vizsgálni kívánt fehérjét. A különböző szelektált, vagy transzfektált emlős sejtek relatíve alacsony fehérje expressziós szintjük miatt sok esetben nem felelnek meg ennek a kívánalomnak, habár mindenképp előnyük, hogy az expresszált transzporter lipid környezete hasonlít a fiziológiához.

#### 2.6.1.2 Sejtes vizsgálatok

A sejtes vizsgálatok különféle sejttypusokon és különböző kultiválási körülmények között végezhető. Sok sejtes esszé elvégezhető szuszpenziós vagy egyszerű adherens kultúrákon, és nem szükséges polarizált sejtvonalak használata. Mivel a barriereket alkotó sejtek mind polarizáltak, a polarizált sejteken végzett transzcelluláris tesztek relevánsabbak. Az alacsony passzív permeabilitású molekulák ABC transzporterekkel történő kölcsönhatásának vizsgálatához az ABC transzportereket sokszor influx transzporterekkel együtt expresszáltatják.

## 3. táblázat Az in vitro esszék jellemzői

Módszer	Rendszer	Alkalmazás	Szolgáltatott adatok	Előnyök	Hátrányok	Referenciák
ATPáz esszé	membránok rovarsejtből, szelektált sejtvonalból	szubsztrát esszé, gátlás esszé ABC transzporterre	$V_{max}$ ; $EC_{50}/K_m$ ; $IC_{50}/K_i$	HT; nem kíván analitikát; az egyetlen szubsztrát esszé magas passzív permeabilitású anyagokra	az ATP hidrolízis sebessége nehezen korreláltható a transzporttal és a passzív permeabilitással	(Sarkadi 1992; Glavinas 2008)
Vezikuláris transzport (VT)	membránok rovarsejtből, transzfektált, szelektált sejtvonalból	szubsztrát esszé, gátlás esszé ABC transzporterre	$V_{max}$ ; $EC_{50}/K_m$ ; $IC_{50}/K_i$	alacsony passzív permeabilitású teszt anyagra ideális szubsztrát és gátlás tesztben	magas passzív permeabilitású szubsztrátra nem alkalmazható	(Glavinas 2008)
Influx esszé	primer, transzfektált, szelektált sejt	szubsztrát esszé, gátlás esszé influx transzporterre	$V_{max}$ ; $EC_{50}/K_m$ ; $IC_{50}/K_i$	Előnyösen alkalmazható közepes és alacsony passzív permeabilitású szubsztrátra	magas passzív permeabilitású szubsztrátra korlátozottan alkalmazható	(Xia 2007)
Efflux esszé	primer, transzfektált, szelektált sejt	szubsztrát esszé, gátlás esszé ABC transzporterre	$IC_{50}/K_i$	sejtes esszé ABC transzporterre	nehézségek, kinetikai paraméterek számítása nehezebb, mint a VT-ben	(Hazlehurst 1999)
Citotoxicitás esszé	primer, transzfektált, szelektált sejt	gyógyszerrezisztencia, kvalitatív szubsztrát, gátlás esszé	relatív rezisztencia, $IC_{50}/K_i$	ideális revertáló szerek (efflux transzporter inhibitorok) jellemzésére	kis áteresztőképességű; nehézkes kinetikai adatok kinyerésére	(Hazlehurst 1999; Kis 2009b)
Vektoriális transzport esszé	primer, egyszeres / többszörös transzfektált, szelektált sejt	szubsztrát esszé, gátlás esszé ABC és influx transzporterekre	$P_{app}$ , efflux arány (ER); $EC_{50}/K_m$ ; $IC_{50}/K_i$	könnyű korreláltatás a passzív permeabilitással; jól működik közepes passzív permeabilitású szubsztrátokra; gyógyszerhatóságok preferálják	nem alkalmas nagyon alacsony és nagyon magas passzív permeabilitású szubsztrátokra; kinetikai adatok extrakciója nem könnyű	(Neuhoff 2003; Neuhoff 2005; Xia 2005; Balimane 2008; von Richter 2009)
Festék-transzport esszé	primer, transzfektált, szelektált sejt	gátlás esszé	$IC_{50}/K_i$	nagy áteresztőképességű	kevés a szubsztrát próbaként alkalmazható gyógyszer	(Homolya 1993; Hollo 1996)



**6. ábra** A legfontosabb *in vitro* esszék működési elve. (A) A vezikuláris transzport esszé a kifordított vezikulákba történő ATP-függő transzportot méri. (B) Az ATPáz esszét a transzporttal kapcsolt vanadát függő ATP hidrolízist detektálja. (C) A festéktranszport esszé a legtöbb esetben gátlás esszéként funkcionál. Előnyös megvalósításban a festék nem fluoreszcens formája a szubsztrátja a transzporternek, tehát a fluoreszcencia sejthez kötött. A transzporter gátlásával nő a fluoreszcencia. (D) A vektorális transzport esszé kétféle megvalósításban használatos. A kétirányú esszében a két irányban mért látszólagos permeabilitási koefficiens aránya, az efflux arány (ER) jelzi a szubsztrát jelleget. Apikális efflux transzporter esetén  $ER = P_{app,B>A} / P_{app,A>B} \geq 2$ . A mérés egyirányban is elvégezhető, ahol a specifikus gátlószer jelenlétében és távollétében mért értékek jelzik a transzporter hozzájárulását.

### 2.6.2 In vivo módszerek

Az *in vitro* rendszerek alkalmasak arra, hogy viszonylag gyorsan információt adjanak arról, hogy egy adott gyógyszerjelölt kölcsönhat-e a vizsgált transzporterrel. Nem válaszolják meg viszont azt a kérdést, hogy fiziológias körülmények között az adott kölcsönhatás jelentős-e. Ennek tisztázása érdekében szükséges az *in vivo* vizsgálatok elvégzése.

Ezeket a vizsgálatokat egerek esetében a leggyakrabban transzgénikus és knock-out, valamint természetes mutáns állatok felhasználásával végzik (Klaassen and Lu 2008; Robey 2010). Komoly potenciált hordoznak magukban az úgynevezett humanizált egerek, mert itt a humán fehérje *in vivo* preklinikai vizsgálatára van lehetőség (Patterson 2008; Jiang 2011). Patkányok esetében a természetes mutáns állatok alkalmazása mellett specifikus gátlószer jelenlétében végrehajtott kísérlet a kézenfekvő opció, bár a transzgenézis technológiája ma már patkányokban is lehetőséget ad knock-out állatok előállítására (Izsvak 2010).

## 2.7 Transzporterek jelentősége a gyógyszerek ADMETox sajátságáiban

A disszertációban tárgyalt transzporterek jelentőségére gyógyszerek ADMETox sajátságainak meghatározásában először *in vitro* vizsgálatok hívták fel a figyelmet. Victor Ling laborjában azt találták, hogy colchicinnel szelektált kínai hörcsög ovárium (CHO) sejtvonal rezisztenssé vált további citosztatikumokra is (Juliano and Ling 1976). További vizsgálatok azt mutatták meg, hogy a rezisztens sejtek membránjában egy 170 kDa molekulásúlyú glikozilált fehérje halmozódott fel, és ezen fehérje mennyisége korrelál a rezisztenciával. Mivel ez a fehérje limitálta a citosztatikumok látszólagos membrán permeabilitását, elnevezték „Permeability glycoprotein”-nek (P-gp). A P-gp-ét (ABCB1), egy évtizeddel később Riordan laboratóriumában klónozták és nevezték el *mdr1*-nek (Ueda 1986).

Bár az első monográfia a digoxin és a quinidin együttes alkalmazásának veszélyeiről már 1950-ben napvilágot látott (Gold 1950), a két gyógyszer közötti gyógyszerinterakció értelmezésére majd három évtizedet kellett várni. Leahy és munkatársai 1978-ban írták le azt a megfigyelésüket, hogy digoxin és quinidin együttes adagolása esetén a szérum digoxin koncentrációk több mint a duplájára nőttek (Leahey 1978). Az *mdr1a*<sup>-/-</sup> egereken végzett első kísérletek igazolták a transzporter hatását a digoxin ADME sajátságaira (Schinkel 1995). Különösen drámai volt a génkiütés hatása az agyi penetrációra, ahol 35-55-szörös növekedést láttak. Az ABCB1 szerepét a digoxin – quinidin interakcióban knock-out egér felhasználásával végül 1999-ben sikerült igazolni (Fromm 1999). Sikerült megmutatni, hogy a quinidin felfüggeszti a digoxin vektoriális transzportját LLC-

MDR1 sejteken, valamint a quinidin – digoxin kölcsönhatás eltűnik *mdr1a*<sup>-/-</sup> állapotokban. Mivel a digoxin klinikán és *in vitro* sejtes tesztekben is ABCB1-függő ADME sajátságokat mutat, ráadásul egy szűk terápiás indexű gyógyszer, a molekula jelenleg is az ABCB1 transzporter preferált szubsztrát próbája úgy az *in vitro*, mint a klinikai tesztekben (Giacomini 2010).

A legutóbbi időkig elsősorban klinikai megfigyelések vezettek oda, hogy transzporterek szerepét tételezzük fel gyógyszerek ADMETox sajátságainak alakításában. A ma legfontosabbnak tartott transzportereket a kétezres évek közepéig klónozták, így ma már megfelelő és specifikus *in vitro* rendszerek állnak rendelkezésre, hogy a transzporter kölcsönhatások szempontjából előnytelen molekulákat kiszűrjék. A tesztelésre vonatkozó regulációs javaslatok is publikálásra kerültek (EMA-Guidance 2010; Giacomini 2010; FDA-Guidance 2012).

A transzporter - gyógyszer kölcsönhatásoknak klinikai következményei akkor vannak, ha a betegben egy olyan transzporter variáns illetve mutáns expresszálódik, melynek aktivitása kisebb az átlagosnál, illetve komedikáció esetében az egyik gyógyszer (elkövető/perpetrator) a transzporter közvetlen gátlásával avagy a transzporter expresszió modulálásával befolyásolja a másik gyógyszer (áldozat/victim) ADMETox sajátságait.

### 2.7.1 Transzporter polimorfizmusok

A transzporterekben megfigyelhető genetikai változékonyság egyes esetekben a vad típusú változathoz képest részleges vagy teljes funkcióvesztésben nyilvánul meg. Transzporter polimorfizmusok vagy mutációk ennek következtében sok esetben genetikailag öröklődő betegségek kialakulásához vezetnek influx és efflux transzporterek esetében egyaránt (Gottesman and Ambudkar 2001; Degorter 2012). A másik hatása a transzporterek genetikai változékonyságának a gyógyszerek eltérő ADMETox sajátságaiban figyelhető meg. Az efflux transzporterek esetében néhány ismert példája van a csökkent transzporter aktivitásnak (Degorter 2012; Ieiri 2012). Általánosságban, az apikális membránokban expresszálódó ABC transzporterek csökkent aktivitása megnövekedett intesztinális abszorpciót, megnövekedett BBB penetrációt és csökkent exkréciót von maga után. Mindez a plazma gyógyszer szintek emelkedésével jár.



Az ABCG2 fehérje nem-szinonim (Q141K) c.421C>A (rs2231142) polimorfizmusa a legjobban dokumentált. Bár nem egyértelmű, hogy a variáns a vadtypushoz képest kisebb átviteli számmal rendelkezik-e (Sparreboom 2005), vagy csak a stabilitása csökkent mértékű (Kondo 2004), esetleg a fehérje plazma membránba történő transzportja sérült (Urquhart 2008), az igazoltnak látszik, hogy ez a variáns kisebb aktivitású *in vivo*. Bár a sulfasalazin, az egyik ABCG2 szubsztrát próba esetében expozíció növekedéséről ellentmondásos adatok láttak napvilágot, közel egy tucat gyógyszer esetében a c.421C>A polimorfizmus az expozíció növekedésével járt (Degorter 2012; leiri 2012).

Az ABCB1 esetében sok polimorf változat létezik. Különösen a c.3435T>C variánst illetve a c.2677G>T/A (rs2032582; S893A), c.3435T>C (rs1045642, I1145I) haplotípust vizsgálták kimerítően meggyőző eredmények nélkül (Degorter 2012; leiri 2012).

A további apikális efflux transzporterek közül az ABCC2-nek ismert sok variánsa. A csökkent ABCC2 aktivitás emberben a Dubin-Johnson szindrómához vezet, ami az ABCC2 szubsztrát bilirubin-glükuronidok defektív canaliculáris transzportjához, következésképp konjugált bilirubinémiához vezet (Paulusma 1997). A defektív ABCC2 gént hordozó emberekben kimutatható volt a szubsztrát gyógyszerek emelkedett plazma szintje is (Gradhand and Kim 2008).

A legismertebb ABCC4 SNP a c.2269G>A (rs3765534; E757K) a fehérje plazma membránba történő csökkent transzportjával és ennek következtében az ABCC4 szubsztrát tiopurinok hemopoetikus sejtekben való fokozott felhalmozódásával és fokozott myeloszuppresszióval jár (Krishnamurthy 2008).

A hepatocytá illetve a PT epithel basolaterális membránjában expresszáldó influx transzporterek polimorf változatait tanulmányozták a legtöbbet. Ezekről a variánsokról is elmondható, hogy a vadtypushoz képest csökkent aktivitásúak. Mivel ezek a transzporterek általában szubsztrátjaik biliáris vagy renális exkréciójának sebességmeghatározó lépését katalizálják, a variánsokat hordozó emberekben magasabb plazma szintek mérhetők (Degorter 2012). Ugyanakkor hepatotoxikus vagy nephrotoxikus gyógyszerek esetében ezekben a páciensekben csökkent szöveti toxicitással találkozunk (Degorter 2012).

A legtöbbet tanulmányozott polimorfizmus az SLCO1B1 c.521C>T variáns (rs4149056; V174A). Több mint 20 gyógyszer szubsztrát farmakokinetikáját tanulmányozták c.521C>T variánst expresszáló betegeken (Niemi 2011). Nem minden szubsztrát esetében találtak változást, ami azt jelenti, hogy egy másik transzporter, legnagyobb valószínűséggel az SLCO1B3 kiegyenlítő hatása elfedi az SLCO1B1 c.521C>T aktivitásvesztését. A szintén a májban expresszálódó SLCO1B3 polimorfizmus következményei kevésbé egyértelműek. Az egyetlen kivétel a docetaxel indukálta leukopenia a variánsokat expresszáló japán pácienseken (Kiyotani 2008), bár ugyanezt kaukázusi populáción nem figyelték meg (Baker 2009).

A PT epithel anion felvételéért felelős SLC22A6 és SLC22A8 transzporter polimorfizmusok nem vezettek dokumentált változásokhoz a gyógyszer szubsztrátjaik farmakokinetikájában illetve farmakológiai hatékonyságában (Degorter 2012). Bár egy közelmúltbeli tanulmány szerint az SLC22A6 és SLC22A8 gének intergenikus régiójában található polimorfizmus (rs1077922367) asszociációt mutatott a szubsztrát hydrochlorothiazid vérnyomáscsökkentő hatásának mértékével (Han 2011).

### 2.7.2 Gyógyszerkölsönhatások

Transzporter mediált gyógyszerkölsönhatások a transzporterek fontosságának legbiztosabb jelei és komoly kockázatát hordozzák a gyógyszer-indukálta toxicitásnak, mellékhatásoknak. A gyógyszerkölsönhatások alapulhatnak közvetlen gátláson/potencírozáson vagy a génexpresszió modulálásán. A génexpresszió modulálása nem releváns a bemutatásra kerülő kísérletes munka szempontjából, ezért nem kerül itt sem tárgyalásra.

#### 2.7.2.1 Közvetlen gátláson alapuló kölcsönhatások

Közvetlen gátláson alapuló kölcsönhatások fontosságát jelzi, hogy a gyógyszerkölsönhatási potenciált modellező *in vitro* gátlás esszék ma már legalább akkora fontosságúak, mint a szubsztrát tesztek.

Az efflux transzportereken keresztül megvalósuló gyógyszerinterakciókra számos példa ismert. Ezek a példák elsősorban az ABCB1 fehérjén történő interakciók. Jellemzője ezeknek az interakcióknak, hogy orálisan adott gyógyszerek esetében a plazma szintek megemelkedése maximum 2-3-szoros. Az agyi szintek viszont ennek

a többszörösére emelkedhetnek. A mérések jellege miatt erről kevés adat van emberben. A liquor gyógyszer szintek mérésére lehetőség nyílik emberek esetében is, azonban a vér–liquor gát epithelben az ABCB1 a liquor felé transzportálja az anyagokat, így a liquor szintek nem feltétlenül felelnek meg az agyi extracelluláris tér szintjeinek (Urquhart and Kim 2009). Az *in vivo* állatkísérletek azonban egyértelműen azt mutatják, hogy az agyi szintek lényegesen jobban megnőnek, mint a plazma szintek (Schinkel 1994). A transzporterek szerepét a humán vér–agy gátban elsősorban képkötő eljárásokkal végzett vizsgálatokkal mutatták meg (Eyal 2009; Kreisl 2010; Bauer 2012). Az ABCG2 fehérje kolokalizálódik az ABCB1 fehérjével. Az ABCG2 transzporterén létesülő gyógyszerkölsönhatások hatását ezért elsősorban olyan szubsztrátok esetében lehet látni, amik nem, vagy nem nagy sebességgel transzportálódó szubsztrátjai az ABCB1-nek (Enokizono 2007a; Enokizono 2008). A klinikai ABCG2-mediált gyógyszerkölsönhatások száma limitált. A klasszikus példa a topotecan – GF120918 kölsönhatás. Bár a topotecan ABCB1 szubsztrát, az ABCG2 c.421C>A polimorfizmus hatással van a topotecan plazma szintjeire, tehát az ABCG2 hatása jelentős (Sparreboom 2005). A legfontosabb transzporter mediált gyógyszerkölsönhatásokat a 4. táblázat tartalmazza.

Az influx transzporterek esetében a legfontosabb példák az SLCO1B1 és SLCO1B3 fehérjéken létrejövő kölsönhatások. Ezek a fehérjék a meghatározói a statinok májba történő felvételének (Watanabe 2010), ezért a legtöbb itt létrejövő gátló kölsönhatás drámai módon emeli az érintett statin plazma szintjét. A cyclosporin A okozta gátlás több statin esetében is jelentős, akár 7-10-szeres növekedést okozhat az expozícióban (AUC) és maximális plazma koncentrációban ( $C_{max}$ ). A legjobban ismert nem statint érintő kölsönhatás az SLCO1B1 fehérje vonatkozásában az endothelin receptor antagonistá bosentan mint áldozattal kapcsolatos. A cyclosporin A együttes adagolása a bosentan plazma szintjeinek 30-szoros koncentráció növekedésével járt (Treiber 2007), holott a bosentan metabolizáló CYP3A4 gátlása alapján csak kb. kétszeres plazma szint emelkedés lett volna várható. *In vitro* mérések alapján azt feltételezik, hogy a megfigyelt gyógyszerinterakció jelentős részben az SLCO1B1 influx transzporterén történik. Az SLCO1B3 transzporterén létrejövő gyógyszerkölsönhatások analógok az SLCO1B1 fehérjén létrejövő kölsönhatásokkal. A gyógyszerek szubsztrát spektrumában van némi különbség (4. táblázat). Transzfektánsokon kapott *in vitro* adatok azt mutatják,

hogy a gyógyszerkölcsönhatásoknak egy olyan formája is létezik, amikor az elkövető gyógyszer növeli az áldozat gyógyszer transzportját. Orális diabétesz elleni szerek, mint a rosiglitazone potenciózta a pravastatin SLCO1B1 és SLCO1B3 általi transzportját (Bachmakov 2008). Ezeket az adatokat eddig klinikai megfigyelések nem támasztották alá.

A basolaterálisan elhelyezkedő renális influx transzportereken is jelentős gyógyszerkölcsönhatások figyelhetők meg. A kölcsönhatások következménye itt is a plazma szintek és az expozíció (AUC) megnövekedése. Az anion transzporterek esetén a probenecid a leggyakoribb elkövető (4. táblázat).

**4. táblázat** Az FDA által listába vett, transzporter mediált gyógyszerkölsönhatások a disszertáció témakörébe tartozó transzportereken

Transzporter	Aldozat gyógyszer	Elkövető gyógyszer	Farmakokinetikai következmény	Referencia
ABCB1	Digoxin	Itraconazol	AUC 1,7x, CIR 0,8x	(Jalava 1997)
	Digoxin	Quinidin	serum conc 2,5x	(Mordel 1993)
	Digoxin	Atorvastatin	AUC 1,15x	(Boyd 2000)
	Digoxin	Valspodar	AUC 3,0x, CIR 0,2x	(Kovarik 1999)
	Digoxin	Ranolazin	AUC 1,6x	(Jerling 2006)
	Digoxin	Dronedaron	AUC 2,6x	(Deneer and van Hemel 2011)
	Loperamid	Quinidin	AUC 2,5x	(Sadeque 2000)
	Loperamid	Tipranavir / Ritonavir	AUC 0,5x	(Mukwaya 2005)
	Talinolol	Erythromycin	AUC 1,5x	(Schwarz 2000)
	Talinolol	Ver (verapamil)	AUC 0,76x	(Schwarz 1999)
ABCB1 / ABCG2	Doxorubicin	GF120918	AUC 1,2x	(Planting 2005)
ABCB1 / ABCG2	Topotecan	GF120918	AUC 2,4x	(Sparreboom 2005)
ABCB1 / SLCO	Aliskiren	Atorvastatin	AUC 1,47	(Vaidyanathan 2008)
ABCB1 / SLCO	Fexofenadin	Ver	AUC 2,5x	(Yasui-Furukori 2005)
ABCG2 / SLCO1B1	Rosuvastatin	Cyclosporin A (CsA)	AUC 7,0x	(Simonson 2004)
SCLO1B1	Bosentan	Lopinavir/Ritonavir	AUC 5-48x	(Dingemans 2010)
	Glyburid	Rifampin	AUC 2,3x	(Zheng 2009)
	Pravastatin	CsA	AUC 9,8x	(Neuvonen 2006)
SLCO1B1 / SLCO1B3	Pravastatin	Clarithromycin	AUC 2,1,	(Jacobson 2004; Seithel 2007)
SLCO1B3	Pitavastatin	Cs A	AUC 4,6x	(Neuvonen 2006)
	Rosuvastatin	CsA	AUC 7,1x	(Neuvonen 2006)
SLCO	Fexofenadin	grapefruit juice	AUC 0,58x	(Dresser 2005)
	Rosuvastatin	Lopinavir/Ritonavir	AUC 2,1x	(Kiser 2008)
SLC22A6	Acyclovir	Cimetidin	AUC 1,2x, CIR 0,78x	(De Bony 2002)
	Cephradine	Probenecid	AUC 2,9x	(Welling 1979)
	Oseltamivir	Probenecid	AUC 2,5x, CIR 0,5x	(Hill 2002)
SLC22A6-8	Acyclovir	Probenecid	AUC 1,42x	(De Bony 2002)
	Cidofovir	Probenecid	AUC 1,5x	(Cundy 1995)
	Dicloxacillin	Probenecid	AUC 1,8x, CIR 0,3x	(Beringer 2008)
	Famotidin	Probenecid	AUC 1,8x, CIR 0,4x	(Inotsume 1990)
	Furosemid	Probenecid	AUC 2,7x	(Vree 1995)
AUC 1,5x= AUC 50%-al nőtt				
CIR 0,3x= clearance 70%-csökkent				

## 2.8 Transzporterek és növényi hatóanyagok

A növények metabolomjában hagyományosan sok a farmakológiailag aktív molekula (Gertsch 2011). A növényekből származó hatóanyagok között sok a daganatterápiában alkalmazott szer (Mishra and Tiwari 2011; Shynu 2011; Pan 2012), de az alkaloidok, antioxidánsok széles skáláját használják különböző kardiovaszkuláris (Babu and Liu 2008), sőt CNS indikációkban (Roth 2004) is.

A gyógyszerkutatás/fejlesztés egyik kiemelkedően fontos bemenetét alkotják a növényekből izolálható hatóanyagok. Bár ezek szerkezetükben több jellegzetes eltérést mutatnak a szintetikus molekuláktól, az elfoglalt kémiai tér jelentős részben átfed és ugyanazok a transzporterek relevánsak. A növényi hatóanyagok ADMETox vizsgálatára ugyanazok a vizsgálati módszerek használatosak.

A vizsgálatok speciális eseteiben a transzporterek terápiás célpontok. Ilyen a multidrog rezisztencia (MDR) esete, amikor az eredeti elmélet szerint efflux transzporterek magas expressziójának következtében a gyógyszerek hatékonysága csökken. Az MDR-t kivédendő gátlószerek (ún. revertáló ágensek) alkalmazása lehetséges. Az utóbbi időben jelentős számú publikáció írt le gátlószert sajátossággal rendelkező természetes eredetű molekulákat (Molnar 2010).

Ugyanezen a jelenségen alapulnak az étel – gyógyszer interakciók, melyek meghatározása már manapság is kötelező része a gyógyszerfejlesztésnek. Amennyiben az ételek kismolekulás komponensei gyógyszerek enterocyták apikális/luminális influx transzportereinek aktivitását gátolják, úgy általában az abszorpciót is gátolják. Ha a gátlás az apikális/luminális efflux transzportereken történik, az interakció az abszorpciót segíti. A grapefruitlé 20-60%-al növelte klinikán az ABCB1 szubsztrát cyclosporin A AUC értékét (Huang and Lesko 2004). A furanokumarin (bergamottin, dihidrobergamottin) mentes grapefruitlének nem volt hatása a cyclosporin A AUC-ra (Paine 2008). A Caco-2 sejteken végzett permeabilitás vizsgálatok igazolták a transzporter gátlást, hiszen a grapefruitlé növelte az A-B látszólagos permeabilitási együttható értékét, míg a furanokumarin mentes grapefruitlének nem volt hatása. A szintén ABCB1 szubsztrát fexofenadin esetében viszont a várakozással ellentétben a grapefruitlé 63%-al csökkentette a plazma AUC értékét (Dresser 2002). Transzfektánsokon végzett vizsgálatok

igazolták, hogy a fexofenadin szubsztrátja az enterocyták lumenális doménjében expresszáldó SLCO1A2 fehérjének (Glaeser 2007), és a grapefruitlé gátlásért felelős hatóanyaga a naringin (Bailey 2007). Az étel-gyógyszer kölcsönhatások tehát megvalósulhatnak úgy az efflux mint az influx transzportereken.

A növényi hatóanyag kutatásnak speciális esetei azok a vizsgálatok, ahol a növényi hatóanyag abszorpciójának javítása az cél. A hesperidin (hesperetin-7-O-rutinozid, egy ramnóz származék) nagyon rosszul szívódik fel, mivel a ramnóz jelenléte miatt nem szubsztrátja a enterocytákban apikálisan elhelyezkedő nátrium-függő glukóz transzporternek (sodium-glucose-cotransporter 1 (SGLT1). A ramnóz eltávolítása a hesperidináz enzim segítségével az SGLT1 szubsztrát hesperetin-7-O-glukozidhoz vezet, ami szignifikánsan jobban felszívódik.

## 2.9 Transzporterek toxikológiai relevanciája

Egy közelmúltban végzett becslés szerint környezetünkben mitegy 97 ezer kemikália található, amelyeknek mindössze 2%-a (1800) gyógyszer (Muir and Howard 2006). Ezek a számok azt mutatják, hogy a gyógyszereken kívül az egyéb vegyszerek okozta terheléssel is meg kell birkóznia az emberi szervezetnek. Ez a terhelés jelentős, mégha a szervezetünket érő egyszeri dózisok alatta is maradnak a gyógyszer dózisoknak. A közelmúlt kutatásai egyre intenzívebben foglalkoznak a környezetszennyező anyagok és humán transzporterek kölcsönhatásával. A transzporter profil hasonló a gyógyszerek transzportjában szerepet játszó transzporterekkel. Ebben annak is lehet szerepe, hogy csak a gyógyszerek transzportjában szerepet játszó fehérjékre vannak kész, kereskedelemben is hozzáférhető reagensek, tesztek.

Általánosságban elmondható, hogy a fókuszban az efflux transzporterek állnak, hiszen a tanulmányok az emberi szervezet toxikus anyagokkal szembeni védelmi mechanizmusaira koncentrálnak. Másrészt a környezetszennyező anyagok között nagy számban vannak magas passzív permeabilitású szerek, amelyek influx transzporterek nélkül is felszívódnak és bejutnak a szövetekbe, és ott felhamozódhatnak. Különösen igaz ez azokra a kemikáliákra, melyen nem metabolizálódnak. A környezetünket károsító anyagok jelentős része a felszíni vizekkel a tavakba, tengerekbe, óceánokba jutnak. A bejutott toxikus anyagokkal

szemben a tengeri élőlények efflux transzporterek indukciójával védekeznek. A hatásért részben felelős ABCB1 fehérjével homológ fehérjék expresszióját sikerült azóta több tengeri élőlényben kimutatni. Az is igazolást nyert, hogy a fehérje expressziója korrelál a környezeti szennyezés mértékével (Shuilleabhain 2005). Az alacsonyabb passzív permeabilitású környezetszennyező anyagok között található olyanok, melyek influx transzportereket vesznek igénybe a szöveti penetrációhoz. A - többek között- háztartási cikkek felületkezelésére használt perfluorozott karbonsavak májba és vesébe történő felvételében, sőt a vesében történő reabszorpcióban is szerepet játszanak az SLCO és SLC22 családokba tartozó anion influx transzporterek növelve ezzel a hepato- és nephrotoxicitás lehetőségét. További példa az arsenát, az anorganikus arzén természetben legnagyobb mennyiségben jelenlévő formája az SLC34A2 (NaPi-IIb) foszfát transzportereken keresztül szívódik fel a bélből (Villa-Bellocosta and Sorribas 2008). A vesében történő reabszorpció is egy foszfát transzporterrel keresztül valósul meg (Csanaky and Gregus 2001). Az arzénit glutation-függő biliáris transzportjéért a patkányban az Abcc2 a felelős (Kala 2000). Az analóg funkciót *in vitro* a humán ABCC2 is ellátja (Carew and Leslie 2010).

A toxikus anyagok között megtalálhatók azok a vegyületek, melyek nem célzott kémiai szintetézissel készülnek. Ide tartoznak a táplálékban található, részben a táplálékok elkészítésekor keletkező toxikus vegyületek, valamint a terményeken található különböző mikroorganizmusok által termelt toxinok. A táplálékból származó karcinogének (Schutte 2006; Enokizono 2008) és a gombák által termelt toxinok (van Herwaarden 2006; Meier-Abt 2007; Evers and Chu 2008) influx és efflux transzporterek közreműködésével kerülnek felvételre illetve szekrécióra. Ezeknek a kölcsönhatásoknak a részletezése túlmutat a disszertáció keretein.

A környezetszennyező anyagok és toxinok tehát ugyanazokat az útvonalakat (influx transzporterek) használják, mint a gyógyszerek és növényi hatóanyagok, és az emberi szervezet is hasonló eszközökkel (efflux transzporterek és metabolikus enzimek) védekezik ellenük.



### 3 Célkitűzések

Célul tűztük ki egy transzporter módszertanra épülő metodikai platform kialakítását, validálását és az *in vitro* – *in vivo* módszerek korrelációs analízisét. A kísérletes munka a módszereket gyógyszermolekulák vizsgálatára optimalizálja. Azonban a módszerek növényi hatóanyagok és toxikus anyagok vizsgálatára is alkalmazhatók. Az élelmiszeriparban és a vegyiparban ezek a vizsgálatok még nem részei a kutatás-fejlesztési paradigmáknak, de a szakmai társadalom és az élelmiszer és gyógyszerhatóságok részéről is figyelmet kap. A metodikai platform abban is speciális, hogy ötvözi az *in vitro* és *in vivo* módszereket. Részletes célok:

#### 3.1 Expressziós rendszerek optimalizálása gyógyszer – transzporter kölcsönhatások vizsgálatára.

Mivel az *in vitro* vizsgálatok egy része heterológ expressziós rendszerben, a célzott fehérjét túltermelő sejtekben, membránokban történik, a nem „fiziológiás” hatások / molekuláris környezet értékelése, korrekciója vagy korrelációba vétele fontos. cél volt olyan tesztrendszer kifejlesztése, amely szabadalmaztatható, és széleskörű gyakorlati alkalmazást nyer. A dolgozatot megalapozó, ebben a témában releváns közlemények: (Glavinas 2007; Pal 2007a; Pal 2007b; Glavinas 2008; Kis 2009a; Kis 2009c; Kis 2011).

#### 3.2 Tesztrendszerek korrelációs analízise, valamint transzporter szubsztrát próbák és referencia inhibitorok validálása *in vitro* ADME vizsgálatok céljára.

A gyógyszer – transzporter kölcsönhatások tesztelésére több tesztrendszer és esszé alkalmazható. Az adott rendszer korlátainak megértése, az eredmények érvényességi tartományának definiálása volt az egyik célunk ezekkel a vizsgálatokkal. A szubsztrát próbák és referencia inhibitorok meghatározása, jellemzése volt a másik cél. A terület viszonylagos újszerűsége miatt a gyógyszerhatóságok sem tudnak mindenre kiterjedő pontos ajánlásokat tenni. Ezekkel a tanulmányokkal megfontolásra méltó adatokat, javaslatokat szeretnénk volna szolgáltatni. A dolgozatot megalapozó, ebben a témában releváns

közlemények: (Heredi-Szabo 2008; Kis 2009b; Beery 2011; Glavinas 2011; Szeremy 2011)

### **3.3 *In vitro* esszérendszerek alkalmazása transzporter – gyógyszer kölcsönhatások kinetikai jellemzésére.**

Az alkalmazható esszérendszerek függenek a kérdésfeltevéstől, a molekula fizikokémiai tulajdonságaitól, és a biológiai tesztrendszer limitációjától. Az alkalmazási példák egy-egy aspektusra világítanak rá. A dolgozatot megalapozó, ebben a témában releváns közlemények: (Lespine 2006; Jani 2009; Lespine 2009; Rajnai 2010; Jani 2011).

### **3.4 *In vitro* esszérendszerek alkalmazása növényi hatóanyagok és környezetszennyező anyagok transzporterekkel való kölcsönhatásának azonosítására és jellemzésére.**

A vizsgált növényi hatóanyagok mindegyike tartalmaz fenolos funkciót. Ezeknek sajátossága a gyors fázis II metabolizmus. Ezekben a munkákban tehát sok alacsony passzív permeabilitású konjugátummal dolgoztunk. Az ilyen alacsony passzív permeabilitású vegyületek transzporterek segítségével képesek átjutni a membránokon. Vizsgálataink ezeknek a transzportereknek az azonosítását célozzák. A dolgozatot megalapozó, ebben a témában releváns közlemények: (Zhang 2007a; Oosterhuis 2008; Brand 2011; Wong 2011; Zhang 2011).

### **3.5 *In vitro* vizsgálatok *in vivo* relevanciájának bemutatása. *In vitro* – *in vivo* korrelációs és fajspecifitász vizsgálatok.**

A gyógyszerkutatásban fontos elem a humán és állati fehérjéket expresszáló *in vitro* rendszereken mért adatok korrelációja (fajspecifitász), valamint az *in vitro* adatok *in vivo* adatokkal való megfeleltetése (*in vitro* – *in vivo* correlation (IVIVC)). Célszerű a különböző rendszereken végzett vizsgálatokat ugyanazon a szubsztrát próbák és referencia inhibitorok felhasználásával végezni. A rendelkezésre álló tesztrendszerek felhasználásával ezekre mutatunk példákat. A dolgozatot megalapozó, ebben a

dc\_350\_11

témában releváns közlemények: (Heredi-Szabo 2009a; Heredi-Szabo 2009b; Jemnitz 2010; Sziraki 2011).

## 4 Anyagok és módszerek

Az Anyagok és módszerek fejezet a kísérleti munka tételes leírását tartalmazza. A szöveges részek a kísérleti protokoll lépéseit és megfontolásait írják le. A pontos paraméterek táblázatokba foglalva találhatóak. A disszertációban számszerűen benne foglalt eredményekhez tartozó módszerek kerülnek itt leírásra.

### 4.1 Anyagok

A felhasznált membránok a Solvo Biotechnológiai Zrt (Szeged, Magyarország) termékei. Az 5.1.1 fejezetben használt (Glavinas 2007; Pal 2007b) MXR-M membrán egy, az ABCG2 fehérjét túlxpresszázó sejtvonalból készült. A sejtvonal identitása a Solvo Biotechnológiai Zrt üzleti titkának minősül. Az ezzel a membránnal készült kísérletek reprodukálása illetve új kísérletek elvégzése lehetséges, hiszen a membránok megvásárolhatók a Solvo Biotechnológiai Zrt-től. A kifejlesztett, szabadalmaztatott, koleszterinnel dúsított membránok nevében a HAM (High Activity Membrane) utótag szerepel. A speciális reagensek (ellenanyagok, radioaktív molekulák) specifikációja, és származási helye megtalálható a disszertáció alapjául szolgáló közleményekben. A gyógyszer, gyógyszerjelölt molekulák, növényi hatóanyagok és metabolitjaik valamint peszticidek egy részét kollaborációs partnereink szintetizálták, míg egy másik részét és az egyéb vegyszereket a Sigma-Aldrich Kft-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk. A betűjellel jelzett standard pufferek összetételét nem részletezem, azok megegyeznek az irodalomban leírtakkal.

### 4.2 Sejtvonalak, tranziensen transzfektált sejtek és primer sejttenyészetek

Az MDCKII szülői sejtvonalat Dr. Kai Simons-tól (Max Planck Intézet, Drezda, Németország, az ABCG2-vel transzfektált MDCKII sejtvonalat (MDCKII-BCRP) Professzor Heyo Klaus Kroemer-től (Greifswaldi Egyetem, Greifswald, Németország), az ABCB1-el transzfektált MDCKII sejtvonalat (MDCKII-MDR1) Professzor Sarkadi Balázstól (Országos Gyógyintézeti Központ) és Dr. Németh Katalintól (Országos Vérellátó Szolgálat) kapta a Solvo Biotechnológia Zrt. Az SLCO1B1 és SLCO1B3 transzfektált Chinese Hamster Ovary-K (CHO-K) sejtvonalak

Professzor Bruno Stiebertől (Zürichi Egyetem, Zürich, Svájc) származnak. A Caco-2 sejtvonalat az American Tissue Type Collection-től vásárolta a Solvo Biotechnológia Zrt. A 293H sejtvonal az Invitrogen-től (Carlsbad, Kalifornia) kerültek beszerzésre.

A sejteket 37°C-on 5% CO<sub>2</sub>- és 100% páratartalmú inkubátorban tartottuk. A sejtek passzálása a nemzetközi gyakorlatban elfogadott, leírt standard szövettenyésztési módszerekkel történt. A sejtvonalak tenyésztési körülményeit az 5. táblázat tartalmazza.

A 293H sejtek a transzfekció előtti napon poly-L-lizinnel bevont 24-kutas lemezekre lettek kiültetve  $1.2 \times 10^5$  sejt/kút sejtszámban. A pCMV-XL6 vektorba klónozott cDNS-ek (2 µg) 3 µl Fugene HD-vel 100 µl Opti-MEM-ben lett elegyítve. Tizennyolc perc szobahőmérsékleten való inkubálás után 25 µl transzfekciós komplex/kút került a sejtekre. A mérés 22-24 órával a transzfekciót követően történt.

A primer hepatocytá kultúrát a Semmelweis Egyetem Transzplantációs Klinikájáról kapott májából izoláltuk. Kivétel nélkül transzplantációra alkalmatlan szerveket használtunk. A felhasználás a Regionális Magyar Kutatási és Etikai Bizottság engedélyével történt. A szövetet először perfundáltuk kalcium-mentes, EGTA-t tartalmazó Earle-féle pufferrel, majd EGTA-mentes Earle-féle pufferrel. Végül kalcium- és IV-es típusú kollagenáz tartalmú Earle-féle pufferrel nyertük ki a sejteket (Heredi-Szabo 2009a). A patkány szövetből is a fenti perfúziós módszerrel nyertük ki a hepatocytákat. A májak 200-250 gramos hím Wistar patkányokból (Charles River, Budapest, Magyarország) származtak. A sejtek viabilitása 90% fölött volt. A kultúrát vektoriális transzport kísérletekben használtuk. A hepatocytákat ( $2 \times 10^6$ ) 30 mm-es patkány farokból nyert I típusú kollagénnel (0,15 ml, 1,6 mg/ml) kezelt Petri csészékbe ültettük Williams tápfolyadékban (5% FCS, 100 nM inzulin, 2,5 µg/ml amphotericin B, 0,1 mg/ml gentamicin, 30 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 0,1 µM dexamethason). 24 órával később a tápfolyadékot eltávolítottuk, és a sejtekre patkány farokból nyert jéghideg, neutralizált I típusú kollagént (1,5 mg/ml, pH 7,4) rétegeztünk. Negyvenöt perccel később a fenti összetételű Williams tápfolyadékot rétegeztünk a kultúra tetejére. A kultúrát vektoriális transzport kísérletekben használtuk.

A vektoriális transzportoz használt patkány agyi endothel kultúrához (Rat Brain Endothelial Culture (RBEC)) az endothel sejteket 2-hetes patkányokból izoláltuk (Wilhelm 2007). A pericytákat kezeletlen Petri csészékbe kiültetett cerebrális mikropillárisokból nyertük, míg a glia kultúrát újszülött patkányokból készítettük, és poly-L-lizinnel kezelt csészékben kultiváltuk. A pericytákat a 12-kutas Transwell lemezek (0,4  $\mu\text{m}$ ;  $1,5 \times 10^4$  sejt/filter) hátoldalára ültettük ki. A következő napon az endothel sejteket ültettük a filterekre. A konfluencia elérése után kiegészítettük a tápfolyadékot hydrocortizonnal (550 nM), CPT-cAMP-vel (250  $\mu\text{M}$ ) és RO-201724-el (17,5  $\mu\text{M}$ ) és 24 órára glia kultúrát tartalmazó edénybe helyeztük. A kultúrát vektoriális transzport kísérletekben használtuk.

**5. táblázat** A sejtvonalak tenyésztési körülményei

Sejtvonal	Alap tápfolyadék	Antibiotikum	Szérum	Egyéb kiegészítő
Caco-2	DMEM	10 $\mu\text{g/ml}$ penicillin-streptomycin	10% (V/V) hőinkativált FBS	2 mM L-glutamin, 1% nemesszenciális aminosavak
CHO-K -OATP1B1 és -OATP1B3	MIX MEM (Hank's F12 :DMEM, 1:1)	10 $\mu\text{g/ml}$ penicillin-streptomycin	10% (V/V) hőinkativált FBS	2 mM L-glutamin, 50 $\mu\text{g/ml}$ Proline
HEK293 és HEK293-BCRP	MIX MEM medium (Hank's F12:DMEM, 1:1)	10 $\mu\text{g/ml}$ penicillin-streptomycin	10% (V/V) hőinkativált FBS	2 mM L-glutamin,
HL60-MRP1	Advanced RPMI 1640	10 $\mu\text{g/ml}$ penicillin-streptomycin	10% (V/V) hőinkativált FBS	-
K562 és K562- MDR	Advanced RPMI 1640	10 $\mu\text{g/ml}$ penicillin-streptomycin	10% (V/V) hőinkativált FBS	2 mM L-glutamin,
LLCPK1-mdr1	Medium199	10 $\mu\text{g/ml}$ penicillin-streptomycin	10% (V/V) hőinkativált FBS	G418 (400g/L),
MCF7-MX	EMEM	10 $\mu\text{g/ml}$ penicillin-streptomycin	10% (V/V) hőinkativált FBS	2 mM L-glutamin, 1% nemesszenciális aminosavak 0.01 mg/ml bovine insulin
MDCKII és MDCKII-MDR1 MDCKII-BCRP	EMEM	10 $\mu\text{g/ml}$ penicillin-streptomycin	10% (V/V) hőinkativált FBS	2 mM L-glutamin, 1% nemesszenciális aminosavak
PLB985 és PLB985-BCRP	Advanced RPMI 1640	10 $\mu\text{g/ml}$ penicillin-streptomycin	10% (V/V) hőinkativált FBS	2 mM L-glutamin,
293H	DMEM	50 U/mL penicillin-streptomycin	10% (V/V) hőinkativált FBS	1% nemsszenciális aminosavak, 25 mM glükóz

### 4.3 A logP és logD<sub>7,4</sub> számítása

A logP és logD<sub>7,4</sub> értékeket a MarvinSketch 5.3 szoftver (ChemAxon, Budapest, Magyarország) segítségével számoltuk.

#### 4.4 Fehérjetartalom meghatározása

Thermo Scientific Kit alkalmazásával, színreakció segítségével határoztuk meg a minták fehérje tartalmát. A fehérje peptid-kötései a  $\text{Cu}^{2+}$  ionokat  $\text{Cu}^+$  ionokká redukálják. A  $\text{Cu}^+$  ionok mennyisége arányos az oldatban jelenlévő fehérje mennyiségével. A  $\text{Cu}^+$  ionok a bicinkoninsav (bichoninic acid (BCA)) molekulákkal lila színű kelátot képeznek, amely kolorimetriásan detektálható 562 nm-en. Az abszorpciós méréseket FluoStar Optima fotométer készülék segítségével végeztük.

#### 4.5 Western blot

A fehérjéket 10%-os nátrium-dodecyl-szulfát poliakrilamid gél elektroforézissel (SDS-PAGE) szeparáltuk, majd polivinilidén-difluorid (PVDF) membránra (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA) transzferáltuk 350 mA áramerősség mellett a gyártó útmutatásai alapján. A membránt blokkoltuk foszfát pufferben (Phosphate Buffered Saline (PBS); 5% zsírmentes tejpor, 0,5% bovin szérum albumin (Bovine Serum Albumin (BSA)), 0,05% Tween 20) minimum 2 órán át szobahőmérsékleten. Majd a blokkoló pufferben kezeltük az 1. ellenanyaggal 2 órán át szobahőmérsékleten. Az ABCG2 fehérje detektálásához BXP-21-es ellenanyagot (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság)használtunk 1:1000 hígításban, míg az ABCB1 fehérje esetén a C-219 (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság) ellenanyag 1:3000-es hígítását alkalmaztuk. A 3X10 perces mosás (PBS, 0,05% Tween 20) után a membránokat kezeltük egér-elleni IG-HRP második ellenanyag (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) 1:5000-szeres hígításával 1 órán át, szobahőmérsékleten. Mostuk, mint fenn, és az ECL Western Blotting Detection System kittel (GE Healthcare, Buckinghamshire, Egyesült Királyság) hívtuk elő.

#### 4.6 Membrán esszék

##### *Hagyományos ATPáz esszé*

ATPáz esszét a Sarkadi és munkatársai által korábban leírt módon végeztük (Sarkadi 1992). A megfelelő mennyiségű membránszuszpenziót 50 mM MOPS-Tris, 50 mM KCl, 5 mM Na-azid, 2 mM DTT és 0,1 mM EGTA-Tris tartalmú elegyben a

tesztelendő molekulák jelenlétében előinkubáltuk 37°C-on. A tesztanyagok alkalmazott koncentrációja az ábrákban, táblázatokban illetve a megjelent közleményekben kerül leírásra. A reakciót 5 mM Mg-ATP oldat hozzáadásával indítottuk el. Az adott transzporternek megfelelő inkubációs időt követően a reakciót 5%-os SDS oldattal állítottuk le. A keletkező P<sub>i</sub> mennyiségét 16,5 mM ammónium-heptamolibdát, 7,5%-os aszkorbinsav és 3,75 mM cink-acetát oldat-elegy segítségével határoztuk meg. A reakcióelegyet 20 percig 37°C-on inkubáltuk, majd az optikai denzitást 690 nm-en mértük. A disszertáció által felhasznált kísérleti munkák némelyikében alkalmazott PREDEASY kitek a hagyományos ATPázon alapulnak, a kapott eredmények egyenértékűek, ezért nem választottam külön a leírásokat sem. Az ATPáz esszé jellemző paramétereit a 6. táblázat tartalmazza.

#### 6. táblázat Az ATPáz esszé jellemző paramétereit

Transzporter	Membrán (µg/lyuk)	Inkubációs idő (perc)	Referencia szubsztrát (koncentráció)	Referencia inhibitor (koncentráció)
ABCB1	15	40	ver (40 µM)	CsA (40 µM)
ABCC1	40	60	N-ethyl-maleinimid-glutation (NEM-GS) (10 mM)	BZB (100 µM)
ABCC2	15	60	sulfasalazin (100 µM)	BZB (100 µM)
ABCC3	10	60	BZB (50 µM)	CsA (40 µM)
ABCG2	10	40	sulfasalazin (10 µM)	Ko134 (1 µM)
egér Abcb11-HAM	8	15	taurokenodeoxykolát (TCDC) (100 µM)	CsA (40 µM)
Kontroll membrán (ABCB1)	15/10	40/30	-	-
Kontroll membrán (ABCC1, ABCC2, ABCC3)	45/15/10	60	-	-
Kontroll membrán (ABCG2)	10	40	-	-
egér Abcb11-HAM	8	15	-	-

#### Hagyományos VT

A kifordított (inside-out) vezikulákat is tartalmazó membránszuszpenziót a megfelelő esszé elegyben -amely tartalmazta a transzportált szubsztrátot is- 4 mM ATP jelenlétében és hiányában 37°C-on inkubáltuk. A tesztanyagok alkalmazott koncentrációja az ábrákban, táblázatokban illetve a megjelent közleményekben kerül leírásra. A reakciókat 200 µl hideg mosópufferrel állítottuk le. Ezt követően a reakcióelegyet 1 µm pórusméretű B típusú üvegszál szűrőt tartalmazó lemezek



(Millipore, Bedford, MA, USA) szűrtük át, és 5x200 µl hideg mosó pufferrel mostuk. A filtereken maradt radioaktivitást folyadékszintillátor segítségével mértük, az ATP-függő transzportot pedig az ATP-t tartalmazó és nem tartalmazó lyukakban mért értékek különbségéből számoltuk (Microbeta Trilux, Wallac, Turku, Finnország). A disszertáció által felhasznált kísérleti munkák némelyikében alkalmazott PREDIVEZ kitek a hagyományos VT-on alapulnak, ezért nem választottam külön a leírásokat sem. A hagyományos VT esszé jellemző paramétereit a 7. táblázat tartalmazza.

## 7. táblázat A hagyományos VT esszé jellemző paraméterei

Membrán	Esszé puffer	Mosó puffer	Memb / µg/lyuk	Idő / perc	Referencia (szubsztrát koncentr.)	Referencia (inhibitor koncentr.)
ABCB1	10 mM Tris-HCl, 250 mM szukróz, 10 mM MgCl <sub>2</sub>	10 mM Tris-HCl, 250 mM szukróz, 100 mM NaCl	50	3	N-metil-quinidin (NMQ) (2 µM)	verap (100 µM)
ABCB1 kontroll	10 mM Tris-HCl, 250 mM szukróz, 10 mM MgCl <sub>2</sub>	10 mM Tris-HCl, 250 mM szukróz, 100 mM NaCl	50	3	NMQ (2 µM)	-
ABCC1	46,5 mM MOPS-Tris, 65,1 mM KCl, 7 mM MgCl <sub>2</sub>	40 mM MOPS-Tris, 70 mM KCl	50	1	LTC <sub>4</sub> (50 nM)	MK571 (150 µM)
ABCC1 kontroll	46,5 mM MOPS-Tris, 65,1 mM KCl, 7 mM MgCl <sub>2</sub>	40 mM MOPS-Tris, 70 mM KCl	50	1	LTC <sub>4</sub> (50 nM)	-
ABCC2	46,5 mM MOPS-Tris, 65,1 mM KCl, 7 mM MgCl <sub>2</sub>	40 mM MOPS-Tris, 70 mM KCl	50	8/1	E <sub>2</sub> 17βG (50 µM) /LTC <sub>4</sub>	BZB (100 µM)
ABCC2 kontroll	46,5 mM MOPS-Tris, 65,1 mM KCl, 7 mM MgCl <sub>2</sub>	40 mM MOPS-Tris, 70 mM KCl	50	8/1	E <sub>2</sub> 17βG (50 µM) /LTC <sub>4</sub>	-
ABCC3	46,5 mM MOPS-Tris, 65,1 mM KCl, 7 mM MgCl <sub>2</sub>	40 mM MOPS-Tris, 70 mM KCl	50	2	E <sub>2</sub> 17βG (1 µM)	<b>BZB</b> (100 µM)
ABCC3 kontroll	46,5 mM MOPS-Tris, 65,1 mM KCl, 7 mM MgCl <sub>2</sub>	40 mM MOPS-Tris, 70 mM KCl	50	2	E <sub>2</sub> 17βG (1 µM)	-
ABCC4	46,5 mM MOPS-Tris, 65,1 mM KCl, 7 mM MgCl <sub>2</sub>	50 mM Tris, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 250 mM szukróz, 0,02% BSA	50	8	DHEAS (0,02 µM)	MK571 (150 µM)
ABCC4 kontroll	46,5 mM MOPS-Tris, 65,1 mM KCl, 7 mM MgCl <sub>2</sub>	50 mM Tris, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 250 mM szukróz, 0,02% BSA	50	8	DHEAS (0,02 µM)	-
ABCG2	10 mM Tris-HCl, 250 mM szukróz, 10 mM MgCl <sub>2</sub>	10 mM Tris-HCl, 250 mM szukróz, 100 mM NaCl	25/50	1/4	E3S(1 µM)/MTX(100 mM)	Ko134 (1 µM)
ABCG2 kontroll	10 mM Tris-HCl, 250 mM szukróz, 10 mM MgCl <sub>2</sub>	10 mM Tris-HCl, 250 mM szukróz, 100 mM NaCl	25/50	1/4	E3S(1 µM)/MTX(100 mM)	-
ABCB11	2 mM Hepes-Tris, 100 mM KNO <sub>3</sub> , 10 mM Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 mM Tris-HCl, 100 mM KNO <sub>3</sub> , 50 mM szukróz, 103,5 µM TC	50	5	taurokolát (2 µM)	CsA (20 µM)
ABCB11 kontroll	2 mM Hepes-Tris, 100 mM KNO <sub>3</sub> , 10 mM Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 mM Tris-HCl, 100 mM KNO <sub>3</sub> , 50 mM szukróz, 103,5 µM TC	50	5	taurokolát (2 µM)	-
Patkány Abcb11	2 mM Hepes-Tris, 100 mM KNO <sub>3</sub> , 10 mM Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 mM Tris-HCl, 100 mM KNO <sub>3</sub> , 50 mM szukróz, 103,5 µM TC	50	5	taurokolát (2 µM)	CsA (100 µM)
Patkány Abcb11 kontroll	2 mM Hepes-Tris, 100 mM KNO <sub>3</sub> , 10 mM Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 mM Tris-HCl, 100 mM KNO <sub>3</sub> , 50 mM szukróz, 103,5 µM TC	50	5	taurokolát (2 µM)	-
Egér Abcb11	2 mM Hepes-Tris, 100 mM KNO <sub>3</sub> , 10 mM Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 mM Tris-HCl, 100 mM KNO <sub>3</sub> , 50 mM szukróz, 103,5 µM TC	50	5	taurokolát (2 µM)	CsA (100 µM)
Egér Abcb11 kontroll	2 mM Hepes-Tris, 100 mM KNO <sub>3</sub> , 10 mM Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 mM Tris-HCl, 100 mM KNO <sub>3</sub> , 50 mM szukróz, 103,5 µM TC	50	5	taurokolát (2 µM)	-
Egér Abcb11-HAM	2 mM Hepes-Tris, 100 mM KNO <sub>3</sub> , 10 mM Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 mM Tris-HCl, 100 mM KNO <sub>3</sub> , 50 mM szukróz, 103,5 µM TC	50	5	TCDC (2 µM)	CsA (100 µM)
Egér Abcb11-HAM kontroll	2 mM Hepes-Tris, 100 mM KNO <sub>3</sub> , 10 mM Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 mM Tris-HCl, 100 mM KNO <sub>3</sub> , 50 mM szukróz, 103,5 µM TC	50	5	TCDC (2 µM)	-

*Fluoreszcens VT:*

A hagyományos VT-hez hasonlóan kiviteleztek azzal a különbséggel, hogy az alkalmazott szubsztrátok fluoreszcens molekulák. A tesztanyagok alkalmazott

koncentrációja az ábrákban, táblázatokban illetve a megjelölt közleményekben kerül leírásra. A szűrőkön, így a vezikulákban maradt fluoreszcens molekulákat a megfelelő detektor oldattal leoldottuk, majd a fluoreszcens jelet mértük. A fluoreszcens VT esszé jellemző paramétereit a 8. táblázat tartalmazza.

### 8. táblázat A fluoreszcens VT esszé jellemző paramétereit

Transzporter	Esszé puffer	Mosó puffer	Detektor puffer	Alkalmazott membrán mennyiség (µg/lyuk)	Inkubációs idő (perc)	Referencia szubsztrát (koncentráció)	Referencia inhibitor (koncentráció)
ABCC2	46,5 mM MOPS-Tris, 65,1 mM KCl, 7 mM MgCl <sub>2</sub>	40 mM MOPS-Tris, 70 mM KCl	1N NaOH	40	30	carboxy-dichloro-fluorescein (CDCF) (7,5 µM)	BZB (150 µM)
Kontroll membrán (ABCC2-höz)	46,5 mM MOPS-Tris, 65,1 mM KCl, 7 mM MgCl <sub>2</sub>	40 mM MOPS-Tris, 70 mM KCl	1N NaOH	40	30	CDCF (7,5 µM)	-

### Membrán esszé adatok értékelése

A vezikuláris transzport kísérletekben a  $K_m$  és  $V_{max}$  értékeket a Michaelis-Menten egyenletből (1) számítottuk, miután a Hill ábrázolásból megállapítottuk a kötőhelyek számát.

(1)

$$V = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

ATPáz esszében és a gátlás esszében a vizsgált molekula által kiváltott hatást a (2) egyenlet alapján számoltuk ki:

(2)

$$v = V_{min} + \frac{V_{max} - V_{min}}{1 + 10^{-(\log EC_{50} - x) \cdot h}}$$

ahol  $v$  az aktivitás,  $V_{min}$ =minimális aktivitás,  $V_{max}$ =maximális aktivitás,  $EC_{50}$ = az 50%-os hatáshoz tartozó koncentráció,  $x$ = a tesztanyag koncentráció logaritmus,  $n_H$ = a kooperativitást jellemző Hill-szám.

A VT esszé esetében a  $K_i$  értékek meghatározására a Cheng-Prusoff képletet (3) használtuk:

(3)

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

ahol  $K_i$ = az inhibitor affinitását jellemző paraméter,  $IC_{50}$ = az 50%-os gátláshoz tartozó inhibitor koncentráció,  $S$ = a szubsztrátkoncentráció,  $K_m$ = a szubsztrát affinitását jellemző paraméter.

#### 4.7 Sejtes esszék

##### *Influx esszé*

A mérőlemezre kiültettünk a sejtvonalra optimalizált számú sejtet. Az egy vagy két napig (sejtvonal-függő) tenyésztett sejtekről leszívtuk a tápfolyadékot, és kétszer mostuk lyukanként 100  $\mu$ l HK pufferrel. A mosás után lyukanként 50-50  $\mu$ l szubsztrátot próbát valamint gátlószerrel vagy tesztanyagot tartalmazó reakcióelegyet adtunk. A tesztanyagok alkalmazott koncentrációja az ábrákban, táblázatokban illetve a megjelent közleményekben kerül leírásra. A sejteket az esszébeállításnál meghatározott ideig inkubáltuk. A reakciót hideg puffer hozzáadásával állítottuk le, majd a sejteket hideg pufferrel kétszer mostuk. Ezt követően zsebenként a sejteket 50  $\mu$ l NaOH vagy MeOH hozzáadásával, 10 percig 37 °C-on lizáltuk. A felvett anyagmennyiséget fotométer készülékkel (FluoStar Optima, BMG Labtech, Offenburg, Germany), folyadék szintillációs módszerrel (Microbeta Trilux, Perkin Elmer, Waltham MA) vagy Agilent Series 1100 HPLC készüléken történt, amihez egy egyszeres quadropole rendszerű tömegspektrométer detektor (MSD) van sorbakötve (Agilent Technologies International SARL, Morges, Switzerland). Az influx esszék legfontosabb paramétereit a 9. táblázat tartalmazza.

**9. táblázat** Az influx esszék legfontosabb paramétere

Sejtvonal	Transzporter	Expressziós rendszer	Vizsgált anyag /gátlószer	Meghatározás módja	Számolt érték
293H	SLC22A6 / OAT1	Tranziens transzfekció	PAH (25 µM) Hidroxi-fahéjsav és származékai (0,1-1000 µM)	HPLC	Transzportált mennyiség/gátlás (%)
293H	SLC22A7 / OAT2	Tranziens transzfekció	PAH(25 µM) Hidroxi-fahéjsav és származékai (2-100 µM)	HPLC	Transzportált mennyiség/gátlás (%)
293H	SLC22A8 / OAT3	Tranziens transzfekció	5-carboxifluorescein (100 µM) Hidroxi-fahéjsav és származékai (0,1-1000 µM)	Fluoreszcens detector, HPLC	Transzportált mennyiség/gátlás (%)
293H	SLC22A11 / OAT4	Tranziens transzfekció	5-carboxifluorescein (100 µM) Hidroxi-fahéjsav és származékai (2-100 µM)	Fluoreszcens detector, HPLC	Transzportált mennyiség/gátlás (%)
CHO	SLCO2B1 / OATP1B1	Stabilan transzfektált	E3S/baicalein és baicalein-glükuronid (1 és 10 µM)	Folyadék szintilláció	gátlás (%)
CHO	SLCO1B3 / OATP1B3	Stabilan transzfektált	Fluo-3/ baicalein és baicalein-glükuronid (1 és 10 µM)	Fluoreszcens detector,	gátlás (%)
MDCKII	SLCO2B1 / OATP2B1	Stabilan transzfektált	E3S/ baicalein és baicalein-glükuronid (1 és 10 µM)	Folyadék szintilláció	gátlás (%)

*Vektoriális transzport esszé*

## Sejtvonalakon

Az MDCKII alap és transzfektált sejteket 24-lyukú Millipore monolayer lemezre ültettük (Millicell 24, A=0.7 cm<sup>2</sup>, PCF 0.4 µm, Millipore, Carrigtwohill, Írország) és 3 napig 37°C-on 5% CO<sub>2</sub>- és 100% páratartalmú inkubátorban tartottuk. A kísérlet előtti napon friss tápfolyadékot adtunk a sejteknek. A Caco-2 sejteket (30-65 passzázs szám) kollagénnel (patkány farokból nyert I típusú kollagén, Sigma) bevont membránra ültettük és 21 napig 37°C-on 5% CO<sub>2</sub>- és 100% páratartalmú inkubátorban tartottuk. Minden harmadik nap friss tápfolyadékot adtunk a sejteknek. A kísérlet előtt 37°C-ra melegített HBSS-sel kétszer mostuk a sejteket és 15 percig enyhe rázatás mellett 37°C-on inkubáltuk. A monolayer kialakulását a transepithel elektromos ellenállás (transepithelial electrical resistance (TEER)) mérésével ellenőriztük a kísérlet megkezdése előtt.

A vizsgált anyagokat általában dimetil-szulfoxid (DMSO) törzsoldatból hígítottuk, a DMSO végső koncentrációja nem haladta meg a 0,5 V/V%-ot. A kísérlet során mértük az A-B és B-A irányú anyagmozgást. A vizsgálat kezdetekor a donor kompartmentből, valamint bizonyos időközönként a receptor kompartmentből mintát vettünk (100 µl) és meghatároztuk a vizsgált anyag- vagy a referencia anyag

koncentrációját fluoriméterrel, folyadéksztillátorral vagy LC-MS-sel. A kérdéses anyag látszólagos permeabilitási együtthatóját 4. egyenlet alapján számítottuk:

4)

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0}$$

ahol  $dQ/dt$  az egységnyi idő alatt a donorból a receptor oldalra átjutott abszolút anyagmennyiség,  $A$  a membrán felülete,  $C_0$  a kiindulási koncentráció a donor oldalon. A B-A és A-B irányokban mért  $P_{app}$ -ok aránya az ún. efflux arány, amivel a transzporter aktivitás jellemezhető. A vektoriális transzport esszék legfontosabb paraméterei a 10. táblázatban vannak felsorolva.

#### Primer hepatocita szendvics kultúrán

A hepatocita szendvics kultúrát előállítását a 4.2 fejezetben írtam le. A patkány sejteket 2 nap a humán sejteket 5 nap szendvics kultúrában való kultiválás után használtuk. A hepatocytákhoz jelölt szubsztrát próbát adtunk HBSS-ben, majd 10 percig 37°C-on 5% CO<sub>2</sub>- és 100% páratartalmú inkubátorban tartottuk. Ezután a puffert eltávolítottuk, a sejteket 3x2 ml jéghideg Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-mentes HBSS-el mostuk. Majd 0,5 ml, a modulátort tartalmazó standard vagy Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-mentes HBSS-t adtunk a sejtekhez. A puffert 20 perc inkubálás után eltávolítottuk, és a radiokaktivitást mértük. A nem-specifikus kötést a sejtek nélküli, 2 réteg kollagénnel kezelt Petri-csészékhez való kötődésből számoltuk. A kísérlet további paraméterei 10. táblázatban és a 32. ábrán vannak feltüntetve.

#### Primer patkány agyi endothel kultúrán

Az RBEC kultúra előállítását a 4.2 fejezetben írtam le. Az RBEC kísérletekhez az endothel és pericyta kultúrát tartalmazó lemezeket kivettük a glia kultúrát tartalmazó edényekből. A filtereket Ringer-HEPES oldattal mostuk, és a mérést a sejtvonalakra leírt módszer szerint végeztük. A kísérletek paraméterei a 10. táblázatban valamint a 33. ábrán vannak megadva (Sziraki 2011).

**10. táblázat** A vektorális transzport esszék legfontosabb paramétere

Sejtvonal	Transzporter	Vizsgálat módja	Vizsgált anyag (koncentráció)/gátlószer	Meghatározás módja	Számolt érték
MDCKII és Caco-2	ABCG2 / BCRP	Szubsztrát esszé	Chlorothiazid(100µM)	HPLC-MS	Papp, ER
Caco-2	ABCB1 / MDR1	gátlásesszé	3H-digoxin (20 µM) / Acetochlor, Alachlor, Metachlor (100 µM)	Folyadék szcintilláció	A-B permeabilitás
MDCKII	ABCB1 / MDR1	Szubsztrát esszé	Seliciclib (5µM)	HPLC-MS	Papp (időfüggés)
MDCKII	ABCB1 / MDR1	Szubsztrát esszé	Quinidin (10µM)	HPLC	Papp (időfüggés)
MDCKII	ABCB1 / MDR1	gátlás esszé	Digoxin (5µM)/LY335979 és PSC8333 és quinidin	Folyadék szcintilláció	Papp , ER
Hepatocyt szendvics kultúra	ABCC2/Abcc2 / MRP2/Mrp2	Gátlás esszé	<sup>3</sup> H-E2-17βG (1 µM) / indomethacin (10,100, 1000 µM), probenecid (50, 250, 2500 µM), BZB ((1,10 µM), sulfasalazin (10, 100 µM)	Folyadék szcintilláció	Billiáris efflux (%; kontroll 100%)
RBEC	Abcb1a / Mdr1a	Szubsztrát esszé	quinidin (0,1 µM, 1 µCi/ml) / Ly335979 (1 µM); PSC833 (1 µM)	Folyadék szcintilláció	Papp , ER

*Festéktranszport esszék*

Calcein esszében az ABCB1 funkció méréséhez ABCB1-et túlexpresszálok K562-MDR, MDCKII-MDR1 vagy hCMC/D3 míg az ABCC1 funkció méréséhez az ABCC1-et túlexpresszálok HL60-MRP sejtvonalat használtuk. Hoechst esszében, az ABCG2 funkció mérésére az ABCG2 transzfektáns PLB985-BCRP vagy HEK293-BCRP sejtvonalakat használtuk, melyek magasan expresszálták az ABCG2 fehérjét.

A calcein-AM (calcein-acetoximetilészter) olyan nem fluoreszcens molekula, ami passzívan bejut a sejtekbe, és ott az endogén észterázok az AM csoport hasításával fluoreszcens calceint hoznak létre, ami már membrán impermeabilis. A calcein-AM az ABCB1 és ABCC1 transzporterek szubsztrátja. A transzportereket túlexpresszálok sejtekben tehát alacsony a fluoreszcencia. A transzporterek teszt molekula általi gátlása megnövekedett sejt-asszociált fluoreszcenciával jár. A kísérlet során a termelődő szabad calcein mennyiségét detektáljuk az idő függvényében.

A Hoechst 33342 festék a dupla szálú DNS-el fluoreszcens adduktot képez, amelyet fluoriméterrel detektálhatunk (Adhikary 2000). A festékmolekula szubsztrátja az ABCG2 transzporternek. A transzportert túlexpresszálok sejtekben emiatt alacsony a fluoreszcencia. A transzporterek teszt molekula általi gátlása megnövekedett sejt-asszociált fluoreszcenciával jár. A kísérlet során az intracelluláris festék mennyiségét detektáljuk az idő függvényében.

A sejteket Hank's puffében mostuk, majd meghatározott sejtszámban és térfogatban kitettük őket 96-lyukú lemezre és Hank's oldatban 37°C-on 30 percig inkubáltuk a specifikus inhibitor/vizsgált anyag jelenlétében.

A Calcein esszénél a sejteket 100 µl térfogatban inkubáltuk és a reakciót 100 µl 250 nM calcein-AM-et és BSA-t tartalmazó Hank's oldat hozzáadásával indítottuk. A sejtek fluoreszcenciáját 8 percen át követtük 485 nm excitációs 538 nm emissziós beállítás mellett.

A Hoechst esszé reakcióját hasonló módon, de 15 percig követtük 350 nm excitációs és 460 nm emissziós beállítás mellett.

A vizsgált anyag dózis-hatás görbáját az 5. egyenlet alapján rajzoltuk meg.

$$\text{Gátlás (\%)} = \frac{R_{\text{drog}} - R_{\text{alap}}}{R_{\text{max}} - R_{\text{alap}}} * 100$$

ahol az  $R_{\text{drog}}$  az aktuális tesztanyag adott koncentrációjához jelöli, az  $R_{\text{alap}}$  a gátlószer nélküli kontrollhoz, az  $R_{\text{max}}$  pedig a maximális gátláshoz tartozó fluoreszcencia-idő meredekséget jelölik. Az  $R_{\text{max}}$  értékeket referencia inhibitorokkal állapítottuk meg, ez Calcein esszénél verapamil (60 µM), Hoechst esszénél Ko134 (300 nM) volt.

A gátlás% - bemérési koncentráció görbére a 2. egyenletnek megfelelő függvényt illesztettünk, amiből  $IC_{50}$  értékeket kaptunk.

### *Citotoxicitás esszé*

A mikrotiter lemezre 200 µl tápfolyadékban meghatározott számú sejtet ültettünk ki, amelyeket 24 órán keresztül 37°C-os 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó inkubátorban tartottunk. Ezt követően a DMSO-ban oldott molekulákat tápfolyadékban előre hígítottuk és 50 µl-ben adtuk a sejtszuszpenzióhoz. A kontrollok ebben az esetben csak DMSO-t tartalmazó tápfolyadékot kaptak. Az inkubáció 96 órán keresztül tartott 37°C-os 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó inkubátorban. A MDCKII és MDCKII-MDR1 sejtvonalak esetében a kiindulási sejtszám 1x10<sup>4</sup> sejt/kút, a HL60 és HL60-MDR1, valamint a K562 és K562-MDR sejtvonalaknál pedig 5x10<sup>4</sup> sejt/kút volt. A 96 óra elteltével az élő sejtek arányát MTS reakció segítségével határoztuk meg a gyártó által ajánlott kísérleti körülmények mellett (Promega, Madison, WI, USA). A kapott értékeket ábrázoltuk az alkalmazott drogkoncentrációk függvényében és meghatároztuk az  $IC_{50}$  értékeket.



A görbeillesztésekhez, valamint a kinetikai paraméterek számításához a PRISM szoftvert használtuk (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). A szignifikanci számításokat -ha másként nem jelezzük- páratlan t-próbával végeztük

#### 4.8 *In vivo* esszék

##### *Epevezeték kanülációs technika alkalmazása a canaliculáris efflux transzportereken történő gyógyszer interakciók vizsgálatára*

A kísérletekhez szükséges állatokat (250-300 g-os Wistar hím patkányok) a Charles River Magyarország Kft-től (Budapest, Hungary) szereztük be. Az állatokat a kísérlet megkezdése előtt legalább egy hétig temperált hőmérsékletű állatszobában tartottuk 12 órás megvilágítás/sötét ciklus beállítása mellett, vízhez és táphoz korlátozás nélküli hozzájutással. A kísérletek előtti nap délutánjától az állatokat éhezettük vízmegvonás nélkül. A kísérleti nap reggelén urethan altatás (1 g/kg; ip) mellett elkülönítettük az epevezetékét és bevezettük a kanült (Fine Bore Polythene Tubing 800/100/200; Smiths Medical Int. Ltd.).

A sikeres epevezeték kanülálást követően az állatok intraperitoneálisan 300  $\mu$ l fiziológiás sóoldatban nyomjelzett transzporter szubsztrátot ( $^3\text{H}$ -E2-17 $\beta$ G) és különböző transzporter modulátort, a kontroll állatok a szubsztrátot és a modulátor vehikulumát kapták. A kezelést követő első két órában az epegyűjtés 10 percenként, a következő 2 órában 20 percenként, majd további 1 órában 30 percenként előre lemért csövekbe történt. A folyadék háztartás egyensúlyának fenntartásához az állatok óránként 2 ml fiziológiás sóoldatot kaptak sub cutan. A gyűjtőcsöveket újra lemértük, majd a minták  $^3\text{H}$ -E2-17 $\beta$ G szintjét folyadékszintillációs számláló segítségével határoztuk meg. A nyers adatokból a következő paramétereket számítottuk ki: i.) Az epemintákban lévő jelzett szubsztrát radioaktivitását (dpm/mg epe); ii.) a szubsztrát kumulatív exkrécióját (dózis %-ban); iii.) az epefolyás sebességét (mg/10 perc). Valamennyi műtéti és kezelési eljárás az MTA Központi Kémiai Kutatóintézetének Állatetikai Bizottsága jóváhagyásával került alkalmazásra.

*Epevezeték kanülációs technika alkalmazása baicalein-glükuronid biliáris clearance vizsgálatára*

A kísérletekhez használt 260-280 grammos hím Sprague-Dawley patkányok a Hong Kongi Kínai Egyetem Laboratóriumi Állat Ellátó Centrumtól kerültek beszerzésre. Az állatokat a kísérlet megkezdése előtt legalább egy hétig temperált hőmérsékletű állatszobában tartottuk 12 órás megvilágítás/sötét ciklus beállításával, vízhez és táphoz korlátozás nélküli hozzájutással. A kísérletek előtti nap délutánjától az állatokat éhezettük vízmegvonás nélkül. Az állatok altatása 60 mg/kg ketamin és 6 mg/kg xylazin elegy intramuscularis injekciójával történt. A jobb oldali vena jugularis, a vena femoralis és az epevezeték kanülálása után a baicalein glükuronidot (1,1 mg/kg) intravénásan adtuk. A vérmintákat a dozírozást követően (0,25, 0,5, 1, 3, 10, 30 és 60 perckor, az epe mintákat a 0-15, 15-30, 30-45, 45-60 és 60-75 perces intervallumokban gyűjtöttük. A plazma és epe mintákat baicalein glükuronid tartalmát glükuronidáz emésztés után mért baicalein mennyiségéből határoztuk meg HPLC UV kromatográfiával (Zhang 2011).

*Mikrodialízis technikák alkalmazása a vér–agy gáton történő gyógyszer interakciók vizsgálatában*

A kísérletekhez szükséges állatokat (280-360 g-os Wistar hím patkányok) a ToxiCoop Kft-től (Budapest, Hungary) szereztük be. A kísérleteket minden esetben a laboratóriumi állatokkal végzett munkálatok nemzetközileg meghatározott irányelveinek/előírásainak követésével, az Állategészségügyi Igazgatóság által kibocsájtott hatósági engedély alapján végeztük.

A kísérletek döntő többségében két-szondás mikrodialízis technikát alkalmaztunk klorál hidráttal altatott állatokon. Egy adott vizsgálati anyag fehérjéhez nem kötött frakciójának az agyba való bejutásának és a vér–agy gáton történő gyógyszer kölcsönhatások közvetlen meghatározására ez a technika a legcélravezetőbb. A technikával egyidejűleg gyűjtünk perifériás (vena jugularis) és agyi (frontális cortex) dializátum mintákat. Az eljárások során a széles körben alkalmazott mikrodialízis technikák eszközeit nemzetközileg elismert cégektől (CMA, Microbiotech) szereztük

be. A jobboldali nyaki vénába CMA/20-as típusú perifériás mikrodialízis szondát ültettünk be, a frontális kortexbe pedig CMA/12-es az agyi mikrodialízis szondát helyeztünk be. Az agyi szonda szterotaxikus készülékben történő behelyezésénél a bregmához viszonyított -a Paxinos patkány agy-atlasz (Paxinos and Watson 1998) alapján választott- koordináták a következők: AP = +3.0 mm, ML = 1.5, DV = -4.5. Az állatok megfelelő testhőmérsékletét rektális hőmérőn keresztül szabályozott elektromos fűtésű melegítőlap (CMA/150) segítségével biztosítottuk a kísérlet alatt.

Az altatott állatos kísérletek némelyikénél két agyi mikrodialízis szondát és egy vénás szondát ültettünk be, s az ún. retrodialízis technikát alkalmaztuk. A retrodialízis kísérletekben a másik oldali frontális cortexbe is beültettünk egy agyi mikrodialízis szondát. A retrodialízis technika segítségével lehetővé válik egy-egy transzporter szubsztrát agyi penetrációjának összehasonlító vizsgálata két ellenoldali félteke esetén.

A két- ill. három-szondás mikrodialízis technikát alkalmaztuk nem-altatott állatokon is. Ilyen kísérleteknél az első lépés az ún vezető-kanül beépítése az adott agyterületbe a tényleges mikrodialízis kísérlet előtt 4 – 8 nappal. Ilyen kísérleteknél a perifériás mikrodialízis szondát a kísérletet megelőző nap délutánján ültettük be a nyaki vénába, altatás mellett.

Az altatott állatos kísérleteknél a transzporter szubsztráttal és az inhibitorral való kezelés a combvénába elhelyezett kanülon keresztül történt. A retrodialízis kísérletekben az inhibítort és annak vehikulumát a perfúziós folyadékkal juttattuk az adott agyterületbe. Az éber állatos kísérletben a kezeléseket intraperitoneális adagolás mellett történtek. A dializátum minták gyűjtése a kezelés előtti -120 – 90 perctől a kezelést követő 210 – 300 perces időszakban történt általában 1,0 µl/perc-es áramlási sebességet alkalmazva. Az agyi szondákat mesterséges cerebrospinalis folyadékkal (CSF), a vena jugularisban elhelyezett szondákat pedig perifériás folyadékkal (PPF) perfundáltuk CMA 102 microdialysis pumpa segítségével. A mintákat 300 – µl-es polietilén csövekbe gyűjtöttük amelyeket a gyűjtési periódus végén szárazjégbe helyeztünk. A kísérlet végén a perifériás és agyi dializátum mintákat -70 °C-os mélyhűtőbe helyeztük s tároltuk a bioanalitikai laborba való szállításig.

## dc\_350\_11

A dializátum minták quinidin koncentrációinak meghatározása HPLC-vel kombinált fluoreszcens detektoros módszerrel történt. Az agyi és vénás dializátumok quinidin-szintjeinek nyers adataiból koncentráció – idő görbéket Microsoft Excel és MicroCal Origin programokkal készítettük. Ez utóbbi segítségével határoztuk meg a görbe alatti területeket (AUC) is.

Az egyes kísérleti csoportokból származó AUC, C<sub>max</sub> és AUC<sub>agy</sub>/AUC<sub>vér</sub> arányok statisztikai kiértékelése ANOVA, ill az azt követő Duncan teszt segítségével történt. A kísérleti csoportok vénás és agyi értékeinek összehasonlítását pedig t-teszt segítségével végeztük.

## 5 Eredmények

Az egyes alfejezeteiben az adott munka rövid bevezetését, kérdésfelvetését követi a legfontosabb kísérleti eredmények leírása szöveges, táblázatos és ábra formában. Az egyes alfejezetek az eredmények értelmezésével és egy rövid konklúzióval zárulnak. A disszertáció által lefedett cikkek azon adataira, melyek nem kerültek be a disszertációba a referencia és azon belül az ábra illetve táblázat megadásával hivatkozom.

Kollaborációs munkák esetén a konkrét eredményeket leíró alfejezetek elején, a jelzett lábjegyzetben listázom azokat a vizsgálatokat melyek kollaboráló partnereink végeztek és azokat a vizsgálatokat, melyek a Solvonál készültek. Az egyes tanulmányokat a közleményben levelező szerző partner kezdeményezte. A vizsgálatok tervezése, az eredmények értékelése és a közlemények kéziratának elkészítése közös munka eredménye, amiben a levelező szerző partner játszott vezető szerepet.

### 5.1 Expressziós rendszerek optimalizálása gyógyszer – transzporter kölcsönhatások vizsgálatára

A gyógyszer – fehérje kölcsönhatások in vitro tesztelésénél mindig kritikus kérdés a specificitás. Az egyik legegyszerűbb módja a specificitás biztosításának a fehérje magas expressziója egy heterológ rendszerben, ahol az endogén fehérje „háttér” expressziójával nem kell számolni. A baculovírus – rovarsejt rendszer sok tekintetben megfelelt ennek, hiszen kivételesen magas expressziót ad és nincs emlős fehérje „háttér” expresszió. Az ABC transzporterek esetében további előnye a rendszernek, hogy ez az expresszió már lehetővé teszi egy kisebb érzékenységű teszt, mint az ATPáz esszé alkalmazását. A rendszernek potenciális hátrányai is vannak, ugyanis (i) rovarsejtekben a fehérjék glikozilációja különbözik az emlős sejtekben látott glikozilációtól (Altmann 1999), és (ii) a rovarsejt membránok lipidösszetétele más, elsősorban az alacsonyabb koleszterin tartalom miatt (Gimpl 1995). A glikoziláció fontossága az ABC transzporterek aktivitása szempontjából megkérdőjelezhető (Ozvegy 2001), hiszen a glikozilációs helyen mutált fehérjék stabilitása, és

funkcionális aktivitása sem változott lényegesen (Mohrmann 2005). Az alacsonyabb koleszterin tartalom azonban jelentős faktor lehet, hiszen az már ismert volt, hogy – elsősorban- az olyan apikális membránban expresszáldó transzporterek, mint az ABCB1 (Bacso 2004) és az ABCC2 (Tietz 2005), a koleszterin gazdag raft-caveola membrán mikrodoménekben lokalizálódnak.

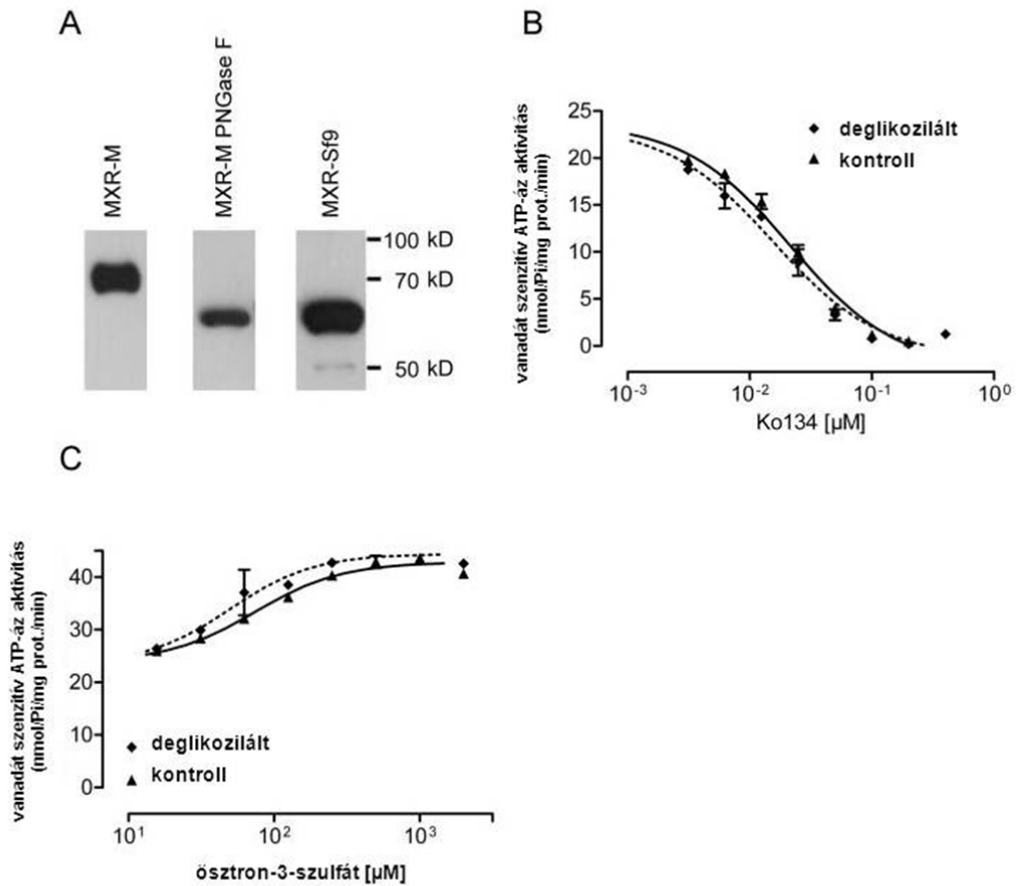
#### 5.1.1 A membrán–koleszterin tartalom hatása ABCG2 fehérje aktivitására<sup>1</sup>

Releváns közlemények: (Glavinas 2007; Pal 2007a; Pal 2007b; Glavinas 2008).

Saját eredményeink megerősítik, hogy a humán sejtekre jellemző glikoziláció nem játszik szerepet az ABCG2 fehérje aktivitásában, hiszen a humán sejtekben expresszáldott ABCG2 fehérje aktivitása nem különbözött a peptid-N-glycanáz által deglikolizált fehérje aktivitásától sem az ATPáz aktiválás, sem az ATPáz gátlás esszéiben (7. ábra).

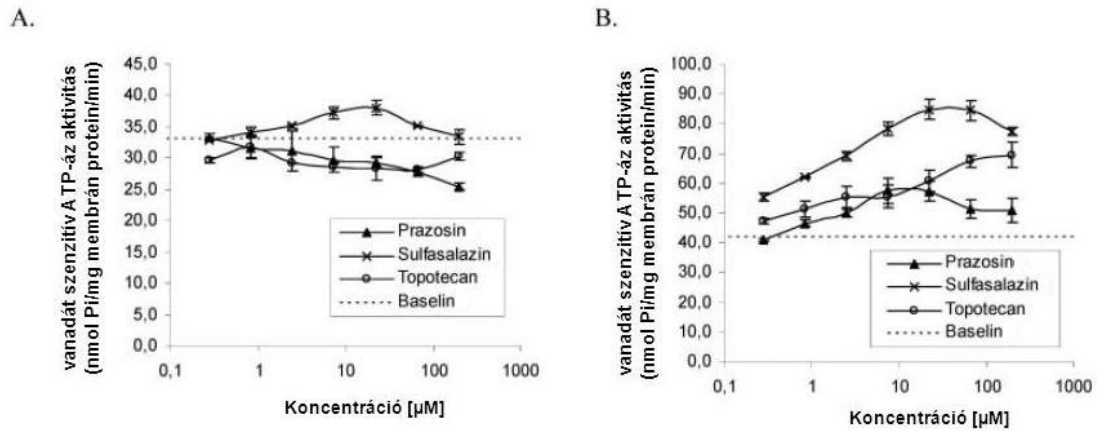
---

<sup>1</sup> A ciklodextrinek és a koleszterin-ciklodextrin komplexeket a kollaboráló partner állította elő. A biológiai/farmakológiai munkát a Solvo végezte.



**7. ábra** Deglikoziláció hatása az ABCG2 transzporter aktivitására. (A) Western blot analízis a humán sejtvonalonban (MXR-M), Peptid-N-glycanázzal deglikozilált MXR-M-ben és rovarsejtben expresszált ABCG2 fehérjén. (B) Ko134-es alapaktivitás gátlás és (C) ösztron-3-szulfát aktiválás az MXR-M és a deglikozilált MXR-M membránon.

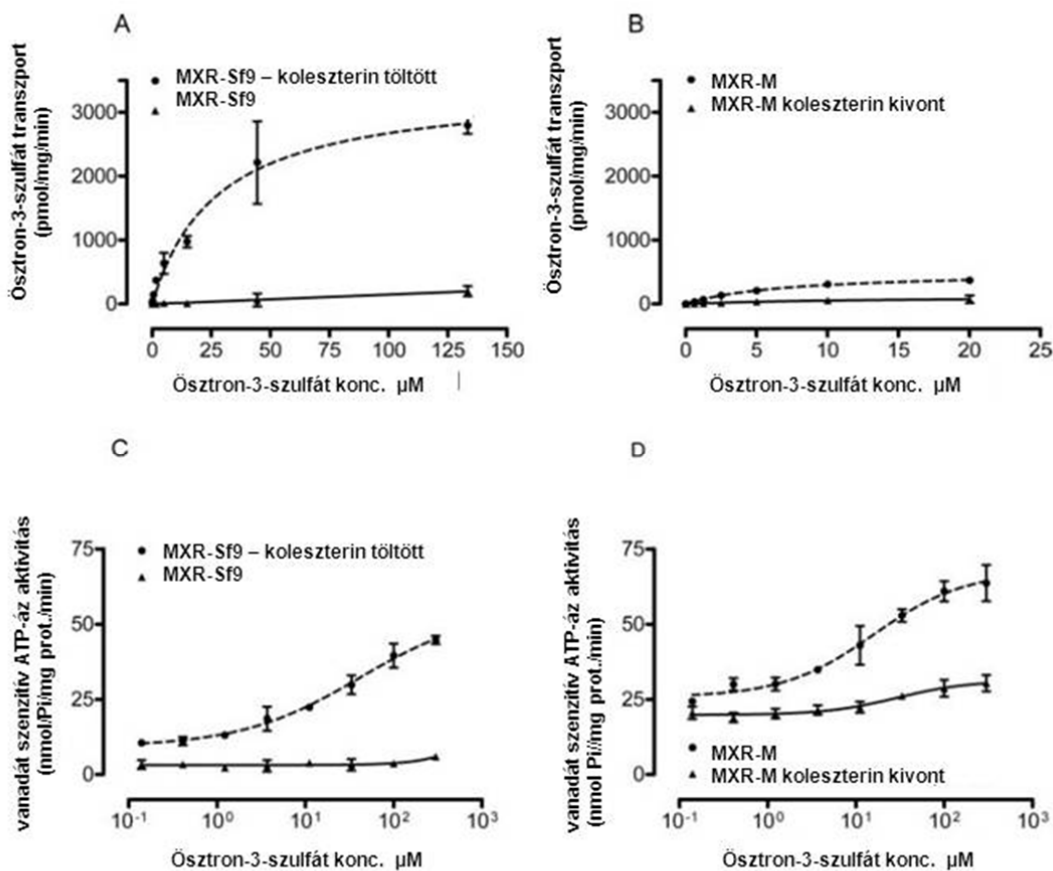
A membrán koleszterin tartalomnak viszont jelentős szerepe van az ABCG2 fehérje aktivitásában. A humán sejtekben expresszált ABCG2 fehérje ATPáz aktivitása stimulálható volt ismert transzport szubsztrátokkal, úgymint a sulfasalazin, prazosin, topotecan, ösztron-3-szulfát, míg az Sf9 rovarsejtvonalonban expresszált ABCG2 fehérje egyedül a sulfasalazin esetében mutatott a humán sejtvonalonban expresszált fehérjénél lényegesen alacsonyabb stimulációt (8. ábra; Pal 2007a Figure 4).



**8. ábra** ABCG2 ATPáz stimulálása MXR-Sf9 (A) és MXR (B) membránokban.

Ha az Sf9 membránoknál mintegy ötször magasabb koleszterintartalmú humán membránokból ciklodextrin segítségével kivontuk a koleszterint, ezek a membránok is elvesztették aktíválhatóságukat (Pal 2007a Figure 4.). Az ösztron-3-szulfát szubsztrát segítségével meg tudtuk mutatni, hogy a koleszterin potenciózás nem csak az ATPáz esszében, hanem a vezikuláris transzportban is megfigyelhető (9. ábra), és a két aktivitás koleszterin függése korrelál (Pal 2007a Figure 8).





**9. ábra** A vezikuláris transzport és az ATPáz aktivitás függése a membrán koleszterin tartalomtól. Az ösztron-3-szulfát transzportot (A, B) és ezzel korrelációban az ösztron-3-szulfát indukált ATPáz aktivitást (C,D) is stimulálja a membrán koleszterin a rovarsejtekben (MXR-Sf9; A, C) és a humán sejtekben (MXR-M; B,D) expresszált ABCG2 fehérje esetében is.

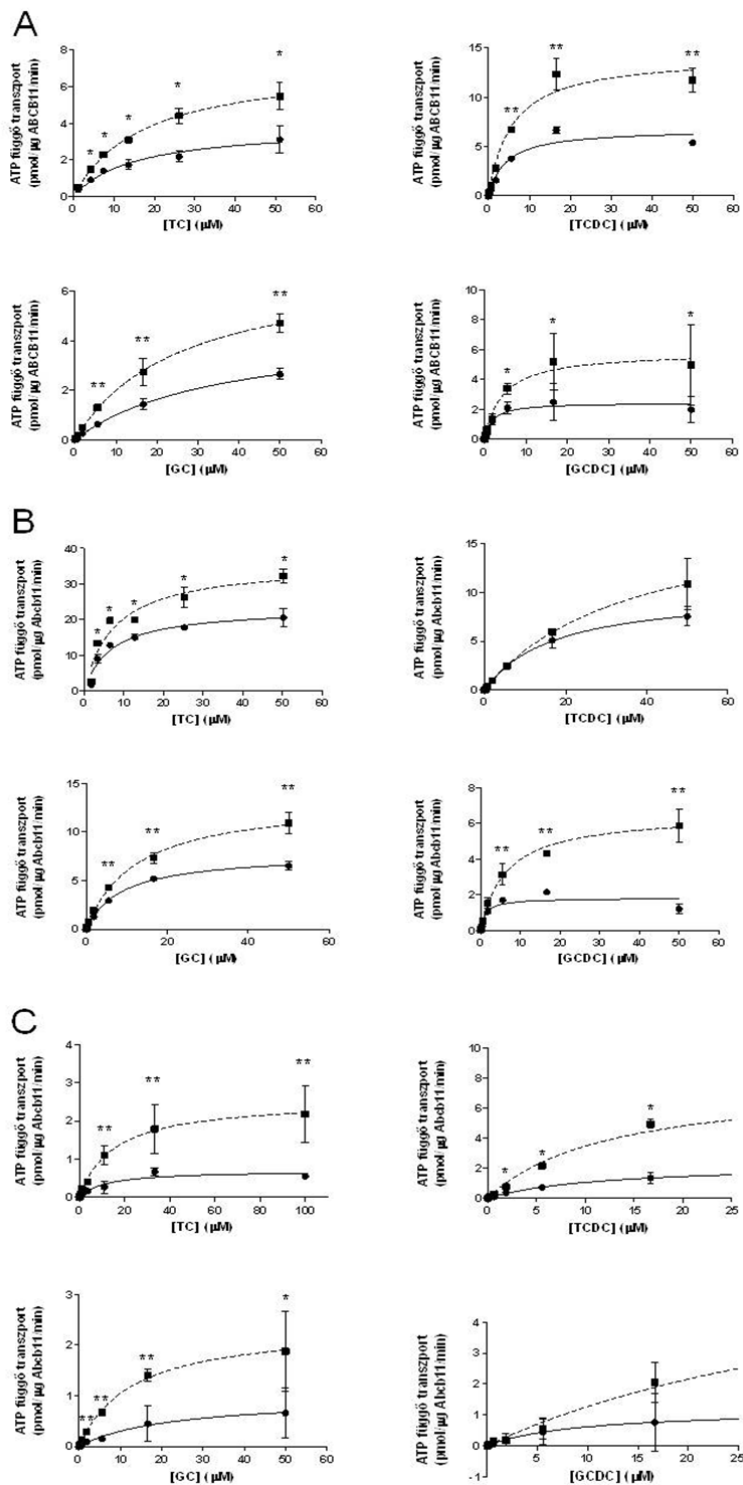
### 5.1.2 A membrán-koleszterin tartalom hatása ABCB11 fehérje aktivitására<sup>2</sup>

Releváns közlemények: (Kis 2009a; Kis 2009c; Kis 2011).

Az ABCG2 fehérjéhez hasonlóan az ABCB11 fehérje, a hepatocyták canaliculáris membránjában expresszáldó, epesó transzportért felelős fehérje is koleszterin-

<sup>2</sup> A ciklodextrineket és a koleszterin-ciklodextrin komplexeket a kollaboráló partner állította elő. A biológiai/farmakológiai munkát a Solvo végezte.

függő transzport aktivitást mutatott. A humán, patkány és egér ABCB11/Abcb11 ortológok egyaránt megnövekedett transzportsebességet mutattak a koleszterinrel feltöltött BSEP-HAM / Bsep-HAM membránban (10. ábra, Kis 2009a Table 1). A vizsgálatokat elvégeztük a 4 legfontosabb epesóra, és szinte egyöntetűen megnövekedett transzportsebességet találtunk mind a 3 fajból származó transzporterek esetében (10. ábra, Kis 2009a Table 1). A legjelentősebb potencírozó hatást a patkány transzporterén mértük (10. ábra, Kis 2009a Figure 2).



**10. ábra** A kontroll (teli kör) és koleszterinkezelt (teli négyzet) humán (A), egér (B) és patkány (C) Abcb11 fehérje általi epesótranszport. A transzport értékek a preparátumok ABCB11/Abcb11 tartalmára lettek korigálva. A statisztikai analízist a Wilcoxon-próbával végeztük, \*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.05$ .

## dc\_350\_11

Az koleszterin szint jelentős hatással volt az ABCB11/Abcb11 transzporterek aktivitására, viszont semmilyen trend nem volt megfigyelhető a  $K_m$  értékekben (11. táblázat). Az intrinzik clearance ( $V_{max}/K_m$ ) értékek ennek megfelelően emelkedtek a koleszterin töltés hatására (11. táblázat).

11. táblázat Koleszterin hatása az ABCB11/Abcb11 transzporterek  $K_M$  és intrinszik clearance értékeire

	Humán ABCB11				Egér Abcb11				Patkány Abcb11			
	Kontroll		HAM		Kontroll		HAM		Kontroll		HAM	
	$K_M \mu\text{M}$	$V_{\max}/K_M$ $\mu\text{l}/\mu\text{g}/\text{min}$	$K_M \mu\text{M}$	$V_{\max}/K_M$ $\mu\text{l}/\mu\text{g}/\text{min}$	$K_M \mu\text{M}$	$V_{\max}/K_M$ $\mu\text{l}/\mu\text{g}/\text{min}$	$K_M \mu\text{M}$	$V_{\max}/K_M$ $\mu\text{l}/\mu\text{g}/\text{min}$	$K_M \mu\text{M}$	$V_{\max}/K_M$ $\mu\text{l}/\mu\text{g}/\text{min}$	$K_M \mu\text{M}$	$V_{\max}/K_M$ $\mu\text{l}/\mu\text{g}/\text{min}$
<b>TC</b>	15,0 ± 3,6	0,25 ± 0,02	17,0 ± 1,1	0,42 ± 0,01	6,7 ± 2,1	3,41 ± 0,23	7,6 ± 2,8	4,70 ± 0,43	11,7 ± 5,5	0,06 ± 0,00	15,3 ± 1,3	0,16 ± 0,0
<b>GC</b>	35,5 ± 1,1	0,12 ± 0,01	25,9 ± 0,9	0,27 ± 0,04	8,84 ± 0,3	0,88 ± 0,08	12,3 ± 1,0	1,08 ± 0,4	22,1 ± 3,8	0,04 ± 0,00	12,8 ± 0,9	0,18 ± 0,0
<b>TCDC</b>	4,2 ± 1,7	1,59 ± 0,3	5,7 ± 1,5	2,49 ± 0,04	17,1 ± 0,3	0,59 ± 0,08	36,5 ± 0,2	0,51 ± 0,07	11,8 ± 1,3	0,19 ± 0,06	12,6 ± 2,3	0,62 ± 0,1
<b>GCDC</b>	1,7 ± 0,6	1,38 ± 0,03	4,3 ± 1	1,36 ± 0,13	1,89 ± 0,7	1,42 ± 0,2	4,75 ± 0,7	1,36 ± 0,3	15,9 ± 2,0	0,12 ± 0,08	45,9 ± 10,2	0,15 ± 0,07

A kontroll és a HAM egér, patkány és humán ABCB11 fehérje általi TC, GC, TCDC, GCDC transzportok  $K_M$  és  $V_{\max}/K_M$  értékei.

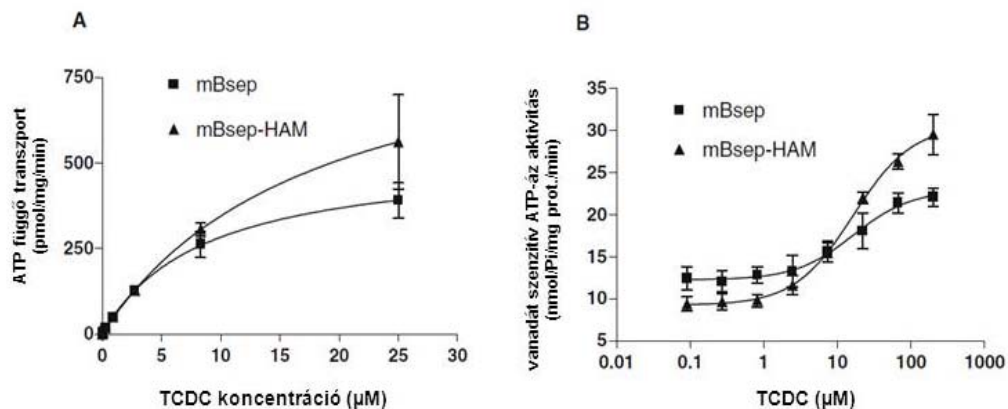
Ezzel analóg módon az ABCB11/Abcb11 taurokolát transzport gyógyszerek általi gátlását jellemző  $IC_{50}$  értékekben sem volt tendenciózus változás, kivéve a cyclosporin A által kiváltott gátlást, ahol mintegy 10-szer kevésbé volt potens a gyógyszer gátló hatása a koleszterinnel feltöltött membránban (ABCB1-HAM), mint a koleszterin szegény Sf9 membránban (18,9  $\mu$ M szemben a 2,0  $\mu$ M-al) (12. táblázat). Tudva, hogy a gyógyszerek ABCB11-mediált epesó transzportjának gátlása epefolyási zavarokhoz, és azt követően kolesztázishoz vezethet, a gyógyszerek ABCB11 transzporter gátló potenciáljának pontos, kvantitatív ismerete igen nagy gyakorlati/klinikai jelentőséggel bír.

**12. táblázat** Koleszterin feltöltés hatása a humán ABCB11 taurokolát transzport gátláson mért  $IC_{50}$  értékekre

	ABCB11-CTRL	ABCB11-HAM
	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	
Troglitazon	8,4	9,5
Cyclosporin A	2,0	18,9
Glibenklamid	11,3	14,7
Valinomicin	0,7	1,0
Vinblastin	57,3	62,0
Rifampicin	10,5	18,8
Clofazimin	2,3	5,4
Reszerpin	2,8	4,9
Etinilösztadiol	15,7	17,1

Az egér Abcb11 transzporter aktivitása megengedi, hogy a szubsztrát stimulálta ATPáz aktivitás is mérhető legyen (Noe 2001). Az egér Abcb11-et expresszáló Sf9 sejtekből izolált membrán koleszterinnel való feltöltése kettős hatással volt az ATPáz profilra. Egyrészt csökkentette az alapaktivitást, másrészt –a várakozásoknak

megfelelően- növelte a szubsztrát indukálta aktivitás növekedést (11. ábra). A két hatás eredőjeként egy szűrésre alkalmas tesztet nyertünk.



**11. ábra** Koleszterin feltöltés hatása az egér Abcb11 taurokolát transzport (A) és taurokenodeoxikolát által stimulált ATPáz (B) aktivitására

A taurokenodeoxikolát által indukált egér Abcb11 ATPáz aktivitás gyógyszerek általi gátlásának  $IC_{50}$  értékei hasonló sorrendet adtak, mint a humán ABCB11 taurokolát transzport gátlás  $IC_{50}$  értékei (13. táblázat). Mindezek figyelembevételével kijelenthető, hogy az egér Abcb11 ATPáz gátlás egy elfogadható, nem-radioaktív teszt gyógyszerek kolesztatikus potenciáljának megbecslésére.

**13. táblázat** Korreláció a taurokenodeoxikolát (TCDC) stimulált egér Abcb11 ATPáz, a egér Abcb11 és humán ABCB11 taurokolát transzport gátlás IC<sub>50</sub> értékei között.

Kölcsönható molekula	IC <sub>50</sub> (µM)		
	TCDC stimulált ATPáz	TCDC vezikuláris transzport	TC vezikuláris transzport
CsA	3,5	7,2	2,0
Glibenklamid	45	120	5,0
Rifamicin SV	62	105	8,0
Ketokonazol	33	>100	15
Troglitazon	33	97	20
Rifampicin	>100	Nem volt mérhető kölcsönhatás	50

## 5.2 Transzporter szubsztrát próbák és referencia inhibitorok validálása *in vitro* ADME vizsgálatok céljára

A gyógyszer – transzporter kölcsönhatásokat tesztelő vizsgálatok két csoportra oszthatók (i) a szubsztrát esszékre és a (ii) gátlás esszékre. A kétféle tesztet célszerű külön kezelni, mert egy szubsztrát nem biztos, hogy inhibitor is a farmakológiailag releváns tartományban. Ezt mutatják az ABCB1 transzporterre a Polli labor (Polli 2001; Rautio 2006) adatai, miszerint a vektoriális transzport esszében (monolayer efflux) mért transzport, és az ugyanabban a rendszerben mért digoxin transzport gátlás között nagyon szerény a korreláció (14. táblázat). Valamivel jobb a korreláció az ATPáz és a digoxin transzport gátlás eredményei között (14. táblázat). A két gátlás esszé (Calcein esszé és digoxin transzport gátlás) között a korreláció sokkal jobb (14. táblázat). Említésre méltó, hogy a Calcein esszé volt az érzékenyebb a két gátlás teszt közül.



**14. táblázat** Korreláció a MDCKIIMDR1-en mért vektoriális transzport, ABCB1 ATPáz és MDCKIIMDR1-en mért digoxin transzport gátlás között. A táblázat a Polli 2001 JPET és Rautio 2006 DMD cikkekben közölt eredmények alapján készült.

Korreláció	Vektoriális transzport / Digoxin transzport gátlás	ATPáz / Digoxin transzport gátlás	Calcein assay / Digoxin transzport gátlás
Y / Y	3	4	6
Y / N	8	6	2
N / Y	3	2	
N / N	5	7	13
<b>Teljes korreláció</b>	8/19	11/19	19/21

Mivel az ABC efflux transzportereknek két egymással kapcsolt aktivitásuk (transzport és ATPáz) van, így szubsztrátok azonosítására mindkét esszé típus számításba jöhet. A transzport esszéknek öt változata használt a gyógyszeriparban, a vektoriális transzport esszé, a vezikuláris transzport esszé, a sejtes felvétel (uptake), a sejtes efflux és a citotoxikus szubsztrátok felhasználásával működő citotoxicitás esszé. Az utóbbi három ritkábban, illetve az utolsó csak citotoxikus anyagokra alkalmazható, ennek következtében ezekre komolyabb adatbázisok nem léteznek. A vezikuláris transzport esszé szubsztrát esszéként való felhasználása is limitált, mert csak nagyon alacsony passzív permeabilitású anyagok esetében használható, így a vektoriális transzport esszé a legelterjedtebb a gyógyszeriparban. Vizsgálataink során tehát a fenti szempontok vezérelték az esszéválasztást.

#### 5.2.1 ABCG2 szubsztrát próbák validálása<sup>3</sup>

Releváns közlemények: (Kis 2009b; Beery 2011).

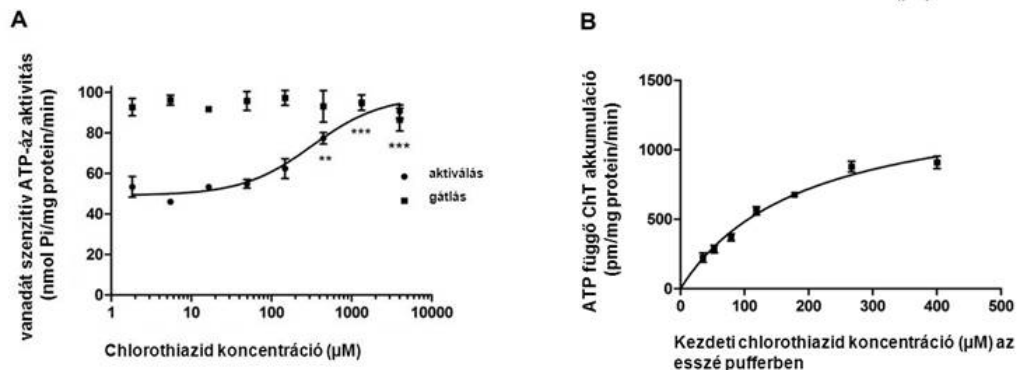
A transzporter gátlás esszék a felfedező kutatás késői fázisaiban illetve a fejlesztési fázisban a potenciális gyógyszerkölcsonhatásokat modellezik. Ezekhez a gátlás esszékhez ezért olyan szubsztrát próbát célszerű választani, mely *in vivo*, klinikai gyakorlatban is alkalmazható. Fontos, hogy a szubsztrát próba *in vitro* is alkalmazható legyen, hogy az *in vitro* eredmények alapján az *in vivo* adatokra

<sup>3</sup> A specifikus inhibitorokat a kollaboráló partner állította elő. A biológiai/farmakológiai munkát a Solvo végezte.

predikciót lehessen tenni. Az ABCB1 transzporterre digoxin a konszenzusos szubsztrát próba (Giacomini 2010). ABCG2 transzporterre, amely szintén a gyógyszerhatóságok listáján lévő efflux transzporter, nincs konszenzus a szubsztrát próba kérdésében.

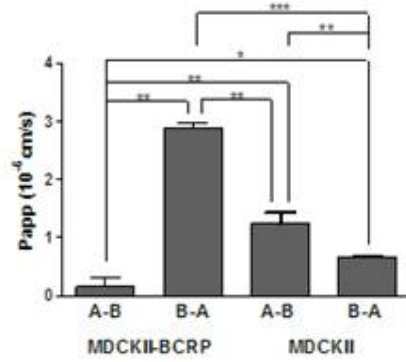
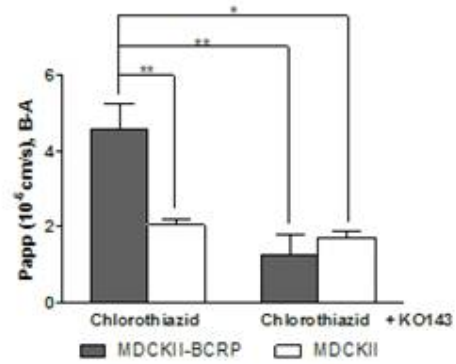
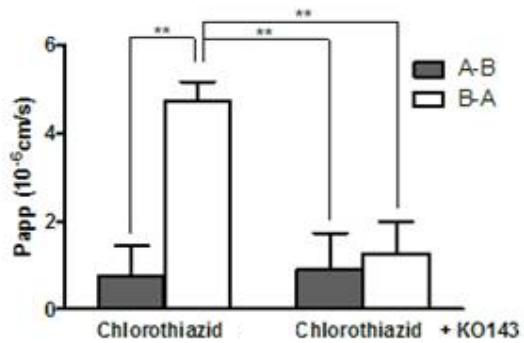
A szubsztrát próba kiválasztásához felmértük azokat a potenciális vegyületeket, melyekre *in vitro* és *in vivo* adatok -beleértve a klinikai adatokat- találhatóak. A szubsztrát próba előnyösen: i) specifikus ABCG2 kölcsönható, ii) ABCG2 függő vektoriális transzportot mutat MDCKII-BCRP ill Caco-2 sejteken, iii) nem, vagy csak elhanyagolható mértékben metabolizálódik, iv) preklinikai állatmodellen és v) klinikai gyakorlatban is ABCG2 függő a farmakokinetikája. A végleges vegyületlistán az atorvastatin, chlorothiazid, dantrolen, sulfasalazin, teriflunomid és a topotecan szerepelt. Az első, a specificitás szűrés alapján a legjobb jelöltnek a chlorothiazid és a teriflunomid tűntek (Krajcsi és munkatársai, kézirat előkészületben).

A chlorothiazid szelektív ABCG2 kölcsönható. A két másik, apikális membránokban koexpresszálandó transzporterrel, az ABCB1-el és az ABCC2-vel nem hat kölcsön (Beery, 2011 Figure 1). A molekula alacsony passzív permeabilitású, így transzportja vezikuláris transzport esszében is mérhető, és az ABCG2 ATPáznak jó aktivátora (12. ábra). A vezikuláris transzportban mért  $K_m$  ( $334,6 \pm 325 \mu\text{M}$ ), az ATPáz  $EC_{50}$  ( $327,2 \pm 9,4 \mu\text{M}$ ) és vezikuláris transzport gátlás  $IC_{50}$  ( $212,3 \pm 210,8 \mu\text{M}$ ) értékek jól korrelálnak.



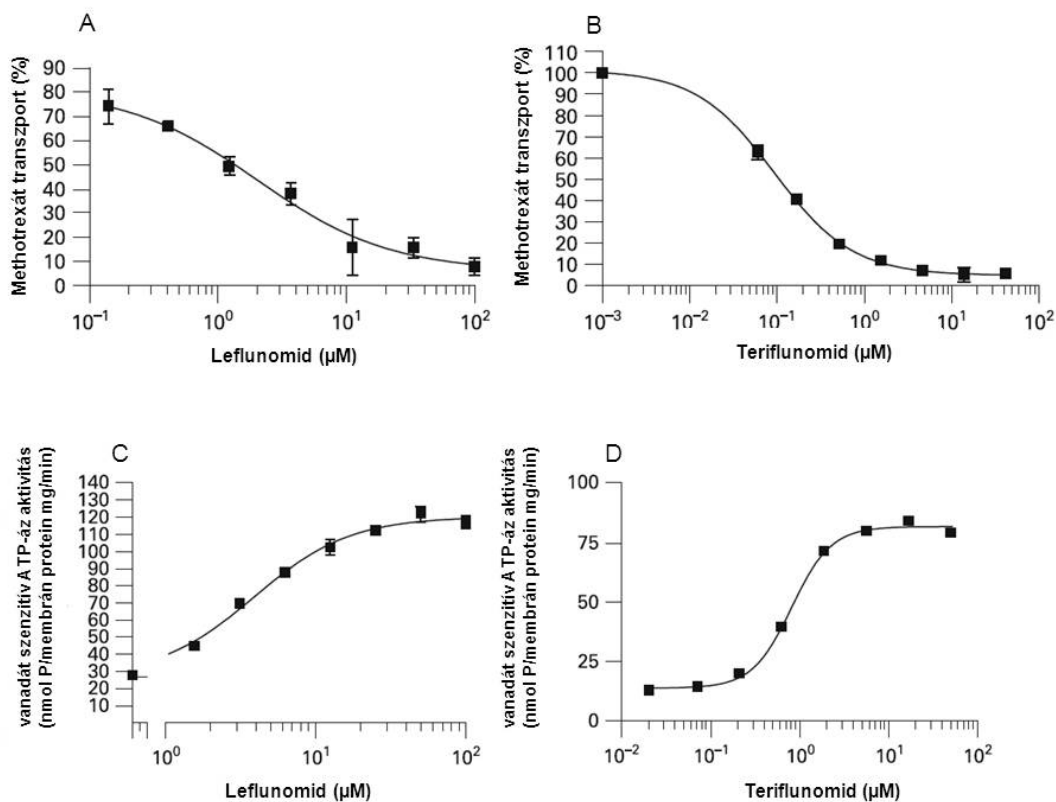
**12. ábra** A chlorothiazid ABCG2 általi vezikuláris transzportjának (A) és ATPáz aktiválásának (B) koncentrációfüggése. Szignifikanciák: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Az ABCG2 transzfektáns MDCKIIBCRP sejteken az MDCKII-re korigált efflux arány 36 (13.A ábra). Az MDCKIIBCRP sejteken B-A irányban mért látszólagos permeabilitási koefficiens érték  $K_{o143}$ , egy ABCG2 specifikus inhibitor jelenlétében 1 körüli értékre csökkent, míg az MDCKII sejteken mért B-A érték nem változott (13.B ábra). Caco-2 sejteken is vektorálisan transzportálódik a chlorothiazid. A 8,1-es effluxarány az ABCG2-re specifikus  $K_{o143}$  jelenlétében 1,4-re csökken (13.C ábra). A chlorothiazid tehát *in vitro* esszékben ABCG2 szelektív szubsztrát próbának bizonyult.

**A****B****C**

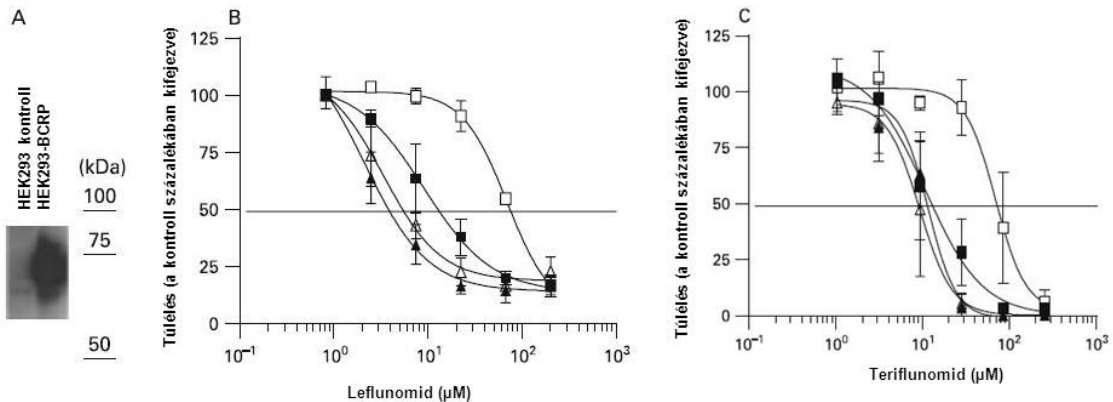
**13. ábra** Chlorothiazid vektorális transzportja MDCKII-BCRP és MDCKII (A,B) valamint Caco-2 sejteken (C). Az MDCKII-BCRP és MDCKII mért B-A irányú transzport (B) és a Caco-2 sejteken (C) mért látszólagos permeabilitási koefficiens gátlása Ko143-al. Szignifikanciák: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

A leflunomid és aktív metabolitja, a teriflunomid (A771726) a reumaellenes gyógyszerek DMARD (Disease Modifying Antirheumatic Drugs) csoportjába tartozik. Egy korábbi munkában sulfasalazinnal szelektált CEM sejtekben az ABCG2 magas expresszióját találták. Mivel ezek a sejtek rezisztensek voltak leflunomid citotoxicitással szemben, így felmerült, hogy a leflunomid és teriflunomiddal szembeni rezisztenciáért az ABCG2 a felelős (van der Heijden 2009). Ezt igazolandó methotrexát szubsztrát próba felhasználásával vezikuláris transzport (14.A,B ábra) és Hoechst festék transzport gátlás (Kis 2009b Figure 2) kísérletekkel igazoltuk, hogy a leflunomid és teriflunomid specifikusan kölcsönhat az ABCG2-vel. Mindkét gyógyszer aktiválta az ABCG2 ATPáz (14.C,D ábra), de nem mutatott kölcsönhatást az ABCB1 ATPáz (Kis 2009b Figure 3D). Az ABCG2 ATPáz aktiválás jelezte, hogy a leflunomide és teriflunomide szubsztrátjai a transzporternek.



**14. ábra** A leflunomid (A,C) és teriflunomid (B,D) gátolják az ABCG2-mediált methotrexát transzportot (A,B) és aktiválják az ABCG2 ATPáz (C,D)

ABCG2-vel transzfektált HEK sejtek segítségével azt is igazoltuk, hogy az ABCG2 magas expressziója rezisztenciát indukál úgy a leflunomiddal mint a teriflunomiddal szemben (15. ábra).



**15. ábra** Az ABCG2 magas expressziója (A) rezisztenciát eredményez leflunomid (B) és teriflunomid (C) citotoxicitásával szemben. HEK kontroll (háromszög) és HEK-BCRP (négyzet) sejtek viabilitását teszteltük Ko134 jelenlétében (teli jelek) és távollétében (üres jelek).

Elmondható tehát, hogy úgy a leflunomid mint a teriflunomid specifikus szubsztrátjai a humán ABCG2-nek. Hipotézisünket, hogy ABCG2 lehet a felelős a leflunomiddal szembeni rezisztenciáért klinikai vizsgálatokban, egy holland csoport később valószínűsítette (van der Heijden 2009). Ráadásul, közelmúltban igazolták, hogy a teriflunomidnak ABCG2-függő humán farmakokinetikája van (Kim 2011).

### 5.2.2 A calcein-AM mint fluoreszcens ABCB1 szubsztrát próba membrán és sejtes tesztekben<sup>4</sup>

Releváns közlemények: (Glavinas 2011; Szeremy 2011).

Ugyan releváns gyógyszerek mint szubsztrát próbák megkerülhetetlenek a gyógyszerjelöltek transzporter kölcsönhatásainak tesztelésében, sokszor nem adnak lehetőséget nagy áteresztőképességű szűrésre. Nagy áteresztőképességű rendszerekhez előszeretettel alkalmaznak fluoreszcens szubsztrátokat. A Calcein

<sup>4</sup> A hCMEC/D3 sejteken végzett Calcein esszé vizsgálatok a Krizbai labor (MTA Szegedi Biológiai Központ) és a Solvo munkatársak együttes munkájával készült. A többi sejtvonalon végzett Calcein esszét, a vezikuláris transzportot valamint az ATPáz méréseket a Solvo végezte.

esszében alkalmazott calcein-AM ABCB1 (Homolya 1993) és ABCC1 szubsztrát (Hollo 1998). Az esszé ideális nagy áteresztőképességű (High throughput (HT)) tesztrendszer, amit a gyógyszeriparban is sokan tanulmányoztak (Polli 2001; Rautio 2006; Cook 2010). Az esszé ráadásul jó korrelációt mutat a „gold standardnak” számító digoxin vektoriális transzport gátlással (Rautio 2006; Cook 2010; Glavinas 2011). Az esszé karakterizálása során azt találtuk, hogy a kapott  $IC_{50}$  értékek erősen függtek az alkalmazott, ABCB1-et magasan expresszáló sejtvonaltól is. Az ABCB1 expresszió az MDCKII/MDR1 > K562MDR1 > hCMEC/D3 sorrendben csökkent (16. ábra).



**16. ábra** A használt sejtvonalak ABCB1 expressziója Western blottal.

Ahol különbségeket látunk az  $IC_{50}$  értékekben, ott is ezt a trendet látjuk (15. táblázat). Nem minden molekulára látunk azonban különbséget a K562MDR és hCMEC/D3 sejtekben. Ezért feltehetően más paraméterek, úgy mint a membránok eltérő lipidösszetétele, vagy tömörsége (Gatlik-Landwojtowicz 2006; Seelig 2007) is számít az  $IC_{50}$  értékek meghatározásában.

**15. táblázat** A calcein esszében kapott IC<sub>50</sub> értékek

Vizsgált gyógyszer	IC <sub>50</sub> (µM)			
	MDCKIIMDR1*	MDCKIIMDR1	K562MDR	hCMEC D3
<b>GF120918</b>	0.101	0.05	0.008	0.002
<b>LY335979</b>	ND	0.1	0.0004	0.0002
<b>Propranolol</b>	N	N	150	ND
<b>Prazosin</b>	>100	>100	30	30
<b>Quinidin</b>	55.5	200	5	2
<b>Vinblastin</b>	>100	ND	20	2
<b>Verapamil</b>	60.9	100	7	3.5
<b>Ketoconazol</b>	10.1	20	2	2
<b>Daunorubicin</b>	N	N	N	ND
<b>Fexofenadin</b>	N	N	N	N
<b>Digoxin</b>	N	N	N	100
<b>Erythromycin</b>	N	N	N	Y
<b>CsA</b>	2.2	2.5	0.2	0.04

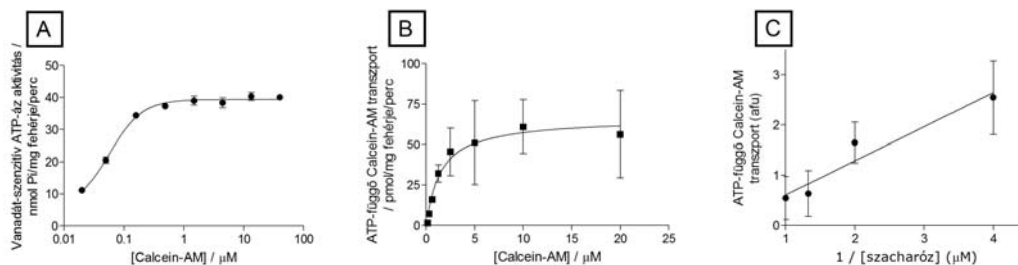
N, nincs gátlás; ND, nem vizsgált.

\* Rautio et al, 2006

A calcein-AM-nek mint szubsztrát próbának előnye, hogy több különböző típusú esszében alkalmazható. Ismert volt, hogy festéktranszport esszében alkalmazható,

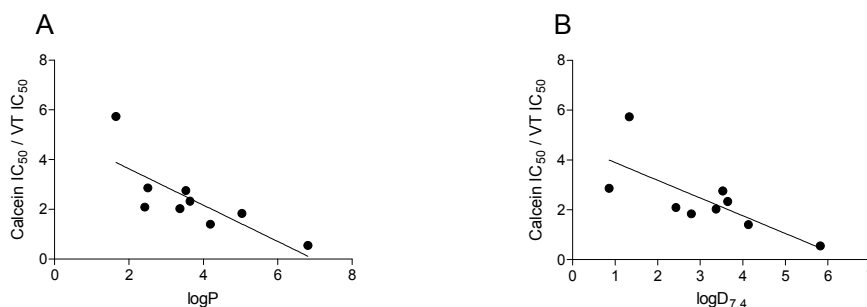


várható volt, hogy ATPáz esszében alkalmazható lesz (17.A ábra), viszont váratlan volt, hogy –magas passzív permeabilitása ellenére- vezikuláris transzportban is alkalmazható. Az utóbbi esszében a calcein-AM vagy metabolitja intravezikuláris retenciójának mechanizmusa máig nem tisztázott. De a transzport telíthető, és szacharóz-függő (18.B ábra).



**17. ábra** A Calcein-AM aktiválja az ABCB1 ATPáz (A) és tekinthető (B) és szacharóz függő (C) transzportot mutat VT-ben.

A calcein-AM-nek ez a tulajdonsága, hogy különböző tesztrendszerekben is használható, lehetővé teszi, hogy az  $IC_{50}$  értékek összehasonlításánál a különböző szubsztrát – különböző kötőhely problémától eltekintsünk. Ezt a korábbi tanulmányok nem tudták megkerülni. Maradt azonban így is egy változó, a passzív permeabilitás, illetve az ezzel bizonyos tartományokban arányos lipofilicitás (18. ábra). A tendencia az, hogy a kevésbé lipofil molekulák vezikuláris és sejtes esszében meghatározott  $IC_{50}$  értékei jobban különböznek egymástól, mint a magasabb lipofilicitással rendelkező molekulák megfelelő értékei (18. ábra).

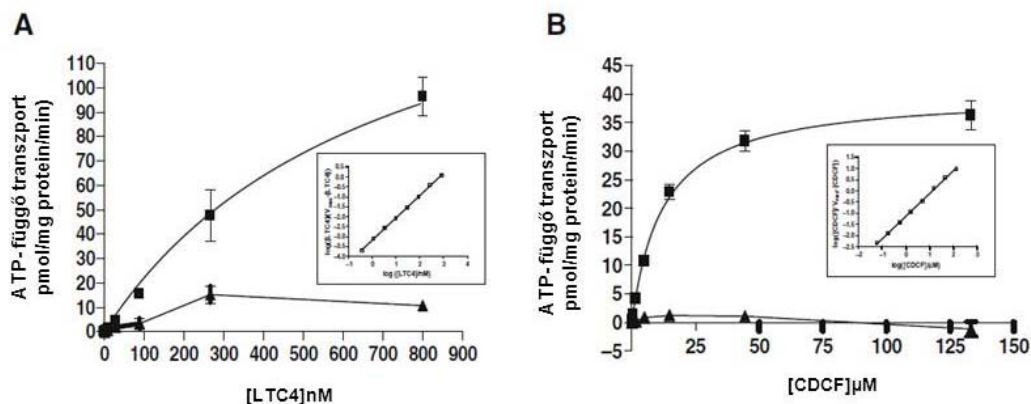


**18. ábra** A sejtes és a vezikuláris transzportban kapott  $IC_{50}$  értékek hányadosainak függése a clogP ( $R^2 = 0,61$ ) (A) és clogD<sub>7,4</sub> ( $R^2 = 0,54$ ) (B) értékektől

## 5.2.3 A CDCF mint fluorescens ABCC2 szubsztrát próba

Releváns közlemény: (Heredi-Szabo 2008)

A harmadik fontos, apikálisan expresszáldó ABC transzporter az ABCC2. Az ABCC2 többek között fázis II konjugátumokat transzportál. A transzporter legálább két kötőhelyet definiáltak, ami bizonyos szubsztrátokra (pl ösztadiol-17 $\beta$ -glükuronid) nem Michaelis-Menten típusú komplex kinetikát eredményeztek (Zelcer 2003). Bizonyos modulátorok a komplex kinetikájú szubsztrát próba transzportját kisebb koncentrációban potenciózták, míg magasabb koncentrációban gátolták (Zelcer 2003; Heredi-Szabo 2009a). Ezek a sajátságok előnytelenek egy HT gátlás esszéiben való felhasználásban. A leukotrién C<sub>4</sub> ABCC2 általi transzportja Michaelis-Menten típusú kinetikát követ, nem jelenik meg a potenciózás jelensége (Gao 1998; Chen 1999) (19.A ábra). Tehát, IC<sub>50</sub> meghatározásokhoz kedvező sajátságokkal rendelkezik. A leukotrién C<sub>4</sub> azonban kémiaailag instabil úgy jelölt, mint jelöletlen formában. Helyette, HT szűrőtesztes munkához a karboxy-dichloro-fluorescein (CDCF) használható. A CDCF Michaelis-Menten típusú telítési görbét ad (19.B ábra), és esetében sem figyelhető meg a potenciózás jelensége. Továbbá igazoltuk, hogy, a kapott IC<sub>50</sub> értékek korrelálnak az irodalomban fellelhető adatokkal (Heredi-Szabo 2008).



**19. ábra** Az ABCC2 általi LTC<sub>4</sub> (A) és CDCF (B) transzport kinetikája vezikuláris transzport esszéiben MRP2-t expresszáldó (teli négyzet) és kontroll (teli háromszög) membránon.

Ismert ABCC2 szubsztrátok esetében –bár az individuális értékekben van különbség– a  $K_i$  értékek sorrendje mindkét szubsztrát próba esetén azonos (16. táblázat).

**16. táblázat** Az LTC4 és CDCF szubsztrát próbák felhasználásával vezikuláris transzport esszében mért ABCC2 gátlás  $IC_{50}$  értékei

Vizsgált anyag	LTC4	CDCF
	$K_i / \mu\text{M}$	
Indomethacin	152 ± 89	71 ± 24
MK571	1.8 ± 0.5	4.1 ± 1.1
Probenecid	2300	580 ± 45
Sulfasalazin	25 ± 15	16 ± 6
Benzbromaron	24 ± 6	4.4 ± 1.3
LTC4	-	1.8 ± 0.3
CDCF	15 ± 10	-

Átlag ± szórás.

### 5.3 In vitro esszérendszerek alkalmazása transzporter – gyógyszer kölcsönhatások kinetikai jellemzésére

#### 5.3.1 A seliciclib egy specifikus ABCB1 szubsztrát – következményei a seliciclib ADME sajátságaira, és citotoxicitására<sup>5</sup>

Releváns közlemény: (Rajnai 2010).

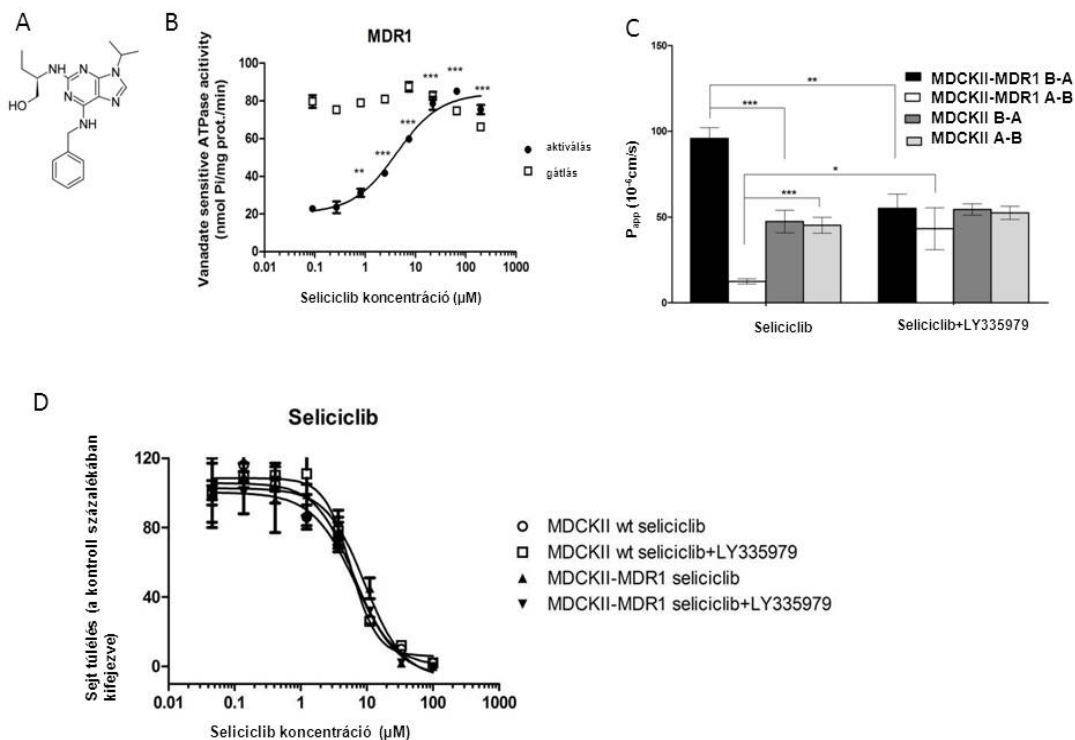
A seliciclib (20.A ábra) második generációs ciklin-függő kináz gátlószer (Meijer 2006). In vitro aktivitást mutatott nem-kissejtes tüdő carcinóma, vastagbél, emlő és

<sup>5</sup> A seliciclibet valamint a használt inhibitorokat a kollaboráló partnerek adták. A biológiai/farmakológiai vizsgálatokat a Solvo végezte.

prosztata daganatokat reprezentáló sejtvonalakban (Iurisci 2006; Meijer 2006). Klinikán is aktívnak mutatkozott krónikus limfoid leukémiában (CLL) (Weingrill 2007), nasopharingeális carcinomában (Hsieh 2009) és hepatocelluláris carcinomában (Le Tourneau 2010).

*In vivo* vizsgálatok azt mutatták, hogy míg az újszülött állatok agyában a seliciclib a plazmaszintnek megfelelő szintet ér el, addig felnőtt állatokban az agy/plazma AUC arány 0,25 volt, ami limitált BBB penetrációra utal (Vita 2005; Sallam 2008). *In vitro* eszközök segítségével azt vizsgáltuk, hogy mely efflux transzporter felel a limitált BBB penetrációért. Az ATPáz tesztek azt mutatták, hogy a 4 potenciálisan érintett efflux transzporter közül az ABCB1-et 4,2  $\mu\text{M}$ -os  $\text{EC}_{50}$  értékkel aktiválta (20.B ábra). Az ABCC2 és ABCC4 transzporterekkel nem láttunk kölcsönhatást, míg az ABCG2 transzportert szuprafarmakológias dózisban gátolta a seliciclib (Rajnai, 2010 Table 1, Figure 1). Az ABCB1-el való kölcsönhatás mintegy 8-as efflux arányhoz vezetett az MDCKIIMDR1 sejtvonalon végzett kétirányú vektoriális transzport mérésekben (20.C ábra). ABCB1 specifikus gátlószer, a LY335979 hatására a szülői sejteken mért látszólagos permeabilitás értékekkel nagyjából azonos,  $5 \times 10^{-5}$  cm/s állandót kaptunk (20.C ábra). Ez azért jelentős, mert ez a mért látszólagos permeabilitási állandó magas értéknek számít. Számunkra váratlanul, ez a hatékony transzporter kölcsönhatás nem eredményezett rezisztenciát a gyógyszerrel szemben az általunk vizsgált 3 sejtvonal páros (MDCKII/MDCKIIMDR1; K562/K562MDR; HL60/HL60MDR1) egyikében sem (Rajnai 2010). Az MDCKII és MDCKIIMDR1 sejteken kapott eredményinket a 20.D ábra demonstrálja. Elmondható, hogy a seliciclib esetében az ATPáz és a vektoriális transzport adatok korrelációt mutattak, míg a citotoxicitás nem mutatott ABCB1-függést.

A seliciclib tehát érdekes transzporter kölcsönhatás profillal rendelkezik. Vizsgálataink alapján elmondható, hogy a csökkent *in vivo* BBB permeabilitás az ABCB1/Abcb1a kölcsönhatásnak köszönhető.



**20. ábra** A seliciclib ABCB1-el való kölcsönhatásának karakterizálása. A seliciclib (A) kölcsönhatása ABCB1-el ATPáz (B) és MDCKIIMDR1-en végzett vektoriális transzport (C) esszéiben, valamint MDCKII és MDCKIIMDR1 sejvonalakon végzett citotoxicitás tesztben (D). Szignifikanciák: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

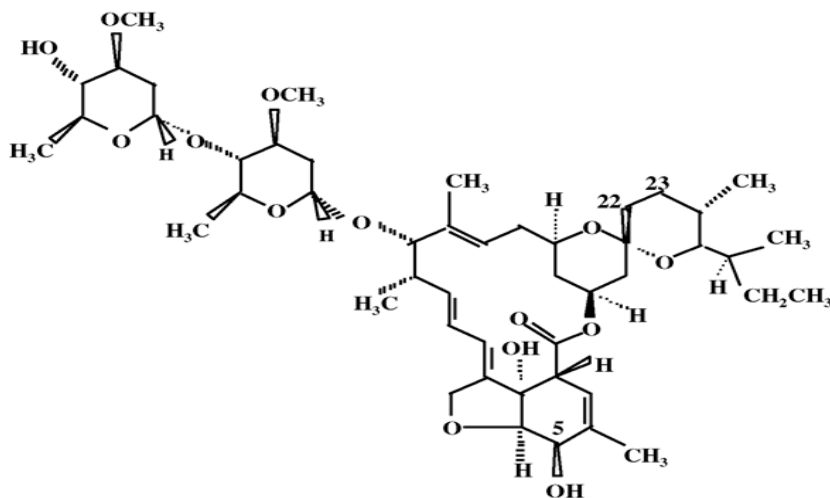
### 5.3.2 Az ivermectin kölcsönhatása ABC transzporterekkel<sup>6</sup>

Releváns közlemények: (Lespine 2006; Lespine 2009; Jani 2011).

Az ivermectin, a makrociklusos laktonok csoportjába tartozó parazitaellenes szer, klasszikus ABCB1 szubsztrát. *Abcb1a* deficiens CF-1 (Kwei 1999) illetve *abcb1a*<sup>-/-</sup> (Kwei 1999) egerekben az ivermectin agyi expozíció 70- illetve 87-szeresre x növekedett, ami a knock-out egerek esetében mintegy 100-szorosra növekedett neurotoxicitással járt együtt (Schinkel 1994). Hasonlóan neurotoxikus a gyógyszer egy 4 bp deléció következtében *Abcb1* deficiens Collie kutyákban (Mealey 2001).

<sup>6</sup> Az ABCB1 és ABCC1 ivermectin kölcsönhatást vizsgáló sejttesztet a kollaboráló partner végezte. Az ABCB1, ABCC1-3 membrán esszéket valamint az összes ABCG2 esszét a Solvo végezte.

Vektoriális transzport kísérletekben *in vitro* is megerősítést nyert a kölcsönhatás úgy a humán ABCB1 fehérjét (Smith 2000), mint az egér Abcb1a fehérjét (Dupuy 2010) expresszáló LLC-PK1 háttérű transzfektánsokon. Az ivermectin szerkezetéből adódó flexibilitás (21. ábra) és az ABC transzporterek átfedő szubsztrátspecifitása megengedi, hogy a molekula további ABC transzporterekkel is kölcsönhatásba kerüljön.



**21. ábra** Az ivermectin szerkezete

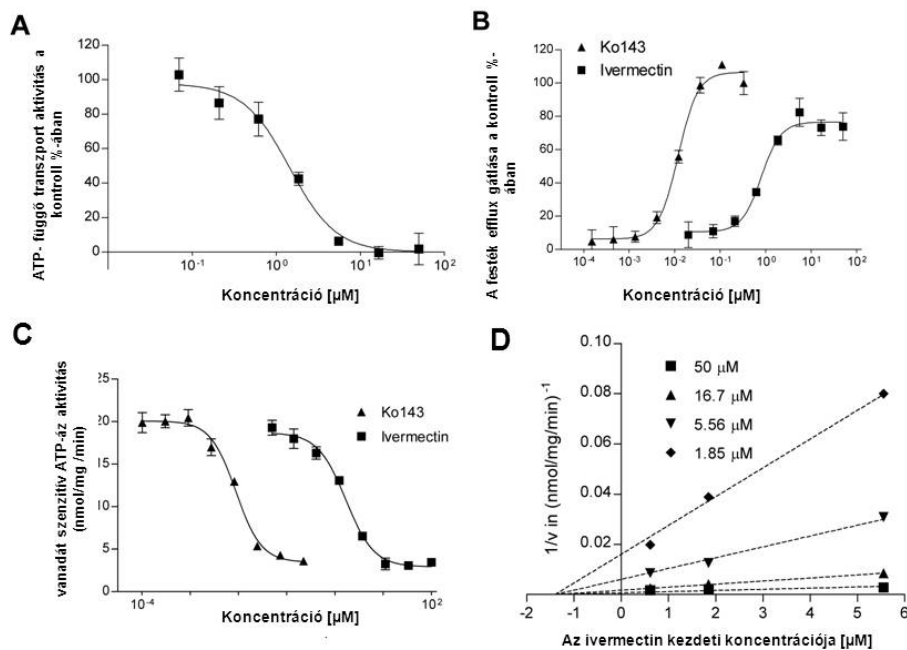
Vizsgálataink azt mutatták, hogy az ivermectin a humán ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3 (Lespine 2006) és ABCG2 (Jani 2011), fehérjét alacsony mikromólos tartományban gátolja (17. táblázat) (Lespine 2009).

**17. táblázat** Az ivermectin kölcsönhatása ABC transzporterekkel ATPáz esszében

Transzporter	ATPáz IC <sub>50</sub> (µM)
ABCB1	2,5 +/- 2.0
ABCC1	9,0 +/- 4.0
ABCC2	18,0 +/- 5.0
ABCC3	40,0 +/- 21.0
ABCG2	1,68 +/- 2.0

Az ivermectin ATPáz esszékben gátolta az aktivált transzportert és az alapaktivitást is. Azonban az ivermectin esetében az ATPáz aktiválás hiánya nem mérvadó, hiszen gátolta a humán ABCB1 ATPáz is (Lespine 2006). Az ABCB1 után legpotensebb kölcsönhatást az ABCG2-vel láttuk. A 22. ábrán látható gátlások 1-1,5 µM IC<sub>50</sub>

értékeket adtak. Az ABCG2 mediált ösztron-3-szulfát transzportot az ivermectin nem-kompetitíven, a Dixon ábrázolás szerint 1,4  $\mu\text{M}$ -os  $K_i$  értékkel gátolja (22.D ábra).



**22. ábra** Ivermectin és a kontroll inhibitor Ko143 gátlása az ABCG2 mediált E3S (A,D) és Hoechst festék (B) transzportnak valamint az ABCG2 ATPáz alapaktivitásnak (C).

Vizsgálataink tehát azt mutatták, hogy az ivermectin több efflux transzporterrel kölcsönhat. Bár kétséget kizáróan csak az ABCB1-ről igazolódott, hogy annak szubsztrátja. Az ivermectin néhány betegben 100 nM-os plazma szintet érhet el (El-Tahtawy 2008) míg a bélben 50-70  $\mu\text{M}$  is lehet a koncentrációja. Tehát az ABCG2 gátlását jellemző 1,4  $\mu\text{M}$ -os  $K_i$  (Jani 2011) érték mellett ez a kölcsönhatás gyógyszerinterakció szempontjából jelentős lehet.

### 5.3.3 A sulfasalazin ABCG2 szubsztrát – a kölcsönhatás jellemzése

Releváns közlemény: (Jani 2009).

A sulfasalazin nagyon alacsony passzív permeabilitású molekula (von Richter 2009). Ennek következtében efflux transzporterekkel való kölcsönhatását nehéz karakterizálni sejtes rendszerben, mert vagy nem jut be a sejtbe, vagy a bejutás

influx transzporterén keresztül történik, ami pedig modulálhatja az efflux transzporterrel való kölcsönhatást. Az alacsony passzív permeabilitású anyagok efflux transzporterekkel való kölcsönhatásának vizsgálatára a VT alkalmazható. Az ABCG2-t túlexpresszázó membránokon végzett vizsgálataink igazolták, hogy a transzporter nagy affinitással transzportálja a sulfasalazint (Jani 2009). A transzport pH független ( $K_{m,pH5,5} = 0,66 \pm 0,08$ ;  $K_{m,pH7,0} = 0,70 \pm 0,03$ ). Bár a  $V_{max}$  értéke valamivel magasabb volt pH 5,5 értéken, mint pH 7,0-án (71,2 pmol/mg/min szemben a 52,1 pmol/mg/min).

Mivel a sulfasalazin potenciális ABCG2 szubsztrát próba a kapott eredmények hasznosak lehetnek az *in vitro* gátlás esszék kialakításában, és a fiziológiás alapú farmakokinetikai modell megépítésében.

#### 5.4 ***In vitro* esszérendszerek alkalmazása növényi hatóanyagok és környezetszennyező anyagok transzporterekkel való kölcsönhatásának azonosítására és jellemzésére**

##### 5.4.1 **A baicalein és a baicalein konjugátumok transzportja enterocytákban és hepatocytákban<sup>7</sup>**

Releváns közlemények: (Zhang 2007a; Zhang 2011)

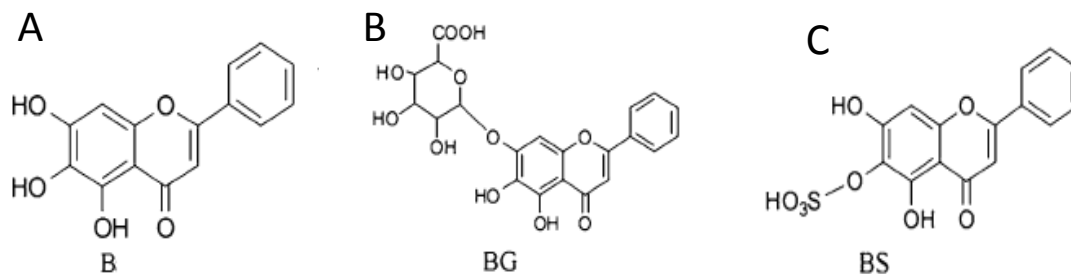
A baicalein a tradicionális kínai gyógynövény, a *Scutellaria baicalensis* gyökerének egyik fő flavonoidja (23.A ábra) (Homma 1997). Gyulladásgátló (Hong 2002), antioxidáns (Shao 2002), antivirális (Ono 1999) és allergiaellenes (Kimata 2000) terápiás hatásokkal is rendelkezik. A patkányban végzett *in vivo* vizsgálatok szerint a baicalein jól abszorbeálódik, az enterocytákban nagy hatékonysággal konjugálódik, és a mesenterialis keringésbe 90%-ban már glükuronidja, a baicalein-glükuronid (baicalin) (23.B ábra) található (Zhang 2005).

Vizsgálatainkban azt találtuk, hogy humán Caco-2 sejtekben egy másik metabolitja, a baicalein szulfát (23.C ábra) is keletkezik. A glükuronid konjugátum az apikális és a basolaterális membránon át is szekretálódik (Zhang 2007a Figure 3,4). A

<sup>7</sup> Az extenzív *in vivo*, a Caco-2 sejteken végzett vizsgálatokat, valamint a metabolizmus vizsgálatokat a kollaboráló partner végezte. A transzporter specifikus sejtes és membrán vizsgálatok a Solvonál készültek.

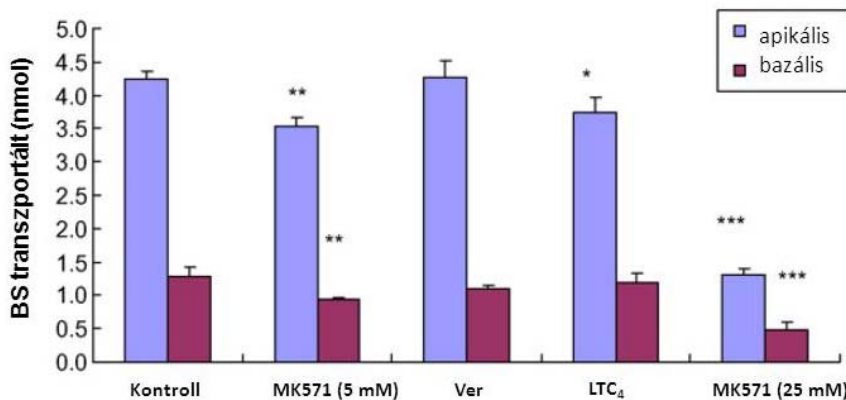
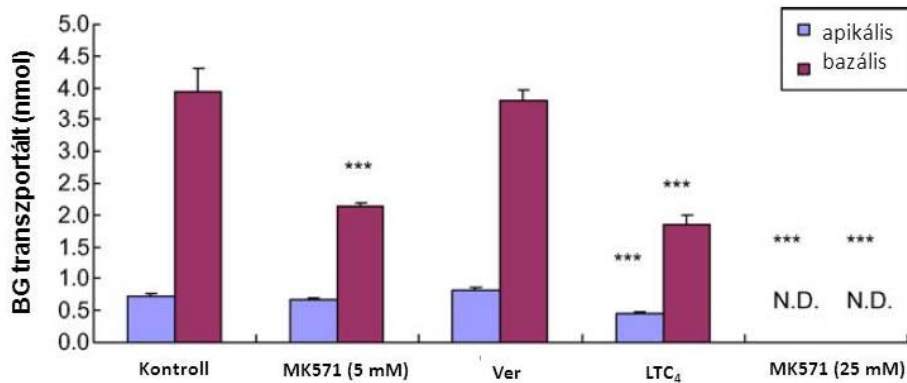


basolaterális szekréció telítődik magasabb koncentrációnál. A szulfát konjugátum szinte kizárólag az apikális oldalon jelenik meg (Zhang 2007a Figure 3,5).



**23. ábra** A baicalein (B) és glükuronid (BG) valamint szulfát konjugátumának (BS) szerkezete

Az inhibitor profilírozás azt mutatta, hogy a glükuronid konjugátum szekréciója gátlódik ABCC inhibitorokkal mint az LTC<sub>4</sub> és az MK571, addig a szulfát konjugátum szekréciója csak MK571 által gátlódik (24. ábra, Zhang 2007a Table 2) amiről tudjuk, hogy az ABCG2-t is gátolja (Matsson 2009). Az ATPáz vizsgálatok azt mutatták, hogy a baicalein-glükuronid aktiválta az ABCC2, ABCC3 és az ABCG2 ATPáz. Különösen jelentős volt ez az ABCG2 esetében, ahol már 20 µM-os koncentrációban a pozitív kontroll sulfasalazinnal mért értékeknél (100%) magasabb,  $109.58 \pm 15.54$  % volt az ATPáz aktivitás. De jelentős aktivitást figyeltünk meg már ebben a koncentrációban az ABCC3 ATPázban is ( $18.07 \pm 1.40\%$ ), míg az ABCC2 esetében csak 100 µM-os baicalein koncentrációnál volt szignifikáns aktiválás ( $26.00 \pm 1.54\%$ )



**24. ábra** A baicalein glükuronid (BG) valamint szulfát konjugátumának (BS) transzportja Caco-2 sejteken. Szignifikanciák: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a baicalein-glükuronid basolaterális transzportjéért és egyben abszorpciójáért az ABCC3 fehérje a felelős, míg az apikális, szekretorikus transzportban az ABCC2 és az ABCG2 fehérje is részt vehet. A baicalein-szulfáttal transzporter specifikus kísérleteket nem végeztünk, de a potenciális transzporterek szubsztrát specifitása alapján feltételezhető (Adachi 2005), hogy az apikális transzport döntően az ABCG2 fehérjén keresztül valósul meg.

Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy egyrészt az enterocytákban képződött konjugátumok, valamint az alapvegyület a mesenterialis keringésbe kerülnek (Zhang 2005), valamint a máj mikroszómái az enterocytáknál gyorsabban metabolizálják a baicaleint (Zhang 2007b). Mindezek az adatok arra utaltak, hogy a májnak a baicalein metabolizmusában és elsősorban a konjugátumok exkréciójában komoly szerepe lehet (Zhang 2007b). A patkányoknak a vena jugularison vagy vena portaen

keresztül adott baicalein, nagyobbik része glükuronid és szulfát konjugátumok formájában szekretálódott az epébe (Zhang 2011 Table 1, Figure 4,5). A baicalein glucuronid intravénás adása mellett ABCC és ABCG2 inhibitor MK571  $126 \pm 22$  nmól-ról  $64,0 \pm 15,3$  nmól-ra csökkentette a baicalein-glükuronid canaliculáris exkrécióját az AUC  $0,103 \pm 0,020 \times 10^3$  nmól/mgxmin-ról  $1,38 \pm 0,28 \times 10^3$  nmól/mgxmin-ra történő emelése mellett. Az ABCC2 és SLCO inhibitor probenecid esetében a megfelelő értékek  $80,8 \pm 9,26$  nmól illetve  $0.701 \pm 0.331 \times 10^3$  nmól/mgxmin. Mivel a baicalein-glükuronid membrán impermeabilis, felvetődött a sinusoidális influx transzporterek szerepe. A baicalein-glükuronid legnagyobb affinitással az SLCO2B1 majd az SLCO1B3 transzportereket gátolta, míg az SLCO1B1 transzporter aktivitására nem volt hatással (18. táblázat). Feltételezhető tehát, hogy az SLCO2B1 és az SLCO1B3 transzporterek részt vesznek a baicalein-glükuronid hepatikus exkréciójában. Az, hogy ezek a kölcsönhatások szubsztrát típusú kölcsönhatások, még bizonyításra szorul. Amennyiben ez sikerrel jár, úgy igazolást nyer, hogy a baicalein-glükuronid biliáris exkréciója influx és efflux transzporterek vektoriális kapcsolódásával valósul meg.

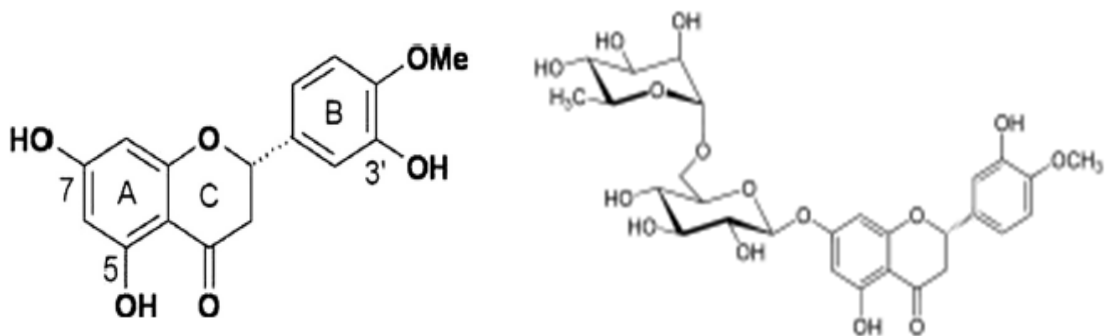
**18. táblázat** A baicalein glükuronid kölcsönhatása sinusoidális hepatocytá influx transzporterekkel

	Influx gátlás %-a	
	10 $\mu$ M BG	100 $\mu$ M BG
OATP1B1 (ES influx)	$6,1 \pm 0,5$	$5,3 \pm 0,1$
OATP2B1 (ES influx)	$83,7 \pm 15,4$	$89,5 \pm 25,8$
OATP2B3 (Fluo3 influx)	$40,1 \pm 3,7$	$37,8 \pm 8,8$

#### 5.4.2 A hesperetin-glükuronidok kölcsönhatása enterocyta ABC transzporterekkel <sup>8</sup>

Releváns közlemény: (Brand 2008).

A hesperetin (25.A ábra) a narancsfélék fő flavonoidjának, a hesperidinnek (7-O-rutinozid-hesperetin; 25.B ábra) az aglikonja. Az orális felvétel és deglikolizáció után keletkező hesperetin glükuronizálódik, majd transzportálódik a bél lumenbe, jelentősen korlátozva ezzel ezen fontos antioxidáns flavonoid biológiai hasznosíthatóságát (Liu and Hu 2007). A hesperetin-glükuronidok egy része a mezenteriális keringésen keresztül felszívódik. Korábbi vizsgálatok azt találták, hogy Caco-2 sejtekben apikálisan a hesperetin-7-O-glükuronid transzportálódik, és a transzportért az ABCG2 fehérje a felelős (Brand 2008). Ugyanakkor, enterocytákból valamint hepatocytákból nyert mikroszómákkal történő inkubálás hatására jelentős mennyiségű hesperetin-3'-O-glükuronid is keletkezett (Brand 2010).



25. ábra A hesperetin (A) és a hesperidin (B) szerkezete

*In vivo* is ez a két glükuronid keletkezik (Mullen 2008). E két konjugátum apikális (lumenális/mucosális) és basolaterális (serosális) transzportjéért felelős efflux transzporterek azonosítását tűztük ki célul. A számbajövő transzporterek az enterocytákban apikálisan elhelyezkedő ABCC2 és ABCG2 valamint a basolaterális membránban expresszálandó ABCC3. A hesperetin-7-O-glükuronid midhárom transzporter ATPáz aktivitását stimulálta, és a kölcsönhatás megfigyelhető volt

<sup>8</sup> A vizsgált molekulák szintézisét a kollaboráló partnerek végezték. A biológiai/farmakológiai kísérleti munka a Solvónál készült.

vezikuláris transzport gátlás tesztben (19. táblázat). Az ATPáz aktiválásban mért  $EC_{50}$  értékek sorrendje a következő volt: ABCG2<ABCC3<ABCC2. A hesperetin-3'-O-glükuronid nem aktiválta az ABCG2 ATPáz-t. Mindkét glükuronid kiváló aktivátora volt az ABCC3 ATPáz-nak. A hesperetin-7-O-glükuronid a control szubsztrát próbánál 2,5-ször, míg a hesperetin-3'-O-glükuronid 3,5-ször magasabb ATPáz aktivitást indukált az ABCC3 ATPáz esszéjében (19. táblázat). Mindez azt sugallja, hogy ezek a konjugátumok jó szubsztrátjai az ABCC3-nak és az ABCC3 fontos szerepet játszhat a glükuronidok abszorpciójában. Továbbá, az ABCG2 blokkolásával javítható ezen flavonoid konjugátumok biológiai hasznosíthatósága.

**19. táblázat** A hesperetin-7-O-glükuronid és a hesperetin-3'-O-glükuronid kölcsönhatása ABC efflux transzporterekkel

Hesperetin glükuronid	ABC transzporter	ATP-áz esszé		Vezikuláris transzport gátlás esszé	
		aktiválás		gátlás	
		$EC_{50}$ ( $\mu M$ )	Efficacy (%)	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	Efficacy (%)
<b>H7G</b>	BCRP	0.45	76	$30 \pm 6$	$79 \pm 4$
	MRP2	$129 \pm 78$	$65 \pm 5$	$48 \pm 23$	$92 \pm 1$
	MRP3	$26 \pm 8$	$250 \pm 80$	$1.5 \pm 0.3$	$100 \pm 1$
<b>H3'G</b>	BCRP	-	-	$42 \pm 22$	$76 \pm 9$
	MRP2	$85 \pm 13$	$78 \pm 15$	$13 \pm 1$	$93 \pm 1$
	MRP3	$20 \pm 5$	$350 \pm 60$	$3.4 \pm 0.0$	$98 \pm 4$

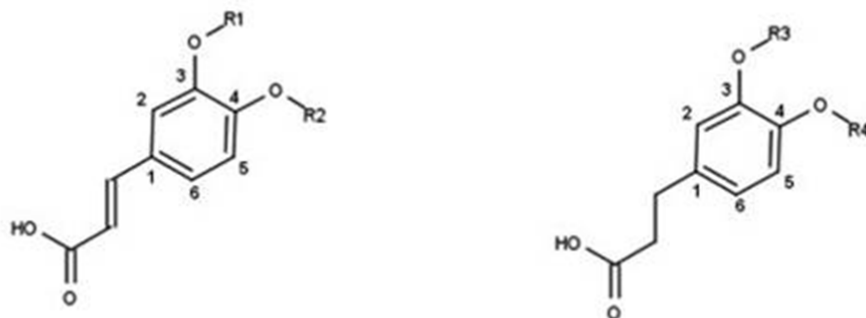
#### 5.4.3 A hidroxifahéjsavak kölcsönhatása renális anion és ABC transzporterekkel<sup>9</sup>

Releváns közlemény: (Wong 2011).

Hidroxifahéjsavak természetes antioxidánsok, melyek nagy mennyiségben találhatóak gyümölcsökben, zöldségekben, kávéban (Tomas-Barberan 2001). A napi bevétel az 1000 mg-ot is elérheti. Emberi plazmában a hidroxifahéjsavak elsősorban

<sup>9</sup> A vegyületek szintézisét valamint a munka meghatározó részét kitevő influx transzporter méréseket a kollaboráló partnerek végezték. A Solvo az efflux transzporter vizsgálatokat végezte.

szulfatált és glükuronidált származékaik formájában találhatók (Wong 2010). A szabad hidroxi-fahéjsavak jól abszorbeálódnak, és a dózis 40-60%-a a vesén át ürül (Bourne 2000). Mivel sok fenolos vegyület, valamint szulfát konjugátumok aktív renális szekrécióval ürülnek, megvizsgáltuk, hogy szerepet játszhatnak-e a vese anion transzporterei a hidroxi-fahéjsavak és származékaik (26. ábra) renális szekréciójában. A vesében a renális szekrécióban a basolaterálisan expresszáldó SLC22A6 és SLC22A8 valamint az apikálisan expresszáldó ABCC2 és ABCG2 játszhatnak szerepet. Az SLC22A11 elsősorban a reabszorpcióban játszik szerepet, de nem kizárható a szerepe az exkrécióban sem.

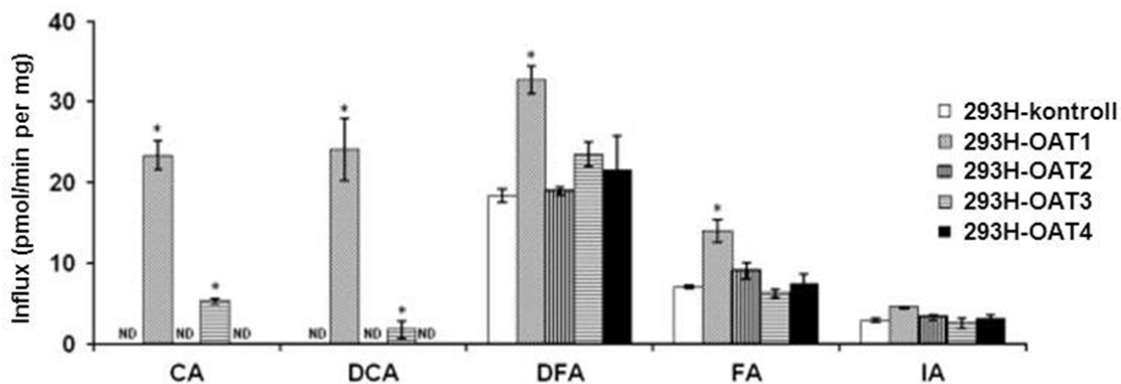


1. R1 = H<sub>2</sub>, R2 = H: kávésav
2. R1 = CH<sub>3</sub>, R2 = H: ferulinsav
3. R1 = H, R2 = CH<sub>3</sub>: kávésav-3-O-glükuronid
4. R1=GluA, R2 = H: kávésav-3-O-glükuronid
5. R1 = H, R2 = GluA: kávésav-3-O-glükuronid
6. R1 = SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, R2 =H: kávésav-3-szulfát
7. R1 = H, R2 = SO<sub>3</sub><sup>-</sup>: kávésav-4-O-szulfát
8. R1 = CH<sub>3</sub> R2 = GluA: ferulinsav-4-O-glükuronid
9. R1 = CH<sub>3</sub> R2 = SO<sub>3</sub><sup>-</sup>: ferulinsav-4-O-szulfát
10. R1 = GluA, R2 = CH<sub>3</sub>: izoferulinsav-3-O-glükuronid
11. R1 = SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, R2 = CH<sub>3</sub>: izoferulinsav-3-O-szulfát
12. R1 = H, R4 = H: dihidrokávésav
13. R3 = CH<sub>3</sub>, R4= dihidroferulinsav
14. R3 = GluA, R4 =H: dihidrokávésav-3-O-glükuronid
15. R3 = H, R4 = GluA: dihidrokávésav-4-O-glükuronid
16. R3 = SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, R4 = H: dihidrokávésav-3-O-szulfát
17. R3 = H, R4 = SO<sub>3</sub><sup>-</sup>: dihidrokávésav-4-O-szulfát
18. R3 = CH<sub>3</sub>, R4 = GluA: dihidroferulinsav-4-O-glükuronid
19. R3 = CH<sub>3</sub>, R4 = SO<sub>3</sub><sup>-</sup>: dihidroferulinsav-4-O-szulfát

## 26. ábra A hidroxi-fahéjsavak és származékaik szerkezete

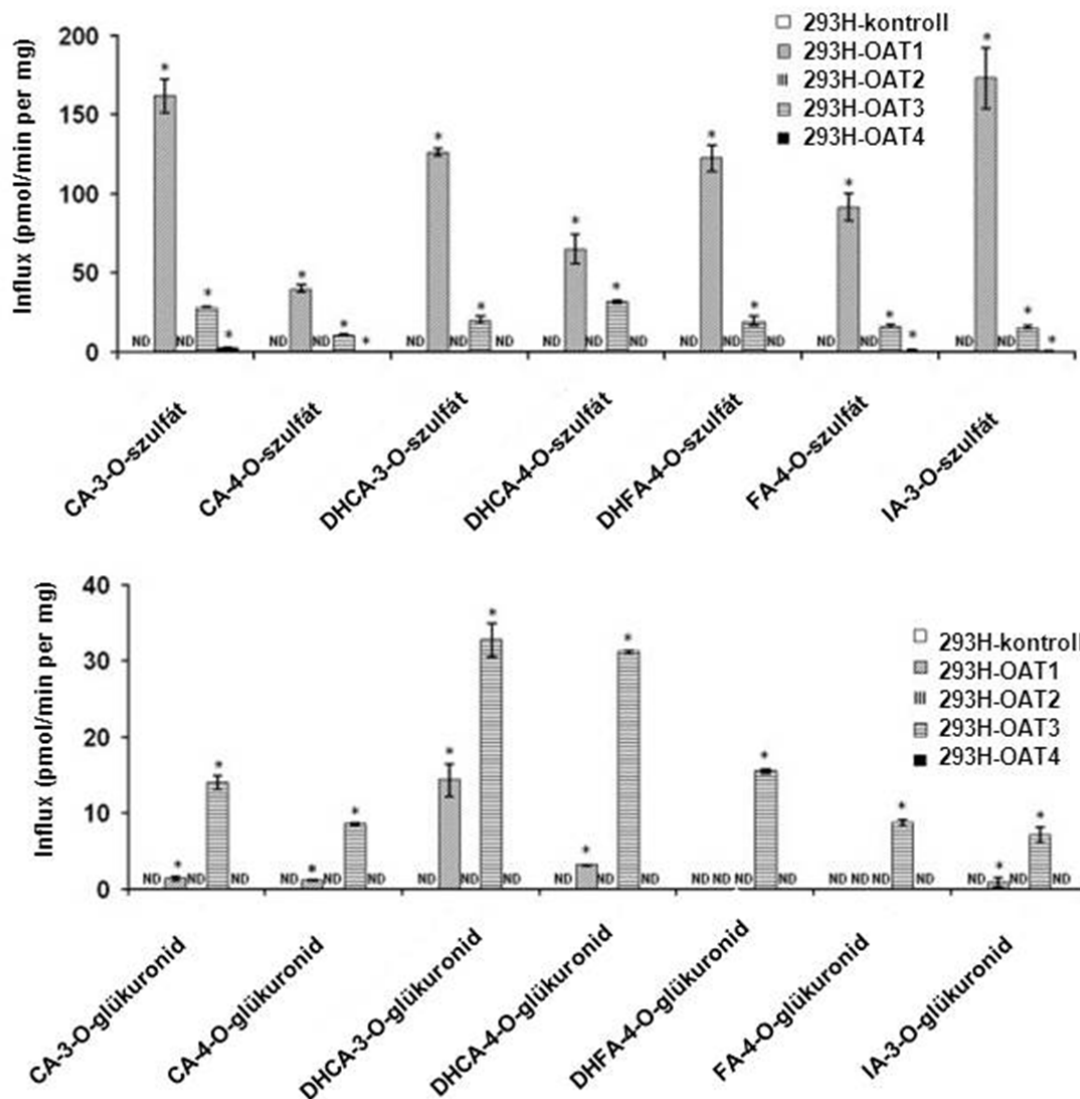
A kávésav és metilétere, a ferulinsav, valamint dihidro származékaik az SLC22A6 szubsztrátjainak bizonyultak HEK-293 transzfektánsokon történt mérésekben, míg az izoferulinsav nem bizonyult szubsztrátnak (27. ábra). A kávésav és telített

származéka a dihidro-kávésav az SLC22A8 transzporternek is szubsztrátja (27. ábra). Különösen drámai volt az SLC22A6 és SLC22A8 expressziója a kávésav és dihidro-kávésav sejtes felvételére, mert a szülői sejteken a detektálási limit alatt volt a sejtasszociált vegyületek mennyisége. Az SLC22A7 és SLC22A11 transzportereknek egyik vegyület sem volt szubsztrátja (27. ábra).



**27. ábra** A kávésav (CA), dihidro-kávésav (DCA), ferulinsav (FA) és izoferulinsav (IA) kölcsönhatása a vese PT epithel sejtekre jellemző organikus anion (SLC22A6,7,8,11) transzporterekkel. Szignifikanciák: \* $p < 0,05$ .

Érdekes szelektivitás volt megfigyelhető a konjugátumok vonatkozásában. A szulfát konjugátumok elsősorban az SLC22A6 és kisebb mértékben az SLC22A8 által kerültek felvételre a transzfektánsokban (28.A ábra), míg a glükuronid konjugátumok transzporter preferenciája ennek a fordítottja volt (28.B ábra). A szulfát konjugátumok vonatkozásában egy regio-szelektivitás is megfigyelhető volt, tudniillik a 3-O-szulfát származékok nagyobb hatékonysággal transzportálódtak, mint a 4-O-szulfát származékok (28.A ábra). Összességében bár a nem konjugált hidroxifahéjsavak esetében is láttunk transzport aktivitást ez a transzportsebesség lényegesen alacsonyabb volt, mint a konjugátumoké. Különösen igaz ez a fiziológiás koncentrációknál ( $< 5 \mu\text{M}$ ) mért értékekre, ahol a konjugátumok esetében láttunk transzportot, míg a konjugátatlan savak esetében nem volt szignifikáns transzport.



**28. ábra** A hidroxi-fahéjsavak szulfát (A) és glükuronid (B) konjugátumainak kölcsönhatása a vese PT sejtekre jellemző organikus anion (SLC22A6,7,8,11) transzporterekkel. Szignifikanciák: \* $p < 0,05$ .

Az apikális membránban lokalizálódó ABC transzporterek közül a konjugátumok transzportjáról ismert ABCC2 és ABCG2 ATPáz alapaktivitását nem stimulálták sem a konjugátatlan sem a konjugált hidroxi-fahéjsavak (20. táblázat).



**20. táblázat** Hidroxi-fahéjsavak és konjugátumaik kölcsönhatása ABCG2 és ABCG2-vel

Szubsztrát (300 $\mu$ M) <sup>a)</sup>	BCRP		MRP2	
	ATPáz aktiváció (%) <sup>b)</sup>	Vezikuláris transzport gátlása (%) <sup>c)</sup>	ATPase activation (%) <sup>b)</sup>	Inhibition of vesicular transport (%) <sup>c)</sup>
Kávésav-3-O-glükuronid	-	-	-	33
Kávésav-4-O-glükuronid	-	-	-	48
Kávésav-3-O-szulfát	-	-	32 <sup>d)</sup>	-
Kávésav-4-O-szulfát	-	50	-	-
Dihidrokávésav-3-O-glükuronid	-	45	-	22
Dihidrokávésav-4-O-glükuronid	-	38	-	32
Dihidrokávésav-3-O-szulfát	-	-	-	-
Dihidrokávésav-4-O-szulfát	-	-	-	-
Dihidroferulinsav-4-O-glükuronid	-	-	-	43
Dihidroferulinsav-4-O-szulfát	-	-	-	-
Ferulinsav-4-O-glükuronid	-	40	-	-
Ferulinsav-4-O-szulfát	-	60	-	-
Izoferulinsav-3-O-glükuronid	-	63	-	36
Izoferulinsav-3-O-szulfát	-	37	-	-

-: nem volt interakció

a) a transzport gátlása nem volt megfigyellehető sem ATPáz sem VT esszében fiziológiás koncentrációkban ( $\leq 10 \mu$ M).

b) relatív aktivitás ábrázolva, ahol a sulfasalazin hatása a 100%

c) a gátlás százaléka. A gátlás inhibitor távollétében 0%

d) a stimulált ATPáz gátlása

Érdekes módon, ugyanakkor néhány szulfát konjugátum transz-stimulálta az apikálisan lokalizálódó SLC22A11 mediált 5-karboxi-fluoreszcein transzportot, tehát ez a transzporter bizonyos szulfát konjugátumok esetében efflux transzporterként működhet (Wong 2011 Figure 7).

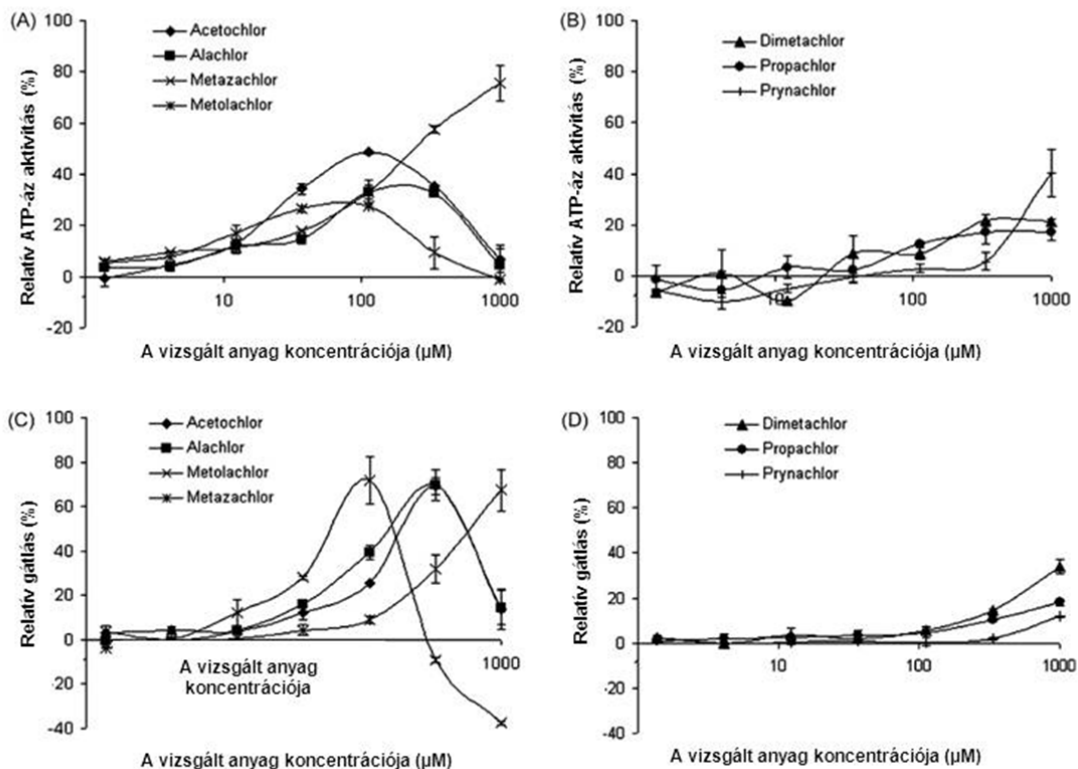
#### 5.4.4 Klóracetanilid herbicidek kölcsönhatása ABC transzporterekkel<sup>10</sup>

Releváns közlemény: (Oosterhuis 2008).

A táplálék összetevői között környezetszennyező anyagok is találhatóak. A környezetszennyező anyagok jelentős részét alkotják a peszticidek. A környezetszennyező anyagok nagy száma és a jelölt molekulák hiánya miatt az ATPáz tesztek az ideális HT szűrőtesztek szubsztrátokra. Munkánk során különböző kémiai típusba tartozó peszticidek és konjugátumaik, összességében több mint félszáz molekula kölcsönhatását néztük meg ABCB1, ABCC1, ABCC2 és ABCG2

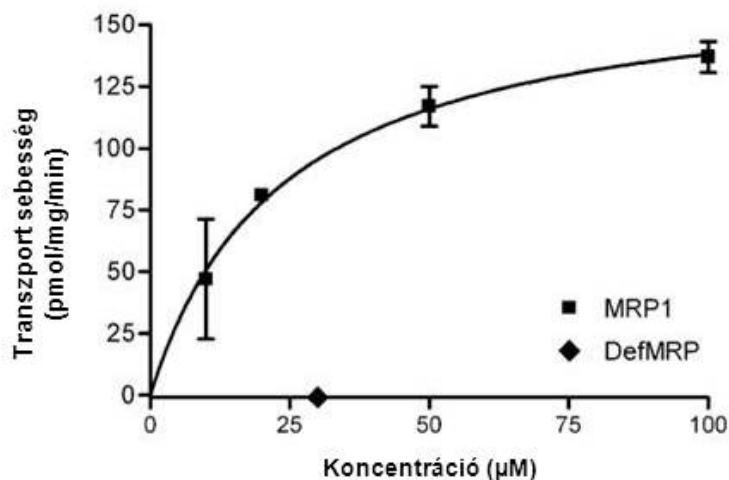
<sup>10</sup> A kollaboráló partner a felhasznált vegyületek egy részének szintézisét végezte. A biológiai/farmakológiai kísérleteket a Solvo végezte.

transzporterrel ATPáz esszében (nem közölt eredmények). A legtöbb molekula az ABCB1 ATPáz-t aktiválta, de bizonyos csoportok (pld., karbanilát és fenilurea herbicidek) preferenciálisan az ABCG2 ATPáz-t aktiválták. A legspecifikusabb kölcsönhatásokat a klóracetanilid herbicidek és az ABCB1 között detektáltuk (Oosterhuis, 2008 Figure 3). A 7 vizsgált molekulából 4, az acetochlor, alachlor, metazachlor és metolachlor aktiválta az ABCB1 ATPáz-t 10-100  $\mu\text{M}$  közötti  $\text{EC}_{50}$  értékekkel (29.A ábra). A dimetachlor, propachlor nem, a prynachlor pedig csak 1 mM-os koncentrációban aktiválta az ATPáz-t (29.B ábra). Az ATPáz eredmények korreláltak a K562MDR sejteken kapott Calcein esszé adatokkal (29.C,D ábra).



**29. ábra** Klóracetanilid herbicidek kölcsönhatása ABCB1-el ATPáz esszében

A konjugátumok közül a 2-klór-N-(2-metil-6-etilfenil)acetamid-S-glutacion stimulálta az ABCC1 ATPáz-t, és vezikuláris transzport esszében  $23,8 \pm 2,6 \mu\text{M}$   $K_m$  értéket állapítottunk meg a kölcsönhatásra (30. ábra).



**30. ábra** A 2-klór-N-(2-metil-6-etilfenil)acetamid-S-glutation transzportja ABCC1 (MRP1) által VT esszében.

A megállapított  $EC_{50}$  értékek lényegesen magasabbak, mint az ételekben/táplálékban várható értékek, azonban az efflux transzporterek a  $K_m$ -nél jelentősen alacsonyabb koncentrációk mellett is hatékonyan csökkentik a szubsztrátok permeabilitását (Xiao 2006; Shirasaka 2008). A konjugátumok esetén is hasonló a helyzet, azzal a különbséggel, hogy ezek alacsony passzív permeabilitású molekulák, ezért felhalmozódhatnak a sejtekben.

Összességében megállapítható, hogy a növényi hatóanyagok és a környezetszennyező anyagok transzporterekkel való kölcsönhatása jól karakterizálható transzportert túlexpresszázó membrán és sejtes esszéekben. Az eredmények magyarázatot adnak a molekulák komplexebb rendszerekben való viselkedésére.

## 5.5 *In vitro* vizsgálatok *in vivo* relevanciájának bemutatása. *In vitro* – *in vivo* korrelációs és fajspecifititás vizsgálatok

### 5.5.1 Az ABCC2 transzporterén mért ösztradiol-17 $\beta$ -glükuronid transzportjának potenciózása membrán, sejtes és *in vivo* rendszereken<sup>11</sup>

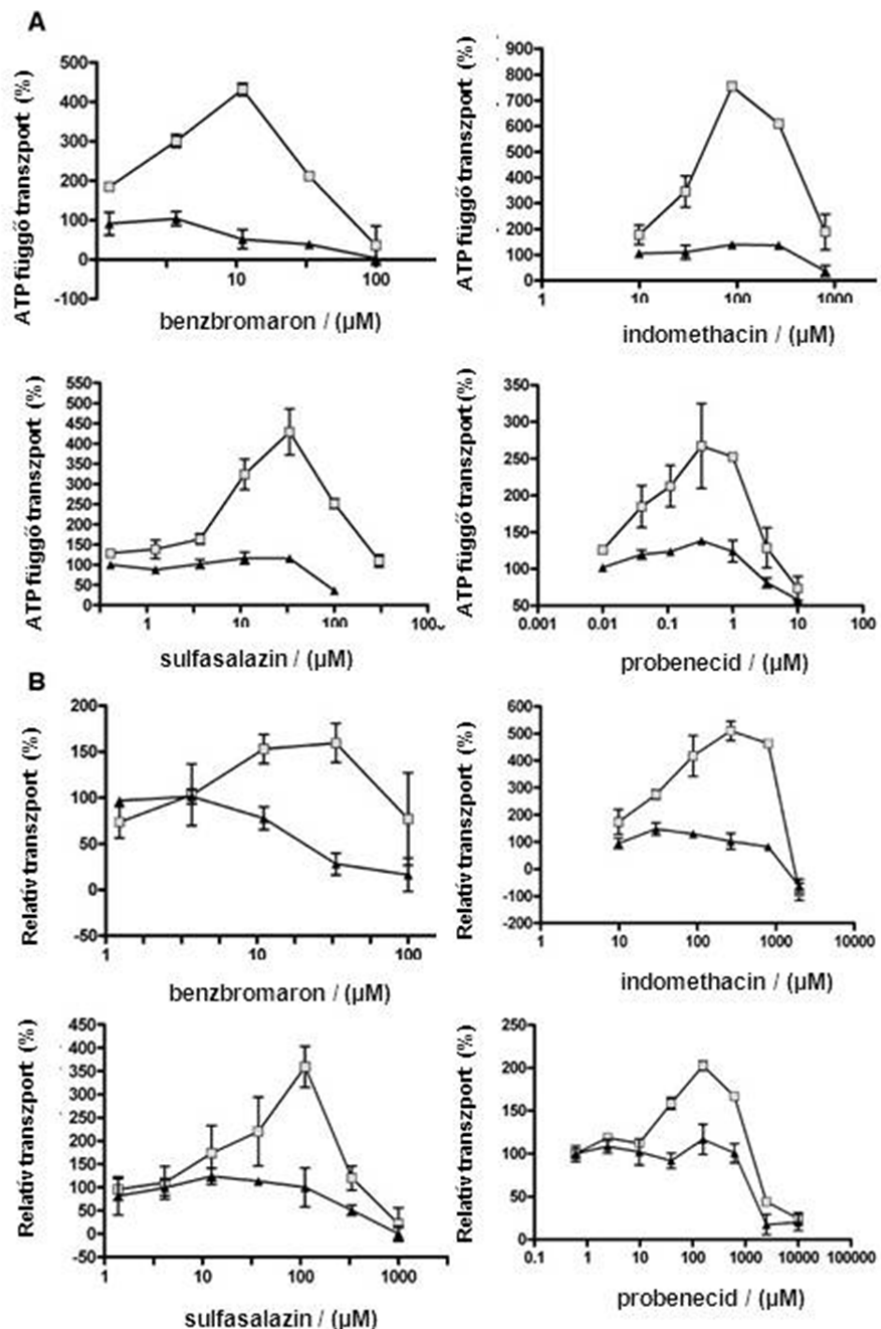
Releváns közlemény: (Heredi-Szabo 2009a; Jemnitz 2010).

A különböző komplexitású vizsgálati módszerek jól kiegészítik egymást. Az *in vitro*, elsősorban transzfektásokon vagy azokból készült sejteken végzett vizsgálatok mechanisztikus vizsgálatokra alkalmasak elsősorban, míg a primer tenyészeteken és elsősorban *in vivo* preklinikai rendszereken és klinikán végzett vizsgálatok a relevanciát igazolhatják. A két rendszer között specifikus inhibitorok illetve transzgén/knock-out állatmodellek biztosíthatják a kapcsolatot. Mi ezen módszerek barrier-specifikus integrációjára tettünk kísérletet.

Az ABCC család fehérjéi, elsősorban ABCC2/Abcc2 fehérje komplex, nem Michaelis-Menten kinetikával transzportál több szubsztrátot (Bodo 2003; Zelcer 2003; Gerk 2004; Huisman 2005; Borst 2006b; Zimmermann 2008; Heredi-Szabo 2009a). Az ösztradiol-17 $\beta$ -glükuronid (E2-17 $\beta$ -G) ABCC2/Abcc2-általi transzportjával több tanulmány is foglalkozik (Bodo 2003; Zelcer 2003; Gerk 2004; Borst 2006b; Zimmermann 2008; Heredi-Szabo 2009a). A humán fehérje minden tanulmányban szigmoidális koncentrációfüggést mutatott. A homotróp kölcsönhatás mellett heterotróp kölcsönhatás is leírásra került. Szubsztrátok és modulátorok is potenciózták egy másik szubsztrát próba transzportját (Bodo 2003; Zelcer 2003; Gerk 2004; Borst 2006b; Zimmermann 2008; Heredi-Szabo 2009a). A potenciózó hatás a legtöbb esetben vezikuláris transzport tesztben került demonstrálásra. Egyedül a paclitaxel (Huisman 2005) és a saquinavir (Zimmermann 2008) vektoriális transzportjának gyógyszer-molekulák általi potenciózása került demonstrálásra MDCKII-MRP2 sejtekben a Schinkel labor által. A mi vizsgálataink célja kettős volt: i) összehasonlítani a humán és a patkány transzportert a potenciózás vonatkozásában nemcsak vezikuláris transzportban, hanem hepatocita szendvics kultúrában is, és ii) vizsgálni, hogy a potenciózás jelensége megfigyelhető-e

<sup>11</sup> A hepatocita szendvics kultúra és az *in vivo* kísérleteket a kollaboráló partner (MTA Központi Kémiai Kutatóintézet) végezte. A Solvo a membrán teszteket hajtotta végre.

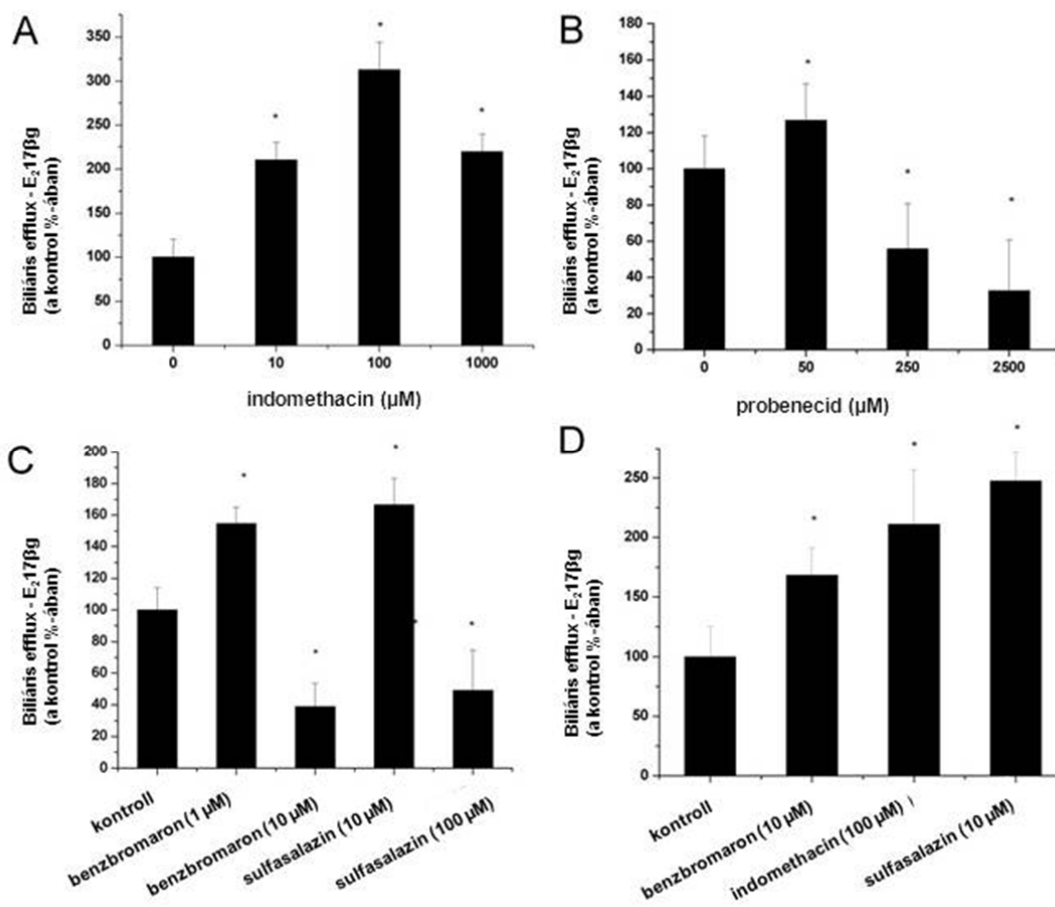
patkányban *in vivo*. A vezikuláris transzportban a humán ABCC2 általi E2-17 $\beta$ -G transzportra általunk számolt Hill szám 1,58 (Heredi-Szabo, 2009a Figure 1A,B) jó egyezésben volt mások által publikált adattal 1,6 (Zimmermann 2008). A patkány fehérjére mi hiperbolikus koncentrációfüggést kaptunk, és az általunk számolt Hill koefficiens érték, a 0,98 (Heredi-Szabo, 2009a Figure 1C,D) elfogadható egyezést mutat a független tanulmányból származó 1,16-os értékkel (Ninomiya 2006). Megjegyzendő, hogy a patkány fehérjére vonatkozóan ellentmondásos eredmények olvashatók az irodalomban, szigmoidális kinetikát és 1,5-ös Hill számot is leírtak (Gerk 2004). Mindkét transzporter esetében megfigyelhető volt a potencírozás jelensége több gyógyszer (benzbromaron, indomethacin, probenecid és sulfasalazin) által is (31. ábra). A jelenség függött a szubsztrát póba, a E2-17 $\beta$ -G koncentrációjától. Míg 1  $\mu$ M E2-17 $\beta$ -G mellett jelentős potencírozást láttunk, addig 50  $\mu$ M E2-17 $\beta$ -G mellett jobbra gátlás volt megfigyelhető (30. ábra). Míg a humán transzporter esetén a maximális potencírozás a 2,5 – 8,0 tartományban mozgott (31.A ábra), addig a patkány transzporter esetében alacsonyabb (1,7 – 5,0-szörös) maximális potencírozás (31.B ábra) volt megfigyelhető. Elmondható, hogy a gyógyszerek potensebben stimulálták az E2-17 $\beta$ -G transzportot a humán transzporterén (31. ábra).



**31. ábra** 1 μM (üres négyzet) vagy 50 μM (teli háromszög) ösztradiol-17-beta-glükuronid humán ABCC2 (A) és patkány Abcc2 (B) mediált transzportjának potencírozása gyógyszerek által.

A jelenséget szeretnénk volna megerősíteni egy komplexebb, ezáltal relevánsabb rendszerben, a hepatocytá szendvics kultúrában. Primer hepatocyták két kollagén réteg között tenyésztve polarizálódnak, kialakulnak az epecsatornák, és a biliáris transzport tanulmányozható (Swift 2010). A potencírozás jelenségét ezekben a

rendszerekben is megfigyeltük az összes vizsgált gyógyszermolekulára úgy a patkány (32.A,B,C mint a humán kultúrában (32.D ábra).



**32. ábra** Ösztradiol-17-beta-glükuronid transzportjának gyógyszerek általi potencírozása szendvics kultúrában tartott patkány (A,B,C) és humán (D) hepatocitákban. Szignifikanciák: \*p<0.05.

Intraperitoneálisan adott E2-17β-G biliáris exkrécióját az együtt adott gyógyszerek potencírozták. Az indomethacin 5 mg/kg-os dózisban 40%-al (104,8 percről 60,9 percre) csökkentette a E2-17β-G félezési idejét. A benzbromaron hatása dóziszfüggő volt. A 190,2 perces kontroll értékről 10 mg/kg dózisban 104,5 percre, míg 20 mg/kg dózisban 71,2 percre csökkent a E2-17β-G félezési ideje. A probenecid hatása bimodális volt. A 25 mg/kg-os dózis jelentős csökkenésével járt (151,2 percről 91,8

percre), míg az 50 mg/kg dózis ennél kisebb változást (115,2 perc) okozott. Elmondható tehát, hogy az ABCG2/Abcc2 mediált E2-17 $\beta$ -G transzport potencírozásának jelensége megfigyelhető primer hepatocytákon és *in vivo* is. Továbbá, kijelenthető, hogy a vezikuláris transzport alkalmas mechanisztikai vizsgálatokra (Heredi-Szabo 2009b; Jemnitz 2010).

#### 5.5.2 A quinidin és PSC833 mint szubsztrát próba és referencia inhibitor alkalmazása vér-agy gát ABCB1/Abcb1a funkció vizsgálatára<sup>12</sup>

Releváns közlemény: (Sziraki 2011).

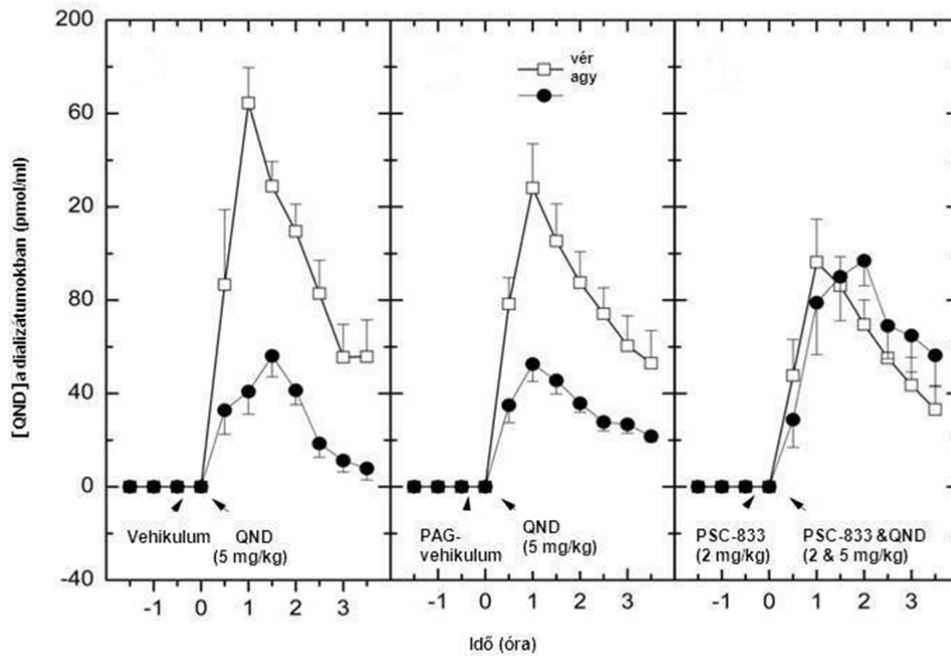
A vér–agy gát a disztribúciós barrierék között kivételesen fontos helyet foglal el. Vizsgálata nem csak a CNS támadáspontú gyógyszerek, hanem a centrális toxicitás és nemkivánt mellékhatások miatt is fontos. Nincs olyan mértékben elfogadott *in vitro* tesztrendszer, mint az abszorpció becslésére használt Caco-2 sejtvonal. Az *in vivo* – *in vitro* korrelációk elsősorban passzívan transzportálódó molekulákra mutatnak jó egyezést (Garberg 2005; Hakkarainen 2010). Következésképpen, annak megválaszolása, hogy egy molekula bejut-e az agyba, milyen efflux transzporter kölcsönhatások befolyásolják az agyi expozíciót és milyen efflux transzporter mediált gyógyszerkölcsönhatások várhatók a vér–agy gátnál többféle módszer alkalmazásával válaszolható meg adekvát módon. Az agyi expozíció mérésére a legalkalmasabb módszer az agyi mikrodialízis, hiszen ez a módszer a szabad (fehérjéhez nem kötött) szinteket határozza meg az extracelluláris folyadékban. A mikrodialízisnek nagyobb számú korlátozó tényezője van, mint az *in vitro* módszereknek. Ezért ezek a limitálók a szubsztrát próba választásban. A legfontosabbak: a szubsztrát próba nem-specifikus tapadása a mikrodialízis próbához, a használt csövezethez, valamint a szubsztrát próba toxicitása. A digoxin, az *in vitro* sejtes tesztekben alkalmazott konszenzusos ABCB1 próba nem alkalmazható *in vivo* agyi mikrodialízisben részben a nagyfokú nem-specifikus kötődés, részben a toxicitása miatt. További potenciális ABCB1 szubsztrát próbák egyike a quinidin (Ma 2010). A vér–agy gátban expresszállódó Abcb1a funkció megakadályozza a quinidin szabad ekvibrációját, ami  $0,32 \pm 0,11$  AUC<sub>agy</sub>/AUC<sub>vér</sub>

<sup>12</sup> Az inhibitorokat szintézisét és a primer patkány endothel kultúrán végzett permeabilitás vizsgálatokat a kollaboráló partnerek (Tóth Gábor, Szegedi Tudományegyetem; Krizbai István, MTA Szegedi Biológiai Központ) végezték. A további membrán, sejtes és *in vivo* vizsgálatok a Solvóban készültek.

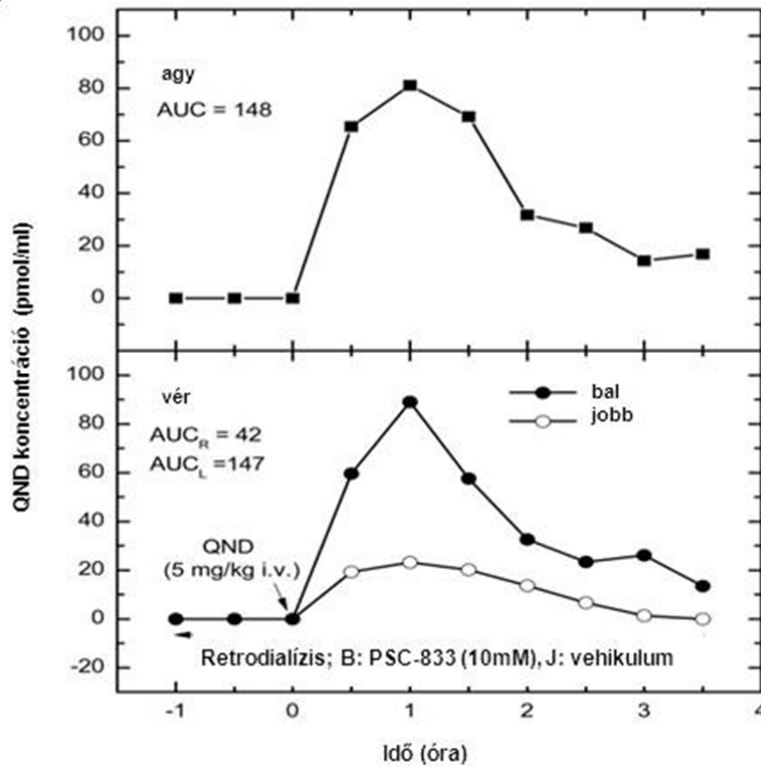


arányhoz vezet (Sziraki 2011). A  $C_{\max, \text{ agy}} / C_{\max, \text{ vér}}$  arány  $0,34 \pm 0,06$ . A specifikus ABCB1 inhibitor PSC833 2X2 mg/kg dózisban közel 4-szeresre ( $AUC_{\text{agy}}/AUC_{\text{vér}} = 1,34 \pm 0,31$ ;  $C_{\max, \text{ agy}} / C_{\max, \text{ vér}} 1,25 \pm 0,34$ ) növelte az arányokat (33.A ábra). A vehikulum kontroll hatása ehhez képest elhanyagolható ( $AUC_{\text{agy}}/AUC_{\text{vér}} = 0,38 \pm 0,09$ ;  $C_{\max, \text{ agy}} / C_{\max, \text{ vér}} 0,44 \pm 0,04$ ) (Sziraki 2011). Hárompróbas retrodialízis kísérletet is végeztünk, ahol az intravénásan adott quinidin mellett (5 mg/kg) a bal frontális cortexbe helyezett mikrodiálízis próbán keresztül 10 mM-os PSC833-at, míg a jobb frontális cortexbe vehiculumot infundáltunk, majd mértük a quinidin agyi szintjeit. Az  $AUC_{\text{agy}}/AUC_{\text{vér}}$  arány 1 volt a bal oldali cortexben, míg jobb oldali cortexben 0,28-as arányt mértünk (33.B ábra).

A

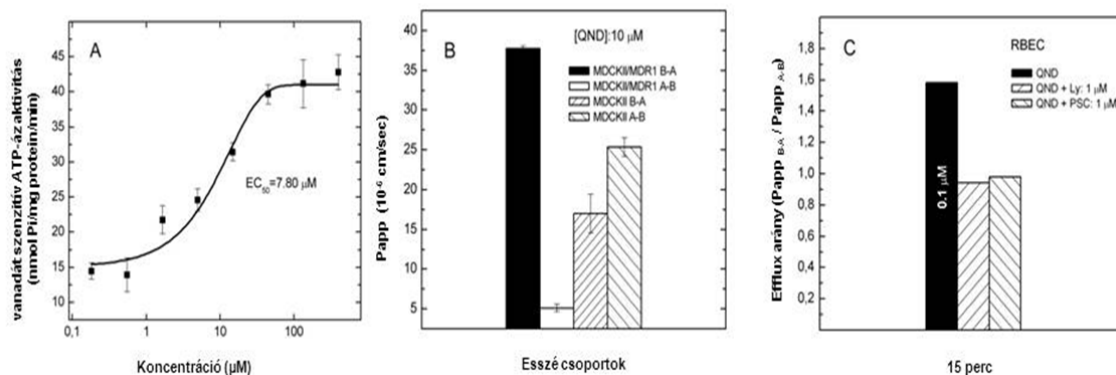


B



33. ábra Quinidin ABCB1 függő kölcsönhatása PSC833-al mikro dialízisben (A) és retrodialízisben (B).

Az *in vitro* vizsgálatok azt mutatták, hogy a quinidin 7,8  $\mu\text{M}$   $\text{EC}_{50}$  értékkel aktiválta az ABCB1 ATPáz (34.A ábra). Ez a kölcsönhatás vektoriális transzportban MDCKIIMDR1 sejtvonalon egy 8-as efflux arányt eredményezett (34.B ábra), míg a primer patkány agyi endothel kultúrán (RBEC) egy 1,8-körüli efflux arányt kaptunk (34.C ábra). A vektoriális transzport mindkét rendszerben ABCB1 függő volt, mivel szülői MDCKII sejteken az efflux arány 0,65 volt (34.B ábra), míg RBEC sejteken specifikus ABCB1 gátlószer (1  $\mu\text{M}$  PSC833 vagy 1  $\mu\text{M}$  LY335979) jelenlétében az efflux arány 1-körüli érték volt (Sziraki 2011) (34.C ábra).



**34. ábra** Quinidin kölcsönhatása ABCB1-el ATPáz esszében (A) és ABCB1 függő kölcsönhatása PSC833-al vektoriális transzport esszében MDCKIIMDR1 (B) és RBEC (C) sejteken.

Elmondható tehát, hogy az *in vitro* és *in vivo* adatok kvalitatívan korreláltak, és a quinidin alkalmas ABCB1 szubsztrát próba, a PSC833 pedig alkalmas referencia inhibitor úgy az *in vitro*, mint az *in vivo* vizsgálatokban.

## 6 Következtetések, új megállapítások

Munkánkat három fő irányvonal köré lehet csoportosítani: (i) új esszék/tesztrendszerek fejlesztése, mely magában foglalja az expressziós rendszer optimalizálását, szubsztrát próbák és referencia inhibitorok jellemzését, és az esszék felhasználhatóságának korlátait, (ii) annak megmutatása, hogy az esszék használhatók gyógyszermolekulák, növényi hatóanyagok, környezetszennyező anyagok transzporterekkel való kölcsönhatásának jellemzésére, és ADMETox sajátságainak megértésére, valamint (iii) *in vitro* – *in vivo* korrelációs vizsgálatok végzése.

Új eredményeink:

- 1., Megmutattuk, hogy az apikálisan expresszálódó ABCB11/Abcb11 és ABCG2 efflux transzporterek aktivitása jelentősen függ az expressziós rendszer membrán koleszterin tartalmától.
- 2., Kifejlesztettünk és szabadalmaztattunk egy új teszt-reagens sorozatot, a koleszterinnel feltöltött rovarsejt membránokat (High-Activity-Membrane (HAM)).
- 3., Megmutattuk, hogy az egér Abcb11 ATPáz esszé koleszterinnel töltött membránban taurokenodeoxikolát (TCDC) szubsztrát próba használata mellett alkalmas gátlás tesztben ABCB11 gátló, potenciálisan kolesztatikus anyagok kiszűrésére. Ennek a megfigyelésnek a hasznosításaként kifejlesztettünk, és validáltunk egy nem-radioaktív tesztrendszert gyógyszeripari felhasználásra.
- 4., Megmutattuk, hogy a lipophilicitás fontos determinánsa a membrán és sejtes esszékben mért IC<sub>50</sub> adatoknak.
- 5., Kidolgoztunk és szabadalmaztattunk egy fluoreszcens VT esszét ABCB1 transzporter gátlásának vizsgálatára.
- 6., Azt találtuk, hogy különböző sejtes rendszerekben mért IC<sub>50</sub> értékek ugyanazon szubsztrát próba használata esetén is különbözőek lehetnek. A különbség egyik fontos oka lehet az eltérő transzporter expresszió, hiszen a legtöbb esetben a megfigyelt különbségek korreláltak az ABCB1 transzporter expressziójával. Mindez felveti a barrier specifikus sejtvonalak, primer kultúrák használatának szükségességét.

7., Megmutattuk, hogy a chlorothiazid szelektív ABCG2 szubsztrát, amely használható különböző *in vitro* tesztekben, és feltételezzük, hogy potenciális klinikai szubsztrát próbaként is alkalmazható lenne.

8., Megmutattuk, hogy a leflunomid és aktív metabolitja a teriflunomid specifikus ABCG2 szubsztrátok, és ez a kölcsönhatás felelős ezen molekulák citotoxicitásával szembeni *in vitro* rezisztenciáért. Mivel a teriflunomidról azóta kiderült, hogy ABCG2-függő farmakokinetikája van, javasoljuk a teriflunomidot ABCG2 szubsztrát próbaként való alkalmazásra úgy klinikai, mint *in vitro* vizsgálatoknál.

9., Igazoltuk, hogy a CDCF alkalmas ABCC2 szubsztrát próbaként való alkalmazásra nagy áteresztőképességű vezikuláris transzport metodikájú szűrésekben. Ennek a megfigyelésnek a hasznosításaként kifejlesztettünk, és validáltunk egy nem-radioaktív tesztrendszert gyógyszeripari felhasználásra.

10., Megmutattuk, hogy a baicalein enterocytákban képződő glükuronidja aktiválja az ABCC2, ABCC3 és ABCG2 ATPázokat. Feltételeztük, hogy az ABCC2 és az ABCG2 lehet felelős a baicalein-glükuronid apikális/lumenális, míg az ABCC3 a basolaterális abszorptív transzportjáért.

11., Azt találtuk, hogy a baicalein-glükuronid biliáris exkréciójában a hepatocyták sinusoidális membránjában lokalizálódó influx és a canaliculáris membránban található ABCC2 és ABCG2 efflux transzporterek vesznek részt. A baicalein glükuronid SLCO influx transzportereken való profilozása azt mutatta, hogy az SLCO2B1 lehet a legfontosabb influx transzporter az SLCO családból baicalein-glükuronid hepatocytákba történő felvételében

12., Azt találtuk, hogy a hesperetin-7-O-glükuronid aktiválja az ABCC2, ABCC3 és ABCG2 ATPázot, míg a hesperetin-3'-O-glükuronid csak az ABCC2 és ABCC3 ATPázot aktiválja. A hesperetin-7-O-glükuronidnak az ABCG2-vel való kölcsönhatása magyarázhatja ennek a glükuronidnak a specifikus, apikális/lumenális szekrécióját az enterocytákban, míg az ABCC3 lehet a felelős a két glükuronid abszorptív transzportjáért.

13., Megvizsgáltuk a hidroxifahéjsavak kölcsönhatását a vesében kulcsszerepet játszó SLC22A alcsaládba tartozó szerves anion (OAT) transzporterekkel. Azt találtuk, hogy a konjugálatlan savak esetében az SLC22A6 játsza a legfontosabb szerepet *in vitro*. A szulfát konjugátumokat az SLC22A6, míg a glükuronid konjugátumokat az SLC22A8 transzportálja preferenciálisan. Ezek a transzporterek lehetnek felelősek a basolaterális oldalon a renális szekrécióért. Az apikális

exkrécióban az ABCG2 és ABCC2 transzportereket teszteltük, és nem találtunk számottevő kölcsönhatást. Ezzel szemben néhány szulfát konjugátum transzstimulálta az SLC22A11 mediált influx aktivitást, tehát elképzelhető, hogy az SLC22A11 részt vesz ezen szulfát konjugátumok szekretórikus transzportjában.

14., Megmutattuk, hogy a klóracetanilid herbicidek jelentős része aktiválja a humán ABCB1 ATPáz, tehát valószínűsíthetően szubsztrátja is. Az ATPáz esszé tehát egy olcsó, nagy áteresztőképességű esszé, amely alkalmas nagyszámú környezetszennyező anyag tesztelésére.

15., Igazoltuk, hogy az ABCC2/Abcc2 transzporterek általi ösztadiol-17béta-glükuronid transzport gyógyszerek általi stimulációja mefigyelhető úgy a humán, mint a patkány transzporterén. Továbbá, mindkét fajból származó hepatocyták szendvics kultúrában végzett méréseiben, valamint patkányban *in vivo*. Kijelenthetjük, hogy a jelenség élettani és farmakológiai szempontból is releváns.

16., Megmutattuk, hogy a quinidin és a PSC833 alkalmas szubsztrát próba – referencia inhibitor páros *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokban a vér-agy gát ABCB1-en történő kölcsönhatásainak vizsgálatára.

## 7 Megbeszélés

A Megbeszélés fejezet a kapott eredményeket, a kísérleti részben alkalmazott sorrendben, de egy tágabb kontextusban tárgyalja. Ahol a leírt kísérleti munka állása megkívánja, a továbblépési lehetőségek is tárgyalásra kerülnek

A munkánk alapvetően arra irányult, hogy a gyógyszerkutatás egy speciális szegmensét kiszolgáló, gyógyszer - transzporter kölcsönhatások mérésére és értelmezésére alkalmas tesztrendszereket kifejlesszünk, optimalizáljunk és validáljunk. Mindehhez szükség volt olyan alapvető membránbiológiai vizsgálatokra, mint a lipiddkörnyezet hatása a transzporterek aktivitására. Szintén fontos a transzporter expresszió hatása a kinetikai paraméterekre. Vizsgáltuk, hogy a molekulák lipofilicitása hogyan befolyasolja a teszt eredményeket. Megfigyeléseinket, eredményeinket „beépítettük” kísérleti rendszereinkbe, és megmutattuk, hogyan használhatók a gyógyszerkutatásban, a növényi hatóanyagok abszorpciójának és exkréciójának megértésében. Továbbá, kezdeti lépéseket tettünk abban az irányban, hogy a környezetszennyező anyagok transzporter kölcsönhatásainak vizsgálatán keresztül lehetőség legyen kedvezőbb tulajdonságú (pl. emberben rosszabbul felszívódó) peszticidek fejlesztésére.

A gyógyszerkutatás ADMETox szegmense arról szól, hogy megértsük milyen kölcsönhatások determinálják a gyógyszerjelöltek farmakokinetikai, és toxikológiai viselkedését emberben. Egy *in vitro* tesztrendszer tehát akkor jó, ha a gyógyszer tulajdonságait meghatározó fehérjék aktív szerkezetűek, és releváns molekuláris környezetben vizsgálhatók. A vizsgálatok mechanisztikus szempontjait (specifititás), és a tesztek áteresztőképességét előnyösen befolyásolja, ha a célfehérjét túlexpresszáljuk. Az ABC transzporterek közkedvelt expressziós rendszere a baculovírus vektor – rovarsejt rendszer, ami magas expressziót ad, és többféle esszében (ATPáz, vezikuláris transzport és festéktranszport) is alkalmazható. Vizsgálataink (5.1.1 és 5.1.2 fejezet), két transzporter (ABCB11/Abcb11, ABCG2) esetében is azt mutatták, hogy ezen rendszer használatának korlátai vannak (Glavinas 2007; Pal 2007b; Kis 2009a). Eredményeinket az ABCG2 (Telbisz 2007) és az Abcb11 (Paulusma 2009) vonatkozásában független kutatások is megerősítették. A foszfatidil-szerin flippáz, ATP8B1 deficienciája emberben a progresszív familiális intrahepatikus kolesztázis 1 típusát (PFIC1) illetve a benignus

ismétlődő intrahepatikus kolesztázis 1-es típusát (BRIC1) okozza. Elferink és munkatársainak (Paulusma 2009) vizsgálata szerint az ATP8B1 deficienciája a hepatocytá membrán exoplazmás lemezében foszfatidil szerin megjelenésével, és az epesókkal szemben rezisztens struktúra elvesztésével jár. Ennek következménye a membrán koleszterin fokozott extrakciója (Paulusma 2008). A csökkent membrán koleszterol csökkent ABCB11 aktivitással, és epepangással, magas szérum epesó koncentrációval jár. A holland kutatók a funkcionálisan deficiens *Atp8b1*<sup>G308V/G308V</sup> egér modellen sikerült igazolniuk ezt a mechanizmust (Paulusma 2009). Az ABCB11 koleszterinfüggő aktivitását igazoló megfigyelésünknek tehát komoly élettani és kóréletti relevanciái vannak. További adatokat szolgáltatnak a megfigyelés megértéséhez azok a tanulmányok, melyek az ABCG2 (Storch 2007), és az ABCB11-ről (Ismair 2009) igazolták, hogy az fiziológiásan az apikális membránok koleszterin gazdag raft/caveola mikrodoménjeiben helyezkednek el. Mindkét transzporterről igazolták, hogy kolokalizálódik a caveolin-1 fehérjével (Storch 2007; Ismair 2009). Továbbá, az ABCG2-ről a caveolin-1-el való asszociáció is igazolást nyert (Storch 2007). A különböző tanulmányok egyetértenek abban, hogy a koleszterin általánosságban véve nem modulálja az epesók affinitását a transzporterhez, viszont jelentősen növeli a transzportsebességet. Ami a gátlószerek potenciáját illeti, ott is hasonlóak a megfigyelések, bár a cyclosporin A közel 10-szer magasabb IC<sub>50</sub> értéke a koleszterinnel töltött ABCB11 membránon (BSEP-HAM) óvatosságra int (Kis 2009a). A koleszterin hatás mechanizmusa máig tisztázatlan (Hegedus 2009). Nincs jele a kompetíciónak, és annak sem, hogy a koleszterin szubsztrátja lenne a fehérjéknek. Az ABCG2 esetén a koleszterin feltöltés emelkedett ATPáz alapaktivitással (Kis 2009a), míg az Abcb11 esetében csökkent ATPáz alapaktivitással (Kis 2009c) járt, tehát ebből sem vonható le egyértelmű konklúzió. Az, hogy az ABCG2 R482G és R482G mutánsok aktivitását a koleszterin nem befolyásolta szignifikánsan (Telbisz 2007), arra utal, hogy itt egy specifikus hatásról van szó.

További ABC transzporterek esetében egyedül a basolaterálisan expresszáldó ABCC1-ről publikált adatok utalnak egységesen arra, hogy a fehérje aktivitását nem potenciózza a koleszterin (Cerf 2007; Telbisz 2007; Meszaros 2011). Az ABCG2- és ABCB11-hez hasonlóan apikálisan expresszáldó ABCC2 esetében szintén megfigyelték a koleszterin potenciózó hatását (Ito 2008). A koleszterin ABCB1-re



kifejtett hatását sokan tanulmányozták, többek között magyar kutatók is (Fenyvesi 2008). A koleszterin ABCB1-en kifejtett hatására és a hatás mechanizmusára vonatkozó következtetések sem egységesek (Klappe 2009).

Összegezve, megfigyeléseink azt sugallják, hogy az expressziós rendszer megválasztásánál vagy kialakításánál a membrán lipidkörnyezetre tekintettel kell lennünk.

Az ABC transzporterek esetében sejtes és membrán alapú tesztrendszerek alkalmazhatók úgy a szubsztrát mint az inhibitor esszéiben. A két leggyakrabban alkalmazott szubsztrát esszé az ATPáz és a vektoriális transzport esszé. Irodalmi adatok analízisével azt állapítottuk meg, hogy a vektoriális transzport szubsztrát esszé eredményei és az ugyanazon rendszerben mért gátlás adatok között kicsi a korreláció (14. táblázat). Ez részben annak tudható be, hogy a magas passzív permeabilitású molekulák között volt, ahol sok ATPáz aktivátor negatívként jelent meg a vektoriális transzport esszéiben (Polli 2001; von Richter 2009).

A tesztrendszerek másik fontos része a szubsztrát próbák kiválasztása. A szubsztrát próbák egyrészt pozitív kontrollok szubsztrát esszéikben, másrészt riporter szubsztrátok gátlás esszéikben. A regulációs vizsgálatokban célszerű konszenzusos szubsztrát próbákat használni, ezért a szubsztrát próbákra a gyógyszerhatóságok javaslatot is tesznek. A gyógyszerhatóságok által kiválasztott efflux transzporterek közül az ABCB1 esetében a digoxin a preferált próba (EMA-Guidance 2010; Giacomini 2010), bár a szakmai társadalom megosztott ezzel kapcsolatban (Lee 2011; Shi 2011). Az ABCB11 esetében a transzporter fiziológiás szerepe és a gátlásából következő toxicitás profil egyértelművé teszi egy epesó szubsztrát próbaként való használatát. A legtöbbet használt szubsztrát próba a taurokolát. A harmadik, a gyógyszerhatóságok által kiválasztott transzporterre, az ABCG2-re nincs konszenzusos próba (Giacomini 2010). Az egyik fontos kiválasztási szempont a specificitás, hiszen az átfedő szubsztrát specificitás profilok miatt *in vivo* egy transzporter hatását egy másik elfedheti kompenzatórikus expresszió növekedés. Ez úgy jelenik meg, hogy egy transzporter hatását knock-out állatokban csak a másik transzporter egyidejű kiütésével lehet felmérni (Robey 2010). A legtöbb példa arra van, hogy az ABCG2 esetén az ABCB1 a legtöbb esetben a maszkírozó transzporter (Enokizono 2008). A vér-agy gátban lévő Abcg2 hatását knock-out állatokban csak

olyan szubsztrátokra lehetett detektálni, melyek nem ABCB1 szubsztrátok is egyúttal. Egyik tanulmányunk, a chlorothiazid ABCG2 kölcsönhatását tanulmányozta. A chlorothiazid mint potenciális szubsztrát egy korábbi szűrőmunkánk során került a látóterünkbe. A molekula szelektív ABCG2 szubsztrát, nem szubsztrátja az ABCB1-nek (Beéry 2011 Figure 1.), bár az ABCC4 interakció még nem zárható ki. Előnye a chlorothiazidnak, hogy az összes vizsgált *in vitro* esszében, azaz az ATPáz, vezikuláris transzport és vektoriális transzport tesztben is használható. A chlorothiazid, és a hydrochlorothiazid összehasonlításából az derül ki, hogy az utóbbi nem ABCG2 ATPáz aktivátor (Beery 2011), bár vezikuláris transzport kísérletek azt mutatták, hogy szubsztrátja a humán ABCG2-nek (Hasegawa 2007). Míg emberben a chlorothiazid abszorpciója p.o. adagolás esetén a 20-50%-os tartományban van (Straughn 1979; Osman 1982; Adebayo and Mabadeje 1985), a hydrochlorothiazid abszorpciója 80% körüli. Feltételezhető, hogy a chlorothiazid nagyobb transzport sebességgel transzportálódó ABCG2 szubsztrát, és ez okozza a különbséget. Ahhoz, hogy a chlorothiazid legitim jelölt legyen az ABCG2 szubsztrát próba szerepre, igazolni kell, hogy emberben is ABCG2-függő farmakokinetikát mutat. Ezek a vizsgálatok még váratnak magukra.

A teriflunomidról és a prophaconon leflunomidról mi írtuk le, hogy specifikus ABCG2 szubsztrátok (Kis 2009b). Mindkét gyógyszer aktiválja az ABCG2 ATPáz, és kölcsönhat az ABCG2-vel membrán (VT) és sejtes (Höchst) esszében is (5.2.1, 14. ábra). Mindkét gyógyszer potens szubsztrátja az ABCG2-nek a leflunomid ABCG2 ATPázban mért  $EC_{50}$  értéke 3,93  $\mu$ M, míg a teriflunomidé 0,78  $\mu$ M (Kis 2009b). Ennek a kölcsönhatásnak a következménye, hogy az ABCG2 túlexpresszálása HEK-293-as sejtekben a gyógyszerek citotoxicitásával szemben rezisztenciát okoz (Kis 2009b), ami a transzporter gátlásával felfüggeszthető (5.2.1, 15. ábra). Eredményeink klinikai relevanciáját egy holland kutatócsoport igazolta, akik megmutatták, hogy methotrexátra és/vagy leflunomidra rezisztens betegek synoviumából izolált makrofágokban az ABCG2 expresszió lényegesen magasabb, mint a kezelésre szuszceptibilis betegek esetében (van der Heijden 2009). További érdekes fordulat, hogy a teriflunomid ABCG2-függő farmakológiát mutatott, azaz az alacsonyabb ABCG2 aktivitással járó, c.421C>A allélt hordozó betegekben a gyógyszer összes lényeges farmakokinetikai paramétere szignifikánsan különbözött a csak vad típusú allélt hordozó betegektől (Kim 2011). A  $C_{max}$  értékek 30%-al (2.01

$\mu\text{g/ml}$  szemben a  $2.61 \mu\text{g/ml}$ ,  $P=0.029$ ), míg az AUC értékek 83%-al ( $476.8 \text{ ng}\cdot\text{h/ml}$  szemben az  $871.2 \text{ ng}\cdot\text{h/ml}$ ) ( $P=0.004$ ) voltak magasabbak a c.421C>A allélt is hordozóknál. A gyógyszer felezési ideje 45%-al hosszabb ( $207.8 \text{ h}$  szemben a  $300.9 \text{ h}$ ) ( $P=0.029$ ), míg az orális clearance 41% -al volt alacsonyabb ( $45.0 \text{ L/h}$  szemben a  $26.6 \text{ L/h}$ ) ( $P=0.001$ ) a c.421C>A allélt is hordozóknál. Mindez annak fényében, hogy a teriflunomid a gyógyszerhatóságok által preferált vektoriális esszében úgy az MDCKIIBCRP, mint a Caco-2 sejteken is ABCG2-től függően transzportálódtak (Krajcsi és munkatársai, kézirat előkészületben) a teriflunomidot ABCG2 szubsztrát próba szerepére alkalmas jelöltté teszi.

A gyógyszerkutatás korai fázisában végzett vizsgálatok a magas vegyületszám miatt megkövetelik HT szűrőtesztek kifejlesztését. A fluoreszcens szubsztrát próbák alkalmazása közkedvelt az ilyen szűrőtesztekben. Még akkor is, ha a fluoreszcens próba nem egy klinikai szempontból releváns gyógyszer. Ez a gyógyszerkutatás-fejlesztés késői fázisaiban szükségessé teszi az *in vitro* vizsgálatok megismétlését klinikailag releváns szubsztrát próbák felhasználásával. Az ABCB1 transzporterre a magyar kutatók által kifejlesztett (Homolya 1993), calcein-AM-et szubsztrát próbaként használó Calcein esszé a legalkalmasabb HT szűrőtesztekben való felhasználásra. A teszt detektálja a legtöbb gyógyszer – ABCB1 kölcsönhatást (Rautio 2006; von Richter 2009). Eredményei jól korrelálnak a szakmai körökben relevánsabbnak tekintett, ám lényegesen alacsonyabb áteresztőképességű digoxin transzport gátlás teszt eredményeivel (Cook 2010; Glavinas 2011). Az irodalomban MDCKIIMDR1 sejteken calcein esszében mért  $IC_{50}$  értékek (Polli 2001; Rautio 2006) lényegesen magasabbak voltak az általunk K562MDR sejteken mért értékeknél, ami standardizációs problémát jelent az eredmények felhasználásában, az ezen értékek alapján megbecsült gyógyszer-interakciós potenciál megállapításában. Megnéztük tehát, hogy a választott sejtrendszer milyen hatással van a kapott  $IC_{50}$  adatokra (5.2.2, 15. táblázat). Jelentős, több mint 50-szeres különbségeket találtunk (Glavinas 2011). Ahol tendenciózus különbségek voltak a három általunk vizsgált sejtvonallal között, ott az  $IC_{50}$ -eredmények korreláltak a transzporter expresszióval ( $IC_{50,MDCKIIMDR1} > IC_{50,K562MDR} > IC_{50,hCNMECD3}$ ) (Glavinas 2011). Nem minden vegyületre voltak azonban ilyen trendek megfigyelhetők a teljes sejtpanelre. Ezért feltételezzük, hogy más jellemzők, úgy mint a membránok lipid összetétele illetve a membránok kompaktsága is szerepet játszhat (Gatlik-Landwojtowicz 2006; Seelig

2007). Pontos magyarázat nincs, de hasonló, sejtvonal- és transzporter expresszió függő ABCB1 gátlási potenciált figyeltek meg quinidinre korábban mások is (Taub 2005). Látva a hCMEC/D3, humán agyi endothelen kapott alacsony  $IC_{50}$  értékeket, összességében elmondható, hogy a tesztrendszernek komoly befolyása van a mért értékekre, és a Calcein esszé alkalmas a gyógyszer-transzporter kölcsönhatások barrier-specifikus tesztelésére.

A calcein-AM egy további érdekes vizsgálatra is lehetőséget adott. Megnézhettük hogyan korrelálnak a kapott  $IC_{50}$  értékek három különböző tesztben (5.2.2): az ABCB1 ATPáz, ABCB1 vezikuláris transzport és ABCB1-specifikus Calcein esszében (Szeremy 2011). Az, hogy a különböző típusú esszében ugyanazt a szubsztrát próbát használhattuk, kiküszöbölte a különböző próba – különböző kötőhely és különböző kinetika problémakörből adódó kompatibilitási nehézségeket. Vizsgálatainkban azt találtuk, hogy a különböző esszéekben kapott  $IC_{50}$  értékek rangsora ugyanaz (Szeremy 2011, Table 1). Különbséget láttunk viszont az individuális értékeknél. Valamint megfigyelhető volt mint tendencia hogy az  $IC_{50,calcein} / IC_{50,VT}$  hányados a molekulák lipofilicitásával fordított arányban változott (18. ábra). Összefoglalva, a calcein-AM többféle tesztrendszerben jól alkalmazható próba. Az eredmények értékelésében, azonban figyelembe kell venni a tesztrendszer karakterisztikáit (transzporter expresszió), és a teszt anyag tulajdonságait (lipofilicitás) is.

Az ABCC2 transzporter több fontos barrierben, úgy mint a hepatikus, intesztinális és renális is jelen van. A legfontosabb szerepet mégis a hepatikus barrierben játssza. Ugyan több szubsztrátja van a hatóanyagok valamint elsősorban a fázis II metabolitok között, fontosságát mégis a toxikológiai jelentősége húzza alá. A transzporter funkció gátlása a szubsztrát bilirubin glükuronidok hepatikus felhalmozódásával, és –elsősorban a sinusoidális ABCC3 általi transzportnak következtében- megemelkedett plazma szintekkel, azaz konjugált hiperbilirubinémiával jár. Az ABCC2 tanulmányozása tehát nagyon fontos. A fiziológiás szubsztrátok között a leukotrién  $C_4$  transzport Michaelis-Menten kinetikát követ, és a potencírozás jelensége nem lép fel (5.2.3, 19. ábra). Tehát olyan szubsztrátot kerestünk, amely hasonló kinetikával transzportálódik, viszont kedvezőbb sajátságokkal rendelkezik, mint az leukotrién  $C_4$ . Vizsgálataink azt mutatták, hogy a CDCF alkalmas szubsztrát (5.2.3, 16. táblázat, 19. ábra). Ráadásul nem csak vezikuláris transzportban alkalmazható, hanem sejtes esszéekben is, hiszen

van membrán permeábilis változata is, a carboxy-dichloro-fluorescein-diacetát (CDCF-DA). Maga a CDCF is szubsztrátja az SLCO családba tartozó hepatocita influx transzportereknek (Howe 2009). Hepatocita szendvics kultúrában a CDCF a kanalikulusokban halmozódik fel, és alkalmas azok megjelenítésére, a kultúra morfológiájának, és az ABCC2 funkció gátlásának vizsgálatára.

Optimalizált és validált tesztek alkalmasak kismolekulák transzporterekkel való kölcsönhatásának tesztelésére. Gyógyszermolekulák tesztelését célzó vizsgálataink az ABCB1, az ABCC és az ABCG2 transzporterekre fókuszáltak (5.3 fejezet).

A seliciclibről igazoltuk, hogy specifikus ABCB1 szubsztrát (5.3.1, 20. ábra). Ez a kölcsönhatás megjelent az MDCKII-MDR1 sejtvonalon végzett vektorialis transzport esszéiben. Valószínűsíthető, hogy ez a kölcsönhatás a felelős a korlátozott vér–agy gát permeabilitásért felnőtt patkányban. Érdekes módon a kölcsönhatás nem járt együtt a gyógyszer citotoxicitása elleni rezisztenciával az ABCB1-et túlexpresszáló sejtvonalakon. Utóbbi lehet annak a következménye, hogy a magas passzív permeabilitás mellett ebben az esszéiben a transzport nem volt képes jelentősen csökkenteni az intracelluláris gyógyszer koncentrációt. Ez LC/MS mérésekkel megválaszolható. Amennyiben nem erről van szó, azt feltételezhetjük, hogy a seliciclib is az MDR1-inverz vegyületek közé tartozik, melyek citotoxikus potenciálja korrelál az ABCB1 expresszióval (Szakacs 2004). A seliciclib esetén ezt a hatást kimutatták MCF7 és az ABCB1-et magasan expresszáló MCF7 sejtvonalakon (Cappellini 2009). Amennyiben ez a mechanizmus a magyarázat a jelenségre, úgy az általunk vizsgált sejtekben az ABCB1 kétélű kardként viselkedik, mely egyrészt csökkenti a citosztatikum intracelluláris koncentrációját, másrészt közvetíti a gyógyszer citotoxikus hatását, és a kettő nagyjából kiegyenlíti egymást.

A parazita ellenes szerként ismert ivermectinről ismert volt, hogy ABCB1/Abcb1 szubsztrát, és a kölcsönhatás felelős a csökkent agyi expozícióért, és a neurotoxicitás hiányáért (Schinkel 1994). Az ivermectin nagy mérete és flexibilis szerkezete alkalmassá teszi, hogy több transzporter szubsztrát/inhibitor kötőhelyére bekötődjön (5.3.2, 21. ábra). Vizsgálataink azt mutatták, hogy az ivermectin kölcsönhat az ABCC1-3 fehérjékkel és az ABCG2-vel is. A kölcsönhatások nem utaltak a szubsztrát jellegre, mert nem volt ATPáz aktiválás (5.3.2, 17. táblázat, 22. ábra), de az az ABCB1-et túlexpresszáló membránokban sincs, pedig az ivermectin

az ABCB1-nek ismert szubsztrátja. Az ivermectin néhány páciensben 100 nM-os plazma szintet érhet el (El-Tahtawy 2008) míg a 150 µg/kg orális dózissal (<http://www.drugs.com/>) számolva koncentrációja a bélben elérheti az 50-70 µM-t. Az ABCG2 gátlását jellemző 1,4 µM-os  $K_i$  (Jani 2011) érték mellett ez a kölcsönhatás gyógyszerinterakció szempontjából már szignifikáns, hiszen plazma szintjén megközelíti a  $\text{koncentráció}/K_i \geq 0,1$ , és a béltraktusban pedig túlszárnyalja a  $\text{koncentráció}/K_i \geq 10$  küszöbértéket (FDA-Guidance 2012). Egy, az ivermectin – ABCG2 interakcióból adódó gyógyszerinterakciót azóta egérben már igazoltak (Real 2011).

A sulfasalazin olyan alacsony passzív permeabilitású molekula, hogy hatékonyan infux transzporter segítségével jut csak be a sejtbe. Ebben az esetben az intracelluláris koncentráció meghatározása addicionális feladat. Az efflux transzporterek sulfasalazin kölcsönhatásának vizsgálata tehát nehézkes, és az eredmények értelmezése sem egyértelmű. A sulfasalazin transzport és sulfasalazin gátlás vizsgálatára a vezikuláris transzport egyértelműen a legalkalmasabb (Jani 2009). Vizsgálataink igazolták, hogy a humán ABCG2 nagy affinitással transzportálja a sulfasalazint (5.3.3 fejezet). Továbbá, a sulfasalazin esetében nem látunk, a methotrexát transzportjánál megfigyelthez (Breedveld 2007) hasonló mértékű pH-függést (Jani 2009 Figure 2,3). Az alacsony passzív permeabilitású gyógyszerek általi gátlás vizsgálatára már a gyógyszerhatóságok által is ajánlották a vezikuláris transzport módszert (Zhang 2009; Giacomini 2010).

A növényi hatóanyagok jelentős része tartalmaz fenolos funkciót. Ezek a molekulák intenzíven konjugálódnak, és a vérben elsősorban a konjugátumaik találhatóak. A konjugátumok passzív permeabilitása igen alacsony, ezért a sejtmembránokon át történő transzportjuk transzporter mediált. Polarizált sejteken való vektoriális transzportjuk pedig egy apikális és egy basolaterális transzporter együttműködésével valósul meg. Az általunk vizsgált növényi hatóanyagok fenolos funkcióiknak köszönhetően már az enterocytákban konjugálódnak ezért a Caco-2 sejtvonalon vizsgálható volt a metabolizmusuk és az alapmolekula valamint a metabolitok transzportja is (5.4. fejezet). A baicalein esetében a glükuronid és szulfát konjugátum is képződött közel egyforma arányban (Zhang 2007a Figure 3-5). A keletkezett konjugátumok nagy hatékonysággal effluxálódtak. Intracellulárisan a képződött

baicalein-glükuronidnak mindössze 1,6% volt található, míg az intracelluláris baicalein-szulfát detektálhatatlan volt (Zhang 2007a). Míg a glükuronid konjugátum nagyobbik része basolaterálisan, addig a szulfát konjugátum nagyobbik része az apikális membránon át effluxálódott. A baicalein-glükuroniddal végzett vizsgálataink azt mutatják, hogy az abszorptív transzportban az ABCC3 játszhat szerepet, míg a szekretórikus transzportban az ABCG2 és az ABCC2 is részt vehet (5.4.1 fejezet). Baicalein szulfáttal nem végeztünk méréseket, de a transzport iránya, és az ott lévő transzporterek szubsztrátspecifitása alapján (Adachi 2005) feltételezhető, hogy döntően az ABCG2 transzportálja. Egérben végzett kísérletek azt mutatták, hogy fenolok glükuronidációja a béltraktus felső szegmenseiben, míg a szulfatálódás az alsó szegmensekben domináns. Mivel az Abcg2 expressziója a középső és alsó szegmensekben magasabb, így az Abcg2 és a szulfotranszferáz (Sult) enzimes család szép példáját szolgáltatja a metabolizmus és transzport együttműködésének (Enokizono 2007b). Feltételezhető továbbá, hogy az enterocytáknál a SULT és/vagy ABCG2 funkciók gátlásával a növényi hatóanyagok biológiai hasznosíthatósága növelhető lenne. A baicalein közepes passzív permeabilitású molekula (Zhang 2007a). Magasabb dózisoknál, a metabolikus apparátus telítődése következtében a baicalein több mint 75%-a átjut a Caco-2-es sejteken (Zhang 2007a). A májnak tehát szerepe lehet a baicalein metabolizmusában valamint biliáris exkréciójában. Vizsgáltuk ezért a baicalein és baicalein-glükuronid biliáris exkrécióját. Szelektív gátlószerekkel azt sikerült igazolni, hogy a canaliculáris exkrécióban az ABCC2 és ABCG2 transzportereknek van szerepük. (Zhang 2011). A baicalein-glükuronid hepatocytákba történő influxában az SLCO2B1 és az SLCO1B3 szerepe feltételezhető (5.4.1, 18. táblázat). Ennek igazolásához primer hepatocytákon és transzfektánsokon végzett influx tesztek elvégzése szükséges.

A hesperidin a narancsfélék fő flavonoidja (5.4.2, 25. ábra). A deglikozilációjából keletkező hesperetin az enterocytákban konjugálódik. A keletkező fő metabolitok, a hesperetin-7-O-glükuronid és a hesperetin-3'-O-glükuronid Caco-2-es sejtekből történő effluxa különbséget mutat (Mullen 2008). Csak az előző effluxálódik az apikális oldalon. Vizsgálataink azt mutatták, hogy csak a hesperetin-7-O-glükuronid aktiválta az ABCG2 ATPáz (5.4.2, 19. táblázat). A hesperetin-7-O-glükuronid a másik, glükuronidok transzportjában érintett apikális efflux transzporterrel, az ABCC2-vel is kölcsönhat, de lényegesen alacsonyabb  $EC_{50}$  értékkel (0,45  $\mu$ M

szemben a  $129 \pm 78 \mu\text{M}$ ). Ez a kölcsönhatás valószínűen elhanyagolható, hiszen a hesperetin-3'-O-glükuronid is aktiválja az ABCC2 ATPázát alacsonyabb EC50 ( $85 \pm 13 \mu\text{M}$ ) és hasonló hatékonysággal, mint a hesperetin-7-O-glükuronid, még sincs számottevő apikális effluxa. Mindkét glükuronid nagy hatékonysággal aktiválja az ABCC3 ATPázát (5.4.2, 19. táblázat). Tehát valószínűsíthető, hogy ez a transzporter a felelős az abszorptív effluxért. Ennek igazolása vezikuláris transzport kísérletben még várat magára. Itt is elmondható, hogy az ABCG2 funkció hesperetin-7-O-glükuronid apikális effluxával limitálhatja a hesperetin biológiai hasznosíthatóságát. Az ABCC3 transzporter ugyanakkor kiemelkedő szerepet játszik a hesperetin-glükuronidok abszorpciójában.

A hidroxifahéjsavak szintén tartalmaznak fenolos funkciót, és ezért hatékonyan glükuronizálódnak és szulfatálódnak (5.4.3, 26. ábra). A dózis mintegy fele a vesén át ürül. Azonosítandó az aktív szekrécióért felelős fehérjéket, teszteltük a renális PT-ban expresszálandó anion transzportereket. A hidroxifahéjsavak a savas funkciónak köszönhetően konjugátlanul is alacsony passzív permeabilitásúak, így sejtes felvételük influx transzporter függő (5.4.3, 27. ábra). A konjugátlan vegyületeket és a szulfát konjugátumokat az SLC22A6, míg a nagyobb méretű glükuronid konjugátumokat az SLC22A8 transzportálta nagyobb sebességgel (5.4.3, 28. ábra). Egy további organikus anion transzporter, az SLC22A11 meddiálhatja az apikális szekretórikus effluxot is, mert a bizonyos szulfát konjugátumok transzstimulálták a SLC22A11 általi 5-karboxy-fluorescein influxot. Érdekes módon a konjugátumok fiziológias szintjeinél ( $<10 \mu\text{M}$ ) a tesztelt apikális efflux transzporterek az ABCC2 és az ABCG2 nem mutattak kölcsönhatást (5.4.3, 22. táblázat). Az efflux transzporterek szerepét azonban nem lehet kizárni, mert úgy a szulfát, mint a glükuronid konjugátumok az SLC22A6 illetve az SLC22A8 koncentratív hatásának következtében feldúsulhatnak a sejtekben, másrészt, egy további, a vese PT epithelben szerepet játszó efflux transzportert, az ABCC4-et nem teszteltük. Összességében, a fenolos növényi hatóanyagok konjugátumai az enterocytákban, hepatocytákban és a vese PT epithelben is membrán transzporterek segítségével abszorbeálódnak és/vagy szekretálódnak.

A környezetiszennyező anyagok közül a peszticidek ABC efflux transzporterekkel való kölcsönhatását vizsgáltuk. Környezetünkben mintegy 1000 peszticid, tehát az összes bennünket körülvevő vegyi anyag valamivel több, mint 1 %-a található (Muir



and Howard 2006). Úgy az alapvegyületek, mint a konjugátumok vizsgálatára alkalmasak az elsősorban gyógyszermolekulák vizsgálatára optimalizált tesztrendszer. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a chloracetanilid herbicidek elsősorban az ABCB1 transzporterrel (29. ábra, Oosterhuis 2008 Figure 3), míg glutation konjugátumaik az ABCC1-el hatnak kölcsön (30. ábra). Az ATPáz tesztek alkalmasak nagy áteresztőképességű tesztelésre és szerkezet – hatás összefüggések megállapítására. Mégis elmondható, hogy az ATPáz aktivátorokat transzport esszéiben, elsősorban Caco-2 sejteken mért vektoriális transzportban kellene tovább tesztelni, hogy enterocytában mért metabolizmusuk és transzporter mediált transzportjuk igazolható legyen. Mindezt egy széles – az enterális és plazma szinteket is magában foglaló - tartományban kell megtenni. A peszticidek transzporter kölcsönhatásait tárgyaló irodalom nem bővült jelentősen annak ellenére, hogy a parazitaellenes peszticid, az ivermectin a prototípus ABCB1 szubsztrát. Továbbá, összefüggéseket találtak magas peszticid expozíció és többek között neurodegeneratív (Parron 2011) és onkohematológiai betegségek (Vajdic 2007; Agopian 2009) között. Gátja lehet a terület bővülésének a transzporter kölcsönhatás értékelése. A humán populáció szempontjából előnyös, ha egy környezetszennyező anyag szubsztrátja apikálisan expresszáldó efflux transzportereknek, hiszen az ilyen vegyület kevésbé szívódik fel, és gyorsabban ürül ki. Ugyanakkor, nagyobb a veszélye annak, hogy a megcélzott fajokban (rovarok, paraziták, gombák, gyomok, stb.) az ott található transzporterek hatásának köszönhetően kevésbé szívódnak fel ezek a vegyületek, azaz a fajok rezisztensek lesznek. Tehát, a szubsztrát specificitásbeli különbségeket leíró keskeny sáv az a kémiai tér, ahol az optimális tulajdonságokkal rendelkező peszticideket keresni kell.

Az ABCC2-re általunk is megfigyelt komplex kinetika (5.5.1 fejezet) és a pozitív homotróp/heterotróp kölcsönhatások jellemzőek a metabolikus (Atkins 2002) és a transzport apparátusra (Borst 2006a; Borst 2006b) is. Az E2-17 $\beta$ -G transzportjának membrán tesztben történő potenciózásáról sok tanulmány született, de a sejtes és *in vivo* adatok hiányoztak. Tehát eredményeink (5.5.1 fejezet, 31. és 32. ábra) akkor is hiánypótlóak, ha a glutation patány Abcc2 általi transzportjának benzylpenicillin általi potenciózál már sejtes és *in vivo* adatok is közlésre kerültek (Ito 2004). Magáról a mechanizmusról nincs a transzporterek vonatkozásában egyértelmű kép. Elképzelhető két külön transzport kötőhelye van a két molekulának. A kotranszport

hipotézissel (Bodo 2003) ez kompatibilis. Ennek alternatívájaként leírásra került egy modulátor és egy transzport kötőhely (Zelcer 2003; Borst 2006a; Borst 2006b). Utóbbi mellett a szerzők azzal érveltek, hogy a modulátorok között vannak olyan molekulák, melyek maguk nem transzportálódnak (Zelcer 2003; Borst 2006b). A kötőhelyek elhelyezkedhetnek szeparáltan illetve egy nagyobb kötőhely részeként. CYP3A4-en végzett krisztallográfiai (Cupp-Vickery 2000) és mutagenézis (Harlow and Halpert 1998) vizsgálatok az utóbbi modellt támasztották alá. Transzporterek esetében az élettani jelentősége az egyik hipotézis szerint az, hogy a homotróp kooperativitás alacsony celluláris koncentrációk mellett segít megakadályozni az értékes fiziológias szubsztrátok effluxát. A heterotróp stimuláció ugyanakkor lehetőséget ad a toxikus szubsztrátok hatékony eltávolítására (Borst 2006a; Borst 2006b).

Toxicitás szempontjából az agy az élettani szerep és a limitált regenerációs képesség okán kiemelt fontosságú. Az agy legfontosabb védőfunkciója a mikropilláris endothel, amely szoros sejt-sejt közötti kapcsolatok és apikálisan/lumenálisan elhelyezkedő efflux transzporterek segítségével limitálja a toxikus molekulák agyi penetrációját. Az efflux transzporter funkció redundáns (Krajcsi 2012), ami mindenképpen jelzi a funkció fontosságát. A normál humán vér-agy gát apikális membránjában négy efflux transzporter, az ABCB1, ABCG2, ABCC4 és ABCC5 expresszálódik (Warren 2009). Az Abcb1a, Abcg2 és Abcc4 knock-out állatokon végzett kísérletekkel igazolt funkciót lát el (Lagas 2009; Ose 2009). A három funkció ugyanakkor nem teljesen ekvivalens. Az Abcb1a kiütése sok vegyületen a többi transzporter státuszától függetlenül megnövekedett agyi expozíciót eredményez. Az Abcg2 funkció kiesése ugyanakkor a legtöbb esetben csak akkor jár megnövekedett agyi expozícióval, ha a molekula nem szubsztrátja az Abcb1a-nak (Enokizono 2008; Robey 2010). A vér-agy gát ABCB1 transzporterrel történő gyógyszerkölcsonhatás tehát toxikus következményei lehetnek. A vér-agy gát ABCB1 funkció tanulmányozásához *in vitro* és *in vivo* módszerek egyaránt szükségesek. Jelenleg használatban lévő *in vitro* rendszerek korrelációja az *in vivo* adatokkal mérsékelt (Garberg 2005; Krajcsi 2012). A digoxin mint szubsztrát próba nem alkalmazható agyi mikrodialízisben preklinikai modelleken, ezért helyette quinidint használtunk (5.5.2 fejezet). A quinidin egyike az alternatív ABCB1 szubsztrátoknak (Ma 2010). Referencia inhibitorként PSC833 használható, amely

efflux transzporterek vonatkozásában lényegesen specifikusabb ABCB1-re, mint a gyakran használt cyclosporin A vagy verapamil (Jani és munkatársai, kézirat előkészületben). Ez a szubsztrát próba – inhibitor páros használható ATPáz, vektoriális transzport esszében is, csakúgy, mint *in vivo* agyi mikrodialízisben patkányban (5.5.2 fejezet) és egérben (Sziraki és munkatársai, kézirat előkészületben). A mi eredményeink szerint a quinidin a digoxinnál jobban használható volt az *in vitro* tesztekben is (Sziraki 2011).

Összefoglalva, munkánk során sikeresen (i) optimalizáltunk expressziós rendszereket, megmutattuk hogy a (ii) molekulák fizikokémiai tulajdonságai hogyan befolyásolják az adatok korrelációját, az esszé-választást és és felhasználását (iii) gyógyszerek, (iv) növényi hatóanyagok és (v) környezeti toxinok esetében, valamint az (vi) *in vitro* és *in vivo* módszerek felhasználásával hogyan lehet a mechanizmus és a relevancia kérdését megválaszolni.

## 6. Jelen kísérletek, jövőbeni tervek, gyakorlati alkalmazások

Az ABCG2 szubsztrát próba jelölt molekulák esetében a kölcsönhatás karakterizálását fejezzük be. Hátra vannak még az *in vivo*, *ex vivo* vizsgálatok preklinikai modelleken. Ezek befejezése átvezet bennünket az összes barrier esetében *in vivo* vizsgálatok beállítására. Tesszük ezt olyan módon, hogy egy fontos kérdést is megválaszolunk. Ez a kutatás-fejlesztési stratégia, amit követünk.

A fejlesztések egy másik fő vonalát jelentik a többszörös transzfektáns barrier modellek létrehozása. A vese PT epithel anion transzportra hoztunk létre egy kettős transzfektáns rendszert (MDCKII-OAT1/BCRP) (Beery és munkatársai, kézirat előkészületben) mit chlorothiazid renális szekréciójának jellemzésére is használni tudunk. A primer sejtek mellett ilyen modellekkel is tanulmányozhatók a barrier sejtekben történő vektoriális transzport mechanisztikus vonatkozásai. Mindkét szöveti modellt fel fogjuk használni a vese PT epithelen át történő transzportok vizsgálatára olyan szubsztrátok (urát, creatinin) felhasználásával, melyek a gyógyszerek káros mellékhatásainak, toxicitásának mérésére alkalmasak. Kezdeti eredményeink azt igazolják, hogy az ABCG2-általi urát transzport chlorothiazid mediált gátlása magyarázhatja a chlorothiazid hiperurcaemiás hatását.

Az egyik legfontosabb, már folyamatban lévő projektünk az influx transzporterek tesztelése releváns gyógyszer szubsztrát próbákkal. Ez a fejlesztés lehetőséget ad majd arra, hogy gyógyszerjelöltek transzportereken történő gyógyszerkölcsönhatás potenciálját HT eszközökkel vizsgáljuk.

Tervezzük a növényi hatóanyagok illetve környezetszennyező anyagokon végzett vizsgálatok kiterjesztését vezikuláris transzport szubsztrát esszében, illetve vektoriális transzport esszében. A funkcionális élelmiszergyártók és a vegyipar is potenciális piaci szegmensek, ahol termékeink és tesztjeink alkalmazása ésszerűbb fejlesztéseket, és biztonságosabb termékeket eredményezhet.

## 8 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom családomnak, akik lehetővé tették, hogy olyan sok időt és energiát szenteljek munkámnak, és örültek a sikereimnek.

Pályafutásom során óriási szerencsével a legkiválóbb tanítómestereim voltak: szerves kémiát a József Attila Tudományegyetemen Prof Dr Fülöp Ferenc akadémikustól, biokémiát a Semmelweis Orvostudományi Egyetemen Dr Arányi Péter akadémiai doktortól, molekuláris sejtbiológiát a St Louisi Egyetemen Bill Wold professzortól és virológiát az OKI Virologiai Főosztályán Dr Berencsi György kandidátustól tanultam.

Nem lett volna esélyem a transzporterek területén végzett munkámra, ha Prof. Dr. Sarkadi Balázs akadémikus, a SOLVO szakmai alapítója, a SOLVO Tudományos Tanácsadó Testületének elnöke és Prof. Dr. Váradi András akadémiai doktor, a Solvo korábbi tudományos tanácsadója nem látták volna meg ilyen pontossággal ezeknek a fehérjéknek a fontosságát a gyógyszerkutatásban. A disszertáció alapját képező közleményekben használt reagensek és szellemi tulajdon, szabadalmak jó része is eredetileg Tőlük származott.

Köszönet illeti Dr. Homolya László akadémiai doktort és Holló Zsolt MD, PhD-t, akik szintén a Solvo Biotechnológia szakmai alapítói és kimagasló a hozzájárulásuk azokhoz a szabadalmakhoz és reagensekhez, amik a disszertációban prezentált munka alapjául szolgáltak.

Ahhoz, hogy az elvégzett munkát magaménak is tudhassam, szükségem volt arra is, hogy egy évtizede Ifj Duda Ernő, a Solvo Biotechnológia elnök-vezérigazgatója engem bízson meg cége kutatás-fejlesztésének irányításával, és akinek a bizalmát azóta is élvezem.

Pályafutásomnak volt egy szakasza, amikor az az egyetemen és az iparban is párhuzamosan dolgoztam. Akkori munkahelyi vezetőim, Prof Dr Ádám Veronika akadémikus, a Semmelweis Egyetem Orvosi Biokémia Intézete vezetője, Dr Darvas Ferenc, a Comgenex elnöke, Dr Üрге László, a Comgenex vezérigazgatója és Dr Szilberek Jenő, a Biorex vezérigazgatója nagyvonalú támogatása kellett ahhoz, hogy ezt a lehetőséget megkaptam.

Ragyogó kollaboráló partnerek sorára találtam Magyarországon és külföldön is, akiktől komoly szakmai segítséget kaptam.

A legtöbbet munkatársaimnak köszönhetek, akikkel együtt tanuljuk ezt, a több diszciplína által meghatározott tudományterületet. Mindannyiunknak nagy öröm, ha hozzájárulhatunk a fejlődéséhez.

## 9 Referenciák

Referenciák száma összesen: 313

- Adachi, Y., H. Suzuki, A. H. Schinkel and Y. Sugiyama (2005). "Role of breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) in the extrusion of glucuronide and sulfate conjugates from enterocytes to intestinal lumen." *Mol Pharmacol* **67**(3): 923-928.
- Adebayo, G. I. and A. F. Mabadeje (1985). "Chlorothiazide absorption in humans--possible example of Michaelis-Menten kinetics." *Pharmacology* **31**(4): 181-188.
- Adhikary, A., E. Bothe, V. Jain and C. Von Sonntag (2000). "Pulse radiolysis of the DNA-binding bisbenzimidazole derivatives Hoechst 33258 and 33342 in aqueous solutions." *Int J Radiat Biol* **76**(9): 1157-1166.
- Agopian, J., J. M. Navarro, A. C. Gac, Y. Lecluse, M. Briand, P. Grenot, P. Gauduchon, P. Ruminy, P. Lebailly, B. Nadel and S. Roulland (2009). "Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis." *J Exp Med* **206**(7): 1473-1483.
- Aller, S. G., J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, P. M. Harrell, Y. T. Trinh, Q. Zhang, I. L. Urbatsch and G. Chang (2009). "Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding." *Science* **323**(5922): 1718-1722.
- Altmann, F., E. Staudacher, I. B. Wilson and L. Marz (1999). "Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins." *Glycoconj J* **16**(2): 109-123.
- Atkins, W. M., W. D. Lu and D. L. Cook (2002). "Is there a toxicological advantage for non-hyperbolic kinetics in cytochrome P450 catalysis? Functional allostery from "distributive catalysis"." *J Biol Chem* **277**(36): 33258-33266.
- Babu, P. V. and D. Liu (2008). "Green tea catechins and cardiovascular health: an update." *Curr Med Chem* **15**(18): 1840-1850.
- Bachmakov, I., H. Glaeser, M. F. Fromm and J. König (2008). "Interaction of oral antidiabetic drugs with hepatic uptake transporters: focus on organic anion transporting polypeptides and organic cation transporter 1." *Diabetes* **57**(6): 1463-1469.
- Bacso, Z., H. Nagy, K. Goda, L. Bene, F. Fenyvesi, J. Matko and G. Szabo (2004). "Raft and cytoskeleton associations of an ABC transporter: P-glycoprotein." *Cytometry A* **61**(2): 105-116.
- Bailey, D. G., G. K. Dresser, B. F. Leake and R. B. Kim (2007). "Naringin is a major and selective clinical inhibitor of organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) in grapefruit juice." *Clin Pharmacol Ther* **81**(4): 495-502.
- Baird, F. E., K. J. Bett, C. MacLean, A. R. Tee, H. S. Hundal and P. M. Taylor (2009). "Tertiary active transport of amino acids reconstituted by coexpression of System A and L transporters in *Xenopus* oocytes." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**(3): E822-829.
- Baker, S. D., J. Verweij, G. A. Cusatis, R. H. van Schaik, S. Marsh, S. J. Orwick, R. M. Franke, S. Hu, E. G. Schuetz, V. Lamba, W. A. Messersmith, A. C. Wolff, M. A. Carducci and A. Sparreboom (2009). "Pharmacogenetic pathway analysis of docetaxel elimination." *Clin Pharmacol Ther* **85**(2): 155-163.
- Balimane, P. V., A. Marino and S. Chong (2008). "P-gp inhibition potential in cell-based models: which "calculation" method is the most accurate?" *AAPS J* **10**(4): 577-586.
- Bauer, M., M. Zeitlinger, R. Karch, P. Matzneller, J. Stanek, W. Jäger, M. Bohmdorfer, W. Wadsak, M. Mitterhauser, J. P. Bankstahl, W. Loscher, M. Koepp, C. Kuntner, M. Müller and O. Langer (2012). "Pgp-mediated interaction between (R)-[11C]verapamil and tariquidar at the human blood-brain barrier: a comparison with rat data." *Clin Pharmacol Ther* **91**(2): 227-233.
- Beery (és munkatársai, kézirat előkészületben).
- Beery, E., Z. Rajnai, T. Abonyi, I. Makai, S. Bansaghi, F. Erdo, I. Sziraki, K. Heredi-Szabo, E. Kis, M. Jani, J. Marki-Zay, K. G. Toth and P. Krajcsi (2011). "ABCG2 modulates chlorothiazide permeability in vitro - characterization of the interaction." *Drug Metab Pharmacokinet*.

- Beringer, P. M., J. Kriengkauykiat, X. Zhang, L. Hidayat, S. Liu, S. Louie, T. Synold, G. J. Burckart, P. A. Rao, B. Shapiro and M. Gill (2008). "Lack of effect of P-glycoprotein inhibition on renal clearance of dicloxacillin in patients with cystic fibrosis." *Pharmacotherapy* **28**(7): 883-894.
- Bikadi, Z., I. Hazai, D. Malik, K. Jemnitz, Z. Veres, P. Hari, Z. Ni, T. W. Loo, D. M. Clarke, E. Hazai and Q. Mao (2011). "Predicting P-glycoprotein-mediated drug transport based on support vector machine and three-dimensional crystal structure of P-glycoprotein." *PLoS One* **6**(10): e25815.
- Bodo, A., E. Bakos, F. Szeri, A. Varadi and B. Sarkadi (2003). "Differential modulation of the human liver conjugate transporters MRP2 and MRP3 by bile acids and organic anions." *J Biol Chem* **278**(26): 23529-23537.
- Borbely, G., M. Huszar, A. Varga, K. Futosi, A. Mocsai, M. Geiszt, L. Orfi, M. Idei, J. Mandl, G. Keri and T. Vantus (2012). "Optimization of Important Early ADME(T) Parameters of NADPH Oxidase-4 Inhibitor Molecules." *Med Chem*.
- Borst, P., N. Zelcer and K. van de Wetering (2006a). "MRP2 and 3 in health and disease." *Cancer Lett* **234**(1): 51-61.
- Borst, P., N. Zelcer, K. van de Wetering and B. Poolman (2006b). "On the putative co-transport of drugs by multidrug resistance proteins." *FEBS Lett* **580**(4): 1085-1093.
- Bourne, L., G. Paganga, D. Baxter, P. Hughes and C. Rice-Evans (2000). "Absorption of ferulic acid from low-alcohol beer." *Free Radic Res* **32**(3): 273-280.
- Boyd, R. A., R. H. Stern, B. H. Stewart, X. Wu, E. L. Reyner, E. A. Zegarac, E. J. Randinitis and L. Whitfield (2000). "Atorvastatin coadministration may increase digoxin concentrations by inhibition of intestinal P-glycoprotein-mediated secretion." *J Clin Pharmacol* **40**(1): 91-98.
- Brand, W., M. G. Boersma, H. Bik, E. F. Hoek-van den Hil, J. Vervoort, D. Barron, W. Meinel, H. Glatt, G. Williamson, P. J. van Bladeren and I. M. Rietjens (2010). "Phase II metabolism of hesperetin by individual UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases and rat and human tissue samples." *Drug Metab Dispos* **38**(4): 617-625.
- Brand, W., B. Oosterhuis, P. Krajcsi, D. Barron, F. Dionisi, P. J. van Bladeren, I. M. Rietjens and G. Williamson (2011). "Interaction of hesperetin glucuronide conjugates with human BCRP, MRP2 and MRP3 as detected in membrane vesicles of overexpressing baculovirus-infected Sf9 cells." *Biopharm Drug Dispos* **32**(9): 530-535.
- Brand, W., P. A. van der Wel, M. J. Rein, D. Barron, G. Williamson, P. J. van Bladeren and I. M. Rietjens (2008). "Metabolism and transport of the citrus flavonoid hesperetin in Caco-2 cell monolayers." *Drug Metab Dispos* **36**(9): 1794-1802.
- Breedveld, P., D. Pluim, G. Cipriani, F. Dahlhaus, M. A. van Eijndhoven, C. J. de Wolf, A. Kuil, J. H. Beijnen, G. L. Scheffer, G. Jansen, P. Borst and J. H. Schellens (2007). "The effect of low pH on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, methotrexate diglutamate, folic acid, mitoxantrone, topotecan, and resveratrol in in vitro drug transport models." *Mol Pharmacol* **71**(1): 240-249.
- Cai, X., Z. Bikadi, Z. Ni, E. W. Lee, H. Wang, M. F. Rosenberg and Q. Mao (2010). "Role of basic residues within or near the predicted transmembrane helix 2 of the human breast cancer resistance protein in drug transport." *J Pharmacol Exp Ther* **333**(3): 670-681.
- Calcagno, A. M., J. M. Fostel, K. K. To, C. D. Salcido, S. E. Martin, K. J. Chewing, C. P. Wu, L. Varticovski, S. E. Bates, N. J. Caplen and S. V. Ambudkar (2008). "Single-step doxorubicin-selected cancer cells overexpress the ABCG2 drug transporter through epigenetic changes." *Br J Cancer* **98**(9): 1515-1524.
- Campbell, J. D., K. Koike, C. Moreau, M. S. Sansom, R. G. Deeley and S. P. Cole (2004). "Molecular modeling correctly predicts the functional importance of Phe594 in transmembrane helix 11 of the multidrug resistance protein, MRP1 (ABCC1)." *J Biol Chem* **279**(1): 463-468.
- Cappellini, A., F. Chiarini, A. Ognibene, J. A. McCubrey and A. M. Martelli (2009). "The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine and the nucleoside analog sangivamycin induce apoptosis in caspase-3 deficient breast cancer cells independent of caspase mediated P-glycoprotein cleavage: implications for therapy of drug resistant breast cancers." *Cell Cycle* **8**(9): 1421-1425.



- Carew, M. W. and E. M. Leslie (2010). "Selenium-dependent and -independent transport of arsenic by the human multidrug resistance protein 2 (MRP2/ABCC2): implications for the mutual detoxification of arsenic and selenium." *Carcinogenesis* **31**(8): 1450-1455.
- Cerf, E., R. Gasper, J. D. Belani, S. Rychnovsky, X. B. Chang, F. Buyse and J. M. Ruysschaert (2007). "Multidrug resistance protein 1 is not associated to detergent-resistant membranes." *Biochem Biophys Res Commun* **355**(4): 1025-1030.
- Chang, C., S. Ekins, P. Bahadduri and P. W. Swaan (2006). "Pharmacophore-based discovery of ligands for drug transporters." *Adv Drug Deliv Rev* **58**(12-13): 1431-1450.
- Chang, C., K. S. Pang, P. W. Swaan and S. Ekins (2005). "Comparative pharmacophore modeling of organic anion transporting polypeptides: a meta-analysis of rat Oatp1a1 and human OATP1B1." *J Pharmacol Exp Ther* **314**(2): 533-541.
- Chen, C. C., K. T. Chiu, Y. T. Sun and W. C. Chen (1999). "Role of the cyclic AMP-protein kinase A pathway in lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. Involvement of cyclooxygenase-2." *J Biol Chem* **274**(44): 31559-31564.
- Clark, R., I. D. Kerr and R. Callaghan (2006). "Multiple drug binding sites on the R482G isoform of the ABCG2 transporter." *Br J Pharmacol* **149**(5): 506-515.
- Cook, J. A., B. Feng, K. S. Fenner, S. Kempshall, R. Liu, C. Rotter, D. A. Smith, M. D. Troutman, M. Ullah and C. A. Lee (2010). "Refining the in vitro and in vivo critical parameters for P-glycoprotein, [I]/IC50 and [I2]/IC50, that allow for the exclusion of drug candidates from clinical digoxin interaction studies." *Mol Pharm* **7**(2): 398-411.
- Cundy, K. C., B. G. Petty, J. Flaherty, P. E. Fisher, M. A. Polis, M. Wachsman, P. S. Lietman, J. P. Lalezari, M. J. Hitchcock and H. S. Jaffe (1995). "Clinical pharmacokinetics of didanosine in human immunodeficiency virus-infected patients." *Antimicrob Agents Chemother* **39**(6): 1247-1252.
- Cupp-Vickery, J., R. Anderson and Z. Hatziris (2000). "Crystal structures of ligand complexes of P450eryF exhibiting homotropic cooperativity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3050-3055.
- Csanaky, I. and Z. Gregus (2001). "Effect of phosphate transporter and methylation inhibitor drugs on the disposition of arsenate and arsenite in rats." *Toxicol Sci* **63**(1): 29-36.
- De Bony, F., M. Tod, R. Bidault, N. T. On, J. Posner and P. Rolan (2002). "Multiple interactions of cimetidine and probenecid with valaciclovir and its metabolite acyclovir." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(2): 458-463.
- Dean, M. and R. Allikmets (2001). "Complete characterization of the human ABC gene family." *J Bioenerg Biomembr* **33**(6): 475-479.
- Dean, M., Y. Hamon and G. Chimini (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." *J Lipid Res* **42**(7): 1007-1017.
- Decleves, X., A. Jacob, S. Yousif, R. Shawahna, S. Potin and J. M. Scherrmann (2011). "Interplay of drug metabolizing CYP450 enzymes and ABC transporters in the blood-brain barrier." *Curr Drug Metab* **12**(8): 732-741.
- Deeley, R. G., C. Westlake and S. P. Cole (2006). "Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins." *Physiol Rev* **86**(3): 849-899.
- Degorter, M. K., C. Q. Xia, J. J. Yang and R. B. Kim (2012). "Drug transporters in drug efficacy and toxicity." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **52**: 249-273.
- Deneer, V. H. and N. M. van Hemel (2011). "Is antiarrhythmic treatment in the elderly different? a review of the specific changes." *Drugs Aging* **28**(8): 617-633.
- Dingemans, J., P. L. van Giersbergen, A. Patat and P. N. Nilsson (2010). "Mutual pharmacokinetic interactions between bosentan and lopinavir/ritonavir in healthy participants." *Antivir Ther* **15**(2): 157-163.
- Dobson, P. D. and D. B. Kell (2008). "Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule?" *Nat Rev Drug Discov* **7**(3): 205-220.
- Dobson, P. D., K. Lanthaler, S. G. Oliver and D. B. Kell (2009). "Implications of the dominant role of transporters in drug uptake by cells." *Curr Top Med Chem* **9**(2): 163-181.

- Dresser, G. K., D. G. Bailey, B. F. Leake, U. I. Schwarz, P. A. Dawson, D. J. Freeman and R. B. Kim (2002). "Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine." *Clin Pharmacol Ther* **71**(1): 11-20.
- Dresser, G. K., R. B. Kim and D. G. Bailey (2005). "Effect of grapefruit juice volume on the reduction of fexofenadine bioavailability: possible role of organic anion transporting polypeptides." *Clin Pharmacol Ther* **77**(3): 170-177.
- Dupuy, J., M. Alvinerie, C. Menez and A. Lespine (2010). "Interaction of anthelmintic drugs with P-glycoprotein in recombinant LLC-PK1-mdr1a cells." *Chem Biol Interact* **186**(3): 280-286.
- Eberhardt, L., K. Kumar and H. Waldmann (2011). "Exploring and exploiting biologically relevant chemical space." *Curr Drug Targets* **12**(11): 1531-1546.
- El-Sheikh, A. A., J. J. van den Heuvel, E. Krieger, F. G. Russel and J. B. Koenderink (2008). "Functional role of arginine 375 in transmembrane helix 6 of multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4)." *Mol Pharmacol* **74**(4): 964-971.
- El-Tahtawy, A., P. Glue, E. N. Andrews, J. Mardekian, G. W. Amsden and C. A. Knirsch (2008). "The effect of azithromycin on ivermectin pharmacokinetics--a population pharmacokinetic model analysis." *PLoS Negl Trop Dis* **2**(5): e236.
- EMA-Guidance. (2010).  
["http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2010/05/WC500090112.pdf."](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/05/WC500090112.pdf)
- Enokizono, J., H. Kusuhara, A. Ose, A. H. Schinkel and Y. Sugiyama (2008). "Quantitative investigation of the role of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting brain and testis penetration of xenobiotic compounds." *Drug Metab Dispos* **36**(6): 995-1002.
- Enokizono, J., H. Kusuhara and Y. Sugiyama (2007a). "Effect of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) on the disposition of phytoestrogens." *Mol Pharmacol* **72**(4): 967-975.
- Enokizono, J., H. Kusuhara and Y. Sugiyama (2007b). "Regional expression and activity of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in mouse intestine: overlapping distribution with sulfotransferases." *Drug Metab Dispos* **35**(6): 922-928.
- Erdman, A. R., L. M. Mangravite, T. J. Urban, L. L. Lagpacan, R. A. Castro, M. de la Cruz, W. Chan, C. C. Huang, S. J. Johns, M. Kawamoto, D. Stryke, T. R. Taylor, E. J. Carlson, T. E. Ferrin, C. M. Brett, E. G. Burchard and K. M. Giacomini (2006). "The human organic anion transporter 3 (OAT3; SLC22A8): genetic variation and functional genomics." *Am J Physiol Renal Physiol* **290**(4): F905-912.
- Evers, R. and X. Y. Chu (2008). "Role of the murine organic anion-transporting polypeptide 1b2 (Oatp1b2) in drug disposition and hepatotoxicity." *Mol Pharmacol* **74**(2): 309-311.
- Eyal, S., P. Hsiao and J. D. Unadkat (2009). "Drug interactions at the blood-brain barrier: fact or fantasy?" *Pharmacol Ther* **123**(1): 80-104.
- FDA-Guidance. (2012).  
["http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM292362.pdf."](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM292362.pdf)
- Fenyvesi, F., E. Fenyvesi, L. Szente, K. Goda, Z. Bacso, I. Bacskay, J. Varadi, T. Kiss, E. Molnar, T. Janaky, G. Szabo, Jr. and M. Vecsernyes (2008). "P-glycoprotein inhibition by membrane cholesterol modulation." *Eur J Pharm Sci* **34**(4-5): 236-242.
- Fredriksson, R., K. J. Nordstrom, O. Stephansson, M. G. Hagglund and H. B. Schioth (2008). "The solute carrier (SLC) complement of the human genome: phylogenetic classification reveals four major families." *FEBS Lett* **582**(27): 3811-3816.
- Fromm, M. F., R. B. Kim, C. M. Stein, G. R. Wilkinson and D. M. Roden (1999). "Inhibition of P-glycoprotein-mediated drug transport: A unifying mechanism to explain the interaction between digoxin and quinidine [see comments]." *Circulation* **99**(4): 552-557.
- Fujikawa, M., R. Ano, K. Nakao, R. Shimizu and M. Akamatsu (2005). "Relationships between structure and high-throughput screening permeability of diverse drugs with artificial membranes: application to prediction of Caco-2 cell permeability." *Bioorg Med Chem* **13**(15): 4721-4732.

- Gao, M., M. Yamazaki, D. W. Loe, C. J. Westlake, C. E. Grant, S. P. Cole and R. G. Deeley (1998). "Multidrug resistance protein. Identification of regions required for active transport of leukotriene C4." *J Biol Chem* **273**(17): 10733-10740.
- Garberg, P., M. Ball, N. Borg, R. Cecchelli, L. Fenart, R. D. Hurst, T. Lindmark, A. Mabondzo, J. E. Nilsson, T. J. Raub, D. Stanimirovic, T. Terasaki, J. O. Oberg and T. Osterberg (2005). "In vitro models for the blood-brain barrier." *Toxicol In Vitro* **19**(3): 299-334.
- Gatlik-Landwojtowicz, E., P. Aanismaa and A. Seelig (2006). "Quantification and characterization of P-glycoprotein-substrate interactions." *Biochemistry* **45**(9): 3020-3032.
- Gerk, P. M., W. Li and M. Vore (2004). "Estradiol 3-glucuronide is transported by the multidrug resistance-associated protein 2 but does not activate the allosteric site bound by estradiol 17-glucuronide." *Drug Metab Dispos* **32**(10): 1139-1145.
- Gertsch, J. (2011). "Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: forth and back to intelligent mixtures." *Planta Med* **77**(11): 1086-1098.
- Giacomini, K. M., S. M. Huang, D. J. Tweedie, L. Z. Benet, K. L. Brouwer, X. Chu, A. Dahlin, R. Evers, V. Fischer, K. M. Hillgren, K. A. Hoffmaster, T. Ishikawa, D. Keppler, R. B. Kim, C. A. Lee, M. Niemi, J. W. Polli, Y. Sugiyama, P. W. Swaan, J. A. Ware, S. H. Wright, S. W. Yee, M. J. Zamek-Gliszczynski and L. Zhang (2010). "Membrane transporters in drug development." *Nat Rev Drug Discov* **9**(3): 215-236.
- Gimpl, G., U. Klein, H. Reilander and F. Fahrenholz (1995). "Expression of the human oxytocin receptor in baculovirus-infected insect cells: high-affinity binding is induced by a cholesterol-cyclodextrin complex." *Biochemistry* **34**(42): 13794-13801.
- Glaeser, H., D. G. Bailey, G. K. Dresser, J. C. Gregor, U. I. Schwarz, J. S. McGrath, E. Jolicoeur, W. Lee, B. F. Leake, R. G. Tirona and R. B. Kim (2007). "Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans." *Clin Pharmacol Ther* **81**(3): 362-370.
- Glaeser, H., K. Mandery, H. Sticht, M. F. Fromm and J. Konig (2010). "Relevance of conserved lysine and arginine residues in transmembrane helices for the transport activity of organic anion transporting polypeptide 1B3." *Br J Pharmacol* **159**(3): 698-708.
- Glavinas, H., E. Kis, A. Pal, R. Kovacs, M. Jani, E. Vagi, E. Molnar, S. Bansaghi, Z. Kele, T. Janaky, G. Bathori, O. von Richter, G. J. Koomen and P. Krajcsi (2007). "ABCG2 (breast cancer resistance protein/mitoxantrone resistance-associated protein) ATPase assay: a useful tool to detect drug-transporter interactions." *Drug Metab Dispos* **35**(9): 1533-1542.
- Glavinas, H., D. Mehn, M. Jani, B. Oosterhuis, K. Heredi-Szabo and P. Krajcsi (2008). "Utilization of membrane vesicle preparations to study drug-ABC transporter interactions." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**(6): 721-732.
- Glavinas, H., O. von Richter, K. Vojnits, D. Mehn, I. Wilhelm, T. Nagy, J. Janossy, I. Krizbai, P. Couraud and P. Krajcsi (2011). "Calcein assay: a high-throughput method to assess P-gp inhibition." *Xenobiotica* **41**(8): 712-719.
- Gold, H. (1950). *Quinidine in disorders of the heart*. New York, Paul B Hoeber Inc.: 85-92.
- Gottesman, M. M. and S. V. Ambudkar (2001). "Overview: ABC transporters and human disease." *J Bioenerg Biomembr* **33**(6): 453-458.
- Gradhand, U. and R. B. Kim (2008). "Pharmacogenomics of MRP transporters (ABCC1-5) and BCRP (ABCG2)." *Drug Metab Rev* **40**(2): 317-354.
- Gui, C. and B. Hagenbuch (2008). "Amino acid residues in transmembrane domain 10 of organic anion transporting polypeptide 1B3 are critical for cholecystokinin octapeptide transport." *Biochemistry* **47**(35): 9090-9097.
- Hakkarainen, J. J., A. J. Jalkanen, T. M. Kaariainen, P. Keski-Rahkonen, T. Venalainen, J. Hokkanen, J. Monkkonen, M. Suhonen and M. M. Forsberg (2010). "Comparison of in vitro cell models in predicting in vivo brain entry of drugs." *Int J Pharm* **402**(1-2): 27-36.
- Han, H. K. and G. L. Amidon (2000). "Targeted prodrug design to optimize drug delivery." *AAPS PharmSci* **2**(1): E6.
- Han, Y. F., X. H. Fan, X. J. Wang, K. Sun, H. Xue, W. J. Li, Y. B. Wang, J. Z. Chen, Y. S. Zhen, W. L. Zhang, X. Zhou and R. Hui (2011). "Association of intergenic polymorphism of organic anion

- transporter 1 and 3 genes with hypertension and blood pressure response to hydrochlorothiazide." *Am J Hypertens* **24**(3): 340-346.
- Harlow, G. R. and J. R. Halpert (1998). "Analysis of human cytochrome P450 3A4 cooperativity: construction and characterization of a site-directed mutant that displays hyperbolic steroid hydroxylation kinetics." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(12): 6636-6641.
- Hasegawa, M., H. Kusuhara, M. Adachi, J. D. Schuetz, K. Takeuchi and Y. Sugiyama (2007). "Multidrug resistance-associated protein 4 is involved in the urinary excretion of hydrochlorothiazide and furosemide." *J Am Soc Nephrol* **18**(1): 37-45.
- Hauss, D. J. (2007). "Oral lipid-based formulations." *Adv Drug Deliv Rev* **59**(7): 667-676.
- Hazai, E. and Z. Bikadi (2008). "Homology modeling of breast cancer resistance protein (ABCG2)." *J Struct Biol* **162**(1): 63-74.
- Hazlehurst, L. A., N. E. Foley, M. C. Gleason-Guzman, M. P. Hacker, A. E. Cress, L. W. Greenberger, M. C. De Jong and W. S. Dalton (1999). "Multiple mechanisms confer drug resistance to mitoxantrone in the human 8226 myeloma cell line." *Cancer Res* **59**(5): 1021-1028.
- He, L., K. Vasiliou and D. W. Nebert (2009). "Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily." *Hum Genomics* **3**(2): 195-206.
- He, S. M., R. Li, J. R. Kanwar and S. F. Zhou (2011). "Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1)." *Curr Med Chem* **18**(3): 439-481.
- Hegedus, C., G. Szakacs, L. Homolya, T. I. Orban, A. Telbisz, M. Jani and B. Sarkadi (2009). "Ins and outs of the ABCG2 multidrug transporter: an update on in vitro functional assays." *Adv Drug Deliv Rev* **61**(1): 47-56.
- Heredi-Szabo, K., H. Glavinas, E. Kis, D. Mehn, G. Bathori, Z. Veres, L. Kobori, O. von Richter, K. Jemnitz and P. Krajcsi (2009a). "Multidrug resistance protein 2-mediated estradiol-17beta-D-glucuronide transport potentiation: in vitro-in vivo correlation and species specificity." *Drug Metab Dispos* **37**(4): 794-801.
- Heredi-Szabo, K., K. Jemnitz, E. Kis, E. Ioja, J. Janossy, L. Vereczkey and P. Krajcsi (2009b). "Potentiation of MRP2/Mrp2-mediated estradiol-17beta-glucuronide transport by drugs--a concise review." *Chem Biodivers* **6**(11): 1970-1974.
- Heredi-Szabo, K., E. Kis, E. Molnar, A. Gyorfi and P. Krajcsi (2008). "Characterization of 5(6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein transport by MRP2 and utilization of this substrate as a fluorescent surrogate for LTC4." *J Biomol Screen* **13**(4): 295-301.
- Hill, G., T. Cihlar, C. Oo, E. S. Ho, K. Prior, H. Wiltshire, J. Barrett, B. Liu and P. Ward (2002). "The anti-influenza drug oseltamivir exhibits low potential to induce pharmacokinetic drug interactions via renal secretion-correlation of in vivo and in vitro studies." *Drug Metab Dispos* **30**(1): 13-19.
- Hirouchi, M., H. Suzuki, M. Itoda, S. Ozawa, J. Sawada, I. Ieiri, K. Ohtsubo and Y. Sugiyama (2004). "Characterization of the cellular localization, expression level, and function of SNP variants of MRP2/ABCC2." *Pharm Res* **21**(5): 742-748.
- Hollo, Z., L. Homolya, T. Hegedus, M. Muller, G. Szakacs, K. Jakab, F. Antal and B. Sarkadi (1998). "Parallel functional and immunological detection of human multidrug resistance proteins, P-glycoprotein and MRP1." *Anticancer Res* **18**(4C): 2981-2987.
- Hollo, Z., L. Homolya, T. Hegedus and B. Sarkadi (1996). "Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells." *FEBS Lett* **383**(1-2): 99-104.
- Homma, M., K. Oka, C. Taniguchi, T. Niitsuma and T. Hayashi (1997). "Systematic analysis of post-administrative saiboku-to urine by liquid chromatography to determine pharmacokinetics of traditional Chinese medicine." *Biomed Chromatogr* **11**(3): 125-131.
- Homolya, L., Z. Hollo, U. A. Germann, I. Pastan, M. M. Gottesman and B. Sarkadi (1993). "Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein." *J Biol Chem* **268**(29): 21493-21496.
- Hong, T., G. B. Jin, S. Cho and J. C. Cyong (2002). "Evaluation of the anti-inflammatory effect of baicalein on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice." *Planta Med* **68**(3): 268-271.

- Honjo, Y., C. A. Hrycyna, Q. W. Yan, W. Y. Medina-Perez, R. W. Robey, A. van de Laar, T. Litman, M. Dean and S. E. Bates (2001). "Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells." *Cancer Res* **61**(18): 6635-6639.
- Howe, K., G. G. Gibson, T. Coleman and N. Plant (2009). "In silico and in vitro modeling of hepatocyte drug transport processes: importance of ABCC2 expression levels in the disposition of carboxydichlorofluorescein." *Drug Metab Dispos* **37**(2): 391-399.
- Hsieh, W. S., R. Soo, B. K. Peh, T. Loh, D. Dong, D. Soh, L. S. Wong, S. Green, J. Chiao, C. Y. Cui, Y. F. Lai, S. C. Lee, B. Mow, R. Soong, M. Salto-Tellez and B. C. Goh (2009). "Pharmacodynamic effects of seliciclib, an orally administered cell cycle modulator, in undifferentiated nasopharyngeal cancer." *Clin Cancer Res* **15**(4): 1435-1442.
- <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>.
- <http://www.bioparadigms.org/slc/menu.asp>.
- <http://www.drugs.com/>.
- <http://www.genenames.org/genefamilies/SLC>.
- Huang, S. M. and L. J. Lesko (2004). "Drug-drug, drug-dietary supplement, and drug-citrus fruit and other food interactions: what have we learned?" *J Clin Pharmacol* **44**(6): 559-569.
- Huisman, M. T., A. A. Chhatta, O. van Tellingen, J. H. Beijnen and A. H. Schinkel (2005). "MRP2 (ABCC2) transports taxanes and confers paclitaxel resistance and both processes are stimulated by probenecid." *Int J Cancer* **116**(5): 824-829.
- Hulot, J. S., E. Villard, A. Maguy, V. Morel, L. Mir, I. Tostivint, D. William-Faltaos, C. Fernandez, S. Hatem, G. Deray, M. Komajda, V. Leblond and P. Lechat (2005). "A mutation in the drug transporter gene ABCC2 associated with impaired methotrexate elimination." *Pharmacogenet Genomics* **15**(5): 277-285.
- Ieiri, I. (2012). "Functional Significance of Genetic Polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2)." *Drug Metab Pharmacokinet* **27**(1): 85-105.
- Inotsume, N., M. Nishimura, M. Nakano, S. Fujiyama and T. Sato (1990). "The inhibitory effect of probenecid on renal excretion of famotidine in young, healthy volunteers." *J Clin Pharmacol* **30**(1): 50-56.
- Ismair, M. G., S. Hausler, C. A. Stuermer, C. Guyot, P. J. Meier, J. Roth and B. Stieger (2009). "ABC-transporters are localized in caveolin-1-positive and reggie-1-negative and reggie-2-negative microdomains of the canalicular membrane in rat hepatocytes." *Hepatology* **49**(5): 1673-1682.
- Ito, K., D. Hoekstra and S. C. van Ijzendoorn (2008). "Cholesterol but not association with detergent resistant membranes is necessary for the transport function of MRP2/ABCC2." *FEBS Lett* **582**(30): 4153-4157.
- Ito, K., T. Koresawa, K. Nakano and T. Horie (2004). "Mrp2 is involved in benzylpenicillin-induced choleresis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**(1): G42-49.
- Iurisci, I., E. Filipinski, J. Reinhardt, S. Bach, A. Gianella-Borradori, S. Iacobelli, L. Meijer and F. Levi (2006). "Improved tumor control through circadian clock induction by Seliciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor." *Cancer Res* **66**(22): 10720-10728.
- Izsvak, Z., J. Frohlich, I. Grabundzija, J. R. Shirley, H. M. Powell, K. M. Chapman, Z. Ivics and F. K. Hamra (2010). "Generating knockout rats by transposon mutagenesis in spermatogonial stem cells." *Nat Methods* **7**(6): 443-445.
- Jacobson, T. A. (2004). "Comparative pharmacokinetic interaction profiles of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin when coadministered with cytochrome P450 inhibitors." *Am J Cardiol* **94**(9): 1140-1146.
- Jalava, K. M., J. Partanen and P. J. Neuvonen (1997). "Itraconazole decreases renal clearance of digoxin." *Ther Drug Monit* **19**(6): 609-613.
- Jani ( és munkatársai, kézirat előkészületben).

- Jani, M., I. Makai, E. Kis, P. Szabo, T. Nagy, P. Krajcsi and A. Lespine (2011). "Ivermectin interacts with human ABCG2." *J Pharm Sci* **100**(1): 94-97.
- Jani, M., P. Szabo, E. Kis, E. Molnar, H. Glavinas and P. Krajcsi (2009). "Kinetic characterization of sulfasalazine transport by human ATP-binding cassette G2." *Biol Pharm Bull* **32**(3): 497-499.
- Jemnitz, K., K. Heredi-Szabo, J. Janossy, E. Ioja, L. Vereczkey and P. Krajcsi (2010). "ABCC2/Abcc2: a multispecific transporter with dominant excretory functions." *Drug Metab Rev* **42**(3): 402-436.
- Jerling, M. (2006). "Clinical pharmacokinetics of ranolazine." *Clin Pharmacokinet* **45**(5): 469-491.
- Jiang, X. L., F. J. Gonzalez and A. M. Yu (2011). "Drug-metabolizing enzyme, transporter, and nuclear receptor genetically modified mouse models." *Drug Metab Rev* **43**(1): 27-40.
- Juliano, R. L. and V. Ling (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." *Biochim Biophys Acta* **455**(1): 152-162.
- Kagawa, T., N. Watanabe, K. Mochizuki, A. Numari, Y. Ikeno, J. Itoh, H. Tanaka, I. M. Arias and T. Mine (2008). "Phenotypic differences in PFIC2 and BRIC2 correlate with protein stability of mutant Bsep and impaired taurocholate secretion in MDCK II cells." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**(1): G58-67.
- Kala, S. V., M. W. Neely, G. Kala, C. I. Prater, D. W. Atwood, J. S. Rice and M. W. Lieberman (2000). "The MRP2/cMOAT transporter and arsenic-glutathione complex formation are required for biliary excretion of arsenic." *J Biol Chem* **275**(43): 33404-33408.
- Kim, K. A., H. J. Joo and J. Y. Park (2011). "Effect of ABCG2 genotypes on the pharmacokinetics of A771726, an active metabolite of prodrug leflunomide, and association of A771726 exposure with serum uric acid level." *Eur J Clin Pharmacol* **67**(2): 129-134.
- Kimata, M., M. Shichijo, T. Miura, I. Serizawa, N. Inagaki and H. Nagai (2000). "Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells." *Clin Exp Allergy* **30**(4): 501-508.
- Kis, E. (2010). "Gyógyszermolekulák és ABC transzporterek kölcsönhatásának vizsgálatára alkalmas in vitro rendszerek fejlesztése és validálása." PhD disszertáció.
- Kis, E., E. Ioja, T. Nagy, L. Szente, K. Heredi-Szabo and P. Krajcsi (2009a). "Effect of membrane cholesterol on BSEP/Bsep activity: species specificity studies for substrates and inhibitors." *Drug Metab Dispos* **37**(9): 1878-1886.
- Kis, E., E. Ioja, Z. Rajnai, M. Jani, D. Mehn, K. Heredi-Szabo and P. Krajcsi (2011). "BSEP inhibition - In vitro screens to assess cholestatic potential of drugs." *Toxicol In Vitro*.
- Kis, E., T. Nagy, M. Jani, E. Molnar, J. Janossy, O. Ujhellyi, K. Nemet, K. Heredi-Szabo and P. Krajcsi (2009b). "Leflunomide and its metabolite A771726 are high affinity substrates of BCRP: implications for drug resistance." *Ann Rheum Dis* **68**(7): 1201-1207.
- Kis, E., Z. Rajnai, E. Ioja, K. Heredi Szabo, T. Nagy, D. Mehn and P. Krajcsi (2009c). "Mouse Bsep ATPase assay: a nonradioactive tool for assessment of the cholestatic potential of drugs." *J Biomol Screen* **14**(1): 10-15.
- Kiser, J. J., J. G. Gerber, J. A. Predhomme, P. Wolfe, D. M. Flynn and D. W. Hoody (2008). "Drug/Drug interaction between lopinavir/ritonavir and rosuvastatin in healthy volunteers." *J Acquir Immune Defic Syndr* **47**(5): 570-578.
- Kiyotani, K., T. Mushiroda, M. Kubo, H. Zembutsu, Y. Sugiyama and Y. Nakamura (2008). "Association of genetic polymorphisms in SLCO1B3 and ABCC2 with docetaxel-induced leukopenia." *Cancer Sci* **99**(5): 967-972.
- Klaassen, C. D. and H. Lu (2008). "Xenobiotic transporters: ascribing function from gene knockout and mutation studies." *Toxicol Sci* **101**(2): 186-196.
- Klappe, K., I. Hummel, D. Hoekstra and J. W. Kok (2009). "Lipid dependence of ABC transporter localization and function." *Chem Phys Lipids* **161**(2): 57-64.
- Kondo, C., H. Suzuki, M. Itoda, S. Ozawa, J. Sawada, D. Kobayashi, I. Ieiri, K. Mine, K. Ohtsubo and Y. Sugiyama (2004). "Functional analysis of SNPs variants of BCRP/ABCG2." *Pharm Res* **21**(10): 1895-1903.

- Kovarik, J. M., L. Rigaudy, M. Guerret, C. Gerbeau and K. L. Rost (1999). "Longitudinal assessment of a P-glycoprotein-mediated drug interaction of valspodar on digoxin." *Clin Pharmacol Ther* **66**(4): 391-400.
- Krajcsi ( **és munkatársai, kézirat előkészületben**).
- Krajcsi, P., M. Jani, B. Toth, F. Erdo, E. Kis, E. Beery and I. Sziraki (2012). "Efflux transporters in the blood-brain interfaces - in vitro and in vivo methods and correlations." *Expert Opin Drug Metab Toxicol*.
- Kreisl, W. C., J. S. Liow, N. Kimura, N. Seneca, S. S. Zoghbi, C. L. Morse, P. Herscovitch, V. W. Pike and R. B. Innis (2010). "P-glycoprotein function at the blood-brain barrier in humans can be quantified with the substrate radiotracer 11C-N-desmethyl-loperamide." *J Nucl Med* **51**(4): 559-566.
- Krishnamurthy, P., M. Schwab, K. Takenaka, D. Nachagari, J. Morgan, M. Leslie, W. Du, K. Boyd, M. Cheok, H. Nakauchi, C. Marzolini, R. B. Kim, B. Poonkuzhali, E. Schuetz, W. Evans, M. Relling and J. D. Schuetz (2008). "Transporter-mediated protection against thiopurine-induced hematopoietic toxicity." *Cancer Res* **68**(13): 4983-4989.
- Kusuhara, H. and Y. Sugiyama (2009). "In vitro-in vivo extrapolation of transporter-mediated clearance in the liver and kidney." *Drug Metab Pharmacokinet* **24**(1): 37-52.
- Kwei, G. Y., R. F. Alvaro, Q. Chen, H. J. Jenkins, C. E. Hop, C. A. Keohane, V. T. Ly, J. R. Strauss, R. W. Wang, Z. Wang, T. R. Pippert and D. R. Umbenhauer (1999). "Disposition of ivermectin and cyclosporin A in CF-1 mice deficient in mdr1a P-glycoprotein." *Drug Metab Dispos* **27**(5): 581-587.
- Lagas, J. S., M. L. Vlaming and A. H. Schinkel (2009). "Pharmacokinetic assessment of multiple ATP-binding cassette transporters: the power of combination knockout mice." *Mol Interv* **9**(3): 136-145.
- Le Tourneau, C., S. Faivre, V. Laurence, C. Delbaldo, K. Vera, V. Girre, J. Chiao, S. Armour, S. Frame, S. R. Green, A. Gianella-Borradori, V. Dieras and E. Raymond (2010). "Phase I evaluation of seliciclib (R-roscovitine), a novel oral cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced malignancies." *Eur J Cancer* **46**(18): 3243-3250.
- Leahey, E. B., Jr., J. A. Reiffel, R. E. Drusin, R. H. Heissenbuttel, W. P. Lovejoy and J. T. Bigger, Jr. (1978). "Interaction between quinidine and digoxin." *JAMA* **240**(6): 533-534.
- Lee, C. A., K. M. Hillgren, L. Zhang and J. W. Polli (2011). "Response from the International Transporter Consortium." *Nature Reviews Drug Discovery* **10**, 75
- Lei, Z. H., S. Yahara, T. Nohara, B. S. Tai, J. Z. Xiong and Y. L. Ma (2000). "Cardiac glycosides from *Erysimum cheiranthoides*." *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **48**(2): 290-292.
- Lespine, A., J. Dupuy, M. Alvinerie, C. Comera, T. Nagy, P. Krajcsi and S. Orłowski (2009). "Interaction of macrocyclic lactones with the multidrug transporters: the bases of the pharmacokinetics of lipid-like drugs." *Curr Drug Metab* **10**(3): 272-288.
- Lespine, A., J. Dupuy, S. Orłowski, T. Nagy, H. Glavinas, P. Krajcsi and M. Alvinerie (2006). "Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3)." *Chem Biol Interact* **159**(3): 169-179.
- Letourneau, I. J., A. J. Slot, R. G. Deeley and S. P. Cole (2007). "Mutational analysis of a highly conserved proline residue in MRP1, MRP2, and MRP3 reveals a partially conserved function." *Drug Metab Dispos* **35**(8): 1372-1379.
- Li, L., P. J. Meier and N. Ballatori (2000). "Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione." *Mol Pharmacol* **58**(2): 335-340.
- Li, Y. F., O. Polgar, M. Okada, L. Esser, S. E. Bates and D. Xia (2007). "Towards understanding the mechanism of action of the multidrug resistance-linked half-ABC transporter ABCG2: a molecular modeling study." *J Mol Graph Model* **25**(6): 837-851.
- Liu, Z. and M. Hu (2007). "Natural polyphenol disposition via coupled metabolic pathways." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **3**(3): 389-406.

- Ma, J. D., S. M. Tsunoda, J. S. Bertino, Jr., M. Trivedi, K. K. Beale and A. N. Nafziger (2010). "Evaluation of in vivo P-glycoprotein phenotyping probes: a need for validation." *Clin Pharmacokinet* **49**(4): 223-237.
- Mahagita, C., S. M. Grassl, P. Piyachaturawat and N. Ballatori (2007). "Human organic anion transporter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**(1): G271-278.
- Mahar Doan, K. M., S. A. Wring, L. J. Shampine, K. H. Jordan, J. P. Bishop, J. Kratz, E. Yang, C. J. Serabjit-Singh, K. K. Adkison and J. W. Polli (2004). "Steady-state brain concentrations of antihistamines in rats: interplay of membrane permeability, P-glycoprotein efflux and plasma protein binding." *Pharmacology* **72**(2): 92-98.
- Matsson, P., J. M. Pedersen, U. Norinder, C. A. Bergstrom and P. Artursson (2009). "Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs." *Pharm Res* **26**(8): 1816-1831.
- Mealey, K. L., S. A. Bentjen, J. M. Gay and G. H. Cantor (2001). "Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene." *Pharmacogenetics* **11**(8): 727-733.
- Meier-Abt, F., A. Hammann-Hanni, B. Stieger, N. Ballatori and J. L. Boyer (2007). "The organic anion transport polypeptide 1d1 (*Oatp1d1*) mediates hepatocellular uptake of phalloidin and microcystin into skate liver." *Toxicol Appl Pharmacol* **218**(3): 274-279.
- Meier-Abt, F., Y. Mokrab and K. Mizuguchi (2005). "Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily: identification of new members in nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode." *J Membr Biol* **208**(3): 213-227.
- Meijer, L., K. Bettayeb and H. Galons, Eds. (2006). Roscovitine (CYC202, Seliciclib). In "Monographs on enzyme inhibitors", Volume 2. CDK inhibitors and their potential as anti-tumor agents », CRC Press Taylor & Francis.
- Meszaros, P., K. Klappe, I. Hummel, D. Hoekstra and J. W. Kok (2011). "Function of MRP1/ABCC1 is not dependent on cholesterol or cholesterol-stabilized lipid rafts." *Biochem J* **437**(3): 483-491.
- Mishra, B. B. and V. K. Tiwari (2011). "Natural products: an evolving role in future drug discovery." *Eur J Med Chem* **46**(10): 4769-4807.
- Miwa, M., S. Tsukahara, E. Ishikawa, S. Asada, Y. Imai and Y. Sugimoto (2003). "Single amino acid substitutions in the transmembrane domains of breast cancer resistance protein (BCRP) alter cross resistance patterns in transfectants." *Int J Cancer* **107**(5): 757-763.
- Mizuno, N., T. Takahashi, H. Kusuhara, J. D. Schuetz, T. Niwa and Y. Sugiyama (2007). "Evaluation of the role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in the urinary excretion of sulfate and glucuronide metabolites of edaravone (MCI-186; 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one)." *Drug Metab Dispos* **35**(11): 2045-2052.
- Mohrmann, K., M. A. van Eijndhoven, A. H. Schinkel and J. H. Schellens (2005). "Absence of N-linked glycosylation does not affect plasma membrane localization of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)." *Cancer Chemother Pharmacol* **56**(4): 344-350.
- Molnar, J., H. Engi, J. Hohmann, P. Molnar, J. Deli, O. Wesolowska, K. Michalak and Q. Wang (2010). "Reversal of multidrug resistance by natural substances from plants." *Curr Top Med Chem* **10**(17): 1757-1768.
- Mordel, A., H. Halkin, L. Zulty, S. Almog and D. Ezra (1993). "Quinidine enhances digitalis toxicity at therapeutic serum digoxin levels." *Clin Pharmacol Ther* **53**(4): 457-462.
- Muehlbacher, M., G. M. Spitzer, K. R. Liedl and J. Kornhuber (2011). "Qualitative prediction of blood-brain barrier permeability on a large and refined dataset." *J Comput Aided Mol Des* **25**(12): 1095-1106.
- Muir, D. C. and P. H. Howard (2006). "Are there other persistent organic pollutants? A challenge for environmental chemists." *Environ Sci Technol* **40**(23): 7157-7166.
- Mukwaya, G., T. MacGregor, D. Hoelscher, T. Heming, D. Legg, K. Kavanaugh, P. Johnson, J. P. Sabo and S. McCallister (2005). "Interaction of ritonavir-boosted tipranavir with loperamide does



- not result in loperamide-associated neurologic side effects in healthy volunteers." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(12): 4903-4910.
- Mullen, W., M. A. Archeveque, C. A. Edwards, H. Matsumoto and A. Crozier (2008). "Bioavailability and metabolism of orange juice flavanones in humans: impact of a full-fat yogurt." *J Agric Food Chem* **56**(23): 11157-11164.
- Neuhoff, S., A. L. Ungell, I. Zamora and P. Artursson (2003). "pH-dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco-2 monolayers: implications for drug-drug interactions." *Pharm Res* **20**(8): 1141-1148.
- Neuhoff, S., A. L. Ungell, I. Zamora and P. Artursson (2005). "pH-Dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 cell monolayers." *Eur J Pharm Sci* **25**(2-3): 211-220.
- Neuvonen, P. J., M. Niemi and J. T. Backman (2006). "Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance." *Clin Pharmacol Ther* **80**(6): 565-581.
- Ni, Z., Z. Bikadi, X. Cai, M. F. Rosenberg and Q. Mao (2010). "Transmembrane helices 1 and 6 of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): identification of polar residues important for drug transport." *Am J Physiol Cell Physiol* **299**(5): C1100-1109.
- Ni, Z., Z. Bikadi, D. L. Shuster, C. Zhao, M. F. Rosenberg and Q. Mao (2011). "Identification of proline residues in or near the transmembrane helices of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) that are important for transport activity and substrate specificity." *Biochemistry* **50**(37): 8057-8066.
- Niemi, M., M. K. Pasanen and P. J. Neuvonen (2011). "Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake." *Pharmacol Rev* **63**(1): 157-181.
- Ninomiya, M., K. Ito, R. Hiramatsu and T. Horie (2006). "Functional analysis of mouse and monkey multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2)." *Drug Metab Dispos* **34**(12): 2056-2063.
- Noe, J., B. Hagenbuch, P. J. Meier and M. V. St-Pierre (2001). "Characterization of the mouse bile salt export pump overexpressed in the baculovirus system." *Hepatology* **33**(5): 1223-1231.
- Nozawa, T., M. Nakajima, I. Tamai, K. Noda, J. Nezu, Y. Sai, A. Tsuji and T. Yokoi (2002). "Genetic polymorphisms of human organic anion transporters OATP-C (SLC21A6) and OATP-B (SLC21A9): allele frequencies in the Japanese population and functional analysis." *J Pharmacol Exp Ther* **302**(2): 804-813.
- Ono, M., T. Yuasa, C. Ra and T. Takai (1999). "Stimulatory function of paired immunoglobulin-like receptor-A in mast cell line by associating with subunits common to Fc receptors." *J Biol Chem* **274**(42): 30288-30296.
- Oosterhuis, B., K. Vukman, E. Vagi, H. Glavinas, I. Jablonkai and P. Krajcsi (2008). "Specific interactions of chloroacetanilide herbicides with human ABC transporter proteins." *Toxicology* **248**(1): 45-51.
- Ose, A., M. Ito, H. Kusuhara, K. Yamatsugu, M. Kanai, M. Shibasaki, M. Hosokawa, J. D. Schuetz and Y. Sugiyama (2009). "Limited brain distribution of [3R,4R,5S]-4-acetamido-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylate phosphate (Ro 64-0802), a pharmacologically active form of oseltamivir, by active efflux across the blood-brain barrier mediated by organic anion transporter 3 (Oat3/Slc22a8) and multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4/Abcc4)." *Drug Metab Dispos* **37**(2): 315-321.
- Osman, M. A., R. B. Patel, D. S. Irwin, W. A. Craig and P. G. Welling (1982). "Bioavailability of chlorothiazide from 50, 100, and 250 MG solution doses." *Biopharm Drug Dispos* **3**(2): 89-94.
- Ozvegy-Laczka, C., G. Koblos, B. Sarkadi and A. Varadi (2005). "Single amino acid (482) variants of the ABCG2 multidrug transporter: major differences in transport capacity and substrate recognition." *Biochim Biophys Acta* **1668**(1): 53-63.
- Ozvegy, C., T. Litman, G. Szakacs, Z. Nagy, S. Bates, A. Varadi and B. Sarkadi (2001). "Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells." *Biochem Biophys Res Commun* **285**(1): 111-117.

- Paine, M. F., W. W. Widmer, S. N. Pusek, K. L. Beavers, A. B. Criss, J. Snyder and P. B. Watkins (2008). "Further characterization of a furanocoumarin-free grapefruit juice on drug disposition: studies with cyclosporine." *Am J Clin Nutr* **87**(4): 863-871.
- Pal, A., E. Kis, D. Mehn, H. Glavinas, T. Nagy, P. Meszaros, G. Bathori, P. Krajcsi and G. Falkay (2007a). "[In vitro methods suitable for the prediction of drug and ABC transporter, especially ABCG2 interactions]." *Acta Pharm Hung* **77**(4): 205-216.
- Pal, A., D. Mehn, E. Molnar, S. Gedey, P. Meszaros, T. Nagy, H. Glavinas, T. Janaky, O. von Richter, G. Bathori, L. Szente and P. Krajcsi (2007b). "Cholesterol potentiates ABCG2 activity in a heterologous expression system: improved in vitro model to study function of human ABCG2." *J Pharmacol Exp Ther* **321**(3): 1085-1094.
- Pan, L., H. B. Chai and A. D. Kinghorn (2012). "Discovery of new anticancer agents from higher plants." *Front Biosci (Schol Ed)* **4**: 142-156.
- Parron, T., M. Requena, A. F. Hernandez and R. Alarcon (2011). "Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases." *Toxicol Appl Pharmacol* **256**(3): 379-385.
- Patterson, D., C. Graham, C. Cherian and L. H. Matherly (2008). "A humanized mouse model for the reduced folate carrier." *Mol Genet Metab* **93**(2): 95-103.
- Paulusma, C. C., D. R. de Waart, C. Kunne, K. S. Mok and R. P. Elferink (2009). "Activity of the bile salt export pump (ABCB11) is critically dependent on canalicular membrane cholesterol content." *J Biol Chem* **284**(15): 9947-9954.
- Paulusma, C. C., D. E. Folmer, K. S. Ho-Mok, D. R. de Waart, P. M. Hilarius, A. J. Verhoeven and R. P. Oude Elferink (2008). "ATP8B1 requires an accessory protein for endoplasmic reticulum exit and plasma membrane lipid flippase activity." *Hepatology* **47**(1): 268-278.
- Paulusma, C. C., M. Kool, P. J. Bosma, G. L. Scheffer, F. ter Borg, R. J. Scheper, G. N. Tytgat, P. Borst, F. Baas and R. P. Oude Elferink (1997). "A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome." *Hepatology* **25**(6): 1539-1542.
- Paxinos, G. and C. Watson (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York, Academic Press.
- Perry, J. L., N. Dembla-Rajpal, L. A. Hall and J. B. Pritchard (2006). "A three-dimensional model of human organic anion transporter 1: aromatic amino acids required for substrate transport." *J Biol Chem* **281**(49): 38071-38079.
- Planting, A. S., P. Sonneveld, A. van der Gaast, A. Sparreboom, M. E. van der Burg, G. P. Luyten, K. de Leeuw, M. de Boer-Dennert, P. S. Wissel, R. C. Jewell, E. M. Paul, N. B. Purvis, Jr. and J. Verweij (2005). "A phase I and pharmacologic study of the MDR converter GF120918 in combination with doxorubicin in patients with advanced solid tumors." *Cancer Chemother Pharmacol* **55**(1): 91-99.
- Polli, J. W., S. A. Wring, J. E. Humphreys, L. Huang, J. B. Morgan, L. O. Webster and C. S. Serabjit-Singh (2001). "Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery." *J Pharmacol Exp Ther* **299**(2): 620-628.
- Pritchard, J. B. and D. S. Miller (1993). "Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations." *Physiol Rev* **73**(4): 765-796.
- Rajnai, Z., D. Mehn, E. Beery, A. Okyar, M. Jani, G. K. Toth, F. Fulop, F. Levi and P. Krajcsi (2010). "ATP-binding cassette B1 transports seliciclib (R-roscovitine), a cyclin-dependent kinase inhibitor." *Drug Metab Dispos* **38**(11): 2000-2006.
- Rautio, J., J. E. Humphreys, L. O. Webster, A. Balakrishnan, J. P. Keogh, J. R. Kunta, C. J. Serabjit-Singh and J. W. Polli (2006). "In vitro p-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates." *Drug Metab Dispos* **34**(5): 786-792.
- Ravna, A. W., I. Sylte and G. Sager (2009). "Binding site of ABC transporter homology models confirmed by ABCB1 crystal structure." *Theor Biol Med Model* **6**: 20.

- Real, R., E. Egado, M. Perez, L. Gonzalez-Lobato, B. Barrera, J. G. Prieto, A. I. Alvarez and G. Merino (2011). "Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the secretion of danofloxacin into milk: interaction with ivermectin." *J Vet Pharmacol Ther* **34**(4): 313-321.
- Rizwan, A. N., W. Krick and G. Burckhardt (2007). "The chloride dependence of the human organic anion transporter 1 (hOAT1) is blunted by mutation of a single amino acid." *J Biol Chem* **282**(18): 13402-13409.
- Robey, R. W., Y. Honjo, K. Morisaki, T. A. Nadjem, S. Runge, M. Risbood, M. S. Poruchynsky and S. E. Bates (2003). "Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity." *Br J Cancer* **89**(10): 1971-1978.
- Robey, R. W., P. R. Massey, L. Amiri-Kordestani and S. E. Bates (2010). "ABC transporters: unvalidated therapeutic targets in cancer and the CNS." *Anticancer Agents Med Chem* **10**(8): 625-633.
- Rosenberg, M. F., Z. Bikadi, J. Chan, X. Liu, Z. Ni, X. Cai, R. C. Ford and Q. Mao (2010). "The human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) shows conformational changes with mitoxantrone." *Structure* **18**(4): 482-493.
- Roth, B. L., E. Lopez, S. Beischel, R. B. Westkaemper and J. M. Evans (2004). "Screening the receptorome to discover the molecular targets for plant-derived psychoactive compounds: a novel approach for CNS drug discovery." *Pharmacol Ther* **102**(2): 99-110.
- Sadeque, A. J., C. Wandel, H. He, S. Shah and A. J. Wood (2000). "Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibition." *Clin Pharmacol Ther* **68**(3): 231-237.
- Saito, H., M. Osumi, H. Hirano, W. Shin, R. Nakamura and T. Ishikawa (2009). "Technical pitfalls and improvements for high-speed screening and QSAR analysis to predict inhibitors of the human bile salt export pump (ABCB11/BSEP)." *AAPS J* **11**(3): 581-589.
- Sallam, H., P. Jimenez, H. Song, M. Vita, A. Cedazo-Minguez and M. Hassan (2008). "Age-dependent pharmacokinetics and effect of roscovitine on Cdk5 and Erk1/2 in the rat brain." *Pharmacol Res* **58**(1): 32-37.
- Sarkadi, B., E. M. Price, R. C. Boucher, U. A. Germann and G. A. Scarborough (1992). "Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase." *J Biol Chem* **267**(7): 4854-4858.
- Satlin, L. M., V. Amin and A. W. Wolkoff (1997). "Organic anion transporting polypeptide mediates organic anion/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange." *J Biol Chem* **272**(42): 26340-26345.
- Sauna, Z. E. and S. V. Ambudkar (2007). "About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work." *Mol Cancer Ther* **6**(1): 13-23.
- Schinkel, A. H., J. J. Smit, O. van Tellingen, J. H. Beijnen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C. A. Mol, M. A. van der Valk, E. C. Robanus-Maandag, H. P. te Riele and et al. (1994). "Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs." *Cell* **77**(4): 491-502.
- Schinkel, A. H., E. Wagenaar, L. van Deemter, C. A. Mol and P. Borst (1995). "Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A." *J Clin Invest* **96**(4): 1698-1705.
- Schneiderman, R. S., E. Shmueli, E. D. Kirson and Y. Palti (2010). "TFIELDS alone and in combination with chemotherapeutic agents effectively reduce the viability of MDR cell sub-lines that over-express ABC transporters." *BMC Cancer* **10**: 229.
- Schutte, M. E., A. P. Freidig, J. J. van de Sandt, G. M. Alink, I. M. Rietjens and J. P. Groten (2006). "An in vitro and in silico study on the flavonoid-mediated modulation of the transport of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) through Caco-2 monolayers." *Toxicol Appl Pharmacol* **217**(2): 204-215.
- Schwarz, U. I., T. Gramatte, J. Krappweis, A. Berndt, R. Oertel, O. von Richter and W. Kirch (1999). "Unexpected effect of verapamil on oral bioavailability of the beta-blocker talinolol in humans." *Clin Pharmacol Ther* **65**(3): 283-290.
- Schwarz, U. I., T. Gramatte, J. Krappweis, R. Oertel and W. Kirch (2000). "P-glycoprotein inhibitor erythromycin increases oral bioavailability of talinolol in humans." *Int J Clin Pharmacol Ther* **38**(4): 161-167.

- Seelig, A. (2007). "The role of size and charge for blood-brain barrier permeation of drugs and fatty acids." *J Mol Neurosci* **33**(1): 32-41.
- Seeman, P. (1972). "The membrane actions of anesthetics and tranquilizers." *Pharmacol Rev* **24**(4): 583-655.
- Seithel, A., S. Eberl, K. Singer, D. Auge, G. Heinkele, N. B. Wolf, F. Dorje, M. F. Fromm and J. König (2007). "The influence of macrolide antibiotics on the uptake of organic anions and drugs mediated by OATP1B1 and OATP1B3." *Drug Metab Dispos* **35**(5): 779-786.
- Shao, Z. H., T. L. Vanden Hoek, Y. Qin, L. B. Becker, P. T. Schumacker, C. Q. Li, L. Dey, E. Barth, H. Halpern, G. M. Rosen and C. S. Yuan (2002). "Baicalein attenuates oxidant stress in cardiomyocytes." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**(3): H999-H1006.
- Shapiro, A. B. and V. Ling (1998). "Stoichiometry of coupling of rhodamine 123 transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein." *Eur J Biochem* **254**(1): 189-193.
- Shi, J. G., Y. Zhang and S. Yeleswaram (2011). "The relevance of assessment of intestinal P-gp inhibition using digoxin as an in vivo probe substrate." *Nat Rev Drug Discov* **10**(1): 75; author reply 75.
- Shikano, N., Y. Kanai, K. Kawai, N. Ishikawa and H. Endou (2004). "Transport of 99mTc-MAG3 via rat renal organic anion transporter 1." *J Nucl Med* **45**(1): 80-85.
- Shirasaka, Y., T. Sakane and S. Yamashita (2008). "Effect of P-glycoprotein expression levels on the concentration-dependent permeability of drugs to the cell membrane." *J Pharm Sci* **97**(1): 553-565.
- Shu, Y., S. A. Sheardown, C. Brown, R. P. Owen, S. Zhang, R. A. Castro, A. G. Ianculescu, L. Yue, J. C. Lo, E. G. Burchard, C. M. Brett and K. M. Giacomini (2007). "Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action." *J Clin Invest* **117**(5): 1422-1431.
- Shuilleabhain, S. N., M. Davoren, C. Mothersill, D. Sheehan, M. G. Hartl, M. Kilemade, M. O'Brien N, J. O'Halloran, F. N. Van Pelt and F. M. Lyng (2005). "Identification of a multixenobiotic resistance mechanism in primary cultured epidermal cells from *Oncorhynchus mykiss* and the effects of environmental complex mixtures on its activity." *Aquat Toxicol* **73**(2): 115-127.
- Shynu, M., P. K. Gupta and M. Saini (2011). "Antineoplastic potential of medicinal plants." *Recent Pat Biotechnol* **5**(2): 85-94.
- Simonson, S. G., A. Raza, P. D. Martin, P. D. Mitchell, J. A. Jarcho, C. D. Brown, A. S. Windass and D. W. Schneck (2004). "Rosuvastatin pharmacokinetics in heart transplant recipients administered an antirejection regimen including cyclosporine." *Clin Pharmacol Ther* **76**(2): 167-177.
- Smith, A. J., A. van Helvoort, G. van Meer, K. Szabo, E. Welker, G. Szakacs, A. Varadi, B. Sarkadi and P. Borst (2000). "MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping." *J Biol Chem* **275**(31): 23530-23539.
- Sparreboom, A., W. J. Loos, H. Burger, T. M. Sissung, J. Verweij, W. D. Figg, K. Nooter and H. Gelderblom (2005). "Effect of ABCG2 genotype on the oral bioavailability of topotecan." *Cancer Biol Ther* **4**(6): 650-658.
- Stieger, B. (2011). "The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation." *Handb Exp Pharmacol*(201): 205-259.
- Storch, C. H., R. Ehehalt, W. E. Haefeli and J. Weiss (2007). "Localization of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in lipid rafts/caveolae and modulation of its activity by cholesterol in vitro." *J Pharmacol Exp Ther* **323**(1): 257-264.
- Straughn, A. B., A. P. Melikian and M. C. Meyer (1979). "Bioavailability of chlorothiazide tablets in humans." *J Pharm Sci* **68**(9): 1099-1102.
- Sugano, K., M. Kansy, P. Artursson, A. Avdeef, S. Bendels, L. Di, G. F. Ecker, B. Faller, H. Fischer, G. Gerebtzoff, H. Lennernaes and F. Senner (2010). "Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport." *Nat Rev Drug Discov* **9**(8): 597-614.

- Swift, B., N. D. Pfeifer and K. L. Brouwer (2010). "Sandwich-cultured hepatocytes: an in vitro model to evaluate hepatobiliary transporter-based drug interactions and hepatotoxicity." *Drug Metab Rev* **42**(3): 446-471.
- Szakacs, G., J. P. Annereau, S. Lababidi, U. Shankavaram, A. Arciello, K. J. Bussey, W. Reinhold, Y. Guo, G. D. Kruh, M. Reimers, J. N. Weinstein and M. M. Gottesman (2004). "Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells." *Cancer Cell* **6**(2): 129-137.
- Szeremy, P., A. Pal, D. Mehn, B. Toth, F. Fulop, P. Krajcsi and K. Heredi-Szabo (2011). "Comparison of 3 assay systems using a common probe substrate, calcein AM, for studying P-gp using a selected set of compounds." *J Biomol Screen* **16**(1): 112-119.
- Sziraki, I. (és munkatársai, kézirat előkészületben).
- Sziraki, I., F. Erdo, E. Beery, P. M. Molnar, C. Fazakas, I. Wilhelm, I. Makai, E. Kis, K. Heredi-Szabo, T. Abonyi, I. Krizbai, G. K. Toth and P. Krajcsi (2011). "Quinidine as an ABCB1 probe for testing drug interactions at the blood-brain barrier: an in vitro in vivo correlation study." *J Biomol Screen* **16**(8): 886-894.
- Tamura, A., K. Wakabayashi, Y. Onishi, M. Takeda, Y. Ikegami, S. Sawada, M. Tsuji, Y. Matsuda and T. Ishikawa (2007). "Re-evaluation and functional classification of non-synonymous single nucleotide polymorphisms of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2." *Cancer Sci* **98**(2): 231-239.
- Tanaka, M., S. Kyosaka and S. Murata (1978). "Bovine liver beta-acetylhexosaminidase. Purification by hydrophobic affinity chromatography and heterogeneity." *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **26**(10): 3225-3228.
- Taub, M. E., L. Podila, D. Ely and I. Almeida (2005). "Functional assessment of multiple P-glycoprotein (P-gp) probe substrates: influence of cell line and modulator concentration on P-gp activity." *Drug Metab Dispos* **33**(11): 1679-1687.
- Telbisz, A., M. Muller, C. Ozvegy-Laczka, L. Homolya, L. Szente, A. Varadi and B. Sarkadi (2007). "Membrane cholesterol selectively modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter." *Biochim Biophys Acta* **1768**(11): 2698-2713.
- Tietz, P., J. Jefferson, R. Pagano and N. F. Larusso (2005). "Membrane microdomains in hepatocytes: potential target areas for proteins involved in canalicular bile secretion." *J Lipid Res* **46**(7): 1426-1432.
- Tomas-Barberan, F. A., M. I. Gil, P. Cremin, A. L. Waterhouse, B. Hess-Pierce and A. A. Kader (2001). "HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums." *J Agric Food Chem* **49**(10): 4748-4760.
- Treiber, A., R. Schneiter, S. Hausler and B. Stieger (2007). "Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interactions with cyclosporin A, rifampicin, and sildenafil." *Drug Metab Dispos* **35**(8): 1400-1407.
- Ueda, K., M. M. Cornwell, M. M. Gottesman, I. Pastan, I. B. Roninson, V. Ling and J. R. Riordan (1986). "The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein." *Biochem Biophys Res Commun* **141**(3): 956-962.
- Urquhart, B. L. and R. B. Kim (2009). "Blood-brain barrier transporters and response to CNS-active drugs." *Eur J Clin Pharmacol* **65**(11): 1063-1070.
- Urquhart, B. L., J. A. Ware, R. G. Tirona, R. H. Ho, B. F. Leake, U. I. Schwarz, H. Zaher, J. Palandra, J. C. Gregor, G. K. Dresser and R. B. Kim (2008). "Breast cancer resistance protein (ABCG2) and drug disposition: intestinal expression, polymorphisms and sulfasalazine as an in vivo probe." *Pharmacogenet Genomics* **18**(5): 439-448.
- Vaidyanathan, S., G. Camenisch, H. Schuetz, C. Reynolds, C. M. Yeh, M. N. Bizot, H. A. Dieterich, D. Howard and W. P. Dole (2008). "Pharmacokinetics of the oral direct renin inhibitor aliskiren in combination with digoxin, atorvastatin, and ketoconazole in healthy subjects: the role of P-glycoprotein in the disposition of aliskiren." *J Clin Pharmacol* **48**(11): 1323-1338.

- Vajdic, C. M., L. Fritschi, A. E. Grulich, J. M. Kaldor, G. Benke, A. Kricger, A. M. Hughes, J. J. Turner, S. Milliken, C. Goumas and B. K. Armstrong (2007). "Atopy, exposure to pesticides and risk of non-Hodgkin lymphoma." *Int J Cancer* **120**(10): 2271-2274.
- van der Heijden, J. W., R. Oerlemans, P. P. Tak, Y. G. Assaraf, M. C. Kraan, G. L. Scheffer, C. J. van der Laken, W. F. Lems, R. J. Scheper, B. A. Dijkmans and G. Jansen (2009). "Involvement of breast cancer resistance protein expression on rheumatoid arthritis synovial tissue macrophages in resistance to methotrexate and leflunomide." *Arthritis Rheum* **60**(3): 669-677.
- van Herwaarden, A. E., E. Wagenaar, B. Karnekamp, G. Merino, J. W. Jonker and A. H. Schinkel (2006). "Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) reduces systemic exposure of the dietary carcinogens aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but also mediates their secretion into breast milk." *Carcinogenesis* **27**(1): 123-130.
- Varma, M. V. (2010). "Role of intestinal transporters and metabolism in the oral absorption of drug and prodrugs." *Curr Drug Metab* **11**(9): 715.
- Vastag, M. and G. M. Keseru (2009). "Current in vitro and in silico models of blood-brain barrier penetration: a practical view." *Curr Opin Drug Discov Devel* **12**(1): 115-124.
- Villa-Bellosta, R. and V. Sorribas (2008). "Role of rat sodium/phosphate cotransporters in the cell membrane transport of arsenate." *Toxicol Appl Pharmacol* **232**(1): 125-134.
- Vita, M., M. Abdel-Rehim, S. Olofsson, Z. Hassan, L. Meurling, A. Siden, M. Siden, T. Pettersson and M. Hassan (2005). "Tissue distribution, pharmacokinetics and identification of roscovitine metabolites in rat." *Eur J Pharm Sci* **25**(1): 91-103.
- von Richter, O., H. Glavinas, P. Krajcsi, S. Liehner, B. Siewert and K. Zech (2009). "A novel screening strategy to identify ABCB1 substrates and inhibitors." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **379**(1): 11-26.
- Vree, T. B., M. van den Biggelaar-Marteau and C. P. Verwey-van Wissen (1995). "Probenecid inhibits the renal clearance of frusemide and its acyl glucuronide." *Br J Clin Pharmacol* **39**(6): 692-695.
- Wang, D. S., J. W. Jonker, Y. Kato, H. Kushihara, A. H. Schinkel and Y. Sugiyama (2002). "Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin." *J Pharmacol Exp Ther* **302**(2): 510-515.
- Warren, M. S., N. Zerangue, K. Woodford, L. M. Roberts, E. H. Tate, B. Feng, C. Li, T. J. Feuerstein, J. Gibbs, B. Smith, S. M. de Morais, W. J. Dower and K. J. Koller (2009). "Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human." *Pharmacol Res* **59**(6): 404-413.
- Watanabe, T., H. Kushihara, K. Maeda, H. Kanamaru, Y. Saito, Z. Hu and Y. Sugiyama (2010). "Investigation of the rate-determining process in the hepatic elimination of HMG-CoA reductase inhibitors in rats and humans." *Drug Metab Dispos* **38**(2): 215-222.
- Weaver, Y. M. and B. Hagenbuch (2010). "Several conserved positively charged amino acids in OATP1B1 are involved in binding or translocation of different substrates." *J Membr Biol* **236**(3): 279-290.
- Weingrill, E., A. Wolfler, D. Strunk, W. Linkesch, H. Sill and P. M. Liebmann (2007). "Roscovitine in B-chronic lymphocytic leukemia cells: high apoptosis-inducing efficacy and synergism with alemtuzumab independent of the patients' pretreatment status." *Haematologica* **92**(9): 1286-1288.
- Welling, P. G., S. Dean, A. Selen, M. J. Kendall and R. Wise (1979). "Probenecid: an unexplained effect on cephalosporin pharmacology." *Br J Clin Pharmacol* **8**(5): 491-495.
- Westphal, K., A. Weinbrenner, M. Zschiesche, G. Franke, M. Knoke, R. Oertel, P. Fritz, O. von Richter, R. Warzok, T. Hachenberg, H. M. Kauffmann, D. Schrenk, B. Terhaag, H. K. Kroemer and W. Siegmund (2000). "Induction of P-glycoprotein by rifampin increases intestinal secretion of talinolol in human beings: a new type of drug/drug interaction." *Clin Pharmacol Ther* **68**(4): 345-355.

- Wilhelm, I., A. E. Farkas, P. Nagyoszi, G. Varo, Z. Balint, G. A. Vegh, P. O. Couraud, I. A. Romero, B. Weksler and I. A. Krizbai (2007). "Regulation of cerebral endothelial cell morphology by extracellular calcium." *Phys Med Biol* **52**(20): 6261-6274.
- Williamson, G., I. Aeberli, L. Miguët, Z. Zhang, M. B. Sanchez, V. Crespy, D. Barron, P. Needs, P. A. Kroon, H. Glavinas, P. Krajcsi and M. Grigorov (2007). "Interaction of positional isomers of quercetin glucuronides with the transporter ABCC2 (cMOAT, MRP2)." *Drug Metab Dispos* **35**(8): 1262-1268.
- Wong, C. C., D. Barron, C. Orfila, F. Dionisi, P. Krajcsi and G. Williamson (2011). "Interaction of hydroxycinnamic acids and their conjugates with organic anion transporters and ATP-binding cassette transporters." *Mol Nutr Food Res* **55**(7): 979-988.
- Wong, C. C., W. Meinel, H. R. Glatt, D. Barron, A. Stalmach, H. Steiling, A. Crozier and G. Williamson (2010). "In vitro and in vivo conjugation of dietary hydroxycinnamic acids by UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases in humans." *J Nutr Biochem* **21**(11): 1060-1068.
- Xia, C. Q., N. Liu, D. Yang, G. Miwa and L. S. Gan (2005). "Expression, localization, and functional characteristics of breast cancer resistance protein in Caco-2 cells." *Drug Metab Dispos* **33**(5): 637-643.
- Xia, C. Q., M. N. Milton and L. S. Gan (2007). "Evaluation of drug-transporter interactions using in vitro and in vivo models." *Curr Drug Metab* **8**(4): 341-363.
- Xiao, Y., R. Davidson, A. Smith, D. Pereira, S. Zhao, J. Soglia, D. Gebhard, S. de Moraes and D. B. Duignan (2006). "A 96-well efflux assay to identify ABCG2 substrates using a stably transfected MDCK II cell line." *Mol Pharm* **3**(1): 45-54.
- Yabe, Y., A. Galetin and J. B. Houston (2011). "Kinetic characterization of rat hepatic uptake of 16 actively transported drugs." *Drug Metab Dispos* **39**(10): 1808-1814.
- Yasui-Furukori, N., T. Uno, K. Sugawara and T. Tateishi (2005). "Different effects of three transporting inhibitors, verapamil, cimetidine, and probenecid, on fexofenadine pharmacokinetics." *Clin Pharmacol Ther* **77**(1): 17-23.
- Zelcer, N., M. T. Huisman, G. Reid, P. Wielinga, P. Breedveld, A. Kuil, P. Knipscheer, J. H. Schellens, A. H. Schinkel and P. Borst (2003). "Evidence for two interacting ligand binding sites in human multidrug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2)." *J Biol Chem* **278**(26): 23538-23544.
- Zhang, D. W., K. Nunoya, M. Vasa, H. M. Gu, S. P. Cole and R. G. Deeley (2006). "Mutational analysis of polar amino acid residues within predicted transmembrane helices 10 and 16 of multidrug resistance protein 1 (ABCC1): effect on substrate specificity." *Drug Metab Dispos* **34**(4): 539-546.
- Zhang, L., C. Li, G. Lin, P. Krajcsi and Z. Zuo (2011). "Hepatic metabolism and disposition of baicalein via the coupling of conjugation enzymes and transporters-in vitro and in vivo evidences." *AAPS J* **13**(3): 378-389.
- Zhang, L., G. Lin, Q. Chang and Z. Zuo (2005). "Role of intestinal first-pass metabolism of baicalein in its absorption process." *Pharm Res* **22**(7): 1050-1058.
- Zhang, L., G. Lin, B. Kovacs, M. Jani, P. Krajcsi and Z. Zuo (2007a). "Mechanistic study on the intestinal absorption and disposition of baicalein." *Eur J Pharm Sci* **31**(3-4): 221-231.
- Zhang, L., G. Lin and Z. Zuo (2007b). "Involvement of UDP-glucuronosyltransferases in the extensive liver and intestinal first-pass metabolism of flavonoid baicalein." *Pharm Res* **24**(1): 81-89.
- Zhang, L., Y. D. Zhang, P. Zhao and S. M. Huang (2009). "Predicting drug-drug interactions: an FDA perspective." *AAPS J* **11**(2): 300-306.
- Zheng, H. X., Y. Huang, L. A. Frassetto and L. Z. Benet (2009). "Elucidating rifampin's inducing and inhibiting effects on glyburide pharmacokinetics and blood glucose in healthy volunteers: unmasking the differential effects of enzyme induction and transporter inhibition for a drug and its primary metabolite." *Clin Pharmacol Ther* **85**(1): 78-85.
- Zimmermann, C., K. van de Wetering, E. van de Steeg, E. Wagenaar, C. Vens and A. H. Schinkel (2008). "Species-dependent transport and modulation properties of human and mouse

dc\_350\_11

multidrug resistance protein 2 (MRP2/Mrp2, ABCC2/Abcc2)." Drug Metab Dispos **36**(4): 631-640.