

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**ABC GEN FAMİLYASINA DAHİL OLAN BCRP1 VE MRP2
TAŞIYICI PROTEİNLERİNİN, ANTİKANSEROJEN BİR İLAÇ
OLAN METOTREKSATIN FARMAKOKİNETİĞİNDEKİ
ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

ZELİHA PALA

**DANIŞMAN
PROF. DR. GÜL BAKTİR**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2009

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

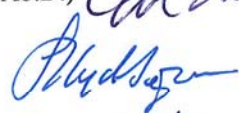
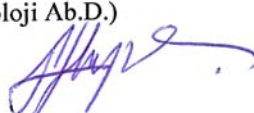
12 / 01 / 2010


Prof. Dr. Tamer DEMİRALP
Enstitü Müdürü (vekl.)

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Farmakoloji
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
Anabilim Dalı : Farmakoloji
Tez Sahibi : Zeliha Pala
Tez Başlığı : ABC gen familyasına dahil olan Bcrp1 ve Mrp2 taşıyıcı proteinlerinin, antikanserojen bir ilaç olan metotreksatın farmakokinetiğindeki rolünün incelenmesi
Sınav Yeri : İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakoloji A.B.D.
Sınav Tarihi : 25 / 12 / 2009

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Gül Dülger Ayanoglu (Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ab.D.) 
2. Prof. Dr. Gül Baktır (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ab.D.) 
3. Prof. Dr. Sönmez Uydeş Doğan (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ab.D.) 
4. Prof. Dr. Buket Alpertunga (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Ab.D.) 
5. Yard.Doç.Dr. Alper Okyar (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ab.D.) 

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Zeliha Pala

İTHAF

Sevgili Aileme ve Saygıdeğer Hocalarıma itafen...

TEŞEKKÜR

Asistanı olduğum ilk günden bu yana bana olan desteği ve güveni ile akademik gelişimime büyük katkıları olan, değerli tecrübelerini paylaşarak bilimsel çalışmalarında bana yol gösteren, beni her konuda ilgi ve sabırla dinleyen Değerli Danışman Hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Gül Baktır'a,

Farmakoloji Anabilim Dalın'da çalıştığım süre boyunca gerek akademik gerekse manevi desteğini ve ilgisini yakinen hissettiğim Sayın hocam Prof. Dr. Sönmez Uydeş Doğan'a,

Akademik ve meslek hayatıma yön veren, manevi desteğini hep yanımda hissettiğim değerli Hocam Prof. Dr. Osman Özdemir'e

Araştırma laboratuvarında bana çalışma fırsatı veren, bilimsel gelişimime önemli katkılar sağlayan Hollanda Kanseri Enstitüsü, Deneysel Tedavi Bölümü'nün değerli Öğretim Üyesi Dr. Alfred Schinkel'e, tez çalışmalarında bana destek olan Dr. Marijn Vlaming ve Dr. Olaf van Tellingen'e,

Bilimsel çalışmalarım boyunca tecrübelerini benimle paylaşan, manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli çalışma arkadaşım Yard. Doç. Dr. Alper Okyar'a,

Doktora tez çalışmam boyunca değerli tecrübelerini benimle paylaşan Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gül Dülger Ayanoğlu'na,

Doktora eğitimimde dostluklarıyla bana her konuda destek olan değerli arkadaşlarım Yard. Doç. Dr. Gökçe Topal Tanyılmaz, Yard. Doç. Dr. İlkey Alp, Yard. Doç. Dr. Selçuk Takır, Araş. Gör. Dr. Deniz Kaleli Durman, Araş. Gör. Nihan Çarçak, Sevgi Özaşçı ve Erdal Doğan'a,

Yaşamımın her dönemimde beni destekleyen, bana olan inançlarını ve güvenlerini her zaman hissettiğim değerli aileme ve bu zorlu süreçte bana destek olan Op.Dr. Halil Kara'ya,

Hollanda Kanseri Enstitüsü'nde çalışmalarım sürecince beni destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığına,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM...

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XIV
ÖZET	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. ABC Taşıyıcı Proteinleri.....	4
2.2. ATP Taşıyıcı Proteinlerinin İlaç Transportundaki Rollerinin Değerlendirilmesinde Kullanılan Deneysel Modeller	12
2.2.1. <i>In vitro</i> Yöntemler ve Modeller	12
2.2.1.1. Sitotoksisite Değerlendirme Testi	12
2.2.1.2. Hücrel Akümülayon	12
2.2.1.3. Transsellüler Taşınma	13
2.2.1.4. ATPaz Aktivite Ölçümü.....	14
2.2.1.5. Veziküler Taşınma	14
2.2.2. <i>In vivo</i> Modeller.....	15
2.2.2.1. Taşıyıcı Genetik Knock-out Fare veya Doğal Mutant Hayvanlar	15
2.3. Meme Kanseri Rezistans Proteini (BCRP)	16
2.3.1. BCRP'nin Lokalizasyonu	17
2.3.2. Kök Hücrelerdeki BCRP/Bcrp1 Ekspresyonu	21
2.3.3. BCRP'nin Kanserdeki Klinik Önemi.....	22
2.3.4. BCRP substratları.....	29
2.3.5. BCRP İnhibitörleri	29
2.3.6. ABGC2 Geni Silinmiş Farelerde Yapılan Çalışmalar	32

2.3.7. Klinik Çalışmalar	39
2.3.8. BCRP'nin Genetik Polimorfizmi	39
2.4. Çoklu İlaç Rezistansı İlişkili Protein (Multidrug Resistance Associated Protein; MRP).....	41
2.4.1. Çoklu İlaç Rezistansı İlişkili Protein-1 (MRP1)	41
2.4.2. MRP3	42
2.4.3. MRP4	42
2.4.4. MRP2	42
2.4.4.1. MRP2'nin Lokalizasyonu	43
2.4.4.2. MRP2'nin substratları	45
2.4.4.3. MRP2 İnhibitörleri	46
2.4.4.4. ABCC2 Geni Silinmiş Farelerde Yapılan Çalışmalar.....	47
2.4.4.5. MRP2'nin Genetik Polimorfizmi	49
2.5. Metotreksat (MTX).....	50
2.5.1. Etki Mekanizması	51
2.5.2. Farmakokinetik Özellikleri	51
2.5.2.1. Absorpsiyon	51
2.5.2.2. Dağılım.....	52
2.5.2.3. Metabolizma.....	52
2.5.2.4. Eliminasyon.....	52
2.5.3. 7-OH-MTX	53
2.5.4. Tedavide Kullanımı.....	54
2.5.5. Toksisitesi ve Yan Etkileri	54
2.5.6. Metotreksata Karşı Gelişen Direnç	55
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	57
3.1. Kullanılan Aletler.....	57
3.2. Kullanılan antikorlar	57
3.3. Kullanılan kimyasal maddeler	57
3.4. Kullanılan Deney Hayvanları ve Genel Özellikleri	59
3.5. Farmakokinetik deneyler	59
3.5.1. İntravenöz uygulama.....	59
3.5.2. Oral uygulama.....	60
3.5.3. Safra Kesesi Kanülasyonu Deneyleri.....	60

3.6. Metotreksatın plazma, safra ve doku örneklerinde tayini	61
3.6.1. Çözeltilerin ve standartların hazırlanması	62
3.6.1.1. Mobil faz	62
3.6.1.2. 1.5 M Perklorik asit hazırlanışı	62
3.6.1.3. 8,0 M Potasyum asetat hazırlanışı	62
3.6.1.4. Metotreksat stok çözeltisi hazırlanışı	62
3.6.1.5. MTX plazma standardının hazırlanışı	62
3.6.1.6. MTX plazma kalite kontrol standartlarının hazırlanışı	63
3.6.1.7. Kalibrasyon standartlarının hazırlanışı	63
3.6.2. Doku Homojenizasyonu	63
3.6.3. Ekstraksiyon işlemi	64
3.6.4. HPLC sistemi:	64
3.7. ABC Gen Familyasına Dahil Diğer Taşıyıcı Proteinlerin Karaciğerdeki Ekspresyonlarının Western Blot Yöntemi ile Değerlendirilmesi:	64
3.7.1. Karaciğer dokusundaki Crude membran fraksiyonlarının hazırlanışı	65
3.8. Farmakokinetik Parametrelerin Hesaplanması	67
3.9. İstatistiksel Analiz	67
4. BULGULAR	68
4.1. Metotreksatın plazma, safra ve doku örneklerinde HPLC ile tayini	68
4.1.1. İntravenöz uygulamayı takiben plazmadaki MTX düzeyleri	68
4.1.2. İntravenöz uygulamayı takiben plazmadaki 7-OH-MTX düzeyleri	69
4.1.3. İntravenöz uygulamayı takiben karaciğerdeki MTX düzeyleri	70
4.1.4. İntravenöz uygulamayı takiben karaciğerdeki 7-OH-MTX düzeyleri	71
4.1.5. İntravenöz uygulamayı takiben böbrekteki MTX düzeyleri	71
4.1.6. İntravenöz uygulamayı takiben böbrekteki 7-OH-MTX düzeyleri	72
4.1.7. İntravenöz uygulamayı takiben ince barsak dokusu ve içeriğindeki MTX düzeyleri	72
4.1.8. İntravenöz uygulamayı takiben ince barsak dokusu ve içeriğindeki 7-OH-MTX düzeyleri	73
4.1.9. MTX'in safra ile atılımı	73
4.1.10. 7-OH-MTX'in safra ile atılımı	74
4.1.11. Oral uygulamayı takiben plazmadaki MTX düzeyleri	75
4.1.12. Oral uygulamayı takiben dokulardaki MTX düzeyleri	76

4.1.13. Oral uygulamayı takiben plazma ve dokulardaki 7-OH-MTX düzeyleri	77
4.2. ABC Gen Familyasına Dahil Diğer Taşıyıcı Proteinlerin Karaciğerdeki Ekspresyonlarının Western Blot Yöntemi ile Değerlendirilmesi:	77
5. TARTIŞMA	99
6. KAYNAKLAR	107
ETİK KURUL KARARI	130
ÖZGEÇMİŞ	131

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: İnsanda ABC familyasına ait proteinlerin sınıflandırılması	5
Tablo 2-2: ABC taşıyıcı proteinlerin dokulardaki lokalizasyonları.....	11
Tablo 2-3: Lösemi çalışmalarındaki BCRP ekspresyonunun gösterildiği klinik raporların özetleri.....	25
Tablo 2-4: Solid tümör çalışmalarındaki BCRP ekspresyonunun gösterildiği klinik raporların özetleri.....	27
Tablo 2-5: BCRP'nin substrat ve inhibitörleri.....	32
Tablo 2-6: MRP taşıyıcı proteinlerinin ekspresyonları ve substratları	45
Tablo 2-7: MRP2 substratları ve inhibitörleri.....	46
Tablo 2-8: MTX'in <i>in vitro</i> şartlarda substratı olduğu gösterilmiş ABC taşıyıcı proteinler.....	56
Tablo 3-1: MTX'in plazmadaki kalibrasyon standartlarının hazırlanması.....	63
Tablo 4-1: MTX'in plazmada hazırlanan standartları ve bunlara ait pik alanları	79
Tablo 4-2: 50mg/kg dozda i.v. MTX uygulaması sonucu elde edilen plazma konsantrasyonları	80
Tablo 4-3: Plazmadaki MTX konsantrasyonlarının ortalama değerleri kullanılarak hesaplanan AUC _{0-2sa} değerleri.....	82
Tablo 4-4: 50mg/kg dozda intravenöz MTX uygulaması sonucu plazmada ölçülen 7-OH-MTX konsantrasyonları	83
Tablo 4-5: Plazmadaki 7-OH-MTX konsantrasyonlarının ortalama değerleri kullanılarak hesaplanan AUC _{0-2sa} değerleri.....	84
Tablo 4-6: 50mg/kg i.v. uygulaması sonucu dokulardaki MTX düzeyleri	85
Tablo 4-7: Karaciğerdeki MTX konsantrasyonu ile aynı zaman noktalarındaki plazmadaki MTX konsantrasyonlarının oranları	86
Tablo 4-8: 50mg/kg i.v. MTX uygulaması sonucu dokulardaki 7-OH-MTX düzeyleri	87
Tablo 4-9: 50mg/kg iv MTX uygulamasını takiben safrada tayin edilen MTX düzeyleri	91
Tablo 4-10: 50mg/kg iv MTX uygulamasını takiben safrada tayin edilen toplam MTX düzeyleri	92

Tablo 4-11: 50mg/kg iv MTX uygulamasını takiben safrada tayin edilen toplam 7-OH-MTX düzeyleri.....	93
Tablo 4-12: 50mg/kg oral MTX uygulamasını takiben elde edilen plazma MTX konsantrasyonları.....	94
Tablo 4-13: 50mg/kg oral MTX uygulamasını takiben hesaplanan AUC değerleri ve oral biyoyaralanımları.....	95
Tablo 4-14: 50mg/kg oral MTX uygulamasını takiben elde edilen doku MTX düzeyleri	96
Tablo 4-15: 50mg/kg oral MTX uygulamasını takiben karaciğer 7-OH-MTX düzeyleri	96

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: ABC familyasına dahil taşıyıcı proteinlerin yapısı	6
Şekil 2-2: P-gp'nin şekli ve fonksiyonu.	7
Şekil 2-3: Karaciğerde taşıyıcı proteinlerin lokalizasyonu.....	8
Şekil 2-4: Böbrekte taşıyıcı proteinlerin lokalizasyonları	9
Şekil 2-5: İnce barsak epitel hücrelerinde taşıyıcı proteinlerin lokalizasyonu	10
Şekil 2-6: Beyin kapiller endotel hücrelerinde taşıyıcı proteinlerin lokalizasyonları	10
Şekil 2-7: BCRP'nin moleküler yapısı	17
Şekil 2-8: BCRP'nin lokalizasyonu	18
Şekil 2-9: BCRP'nin plasentadaki lokalizasyonu	20
Şekil 2-10: BCRP'nin testislerdeki lokalizasyonu	21
Şekil 2-11: MTX'in kimyasal yapısı	50
Şekil 2-12: 7-OH-MTX'in kimyasal yapısı	53
Şekil 4-1: MTX ve 7-OH-MTX' a ait kromatogram	78
Şekil 4-2: MTX'in plazmada hazırlanan standartlarına ait kalibrasyon eğrisi	78
Şekil 4-3: MTX plazma konsantrasyonu - zaman eğrisi	80
Şekil 4-4: 50mg/kg dozda i.v. MTX uygulanmasını takiben 120. dakikadaki MTX plazma düzeyleri.	81
Şekil 4-5: i.v. uygulama sonucu MTX AUC _{0-2sa} değerlerinin karşılaştırılması	82
Şekil 4-6: 50mg/kg iv MTX uygulamasını takiben plazmada 7-OH-MTX konsantrasyonu – zaman eğrisi.	83
Şekil 4-7: 50mg/kg i.v. MTX uygulaması sonucu 7-OH-MTX AUC _{0-2sa} değerlerinin karşılaştırılması.	84
Şekil 4-8: 50mg/kg i.v. MTX uygulaması sonucu karaciğer MTX düzeylerinin karşılaştırılması.	86
Şekil 4-9: 50mg/kg i.v. MTX uygulaması sonucu karaciğer 7-OH-MTX düzeylerinin karşılaştırılması.	88
Şekil 4-10: 50mg/kg i.v. MTX uygulaması sonucu böbrekteki MTX düzeylerinin karşılaştırılması.	89
Şekil 4-11: 50mg/kg i.v. MTX uygulaması sonucu böbrekteki 7-OH-MTX düzeylerinin karşılaştırılması.	89

Şekil 4-13: 50mg/kg i.v. MTX uygulaması sonucu ince barsak ve içeriğindeki 7-OH-MTX düzeylerinin karşılaştırılması.....	90
Şekil 4-14: 50mg/kg iv MTX uygulamasını takiben safrada tayin edilen MTX düzeylerinin karşılaştırılması.....	91
Şekil 4-15: 50mg/kg iv MTX uygulamasını takiben safrada tayin edilen toplam MTX düzeylerinin karşılaştırılması.....	92
Şekil 4-16: 50mg/kg iv MTX uygulamasını takiben safrada tayin edilen toplam 7-OH-MTX düzeylerinin karşılaştırılması.....	93
Şekil 4-17: 50mg/kg oral MTX uygulamasını takiben elde edilen plazma MTX konsantrasyonu – zaman eğrisi	94
Şekil 4-18: 50mg/kg oral MTX uygulamasını takiben hesaplanan AUC değerlerinin karşılaştırılması	95
Şekil 4-19: 50mg/kg oral MTX uygulamasını takiben karaciğer 7-OH-MTX düzeylerinin karşılaştırılması.....	97
Şekil 4-20: Mrp3'ün karaciğerdeki ekspresyonunun Western Blotting yöntemi ile gösterilmesi.....	98
Şekil 4-21: Mrp4'ün karaciğerdeki ekspresyonunun Western Blotting yöntemi ile gösterilmesi.....	98

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABC	: ATP bağımlı taşıyıcı (ATP-binding cassette)
MDR	: Çoklu ilaç rezistansı (Multidrug Resistance)
ABCB1/Abcb1	: P-gp'yi kodlayan gen
MDR1	: P-glikoprotein
MRP	: Çoklu ilaç rezistansı ilişkili protein
ABCC2/Abcc2	: Mrp2'yi kodlayan gen
BCRP	: Meme kanseri rezistans proteini
ABCG2/Abcg2	: BCRP'yi kodlayan gen
TMD	: Transmembranal domain
NBD	: Nükleotid bağlanan domain
P-gp	: P-glikoprotein
Caco-2	: Kolon adenokarsinoma hücreleri
MDCK	: Madin-Darby köpek böbrek epitel hücreleri
LLC-PK1	: Domuz böbrek epitel hücreleri
EHBR	: Eisai hiperbilirubinemik sıçanlar
PhIP	: 2-amino-1-metil-1-6-fenil-imidazol[4,5-b]piridin)
AML	: Akut miyelositer lösemi
ALL	: Akut lenfotik lösemi
FTC	: Fumitremorgin C
TPS-A	: Triprostatin A
GF120918	: Elaklidar
XR9576	: Tarikidar
PMEA	: (9-(2(fosfonometoksi)etil)-adenin)
SNP	: Tek nükleotid polimorfizimi (Single Nucleotide Polymorphism)
MSD	: Membrane-spanning domain
LTC4	: Lökotrien C4
cMOAT	: Kanaliküler multispesifik organik anyon taşıyıcı
MTX	: Metotreksat
7-OH-MTX	: 7-hidroksi metotreksat
DHFR	: Dihidrofolat redüktaz
BOS	: Beyin omurilik sıvısı

$t_{1/2}$	: Yarılanma ömrü
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
AUC	: Eğri altında kalan alan

ÖZET

Pala, Z. (2009). ABC gen familyasına dahil olan Bcrp1 ve Mrp2 taşıyıcı proteinlerinin, antikanserojen bir ilaç olan metotreksatın farmakokinetiğindeki rolünün incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

ABC üst familyasına dahil, Mrp2 (Abcc2) ve Bcrp1 (Abcg2) ince barsak, karaciğer, böbrekler, beyin, testisler ve plasentada eksprese olan ve antineoplastik ilaçlar da dahil birçok ilacın aktif olarak taşınmasından sorumlu taşıyıcı proteinlerdir. Vücuttaki ekspresyonlarına göre ilaçların emilimi, dağılımı ve atılımında önemli rol oynamaktadırlar. Çalışmamızda, Bcrp1 ve Mrp2 taşıyıcı proteinlerinin antineoplastik bir ilaç olan metotreksatın (MTX) farmakokinetiğindeki rölatif rollerinin, normal koşullarda yaşayabildiği ve üreyebildiği gösterilmiş her iki taşıyıcı proteini de eksprese etmeyen Abcc2/Abcg2 knock-out farelerde incelenmesi planlanmıştır. MTX, 50 mg/kg dozda i.v. ve oral olarak normal, Abcc2 knock-out, Abcg2 knock-out ve Abcc2/Abcg2 knock-out farelere uygulanmış, 7.5, 15.,30.,60. ve 120. dakikalarda kan örneği alınmış ve bazı organlar izole edilmiştir. Ayrıca safra kesesi kanülasyonu yapılarak MTX'in karaciğerden safraya eliminasyonundaki rolleri değerlendirilmiştir. Alınan örneklerdeki MTX ve toksik metaboliti olan 7-hidroksi-MTX (7-OH-MTX) valide edilmiş HPLC yöntemi ile tayin edilmiştir. I.v. ve oral uygulama sonucu plazma eğri altındaki alan (AUC) değerleri normal fareler ile karşılaştırıldığında, tüm gruplarda artmıştır. Her iki uygulamada da toksik metabolitin sistemik maruziyeti ve dokulardaki akümüasyonu artmıştır. MTX'in biliyer atılımı her iki taşıyıcı yokluğunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Bcrp1 ve Mrp2'nin yokluğu diğer taşıyıcı proteinlerin ekspresyonlarında artışa neden olmuştur. Bu çalışmanın sonucu göstermektedir ki; Bcrp1 ve Mrp2 MTX'in eliminasyonunda önemli rol oynamakta, ayrıca Bcrp1 ve Mrp2 birbirlerinin eliminasyondaki fonksiyonlarını tam olarak olmasa da kısmen üstlenmektedirler. Bu bulguların ilaç tedavisinin hastaya göre bireyselleştirilmesine, toksik yan etkilerin en aza indirilmesine ve ilaca olan cevabın bireyler arasındaki farklılığının nedenlerinin aydınlatılmasına yardımcı olacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: BCRP, MRP2, metotreksat, 7-hidroksi-metotreksat, farmakokinetik.

ABSTRACT

Pala, Z. (2009). The role of the ABC transporters Bcrp1 (Abcg2) and Mrp2 (Abcc2) in the pharmacokinetics of the anti-cancer drug methotrexate. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmacology. PhD Thesis. İstanbul.

The multidrug transporters Bcrp1 (Abcg2) and Mrp2 (Abcc2), both members of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, are present in the apical membranes of hepatocytes and epithelial cells of small intestine and kidney, where they play a role in the excretion of both endogenous and exogenous compounds into bile, feces and urine. Bcrp1 and Mrp2 show substantial overlap in substrate specificity, and can both influence the pharmacokinetics of many (anti-cancer) drugs. The primary aim of this project is to investigate the relative roles of the ABC transporters Bcrp1 and Mrp2 in pharmacokinetics of the anti-cancer drug methotrexate by using the newly generated Abcc2/Abcg2 knock-out mice. MTX was administered i.v. and oral at a dose of 50 mg/kg to female wild-type, Abcc2, Abcg2 knock-out and Abcc2/Abcg2 double knock-out mice. MTX and toxic metabolite 7-hydroxy-MTX (7-OH-MTX) were detected by validated HPLC method in samples. Compared to wild-type, the plasma areas under the curve (AUCs) for MTX were higher in all groups in both of i.v. and oral application. Biliary excretion of MTX was nearly abrogated to in Abcc2/Abcg2 double knock-out mice. After i.v. and oral application of MTX, it was occurred substantial 7-OH-MTX accumulation in liver and kidney. Abcc2 and Abcg2 together are the major determinants of MTX and 7-OH-MTX pharmacokinetics. Variation in ABCC2 and/or ABCG2 activity may therefore substantially effect the elimination and toxicity in patients treated with MTX. This will eventually lead to improve the possibility of optimizing drug treatment for individual patient, and minimizing side effects.

Key words: BCRP, MRP2, methotrexate, 7-hydroxy methotrexate, pharmacokinetics

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser hücrelerinde görülen ilaç rezistansı (MDR- multi-drug resistance), kanser hastalarına uygulanan kemoterapinin başarısız olmasının temel nedenlerinden biridir. Tümör hücrelerinde görülen bu rezistans, ilaçların hücre dışına atılmasını sağlayan membran proteinlerinin ekspresyonunun bir sonucudur ve ilaçların hücre içindeki konsantrasyonlarının düşmesine neden olmaktadır. Bu sorunu daha da karmaşık hale getiren, eflüks taşıyıcılarının çok çeşitli olmaları ve birçok alt tiplerinin bulunmasıdır. ABC taşıyıcı (ATP-binding cassette) proteinleri, metabolik ürünler, ilaçlar, toksinler, endojen lipidler, peptidler, nükleotidler ve steroller gibi çeşitli substratların ekstra- ve intraselüler transportunu sağlayan membran proteinleridir. P-glikoprotein (P-gp), MRP (multidrug resistance associated protein) ve BCRP (breast cancer resistance protein) son yıllarda üzerinde durulan ve kanserli hücrelerin yanı sıra, organizmada ince barsak, karaciğer, böbrekler, beyin, testisler ve plasentada eksprese olan, geniş substrat spesifitesine sahip taşıyıcı proteinlerdir (Szakacs ve ark. 2006, Borst ve Oude Elferink 2002, Chan ve ark. 2004, Belinsky ve ark. 2005).

Kanser hastalarının tedavisinde karşılaşılan diğer önemli bir problem de, kemoterapötik ajanların farmakokinetiğinin aynı bireyde ve bireyler arasında oldukça geniş değişkenlik göstermesidir. Antineoplastik ilaçların terapötik pencerelerinin dar olması nedeniyle farmakokinetik profillerinde oluşan küçük sapmalar bile klinik yanıtın anlamlı olarak değişmesine neden olabilmektedir. Farmakokinetik profilin değişmesi, genellikle terapötik etkinliğin azalması veya toksisitenin artması şeklinde sonuçlanmaktadır (Harmsen ve ark. 2007). MRP2 ve BCRP, ilaçların gastrointestinal sistemden emilimini sınırlandırarak ve karaciğer ve böbreklerden eliminasyonunu artırarak sistemik maruziyeti etkileyebilmektedir. Ayrıca ilaçların hücre içine, dokulara ve farmakolojik kompartmanlara geçişini sınırlandırmak suretiyle dağılımlarını da etkilemektedir (Szakacs ve ark. 2008). Diğer taraftan, son zamanlarda yapılan çalışmalar, ABC taşıyıcı proteinlerin ekspresyonlarında görülen genetik varyasyonların, antineoplastik ilaçların farmakokinetiğini ve böylelikle klinik seyri etkilediğini göstermiş, taşıyıcı proteinlerin ilaçların farmakokinetiğindeki rollerinin tam olarak belirlenmesi için detaylı çalışmaların gerekliliğini ortaya koymuştur (Cascorbi 2006).

Kullanılmakta olan ve özellikle yeni geliştirilen ilaçların, taşıyıcı proteinler için substrat olup olmadıklarının belirlenmesi, gerek tedavi, gerekse yeni ilaç araştırma-geliştirme çalışmaları bakımından önemli bir basamak haline gelmiştir. Bu bağlamda ABC taşıyıcı proteinlerinin, ilaçların taşınmasındaki rolleri ve/veya ilaç-ilaç etkileşimlerinin değerlendirilerek farmakolojik öneminin belirlenmesi için çeşitli *in vitro* ve *in vivo* deneysel modeller geliştirilmiştir. Genetik knock-out fareler, taşıyıcı proteinlerin fizyolojik fonksiyonlarının anlaşılmasında ve taşıyıcı proteinlerin ilaçların farmakokinetik ve farmakodinamiğine etkilerinin değerlendirilmesinde önemli deneysel modellerdir. Günümüze kadar bu proteinleri eksprese etmeyen knock-out fare türlerinin kullanıldığı bir çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Fakat bu farelerde, özellikle bir taşıyıcı proteinin yokluğunun diğer bir taşıyıcı proteinin ekspresyonundaki artış ile kompanse edilebildiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle, taşıyıcı proteinlerin örtüşen etkilerini *in vivo* olarak değerlendirmek için aynı anda iki ya da daha fazla taşıyıcı proteini eksprese etmeyen genetik knock-out fareler geliştirilmiştir (Jonker ve ark. 2005, Lagas ve ark. 2006, Takenaka ve ark. 2007, Tian ve ark. 2008).

Taşıyıcı proteinleri eksprese etmeyen deney hayvanlarının normal yaşam döngülerine sahip olmaları bu proteinlerin farmakolojik olarak modüle edilebileceğini göstermiştir. Bu modülasyon da kanser tedavisinde antineoplastik ilaçların etkinliğini, oral biyoyararlanımlarını ve santral sinir sistemine geçişlerini arttırmak için etkin ve güvenli bir strateji biçimi olmuştur. Bu bağlamda özellikle P-gp’i inhibe ettiği bilinen ilaçlar (verapamil, siklosporin) klinik çalışmalarda denenmiştir. Bu çalışmalarda görülen en temel sorun ilaç-ilaç etkileşmeleri sonucu, uygulanan sitotoksik ilaçların P-gp’nin eksprese olduğu dokulara dağılımlarının artmış olmasıdır. Farmakolojik etkiden yoksun olarak geliştirilen ikinci kuşak inhibitörler (örn. PSC-833) ise antineoplastik ilaçların metabolizmasını ve ilaç eliminasyonunu sınırlandırarak farmakokinetik etkileşmelere neden olmuş ve yapılan klinik çalışmalarda ciddi toksik etkiler görülmüştür. Tüm bu sonuçlar çerçevesinde daha hedefe yönelik, yüksek taşıyıcı seçiciliği olan, düşük toksisite potansiyeline sahip ve farmakokinetik etkileşme potansiyeli az olan üçüncü kuşak inhibitörler (örn. tarikidar) geliştirilmiştir. Bu inhibitörlerin günümüzde Faz III çalışmaları devam etmektedir (Szacaks ve ark. 2008).

Metotreksat (MTX) folat antagonisti antineoplastik bir ilaçtır. Aynı zamanda romatoid artrit ve psoriasis tedavisinde oral yoldan da kullanılmaktadır. MTX

karaciğerde aldehit oksidaz enzimi aracılığı ile daha toksik olan 7-hidroksi metabolitine (7-OH-MTX) dönüştürülmektedir. MTX'in tedavideki etkinliği ve toksik etkileri hastalar arasında oldukça fazla değişkenlik görülmektedir. Bu durum, MTX ile tedavide dozun hastaya göre bireyselleştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır (Widemann ve Adamson 2006).

ABC üst familyası taşıyıcılarının substrat spesifitelerinin hemen hemen aynı olması nedeniyle bir taşıyıcının inhibe edilmesi veya olmaması durumunda, diğer taşıyıcı proteinin onun fonksiyonunu kısmen gerçekleştirebilmesi olasıdır. MTX'in hem BCRP, hem de MRP2 tarafından da taşındığı *in vitro* olarak gösterilmiş ve *in vivo* şartlarda MTX farmakokinetiğinin bu taşıyıcılar tarafından etkilendiği ortaya konmuştur (Breedveld ve ark. 2004, Vlaming ve ark. 2006). Bu bağlamda, BCRP ve MRP2'nin fizyolojik önemi, ilaç rezistansı ve antineoplastik ilaçların farmakokinetiği üzerine olan etkilerinin net olarak değerlendirilebilmesi için *Mrp2 knock-out* fareler ile *Bcrp1 knock-out* fareler çaprazlanmış ve *Bcrp1/Mrp2 double knockout* fareler elde edilmiştir. Bu çalışmada, Bcrp1 ve Mrp2 taşıyıcı proteinlerinin, i.v. ve oral olarak uygulanan MTX'in farmakokinetiğine olan etkilerinin incelenmesi ve bu proteinlerin birbiriyle örtüşen fonksiyonlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

ABC taşıyıcı proteinlerinin antineoplastik ilaçların farmakokinetiği üzerine olan etkilerinin belirlenmesi, inhibitör veya substratların bilinçli olarak eş zamanlı kullanımları sonucunda tedavide ortaya çıkabilecek risklerin ve hastada oluşturacağı olumsuz etkilerin öngörülmesine olanak sağlayacaktır. Çalışmada elde edilen bulguların MTX ile tedavide dozun bireyselleştirilmesine, toksik ve yan etkilerin en aza indirilmesine katkıda bulunacağı görüşündeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ABC Taşıyıcı Proteinleri

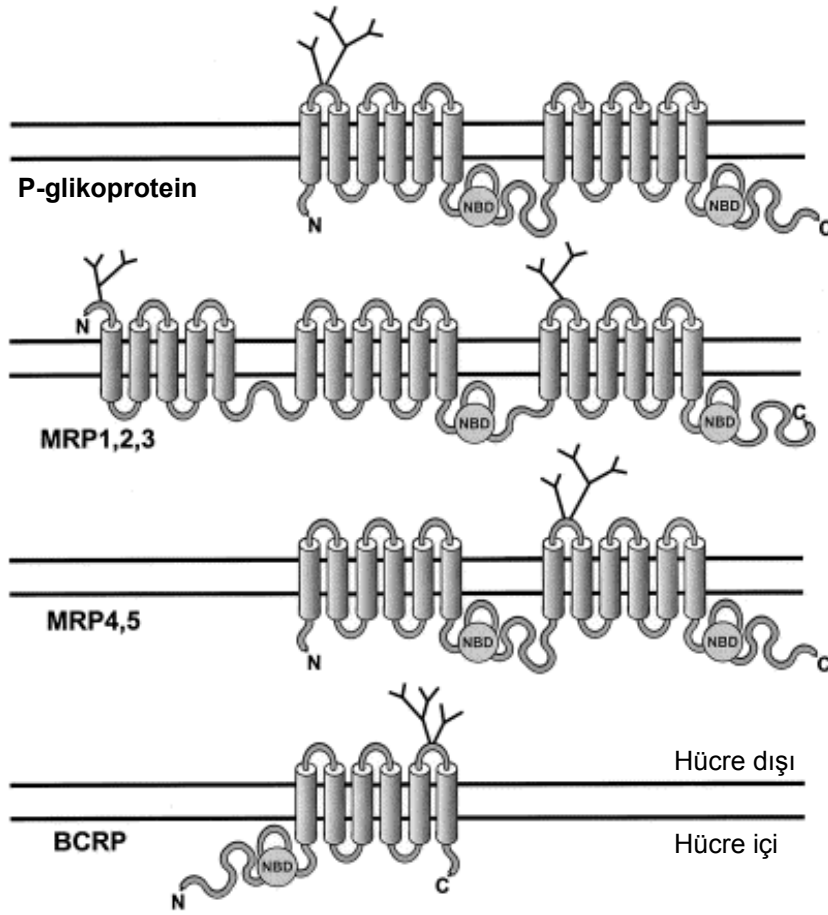
ABC taşıyıcı (ATP-binding cassette) familyası, metabolik ürünler, ilaçlar, toksinler, endojen lipidler, peptidler, nükleotidler ve steroller gibi çeşitli substratların ekstra- ve intraselüler membranlardan taşınmasını sağlayan membran proteinlerini içermektedir. Bu familyanın proteinleri yaşayan tüm canlılarda bulunmaktadır. ABC üst familyası oldukça farklı bileşikler taşıyan yaklaşık 300 protein içermekte iken bugüne kadar insanda 49 protein tanımlanmış ve dokulardaki lokalizasyonu ve fonksiyonları değerlendirilmiştir. Bu proteinlerin homolojileri farelerdeki ile karşılaştırıldığında bir çoğunun insandakiler ile yüksek oranda uyumlu olduğu gösterilmiştir (Stavrovskaya ve Stromskaya 2008, Schinkel ve Jonker 2003).

ABC taşıyıcı familyası şekilsel benzerliklerine ve nükleotid bağlayan domainlerin homolojisine göre yedi alt gruba ayrılmıştır (Dean ve ark. 2001) (Tablo 2-1). Günümüzde insanda bulunan ABC üst familyası proteinlerinin 10-12'si, çoklu ilaç taşıyıcılar (MDT-Multidrug Transporters) veya çoklu ilaç resistansına (MDR-Multidrug Resistance) neden olan taşıyıcı proteinler olarak tanımlanmaktadır (Tablo 2-1) (Stavrovskaya ve Stromskaya 2008). Bu proteinler de kendi aralarında (i) hastalarda ve hücre kültürlerinde çoklu ilaç rezistansına neden olabilenler, (ii) sadece bazı *in vitro* deneylerde hücrelerde ilaç rezistansına neden olanlar olarak ikiye ayrılmıştır (Szakács ve ark. 2006). İlk gruba dahil ilaç taşıyıcı proteinleri arasında, substratları enerjiye bağımlı (aktif) olarak hücre dışına pompalayarak hücre içi konsantrasyonlarını sınırlandıran P-glikoprotein (ABCB1; MDR1), çoklu ilaç rezistansı ilişkili protein 1 (Multidrug resistance associated protein; MRP1, ABCC1) ve meme kanseri rezistans proteini (Breast cancer resistance protein; BCRP, ABCG2, MXR, ABCP) bulunmaktadır (Dean ve ark. 2001). Bu taşıyıcı proteinler özellikle kemoterapötiklere karşı gelişen ilaç rezistansına neden olmalarının yanında substratlarının vücuttaki dağılım, intestinal absorpsiyon ve sekresyon, plasentadan geçiş ve böbrek ve karaciğerden eliminasyonlarında da önemli rol oynarlar (Schinkel ve Jonker 2003, Szakacs ve ark. 2006).

Tablo 2-1: İnsanda ABC familyasına ait proteinlerin sınıflandırılması –Stavrovskaya ve Stromskaya (2008)’den değiştirilerek

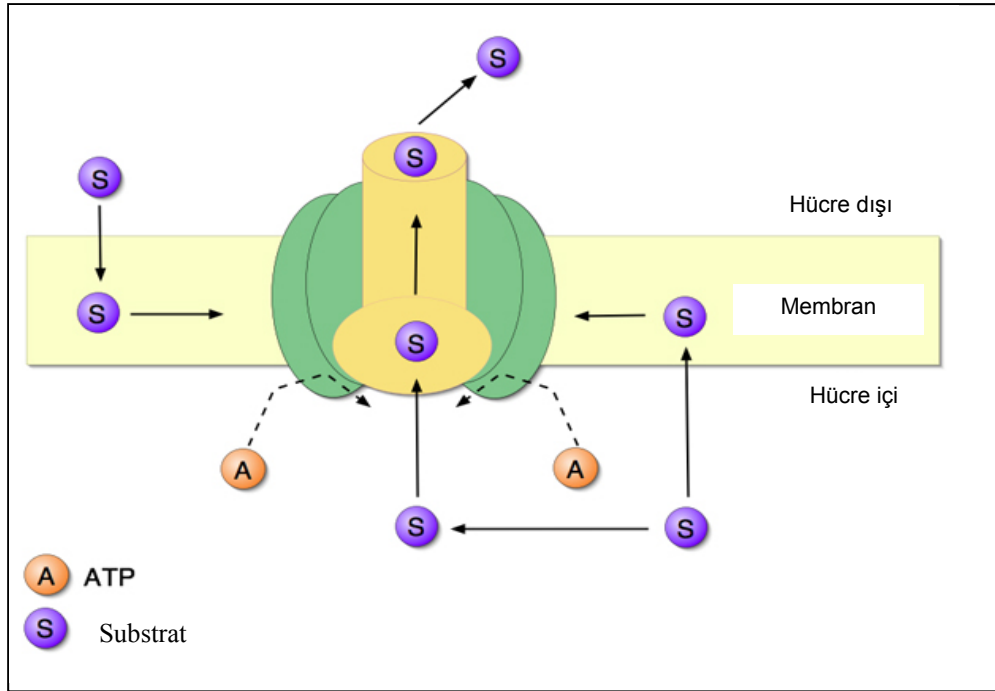
Alt familya	Alternatif İsim	Protein Sayısı	İlaç Rezistansına Neden Olan Proteinler	
			<u>İsim</u>	<u>Sayı</u>
ABCA	ABC1	12	ABCA2	1
ABCB	MDR	11	ABCB1 (P-gp)	3
			ABCB4 (MDR2)	
			ABCB11 (BSEP,SPGP)	
ABCC	MRP	13	ABCC1 (MRP1)	8
			ABCC2-6 (MRP2-6)	
			ABCC10 (MRP7)	
			ABCC11 (MRP8)	
ABCD	ALD	4		
ABCE	OABP	1		
ABCF	GCH20	3		
ABCG	White	5	ABCG2 (BCRP)	1

ABC taşıyıcı proteinleri transmembranal domain (TMD) ve ATP bağlayan domain (NBD, nükleotide binding domain) olmak üzere temel olarak iki kısımdan oluşmaktadır. ABC taşıyıcı fonksiyonu için en az dört domain olması gerekmektedir. İki adet sitoplazmik NBD ATP’ye bağlanır ve hidrolizine neden olur. İki adet TMD bulunur ve her ikisi de genellikle 6 adet transmembranal segmentten oluşmaktadır (Chan ve ark. 2004). P-glikoprotein (P-gp) ile MRP4 ve MRP5 gibi iki adet TMD ve NBD bulunan taşıyıcı proteinler tam taşıyıcı olarak adlandırılırken, sadece birer tane TMD ve NBD içeren BCRP yarı taşıyıcı olarak adlandırılır. Buna ek olarak MRP 1, 2, 3, 6 gibi taşıyıcılarda beş adet transmembranal segment içeren üçüncü bir TMD bulunmaktadır (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: ABC familyasına dahil taşıyıcı proteinlerin yapısı -Schinkel ve Jonker (2003)'den değiştirilerek

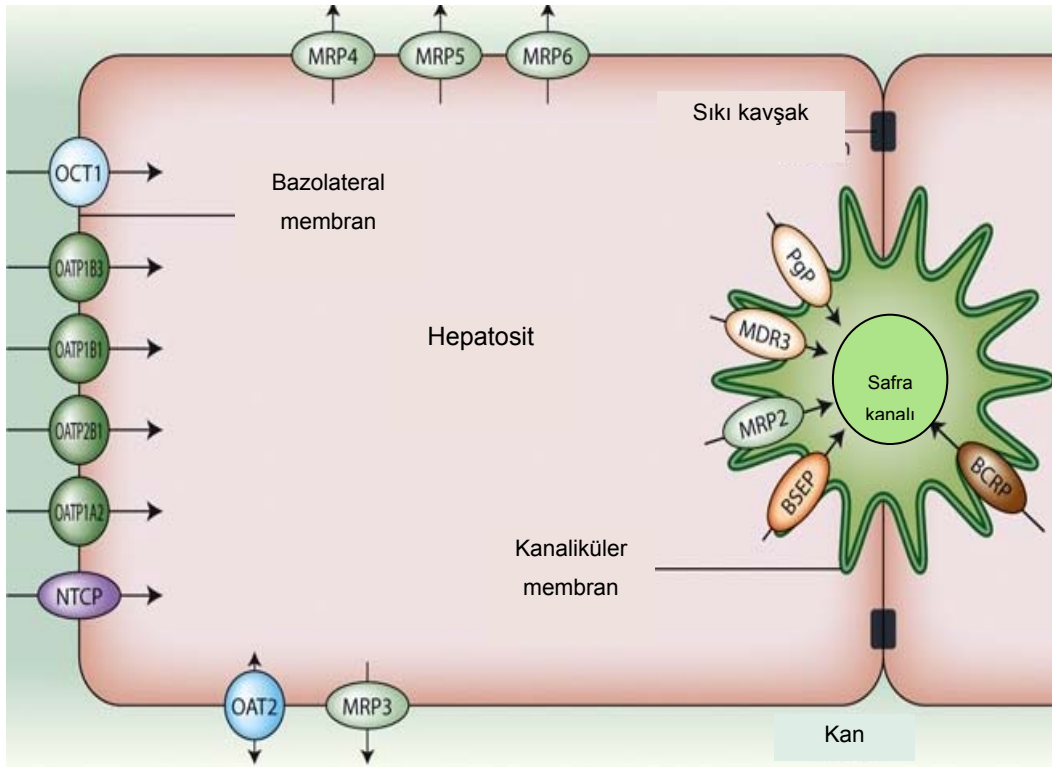
ABC taşıyıcı proteinlerin substratları nasıl taşıdığına dair mekanizmaların aydınlatılması için özellikle tam taşıyıcı protein olan P-gp ile çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan en fazla kabul gören teoriye göre (Neyfakh 2003, Zheleznova ve ark. 1999); P-gp'nin transmembran heliksleri tarafından hücre membranında bir cep oluşturulmuştur. Bu cep, membranın içine doğru substratların cebin içine girebileceği iki adet lateral açıklık içermektedir. Taşıyıcının intraselüler NBD bölgesine ATP bağlanmasından sonra, proteinin transmembran segmentleri güçlü bir şekilde değişerek lateral açıklıkların kapanmasına neden olur ve Van der Waals bağları ile cebe bağlanmış olan substrat ekstraselüler ortama taşınmış olur (Şekil 2-2).



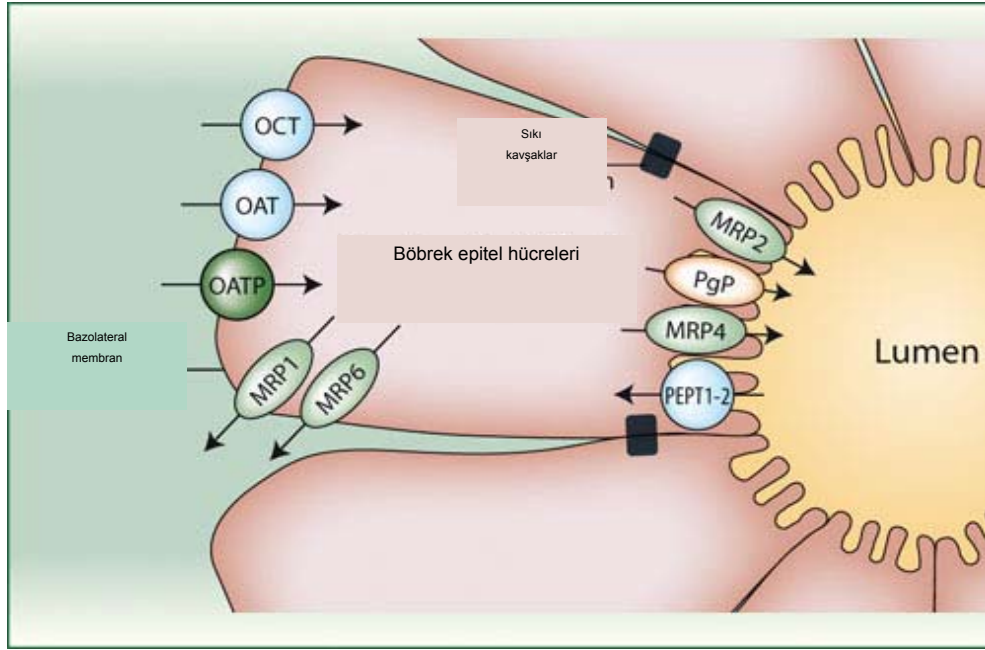
Şekil 2-2: P-gp'nin şekli ve fonksiyonu -Edwards (2003)'den değiştirilerek.

ABC taşıyıcı proteinlerinin regülasyonları çeşitli yollar üzerinden gerçekleşmektedir. Endojen ve eksojen olarak gelen uyarılar genellikle farnesoid X reseptör (FXR), pregnan X reseptör (PXR), steroid ve zenobiyotik reseptör (SXR), karaciğer X reseptör (LXR), peroksizom poliferatör aktive edici reseptör (PPAR) gibi nüklear reseptörler aracılığı ile sorumlu promoter gene aktarılmakta ve bunun sonucunda ekspresyonları gerçekleşmektedir. Bunlara ek olarak sfingomiyelin yolağı, Ras-aracılı yolk ve PI3K-aracılı sinyal yolağı da regülasyonlarında rol oynamaktadır (Stavroskaya ve Stromskaya 2008).

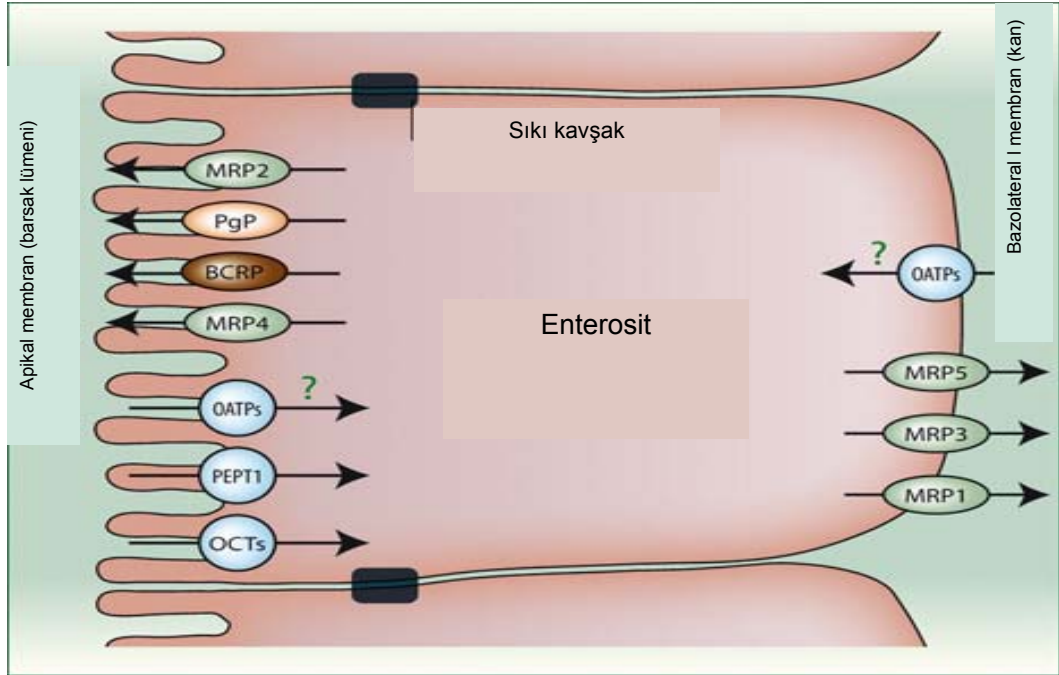
İnce barsaklardan absorpsiyon, karaciğer ve böbrekten atılım, kan-beyin, kan-testis veya anne-fetus arasındaki bariyer dahil ilaçların taşındığı tüm doku bariyerleri spesifik, çoğunlukla polarize hücre dizileri içermektedir (Szakacs ve ark. 2008) (Tablo 2-2).



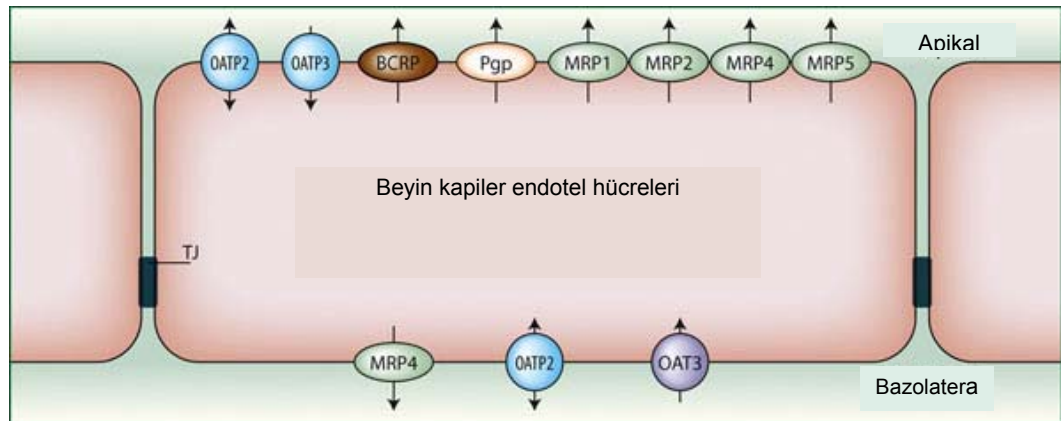
Şekil 2-3: Karaciğerde taşıyıcı proteinlerin lokalizasyonu-<http://www.solvo.com>'den değiştirilerek



Şekil 2-4: Böbrekte taşıyıcı proteinlerin lokalizasyonları -<http://www.solvo.com>'den değiştirilerek



Şekil 2-5: İnce barsak epitel hücrelerinde taşıyıcı proteinlerin lokalizasyonu - <http://www.solvo.com>'den değiştirilerek



Şekil 2-6: Beyin kapiller endotel hücrelerinde taşıyıcı proteinlerin lokalizasyonları - <http://www.solvo.com>'den değiştirilerek

Tablo 2-2: ABC taşıyıcı proteinlerin dokulardaki lokalizasyonları

Protein adı	Boyutu	Doku dağılımı	Polarize hücre lokalizasyonu
ABCB1/P-gp/MDR1	1280 aa	Kan-beyin bariyeri, karaciğer, barsak, böbrek, plasenta, kök hücreler	Apikal
ABCC1/MRP1	1531 aa	Akciğer, testis, böbrek, plasenta, periferik kan mononükleer hücreleri, iskelet ve kalp kası	Bazolateral
ABCC2/MRP2	1545 aa	Kan-beyin bariyeri, karaciğer, barsaklar, böbrek, plasenta	Apikal
ABCC3/MRP3	1527 aa	Adrenal bez, barsaklar, pankreas, safra kesesi, plasenta, karaciğer, böbrek, prostat	Bazolateral
ABCC4/MRP4	1325 aa	Over, testis, böbrek, akciğer, prostat	Apikal, Bazolateral
ABCC5/MRP5	1437 aa	Karaciğer, testis, iskelet ve kalp kası, beyin	Bazolateral, Apikal
ABCG2/BCRP	655 aa	Kan-beyin bariyeri, plasenta, meme, Karaciğer, barsak, kök hücreleri	

2.2. ATP Taşıyıcı Proteinlerinin İlaç Transportundaki Rollerinin Değerlendirilmesinde Kullanılan Deneysel Modeller

2.2.1. *In vitro* Yöntemler ve Modeller

ABC taşıyıcı proteinlerinin, ilaçların taşınması ve/veya ilaç-ilaç etkileşimlerinin değerlendirilerek farmakolojik öneminin belirlenmesi için çeşitli *in vitro* sistemler/modeller geliştirilmiştir. Substrat olduğu düşünülen ilaç/bileşiklerin akümülyasyonları yüksek oranda intraselüler bağlanma bölgelerine ulaşılabilirliğine ve hücre membranının geçirgenliğine bağlıdır. Test edilecek maddenin fizikokimyasal özelliklerine (hidrofilik veya lipofilik) göre uygun deneysel modeller seçilmelidir. Kendiliğinden veya transfeksiyon sonucu MDR-ABC proteinleri yüksek oranda eksprese eden hücreler veya bu hücrelerden izole edilen membranların/proteinlerin kullanıldığı modeller geliştirilmiştir (Szakacs ve ark. 2008, Xia ve ark. 2007).

2.2.1.1. Sitotoksite Değerlendirme Testi

ABC taşıyıcı proteinlerinin substrat ve inhibitörlerinin belirlenmesinde çok yaygın olarak kullanılan indirekt bir testtir. Değerlendirilecek taşıyıcı proteini yüksek oranda eksprese eden stabil hücre dizileri, test edilecek ilacın artan konsantrasyonları ile inkübe edilir ve sağ kalan hücreler sayılarak IC_{50} değeri (hücrelerin yarısını öldüren ilaç konsantrasyonu) hesaplanır. Bulunan değer, taşıyıcı proteinleri eksprese etmeyen parental hücrelerde tayin edilen değer ile karşılaştırılarak değerlendirme yapılır. Taşıyıcı proteinin inhibitörü olduğu düşünülen ilaç/bileşikler de bu yöntem ile tayin edilebilir. İnhibitörler, daha önceden toksik etkisi bilinen substratın, taşıyıcı proteinleri yüksek oranda eksprese eden hücrelerdeki toksisitesini artırır (Xia ve ark. 2007, Zhang ve ark. 2003).

2.2.1.2. Hücresel Akümülyasyon

ABC taşıyıcı proteinleri tarafından taşınan substrat, bu taşıyıcı proteini eksprese eden hücrelerde daha düşük oranda akümüle olurken, taşıyıcı protein inhibitörleri substratların hücrelere akümülyasyonunu artırarak parental hücrelerde gözlenen

düzeyle yakın hale getirirler. Substratın hücredeki düzeyleri floresans veya radyoaktif işaretleme ile direkt olarak ölçülür ve kararlı durum akümülayonu, efluks veya hücre içine alımı belirlenebilir.

Daunorubisin ve rodamin 123 (P-gp substratı), kalsein (P-gp ve MRP substratı) ve Hoechst 43 ve LysoTracker (BCRP substratı) gibi floresan substratların konsantrasyonları flow sitometri veya herhangi bir floresan dedektör ile ölçülerek, taşıyıcı proteinin inhibitörlerinin belirlenmesinde kullanılmaktadırlar (Wang ve ark. 2000, Karász ve ark. 2001, Xia ve ark. 2007)

2.2.1.3. Transsellüler Taşınma

İn vivo şartlarda, ilaçlar absorbe olmak (intestinal epitel hücreler), dokulara dağılmak (kan-beyin bariyeri endotel hücreleri) ve atılım için (hepatosit, proksimal tübül epitel hücreleri) biyolojik bariyerleri geçmek zorundadırlar. Bu hücreler arası geçiş, polarize edilmiş tek sıra hücresel efluks modeli oluşturularak değerlendirilmektedir. Bu metod, taşıyıcı proteinin fonksiyonun ve test maddesinin tek sıralı hücrelerden permeabilitesinin değerlendirilmesi için en doğru metottur. Hücreler membran yüzeyini %100 kaplayacak şekilde ekilir. Test bileşiği apikal veya bazolateral solusyona eklenir. Belirlenen zaman noktalarında apikal ve bazolateral bölümlerden örnek alınarak eklenen bileşiğin miktar tayini yapılır. Apikalden bazolaterale (A-B) ve bazolateralden apikal (B-A) kompartmana geçiş belirlenir ve ABC taşıyıcı proteinin fonksiyonunu yansıtan iki kompartmanın taşınma derecelerinin oranı hesaplanır. P-gp ve BCRP gibi apikal yüzeyde lokalize olan taşıyıcı proteinleri eksprese eden hücrelerde basolateralden apikal kompartmana geçiş baskındır (B-A>A-B). Net geçiş oranı 2'den büyük ise değerlendirilen ilaç/bileşiğin membranda eksprese olan protein tarafından taşınmakta olduğu anlamına gelir (Szakacs ve ark. 2006, Xia ve ark. 2007).

Hücre dizisi olarak insan kolon adenokarsinoma (Caco-2), Madin-Darby köpek böbrek epitel (MDCK) ve domuz böbrek epitel (LLC-PK1) hücreleri sıklıkla kullanılmaktadır. Caco-2 hücreleri barsak epitel hücrelerinin özelliklerine sahiptir ve bu hücrelerin kullanıldığı diziler barsak duvarından absorpsiyon modeli için uygundur. Alternatif olarak ABC taşıyıcı proteinler ile transfekte edilen MDCKI, MDCKII veya LLC-PK1 hücreleri kullanılabilir. Dağılım modeli oluşturmak için, beyin endotel hücreleri, konjunktiva ve alveoler epitel hücreleri de kullanılabilir. Bu deney modelinde

test edilecek bileşimin/ilacın bu hücreler üzerine toksik etki göstermemesi ve pasif difüzyona orta derecede maruz kalması gerekmektedir. Transellüler taşıma modeli *in vivo* şartlara en uygun *in vitro* model olarak değerlendirilmektedir (Szakacs ve ark. 2008, Xia ve ark. 2007).

2.2.1.4. ATPaz Aktivite Ölçümü

Bileşiklerin membranlardan ABC taşıyıcı proteinleri tarafından taşınması ATP hidrolizinden açığa çıkan enerji ile gerçekleşir. ATPaz aktivitesi ise ATP tüketimi, ADP oluşumu veya inorganik fosfat serbestlenmesi aracılığı ile belirlenebilir. ABC taşıyıcı proteinleri aşırı eksprese eden hücrelerden elde edilen membranlar veya izole edilen ve yeniden düzenlenen proteinler ATP hidrolizinin ölçülmesi için uygundur. ABC taşıyıcı proteinleri ile taşınan bileşikler/ilaçların çoğu ATPaz aktivitesini stimüle ederler. İnhibitörler veya düşük oranda taşınan bileşikler ise taşıyıcının stimüle edilmiş ATPaz aktivitesini inhibe ederler (Xia ve ark. 2007).

2.2.1.5. Veziküler Taşıma

Bu modelde, hücrelerden hazırlanmış içi dışına çevrilmiş membran veziküllerinin veya tekrardan düzenlenmiş taşıyıcı membran veziküllerinin içine test bileşiminin akümüasyonu ölçülmektedir. İçi dışına çevrilmiş veziküllerde ATP bağlayan domain dış tarafta yani inkübasyon ortamındadır ve substratlar aktif olarak vezikülün içine taşınır. Cam fiber filtreler veya nitroselüler membranların kullanıldığı hızlı filtrasyon ile veziküller ve inkübasyon solusyonu birbirinden ayrılır. Taşınan molekülün miktarı yüksek hassasiyetli bir analitik yöntem ile tayin edilir. Alternatif olarak, bileşik radyoaktif veya fluoresans bir madde ile işaretlenerek taşınan miktar tayin edilebilir. Bu metod özellikle hücre içine geçişi zor olan hidrofilik bileşiklerin değerlendirilmesi için kullanılmaktadır (Xia ve ark. 2007, Szakacs ve ark. 2008).

2.2.2. İn vivo Modeller

2.2.2.1. Taşıyıcı Genetik Knock-out Fareler veya Doğal Mutant Hayvanlar

Genetik knock-out fareler veya doğal olarak taşıyıcı proteinlerin bazılarını eksprese etmeyen mutant hayvanlar, taşıyıcı proteinlerin fizyolojik fonksiyonlarının incelenmesinde ve taşıyıcı proteinlerin ilaçların farmakokinetik ve farmakodinamiğine etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılan önemli deneysel modellerdir.

Genetik knock-out fareler, spesifik olarak taşıyıcı proteinleri değerlendirmek amacıyla bu proteini eksprese eden genin silinmesi ile geliştirilmektedir (Schinkel ve ark. 1997, Jonker ve ark. 2002). Fakat ABC taşıyıcı proteinlerinin substrat seçiciliklerinin birbirleri ile örtüşmesi nedeniyle bu taşıyıcıların rollerinin birbirinden bağımsız olarak değerlendirilmesi genellikle sadece bir genin silindiği farelerde güçtür. Taşıyıcı bir proteinin yokluğu diğer bir taşıyıcı proteinin ekspresyonundaki artış ile kompanse edilebilmektedir. Bu nedenle, taşıyıcı proteinlerin örtüşen etkilerini *in vivo* olarak değerlendirmek için aynı anda iki ya da daha fazla taşıyıcı proteini eksprese etmeyen genetik knock-out fareler geliştirilmiştir (Jonker ve ark. 2005, Lagas ve ark. 2006, Takenaka ve ark. 2007, Tian ve ark. 2008)

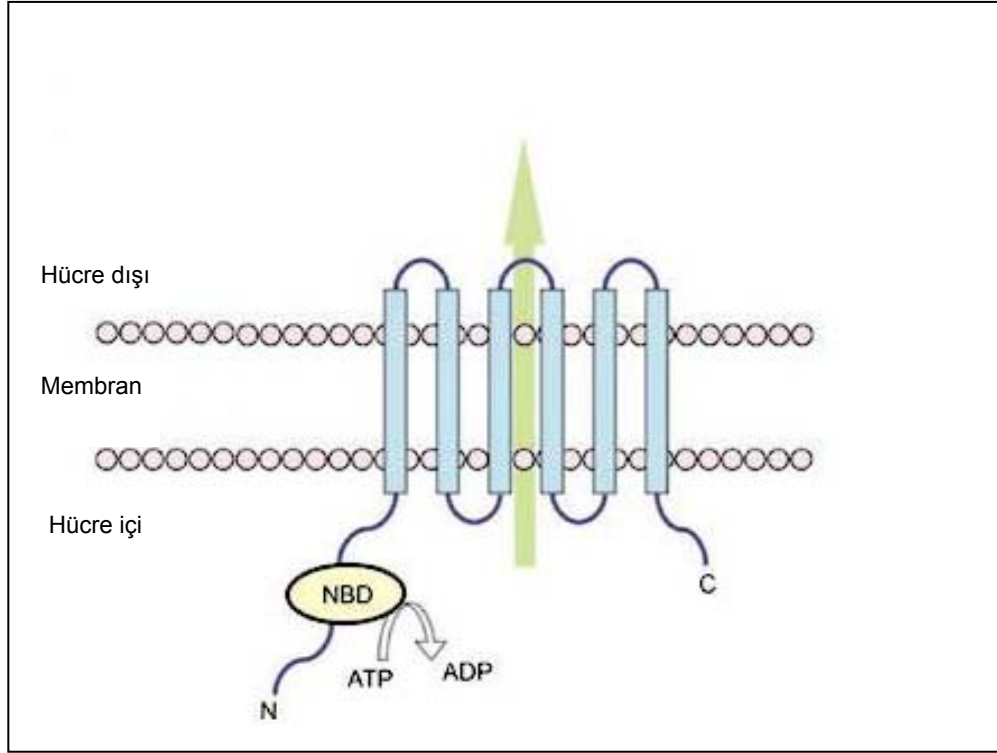
Doğal mutant hayvanlar, taşıyıcı proteini eksprese eden geninde spontan mutasyona sahip olan alt populasyonlardır. P-gp veya Mrp2 proteinlerini eksprese eden genlerde fare (Lankas ve ark. 1997, Kwei ve ark. 1999), sıçan (Elferink ve ark. 1989) veya köpeklerde (Paul ve ark. 1987) mutasyonlar belirlenmiştir. Bu hayvanlardan özellikle Mrp2'yi eksprese etmeyen sıçanlar (EHBR, GY/TR⁻) Mrp2'nin fizyolojik fonksiyonlarının değerlendirilmesi, ilaç absorpsiyonu ve safrayla atılımdaki rolünün belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır.

Genetik hayvan modelleri kullanılırken, eksprese olmayan taşıyıcı proteinlerin fonksiyonları, diğer taşıyıcı protein veya enzimlerin ekspresyonundaki artış ile kompanse edilebildiği ve bunun da knock-out hayvanın fizyolojini değiştirebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Diğer taraftan, türler arasında taşıyıcı proteinlerin ekspresyonlarında farklılıklar gözlenmektedir (Mizuno ve ark. 2004). Taşıyıcı proteinlerin insanlardaki rollerinin değerlendirilmesi amacıyla genetik knock-out hayvanlarda yapılan çalışmaların sonuçları dikkatli değerlendirilmelidir (Xia ve ark. 2007).

2.3. Meme Kanseri Rezistans Proteini (BCRP)

Meme kanseri rezistans proteini (Breast cancer resistance protein - BCRP/ABCG2) en son keşfedilen ABC familyasına dahil taşıyıcı proteindir. İlk olarak Doyle L.A. ve ark. (1998) tarafından doksorubisin-rezistans MCF-7 meme kanseri hücre dizisinden (MCF-7/AdrVp) klonlanmıştır ve bu sebeple meme kanseri rezistans proteini adını almıştır. Fakat bu kavram karışıklığa neden olmaktadır çünkü bu taşıyıcı proteinin genetik ekspresyonu ne sadece meme dokusunda ne de kanser hücrelerinde görülmektedir. Bunun yanında mitoksantrona karşı rezistans oluşumuna neden olduğu için mitoksantron rezistans protein (MXR) ve plasentadaki ekspresyonundan dolayı da plasental ABC taşıyıcı protein (ABCP) olarak da isimlendirilmektedir (Doyle ve ark. 1998, Allikmets ve ark. 1998). Şekil ve genetik dizi homolojisine göre BCRP, ABCG gen alt familyasına dahildir.

İnsan BCRP geni 16 ekson ve 15 intron içermekte ve 4q22 kromozomunda bulunmaktadır. 655 amino asit içeren ABC protein 72 kDa boyutundadır ve tek NH₂-terminal sitozolik nükleotid bağlayan domain (NBD) ve tek 6 transmembranal segmentten oluşan trans membran domain (TMD) içermektedir (Şekil 2-7). Farelerdeki Bcrp1'nin aminoasit dizilimi insanınki ile %81 oranında aynıdır ve insandaki BCRP gibi enerji bağımlı efluks ile ilaç substratlarına karşı rezistansa neden olmaktadır (Zhang ve ark. 2004).



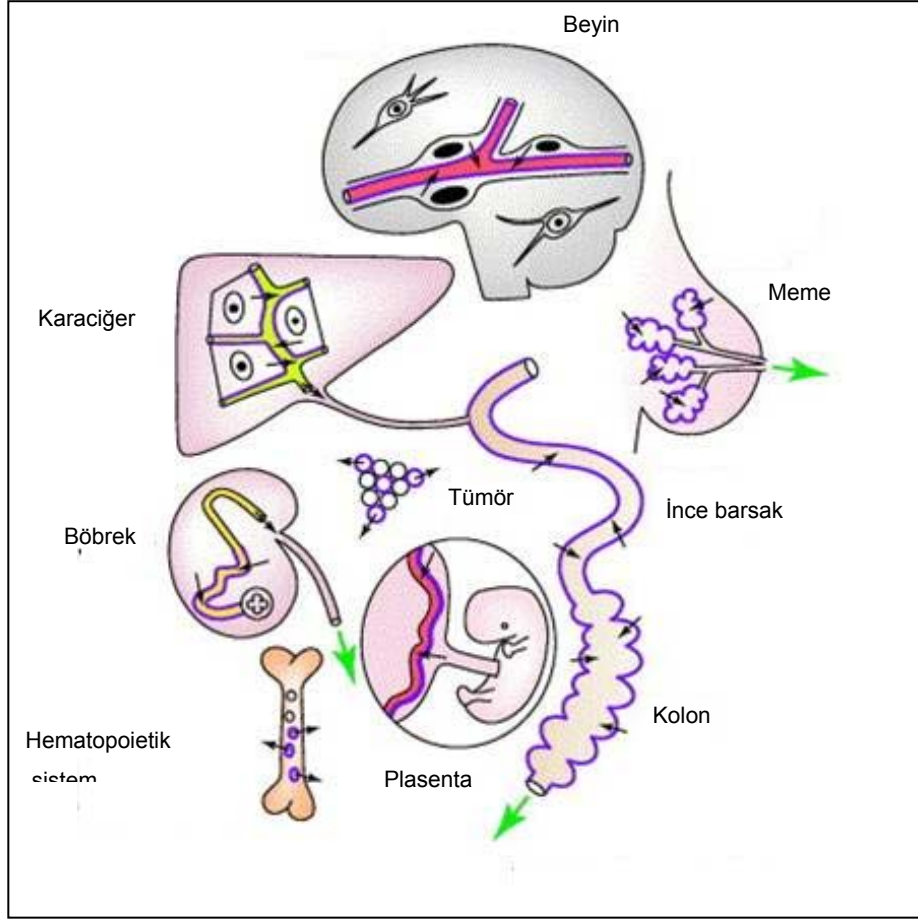
Şekil 2-7: BCRP'nin moleküler yapısı -Lin (2006)'den değiştirilerek

İnsandaki BCRP ve faredeki Bcrp1, hidrofobik bileşikler, zayıf bazlar, organik anyonlar ve birçok endojen ve eksojen moleküllerin glukuronid-, sulfat-, glutamat- ve glutatyon konjugatları da dahil geniş substrat seçiciliği olan yüksek kapasiteli bir taşıyıcı efluks proteinidir. BCRP ile P-gp ve MRP2 arasındaki substrat benzerliği oldukça fazladır (Fromm 2004, Breedveld ve ark. 2006, Borst ve Elferink 2002, Schinkel ve Jonker 2003, Doyle ve Ross 2003).

2.3.1. BCRP'nin Lokalizasyonu

Memeli dokularındaki BCRP'nin lokalizasyonunu belirlemek için hem RNA hem de protein düzeylerini gösteren birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. İmmünohistokimyasal ve/veya Western Blot analizleri için birçok monoklonal antikor bulunmaktadır. BCRP karaciğerde hepatositlerin safra kanaliküler membranı, ince barsak ve kolonun villus epitel hücrelerinin luminal membranları, plasental sinsitiotrofoblastların apikal membranı, kan-beyin bariyeri kapiller membranı, böbrek proksimal tübüler epitel hücrelerinin apikal membranı (özellikle farelerde), pankreasın

endokrin hücreleri, meme bezlerinin alveoler epitel hücrelerinin apikal membranları (özellikle gebeliğin son dönemleri ve laktasyonda), hemen hemen tüm dokuların venöz ve kapiller endotelial hücrelerinin membranlarında ve hematopoietik kök hücreler ve tümör hücrelerinde bulunmaktadır (Doyle and Ross 2003, van Herwaarden ve Schinkel 2006, Staud ve Pavlek 2005) (Şekil 2-8).



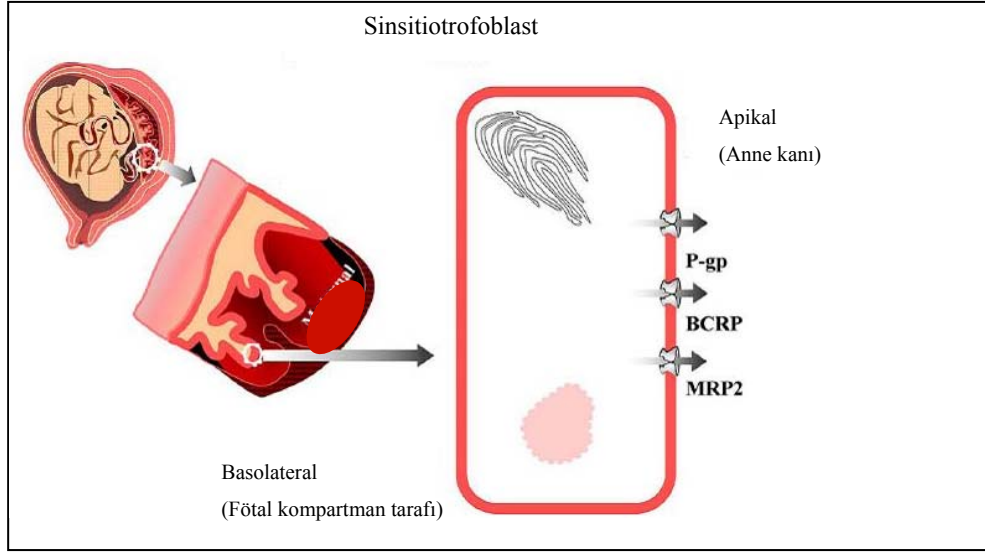
Şekil 2-8: BCRP'nin lokalizasyonu -van Herwaarden (2006)'den değiştirilerek

Yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda, BCRP ve Bcrp1'nin ince barsak ve kolonun epitel hücrelerinin apikal membranında eksprese olduğu gösterilmiştir (Scheffer ve ark. 2000, Maliepaard ve ark. 2001, Jonker ve ark. 2000) (Şekil 2-5). BCRP'nin ince barsaktaki lokalizasyonu, oral yoldan uygulanan BCRP substratlarının barsak epitelinden tekrar lümene atılması suretiyle absorpsiyonunu ve dolayısıyla oral biyoyarlanımlarını azaltırken, intravenöz yoldan uygulanan substratların da direkt olarak ince barsak lümenine atılarak eliminasyonlarına neden olmaktadır.

Hepatositler birçok endojen ve zenobiyotik bileşiğin taşınma, metabolizma ve atılımında önemli rol oynamaktadır. Bu bağlamda bir çok ABC taşıyıcı protein biliyer atılımı gerçekleştirmek için kanaliküler membranda eksprese olmaktadır (Şekil 2-3). Hepatositlerin kanaliküler membranında bulunan BCRP, substratların safra kanalikülerine aktif olarak taşınmasını sağlayarak ilaçların hepatobiliyer eliminasyonlarında önemli rol oynamaktadır (Doyle ve ark. 1998, Allen ve Schinkel 2002). Yapılan bir çalışmada karaciğerdeki Bcrp1 ekspresyonunun cinsiyete bağımlı olduğu gösterilmiştir. FVB ve 129/Ola fare soylarının her ikisinde de yetişkin erkek farelerde dişi farelere göre daha fazla eksprese olduğu gösterilmiştir. FVB farelerde cinsiyetler arasında Bcrp1 ekspresyonunda 2-3 kat farklılık görülmüştür. Sınırlı sayıda insan karaciğeri doku örneğinde yapılan analizler de BCRP ekspresyonunun erkeklerde dişilere göre daha fazla olduğunu göstermektedir (Merino ve ark. 2005).

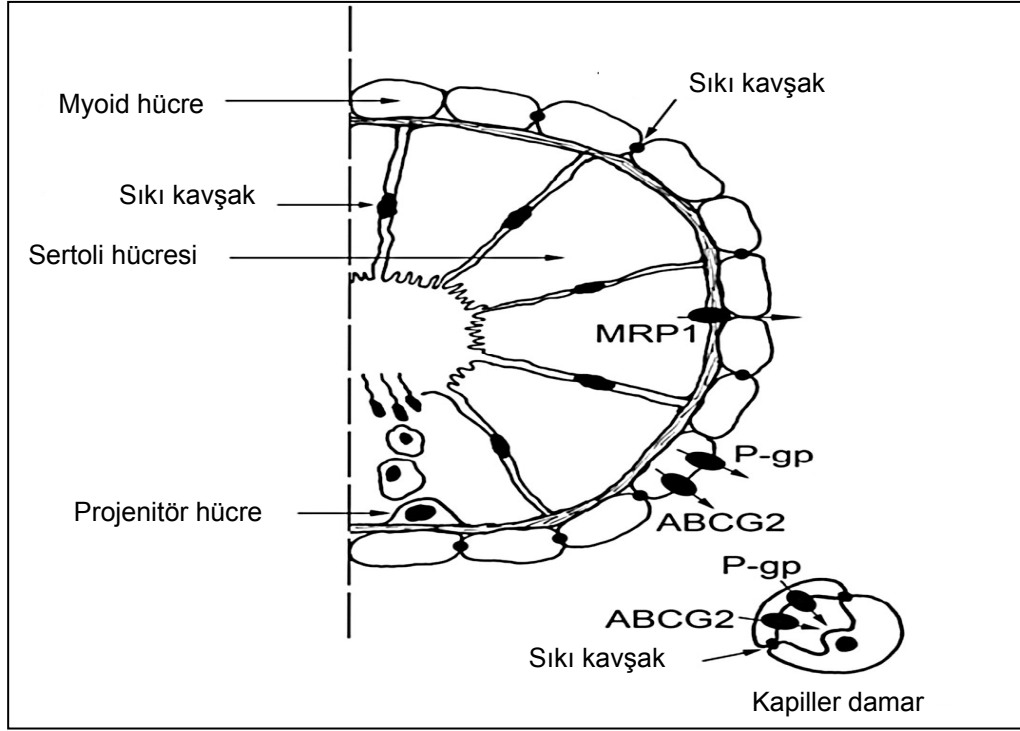
BCRP ve Bcrp1 beyinde kapillerlerin endotel hücrelerinin luminal membranında eksprese olmakta ve zenotoksinlerin ve substrat ilaçların beyine penetrasyonlarını sınırlandırmaktadır (Şekil 2-6). Oral olarak uygulanan BCRP inhibitörü elaklidarin, imatinibin beyine penetrasyonunu beş kat artırdığı gösterilmiş ve BCRP ve P-gp inhibitörleri ile birlikte uygulanan imatinibin beyin tümörlerine olan penetrasyonunun da artırılmasında yarar sağlanacağı öne sürülmüştür (Breedveld ve ark. 2006).

Plasentadaki sinsitiotrofoblastlar anne ve fetus kan dolaşımı arasındaki temel bariyerdir ve tüm besinler ve atıkların değişiminin olduğu hücre dizileridir. BCRP'nin, P-gp ve MRP2 gibi taşıyıcı proteinler ile birlikte plasentadaki sinsitiotrofoblastların apikal membranlarında eksprese olduğu ve ekspresyonun da anne ve fetus arasındaki madde alışverişini sınırlandırarak fetusu zenotoksinler ve ilaçlardan koruyan bir bariyer oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Mao 2008) (Şekil 2-9). Bcrp1 geni silinmiş gebe farelere uygulanan antineoplastik ilaç olan topotekanın fotal penetrasyonunun normal fareler ile karşılaştırıldığında iki kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (Jonker ve ark. 2002).



Şekil 2-9: BCRP'nin plasentadaki lokalizasyonu -Mao Q (2008)'den değiştirilerek

Testisler organizmadaki kan dolaşımından bariyer ile ayrılan diğer bir bölgedir. Yapılan immünohistokimyasal analizler BCRP'nin insanda testis kapillerlerinin endotel hücrelerinin luminal membranlarında eksprese olduğunu göstermektedir. Testis endotel hücreleri birbirlerine sıkı kavşaklar (tight junctions) ile tutunmuştur ve kan-testis bariyerini oluşturan devamlı bir hücre dizisi şeklindedir. Fakat testis kapiller endotel hücreleri beyindeki endotel hücreleri kadar birbirine sıkıca bağlı değildir ve bu bariyerin kan-beyin bariyeri gibi tam bir koruma sağladığı şüphelidir. BCRP ve P-gp seminiferus tüplerini saran myoid hücrelerinin apikal membranlarında da oldukça fazla eksprese olmaktadır. Her iki bölgedeki taşınma da seminiferus tübülünden dışarı doğru gerçekleşmekte ve bu da burada eksprese olan taşıyıcı proteinlerin fonksiyonunun gelişen germ hücrelerinin potansiyel zararlı maddelerden korunması yönünde olduğunu göstermektedir (Vlaming ve ark. 2009) (Şekil 2-10). Fare testisinde de Bcrp1 kapillerlerin endotel hücrelerinin luminal membranlarında eksprese olurken, myoid hücrelerinde ekspresyonu gösterilememiştir (Enokizono ve ark. 2007). Fare ve insan epididimisindeki Bcrp1/BCRP ekspresyonu değerlendirilmiş ve farelerde Bcrp1'in kapillerin endotel hücrelerinde ve testise yakın kısımlarında ise spermi içeren kanalların luminal ve abluminal membranlarında eksprese olduğu gösterilmiştir. İnsan epididimisinde ise BCRP'nin mRNA ekspresyonu gösterilmiş fakat immünohistokimyasal analizi henüz yapılmamıştır (Enokizono ve ark. 2007).



Şekil 2-10: BCRP'nin testislerdeki lokalizasyonu –Vlaming ve ark. (2009)'den değiştirilerek

BCRP/Bcrp1'in zenotoksinlerin süte aktif transportunda önemli rol oynadığı son zamanlarda gösterilen fonksiyonları arasında yer almaktadır. Bcrp1, farelerde özellikle gebeliğin sonlarında ve laktasyonda, meme epitel dokusunda süt üretiminin temel yeri olan alveoler epitel hücrelerinin apikal membranlarında eksprese olmaktadır. Bcrp1'in meme bezlerindeki fonksiyonel rolünün belirlenmesi için Bcrp1 substratı olduğu bilinen bir çok ilacın süte sekresyonları normal ve Bcrp1 geni silinmiş farelerde yapılan çalışmalarda değerlendirilmiştir. Uygulamalarını takiben topotekan ve karsinojen bir ajan olan PhIP normal farelerin sütünde yüksek oranda bulunurken Bcrp1 geni silinmiş farelerde süte sekresyonları bloke olmuştur. Daha önce süte yüksek oranda geçtiği bilinen asiklovir, simetidin ve nitrofurantoin gibi bazı ilaçların da Bcrp1 tarafından süte aktif olarak sekrete edildiği gösterilmiştir (Jonker ve ark. 2005, Merino ve ark. 2005).

2.3.2. Kök Hücrelerdeki BCRP/Bcrp1 Ekspresyonu

Bugüne kadar elde edilen kanıtlar, ABC taşıyıcı proteinlerin, hematopoietik kök hücrelerin ve muhtemelen diğer kök hücrelerin de korunmasında önemli rolü olduğunu

göstermektedir. Bu hücrelerdeki ABC taşıyıcı proteinlerin varlığı, hücrelerin rodamin 123 ve Hoechst 33342 gibi fluoressan boyalarla muamele edildikten sonra düşük fluoressans göstermeleri sonucu ortaya konmuştur. Hematopoietik kök hücreleri Hoechst 33342 taşınması ile karakterizedir ve buna göre flowsitometri ile izolasyonlarında “side populasyon” (SP) olarak ayrılıp tanımlanırlar (Goodell ve ark. 1996). İlk olarak Zhou ve ark. (2001) fare ve sıçan hematopoietik kök hücrelerinde, Scharenberg ve ark. (2002) ise insan kök hücrelerinde Hoechst boyasının BCRP/Bcrp1 tarafından taşındığını göstermişlerdir. BCRP normal hematopoiesis için gerekli değildir çünkü Bcrp1 geni silinmiş farelerde hematolojik bozukluklar görülmemiştir (Zhou ve ark. 2002, Jonker ve ark. 2002). Fakat, hematopoietik projenitör hücrelerdeki Bcrp1 ekspresyonunun fizyolojik fonksiyonunun bu hücrelerin sitotoksik maddelerden korunması yönünde olduğu gösterilmiştir. (Zhou ve ark. 2003).

Krishnamurthy ve ark. (2004) Bcrp^{+/+} ve Bcrp^{-/-} projenitör hücreler ile yaptıkları çalışmada, Hem moleküllerinin (porfirinler) hipoksi şartlarında Bcrp^{-/-} projenitör hücrelere zarar verdiğini göstermişlerdir. BCRP spesifik olarak Hem moleküllerine bağlanmakta ve hücre dışına taşınmasına neden olmaktadır. BCRP yokluğunda hücrelerde porfirinlerin akümüasyonlarında artış görülmektedir. Hipoksik şartlarda Bcrp1 ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Bu da, hücrelerin BCRP’yi Hem/porfirin akümüasyonunu azaltmak için kullandığını göstermektedir ve BCRP, hücrelere hipoksik şartlar altında güçlü bir sağkalım avantajı sağlamaktadır. Bu bulgular, bir çok tümör kitlesinin hipoksik bir ortam oluşturduğu göz önüne alındığında, BCRP’nin bu hücrelerde de regülasyonunun artmış olabileceğini düşündürmektedir.

2.3.3. BCRP’nin Kanserdeki Klinik Önemi

İnsandaki neoplazmlarda ABC taşıyıcı proteinlerinin rollerinin belirlenmesi amacıyla bir çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar, çoklu ilaç rezistansının klinikteki rollerinin aydınlatılması ve ekspresyonlarının zayıf prognozun bir işareti olabileceğinin gösterilmesi yönündedir. İlk olarak Ross ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada, lösemi hastalarından alınan kan hücreleri ve kemik iliği örneklerinde ABCG2 ekspresyonu gösterilmiştir. 20 akut miyelositer lösemi (AML) ve bir akut lenfotik lösemi (ALL) hastasının örnekleri incelenmiş ve 7 örnekte yüksek oranda ekspresyon gösterilmiş ve ekspresyonda 1000 kat oranında değişen varyasyon tespit

edilmiştir. Bu ilk raporda ABCG2 ekspresyonunun lösemide klinik prognoz bakımından önemli bir faktör olabileceği öne sürülmüştür. Bunun yanında, başka bir çalışmada AML’de bir önceki çalışmada olduğu gibi yüksek ABCG2 ekspresyonu gösterilmişken (Galimberti ve ark. 2004) diğer bir çalışmada ise daha düşük ekspresyon düzeyleri rapor edilmiştir (van Der Kolk ve ark. 2002, , van Der Pol ve ark. 2003). Uggla ve ark. (2005) tarafından yürütülen bir çalışmada ABCG2 ekspresyonu ile tedaviye yanıt arasında korelasyon gösterilmiş iken, diğer bir çalışmada ekspresyon ve tedaviye yanıt arasında korelasyon bulunmadığı rapor edilmiştir (Abbott ve ark. 2002).

ABCG2’nin, ALL’de görülen ilaç rezistansında rol oynayabileceği de öne sürülmektedir. Fakat, Steinbach ve ark. ABCG2 ekspresyonu ile prognoz arasında korelasyon olduğunu göstermişken (Steinbach ve ark. 2002), Sauerbrey ve ark. çocuklarda görülen ALL’ de böyle bir korelasyon bulamamışlardır (Sauerbrey ve ark. 2002). Bu çalışmaların sonuçları Tablo 2.3’de gösterilmektedir.

Lösemide görülen ilaç rezistansında BCRP’nin rolünün net olarak ortaya konması için daha fazla örnekte BCRP ekspresyonunun değerlendirildiği daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca bu çalışmalarda ilaç rezistansı oluşumunda rolü olan P-gp ekspresyonu da tek başına ve BCRP ile birlikte değerlendirmelidir.

Tablo 2.4’de solid tümörlerde BCRP’nin ekspresyonlarının değerlendirildiği çalışmalar gösterilmektedir. Yapılan bir çalışmada, herhangi bir tedavi görmemiş hastalardan izolasyonu yapılmış parafinli 150 tümör örneğinde BCRP ekspresyonu değerlendirilmiştir. Özellikle sindirim kanalı, endometrium, akciğer ve melanoma kaynaklı tümörlerde sıklıkla BCRP ekspresyonu bulunmuştur (Kanzaki ve ark. 2001).

Üzerinde en çok çalışılan tümör tipi olan meme kanserinde Kanzaki ve ark. (2001) ve Faneyte ve ark.’na (2002) göre BCRP ekspresyonu relatif olarak düşüktür ve tedaviye yanıt ile arasında bir korelasyon görülmemiştir. Burger ve ark. yaptığı çalışmada (2003) antrasiklinler ile tedavi edilen hastalarda tedaviye yanıt ile BCRP ekspresyonu arasında korelasyon bulunmuştur. Yoh ve ark. (2004) tarafından yürütülen bir başka çalışmada ise küçük hücreli olmayan akciğer kanserindeki BCRP ekspresyonu ile platin bazlı kemoterapi alan hastalardaki tedavinin başarısızlığı arasında korelasyon gösterilmiştir. Fakat bu iki çalışmada da ilginç olan taraf antrasiklinlerin ve platin bileşiklerinin BCRP tarafından taşınmamasıdır (Robey ve ark. 2003). Friedrich ve ark. (2004) tarafından yürütülen bir çalışmada artmış olan BCRP ekspresyonunun, oral

skuamoz hücre kanserinde diferansiyel kaybı ve daha kısa sağkalım ile korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır. Testiküler tümörlerde yapılan çalışmalarda, BCRP ekspresyonu ile tedaviye yanıtta korelasyon bulunamıştır (Zurita ve ark. 2003, Diestra ve ark. 2003).

Tablo 2-3: Lösemi çalışmalarındaki BCRP ekspresyonunun gösterildiği klinik raporların özetleri- Robey ve ark. (2007) 'den değiştirilerek

Çalışma	Metod	Örnekler	Bulgular
<i>Akut Miyeloblastik Lösemi (AML)</i>			
Sargent ve ark. 2001	İmmünohistokimya	20 blast örneği	20 örneğin 6 sında (%27) BCRP pozitif
Van der Kolk ve ark. 2002	Flowsitometri	20 örnek	AML'de düşük BCRP ekspresyonu.
Abbott ve ark. 2002	RT-PCR	40 de novo örnek	AML'de yüksek BCRP düzeyleri. BCRP ekspresyonu ile tedaviye yanıt arasında korelasyon yok
Van Den Huevel-Ebrink ve ark. 2002	RT-PCR	20 de novo ve tekrarılan AML örneği	Hastalığıdaki hücreler ile karşılaştırıldığında tekrarlayan örneklerinde daha yüksek BCRP ekspresyonu. BCRP ekspresyonu ile P-gp ekspresyonunda ilişki yok
van der Pol ve ark. 2003	Flowsitometri	45 örnek	Örneklerin hemen hepsinde BCRP fonksiyonu bulunmamış. Terapi sonrası ekspresyonda bir değişiklik yok
Galimberti ve ark. 2004	RT-PCR	51 AML örneği	Örneklerin %56'sında BCRP ekspresyonu gösterilmiş, %48.2'sinde orta düzeyde ekspresyon görülmüştür. BCRP ekspresyonu P-gp ile ilişkilidir
Suvannasankha ve ark. 2004	RT-PCR Flowsitometri	31 tedavi öncesi blast örneği	AML örneklerinde fonksiyon ile protein veya gen ekspresyonu arasında korelasyon yok.
Benderra ve ark. 2004	RT-PCR	149 de novo örnek	Tam gerileme, 4-yıllık hastalık serbest sağkalım ve 4 yıllık toplam sağkalım BCRP ekspresyonu ile ilişkili. Daunorubisin ve mitoksantron alan hastalarda prediktif iken idarubisin alan hastalarda değil

Tablo 2-3-Devamı: Lösemi çalışmalarındaki BCRP ekspresyonunun gösterildiği klinik raporların özetleri- Robey ve ark. (2007)'den değiştirilerek

Çalışma	Metod	Örnekler	Bulgular
Ugla ve ark. 2005	RT-PCR	40 AML örneği	Tedaviye yüksek BCRP ekspresyonu ile yanıt veren hastalarda daha kısa toplam sağkalım. Tedaviye cevap veren hastalar ile vermeyenler arasında korelasyon yok.
<i>Akut lenfotik Lösemi (ALL)</i>			
Sauerbrey ve ark. 2002	RT-PCR	47 de novo örnek 20 tekrarlanmış AML örneği 59 tedavi edilmemiş AML	T-tipi hücrelerde daha düşük ekspresyon. Ekspresyon ile yanıt arasında korelasyon yok.
Stenbach ve ark. 2002	RT-PCR	9 tekrarlanmış AML örneği	Yanıt veren hastalara göre remisyon olan hastalarda 10 kat daha fazla ortalama BCRP düzeyleri
Plasschaert ve ark. 2004	Flowsitometri	46 <i>de novo</i> örnek	Daha yüksek gen ekspresyonu daha yüksek fonksiyon ile ilişkili.
Stam ve ark. 2004	RT-PCR	13 örnek (yenidoğandan) 13 örnek	Yenidoğanlardan alınmış örneklerde 2.4 kez daha az BCRP ekspresyonu. Ekspresyon Ara-C rezistansı ile korelasyonlu fakat ilaç substrat değil.
Suvannasankha ve ark. 2004	RT-PCR Flowsitometri	30 tedavi edilmemiş örnek	Vakaların %43'ünde BXP-21 pozitif hücre. Vakaların %70'inde mitoksantron taşınması. BXP-21 pozitifliği daha kısa sağkalımın göstergesi

Tablo 2-4: Solid tümör çalışmalarındaki BCRP ekspresyonunun göstereildiği klinik raporların özetleri- Robey ve ark. (2007)'den değiştirilerek

Çalışma	Kanser	Metod	Örnekler	Bulgular
Scheffer ve ark. 2000	Çeşitli	İmmünohistokimyasal	34 parafinlenmiş, çeşitli kanser tiplerinden tedavi edilmemiş örnek	Sadece 1 ince barsak adenokarsinoma örneğinde pozitif BCRP ekspresyonu
Diestra ve ark. 2002	Çeşitli	İmmünohistokimyasal	150 parafinlenmiş, çeşitli kanser tiplerinden tedavi edilmemiş örnek	BCRP'nin ekspresyonunda sıklık. En yüksek düzeyler sindirim kanalı, endometriyum, akciğer ve melanoma kaynaklı tümörlerde.
Kanzaki ve ark. 2001	Meme	RT-PCR	43 tedavi edilmemiş meme karsinoma hücreleri	Düşük BCRP ekspresyonu. P-gp, MRP1 veya LPR ekspresyonu ile korelasyon yok. Klinik sonuç ile korelasyon yok.
Faneyte ve ark.2002	Meme	RT-PCR	25 primer meme karsinoma, 27 tümör örneği-preop antrasiklin tedavisi	PCR'da ekspresyonda geniş varyasyon ve immünohistokimyasal olarak tayin edilememiştir. Tedavi edilmiş ve edilmemiş tümör örneklerinde fark yok. Sağkalımda korelasyon yok.
Burger ve ark.2003	Meme	RT-PCR	59 primer meme tümör örneği	BCRP ve P-gp ekspresyonu antrasiklin ile tedavi edilmiş hastalardaki yanıt ile korelasyonlu.
Kawabata ve ark. 2003	NSCLC	RT-PCR Flowsitometri	23 tedavi edilmemiş küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri	5 örnekte (%23), topotekan rezistanslı NCI-H441 akciğer kanseri tümörü hücrelerinden daha yüksek BCRP ekspresyonu.
Yoh ve ark. 2004	NSCLC	İmmünohistokimyasal	72 formalin ile fikse edilmiş örnek	BCRP pozitif örneklerde, platinum bazlı tedaviye daha düşük cevap ve daha kısa PFS.

Tablo 2-4-Devamı: Solid tümör çalışmalarındaki BCRP ekspresyonunun göstereildiği klinik raporların özetleri- Robey (2007) 'den değiştirilerek

Çalışma	Kanser	Metod	Örnekler	Bulgular
Zurita ve ark. 2003	Testiküler kanser germ hücreli	İmmünohistokimyasal	56 parafinlenmiş, <i>de novo</i> örnek	Örneklerin %7sinde yüksek ve orta derecede BCRP ekspresyonu. Tedaviye yanıtta korelasyon yok.
Bart ve ark. 2004	Testiküler tümörler	İmmünohistokimyasal	10 non-seminoma, 10 seminoma ve 9 testiküler lenfoma vakası	Seminoma ve non-seminomalarda BCRP ekspresyonu varken lenfomalarda yok. BCRP eksprese eden tüm tümörlerde yeni oluşmuş damarlar.
Diestra ve ark. 2003	Mesane kanseri	İmmünohistokimyasal	83 lokal olarak ilerlemiş mesane tümörü	Örneklerin %28'inde BCRP ekspresyonu pozitif. Prognostik olarak önemi yok.
Friedrich ve ark. 2004	Oral skuamos hücreli karsinoma	İmmünohistokimyasal RT-PCR	45 primer tümör örneği	Hastalığın III. ve IV. evresi arasında 2.4 kat artmış BCRP ekspresyonu. Artmış BCRP ekspresyonu diferensiasyon kaybı ve daha kısa sağkalım ile ilişkilidir. P-gp ile orta düzeyde ilişki.
Aust ve ark. 2004	Safra kesesi karsinomu	İmmünohistokimyasal	41 tedavi edilmemiş safra kesesi karsinom örneği	41 örneğin 11 inde güçlü BCRP ekspresyonu.
Glasgow ve ark. 2005	Kolorektal kanser	RT-PCR	21 mukozal kolorektal tümör, 30 non-mukozal kolorektal tümör	Mukozal ve non-mukozal tümör örnekleri arasında BCRP ekspresyonunda farklılık yok.
Konig ve ark. 2005	Pankreatik karsinoma	RT-PCR	31 pankreatik karsinoma örneği	Normal ve kanserli doku arasında BCRP ekspresyonunda farklılık yok.
Deichmann ve ark. 2005	Melanoma	İmmünohistokimyasal RT-PCR	50 primer kutanöz melanoma, 29 nöroendokrin cilt karsinomu, 10 dermatofibrosarkoma örneği	Hücrelerin tek seferlik kültürlerinde 29 nöroendokrin tümörlerinin üçünde orta derece BXP-21 pozitifliği. 16 melanoma metastazı

2.3.4. BCRP substratları

BCRP çok çeşitli ilaçları taşıyabilme kapasitesine sahiptir. Kansere tedavisinde etkin olarak kullanılan birçok kemoterapötik BCRP tarafından etkili bir şekilde hücre dışına atılmaktadır. Mitoksantron (Miyake ve ark. 1999), topotekan (Allen ve ark. 1999), irinotekan (Schellens ve ark. 2000) ve metaboliti SN-38 (Kawabata ve ark. 2001), diflomotekan (Krishnamurty ve ark. 2006), metotreksat (Volk ve ark. 2002), etoposid ve teniposid gibi epipodofilotoksinler (Allen ve ark. 2003), imatinib (Burger ve ark. 2004), gefitinib (Elkind ve ark. 2005) ve muhtemelen nilotinib (Brendel ve ark. 2007) gibi tirozin kinaz inhibitörleri, flavopiridol (Robey ve ark. 2001) gibi diğer kinaz inhibitörleri, 9-aminokamptotesin (Brangi ve ark. 1999), bisantren (Rabindran ve ark. 1998), doksorubisin, daunomisin, daunorubisin, epirubisinin (Brangi ve ark. 1999) BCRP tarafından etkin olarak taşındığı gösterilmiştir. Bunun yanında bir çok etkin madde ve doğal bileşiklerin de BCRP tarafından taşındığı gösterilmiştir. Bunlar, zidovudin (Wang ve ark. 2004), lamivudin (Wang ve ark. 2003), ve abakavir (Pan ve ark. 2007) gibi antiviral ilaçlar, genistein ve kuersetin gibi flavanoidler (Cooray ve ark. 2004, Yoshikawa ve ark. 2004, Zhang ve ark. 2004), feoforbid A ve protoporfirin IX gibi porfirinler (Robey ve ark. 2004), PhiP (2-amino-1-metil-1-6-fenil-imidazol[4,5-b]piridin) gibi kanserojenler (van Herwaarden 2006), bazı antibiyotikler (Merino 2006), 17-beta-östradiol sülfat ve dipiridamol gibi konjuge steroidler (Imai ve ark. 2003, Zhang ve ark. 2005), Hoechst 33342 (Zhou ve ark. 2002) ve Rhodamine 123 (Doyle ve ark. 1998) gibi fluoressan boyalar olarak özetlenebilir (Tablo 2-5).

2.3.5. BCRP İnhibitörleri

Son zamanlarda BCRP'nin fonksiyonel çalışmalarının yanında BCRP'yi inhibe edebilecek olası bileşikler de araştırılmaktadır. Bu araştırmalar, yüksek oranda BCRP ekspresyonunun olduğu kanser hücrelerinde kemoterapötik ajanların hücre içi düzeylerini artırmak suretiyle sitotoksik etkilerini artırmak, klinik ilaç rezistansını azaltmak ve özellikle barsaklardan çok az absorbe olan antineoplastik ilaçların biyoyararlanımlarını artırarak oral yoldan kullanılabilir hale getirmek amacıyla gerçekleştirilmektedir. Fakat, BCRP'nin organizmadaki geniş dağılımı ve farklı

fonksiyonları göz önüne alındığında, inhibitörlerin diğer substratların farmakokinetiğini değiştirmek suretiyle toksik etkilerin görülmesine neden olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Normal şartlarda BCRP tarafından korunan hücrelerde hipersensitizasyona neden olabileceği için inhibitörlerin klinikte sistemik olarak kullanımında oldukça dikkatli olunmalıdır (Krishnamurthy ve Schuet 2006, Staud ve ark. 2005).

BCRP'nin ilk olarak rapor edilen spesifik inhibitörü fumitremorgin C (FTC) olmuştur (Rabindran ve ark. 1998). FTC, *Aspergillus fumigatis* 'in et suyundaki fermantasyonundan izole edilen bir diketopiperazindir. Rabindran ve ark. tarafından S1-M1-3.2 kolon kanseri hücre dizisinde, hücrelerdeki ilaç akümüleyonunu etkili bir şekilde arttırdığı ve mitoksantron rezistansını inhibe ettiği gösterilmiştir. FTC, temel farmakoloji çalışmalarında oldukça sık kullanılmasına rağmen nörotoksik etkileri nedeniyle klinikte kullanılmamaktadır. FTC'nin inhibe edici etkisinden yola çıkılarak birçok FTC analogu bileşik sentezlenmiş ve *in vitro* olarak test edilmiştir. Ko 143'ün oldukça potent bir BCRP inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Farelere yüksek dozda oral ve intraperitoneal yoldan uygulanması sonucu herhangi bir toksik etki görülmemiş ve farelerde topotekanın oral biyoyararlanımını anlamlı olarak arttırmıştır (Allen ve Schinkel 2002).

Triprostatin A (TPS-A), FTC analogu olan diğer bir fungal metabolittir. Woehlecke ve ark. tarafından, mitoksantronun hücre içine akümüleyonunun ve sitotoksitesinin değerlendirildiği *in vitro* çalışmalarda, TPS-A'nın BCRP inhibitörü olduğu gösterilmiştir (Woehlecke ve ark. 2003).

Flavonoidler de son zamanlarda BCRP inhibitörleri olarak sürekli gelişen bir sınıfı teşkil etmektedir. Silimarin, hesperetin, kuersetin ve daidzein gibi flavonoidlerin BCRP'yi eksprese eden hücrelerde, mitoksantronun hücre içi akümüleyonunu artırdığı gösterilmiştir (Cooray ve ark. 2004). Biokanin A, krisin ve tektokrisin mitoksantrona dirençli MCF7 ve NCI-H460 hücrelerinde en etkin olan flavonoidlerdir. Rölatif olarak daha az toksik olan tektokrisin ve 6-prenilkrisinin hücrelerde mitoksantrona olan rezistansın azaltılmasındaki etkinliği, bu bileşiklere klinik çalışmalarda kullanılması için potansiyel yaratmaktadır (Katayama ve ark. 2007). Genistein, naringenin, akasetin ve kamferolün de BCRP'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (Imai ve ark. 2004).

Streptomyces niveus tarafından üretilen ve metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* ve ayrıca *Staphylococcus epidermidis*'e karşı etkin bir antibakteriyel ajan olan novobiosin, MCF7/TPT300 hücrelerinde topotekanın efluksunu inhibe etmiş ve hücre akümülyasyonunu artırmıştır. Ayrıca bu hücrelerde topotekan ve mitoksantronun toksisitesini de artırmıştır (Yang ve ark. 2003).

BCRP için substrat olan birçok ilaç aynı zamanda P-gp ile de taşınmaktadır. Bu nedenle P-gp'yi inhibe eden birçok bileşiğin BCRP inhibitörü olup olmadığı da değerlendirilmiştir. İlk olarak değerlendirilen bileşik P-gp inhibitörü olarak geliştirilmiş olan GF120918 (elaklidor) olmuş ve yapılan çalışmalarda BCRP'nin de etkin bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir (Bruin ve ark. 1999). Elaklidorun moleküler yapısı temel alınarak analogları geliştirilmiştir. Bunlardan bir tanesi olan tarikidor (XR9576) BCRP bağımlı taşınmayı inhibe etmiştir (Robey ve ark. 2004).

İmmünosupresif bir ajan olan siklosporin A'nın da BCRP inhibitörü olduğu BCRP'yi eksprese eden hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Quadir ve ark. 2005, Gupta ve ark. 2006).

Üzerinde çok çalışılan diğer bir grup da antiviral ilaçlardır. CD4+ hücre dizilerindeki BCRP ekspresyonunun, nükleozit ters transkriptaz inhibitörlerine karşı rezistansa neden olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada BCRP, AIDS hastalarında tedavinin etkinliğinin artırılması amacıyla hedef olarak değerlendirilmiştir (Wang ve ark. 2005). Anti-HIV ilaçların BCRP aktivitesi üzerine olan etkileri, insan BCRP taşıyıcı proteini eksprese etmeyen parental MDCKII hücreleri ile karşılaştırılarak, MDCKII-ABCG2 hücrelerindeki feoforbid A akümülyasyonundaki artış ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, lopinavir ve nelfinavir en etkin BCRP inhibitörü olarak bulunurken, azitromisin düşük inhibisyon aktivitesi göstermiştir (Weiss ve ark. 2007).

Tablo 2-5: BCRP'nin substrat ve inhibitörleri

Substrat	İnhibitör
Mitoksantron	Fumitremorjin C
Daunorubisin	Ko 143
Doksorubisin	Siklosporin A
Epirubisin	Gefitinib
Bisantren	İmatinib
Flavopiridol	Elakridar (GF120918)
Etoposid	Tarikidar (XR9576)
Teniposid	Birikodar
9-aminokamptotesin	Krisin
Topotekan	6-prenilkrisin
İrinotekan	Tektokrisin
SN-38	Naringenin
Diflomotekan	Kuersetin
Metotreksat	Asesetin
İmatinib	Slimarin
Gefitinib	Genistein
CI1033	Novobiosin
Feoforbid	Estron
Pirofeoforbid	17-beta estradiol
Protoporfirin IX	

Tirozin kinaz inhibitörleri de yeni sınıf BCRP inhibitörleri olarak son zamanlarda ortaya çıkmaktadır. Hidrofobik tirozin kinaz inhibitörleri BCRP gibi ATP-bağımlı aktif taşıyıcılar ile etkileşimde yüksek potansiyele sahiptir. BCRP'nin yüksek ekspresyonunun birçok kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan imatinib mesilata karşı oluşan dirençte rolü olduğu gösterilmiştir (Houghton ve ark. 2004). Bunun yanında BCRP'nin CI1033, gefitinib ve imatinibin taşınmasından sorumlu olduğu ve bu ilaçlara karşı gelişen dirençte rolünün olduğu gösterilmiştir (Erlichman ve ark. 2001, Elkind ve ark. 2005, Burger ve ark. 2004).

2.3.6. ABCG2 Geni Silinmiş Farelerde Yapılan Çalışmalar

BCRP'nin fizyolojik ve farmakolojik fonksiyonlarının değerlendirilmesi için birbirinden bağımsız olan iki çalışma grubu tarafından ABCG2 geni silinmiş *Bcrp1* knockout fareler (*Bcrp1*^{-/-}) geliştirilmiştir (Jonker ve ark. 2002, Zhou ve ark. 2002).

Bcrp1^{-/-} fareler normal şartlarda üreyebilmekte, yaşam döngüleri ve vücut ağırlıkları normal farelere göre farklılık göstermemektedir. *Bcrp1*^{-/-} farelerde, plazmadaki klinik biyokimya analizlerinde normal farelere göre herhangi bir değişiklik

görülmezken safranın rengi kırmızımsıdır. Safranın rengindeki bu farklılık diyet ile aldıkları klorofil kaynaklıdır. Bu farelerde normalden farklı gözle görülebilen bir fenotipik sapma görülmezken, bazı farelerde nekrotik kulak lezyonları gelişmiştir. Yapılan detaylı incelemeler sonucu bu lezyonların fototoksositeye bağlı olduğu ve özellikle fototoksik yem ile beslenen ve floresan ışığa direkt maruz kalan hayvanlarda 1 hafta gibi kısa bir sürede geliştiği tespit edilmiştir. Diyet kaynaklı fotosensitizasyon çok yaygın görünen bir durumdur. İlaçlar ve pestisitlerin dahil olduğu bir çok kimyasalın yanısıra bitki ve mantar kaynaklı doğal toksinlerin fotosensitizasyona neden olduğu gösterilmiştir. Farelerin standart yemlerinde bitkisel bir fotoksik madde olan alfalfa (*Medicago sativa*) bulunmaktadır ve bu maddenin *Bcrp1*^{-/-} farelerde fototoksositeye neden olduğu sonucuna varılmıştır (Jonker ve ark. 2002).

Aynı yılda Zhou ve ark. tarafından da *Bcrp1*^{-/-} fareler geliştirilmiştir. Bu farelerde de normal fareler ile kıyaslandığında yaşamsal önemi olan bir farklılık gözlenmemiştir. Fakat, bu farelerin hematopoietik hücrelerinin Hoechst 33342 boyası ile tanımlanamadığı ve mitoksantrona karşı artmış bir hassasiyet olduğu gözlenmiştir (Zhou ve ark.2002).

Jonker ve ark. ilk olarak geliştirdikleri *Bcrp1*^{-/-} farelere oral yoldan topotekan uygulamışlar, biyoyararlanımını ve fetal akümülyasyonunu değerlendirmişlerdir. *Bcrp1*^{-/-} farelerde topotekanın oral biyoyararlanımı kontrol grubuna göre 6 kat daha fazla olmuştur. Fetusa olan akümülyasyonun değerlendirilmesinde, P-gp'nin etkisini elimine etmek için, *Bcrp*^{+/-} fareler ile *Mdr1a/b*^{-/-} farelerin çaprazlanması sonucu gelişen fetuslarda topotekan analizi yapılmıştır. Fetustaki topotekan konsantrasyonunun annenin plazma konsantrasyonuna olan oranı, *Bcrp1*^{-/-} fetuslarda *Bcrp1*^{+/+} fetuslara göre yaklaşık 2 kat daha fazla iken, *Bcrp1*^{+/-} fetuslarda orta düzeyde bir akümülyasyon görülmüştür (Jonker ve ark. 2002).

Breedveld ve ark., MTX ve pantoprazol arasındaki farmakokinetik etkileşmenin mekanizmasını aydınlatmak amacıyla *Bcrp1*^{-/-} farelerin kullanıldığı bir çalışma yürütmüşlerdir. Normal ve *Bcrp1*^{-/-} farelere i.v. yoldan MTX ve pantoprazol uygulanmıştır. İ.v. pantoprazol uygulaması normal farelerde MTX'in AUC değerlerini yaklaşık 2 kat artırmışken, *Bcrp1*^{-/-} farelerdeki MTX'in AUC değerleri değişmemiştir. Pantoprazol uygulaması normal farelerde MTX'in klirensini yaklaşık 2 kat azaltmış ve bu değer *Bcrp1*^{-/-} farelerdeki ile aynı seviyede olmuştur. Fakat MTX klirensi *Bcrp1*^{-/-}

farelerde pantoprazol uygulaması sonucu değişmemiştir. Yapılan diğer analizler pantoprazolün MTX'in klirensini *Bcrp1*'i inhibe ederek MTX'in hepatobiliyer atılımını etkilemek suretiyle azalttığını göstermiştir (Breedveld ve ark. 2004).

Herwaarden ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, 1 mg/kg dozda [¹⁴C]PhIP normal ve *Bcrp1*^{-/-} farelere oral ve i.v. yoldan uygulanmıştır. Oral ve i.v. uygulama sonrası [¹⁴C]PhIP plazma AUC değerleri *Bcrp1*^{-/-} farelerde normal farelere göre sırasıyla 2.9 ve 2.2 kat daha fazla olmuştur. Safra kesesi kanülasyonu yapılmış normal ve *Bcrp1*^{-/-} farelere i.v. olarak [¹⁴C]PhIP uygulanmıştır. [¹⁴C]PhIP'nin hepatobiliyer ve direkt intestinal atılımı *Bcrp1*^{-/-} farelerde normal farelere göre oldukça azalmıştır. Bu veriler *Bcrp1*'nin, PhIP'nin ince basaklardan absorpsiyonunu azaltırken, biliyer ve intestinal eliminasyonunu arttırdığını göstermektedir. PhIP'nin besinlerde oldukça bol bulunan bir kanserojen madde olduğu göz önüne alındığında, BCRP'nin normal besinlerle alınması muhtemel toksik maddelerden vücudu korumada önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır (van Herwaarden ve ark. 2003).

Merino ve ark. BCRP ekspresyonunun cinsiyetler arasındaki farklılığını ve bunun nitrofurantoin, [³H]simetidin, [¹⁴C]topotekan ve [¹⁴C]PhIP'nin farmakokinteğine olan etkisini dişi ve erkek *Bcrp1*^{-/-} farelerde incelemişlerdir. Oral yoldan nitrofurantoin uygulamasını takiben normal ve *Bcrp1*^{-/-} farelerin plazma konsantrasyonları arasındaki farklılık, erkek farelerde (3.3 kat) dişi farelere göre (1.6 kat) daha fazla olmuştur. İ.v. olarak uygulanan [³H]simetidin, [¹⁴C]topotekan ve [¹⁴C]PhIP'nin 30 dakika sonra plazmadaki değerleri, normal dişi farelerde erkeklere göre daha fazla olurken, *Bcrp1*^{-/-} farelerde cinsiyetler arasında farklılık görülmemiştir (Merino ve ark. 2005).

Merino ve ark. tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise *Bcrp1*^{-/-} farelerde fluorokinolon türevi bir antibiyotik olan siprofloksazinin farmakokinetiği değerlendirilmiştir (Merino ve ark. 2006). Oral yoldan uygulamayı takiben 15. dakikada *Bcrp1*^{-/-} farelerdeki plazma siprofloksazinin düzeyleri, normal farelere göre 2 kat artmıştır (p<0,01). İ.v. uygulama sonrasındaki plazma AUC değerleri ise normal farelere göre *Bcrp1*^{-/-} farelerde 1,5 kat daha fazla olmuştur (p<0,05). Ayrıca siprofloksazinin süte atılımında BCRP'nin rolünü değerlendirmek amacıyla laktasyon dönemindenki *Bcrp1*^{-/-} ve normal farelere i.v. olarak siprofloksazinin uygulanmış ve 10 dakika sonrasında sütteki ve plazmadaki konsantrasyonları tayin edilmiştir. Siprofloksazinin sütteki

konsantrasyonu *Bcrp1*^{-/-} farelerde normal farelere göre 2 kat daha az olmuş, süt-plazma konsantrasyonu oranı da normal farelerde *Bcrp1*^{-/-} farelerden 2 kat daha fazla olmuştur.

Önemli bir nutrisyon olan riboflavinin (vitamin B₂) BCRP/Bcrp1'in substratı olduğu ve aktif olarak taşındığı *in vitro* olarak gösterilmiştir. *Bcrp1*^{-/-} fareler kullanılarak yapılan *in vivo* çalışmada ise Bcrp1'nin bu farelerde diyet ile alınan riboflavinin plazma konsantrasyonunu ve doku dağılımını sınırlandırdığı ve *Bcrp1*^{-/-} farelerde riboflavinin kararlı durum süt sekresyonunun normal farelere göre 60 kat azalmış olduğu gösterilmiştir. Buna rağmen *Bcrp1*^{-/-} farelerin yavrularında laboratuvar koşullarında riboflavin eksikliğine bağlı herhangi bir semptom görülmemiştir. Bu da Bcrp1 tarafından süte sekrete olan riboflavinin emen yavruların sağlığında çok da önemli bir faktör olmadığını göstermektedir (van Herwaarden ve ark. 2007).

Fitoöstrojen olarak bilinen daidzein, genistein ve kumestrolün farmakokinetiğindeki BCRP'nin rolü Enokizono ve ark. tarafından *Bcrp1*^{-/-} ve normal fareler kullanılarak değerlendirilmiştir. Oral yoldan uygulanmalarını takiben, daidzein ve genisteinin plazma AUC değerleri normal fareler göre sırasıyla 3,7 ve 2 kat daha fazla iken, kumestrolün diğer fitoöstrojenlere göre plazma AUC değerleri daha düşük olmuş ve *Bcrp1*^{-/-} ve normal fareler arasından anlamlı bir fark görülmemiştir. İ.v. infüzyon sonrasında daidzein plazma konsantrasyonları *Bcrp1*^{-/-} farelerde normal farelere göre yükselmiş iken diğer iki fitoöstrojenin plazma konsantrasyonlarında *Bcrp1*^{-/-} ve normal fareler arasında fark gözlenmemiştir. Daidzein, genistein ve kumestrolün normal farelere göre *Bcrp1*^{-/-} farelerdeki beyin-plazma konsantrasyonu oranları sırasıyla, 5.6, 9.2 ve 3.9 kat; testis-plazma konsantrasyonu oranları ise sırasıyla 5.8, 5.8 ve 4.1 kat daha fazla olmuştur. Yine aynı çalışmada genistein gebe olan *Bcrp1*^{-/-} ve normal farelere i.v. infüzyon şeklinde uygulanmış ve fetüse penetrasyonu değerlendirilmiştir. Gebe *Bcrp1*^{-/-} ve normal farelerin plazma konsantrasyonlarında anlamlı bir farklılık olmaz iken, fetüs-plazma konsantrasyonu oranı *Bcrp1*^{-/-} farelerde normal farelere göre 1.8 kat daha fazla olmuştur (Enokizono ve ark 2007).

P-gp'nin, kan beyin bariyerindeki kapillerde oldukça yüksek oranda eksprese olduğu ve birçok bileşiğin beyine geçişini engellediği bilinmektedir (Schinkel ve ark. 1994, Schinkel ve ark. 1996). Son olarak yapılan çalışmalar, BCRP'nin de, insan, domuz ve kemirgenlerde, P-gp gibi beyin kapillerlerinin endotel hücrelerinin luminal yüzeyinde eksprese olduğu gösterilmiştir. (Vlaming ve ark. 2009). P-gp'nin kan beyin

bariyerindeki baskın fonksiyonu Mdr1a geni silinmiş farelerde gösterilmiş iken (Schinkel ve ark. 1994), BCRP kan beyin bariyerindeki rolü Bcrp1 ve P-gp'yi eksprese etmeyen farelerde tam olarak ortaya konamamıştır. BCRP'nin kan beyin bariyerindeki rolünü belirlemek için yapılmış olan birçok çalışma bulunmaktadır (Jonker ve ark.2002).

Cisterno ve ark tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, CF-1 kökenli *Mdr1a*^{-/-} farelerde BCRP substratı olan prazosin ve mitoksantron uygulamasını takiben *in situ* beyin perfüzyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Her iki bileşiğinde beyine geçişleri P-gp'in yokluğundan etkilenmemiştir. Fakat, P-gp ve BCRP'nin her ikisini de inhibe eden elaklidar, normal ve *Mdr1a*^{-/-} farelerin her ikisinde de bu bileşiklerin beyine geçişini anlamlı olarak artırmıştır. İlginç olarak, elaklidarın prazosin ve mitoksantronun beyine geçişini CF-1 kökenli *Mdr1a*^{-/-} farelerde normal farelere göre daha fazla artırdığı görülmüştür. Normal farelere göre *Mdr1a*^{-/-} farelerin beyin kapillerlerinde 3 kat daha fazla Bcrp1 ekspresyonun olduğu gözönüne alındığında, bu çalışmada, prazosin ve mitoksantronun beyine penetrasyonunda Bcrp1'in önemli rol oynadığı sonucuna varılmaktadır (Cisternino ve ark. 2004).

Fakat Lee ve ark. gerçekleştirdiği, BCRP substratı olan mitoksantron ve dehidroepiandrosteron (DHEAS) kullanılarak FVB kökenli farelerde yapılan *in situ* beyin perfüzyonu çalışmasında sonuçlar Cisternino ve ark. farklı olmuştur. *Mdr1a/b*^{-/-} farelerde orta derecede fakat normal farelere göre anlamlı olarak daha yüksek oranda mitoksantron ve DHEAS'ın beyine penetrasyonu görülmüştür ve bu sonuç P-gp'nin her iki bileşiğin beyine penetrasyonunu sınırlandırdığını göstermektedir. Bunu yanında, *Bcrp1*^{-/-} farelerde normal fareler ile karşılaştırıldığında her iki bileşiğin de beyine geçişlerinde farklılık bulunmamıştır. Fakat elaklidarın da bu bileşikler ile birlikte beyine perfüzyonu üç deney hayvanı grubunda da mitoksantron ve DHEAS'nin beyine penetrasyonunu artırmıştır. Araştırmacılar, kan beyin bariyerinde elaklidara afinitesi olan bir ya da birden fazla taşıyıcı proteinin mitoksantron ve DHEAS'ın taşınmasında rol oynayabileceği sonucuna varırlarken, Bcrp1'in kan beyin bariyerindeki fonksiyonel rolüne dair kanıt bulamamışlardır (Lee ve ark. 2005).

Kan beyin bariyerindeki BCRP'nin fonksiyonel rolünü belirlemek için yapılan diğer bir çalışma da Breedveld ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. P-gp ve Bcrp1 substratı olduğu bilinen tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib *Mdr1a/b*^{-/-} ve *Bcrp1*^{-/-} farelere i.v. yoldan uygulanmış ve 2 saat sonunda beyin konsantrasyonları tayı

edilmiştir. *Mdr1a/b*^{-/-} farelerde normal farelere göre beyine penetrasyonu 3,6 kat daha fazla bulunmuşken, *Bcrp1*^{-/-} farelerde normal farelere göre 2,5 kat daha fazla imatinib beyine geçmiştir. Fakat, elaklidar ile birlikte uygulanan imatinibin normal farelerdeki beyin konsantrasyonları elaklidar uygulanmayan normal farelere göre 4,2 kat daha fazla olmuştur. Ek olarak BCRP inhibitörü olan pantoprazol ile birlikte uygulanan imatinibin beyin konsantrasyonları normal farelere göre *Mdr1a/b*^{-/-} farelerde artmış iken *Bcrp1*^{-/-} farelerde herhangi bir değişiklik görülmemiştir (Breedveld ve ark. 2005).

Yapılan çalışmalar da gösterildiği üzere, ABC üst familyası taşıyıcılarının substrat spesifitelerinin hemen hemen aynı olması nedeniyle bir taşıyıcının inhibe edilmesi veya olmaması durumunda, diğer bir taşıyıcı proteinin onun fonksiyonunu kısmen gerçekleştirebilmesi olasıdır. Her taşıyıcı proteinin fizyolojik ve farmakolojik öneminin net olarak değerlendirilebilmesi için ABC taşıyıcı genleri silinmiş fare soyları birbirleri ile çaprazlanmaktadır. Bu bağlamda, P-gp ve *Bcrp1*'in her ikisini de eksprese etmeyen *Mdr1a/b/Bcrp1*^{-/-} fareler geliştirilmiştir (Jonker ve ark. 2005). Vries ve ark. bu deney hayvanı modelini kullanarak, BCRP için iyi fakat P-gp için zayıf substrat olan topotekanın eliminasyonunu ve beyin penetrasyonunu değerlendirmişlerdir (Vries ve ark. 2007). Normal fareler ile karşılaştırıldığında topotekanın beyin-plazma AUC oranları *Mdr1a/b*^{-/-} farelerde 2 kat, *Mdr1a/b/Bcrp1*^{-/-} farelerde 3.2 kat daha fazla bulunmuşken, *Bcrp1*^{-/-} farelerde anlamlı bir fark görülmemiştir. Topotekan ile birlikte P-gp/BCRP inhibitörü elaklidar uygulanması topotekanın beyin AUC düzeylerinde normal farelerde 4,5 kat, *Mdr1a/b/Bcrp1*^{-/-} farelerde ise 17 kat artışa neden olmuştur. *Mdr1a/b*^{-/-} farelerde de elaklidar ile birlikte uygulanan topotekanın beyin AUC düzeyleri normal fareler ile aynı iken *Bcrp1*^{-/-} farelerde anlamlı bir artış görülmüştür. *Bcrp1*^{-/-} farelerde elaklidar ile birlikte uygulanan topotekanın beyin-plazma AUC oranları elaklidar uygulamasından bağımsız olarak *Mdr1a/b/Bcrp1*^{-/-} farelerinkinden farklı olmamıştır. Bu sonuç elaklidarın, kan beyin bariyerinde etkin olarak P-gp'i inhibe ederek topotekanın beyine penetrasyonunu artırdığını göstermektedir. Bu çalışma, topotekanın *in vitro* deneylerde ve fare ince barsağında oldukça iyi bir *Bcrp1* substratı olduğunun gösterilmesine rağmen (Jonker ve ark. 2000), kan beyin bariyerinde P-gp'nin fonksiyonunun daha baskın olduğunu göstermektedir. Fakat, *Bcrp1* P-gp yokluğunda topotekanın beyine penetrasyonunda fonksiyonel rol oynamaktadır. Topotekan plazma AUC düzeyleri normal farelere göre *Mdr1a/b*^{-/-} farelerde anlamlı olarak daha az iken *Bcrp1*^{-/-} ve *Mdr1a/b/Bcrp1*^{-/-} farelerde sırasıyla 2,5 ve 3,1 kat daha fazla olmuştur.

Topotekanın elaklidor ile birlikte uygulanması deney gruplarının hepsinde plazma AUC değerlerinde artışa neden olmuştur.

Aynı şekilde Oostendorp ve ark. (2009) *Mdr1a/b/Bcrp1^{-/-}* fareleri kullanarak P-gp ve Bcrp1'in oral (100 mg/kg) ve i.v. (50 mg/kg) yoldan uygulanan imatinibin farmakokinetiğindeki önemini ortaya koymak için bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Oral yoldan uygulama sonrasında *Mdr1a/b/Bcrp1^{-/-}* fareler ile normal fareler arasında AUC, ve C_{maks} değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. İ.v. uygulama sonrasında ise *Mdr1a/b/Bcrp1^{-/-}* farelerdeki plazma AUC değerleri normal farelerinkinden 1,6 kat daha fazla olmuştur. İmatinibin beyin-plazma oranları normal farelere göre *Mdr1a/b/Bcrp1^{-/-}* farelerde oldukça yüksek (>10 kat) iken *Mdr1a/b^{-/-}* farelerde orta düzeyde bir artış (yaklaşık 2 kat) olmuştur. *Bcrp1^{-/-}* farelerde ise herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Aynı çalışmada oral ve i.v. yoldan imatinib, oral elaklidor (100 mg/kg) ve oral pantoprazol (40 mg/kg) ile birlikte *Mdr1a/b/Bcrp1^{-/-}* ve normal farelere uygulanmıştır. Elaklidor uygulaması imatinibin normal farelerdeki plazma AUC_{po} ve AUC_{iv} değerlerini sırasıyla 3.3 ve 2 kat arttırmışken, *Mdr1a/b/Bcrp1^{-/-}* farelerde bu değerlerdeki artış sırasıyla 2.7 ve 1.3 kat olmuştur ($p<0.05$). Oral pantoprazol uygulaması ise imatinib plazma AUC_{po} ve AUC_{iv} değerlerini normal farelerde sırasıyla 3.4 ve 3.5 kat, *Mdr1a/b/Bcrp1^{-/-}* farelerde de 3.6 ve 3 kat artışa neden olmuştur ($p<0.05$). Elaklidor oral yoldan uygulanan imatinibin 1. ve 4. saatlerdeki beyin konsantrasyonlarını normal farelerde anlamlı olarak 5 ve 3 kat, *Mdr1a/b/Bcrp1^{-/-}* farelerde ise 7.9 ve 6.4 kat artırmıştır. Pantoprazol ise oral imatinib uygulamasını takiben beyindeki imatinib düzeylerini 1. ve 4. saatlerde normal farelerde sırasıyla 1.2 ve 1.8 ($p<0.05$), *Mdr1a/b/Bcrp1^{-/-}* farelerde de 10.3 ve 6 kat artırmıştır ($p<0.001$). Bu çalışma imatinibin sistemik klirensi ve özellikle beyine penetrasyonunda P-gp'nin daha önemli bir rol üstlendiğini göstermektedir. P-gp/BCRP inhibitörlerinin birlikte uygulanmasının, imatinibin sistemik maruziyetini hem normal farelerde hem de P-gp/BCRP'nin eksprese olmadığı farelerde anlamlı olarak artırması, imatinibin P-gp ve BCRP dışında diğer eliminasyon yolları ile de etkileştiğini göstermektedir.

ABC taşıyıcı protein olan Mrp4 ile Bcrp1 geni silinmiş farelerin çaprazlanması ile geliştirilen *Bcrp1/Mrp4^{-/-}* (*Abcg2/Abcc4^{-/-}*) farelerin kullanıldığı diğer bir çalışmada ise purin analogu olan PMEA'nın (9-(2(fosfonometoksi)etil)-adenin) farklı dokulardaki dağılımı değerlendirilmiştir. Fakat bu çalışmada, beyin penetrasyonu bu iki taşıyıcı

proteini de eksprese etmeyen deney hayvanlarında normal fareler göre herhangi bir farklılık oluşturmamıştır (Takenaka ve ark. 2007).

2.3.7. Klinik Çalışmalar

Antineoplastik ilaçların oral uygulamaları genellikle düşük biyoyararlanım ve biyoyararlanımın bireyler arasında yüksek değişkenlik göstermesinden dolayı sınırlıdır. Preklinik *in vivo* çalışmalarda, elaklidar ile oral yoldan birlikte uygulanan topotekanın plazma konsantrasyonlarının, P-gp eksprese etmeyen farelerde normal farelere göre 6 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (Jonker ve ark. 2000). Bu çalışma baz alınarak topotekanın elaklidar ile birlikte uygulanarak oral biyoyararlanımının değerlendirildiği klinik bir çalışma Kruijtzter ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya 16 hasta alınmış ve 2 farklı grup oluşturulmuştur. 1. Grup iki farklı şekilde oral yoldan topotekan almış ve bunlar randomize edilmiştir. 1. veya 8. günde oral olarak tek doz 1.0 mg/m² topotekan tek doz 1000 mg elaklidar ile ve yine aynı şekilde 1. veya 8. günde oral olarak tek doz 1.0 mg/m² topotekan elaklidar uygulanmaksızın hastalara uygulanmıştır. 2. Gruba ise iki farklı şekilde i.v. topotekan uygulaması yapılmış ve bunlar randomize edilmiştir. 1. veya 8. günde tek doz i.v. 1.0 mg/m² topotekan tek doz oral 1000 mg elaklidar ile ve yine aynı şekilde 1. veya 8. günde iv 1.0 mg/m² dozda topotekan elaklidar uygulanmaksızın hastalara uygulanmıştır. 15. günde tüm hastalara her 3 haftada 5 günlük i.v. 1.5 mg/m² dozda topotekan uygulanmasına devam edilmiştir. Oral yoldan topotekan uygulaması yapılan grupta, topotekanın biyoyararlanımında elaklidar uygulaması ile anlamlı olarak %40'tan %97'ye artış olmuştur. Hastalar arasındaki biyoyararlanımdaki değişkenlik sadece topotekan alan hastalar arasında %17 iken elaklidar uygulaması ile bu oran %11'e gerilemiştir. İ.v. yoldan topotekan uygulanan grupta ise ortalama plazma AUC değerlerinin elaklidar uygulaması ile birlikte %82'den %96'ya anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir.

2.3.8. BCRP'nin Genetik Polimorfizmi

İlaçların farmakokinetik profillerinde görülen bireyler arası varyasyon, cinsiyet, genetik, beslenme, hastalık varlığı ve diğer ilaçların kullanımının dahil olduğu bir çok faktöre bağlı olabilir. Yapılan çalışmalar, ilaçların etkinliği ve farmakokinetiğindeki

önemi ortaya konmuş ABC taşıyıcı proteinlerin ekspresyonlarının bireyler arası varyasyon gösterdiği rapor edilmiştir (Fromm 2000, Lown ve ark. 1997, Schuetz ve ark. 1995). İlaçların atılımından sorumlu temel organlardaki (karaciğer ve böbrek) efluks taşıyıcı proteinlerin taşıma aktivitesi azalırsa, substrat olan ilacın klirensi azalır ve plazma konsantrasyonu daha yüksek hale gelir. Bunun sonucunda ise tüm organların ilaç ile maruziyeti artmış olur. Farmakolojik olarak hedef organlardaki taşıyıcı proteinlerin ekspresyonlarının azalması ise, bu organlardaki ilaç konsantrasyonunu artırır. Önemli dokularda (beyin, testis, plasenta) ilaç konsantrasyonu artar ve istenmeyen etkilere maruz kalınabilir.

Bazı çoklu ilaç rezistansının görüldüğü hücre dizilerinde BCRP'nin substrat seçiciliğinin farklı olduğu gözlenmiştir. Örnek vermek gerekirse, BCRP'yi aşırı eksprese eden iki hücre dizisinde (MCF-7 AdVp3000 ve S1-M1-80) Rhodamin 123 ve antrasiklinler etkin olarak taşınabilmekte iken, BCRP'yi aşırı aktive eden diğer bir hücre dizisinde bu maddelerin taşınmadığı farkedilmiştir. Yapılan dizilim analizleri sonucunda kodon 482'de arjininin threonin veya glisin ile yer değiştirdiği bir mutasyon bulunmuştur (Honjo ve ark. 2001).

BCRP'nin, 90 farklı etnik popülasyondaki tek nükleotid polimorfizimi (Single Nucleotide Polymorphism-SNP) sistemik olarak taranmıştır. İntron ve ekson dizilerinde 40'tan fazla SNP tespit edilmiştir (Zamber ve ark. 2003). BCRP ekspresyonunda görünen en önemli SNP, N-terminal domainde gerçekleşen, protein ekspresyonunun azalması, taşıma fonksiyonunun ve bir çok antineoplastik ilaca olan hassasiyetin değişmesi ile sonuçlanan C421A'dır (Gln141Lys). BCRP'de görünen bu mutasyonun, rosuvastatin ve yeni bir antineoplastik olan diflomotekanın plazma konsantrasyonlarının artmasına neden olduğu rapor edilmiştir (Sparreboom ve ark. 2004, Zhang ve ark. 2006). Yamasaki ve ark. (Yamasaki ve ark. 2008) tarafından, bir antibiyotik olan sulfasalazinin plazma konsantrasyonlarının, C421A mutasyonu olan hastalarda olmayanlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

2.4. Çoklu İlaç Rezistansı İlişkili Protein (Multidrug Resistance Associated Protein; MRP)

Çoklu ilaç rezistansı ilişkili protein (Multidrug Resistance Associated Protein; MRP), ABC taşıyıcı protein familyasının C alt familyasına dahildir. C alt familyası 13 tane proteinden oluşmaktadır. Bunlardan 9 tanesi MRP ilişkilidir ve MRP1'den MRP9'a kadar isimlendirilmiştir (sırasıyla ABCC1-6 ve ABCC10-12). Diğer üç tanesi ise kistik fibrozis transmembran kondüktans regülatör proteini (CFTR/ABCC7) ve sülfonilüre reseptörleridir (SUR1/ABCC8 ve SUR2/ABCC9). MRP1-9'da birbirleri arasında şekilsel ve fonksiyonel benzerlikler bulunmaktadır. Herbirinde iki tane çoklu membrana bağlanan domain (membrane-spanning domain-MSD, MSD₁ ve MSD₂) ve iki tane hücre içinde lokalize olan ATP-bağlayan domain (NBD) bulunmaktadır. Bunlara ek olarak MRP1-3, 6 ve 7'de ek bir MSD daha bulunmaktadır (MSD₀) (Şekil 2-1) (Toyoda ve ark. 2008). MRP1 üzerinde yapılan çalışmalar MSD₀'ın herhangi bir katalitik fonksiyonu olmadığını göstermektedir (Varadi ve ark. 1998).

2.4.1. Çoklu İlaç Rezistansı İlişkili Protein-1 (MRP1)

MRP1 ilk olarak, P-gp eksprese etmeyen çoklu ilaç rezistansı gelişmiş insan küçük hücreli akciğer kanseri hücre dizisinden klonlanmıştır (Cole ve ark. 1992). Hücresel düzeyde MRP1'in ekspresyonunun bir çok antineoplastik ilaca karşı rezistans oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Schinkel ve Jonker 2003). Yüksek düzeylerde ince barsak, beyin, böbrekler, akciğer ve testislerde, daha düşük düzeylerde ise karaciğerde eksprese olmaktadır (Chan ve ark. 2004). İnce barsak, böbrek distal ve toplayıcı tübüller ve karaciğerdeki polarize epitel hücrelerin bazolateral membranında lokalize olmaktadır (Peng ve ark. 1999). MRP1'in normal hücrelerdeki bazolateral lokalizasyonu substratlarının kana taşınmasını sağlayarak hücrelerin zenotoksinlerden korunmasını sağlamakta ve vücuttaki ilaç dağılımını etkilemektedir (Chan ve ark. 2004).

Vinka alkaloidleri, antrasiklinler, epipodofillotoksinler, mitoksantron ve metotreksat MRP1 aracılığı ile etkin olarak taşınmaktadır (Schinkel ve Jonker 2003). İnflamatuar bir mediyatör olan lökotrien C4 (LTC₄) MRP1 substratıdır ve Mrp1 genini eksprese etmeyen knock-out farelerde LTC₄ aracılı inflammatuar reaksiyonlarda bozukluk olduğu gösterilmiştir (Wijnholds ve ark. 1997).

2.4.2. MRP3

MRP3 aminoasit dizilimine göre, MRP taşıyıcı proteinleri arasında en fazla MRP1 ile benzerlik taşımaktadır ve MRP1 gibi polarize hücrelerin bazolateral membranında lokalize olmaktadır. MRP3 başlıca karaciğer olmak üzere, ince ve kalın barsak, adrenal bezde ve daha az düzeylerde pankreas ve böbrekte eksprese olmaktadır (Schinkel ve Jonker 2003). Safra kesesinin bazolateral membranında da MRP3 ekspresyonu gösterilmiştir. Bir çok organik anyon ve glukuronid ve sülfat konjugatlarının taşınmasından sorumludur. MRP3'ün aşırı ekspresyonu sadece etoposid/teniposid ve metotreksata karşı rezistansa neden olmaktadır. Bugüne kadar yapılmış çalışmalarda özellikle karaciğer ve barsaktaki lokalizasyonu ile ilaç-glukuronid konjugatlarının dağılımından sorumlu olduğu gösterilmiştir (Borst ve ark. 2006).

2.4.3. MRP4

İnsan MRP4 proteininin %30-40 oranında MRP1-6 ile aminoasit benzerliği bulunurken, şekil itibariyle diğer MRP proteinlerine nazaran P-gp ile daha fazla benzerlik göstermektedir. Folik asit, folinik asit, metotreksat, cAMP, cGMP, östradiol-17- β -glukuronid ve safra asitleri MRP4 tarafından taşınmaktadır. MRP4 vücutta hücre tipine göre bazolateral veya apikal membranda lokalize olduğu gösterilmiştir. Prostat glandular epitel hücreleri, hepatositler, ürogenital dokular ve koroid epitel hücrelerinde bazolateral membranda, beyin kapillerleri ve böbrek proksimal tübülünde ise apikal membranda lokalize olmaktadır (Chan 2004, Kruh ve ark. 2007).

2.4.4. MRP2

MRP2 ikinci olarak adlandırılan MRP taşıyıcı proteini olmasına rağmen aslında ilk keşfedilen ve özellikleri belirlenen MRP'dir. 1985 yılında Jansen ve ark. bilirubin-glukuronidleri ve diğer organik anyonların safraya atılımında defektleri bulunan mutant bir sıçan türü olan TR⁻/GY sıçanları tanımlamıştır (Jansen ve ark. 1985). Aynı mutant sıçanlar Japonya'da Eisai hiperbilirubinemik (EHBR) sıçanlar olarak tanımlanmıştır. Günümüzde bu mutant sıçanlarda insanlardaki gibi Dubin-Johnson sendromunun bulunduğu ve MRP2 defektlerinin olduğu bilinmektedir. MRP2'nin biyokimyasal

karakterizasyonu 1990' da Ishikawa ve arkadaşlarının hepatositlerin kanaliküler membranında bulunan ve glutatyon-S-konjugatlarını taşıyabilen bir ATP-bağımlı taşıyıcı proteini bulmaları ile başlamıştır (Ishikawa ve ark. 1990). Devam eden çalışmalarda Oude Elferink ve ark. (1990) bir çok organik anyonun taşındığı bu taşıyıcı proteinin TR⁻/GY sıçanlarda bulunmadığını göstermiştir ve bu taşıyıcı protein kanaliküler multispesifik organik anyon taşıyıcı (cMOAT) olarak adlandırılmıştır. 1996 yılında insan ve sıçan *MRP2/Mrp2* geninin klonlanması ile MRP2'nin yapısının MRP1'e oldukça yakın olduğu gösterilmiş ve cMOAT yerine MRP2 olarak adlandırılmıştır (Borst ve ark. 2006).

Özellikle hepatositlerin apikal membranlarında ve böbrek tübüler hücrelerinde lokalize olarak, metabolitlerin ve ilaçların atılımında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca ince barsaklardaki lokalizasyonu ile bazı ilaçların ve zenotoksinlerin oral yoldan vücuda alınmasını sınırlandırmaktadır (Borst ve ark. 2006).

İnsan MRP2 geni (ABCC2) 32 ekson içermekte ve 10q24 kromozomunda bulunmaktadır. Herbiri 6 transmembran segmentten (TM) oluşan MSD₁ ve MSD₂ olmak üzere iki ve 5 TM'dan oluşan ek bir (MSD₀) domain içermektedir. Ayrıca diğer ABC taşıyıcı proteinler gibi iki adet ATP'nin bağlandığı NBD içermektedir (Fardel ve ark. 2005). MRP2 benzer fakat tam olarak aynı olmayan iki adet ligand bağlanma bölgesi içerir. Biri substratın taşındığı bölge diğeri ise substrat için taşınma bölgesinin afinitesinin düzenlendiği bölgedir (Zelcer ve ark. 2003).

2.4.4.1. MRP2'nin Lokalizasyonu

MRP2'nin ilk olarak sıçan ve insan karaciğerinde hepatositlerin apikal (kanaliküler) membranında lokalize olduğu gösterilmiştir (Büchler ve ark. 1996, Keppler ve ark. 1996, Paulusma ve ark. 1997). *Mrp2*'nin sıçan böbrek proksimal tübüldeki epitel hücrelerin apikal membranlarında tanımlanması ile bu konjugat efluks proteininin karaciğer dışında da lokalize olduğu gösterilmiştir (Schaub ve ark. 1997). MRP2 insanda böbreğin haricinde, ince barsak, kolon, safra kesesi, bronşlar ve plasantanın epitel hücrelerinin apikal membranlarında eksprese olmaktadır (Pflugers 2007). MRP2'nin insanda kan-testis bariyeri (Bart ve ark. 2004, Sandusky ve ark. 2002) ve korteksteki kan-beyin bariyerinde (Nies ve ark. 2004, Sandusky ve ark. 2002, Zhang ve ark. 2004) ekspresyonu görünmese de temporal lob epilepsisi olan hastalardaki

hippokampusteki beyin kapillerlerinde (Aronica ve ark. 2004) ve sıçanda pilokarpinin indüklediği epilepsi ataklarından sonra kan-beyin bariyerinde eksprese olduğu gösterilmiştir (Hoffmann ve ark. 2006). Fakat Mrp2'nin normal sıçanlarda beyin kapillerlerinde ekspresyonun gösterildiği çalışmalar da bulunmaktadır (Miller ve ark. 2000) (Tablo2-6).

MRP2 dokulardaki ekspresyonunun yanında malign tümörlerde de eksprese olmaktadır. Yapılan immünohistokimyasal çalışmalar, berrak hücreli renal, hepatoselüler, over ve kolorektal karsinomalarda MRP2 ekspresyonunu göstermektedir. Doku mikroarray çalışmalarında ise, MRP2'nin akciğer, meme ve gastrik karsinomlardaki ekspresyonu gösterilmiştir (Pflugers 2007). Diğer taraftan, MRP2'nin aşırı ekspresyonu hücreleri birçok antineoplastik ilaca karşı dirençli hale getirirse de bu direnç orta düzeyde olmuş ve kanser hastalarında MRP2 düzeyleri ile klinik direnç arasında bir korelasyon ortaya konamamıştır (Borst ve ark. 2006).

Endojen olarak MRP2'yi eksprese eden hücre dizileri bu taşıyıcı proteinin fonksiyonunun değerlendirilmesi için kullanılmaktadır. İnsan kolon karsinomu hücreleri olan Caco-2 hücreleri endojen olarak MRP2'yi eksprese etmekte ve MRP2 bu hücrelerin apikal memebranında lokalize olmaktadır. Ayrıca MDCK (MDCKII) hücrelerinde insan ve fare ABCC2/Abcc2 geni transfekte edilerek oluşturulan *in vitro* deney modeli MRP2'nin fonksiyonunun değerlendirilmesinde oldukça sık kullanılmaktadır. Bu model, diğer ABC taşıyıcı protein genlerinin de aynı anda transfeksiyonu yapılarak dokulardakine yakın bir model haline getirilebilmektedir.

Tablo 2-6: MRP taşıyıcı proteinlerinin ekspresyonları ve endojen substratları -Kruh (2007)'den değiştirilerek

MRP	Ekspresyon	Substrat		
		*Konjugat	Glutasyon	Fizyolojik önemi
MRP1	Yaygın	+	+	LTC4, steroid sülfatlar
MRP2	Karaciğer, böbrek, barsak, plasenta	+	+	Bilirubin glukuronidi
MRP3	Pankreas, adrenal bez, plasenta, barsak, karaciğer, böbrek, prostat	+	-	Safra asitleri
MRP4	Yaygın, prostat ↑	+	+	cAMP, cGMP, PGE1, PGE2, safra asitleri, steroid sülfatlar

* Glutasyon ve/veya glukuronat konjugatlarının taşınması

2.4.4.2. MRP2'nin substratları

Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar sonucunda MRP2'nin birçok organik anyon, endojen bileşikler ve zenotoksinler ve bunların glukuronat, sülfat ve glutasyon konjugatlarının hücre dışına taşınmasına aracılık ettiği gösterilmiştir (Kusuhara ve ark. 2002, Keppler ve ark. 2000). LTC4, D4 ve E4 (Jedlitschky ve ark. 2002), redüklenmiş ve okside olmuş glutasyon (Suziki ve ark. 1998, Balltor ve ark. 1998), bromosülfotalein glutasyon ve arsenik gibi ağır metallerin glutasyon konjugatları örnek olarak verilebilir (Kala ve ark. 2000). Bilirubinin glukuronid konjugatları (Kamisako ve ark. 1999, Jedlitschky ve ark. 1997), östradiol (Chu ve ark. 2004), triiodo-L-tironin, grepafloksazin ve parasetamol (Xiong ve ark. 2000) da MRP2 tarafından taşınmaktadır. MRP2 ayrıca safra tuzlarının glukuronid ve sülfat konjugatlarının taşınmasından sorumludur (Akita ve ark. 2001). Metotreksat (Hooijberg ve ark. 1999), irinotekan ve metaboliti SN-38 (Toffoli ve ark. 2003), ampicilin, seftriakson (Accatino ve ark. 2003), pravastatin (Sasaki ve ark. 2002), temokaprilat (Sasaki ve ark. 2004), BQ-123 ve p-aminohippurat gibi konjuge olmayan organik anyonların MRP2 substratı olduğu gösterilmiştir. Diğer MRP2 substratları arasında –doğal veya konjuge formları– probenesid (Chen ve ark. 2003), sisplatin, kamptotesin, vinblastin, sulfinpirazon (Evers ve ark. 2000), epigallokateşin-3-gallat (Hong ve ark. 2003), sakinavir, ritonavir, indinavir gibi HIV protez inhibitörleri (Huisman ve ark. 2002), azitromisin (Sugie ve ark. 2004), fenobarbital (Patel ve ark. 2003) ve flavoripiridol (Jager ve ark. 2003) yer

almaktadır. Ayrıca MRP2 beslenme ile alınan kanserojen PhIP (Dietrich ve ark. 2001) ve nefrotoksik bir toksin olan okratoksin A' nın (Berger ve ark. 2003) taşınmasına da aracılık eder.

2.4.4.3. MRP2 İnhibitörleri

ABC gen familyasına dahil diğer taşıyıcı proteinler gibi (P-gp, BCRP, MRP1) MRP2 de birçok farmakolojik bileşik tarafından inhibe edilmektedir. Siklosporin A, rifampisin, glibenklamid, probenesid, indometazin, MK571, azitromisin, fusidat, luteolin ve kuersetin gibi flavonoidlerin MRP2'nin aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Payen ve ark. 2000, Asakura ve ark. 2004) (Tablo 2-7).

Fakat bu bileşikler MRP2'yi spesifik olarak inhibe etmemektedir. Birçok MRP2 inhibitörünün ayrıca MRP1 ile de ilişkili olduğu (Wang ve ark. 2003) ve bazılarının da P-gp'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (Arimori ve ark. 2003).

Tablo 2-7: MRP2 substratları ve inhibitörleri

MRP2 substratları		MRP2 inhibitörleri
Antibiyotikler	Ampisilin Seftriakson Azitromisin Grepafloksazin	Probenesid Rifampisin Siklosporin A Glibenklamid
Antineoplastikler	Metotreksat Sisplatin Vinblastin İrinotekan Kamptotesin	İndometazin Flavonoidler Azitromisin
HIV proteaz inhibitörleri	Sakinavir Ritonavir İdinavir	
Diğer ilaçlar	Pravastatin Temokaprilat Asetaminofen	
Ağır metaller	Arsenik	
Endojen bileşikler	Bilirubin Lökotrienler Safra tuzları Östradiol Glutasyon konjugatları	

2.4.4.4. ABCC2 Geni Silinmiş Farelerde Yapılan Çalışmalar

MRP2'nin fizyolojik ve farmakolojik fonksiyonlarının değerlendirilmesi için birbirinden bağımsız olan üç çalışma grubu tarafından *Abcc2* geni silinmiş fareler (*Mrp2*^{-/-} fareler) geliştirilmiştir (Vlaming ve ark. 2006, Chu ve ark. 2006 ve Nezesa ve ark. 2006). *Mrp2*^{-/-} fareler normal şartlarda üreyebilmektedir. Laboratuvar koşullarında normal yaşam döngülerini sağlıklı olarak tamamlarken, Dubin-Johnson sendromlu hastalar ve *Mrp2* eksikliği bulunan sıçan soylarında tespit edilmiş olan biyokimyasal anomaliler ile benzerlikleri bulunmaktadır. *Mrp2*^{-/-} farelerde serum ve idrardaki bilirubin düzeylerinin ve hepatosit glutatyon konsantrasyonlarının artmış, biliyer glutatyon ve safra akışının azalmış olduğu gösterilmiştir. Bu anomaliler bilirubin glukuronidinin hepatositlerin sinuzoidal membranından kan dolaşımına doğru taşınmasının artması sonucunda, glutatyon ve bilirubin glukuronidlerinin safraya atılımının bozulmasına bağlanabilir. Organik anyonların kanaliküler taşınmasındaki fonksiyonel bozukluk DBSP (dibromosülfofitalein) ve CDF (5-(ve 6)-karboksi-2',7'-diklorofluoressein) gibi floresan probalar kullanılarak belirlenmiş ve bu problemlerin hepatobiliyer eliminasyonunun *Mrp2* eksikliği bulunan sıçanlarda azalmış olduğu gösterilmiştir. *Mrp2*^{-/-} farelerde DBSP'nin biliyer eliminasyonunun anlamlı olarak azalmış, CDF eliminasyonunun ise önemsiz olduğu gösterilmiştir (Chu ve ark. 2006, Nezesa ve ark. 2006). *Mrp2*^{-/-} farelerdeki kompensatuvar değişiklikler *Mrp2* eksikliği olan sıçanlar ile bazı benzerlikler gösterirken potansiyel farklılıklar da bulunmaktadır. *Mrp2* eksikliği bulunan sıçanlarda hepatositlerin sinuzoidal membranlarında bulunan *Mrp3* ve böbrekte apikal yüzeylerde bulunan *Mrp4* ekspresyonunda artma olduğu gösterilmiştir (Hirohashi ve ark. 1998, Chen ve ark. 2005). Bazı *Mrp2* substratlarının kan ve idrar içine atılmasına aracılık eden bu kompensatuvar adaptasyonlar *Mrp2*^{-/-} farelerde de gözlenmiştir (Vlaming ve ark. 2006, Nezesa ve ark. 2006).

Sülfat ve glukuronid konjugatları daha önce de belirtildiği gibi MRP2 tarafından taşınan substratlardır. *Mrp2*'nin bu Faz II metabolitlerin karaciğerdeki dağılımlarında rolünün değerlendirilmesi için, *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp*^{-/-} farelerde asetaminofen (A), 4-metillumbelliferon (4MU) ve harmol'ün (H) kullanıldığı bir çalışma yapılmıştır (Zamek-Gliszczyński ve ark. 2006). Son iki madde karaciğerde sülfat ve glukuronid metabolitlerine dönüştürülen küçük moleküllerdir ve bu çalışmalarda prob moleküller olarak kullanılmaktadır. Bu bileşiklerin sülfat ve glukuronid konjugatlarının hepatobiliyer dağılımları, karaciğer *in situ* perfüzyon deneyleri ile gösterilmiştir. *Mrp2*

^{-/-} farelerde sadece 4MU-glukuronidin biliyer klirensi azalmış iken *Bcrp*^{-/-} farelerde, tüm bileşiklerin sülfat konjugatlarının klirensi ciddi oranda azalmış ve glukuronid konjugatlarının klirensinde de belirgin bir azalma gözlenmiştir. Bu çalışma, *Bcrp1*'in sülfat ve glukuronid konjugatlarının safraya atılımında daha baskın iken, *Mrp2*'nin minör rol oynadığını göstermiştir.

Çalışmalarımızda kullandığımız Vlaming ve ark. tarafından (Vlaming ve ark. 2006) geliştirilen *Mrp2*^{-/-} farelerde konjuge-bilirubinin safraya sekresyonundaki bozukluk ile safra akışının ve GSH atılımının azalması sonucu orta düzeyde bir hiperbilirubinemi gözlenmiştir. Ayrıca normal fareler ile karşılaştırıldığında karaciğerlerinin %20-25 oranında daha büyük olduğu görülmüştür. Fakat tüm bu anomalilere rağmen sağlıklı yaşam döngüleri bulunmaktadır. Karaciğerdeki *Mrp3* ve böbrekteki *Mrp4* düzeyleri normal fareler ile karşılaştırıldığında yaklaşık 2 kat artmıştır. Yine aynı çalışmada, diyetle alınan karsinojenler olan [¹⁴C]PhIP ve [¹⁴C]IQ oral yoldan, antineoplastik olan [³H]MTX ve irinotekan ise i.v. olarak uygulanmış ve *Mrp2*^{-/-} farelerdeki farmakokinetik profilleri değerlendirilmiştir. Oral olarak uygulanan [¹⁴C]PhIP ve [¹⁴C]IQ'nun plazmadaki değerleri normal farelere göre, sırasıyla 1.9 ve 1.7 kat daha yüksek olmuş ve bu sonuç *Mrp2*'nin bu karsinojenlerden vücudu korumada açıkça rol oynadığını göstermiştir. MTX 1, 10 ve 50 mg/kg olmak üzere üç farklı dozda uygulanmış ve *Mrp2*'nin MTX'in eliminasyondaki etkisinin doza bağımlı olduğu görülmüştür. *Mrp2* MTX'in elimasyonunda sadece yüksek dozda uygulandığında (50 mg/kg) önemli rol oynarken diğer düşük dozlarda etkin olmamıştır. Özellikle uygulandıktan 7.5 dakika sonra plazmadaki MTX düzeylerinde normal farelere göre önemli bir fark görülmüş fakat bu farklılık 30. dakikada bu kadar belirgin olmamıştır. Bu sonuçlar *Mrp2*'nin MTX'i düşük afinite fakat yüksek kapasite ile taşıdığını ayrıca, MTX düşük dozda uygulandığında ve/veya plazmadaki değerleri düştüğü zaman diğer klirens mekanizmalarının daha baskın hale geldiğini göstermektedir. Bu çalışmada farelerdeki *Mrp2*'nin irinotekan ve metaboliti SN-38'in eliminasyonunda rolünün olmadığı gösterilmiştir.

ABC üst familyası taşıyıcılarının fizyolojik önemini ve antineoplastik ilaçların farmakokinetiği üzerine olan etkilerini net olarak değerlendirilebilmesi için *Mrp2*^{-/-} fareler diğer ABC taşıyıcı transgenik fare soyları ile çaprazlanmaktadır. Yine aynı çalışma grubu tarafından farelerde P-gp ekspresyonundan sorumlu gen olan *Mdr1a/b*

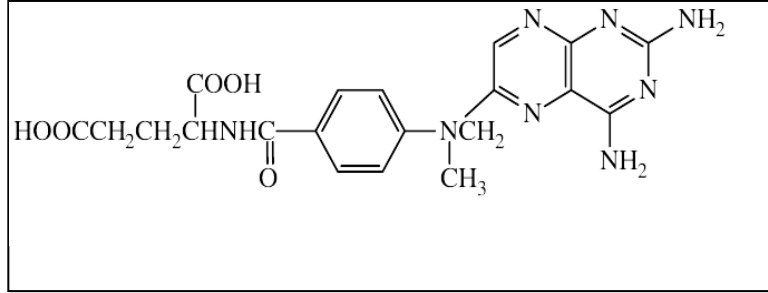
geni silinmiş fareler ile (*Mdr1a/b*^{-/-} fareler) *Mrp2*^{-/-} fareler çaprazlanarak *Mdr1a/b/Mrp2*^{-/-} double knock-out fareler geliştirilmiştir. Doksorubisinin i.v. olarak uygulanmasını takiben plazmadaki düzeyleri *Mrp2*^{-/-} ve *Mdr1a/b*^{-/-} farelerde artış göstermemişken, safradaki doksorubisin düzeyleri *Mrp2*^{-/-} ve *Mdr1a/b*^{-/-} farelerde sırasıyla 2 ve 10 kat azalmış, *Mdr1a/b/Mrp2*^{-/-} double knock-out farelerde ise 50 kat daha az olmuştur (Vlaming ve ark. 2006).

Lagas ve ark. tarafından (Lagas ve ark. 2006) yapılan bir çalışmada ise, antineoplastik bir ilaç olan paklitaksel *Mrp2*^{-/-} ve *Mdr1a/b*^{-/-} farelere i.v. ve oral yoldan uygulanmıştır. İ.v. uygulama sonrasında plazma AUC değerleri normal farelere göre knock-out farelerde yaklaşık 1.3 kat daha fazla olmuştur. *Mrp2*^{-/-} farelerde AUC değerlerindeki artış daha çok *Mrp2*'nin safraya atılımındaki rolü ile ilişkili iken *Mdr1a/b*^{-/-} farelerin plazma değerlerindeki artışta *Mdr1a/b*'nin intestinal atılımındaki rolü daha baskın olmuştur. Bu sonuç oral uygulama sonrasında elde edilen veriler ile desteklenmiştir. Oral uygulamayı takiben paklitakselin oral biyoyararlanımı *Mdr1a/b*^{-/-} farelerde 8.5 kat daha fazla iken *Mrp2*^{-/-} farelerde AUC_{oral} değerlerinde bir artış gözlenmemiştir.

2.4.4.5. MRP2'nin Genetik Polimorfizmi

MRP2'nin bilirubin glukuronidinin safraya atılımında önemli rol oynamasından dolayı mutasyonlar sonucu gelişen MRP2'nin yokluğu, Dubin Johnson sendromu olarak adlandırılan hiperbilirubinemiye neden olmaktadır (Suzuki ve ark. 2002). İlaçların farmakokinetiği ve farmakodinamiği ile ilişkili olan MRP2'nin genetik polimorfizminin, temel olarak, transkripsiyon etkinliğini değiştiren 5'. bölgede olduğu bulunmuştur (Maeda 2008). MRP2 geninde oluşan C-24T mutasyonunun oral yoldan uygulanan MTX'in AUC değerlerini artırdığı gösterilmiştir (Rau ve ark. 2006). MRP2'nin genetik polimorfizminin irinotekanın farmakokinetiğini etkilediği ve yan etki görülme potansiyelini değiştirdiği gösterilmiştir. A-1019G haplotipi olan hastalarda irinotekanın klirensi azalmış ve irinotekanın ince barsaktaki maruziyetinin azalmasından dolayı tedavide görülen ciddi diyare sıklığı da göreceli olarak azalmıştır (de Jong ve ark. 2007). Daly ve ark. (2007) ise MRP2'deki C-24T mutasyonunun diklofenak açılglukuronidin hepatik klirensini azaltmak suretiyle diklofenagin indüklediği hepatotoksisitenin sıklığını artırdığını göstermişlerdir.

2.5. Metotreksat (MTX)



Şekil 2-11: MTX'in kimyasal yapısı

Folat bağımlı enzimler, DNA'nın öncü maddelerinin sentezindeki esansiyel rollerinden dolayı kemoterapinin en temel hedeflerinden biri olmuş ve ilk olarak antifolat bir ajan olan aminopterin (4-amino-folik asit) ile akut lösemili çocukların tedavisinde ilerleme kaydedilmiştir (Farber ve Diamond 1948). Bunu takiben daha iyi ve daha az toksik olan analogların sentezi için çalışmalar yapılmış ve 1956 yılında ilk olarak metotreksatın (N-[4-[(2,4-diamino-6-pterinidil)metil]metilamino]benzoil]-L-glutamik asit (Şekil 2-11) koriokarsinomada etkinliği klinik çalışmalarda gösterilmiştir (Hertz ve ark. 1956). Klasik bir antifolat olan metotreksat (MTX), tedavide oldukça yaygın kullanılan ve bugüne kadar klinik ve prelinik olarak oldukça çok çalışılmış antineoplastik bir ilaçtır. Diğer antineoplastik ilaçlardan farklı olarak MTX geniş doz aralıklarında kullanılmaktadır. Akut lenfoblastik lösemi idame kemoterapisinde ve romatoid artrit ve psöriazis gibi hastalıkların tedavisinde haftada 20 mg/m² dozda kullanılırken, onkolojik hastalıklarda lökoverin ile birlikte 1000-33000 mg/m² dozda uygulanmaktadır ve bu uygulama yüksek doz MTX uygulaması olarak tanımlanmaktadır. Yüksek dozda MTX uygulanması uzun süreli i.v. infüzyon şeklinde yapılmakta ve akut lenfoblastik lösemi, lenfoma, osteosarkoma, meme kanseri, baş ve boyun kanseri gibi çeşitli kanserlerin tedavi rejimlerinin önemli bir bileşenini oluşturmaktadır (Hardman ve Limbrid 2001).

2.5.1. Etki Mekanizması

MTX, hücre içine indirgenmiş folat taşıyıcı protein ile alınır ve folilpoliglutamat sentetaz aracılığı ile moleküle glutamil grupları eklenerek poliglutamat formuna dönüştürülür. MTX'in poliglutamat formu hücre içinde uzun süre kalmaktadır. MTX ve poliglutamat formu dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimine bağlanarak bu enzimi inhibe eder ve bu inhibisyon sonucunda timidilat ve purinlerin sentezinde esansiyel kofaktörler olan N^5 - N^{10} metilen tetrahidrofolat ve N^{10} formil tetrahidrofolat oluşumunu inhibe eder. Bu inhibisyon sonucunda DNA replikasyonu inhibe olur ve hücre ölümü gerçekleşir. Aynı zamanda, purinlerin *de novo* sentezine dahil olan glisinamid ribonükleotit (GAR) transformilaz ve aminoimidazol karboksamid (AICAR) transformilaz enzimleri de MTX-poliglutamat tarafından inhibe edilmektedir. Ayrıca MTX, indirgenmiş folatlar ile taşınma ve poliglutamasyonda kompetisyona girmektedir. MTX'in etkinliği hücrelerdeki konsantrasyonuna ve kalış süresine bağlıdır (Hardman ve Limbrid 2001, Chu ve ark. 1996).

2.5.2. Farmakokinetik Özellikleri

2.5.2.1. Absorpsiyon

MTX'in oral absorpsiyonu uygulanan doza bağımlıdır ve oldukça değişkendir. Daha eski çalışmalarda MTX'in oral absorpsiyonunun özellikle düşük dozda uygulandığında iyi olduğu, biyoyararlanımının %70 civarında olduğu gösterilmiş iken (Herman ve ark. 1989), daha güncel çalışmalarda düşük dozlarda (15 mg/m^2 veya daha düşük) uygulandığında biyoyararlanımının %50'den daha düşük olduğu görülmektedir (Hamilton ve ark. 1997). MTX'in artan dozlarda oral uygulamasını takiben gastrointestinal kanaldaki taşıyıcıların doyurulması nedeniyle absorpsiyonu azalmakta, 80 mg/m^2 'den daha fazla dozda uygulandığında ise oldukça düşmektedir. Besinler MTX'in absorpsiyonunu etkilememektedir (Hamilton ve ark. 1994). İntramüsküler olarak uygulandığında ise absorpsiyonu tamdır (Hardman ve Limbrid 2001).

2.5.2.2. Dağılım

MTX hücre membranlarından aktif taşınma ile geçmektedir. Serum konsantrasyonu 0,1 $\mu\text{mol/ml}$ 'yi aştığında hücreler arası geçişte pasif difüzyon rol oynar. MTX dokulara dağılımı oldukça geniştir ve özellikle böbrek, safra kesesi, dalak, karaciğer ve deride yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Oral ve i.v. yoldan deney hayvanlarına uygulandığında inflamasyonlu eklemlere dağılımı inflamasyon olmayanlardan daha fazladır. Uzun süreli oral yoldan MTX kullanan romatoid artritli hastalarda, sinoviyal sıvı-serum konsantrasyonu oranı 0,9-1,2 arasındadır. MTX vücutta 3. kompartmanda da akümüle olmaktadır ve bu kompartmandan tekrar dağılımı eliminasyon yarılanma ömrünü uzatmakta ve özellikle yüksek dozda uygulandığında toksisite riskini artırmaktadır. MTX böbreklerde haftalar, karaciğerde ise aylar boyunca kalmaktadır. İ.v. uygulamayı takiben dağılım hacmi yaklaşık 0,18 L/kg ve kararlı durum dağılım hacmi ise 0,4-0,8 L/kg olarak rapor edilmiştir. İ.v. uygulamayı takiben beyin omurilik sıvısındaki (BOS) konsantrasyonu doza bağımlıdır. MTX'in BOS konsantrasyonunun 500 mg/m^2 dozda 24 saat i.v. infüzyonu takiben 0,0001 $\mu\text{mol/ml}$, 7500 mg/m^2 dozda bolus i.v. uygulamayı takiben ise 0,01 $\mu\text{mol/ml}$ olduğu rapor edilmiştir. MTX plasentayı geçmektedir (Hardman ve Limbrid 2001).

2.5.2.3. Metabolizma

MTX absorbe edildikten sonra, karaciğer hücre içinde tekrar serbest MTX'e dönüşen poliglutamat formuna dönüştürülür. Etkin formu olan MTX-poliglutamatın çok az miktarları dokularda uzun süre kalabilmektedir. MTX karaciğerde aldehid oksidaz enzimi aracılığı ile %10-15 oranında 7-hidroksi metabolitine (7-OH-MTX) dönüştürülmektedir (Hardman ve Limbrid 2001).

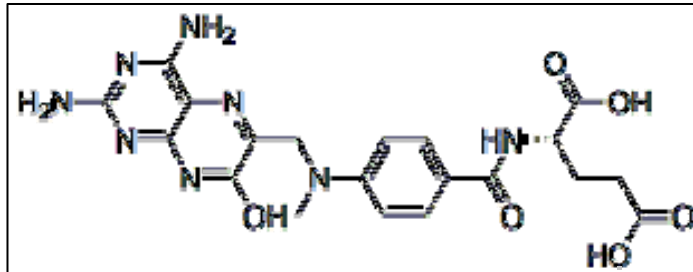
2.5.2.4. Eliminasyon

Romatoid artrit ve psoriasis olan veya düşük dozda kemoterapi alan hastalarda (30 mg/m^2 ve daha az dozda) MTX'in terminal yarılanma ömrünün 3-10 saat arasında olduğu gösterilmiştir. Yüksek dozlarda uygulandığında ise eliminasyon yarılanma ömrü daha uzamış ve yaklaşık 8-15 saat arasında olduğu rapor edilmiştir. Yüksek dozda i.v. infüzyon şeklinde uygulanan MTX'in plazma konsantrasyonundaki azalma bifazik şekilde

gerçekleşmektedir. Normal vücut klirensi olan hastalarda dağılım fazının yarılanma ömrü ($t_{1/2\alpha}$) 1,5-3,5 saat iken eliminasyon yarılanma ömürleri ($t_{1/2\beta}$) ise yaklaşık 8-15 saattir (Hardman ve Limbrid 2001).

MTX temel olarak böbreklerden glomerüler filtrasyon ve aktif tübüler sekresyon aracılığı ile atılmakta ve eliminasyonu doza ve uygulama yoluna bağlı olarak değişmektedir. İnsanda i.v. bolus uygulama sonrasında uygulanan dozun %80-90'ı 24 saat içinde değişmeden idrar ile atılmaktadır. %10 veya daha az bir oranda ise safra ile atıldığı gösterilmiştir. 10 mg/kg dozda oral yoldan uygulandığında idrarda 24 saatte sadece %15'i tayin edilmiş, %48'i ise 5 günde atılmıştır. MTX klirensi oldukça değişkenlik göstermekte ve yüksek dozlarda azalmaktadır. MTX'in klirensinin azalması toksisitesinden sorumlu temel faktörlerden biri olarak gösterilmiştir (Hardman ve Limbrid 2001). Sıçan ve farelerde uygulanan MTX dozunun %50'den fazlası karaciğerden safra ile elimine olmaktadır (Handerson ve ark. 1965).

2.5.3. 7-OH-MTX



Şekil 2-12: 7-OH-MTX'in kimyasal yapısı

İnsanda MTX'in yaklaşık %15'i karaciğerde aldehid oksidaz enzimi ile 7-OH-MTX metabolitine (Şekil 2-12) dönüştürülmektedir. 7-OH-MTX yüksek doz MTX infüzyonundan sonra 3. saatte plazmada pik yapmaktadır. Plazmadaki eliminasyonu bifazik olarak gerçekleşmekte ve yarılanma ömrü MTX'in terminal yarılanma ömründen 11 kat daha uzun, renal klirensinin ise MTX'in renal klirensinden 4 kat daha az olduğu gösterilmiştir (Breithaupt ve ark. 1982). 10 mg/kg dozda MTX'in sıçanlara uygulanmasını takiben MTX'in çok hızlı bir şekilde 7-OH-MTX'a dönüştürüldüğü ve birkaç dakika gibi kısa bir sürede MTX ve 7-OH-MTX'in yüksek konsantrasyonlarda

safrada tayin edilebildiği gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucu sıçanlarda karaciğerin MTX'in metabolizmasından ve eliminasyonundan sorumlu temel organ olduğunu göstermektedir (Bremnes ve ark. 1989). 7-OH-MTX ana bileşikten 200 kez daha az sitotoksiktir (Farquar ve ark. 1972).

2.5.4. Tedavide Kullanımı

MTX düşük dozda ciddi psoriazisin tedavisinde kullanılmaktadır. Tedavi 5 gün boyunca günde 2,5 mg dozda oral yoldan (bu periyodu takiben 2 gün ara ile) veya haftada 10-25 mg dozda i.v. olarak sürdürülür. Ayrıca romatoid artrit hastalarında düşük dozlarda remisyonu artırmak amacıyla da kullanılmaktadır (Hardman ve Limbrid 2001).

MTX çocuklarda görülen ALL' de sıklıkla kullanılan bir ilaçtır. Tedavinin idame ettirilmesi için haftada 30 mg/m² dozda (ikiye bölünerek) veya ayda 175-525 mg/m² dozda (2 gün içinde) intramüsküler olarak uygulanır. MTX'in yetişkinlerde görülen lösemide, meninjeal lösemi profilaksisi hariç, oldukça sınırlı bir kullanımı vardır. MTX'in intratekal uygulamasına meninjeal lösemi veya lenfoma profilaksisi ve tedavisi amacıyla ve meninjeal karsinomatosis tedavisi için başvurulmaktadır. Önerilen intratekal doz 3 yaşın üzerindeki hastalarda 12 mg'dır. Bu doz, her 4 gün boyunca, serebrospinal sıvıda malign hücre kalmadığından emin olana kadar uygulanır (Hardman ve Limbrid 2001).

MTX aynı zamanda osteosarkoma, non-Hodgkin lenfoma ve meme, baş-boyun, over, mesane kanserlerinde diğer antineoplastik ilaçlarla kombine olarak kullanılmaktadır (Hardman ve Limbrid 2001).

Yüksek dozda MTX (250 mg-7,5 g/m²), lökoverin ile kurtama yapılarak, osteosarkoma, çocuklarda görülen lösemi ve non-Hodgkin lenfomalarda uzun yıllardır başarılı olarak kullanılmaktadır (Hardman ve Limbrid 2001).

2.5.5. Toksisitesi ve Yan Etkileri

MTX'in başlıca toksik etkileri, diğer antineoplastik ajanlarda da olduğu gibi, kemik iliği ve gastrointestinal epitelin hızlı bölünen hücreleri üzerinde oldukça fazladır. Mukozit, kemik iliği supresyonu ve trombositopeni gibi yan etkiler ilacın

uygulanmasını takiben 5-10 gün içinde maksimum düzeye ulaşır (Hardman ve Limbrid 2001).

Psoriasis ve romatoid artrit tedavisinde kronik olarak uygulanan MTX'in karaciğer üzerine toksik etkileri vardır ve hepatik fibrozis ve siroza neden olabilir (Hardman ve Limbrid 2001).

Akut hepatotoksisite insanlarda yüksek doz MTX tedavisi sonrasında oldukça sık görülen yan etkilerden birisidir. 7-OH-MTX'in sıçanlar da yapılan bir çalışmada MTX'in indüklediği hepatotoksisitede olası bir aracı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca 7-OH-MTX'in sudaki çözünürlüğü ana bileşikten 3-5 kat daha azdır ve böbreklerdeki tübüllerde kristalizasyonu nedeniyle MTX tedavisinden sonra görülen renal toksisite de önemli rolü vardır (Smeland ve ark. 1994).

Bunların yanında alopesi, dermatit, defektif oogenezis veya spermatogenezis, abortus ve teratojenite de yan etkileri arasındadır (Hardman ve Limbrid 2001).

İntratekal uygulanması sonucu serebrospinal sıvıda inflamatuvar yanıtı neden olabilir. Nadiren koma ve ölümlerle sonuçlanabilir. Lökoverin nörotoksisiteyi geri döndüremez (Hardman ve Limbrid 2001).

2.5.6. Metotreksata Karşı Gelişen Direnç

MTX'a karşı gelişen dirençte çeşitli mekanizmalar rol oynamaktadır. Bunlar, MTX'in hücre içine taşınmasında bozukluk, DHFR enziminde enzimin yüksek konsantrasyonda sentezlenmesi ile sonuçlanan gen amplifikasyonu, MTX'in DHFR enzimine olan afinitesinin azalması ve ABC üst familyasına dahil taşıyıcı proteinlerin ekspresyonlarının artması sonucu MTX'in hücre dışına atılımının artması olarak sıralanabilir (Sorbello 2001)

İlk olarak Masuda ve ark. (1997) tarafından EHBR sıçanlarda yapılan bir çalışmada MTX'in Mrp2 tarafından taşındığı ortaya konmuştur. Normal sıçanlarda MTX safra ile atılırken Mrp2 eksikliği olan EHBR sıçanlarda safra ile atılımının olmadığı gösterilmiştir. Daha sonra yapılan hücre düzeyindeki çalışmalarda MTX'e karşı direnç gelişimine neden olan ABC taşıyıcı proteinler gösterilmiştir (Tablo 2-8).

Tablo 2-8: MTX'in *in vitro* şartlarda substratı olduğu gösterilmiş ABC taşıyıcı proteinler

ABC taşıyıcı proteinleri aşırı oranda eksprese eden hücre dizileri	Referans
P-gp	Norris ve ark. 1996
MRP1	Hooijberg JH ve ark.1999, Bakos E ve ark. 2000
MRP2	Hooijberg JH ve ark.1999, Bakos E ve ark. 2000
MRP4	Chen Z. S. Ve ark. 2002.
BCRP	Rhee ve Schneider 2005
Transfekte edilmiş hücrelerde ilaç rezistansı gösteren ABC taşıyıcılar	
MRP3	Zeng H ve ark. 2001, Kool M. ve ark. 1999
MRP5	Wielinga P ve ark. 2005

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Aletler

HPLC sistemi:

- Pompa: Ultimate 3000 (Dionex Corp, Sunnyvalley, CA, USA)
- Detektör (UV): SF757 (Kratos, Ramsey, NJ, USA)
- Ototampler: Midas (Spark, Emmen, Hollanda)
- Kolon: Microspher C18 (10 cm x 4.6 mm ID) (Varian Inc, Palo Alto, CA, USA)
- Ön kolon: Chromesep RP guard colum (Varian Inc, Palo Alto, CA, USA)

Soğutmalı santrifuj: Centrifuge 5417, Eppendorf AG, Hamburg, Almanya.

Polietilen katater: Portex Limited, Hythe, İngiltere.

Nitroselüloz membran: Hybond, Amersham, İngiltere.

Fotoğraf filmi: Kodak® Blue X-OMAT AR film, Eastman Kodak Company, ABD.

Film makinesi: Kodak X-OMAT 2000 Processor 129444, Eastman Kodak Company, ABD

3.2. Kullanılan antikorlar

M3II-18: Dr. G.L. Scheffer'den tedarik edilmiştir (VU Universite Hastanesi, Hollanda)

M4I-80: Dr. G.L. Scheffer'den tedarik edilmiştir (VU Universite Hastanesi, Hollanda)

Rat-immunoglobulin / HRP (P0450): Dako, Danimarka.

3.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Metotreksat: Emthexate PF® 25mg/ml, Pharmachemie, Hollanda.

7-OH-Metotreksat: Toronto Research Chemicals Inc., Kanada.

Ketamin: Ketanest-S (25 mg/ml), Parke-Davis, Hollanda.

Ksilazin: Sigma-Aldrich®

Metoksifluran: Metofane, Medical Developments Australia Oty. Ltd., Avustralya.

BSA (Bovine Serum Albumin): Fraksiyon 5, Roche, Almanya.

Ponceau S: Sigma-Aldrich®

ECL: ECL Western blotting reagents-Amersham, RPN 2209.

Amonyum format: Sigma-Aldrich®

Asetonitril: Merck

HCl: Merck

Perklorik asit: Merck

Potasyum asetat: Merck

2-merkaptotanol: Sigma-Aldrich®

Sodyum Dodesil Sülfat: Sigma-Aldrich®

Kaleidoscope: Bio-Rad, Hollanda.

Tween: Merck

Tetrametiletildiamin: Sigma-Aldrich®

Amonyum persulfat: Merck

Akrilamid / bisakrilamid: Sigma-Aldrich®

Trizma baz: Merck

Glisin: Merck

Metanol: Merck

3.4. Kullanılan Deney Hayvanları ve Genel Özellikleri

Deneylerde 9-14 haftalık, dişi, %99 Fvb kökenli *Bcrp1*^{-/-}, *Mrp2*^{-/-} knock-out ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} double knock-out fareler kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak %99 FVB kökenli fareler kullanılmıştır. *Mrp2* ve *Bcrp1* fareler Hollanda Kanser Enstitüsü Deneysel Tedavi Bölümü'nde Dr. Alfred Schinkel' in laboratuvarında üretilmiştir. *Mrp2*^{-/-} fareler, 129/Ola farelerin 4. ve 6. eksonlar arasını içeren 1.7-kb'lık kısmı silinip yerine 2.0-kb *pgk-hygro cassette* yerleştirilerek gerçekleştirilmiştir. Üretilen *Mrp2*^{-/-} fareler %99 FVB kökenli fareler ile çaprazlanmıştır (Vlaming ve ark. 2006). *Bcrp1*^{-/-} farelerde, 129/Ola farelerdeki 3. ve 6. eksonlar arasındaki 5,1-kb'lık kısım silinip yerine 1,8-kb *pgk-hygro cassette* yerleştirilmiştir. 129/Ola kökenli *Bcrp1*^{-/-} fareler %99 FVB kökenli fareler ile çaprazlanmıştır (Jonker ve ark. 2002). %99 FVB kökenli *Bcrp1*^{-/-} ve *Mrp2*^{-/-} fareler birbirleri ile çaprazlanarak *Bcrp1/Mrp2* double knock-out fareler üretilmiştir.

Tüm deney hayvanları 12 saat gündüz 12 saat gece periyodunun sağlandığı ve oda sıcaklığının (22±1 °C) sabit olduğu kontrollü şartlarda bakılmıştır. Standart yem ile beslenmiş (AM-II; Hope Farms, Woerden, Hollanda) ve çeşme suyu verilmiştir. Deney hayvanlarının bakımı, muhafazası ve kullanımları süresince Hollanda yasaları esas alınmıştır. Deneyler Hollanda Kanser Enstitüsü Deney Hayvanları Etik kurulu tarafından 13 Eylül 2006 tarihli, 04.053 sayılı karara uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.5. Farmakokinetik deneyler

Metotreksat' ın (MTX) farmakokinetik profini değerlendirmek için Fvb, *Bcrp1*^{-/-} ve *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelere intravenöz (i.v.) ve oral yoldan 50 mg/kg dozda MTX uygulanmıştır.

3.5.1. İntravenöz uygulama

Metotreksat (Emthexate PF® 25mg/ml, Pharmachemie, Hollanda) 50 mg/kg dozda maksimum 150 µl hacimde olacak şekilde serum fizyolojik ile seyreltilerek Fvb, *Bcrp1*^{-/-} ve *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerin kuyruk veninden uygulanmıştır (n=3-14, Tablo 3-1). Uygulamayı takiben 7.5, 15, 30, 60 ve 120 dakika olarak belirlenmiş olan zaman noktalarında metoksifluran anestezisi altında kardiyak ponksiyon ile kanları

alınmış, servikal dislokasyon ile feda edilerek doku dağılım profilini değerlendirmek ve taşıyıcı proteinlerin bu prosesteki etkisini inceleyebilmek amacıyla farelerden karaciğer, böbrek ve tüm ince barsak izole edilmiştir. İnce barsak ve içeriği bir birinden ayrılmıştır. Kan örnekleri santrifuj edilmiş ve plazma örnekleri analiz edilene kadar -20 C° de saklanmıştır. İzole edilen dokular ve ince barsak içeriği %4'lük BSA (Bovine Serum Albumin- Sığır Serum Albumini) içinde homojenize edilmiş ve analiz edilene kadar -20 C° de saklanmıştır.

3.5.2. Oral uygulama

MTX klinikte romatoid artrit ve psoriasis tedavisi için hastalara oral yoldan uygulanmaktadır (Hardman ve Limbrid 2001). *Bcrp1* ve *Mrp2*'nin MTX'in absorpsiyonu ve biyoyararlanımına olan olası etkilerini değerlendirilmek amacıyla oral uygulama deneyleri gerçekleştirilmiştir. Metotreksat (Emthexate PF® 25mg/ml, Pharmachemie, Hollanda) 50 mg/kg dozda maksimum 300 µl hacimde olacak şekilde serum fizyolojik ile seyreltilerek Fvb, *Bcrp1*^{-/-} ve *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelere (n= 5-7, Tablo 3-1) gavaj yardımı ile oral yoldan uygulanmıştır. Uygulamayı takiben 7.5, 15, 30 ve 60. dakika olarak belirlenmiş olan zaman noktalarında kuyruktan kan örneği (yaklaşık 60µl) alınmıştır. 120. dakikada metoksifluran anestezisi altında kardiyak ponksiyon ile kanları alınmış, servikal dislokasyon ile feda edilerek karaciğer, böbrek ve tüm ince barsak izole edilmiştir. İnce barsak ve içeriği birbirinden ayrılmıştır. Kan örnekleri santrifuj edilmiş ve plazma örnekleri analiz edilene kadar -20 C° de saklanmıştır. İzole edilen dokular ve ince barsak içeriği %4'lük BSA içinde homojenize edilmiş ve analiz edilene kadar -20 C° de saklanmıştır.

3.5.3. Safra Kesesi Kanülasyonu Deneyleri

Mrp2 ve *Bcrp1*'in MTX'in doğrudan ince barsağa atılımı (kandan barsak duvarı aracılığı ile lumene sekrete olması) ile hepatik eliminasyondaki (hepatositlerden safraya sekresyonu ile barsağa atılması) rolünün ayırd edilebilmesi amacıyla Fvb, *Bcrp1*^{-/-} ve *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde (n=4-6, Tablo 3-1) safra kesesi kanülasyonu deneyleri gerçekleştirilmiştir. Ketamin (25mg/ml) ve ksilazin kombinasyonu anestezisi altında çalışılmıştır. 100 mg/kg dozda ketamin ve 8 mg/kg dozda ksilazin 5µl/g dozda i.p. olarak uygulanmıştır. Vücut sıcaklığının düşmemesi için 37 C° de sabit ısıda duran

ısıtıcılı yastığa yatırılmış ve vücut ısısı rektal termometre ile deney süresince kontrol edilmiştir. Anestezi altında abdominal kavite cerrahi makas ile açılmıştır. Safra kesesinden çıkan ve ince barsağa inen genel safra kanalının cerrahi iplik ile distal ligasyonu yapılmıştır. Ligasyonu takiben safra kesesi penset yardımı ile tutulmuş ve ince cerrahi makas ile kesi yapılmıştır. 0.28 mm çapında polietilen katater (Portex Limited, Hythe, United Kingdom) kesiye yerleştirilmiş ve cerrahi ip ile sabitlenmiştir. Birkaç dakika süre ile safranin kateterden Eppendorf tüpüne akışı kontrol edilmiştir. Safra akışının standardizasyonu sağlandıktan sonra 50 mg/kg dozda MTX kuyruk veninden i.v. olarak uygulanmış ve 15 dakikalık periyodlarla 60 dakika süresince daha önceden ağırlıkları belirlenmiş Eppendorf tüplerine safra örneği toplanmıştır. Safra örneği bulunan tüpler tekrar tartılmış, her biri boş plazma ile 500µl' ye tamamlanmış ve analiz edilene kadar -20 C° de saklanmıştır. Örneklerdeki MTX valide edilmiş yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) tayin yöntemi ile analiz edilmiştir.

Tablo 3-1: Farmakokinetik deneylerde kullanılan deney hayvanı sayıları

	i.v. Uygulama					Oral uygulama	Safra kesesi kanülasyonu
	7.5 dak.	15 dak.	30 dak.	60 dak.	120 dak.		
Kontrol	8	5	14	6	7	7	5
<i>Bcrp1^{-/-}</i>	5	3	9	3	5	5	6
<i>Mrp2^{-/-}</i>	8	6	8	5	5	5	6
<i>Bcrp1/Mrp2^{-/-}</i>	6	6	11	3	5	5	4

3.6. Metotreksatın plazma, safra ve doku örneklerinde tayini

Plazma, doku ve safra örneklerindeki MTX konsantrasyonları Van Tellingen ve ark. (van Tellingen ve ark. 1989) tarafından geliştirilmiş HPLC tayin yöntemi kullanılarak saptanmıştır.

3.6.1. Çözeltilerin ve standartların hazırlanması

3.6.1.1. Mobil faz

İki ayrı mobil faz hazırlanmıştır. İlk olarak Mobil Faz A (10 mM amonyum format tamponu pH: 3,5) hazırlanmıştır. 0,63 g amonyum format tartılarak 1L suda çözündürülmüş ve pH'sı 10 M HCl ile 3,5'e ayarlanmıştır. Asetonitril ve Mobil Faz A 25:75 (v/v) oranında karıştırılarak Mobil Faz B hazırlanmıştır.

3.6.1.2. 1.5 M Perklorik asit hazırlanışı

%60'lık 16 ml HClO₄ üzerine 84 ml distile su eklenmiştir.

3.6.1.3. 8,0 M Potasyum asetat hazırlanışı

100 ml'lik erlene 50 ml distile su konmuş ve 79 g Potasyum asetat çözündürülerek 100 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

3.6.1.4. Metotreksat stok çözeltisi hazırlanışı

6,06 mg MTX (MA: MTX.3H₂O = 508 g/mol) 100 ml'lik balon jojeye tartılmış ve 20 ml distile su eklenmiştir. Birkaç damla 5M NaOH eklenerek tamamen çözünmesi sağlanmış ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanmış olan stok çözeltideki MTX konsantrasyonu 119,3 µM olarak hesaplanmıştır. Hazırlanan çözelti 1,5 ml'lik tüplere aktarılmış ve -20 C° de saklanmıştır.

3.6.1.5. MTX plazma standardının hazırlanışı

25 ml'lik balon jojeye 1 ml stok MTX çözeltisi konmuş ve boş insan plazması ile hacmine tamamlanmıştır. Plazma standartının konsantrasyonu 4800 nM olarak hesaplanmıştır. 1,2 ml'lik hacimlerde Eppendorf tüplerinde -20 C° de saklanmıştır.

3.6.1.6. MTX plazma kalite kontrol standartlarının hazırlanışı

Metodunun valide edilmesi amacıyla 25 ml'lik balon jojelerde üç farklı konsantrasyonda (4800 nM, 480 nM ve 48 nM) MTX kalite kontrol plazma standartları hazırlanmış ve 1,2 ml'lik ependorf tüplerinde -20 C° de saklanmıştır.

3.6.1.7. Kalibrasyon standartlarının hazırlanışı

Her örnek seti analizi için 4800, 1920, 960, 480, 192, 96, 48, 24 nM ve boş olmak üzere 9 farklı konsantrasyonda MTX plazma standardı taze olarak hazırlanmıştır. 480 nM standart hazırlamak için 4800 nM MTX plazma standardından 150 µl alınmış ve 1350 µl boş insan plazması eklenmiştir. 48 nM standart hazırlamak için ise 480 nM MTX plazma standardından 150 µl alınmış ve 1350 µl boş insan plazması eklenmiştir. Diğer konsantrasyonlardaki plazma kalibrasyon standartlarının hazırlanması Tablo 3-2'e göre yapılmıştır. Her bir kalibrasyon konsantrasyonu için 2 adet standart hazırlanmıştır.

Tablo 3-2: MTX'in plazmadaki kalibrasyon standartlarının hazırlanması

Kalibrasyon konsantrasyonları	Kullanılan standart	µl	Boş plazma (µl)
4800 nM	4800 nM	250	0
1920 nM	4800 nM	100	150
960 nM	4800 nM	50	200
480 nM	480 nM	250	0
192 nM	480 nM	100	150
96 nM	480 nM	50	200
48 nM	48 nM	250	0
24 nM	48 nM	125	125

3.6.2. Doku Homojenizasyonu

Oral ve i.v. uygulama sonrası izole edilen karaciğer 5 ml, diğer organlar 2 ml %4'lük BSA içinde homojenize edilmiştir. Homojenatlar analiz edilene kadar -20 C° de saklanmıştır.

3.6.3. Ekstraksiyon işlemi

Tüm kalibrasyon standartları, kalite standartları, plazma ve doku homojenat örnekleri 2 ml'lik Eppendorf tüplerine 250 µl olarak konulmuş ve tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Her tüpe 250 µl soğuk 1,5 M HClO₄ eklenmiş, 5 saniye vorteks ile karıştırılmış ve 5 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 5 dakika 4 C° 'de >5000 g hızda santrifüjlenmiştir. Supernatant kısmından 350 µl alınarak yeni tüplere konulmuştur. 50 µl soğuk 8 M potasyum asetat çözeltisi eklenmiş, 5 saniye vorteks ile karıştırılmış ve 2 dakika 4 C° 'de >5000 g hızda santrifüj edilmiştir. Supernatant kısmından yaklaşık 300 µl alınarak analiz için HPLC viallerine konulmuştur.

3.6.4. HPLC sistemi:

Dalga Boyu: 305 nm

Kolon: Microspher C18 (10 cm x 4.6 mm ID) (Varian Inc, Palo Alto, CA, USA)

Ön kolon: Chromesep RP guard colum (Varian Inc, Palo Alto, CA, USA)

Akış hızı: 1.0 ml/dak

Mobil faz A: 10 mM Amonyum format tamponu pH 3.5

Mobil faz B: Asetonitril (25k) + Mobil faz A (75k)

Alıkonma Zamanı: 21 dakika

Akış gradiyenti:

0 – 15 dakika %15'den %75'e Mobil faz B

15 – 15.5 dakika %75'den %95'e Mobil faz B

15.5 – 17.5 dakika %95 Mobil faz B

17.5 – 18 dakika %95'den %15'e Mobil faz B

18 – 21 dakika %15 Mobil faz B

3.7. ABC Gen Familyasına Dahil Diğer Taşıyıcı Proteinlerin Karaciğerdeki Ekspresyonlarının Western Blot Yöntemi ile Değerlendirilmesi:

Bcrp1 ve Mrp2'nin MTX'in eliminasyonlarındaki rollerini tam olarak açıklayabilmek için, karaciğerde MTX'in substratı olduğu ABC gen familyasına dahil olan Mrp3 ve Mrp4 taşıyıcı proteinlerinin *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} double knockout ve normal farelerdeki düzeyleri MTX uygulaması yapılmaksızın Western blot yöntemi ile tayin edilmiştir.

3.7.1. Karaciğer dokusundaki Crude membran fraksiyonlarının hazırlanışı

Normal ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} double knock-out fareler hafif metoksifluran anestezisini takiben servikal dislokasyon ile feda edilmiş, karaciğerleri izole edilerek kuru buz içindeki tüplere alınmıştır. Her bir karaciğer 12,5 ml homojenizasyon tampon çözeltisinde (1 M Tris pH 7,5; 1 M sukroz; 0,5 M EDTA; Tablet) homojenize edilmiştir. Homojenat 15 dakika 6000 rpm hızda santrifüj edilmiş, süpernatant kısım alınarak ultra-santrifüjde 30000 rpm hızda 30 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet 0,5 ml homojenizasyon tampon çözeltisi ile tekrar çözündürülmüş, daha küçük hacimlere ayrılarak sıvı azot ile dondurulmuş ve analiz edilene kadar -80 °C’de saklanmıştır. Membran fraksiyonlarındaki protein konsantrasyonunun tayini Bio-Rad protein ölçüm kiti kullanılarak yapılmıştır. Örnekler Laemmli tamponu (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, %10 Gliserol, %1 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), %0,05 brom fenol mavisi ve %2 2-merkaptetanol) ile muamele edilmiş ve 65 °C’de 10 dakika protein denatürasyonu için bekletilmiştir. Bu işlemin ardından moleküler marker (Kaleidoscope) ve protein örnekleri %5’lik jele yüklenmiş ve jel yürütme tamponunda elektroforez jel ünitesinde 100 V’ ta 60-90 dakika süreyle proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılması beklenmiştir. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra transfer tampon çözeltisi içinde proteinlerin nitroselüloz membrana (Hybond) transferi (100 mA, 1 gece, 4 °C) sağlanmıştır. Transfer tamamlandıktan sonra membran eşit protein miktarının yüklendiğinden emin olmak amacıyla Ponceau S çözeltisi ile muamele edilmiştir. Membran PBST yıkanmış ve bloklama çözeltisi (PBS, %25 Tween, %1 BSA ve %1 süt tozu) ile 1 saat bekletilmiştir. Mrp3 için M3II-18 (1:100), Mrp4 için M4I-80 (1:400) primer antikorları ile 1 saat oda sıcaklığında inkubasyon yapılmıştır. Bu işlemi takiben membran PBST ile 3 kez 10’ar dakika boyunca yıkanmış ve ardından sekonder antikorlar ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sekonder antikor olarak Rat-immunoglobulin / HRP (Dako P0450) kullanılmıştır. Membran 3 kez 10’ar dakika PBST ve 1 kez 10 dakika PBS ile yıkandıktan sonra 1 dakika ECL (ECL Western blotting reagents-Amersham, RPN 2209) ile inkübe edilmiş ve karanlık odada fotoğraf filmi ile muamele edilerek film makinesinden geçirilmiştir.

Ayırıcı jel (running gel) (%8)

Akrilamid / bisakrilamid (37,5:1) %40	2 ml
1,5 M tris pH 8,8	2,5 ml
H ₂ O	5,35 ml
SDS %20	0,05 ml
APS (Amonyum persulfat) %10	0,1 ml
TEMED (Tetrametiletildiamin)	0,01 ml
Toplam hacim	10 ml (2 jel için)

Toplayıcı Jel (Stacking gel) (%5)

Akrilamid / bisakrilamid (37,5:1) %40	0,625 ml
0,5 M tris pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O	3,05 ml
SDS %20	0,025 ml
APS (Amonyum persulfat) %10	0,05 ml
TEMED (Tetrametiletildiamin)	0,005 ml
Toplam hacim	5 ml (2 jel için)

Jel yürütme tamponu

*1xSDS (100 ml 10xSDS + 900 ml H₂O)

10x SDS

Trizma baz	60,6 g
Glisin	288 g
SDS	20 g
H ₂ O ile	2 litreye tamamlanır.

Transfer tamponu

Trizma baz	6,06 g
Glisin	28,82 g
Metanol	400 ml
H ₂ O ile	2 litreye tamamlanır.

PBST

400 ml PBS + 800 µl %25 Tween

3.8. Farmakokinetik Parametrelerin Hesaplanması

MTX'in plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi Microsoft Excel programı kullanılarak elde edilmiştir. i.v. ve oral yoldan MTX uygulamasını takiben plazma ve dokulardaki MTX düzeyleri ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak gösterilmiştir. İ.V. ve oral yoldan MTX uygulamasını takiben her zaman noktasındaki ortalama konsantrasyonlardan elde edilen plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi kullanılarak, eğri altında kalan alan (AUC) lineer trapezoidal yöntem (yamuklar yöntemi) göre hesaplanmıştır. $t=0$ ve son örneğin alındığı zaman noktası arasındaki AUC değerleri ortalama $\pm$ Standart hata (SE) olarak gösterilmiştir.

3.9. İstatistiksel Analiz

İki veri seti arasındaki farklılığın istatistiksel anlamlılığı Student's t-testi ile değerlendirilmiştir. Farklılıklar $P<0,05$ olduğu zaman anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Metotreksatın plazma, safra ve doku örneklerinde HPLC ile tayini

Plazma, doku ve safra örneklerindeki MTX konsantrasyonları Van Tellingin ve arkadaşları (van Tellingin 1989) tarafından geliştirilmiş HPLC tayin yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Bu metoda göre elde edilen MTX ve 7-OH-MTX' a ait kromatogram örneği Şekil 4-1'de, plazmada hazırlanan standartlara ait kalibrasyon eğrisi Şekil 4-2'de ve bu eğrinin hazırlanmasında kullanılan MTX pik alanları Tablo 4-1'de gösterilmiştir. MTX'in i.v. ve oral yoldan uygulanmasından sonra belirlenen zaman noktalarında izole edilen karaciğer, böbrek, ince barsak ve ince barsak içeriğindeki MTX düzeyleri uygulanan dozun yüzdesi olarak gösterilmiştir.

4.1.1. İntravenöz uygulamayı takiben plazmadaki MTX düzeyleri

Bcrp1 ve Mrp2'nin MTX'in farmakokinetiğindeki rölatif yollarının belirlenmesi için, 50 mg/kg dozda MTX i.v. olarak normal, *Bcrp1*^{-/-}, *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelere uygulanmış ve bunu takiben 7.5, 15, 30, 60 ve 120 dakika zaman noktalarında kan alınmış ve organ izolasyonu yapılmıştır. Bu zaman noktalarına ait MTX plazma konsantrasyonları Tablo 4-2'de, plazma konsantrasyonu – zaman eğrileri de Şekil 4-3'de gösterilmiştir.

Uygulamadan 7.5 dakika sonra plazmadaki ortalama MTX konsantrasyonları normal farelerde 23,3±2,7 µg/ml, *Bcrp1*^{-/-} farelerde 28,8±2,0 µg/ml, *Mrp2*^{-/-} farelerde 36,2±4,9 µg/ml ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 35,3±4,8 µg/ml olarak bulunmuştur. Mrp2 ve Bcrp1 taşıyıcı proteinlerini eksprese etmeyen farelerdeki plazma MTX değerlerinin, normal faredekinden anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür (p<0,01).

15. dakikadaki MTX plazma düzeyleri ise normal farelerde 9,07±2,7 µg/ml, *Bcrp1*^{-/-} farelerde 11,8±1,3 µg/ml, *Mrp2*^{-/-} farelerde 18,9±6,4 µg/ml ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 32,6±13,6 µg/ml olarak bulunmuştur. Normal fareler ile karşılaştırıldığında MTX plazma düzeylerinin *Mrp2*^{-/-} farelerde 2 (p<0,05), *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 3,6 (p<0,001) kat daha yüksek olduğu görülmüştür.

30. dakikadaki MTX plazma değerleri normal fareler ($4,3 \pm 0,7$ $\mu\text{g/ml}$) ile karşılaştırıldığında *Bcrp1*^{-/-} farelerde 2 ($8,3 \pm 1,4$ $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,001$), *Mrp2*^{-/-} farelerde 3 ($11,9 \pm 2,2$ $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,001$) ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 5 ($19,8 \pm 6,8$ $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,001$) kat daha yüksek olduğu görülmüştür.

60. dakikadaki MTX plazma değerleri normal farelerde $1,4 \pm 0,4$ $\mu\text{g/ml}$, *Bcrp1*^{-/-} farelerde $3,1 \pm 0,9$ $\mu\text{g/ml}$, *Mrp2*^{-/-} farelerde $2,7 \pm 0,4$ $\mu\text{g/ml}$ ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise $7,8 \pm 1,4$ $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Normal fareler ile karşılaştırıldığında MTX plazma düzeyleri *Bcrp1*^{-/-} farelerde 2 ($p < 0,01$), *Mrp2*^{-/-} farelerde 2 ($p < 0,001$) ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 6 ($p < 0,001$) kat daha yüksek olduğu görülmüştür.

120. dakikada plazmadaki MTX konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre *Bcrp1*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde 2 kat daha yüksek olduğu ($p < 0,05$; $p < 0,01$) fakat *Mrp2* farelerde anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 4-4). Plazma MTX konsantrasyonları normal farelerde $0,27 \pm 0,1$ $\mu\text{g/ml}$, *Bcrp1*^{-/-} farelerde $0,57 \pm 0,3$ $\mu\text{g/ml}$, *Mrp2*^{-/-} farelerde $0,35 \pm 0,1$ $\mu\text{g/ml}$ ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde $0,57 \pm 0,2$ $\mu\text{g/ml}$ olarak ölçülmüştür.

50 mg/kg dozda i.v. MTX uygulamasını takiben plazmadaki MTX konsantrasyonlarının ortalama değerleri kullanılarak hesaplanan $\text{AUC}_{0-2\text{sa}}$ değerleri Tablo 4-3'de gösterilmiştir. $\text{AUC}_{0-2\text{sa}} \pm \text{SE}$ değerleri normal farelerde 445 ± 18 dak. $\mu\text{g/ml}$, *Bcrp1*^{-/-} farelerde 692 ± 28 dak. $\mu\text{g/ml}$, *Mrp2*^{-/-} farelerde 884 ± 39 dak. $\mu\text{g/ml}$ ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 1445 ± 98 dak. $\mu\text{g/ml}$ 'dir. Bu sonuçlara göre, normal fareler ile karşılaştırıldığında $\text{AUC}_{0-2\text{sa}}$ değerleri *Bcrp1*^{-/-} farelerde 1,5 ($p < 0,05$), *Mrp2*^{-/-} farelerde 2 ($p < 0,01$) ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde 3,2 ($p < 0,01$) kat daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4-5).

4.1.2. İntravenöz uygulamayı takiben plazmadaki 7-OH-MTX düzeyleri

MTX'in tayini için kullanmış olduğumuz HPLC analizi ile metotreksatın toksik etkilere neden olduğu daha önce gösterilmiş olan 7-hidroksi (7-OH-MTX) metaboliti de tayin edilmiştir. 50 mg/kg dozda i.v. MTX uygulamasını takiben 7-OH-MTX'in plazmadaki konsantrasyonları Tablo 4-4, plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri ise Şekil 4-6'de gösterilmiştir. 7-OH-MTX, uygulamayı takiben 7,5 dakika gibi kısa bir sürede kanda tayin edilebilmiştir. Özellikle *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde 15.

dakikadan itibaren plazmadaki konsantrasyonu yükselmiş, *Mrp2*^{-/-} farelerde 30., *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 60. dakikada maksimum konsantrasyona ulaşmıştır. Bu zaman noktalarındaki plazma konsantrasyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek iken, *Bcrp1*^{-/-} farelerde anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Mrp2^{-/-} farelerde tüm zaman noktalarındaki metabolit düzeyleri sırasıyla 0,46±0,15 µg/ml, 1,08 ± 0,38 µg/ml, 1,43 ± 0,37 µg/ml, 1,0 ± 0,1 µg/ml ve 0,46 ± 0,06 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla 2 (p<0,05), 4, 6, 10 ve 9 kat (p<0,001) daha yüksektir.

Bcrp1/Mrp2^{-/-} farelerde ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazmadaki 7-OH-MTX düzeyleri tüm zaman noktalarında yüksek olup bu fark özellikle 60. ve 120. dakikalarda oldukça belirgindir. Plazmada ölçülen değerler sırası ile 0,57±0,13µg/ml, 1,59±0,34µg/ml, 2,21±0,6µg/ml, 2,8±0,7µg/ml ve 0,49±0,1µg/ml'dir. Bu değerler kontrol ile karşılaştırıldığında sırasıyla 2, 6, 8, 28 ve 10 kat daha yüksektir (p<0,001).

Plazmadaki 7-OH-MTX konsantrasyonlarının ortalama değerleri kullanılarak hesaplanan AUC_{0-2sa} değerleri Tablo 4-5'de gösterilmiştir. AUC_{0-2sa} ±SE değerleri normal farelerde 17±1dak.µg/ml, *Bcrp1*^{-/-} farelerde 25±3 dak.µg/ml, *Mrp2*^{-/-} farelerde 107±4 dak.µg/ml ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 213±19 dak.µg/ml'dir. Knock-out farelerdeki AUC_{0-2sa} değerleri normal fareler ile karşılaştırıldığında *Bcrp1*^{-/-} farelerde anlamlı bir farklılık bulunmazken, *Mrp2*^{-/-} farelerde 6 (p<0,01), *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 13 (p<0,01) kat daha yüksektir (Şekil 4-7).

4.1.3. İntravenöz uygulamayı takiben karaciğerdeki MTX düzeyleri

50 mg/kg dozda MTX'in i.v. olarak uygulanması takiben 7.5, 15, 30, 60 ve 120 dakika zaman noktalarında karaciğerde MTX düzeyleri tayin edilmiş ve uygulanan dozun yüzdesi olarak hesaplanmıştır. Bu değerler Tablo 4-6 ve Şekil 4-8'da gösterilmiştir. 7.5 dakika gibi kısa bir sürede tüm grupların karaciğerlerindeki MTX düzeylerinin oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir (%44-53). İlerleyen zaman noktalarında ise azalarak 120 dakika sonunda %0,7-1,7'ye kadar düşmüştür. Karaciğerdeki MTX düzeylerinde kontrol grubuna göre *Mrp2*^{-/-} farelerde anlamlı bir fark görülmemiştir. *Bcrp1*^{-/-} farelerin karaciğerindeki 30., 60. dakikalardaki MTX yüzdeleri kontrol grubu ile kıyaslandığında 2 kat (p<0,001), 120. dakikada ise 1,6 kat

($p<0,05$) daha yüksek bulunmuştur. *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerin karaciğerlerinde sadece 30. ve 60. dakikalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükselmiştir..

Karaciğerdeki MTX konsantrasyonu ile aynı zaman noktalarındaki plazmadaki MTX konsantrasyonunun oranı hesaplanmıştır. Özellikle *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde bu oranın tüm zaman noktalarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha az olduğu görülmüştür (Tablo 4-7). 7,5. dakikada bu azalma %50 oranında iken, 15. ve 30. dakikalarda %75 ($p<0,001$), 60. ve 120. dakikalarda ise %80 ($p<0,01$) oranında daha az olduğu görülmüştür. *Mrp2^{-/-}* farelerde 7,5 ve 15. dakikalarda kontrol grubuna göre %50 ve %70 ($p<0,001$), 60. ve 120. dakikalarda ise %70 ($p<0,001$) ve %50 ($p<0,05$) oranında azalma olmuştur. *Bcrp1^{-/-}* farelerde kontrol grubuna göre sadece 7.5. ve 15. dakikalarda sırası ile %15 ve %30 oranında bir azalma görülmüştür ($p<0,05$).

4.1.4. İntravenöz uygulamayı takiben karaciğerdeki 7-OH-MTX düzeyleri

Karaciğerde 7-OH-MTX düzeyleri, grupların hepsinde 7.5. dakika gibi kısa bir sürede tayin edilebilmiş, 15. dakikada en yüksek seviyeye ulaşmış ve bunu takiben azalarak devam etmiştir (Tablo 4-8, Şekil 4-9). *Bcrp1^{-/-}* farelerin karaciğerindeki 7-OH-MTX düzeyleri 30. 60. ve 120. dakikada kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükselmiştir. *Mrp2^{-/-}* ve *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerin karaciğerlerinde tüm zaman noktalarındaki 7-OH-MTX düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu farklılık *Mrp2^{-/-}* farelerde özellikle 120. dakikada kontrol grubuna göre 5 kat daha yüksek ($p<0,001$) iken, diğer zaman noktalarında anlamlı olarak yaklaşık 2 kat daha yüksek olmuştur (7.5., 15. ve 30. dak., $p<0,001$; 60. dak., $p<0,01$). *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerin karaciğerlerindeki 7-OH-MTX düzeyleri ilk iki zaman noktasında kontrol grubuna göre anlamlı olarak 2 kat daha yüksek iken, 30. dakikada 3, 60. dakikada 4 ve 120. dakikada 3 kat daha fazla metabolit tayin edilmiştir ($p<0,001$).

4.1.5. İntravenöz uygulamayı takiben böbrekteki MTX düzeyleri

Uygulamadan sonra 7.5, 15, 30 ve 60. dakikada tüm grupların böbreklerinde tayin edilen MTX düzeyleri Tablo 4-6'da gösterilmiştir. 7.5. dakikada böbrekteki MTX değerleri kontrol grubunda $3,3\pm1,6$, *Bcrp1^{-/-}* farelerde $3,6\pm0,6$, *Mrp2^{-/-}* farelerde $5,3\pm2,3$ ve *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde ise $3,6\pm0,3$ olarak bulunmuştur ve gruplar

arasında anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir. MTX düzeyleri 15. dakikada *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerin böbreklerinde kontrol grubuna göre 3 kat daha yüksektir. 30. dakikada kontrol grubuna göre *Bcrp1*^{-/-} farelerde 1,5, *Mrp2*^{-/-} farelerde 2 ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 3 kat daha yüksek MTX tayin edilmiştir (p<0,001). 60. dakikada kontrole göre *Bcrp1*^{-/-} farelerde 1,5 (p<0,01), *Mrp2*^{-/-} farelerde 1,7 kat (p<0,01), *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 7 (p<0,05) kat daha fazla MTX'in böbreklere akümüle olduğu görülmüştür (Şekil 4-10).

4.1.6. İntravenöz uygulamayı takiben böbrekteki 7-OH-MTX düzeyleri

Böbrekte tayin edilen 7-OH-MTX düzeyleri Tablo 4-8'de, gruplar arasındaki karşılaştırmaları ise Şekil 4-11'da gösterilmiştir. Özellikle *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerin böbreklerinde kontrol grubuna göre 7-OH-MTX düzeylerinde tüm zaman noktalarında oldukça yüksek farklılıklar gözlenmiştir. Bu değerler 7.5, 15., 30. ve 60. dakikalarda kontrol grubuna göre sırası ile 3, 9, 8 ve 35 kat daha yüksektir (7.5., 15. ve 30. dak, p<0,001; 60. dak, p<0,01). *Mrp2*^{-/-} farelerin böbreklerinde de kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm zaman noktalarında sırası ile 4, 7.5, 4 ve 10 kat daha yüksek metabolit akümüasyonu görülmüştür (7.5. dak, p<0,01; 15., 30. ve 60. dak., p<0,001). *Bcrp1*^{-/-} farelerin böbrekteki 7-OH-MTX düzeyleri 15. dakikadan itibaren kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükselmiş fakat bu yükselme diğer knock-out farelerdeki kadar belirgin olmamıştır.

4.1.7. İntravenöz uygulamayı takiben ince barsak dokusu ve içeriğindeki MTX düzeyleri

50 mg/kg dozda MTX'in i.v. olarak uygulanmasını takiben 7.5, 15, 30 ve 60. dakikalarda ince barsak dokusu ve içeriğinde MTX tayini yapılmıştır. Bu zaman noktalarında ince barsak ve içeriğindeki MTX düzeyleri uygulanan dozun yüzdesi olarak ifade edilmiş ve Tablo 4-6'da gösterilmiştir. Tüm gruplarda 7.5. dakikada ince barsak ve içeriğinde MTX saptanmış ve ilerleyen zaman noktalarında da yüzdesi giderek artmıştır. *Bcrp1*^{-/-} farelerde MTX'in ince barsak dokusu ve içeriğine geçen miktarında, kontrol grubuna göre, ilk zaman noktasında %40 (p<0,05), 15. ve 30. dakikalarda %30 (p<0,05), 60. dakikada ise %20 (p<0,05) oranında bir azalma olmuştur. *Mrp2*^{-/-} farelerde kontrol grubuna göre 7.5. dakikada %70 (p<0,001), 15. ve

30. dakikalarda yaklaşık %60 ($p<0,001$) ve 60. dakikada ise %50 ($p<0,001$) oranında daha az MTX'in ince barsak dokusu ve içeriğine geçtiği görülmüştür. *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerin ince barsak ve içeriğinde ise kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında 7.5. dakikada %83 ($p<0,001$), diğer zaman noktalarında ise yaklaşık %90 oranında daha az MTX tayin edilmiştir ($p<0,001$) (Şekil 4-12).

4.1.8. İntravenöz uygulamayı takiben ince barsak dokusu ve içeriğindeki 7-OH-MTX düzeyleri

İnce barsak dokusu ve içeriğinde 7-OH-MTX düzeyleri grupların hepsinde 7.5. dakika gibi kısa bir sürede tayin edilebilmiş ve değerlerin %0,01-0,08 arasında olduğu görülmüştür. 60. dakikada tüm gruplarda en yüksek seviyeye ulaşmış ve bu değerler %0,34-3 arasında olmuştur (Tablo 4-8). *Bcrp1^{-/-}* farelerin ince barsak ve içeriğindeki 7-OH-MTX düzeylerinde sadece 7.5. dakikada kontrol grubuna göre %60 oranında anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0,001$). *Mrp2^{-/-}* ve *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde tüm zaman noktalarındaki 7-OH-MTX düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalma olduğu gözlenmiştir. *Mrp2^{-/-}* farelerin ince barsak ve içeriğindeki 7-OH-MTX düzeyleri tüm zaman noktalarında kontrol grubuna göre %70-80 oranında azalmıştır (7.5. ve 60. dak, $p<0,001$; 15. ve 30. dak, $p<0,01$). *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde ise ince barsak ve içeriğindeki 7-OH-MTX düzeyleri ortalama %0,01-0,34 arasında değişmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm zaman noktalarında %88-93 oranında daha az olduğu görülmüştür ($p<0,001$) (Şekil 4-13).

4.1.9. MTX'in safra ile atılımı

Normal, *Bcrp1^{-/-}*, *Mrp2^{-/-}* ve *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde ($n=4-5$) safra kesesi kanülasyonu deneyleri gerçekleştirilmiştir ve 15 dakikalık periyotlarda toplam 60 dakika boyunca safra örneği alınmıştır.

Tüm gruplardaki, 15 dakikalık periyotların her birindeki safrada ölçülen MTX düzeyleri Tablo 4-9'da, gruplar arasındaki karşılaştırmalar ise Şekil 4-14'de gösterilmiştir. Özellikle *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde, MTX'in safrada tayin edilen miktarı 15 dakikalık periyotların hepsinde kontrol grubuna göre oldukça düşük bulunmuştur (0-15. dak., %11 vs %0,2, $p<0,01$; 15-30. dak., %19 vs %0,7, $p<0,05$; 30-45. dak., %9,9 vs %0,6, $p<0,001$; 45-60. dak., %5,2 vs %0,4, $p<0,01$).

Mrp2^{-/-} farelerin safralarındaki MTX konsantrasyonu özellikle ilk iki periyotta kontrol grubuna göre sırası ile %87 ve %75 oranında azalmıştır (0-15. dak., %11 vs %1,4, $p<0,01$; 15-30. dak., %19 vs %4,5, $p<0,05$). Son iki periyotta da kontrol grubuna göre sırası ile %60 (30-45. dak., %9,9 vs %3,9, $p<0,01$) ve %50 (45-60. dak., %5,2 vs %2,6, $p<0,05$) oranında azalmıştır.

Bcrp1^{-/-} farelerde sadece 0-15. dakikada safradaki MTX konsantrasyonu kontrol grubuna göre %70 oranında azalmış iken (0-15. dak., %11 vs %3,4, $p<0,05$) diğer periyotlarda anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Bcrp1^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerin safradaki MTX düzeyleri *Mrp2^{-/-}* farelerinki ile karşılaştırıldığında; *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde tüm periyotlarda %85 oranında azalmış (0-15. dak., $p<0,05$; 15-30. dak., 30-45. dak., ve 45-60. dak., $p<0,001$), *Bcrp1^{-/-}* farelerde ilk üç periyotta 2 kat yükselmiştir ($p<0,05$).

0-60 dakika arasında, uygulanan MTX dozunun safraya atılan total miktarı (ortalama $\% \pm$ SD) kontrol grubunda $\%45 \pm 20$, *Bcrp1^{-/-}* farelerde $\%25 \pm 10$, *Mrp2^{-/-}* farelerde $\%12 \pm 2$ ve *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde $\%2 \pm 0,5$ olarak hesaplanmıştır. Kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında, MTX safraya atılan miktarı *Mrp2^{-/-}* ve *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde sırası ile %73 ve %95 oranında azalmıştır ($p<0,01$). *Bcrp1^{-/-}* ve *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde safradaki total MTX düzeyleri *Mrp2^{-/-}* fareler ile karşılaştırıldığında; *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde %82 oranında azalmışken ($p<0,001$), *Bcrp1^{-/-}* farelerde 2 kat yükselmiştir ($p<0,05$) (Tablo 4-10 ve Şekil 4-15).

4.1.10. 7-OH-MTX'in safra ile atılımı

Tüm gruplardan alınan safra örneklerinde 7-OH-MTX düzeylerinin tayini yapılmıştır (Tablo 4-11 ve Şekil 4-16). 0-60 dakika arasında, safraya geçen 7-OH-MTX'in düzeyleri (ortalama $\% \pm$ SD) kontrol grubunda $\%2,5 \pm 1,5$, *Bcrp1^{-/-}* farelerde $\%1 \pm 0,4$, *Mrp2^{-/-}* farelerde $\%0,4 \pm 0,1$ ve *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde $\%0,1 \pm 0,04$ olarak hesaplanmıştır. Kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında, safraya atılan total metabolit düzeyleri, *Mrp2^{-/-}* ve *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde sırası ile %84 ($p<0,05$) ve %96 ($p<0,05$) oranında azalmıştır. *Bcrp1^{-/-}* farelerde kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. *Bcrp1^{-/-}* ve *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde safradaki total 7-OH-MTX düzeyleri

Mrp2^{-/-} fareler ile karşılaştırıldığında; *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde %75 oranında azalmışken ($p<0,01$), buna karşın *Bcrp1*^{-/-} farelerde 2 kat yükselmiştir ($p<0,01$).

4.1.11. Oral uygulamayı takiben plazmadaki MTX düzeyleri

Normal, *Bcrp1*^{-/-}, *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelere 50 mg/kg dozda oral yoldan MTX uygulanmış ve bunu takiben 7.5, 15, 30 ve 60. dakika da kuyruktan kan örneği alınmıştır. 120. dakikada metoksifluran anestezisi altında kardiyak ponksiyon ile kanları alınmış ve organ izolasyonu yapılmıştır. Bu zaman noktalarına ait plazma MTX konsantrasyonları Tablo 4-12’de, plazma konsantrasyonu – zaman eğrileri Şekil 4-17’de gösterilmiştir.

Uygulamadan 7.5 dakika sonra kontrol ve *Mrp2*^{-/-} gruplarında plazmada MTX tayin edilememiştir. *Bcrp1*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise plazmadaki ortalama MTX konsantrasyonları sırasıyla $0,11 \pm 0,009$ µg/ml ve $0,21 \pm 0,06$ µg/ml olarak bulunmuştur.

15. dakikadaki ortalama plazma MTX düzeyleri normal farelerde $0,12 \pm 0,003$ µg/ml, *Bcrp1*^{-/-} farelerde $0,20 \pm 0,03$ µg/ml, *Mrp2*^{-/-} farelerde $0,26 \pm 0,08$ µg/ml ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise $0,42 \pm 0,09$ µg/ml olarak bulunmuştur. Normal fareler ile karşılaştırıldığında MTX plazma düzeyleri *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde 3,5 kat ($p<0,05$) daha yüksek olduğu görülürken *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1*^{-/-} farelerde anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

30. dakikadaki ortalama MTX plazma düzeyleri normal farelerde $0,19 \pm 0,05$ µg/ml, *Bcrp1*^{-/-} farelerde $0,31 \pm 0,13$ µg/ml, *Mrp2*^{-/-} farelerde $0,26 \pm 0,09$ µg/ml ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise $0,54 \pm 0,05$ µg/ml olarak bulunmuştur. Normal fareler ile karşılaştırıldığında MTX plazma düzeyleri *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde 2,8 kat ($p<0,001$) yükselmiş, *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1*^{-/-} farelerde anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

60. dakikadaki ortalama MTX plazma değerleri normal farelerde $0,24 \pm 0,08$ µg/ml, *Bcrp1*^{-/-} farelerde $0,45 \pm 0,19$ µg/ml, *Mrp2*^{-/-} farelerde $0,38 \pm 0,1$ µg/ml ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise $0,72 \pm 0,07$ µg/ml olarak tayin edilmiştir. Normal fareler ile karşılaştırıldığında MTX plazma düzeyleri *Bcrp1*^{-/-} farelerde 2 ($p<0,05$), *Mrp2*^{-/-} farelerde 1,6 ($p<0,05$) ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 3 ($p<0,001$) kat yükselmiştir.

120. dakikada plazmadaki MTX konsantrasyonları kontrol grubuna göre *Bcrp1*^{-/-}, *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde sırası ile 2,4 (p<0,001), 1,6 (p<0,001) ve 4 (p<0,001) kat yükselmiştir. Plazma MTX konsantrasyonları normal farelerde 0,21 ± 0,04 µg/ml, *Bcrp1*^{-/-} farelerde 0,50 ± 0,1 µg/ml, *Mrp2*^{-/-} farelerde 0,33 ± 0,07 µg/ml ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 0,84 ± 0,4 µg/ml olarak ölçülmüştür.

50 mg/kg dozda oral yoldan MTX uygulamasını takiben elde edilen plazma konsantrasyonu – zaman eğrisinden hesaplanan AUC_{0-2sa} değerleri Tablo 4-13’de gösterilmiştir. AUC_{0-2sa} ± SE değerleri normal farelerde 22,7 ± 1,5 dak.µg/ml, *Bcrp1*^{-/-} farelerde 45,3 ± 4,6 dak.µg/ml, *Mrp2*^{-/-} farelerde 35,8 ± 2,5 dak.µg/ml ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 77,0 ± 4,3 dak.µg/ml’dir. Bu sonuçlara göre, normal fareler ile karşılaştırıldığında AUC_{0-2sa} değerleri *Bcrp1*^{-/-} farelerde 2 (p<0,05), *Mrp2*^{-/-} farelerde 1,6 (p<0,05) ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 3,4 (p<0,01) kat yüksek bulunmuştur (Şekil 4-18).

Oral yoldan uygulanan MTX’in mutlak biyoyararlanımları kontrol grubunda %5,1; kontrol, *Bcrp1*^{-/-} grubunda %6,6; *Mrp2*^{-/-} grubunda %4,1 ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} grubunda ise %5,3 olarak hesaplanmıştır. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 4-13).

4.1.12. Oral uygulamayı takiben dokulardaki MTX düzeyleri

MTX’in oral yoldan uygulanmasından sonra 120. dakikadaki karaciğer, 60. dakikadaki böbrek, ince barsak ve ince barsak içeriğindeki MTX düzeyleri Tablo 4-14’da gösterilmiştir.

120. dakikada karaciğerdeki MTX düzeyleri kontrol grubuna (%0,48 ± 0,11) göre *Bcrp1*^{-/-} (0,83 ± 0,18) ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} (%0,95 ± 0,22) farelerde sırasıyla 1,7 (p<0,01) ve 2 (p<0,001) kat yükselmiştir. *Mrp2*^{-/-} farelerin karaciğerindeki MTX düzeyi %0,36 ± 0,09 iken, kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermemiştir.

120. dakikada böbrekteki MTX düzeyleri oldukça düşüktür (%0,05-0,13). Fakat *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde kontrol grubuna göre 2 kat daha fazla MTX tayin edilmiştir (p<0,001).

İnce barsak ve ince barsak içeriğindeki toplam MTX düzeyleri kontrol, *Bcrp1*^{-/-}, *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde sırası ile %54,04 ± 27,8, %51,33 ± 10,8, %27,7 ± 7,2

ve $37,36 \pm 22,9$ olarak bulunmuşken gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmamıştır.

4.1.13. Oral uygulamayı takiben plazma ve dokulardaki 7-OH-MTX düzeyleri

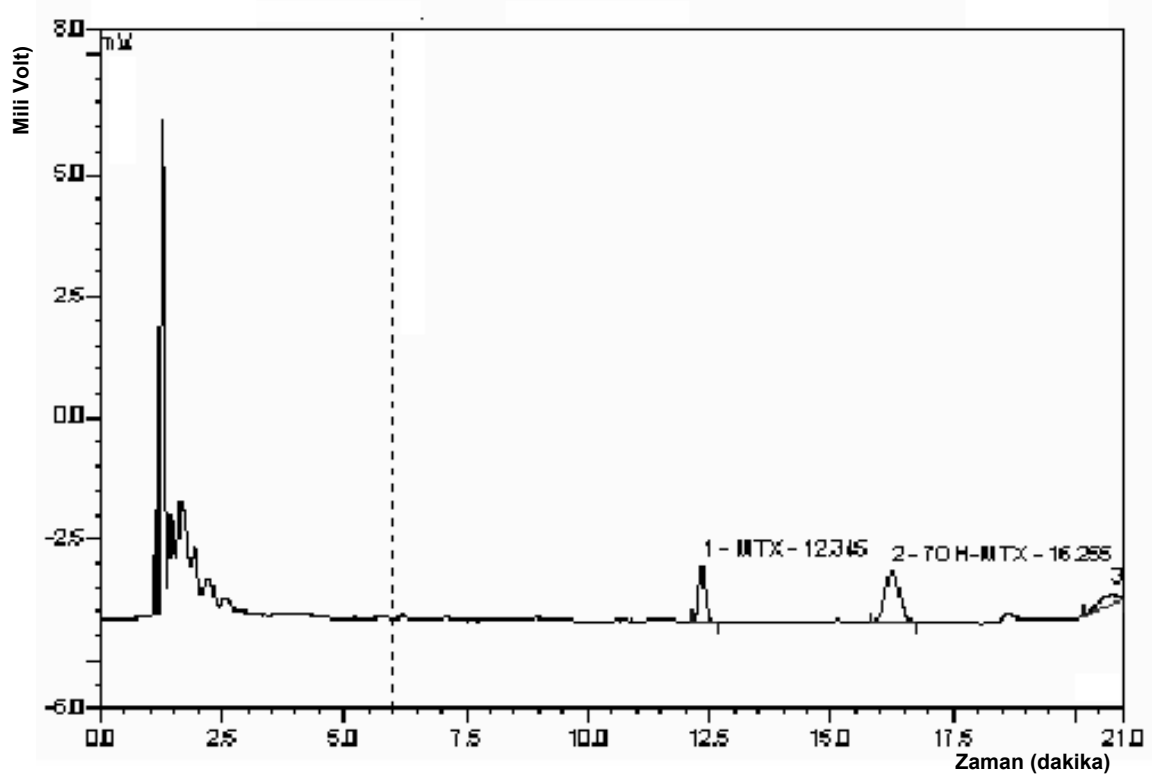
Oral uygulamayı takiben plazmada alınan kan örneğinin az olması sebebiyle 7.5, 15, 30 ve 60. dakika zaman noktalarında 7-OH-MTX düzeyleri tayin edilememiştir. 120. dakikada sadece *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde plazmadaki 7-OH-MTX konsantrasyonu $0,33 \pm 0,08$ µg/ml olarak bulunmuştur.

120. dakikada karaciğerdeki 7-OH-MTX düzeyleri kontrol grubunda $0,082 \pm 0,03$; *Bcrp1^{-/-}* farelerde $0,170 \pm 0,07$; *Mrp2^{-/-}* farelerde $0,18 \pm 0,04$ ve *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde ise $0,64 \pm 0,2$ olarak tayin edilmiştir. Kontrol grubuna göre *Bcrp1^{-/-}* ve *Mrp2^{-/-}* farelerde 2 kat ($p < 0,01$), *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde 7,7 kat ($p < 0,001$) yüksektir (Tablo 4-15, Şekil 4-19).

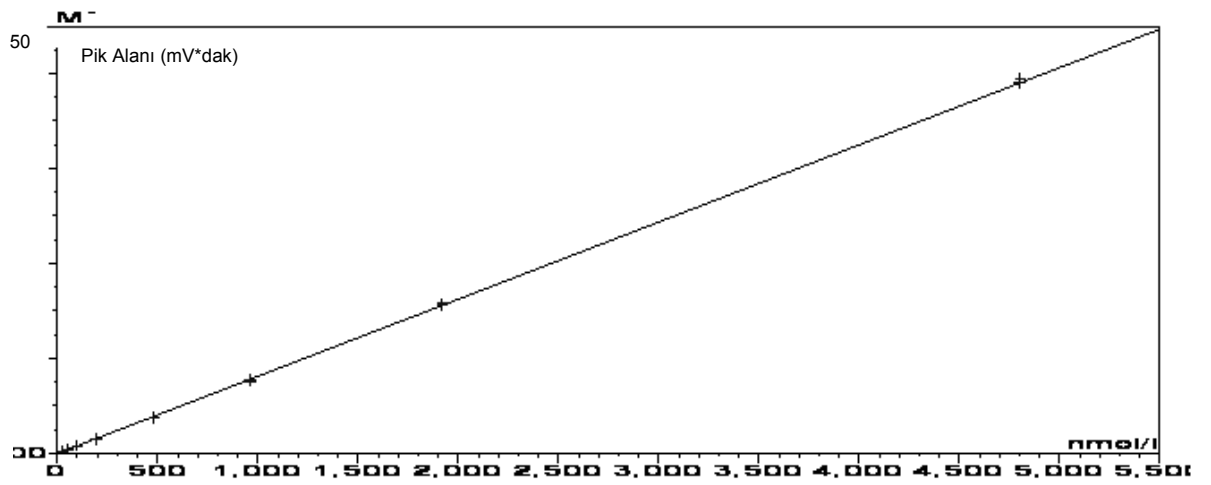
Oral uygulamayı takiben 120. dakikada böbreklerde sadece *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde 7-OH-MTX tayin edilebilmiştir ($0,02 \pm 0,01$).

4.2. ABC Gen Familyasına Dahil Diğer Taşıyıcı Proteinlerin Karaciğerdeki Ekspresyonlarının Western Blot Yöntemi ile Değerlendirilmesi:

Mrp3 ve Mrp4 taşıyıcı proteinlerinin *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* ve normal farelerdeki protein düzeylerine MTX uygulaması yapılmaksızın Western blot yöntemi ile bakılmıştır. Her iki taşıyıcı proteinin de normal koşullarda *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerde kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat daha fazla eksprese olduğu gösterilmiştir (Şekil 4-20 ve 4-21).



Şekil 4-1: MTX ve 7-OH-MTX' a ait kromatogram



Şekil 4-2: MTX'in plazmada hazırlanan standartlarına ait kalibrasyon eğrisi

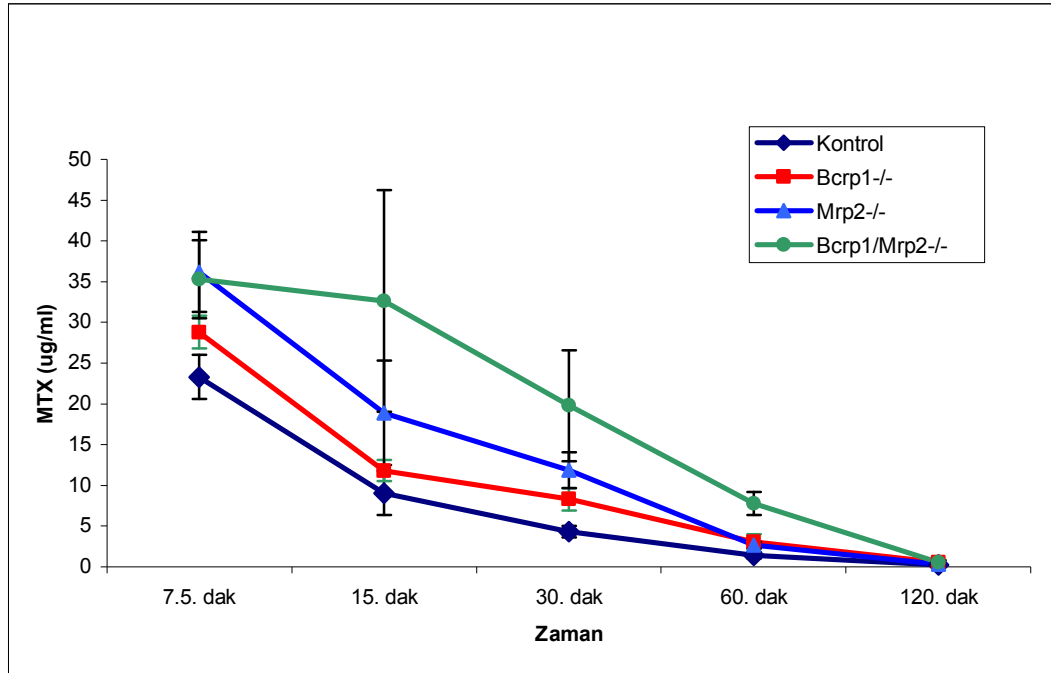
Tablo 4-1: MTX'in plazmada hazırlanan standartları ve bunlara ait pik alanları

Örnek adı	Miktar nmol/l	Pik Alanı mV*dak	Konsantrasyon nmol/l
	7OH-MTX	MTX	MTX
	Channel_3A	Channel_3A	Channel_3A
St. 4800	n.a.	3,8971	4796,6
St. 4800	n.a.	3,9425	4852,4
St. 1920	n.a.	1,561	1922,5
St. 1920	n.a.	1,5786	1944,2
St. 960	n.a.	0,758	934,7
St. 960	n.a.	0,7676	946,5
St. 480	n.a.	0,3719	459,7
St. 480	n.a.	0,3815	471,5
St. 192	n.a.	0,1566	194,9
St. 192	n.a.	0,1476	183,8
St. 96	n.a.	0,0733	92,3
St. 96	n.a.	0,0703	88,6
St. 48	n.a.	0,0408	52,4
St. 48	n.a.	0,0388	49,9
St. 24	n.a.	0,0176	23,8
St. 24	n.a.	0,0197	26,4
St. 0	n.a.	n.a.	n.a.
St. 0	n.a.	n.a.	n.a.

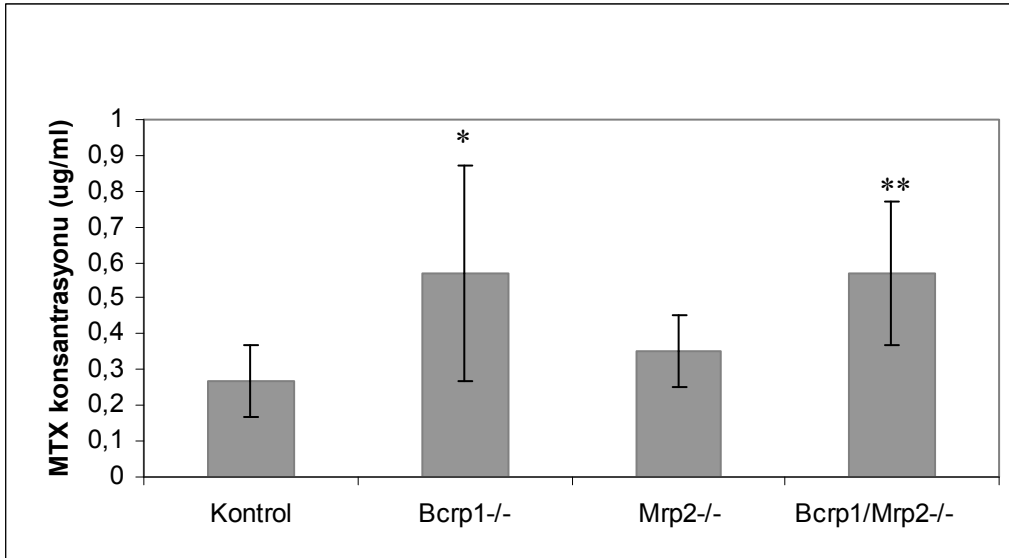
Tablo 4-2: 50mg/kg dozda i.v. MTX uygulaması sonucu elde edilen plazma konsantrasyonları (ortalama $\pm$ SD ($\mu\text{g/ml}$))

	7.5. dak	15. dak	30. dak	60. dak	120. dak
Kontrol	23,3 $\pm$ 2,7	9,07 $\pm$ 2,7	4,3 $\pm$ 0,7	1,4 $\pm$ 0,4	0,27 $\pm$ 0,1
<i>Bcrp1</i> ^{-/-}	28,8 $\pm$ 2,0**	11,8 $\pm$ 1,3	8,3 $\pm$ 1,4***	3,1 $\pm$ 0,9**	0,57 $\pm$ 0,3*
<i>Mrp2</i> ^{-/-}	36,2 $\pm$ 4,9***	18,9 $\pm$ 6,4*	11,9 $\pm$ 2,2***	2,7 $\pm$ 0,4***	0,35 $\pm$ 0,1
<i>Bcrp1/Mrp2</i> ^{-/-}	35,3 $\pm$ 4,8***	32,6 $\pm$ 13,6***	19,8 $\pm$ 6,8***	7,8 $\pm$ 1,4***	0,57 $\pm$ 0,2**

* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 aynı zaman noktalarındaki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).



Şekil 4-3: MTX plazma konsantrasyonu - zaman eğrisi (50mg/kg dozda i.v. MTX uygulaması; (ortalama $\pm$ SD ($\mu\text{g/ml}$))



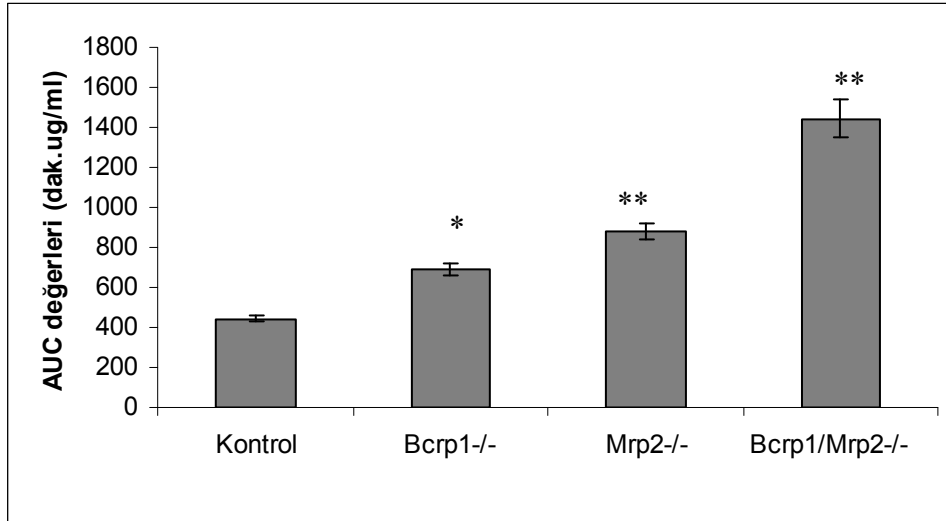
* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).

Şekil 4-4: 50mg/kg dozda i.v. MTX uygulanmasını takiben 120. dakikadaki MTX plazma düzeyleri (ortalama $\pm$ SD).

Tablo 4-3: Plazmadaki MTX konsantrasyonlarının ortalama değerleri kullanılarak hesaplanan AUC_{0-2sa} değerleri (50 mg/kg, iv uygulama)

	AUC (dak.ug/ml)±SE
Kontrol	445 ± 18
<i>Bcrp1</i> ^{-/-}	692 ± 28*
<i>Mrp2</i> ^{-/-}	884 ± 39**
<i>Bcrp1/Mrp2</i> ^{-/-}	1445 ± 98**

* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).



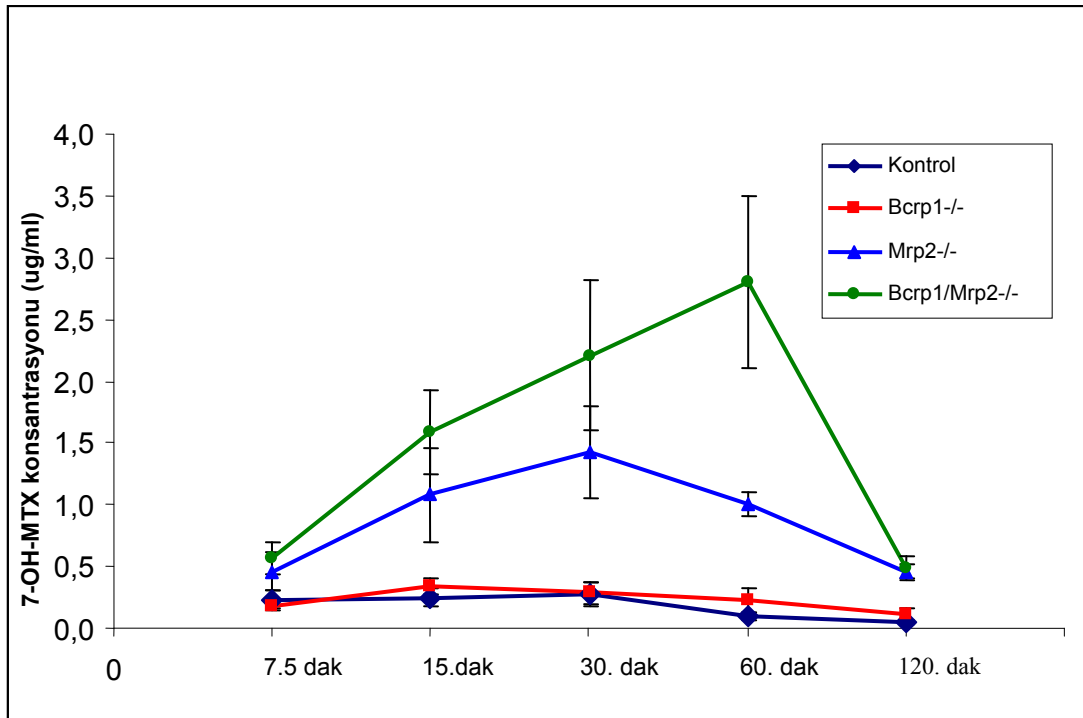
* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır)

Şekil 4-5: i.v. uygulama sonucu MTX AUC_{0-2sa} değerlerinin karşılaştırılması (ortalama ± SE).

Tablo 4-4: 50mg/kg dozda intravenöz MTX uygulaması sonucu plazmada ölçülen 7-OH-MTX konsantrasyonları (ortalama $\pm$ SD (μ g/ml))

	7.5. dak	15. dak	30. dak	60. dak	120. dak
Kontrol	0,23 $\pm$ 0,07	0,25 $\pm$ 0,07	0,28 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,02
<i>Bcrp1</i> ^{-/-}	0,18 $\pm$ 0,04	0,34 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,09	0,22 $\pm$ 0,1*	0,11 $\pm$ 0,06
<i>Mrp2</i> ^{-/-}	0,46 $\pm$ 0,15*	1,08 $\pm$ 0,38***	1,43 $\pm$ 0,37***	1,0 $\pm$ 0,1***	0,46 $\pm$ 0,06***
<i>Bcrp1/Mrp2</i> ^{-/-}	0,57 $\pm$ 0,13***	1,59 $\pm$ 0,34***	2,21 $\pm$ 0,6***	2,8 $\pm$ 0,7***	0,49 $\pm$ 0,1***

* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 aynı zaman noktalarındaki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).

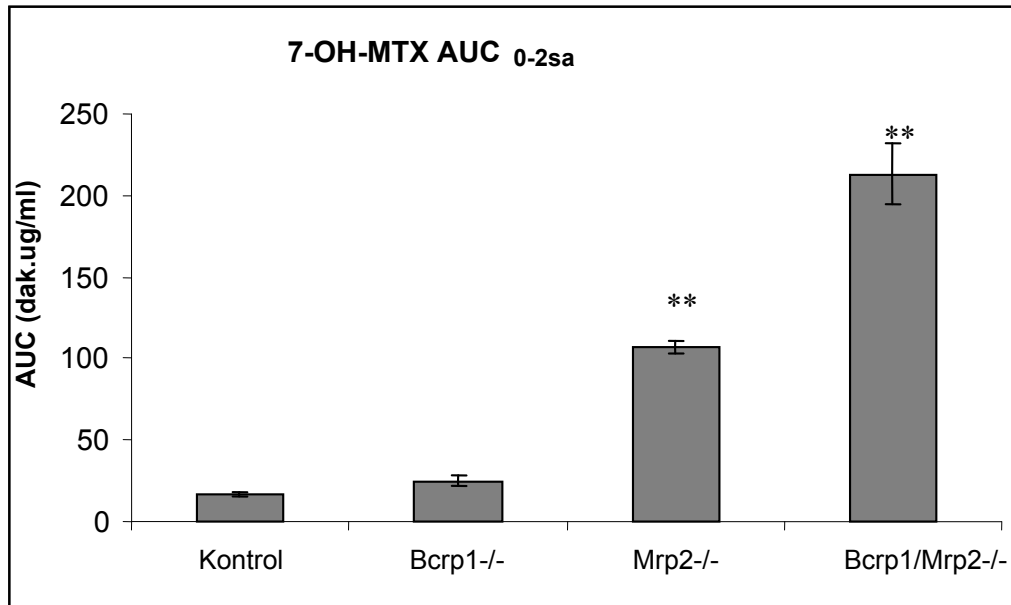


Şekil 4-6: 50mg/kg iv MTX uygulamasını takiben plazmada 7-OH-MTX konsantrasyonu – zaman eğrisi (ortalama $\pm$ SD).

Tablo 4-5: Plazmadaki 7-OH-MTX konsantrasyonlarının ortalama değeri kullanılarak hesaplanan AUC_{0-2sa} değeri (50 mg/kg, MTX iv uygulama)

	AUC (dak.ug/ml) $\pm$ SE
Kontrol	17 $\pm$ 1
<i>Bcrp1</i> ^{-/-}	25 $\pm$ 3
<i>Mrp2</i> ^{-/-}	107 $\pm$ 4**
<i>Bcrp1/Mrp2</i> ^{-/-}	213 $\pm$ 19**

* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).



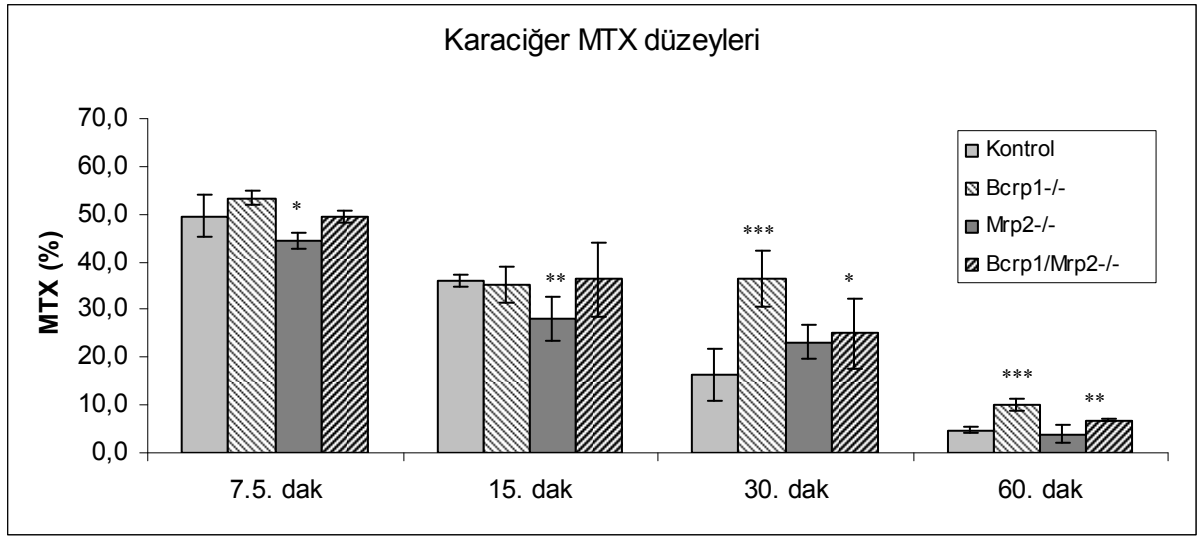
* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).

Şekil 4-7: 50mg/kg i.v. MTX uygulaması sonucu 7-OH-MTX AUC_{0-2sa} değerlerinin karşılaştırılması (ortalama $\pm$ SD).

Tablo 4-6: 50mg/kg i.v. uygulaması sonucu dokulardaki MTX düzeyleri (ortalama $\pm$ SD (uygulanan MTX dozunun %))

	Karaciğer MTX değerleri				
	7.5. dak	15. dak	30. dak	60. dak	120. dak
Kontrol	49,5 $\pm$ 4,4	36 $\pm$ 1,3	16,4 $\pm$ 5,3	4,81 $\pm$ 0,8	1,02 $\pm$ 0,4
<i>Bcrp1</i> ^{-/-}	53,4 $\pm$ 1,6	35,3 $\pm$ 3,7	36,5 $\pm$ 5,9***	10,0 $\pm$ 1,2***	1,68 $\pm$ 0,5*
<i>Mrp2</i> ^{-/-}	44,4 $\pm$ 4,9*	28,1 $\pm$ 4,7**	23,2 $\pm$ 3,7	3,95 $\pm$ 1,9	0,85 $\pm$ 0,1
<i>Bcrp1/Mrp2</i> ^{-/-}	49,4 $\pm$ 4,5	36,4 $\pm$ 7,7	25,0 $\pm$ 7,4*	6,84 $\pm$ 0,2**	0,68 $\pm$ 0,03
	Böbrek MTX değerleri				
	7.5. dak	15. dak	30. dak	60. dak	
Kontrol	3,3 $\pm$ 1,6	0,9 $\pm$ 0,3	0,45 $\pm$ 0,09	0,19 $\pm$ 0,06	
<i>Bcrp1</i> ^{-/-}	3,6 $\pm$ 0,6	1,2 $\pm$ 0,1	0,71 $\pm$ 0,07***	0,29 $\pm$ 0,06*	
<i>Mrp2</i> ^{-/-}	5,3 $\pm$ 2,3	2,6 $\pm$ 0,7**	0,86 $\pm$ 0,22***	0,33 $\pm$ 0,04**	
<i>Bcrp1/Mrp2</i> ^{-/-}	3,6 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,6***	1,49 $\pm$ 0,33***	1,42 $\pm$ 1,26*	
	İnce barsak ve içeriğindeki toplam MTX değerleri				
	7.5. dak	15. dak	30. dak	60. dak	
Kontrol	5,08 $\pm$ 1,5	26,9 $\pm$ 2,8	39,5 $\pm$ 9,4	47,7 $\pm$ 5,3	
<i>Bcrp1</i> ^{-/-}	3,05 $\pm$ 0,8*	19,08 $\pm$ 4,7***	27,7 $\pm$ 1,5*	38,9 $\pm$ 3,9*	
<i>Mrp2</i> ^{-/-}	1,48 $\pm$ 0,4***	10,6 $\pm$ 4,3***	14,8 $\pm$ 1,3**	24,5 $\pm$ 8,2***	
<i>Bcrp1/Mrp2</i> ^{-/-}	0,90 $\pm$ 0,17***	1,84 $\pm$ 1,0***	2,7 $\pm$ 0,3***	2,9 $\pm$ 0,4***	

* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 aynı zaman noktalarındaki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).



* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).

Şekil 4-8: 50mg/kg i.v. MTX uygulaması sonucu karaciğer MTX düzeylerinin karşılaştırılması (ortalama ± SD).

Tablo 4-7: Karaciğerdeki MTX konsantrasyonu ile aynı zaman noktalarındaki plazmadaki MTX konsantrasyonlarının oranları

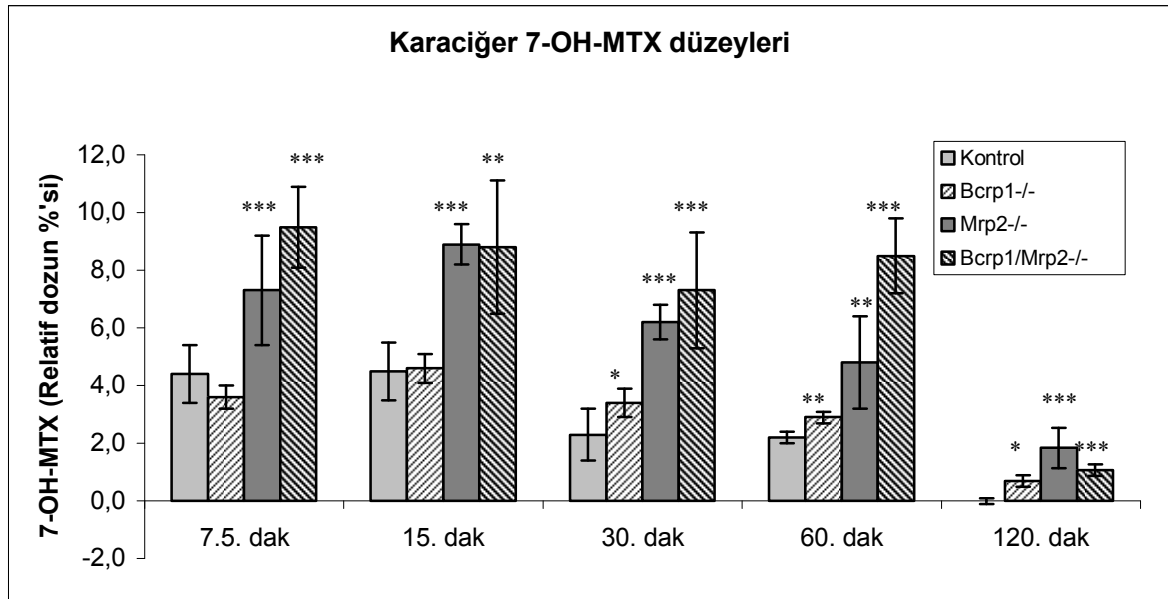
	7.5. dak	15. dak	30. dak	60. dak	120. dak
Kontrol	20,0 ± 2,3	36,8 ± 5,9	37,6 ± 13,5	35,0 ± 9,4	42,1 ± 16,5
<i>Bcrp1</i> ^{-/-}	16,9 ± 0,9*	25,9 ± 2,2*	47,5 ± 13,7	30,9 ± 6,4	30,9 ± 6,9
<i>Mrp2</i> ^{-/-}	9,6 ± 1,8***	12,0 ± 3,3***	22,5 ± 8,0	11,5 ± 4,4***	19,9 ± 5,4*
<i>Bcrp1/Mrp2</i> ^{-/-}	10,0 ± 1,3***	9,2 ± 4,7***	9,5 ± 1,2***	6,9 ± 1,1**	8,9 ± 1,8**

* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 aynı zaman noktalarındaki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (İstatistiksel analiz olarak Student's t-testi kullanılmıştır).

Tablo 4-8: 50mg/kg i.v. MTX uygulaması sonucu dokulardaki 7-OH-MTX düzeyleri, ortalama $\pm$ SD (uygulanan dozun yüzdesi %)

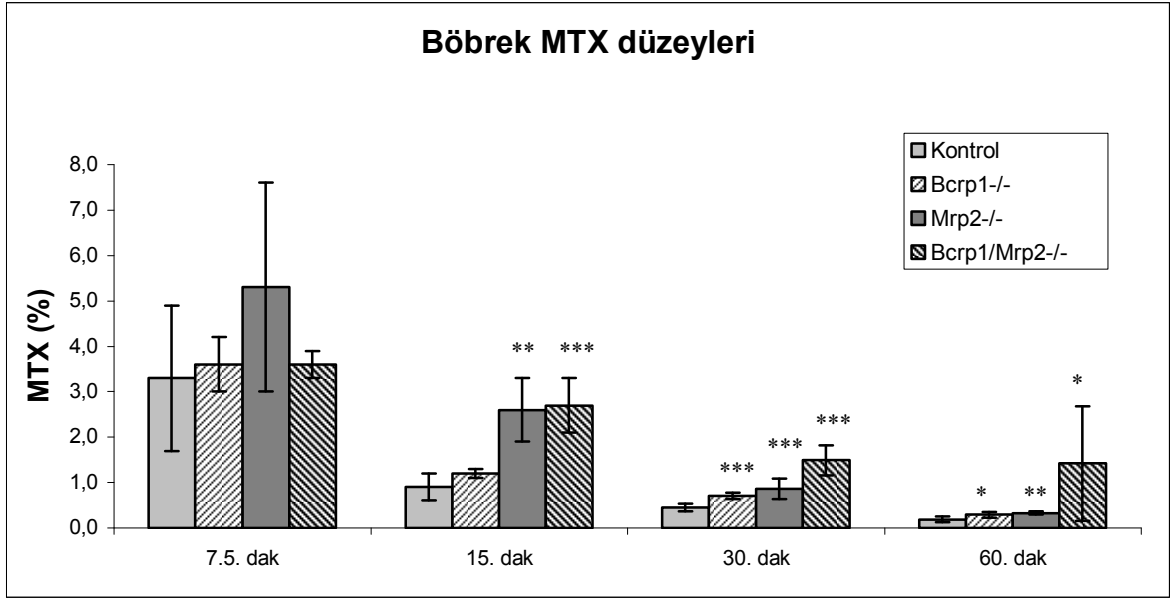
Karaciğer 7-OH-MTX değerleri;					
	7.5. dak	15. dak	30. dak	60. dak	120. dak
Kontrol	4,4 $\pm$ 1	4,5 $\pm$ 1,0	2,3 $\pm$ 0,9	2,2 $\pm$ 0,2	0,39 $\pm$ 0,1
<i>Bcrp1</i> ^{-/-}	3,6 $\pm$ 0,4	4,6 $\pm$ 0,5	3,4 $\pm$ 0,5*	2,9 $\pm$ 0,2**	0,69 $\pm$ 0,2*
<i>Mrp2</i> ^{-/-}	7,3 $\pm$ 1,9***	8,9 $\pm$ 0,7***	6,2 $\pm$ 0,6***	4,8 $\pm$ 1,6**	1,84 $\pm$ 0,7***
<i>Bcrp1/Mrp2</i> ^{-/-}	9,5 $\pm$ 1,4***	8,8 $\pm$ 2,3**	7,3 $\pm$ 2,0***	8,5 $\pm$ 1,3***	1,07 $\pm$ 0,2***
Böbrek 7-OH-MTX değerleri					
	7.5. dak	15. dak	30. dak	60. dak	
Kontrol	0,009 $\pm$ 0,003	0,014 $\pm$ 0,002	0,022 $\pm$ 0,005	0,010 $\pm$ 0,008	
<i>Bcrp1</i> ^{-/-}	0,007 $\pm$ 0,003	0,018 $\pm$ 0,0003*	0,030 $\pm$ 0,003*	0,028 $\pm$ 0,006*	
<i>Mrp2</i> ^{-/-}	0,034 $\pm$ 0,023**	0,106 $\pm$ 0,025***	0,094 $\pm$ 0,012***	0,111 $\pm$ 0,013***	
<i>Bcrp1/Mrp2</i> ^{-/-}	0,029 $\pm$ 0,009***	0,127 $\pm$ 0,034***	0,173 $\pm$ 0,016***	0,353 $\pm$ 0,199**	
İnce barsak ve içeriğindeki toplam 7-OH-MTX değerleri					
	7.5. dak	15. dak	30. dak	60. dak	
Kontrol	0,08 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,11	1,6 $\pm$ 0,5	3,00 $\pm$ 0,5	
<i>Bcrp1</i> ^{-/-}	0,03 $\pm$ 0,006***	0,66 $\pm$ 0,26	1,1 $\pm$ 0,2	3,04 $\pm$ 0,5	
<i>Mrp2</i> ^{-/-}	0,02 $\pm$ 0,009***	0,15 $\pm$ 0,12**	0,3 $\pm$ 0,1**	0,82 $\pm$ 0,2***	
<i>Bcrp1/Mrp2</i> ^{-/-}	0,01 $\pm$ 0,012***	0,05 $\pm$ 0,02***	0,1 $\pm$ 0,03***	0,34 $\pm$ 0,07***	

* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 aynı zaman noktalarındaki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (İstatistiksel analiz olarak Student's t-testi kullanılmıştır).



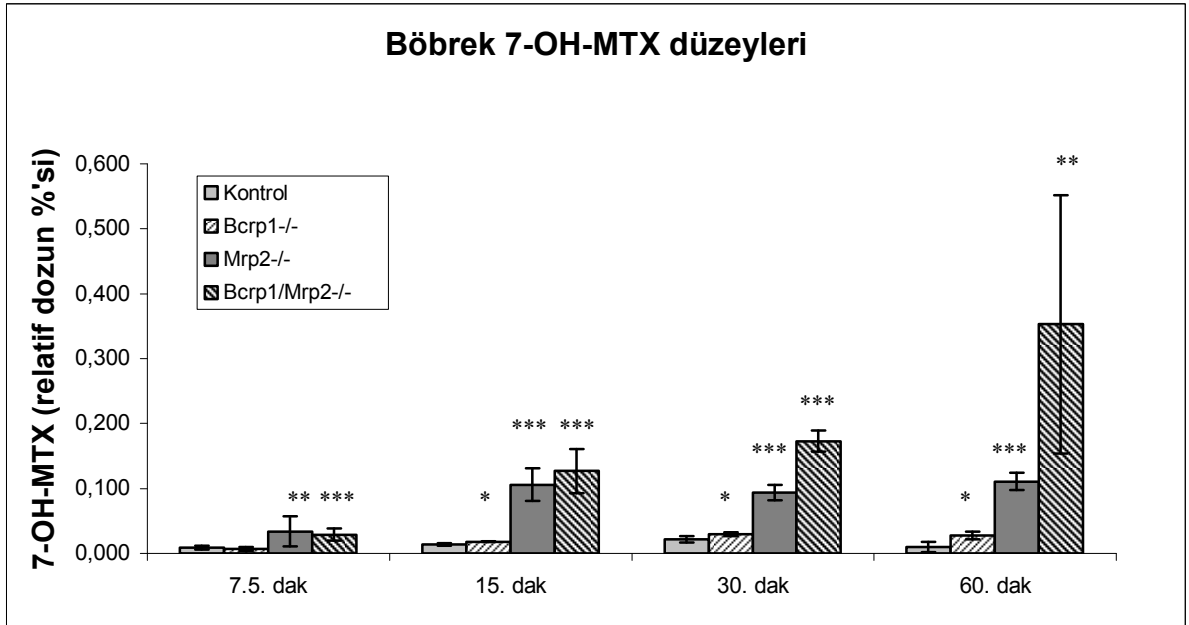
* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).

Şekil 4-9: 50mg/kg i.v. MTX uygulaması sonucu karaciğer 7-OH-MTX düzeylerinin karşılaştırılması (ortalama $\pm$ SD).



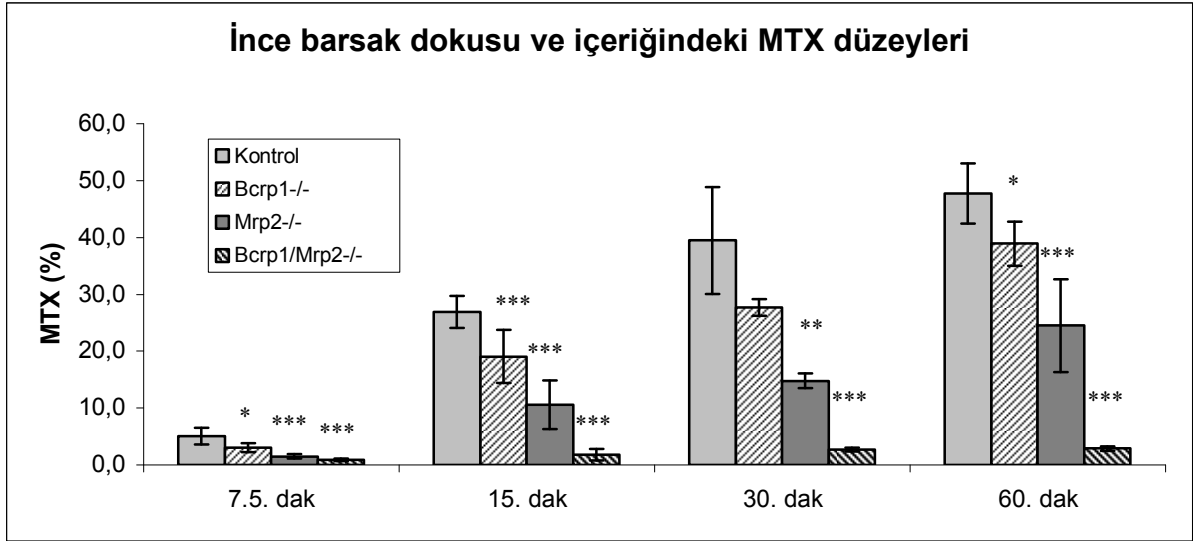
* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).

Şekil 4-10: 50mg/kg i.v. MTX uygulaması sonucu böbrekteki MTX düzeylerinin karşılaştırılması (ortalama $\pm$ SD).



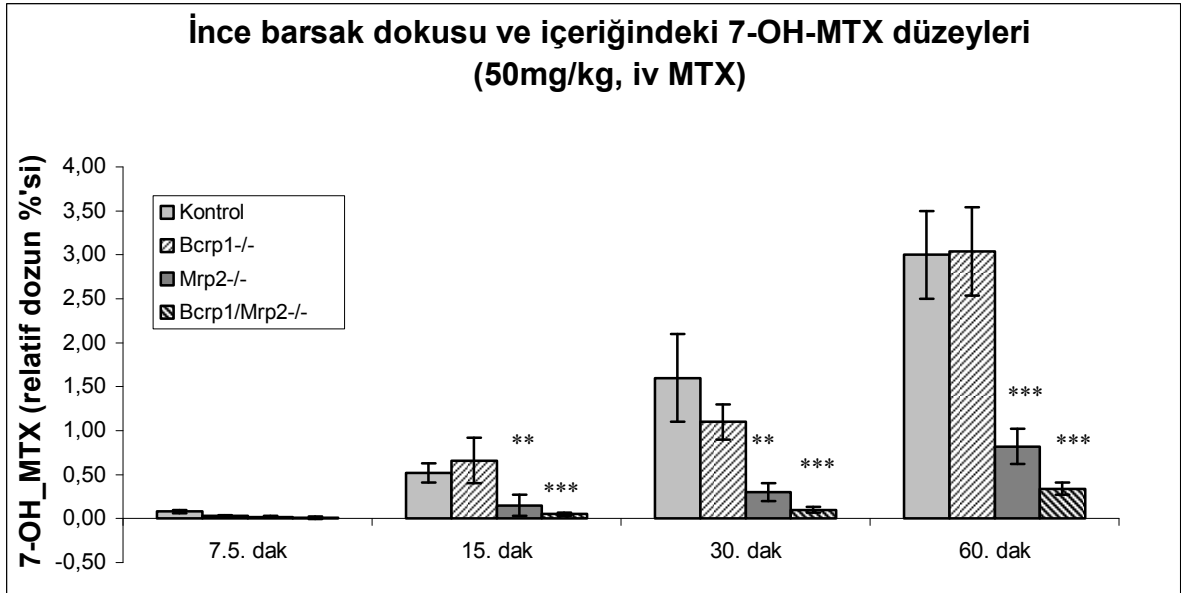
* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).

Şekil 4-11: 50mg/kg i.v. MTX uygulaması sonucu böbrekteki 7-OH-MTX düzeylerinin karşılaştırılması (ortalama $\pm$ SD).



* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).

Şekil 4-12: 50mg/kg i.v. MTX uygulaması sonucu ince barsak ve içeriğindeki MTX düzeylerinin karşılaştırılması (ortalama ± SD).



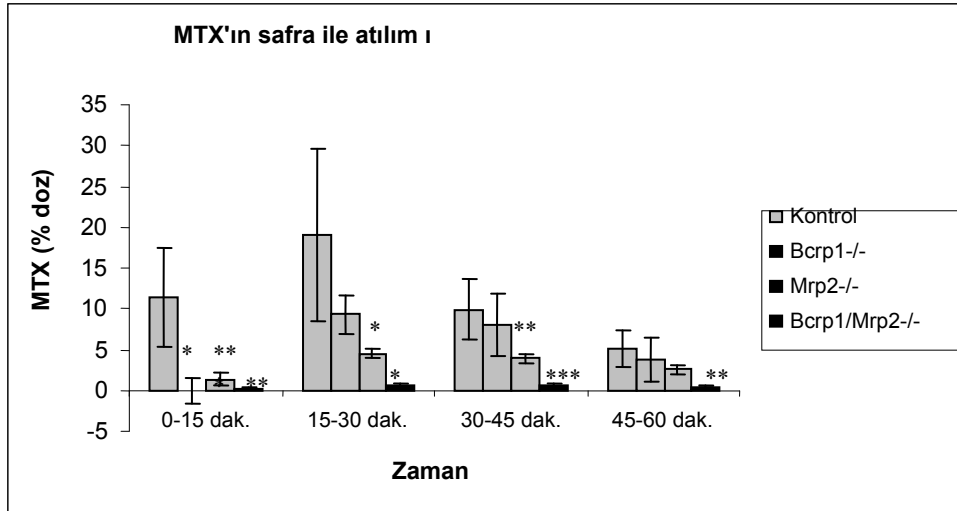
* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).

Şekil 4-13: 50mg/kg i.v. MTX uygulaması sonucu ince barsak ve içeriğindeki 7-OH-MTX düzeylerinin karşılaştırılması (ortalama ± SD).

Tablo 4-9: 50mg/kg iv MTX uygulamasını takiben safrada tayin edilen MTX düzeyleri (%)

	0-15 dak.	15-30 dak.	30-45 dak.	45-60 dak.
Kontrol	11,4 ± 6,0	19 ± 10,5	9,9 ± 3,7	5,2 ± 2,2
<i>Bcrp1</i> ^{-/-}	3,4 ± 1,5*	9,3 ± 2,3	8,1 ± 3,8	3,8 ± 2,7
<i>Mrp2</i> ^{-/-}	1,4 ± 0,8**	4,5 ± 0,6*	3,9 ± 0,5**	2,6 ± 0,5*
<i>Bcrp1/Mrp2</i> ^{-/-}	0,2 ± 0,06**	0,7 ± 0,3*	0,6 ± 0,2***	0,4 ± 0,1**

* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 aynı zaman noktalarındaki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (İstatistiksel analiz olarak Student's t-testi kullanılmıştır).



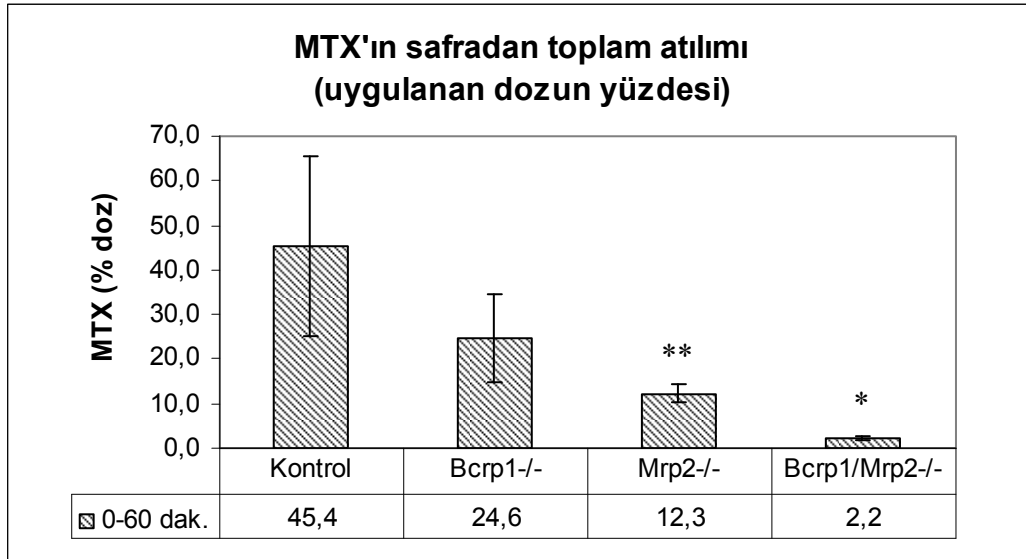
* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).

Şekil 4-14: 50mg/kg iv MTX uygulamasını takiben safrada tayin edilen MTX düzeylerinin karşılaştırılması (ortalama ± SD).

Tablo 4-10: 50mg/kg iv MTX uygulamasını takiben safrada tayin edilen toplam MTX düzeyleri (MTX dozunun %'si)

	0-60 dak.	SD
Kontrol	45,4	20,1
<i>Bcrp1</i> ^{-/-}	24,6	9,7
<i>Mrp2</i> ^{-/-}	12,3**	2,1
<i>Bcrp1/Mrp2</i> ^{-/-}	2,2*	0,5

* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).



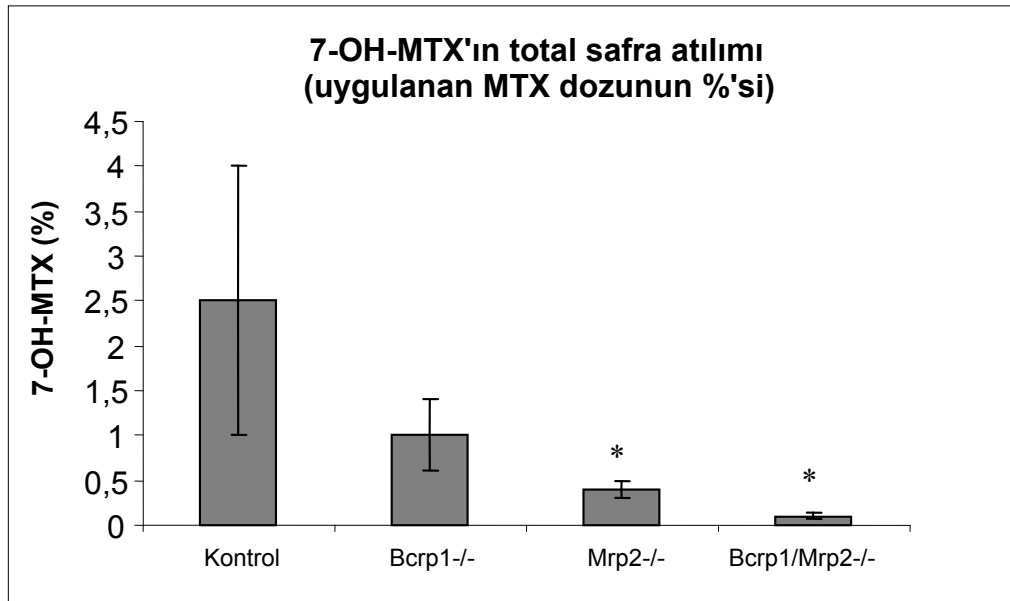
* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).

Şekil 4-15: 50mg/kg iv MTX uygulamasını takiben safrada tayin edilen toplam MTX düzeylerinin karşılaştırılması

Tablo 4-11: 50mg/kg iv MTX uygulamasını takiben safrada tayin edilen toplam 7-OH-MTX düzeyleri(MTX dozunun %'si)

	0-60 dak.	SD
Kontrol	2,5	1,5
<i>Bcrp1</i> ^{-/-}	1	0,4
<i>Mrp2</i> ^{-/-}	0,4*	0,1
<i>Bcrp1/Mrp2</i> ^{-/-}	0,1*	0,04

* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 aynı zaman noktalarındaki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (İstatistiksel analiz olarak Student's t-testi kullanılmıştır).



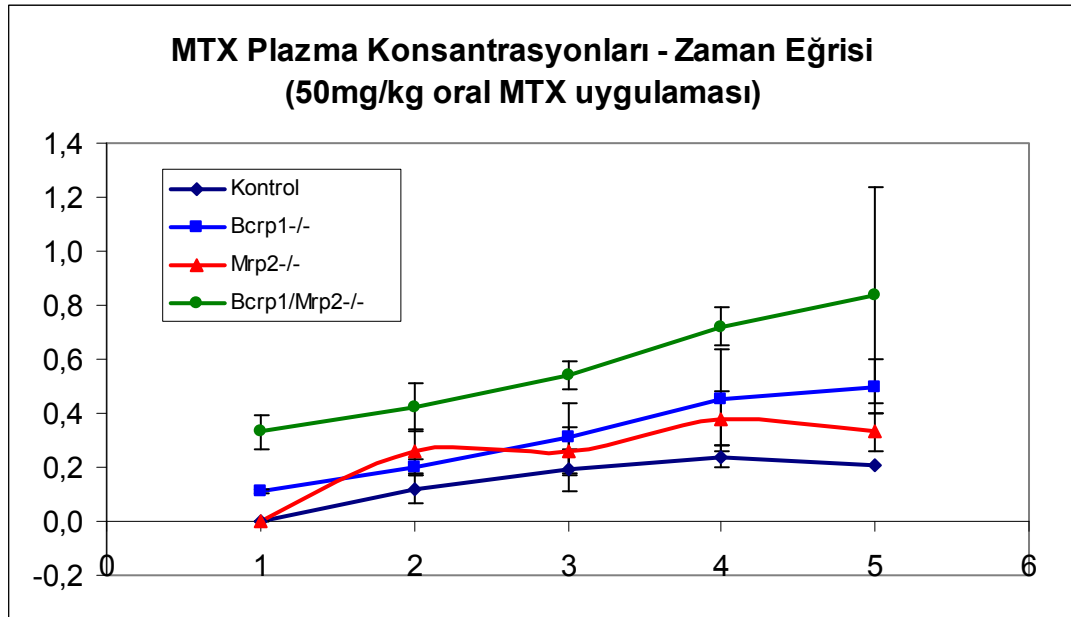
* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).

Şekil 4-16: 50mg/kg iv MTX uygulamasını takiben safrada tayin edilen toplam 7-OH-MTX düzeylerinin karşılaştırılması (ortalama ± SD)

Tablo 4-12: 50mg/kg oral MTX uygulamasını takiben elde edilen plazma MTX konsantrasyonları ortalama $\pm$ SD ($\mu\text{g/ml}$)

	7.5. dak	15. dak	30. dak	60. dak	120. dak
Kontrol	n.a.	$0,12 \pm 0,003$	$0,19 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,08$	$0,21 \pm 0,04$
<i>Bcrp1</i> ^{-/-}	$0,11 \pm 0,009$	$0,20 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,13$	$0,45 \pm 0,19^*$	$0,50 \pm 0,1^{***}$
<i>Mrp2</i> ^{-/-}	n.a.	$0,26 \pm 0,08$	$0,26 \pm 0,09$	$0,38 \pm 0,1^*$	$0,33 \pm 0,07^{***}$
<i>Bcrp1/Mrp2</i> ^{-/-}	$0,21 \pm 0,06$	$0,42 \pm 0,09^{**}$	$0,54 \pm 0,05^{***}$	$0,72 \pm 0,07^{***}$	$0,84 \pm 0,4^{***}$

* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 aynı zaman noktalarındaki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (İstatistiksel analiz olarak Student's t-testi kullanılmıştır).

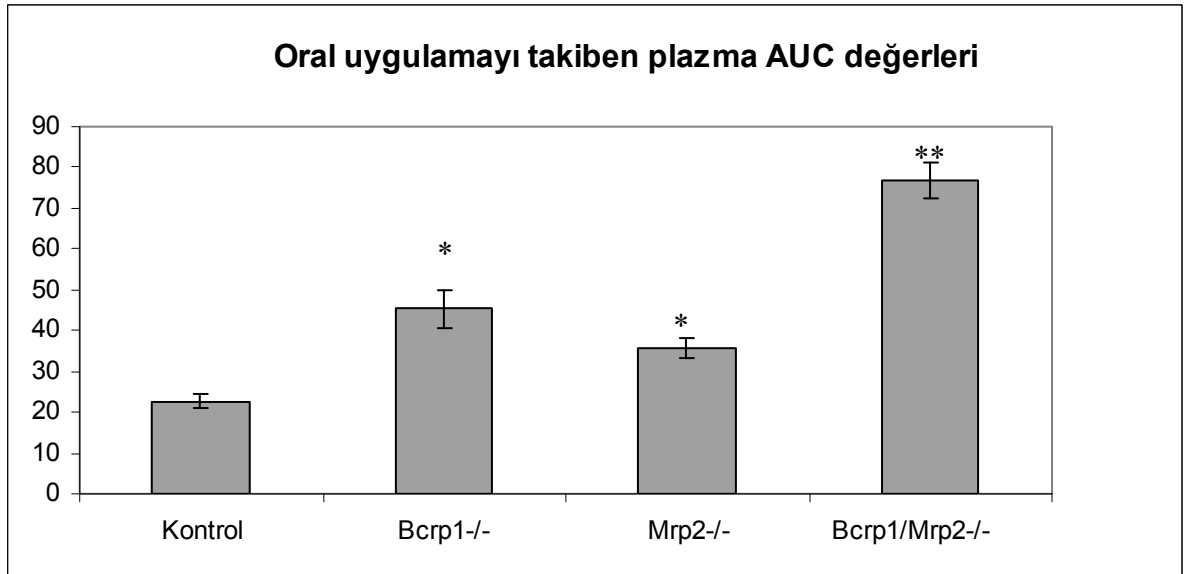


Şekil 4-17: 50mg/kg oral MTX uygulamasını takiben elde edilen plazma MTX konsantrasyonu – zaman eğrisi (ortalama $\pm$ SD).

Tablo 4-13: 50mg/kg oral MTX uygulamasını takiben hesaplanan AUC değerleri ve oral biyoyararlanımları

	AUC _{po} (dak.ug/ml) ±SE	AUC _{i.v.} (dak.ug/ml) ±SE	Oral biyoyararlanım (F _{oral/iv}) (%)
Kontrol	22,7 ± 1,5	445 ± 18	5,11
<i>Bcrp1</i> ^{-/-}	45,3 ± 4,8*	692 ± 28*	6,55
<i>Mrp2</i> ^{-/-}	35,8 ± 2,5*	884 ± 39**	4,05
<i>Bcrp1/Mrp2</i> ^{-/-}	77,0 ± 4,3**	1445 ± 98**	5,33

* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 aynı zaman noktalarındaki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (İstatistiksel analiz olarak Student's t-testi kullanılmıştır).



* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).

Şekil 4-18: 50mg/kg oral MTX uygulamasını takiben hesaplanan AUC değerlerinin karşılaştırılması (ortalama ± SD).

Tablo 4-14: 50mg/kg oral MTX uygulamasını takiben elde edilen doku MTX düzeyleri (uygulanan dozun yüzdesi)

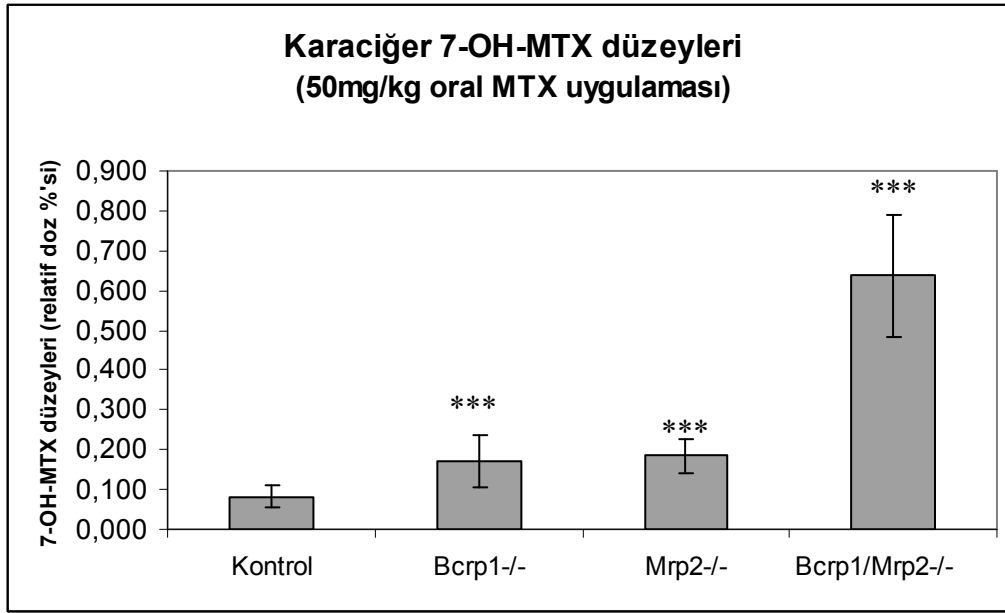
	Karaciğer (120. dak)	Böbrek (120. dak)	İnce barsak ve içeriği (120. dak)
Kontrol	0,48 ± 0,11	0,06 ± 0,02	54,04 ± 27,81
<i>Bcrp1</i> ^{-/-}	0,83 ± 0,18 *	0,07 ± 0,02	51,33 ± 10,81
<i>Mrp2</i> ^{-/-}	0,36 ± 0,09	0,05 ± 0,01	27,71 ± 7,23
<i>Bcrp1/Mrp2</i> ^{-/-}	0,95 ± 0,22 **	0,13 ± 0,03 **	37,36 ± 22,93

* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 aynı zaman noktalarındaki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (İstatistiksel analiz olarak Student's t-testi kullanılmıştır).

Tablo 4-15: 50mg/kg oral MTX uygulamasını takiben karaciğer 7-OH-MTX düzeyleri (%) ± SD

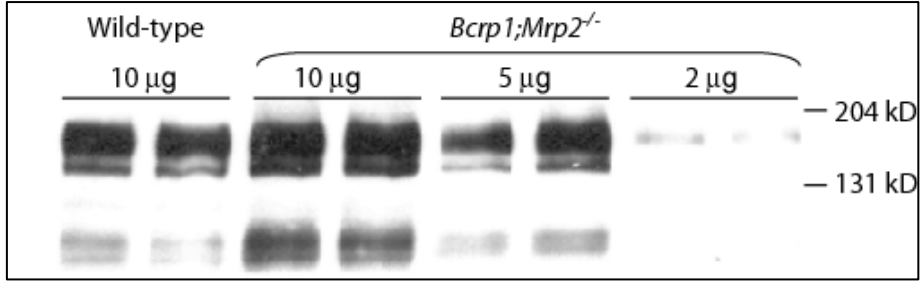
Kontrol	0,082 ± 0,0027
<i>Bcrp1</i> ^{-/-}	0,170 ± 0,065***
<i>Mrp2</i> ^{-/-}	0,184 ± 0,044***
<i>Bcrp1/Mrp2</i> ^{-/-}	0,636 ± 0,152***

* P < 0.05, ** P<0.01, *** P< 0.001 aynı zaman noktalarındaki kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (İstatistiksel analiz olarak Student's t-testi kullanılmıştır).

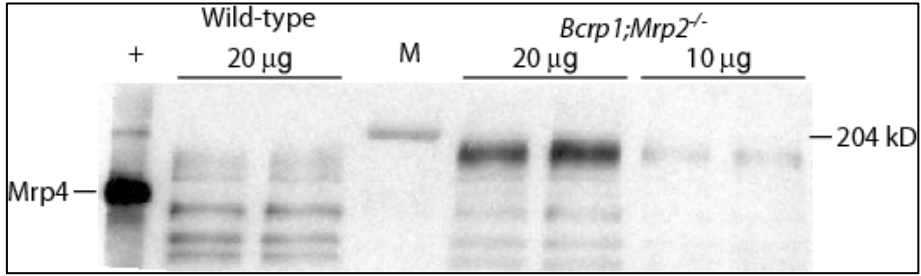


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Student's t-testi kullanılmıştır).

Şekil 4-19: 50mg/kg oral MTX uygulamasını takiben karaciğer 7-OH-MTX düzeylerinin karşılaştırılması (ortalama $\pm$ SD).



Şekil 4-20: Mrp3'ün karaciğerdeki ekspresyonunun Western Blotting yöntemi ile gösterilmesi



Şekil 4-21: Mrp4'ün karaciğerdeki ekspresyonunun Western Blotting yöntemi ile gösterilmesi

5. TARTIŞMA

MRP2 ve BCRP oldukça geniş substrat seçiciliğine sahip ABC taşıyıcı proteinleri olup birçok maddenin de her iki taşıyıcı için substrat olma özelliği vardır. Bu özelliğe sahip endojen ve eksojen maddelerin farmakokinetiği üzerine MRP2 ve BCRP'nin olası etkilerinin *in vivo* şartlarda incelenmesi amacıyla Dr. Alfred Schinkel'in laboratuvarında *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* double knock-out fareler geliştirilmiştir. Bu farelerin laboratuvar ortamında normal yaşam döngüsüne sahip oldukları ve üreyebildikleri gösterilmiştir.

Birçok taşıyıcı proteinin substrat seçicilikleri birbirleri ile örtüştüğü için bir taşıyıcı proteinin yokluğu diğer bir taşıyıcı proteinin ekspresyonunda artış ile kompanse edilebilmektedir (Szakacs ve ark. 2008, Xia ve ark. 2007). Bu nedenle üretilen knock-out deney hayvanlarında diğer taşıyıcı proteinlerin ekspresyonları da değerlendirilmelidir. Vlaming ve ark. tarafından geliştirilen ve deneylerimizde kullandığımız *Mrp2^{-/-}* farelerin karaciğerlerindeki Mrp3 protein düzeylerinin normal farelere kıyasla yaklaşık 2 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (Vlaming ve ark. 2006). Ayrıca Mrp2'yi eksprese etmeyen sıçanlarda ve Dubin-Johnson sendromlu hastaların karaciğerlerinde de Mrp3 düzeylerinin yükselmiş olduğu gösterilmiştir (Donner ve ark. 2001). Dişi farelerin karaciğerindeki Mrp4 protein ekspresyonlarında, *Mrp2^{-/-}* ve normal fareler arasında fark olmadığı gösterilmiştir. Buna karşın, böbrekteki Mrp4 protein düzeyleri *Mrp2^{-/-}* farelerde normal farelere kıyasla yaklaşık 2 kat daha yüksektir (Vlaming ve ark. 2006). Bu çalışmada da Mrp3 ve Mrp4'ün normal koşullarda, *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* dişi farelerin karaciğerlerinde kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 2 kat daha fazla eksprese olduğu gösterilmiştir.

MRP2 ve BCRP'nin birbirleri ile örtüşen fonksiyonlarını değerlendirmek amacıyla her iki taşıyıcı protein için de substrat olduğu gösterilmiş antineoplastik bir ajan olan MTX'in (Breedveld ve ark. 2007) i.v. ve oral yoldan uygulanmasını takiben farmakokinetiği incelenmiştir.

MTX 50 mg/kg dozda i.v. yoldan normal, *Bcrp1^{-/-}*, *Mrp2^{-/-}* ve *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelere uygulanmış, plazma ve dokulardaki düzeyleri tayin edilmiştir. Kontrol grubu ile

karşılaştırıldığında, MTX'in plazma konsantrasyonlarındaki yükselme özellikle Mrp2'nin eksprese olmadığı farelerde ilk zaman noktalarında (7.5 ve 15. dakikalar) daha fazla olmuştur. *Mrp2*^{-/-} farelerde MTX konsantrasyonunun daha yüksek olduğu ilk zaman noktalarında plazmadan eliminasyonu kontrol grubuna göre daha hızlı gerçekleşmiştir. 30. dakikadan sonra *Mrp2*^{-/-} farelerdeki MTX klirensinde normal farelere kıyasla anlamlı bir fark görülmemiştir. *Bcrp1*^{-/-} farelerde ise hemen hemen tüm zaman noktalarındaki MTX plazma konsantrasyonu normal farelere göre daha yüksek bulunmuştur. 120. dakikada *Bcrp1*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde kontrol grubuna göre plazmada eşit düzeylerde anlamlı bir yükselme gözlenirken, *Mrp2*^{-/-} farelerde bir fark görülmemiştir. Vlaming ve ark.'nın yaptığı çalışmada MTX 1, 10 ve 50 mg/kg dozlarda i.v. yoldan *Mrp2*^{-/-} ve normal farelere uygulanarak plazma konsantrasyonları tayin edilmiştir. 1 mg/kg dozda uygulandığında plazma konsantrasyonlarında fareler arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. 10 ve 50 mg/kg dozlarda uygulanmasını takiben *Mrp2*^{-/-} farelerdeki MTX plazma konsantrasyonları normal farelere kıyasla sırasıyla 1.6 ve 2.2 kat daha yüksek olmuştur. Bu sonuçlar, MTX dozunun ve plazmadaki konsantrasyonlarının arttığı durumlarda Mrp2'nin eliminasyondaki fonksiyonunun daha baskın hale geldiğini göstermektedir. Bu çalışmanın bulguları, çalışmamızdaki bulgular ile paralellik göstermektedir. Her iki çalışmaya göre, Mrp2'nin MTX'a afinitesinin düşük, fakat MTX'i taşımada kapasitesinin yüksek olduğu sonucuna varılabilir. MTX daha düşük dozda uygulandığında veya plazmadaki konsantrasyonu düştüğünde Bcrp1 gibi diğer taşıyıcıların MTX'in eliminasyonunda önemli olabileceği düşünülmektedir. Normal fareler ile karşılaştırıldığında plazma AUC_{0-2sa} değerlerinin *Bcrp1*^{-/-} farelerde 1.5, *Mrp2*^{-/-} farelerde 2, *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde 3.2 kat daha yüksek bulunması ise Mrp2 ve Bcrp1'in MTX'in plazmadan eliminasyonunda aditif etkiye sahip olduklarını göstermektedir.

MTX' in karaciğerdeki konsantrasyonları i.v. uygulamadan sonra 7,5 dakika gibi kısa bir sürede en yüksek düzeylere ulaşmış, diğer zaman noktalarında ise hızlıca azalmıştır. 120. dakikada karaciğer-plazma MTX oranları *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde anlamlı olarak azalmış, *Bcrp1*^{-/-} farelerde ise normal farelere kıyasla anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu bulgu, *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde MTX'in karaciğerden eliminasyonunun çoğunlukla hepatositlerin sinüzoidal membranında eksprese olan Mrp3 aracılığı ile karaciğerden kan dolaşımına doğru gerçekleştiğini düşündürmektedir. *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerin karaciğerlerindeki Mrp3 protein

düzeyleri normal farelere kıyasla 2 kat daha fazladır. *Bcrp1*^{-/-} farelerde ise Mrp3 proteininin regülasyonunda normal farelere göre artış gösterilmemiştir. *Bcrp1*^{-/-} farelerin karaciğer-plazma MTX oranlarında normal farelere göre anlamlı bir fark bulunmaması, *Bcrp1*^{-/-} farelerin karaciğerinde Mrp3 proteininin regülasyonunda bir artış olmaması ile açıklanabilir.

MTX'in toksik metaboliti olan 7-OH-MTX'in *in vitro* koşullarda MRP2 ve BCRP tarafından taşındığı gösterilmiştir (Breedveld ve ark. 2007). 7-OH-MTX'in farelerde Mrp2 ve Bcrp1 tarafından taşındığı henüz *in vitro* olarak gösterilmemiştir. *Mrp2*^{-/-} farelerde 7-OH-MTX plazma AUC_{0-2sa} değerleri kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 6 kat daha yüksek iken *Bcrp1*^{-/-} farelerde anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuca göre Bcrp1'in 7-OH-MTX'in eliminasyonunda önemli bir rol oynamadığı söylenebilir. Bunun yanında *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde plazma 7-OH-MTX konsantrasyonları kontrol grubuna kıyasla 13 kat daha yüksek bulunmuştur. Bu fark *Mrp2*^{-/-} farelerdeki değerler ile karşılaştırıldığında 2 kat daha fazla olup istatistiksel bakımdan anlamlıdır (p<0.05, Student's t-testi). Sadece Bcrp1'yi eksprese etmeyen farelerdeki sonuçlara göre, Bcrp1'in 7-OH-MTX'in eliminasyonunda rolünün olmadığı düşünülse de Mrp2'nin yokluğunda Bcrp1'in metabolitin plazmadan eliminasyonunu etkilediği görülmektedir.

MTX'in i.v. yoldan uygulanmasından 7.5 dakika sonra karaciğerdeki 7-OH-MTX düzeyleri *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuş, fakat 30 dakika sonunda *Mrp2*^{-/-} farelerin karaciğerindeki metabolit düzeyleri hızlıca azalmıştır. *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 60 dakika sonuna kadar yüksek düzeyde seyretmiştir. Bu bulgu, Mrp2 ve Bcrp1'in yokluğunda 7-OH-MTX'in karaciğerden eliminasyonunun geciktiğini düşündürmektedir.

7-OH-MTX'in sudaki çözünürlüğü ana bileşikten 3-5 kat daha düşüktür. Böbrek tübüllerinde kristalize olarak çöktüğü için MTX tedavisinden sonra görülen ve böbrek yetmezliği ile sonuçlanan renal toksisitede 7-OH-MTX'in rolü vardır (Smeland ve ark. 1994). Bu nedenle MTX uygulamasını takiben böbreklerdeki 7-OH-MTX düzeyleri oldukça önem taşımaktadır. 60 dakika sonunda böbrekteki 7-OH-MTX düzeyleri kontrol grubuna kıyasla *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde sırasıyla anlamlı olarak 11 ve 35 kat daha yüksek bulunmuştur.

İnce barsağın tamamı ve içeriğindeki MTX düzeyleri *Bcrp1*^{-/-}, *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ölçüm yapılan tüm zaman noktalarında, normal farelere kıyasla anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Normal farelere göre *Bcrp1*^{-/-} ve *Mrp2*^{-/-} farelerde ince barsağa sırasıyla %20 ve %50 oranında daha az MTX geçtiği görülürken, *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde uygulanan MTX dozunun sadece %10'u geçmiştir. Bu bulgu MTX'in safradan ince barsağa sekresyonunda Mrp2 ve Bcrp1'in rol oynadığını ve birbirlerinin yokluğunu kısmen kompanse edebildiklerini göstermektedir. Fakat, ince barsak ve içeriğinde tayin edilen MTX'in doğrudan intestinal sekresyona mı yoksa safra ile atılımına mı bağlı olduğu net değildir. *Bcrp1*^{-/-} farelerde ince barsak ve ince barsak içeriğindeki 7-OH-MTX düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla çok az bir fark gözlenmiş ve metabolitin ince barsağa eliminasyonunda Bcrp1'in minor bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Mrp2'nin eksprese olmadığı farelerde ise 7-OH-MTX düzeyleri kontrol grubuna göre düşük bulunmuş, *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 60 dakika sonunda kontrol grubundaki düzeylerin sadece %11'i ince barsak ve içeriğinde tespit edilebilmiştir. MTX' a benzer şekilde, 7-OH-MTX'in ince barsağa eliminasyonunda da Mrp2 majör rolü üstlenmiş, Bcrp1'in rolü ise özellikle Mrp2'nin yokluğunda belirgin hale gelmiştir.

Mrp2 ve Bcrp1'in fonksiyonlarını daha detaylı incelemek amacıyla safra kesesi kanülasyonu deneyleri gerçekleştirilmiş ve MTX'in safra kesesine ve/veya ince barsağa doğrudan sekresyonu değerlendirilmiştir. MTX'in safraya atılımı kontrol grubuna göre tüm knock-out gruplarda azalmış, özellikle her iki taşıyıcı proteini de eksprese etmeyen *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde bu azalma oldukça dramatik olmuştur. *Mrp2*^{-/-} fareler ile karşılaştırıldığında *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde MTX'in safraya atılımı oldukça azalmış, *Bcrp1*^{-/-} farelerde ise *Mrp2*^{-/-} farelere göre MTX'in safraya atılımı artmıştır. Bu bulgular, özellikle Mrp2 olmak üzere her iki taşıyıcı proteinin de MTX'in safraya atılımında önemli bir rol üstlendiğini ortaya koymaktadır. 7-OH-MTX'in safraya atılımında Mrp2, Bcrp1'e göre daha fazla önem taşımakta, Mrp2'nin yokluğunda ise, Bcrp1 Mrp2'nin fonksiyonunu kısmi olarak üstlenmektedir.

MTX'in oral yoldan uygulanmasını takiben absorpsiyon ve biyoyararlanımına Bcrp1 ve Mrp2'nin olası etkilerini değerlendirmek amacıyla, normal, *Mrp2*^{-/-}, *Bcrp1*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelere oral yoldan 50 mg/kg dozda MTX uygulanmıştır. Uygulamayı takiben MTX'in plazma düzeyleri tüm gruplarda i.v. uygulamaya kıyasla

düşük bulunmuştur. 120 dakika sonunda plazma AUC değerleri i.v. uygulama sonrasında elde edilen AUC değerlerinden yaklaşık 10 kat daha düşük olmuştur. Bu bulguya göre 50 mg/kg dozda uygulanan MTX'in biyoyararlanımı tüm gruplarda oldukça düşüktür (%4-7). Plazma AUC değerlerinin *Mrp2*^{-/-}, *Bcrp1*^{-/-} ve *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde normal farelerin değerlerine göre sırasıyla 1,6, 2 ve 3,4 kat fazla bulunması, *Mrp2* ve *Bcrp1*'nin MTX'in oral farmakokinetiğinde aditif etkilerinin olduğunu göstermektedir. Oral uygulamayı takiben 7,5 dakika gibi kısa bir sürede *Bcrp1*'i eksprese etmeyen farelerin plazmalarında MTX tayin edilebilmiştir. *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 7.5 dakikadaki plazma değerleri *Bcrp1*^{-/-} farelerden daha yüksek bulunmuştur. Bu da *Bcrp1*'in oldukça kısa bir sürede MTX'in barsaktan absorpsiyonunu azalttığını fakat *Mrp2*'nin de az da olsa etkili olduğunu göstermektedir.

Oral uygulamayı takiben, farelerin kuyruk veninden alınan kan örneklerinin yeterli hacimde olmaması nedeniyle, plazmada 7-OH-MTX düzeyleri tayin edilememiştir.

Karaciğerdeki MTX düzeyleri, oral yoldan uygulamayı takiben *Bcrp1*'i eksprese etmeyen farelerde kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 2 kat daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgu, muhtemelen plazma konsantrasyonlarındaki yükselmenin bir sonucudur. *Mrp2*^{-/-} farelerde ise plazma MTX konsantrasyonu normal farelere göre daha yüksek olsa da karaciğerdeki düzeylerinde anlamlı bir fark görülmemiştir. İ.V. uygulamaya benzer şekilde bu farelerde MTX'in karaciğerden eliminasyonu *Mrp3* aracılığı ile sinüzoidal membrandan kana taşınması sonucu artmış olabilir.

İnce barsak ve ince barsak içeriğindeki MTX düzeyleri tüm gruplarda yüksek olmuş fakat aralarında istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanmamıştır.

Oral yoldan MTX uygulamasını takiben karaciğerdeki 7-OH-MTX düzeyleri *Mrp2*^{-/-} ve *Bcrp1*^{-/-} farelerde normal farelere kıyasla yaklaşık 2 kat, *Bcrp1/Mrp2*^{-/-} farelerde ise 8 kat daha yüksek bulunmuştur. Özellikle *Mrp2*'nin yokluğu ve bunun diğer taşıyıcı protein ile kombinasyonu karaciğerde toksik metabolitin akümüülasyonunu artırmıştır.

MTX'in oral yoldan uygulanması sonrasında sistemik maruziyetini *Mrp2* ve *Bcrp1*'in sınırladığını göstermemize rağmen, bu durumun MTX'in ince barsaklardan emiliminin sınırlandırılmasına mı yoksa safraya atılımının azalmasına mı bağlı olduğu net değildir. İ.V. ve oral yoldan uygulamaların her ikisinde de

Bcrp1/Mrp2^{-/-} farelerde AUC değerleri kontrol grubuna göre 3.3 kat daha yüksektir. İ.V. uygulamayı takiben görülen bu artışın temel nedeninin safraya atılımının sınırlandırılması olduğu göz önüne alınır ise oral uygulama sonrasında da bunun sistemik maruziyetteki artışın nedeni olabileceği kanısına varılabilir. 7,5 dakika sonra *Bcrp1*'i eksprese etmeyen farelerin plazmalarında MTX konsantrasyonunun yükselmiş olması ve *Bcrp1/Mrp2^{-/-}* farelerdeki MTX düzeylerinin *Bcrp1^{-/-}* farelere kıyasla daha yüksek olması bu farelerde karaciğerdeki *Mrp3* ekspresyonunun yüksek olmasına bağlı olabilir. İ.V. uygulamada MTX'in farmakokinetiğinde *Mrp2*'nin daha önemli bir fonksiyona sahip olduğu ortaya konmuş, oral uygulamada ise *Bcrp1* majör rolü üstlenmiştir. Bu bulgular, ABC taşıyıcı proteinlerinin oral uygulama sonrasında ilaçların farmakokinetiğine etkilerinin daha detaylı incelenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

MTX tedavide oral yoldan romatoid artrit ve psoriasis tedavisinde kullanılmaktadır (Hardman ve Limbrid 2001). Oral yoldan MTX kullanan bir hastada *ABCC2* geninde 3 SNP mutasyonu ile MTX etkinliği ve yan etkilerin görülme olasığı arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (Ranganathan ve ark. 2008). Çalışmamızda elde edilen bulgular da, *Mrp2* ve *Bcrp1* yokluğunda oral uygulamayı takiben sistemik dolaşımda, karaciğer ve böbreklerde MTX düzeylerinin yükseldiğini göstermektedir. Bu bulgulardan hareketle, oral yoldan MTX kullanacak olan hastalarda söz konusu taşıyıcı proteinleri eksprese eden genlerdeki mutasyonların taranmasının, hastalarda olası yan etki profilinin daha iyi değerlendirmesine olanak sağlayacağı ileri sürülebilir.

MRP2 ve/veya BCRP taşıyıcı proteinlerin aktivitesi veya ekspresyonlarındaki farklılıklar hastalarda MTX'in toksisitesini etkileyebilir. *ABCC2* ve *ABCG2* genlerindeki polimorfizmlerin bu proteinlerin ekspresyonlarını veya fonksiyonlarını azalttığı gösterilmiştir (Huang 2007). Bu bulgu da MTX'in etkinliği ve toksisitesinin hastalar arasında farklılık göstermesinin önemli nedenlerinden biri olabilir.

Dikkat edilmesi gereken diğer bir husus, bazı taşıyıcı proteinlerin ekspresyonlarının cinsiyetler arasında farklılık göstermesidir. İnsan karaciğerindeki BCRP protein düzeyleri erkeklerde kadınlardakinden daha fazladır (Merino ve ark. 2005). Çalışmamızda dişi fareler kullanmamıza rağmen, *Mrp2*'yi eksprese etmeyen dişi farelerde *Bcrp1*'in MTX ve 7-OH-MTX'in biliyer eliminasyonuna etkisini göstermiş bulunmaktayız. Rau ve ark. *ABCC2* genindeki polimorfizm ile MTX'in farmakokinetiği arasındaki ilişkiyi sadece kadın hastalarda göstermiştir (Rau ve ark. 2006).

Çalışmamızda Bcrp1'in dişi farelerdeki Mrp2'nin yokluğunu kısmen kompanse edebildiği gösterilmiştir. İnsanda ise erkeklerdeki artmış BCRP ekspresyonu MTX eliminasyonunu kompanse edebilecek kadar yeterli olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmamızda farelere 50 mg/kg dozda MTX hem i.v. bolus, hem de oral yoldan uygulanmıştır. Farelere 50 mg/kg i.v. bolus olarak uygulanan MTX insanda yaklaşık 154 mg/m^2 doza tekabül etmektedir (Freireich ve ark. 1966). Bu doz, yüksek doz kemoterapide ($1000\text{-}33000 \text{ mg/m}^2$ lökoverin ile birlikte) kullanılan MTX dozundan daha düşük olsa da, MTX farklı kanser tiplerinde ve hastalıklarda geniş bir doz aralığında kullanılmaktadır (Widemann ve Adamson 2006). Bu çalışmada Mrp2 ve/veya Bcrp1'in MTX'in farmakokinetiğine etkisini göstermiş olsak da, daha yüksek dozlarda veya uzun süreli infüzyon uygulamalarında bu taşıyıcı proteinlerin rolleri ile ilgili prelinik çalışmaları henüz yapılmamıştır. Ancak, MRP2 ve BCRP'yi eksprese eden genlerdeki mutasyonlar/polimorfizm ile MTX'in farmakokinetiği veya toksisitesi arasındaki bağlantı, yüksek doz MTX ($1\text{-}5 \text{ g/m}^2$) infüzyonu tedavisi alan hastalarda gösterilmiştir (Rau ve ark. 2006, Hulot ve ark. 2005, Kager ve ark. 2005). Diğer taraftan, MTX toksisitesinde sadece ilaç konsantrasyonunun değil, bunun yanı sıra maruziyet süresinin de önemli olduğu göz ardı edilmemelidir. Yüksek dozda MTX kısa süreli uygulamalarda iyi tolere edilebilirken düşük konsantrasyonda daha uzun süreli maruziyet hayatı tehdit eden yan etkilere neden olabilmektedir (Brigitte ve ark 2006). MTX atılımının gecikmesi, vücutta ilaca maruziyet süresini ve hayatı tehdit edici toksik etkilerin görülme potansiyelini artırır. MTX ve ana metaboliti olan 7-OH-MTX kristallerinin böbrek tübüllerinde birikmesi sonucu tıkanmaya bağlı akut böbrek yetmezliği en önemli yan etkilerden biridir (Hempel ve ark. 2003, Widemann ve ark. 2004). Renal yetmezliğin gelişmesinde erken klinik semptomların bulunmaması nedeniyle, özellikle yüksek dozda MTX ile tedavide mutlaka plazma MTX konsantrasyonları izlenmeli ve MTX eliminasyonu değerlendirilmelidir (Evans ve ark. 1979). Bu bağlamda olası toksik etkileri engelleyebilmek amacıyla MTX ile tedaviye başlamadan önce hastalarda bireysel olarak MTX'in farmakokinetiğini etkileyen proseslerin karakterize edilmesi ve buna göre dozun bireyselleştirilmesi önerilmektedir.

Son olarak, deney hayvanlarında yapılan prelinik çalışmalardan elde edilen sonuçların insana yansıtılarak yorumlanması dikkat gerektiren bir husustur. Örneğin

insanda MTX eliminasyonunda safra yolu ile atılım daha az önemli iken (uygulanan dozun %20'si), böbreklerden atılım farelerdekiye kıyasla daha fazla önem taşımaktadır. Fakat MTX'in insandaki farmakokinetiği ile ilgili çalışmalar oldukça kısıtlıdır ve az sayıda denek ile yürütülmüştür (Creaven ve ark. 1973, Calvert ve ark. 1977). Diğer taraftan, MTX ve metabolitine afinitesi olan, karaciğer veya böbrekte eksprese edilen diğer taşıyıcı proteinlerin varlığı ve etkinliği, insanlarda ve farelerde farklılık gösterebilir.

ABC taşıyıcı proteinlerinin antineoplastik ilaçların farmakokinetiği üzerine olan etkilerinin belirlenmesi, inhibitör veya substratların bilinçli olarak eş zamanlı kullanımları sonucu tedavide ortaya çıkabilecek risklerin öngörülmesi açısından önemlidir. Bu hususun, sunulan çalışma ile bir kez daha ortaya konmuş olduğu ve elde edilen bulguların, MTX ile tedavide dozun bireyselleştirilerek toksik ve yan etkilerin en aza indirilmesine katkıda bulunacağı görüşündeyiz.

6. KAYNAKLAR

- Abbott, B.L., Colapietro, A.M., Barnes, Y., Marini, F., Andreeff, M., Sorrentino, B.P. (2002) Low levels of ABCG2 expression in adult AML blast samples. *Blood*. **100**(13), 4594-601
- Akita, H., Suzuki, H., Ito, K., Kinoshita, S., Sato, N., Takikawa, H., Sugiyama, Y. (2001) Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta*. **1511**(1), 7-16
- Allen, J.D. ve Schinkel, A.H. (2002) Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Mol Cancer Ther*. **1**(6), 427-34
- Allen, J.D., Brinkhuis, R.F., Wijnholds, J., Schinkel, A.H. (1999) The mouse *Bcrp1/Mxr/Abcp* gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res*. **59**(17), 4237-41.
- Allen, J.D., Van Dort, S.C., Buitelaar, M., van Tellingen, O., Schinkel, A.H. (2003) Mouse breast cancer resistance protein (*Bcrp1/Abcg2*) mediates etoposide resistance and transport, but etoposide oral availability is limited primarily by P-glycoprotein. *Cancer Res*. **63**(6), 1339-44
- Allen, J.D., van Loevezijn, A., Lakhai, J.M., van der Valk, M., van Tellingen, O., Reid, G., Schellens, J.H., Koomen, G.J., Schinkel, A.H. (2002) Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther*. **1**(6), 417-25
- Allikmets, R., Schriml, L.M., Hutchinson, A., Romano-Spica, V., Dean, M. (1998) A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res*. **58**(23), 5337-9.
- Arimori, K., Kuroki, N., Hidaka, M., Iwakiri, T., Yamsaki, K., Okumura, M., Ono, H., Takamura, N., Kikuchi, M., Nakano, M. (2003) Effect of P-glycoprotein modulator, cyclosporin A, on the gastrointestinal excretion of irinotecan and its metabolite SN-38 in rats. *Pharm Res*. **20**(6), 910-7.

- Aronica, E., Gorter, J.A., Ramkema, M., Redeker, S., Ozbas-Gerçeker, F., van Vliet, E.A., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., van der Valk, P., Baayen, J.C., Troost, D. (2004) Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. **45**(5), 441-51.
- Asakura, E., Nakayama, H., Sugie, M., Zhao, Y.L., Nadai, M., Kitaichi, K., Shimizu, A., Miyoshi, M., Takagi, K., Takagi, K., Hasegawa, T. (2004) Azithromycin reverses anticancer drug resistance and modifies hepatobiliary excretion of doxorubicin in rats. *Eur J Pharmacol*. **484**(2-3), 333-9.
- Bakos, E., Evers, R., Sinkó, E., Váradi, A., Borst, P., Sarkadi, B. (2000) Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. *Mol Pharmacol*. **57**(4), 760-8.
- Ballatori, N. ve Rebeor, J.F. (1998) Roles of MRP2 and oatp1 in hepatocellular export of reduced glutathione. *Semin Liver Dis*. **18**(4), 377-87
- Bart, J., Hollema, H., Groen, H.J., de Vries, E.G., Hendrikse, N.H., Sleijfer, D.T., Wegman, T.D., Vaalburg, W., van der Graaf, W.T. (2004) The distribution of drug-efflux pumps, P-gp, BCRP, MRP1 and MRP2, in the normal blood-testis barrier and in primary testicular tumours. *Eur J Cancer*. **40**(14), 2064-70.
- Berger, V., Gabriel, A.F., Sergent, T., Trouet, A., Larondelle, Y., Schneider, Y.J. (2003) Interaction of ochratoxin A with human intestinal Caco-2 cells: possible implication of a multidrug resistance-associated protein (MRP2). *Toxicol Lett*. **140-141**, 465-76.
- Borst, P. ve Elferink, R.O. (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*. **71**, 537-92
- Borst, P., Zelcer, N., van de Wetering, K. (2006) MRP2 and 3 in health and disease. *Cancer Lett*. **234**(1), 51-61
- Brangi, M., Litman, T., Ciotti, M., Nishiyama, K., Kohlhagen, G., Takimoto, C., Robey, R., Pommier, Y., Fojo, T., Bates, S.E. (1999) Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantrone-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells. *Cancer Res*. **59**(23), 5938-46

- Breedveld, P., Beijnen, J.H., Schellens, J.H. (2006) Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs. *Trends Pharmacol Sci.* **27**(1), 17-24.
- Breithaupt, H., Küenzlen, E., Goebel, G. (1982) Rapid high-pressure liquid chromatographic determination of methotrexate and its metabolites 7-hydroxymethotrexate and 2,4-diamino-N(10)-methylpteroic acid in biological fluids. *Anal Biochem.* **121**(1), 103-13
- Bremnes, R.M., Slørdal, L., Wist, E., Aarbakke, J. (1989) Formation and elimination of 7-hydroxymethotrexate in the rat in vivo after methotrexate administration. *Cancer Res.* **49**(9), 2460-4.
- Brendel, C., Scharenberg, C., Dohse, M., Robey, R.W., Bates, S.E., Shukla, S., Ambudkar, S.V., Wang, Y., Wennemuth, G., Burchert, A., Boudriot, U., Neubauer, A. (2007) Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells. *Leukemia.* **21**(6), 1267-75
- Brigitte, C., Widemann, P.C., Adamson (2006). Understanding and Managing Methotrexate Nephrotoxicity. *The Oncologist.* **11**: 694-703
- Burger, H. ve Nooter, K. (2004) Pharmacokinetic resistance to imatinib mesylate: role of the ABC drug pumps ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) in the oral bioavailability of imatinib. *Cell Cycle.* **3**(12), 1502-5
- Burger, H., Foekens, J.A., Look, M.P., Meijer-van Gelder, M.E., Klijn, J.G., Wiemer, E.A., Stoter, G., Nooter, K. (2003) RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res.* **9**(2), 827-36.
- Büchler, M., König, J., Brom, M., Kartenbeck, J., Spring, H., Horie, T., Keppler, D. (1996) cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem.* **271**(25), 15091-8

- Calvert, A.H., Bondy, P.K., Harrap, K.R. (1977). Some observations on the human pharmacology of methotrexate. *Cancer Treat Rep* **(61)**: 1647-56.
- Cascorbi, I. (2006) Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther.* **112**(2), 457-73
- Chan, L.M., Lowes, S., Hirst, B.H. (2004) The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci.* **21**(1), 25-51.
- Chen, C., Scott, D., Hanson, E., Franco, J., Berryman, E., Volberg, M., Liu, X. (2003) Impact of Mrp2 on the biliary excretion and intestinal absorption of furosemide, probenecid, and methotrexate using Eisai hyperbilirubinemic rats. *Pharm Res.* **20**(1), 31-7.
- Chen, C., Slitt, A.L., Dieter, M.Z., Tanaka, Y., Scheffer, G.L., Klaassen, C.D. (2005) Up-regulation of Mrp4 expression in kidney of Mrp2-deficient TR- rats. *Biochem Pharmacol.* **70**(7), 1088-95
- Chen, Z.S., Lee, K., Walther, S., Raftogianis, R.B., Kuwano, M., Zeng, H., Kruh, G.D. (2002) Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res.* **62**(11), 3144-50
- Chu, X.Y., Huskey, S.E., Braun, M.P., Sarkadi, B., Evans, D.C., Evers, R. (2004) Transport of ethinylestradiol glucuronide and ethinylestradiol sulfate by the multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, and MRP3. *J Pharmacol Exp Ther.* **309**(1), 156-64.
- Chu, X.Y., Strauss, J.R., Mariano, M.A., Li, J., Newton, D.J., Cai, X., Wang, R.W., Yabut, J., Hartley, D.P., Evans, D.C., Evers, R. (2006) Characterization of mice lacking the multidrug resistance protein MRP2 (ABCC2). *J Pharmacol Exp Ther.* **317**(2), 579-89.
- Cisternino, S., Rousselle, C., Debray, M., Scherrmann, J.M. (2004) In situ transport of vinblastine and selected P-glycoprotein substrates: implications for drug-drug interactions at the mouse blood-brain barrier. *Pharm Res.* **21**(8), 1382-9

- Cole, S.P., Pinkoski, M.J., Bhardwaj, G., Deeley, R.G. (1992) Elevated expression of annexin II (lipocortin II, p36) in a multidrug resistant small cell lung cancer cell line. *Br J Cancer*. **65**(4), 498-502
- Cooray, H.C., Janvilisri, T., van Veen, H.W., Hladky, S.B., Barrand, M.A. (2004) Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun*. **317**(1), 269-75.
- Creaven, P.J., Hansen, H.H., Alford, D.A., Allen, L.M.(1973) Methotrexate in liver and bile after intravenous dosage in man. *Br J Cancer*. **28**:589-91.
- Daly, A.K., Aithal, G.P., Leathart, J.B., Swainsbury, R.A., Dang, T.S., Day, C.P. (2007) Genetic susceptibility to diclofenac-induced hepatotoxicity: contribution of UGT2B7, CYP2C8, and ABCC2 genotypes. *Gastroenterology*. **132**(1), 272-81.
- Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*. **11**: 1156-1166.
- de Bruin, M., Miyake, K., Litman, T., Robey, R., Bates, S.E. (1999) Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett*. **146**(2), 117-26.
- de Jong, F.A., Scott-Horton, T.J., Kroetz, D.L., McLeod, H.L., Friberg, L.E., Mathijssen, R.H., Verweij, J., Marsh, S., Sparreboom, A. (2007) Irinotecan-induced diarrhea: functional significance of the polymorphic ABCC2 transporter protein. *Clin Pharmacol Ther*. **81**(1), 42-9.
- de Vries, N.A., Zhao, J., Kroon, E., Buckle, T., Beijnen, J.H., van Tellingen, O. (2007) P-glycoprotein and breast cancer resistance protein: two dominant transporters working together in limiting the brain penetration of topotecan. *Clin Cancer Res*. **13**(21), 6440-9
- Diestra, J.E., Condom, E., Del Muro, X.G., Scheffer, G.L., Pérez, J., Zurita, A.J., Muñoz-Seguí, J., Vigués, F., Scheper, R.J., Capellá, G., Germà-Lluch, J.R., Izquierdo, M.A. (2003) Expression of multidrug resistance proteins P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, breast cancer resistance protein and lung resistance related protein in locally advanced bladder cancer treated with neoadjuvant chemotherapy: biological and clinical implications. *J Urol*. **170**(4 Pt 1), 1383-7

- Dietrich, C.G., de Waart, D.R., Ottenhoff, R., Bootsma, A.H., van Gennip, A.H., Elferink, R.P. (2001) Mrp2-deficiency in the rat impairs biliary and intestinal excretion and influences metabolism and disposition of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo. *Carcinogenesis*. **22**(5), 805-11.
- Donner, M.G. ve Keppler, D. (2001) Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology*. **34**(2), 351-9
- Doyle, L.A. ve Ross, D.D. (2003) Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene*. **22**(47), 7340-58.
- Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., Ross, D.D. (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**(26), 15665-70.
- Edwards, G. (2003) Ivermectin: does P-glycoprotein play a role in neurotoxicity? *Filaria J*. **2**, 8
- Elferink, R.P., Ottenhoff, R., Liefing, W., de Haan, J., Jansen, P.L. (1989) Hepatobiliary transport of glutathione and glutathione conjugate in rats with hereditary hyperbilirubinemia. *J Clin Invest*. **84**(2), 476-83
- Elkind, N.B., Szentpétery, Z., Apáti, A., Ozvegy-Laczka, C., Várady, G., Ujhelly, O., Szabó, K., Homolya, L., Váradi, A., Buday, L., Kéri, G., Németh, K., Sarkadi, B. (2005) Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib). *Cancer Res*. **65**(5), 1770-7.
- Enokizono, J., Kusuhara, H., Sugiyama, Y. (2007) Effect of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) on the disposition of phytoestrogens. *Mol Pharmacol*. **72**(4), 967-75
- Erlichman, C., Boerner, S.A., Hallgren, C.G., Spieker, R., Wang, X.Y., James, C.D., Scheffer, G.L., Maliepaard, M., Ross, D.D., Bible, K.C., Kaufmann, S.H. (2001) The HER tyrosine kinase inhibitor CI1033 enhances cytotoxicity of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and topotecan by inhibiting breast cancer resistance protein-mediated drug efflux. *Cancer Res*. **61**(2), 739-48.

- Evans, W.E., Pratt, C.B., Taylor, R.H., Barker, L.F., Crom, W.R. (1979) Pharmacokinetic monitoring of high-dose methotrexate. Early recognition of high-risk patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* **3**(3), 161-6.
- Evers, R., de Haas, M., Sparidans, R., Beijnen, J., Wielinga, P.R., Lankelma, J., Borst, P. (2000) Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export. *Br J Cancer.* **83**(3), 375-83
- Faneyte, I.F., Kristel, P.M., Maliepaard, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Schellens, J.H., van de Vijver, M.J. (2002) Expression of the breast cancer resistance protein in breast cancer. *Clin Cancer Res.* **8**(4), 1068-74.
- Farber, S. ve Diamond, L.K. (1948) Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med.* **238**(23), 787-93
- Fardel, O., Jigorel, E., Le Vee, M., Payen, L. (2005) Physiological, pharmacological and clinical features of the multidrug resistance protein 2. *Biomed Pharmacother.* **59**(3), 104-14
- Farquhar, D. ve Loo, T.L. (1972) Synthesis and biologic evaluation of 7-hydroxymethotrexate, 7-methylaminopterin, and 7-methylmethotrexate. *J Med Chem.* **15**(5), 567-9.
- Friedrich, R.E., Punke, C., Reymann, A. (2004) Expression of multi-drug resistance genes (*mdr1*, *mrp1*, *bcrp*) in primary oral squamous cell carcinoma. *In Vivo.* **18**(2), 133-47.
- Fromm, M.F. (2004) Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci.* **25**(8), 423-9
- Galimberti, S., Guerrini, F., Palumbo, G.A., Consoli, U., Fazzi, R., Morabito, F., Santini, V., Petrini, M. (2004) Evaluation of BCRP and MDR-1 co-expression by quantitative molecular assessment in AML patients. *Leuk Res.* **28**(4), 367-72.
- Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., Mulligan, R.C. (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med.* **183**(4), 1797-806

- Gupta, A., Dai, Y., Vethanayagam, R.R., Hebert, M.F., Thummel, K.E., Unadkat, J.D., Ross, D.D., Mao, Q. (2006) Cyclosporin A, tacrolimus and sirolimus are potent inhibitors of the human breast cancer resistance protein (ABCG2) and reverse resistance to mitoxantrone and topotecan. *Cancer Chemother Pharmacol.* **58**(3), 374-83
- Hamilton, R.A. ve Kremer, J.M. (1997) Why intramuscular methotrexate may be more efficacious than oral dosing in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* **36**(1), 86-90
- Hardman, J.G., Limbird, L.E. (Ed) (2001) Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. ABD, The McGraw-Hill Companies.
- Hempel, L., Misselwitz, J., Fleck, C., Kentouche, K., Leder, C., Appenroth, D., Rost, M., Zintl, F. (2003). Influence of high-dose methotrexate therapy (HD-MTX) on glomerular and tubular kidney function. *Med Pediatr Oncol.* (40): 348-54
- Henderson, E.S., Adamson, R.H., Denham, C., Oliverio, V.T. (1965) The metabolic fate of tritiated methotrexate. I. Absorption, excretion, and distribution in mice, rats, dogs and monkeys. *Cancer Res.* **25**(7), 1008-17
- Herman, R.A., Veng-Pedersen, P., Hoffman, J., Koehnke, R., Furst, D.E. (1989) Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis patients. *J Pharm Sci.* **78**(2), 165-71.
- Hertz, R., Li, M.C., Spencer, D.B. (1956) Effect of methotrexate therapy upon choriocarcinoma and chorioadenoma. *Proc Soc Exp Biol Med.* **93**(2), 361-6.
- Hirohashi, T., Suzuki, H., Sugiyama, Y. (1999) Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3). *J Biol Chem.* **274**(21), 15181-5.
- Hoffmann, K., Gastens, A.M., Volk, H.A., Löscher, W. (2006) Expression of the multidrug transporter MRP2 in the blood-brain barrier after pilocarpine-induced seizures in rats. *Epilepsy Res.* **69**(1), 1-14
- Hong, J., Lambert, J.D., Lee, S.H., Sinko, P.J., Yang, C.S. (2003) Involvement of multidrug resistance-associated proteins in regulating cellular levels of (-)-

- epigallocatechin-3-gallate and its methyl metabolites. *Biochem Biophys Res Commun.* **310**(1), 222-7
- Honjo, Y., Hrycyna, C.A., Yan, Q.W., Medina-Pérez, W.Y., Robey, R.W., van de Laar, A., Litman, T., Dean, M., Bates, S.E. (2001) Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res.* **61**(18), 6635-9
- Hooijberg, J.H., Broxterman, H.J., Kool, M., Assaraf, Y.G., Peters, G.J., Noordhuis, P., Scheper, R.J., Borst, P., Pinedo, H.M., Jansen, G. (1999) Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res.* **59**(11), 2532-5.
- Houghton, P.J., Germain, G.S., Harwood, F.C., Schuetz, J.D., Stewart, C.F., Buchdunger, E., Traxler, P. (2004) Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. *Cancer Res.* **64**(7), 2333-7.
- Huang, Y. (2007) Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* **26**(1), 183-201.
- Huisman, M.T., Smit, J.W., Crommentuyn, K.M., Zelcer, N., Wiltshire, H.R., Beijnen, J.H., Schinkel, A.H. (2002) Multidrug resistance protein 2 (MRP2) transports HIV protease inhibitors, and transport can be enhanced by other drugs. *AIDS.* **16**(17), 2295-301.
- Hulot, J.S., Villard, E., Maguy, A., Morel, V., Mir, L., Tostivint, I., William-Faltaos, D., Fernandez, C., Hatem, S., Deray, G., Komajda, M., Leblond, V., Lechat, P. (2005) A mutation in the drug transporter gene ABCC2 associated with impaired methotrexate elimination. *Pharmacogenet Genomics.* **15**(5), 277-85.
- Imai, Y., Asada, S., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., Sugimoto, Y. (2003) Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Mol Pharmacol.* **64**(3), 610-8
- Ishikawa, T., Müller, M., Klünemann, C., Schaub, T., Keppler, D. (1990) ATP-dependent primary active transport of cysteinyl leukotrienes across liver canalicular

- membrane. Role of the ATP-dependent transport system for glutathione S-conjugates. *J Biol Chem.* **265**(31), 19279-86
- Jäger, W., Gehring, E., Hagenauer, B., Aust S., Senderowicz, A., Thalhammer, T. (2003) Biliary excretion of flavopiridol and its glucuronides in the isolated perfused rat liver: role of multidrug resistance protein 2 (Mrp2). *Life Sci.* **73**(22), 2841-54.
- Jansen, P.L., Peters, W.H., Lamers, W.H. (1985) Hereditary chronic conjugated hyperbilirubinemia in mutant rats caused by defective hepatic anion transport. *Hepatology.* **5**(4), 573-9.
- Jedlitschky, G. ve Keppler, D. (2002) Transport of leukotriene C4 and structurally related conjugates. *Vitam Horm.* **64**, 153-84.
- Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U., Hummel-Eisenbeiss, J., Burchell, B., Keppler, D. (1997) ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem J.* **327**(Pt 1), 305-10
- Jonker, J.W., Buitelaar, M., Wagenaar, E., Van Der Valk, M.A., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Plosch, T., Kuipers, F., Elferink, R.P., Rosing, H., Beijnen, J.H., Schinkel, A.H. (2002) The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**(24), 15649-54.
- Jonker, J.W., Freeman, J., Bolscher, E., Musters, S., Alvi, A.J., Titley, I., Schinkel, A.H., Dale, T.C. (2005) Contribution of the ABC transporters Bcrp1 and Mdr1a/1b to the side population phenotype in mammary gland and bone marrow of mice. *Stem Cells.* **23**(8), 1059-65
- Jonker, J.W., Smit, J.W., Brinkhuis, R.F., Maliepaard, M., Beijnen, J.H., Schellens, J.H., Schinkel, A.H. (2000) Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J Natl Cancer Inst.* **92**(20), 1651-6
- Kager, L., Cheok, M., Yang, W., Zaza, G., Cheng, Q., Panetta, J.C., Pui, C.H., Downing, J.R., Relling, M.V., Evans, W.E. (2005) Folate pathway gene expression differs in subtypes of acute lymphoblastic leukemia and influences methotrexate pharmacodynamics. *J Clin Invest.* **115**(1), 110-7.

- Kala, S.V., Neely, M.W., Kala, G., Prater, C.I., Atwood, D.W., Rice, J.S., Lieberman, M.W. (2000) The MRP2/cMOAT transporter and arsenic-glutathione complex formation are required for biliary excretion of arsenic. *J Biol Chem.* **275**(43), 33404-8
- Kamisako, T., Leier, I., Cui, Y., König, J., Buchholz, U., Hummel-Eisenbeiss, J., Keppler, D. (1999) Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2. *Hepatology.* **30**(2), 485-90.
- Kanzaki, A., Toi, M., Nakayama, K., Bando, H., Mutoh, M., Uchida, T., Fukumoto, M., Takebayashi, Y. (2001) Expression of multidrug resistance-related transporters in human breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* **92**(4), 452-8
- Karászi, E., Jakab, K., Homolya, L., Szakács, G., Holló, Z., Telek, B., Kiss, A., Rejtő, L., Nahajevszky, S., Sarkadi, B., Kappelmayer, J. (2001) Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* **112**(2), 308-14
- Katayama, K., Masuyama, K., Yoshioka, S., Hasegawa, H., Mitsuhashi, J., Sugimoto, Y. (2007) Flavonoids inhibit breast cancer resistance protein-mediated drug resistance: transporter specificity and structure-activity relationship. *Cancer Chemother Pharmacol.* **60**(6), 789-97
- Kawabata, S., Oka, M., Shiozawa, K., Tsukamoto, K., Nakatomi, K., Soda, H., Fukuda, M., Ikegami, Y., Sugahara, K., Yamada, Y., Kamihira, S., Doyle, L.A., Ross, D.D., Kohno, S. (2001) Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **280**(5), 1216-23
- Keppler, D., Leier, I., Jedlitschky, G., Mayer, R., Büchler, M. (1996) The function of the multidrug resistance proteins (MRP and cMRP) in drug conjugate transport and hepatobiliary excretion. *Adv Enzyme Regul.* **36**, 17-29
- Kool, M., van der Linden, M., de Haas, M., Scheffer, G.L., de Vree, J.M., Smith, A.J., Jansen, G., Peters, G.J., Ponne, N., Scheper, R.J., Elferink, R.P., Baas, F., Borst, P. (1999) MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(12), 6914-9

- Krishnamurthy, P., Ross, D.D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K.E., Sarkadi, B., Sorrentino, B.P., Schuetz, J.D. (2004) The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem.* **279**(23), 24218-25.
- Krishnamurthy, P., Schuetz, J.D.(2006) Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **46**: 381-410.
- Kruh, G.D., Belinsky, M.G., Gallo, J.M., Lee, K. (2007) Physiological and pharmacological functions of Mrp2, Mrp3 and Mrp4 as determined from recent studies on gene-disrupted mice. *Cancer Metastasis Rev.* **26**(1), 5-14.
- Kusuhara, H., Sugiyama, Y. (2002) Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney. *J Control Release.* **78**(1-3), 43-54.
- Kwei, G.Y., Alvaro, R.F., Chen, Q., Jenkins, H.J., Hop, C.E., Keohane, C.A., Ly, V.T., Strauss, J.R., Wang, R.W., Wang, Z., Pippert, T.R., Umbenhauer, D.R. (1999) Disposition of ivermectin and cyclosporin A in CF-1 mice deficient in mdr1a P-glycoprotein. *Drug Metab Dispos.* **27**(5), 581-7.
- Lagas, J.S., Vlaming, M.L., van Tellingen, O., Wagenaar, E., Jansen, R.S., Rosing, H., Beijnen, J.H., Schinkel, A.H.. (2006) Multidrug resistance protein 2 is an important determinant of paclitaxel pharmacokinetics. *Clin Cancer Res.* **12**(20 Pt 1):6125-32.
- Lankas, G.R., Cartwright, M.E., Umbenhauer, D. (1997) P-glycoprotein deficiency in a subpopulation of CF-1 mice enhances avermectin-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* **143**(2), 357-65
- Lee, Y.J., Kusuhara, H., Jonker, J.W., Schinkel, A.H., Sugiyama, Y. (2005) Investigation of efflux transport of dehydroepiandrosterone sulfate and mitoxantrone at the mouse blood-brain barrier: a minor role of breast cancer resistance protein. *J Pharmacol Exp Ther.* **312**(1), 44-52
- Lin, T., Islam, O., Heese, K. (2006) ABC transporters, neural stem cells and neurogenesis--a different perspective. *Cell Res.* **16**(11), 857-71

- Lown, K.S., Mayo, R.R., Leichtman, A.B., Hsiao, H.L., Turgeon, D.K., Schmiedlin-Ren, P., Brown, M.B., Guo, W., Rossi, S.J., Benet, L.Z., Watkins, P.B. (1997) Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther.* **62**(3), 248-60
- Maliepaard, M., Scheffer, G.L., Faneyte, I.F., van Gastelen, M.A., Pijnenborg, A.C., Schinkel, A.H., van De Vijver, M.J., Scheper, R.J., Schellens, J.H. (2001) Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* **61**(8), 3458-64
- Mao, Q. (2008) BCRP/ABCG2 in the placenta: expression, function and regulation. *Pharm Res.* **25**(6), 1244-55. Review. Erratum in: *Pharm Res.* **25**(6), 1484
- Merino, G., van Herwaarden, A.E., Wagenaar, E., Jonker, J.W., Schinkel, A.H. (2005) Sex-dependent expression and activity of the ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in liver. *Mol Pharmacol.* **67**(5), 1765-71
- Merino, G., Alvarez, A.I., Pulido, M.M., Molina, A.J., Schinke, A.H., Prieto, J.G. (2006) Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug Metab Dispos.* **34**(4), 690-5
- Miller, D.S., Nobmann, S.N., Gutmann, H., Toeroek, M., Drewe, J., Fricker, G. (2000) Xenobiotic transport across isolated brain microvessels studied by confocal microscopy. *Mol Pharmacol.* **58**(6), 1357-67
- Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T., Bates, S.E. (1999) Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* **59**(1), 8-13
- Mizuno, N., Suzuki, M., Kusuhara, H., Suzuki, H., Takeuchi, K., Niwa, T., Jonker, J.W., Sugiyama, Y. (2004) Impaired renal excretion of 6-hydroxy-5,7-dimethyl-2-methylamino-4-(3-pyridylmethyl) benzothiazole (E3040) sulfate in breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2) knockout mice. *Drug Metab Dispos.* **32**(9), 898-901

- Nezasa, K., Tian, X., Zamek-Gliszczynski, M.J., Patel, N.J., Raub, T.J., Brouwer, K.L. (2006) Altered hepatobiliary disposition of 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein in Abcg2 (Bcrp1) and Abcc2 (Mrp2) knockout mice. *Drug Metab Dispos.* **34**(4), 718-23
- Nies, A.T., Jedlitschky, G., König, J., Herold-Mende, C., Steiner, H.H., Schmitt, H.P., Keppler, D. (2004) Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience.* **129**(2), 349-60
- Norris, M.D., De Graaf, D., Haber, M., Kavallaris, M., Madafiglio, J., Gilbert, J., Kwan, E., Stewart, B.W., Mechetner, E.B., Gudkov, A.V., Roninson, I.B. (1996) Involvement of MDR1 P-glycoprotein in multifactorial resistance to methotrexate. *Int J Cancer.* **65**(5), 613-9.
- Oostendorp, R.L., Buckle, T., Beijnen, J.H., van Tellingen, O., Schellens, J.H. (2009) The effect of P-gp (Mdr1a/1b), BCRP (Bcrp1) and P-gp/BCRP inhibitors on the in vivo absorption, distribution, metabolism and excretion of imatinib. *Invest New Drugs.* **27**(1), 31-40.
- Oude Elferink, R.P., Ottenhoff, R., Liefting, W.G., Schoemaker, B., Groen, A.K., Jansen, P.L. (1990) ATP-dependent efflux of GSSG and GS-conjugate from isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol.* **258**(5 Pt 1), G699-706
- Pan, G., Giri, N., Elmquist, W.F. (2007) Abcg2/Bcrp1 mediates the polarized transport of antiretroviral nucleosides abacavir and zidovudine. *Drug Metab Dispos.* **35**(7), 1165-73
- Patel, N.J., Zamek-Gliszczynski, M.J., Zhang, P., Han, Y.H., Jansen, P.L., Meier, P.J., Stieger, B., Brouwer, K.L. (2003) Phenobarbital alters hepatic Mrp2 function by direct and indirect interactions. *Mol Pharmacol.* **64**(1), 154-9
- Paulusma, C.C. ve Oude Elferink, R.P. (1997) The canalicular multispecific organic anion transporter and conjugated hyperbilirubinemia in rat and man. *J Mol Med.* **75**(6), 420-8

- Payen, L., Courtois, A., Campion, J.P., Guillouzo, A., Fardel, O. (2000) Characterization and inhibition by a wide range of xenobiotics of organic anion excretion by primary human hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* **60**(12), 1967-75
- Qadir, M., O'Loughlin, K.L., Fricke, S.M., Williamson, N.A., Greco, W.R., Minderman, H., Baer, M.R. (2005) Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator. *Clin Cancer Res.* **11**(6), 2320-6.
- Rabindran, S.K., He, H., Singh, M., Brown, E., Collins, K.I., Annable, T., Greenberger, L.M. (1998) Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. *Cancer Res.* **58**(24), 5850-8.
- Ranganathan, P., Culverhouse, R., Marsh, S., Mody, A., Scott-Horton, T.J., Brasington, R., Joseph, A., Reddy, V., Eisen, S., McLeod, H.L. (2008) Methotrexate (MTX) pathway gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* **35**(4), 572-9.
- Rau, T., Erney, B., Göres, R., Eschenhagen, T., Beck, J., Langer, T. (2006) High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia: impact of ABCG2 polymorphisms on plasma concentrations. *Clin Pharmacol Ther.* **80**(5), 468-76.
- Rhee, M.S. ve Schneider, E. (2005) Lack of an effect of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) overexpression on methotrexate polyglutamate export and folate accumulation in a human breast cancer cell line. *Biochem Pharmacol.* **69**(1), 123-32
- Robey, R.W., Medina-Perez, W.Y., Nishiyama, K., Lahusen, T., Miyake, K., Litman, T., ve ark. (2001). Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (MXR/BCRP/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells. *Clinical Cancer Research.* **7**: 145-152.
- Robey, R.W., Polgar, O., Deeken, J., Wah To, K., Bates S.E. (2007) ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis Rev.* **26**: 39-57.
- Ross, D.D., Karp, J.E., Chen, T.T., Doyle, L.A. (2000) Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood.* **96**(1), 365-8.

- Sandusky, G.E., Mintze, K.S., Pratt, S.E., Dantzig, A.H. (2002) Expression of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) in normal human tissues and carcinomas using tissue microarrays. *Histopathology*. **41**(1), 65-74.
- Sasaki, M., Suzuki, H., Aoki, J., Ito, K., Meier, P.J., Sugiyama, Y. (2004) Prediction of in vivo biliary clearance from the in vitro transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II monolayer expressing both rat organic anion transporting polypeptide 4 and multidrug resistance associated protein 2. *Mol Pharmacol*. **66**(3), 450-9
- Sasaki, M., Suzuki, H., Ito, K., Abe, T., Sugiyama, Y. (2002) Transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II cell monolayer expressing both human organic anion-transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2). *J Biol Chem*. **277**(8), 6497-503
- Saubrey, A., Sell, W., Steinbach, D., Voigt, A., Zintl, F. (2002) Expression of the BCRP gene (ABCG2/MXR/ABCP) in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. **118**(1), 147-50.
- Scharenberg, C.W., Harkey, M.A., Torok-Storb, B. (2002) The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*. **99**(2), 507-12
- Schaub, T.P., Kartenbeck, J., König, J., Vogel, O., Witzgall, R., Kriz, W., Keppler, D. (1997) Expression of the conjugate export pump encoded by the mrp2 gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. *J Am Soc Nephrol*. **8**(8), 1213-21.
- Scheffer, G.L., Maliepaard, M., Pijnenborg, A.C., van Gastelen, M.A., de Jong, M.C., Schroeijers, A.B., van der Kolk, D.M., Allen, J.D., Ross, D.D., van der Valk, P., Dalton, W.S., Schellens, J.H., Scheper, R.J. (2000) Breast cancer resistance protein is localized at the plasma membrane in mitoxantrone- and topotecan-resistant cell lines. *Cancer Res*. **60**(10), 2589-93
- Schellens, J.H., Maliepaard, M., Scheper, R.J., Scheffer, G.L., Jonker, J.W., Smit, J.W., Beijnen, J.H., Schinkel, A.H. (2000) Transport of topoisomerase I inhibitors by the

- breast cancer resistance protein. Potential clinical implications. *Ann N Y Acad Sci.* 922, 188-94
- Schinkel, A.H., Wagenaar, E., Mol, C.A., van Deemter, L. (1996) P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest.* **97**(11), 2517-24.
- Schinkel, A.H., Mayer, U., Wagenaar, E., Mol, C.A., van Deemter, L., Smit, J.J., van der Valk, M.A., Voordouw, A.C., Spits, H., van Tellingen, O., Zijlmans, J.M., Fibbe, W.E., Borst, P. (1997) Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(8); 4028-33
- Schinkel, A.H. ve Jonker, J.W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev.* **55**(1), 3-29.
- Schuetz, E.G., Furuya, K.N., Schuetz, J.D. (1995) Interindividual variation in expression of P-glycoprotein in normal human liver and secondary hepatic neoplasms. *J Pharmacol Exp Ther.* **275**(2), 1011-8
- Smeland, E., Bremnes, R.M., Andersen, A., Jaeger, R., Eide, T.J., Huseby, N.E., Aarbakke, J. (1994) Renal and hepatic toxicity after high-dose 7-hydroxymethotrexate in the rat. *Cancer Chemother Pharmacol.* **34**(2), 119-24
- Sparreboom, A., Gelderblom, H., Marsh, S., Ahluwalia, R., Obach, R., Principe, P., Twelves, C., Verweij, J., McLeod, H.L. (2004) Diflomotecan pharmacokinetics in relation to ABCG2 421C>A genotype. *Clin Pharmacol Ther.* **76**(1), 38-44
- Staud, F. ve Pavcek, P. (2005) Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Int J Biochem Cell Biol.* **37**(4), 720-5
- Stavrovskaya, A.A. ve Stromskaya, T.P. (2008). Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc).* **73**(5), 592-604.
- Steinbach, D., Sell, W., Voigt, A., Hermann, J., Zintl, F., Sauerbrey, A. (2002) BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia.* **16**(8), 1443-7

- Sugie, M., Asakura, E., Zhao, Y.L., Torita, S., Nadai, M., Baba, K., Kitaichi, K., Takagi, K., Takagi, K., Hasegawa, T. (2004) Possible involvement of the drug transporters P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein Mrp2 in disposition of azithromycin. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**(3), 809-14
- Suzuki, H. ve Sugiyama, Y. (1998) Excretion of GSSG and glutathione conjugates mediated by MRP1 and cMOAT/MRP2. *Semin Liver Dis.* **18**(4), 359-76
- Suzuki, H. ve Sugiyama, Y. (2002) Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition. *Adv Drug Deliv Rev.* **54**(10), 1311-31
- Szakács, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C., Gottesman, M.M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* **5**(3), 219-34.
- Szakács, G., Váradi, A., Ozvegy-Laczka, C., Sarkadi, B. (2008) The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today.* **13**(9-10), 379-93
- Takenaka, K., Morgan, J.A., Scheffer, G.L., Adachi, M., Stewart, C.F., Sun, D., Leggas, M., Ejendal, K.F., Hrycyna, C.A., Schuetz, J.D. (2007) Substrate overlap between Mrp4 and Abcg2/Bcrp affects purine analogue drug cytotoxicity and tissue distribution. *Cancer Res.* **67**(14), 6965-72.
- Tian, X., Li, J., Zamek-Gliszczynski, M.J., Bridges, A.S., Zhang, P., Patel, N.J., Raub, T.J., Pollack, G.M., Brouwer, K.L. (2007) Roles of P-glycoprotein, Bcrp, and Mrp2 in biliary excretion of spiramycin in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**(9). 3230-4.
- Toffoli, G., Cecchin, E., Corona, G., Boiocchi, M. (2003) Pharmacogenetics of irinotecan. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* **3**(3), 225-37
- Toyoda, Y., Hagiya, Y., Adachi, T., Hoshijima, K., Kuo, M.T., Ishikawa, T. (2008) MRP class of human ATP binding cassette (ABC) transporters: historical background and new research directions. *Xenobiotica.* **38**(7-8), 833-62.

- Tranquilli, W.J., Paul, A.J., Seward, R.L., Todd, K.S., Dipietro, J.A. (1987) Response to physostigmine administration in collie dogs exhibiting ivermectin toxicosis. *J Vet Pharmacol Ther.* **10**(1), 96-100
- Uggla, B., Ståhl, E., Wågsäter, D., Paul, C., Karlsson, M.G., Sirsjö, A., Tidefelt, U. (2005) BCRP mRNA expression v. clinical outcome in 40 adult AML patients. *Leuk Res.* **29**(2), 141-6.
- van der Kolk, D.M., Vellenga, E., Scheffer, G.L., Müller, M., Bates, S.E., Scheper, R.J., de Vries, E.G. (2002) Expression and activity of breast cancer resistance protein (BCRP) in de novo and relapsed acute myeloid leukemia. *Blood.* **99**(10), 3763-70
- van der Pol, M.A., Broxterman, H.J., Pater, J.M., Feller, N., van der Maas, M., Weijers, G.W., Scheffer, G.L., Allen, J.D., Scheper, R.J., van Loevezijn, A., Ossenkoppele, G.J., Schuurhuis, G.J. (2003) Function of the ABC transporters, P-glycoprotein, multidrug resistance protein and breast cancer resistance protein, in minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* **88**(2), 134-47.
- van Herwaarden, A.E. ve Schinkel, A.H. (2006) The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. *Trends Pharmacol Sci.* **27**(1), 10-6
- van Herwaarden, A.E., Wagenaar, E., Merino, G., Jonker, J.W., Rosing, H., Beijnen, J.H., Schinkel, A.H. (2007) Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Mol Cell Biol.* **27**(4), 1247-53
- van Tellingen, O., van der Woude, H.R., Beijnen, J.H., van Beers, C.J., Nooyen, W.J. (1989) Stable and sensitive method for the simultaneous determination of N5-methyltetrahydrofolate, leucovorin, methotrexate and 7-hydroxymethotrexate in biological fluids. *J Chromatogr.* **488**(2), 379-88.
- Váradi, A., Tusnády, G.E., Bakos, E., Sarkadi, B. (1998) Membrane topology of the human multidrug resistance-associated protein (MRP) and its homologs. *Cytotechnology.* **27**(1-3), 71-9.
- Vlaming, M.L., Mohrmann, K., Wagenaar, E., de Waart, D.R., Elferink, R.P., Lagas, J.S., van Tellingen, O., Vainchtein, L.D., Rosing, H., Beijnen, J.H., Schellens, J.H.,

- Schinkel, A.H. (2006) Carcinogen and anticancer drug transport by Mrp2 in vivo: studies using Mrp2 (Abcc2) knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther.* **318**(1), 319-27
- Vlaming, M.L., Lagas, J.S., Schinkel, A.H. (2009) Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice. *Adv Drug Deliv Rev.* **61**(1), 14-25
- Volk, E.L., Farley, K.M., Wu, Y., Li, F., Robey, R.W., Schneider, E. (2002) Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res.* **62**(17), 5035-40
- Wang, E.J., Casciano, C.N., Clement, R.P., Johnson, W.W. (2000) In vitro flow cytometry method to quantitatively assess inhibitors of P-glycoprotein. *Drug Metab Dispos.* **28**(5), 522-8.
- Wang, E.J. ve Johnson, W.W. (2003) The farnesyl protein transferase inhibitor lonafarnib (SCH66336) is an inhibitor of multidrug resistance proteins 1 and 2. *Chemotherapy.* **49**(6), 303-8
- Wang, X., Furukawa, T., Nitanda, T., Okamoto, M., Sugimoto, Y., Akiyama, S., Baba, M. (2003) Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Mol Pharmacol.* **63**(1), 65-72.
- Wang, X., Nitanda, T., Shi, M., Okamoto, M., Furukawa, T., Sugimoto, Y., Akiyama, S., Baba, M. (2004) Induction of cellular resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors by the wild-type breast cancer resistance protein. *Biochem Pharmacol.* **68**(7), 1363-70
- Weiss, J., Rose, J., Storch, C.H., Ketabi-Kiyanvash, N., Sauer, A., Haefeli, W.E., Efferth, T. (2007) Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs. *J Antimicrob Chemother.* **59**(2), 238-45
- Widemann, B.C., Balis, F.M., Kempf-Bielack, B., Bielack, S., Pratt, C.B., Ferrari, S., Bacci, G., Craft, A.W., Adamson, P.C. (2004) High-dose methotrexate-induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma. *Cancer.* **100**(10), 2222-32

- Widemann, B.C. ve Adamson, P.C. (2006) Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist*. **11**(6), 694-703
- Wielinga, P., Hooijberg, J.H., Gunnarsdottir, S., Kathmann, I., Reid, G., Zelcer, N., van der Born, K., de Haas, M., van der Heijden, I., Kaspers, G., Wijnholds, J., Jansen, G., Peters, G., Borst, P. (2005) The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. *Cancer Res*. **65**(10), 4425-30
- Wijnholds, J., Evers, R., van Leusden, M.R., Mol, C.A., Zaman, G.J., Mayer, U., Beijnen, J.H., van der Valk, M., Krimpenfort, P., Borst, P. (1997) Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. *Nat Med*. **3**(11), 1275-9.
- Woehlecke, H., Osada, H., Herrmann, A., Lage, H. (2003) Reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by tryprostatin A. *Int J Cancer*. **107**(5), 721-8
- Xia, C.Q., Milton, M.N., Gan, L.S. (2007) Evaluation of drug-transporter interactions using in vitro and in vivo models. *Curr Drug Metab*. **8**(4), 341-63.
- Yamasaki, Y., Ieiri, I., Kusuhara, H., Sasaki, T., Kimura, M., Tabuchi, H., Ando, Y., Irie, S., Ware, J., Nakai, Y., Higuchi, S., Sugiyama, Y. (2008) Pharmacogenetic characterization of sulfasalazine disposition based on NAT2 and ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms in humans. *Clin Pharmacol Ther*. **84**(1), 95-103.
- Yang, C.H., Chen, Y.C., Kuo, M.L. (2003) Novobiocin sensitizes BCRP/MXR/ABCP overexpressing topotecan-resistant human breast carcinoma cells to topotecan and mitoxantrone. *Anticancer Res*. **23**(3B), 2519-23.
- Yoh, K., Ishii, G., Yokose, T., Minegishi, Y., Tsuta, K., Goto, K., Nishiwaki, Y., Kodama, T., Suga, M., Ochiai, A. (2004) Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. **10**(5), 1691-7.
- Yoshikawa, M., Ikegami, Y., Hayasaka, S., Ishii, K., Ito, A., Sano, K., Suzuki, T., Togawa, T., Yoshida, H., Soda, H., Oka, M., Kohno, S., Sawada, S., Ishikawa, T.,

- Tanabe, S. (2004) Novel camptothecin analogues that circumvent ABCG2-associated drug resistance in human tumor cells. *Int J Cancer*. **110**(6), 921-
- Zamber, C.P., Lamba, J.K., Yasuda, K., Farnum, J., Thummel, K., Schuetz, J.D., Schuetz, E.G. (2003) Natural allelic variants of breast cancer resistance protein (BCRP) and their relationship to BCRP expression in human intestine. *Pharmacogenetics*. **13**(1), 19-28.
- Zamek-Gliszczyński, M.J., Nezasa, K., Tian, X., Kalvass, J.C., Patel, N.J., Raub, T.J., Brouwer, K.L. (2006) The important role of Bcrp (Abcg2) in the biliary excretion of sulfate and glucuronide metabolites of acetaminophen, 4-methylumbelliferone, and harmol in mice. *Mol Pharmacol*. **70**(6), 2127-33
- Zelcer, N., Huisman, M.T., Reid, G., Wielinga, P., Breedveld, P., Kuil, A., Knipscheer, P., Schellens, J.H., Schinkel, A.H., Borst, P. (2003) Evidence for two interacting ligand binding sites in human multidrug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2). *J Biol Chem*. **278**(26), 23538-44
- Zeng, H., Chen, Z.S., Belinsky, M.G., Rea, P.A., Kruh, G.D. (2001) Transport of methotrexate (MTX) and folates by multidrug resistance protein (MRP) 3 and MRP1: effect of polyglutamylation on MTX transport. *Cancer Res*. **61**(19), 7225-32
- Zhang, S., Yang, X., Coburn, R.A., Morris, M.E. (2005) Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships for the flavonoid-mediated inhibition of breast cancer resistance protein. *Biochem Pharmacol*. **70**(4), 627-39
- Zhang, W., Yu, B.N., He, Y.J., Fan, L., Li, Q., Liu, Z.Q., Wang, A., Liu, Y.L., Tan, Z.R., Fen-Jiang, Huang, Y.F., Zhou, H.H. (2006) Role of BCRP 421C>A polymorphism on rosuvastatin pharmacokinetics in healthy Chinese males. *Clin Chim Acta*. **373**(1-2), 99-103
- Zhang, Y., Bachmeier, C., Miller, D.W. (2003) In vitro and in vivo models for assessing drug efflux transporter activity. *Adv Drug Deliv Rev*. **55**(1), 31-51.
- Zhang, Y., Gupta, A., Wang, H., Zhou, L., Vethanayagam, R.R., Unadkat, J.D., Mao, Q. (2005) BCRP transports dipyrindamole and is inhibited by calcium channel blockers. *Pharm Res*. **22**(12), 2023-34

- Zheleznova, E.E., Markham, P.N., Neyfakh, A.A., Brennan, R.G. (1999) Structural basis of multidrug recognition by BmrR, a transcription activator of a multidrug transporter. *Cell*. **96**(3), 353-62.
- Zhou, S., Zong, Y., Lu, T., Sorrentino, B.P. (2003) Hematopoietic cells from mice that are deficient in both Bcrp1/Abcg2 and Mdr1a/1b develop normally but are sensitized to mitoxantrone. *Biotechniques*. **35**(6), 1248-52
- Zhou, S., Zong, Y., Ney, P.A., Nair, G., Stewart, C.F., Sorrentino, B.P. (2005) Increased expression of the Abcg2 transporter during erythroid maturation plays a role in decreasing cellular protoporphyrin IX levels. *Blood*. **105**(6), 2571-6
- Zurita, A.J., Diestra, J.E., Condom, E., García Del Muro, X., Scheffe, G.L., Scheper, R.J., Pérez, J., Germà-Lluch, J.R., Izquierdo, M.A. (2003) Lung resistance-related protein as a predictor of clinical outcome in advanced testicular germ-cell tumours. *Br J Cancer*. **88**(6), 879-86.

ETİK KURUL KARARI

Dierexperimentencommissie NKI
 Plesmanlaan 121
 1066 CX AMSTERDAM
 020-512.1904
DEC@nki.nl



Ir. M.L.H. Vlaming

13 september 2006
 04053_060913_VRA

Onderzoeksproject: Mrp2 and compound transporter knockout mice; physiological and pharmacological analysis
DEC-nummer: 04.053
Advies: positief

Uw onderzoeksplan "Mrp2 and compound transporter knockout mice; physiological and pharmacological analysis" is in de DEC-vergadering van 6 september 2006 behandeld.

Voor het B19-deel "Determination of drug pharmacokinetics and tissue distribution of the anticancer drug methotrexate in Mrp2 compound transporter knockout mice after oral and intravenous administration" heeft de DEC een positief advies uitgebracht.

Voorwaarden:

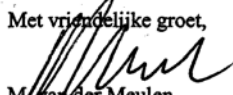
- 1.4.: het secretariaat zal het antwoord wijzigen in "1 jaar" daar bij deze vraag de duur van het totale experiment wordt bedoeld.
- 2.: alvorens Z. Pala met dieren mag werken, dient hij/zij eerst contact op te nemen met de Proefdierdeskundige om eventuele mogelijkheden te bespreken.
- 5.1.: het secretariaat zal in de 3^e regel "both transporters" wijzigen in "all three transporters".
- 5.2.: het secretariaat zal in de 4^e regel de laatste stamlijn wijzigen in "Bcrp1;Mrp3".

Voor het B20-deel "Analysis of the excretion of methotrexate in Mrp2 and compound transporter knockout mice" heeft de DEC een positief advies uitgebracht.

Voorwaarden:

- 1.4.: het secretariaat zal het antwoord wijzigen in "1 jaar" daar bij deze vraag de duur van het totale experiment wordt bedoeld.
- 2.: alvorens Z. Pala met dieren mag werken, dient hij/zij eerst contact op te nemen met de Proefdierdeskundige om eventuele mogelijkheden te bespreken.
- 5.2.: het secretariaat zal in de 8^{ste} regel de laatste stamlijn wijzigen in "Bcrp1;Mrp3".

Met vriendelijke groet,


 M. van der Meulen
 secretaris DEC/NKI
DEC@nki.nl

Een positief advies voor de uitvoering van dierproeven (B-delen) heeft een maximale geldigheid van een jaar. Indien een jaar na datum afgifte van een positief advies dieren in proef genomen worden dient u vooraf een hernieuwde aanvraag in te dienen bij de DEC.

Iedere wijziging in de uitvoering van een dierproef dient vooraf aan de secretaris van de DEC gemeld te worden. Wijziging in uitvoering kan pas doorgevoerd worden nadat toestemming van de DEC verkregen is.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Zeliha	Soyadı	Pala
Doğ.Yeri	İzmir	Doğ.Tar.	09.03.1980
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	15170440686
Email	Zeliha_pala@yahoo.com	Tel	0 535 2751561

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2009
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2004
Lisans	İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	2001
Lise	İzmir Kız Lisesi	1997

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Üniv. Eczacılık Fakültesi	2002-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	65	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi