

dc_350_11

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Tézisek

Krajcsi Péter, PhD

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



Budaörs, 2012

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések jegyzéke	3
2	Bevezetés és irodalmi áttekintés.....	3
2.1	Az ADMETox és jelentősége	3
2.2	Biológiai membránok, transzportfolyamatok	4
2.3	Efflux és influx transzporterek.....	4
2.4	Farmakológiai szempontból fontos fiziológiás barrierek	5
3	A transzporterek jelentősége a gyógyszerek ADMETox sajátságainak meghatározásában	5
4	Célkitűzések.....	6
4.1	Expressziós rendszerek optimalizálása gyógyszer – transzporter kölcsönhatások vizsgálatára.	6
4.2	Tesztrendszerek korrelációs analízise, valamint transzporter szubsztrát próbák és referencia inhibitorok validálása in vitro ADME vizsgálatok céljára.....	6
4.3	In vitro esszérendszerek alkalmazása transzporter – gyógyszer kölcsönhatások kinetikai jellemzésére.	6
4.4	In vitro esszérendszerek alkalmazása növényi hatóanyagok és környezetszennyező anyagok transzporterekkel való kölcsönhatásának azonosítására és jellemzésére.....	7
4.5	<i>In vitro</i> vizsgálatok <i>in vivo</i> relevanciájának bemutatása. <i>In vitro</i> – <i>in vivo</i> korrelációs és fajspecifitás vizsgálatok.	7
5	Anyagok és módszerek	7
	<i>In vivo</i> esszék.....	10
	<i>Epevezeték kanulációs technika alkalmazása a kanalikuláris efflux transzporterekre történő gyógyszer interakciók vizsgálatára</i>	10
6	Eredmények és megbeszélés.....	11
6.1	Expressziós rendszerek optimalizálása gyógyszer – transzporter kölcsönhatások vizsgálatára	12
6.2	Transzporter szubsztrát próbák és referencia inhibitorok validálása in vitro ADME vizsgálatok céljára.....	13
6.3	In vitro esszérendszerek alkalmazása transzporter – gyógyszer kölcsönhatások kinetikai jellemzésére	14
6.4	In vitro esszérendszerek alkalmazása növényi hatóanyagok és környezetszennyező anyagok transzporterekkel való kölcsönhatásának azonosítására és jellemzésére.....	15
6.5	In vitro vizsgálatok <i>in vivo</i> relevanciájának bemutatása. <i>In vitro</i> – <i>in vivo</i> korrelációs és fajspecifitás vizsgálatok	17
7	Új megállapítások, gyakorlati hasznosítás.....	18

8	Köszönetnyilvánítás.....	20
9	A disszertációban tárgyalt <i>in extenso</i> saját közlemények	21
10	A kandidátusi disszertáció megvédése után megjelent <i>in extenso</i> saját közlemények	23
11	Referenciák.....	24

1 Rövidítések jegyzéke

ABC: ATP Binding Casette (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-exkréció)
 BCA: Bicinchoninic Acid (bicinkoninsav)
 calcein-AM: calcein-Acetoxy-Methylester (calcein-acetoximetilészter)
 CSF: Cerebrospinal Fluid (cerebrospinális folyadék)
 DMSO: Dimethyl Sulfoxide (dimetil-szulfoxid)
 E2-17 β G: Estradiol-17 β -Glucuronide (ösztadiol-17 β -glükuronid)
 EMA: European Medicines Agency (Európai Gyógyszerhatóság)
 ER: Efflux Ratio (efflux arány)
 FDA: Food and Drug Administration (Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerhatóság)
 HBSS: Hank's Buffered Salt Solution (Hanks puffer)
 IVIVC: *In vitro* – *In vivo* Correlation (*in vitro* - *in vivo* korreláció)
 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)
 OAT: Organic Anion Transporter (szerves anion transzporter)
 PPF: Peripheral Fluid (perifériás folyadék)
 SLC: Solute Carriers (oldott anyag transzporterek azonosak az influx transzporterekkel)
 TEER: Transepithelial Electrical Resistance (transzepitélialis elektromos ellenállás)
 VT: Vesicular Transport (vezikuláris transzport)

2 Bevezetés és irodalmi áttekintés

2.1 Az ADMETox és jelentősége

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

2.2 Biológiai membránok, transzportfolyamatok

Az ADME szempontból legfontosabb sejtek a polarizált epithel és endothel sejttypusok. 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.

A transzcelluláris transzport kismolekulák esetében lehet passzív és aktív. A passzív transzport kétféle mechanizmus szerint valósulhat meg. A transzporter-mediált transzport a facilitált diffúzió, míg a nem fehérje mediált transzport a passzív diffúzió (passzív permeabilitásnak). A passzív transzport folyamatok a koncentrációgrádiens mentén történnek. Az aktív transzport folyamatok hajtóereje az ATP hidrolízis, amely lehetővé teszi a koncentráció grádienssel szembeni transzportot is.

A gyógyszerkutatás egyik legtöbbet vitatott kérdése a passzív permeabilitás és a transzporter-mediált folyamatok súlya a gyógyszermolekulák transzportjában (Dobson and Kell 2008; Dobson 2009; Sugano 2010). Kell és munkatársai szerint a passzív permeabilitásnak tekintett folyamatok legtöbbszörre nincs kellő bizonyíték. A lineáris koncentrációfüggés lehet több transzport fehérje hozzájárulásának az eredménye, míg molekulaszervezetből adódó specifitás hiánya a transzporterek széles és átfedő szubsztrátspecifitásából eredeztethető (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; Borbely 2012). A transzporter kölcsönhatásokra való optimalizálás is számos lehetőséget kínál. A abszorpció javítását lehet elérni olyan prophaconok (prodrug) alkalmazásával, melyek az enterocyták apikális influx transzportereinek szubsztrátjai (Varma 2010). A transzporter-mediált célzott szöveti felvételre példák a HMG-CoA-reduktáz inhibitor statinok.

A fentieket összegezve a molekulák legnagyobb részénél, a közepes passzív permeabilitásúakat is ide értve, a transzporter-mediált membrán permeáció valószínűleg jelentős (Yabe 2011).

2.3 Efflux és influx transzporterek

Az eukariota sejtekben az efflux transzporterek a szubsztrátok citoplazmából történő eltávolítását végzik (Dean 2001). A legtöbb efflux funkciót ellátó transzporter az ABC szupercsaládba tartozik. A 49 ismert humán ABC transzportert 7 alcsaládba (ABCA-G) sorolják (<http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>). A transzporterek nomenklaturájában a szisztematikus angol elnevezést használom.

A géneket a génstruktúra (fél illetve teljes transzporter), a domének sorrendje és az NBD és transzmembrán domének szekvenciája alapján soroljuk a különböző alcsaládokba (Dean 2001). Kísérletes munkánkban az ABCB, ABCC és ABCG alcsalád tagjaival dolgoztunk.

A sejtekbe történő felvételt katalizáló transzporterek a „Solute Carriers” (SLC) szupercsalád tagjai. Megnevezésükre a nemzetközi szaknyelvben is elfogadott influx transzporter kifejezést használom. Emberben ez a legnagyobb transzporter szupercsalád, több mint 300 taggal (<http://www.bioparadigms.org/slc/menu.asp>). Kísérletes munkánkban az SLCO és az SLC22 családok tagjaival dolgoztunk.

2.4 Farmakológiai szempontból fontos fiziológiás barrierek

A legfontosabb négy barriert képező sejtek az enterocyták, hepatocyták, vese proximális tubulus (PT) epithel és a vér-agy gát 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.

Az általunk vizsgált efflux transzporterek közül az ABCB1 mind a négy fenti barrier sejtréteg apikális membránjában expresszálódik, és döntően hidrofób, valamint kationos molekulákat transzportál. A szintén apikális lokalizációjú ABCC2 és ABCG2 elsősorban anionokat, köztük konjugátumokat transzportál. Az ABCC1, ABCC3 és ABCC4 szintén anionokat transzportál. Funkciójuk lokalizációjuktól függő. A vizsgált influx transzporterek közül az SLCO1B1, SLCO1B3 és SLCO2B1 máj, míg az SLC22A6, SLC22A7, SLC22A8 a vese basolateralis, az SLC22A11 az apikális mebránjában tölt be fontos zerepet az exkrécióban illetve reabszorpcióban.

3 A transzporterek jelentősége a gyógyszerek ADMETox sajátságainak meghatározásában

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.

Az apikális membránban expresszálódó efflux transzporterek csökkent aktivitású variánsait hordozó páciensekben (pl. ABCG2 c.421C>A) megnövekedett gyógyszerexpozíció a következmény (Degorter 2012; Ieiri 2012). Ugyanez a következménye a ilyen transzportereken történő gyógyszerinterakciónak is. A máj és vese basolateralis membránjában expresszálódó influx transzporterek esetében a csökkent aktivitású variánsokat hordozó páciensekben és gyógyszerinterakció esetében is csökkent exkréció, és magasabb plazma szintek a jellemzőek (Degorter 2012).

Növényi hatóanyagok a gyógyszerekkel részben átfedő kémiai teret foglalnak el. A növények metabolomjában sok a farmakológiailag aktív molekula található (Gertsch 2011). Az előnyös terápiás tulajdonságokkal rendelkező molekulák jelentős része tartalmaz fenolos funkciót, aminek következtében már az enterocytákban konjugálódnak (Tang 2012). A konjugátumok alacsony passzív permeabilitással rendelkeznek, ezért sejtmembránokon át történő transzportjuk transzporter fehérjék közreműködésével történik. A növényekben található kismolekulájú anyagok transzporter kölcsönhatásai az étel - gyógyszer interakciók szempontjából is fontosak.

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, mégha a szervezetünket érő egyszeri dózisok alatta is maradnak a gyógyszer dózisoknak. Az idevonatkozó tanulmányok fókuszában az efflux transzporterek állnak, hiszen az emberi szervezet toxikus anyagokkal szembeni védelmi mechanizmusaira koncentrálnak.

4 Célkritizések

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. A metodikai platform abban is speciális, hogy ötvözi az *in vitro* és *in vivo* módszereket.

Részletes célok:

4.1 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 „fiziológias” 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).

4.2 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 dolgozatot megalapozó, ebben a témában releváns közlemények: (Herédi-Szabo 2008; Kis 2009b; Beery 2011; Glavinas 2011; Szeremly 2011)

4.3 *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).

4.4 *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. Vizsgálataink az alacsony passzív permeabilitású konjugátumot transzportáló fehérjék azonosítását célozzák. A dolgozatot megalapozó, ebben a témában releváns közlemények: (Zhang 2007a; Oosterhuis 2008; Brand 2011; Wong 2011; Zhang 2011).

4.5 *In vitro* vizsgálatok *in vivo* relevanciájának bemutatása. *In vitro* – *in vivo* korrelációs és fajspecifitás vizsgálatok.

A gyógyszerkutatásban fontos elem a humán és állati fehérjéket expresszáló *in vitro* rendszereken mért adatok korrelációja (fajspecifitás), 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 dolgozatot megalapozó, ebben a témában releváns közlemények: (Heredi-Szabo 2009a; Heredi-Szabo 2009b; Jemnitz 2010; Sziraki 2011).

5 Anyagok és módszerek

Anyagok

A felhasznált membránok a Solvo Biotechnológiai Zrt (Szeged, Magyarország) termékei. 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.

Sejtvonalak, primer kultúrák

Az MDCKII szülői sejtvonalat Dr. Kai Simons-tól (Max Planck Institute, Drezda, Németország, az ABCG2-vel transzfektált MDCKII sejtvonalat (MDCKII-BCRP) Professzor Heyo Klaus Kroemer-től (Greifswald Egyetem, Greifswald, Németország), 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. A Caco-2 sejtvonalat az American Tissue Type Collection-től vásárolta a Solvo Biotechnológia Zrt. A 293H sejtvonal az Invitrogentől (Carlsbad, Kalifornia) került beszerzésre.

A sejtek fenntartása a nemzetközi gyakorlatban elfogadott, leírt standard szövettenyésztési módszerekkel 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 szövetből kalcium- és IV-es típusú kollagenáz tartalmú Earle-féle pufferrel nyertük ki a

sejteket (Heredi-Szabo 2009a). A patkány szövetből is perfúziós módszerrel nyertük ki a hepatocytákat. A májak hím Wistar patkányokból (Charles River, Budapest, Magyarország) származtak. A kultúrát vektoriális transzport kísérletekben használtuk.

A vektoriális transzportozhoz használt patkány agyi endothel kultúrához (Rat Brain Endothelial Culture (RBEK)) 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. 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 kultúrát vektoriális transzport kísérletekben használtuk.

A $\log P$ és $\log D_{7,4}$ számítása

A $\log P$ és $\log D_{7,4}$ értékeket a MarvinSketch 5.3 szoftver (ChemAxon, Budapest) segítségével számoltuk.

Fehérjemérés

Thermo Scientific Kit alkalmazásával, a bicinkoninsav (bicinchoninic acid (BCA)) módszerrel történt.

Western blot

Az elektroforézis és a western blot standard módszerekkel történt. 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.

Membrán esszék

ATPáz esszé

ATPáz esszét a Sarkadi és munkatársai által korábban leírt módon végeztük (Sarkadi 1992). 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_i mennyiségét ammónium-heptamolibdát - aszkorbinsav - cink-acetát oldat-elegy segítségével határoztuk meg. Az optikai denzitást 690 nm-en mértük.

Vezikuláris transzport esszé

A kifordított (inside-out) vezikulákat is tartalmazó membránszuspenziót a megfelelő esszé elegyben -amely tartalmazta a transzportált szubsztátot is- 4 mM ATP jelenlétében és hiányában 37°C -on inkubáltuk, majd hideg mosópufferrel leállítottuk. A reakcióelegyeket $1\ \mu\text{m}$ porusméretű B típusú üvegszál szűrőt tartalmazó lemezekken (Millipore, Bedford, MA, USA) szűrtük, mostuk. A filtereken maradt radioaktivitást folyadékszintillátor (Microbeta Trilux, Wallac, Turku, Finnország) vagy fluoriméter segítségével mértük.

Sejtes esszék

Influx esszé

A mérőlemezre kiültetett a sejtekhez lyukanként $50\text{--}50\ \mu\text{l}$ szubsztátot próbát valamint gátlószert vagy tesztanyagot tartalmazó reakcióelegyet adtunk. A reakciót hideg puffer hozzáadásával állítottuk le. Ezt követően zsebenként a sejteket $50\ \mu\text{l}$ NaOH vagy MeOH

hozzáadásával 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 quadrupole rendszerű tömegspektrométer detektor (MSD) van sorbakötve (Agilent Technologies International SARL, Morges, Switzerland).

Vektoriális transzport esszé

Sejtvonalakon

Az MDCKII alap és transzfektált sejteket 24-lyukú Millipore monolayer lemezre ültettük és 3 napig inkubátorban tartottuk. A Caco-2 sejteket (30-65 passzázs szám) kollagénnel bevont membránra ültettük és 21 napig inkubátorban tartottuk. A vizsgált anyagokat DMSO-ban oldva adtuk a sejtekhez, és mértük az A>B és B>A irányú anyagmozgást. A vizsgált anyag- vagy a referencia anyag koncentrációját fluoriméterrel, folyadéksztillátorral vagy LC-MS-sel. A kérdéses anyag látszólagos permeabilitási együtthatóját az alábbi egyenlet alapján számítottuk:

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

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.

Hepatocytá szendvics kultúrán

A hepatocytákat patkány farokból nyert I típusú kollagénnel kezelt Petri csészékbe ültettük. 24 órával később a tápfolyadékot eltávolítottuk, és a sejtekre patkány farokból nyert jéghideg, neutralizált I típusú kollagént rétegeztünk. A patkány sejteket 2 nap a humán sejteket 5 nap szendvics kultúrában való kultiválás után használtuk. A hepatocytákhoz jelölt szubsztát próbát adtunk HBSS-ben, majd 10 percig inkubátorban tartottuk. Ezután a puffert eltávolítottuk, a sejteket jéghideg Ca^{2+} , Mg^{2+} -mentes HBSS-el mostuk. Majd 0,5 ml, a modulátort tartalmazó standard vagy Ca^{2+} , Mg^{2+} -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.

Primer patkány agyi endothel kultúrán

Az RBEC (rat brain endothelial cell / patkány agyi endothel) 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.

Festéktranszport esszé

Calcein esszében az ABCB1 funkció méréséhez ABCB1-et túlexpresszázó K562-MDR, MDCKIIMDR1 míg az ABCC1 funkció méréséhez 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. A calcein-AM az ABCB1 és ABCC1 transzporterek szubsztátja. A transzportereket túlexpresszázó 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 (Homolya 1993).

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 túlexpresszálo 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-lukú lemezre és Hank's oldatban inkubáltuk a specifikus inhibitor/vizsgált anyag jelenlétében. A calcein esszénél 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 alábbi egyenlet alapján határoztuk meg.

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

ahol az R_{drog} az aktuális tesztanyag adott koncentrációjához jelöli, az R_{alap} a gátlószer nélküli kontrollhoz, az R_{max} pedig a maximális gátláshoz tartozó fluoreszcencia-idő meredekséget jelölik. Az R_{max} értékeket referencia inhibitorokkal állapítottuk meg, ez Calcein esszénél verapamil (60 μM), Hoechst esszénél Ko134 (300 nM) volt. A gátlás% - bemérési koncentráció görbére függvényt illesztettünk, amiből IC_{50} értékeket kaptunk.

Citotoxicitás esszé

A mikrotiter lemezre kiültetett sejtekhez a DMSO-ban oldott molekulákat adtuk. A 96 óra elteltével az élő sejtek arányát MTS reakció segítségével határoztuk meg a gyártó protokollja alapján (Promega, Madison, WI, USA), és meghatároztuk az IC_{50} értékeket.

A görbeillesztésekhez, valamint a kinetikai paraméterek számításához a PRISM szoftvert használtuk (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

In vivo esszék

Epevezeték kanulációs technika alkalmazása a kanalikuláris efflux transzportereken történő gyógyszer interakciók vizsgálatára

A 250-300 g-os Wistar hím patkányokban a kísérleti nap reggelén urethan altatás (1 g/kg; intraperitoneálisan (ip)) mellett elkülönítettük az epevezetékét és bevezettük a kanült (Fine Bore Polythene Tubing 800/100/200; Smiths Medical Int. Ltd.). A sikeres epevezeték kanulálást követően az állatok intraperitoneálisan fiziológiás sóoldatban kapták a transzporter szubsztrátot ($^3\text{H-E2-17}\beta\text{G}$) és különböző transzporter modulátorokat. A minták gyűjtése előre lemerített csövekbe történt. A minták $^3\text{H-E2-17}\beta\text{G}$ szintjét folyadéksztillációs számláló segítségével határoztuk meg. A nyers adatokból az epemintákban lévő jelzett szubsztrát radioaktivitását (dpm/mg epe), a szubsztrát kumulatív exkrécióját (dózis %-ban), illetve az epefolyás sebességét (mg/10 perc) határoztuk meg. Valamennyi műtéti és kezelési eljárás az MTA Központi Kémiai Kutatóintézetének Állatetikai Bizottsága jóváhagyásával került alkalmazásra.

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

A kísérleteket az Állategészségügyi Igazgatóság által kibocsájtott hatósági engedély alapján végeztük. A 280-360 g-os Wistar hím patkányokon két-szondás mikrodialízis technikát alkalmaztunk klorál hidráttal altatott állatokon. Egyidejűleg gyűjtöttünk perifériás (véna jugularis) és agyi (frontális cortex) mintákat. A jobboldali nyaki vénába CMA/20-as (CMA, Microbiotech) típusú perifériás mikrodialízis szondát ültettünk be, a frontális kortexbe pedig CMA/12-es az agyi mikrodialízis szondát helyeztünk be.

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 kortexbe is beültettünk egy agyi mikrodialízis szondát. A retrodialízis technika segítségével lehetővé válik egy-egy transzporter szubsztrát agyi penetrációjának összehasonlító vizsgálata két ellenoldali félteke esetén.

Az altatott állatos kísérleteknél a transzporter szubsztráttal és az inhibitorral való kezelés a combvénába elhelyezett kanülön keresztül történt. A retrodialízis kísérletekben az inhibítort és annak vehikulumát a perfúziós folyadékkal juttattuk az adott agyterületbe. Az agyi szondákat mesterséges cerebrospinális folyadékkal (CSF), a véna jugulárisban elhelyezett szondákat pedig perifériás folyadékkal (PPF) perfundáltuk CMA 102 microdialysis pumpa segítségével.

A dializátum minták quinidin koncentrációinak meghatározása HPLC-vel kombinált fluoreszcens detektorral történt. Meghatároztuk a görbe alatti területeket (AUC) is.

Az egyes kísérleti csoportokból származó AUC, C_{max} és AUC_{agy}/AUC_{vér} 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.

6 Eredmények és megbeszélés

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. 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 Solvo-nál 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.

6.1 Expressziós rendszerek optimalizálása gyógyszer – transzporter kölcsönhatások vizsgálatára¹

(Glavinas 2007; Pal 2007a; Pal 2007b; Glavinas 2008; Kis 2009a; Kis 2009c; Kis 2011)

Az ABC transzporterek esetében használt baculovírus – rovarsejt expressziós rendszer előnye, 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).

Saját eredményeink megerősítik, hogy a humán sejtekre jellemző glikoziláció nem játszik szerepet az ABCG2 fehérje aktivitásában (Pal 2007a). Ugyanakkor, a koleszterin jelentős hatással volt a transzporter aktivitására úgy az ATPáz, mint a vezikuláris transzport mérésekben (Glavinas 2007; Pal 2007a). A koleszterinnel dúsított MXR-Sf9 membránok ATPáz aktivitása megnőtt, a koleszterin-depletált MXR-M membránoké pedig lecsökkent (Pal 2007a). Az ATPáz aktivitás változással analóg transzport aktivitás változást is detektáltunk (Pal 2007a). A transzporter szubsztrátok iránti affinitására utaló EC_{50} és K_m értékek nem változtak lényegesen.

Az ABCG2 fehérjéhez hasonlóan az ABCB11 fehérje, a hepatocyták kanalikuláris membránjában expresszáldó, epesó transzportért felelős fehérje is koleszterin-függő transzport aktivitást mutatott. A humán, patkány és egér ABCB11/Abcb11 ortológok egyaránt megnövekedett transzportsebességet mutattak a koleszterinnel feltöltött BSEP-HAM / Bsep-HAM membránban (Kis, 2009a). Az koleszterin szint jelentős hatással volt az ABCB11/Abcb11 transzporterek aktivitására, viszont semmilyen trend nem volt megfigyelhető a K_m értékekben. 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 μ M szemben a 2,0 μ M-al).

Az egér Abcb11 transzporter aktivitása megengedi, hogy a szubsztrát stimulálta ATPáz aktivitás is mérhető legyen (Noe 2001). Az egér Abcb11-et expresszálo Sf9 sejtekből izolált membrán koleszterinnel való feltöltése csökkentette az alapaktivitást, és növelte a szubsztrát indukálta aktivitást. A két hatás eredőjeként egy szűrésre alkalmas tesztet nyertünk.

Összefoglalva, azt találtuk, hogy a koleszterin két, a koleszterin gazdag raft/caveola mikrodoménekben gazdag apikális membránban elhelyezkedő transzporter aktivitását is stimulálja. Eredményeink összhangban vannak mások eredményeivel az ABCG2 (Telbisz 2007) és a ABCB11/Abcb11 (Paulusma 2009) vonatkozásában. Publikációinkat követően igazolódott, hogy az ABCG2 (Storch 2007) és az ABCB11/Abcb11 (Ismair 2009; Paulusma 2009) is koleszterin gazdag mikrodoménekben található, és az ABCG2 caveolin-1-el asszociálódik (Storch 2007). Megfigyeléseinkre épülő szabadalmunkat Európában és az Egyesült Államokban már megadták. A szabadalom oltalmat biztosít egy új termékláncnak (High-Activity Membrane (HAM)). Továbbá, az Abcb11 ATPáz-ra építve egy nagy áteresztőképességű (High Throughput (HT)) nem-radioaktív tesztet is kidolgoztunk BSEP-gátló, tehát potenciálisan kolesztatikus vegyületek kiszűrésére.

¹ A kollaboráló partnerek a ciklodextrin komplexeket állították elő. A biokémiai/farmakológiai mérések a Solvonál történtek.

6.2 Transzporter szubsztrát próbák és referencia inhibitorok validálása in vitro ADME vizsgálatok céljára

(Heredi-Szabo 2008; Kis 2009b; von Richter 2009; Beery 2011; Glavinas 2011; Szeremy 2011)

Mivel az ABC efflux transzportereknek két egymással kapcsolt aktivitásuk (transzport és ATPáz) van, így szubsztrátok azonosítására mindkét esszé típus számításba jöhet. Avezikuláris transzport esszé szubsztrát esszéként való felhasználása limitált a nagyon alacsony passzív permeabilitású anyagokra. A vektoriális transzport esszé a legelterjedtebb a gyógyszeriparban.

A transzporter gátlás esszék a potenciális gyógyszerkölsönhatásokat 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 predikciót lehessen tenni. Az ABCB1 transzporterre digoxin a konszenzusos szubsztrát próba (Giacomini 2010). ABCG2 transzporterre 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 specificitás szűrés alapján a legjobb jelöltnek a chlorothiazid, a teriflunomid és a topotecan tűnnek. Az első két vegyület ABCG2 kölcsönhatását karakterizáltuk.

A chlorothiazid szelektív ABCG2 kölcsönható. A két másik, apikális membránokban koexpresszáldó transzporterrel, az ABCB1-el és az ABCC2-vel nem hat kölcsön (Beery, 2011), és az ABCC4-hez is kisebb az affinitása, mint az ABCG2-höz. A molekula alacsony passzív permeabilitású, így transzportja vezikuláris transzport esszéiben is mérhető (K_m (334,6), és az ABCG2 ATPáznak jó aktivátora. Az ABCG2 transzfektáns MDCKIIBCRP sejteken az MDCKII-re korrigált efflux arány 36 (Beery, 2011). Caco-2 sejteken is vektoriálisan transzportálódik a chlorothiazid. A 8,1-es effluxarány az ABCG2-re specifikus Ko143 jelenlétében 1,4-re csökken. A chlorothiazid az összes *in vitro* ABCG2 esszéiben alkalmazható szubsztrát próba, és igen mérsékelt a felszívódása (Fa 20-50%). Ahhoz, hogy legitim szubsztrát próbává váljon igazolni kell, hogy az ABCG2 c.421C>A allélt hordozó betegekben magasabb az expozíció.

A teriflunomid és profarmakonja a leflunomid is specifikus ABCG2 kölcsönható (Kis 2009b). Mindkét gyógyszer aktiválta az ABCG2 ATPázt, de nem mutatott kölcsönhatást az ABCB1 ATPázzal (Kis, 2009b). Az ABCG2 ATPáz aktiválás jelezte, hogy a leflunomid és teriflunomid szubsztrátjai a transzporternek. ABCG2-vel transzfektált HEK sejtek segítségével azt is igazoltuk, hogy az ABCG2 magas expressziója rezisztenciát indukál úgy a leflunomiddal mint a teriflunomiddal szemben. 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).

Nagy áteresztőképességű rendszerekhez előszeretettel alkalmaznak fluoreszcens szubsztrátokat. A Calcein esszéiben alkalmazott calcein-AM ABCB1 (Homolya 1993) és ABCC1 szubsztrát (Hollo 1998). Az esszé ideális HT tesztrendszer, amit a gyógyszeriparban is sokan tanulmányoztak (Polli 2001; Rautio 2006; Cook 2010). 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 expresszáldó sejtvonaltól is. Az ABCB1 expresszió az MDCKIIMDR1 > K562MDR > HCMEC/D3 sorrendben csökkent.

A calcein-AM-nek mint szubsztrát próbának előnye, hogy sejtes és membrán esszéekben is alkalmazható. A tendencia az, hogy a kevésbé lipofil molekulák vezikuláris és sejtes esszében meghatározott IC_{50} értékei jobban különböznek egymástól, mint a magasabb lipofilcítással rendelkező molekulák megfelelő értékei (Szeremy 2011).

A harmadik fontos, apikálisan expresszáldó ABC transzporter az ABCC2. Az ABCC2 többek között fázis II konjugátumokat transzportál. Bizonyos szubsztrátok a komplex kinetikájával transzportálódnak (Zelcer 2003; Heredi-Szabo 2009a). Ezek a sajátságok előnytelenek egy HT gátlás esszéiben való felhasználásban. A leukotrién C_4 ABCC2 általi transzportja Michaelis-Menten típusú kinetikát követ, nem jelenik meg a potenciózás jelensége (Gao 1998; Chen 1999). A leukotrién C_4 azonban kémiaiilag instabil. Helyette, HT szűrőteszt munkához a karboxy-dichloro-fluoreszcein (CDCF) használható. A CDCF Michaelis-Menten típusú telítési görbét ad, és esetében sem figyelhető meg a potenciózás jelensége. A kapott IC_{50} értékek korrelálnak az irodalomban fellelhető adatokkal (Heredi-Szabo 2008). Ismert ABCC2 szubsztrátok és gátlószerek esetében a K_i értékek sorrendje mindkét szubsztrát próba esetén azonos.

6.3 *In vitro* esszérendszerek alkalmazása transzporter – gyógyszer kölcsönhatások kinetikai jellemzésére ²

(Lespine 2006; Jani 2009; Lespine 2009; Rajnai 2010; Jani 2011)

A seliciclib második generációs ciklin-függő kináz gátlószer (Meijer 2006). *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 (Vita 2005; Sallam 2008). *In vitro* eszközök segítségével azt vizsgáltuk, hogy mely efflux transzporter felel a limitált BBB penetrációért.

Vizsgálataink azt mutatták, hogy a 4 potenciálisan érintett efflux transzporter közül a seliciclib csak az ABCB1-et aktiválta 4,2 μM -os EC_{50} értékkel (Rajnai 2010). Az ABCB1-el való kölcsönhatás mintegy 8-as efflux arányhoz vezetett az MDCKII-MDR1 sejtvonalon végzett kétirányú vektoriális transzport mérésekben. Vizsgálataink alapján elmondható, hogy a csökkent *in vivo* BBB permeabilitás valószínűleg az ABCB1/Abcb1a kölcsönhatásnak köszönhető.

Az ivermectin, a makrociklusos laktonok csoportjába tartozó parazitaellenes szer, klasszikus ABCB1 szubsztrát. Az ivermectin szerkezetéből adódó flexibilitás és az ABC transzporterek átfedő szubsztrátspecifitása megengedi, hogy a molekula további ABC transzporterekkel is kölcsönhatásba kerüljön. Vizsgálataink azt mutatták, hogy az ivermectin a humán ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3 (Lespine 2006) és ABCG2 (Jani 2011), fehérjéket alacsony mikromólos tartományban gátolja (Lespine 2009). Az ABCB1 után legpotensebb kölcsönhatást az ABCG2-vel láttuk. Az ABCG2 mediált ösztron-3-szulfát transzportot az ivermectin nem-kompetitíven a Dixon ábrázolás szerint 1,4 μM -os K_i értékkel gátolja (Jani 2011). A 150 $\mu g/kg$ 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 (FDA-Guidance 2012).

A sulfasalazin nagyon alacsony passzív permeabilitású molekula (von Richter 2009). Az alacsony passzív permeabilitású anyagok efflux transzporterekkel való kölcsönhatásának

² Az ABCB1 és ABCC1 ivermectin kölcsönhatást vizsgáló festéktranszport vizsgálatokat a kollaboráló partner végezte. Az ivermectinnel végzett ATPáz és VT esszé és az összes sulfasalazinnal végzett vizsgálat a Solvonál készült.

vizsgálatára a VT alkalmazható, amit ma már a gyógyszerhatóságok is ajánlanak (Zhang 2009; Giacomini 2010). A VT ABCG2-t túlexpresszázó membránokon végzett vizsgálataink igazolták, hogy a transzporter nagy affinitással ($K_{m,pH7,0} = 0,70 \pm 0,03$) transzportálja a sulfasalazint (Jani 2009). 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.

6.4 *In vitro* esszérendszerek alkalmazása növényi hatóanyagok és környezetszennyező anyagok transzporterekkel való kölcsönhatásának azonosítására és jellemzésére³

(Williamson 2007; Zhang 2007a; Brand 2011; Wong 2011; Zhang 2011)

A baicalein a tradicionális kínai gyógynövény, a *Scutellaria baicalensis* gyökerének egyik fő flavonoidja (Homma 1997). Humán Caco-2 sejtekben két metabolitja a baicalein glükuronid és a baicalein szulfát keletkezik. A glükuronid konjugátum az apikális és a basolateralis membránokon át is szekretálódik (Zhang 2007a). A szulfát konjugátum szinte kizárólag az apikális oldalon jelenik meg (Zhang 2007a). 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 μ M-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 μ M-os baicalein koncentrációnál volt szignifikáns aktiválás ($26,00 \pm 1,54$ %)

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a baicalein-glükuronid basolateralis transzportjáért és egyben abszorpciójáért az ABCC3 fehéreje a felelős, míg az apikális, szekretorikus transzportban az ABCC2 és az ABCG2 fehéreje is részt vehet.

Korábbi vizsgálatok 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). A baicalein glükuronid intravénás adásakor az ABCC és ABCG2 inhibitor MK571 valamint az ABCC2 és SLCO inhibitor probenecid is szignifikánsan csökkentette a baicalein-glükuronid biliáris exkrécióját és növelte a plazma AUC értéket (Zhang, 2011). 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. 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.

A hesperetin a narancsfélék fő flavonoidjának, a hesperidinnek (7-O-rutinozid-hesperetin) 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). Korábbi vizsgálatok azt találták, hogy Caco-2 sejtekben apikálisan a hesperetin-7-O-glükuronid szekretálódik (Brand 2008).

³ A baicaleinnel és származékaival végzett *in vivo* és caco-2 vizsgálatok a kollaboráló partnernél, míg a transzporter specifikus efflux és influx vizsgálatok a Solvonál készültek. A hesperetin glükuronidjaival végzett vizsgálatok a Solvonál készültek. A hidroxi-fahéjsav és konjugátumaival végzett munkák döntő részét kiadó influx transzporter kísérleteket a kollaboráló partner, míg az efflux transzporter munkát a Solvo végezte.

Ugyanakkor, enterocytaból nyert mikroszómákkal történő inkubálás hatására jelentős mennyiségű hesperetin-3'-O-glükuronid is keletkezett. *In vivo* is ez a két glükuronid keletkezik (Mullen 2008). A számbajövő transzporterek az enterocytaban apikálisan elhelyezkedő ABCC2 és ABCG2 valamint a basolateralis membránban expresszáldó ABCC3. A hesperetin-7-O-glükuronid midhárom transzporter ATPáz aktivitását stimulálta. A hesperetin-3'-O-glükuronid nem aktiválta az ABCG2 ATPázt. Mindkét glükuronid kiváló aktivátora volt az ABCC3 ATPáznak. A hesperetin-7-O-glükuronid a control szubsztát próbánál 2,5-ször, míg a hesperetin-3'-O-glükuronid 3,5-ször magasabb ATPáz aktivitást indukált az ABCC3 ATPáz esszéiben. Mindez azt sugallja, hogy az ABCC3 fontos szerepet játszhat a glükuronidok abszorpciójában.

Hidroxi-fahéjsavak természetes antioxidánsok, melyek nagy mennyiségben találhatók gyümölcsökben, zöldségekben, kávéban (Tomas-Barberan 2001). Emberi plazmában a hidroxi-fahéjsavak elsősorban 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). Megvizsgáltuk, hogy szerepet játszhatnak-e a vese anion transzporterei a hidroxi-fahéjsavak és származékaik renális szekréciójában. A vesében a renális szekrécióban a basolateralisan 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.

A kávésav és metilétere, a ferulinsav, valamint dihidro származékaik az SLC22A6 szubsztátjainak bizonyultak HEK-293 transzfektánsokon történt mérésekben, míg az izoferulinsav nem bizonyult szubsztátnak. A kávésav és telített származéka a dihidro-kávésav az SLC22A8 transzporternek is szubsztátja. Érdekes szelektivitás volt megfigyelhető a konjugátumok vonatkozásában. A szulfát konjugátumok elsősorban az SLC22A6 és kisebb mértékben az SLC22A8 által kerültek felvételre a transzfektánsokban, míg a glükuronid konjugátumok transzporter preferenciája ennek a fordítottja volt. Bár a nem konjugált hidroxi-fahéjsavak esetében is láttunk transzport aktivitást, ez a transzportsebesség lényegesen alacsonyabb volt, mint a konjugátumoké. Különösen igaz ez a fiziológiás koncentrációknál (<5 μM) mért értékekre. Az apikális membránban lokalizáldó ABC transzporterek közül a konjugátumok transzportjáról ismert ABCC2 és ABCG2 ATPáz alapaktivitását nem stimulálták sem a konjugátatlan sem a konjugált hidroxi-fahéjsavak. Érdekes módon, ugyanakkor néhány szulfát konjugátum transz-stimulálta az SLC22A11 transzportert, tehát ez a transzporter bizonyos szulfát konjugátumok esetében apikális efflux transzporterként működhet (Wong, 2011).

A táplálékban környezetszennyező anyagok is találhatók, aminek egy részét alkotják a peszticidek. A környezetszennyező anyagok nagy száma és a jelölt molekulák hiánya miatt az ATPáz tesztek az ideális HT szűrőtesztek szubsztátokra. A lespecifikusabb kölcsönhatásokat a klóracetanilid herbicidek és az ABCB1 között detektáltuk (Oosterhuis, 2008). A 7 vizsgált molekulából 4 aktiválta az ABCB1 ATPázt 10-100 μM közötti EC_{50} értékekkel. A konjugátumok egyike stimulálta az ABCC1 ATPázt, és vezikuláris transzport esszéiben $23,8 \pm 2,6 \mu\text{M}$ K_m értéket állapítottunk meg a kölcsönhatásra. A humán populáció szempontjából előnyös, ha egy környezetszennyező anyag szubsztátja 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.) is kevésbé szívódnak fel ezek a vegyületek, azaz a fajok rezisztensek lesznek. Tehát, a szubsztát specifitátsábeli különbségeket leíró keskeny sáv az a kémiai tér, ahol az optimális tulajdonságokkal rendelkező peszticideket keresni kell.

6.5 In vitro vizsgálatok in vivo relevanciájának bemutatása. In vitro – in vivo korrelációs és fajspecifitász vizsgálatok⁴

(Heredi-Szabo 2009a; Heredi-Szabo 2009b; Jemnitz 2010; Wong 2010; Sziraki 2011)

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.

Az ABCC2/Abcc2 fehérje komplex, nem Michaelis-Menten kinetikával transzportál ösztradiol-17 β -glükuronidot (E2-17 β -G) (Bodo 2003; Zelcer 2003; Gerk 2004; Borst 2006; Zimmermann 2008; Heredi-Szabo 2009a). Szubsztrátok és modulátorok is potenciózták az E2-17 β -G transzportját (Bodo 2003; Zelcer 2003; Gerk 2004; Borst 2006; Zimmermann 2008; Heredi-Szabo 2009a). A potenciózó hatás a legtöbb esetben vezikuláris transzport tesztben került demonstrálásra. A mi vizsgálataink célja kettős volt: i) összehasonlítani a humán és a patkány transzportert a potenciózás vonatkozásában nemcsak vezikuláris transzportban, hanem hepatocytá szendvics kultúrában is, és ii) vizsgálni, hogy a potenciózás jelensége megfigyelhető-e patkányban *in vivo*. Mindkét transzporter esetében megfigyelhető volt a potenciózás jelensége több gyógyszer (benzbromaron, indomethacin, probenecid és sulfasalazin) által is. A jelenség függött a szubsztrát póba, a E2-17 β -G koncentrációjától. Míg 1 μ M E2-17 β -G mellett jelentős potenciózást láttunk, addig 50 μ M E2-17 β -G mellett jobbára gátlás volt megfigyelhető. Primer hepatocyták két kollagén réteg között tenyésztve polarizálódnak, kialakulnak az epecsatornák, és a biliáris transzport tanulmányozható (Swift 2010). A potenciózás jelenségét ezekben a rendszerekben is megfigyeltük az összes vizsgált gyógyszer-molekulára úgy a patkány mint a humán kultúrában. A potenciózást patkányban *in vivo* is megfigyeltük. Az indomethacin 5 mg/kg-os dózisban 40%-al (104,8 percről 60,9 percre) csökkentette a E2-17 β -G félezési idejét. A benzbromaron hatása dóziszfüggő, a probenecid hatása bimodális volt. Elmondható tehát, hogy az ABCC2/Abcc2 mediált E2-17 β -G transzport potenciózásának jelensége megfigyelhető primer hepatocytákon és *in vivo* is. Továbbá, kijelenthető, hogy a vezikuláris transzport alkalmas mechanisztikai vizsgálatokra (Heredi-Szabo 2009b; Jemnitz 2010).

A vér–agy gát vizsgálatára 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. 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 expresszáldó Abcb1a funkció megakadályozza a quinidin szabad ekvibrációját, ami $0,32 \pm 0,11$ AUC_{agy}/AUC_{vér} arányhoz vezet (Sziraki 2011). A C_{max,agy} / C_{max,vér} arány $0,34 \pm 0,06$. A specifikus ABCB1 inhibitor PSC833 2X2 mg/kg dózisban közel 4-szeresre

⁴ Az ABCC2 vizsgálatoknál az *in vivo* és a szendvics kultúrák kísérleteket a kollaborációs partner, a membrános méréseket pedig a Solvo végezte. Az ABCB1 vizsgálatoknál a patkány agyi endothel munkát a kollaborációs partner, míg a többi membrános és sejtes munkát valamint az *in vivo* vizsgálatokat a Solvo végezte.

($AUC_{\text{agy}}/AUC_{\text{vér}} = 1,34 \pm 0,31$; $C_{\text{max,agy}} / C_{\text{max,vér}} 1,25 \pm 0,34$) növelte az arányokat. Hárompróbás retrodialízis kísérletet is végeztünk, ahol az intravénásan adott quinidin mellett (5 mg/kg) a bal frontális cortexbe helyezett mikro-dialízis 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. Elmondható tehát, hogy a quinidin és PSC833 alkalmas szubsztrát és referencia inhibitor páros vér-agy gát ABCB1/Abcb1a funkció tesztelésére.

7 Új megállapítások, gyakorlati hasznosítás

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 használható gyógyszermolekulák, növényi hatóanyagok, környezetszennyező anyagok transzporterekkel való kölcsönhatásának jellemzésére, és ADMETox sajátosságainak megértésére, valamint (iii) *in vitro* – *in vivo* korrelációs vizsgálatok végzése.

Új eredményeink:

- 1., Megmutattuk, hogy az apikálisan expresszáldó 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_{50} adatoknak.
- 5., Kidolgoztunk és szabadalmaztattunk egy fluoreszcens VT esszét ABCB1 transzporter gátlásának vizsgálatára.
- 6., Azt találtuk, hogy különböző sejtes rendszerekben mért IC_{50} 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 teriflunomidről azóta kiderült, hogy ABCG2-függő farmakokinetikája van, javasoljuk a teriflunomidet 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 basolateralis abszorptív transzportjáért.

11., Azt találtuk, hogy a baicalein-glükuronid biliáris exkréciójában a hepatocyták sinusoidális membránjában lokalizálódó influx és a kanalikuláris membránban található ABCC2 és ABCG2 efflux transzporterek vesznek részt. A baicalein glükuronid SLCO influx transzportereken való profilrozása 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 (organic anion transporter (OAT)) transzporterekkel. Azt találtuk, hogy a konjugátlan 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 basolateralis oldalon a renális szekrécióért. Az apikális exkrécióban az ABCG2 és ABCC2 transzportereket teszteltük, és nem találtunk számottevő kölcsönhatást. Ezzel szemben néhány szulfát konjugátum transz-stimulálta az SLC22A11 mediált influx aktivitást, tehát elképzelhető, hogy az SLC22A11 résztvesz ezen szulfát konjugátumok szekretórikus transzportjában.

14., Megmutattuk, hogy a klóracetanilid herbicidek jelentős része aktiválja a humán ABCB1 ATPázot, 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 megfigyelhető 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.

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.

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 akademikustól, 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 Ürge László, a Comgenex vezérigazgatója és Dr Szilbereky 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 A disszertációban tárgyalt *in extenso* saját 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, Ioja 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**, Orlowski 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, Ioja 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, Molnar E, Janossy J, Ujhellyi O, Nemet K, Heredi-Szabo K, **Kraicsi 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, Ioja E, Nagy T, Szente L, Heredi-Szabo K, **Kraicsi 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, **Kraicsi 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, Ioja E, Jánossy J, Vereczkey L, **Kraicsi 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, **Kraicsi 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, Gyorfí 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 transzporterek-kulonos tekintettel az ABCG2-re-es gyogyszerjelolt molekulak: kolcsonhasasanak 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

10 A kandidátusi disszertáció megvédése után megjelent *in extenso* saját 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, Glavinas H, **Kraicsi 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, **Kraicsi P**, Puskás L, Kovári Z, Lőrincz Z, Ürge L, Darvas F
Recent Advances in Chemical Genomics.
FRONTIERS IN MEDICINAL CHEMISTRY 3: pp. 503-550. (2006)
- Ying BL, **Kraicsi 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, **Kraicsi 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
- GLAVINAS 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, **Kraicsi 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, **Kraicsi 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, Ürge L, **Kraicsi P**, Simonyi M
Enantioselective plasma protein binding of bimecizolol.
CHIRALITY 14: pp. 638-642. (2002)
IF: 1.575
- Lichtenstein DL, **Kraicsi 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, **Kraicsi 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, **Kraicsi 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, **Kraicsi 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, Üрге L, **Kraicsi 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, **Kraicsi 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, **Kraicsi 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, **Kraicsi P**, Üрге 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

11 Referenciák

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.

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.

- 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*.
- 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. Mocsa, 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, K. van de Wetering and B. Poolman (2006). "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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Dean, M., Y. Hamon and G. Chimini (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." *J Lipid Res* **42**(7): 1007-1017.
- 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.
- 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.
- FDA-Guidance. (2012).
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM292362.pdf>.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>.
- <http://www.bioparadigms.org/slc/menu.asp>.
- <http://www.drugs.com/>.
- 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.
- 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.

- 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. Iojá, L. Vereczkey and P. Krajcsi (2010). "ABCC2/Abcc2: a multispecific transporter with dominant excretory functions." *Drug Metab Rev* **42**(3): 402-436.
- 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.
- Kis, E., E. Iojá, 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. Iojá, 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. Iojá, 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.
- Lespine, A., J. Dupuy, M. Alvinerie, C. Comera, T. Nagy, P. Krajcsi and S. Orlowski (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. Orlowski, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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., 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.
- Tang, S. N., J. Fu, S. Shankar and R. K. Srivastava (2012). "EGCG enhances the therapeutic potential of gemcitabine and CP690550 by inhibiting STAT3 signaling pathway in human pancreatic cancer." *PLoS One* **7**(2): e31067.
- Telbisz, A., M. Muller, C. Ozvegy-Laczka, L. Homolya, L. Szenté, 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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