T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KOYUNLARDA MONEPANTELİN SÜTLE ATILIMINDA BCRP (ABCG2)'NİN ROLÜ VE BAZI İZOFLAVONOİD BİLEŞİKLERİYLE OLASI ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ

YİĞİT GÜNEŞ

DANIŞMAN
PROF. DR. OYA ÜSTÜNER

II. DANIŞMAN
PROF. DR. ALPER OKYAR

FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2021

Bu çalışma 31.08.2021 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Farmakoloji ve Toksikoloji Doktora Programı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. Oya ÜSTÜNER
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji AbD.

Prof. Dr. Murat YILDIRIM
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji AbD.

Doç. Dr. Iraz AKIŞ AKAD
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi
Biyokimya AbD.

Prof. Dr. Gülden Zehra OMURTAG
İstanbul Medipol Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji AbD.

Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU
Fırat Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji AbD.

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 çalışmasıyla 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.

Yiğit GÜNEŞ

İTHAF

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan anneme ve babama ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, akademik gelişimime büyük katkısı olan danışman hocam Prof. Dr. Oya ÜSTÜNER'e,

Bilgi ve tecrübelerini paylaşarak her zaman destek olan ikinci danışman hocam Prof. Dr. Alper OKYAR'a,

Doktora eğitimim süresince her zaman büyük desteklerini gördüğüm başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Tülay BAKIREL olmak üzere, Prof. Dr. Murat YILDIRIM, Doç. Dr. Fulya ÜSTÜN ALKAN, Dr. Öğr. Üyesi Ceren ANLAŞ, Araş. Gör. Dr. Ataman Bilge SARI ve Kerem GÜZELAYDIN'a,

İspanya Leon Üniversitesi Veteriner Fakültesi ve Hayvan Sağlığı Enstitüsü (INDEGSAL) araştırma laboratuvarlarında bana çalışma fırsatı veren, bilimsel gelişimime önemli katkılar sağlayan Biyomedikal Bilimler Bölümü Fizyoloji Öğretim Üyesi Dr. Gracia MERINO'ya,

Macaristan Szeged Solvo Biyoteknoloji laboratuvarlarında bana çalışma imkanı sunarak ATPaz aktivite deneyi ve veziküler taşınma inhibisyon deneylerini öğrenmeme yardımcı olan araştırmacılar Dr. Peter KRAJCSI, Dr. Emese KIS ve Zsolt FEKETE'ye,

Hayvan bakslarının dizaynı, rasyonların formülasyonu ve temin edilmesinde yardımları olan hocalarım Prof. Dr. Serhat ALKAN, Prof. Dr. Ömür KOÇAK ve Prof. Dr. İsmail ABAŞ'a,

Doktoramın hayvan deneyi aşamasının ilk gününde ve devamında yoğun numune alma sürecinde yardım eden, adlarını özür dileyerek burada sayamadığım tüm meslektaşlarıma, öğrenci arkadaşlarıma ve hayvan bakıcılarına,

Farmakokinetik ve istatistiksel hesaplamalarda yardımları olan Araş. Gör. Dr. Dilek ÖZTÜRK'e,

Doktoram süresince dostluklarıyla yanımda olan Ece CANAVAR, Duygu ÇAVUŞOĞLU, Busem DENİZMEN ŞEKERCİ ve Osman Can ARSLAN'a,

Her zaman yanımda olarak beni destekleyen canım ailem Günsel, Baycan, Ahmet Gencehan, Esat Tolgahan, Dilek ve Serra GÜNEŞ'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30481

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ X
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ XV
ÖZET ..... XVİİ
ABSTRACT ..... XVİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. ABC (ATP-binding cassette) Taşıyıcı Proteinleri 4
2.1.1. Vücutta Bulunan Önemli Bariyerler ve Taşıyıcılar 8
2.1.1.1. Kan-Beyin Bariyeri 8
2.1.1.2. Bağırsak Bariyeri 9
2.1.1.3. Karaciğer Bariyeri 10
2.1.1.4. Böbrek Bariyeri 11
2.1.1.5. Kan-Süt Bariyeri ve İlaçların Süte Geçişinde ABC Taşıyıcılarının Rolü 12
2.2. P-glikoprotein (MDR1, ABCB1) 16
2.2.1. P-gp'nin Vücut Bariyerlerinde Varlığı ve Farmakolojik Fonksiyonları 17
2.3. Meme Kanseri Direnç Proteini (BCRP, ABCG2) 20
2.3.1. BCRP'nin Moleküler Yapısı 20
2.3.2. BCRP'nin Dokulardaki Ekspresyonu ve Fonksiyonu 21
2.3.3. BCRP Substratları ve İnhibitörleri 22
2.3.4. BCRP'nin İlaç Farmakokinetiğindeki Rolü ve ABCG2 (Knockout) Geni Silinmiş Farelerde Yapılan Çalışmalar 27
2.3.4.1. BCRP'nin İlaç Absorpsiyonundaki Rolü 28
2.3.4.2. BCRP'nin İlaç Dağılımındaki Rolü 28
2.3.4.3. BCRP'nin İlaç Atılımındaki Rolü 29
2.3.4.4. BCRP'nin Süte İlaçların Geçişinde Rolü 29

2.4. Ruminantlarda ABC Taşıyıcı Proteinlerinin Önemi 31
2.4.1. Ruminantlarda İn Vitro İlaç-İlaç Etkileşimlerinin Değerlendirilmesi 31
2.4.2. Ruminantlarda İn vivo İlaç-İlaç Etkileşimlerinin Değerlendirilmesi 33
2.5. ABC Taşıyıcı Proteinlerinin İlaç Etkileşimlerindeki Rolünün İncelenmesinde Kullanılan *İn Vitro* Membran Bazlı Deneyler 37
2.5.1. ATPaz Aktivite Deneyleri (ATPase Activity Assays) 37
2.5.2. Veziküler Taşınma Deneyi (Vesicular Transport Assay) 40
2.6. ABC Taşıyıcı Proteinlerinin İlaç Etkileşimlerindeki Rolünün İncelenmesinde Kullanılan *İn vitro* Hücre Bazlı Deneyler 43
2.6.1. Sitotoksisite Deneyleri (Cytotoxicty Experiments) 43
2.6.2. Transsellüler (Vektörel) Taşınma Deneyi (Transcellular Transport Assay) 43
2.6.3. Akümülasyon Deneyleri (Accumulation Assays) 45
2.7. ABC Taşıyıcı Proteinlerinin İlaç Etkileşimlerindeki Rolünün İncelenmesinde Kullanılan *İn Vivo* Deneyler 46
2.8. Flavonoidler 48
2.8.1. İzoflavonoidler 51
2.8.2. BCRP İnhibitörleri Olarak Gösterilen İzoflavonlarla Yapılan Çalışmalar 54
2.9. Monepantel (MNP, AAT 1566) 57
2.9.1. Etki Mekanizması 57
2.9.2. Monepantel ile İlgili Yapılan Farmakokinetik Çalışmalar 58
2.9.2.1. Monepantel Metabolizması 61
2.9.3. Monepantele Karşı Gelişen Direnç 62
2.9.4. Toksisitesi ve Dozu 63
2.9.5. Endikasyonu 63
2.9.6. Rezidü 64
3. GEREÇ VE YÖNTEM 65
3.1. Gereç 65
3.1.1. Kimyasallar 65
3.1.2. Ekipman ve Cihazlar 66
3.2. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu 68
3.2.1. Stok ve Çalışma Standart Çözeltilerinin Hazırlanması 68
3.2.2. Mobil Fazın Optimizasyonu 68
3.2.3. Ekstraksiyon Yönteminin Optimizasyonu 68

3.2.4. Yöntemin Validasyonu 69
3.3. Monepantelin Farmakokinetiği 70
3.3.1. Hayvan Materyali 70
3.3.2. Hayvanların Gruplandırılması, Beslenmesi ve İlaç Uygulaması 70
3.3.3. Plazma ve Süt Örneklerinin Analizi 72
3.3.4.Farmakokinetik Parametrelerin Hesaplanması ve İstatistiksel Değerlendirme 73
3.4. Hayvanlara Verilen Yem Maddelerindeki Genistein ve Daidzein İdentifikasyonu 74
3.5. Monepantel ve Monepantel Sülfonun BCRP Membran Bazlı Deney Sisteminde Analizi 76
3.5.1. ATPaz Aktivite Deneyleri 76
3.5.1.1. ATPaz Deney Yöntemi 78
3.5.1.2. Hesaplamalar 82
3.5.2. Veziküler Taşınma İnhibisyon Deneyleri 83
3.5.2.1. VT İnhibisyon Deney Yöntemi 85
3.5.2.2. Hesaplamalar 86
3.6. BCRP'nin Meme Bezindeki Ekspresyonlarının Western Blot ile Değerlendirilmesi 88
3.6.1. Koyunların Meme Dokusundan Biyopsi Örneği Alınması 88
3.6.2. Meme Bezi Dokusundan Protein İzolasyonu 88
3.6.3. Western Blotlama 88
4. BULGULAR 91
4.1. Plazma ve Süt HPLC Metodu Validasyon Sonuçları 91
4.1.1. Plazma HPLC Metodu Validasyon Sonuçları 91
4.1.2. Süt HPLC Metodu Validasyon Sonuçları 94
4.2. Plazma ve Süt Monepantel Farmakokinetiği 97
4.3. Yem Genistein ve Daidzein Düzeylerinin LC-MS/MS İle Belirlenmesi 102
4.4. BCRP ATPaz Aktivite ve Veziküler Taşınma İnhibisyon Deneyleri Sonuçları 105
4.5. BCRP'nin Meme Bezinde Ekspresyonlarının Western Blot Deney Sonuçları 109
5. TARTIŞMA 110
5.1. Sonuç ve Çıkarımlar 121
KAYNAKLAR 123
ETİK KURUL KARARI 158

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....159
ÖZGEÇMİŞ.....160

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: ABC ailesinde bulunan başlıca taşıyıcı proteinler ve bulundukları dokular... 5
Tablo 2-2: Bazı BCRP Substratları ile Flavonoidlerin *In Vivo* Etkileşimleri 24
Tablo 2-3: Başlıca BCRP Substratları ve İnhibitörleri 26
Tablo 2-4: Ruminantlarda farklı makrosiklik laktonların in vivo biyoyararlanımı üzerine P-gp modülasyonunun etkisi 35
Tablo 2-5: Farklı membran bazlı ABC taşıyıcı deneylerinin özeti 42
Tablo 2-6: MNP ve $MNPSO_2$'nin farklı uygulama yolu ve dozlarda uygulanması sonrası elde edilen farmakokinetik parametreler 60
Tablo 2-7: Farklı cinsiyet ve ırktaki koyunlar arasında MNP'nin 2,5 mg/kg farmakokinetik parametreleri 60
Tablo 2-8: Monepantelin insan gıdası olarak tüketilen koyun ve keçi dokularında maksimum kabul edilebilir rezidü düzeyleri 64
Tablo 3-1: Plazma ve sütten monepantel ve monepantel sülfon belirlenmesi için geliştirilen HPLC metodundaki kromatografik koşullar ve çalışmada kullanılan malzemeler 69
Tablo 3-2: Hayvanların gruplandırılması 71
Tablo 3-3: Yemlerin kompozisyonu 72
Tablo 3-4: VT inhibisyon analizlerinde kullanılan stok solüsyonların içerik ve miktarları 83
Tablo 3-5: VT inhibisyon analizlerinde kullanılan tamponların içerik ve miktarları 84
Tablo 3-6: VT inhibisyon analizleri için deney koşulları 84
Tablo 3-7: Jel elektroforez ve transfer aşamasında kullanılan solüsyonların içerikleri ve miktarları 89
Tablo 4-1: Plazma monepantel ve monepantel sülfon tayininde kullanılan HPLC metodunun validasyon verileri 91
Tablo 4-2: Süt monepantel ve monepantel sülfon tayininde kullanılan HPLC metodunun validasyon verileri 94
Tablo 4-3: Üç deney grubunda monepantelin (2,5 mg/kg) oral uygulamasından sonra elde edilen monepantel ve monepantel sülfon plazma ve süt farmakokinetik parametreleri 100
Tablo 4-4: MNP ve $MNPSO_2$ ATPaz ve VT inhibisyon deneylerinde elde edilen EC50 ve IC50 değerleri 106

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: ABC taşıyıcı proteinlerin transmembranal gösterimi..... 6
Şekil 2-2: ABC taşıyıcılarının moleküler mekanizmasının şematik gösterimi..... 7
Şekil 2-3: Kan-beyin bariyerinde ABC taşıyıcı proteinlerinin yerleşimi..... 8
Şekil 2-4: Bağırsak bariyerinde ABC taşıyıcı proteinlerinin yerleşimi 9
Şekil 2-5: Karaciğer bariyerinde ABC taşıyıcı proteinlerinin yerleşimi..... 10
Şekil 2-6: Böbrek bariyerinde ABC taşıyıcı proteinlerinin yerleşimi..... 11
Şekil 2-7: Kan-süt bariyeri..... 12
Şekil 2-8: Veteriner hekimlikte kullanılan bazı ilaçların süte geçişinde meme kanseri direnç proteininin (BCRP) rolü..... 14
Şekil 2-9: ABC taşıyıcı proteinlerinin hücre içi lokalizasyonu 16
Şekil 2-10: Plasentada materno-fötal bariyerin fonksiyonu ve ABC ilaç efluks taşıyıcılarının lokalizasyonunun şematik gösterimi..... 18
Şekil 2-11: BCRP (ABCG2)'nin iki boyutlu (a) ve üç boyutlu (b) olarak moleküler yapısı 20
Şekil 2-12: Vücudun çeşitli organlarından BCRP (ABCG2) ekspresyonunun şematik gösterimi 21
Şekil 2-13: Bazı dokularda BCRP/ABCG2'nin yeri ve işlevi 22
Şekil 2-14: Veziküler Taşınma ve ATPaz Aktivite Deneyi 37
Şekil 2-15: Başlıca ATPaz eğrileri tipik örnekleri..... 39
Şekil 2-16: Direkt (A) ve indirekt (B) veziküler taşınma deneylerinin tipik örnekleri... 41
Şekil 2-17: Apikal olarak lokalize olmuş bir ABC taşıyıcısı tarafından transselüler taşınma modeli..... 44
Şekil 2-18: Flavonoid ve İzoflavonoid Kimyasal Yapıları 48
Şekil 2-19: Genistein ve daidzein kimyasal yapısı 49
Şekil 2-20: Bağırsak ve karaciğerde flavonoidler (F) ve metabolitleri (M, flavonoid konjugatı) için başlıca dağılım ve metabolizma yolları..... 51
Şekil 2-21: İzoflavon glikozitlerin kimyasal yapısı 52
Şekil 2-22: Monepantel kimyasal yapısı..... 57
Şekil 3-1: Soyadaki izoflavonların ekstraksiyon metodu akış şeması 74
Şekil 3-2: Aktivasyon ve inhibisyon çalışması için düzenlenen mikroplakanın tasarımı ve SB-BCRP-M ATPaz aktivite deneyi sonrası mikroplakanın görünümü 77

Şekil 3-3: SB-BCRP-M ATPaz deneylerinde membran solüsyonlarının hazırlanması akış şeması..... 81
Şekil 3-4: VT inhibisyon analizinde mikroplakada ATP - AMP eklenen kolonların gösterimi (solda) ve vakum pompa sistemi ile filtre plakasının gösterimi (sağda) 86
Şekil 4-1: Monepantel ve monepantel sülfon plazma standartlarının pik alanı-konsantrasyon kalibrasyon eğrileri. 92
Şekil 4-2: (A) Koyun boş plazma örneklerinin ekstraksiyonu ve HPLC sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram. (B) Koyun plazmasına spike edilen MNP ve $MNPSO_2$ standardına ait kromatogram. 93
Şekil 4-3: Monepantel ve monepantel sülfon süt standartlarının pik alanı-konsantrasyon kalibrasyon eğrileri 95
Şekil 4-4: (A) Koyun boş süt örneklerinin ekstraksiyonu ve HPLC sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram. (B) Koyun sütüne spike edilen MNP ve $MNPSO_2$ standardına ait kromatogram..... 96
Şekil 4-5: Üç deney grubunda koyunlarda monepantel oral uygulamayı (2,5 mg / kg) takiben elde edilen monepantel sülfon plazma konsantrasyonları (µg /mL) ve zaman (gün) eğrileri..... 98
Şekil 4-6: Üç deney grubunda koyunlarda monepantel oral uygulamayı (2,5 mg / kg) takiben elde edilen monepantel sülfon süt konsantrasyonları (µg / mL) ve zaman (gün) eğrileri..... 99
Şekil 4-7: (A) Üç gruba oral yoldan 2,5 mg/kg MNP uygulanmasını takiben elde edilen süt $MNPSO_2$ $AUC_{0\text{-}840}$ c_{maks} t_{maks} verileri. (B) Üç gruba oral yoldan 2,5 mg/kg MNP uygulanmasını takiben elde edilen plazma $MNPSO_2$ $AUC_{0\text{-}840}$ c_{maks} t_{maks} verileri. (C) Üç gruba oral yoldan 2,5 mg/kg MNP uygulanmasını takiben elde edilen süt $MNPSO_2$ $AUC_{0\text{-}840}$ süt/plazma oranı verileri..... 101
Şekil 4-8: Daidzein ve genistein kalibrasyon eğrileri..... 102
Şekil 4-9: (A) Daidzein (RT:7,84) (B) Genistein (RT:8,02) ve (C) Atropine-d3'e (IS) (RT:8,48) ait kromatogramlar..... 103
Şekil 4-10: Buğday unu (kör matrikste) ekstraksiyonu sonucu elde edilen kromatogramlar..... 104
Şekil 4-11: Monepantel için SB-BCRP-M membranında yapılan vanadata duyarlı ATPaz aktivitesi deneyinde aktivasyon (mavi daireler) ve inhibisyon (kırmızı kareler) koşulları 107

Şekil 4-12: Monepantel sülfon için SB-BCRP-M membranında yapılan vanadata duyarlı ATPaz aktivitesi deneyinde aktivasyon (mavi daireler) ve inhibisyon (kırmızı kareler) koşuları..... 107
Şekil 4-13: BCRP-HEK293 içten dışa veziküllere ATP bağımlı E3S taşınması 108
Şekil 4-14: Koyun meme bezi membran fraksiyonlarında BCRP'nin (BXP-53) ekspresyonu ve kantifikasyonu için yapılan Western blot deneyleri..... 109

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABC: ATP bağımlı taşıyıcı (ATP-binding cassette)

BCRP/ABCG2: Meme kanseri direnç proteini

bABCG2: Bovine/Sığır ABCG2

oABCG2: Ovine/Koyun ABCG2

cABCG2: Caprine/Keçi ABCG2

P-gp/ABCB1/MDR1: P-glikoprotein

MRP: Çoklu ilaç rezistansı ilişkili protein

ATP: Adenozin trifosfat

ADP: Adenozin difosfat

P_i : İnorganik fosfat

NBD : Nükleotid bağlayan alan

TMD: Transmembranal alan

MDCK : Madin-Darby köpek böbrek epitel hücreleri

LLC-PK1: Domuz böbrek epitel hücreleri

Caco-2: İnsan kolon adenokarsinom hücreleri

KBB: Kan-beyin bariyeri

KBOSB: Kan- beyin omurilik sıvısı bariyeri

AAT: Amino-asetonitril türevleri

MNP: Monepantel

$MNPSO_2$: Monepantel sülfon

VT inhibisyon: Veziküler taşınma inhibisyon

HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

LC-MS/MS: Sıvı kromatografi tandem kütle/kütle spektrometre sistemi

AUC: Konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alan

c_{maks}: Maksimum plazma konsantrasyonu

t_{maks} : Maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşma zamanı

$t_{1/2}$: Eliminasyon yarılanma ömrü

k_{el}: Eliminasyon hız sabiti

MRL: Maksimum rezidü limiti

LOD: Tespit limiti

LOQ: Tayin limiti

% CV: % Varyasyon katsayısı

% RSD: Bağıl standart sapma

IS: İnternal standart

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

EMA: Avrupa İlaç Ajansı

APVMA: Avustralya Pestisitler ve Veteriner İlaçları Otoritesi

USDA: A.B.D. Tarım Bakanlığı

PhIP: 2-amino-1-metil-1-6-fenil-imidazol[4,5-b]piridin)

Rho123: Rhodamine 123

FTC: Fumitremorgin C

BCA: Bikinkoninik asit

PVDF: Poliviniliden florür

TBST: Tween 20 içeren tris tamponlu salin çözeltisi

TEMED: Tetrametiletilendiamin

APS: Amonyum persülfat

SDS: Sodyum dodesil sülfat

dH$_2$O: Distile su

SULT: Sülfotransferaz

UGT: Üridin difosfoglukuronozil transferaz

EC50: İstenen etkinin % 50'sini oluşturması için gerekli konsantrasyon

IC50: İstenen etkinin % 50'sini inhibe eden konsantrasyon

S/P oranı: Süt/plazma oranı

ÖZET

Güneş, Y. (2021). Koyunlarda monepantelin sütle atılımında BCRP (ABCG2)'nin rolü ve bazı izoflavonoid bileşikleriyle olası etkileşiminin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Amino-asetonitril türevi yeni bir antelmentik ilaç olan monepantel (MNP) meme kanseri direnç proteini (BCRP) substratıdır. İlaçların BCRP aracılı süte geçişi izoflavonlar ile değiştirilebilmektedir. Bu çalışmada soyada bulunan izoflavonlar ve BCRP inhibitörleri genistein ve daidzeinin süte monepantel atılımını nasıl değiştireceğini göstermeyi amaçladık. Ayrıca western blot analizleri ile laktasyondaki meme bezindeki BCRP ekspresyonunun laktasyonda olmayan koyunlara oranla önemli oranda yüksek olduğunu belirledik. BCRP ile etkileşimi belirlemede bir BCRP substratı olarak tanımlanan MNP ve $MNPSO_2$'nin bu özellikleri ATPaz ve VT inhibisyon deneyleri ile incelendi. Farmakokinetik çalışmalarda, monepantelin süte geçini üç deney grubunda gösterdik: G1 koyunlar standart yemle; G2 koyunlar soya ile zenginleştirilmiş yemle; G3 koyunlar ise oral yolla ekzojen olarak genistein ve daidzein ile birlikte standart rasyonla beslendi. MNP ve aktif metaboliti $MNPSO_2$ konsantrasyonları HPLC ile belirlendi. Ana ilaç MNP ile karşılaştırıldığında daha yüksek $MNPSO_2$ plazma konsantrasyonları saptandı. Soya ile zenginleştirilmiş rasyonla beslenen gruptaki koyunların sütünde $MNPSO_2$ konsantrasyonlarının azaldığı belirlendi. $MNPSO_2$ süt AUC (0-840 saat) kontrol grubunda 611.6 ± 31.91 μg sa/mL'ye karşılık soya ile zenginleştirilmiş diyet grubunda 497.6 ± 53.48 idi. AUC (0-840 saat) süt/plazma oranı, soya ile zenginleştirilmiş rasyon grubunda kontrol grubuna kıyasla % 40 azaldı (3,27 ± 1,13; 5,46 ± 2,23). Ayrıca MNP ve $MNPSO_2$'nin, hem ATPaz hem de VT inhibisyon deneylerinde BCRP ile etkileşime girdiği saptandı. Bu çalışma, monepantel gibi spesifik bir BCRP substratının süte atılımının rasyonda izoflavonların varlığı ile azaltılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Monepantel, koyun, kan-süt bariyeri, soya, BCRP/ABCG2

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30481

ABSTRACT

Gunes, Y. (2021). The role of BCRP (ABCG2) on the milk excretion of monepantel in sheep and the investigation of possible interaction with some isoflavonoid compounds. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Pharmacology and Toxicology. PhD Thesis. Istanbul.

Monepantel (MNP), a new anthelmintic drug from a group of amino-acetonitrile derivatives, is a substrate for breast cancer resistance protein (BCRP). BCRP-mediated milk secretion of drugs can be altered by isoflavones. In this study, we aimed to show how soy isoflavones and BCRP inhibitors genistein and daidzein can modulate the secretion of monepantel into milk. Moreover, we determined the expression of BCRP in lactating mammary gland significantly higher than in nonlactating sheep by Western blot analysis. These properties of MNP and $MNPSO_2$, which were identified as a BCRP substrate in determining the interaction with BCRP, were examined by ATPase and VT inhibition assays. In pharmacokinetic studies, we demonstrated the transport of monepantel into milk in three experimental groups: G1-ewes fed standard forage; G2-ewes fed soy-enriched forage; G3-ewes fed standard forage paired with orally administered exogenous genistein and daidzein. The concentrations of MNP and the active MNP metabolite $MNPSO_2$ were determined by HPLC. Higher plasma concentrations of $MNPSO_2$ were detected compared to parent drug MNP. It was determined that the $MNPSO_2$ concentrations in the milk of the sheep in the soy-enriched diet group were decreased. $MNPSO_2$ milk AUC (0–840 h) was 497.6 ± 53.48 in the soy-enriched diet group vs. 611.6 ± 31.91 μg h/mL in the control group. The AUC (0– 840 h) milk/plasma ratio decreased by 40% in the soy-enriched diet group, compared to the control group (3,27 ± 1,13 vs. 5,46 ± 2,23). In addition, MNP and $MNPSO_2$ were found to interact with BCRP in both the ATPase and VT inhibition assays. This study showed that milk excretion of a specific substrate of BCRP, such as monepantel, can be diminished by the presence of isoflavones in the diet.

Key Words: Monepantel, sheep, blood-milk barrier, soy, BCRP/ABCG2

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University-Cerrahpasa. Project No: 30481

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ruminantlarda paraziter enfestasyonların neden olduğu sağlık sakıncalarına karşı antelmentik ilaç kullanımının yararlılığı tartışılmaz bir sonuçtur. Buna rağmen ilaç rezidülerinin (kalıntı) süte geçişi sonucunda gıda güvenliği dolayısıyla halk sağlığı yönünden riskler oluşmaktadır (Behnke ve ark. 2008). Süte geçişi sağlayan başlıca mekanizmalar; pasif difüzyon, ABC taşıyıcı proteinleri aracılığıyla aktif taşınma ve iyon tuzağıdır. Bunun yanında diğer mekanizmalar; kolaylaştırılmış difüzyon, pinositoz ve ekzositozdur (Ito ve Alcorn 2003). ABC (ATP-binding cassette) taşıyıcı proteinleri ailesinde yer alan BCRP/ABCG2, ilaçların süte geçişinin ana faktörlerinden biridir ve bu durum sütte istenmeyen ürünlerin varlığına; süt emen yavrular ile tüketicilerin ksenotoksinlere maruz kalmasına neden olmaktadır (Jonker ve ark 2005; van Herwaarden ve Schinkel 2006; Schrickx ve Fink-Gremmels 2008).

Meme kanseri direnç proteini (breast cancer resistance protein) olarak tanımlanan BCRP/ABCG2 geniş substrat alanına sahip bir efluks (dışa atım) membran proteinidir. BCRP bağırsak, karaciğer ve diğer organlardaki birçok toksik unsurun hücrelerden dışarı çıkışını sağlamakta ve böylece birçok bileşiğin biyoyararlanımını etkileyerek ilaç-ilaç etkileşimlerine neden olmaktadır (Szakacs ve ark. 2006). BCRP, laktasyon süresince inek ve koyunların özellikle meme dokularında ve kan-süt bariyerini oluşturan alveoler epitel hücrelerin apikal membranında yüksek oranda eksprese edilmektedir (Pulido ve ark. 2006). Laktasyon döneminin BCRP ekspresyonunu etkilediği; laktasyondaki hayvanların meme bezinde bulunan BCRP'nin, laktasyonda olmayanlara oranla daha yüksek seviyede olduğu gösterilmiştir (Jonker ve ark. 2005). Ayrıca BCRP'ye yapıca benzer olan birçok ABC taşıyıcı proteininin de laktasyondaki meme bezinde BCRP kadar önemli oranda eksprese edilmediği gösterilmiştir (van Herwaarden ve Schinkel 2006). Bu sonuçlar, BCRP substratı olan ilaçların süte geçişinin daha yüksek oranda olduğu görüşünü desteklemektedir (Jonker ve ark. 2005).

Etkin tedavi amacıyla ilaçların oral biyoyararlanımı ve dokulara penetrasyonunu arttırmak veya ABC taşıyıcı proteinlerin substratlarının süte geçişini azaltmak için inhibitörlerin kullanımına verilen önem giderek artış göstermektedir (Merino ve ark. 2010; Shukla ve ark. 2011). Yapılan birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmada BCRP gibi ABC taşıyıcı proteinlerinin çeşitli ilaçlarla inhibisyonunun da ilaç etkileşimlerine yol açtığı

görülmüştür. BCRP substratı ilaçların BCRP inhibitörleri ile birlikte kullanımı sonucunda substrat ilaçların biyoyararlanımının ve terapötik etkisinin arttığı; BCRP substratlarının BCRP indüktörleriyle beraber kullanımı sonucunda ise substrat ilaçların biyoyararlanımlarının ve terapötik etkilerinin zayıfladığı saptanmıştır (Kunta ve Sinko 2004).

Ruminant yemlerinde büyük oranda bulunan polifenoller ile (tanenler, gossipol, fagopirin) BCRP etkileşimini ve inhibisyonunu gösteren birçok çalışma yer almaktadır (Broderick 1995; Cooray ve ark. 2004; Zhang ve ark. 2004b). Ruminant yemlerinde bir protein kaynağı olarak kullanılan soya, bitkisel aktif unsurlar içeren izoflavonoidler yönünden zengindir (100 g soyada 100-200 mg izoflavonoid bulunmaktadır) (Broderick 1995, 2003). Soyanın sekonder metabolitleri olan ve polifenollerde yoğun miktarda bulunan izoflavonoidler ile meme bezinde bulunan BCRP'nin etkileşimi sonucunda BCRP'nin inhibe olduğu gösterilmiştir (Pulido ve ark. 2006; Perez ve ark. 2009b). Bu bilgiler doğrultusunda yapılan çalışmalarda yemlere izoflavonoidler gibi BCRP inhibitörlerinin eklenmesi ile toksinlerin süte geçmesinin önlendiği ve ilaç kalıntılarının kontrolünde yararlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu prosedürün, laktasyondaki koyunlarda ilaç arınma süresinin düşürülmesini mümkün kılabileceği beklenmektedir (Pulido ve ark. 2006).

Veteriner hekimlikte antelmentik ilacın terapötik dozlar dışında ve sıkça kullanımı, birçok geniş spektrumlu antelmentik ilaç grubuna (benzimidazoller, imidatiyazoller ve makrosiklik laktonlar) karşı dirençli parazit suşlarının gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Bu durum, çiftlik hayvanlarında helmint enfestasyonlarının etkin kontrolüne karşı ciddi bir tehdit oluşturmakta ve farklı etki mekanizmasına sahip antelmentik ilaçların sentezini zorunlu hale getirmektedir (Prichard 1994; Coles 1999; Sangster ve Gill 1999; Köhler 2001). Bu yönde yapılan çalışmalar sonucunda, ruminantlarda nematod türlerine karşı geniş spektrumuna sahip olan amino-asetonitril türevleri (AAT) sentezlenmiştir (Ducray ve ark. 2008; Kaminsky ve ark. 2008a). AAT, geniş spektrumlu antelmentik ilaçlara dirençli olan nematod suşlarına karşı aktivite gösterebilmektedir. Bu durum, nematodun nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChr) alt birimlerine bağlanan özgün ve yeni etki mekanizmasına sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Kaminsky ve ark. 2008a). Bu sınıfa ait olan monepantel (AAT 1566) günümüzde koyun ve keçilerde kullanılan oral yolla kullanılabilen bir antelmentik ilaçtır

(Kaminsky ve ark. 2008b). Laktasyondaki Jersey ineklerde yapılan farmakokinetik çalışmalara paralel olarak *in vitro* efluks çalışmalarında yeni bir antelmentik ilaç olan monepantelin sığır/bovine ABCG2 (bABCG2) substratı olduğu gösterilmiştir (Mahnke ve ark. 2016). Buna karşın, monepantelin koyun BCRP üzerindeki aktivitesine ve süte geçişinin azaltılmasına yönelik yapılan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında monepantel (MNP) ve ana metaboliti monepantel sülfonun ($MNPSO_2$) BCRP üzerindeki aktivitesinin *in vivo* ve in *vitro* yöntemlerle incelenmesi hedeflenmiştir. Çalışmamızın amaçları şu şekildedir: 1) Antelmentik bir ilaç olan MNP'nin laktasyondaki koyunlara soyalı rasyonlar ve ekzojen izoflavonoidlerle (genistein + daidzein) uygulanması sonucu plazma ve süt konsantrasyon zaman profilinin incelenmesi. 2) Laktasyondaki koyunların meme bezindeki BCRP ekspresyonunun Western blot yöntemi ile ölçülmesi ve ilaç ($MNP/MNPSO_2$) ile taşıyıcı (BCRP) arasındaki etkileşimin membran bazlı deneylerle belirlenmesi.

Koyun sütünde MNP arınma süresinin izoflavonoidlerle kısalması yönünde elde edilebilecek verilerin, ilaç rezidü sorununun doğal bileşenler ile çözümlenmesi açısından pratik bir anlam taşıyabileceğini düşünmekteyiz. Bu çalışmanın, veteriner halk sağlığı açısından günümüzde önemli bir sorun haline gelmiş olan hayvansal ürünlerdeki rezidü sorununa çözüm önerisi getirmesini hedeflemekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ABC (ATP-binding cassette) Taşıyıcı Proteinleri

ABC taşıyıcı ailesi; tüm canlı organizmalarda (bakteri, arke, ökaryot) bulunan büyük bir protein ailesidir. Bu proteinler; ilaçlar, iyonlar, metabolitler, lipitler, vitaminler ve organik bileşikler gibi birçok bileşiğin ATP hidrolizine bağımlı olarak hücre membranlarından taşınmasını sağlarlar. Yedi alt aileye ayrılmış olan ABC taşıyıcıları 40'tan fazla üyeden oluşmaktadır (Higgins 1992; Dean ve Annilo 2005; Molday 2015).

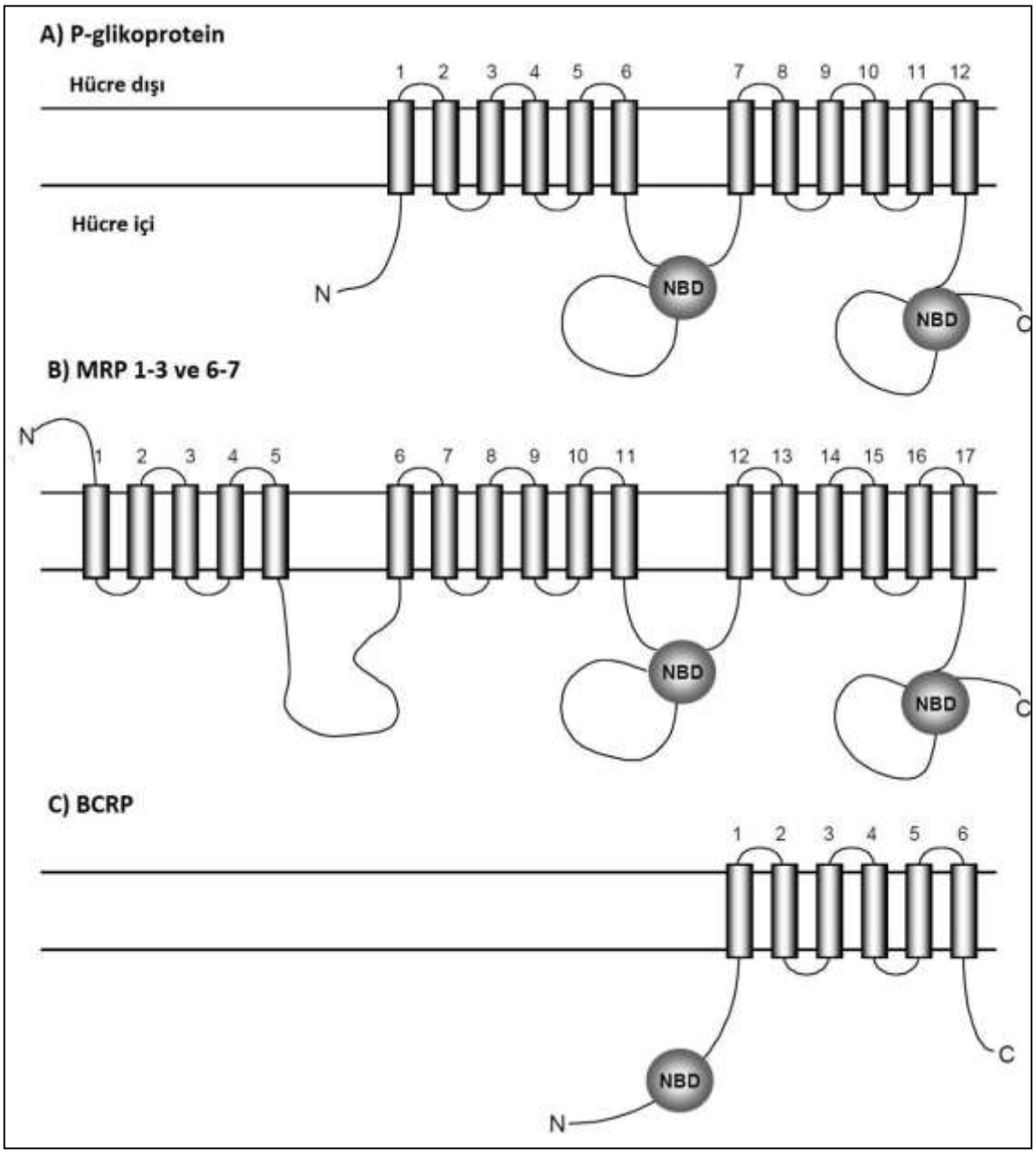
Veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılan ilaçların taşınmasından sorumlu olan en önemli ABC taşıyıcı proteinleri; MDR1 (ABCB1/P-glikoprotein), BCRP (ABCG2, Meme kanseri direnç proteini), MRP1 (ABCC1, Çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein-1) ve MRP2'dir (ABCC2, Çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein-2). Bunlar arasında hem beşeri hem de veteriner hekimlikte görülen anlamlı polimorfizmler açısından en iyi karakterize edilmiş olan üyeler ise P-glikoprotein ve BCRP'dir (Mealey 2012). ABC ailesinde bulunan başlıca taşıyıcı proteinler ve bulundukları dokular Tablo 2-1'de sunulmuştur.

ABC taşıyıcı proteinleri tarafından taşınan bileşikler "*substrat*" taşıyıcıları inhibe eden bileşikler "*inhibitör veya blokör*" olarak adlandırılmaktadır (Schinkel ve Jonker 2003). ABC taşıyıcıları, substratlarını membranların sitoplazmik kısmından ekzositoplazmik kısmına doğru taşırsa "*exporter"*; membranların ekzositoplazmik kısmından sitoplazmik kısmına doğru taşırsa "*importer"* olarak adlandırılır. Prokaryot ABC taşıyıcıları importer veya exporter olabilirken; ökaryotik ABC taşıyıcılarının çoğu exporter olarak görevlidir (Molday 2015).

ABC protein ailesini oluşturan temel yapı, nükleotid bağlayan alan (NBD, nucleotide binding domain) ve transmembranal alan (TMD, transmembranal domain) olmak üzere iki kısımdan oluşur. Memelilerde bulunan ABC proteinlerinin fonksiyonel olarak aktif olabilmesi için, iki TMD ve iki NBD olmak üzere toplam dört karakteristik alandan oluşması gerekmektedir. Bu dört alan bir polipeptit zinciri içinde bulunursa "*tam taşıyıcı*" (P-glikoprotein) iki ayrı protein içinde bulunursa "*yarım taşıyıcı*" (BCRP) olarak adlandırılır. BCRP gibi yarım taşıyıcıların taşıma fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için homodimer veya heterodimer oluşturmaları gerekir (Dean ve ark. 2001; Glavinas ve ark. 2004; Stavrovskaya ve Stromskaya 2008; Molday 2015) (Şekil 2-1).

Tablo 2-1: ABC ailesinde bulunan başlıca taşıyıcı proteinler ve bulundukları dokular - Szakacs ve ark. (2008)'den değiştirilerek

Protein adı	Proteinin büyüklüğü	Bulundukları dokular	Polarize hücre lokalizasyonu	Topoloji
ABCB1/Pgp/MDR1	1280 aa	Kan-beyin bariyeri, karaciğer, bağırsak, böbrek, plasenta, kök hücreler	Apikal	TMD1-ABC1-TMD2-ABC2
ABCB11/BSEP/SPGP	1321 aa	Karaciğer	Apikal	TMD1-ABC1-TMD2-ABC2
ABCC1/MRP1	1531 aa	Akciğer, testis, böbrek, periferik kan mononüklear hücreleri, iskelet ve kalp kası, plasenta	Bazolateral	TMD0-L0-TMD1-ABC1-TMD2-ABC2
ABCC2/MRP2	1545 aa	Kan-beyin bariyeri, karaciğer, bağırsak, böbrek, plasenta, akciğer	Apikal	TMD0-L0-TMD1-ABC1-TMD2-ABC2
ABCC3/MRP3	1527 aa	Adrenal bez, bağırsak, pankreas, safra kesesi, plasenta, karaciğer, böbrek, prostat	Bazolateral	TMD0-L0-TMD1-ABC1-TMD2-ABC2
ABCC4/MRP4	1325 aa	Ovaryum, testis, böbrek, akciğer, prostat	Apikal, bazolateral	TMD1-ABC1-TMD2-ABC2
ABCC5/MRP5	1437 aa	Karaciğer, testis, iskelet ve kalp kası, beyin	Bazolateral, apikal	TMD1-ABC1-TMD2-ABC2
ABCG2/BCRP	655 aa	Kan-beyin bariyeri, plasenta, karaciğer, bağırsak, meme, kök hücreler	Apikal	ABC-TMD, homodimer



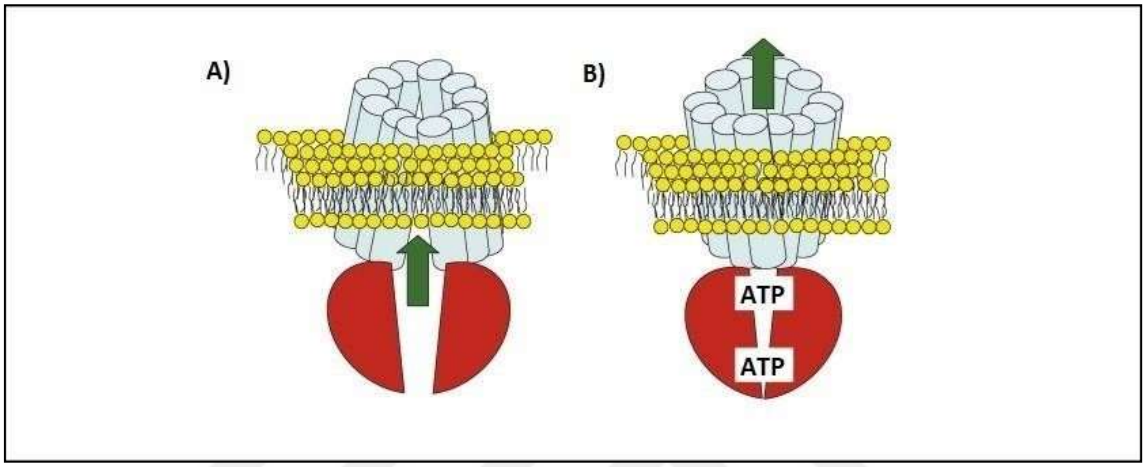
Şekil 2-1: ABC taşıyıcı proteinlerin transmembranal gösterimi. - Chan ve ark. (2004)'den değiştirilerek

A) P-gp (MDR1), MDR3, BSEP (SPgp), MRP4, MRP5, ve MRP8, 12 TMD ve 2 NBD içermektedir.

B) MRP 1-3 ve 6-7'de ek bir TMD içeren 5 adet transmembranal alan bulunmaktadır.

C) BCRP gibi yarım taşıyıcılar ise 6 TMD ve 1 NBD'ye sahiptirler.

ABC taşıyıcı proteinlerinin taşıma fonksiyonu NBD'lerin ATP'yi hidrolizi ile gerçekleşmektedir. Bu sitoplazmik alanlar, TMD'lerin hücre içi bölgelerine bağlanarak bu iki farklı alan arasındaki bağlantıyı sağlar (Glavinas ve ark. 2004). NBD'lerin sitoplazmik ATP'ye bağlanması sonucu ATP hidrolize olur ve substrat ilaçların taşınması için gerekli olan enerji sağlanır (Szakacs ve ark. 2008) (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: ABC taşıyıcılarının moleküler mekanizmasının şematik gösterimi - Szakacs ve ark. (2008)'den değiştirilerek

12 transmembranal heliks (mavi) lipit katmanında (sarı) sentral kaviteyi oluşturur.

A) Soldaki şematik gösterimde, nükleotid bağlayan alan (NBD, kırmızı) açık şekildedir. Nükleotid bağlanmamış olan bu gösterimde, transmembran heliksler transmembranal alanların içe dönük yapıda (inward-facing) olmasını sağlar.

B) Sağdaki şematik gösterimde, sitoplazmik NBD'lerin ATP'ye bağımlı şekilde gerçekleşen dimerizasyonu sonucu, TMD'ler dışa dönük (outward-facing) yapıya geçer ve sonrasında taşınan ligandın ok yönünde ayrılmasına neden olur.

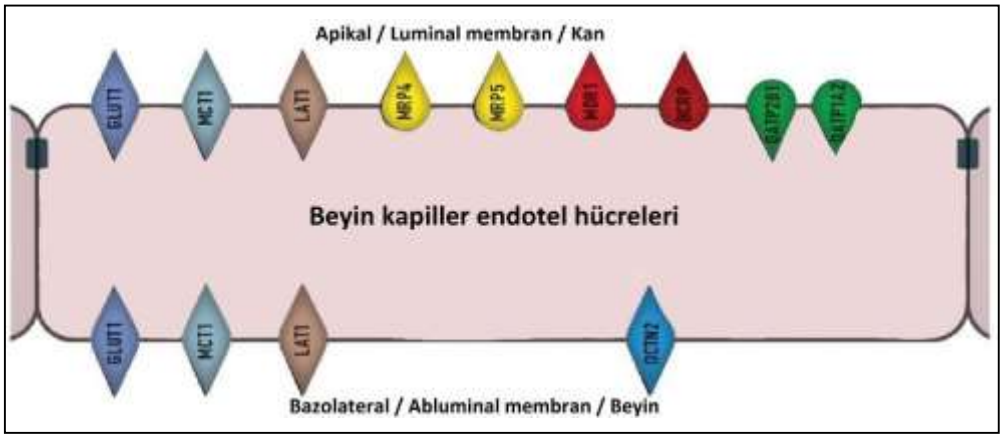
2.1.1. Vücutta Bulunan Önemli Bariyerler ve Taşıyıcılar

Organizma taşıyıcı proteinlerden oluşan bir dizi fizyolojik bariyer barındırmaktadır. Başlıcaları; kan-beyin, bağırsak, karaciğer, böbrek ve kan-süt bariyeridir.

2.1.1.1. Kan-Beyin Bariyeri

Beyin kritik bir organdır ve ekzojen bileşiklerin her türlü toksik ve diğer farmakodinamik etkilerine oldukça duyarlıdır. Beyin kapillerinin endotel hücreleri birbirine sıkıca bağlıdır. Hücreler arasında dağılacak kadar küçük olmayan tüm bileşikler, kandan beyin dokusuna geçebilmek için endotel hücrelerini geçmek durumundadır (Schinkel ve Jonker 2003).

Kan ve beyin arasında bulunan iki ana bariyerden biri kan-beyin bariyeri (KBB) diğeri ise kan-beyin omurilik sıvısı bariyeridir (KBOSB). KBB yüzey alanının, KBOSB yüzey alanından yaklaşık 100 kat daha büyük olması KBB'yi daha önemli bir yapı haline getirmektedir (Keep ve Jones 1990; Pardridge 2002). KBB'nin fonksiyonu, mikrokapiller endotel hücreleri tarafından sağlanmaktadır. Beyin mikrokapiller endotel hücrelerinde eksprese edilen taşıyıcılar Şekil 2-3'te gösterilmiştir.



Şekil 2-3: Kan-beyin bariyerinde ABC taşıyıcı proteinlerinin yerleşimi - https://www.solvobiotech.com'dan değiştirilerek

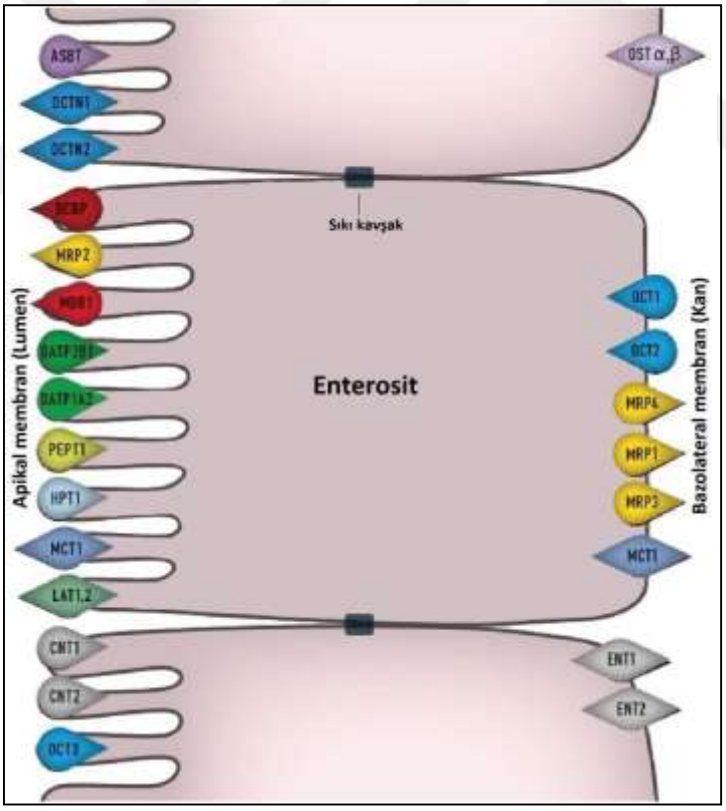
Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından KBB'de belirtilen iki taşıyıcı protein MDR1 (P-gp) ve BCRP'dir (EMA 2010; FDA 2012). Diğer efluks taşıyıcılarından MRP4 (ABCC4) ve MRP5'in de (ABCC5) KBB'de eksprese edildiği gösterilmiştir; ancak yalnızca MRP4 ekspresyonu LC/MS/MS ile

doğrulanmıştır (Nies ve ark. 2004; Bronger ve ark. 2005; Uchida ve ark. 2011). MRP4'ün *in vivo* koşullarda farelerde apikal olarak lokalize olması nedeniyle, KBB'nin ilaç emiliminde bir bariyer görevi gördüğü sonucuna ulaşılmıştır (Roberts ve ark. 2008).

2.1.1.2. Bağırsak Bariyeri

İnce bağırsaklar geniş yüzey alanına sahip olması ve midenin proksimalinde bulunması nedeniyle oral yolla uygulanan birçok ilacın emilim bölgesidir. Kolondan ilaçların emilimi de metabolik enzim aktivitesinin ince bağırsağa göre daha düşük olması nedeniyle oldukça önemlidir (Lin ve ark. 1999; Berggren ve ark. 2007).

İnce bağırsakla kolon karşılaştırıldığında, ince bağırsaktaki MDR1 (P-gp) ve MRP2 ekspresyonunun önemli ölçüde yüksek olduğu görülmektedir. Enterositlerde eksprese edilen taşıyıcılar Şekil 2-4'te gösterilmiştir.

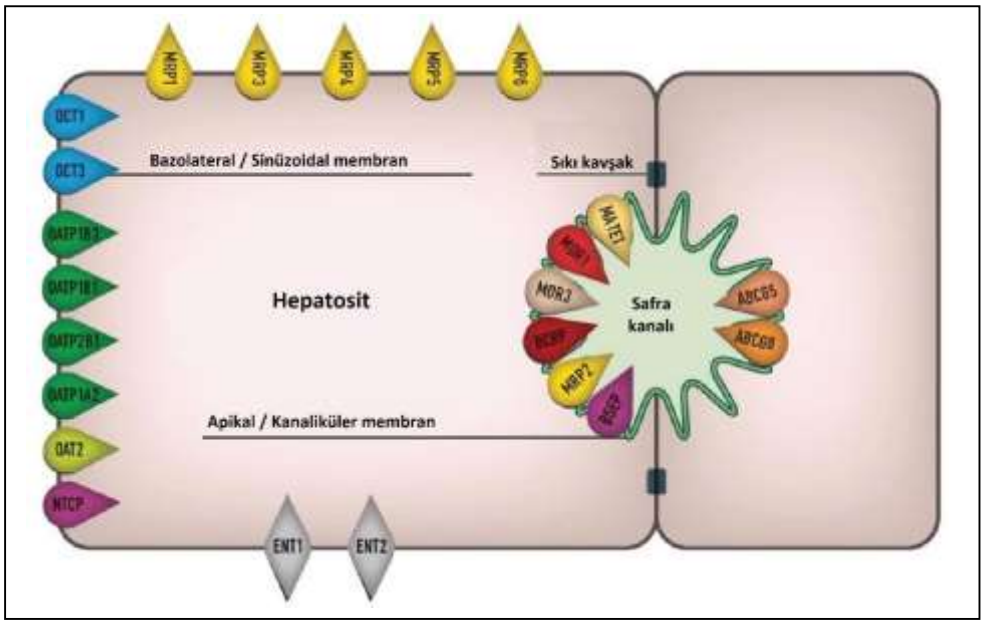


Şekil 2-4: Bağırsak bariyerinde ABC taşıyıcı proteinlerinin yerleşimi - https://www.solvobiotech.com'dan değiştirilerek

Bağırsakta yüksek oranda eksprese edilen ve hem Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) hem de Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından bildirilen taşıyıcılar apikal olarak lokalize olan MDR1 (P-gp) ve BCRP'dir (Maliepaard ve ark. 2001; EMA 2010; FDA 2012; Dahan ve ark. 2012). Bu taşıyıcıların birçok ksenobiyotiği taşıdığı ve bağırsaktan ilaç emiliminde bir bariyer özelliğine sahip olduğu bildirilmektedir. Bazolateral yerleşimli efluks taşıyıcıları arasında MRP3 (ABCC3) de dikkat çeken bir dışa atım proteini olarak görev görmektedir (Kitamura ve ark. 2010).

2.1.1.3. Karaciğer Bariyeri

Hepatositler oral yoldan uygulanan ilaçların atılımında önemli bir bariyer oluşturmaktadır. Parenşimal hücrelerde (hepatositler) eksprese edilen taşıyıcılar Şekil 2-5'te gösterilmiştir. Sinüzoidal/bazolateral uptake taşıyıcılarının ve kanaliküler/apikal efluks taşıyıcılarının aktivitesinin vektörel toplamı, bu bariyerin sekresyon fonksiyonunu şekillendirir. Anyon taşınmasında görevli olan membran taşıyıcı proteinler, birçok ilacı ve faz II ilaç metabolitlerini safraya taşıyan BCRP ve MRP2'dir (Kitamura ve ark. 2008; Ieiri ve ark. 2009; Hillgren ve ark. 2013). Ayrıca, kanaliküler olarak eksprese olan MDR1'in (P-gp) katyonik ilaçları ve metabolitleri safraya taşımada görev aldığı bildirilmektedir (Nies ve ark. 2008; EMA 2010).

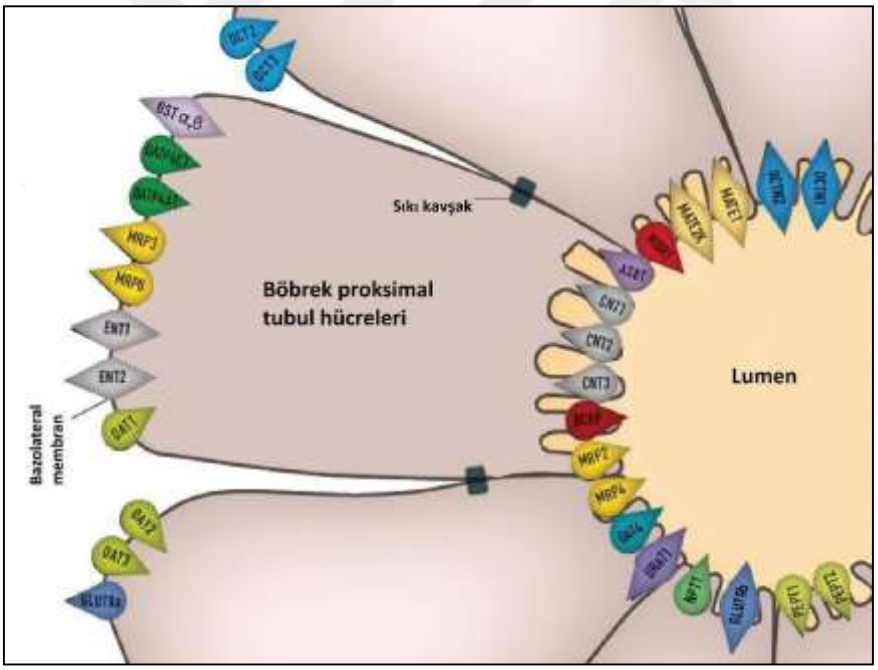


Şekil 2-5: Karaciğer bariyerinde ABC taşıyıcı proteinlerinin yerleşimi - https://www.solvobiotech.com'dan değiştirilerek

2.1.1.4. Böbrek Bariyeri

Böbrek bariyeri bir diğer önemli atılım organıdır. Renal atılımda ana yapıyı oluşturan hücreler proksimal tubul epitel hücreleridir. Proksimal tubul epitel hücrelerinde gösterilen taşıyıcılar Şekil 2-6'de gösterilmiştir. Anyonlar için proksimal tubuler hücrelerin apikal fırça sınır membranı üzerindeki efluks proteinleri BCRP, MRP2 ve MRP4'tür (Robertson ve Rankin 2006; Madejczyk ve ark. 2007; Brown ve ark. 2008; Jin ve ark. 2009). FDA ve EMA tarafından MDR1'in de apikal efluks fonksiyonu gösterdiği bildirilmiştir (EMA 2010; FDA 2012).

Böbrek ürat homeostasisine (vücutta kararlı iç dengenin korunması) birçok taşıyıcı aracılık etmektedir. MRP4 ve BCRP gibi efluks taşıyıcıları geniş substrat aralığına sahip taşıyıcılar oldukları için üre atılımında büyük önem taşımaktadırlar (El-Sheikh ve ark. 2008; Sato ve ark. 2008; Beery ve ark. 2012).



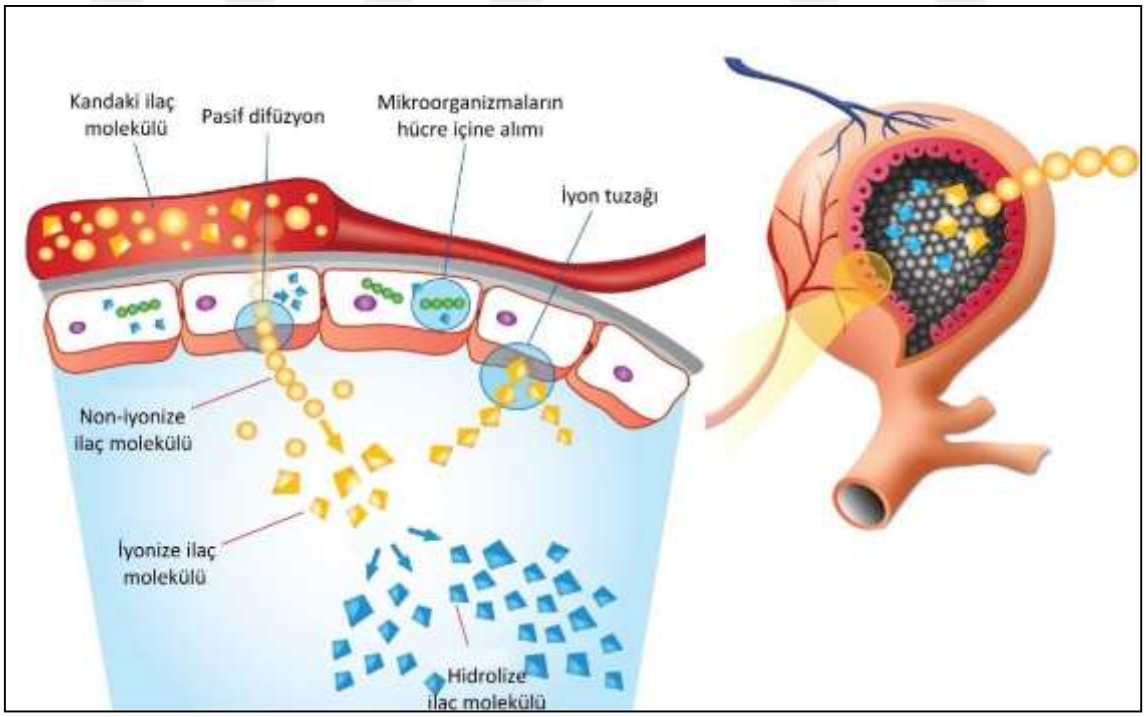
Şekil 2-6: Böbrek bariyerinde ABC taşıyıcı proteinlerinin yerleşimi - https://www.solvobiotech.com'dan değiştirilerek

2.1.1.5. Kan-Süt Bariyeri ve İlaçların Süte Geçişinde ABC Taşıyıcılarının Rolü

Kan-süt bariyeri; apikal tarafı süte, bazolateral tarafı meme bezi kapiller damarlara bakan sıkı kavşaklardan oluşan meme alveoler epitel hücrelerinden oluşur (Zhao ve Lacasse 2008) (Şekil 2-7).

Süte ilaç geçişi; ilacın lipofilitesi, moleküler ağırlığı, plazma proteinlerine bağlanma oranı, iyonizasyon gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir (Agatonovic-Kustrin ve ark. 2002; Ito ve Lee 2003).

Hastalığı tedavi etmek veya hayvansal üretimi artırmak amacıyla kullanılan ana ilaç veya metabolitleri hayvan dokularında veya süt gibi ürünlerde birikebilmektedir. İlaç rezidüleri insan sağlığı ve olası ilaç direnci nedeniyle potansiyel bir risk olarak görülmektedir. Sütteki rezidü seviyelerinin sağlığa zararlı olması nedeniyle ilaç arınma sürelerine dikkat edilmesi gerekmektedir (Alvarez ve ark. 2006). Avrupa Birliği, rezidülerin yaratabileceği olası halk sağlığı sorunlarını gidermek amacıyla birçok ilaç grubunda olduğu gibi antelmentik ilaçlar için de maksimum rezidü limiti (MRL) değerleri belirlemiştir (EMA 1999).



Şekil 2-7: Kan-süt bariyeri - https://www.otago.ac.nz'dan değiştirilerek

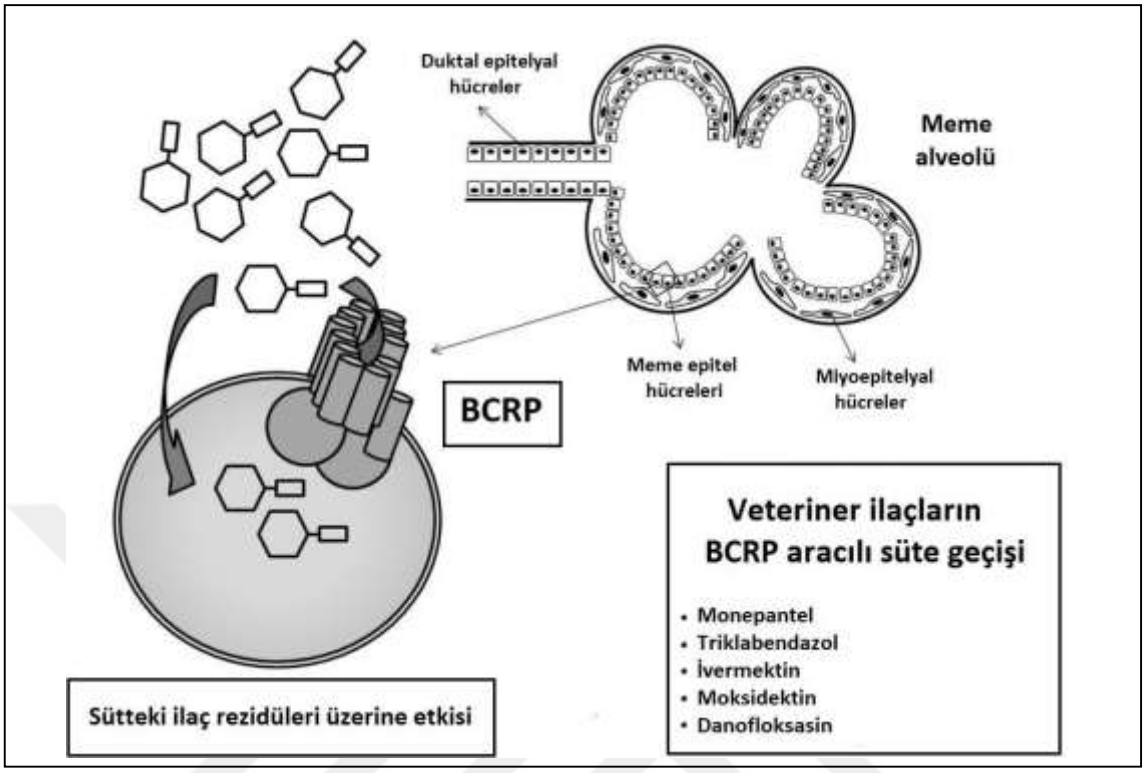
Ruminantlarda ilaç atılım özelliklerinin araştırıldığı çalışmalarda; benzimidazoller, avermektinler ve milbemisinlerin süte geçtiği gösterilmiş ve buna karşın atılım sürecinin altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır (De Liguoro ve ark. 1996; Barker ve Kappel 1997; Moreno ve ark. 2005).

İlaçların çoğu maternal plazmadan süte pasif difüzyonla geçmekle birlikte anne sütü ve kan arasındaki denge konsantrasyonunu belirlemek için kullanılan Süt/Plazma (S/P) oranı sütün bileşimi ve ilacın fizikokimyasal özelliklerinden etkilenmektedir (Agatonovic-Kustrin ve ark. 2002; Ito ve Lee 2003). Yüksek kararlı durum konsantrasyonlarına sahip ilaçlar büyük oranda aktif taşıma mekanizması ile süte geçerler. Evcil hayvanlarda moksidektin, ivermektin gibi bazı ilaçlar için yüksek S/P oranı bildirilmiştir ve bu bileşikler aktif olarak süte taşınabilmektedir (Imperiale ve ark. 2004).

Keçilerde ve ineklerde yapılan bir çalışmada benzilpenisilinin kan-süt bariyerini aktif taşımayla geçebildiği ve bu taşınmanın probenesid ile inhibe edilebildiği gösterilmiştir (Schadewinkel-Scherkl ve ark. 1993).

RT-PCR ile yapılan bir çalışmada, meme bezinde ilaç dispozisyonunda potansiyel rolü olan MDR1 ve OCTN2 gibi bazı taşıyıcıların laktasyondaki hücrelerde önemli oranda arttığı gösterilmiştir (Alcorn ve ark. 2002).

BCRP/ABCG2, çeşitli ilaçların ve toksinlerin kan-süt bariyerini geçerek süte aktif taşınmasını sağlamaktadır (Jonker ve ark. 2005). BCRP'nin bazı veteriner ilaçların süte geçişindeki rolü Şekil 2-8'de şematize edilmiştir. BCRP'nin laktasyondaki fare, inek ve insanlarda ekspresyonunda artış ve substrat ilaçların süte geçişinde önemli rolü olduğu görülmesine karşın; MRP1, MRP2 ve P-gp'nin laktasyondaki farelerde önemli derecede eksprese olmadığı saptanmıştır (Jonker ve ark. 2005). Bunun yanında, Bcrp1'in bazı ilaçların ve kanserojen ksenotoksinlerin (simetidin, nitrofurantoin, topotekan, asiklovir, PhIP) süte aktif taşınmasında önemli rolü olduğu bildirilmiştir (Jonker ve ark. 2005; Merino ve ark. 2005b). Benzer nitelikteki bir başka çalışmada yapılan immunoblot ve western blot deneylerinde, koyun ve ineklerin meme bezlerinde yüksek BCRP ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Araştırmacıların BCRP spesifik substratları ve inhibitörlerinin inek meme bezleri homojenatlarındaki vanadata duyarlı ATPaz aktivitesi üzerindeki elde ettikleri sonuçlar da, inek ve koyunlarda BCRP'nin fonksiyonel ekspresyonunu doğrulamıştır (Pulido ve ark. 2006).



Şekil 2-8: Veteriner hekimlikte kullanılan bazı ilaçların süte geçişinde meme kanseri direnç proteininin (BCRP) rolü - Virkel ve ark. (2018)'den değiştirilerek

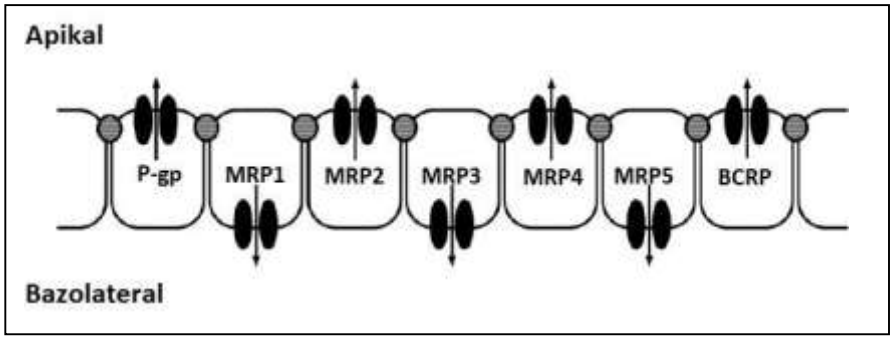
İlaçlar ve diğer maddelerin süte geçişinin halk sağlığı açısından risklerini minimalize etmek amacıyla yapılan araştırmalarda, efluks taşıyıcıları ile yemlerin etkileşiminin ilaç arınma sürelerinin kısaltabileceği yönünde veriler elde edilmiştir (Cooray ve ark. 2004; Janvilisri ve ark. 2003; Imai ve ark. 2004). Ruminant yemlerinde farmakolojik ve toksikolojik yönden aktif unsurlar olduğu bilinen tanenler, gossipol ve fagopirin gibi bileşikler bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda da bitkilerde bulunan polifenollerin BCRP ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. Polifenol alt grubu olan flavonoidler ile sitotoksik ilaç etkileşiminin incelendiği bazı çalışmalarda sitotoksik ilaç uygulanmasını takiben ilaç akümülasyonunu, ATPaz aktivitesini ve hücre canlılığını etkileyerek hem P-gp'nin hem de MRP1'in aktivitesini değiştirebileceği gösterilmiştir (Zhang ve Morris 2003). Son zamanlarda izoflavonlar da dahil olmak üzere flavonoidlerin BCRP aracılı ilaç direncini tersine çevirdiği ve BCRP'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (Cooray ve ark. 2004; Imai ve ark. 2004; Zhang ve ark. 2004b).

ABC taşıyıcılarının potansiyel rolleri ve hayvanlarda bu taşıyıcıların parazitler, ilaçlar, hayvan yemleri ve beslenmeyle olan etkileşimleri konusu hakkında edinilen bilgiler gün geçtikçe artış göstermektedir ve bu etkileşimlerin önemini arttırmaktadır (Alvarez ve ark. 2006).

2.2. P-glikoprotein (MDR1, ABCB1)

P-glikoprotein (P-gp), kolşisine dirençli Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinden aşırı eksprese edilen bir yüzey glikoproteini olarak Juliano ve Ling tarafından 1976 yılında keşfedilmiştir. İlk keşfedilen ABC taşıyıcı proteini olan P-gp, ABC ilaç efluks taşıyıcıları arasında en fazla çalışma yapılan üye olma özelliğine sahiptir. P-gp'nin taşıdığı organik maddelerin molekül ağırlıkları 200 dalton ile 1900 dalton arasında değişmektedir. Bu maddelerin birçoğu aromatik grup içerir; ancak non-aromatik moleküller de taşınmaktadır. Yüksek oranda taşınan moleküllerin çoğu yüksüz veya zayıf bazik özelliktedir; ancak metotreksat veya fenitoin gibi bazı asidik bileşikler düşük oranda da olsa taşınabilmektedir. P-gp substratlarında şu ana kadar identifiye edilmiş olan tek ortak özellik, amfipatik (molekülde hem hidrofobik hem de hidrofilik grubun bulunması) yapıya sahip olmalarıdır (Schinkel ve Jonker 2003).

P-gp başlıca vücuttaki epitel hücrelerin apikal membranında lokalize olur ve substratları bazolateralden epitelyumun apikal tarafına taşıyarak substrat ilaçların farmakolojik davranışları üzerinde önemli etkilere yol açar (Thiebaut ve ark. 1987) (Şekil 2-9). Bu farmakolojik fonksiyonlar ilk olarak MDR1 knockout farelerde gösterilmiştir (Schinkel ve Jonker 2003).



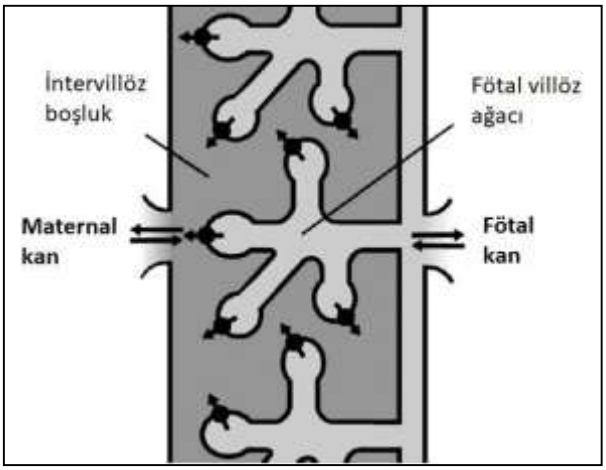
Şekil 2-9: ABC taşıyıcı proteinlerinin hücre içi lokalizasyonu - Schinkel ve Jonker (2003)'den değiştirilerek

2.2.1. P-gp'nin Vücut Bariyerlerinde Varlığı ve Farmakolojik Fonksiyonları

Kan-beyin bariyerinde yer alan P-gp, ksenobiyotiklerin beyin dokusuna geçişini sınırlamakta; hassas ve kritik dokuların ksenotoksiklerden korunmasına yardımcı olmaktadır (Schinkel ve ark. 1995; 1996; Choo ve ark. 2000; Saito ve ark. 2001). Gerçekte ilaçların çoğu hidrofobik yapıda olduğundan, endotelyal hücre membranlarına pasif difüzyonla geçme ve böylece beyin dokusuna belirli bir oranda girme olasılıkları bulunmaktadır. Bu durumda, endotel hücrelerin luminal membranında yer alan P-gp, kandan endotel hücrelere giren ilaçları kana geri pompalamaktadır (Cordon-Cardo ve ark. 1989). Sonuç olarak substrat ilaçların ve diğer substrat bileşiklerin kandan beyin dokusuna geçişi önemli ölçüde azaltılmaktadır. Kan-beyin bariyerinin P-gp eksikliğinde, P-gp substratı ilaçların beyne penetrasyonunun 10 ila 100 kat gibi yüksek düzeyde arttığı ve bileşiklerin toksisitesinin de önemli ölçüde arttığı görülmüştür (Schinkel ve ark. 1994; 1995; 1996).

P-gp'nin *kan-testis* ve *kan-sinir bariyerinde* de benzer şekilde farmakolojik işleve sahip olduğu bildirilmiştir. Bu dokulardaki kılcal damar sisteminin yanı sıra endotel hücrelerde bulunan P-gp'nin beyindeki ile benzer özelliklere sahip olduğu görüşü savunulmaktadır (Cordon-Cardo ve ark. 1989).

Plasentada bulunan *materno-fötal bariyer,* anne ve fötal kan dolaşımı arasında fonksiyonel rolü olan sinsityotrofoblastlardan oluşmaktadır. P-gp ilk olarak plasental sinsityotrofoblastların apikal membranında maternal kan kompartmanına bakan yüzünde bulunmuştur (Sugawara ve ark. 1988; Lankas ve ark. 1998). Sinsityotrofoblastlar, besin ve atık ürün değişiminin yanı sıra fötal dolaşımın korunmasında da görevlidir. Buradaki P-gp'nin işlevinin kan-beyin bariyerindekine benzer olduğu düşünülmektedir. P-gp, fötusu substrat ksenotoksinlerden ve maternal dolaşımda bulunan ilaçlardan aktif taşıma yoluyla korumaktadır (Şekil 2-10). Bu özelliği, dört farklı P-gp substratında (avermektin, digoksin, saquinavir, paklitaksel) P-gp geni silinmiş mutant ve knockout farelerde gösterilmiştir (Lankas ve ark. 1998; Smit ve ark. 1998; Huisman ve ark. 2001).



Şekil 2-10: Plasentada materno-fötal bariyerin fonksiyonu ve ABC ilaç efluks taşıyıcılarının lokalizasyonunun şematik gösterimi - Schinkel ve Jonker (2003)'den değiştirilerek

Plasenta bariyerinin fonksiyonel birimi, fötal kan kılcal damarlarını içeren bir fötal villöz ağaçtan (açık gri) oluşur. Villöz ağaçlar, intervillöz boşluk (koyu gri) boyunca uzanan maternal kan ile doğrudan temas halinde olan sinsityotrofoblastlar tarafından oluşturulan bir epitel hücre tabakası ile kaplıdır. P-gp, BCRP ve MRP2 (top ve oklarla belirtilen) gibi ilaç efluks taşıyıcıları, ilaç ve toksinlerin maternal kandan fötal dolaşıma girmesini engelleyen sinstiotrofoblastların apikal membranında bulunur. Sinsityotrofoblast epitel tabakası, villöz ağacı çevreleyen düz siyah çizgi ile gösterilmiştir.

P-gp, hepatositlerin safra kanaliküler membranında ve ince-kalın bağırsak epitelinin apikal (villöz) membranında bol bulunmaktadır (Thiebaut ve ark. 1987). Bu bölgelerde P-gp, substrat ilaçların ve diğer bileşiklerin karaciğer hepatositlerinden safraya ve bağırsak epitelinden bağırsak lumenine atılmasını sağlamaktadır. Lumene atılmış olan substratlar vücudu dışkı yoluyla terk ederek plazmanın ilaçlardan arınması ve detoksifikasyonunu sağlar. P-gp knockout ve normal (wild tip) hayvanlar karşılaştırılarak yapılan çalışmalarda, substrat ilaçların kandan safraya ve ayrıca doğrudan bağırsağa P-gp aracılığı ile atıldığı gösterilmiştir (Mayer ve ark. 1996; Sparreboom ve ark. 1997).

P-gp, bağırsak epitelinde bol miktarda bulunması nedeniyle bağırsak lumeninde bulunan substrat bileşiklerin kan dolaşımına girişini sınırlandırabilmektedir. P-gp substratı olan ilaçların geniş aralığa sahip olması nedeniyle oral yoldan verilen birçok ilacın biyoyararlanımı P-gp tarafından azaltılabilmektedir. P-gp geni silinmiş knockout hayvanlarda bir antineoplastik ilaç olan paklitakselin oral biyoyararlanımının belirgin şekilde artışı bu durumu doğrulamaktadır (Sparreboom ve ark. 1997). Oral yolla ilaç kullanımı çok tercih edilen bir uygulama yolu olmasına karşın, düşük oral biyoyararlanıma sahip bir ilaç plazmada terapötik konsantrasyona ulaşamayabilir. Bu

nedenle P-gp aktivitesi, ilaçların terapötik uygulamalarında önemli bir sorun olarak görülmektedir (Schinkel ve Jonker 2003).

P-gp'nin diğer dokulardaki işlevi net bir şekilde bilinmesine karşın, ilaçların idrarla atılımındaki rolü belirgin değildir. P-gp proksimal tubullerin apikal (luminal) membranında yoğun miktarda bulunmaktadır ve substratların kandan idrara geçişini sağlayan bir boşaltım fonksiyonu olduğu düşünülmektedir. P-gp knockout farelerde yapılan farmakoloji çalışmalarından elde edilen sonuçlarda boşaltım fonksiyonuyla çelişkili olacak şekilde renal atılımın ve ilaçların klerensinin artmasıyla sonuçlanan bir durum ortaya çıkmıştır (Smit ve ark. 1998). Bu durumun, P-gp knockout farelerde P-gp substratları için boşaltım yollarının yön değiştirmesi veya test edilen ilaçları etkileyen diğer taşıyıcıların veya enzimlerin ekspresyonu sonucu olabilebileceği düşünülmüştür (Mayer ve ark. 1996). Örneğin, P-gp eksikliği olan hayvanlarda bulunduğu koşullara bağlı olarak ilaç metabolize edici enzimlerin artışına (upregülasyonuna) neden olduğu gösterilmiştir (Schuetz ve ark. 2000). Bu nedenle renal P-gp'nin boşaltım rolünün ne olduğu belirsizdir; ancak vücudun başka yerlerinde gösterilen işlevleri göz önüne alındığında bazı P-gp substrat ilaçların renal atılımına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Schinkel ve Jonker 2003).

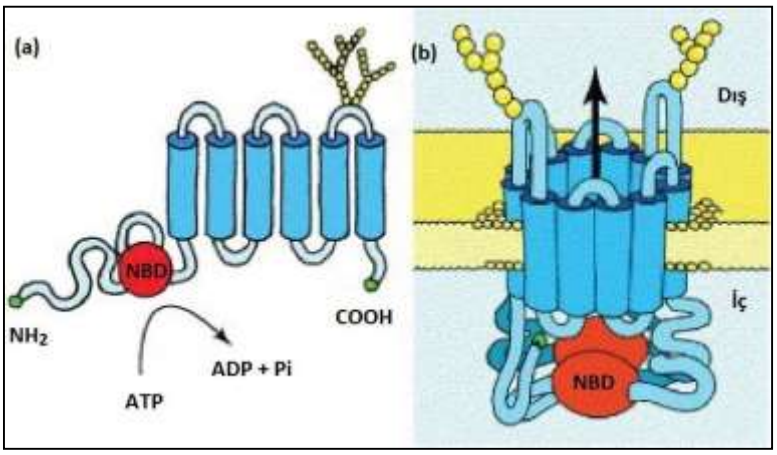
2.3. Meme Kanseri Direnç Proteini (BCRP, ABCG2)

BCRP, ABC taşıyıcı proteinlerinin en son keşfedilen üyesidir. 72 kDa ağırlığındadır ve 655 amino asit içermektedir. İlk olarak doksorubisine dirençli meme kanseri hücre hattından (MCF-7/AdrVp) klonlanmıştır (Doyle ve ark. 1998). BCRP, mitoksantrona karşı olan direncinden dolayı MXR; plasentada bulunması nedeniyle ABCP olarak da adlandırılmaktadır (Allikmets ve ark. 1998; Miyake ve ark. 1999) BCRP'nin; P-gp ve MRP2 proteinlerine benzer şekilde birçok substrat ilacın farmakolojisi üzerinde önemli etkilerine yönelik geniş kanıtlar bulunmaktadır (Schinkel ve Jonker 2003).

BCRP birçok dokunun yanı sıra meme lop ve kanallarının apikalinde yer almaktadır (Maliepaard ve ark. 2001; Jonker ve ark. 2005). BCRP'nin dokulardaki dağılımı ve substrat taşınmasındaki rolü P-gp ile büyük oranda benzerlik göstermektedir (Schinkel ve Jonker, 2003). BCRP, oral yolla verilen ilaçların bağırsaklardan atılımı ve safrayla eliminasyonunda rol oynamasına ek olarak birçok substrat ilacın süte geçişinden de sorumludur (Allen ve ark. 2002; Mizuno ve ark. 2003; Jonker ve ark. 2005).

2.3.1. BCRP'nin Moleküler Yapısı

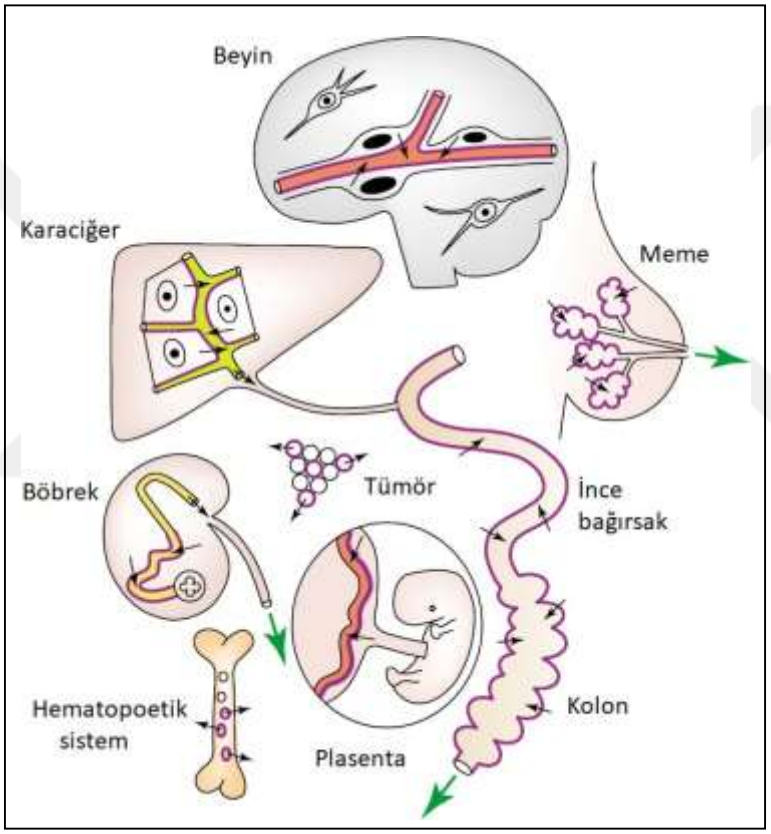
BCRP'nin, diğer ABC taşıyıcılarından farklı olan bir özelliği yarım taşıyıcı olmasıdır (Robey ve ark. 2009). Çoğu ABC taşıyıcısı 12 transmembranal alan ve 2 nükleotid bağlayan alan içerirken; ABCG2 6 transmembranal alan ve 1 nükleotid bağlayan alan içermektedir. BCRP'nin tam taşıyıcı olarak fonksiyon gösterebilmesi için, iki ayrı protein arasında disülfit bağları oluşturmasıyla stabilize olan homodimerlere gereksinim duyulmaktadır (Leimanis ve Georges 2007) (Şekil 2-11).



Şekil 2-11: BCRP (ABCG2)'nin iki boyutlu (a) ve üç boyutlu (b) olarak moleküler yapısı - van Herwaarden ve Schinkel (2006)'dan değiştirilerek

2.3.2. BCRP'nin Dokulardaki Ekspresyonu ve Fonksiyonu

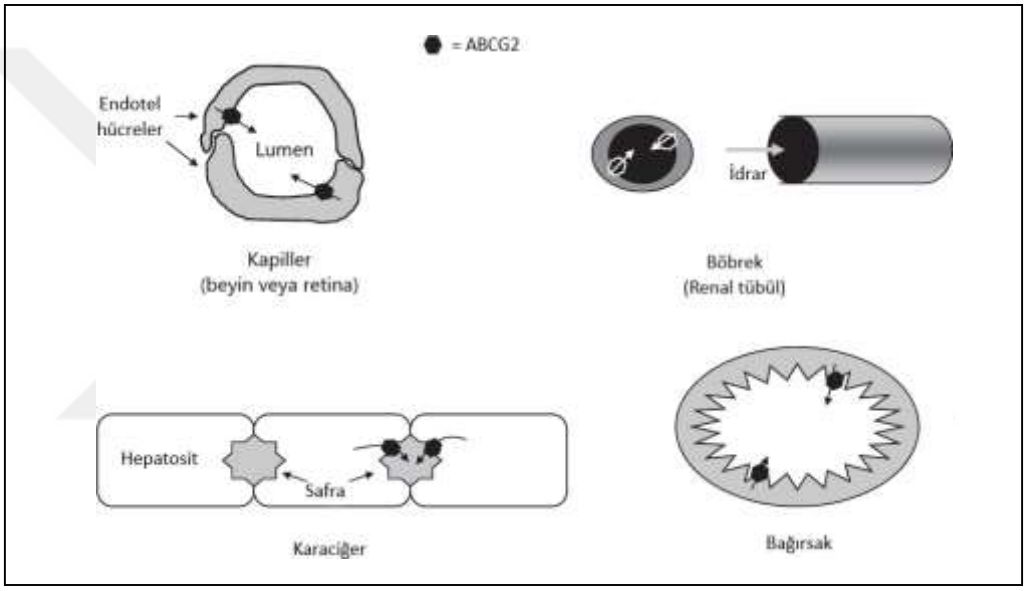
BCRP/BCRP1 ince ve kalın bağırsağın epitel hücrelerinin apikal membranında, hepatositlerin safra kanaliküler membranında, renal proksimal tübüler epitel hücrelerinin apikal membranında, beyindeki kapiller damarların endotel hücrelerinin luminal membranında, plasenta sinsityofoblastlarında ve süt üretiminin ana bölgesi olan meme alveoler epitel hücrelerinin apikal membranında bulunmaktadır (van Herwaarden ve Schinkel 2006) (Şekil 2-12).



Şekil 2-12: Vücudun çeşitli organlarından BCRP (ABCG2) ekspresyonunun şematik gösterimi - van Herwaarden ve Schinkel (2006)'dan değiştirilerek

Küçük siyah oklar, substratların BCRP (mor çizgiler) ile efluks yönünü gösterirken, daha büyük yeşil oklar BCRP substratlarının vücuttan atılımını göstermektedir. BCRP, ince ve kalın bağırsağın epitel hücrelerinin apikal membranında ilaçların doğrudan bağırsaktan atılımına aracılık ederek bağırsak lumeninden alımı azaltmakta; hepatositlerin safra kanaliküler membranında safrayla atılıma aracılık etmekte; böbrek proksimal tubul epitel hücrelerinin apikal membranında böbrek eliminasyonuna aracılık etmekte; beyindeki kan kapiller damarlarında kan-beyin bariyerine penetrasyonu sağlamakta; plasental sinstiotrofoblastlarda plasenta boyunca maternal-fötal transferini sınırlamakta; hematopoetik kök hücreler ve tümör hücrelerinde ilaç direncini sağlamakta ve son olarak meme bezinin alveolar epitel hücrelerinin apikal membranında (gebeliğin son dönemi ve laktasyon döneminde bulunur) substratlarını aktif olarak anne sütüne taşınmasını sağlamaktadır.

BCRP, diğer ABC taşıyıcılarına benzer olarak, substratları sitoplazmadan hücre dışına pompalamaktadır. BCRP bunu, substrat ilaçların hepatositlerden safraya, bağırsak epitelinden bağırsak lümenine, beyin veya retinal endotel hücrelerinden kapiller lümene taşınmasını sağlayarak gerçekleştirir ve bu şekilde toksinlerin duyarlı sinir ve retinal dokulara erişimini önler (Şekil 2-13). BCRP aynı zamanda substrat ilaçların süte geçişini de sağlar (Jonker ve ark. 2005). Tümör hücrelerinde BCRP ekspresyonu sonucunda ise, substrat ilaçlar kanser hücreleri dışına pompalanır ve çoklu ilaç direnci (multidrug resistance) meydana gelir (Mealey 2012).



Şekil 2-13: Bazı dokularda BCRP/ABCG2'nin yeri ve işlevi - Mealey (2012)'den değiştirilerek

2.3.3. BCRP Substratları ve İnhibitörleri

BCRP, P-glikoprotein gibi substrat spesifitesi açısından oldukça geniş bir aralığa sahiptir. Her iki protein de birbirinden oldukça farklı birçok ilacı yüksek verimle taşımaktadır. BCRP substratları, pozitif veya negatif yüklü büyük, amfifilik moleküller olma eğilimindedir ve birçok sitotoksik ilaç, sitotoksik ilaçların metabolitleri, ilaçların sülfat metabolitleri, çevresel toksinler ve kanserojenlerin yanı sıra endojen bileşikleri (hormonlar, protoporfirin IX, riboflavin) içermektedir (Mealey 2012) (Tablo 2-3).

Veteriner alanda sıklıkla kullanılan BCRP substrat ilaç örnekleri arasında florokinolon grubu antibiyotikler (Alvarez ve ark. 2008a), antineoplastik ilaçlardan mitoksantron (Robey ve ark. 2001) ve tirozin kinaz inhibitörleri (köpeklerde mast hücresi tümör tedavisinde kullanılan toceranib) (Cusatis ve ark. 2006) ile bazı antelmentikler (MNP) bulunmaktadır (Mahnke ve ark. 2016) (Tablo 2-3). BCRP tarafından substrat tanıma ve taşınma ile ilişkili yapısal özellik tam olarak bilinmemektedir. Bir ilacın BCRP substratı olup olmadığının belirlenmesi *in vitro* (Morisaki ve ark. 2005) ve *in vivo* çalışmalar ile gerçekleştirilmektedir (Vlaming ve ark. 2009a). İnsan ve fare BCRP için substrat olarak tanımlanan bazı ilaçların; kedi (Ramirez ve ark. 2011), koyun ve inekte de (Pulido ve ark. 2006) BCRP substratı olduğu gösterilmiştir.

BCRP inhibitörlerinin klinik açıdan iki önemli farmakolojik etkisi bulunmaktadır. İlki ve bu ilaçlar üzerinde araştırmaların yoğunlaştırılmasının da nedeni, tümör hücrelerinde BCRP aracılı çoklu ilaç direncinin üstesinden gelebilmeleridir (Henrich ve ark. 2007). İkincisi, BCRP inhibitörlerinin BCRP substratı olan ilaçlarla birlikte uygulandıklarında, BCRP substrat ilacın vücutta izlediği yolu (emilim, dağılım ve atılım) değiştirebilmesidir (Breedveld ve ark. 2004; Kuppens ve ark. 2007).

BCRP inhibitörleri, BCRP substratlarına benzer şekilde ortak bir yapısal bileşen içermeyen birçok bileşik grubundan oluşmaktadır (Tablo 2-3) (Henrich ve ark. 2007). Bunun yanında, bazı BCRP substratları aynı zamanda BCRP inhibitörü olabilmektedir. Östrojen ve tirozin kinaz inhibitörleri istisnaları dışında, BCRP inhibitörlerinin çoğu veteriner alanda yaygın olarak kullanılan ajanlar değildir. BCRP substratlarında olduğu gibi, insan veya fare BCRP için inhibitör olarak tanımlanan ilaçların, bazı hayvan türlerinde (kedi) BCRP inhibitörü olduğu görülmüştür (Ramirez ve ark. 2011).

Flavonoidler son zamanlarda BCRP inhibitörleri olarak dikkat çeken ve üzerinde yoğun araştırmalar yapılan bitkisel komponentlerdir. Zhang ve ark. (2004b, 2005) yaptıkları çalışmalarda, aşırı BCRP eksprese eden MCF-7 hücrelerinde krisin, biokanin A ve 7,8 benzoflavon'un mitoksantron efluksunu inhibe etmede en etkili flavonoidler olduklarını göstermişlerdir. Ayrıca flavonların BCRP transfekte edilmiş HEK923 hücrelerinde mitoksantron efluksunu inhibe eden en etkili inhibitörler olduğu saptanmıştır (Ahmed-Belkacem ve ark. 2005). Genistein ve naringeninin efluks pompası olarak görev yapan BCRP'nin fonksiyonunu azalttığı ve yoğun BCRP eksprese eden hücrelerde antineoplastik ajanlara karşı BCRP aracılı direnci tersine çevirdiği

bulunmuştur (Imai ve ark. 2004, Takahata ve ark. 2008). Bunun yanında, genistein ve daidzeinin BCRP substratı olan enrofloksasinin BCRP aracılı taşınmasını tersine çevirdiği gösterilmiştir (Pulido ve ark. 2006). Silimarin, hesperetin, kuersetin, daidzein ve resveratrol, BCRP aşırı eksprese eden hücre dizilerinde iyi bilinen BCRP substratları olan BODIPY-FL-prazosin ve mitoksantron akümülasyonunu önemli ölçüde arttırdığı, ayrıca bu flavonoidlerin seçici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Cooray ve ark. 2004).

Bazı krisin türevlerinin BCRP'yi spesifik olarak inhibe ettiği; ancak MRP1 veya P-gp ile herhangi bir etkileşime girmediği gösterilmiştir (Ahmed-Belkacem ve ark. 2005). Bu yönde yapılan bir çalışmada, 29 flavonoid ve flavonoidler ile yapısal benzerlik gösteren 3 bileşik hücre büyüme inhibisyon testinde denenmiş, bu bileşiklerden 20 tanesinin yalnız BCRP'ye karşı inhibitör aktivitesinin olduğu ve iki tanesinin ise P-gp aracılı çoklu ilaç direncini zayıf şekilde tersine çevirdiği görülmüştür (Katayama ve ark. 2007). Ayrıca Zhang ve ark. (2004b) yaptıkları çalışmada, flavonoidlerin kombine kullanıldığında BCRP'nin daha iyi inhibe olduğunu göstermişlerdir. İlginç olarak, flavonoidlere bir şeker grubunun bağlanmasının BCRP inhibitör aktivitesini azalttığı hatta ortadan kaldırdığı saptanmıştır (Imai ve ark. 2004, Zhang ve ark. 2004b).

Flavonoidler tarafından BCRP inhibisyonunun iki olası mekanizması olduğu düşünülmektedir (Morris ve Zhang 2006). Birincisi, flavonoidlerin BCRP'nin nükleotid bağlayan alan ile etkileşimleri sonucu inhibe olduğu yönündedir. İkinci mekanizma ise BCRP substrat bağlanma bölgeleriyle etkileşimden kaynaklandığı görülmektedir; çünkü birçok flavonoid BCRP substratı mitoksantronda da görüldüğü gibi BCRP ATPaz aktivitesini uyarabilmektedir (Cooray ve ark. 2004, Pulido ve ark. 2006). Bazı bileşiklerin *in vivo* biyoyararlanımının değişmesine yol açan BCRP inhibitörleri flavonoidler hakkında yapılan bazı çalışmalar Tablo 2-2'de gösterilmiştir.

Tablo 2-2: Bazı BCRP Substratları ile Flavonoidlerin *In Vivo* Etkileşimleri Alvarez ve ark. (2010)'dan değiştirilerek

BCRP Substratı	BCRP Inhibitörü	Hayvan Türü	Etki	Referans
Topotekan (2 mg/kg, oral)	Krisin/7,8-benzoflavon(5–50 mg/kg, oral)	Mdr1a/1b$^{(-/-)}$ fareler	Etki yok	*Zhang ve ark. 2005*

Nitrofurantoin (10 mg/kg, oral)	Krisin (50 mg/kg, oral)	Sıçan	Etki yok	*Wang ve Morris 2007*
Nitrofurantoin (10 mg/kg, oral)	Krisin (200 mg/kg, oral)	Sıçan	AUC ve c_{maks} 1,7 kat	*Wang ve Morris 2007*
Nitrofurantoin (2 mg/kg, IV)	Krisin (50 mg/kg, IP)	Sıçan	AUC 1,3 kat	*Wang ve Morris 2007*
Nitrofurantoin (1,5 mg/kg, IV)	Krisin (50 mg/kg, IP)	Sıçan	Hepatobiliyer eliminasyon 1,7 kat	*Wang ve Morris 2007*
Nitrofurantoin (10 mg/kg, oral)	7,8-benzoflavon (50 mg/kg, oral)	Sıçan	AUC 1,3 kat	*Wang ve Morris 2008*

Flavonoidlerden krisin ve 7,8-benzoflavon (50 mg/kg) *mdr1a/1b* $^{(-/-)}$ farelere oral yolla uyguladıktan sonra topotekanın biyoyararlanımı araştırılmış ve flavonoidlerden hiçbirinin topotekanın biyoyararlanımını değiştirmediği sonucuna ulaşılmıştır. Bu durumda, iki flavonoidin fare veya sıçanlarda BCRP aracılı topotekan taşınmasında zayıf bir inhibitör olabileceği ileri sürülmüştür (Zhang ve ark. 2005).

Benzer nitelikteki bir başka çalışmada, krisin 200 mg/kg dozda sıçanlara oral uygulandığında BCRP substratı nitrofurantoin biyoyararlanımında önemli oranda artış görülmüş ve oral klerensinde düşme saptanmıştır (Wang ve Morris 2007). Aynı araştırmacılar, daha düşük dozda krisin (50 mg/kg) uygulamış ve nitrofurantoin damar içi uygulandıktan sonra AUC değeri üzerinde düşük bir etki gözlemlemişlerdir. Krisin aynı dozda oral yolla uygulandıktan sonra ise BCRP ile arasında önemli oranda etkileşim görülmediği bildirilmiştir. Bu etkileşim eksikliği, krisinin biyoyararlanımının düşük veya bağırsaklardaki metabolizmasının yüksek oranda gerçekleşmesi ile açıklanmıştır. Sıçanlara 7,8-benzoflavonun 50 mg/kg dozda oral yolla verilmesinin nitrofurantoinin AUC değerini önemli oranda arttırdığı ve nitrofurantoin klerensini düşürdüğü gösterilmiştir (Wang ve Morris 2008). Bu önemli etkileşimin, nitrofurantoinin BCRP aracılı intestinal efluksunun inhibisyonu nedeniyle gerçekleştiği bildirilmiştir (Wang ve Morris 2008). Sıçanlarda, krisin ve 7,8-benzoflavonun nitrofurantoinin biyoyararlanımını arttırmak için iyi birer BCRP inhibitörü olduğu görülürken; topotekan için bu durumun geçerli olmadığı saptanmıştır.

Bu çalışmalardan elde edilen tartışmalı sonuçların flavonoidlerle olan etkileşimin, BCRP substratına bağlı değişim gösterdiği ileri sürülmüştür. Taşıyıcı proteinin birden fazla bağlanma bölgesinin olmasının da bu durumu açıklayabildiği öne sürülmüştür (Clark ve ark. 2006).

Tablo 2-3: Başlıca BCRP Substratları ve İnhibitörleri- Mealey (2012), Bircsak ve Aleksunes (2015) ve Mahnke ve ark. (2016)'dan değiştirilerek

BCRP Substratları	BCRP İnhibitörleri
Antimikrobiyaller	**Antimikrobiyaller**
Danofloksasin	Novobiyosin
Enrofloksasin	**Antiviraller**
Siprofloksasin	Amprenavir
Eritromisin	Nelfinavir
Nitrofurantoin	Ritonavir
Norfloksasin	**Kalsiyum kanal blokerleri**
Antiviraller	Dipiridamol
Abakavir*	Nikardipin
Zidovudin	Nitrendipin
Kalsiyum kanal blokerleri	**İmmunosupresanlar**
Dipiridamol*	Siklosporin A
Nitrendipin*	Sirolimus
Statinler	Takrolimus
Serivastatin	**Hormonlar**
Pitavastatin	17-b-östradiol
Rosuvastatin	Dietilstilbestrol
Karsinojenler	Östron
Aflatoksin B1	Tamoksifen
2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b) pyridine (PhIP)	**Kemoterapötik ilaçlar**
Kemoterapötik ilaçlar	Gefitinib
Etoposid	İmatinib
İmatinib	Erlotinib
Mitoksantron	**Fungal toksinler**
Metotreksat	Fumitremorjin C (FTC)
Topotekan	Ko143
SN-38	**Flavonoidler**
Endojen bileşikler	Biokanin A
Östron-3-sülfat	Daidzein
Folik asit	Formononetin
Protoporfirin IX	Genistein
Ürik asit	Glisitein
Flavonoidler	**Endojen bileşikler**
Biokanin A-glukuronid, Biokanin A-sülfat	17β-östradiol
Daidzein, Daidzein-sülfat	Östron

Genistein, Genistein-glukuronid, Genistein sülfat	**Diğer ilaçlar**
Kuersetin	Albendazol
Flurosean boyalar	Elakridar (GF120918)
BODIPY-Prazosin	Omeprazol
Hoechst 33342	Pantoprazol
Feoforbid a	
Rhodamin 123	
Diğer ilaçlar	
Simetidin	
Oksfendazol	
Feoforbid A	
Riboflavin	
Sülfosalazin	
Gliburid	
Prazosin	
Monepantel sülfon	

*Hem substrat hem inhibitör

2.3.4. BCRP'nin İlaç Farmakokinetiğindeki Rolü ve ABCG2 (Knockout) Geni Silinmiş Farelerde Yapılan Çalışmalar

BCRP/ABCG2 substrat ilaca bağlı olarak ilaç farmakokinetiğinde büyük bir role sahiptir. İnsanlarda yapılan çalışmalarda, BCRP polimorfizminin BCRP ekspresyonunu azalttığı ve BCRP taşınma aktivitesini düşürdüğü gösterilmiştir. BCRP polimorfizmine sahip olan bireylerde, substrat ilaçlara [statinler (Hu ve ark. 2006), birçok antikanser ajan (Cusatis ve ark. 2006; Cha ve ark. 2009) ve diğer ilaçlara (Cusatis ve Sparreboom 2008)] olan maruziyet, polimorfizm olmayan normal BCRP'ye sahip olanlara göre çok daha fazla olduğundan, advers ilaç reaksiyonları oluşma olasılığı daha yüksektir. Polimorfizme bağlı olarak gelişen BCRP fonksiyonunun azalması, bireylerde ilaçların sistemik etkilerine duyarlılığı arttırmaktadır. BCRP işlevindeki bu azalma; bağırsakta ilaç emiliminin artması, ilaç dağılımında değişim ve atılımın sınırlanması ile ilişkilendirilmektedir. BCRP aracılı ilaç taşınması ve bağlanması hakkında kapsamlı bilgiler olmamasına rağmen, BCRP farmakogenetiği alanında yapılan çalışmalar hızla artış göstermektedir (Mealey 2012).

Veteriner alanda yapılan bazı araştırmalar, BCRP'nin ilaç farmakokinetiği ve güvenliğinde kritik öneme sahip olduğunu göstermiştir (Mealey 2012). Koyunlarda BCRP'nin, enrofloksasin ve nitrofurantoin gibi bazı substrat ilaçların süte geçmesine aracılık ettiği görülmüştür (Pulido ve ark. 2006; Perez ve ark. 2009b). Kedilerde ise

BCRP'de türe özgü amino asit farklılıkları ile, florokinolon grubu ilaçların retinal dejenerasyona yol açması arasında ilişki kurulmaktadır (Ramirez ve ark. 2011).

2.3.4.1. BCRP'nin İlaç Absorpsiyonundaki Rolü

BCRP'nin, P-gp'ye benzer şekilde enterositlerde eksprese edilmesi nedeniyle BCRP'nin de substrat ilaçların oral absorpsiyonunu değiştirebileceği ileri sürülmüştür (Mealey 2012). Bir antikanser ilaç olan topotekanın insan ve farelerde düşük oral biyoyararlanıma sahip olmasının nedeninin bu ilacın büyük oranda BCRP aracılığıyla enterositlerden intestinal lumene doğru taşınması olduğu gösterilmiştir (Jonker ve ark. 2000; Kruijtzer ve ark. 2002). BCRP eksikliğinin, farelerde tirozin kinaz inhibitörü erlotinibin oral biyoyararlanımını arttırdığı gösterilmiştir (Marchetti ve ark. 2008). Ayrıca, sülfosalazinin *abcg2*$^{-/-}$ knockout farelere oral yolla uygulandıktan sonra AUC değerinin wild tip farelere göre 111 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (Zaher ve ark. 2006). BCRP fonksiyonel polimorfizmli insanlarda ve *abcg2*$^{-/-}$ knockout farelerde yapılan çalışmalarda, BCRP substratı olan ilaçların intestinal ilaç emilimini sınırlamada önemli bir rol oynadığı sonucuna ulaşılmıştır. Bir BCRP inhibitörü ile bir BCRP substratının birlikte uygulanması, substrat ilacın oral biyoyararlanımının artmasına neden olabileceği gibi advers ilaç etkileşimleriyle de sonuçlanabilmektedir (Mealey 2012). Benzimidazollerin BCRP substratı metotreksat ile birlikte uygulanması sonucunda, metotreksat ve metabolitlerinin plazma konsantrasyonlarında artış saptanmış olması bu duruma örnek olarak verilebilmektedir (Breedveld ve ark. 2004).

2.3.4.2. BCRP'nin İlaç Dağılımındaki Rolü

İlaç farmakokinetiğinin bir aşaması olarak bilinen ilaç dağılımı, hücre membranları boyunca ilaç hareketini etkileyen fizikokimyasal özelliklere (boyut, lipofilite, yük) bağlı olarak değişir. Bir ilaç molekülünün taşınması basit difüzyon mekanizmasının yanı sıra, konsantrasyon farkına bağlı olarak BCRP gibi taşıyıcılar ile gerçekleşmektedir. İlaçların beyin, retina ve fötus gibi bazı dokulara dağılımı fizyolojik bariyerlerle sınırlanmaktadır (Mealey 2012). *abcg2*$^{-/-}$ knockout farelerde yapılan araştırmalarda, BCRP'nin beyin kapiller endotel hücrelerinde kan-beyin bariyerinin önemli bir bileşeni olduğunu göstermiştir (Leslie ve ark. 2005; Robey ve ark. 2009). BCRP, P-gp'ye benzer şekilde; tirozin kinaz inhibitörleri, mitoksantron ve diğer birçok ilaç gibi BCRP substratı olan ilaçların beyin dokusuna girişini sınırlamaktadır. BCRP ayrıca retinal kapiller endotel hücrelerin luminal membranında eksprese edilmesi

nedeniyle fototoksinlerin akümülasyonunu önleyerek retinayı korumaktadır (Asashima ve ark. 2006). BCRP'deki aminoasit farklılığının kedilerde florokinolona bağlı retina toksisitesine neden olduğu da yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Substrat ilaçların fötüse dağılımı da plasental BCRP ile sınırlandırılmıştır. BCRP substratları olan topotekan, nitrofurantoin, genistein ve gliburit, *abcg2*$^{-/-}$ knockout farelerinde, *abcg2 wild tip* farelere kıyasla daha büyük (2-5 kat) fötal-maternal plazma oranları elde edilmiştir (Vlaming ve ark. 2009b). Testiste kılcal damarların luminal membranında eksprese edilen BCRP ve diğer taşıyıcılar da ilaçların söz konusu organa dağılımını etkileyen unsurlardır. Yine *abcg2*$^{-/-}$ knockout fareleri kullanılarak, çeşitli BCRP substratlarının testis içine penetrasyonunun BCRP tarafından etkin şekilde sınırlandırıldığı gösterilmiştir (Enokizono ve ark. 2008). Bu bileşiklerin (dantrolen, prazosin, fitoöstrojenler daidzein ve genistein) sistemik uygulanmasından sonra testis/plazma oranları, *abcg2*$^{-/-}$ knockout farelerde normal farelere oranla belirgin olarak (15 katı kadar) daha yüksek bulunmuştur. Bu veriler ışığında BCRP'nin substrat ilaçların testise ilaç geçişini azaltmada belirgin bir rolünün olduğu görülmektedir.

2.3.4.3. BCRP'nin İlaç Atılımındaki Rolü

BCRP'nin, renal tübül hücreleri ve safra kanaliküler hücrelerinde eksprese edilmesi renal ilaç atılımında rol oynadığını düşündürmektedir. *abcg2*$^{-/-}$ knockout farelerde normal farelere kıyasla birçok ilacın [nitrofurantion (Merino ve ark. 2005b), metotreksat (Vlaming ve ark. 2009b) ve florokinolonlar (Alvarez ve ark. 2008a)] safrayla atılımının azaldığı gösterilmiştir. Normal farelerde nitrofurantoinin safra yoluyla atılımı, *abcg2*$^{-/-}$ knockout farelere göre 48 kat daha fazla bulunmuştur. Bu durum, BCRP'nin ilaçların atılımındaki rolünü ortaya koymaktadır. BCRP'nin insan böbrek dokusundaki proksimal tubüler hücrelerin fırça sınır membranında eksprese edildiği gösterilmişse de, ilaç atılımındaki rolü henüz belirlenememiştir. Yine de ABCG2'nin ürat taşıyıcı olarak büyük rol oynadığı tanımlanmıştır (Woodward ve ark. 2009).

2.3.4.4. BCRP'nin Süte İlaçların Geçişinde Rolü

Laktasyon süresince koyun ve sığırların meme bezlerinden yüksek oranda eksprese edilen BCRP'nin farelerde riboflavin ve biyotin gibi bazı endojen ve ekzojen maddelerin süte geçişini sağladığı gösterilmiştir (Jonker ve ark. 2005; Merino ve ark. 2005b; 2006; Pulido ve ark. 2006). *abcg2*$^{-/-}$ knockout farelerde riboflavinin süt içinde kararlı durum konsantrasyonu, normal farelerden 60 kat daha düşük bulunmuştur

(Vlaming ve ark. 2009a). BCRP tarafından taşınan antibiyotiklerden nitrofurantoin (Perez ve ark. 2009b) ve enrofloksasinin de (Pulido ve ark. 2006) koyun sütüne önemli düzeyde geçtiği gösterilmiştir. Sığırlarda yapılan bir çalışmada ABCG2 Y581S polimorfizmi sonucunda sütün verim ve kompozisyonunda değişiklikler açığa çıktığı bildirilmiştir (Cohen-Zinder ve ark. 2005). Benzer nitelikteki bir başka çalışmada ise Y581S polimorfizmine bağlı ABCG2'deki genetik varyasyonlar ile danofloksasinin süte geçişinin artması arasında pozitif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (Otero ve ark. 2013; 2015). ABCG2 Y581S polimorfizminin süte riboflavin ve ürik asit gibi endojen moleküllerin geçişinin artışında da önemli bir rolü olduğu ortaya konmuştur (Otero ve ark. 2016). Koyun ve farelerden elde edilen verilerin sığırlara uygulanması sonucunda çok yönlü bulgulara ulaşılabileceği düşünülmektedir. Ekzojen bileşiklerin BCRP aracılığıyla süte geçmesi faydalı veya sakıncalı birçok sonuca yol açabilmektedir. BCRP aracılı süte ilaç geçişinin faydalı örneği, mastitis tedavisinde parenteral antibiyotik uygulanması ile etkin tedavi sağlamaktır. Buna karşın, parenteral uygulanan florokinolonların süte geçişi emen yavrularda florokinolon kaynaklı kıkırdak bozuklukları gibi bazı advers ilaç reaksiyonlara neden olabilir. Özellikle süt hayvanlarında, ilaçların BCRP aracılığıyla süte geçişi, insan tüketimine sunulan sütlerde istenmeyen kontaminasyonlara neden olabilmektedir (Mealey 2012). İnsan, fare, sıçan, inek ve koyunlarda yapılan diğer çalışmalarda safra asitleri, ürik asit, enterolakton, enterodiol, siprofloksasin, danofloksasin, moksidektin, fluniksin, 5-hidroksifluniksin, topotekan, asiklovir, simetidin, pantoprazol, nifedipin, aflatoksin B1 ve heterosiklik aminlerin (PhIP, IQ, Trp-P-1) BCRP tarafından süte taşındığı gösterilmiştir (Garcia-Lino ve ark. 2019).

2.4. Ruminantlarda ABC Taşıyıcı Proteinlerinin Önemi

Ruminantların fizyolojik özellikleri farmakokinetik araştırmalarda özel bir öneme sahiptir. Ruminant gastrointestinal sisteminin anatomi ve fizyolojisinin insanlara göre daha karmaşık olmasının nedeni, asıl mide olarak kabul edilen abomasumun önünde evrimsel olarak gelişen üç odalı rumen, retikulum ve omasum bölmelerinin olmasıdır. Bu nedenle, ruminant sindirim sisteminin anterior (ön) kısmındaki fermentasyon ortamı monogastrik (tek mideli) türlere göre oldukça farklıdır. Bu durum, ilaçların oral emiliminde ruminantlar ve tek mideliler arasında gözlenen farklılığı açıklamaktadır (Koritz 1983).

İnsan ve hayvanlarda yapılan farmakolojik araştırmalarda ABC taşıyıcıları ile ilaçların farmakokinetik davranışı arasındaki ilişki elde edilen verilerin niteliğini etkileyen önemli bir faktördür. Veteriner hekimlikte ruminantlarda yaygın olarak kullanılan birçok ilaç efluks taşıyıcılarının substratı veya inhibitörüdür. Aktif bileşenlerle taşıyıcı proteinlerin arasındaki bu potansiyel etkileşimin veteriner alanda önemli bir farmakolojik sorun olduğu bildirilmektedir (Virkel ve ark. 2018).

Ruminant yemlerinde yaygın olarak bulunan flavonoidler, vücutta ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile görevli enzimler ve efluks taşıyıcıları ile etkileşime girebilmektedir. Böylelikle, ilaçların farmakokinetiği değişerek terapötik etki artabilmekte ve toksisite riski doğabilmektedir (Cermak 2008; Li ve Paxton 2013). Ruminantlarda rumen duvarında bulunan ABC taşıyıcı proteinlerinin rumen fermentasyonu sırasında oral yolla alınabilen toksin ve zararlı metabolitlere karşı koruyucu bir rol üstlendiği de düşünülmektedir (Haslam ve Simmons, 2014).

Veteriner ilaçların süte geçişine neden olan BCRP, laktasyondaki hayvanlarda ilaç kullanımı sonucu tüketicilerde potansiyel sağlık risklerine neden olur. Ruminantlarda sıklıkla kullanılan ilaçlar arasında efluks taşıyıcılarına bağlı olarak gerçekleşen ilaç-ilaç etkileşimlerinin birçok örneği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla doğrulanmıştır (Virkel ve ark. 2018).

2.4.1. Ruminantlarda İn Vitro İlaç-İlaç Etkileşimlerinin Değerlendirilmesi

Ruminantlarda ABC taşıyıcılarının aracılık ettiği efluksu araştırmak için yapılan araştırmalarda makrosiklik laktonlar ile P-gp arasındaki etkileşimler detaylı olarak incelenmiştir. Yapı-afinite ilişkisi çalışmalarında, bu antelmentik grup bileşenlerinin aktif P-gp aracılı hücresel efluksa göre büyük farklılıklar gösterdiği saptanmıştır (Lespine ve

ark. 2007). İvermektinin P-gp aktivitesini inhibe etme gücü, siklosporin sentetik analoğu PSC833 (Valspodar) ve antidiyareik opioid grubu loperamid gibi en güçlü P-gp ligantları ile aynı düzeydedir (Eneroth ve ark. 2001). *İn vitro* çalışmalarda, makrosiklik laktonların P-gp substratı Rodamin 123 (Rho123) efluksunu inhibe etme kapasitesi ölçülmüş; makrosiklik laktonların bu substratın intrasellüler konsantrasyonunu farklı derecelerde arttırdığı saptanmıştır. İvermektinin, P-gp'ye büyük affinite göstermesine karşın; bu grubun bir başka üyesi olan moksidektinin P-gp fonksiyonunu inhibe etme gücünün 10 kat daha düşük olduğu gösterilmiştir (Lespine ve ark. 2007). Bu affinite farklılığının ivermektin ve moksidektinin farmakokinetik davranış ve direnç mekanizmasındaki farklılığa neden olabileceği düşünülmektedir (Lanusse ve ark. 1997, Prichard ve ark. 2012).

İlaçların transsellüler (vektörel) taşınma çalışmalarında efluks proteinlerini aşırı eksprese eden hücresel monolayer deney modelleri kullanılmasının yanında, *ex vivo* yaklaşımlar da ABC taşıyıcılarının ilaçların atılımındaki rolünü incelemede önemli bir araç olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemlerden Ussing chamber tekniğinin, kesip çıkarılan bağırsak dokularındaki aktif ilaç taşınmasını ölçmede belirleyici bir yöntem olduğu gösterilmiştir (Lennernäs 1997).

Veteriner alanda Ussing chamber tekniği, atlara uygulanan ilaçların oral absorpsiyon derecesini saptamak amacıyla kullanılmıştır (Davis ve ark. 2006). Veteriner alanda yapılan bir başka çalışmada ise, koyun bağırsağında ivermektin varlığında mukozadan (bazal) serozaya (apikal) geçişte Rho123 permeabilitesinin önemli oranda arttığı (% 68) görülmüştür (Ballent ve ark. 2009). Sıçan ileumunda bu tekniğin uygulanması ile çeşitli antelmentik ilaçların inhibisyon gücünde farklılıklar gözlenmiştir. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında Rho123 efluksu, ivermektin tarafından % 69, klosantel tarafından % 51, pozitif kontrol PSC833 tarafından % 65 oranında azaltılırken; moksidektin varlığında önemli bir fark (%30) gözlenmemiştir (Ballent ve ark. 2014).

Veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılan benzimidazol grubu antelmentiklerin ana ilaçları ve/veya metabolitlerinin P-gp etkileşimleri *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Benzimidazol grubu antelmentiklerden albendazol, fenbendazol ve triklabendazol gibi ana ilaçlar, iki aşamalı bir S-oksidasyona uğrayarak sülfoksit ve sülfon metabolitlerine dönüşürler. Ruminantlarda bu oksidatif basamaklardan flavin monoksijenaz ve sitokrom P450 enzim sistemleri sorumludur (Short ve ark. 1988;

Souhaili ve ark. 1988; Virkel ve ark. 2004; 2006). Triklabendazol sülfon, albendazol, mebendazol, oksfendazol ve tiyabendazol p-gp aktivitesini etkilememesine karşın; triklabendazol ve triklabendazol sülfoksit p-gp'nin *in vitro* taşınma aktivitesini inhibe etmiştir (Dupuy ve ark. 2010). Bu bilgiler doğrultusunda, benzimadazollerin P-gp ile olan etkileşiminin makrosiklik laktonlara oranla daha az olduğu görülmektedir.

Kan-beyin bariyeri, bağırsak ve plasenta gibi birçok dokuda bulunan BCRP/ABCG2, ruminantların meme bezinde de özellikle laktasyon döneminde yüksek oranda eksprese edilmektedir (Krishnamurthy ve ark. 2006). BCRP birçok ilacın sığır, koyun ve keçi sütüne geçişinde önemli rol oynamaktadır (Jonker ve ark. 2005, Wu ve ark. 2008b, Lindner ve ark. 2013). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bu türdeki BCRP substratlarını tanımlamak amacıyla, laktasyondaki sığır (bABCG2), koyun (oABCG2) ve keçilerin (cABCG2) meme bezlerinden ABCG2 eksprese eden MDCKII hücre serileri kullanılmıştır (Wassermann ve ark. 2013b). Bu yöntemler, veteriner alanda yaygın olarak kullanılan ve süte geçme potansiyeli olan antimikrobiyal ve antiparaziter ilaçları saptamada uygun bir araç olarak görülmektedir. MDCKII-bABCG2 hücre serisinde (Wassermann ve ark. 2013b) ve sığır karaciğerinden (Real ve ark. 2011b) ABCG2 transfekte edilmiş MDCKII hücrelerinde yapılan fonksiyonel çalışmalarda, enrofloksasinin ABCG2 aracılı aktif taşındığı saptanmıştır. Antelmentiklerden oksfendazol ve moksidektin ilk olarak fare ABCG2 substratı olarak tanımlanmıştır (Merino ve ark. 2005a; Perez ve ark. 2009a). Daha sonra yapılan çalışmalarda ise oksfendazol, moksidektin ve ivermektinin sığır ABCG2 ile etkileşimi de gösterilmiştir (Merino ve ark. 2005a; Perez ve ark. 2009a; Real ve ark. 2011b; Wassermann ve ark. 2013a).

Elde edilen veriler, *in vitro* modellerin farklı ABC taşıyıcıları ile ruminantlarda kullanılan ilaçlar arasındaki etkileşimi anlamak için çok yararlı araçlar olduğunu göstermektedir. Bu bilgiler doğrultusunda, bildirilen etkileşimlerin *in vivo* çalışmalar yapılarak desteklenmesi gerekmektedir (Virkel ve ark. 2018).

2.4.2. Ruminantlarda İn vivo İlaç-İlaç Etkileşimlerinin Değerlendirilmesi

Vücutta birçok organda bulunan ABC taşıyıcıları ksenebiyotiklerin emilim, dağılım ve atılım süreçlerinde aktif rol oynamaktadır. Günümüzde kullanılan birçok ilacın hücre içi konsantrasyonu efluks taşıyıcılarının aktivitesinden etkilenmektedir (Degorter ve ark. 2012). *İn vivo* ilaç-ilaç etkileşimlerinin belirlenmesinde kullanılan en

etkin mekanizmalardan birinin ABC taşıyıcıları ile etkileşimlerin saptanması olduğu bildirilmektedir (Aszalos 2007). Olası tüm *in vivo* ilaç-ilaç etkileşimleri klinik yönden anlamlı etkilere neden olmasa da, tedavide başarısızlık ve toksisite gibi bazı istenmeyen etkiler saptanabilmektedir (Liang ve Aszalos 2006). Yine de, bu etkileşimler her zaman zararlı değildir, çünkü bir ilaç diğerinin sistemik maruziyetini arttırabilmektedir. Bu yöndeki etkileşimler farklı mekanizmalar ile etki eden antelmentik ilaçların kombine kullanımı ile tedavi sıklığının azalması ve direnç gelişiminin gecikmesi gibi sonuçlara yol açabilir (Barnes ve ark. 1995). Ayrıca bir ilacın doku veya kan konsantrasyonunun birlikte kullanıldığı diğer bir ilaç ile arttırılması söz konusu olabilir. Koyunlarda yapılan bir araştırmada ivermektinin fasiolisid (triklabendazol) ve nematodisidal (albendazol) ilaçlarla kombinasyonu sonucu bileşiğin (ivermektin) plazma konsantrasyonunu önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır (Alvarez ve ark. 2008b; Lifschitz ve ark. 2009). Benzer nitelikteki bir başka çalışmada ise, sığırlarda klosantel-ivermektin kombinasyonu kullanıldığında, tek başına ivermektin uygulanmasına oranla ivermektinin emiliminin daha hızlı ve yüksek bir maksimum konsantrasyona ulaştığı gösterilmiştir (Cromie ve ark. 2006).

Antelmentik ilaçların farmakokinetiğini değiştirmek için uygulanan bir başka strateji ise antiparaziter etkisi olmayan modülatörlerle kombine olarak uygulanmasıdır. Bu farmakolojik stratejide, laboratuvar hayvanlarında makrosiklik laktonların farklı P-gp modülatörleri ile birlikte kullanımı sonucu makrosiklik laktonların plazma konsantrasyonlarında önemli değişiklikler gözlendiği bildirilmiştir (Alvinerie ve ark. 1998; Lifschitz ve ark. 2004; Kiki-Mvouaka ve ark. 2010).

Ruminantlarda yapılan çalışmalarda birçok P-gp modülatörünün ivermektin ve moksidektinin farmakokinetik profillerini değiştirdiği gözlenmiştir. Koyunlara ivermektinin verapamil ile birlikte uygulanmasının ivermektinin dağılım kinetiğinde; fungistatik bir ilaç olan itrakonazol ile birlikte uygulanmasının plazma biyoyararlanımında artışa neden olduğu bildirilmiştir (Ballent ve ark. 2007; Molento ve ark. 2004). Bir diğer araştırmada ise kuzulara bir flavonoid türevi kuersetin ile moksidektinin birlikte uygulanması sonucu moksidektin plazma konsantrasyonlarında önemli düzeyde artış saptanmıştır (Dupuy ve ark. 2003). Bu araştırma sonuçlarının, makrosiklik laktonların intestinal sekresyonunda P-gp'nin etkin rolü olduğu yönündeki *ex vivo* bulguları destekler nitelikte olduğu görülmektedir (Laffont ve ark. 2002; Ballent

ve ark. 2006; Virkel ve ark. 2018). Ruminantlarda kullanılan farklı makrosiklik laktonların *in vivo* biyoyararlanımına P-gp modülasyonunun etkisi Tablo 2-4'te gösterilmiştir.

Tablo 2-4: Ruminantlarda farklı makrosiklik laktonların in vivo biyoyararlanımı üzerine P-gp modülasyonunun etkisi - Virkel ve ark. (2018)'den değiştirilerek

Etkileşim	Tür	AUC (kat artış)	Referans
İvermektin+Ketokonazol	Koyun	1,8	*Alvinerie ve ark. (1998)*
İvermektin+Itrakonazol	Koyun	3,8	*Ballent ve ark. (2007)*
İvermektin+Verapamil	Koyun	1,6	*Molento ve ark. (2004)*
Moksidektin+Kuersetin	Koyun	1,8	*Dupuy ve ark. (2003)*
Moksidektin+Loperamid	Sığır	1,5	*Lifschitz ve ark. (2004)*
İvermektin+Triklabendazol	Koyun	3,4	*Lifschitz ve ark. (2009)*
İvermektin+Albendazol	Koyun	1,9	*Alvarez ve ark. (2008b)*
İvermektin+Klosantel	Sığır	1,0	*Cromie ve ark. (2006)*

Ruminantlarda P-gp aracılı potansiyel ilaç etkileşimlerine yönelik çok sayıdaki araştırmaların yanı sıra meme bezinde yer alan BCRP aracılı etkileşimler de giderek önem kazanmaktadır. Veteriner hekimlikte birden çok ilacın eş zamanlı kullanımı, ilaçların süte geçişini etkileyebilmekte ve ilaç rezidü düzeylerinde kantitatif değişiklere neden olabilmektedir (Virkel ve ark. 2018).

MNP, veteriner ilaç pazarına 2009'da giren yeni bir antelmentik bileşiktir. MNP ve ana metabolit $MNPSO_2$'nin polarize MDCKII-bABCG2 monolayer deneylerinde yapılan efluks çalışmalarında BCRP aracılı taşındığı gösterilmiştir (Mahnke ve ark. 2016). Bu *in vitro* sonuçlar, süt ineklerinde her iki bileşiğin plazma ve süt dağılım kinetikleri ile desteklenmiştir. MNP'nin süt ineklerine oral yolla verilmesinden sonra $MNPSO_2$'nin büyük oranda süte geçtiği ve plazmaya oranla sütte daha yüksek bir

akümülasyona neden olduğu gösterilmiştir (süt-plazma oranı 6,75) (Mahnke ve ark. 2016).

Danofloksasin veteriner hekimlikte üreme sisteminde enfeksiyona neden olan patojenlere karşı kullanılan florokinolon grubu bir antibiyotiktir. Danofloksasin süt ineklerinde genellikle gram-negatif bakterilerin neden olduğu mastitis tedavisinde kullanılmaktadır (Schrickx ve Fink-Gremmels 2008). Danofloksasinin plazmadan 10 kat daha fazla konsantrasyonda süte geçtiği bildirilmiştir (Escudero ve ark. 2007). Koyunlarda danofloksasin ve ivermektinin birlikte uygulanmasından sonra BCRP aracılı ilaç-ilaç etkileşimi tanımlanmıştır (Ballent ve ark. 2012). Koyunlarda danofloksasinin süte geçiş hızında, ivermektin (Real ve ark. 2011a) ile doğal izoflavonoidlerden genistein ve daidzein (Pérez ve ark. 2013) ile birlikte uygulandığında önemli bir azalma bildirilmiştir. Benzer şekilde bir avermektin türevi olan moksidektin ile yapılan *in vivo* deneylerde, triklabendazol ile kombinasyonun sütteki moksidektin düzeylerini düşürdüğü gözlenmiştir (Barrera ve ark. 2013).

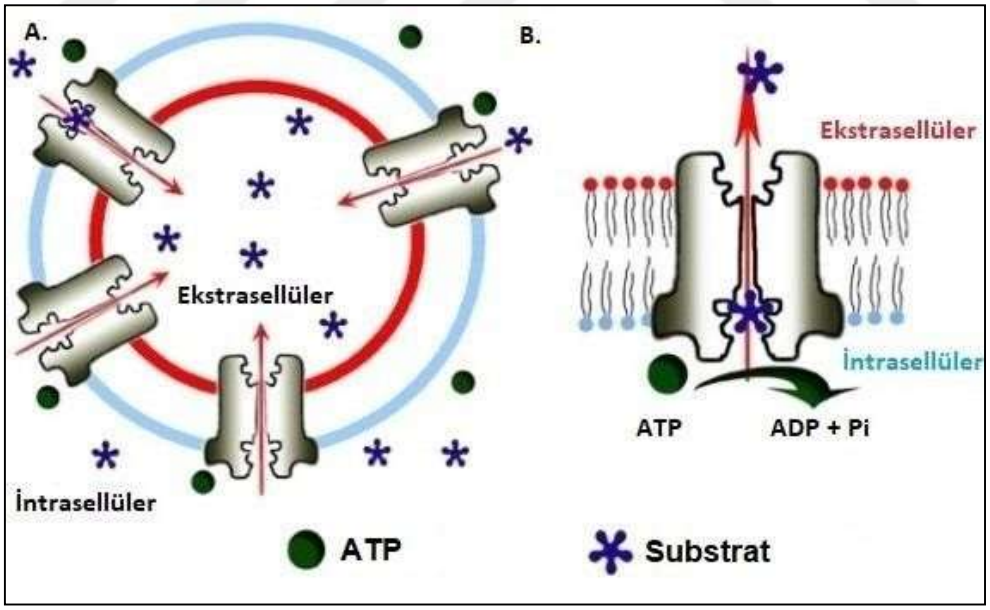
P-gp ve BCRP özellikle ruminantlarda kullanılan antiparaziter ve antibiyotiklerin farmakokinetiğinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda ABC taşıyıcı proteinlerin *in vivo* modülasyonu ile ilaçların biyoyararlanımı ve sütteki rezidüleri üzerinde büyük bir değişime neden olabileceği sonucuna varılmıştır (Virkel ve ark. 2018).

2.5. ABC Taşıyıcı Proteinlerinin İlaç Etkileşimlerindeki Rolünün İncelenmesinde Kullanılan *İn Vitro* Membran Bazlı Deneyler

ABC taşıyıcılarının ilaç etkileşimlerindeki rolünün incelenmesinde kullanılan en yaygın *in vitro* membran bazlı deneyler ATPaz ve veziküler taşınma deneyleridir. Birinci yöntem etkileşime giren bileşiklerin varlığında ATP hidroliz hızındaki değişiklikleri; ikinci yöntem ise substratların içten dışa veziküllere translokasyonunu ölçmektedir (Glavinas ve ark. 2008).

2.5.1. ATPaz Aktivite Deneyleri (ATPase Activity Assays)

ABC taşıyıcı proteinleri, ATP'yi hücre membranları boyunca substratların taşınmasında bir enerji kaynağı olarak kullanmaktadır. ATPaz deneyi temel olarak bileşiklerin taşıyıcı ile etkileşime girme prensibine dayanmaktadır (Şekil 2-14B). ATPaz aktivitesi, enzim tarafından salınan inorganik fosfat miktarı ile belirlenmektedir (Sarkadi ve ark. 1992). Bu deney en çok ABCB1 (MDR1, Pgp) ve ABCG2 (BCRP, MXR) çalışmalarında kullanılmasının yanı sıra MRP'ler için de kullanılmaktadır (Bakos ve ark. 2000; Zhang ve ark. 2007a).

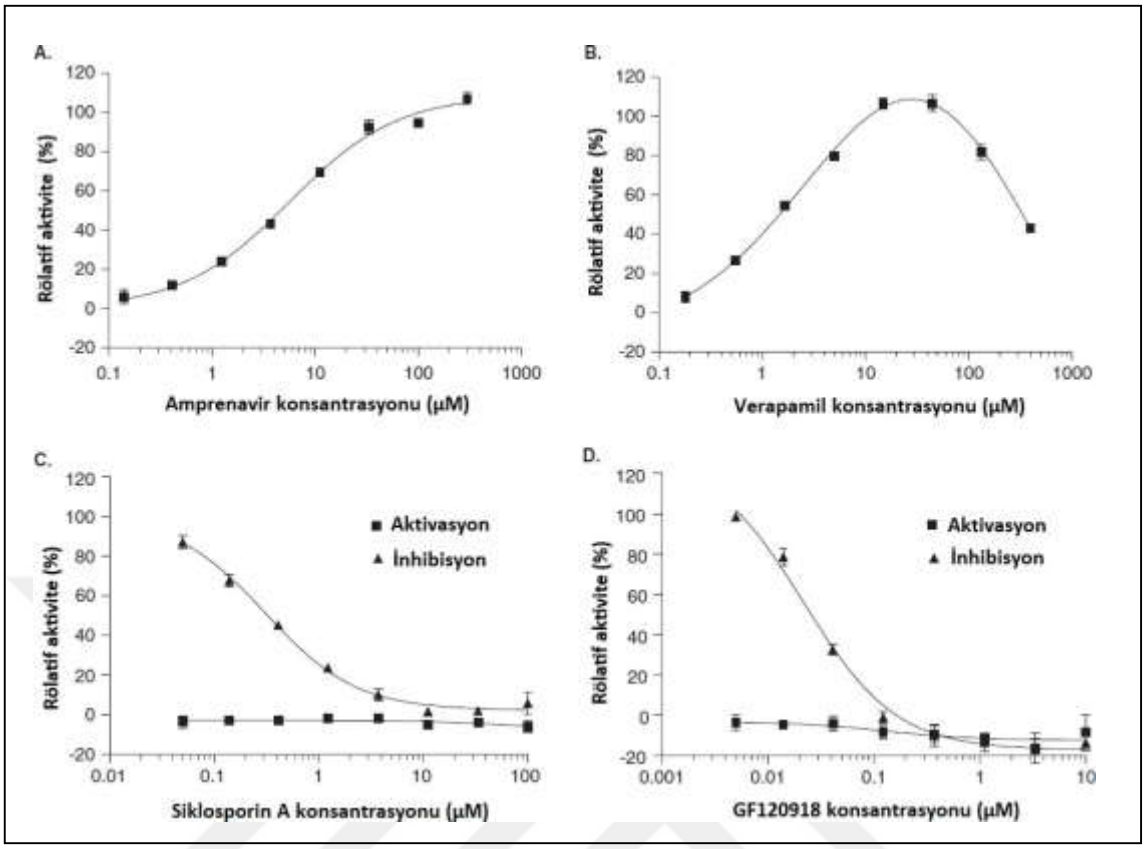


Şekil 2-14: Veziküler Taşınma ve ATPaz Aktivite Deneyi- Glavinas ve ark. (2008)'den değiştirilerek.

A) Veziküler taşınma deneyi. Veziküllerde bulunan efluks taşıyıcısı, bileşikleri assay buffer'dan veziküllere ATP'ye bağımlı bir şekilde taşır. İçeride tutunmuş olan bileşikler, numunenin hızlı bir şekilde fıltrasyonu sonrası uygun bir metotla ölçülür.

B) ATPaz aktivite deneyi. Taşıma işlemi için ATP gerekmektedir. Hidrolize ATP oranı substrat moleküllerin varlığında artar; inhibitörlerin varlığında ise azalır. Hidrolize ATP miktarı açığa çıkan inorganik fosfat (P_i) miktarı ölçülerek belirlenir.

ATPaz deneyinde taşıyıcı proteinin substratı olan ilaçların çoğu farklı konsantrasyonlarda "*çan eğrisi*" şeklinde bir grafik göstermektedir: Düşük konsantrasyonlarda ATPaz aktiviteleri artmakta, yüksek konsantrasyonlarda ise azalmaktadır. Bu fenomen için kabul edilen hipotez iki bağlanma alanı modelidir (two-binding-site model). Taşıyıcı, substrat molekülü için iki farklı bağlanma alanı içermektedir; bunlardan biri sitoplazmik veya transmembranal alanlarda lokalize yüksek affiniteli aktive/taşıyıcı alan, diğeri ise ekstrasellüler alanlarda lokalize olan düşük affiniteli inhibitör alan "*salım bölgesi*" olarak adlandırılmıştır (Litman ve ark. 1997; Buxbaum 1999; Al-Shawi ve ark. 2003). İki bağlanma bölgesinin bağıl affinitesinin farklı substratlar için farklı olması sonucu farklı ATPaz eğrileri oluşmaktadır. İki bağlanma alanının affiniteleri çok farklıysa (inhibitör alanın affinitesi, aktivasyon alanının affinitesinden çok daha düşükse) "*Michaelis-Menten"* tipi eğriler gözlenmekte (Şekil 2-15A); bağlayıcı alanlar birbirine yakınsa, gözlenen grafik *çan eğrisi* şeklinde olmaktadır (Şekil 2-15B). ATPaz deneyinde etkileşimlerin gözden kaçmaması için ilaçlar arası etkileşimin geniş bir aralıkta çoklu konsantrasyonlarda ölçülmesi gerekmektedir (Glavinas ve ark. 2008). ATPaz eğrilerinin çan eğrisi şeklinde olması, test bileşiğinin yüksek konsantrasyonlarda renk reaksiyonu ile substrat etkileşiminden de ortaya çıkabilmektedir (Shirasaka ve ark. 2006).



Şekil 2-15: Başlıca ATPaz eğrileri tipik örnekleri - Glavinas ve ark. (2008)'den değiştirilerek

A) Michaelis–Menten.

B) Çan eğrisi (Bell-shaped).

C) Yavaş taşınan bileşik.

D) İnhibitör.

ABC taşıyıcılarının bazı substratları, membran preparatlarının vanadata duyarlı ATPaz aktivitesini Michaelis-Menten kinetiğine uygun şekilde stimüle etmektedir. Diğer substratlar, düşük konsantrasyonlarda stimülan, yüksek konsantrasyonlarda inhibitör görevi görür ve çan eğrisi şeklinde bir grafik oluştururlar. Daha yüksek konsantrasyonlardaki inhibisyonun, taşıyıcının ekstrasellüler bölmedeki sekonder, düşük affiniteli bir bağlanma alanından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yavaş taşınan bileşikler ve inhibitörler, temel vanadata duyarlı ATPaz aktivitesini uyarmaz, ancak güçlü bir substrat varlığında ölçülen ATPaz aktivitesini inhibe eder. Bu iki tür etkileşim ATPaz deneyleri kullanılarak ayırt edilemez.

Bazı bileşiklerin taşıyıcı protein tarafından çok yavaş taşınması sonucu saptanabilir miktarda inorganik fosfat açığa çıkmayan düşük bir ATP hidroliz oranı meydana gelmektedir. Bu tür etkileşimlerin tipik bir örneği, siklosporin A'nın ABCB1 aracılı taşınmasıdır. Siklosporin A'nın ABCB1 tarafından taşındığı gösterilmişse de ATPaz deneyinde taşıyıcının ATPaz aktivitesinin stimülasyonu tespit edilememiştir

(Goldberg ve ark. 1988). Yanlış negatif sonuçların sayısını azaltmak için, ATPaz deneyinin inhibisyon modunun da gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu durumda, yüksek hızla taşınan bir substrat tarafından tetiklenen taşıyıcının, maksimum taşıyıcı ATPaz aktivitesinin modülasyonu ölçülmektedir. Yavaş taşınan bileşikler yüksek hızla taşınan substratlarla yarışarak taşıyıcı ATPaz aktivitesini engellemektedir. ATPaz deneyi ile siklosporin gibi yavaş taşınan substratlar ve GF120918 gibi inhibitörler ayırt edilememektedir. Ancak yavaş taşınan substratlar için ATPaz aktivasyon deneyinde belirlenemeyen etkileşim gösterilmektedir (Şekil 2-15 C ve D).

ATPaz deneyi ilaç endüstrisinde ABCB1 (P-gp) için en yaygın kullanılan tarama araçlarından biridir. Hem aktivasyon hem de inhibisyon koşulları altında taşıyıcı-ilaç etkileşimlerinin çoğunu tespit eden basit ve tekrarlanabilir bir deneydir. ATPaz deneyi günümüzde BCRP gibi efluks taşıyıcıları için de gerçekleştirilebilmektedir ve klinik açıdan olası etkileşimlerde taşıyıcılar için önemli bir tarama aracı olduğu bildirilmektedir (Glavinas ve ark. 2008).

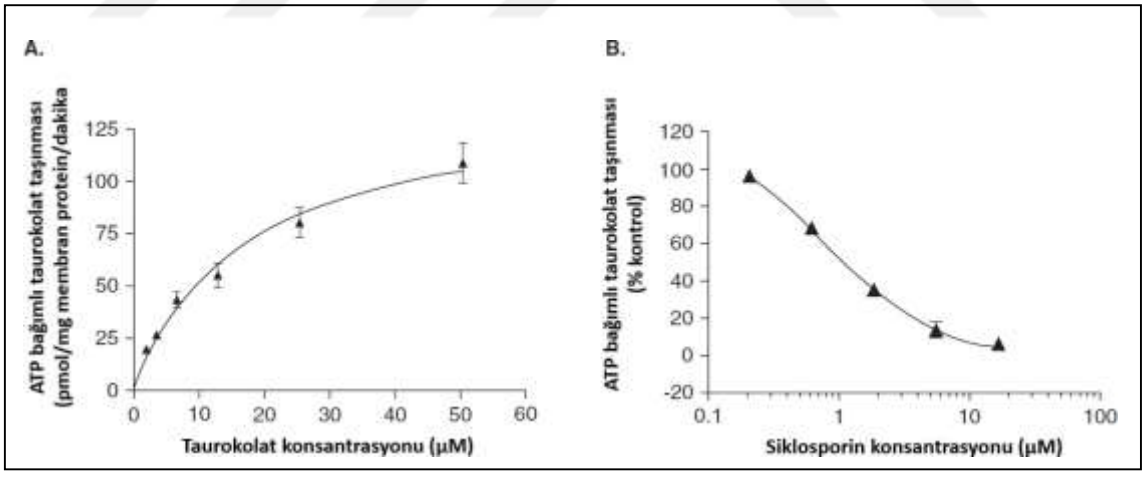
2.5.2. Veziküler Taşınma Deneyi (Vesicular Transport Assay)

Veziküler taşınma deneyi, moleküllerin ABC taşıyıcıları tarafından direkt translokasyonunu belirlemek için keşfedilen ilk membran bazlı deneydir (Şekil 2-14A). Taşıyıcının substratı olan bileşik veya ilaçlar ATP'ye bağımlı bir şekilde vezikküllere alınmaktadır. Vezikküllerin inkübasyon solüsyonundan ayrılması için cam fiber filtreler veya nitroselüloz membranlar ile hızlı filtrasyon uygulanmaktadır ve böylece vezikküllerin içinde hapsolan test bileşiği filtre üzerinde tutunmaktadır (Bakos ve ark. 1998). Taşınan işaretlenmemiş moleküllerin miktarı HPLC, LC/MS ve LC/MS/MS ile belirlenebilmektedir. Alternatif olarak bileşikler radyoaktif işaretleme, fluoresans veya fluoresans tagı ile filtre üzerinde tutunan radyoaktivite veya fluoresans miktar ölçülebilmektedir (Glavinas ve ark. 2008).

İnsekt hücreleri, transfekte memeli hücre hatları veya yapay membran vezikülleri gibi çeşitli membran tiplerinin kullanıldığı veziküler taşınma çalışmaları bildirilmiştir (Bakos ve ark. 1998; Sharom ve ark. 1999; Zeng ve ark. 2000; Glavinas ve ark. 2007). Bu deney, substratın hücre membranı boyunca dispozisyonunu ölçme avantajına sahiptir. Dezavantajları, orta ile yüksek pasif permeabiliteye sahip bileşiklerin vezikküllerin içinde tutunamaması ve bu bileşik sınıfları ile doğrudan taşıma ölçümlerinin gerçekleştirilmesinin zor olmasıdır (Glavinas ve ark. 2008).

Veziküler taşınma deneyi direkt taşınmanın yanında, etkileşen ilaçların bir haberci bileşiğin taşınma oranını değiştirmesiyle 'indirekt' olarak da gerçekleştirilebilir (Stieger ve ark. 2000). Bu deney tipinin özellikle olası ilaç-ilaç etkileşimlerinin ve ilaç-endojen substrat etkileşimlerinin saptanması için uygun olduğu düşünülmektedir. Bu deney, bileşiklerin pasif geçirgenliğine duyarlı değildir ve bu nedenle etkileşen tüm bileşikler tespit edilmektedir. Bununla birlikte, indirekt bir yöntem olarak test edilen bileşiğin, taşıyıcının bir inhibitörü mü yoksa taşıyıcının bir substratı olup olmadığı ya da işlevini yarışmalı bir şekilde inhibe edip etmediği hakkında veri elde edilememektedir (Glavinas ve ark. 2008).

İndirekt veziküler taşınma deneyinin tipik bir örneği, ABCB11 (BSEP) ile taurokolat taşınmasının inhibisyonunun saptanmasıdır. MRP2 gibi ABCB11 de hepatositlerin kanaliküler membranında lokalizedir; kolat konjugatlarının safraya taşınmasından sorumludur (Stieger ve ark. 1992). Taurokolat taşınmasının inhibisyonu, bir bileşiğin kolestatik potansiyelini tahmin etmek için indirekt veziküler taşınma deneyi gerçekleştirilerek belirlenebilmektedir (Şekil 2-16).



Şekil 2-16: Direkt (A) ve indirekt (B) veziküler taşınma deneylerinin tipik örnekleri- Glavinas ve ark. (2008)'den değiştirilerek

Yapılacak deney seçimi, i) ilaç-taşıyıcı etkileşimi, etkileşim mekanizması (substrat - inhibitör), ilaç-ilaç etkileşimi, ilaç-endobiyotik etkileşimi gibi konulara ve ii) bileşiğin pasif geçirgenliğine bağlı olarak yapılmaktadır (Tablo 2-5).

Tablo 2-5: Farklı membran bazlı ABC taşıyıcı deneylerinin özeti - Glavinas ve ark. (2008)'den değiştirilerek

Deney	**Deney tipi**	**Permeabilite**	**Belirlenen etkileşim**
ATPaz aktivite deneyi*	Aktivasyon	Yüksekten düşüğe	Yüksek hızda taşınma
	İnhibisyon	Yüksekten düşüğe	Yavaş taşınan bileşikler ve inhibitörlerin saptanması
Veziküler taşınma deneyi*	Direkt	Çok düşük	Direkt taşınma ölçümü, kinetik veri için uygun
	İndirekt*	Yüksekten düşüğe	Taşıyıcı ile etkileşen bileşiğin belirlenmesi, ilaç-ilaç etkileşim modelleri

*Çalışmamızda ATPaz aktivite deneyleri ve veziküler taşınma inhibisyon deneyleri yapılmıştır.

2.6. ABC Taşıyıcı Proteinlerinin İlaç Etkileşimlerindeki Rolünün İncelenmesinde Kullanılan *İn vitro* Hücre Bazlı Deneyler

Farmakoloji çalışmalarında, genetik olarak belirli bir ABC taşıyıcısını aşırı eksprese eden hücre dizileri üzerinde deneyler yapılmaktadır. Memeli hücre dizilerinin yanı sıra bakteri, insekt, maya ve Xenopus oosit hücreleri de ABC proteinlerinin karakterizasyonunda kullanılmaktadır (Evans ve ark. 1995; Litman ve ark. 2001; Ozvegy ve ark. 2001; Cai ve Gros 2003; Janvilisri ve ark. 2003; Lee ve Altenberg 2003). Bu heterolog ekspresyon sistemleri büyük oranda belirlenen proteini üretmektedir. İnfluks ve efluks taşıyıcılarının kombine rolünü incelemek için, ABC taşıyıcılarını ve influks taşıyıcılarını stabil bir şekilde eksprese eden hücre dizileri daha karmaşık ADME (absorpsiyon, dağılım, metabolizasyon ve eliminasyon) ve toksikoloji deney sistemlerinde kullanılmaktadır. Hücre bazlı tekniklerin, taşınmanın kinetik parametrelerinin değerlendirilmesi için uygun olduğu belirtilmektedir (Szakacs ve ark. 2008).

2.6.1. Sitotoksisite Deneyleri (Cytotoxicty Experiments)

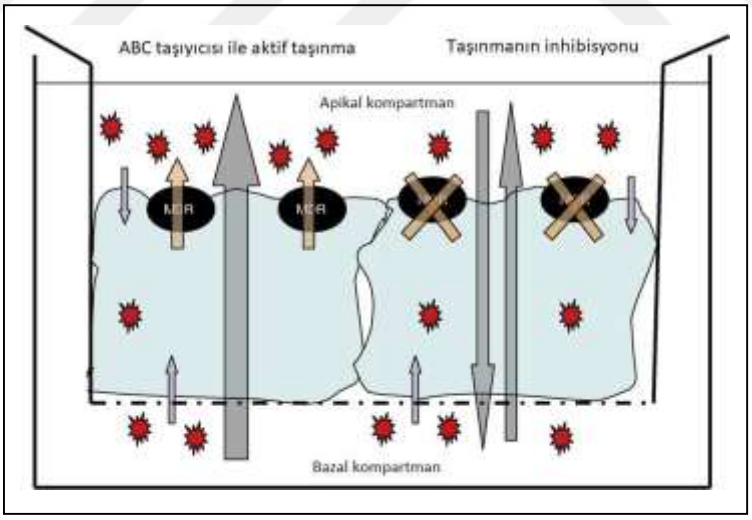
Sitotoksisite deneyi, ABC taşıyıcıların substratlarını ve inhibitörlerini test etmede yaygın olarak kullanılmaktadır. ABC proteinini aşırı eksprese eden stabil hücre dizileri, test edilen ilacın artan konsantrasyonlarında kültüre edilir. Sağ kalan hücreler sayılarak IC50 değeri (hücrelerin yarısını öldüren ilaç konsantrasyonu) belirlenir. Elde edilen IC50 değeri taşıyıcı proteini eksprese etmeyen parental hücrelerdeki değer ile karşılaştırılarak değerlendirilir. İnhibitörler ve geri dönüşüm (reversal) ajanlar da bu yöntem kullanılarak identifiye edilebilmektedir. İnhibitörler, toksik etkisi iyi bilinen bir substratın, taşıyıcı proteinleri yüksek oranda eksprese eden hücrelerdeki toksisitesini artırırlar. Bu test kantitatif olmasına karşın, antiproliferatif aktivite gösteren bileşiklerle sınırlıdır (Szakacs ve ark. 2008).

2.6.2. Transsellüler (Vektörel) Taşınma Deneyi (Transcellular Transport Assay)

İn vivo koşullarda, ilaçların emilimi (bağırsak epitel hücreleri), dağılımı (kan-beyin bariyeri endotel hücreleri) veya atılımı (hepatositler, proksimal tübül epitel hücreleri) için farmakolojik bariyerlerin aşılması gerekmektedir.

Bu transselüler (hücreler arası) hareket, tek sıra hücresel efluks (vektörel taşınma) deneyleri ile modellenmiştir. Hücresel efluks ölçümlerinde ABC taşıyıcısının direkt taşıma aktivitesi ve test bileşiğinin polarize edilmiş tek sıralı hücreler yoluyla geçirgenliği

değerlendirilmektedir. Hücreler bir membran yüzeyi üzerine (bir transwell içinde) ekilir ve % 100 hücre doluluk oranında (confluency), test bileşiği apikal veya bazolateral çözeltiye eklenir. Verilen bileşiğin belirlenen zaman noktalarında konsantrasyonu hem apikal hem de bazolateral bölmelerde belirlenir. Apikal ila bazolateral (A – B) ve bazolateral ile apikal (B – A) permeabilitesi belirlenir ve ABC taşıyıcısının fonksiyonunu yansıtan iki taşınma oranı hesaplanır. P-gp veya BCRP gibi apikal olarak lokalize efluks taşıyıcılarında, bazolateralden apikale efluks daha büyük olmaktadır (B – A > A – B) (Adachi ve ark. 2001; Imai ve ark. 2003). Net geçiş oranı 2'den büyük olduğunda, genellikle P-gp'nin aracılık ettiği taşınmayı gösterir. Bu oran, bazolateral lokalize olarak fonksiyon gösteren MRP1'de tam tersinedir (Evers ve ark. 1996). İndirekt kullanımda, bilinen substratların B – A ve A – B taşıma oranları, test edilen bileşiğin varlığında ve yokluğunda belirlenir. Test edilen bileşik ABC taşıyıcısı ile etkileşime girdiğinde, taşıma oranları arasındaki fark azalmaktadır. Bu deneyde, iyi tanımlanmış ABC taşıyıcı substratları ve spesifik inhibitörlerin kullanılması gerekmektedir (Szakacs ve ark. 2008). (Şekil 2-17).



Şekil 2-17: Apikal olarak lokalize olmuş bir ABC taşıyıcısı tarafından transselüler taşınma modeli - Szakacs ve ark. (2008)'den değiştirilerek

Bu deneyde kullanılan hücre serilerinde, uygun membran kompartmanında polarize edilen ABC proteini eksprese edilmelidir. En sık kullanılan hücre serileri; insan kolon adenokarsinomu (Caco-2), Madin-Darby köpek böbrek epitel (MDCK) ve domuz

böbrek epitel (LLC-PK1) hücre serileridir. Caco-2 hücreleri, apikal yüzeyde iyi tanımlanmış fırça kenarlığı ve polarize edilmiş tek sıralı hücreler oluşumuyla bağırsak epitel hücrelerine benzeyen özelliklere sahiptir. Caco-2 tek sıralı hücreler boyunca taşıma hızının ölçülmesinin, bağırsak duvarı boyunca emilimi modellediği düşünülmektedir. ABC taşıyıcılarının spesifik rollerini oluşturmak için, Caco-2 hücreleri spesifik pompa inhibitörleri ile birlikte kullanılır. Alternatif olarak, köpek böbrek hücre dizileri MDCKI, MDCKII veya domuz böbrek epitel hücreleri LLC-PK1'in transfekte edilmiş versiyonları kullanılmaktadır (Sugiyama ve ark. 1999). Dağılım modeli için beyin endotel hücreleri, konjunktiva ve alveoler epitel hücreleri gibi primer kültürlenmiş hücreler de kullanılmaktadır (Xia ve ark. 2007). Bu deneyde test edilecek bileşiklerin ya da ilaçların hücreler için toksik olmaması (deneyin zaman çerçevesi içinde) ve orta derecede bir pasif difüzyon (geçirgenlik) oranına sahip olmaması gereklidir. Uzun hücre kültürleme süresi, kültürleme koşulları ve pasaj sayısına bağlı değişen taşıyıcı ekspresyon seviyeleri gibi teknik zorluklara rağmen, transselüller taşınma deneyi *in vivo* etkileşimi karşılayan en iyi *in vitro* model olarak kabul edilmektedir (Szakacs ve ark. 2008).

2.6.3. Akümülasyon Deneyleri (Accumulation Assays)

ABC taşıyıcıları tarafından taşınan substratlar bu taşıyıcı proteini eksprese eden hücrelerde daha düşük akümülasyon göstermektedir. Taşıyıcı proteinlerin inhibitörleri ise substrat ilaçların hücrelere akümülasyonu arttırarak parental hücrelerdeki seviyelere yakın duruma getirmektedirler. Substratın hücredeki düzeyleri fluoresans veya radyoaktif işaretleme ile doğrudan ölçülebilir ve kararlı durum akümülasyonu, efluksu veya hücre içine alımı belirlenebilir. BCRP fonksiyonunun tespiti ve ilaç görüntülemesinde Hoechst 33342 boyası akümülasyonu izlenir (Ozvegy-Laczka ve ark. 2005). P-gp substratları rodamin 123 ve daunomisin, P-gp ve BCRP substratı BODIPY-prazosin veya BCRP substratı feoforbit A gibi fluoresans substratlar flow sitometri ile taşıyıcı protein inhibitörlerinin tespit edilmesinde kullanılmaktadırlar (Szakacs ve ark. 2008).

2.7. ABC Taşıyıcı Proteinlerinin İlaç Etkileşimlerindeki Rolünün İncelenmesinde Kullanılan *İn Vivo* Deneyler

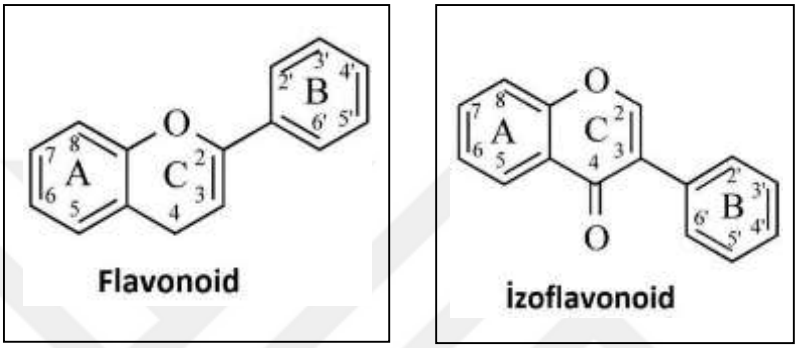
Taşıyıcı proteinlerin *in vivo* fonksiyonu farklı yaklaşımlar kullanılarak değerlendirilebilmektedir. Son yıllarda çok sayıda taşıyıcı gen knockout (taşıyıcı eksprese etmeyen) ve doğal olarak taşıyıcısı eksik hayvan modelleri üretilmiştir. Taşıyıcı gen knockout fareleri genetik olarak tasarlanmıştır ve farmakokinetik-toksikolojik çalışmalarda çok fazla kullanım alanı bulmuştur. Knockout modeller, taşıyıcıların fizyolojideki rolünü, kan-doku bariyerlerinin korunmasını, ksenobiyotiklerin/endojen bileşiklerin emilimini ve atılımının gösterilmesine katkıda bulunmuştur (Giacomini ve ark. 2010; Klaassen ve Alleksunes 2010). ABCG2 knockout fareler, ilk olarak Jonker ve ark. (2002) tarafından üretilmiştir. Genetiği değiştirilmiş ABCG2 knockout farelerinin kullanımının, bu efluks pompasının *in vivo* fonksiyonunun incelenmesinde yararlı bir araç olduğu kanıtlanmıştır (Vlaming ve ark. 2009a). Esas olarak ABCG2 knockout farelerinin kullanımına dayanan çalışmalar, ABCG2'nin kan-beyin, kan-testis ve kan-fetal bariyerlerin korunmasına önemli katkılarını ortaya koymuştur. Ayrıca, hematopoietik hücreler, karaciğer ve harder bezinden porfirin ve porfirin konjugatlarının ekstrüzyonunun yanı sıra, B2 vitamini (riboflavin) ve diğer vitaminlerin (biyotin, K vitamini) ana sütüne geçişini de içeren ABCG2'nin farklı birçok fizyolojik fonksiyonu gözlenmiştir. Bununla beraber, knockout farelerin günümüzde kullanılan birçok ilaç için ve yeni keşfedilen ilaçların karakterizasyonunda ABCG2'nin *in vivo* etkilerini belirlemede yararlı araçlar olduğu düşünülmektedir (Vlaming ve ark. 2009a). P-gp yokluğunun ilaçların biyoyararlanımı üzerindeki etkisini incelemek için bazı transgenik hayvan modelleri (double knockout fareler, *mdr1a* ve *mdr1b* gibi) üretilmiştir (Schinkel ve ark. 1996). Lapatinib ve diğer bileşiklerle tedavi edilen *Abcg2*$^{-/-}$/*Mdr1a*$^{-/-}$/*Mdr1b*$^{-/-}$ triple knockout farelerinde elde edilen kanıtlar, ABCG2 ve P-gp'nin kan-beyin bariyerinde kombine bir etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir (De Frutos 2014; Polli ve ark., 2009; Tang ve ark., 2012; Tang ve ark., 2013).

Knockout hayvan modelleri, taşıyıcıların ilaç moleküllerinin farmakokinetiği, farmakodinamiği ve ilaç-ilaç etkileşimleri üzerindeki etkisini değerlendirmede önemli araçlar haline gelmiştir (Xia ve ark., 2005; Vlaming ve ark., 2009a). Taşıyıcı aracılı efluks ve ilaç moleküllerinin geri alımının daha iyi anlaşılması için bu metodolojilerin kullanılması gerekmektedir. *İn vivo* çalışmaların pahalı ve düşük verimli olması; ayrıca, tür, ırk, cinsiyet, diyet ve barınma durumu farklılıkları gibi mekanizmalar, knockout ve

mutant hayvan modellerinin kullanılmasını sınırlandıran faktörlerdir. Tüm bu faktörler verilerin yorumlanmasında ve türler arasında bulguların ekstrapolasyonunda dikkatli olunması edilmesi gereken konulardır (Giacomini ve ark. 2010). Transgenik hayvan modelleri ile alınan sonuçların yorumlanmasında dikkatli olunması gerektiği, bir taşıyıcının silinmesi diğerinin ekspresyonunda artışa neden olabileceği bildirilmektedir (Xia ve ark. 2005). Örneğin, beyindeki P-gp, Mrp1, Mrp4 ve Oatp2'nin mRNA seviyeleri *Abcg2*$^{-/-}$ farelerde değişmese de (Lee ve ark., 2005), beyin mikrodamarlarında *Mdr1a/1b*$^{-/-}$ farelerde wild tip farelere göre yaklaşık üç kat daha fazla ABCG2 mRNA var olduğu bulunmuştur (Cisternino ve ark., 2004). Bununla birlikte, farklı taşıyıcıların mRNA seviyesindeki bu farklılıklar, protein ekspresyonunda değişiklik olduğunu göstermemektedir (Agarwal ve Elmquist, 2012; De Frutos 2014).

2.8. Flavonoidler

Flavonoidler, bitki ve meyvelerde yaygın olarak bulunan polifenollerdir. Bu ürünlere lezzetini ve rengini veren flavonoidler ayrıca birçok bitkisel ürünün ana bileşenidir (Zhang ve ark. 2004a). Flavonoidler, her biri en az bir aromatik hidroksil taşıyan ve bir karbon köprüsüyle bağlanan iki veya daha fazla aromatik halka içermektedir (Şekil 2-18).

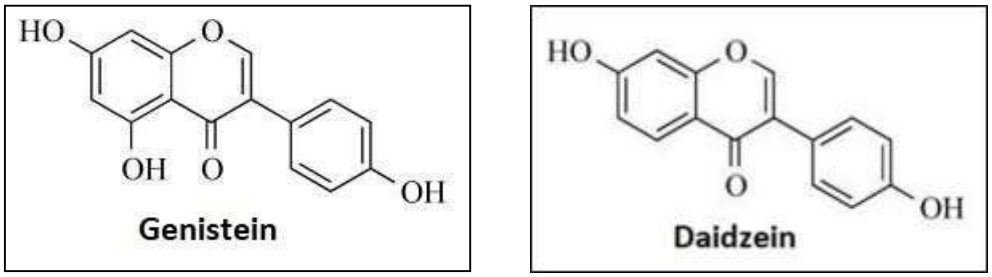


Şekil 2-18: Flavonoid ve İzoflavonoid Kimyasal Yapıları - Bircsak ve Aleksunes (2015)'den değiştirilerek

Flavonoidler, C halkasının değişimi ve oksidasyon durumuna göre şalkonlar, flavonoller, flavonlar, prosiyanidinler, flavan-3 oller (kateşinler), flavanonlar ve izoflavonlar gibi farklı alt sınıflara ayrılmaktadır (Morris ve Zhang 2006). Bu flavonoidlerin diyetteki ana kaynakları alt gruplar arasında büyük farklılıklar göstermektedir (Neuhouser 2004; Arts ve Hollman 2005). Şalkonlar, şerbetçiotu ve birada bulunur. Gıdalarda en yaygın bulunan flavonoidlerden kuersetin, kaemferol ve mirisetin gibi flavonoller daha çok yapraklı sebzelerde, elmalarda, soğanlarda ve zarlı kabuksuz meyvelerde bulunur. Apigenin ve luteolin gibi flavonlar ve prosiyanidinler bazı sebze ve şaraplarda düşük oranda yer alır. Flavan-3-oller (kateşinler) yeşil çay, siyah çay, üzüm, elma, çikolata ve kırmızı şarapta yaygındır. Narenciye flavonoidleri olarak da bilinen naringenin ve hesperetin gibi flavanonlar narenciye ve meyve sularının yapısını oluşturur.

Son grup olan genistein, daidzein ve biokanin A gibi izoflavonlar soya fasulyesinde yer alır ve prekürsörleri çok çeşitli bitkilerde bulunan lignandlarla birlikte fitoöstrojen grubunu oluşturur (Yao ve ark. 2004). Genistein ve daidzein gibi

izoflavonoidlerin ABC taşıyıcılarıyla etkileşime giren kimyasal yapıları Şekil 2-19'da gösterilmiştir.



Şekil 2-19: Genistein ve daidzein kimyasal yapısı - Bircsak ve Aleksunes (2015) 'den değiştirilerek

Yüksek oranda flavonoid alımının kardiyovasküler hastalıklar, osteoporoz ve kanserin önlenmesi gibi yararlı etkileri olduğu bildirilmektedir (Watanabe ve ark. 2002). Flavonoidlerin biyolojik sistemlerde koruyucu etkileri bileşiğin yapısal ve fiziko-kimyasal özelliklerine bağlıdır (Heim ve ark. 2002). Doğada bulunan flavonoidler glikozillenirler; buna karşın ince bağırsaktan geçiş sırasında veya kolondaki bakteriyel aktivite ile dekonjugasyona uğrarlar. Aglikon formundaki flavonoidler emilir ve dokular ve/veya bağırsak mikroflorası tarafından kapsamlı bir biyotransformasyona uğrarlar (Manach ve ark. 2004). Karaciğer ve enterositlerde faz II konjugasyonu glukuronidler, sülfatlar, metil konjugatları ve az miktarda serbest aglikonların oluşumuna yol açar (Piskula ve Terao 1998; Spencer ve ark. 1999; Crespy ve ark. 2001; Boersma ve ark. 2002; Manach ve ark. 2004; Spencer ve ark. 2004). Aglikonlar, glikozitlerden daha güçlü antioksidanlardır (Heim ve ark. 2002). Glukuronidlerin kan dolaşımındaki yaygın flavonoid formlarından biri olduğu bulunmuştur (Zhang ve ark. 2007b). Hem bağırsak hem de karaciğere bağlanan konjuge metabolitler-efluks taşıyıcıları kompleksi enterohepatik sirkülasyona girer, bu da vücutta, özellikle tekrarlanan alımlarda flavonoid akümülasyonuna yol açabilir (Setchell ve ark. 2001; Walle ve ark. 2001).

Glukuronidler gibi metabolitlerin vücutta yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ve bu metabolitlerin bazılarının da biyoaktif olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle glukuronidlerin biyolojik aktivitelerinin araştırılması büyük önem taşımaktadır. Normal koşullarda glukuronidasyon ve sülfasyon gibi konjugasyon reaksiyonları farmakolojik

aktivitesi düşük bileşikler oluşumuna yol açmasına karşın, yapılan çalışmalarda flavonoidlerin glukuronid formlarının da biyolojik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Tukey ve Strassburg 2000; Rimbach ve ark. 2004; Zhang ve ark. 2007b). Bu kapsamda yapılan çalışmalarda kuersetin 3-O-glukuronid'in antiinflamatuar özelliklere ve anjiyogenez aktiviteye sahip olduğu ve kuersetin glukuronidlerinin insan akciğer kanseri hücre hattında büyümeyi inhibe ettiği gösterilmiştir (Donnini ve ark. 2006; Yang ve ark. 2006; Tribolo ve ark. 2008). Hem kuersetin hem de kuersetin 3-O-glukuronid ve (–)-epikateşin 5-O-glukuronidin antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Harada ve ark. 1999; Terao ve ark. 2001).

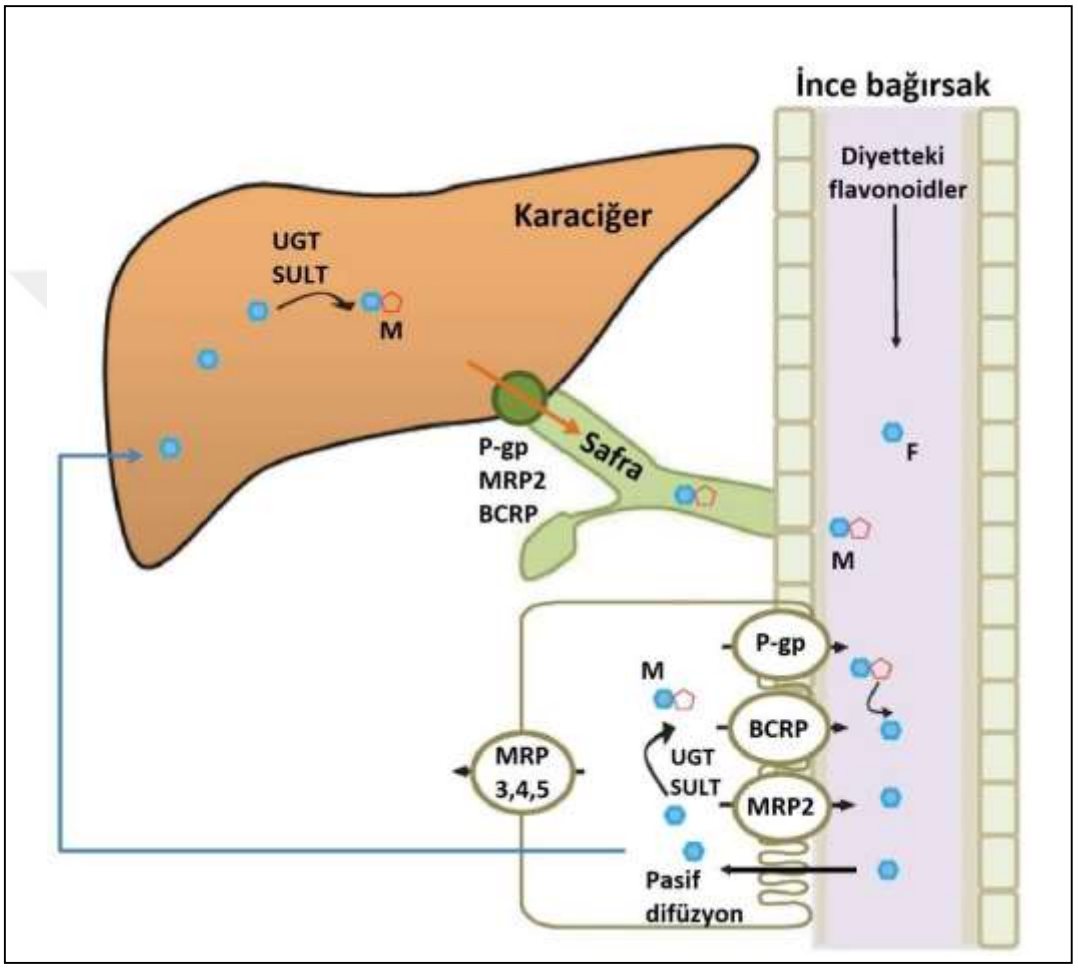
Yapılan bazı çalışmalarda, flavonoidlerin glukuronidasyona uğrayan kısmının biyolojik aktivitesini etkileyebileceği bildirilmiştir (Jovanovich ve ark. 1998). Daidzeinin biyotransformasyonunun son ürünü olan ekuol, yüksek antioksidan aktiviteye ve birçok doku üzerinde antiandrojenik etkilere sahip olabilmektedir (Setchell ve ark. 2002; Lund ve ark. 2004).

Flavonoidler ve metabolitlerinin farelerde, sıçanlarda ve insanlarda birçok dokuda bulunabildiği saptanmıştır (Manach ve ark. 2004). Doku metabolitleri spesifik geri alımı, eliminasyonu veya intrasellüler metabolizması nedeniyle kan metabolitlerinden farklı olabilmektedir. ABC taşıyıcıları ile flavonoidler arasındaki etkileşim emilim, biyotransformasyon ve dokularda dağılım gibi organizmadaki biyolojik etkilerin belirleyicisi olan süreçlerde kritik öneme sahiptir (Alvarez ve ark. 2010).

ABC taşıyıcılarından MRP1 ve MRP3'ün bazı flavonoidlerle etkileşime girdiği bildirilmiştir (Perez-Victoria ve ark. 1999; 2002; Conseil ve ark. 2000; Leslie ve ark. 2003; van Zanden ve ark. 2005). MRP1'in bağırsaktan emilim ve safrayla atılımda önemli bir rol oynamadığı düşünülmesine karşın glukuronid ve sülfat konjugatlarının substratı olması nedeniyle ilaçların dağılımını etkileyebildiği bildirilmektedir (Morris ve Zhang 2006; Aszalos 2008). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda MRP3'ün flavonoid metaboliti olan resveratrol-glukuronidi taşıdığı saptanmıştır. *MRP3* knockout farelerde, bu glukuronidin ve ana bileşik resveratrolün dağılımında değişim meydana gelmekte ve bu da *Mrp3*$^{(-/-)}$ farelerde daha düşük resveratrolün idrarla atılımına yol açmaktadır (Alvarez ve ark. 2010).

Gastrointestinal kanalda özellikle enterosit apikal membranında bulunan P-gp, BCRP ve MRP2 gibi taşıyıcı proteinler birçok substrat ksenobiyotiği, bağırsak lümenine

geri efluksu ile emilimi engellemektedir. Flavonoidler absorbe edildikten sonra bağırsak duvarında ve karaciğerde Faz I ve II ilaç metabolize enzim sistemi tarafından ilk geçiş etkisine uğrar ve genellikle bu durum düşük oral biyoyararlanım ile sonuçlanır (Giacomini ve ark. 2010) (Şekil 2-20).



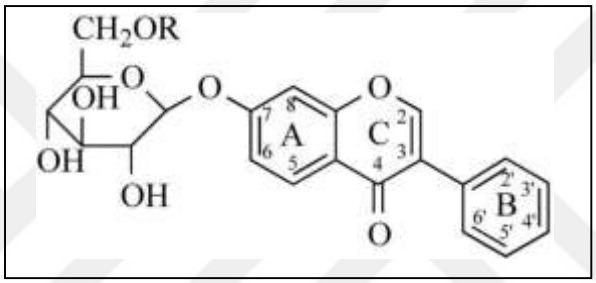
Şekil 2-20: Bağırsak ve karaciğerde flavonoidler (F) ve metabolitleri (M, flavonoid konjugatı) için başlıca dağılım ve metabolizma yolları- Li ve ark. (2013)'ten değiştirilerek

SULT: Sülfotransferaz; UGT: Üridin difosfoglukuronozil transferaz

2.8.1. İzoflavonoidler

İzoflavonoidler soya fasulyesi, kırmızı yonca, yer fıstığı, nohut ve yonca gibi *Leguminosae* familyasındaki bitkilerde doğal olarak bulunan sekonder metabolitlerdir (USDA 2013). İzoflavonoidler, nodülasyon ve azot fiksasyonuna yardımcı olmak için bakterileri bitki köklerine çekmektedir (Rolfe 1988). İzoflavonlar, polifenolik üç halka yapısı (A, B ve C) (Şekil 2-18) ile flavonoidler sınıfının bir alt kümesini temsil

etmektedir. B halkasının C2 yerine C3'te yer alması izoflavonları diğer flavonoidlerden ayırmaktadır. İzoflavonların en bol kaynağı genistein (yaklaşık 2,3 mg/kg), daidzein ve glisitin içeren soyadır (USDA 2013). Bunun yanında eser miktarda formononetin ve biokanin A da içermektedirler (Burdette ve Marcus 2013). Tofu (soya peyniri), tempeh (fermente soya), soya yağı, tahıllar gibi birçok soya ürünü bulunmaktadır (USDA 2013). Kırmızı yonca; biokanin A, daidzein ve genisteinin yanı sıra, büyük oranda formononetin içeren ve doğada yaygın olarak bulunan bir izoflavon kaynağıdır (Burdette ve Marcus 2013). İzoflavonlar bitkiler içinde glikozit (Şekil 2-21) (genistin veya genistein-7-O-β-D-glikozit) ve aglikon (genistein) şeklinde iki formda bulunurlar (Barnes 2010).



Şekil 2-21: İzoflavon glikozitlerin kimyasal yapısı - Bircsak ve Aleksunes (2015)'den değiştirilerek

Glikozitler, soya ve diğer bitkilerde aglikonlardan daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Song ve ark. 1998). Oral yolla alındıktan sonra izoflavon glikozitler, ağız boşluğunda ve ince bağırsaklarda epitelyal ve mikrobiyal β-glukozidazlar tarafından biyolojik aktivitesi yüksek aglikon formlarına dönüştürülür. (Akiyama ve ark. 1987; Day ve ark. 1998; Morito ve ark. 2001; Walle ve ark. 2005). İzoflavonların yaklaşık % 70-90'ı, karaciğerde sırasıyla UDP-glukuronoziltransferazlar (UGT'ler; UGT1A1, 1A8, 1A9, 1A10) ve sülfotransferazlar (SULT'lar; SULT1A1*2, 1E, 2E1) tarafından glukuronid ve sülfat konjügatlarına metabolize edilir (Doerge ve ark. 2000; Pritchett ve ark. 2008). Konjugasyon; monokonjugatlar (genistein-7-glukuronid, G-7-G; genistein-4′-glukuronid, G-4′- G; genistein-7-sülfat, G-7-S; genistein-4′-sülfat, G-4′-S) ve dikonjugatlar (genistein-7-glukuronid-4p-glukuronid; genistein-7-sülfat- 4p-sülfat; genistein-7-glukuronid-4p-sülfat; genistein-7-sülfat-4p-glukuronid) oluşturmak için esas olarak ana halka sistemi üzerindeki C7 ve C4'te meydana gelir. Faz II metabolitleri bağırsak lümeni ve safra kanalına atıldıktan sonra dışkıyla elimine edilir ya

da izoflavonların reabsorpsiyonu ve enterohepatik resirkülasyonu sonucu bağırsak mikroflorası tarafından dekonjüge edilir (Sfakianos ve ark. 1997). İzoflavonoid metabolizmasının birincil yolu olmasa da, idrarda genistein, daidzein ve formononetin faz I oksidatif metabolitleri tanımlanmıştır (Kulling ve ark. 2001; Tolleson ve ark. 2002). İnsan karaciğer mikrozomlarında bulunan sitokrom P450 enzimleri, karaciğerdeki izoflavonların oksidasyonundan sorumludur. Bu kimyasalların faz I metabolizması, özellikle biokanin A ve formononetin için oksidatif demetilasyonu içerir. Biokanin A ve formononetinin insan karaciğer mikrozomları ile inkübasyonu, sırasıyla genistein ve daidzein oluşumuna neden olmuştur (Tolleson ve ark. 2002). İzoflavonların faz I metabolizmasının başka bir örneği, bağırsak bakterileri tarafından daidzeinden ekuol oluşumudur (Schröder ve ark. 2013). Ekuol, *in vitro* çalışmalarda prostat kanseri büyümesinin azaltılmasında daidzeinden daha etkili bulunmuş ve idrardaki varlığı meme kanseri riskinde azalma ile ilişkilendirilmiştir (Ingram ve ark. 1997; Hedlund ve ark. 2003). Elde edilen kanıtlar, nüfusun yaklaşık % 30-50'sinin daidzeinden ekuol üretebileceğini göstermektedir (Kelly ve ark. 1995; Rowland ve ark. 2000).

Genistein çeşitli gıda kaynaklarında yaygın bulunması ve biyolojik aktiviteye sahip olduğunu gösteren çok sayıda veri olması nedeniyle en sık çalışılan izoflavondur (Wang ve ark. 2004; Banerjee ve ark. 2008; Bitto ve ark. 2008; Wu ve ark. 2008a; Yan ve Spitznagel 2009). Özellikle, genistein ve diğer izoflavonların kanser önleyici ve/veya terapötik aktiviteye sahip olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Strom ve ark. 1999; Chen ve ark. 2003; Hussain ve ark. 2003; Constantinou ve ark. 2005; Bitto ve ark. 2008; Clarkson ve ark. 2011; Squadrito ve ark. 2013). Buna karşın, daha önceki çalışmalar genistein ve diğer izoflavonların kanser ilerlemesini teşvik ederek veya yaşamın erken dönemlerinde üreme gelişimine müdahale ederek insan sağlığını olumsuz etkilediğini göstermiştir (Allred ve ark. 2001; Ju ve ark. 2001; Newbold ve ark. 2001; Jefferson ve ark. 2002). İzoflavonlar tarafından üretilen biyolojik yanıtların çoğuna, östrojen reseptörü ve tirozin kinaz reseptörleri dahil olmak üzere hücresel proteinlerin aracılık ettiği düşünülmektedir. İzoflavonların östrojen reseptör agonistleri ve üreme fonksiyon modülatörleri olarak rol oynaması nedeniyle bu bileşikler fitoöstrojenler olarak tanımlanmaktadır (Barrett ve ark. 1965; Martin ve ark. 1978). İzoflavonların fenolik halka yapısı, bileşiklerin östrojen reseptörlerine bağlanmasına izin verir ve östrojen reseptörüne bağımlı genlerin transkripsiyonunu başlatır (Martin ve ark. 1978). İzoflavonlar östrojen reseptörü β'ya östrojen reseptörü α'dan daha fazla afinite ile bağlanır (Kuiper ve ark.

1998). Ayrıca izoflavonların, epidermal büyüme faktörü reseptörü dahil (genistein> prunetin> biokanin A> daidzein = genistin) A431 epidermoid kanser hücrelerinde tirozin kinaz enzimlerini inhibe edebileceği bildirilmiştir (Akiyama ve ark. 1987). Bu bulgular *in vitro* ve *in vivo* olarak doğrulanmıştır ve izoflavonların, kanser tedavisinde etkinliği arttırmak için kemoterapötik ajanlarla birleştirilebileceği öne sürülmüştür (Wegner ve ark. 1997; Aptel ve ark. 1999; Wang ve ark. 2004; Sakla ve ark. 2007; Yan ve ark. 2010). İzoflavonlar, östrojen ve tirozin kinaz reseptörlerinin yanında, ksenobiyotiklerin ve endojen bileşiklerin atılmasında rol oynayan meme kanseri direnç proteini (BCRP) efluks taşıyıcısı ile de etkileşime girebilmektedir. Bu bileşikler, BCRP'nin substratları ve ayrıca inhibitörleridir. Ayrıca, izoflavonların çoğu, eşzamanlı olarak uygulanan diğer BCRP substratlarının kemorezistansı ve *in vivo* farmakokinetiğini değiştirmektedir (Bircsak ve Aleksunes 2015).

2.8.2. BCRP İnhibitörleri Olarak Gösterilen İzoflavonlarla Yapılan Çalışmalar

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, izoflavonların BCRP tarafından taşınan bileşiklerin farmakokinetiğini veya farmakodinamiğini değiştirme yeteneği araştırılmaya başlanmıştır. İzoflavonların, kemoterapötik bir ilacın etkinliğini arttırması gibi faydalı etkileri olabilmektedir. Bununla birlikte, izoflavonların BCRP'yi inhibe etmesi sonucu kemoterapötiklerin toksisitesinde artış veya etkinliğinde azalma gibi negatif sonuçlar da ortaya çıkabilmektedir. Bugüne kadar, BCRP fonksiyonunu inhibe eden izoflavonları tespit etmek ve eşzamanlı olarak tüketilen izoflavonların (örneğin soya yönünden zengin diyet) BCRP tarafından taşınan ilaçlarla potansiyel etkilerini daha iyi anlamak için çeşitli *in vitro* ve *in vivo* deneysel modeller kullanılmıştır (Bircsak ve Aleksunes 2015).

BCRP inhibitörleri, BCRP inverted plazma membran vezikülleri kullanılarak belirlenebilmektedir. Bu deneyde inhibitörlerin, BCRP prob substratının veziküler akümülasyonunda ciddi bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır. BCRP veziküllerinde, BCRP substratı olan 3H-metotreksatın (100 μM) aglikonlar tarafından (genistein> biokanin A> glisitin> formononetin> daidzein) ATP'ye bağlı taşınmasını azaltma eğiliminin glikozitlere oranla (biokanin A-glikozit, sissotrin> genistin> formononetin-glikozit, ononin>glisitin>daidzein) daha yüksek olduğu sıvı sintilasyon sayacı (liquid scintillation counting) ile belirlenmiştir (Tamaki ve ark. 2010). İnverted veziküllerde BCRP fonksiyonunu inhibe eden genistein konsantrasyonu, soya ürünlerinin tüketimini takiben dolaşımda bulunabilen genistein plazma konsantrasyonları aralığında

bulunmuştur (1–3 μM, n = 12 sağlıklı, gönüllü insanlar) (Gardner ve ark. 2009). İlginç bir şekilde, 1 mg/ml soya özütünün, BCRP'yi aşırı eksprese eden veziküllerde 3H-metotreksat alımını, BCRP inhibitörü FTC (5 μM) ile aynı ölçüde azalttığı saptanmış ve bu durumun soyada bulunan genistein, daidzein, glisitin ve glikozitleri gibi birçok bileşiğin BCRP fonksiyonunu kollektif olarak azalttığı bildirilmiştir (Tamaki ve ark. 2010).

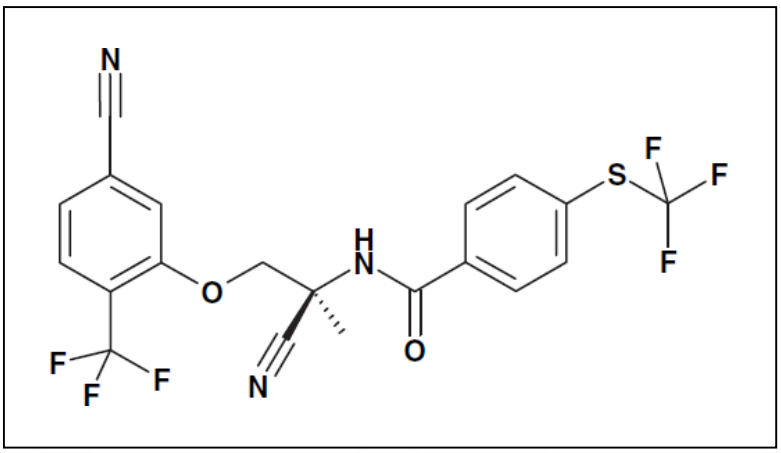
BCRP aracılı taşınmanın fonksiyonel inhibitörleri tespit etmede kullanılan bir başka membran bazlı yöntem ATPaz deneyidir. ATP hidrolizi, substrat taşınmasının indirekt bir göstergesi olarak ölçülür ve BCRP'ye spesifik bir fonksiyonel inhibitör varlığında azalır (Glavinas ve ark. 2007). Laktasyondaki bir ineğin meme bezinden izole edilen membranlarda, genisteinin (10 μM), mitoksantron tarafından stimüle edilen BCRP ATPaz aktivitesini azalttığı saptanmıştır. Bu bilgiler ışığında genisteinin, laktasyondaki hayvanların ve insanların sütüne ilaçların potansiyel olarak taşınmasını değiştirebileceği öne sürülmüştür (Pulido ve ark. 2006).

Hayvan yemlerinde ve rasyonlarda bulunan izoflavonlar birçok ilacın *in vivo* farmakokinetiğini ve farmakodinamiğini değiştirebilmektedir. Bu nedenle özellikle laktasyon dönemindeki hayvanlara BCRP substratı ilaçların uygulanmasına dikkat edilmesi gerekmektedir. Buna karşın, söz konusu fonksiyon ile süte ksenobiyotiklerin geçişinin inhibe edilmesinin yavrunun ilaca bağlı toksik etkilerden korunmasına yol açması gibi terapötik kullanım alanları da bulunmaktadır. Ayrıca ruminantlarda enrofloksasin ve metaboliti olan siprofloksasin BCRP substratı ilaçlardır (Pulido ve ark. 2006; Haslam ve ark. 2011). Laktasyondaki koyunlarda yapılan bir çalışmada enrofloksasinin sütteki konsantrasyonunun genistein ile birlikte uygulanması sonucunda azaldığı saptanmıştır (Pulido ve ark. 2006). Benzer nitelikte yapılan diğer çalışmalarda ise danofloksasin ve nitrofurantoin ile izoflavonoidlerin kombine uygulanması sonucu soya yönünden zengin rasyonla beslenen grupta sütteki konsantrasyonlarında düşüş saptanmıştır. (Perez ve ark. 2009b; 2013).

Bcrp $^{-/-}$ farelerde yapılan çalışmalarda, *in vivo* koşullarda besin-ilaç etkileşiminin potansiyel etkileri ve BCRP'nin fonksiyonel rolü incelenmiştir. İzoflavonların yokluğunda, wild tip farelere oranla *Bcrp* $^{-/-}$ farelerde nitrofurantoinin plazma AUC değerinin artması nedeniyle bir BCRP substratı olduğu doğrulanmıştır (Merino ve ark. 2005b; Merino ve ark. 2010). Genistein ve daidzeinin wild tip farelerde kontrol

grubundakilere oranla nitrofurantoinin plazma AUC üzerindeki etkisinin 30. dakikada daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Merino ve ark. 2010). Ayrıca, genistein ve daidzeinin wild tip farelerin süt ve safrasındaki nitrofurantoin konsantrasyonlarını, kontrol grubundaki farelere oranla 30. dakikada önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır (Merino ve ark. 2010). Bu çalışma, izoflavonların neden olduğu ilaç farmakokinetiği üzerindeki değişimleri gözlemlemek için 30. dakika gibi erken zaman noktalarında alınan numunelerin incelenmesinin gerekli olabileceğini düşündürmüştür. Koyunlardakilerle birleştirilen bu sonuçlar, soyadan zengin rasyonla beslenen laktasyondaki hayvanların yavrularının sütteki nitrofurantoine maruz kalma potansiyelini azaltabileceğini göstermektedir (Bircsak ve Aleksunes 2015). Biokanin A'nın BCRP substratlarının farmakokinetiğini değiştirmeye yönelik etkisinin incelendiği bir başka çalışmada erkek wild tip ND4 Swiss Webster farelere intravenöz 10 mg/kg biokanin A sonrasında 5 dakika içinde intravenöz 5 mg/kg mitoksantron uygulanmıştır. Biokanin A kontrol grubundaki farelere oranla böbrek ve dalaktan mitoksantron eliminasyonunu arttırmıştır, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (An ve Morris 2010). Bu bulgular biokanin A'nın BCRP aracılı mitoksantron taşınmasının bir inhibitörü olduğunu gösteren aynı çalışmanın *in vitro* sonuçlarıyla tutarsızlık olduğunu ve BCRP inhibisyonunu ölçmede *in vitro* ve *in vivo* modeller arasında kopukluk olduğunu göstermiştir (Bircsak ve Aleksunes 2015).

2.9. Monepantel (MNP, AAT 1566)



Şekil 2-22: Monepantel kimyasal yapısı - Karadzovska ve ark. (2009)'den değiştirilerek

Antelmentiklerle tedavide nematodlara karşı ilaç direncinin artması yeni bir antelmentik sınıfı olan amino-asetonitril türevlerinin (AAT) keşfine neden olmuştur (Ducray ve ark. 2008). AAT grubu bileşiklerin antelmentik aktivitesi, *H. contortus* ve *Trichostrongylus colubriformis* larval gelişim testi ile saptanmış ve daha sonra *in vivo* olarak rodent modelinde denenmiştir. Öncü molekül AAT-450 ile elde edilen ilk sonuçlara dayanarak, 700'den fazla farklı AAT molekülü üretilmiş ve bunların potansiyel antelmentik aktivitesi incelenmiştir. Bu denemelerde en etkili bulunan moleküller koyun ve sığırlarda yapılacak ileri testler için seçilmiştir. Yapılan tüm testlerin sonunda endüstriyel geliştirme aşamasına girmek için AAT-1566 seçilmiştir (Kaminsky ve Rufener 2012).

Yeni sentezlenen AAT grubu 2009 yılında veteriner ilaç pazarına girmiştir (Good, 2012). AAT-1566'ya Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından monepantel (N-[(1S)-1-siyano-2-(5-siyano-2-triflorometil-fenoksi)-1-metil-etil]-4-triflorometilsülfanil-benzoamid) adı verilmiş (Şekil 2-22) ve koyunlarda diğer antelmentiklere dirençli nematod suşlarına karşı etkili olan lisanslı bu antelmentik ilaç Zolvix™, Novartis Hayvan Sağlığı tarafından tanıtılmıştır.

2.9.1. Etki Mekanizması

AAT'ler nematoda spesifik nikotinik asetilkolin reseptörünün (nAChR) alt birimlerine bağlanma özelliği gösteren yeni bir etki mekanizmasına sahiptir. MNP'nin

etki mekanizması ilk olarak *Caenorhabditis elegans* ve *H. contortus*'ta tanımlanmıştır (Kaminsky ve ark. 2008a). AAT'lerin ön farenks kasları ve diğer kasların kontraksiyonlarında artış, felç ve sonuçta erişkin nematodların ölümüne yol açtığı gösterilmiştir. AAT'ye maruz kalan *C. elegans'ın* yaşam döngüsünde deri değişim bozuklukları ve nekrozla karakterize büyük vakuoller oluştuğu gözlenmiştir (Kaminsky ve ark. 2008a). *C. elegans* ile yapılan genetik taramalarda, MNP etki mekanizmasının moleküler hedefinin nAChR'nin alt birimi (ACR-23) olduğu tanımlanmıştır (Kaminsky ve Rufener, 2012). ACR-23'ün *C. elegans*'ta bulunması daha sonra *H. contortus*'ta homolog proteinlerin araştırılmasına yön vermiştir. Bir diğer çalışmada, MNP için daha az duyarlılığa sahip *H. contortus* mutantlarından monepantel-1 geninde (Hco-mptl-1) bazı farklı mutasyonlar tanımlanmış ve bu türdeki AAT'lerin etkisi için ana hedef olarak MPTL-1 proteinini içerdiği görülmüştür (Rufener ve ark. 2009).

AAT'lerin etki mekanizmasının daha iyi anlaşılması amacıyla yapılan bir çalışmada tüm nematod türlerinin ligand kapılı iyon kanalı genlerinin karşılaştırmalı genomik analizleri gerçekleştirilmiş ve ACR-23/MPTL-1 ortoloğunun primer hedef olarak nematoda spesifik DEG-3 nAChR alt birimlerine ait olduğu doğrulanmıştır (Rufener ve ark. 2010a). MNP, bu reseptör alt biriminin açılması ve tekrar kapanmamasını sağlayan pozitif bir allosterik modülatör gibi görev görmektedir. Kontrolsüz iyon akışı kas hücrelerinin depolarizasyonuna ve felce neden olur (Kaminsky ve ark. 2013). Yapılan çalışmalarda bazı nematod türlerinde ACR-23/MPTL-1 bulunmadığı ve MNP'ye duyarsız oldukları saptanmıştır.

MNP'nin memelilerde toksisitesi oldukça düşük ve aynı zamanda çoklu ilaç direnci gösteren parazitlere karşı da aktif olduğu bildirilmiştir. Bu durum MNP'nin klasik antelmentiklerden farklı olduğunu göstermektedir (Rufener ve ark. 2010b).

2.9.2. Monepantel ile İlgili Yapılan Farmakokinetik Çalışmalar

MNP ve ana metaboliti $MNPSO_2$ ile yapılan ilk farmakokinetik çalışmalar 20, 32 ve 36 adet sağlıklı kuzu (4-8 aylık, karışık cinsiyette ve 30-50 kg ağırlığında) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hayvanlar; cinsiyet, ırk, MNP dozu ve uygulama yoluna bağlı olarak farklı gruplara ayrılmıştır (Karadzovska ve ark. 2009; Hosking ve ark. 2010a; 2010b). İlk çalışmada üç gruba ayrılan farklı cinsiyetteki koyunlara MNP 0,8 mg/kg dozda oral, intra-ruminal ve intra-abomasal yollarla uygulanmıştır (Hosking ve ark. 2010b). İkinci çalışmada, hem cinsiyet hem de farklı ırk koyunlara (Merinos kuzuları ve Dorset (1/2) ×

Border Leicester (1/4) × Merinos (1/4) çapraz kuzular) MNP oral yolla uygulanmıştır (Hosking ve ark. 2010a). Üçüncü çalışmada melezlenmiş ve farklı cinsiyetteki koyunlara farklı doz ve konsantrasyonlarda (1 mg/kg − % 0,5 MNP ve $MNPSO_2$ intravenöz enjeksiyon) ve (1, 3 ve 10 mg/kg dozda % 2,5 MNP oral uygulama çözeltisi) MNP ve ana metaboliti $MNPSO_2$ uygulanmıştır (Karadzovska ve ark. 2009). Her üç çalışmada kan örnekleri ve üçüncü çalışmada fekal örnekler belirlenen zamanlarda toplanmıştır. Kan numuneleri, her bir hayvandan juguler venden antikoagülan etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere toplanmıştır. Numune toplama süreleri çalışmalar arasında değişiklik göstermiştir (Karadzovska ve ark. 2009; Hosking ve ark. 2010a, 2010b). MNP toplam kan klerensi (1,49 l/kg) intravenöz uygulamadan sonra yüksek bulunmuştur ve ana ilacın terminal yarı ömrü belirlenememiştir. MNP 1 mg/kg oral uygulamadan sonra biyoyararlanımı % 31 bulunmuştur. MNP'nin koyunlara 1, 3 ve 10 mg/kg dozlarında oral yolla uygulanması sonrasında kandaki ilacın varlığı, intravenöz uygulamadan daha uzun sürmüştür. Uygulamadan 1 ve 4 saat sonra $MNPSO_2$ konsantrasyonu ana bileşiğin konsantrasyonundan daha yüksek bulunmuştur, maksimum konsantrasyon ise 24. saatte gözlenmiştir. MNP 10 mg/kg dozunda oral yolla uygulandığında ana ilacın t_{maks} değeri, MNP diğer dozlarının t_{maks} değerinden daha kısa bulunmuştur. Ana ilacın eğri altında kalan alanı (AUC) ve c_{maks}'ın doza bağlı olarak arttığı saptanmıştır (Karadzovska ve ark. 2009). Oral yolla MNP uygulanan koyunlarda, intra-ruminal ve abomasal uygulanan koyunlara göre daha yüksek bir c_{maks} ve daha büyük AUC saptanmıştır. $MNPSO_2$ için de MNP'ye benzer sonuçlar gözlenmiştir. Ayrıca oral yolla MNP uygulanan koyunlarda, tüm farmakokinetik parametrelerin daha yüksek değerlere sahip olduğu bildirilmiştir. MNP'nin oral yolla uygulandığı kuzularda intra-ruminal veya intra-abomazal yola oranla daha yüksek plazma MNP ve MNPSO2 konsantrasyonları elde edilmesi nedeniyle oral yolla MNP uygulamanın daha yüksek etkinlik sağladığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu nedenle de oral tedaviye uygun tabanca tekniği önerilmiştir (Hosking ve ark. 2010b). Erkek ve dişi kuzularda MNP farmakokinetiği karşılaştırıldığında, yalnızca $MNPSO_2$'nin AUC değeri, cinsiyetler arasında (erkekler dişilerden daha büyük bir değere sahip) önemli ölçüde farklılık göstermiş; diğer farmakokinetik parametrelerde anlamlı bir fark bulunmamıştır. Koyun ırklarının MNP farmakokinetiği üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde, Merinos koyunlarının Dorset melezi kuzulara oranla yüksek c_{maks} ve düşük t_{maks} değerlerine sahip olduğu görülmüştür; ancak AUC değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Hosking ve ark. 2010a). MNP ve $MNPSO_2$

farmakokinetik parametreleri Tablo 2-6 ve Tablo 2-7'de özetlenmiştir. MNP eliminasyonu ile ilgili olarak, ana ilacın oldukça küçük bir kısmının (% 3-7) dışkı yoluyla atıldığı, geri kalan ilacın esas olarak sülfon metabolitine dönüştüğü bildirilmiştir. $MNPSO_2$'ye sülfoksidasyonun yanı sıra, ana ilaç MNP'nin diğer uygulama yolları ile metabolize edildiği ve farklı MNP metabolitlerinin de oluştuğu saptanmıştır (Karadzovska ve ark. 2009, Stuchlikova ve ark. 2014).

Tablo 2-6: MNP ve $MNPSO_2$'nin farklı uygulama yolu ve dozlarda uygulanması sonrası elde edilen farmakokinetik parametreler - Lecova ve ark. (2014)'ten değiştirilerek

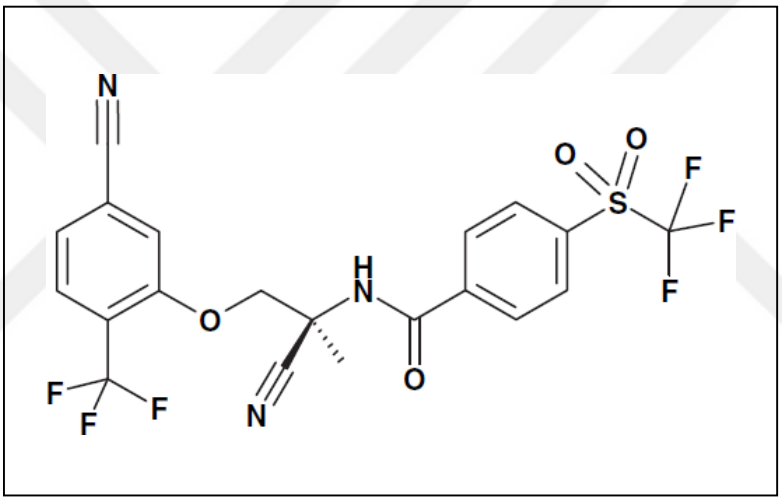
Uyg. Yolu	**İntravenöz**		**İntraruminal**		**İntraabomazal**		**Oral**				
Doz (mg/kg)	1		0,8		0,8		0,8		1	3	10
	MNP	$MNPSO_2$	MNP	$MNPSO_2$	MNP	$MNPSO_2$	MNP	$MNPSO_2$	MNP		
AUC (0-7 gün)	671	3564	-	3350	-	2834	-	2704	211	671	1920
AUC (0-5 gün)	-	-	273	-	132	-	211	-	-	-	-
c_{maks} (ng/ml)	710	632	4,6	29,8	5,8	26,0	7,8	35,3	6,8	17,9	98,8
t_{maks} (saat)	-	-	-	-	-	-	-	-	8	16	4

Tablo 2-7: Farklı cinsiyet ve ırktaki koyunlar arasında MNP'nin 2,5 mg/kg farmakokinetik parametreleri -Lecova ve ark. (2014)'ten değiştirilerek

Koyun ırkı	Merinos		Dorset melezi	
Cinsiyet	Dişi	Erkek	Dişi	Erkek
AUC (0-168 sa) ng.sa/ml	525	504	502	589
C_{maks} (ng/ml)	30,4	21,8	14,9	17
t_{maks} (saat)	5	5	8	8

2.9.2.1. Monepantel Metabolizması

Hedef türlerde etkili tedavi sağlanması ve ilaç-ilaç etkileşimlerinin en aza indirilmesi ilaç metabolizması ile ilgili özelliklerin iyi bilinmesi ile ilişkilidir. MNP'nin biyotransformasyonu küçük ruminantlarda *in vivo* ve *in vitro* olarak incelenmiştir. *İn vivo* araştırmalar biyolojik örneklerde (dışkı, idrar, kas, süt ve kan) *in vitro* çalışmalar ise koyun hepatositleri primer kültüründe sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (LC/MS) ile gerçekleştirilmiştir (Karadzovska ve ark. 2009; Kinsella ve ark. 2011; Stuchlikova ve ark. 2013, 2014). Küçük ruminantlarda MNP ana metaboliti $MNPSO_2$'dir (Şekil 2-23).



Şekil 2-23: Monepantel sülfon kimyasal yapısı - Karadzovska ve ark. (2009)'dan değiştirilerek

Kinsella ve ark. (2011) tarafından biyolojik numunelerde MNP ve $MNPSO_2$'nin ölçümü için (HPLC/MS) yöntemindeki koşullar bildirilmiştir. HPLC/MS, oldukça karmaşık matrislerdeki eser miktardaki metabolitler için bile yüksek duyarlılık nedeniyle metabolik çalışmalar için tercih edilen bir yöntemdir (Holcapek ve ark. 2008). Ultra-HPLC (UHPLC) ve LC/MS/MS tekniklerinin gelişimi, veteriner ilaç kalıntısı ortaya koyma yöntemleri için yeni stratejiler meydana getirmiştir (Kinsella ve ark. 2011; Vokral ve ark. 2012, 2013; Holcapek ve ark. 2012). Bu teknik, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda koyunlardaki diğer MNP metabolitlerinin tanımlanmasına olanak sağlamıştır (Stuchlikova ve ark. 2013, 2014). MNP'nin iki aşamalı S oksidasyonu sonucunda hidroksilasyon, hidroliz, sülfatasyon, glukuronidasyon ve glutatyon ile konjugasyon

yoluyla metabolize edilebildiği gösterilmiştir. Glutatyonla konjugasyon sonucu oluşan MNP konjugatları hızlıca hidrolize olarak MNP-asetilsistein konjugatlarının oluşumuna neden olmaktadır. (Stuchlikova ve ark. 2013).

2.9.3. Monepantele Karşı Gelişen Direnç

Yeni Zelanda ve Avustralya'da yapılan çalışmalarda, bu yeni antelmentik ilacın etkinliğinin önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Scott ve ark. 2013; Love, 2014). Mezbahadaki koyunlarda *T. circumcincta* ve *T. colubriformis* yüklerinde önemli bir azalma görülmediği ancak MNP'nin etkinliğinde azalma olduğu doğrulanmıştır. Bu iki parazit, ilaca karşı dirençli görünse de *O. venulosum*'un durumu daha az belirgindir (Scott ve ark. 2013). Yapılan bir başka çalışmada, son zamanlarda MNP ile tedavi edilen keçilerde de direnç geliştiği saptanmıştır (Scott ve ark. 2013). Ayrıca Avustralya'da keçilerde *Teladorsagia spp.* ve *T. colubriformis*'te ortaya çıkan direnç gösterilmiştir (Love 2014).

Dirence yol açan faktörlerin bilinmesi antelmentiklerin etkinliğini arttırmada önem taşımaktadır. Direnci önlemek için kullanılan birçok strateji bulunmaktadır. Bunlar; yüksek risk yönetimi uygulamalarını belirlemek, antelmentiklere duyarlı bir popülasyonun devamını sağlamak, ilaçların kombine edilmesi, formülasyonlarla optimal antelmentik seçimi ve dirençli nematodların gelişimini önlemek olarak sıralanabilmektedir (Leathwick ve Besier, 2014).

İki yeni antelmentik bileşiğin (MNP ve derquantel) piyasaya sürülmesi ile doğru ilaç kullanım stratejisi konusu önem kazanmıştır. Son yapılan çalışmalar, herhangi bir yeni aktif bileşiğin sürdürülebilir şekilde kullanımında en etkin yöntemin, diğer antelmentiklerle kombinasyon halinde formüle edilmesi olduğunu göstermektedir. Dirençli genotiplerin hayatta kalmasını en aza indirgeyerek direnç gelişimini yavaşlatmanın yanında, kombinasyonların kullanılmasının da dirençle mücadelede fayda sağladığı bildirilmiştir (Leathwick, 2013).

Yapılan bir başka çalışmada, MNP'nin benzimidazol ve levamizol gibi yüksek direnç seviyesine veya abamektin gibi orta düzeyde bir dirence sahip mevcut ilaçlarla kombine kullanımı ve diğer antelmentiklerle rotasyonu incelenmiştir (Dobson ve ark. 2011). *T. colubriformis, H. contortus* veya *T. circumcincta* popülasyonlarını ve antelmentiklere dirençli genlerin frekansını tahmin eden bir bilgisayar simülasyon modeli kullanılmıştır. En iyi seçenek olarak; MNP ve üçlü benzimidazol, levamizol ve abamektin

kombinasyonu bulunmuştur. Diğer en iyi seçenekler ise; *i)* MNP, moksidektin ve abamektin arasındaki her tedavide rotasyon *ii)* MNP ve abamektin arasındaki her tedavide rotasyon *iii)* kış aylarında MNP ve yaz-sonbaharda abamektin veya moksidektin arasında her tedavide rotasyon olarak bildirilmiştir. Buna ek olarak, üreticilerin yüksek maliyet nedeniyle ilaçları her zaman kombine kullanması mümkün olmayacağından dolayı, ikinci ve üçüncü seçeneklerin antelmentik direncin gelişimini önemli ölçüde yavaşlatabileceği belirtilmiştir (Dobson ve ark. 2011).

2.9.4. Toksisitesi ve Dozu

Akut toksisite çalışmaları, MNP'nin sıçanlarda düşük akut oral ve dermal toksisiteye sahip olduğunu göstermiştir (LD_{50} değerleri > 2000 mg/kg). Sıçanlarda yapılan diğer ilaç güvenlik çalışmalarında MNP'nin 2000 mg/kg dozda olumsuz etki göstermediği belirtilmiştir (APVMA 2010). Önerilen MNP dozu koyunlarda 2,5 mg/kg ve keçilerde 3,75 mg/kg'dır. Bu dozun benzimidazoller, imidazotiyazol ve makrosiklik laktonlara dirençli türler de dahil tüm gastrointestinal nematodlara karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Kaminsky ve ark. 2011).

2.9.5. Endikasyonu

Zolvix™ oral solüsyon (25 mg/ml monepantel) kuzu, domuz, damızlık koç ve koyunlarda gastrointestinal nematod enfestasyonlarının tedavisi ve kontrolünde kullanılan geniş spektrumlu bir antelmentik ilaçtır (EMA 2013).

Antelmentik etki spektrumu, dördüncü larval form ve aşağıda belirtilen nematodların erişkin formlarına etkilidir:

*Haemonchus contortus**	*İnhibe larvalarına da etkili.
*Teladorsagia circumcincta**	
*T. trifurcata**	
*T. davtiani**	
*Trichostrongylus axei**	
T. colubriformis	
T. vitrinus	
Cooperia curticei	
C. oncophora	
Nematodirus battus	
N. filicollis	
N. spathiger	
Chabertia ovina	
Oesophagostomum venulosum	

2.9.6. Rezidü

MNP, koyun ve keçilerde gastrointestinal nematodların tedavisi ve kontrolünde kullanılan bir antelmentiktir. Koyun ve keçilerde önerilen kullanım, sırasıyla oral yolla 2,5 ve 3,75 mg/kg'dır. MNP ana metaboliti olan $MNPSO_2$ MRL değerleri Tablo 2-8'de verilmiştir.

Tablo 2-8: Monepantelin insan gıdası olarak tüketilen koyun ve keçi dokularında maksimum kabul edilebilir rezidü düzeyleri - (EMA 2010)'dan değiştirilerek

Farmakolojik yönden aktif madde(ler)	Belirteç rezidü	Hayvan türü	MRL	Hedef doku	Terapötik sınıflandırma
Monepantel	Monepantel sülfon	Koyun, keçi	700 µg/kg 7000 µg/kg 5000 µg/kg 2000 µg/kg 170 µg/kg	Kas Yağ Karaciğer Böbrek Süt	Antiparaziter ajanlar /Endoparazitlere karşı kullanılan ajanlar

MNP son yıllarda sentezlenmiş ve kullanıma yeni girmiş bir bileşik olması nedeniyle farmakolojik özelliklerinin detaylı olarak incelenme gerekliliği bulunmaktadır. Mahnke ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada MNP'nin laktasyondaki Jersey ineklerde bABCG2 substratı olduğu saptanmış olmasına rağmen koyunlarda MNP'nin BCRP üzerine aktivitesi ve süte geçişinin azaltılmasına yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. BCRP, vücuttaki birçok organı ksenobiyotiklere karşı savunma görevi üstlenmesinin yanında, laktasyon döneminde koyun ve inek meme bezinden de yüksek oranda eksprese edilmektedir (Pulido ve ark. 2006). İlaçların süte geçmesine ve dolayısıyla organizmada kalıntı sorununa yol açan bu durum, halk sağlığı açısından sorun yaratabilmektedir. Çalışmamızda koyunlara MNP uygulanması sırasında fonksiyonel BCRP aktivitesinin *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerle araştırılması hedeflenmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda soya izoflavonoidlerinin BCRP ekspresyonu üzerine inhibitör etkisinin olduğu ve bu konu üzerinde daha çok araştırmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (Pulido ve ark. 2006; Perez ve ark. 2009b, 2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasallar

- Zolvix™; 25 mg/ml monepantel (Elanco, ABD)
- Monepantel (Elanco Hayvan Sağlığı tarafından çalışmamızda kullanılmak üzere hediye edilmiştir)
- Monepantel sülfon (HPC Standards, Almanya)
- Genistein (Fluorochem, İngiltere)
- Daidzein (Fluorochem, İngiltere)
- Metanol, HPLC Grade (Merck, Almanya)
- Asetonitril, HPLC Grade (Merck, Almanya)
- Distile su, HPLC Grade (Millipore Milli-Q®, ABD)
- SB-BCRP-M PREDEASY™ ATPaz Kiti (Solvo Biotechnology, Macaristan)
- BCRP-HEK293 veziküler taşınma inhibisyon deney kiti (Solvo Biotechnology, Macaristan)
- Sintilasyon kokteyli (Ultima Gold™ XR, Perkin Elmer, ABD)
- SMART™ BCA Protein Test Kiti (İntron Biotechnology, Güney Kore)
- ECL Substratı (Thermo, ABD)
- Yağsız süt tozu (Bioshop, Kanada)
- PVDF 0,45 µm membran (Roche, İsviçre)
- Sodyum dodesil sülfat (Riedel-de Haen, Almanya)
- Tris (Sigma, Almanya)
- Sodyum Klorür (Sigma, Almanya)
- Glisin (Fisher scientific, ABD)
- Tween 20 (Riedel-de Haen, Almanya)
- TEMED (Sigma, Almanya)

- Akrilamid (Sigma, Almanya)
- Bisakrilamid (Sigma, Almanya)
- Boyalı protein marker (Thermo, ABD)
- Rat Anti-ABCG2 antikoru (Santa Cruz, ABD)
- Mouse Anti beta aktin-HRP antikoru (Santa Cruz, ABD)
- Goat Anti-rat antikoru (Thermo, ABD)

3.1.2. Ekipman ve Cihazlar

- HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografi) (Agilent 1260 Infinity, Almanya)
- HPLC viali; 2 ml (Agilent, Almanya)
- HPLC viali için mikro insert (La-Pha-Pack, ABD)
- C18 ters faz kolon; 250 x 4.6 mm (Kromasil, İsveç)
- Bond Elut Plexa katı faz ekstraksiyon kartuşu, 60 mg/1 ml (Agilent, Almanya)
- Holder uyumlu enjektör ucu (Greiner bio-one, Almanya)
- 0,45 μm filtre (Millipore, ABD)
- Hassas terazi (Schimadzu Libror AEL-40 SM, Japonya ve Ohaus, Çin)
- Ultrasonik banyo (Nersetech NRS 50-2, Türkiye)
- Vakum degazer (Heraus, Almanya)
- Soğutmalı santrifüj (Nüve NF800R, Türkiye)
- Vakum manifold pompası (Rotavac Heidolph, Almanya)
- -20°C derin dondurucu (Siemens, Almanya)
- -80°C derin dondurucu (Thermo Scientific, ABD)
- Azot Evaporatörü (Ar Mühendislik AVP B24, Türkiye)
- Çalkalamalı ısıtıcı (Thermoshaker, BIOSAN PST-60 HL, Letonya)
- Repeater (Eppendorf Multipette plus, Almanya)

- Tek kanallı pipet; 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 0,5-5 ml (Eppendorf Research plus, Almanya)
- Çok kanallı pipet; 8 kanallı, 0,5-10 µl (Eppendorf, Almanya)
- Çok kanallı elektronik pipet; 8 kanallı, 50-1200 µl (Eppendorf Xplorer plus, Almanya)
- Su banyosu (VWR, ABD)
- Vorteks (BIOSAN Bio Vortex V1, Letonya)
- 96 kuyucuklu mikroplaka (VWR, ABD)
- Mikroplaka okuyucu (Fluostar Omega BMG Labtech, Almanya)
- Cam deney tüpleri 2 ml, 5 ml, 10 ml (Sarstedt, Almanya)
- Kar buz makinesi (Scotsman AF100, İngiltere)
- Sıvı sintilasyon sayacı (Perkin Elmer Mikrobeta 2, ABD)
- Vakum pompası (Millipore, ABD)
- 96-kuyucuklu mikroplaka filtrasyon sistemi (Millipore, ABD)
- 96 kuyucuklu düz tabanlı hücre kültürü mikroplakası (VWR, ABD)
- 96 kuyucuklu filtreli mikroplaka (Millipore, ABD)
- Tek kullanımlık steril punch biyopsi aleti (Kai, Japonya)
- Transfer aparatı (Mini trans blot cell, Biorad, ABD)
- Elektroforez (Mini protean III cell, Biorad, ABD)
- Magna Lyser cihazı (Roche, İsviçre)
- Syngene Kemilüminesans Görüntüleme Sistemi (Biocon, Hindistan)
- LC-MS/MS (Thermo Q Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap, ABD)

3.2. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

MNP ve $MNPSO_2$'nin plazma ve sütten tayini Karadzovska ve ark. (2009) ve Lifschitz ve ark. (2014) tarafından bildirilen yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirildi.

3.2.1. Stok ve Çalışma Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

İki mg MNP ve $MNPSO_2$ 20 ml asetonitril ile çözülerek 100 µg/ml konsantrasyonunda stok MNP ve $MNPSO_2$ çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilerden 1 - 0,5 - 0,2 - 0,1 - 0,05 - 0,02 µg/ml konsantrasyon aralığında plazma standartları ve 4 - 2 - 1 - 0,5 - 0,05 - 0,02 µg/ml konsantrasyon aralığında süt standartları hazırlandı.

3.2.2. Mobil Fazın Optimizasyonu

Optimizasyonda Karadzovska ve ark. (2009) (asetonitril/metanol/su 50:10:40, v/v/v) ve Lifschitz ve ark. (2014) yapmış oldukları çalışmadaki (asetonitril/metanol/su 60:8:32, v/v/v) mobil fazlar kullanıldı. MNP ve $MNPSO_2$ piklerinin düzgün çıkmaması nedeniyle gradiyent sistem tercih edildi. En iyi kromatogramlar 95:5 (v/v) oranında su:asetonitril-metanol karışımı ile elde edildi.

Mobil faz A (%95): HPLC su

Mobil faz B (%5): Asetonitril (300k) + Metanol (64k)

Alıkonma zamanı: $MNPSO_2$: 13,95 dakika MNP: 14,51 dakika

Akış gradiyenti:

0-12 dakika % 95 Mobil faz A % 5 Mobil faz B

12-16 dakika % 5 Mobil faz A % 95 Mobil faz B

16-16,5 dakika % 5 Mobil faz A % 95 Mobil faz B

16,5-25 dakika % 95 Mobil faz A % 5 Mobil faz B

3.2.3. Ekstraksiyon Yönteminin Optimizasyonu

Karadzovska ve ark. (2009) ve Lifschitz ve ark. (2014) nın uyguladıkları ekstraksiyon yönteminde yapılan minör modifikasyonlar sonucu optimizasyon sağlandı. MNP ve $MNPSO_2$ Bond Elut Plexa (Agilent, Almanya) kartuşlardan geçirilerek asetonitril ile elüe edildi. Bu şekilde kirliliklerden arındırılmış çözelti numunesi azot evaporatöründe (40 °C'de) uçuruldu ve tam uçma gerçekleştikten sonra 250 µl metanolde

çözüldü. Elde edilen berrak çözelti HPLC sistemine enjekte edildi. Kromatografik koşullar Tablo 3-1'de sunulmuştur.

Tablo 3-1: Plazma ve sütten monepantel ve monepantel sülfon belirlenmesi için geliştirilen HPLC metodundaki kromatografik koşullar ve çalışmada kullanılan malzemeler

Parametreler	**Kromatografik Koşullar**
Dedektör	Diode array dedektör DAD
Akış hızı	1 ml/dk
Kolon	C18 ters faz kolon
Kolon sıcaklığı	30°C
Dalga boyu	230 nm
Run time	25 dakika
Ekstraksiyon yöntemi	Katı faz ekstraksiyon
Enjeksiyon hacmi	50 µl

3.2.4. Yöntemin Validasyonu

Kesinlik ve doğruluk, özgünlük, doğrusallık, geri kazanım, duyarlılılık (LOD ve LOQ) değerleri hesaplandı. MNP ve $MNPSO_2$ için doğrusallık 1 - 0,02 µg/ml konsantrasyonda plazma ve 4 - 0,02 µg/ml konsantrasyonda süt standartları hazırlanarak test edildi. Bu konsantrasyonlarda 6 tekrarlı analizler yapılarak sistem test edildi. Standart sapma (% RSD), R^2 değeri, regresyon denklemi ve % varyasyon katsayısı hesaplandı. MNP ve $MNPSO_2$ için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik açısından tekrarlı analizler yapıldı. Süt için 4 - 2 - 1 - 0,5 - 0,05 - 0,02 µg/ml konsantrasyonlarda plazma için 1 - 0,5 - 0,2 - 0,1 - 0,05 - 0,02 µg/ml konsantrasyonlarda MNP ve $MNPSO_2$ kullanılarak gün içi tekrarlanabilirlik aynı gün içinde; günler arası tekrarlanabilirlik deneyi iki farklı günde gerçekleştirildi. Süt için 4 - 1 - 0,5 µg/ml konsantrasyonlarda, plazma için 1 - 0,5 - 0,1 µg/ml konsantrasyonlarda MNP ve $MNPSO_2$ kullanılarak geri kazanım örnekleri hazırlandı. Üç farklı konsantrasyonun farklı zamanda çalışılarak standart eğriden % kaç oranında doğru belirlendiği ile geri kazanım hesaplandı. Sinyal/gürültü oranının 3'ten

büyük olduğu en düşük konsantrasyon ile LOD (Tespit limiti) ve sinyal/gürültü oranının 10'dan büyük olduğu en düşük konsantrasyon ile LOQ (Tayin limiti) belirlendi.

3.3. Monepantelin Farmakokinetiği

3.3.1. Hayvan Materyali

Hayvanlara yapılan tüm uygulamalar, İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 13.11.2017 tarih ve 425000 sayılı kararı ile alınan etik kurul kararı çerçevesinde gerçekleştirildi.

Çalışmamızda, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nden temin edilen laktasyon periyodunun 3-4. ayında, 1-3 yaş aralığında 48 adet Kıvırcık ırkı dişi koyun kullanıldı.

3.3.2. Hayvanların Gruplandırılması, Beslenmesi ve İlaç Uygulaması

Tüm hayvanların uygulama öncesinde kontrolleri yapılarak yalnızca sağlıklı olanlar seçildi. Hayvanlar her grupta 16 hayvan olacak şekilde 3 gruba (Grup 1, 2, 3) ayrıldı (Tablo 3-2). Birinci ve üçüncü grup standart rasyon ile beslenirken; ikinci grup soya yönünden zengin rasyon ile beslendi. Ağırlıkları tartılarak ilaçların uygulama dozları kg başına hesaplandı. Birinci gruba (kontrol grubu) MNP oral yolla 2,5 mg/kg verilerek bu gruptaki koyunlar standart rasyonla beslendi. İkinci gruptaki koyunlara MNP 2,5 mg/kg verilerek soyadan zenginleştirilmiş rasyonla beslendi (Tablo 3-3). Üçüncü gruptaki koyunlara ise MNP 2,5 mg/kg dozda verilerek, standart rasyona ilave olarak ilaç uygulanmasından önce oral yolla 10 mg/kg genistein ve 10 mg/kg daidzein verildi. Genistein ve daidzein % 25 etanol, %25 polietilenglikol 400, %50 fizyolojik tuzlu suda çözdürüldükten sonra koyunlara oral yolla verildi (Perez ve ark. 2013). Kan örnekleri, Vena jugularis'ten 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96. saat ve 7, 10, 14, 21, 28 ve 35. günde EDTA'lı tüplere alındı. Kan 2000 g 15 dakika süreyle santrifüj edilerek plazma elde edildi ve plazmalar analize kadar -20°C'de saklandı. Süt örnekleri 0, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96. saat ve 7, 10, 14, 21, 28 ve 35. günde elle sağım ile polipropilen tüplere toplandı. Süt örnekleri analize kadar -20°C'de saklandı (Karadzovska ve ark. 2009).

Tablo 3-2: Hayvanların gruplandırılması

1. Grup (MNP)		2. Grup (MNP +Soya rasyonu)		3. Grup (MNP + Gen-Daid)	
Kulak Numarası	**Canlı Ağırlık (kg)**	**Kulak Numarası**	**Canlı Ağırlık (kg)**	**Kulak Numarası**	**Canlı Ağırlık (kg)**
273350	54	800001	53	494206	43
273434	46	273299	43	446207	48
551682	48	446175	42	800007	54
551731	44	551728	43	273344	55
494219	40	273015	40	273303	46
446100	49	551719	43	800002	46
551681	44	551733	52	273424	41
273369	48	446385	47	273386	50
446127	43	551707	38	551680	49
273385	42	446372	46	273001	45
446130	42	273427	56	446167	39
494291	35	273416	42	446306	37
551718	46	551678	46	551692	43
446379	42	273306	46	446162	41
800006	45	273444	48	273342	49
273376	37	273361	47	551737	45
	Ort: 44,06 ± 4,65		**Ort: 45,75 ± 4,82**		**Ort: 45,68 ± 5,04**

Tablo 3-3: Yemlerin kompozisyonu

Standart Yem	**kg/ton**	**Soya Yemi**	**kg/ton**
İçindekiler			
Kepek	676,8		-
Mısır kepeği	150		-
Melas	60		-
Mısır kırması	50		-
Mermer tozu	25		-
Buğday kırması	20		-
Tuz	10		-
Amonyum klorür	5		-
Soya tohumu küspesi (%47)	1,1		960
Kekik aroması	1		-
Vitamin-mineral karışımı	1		40
VPC %60 (Maya özütü)	0,1		-
	%		**%**
Kuru madde (KM)	87,75		88,45
Ham protein (HP)	13,68		45,96
Ham selüloz (HS)	7,75		4,89
Ham kül (HK)	8,18		6,11
Ham yağ (HY)	4,11		1,86
Nişasta	25,5		8,75
Asit deterjan fiber (ADF)	12,54		8,54
Nötral deterjan fiber (NDF)	30,09		13,18
Metabolize olabilir enerji (ME, Mcal)	2,602		2,509

3.3.3. Plazma ve Süt Örneklerinin Analizi

Ölçümler yüksek performanslı sıvı kromatografide (HPLC) C18 ters faz kolon kullanılarak gerçekleştirildi. Süt ve plazma numunelerinde MNP ve $MNPSO_2$ ekstraksiyonu Karadzovska ve ark. (2009) ve Lifschitz ve ark. (2014) nın uyguladığı yönteme göre belirlendi.

Plazmadan ve sütten MNP'nin ekstraksiyonu amacıyla -20 ºC'de saklanmış olan plazma (0,5 ml) ve süt (1 ml) numuneleri deney tüplerine alındıktan sonra 0,5 ml su ve 2 ml asetonitril eklenerek 15 dakika vortekslendikten sonra 2000 g 10 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst faz 6 ml distile su bulunan temiz bir plastik tüpe alındı ve karışım 5 saniye vortekslendi. Bond Elut Plexa katı faz ekstraksiyon kartuşları sırası ile 1 ml

asetonitril ve 1 ml su ile vakum monifold yardımı ile koşullandırıldıktan sonra örnek kartuştan geçirildi. Bu aşamadan sonra 2 ml asetonitril:su (30:70) geçirilerek kartuş yıkandı. Kartuş 1 dakika hava ile kurutuldu ve vakum manifolduna temiz tüp yerleştirilerek örnekler 1,5 ml asetonitril ile elüe edildi. Elüe edilen örnek azot evaporatöründe (40 °C'de) uçuruldu. Tam uçma gerçekleştikten sonra 250 µl mobil faz ilave edildi ve sonra mikroinsert içeren viallere alınarak 50 µl kolona enjekte edildi.

3.3.4. Farmakokinetik Parametrelerin Hesaplanması ve İstatistiksel Değerlendirme

Plazma ve süt standart kromatogramlardan elde edilen pik alanları kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisinden standartlara ait y=ax+b denklemleri elde edildi. Plazma ve süt örneklerinden elde edilen kromatogramlardan integre edilen pik alanları, plazma y=ax+b ve süt y=ax+b denklemlerine yerleştirilerek konsantrasyonlar hesaplandı.

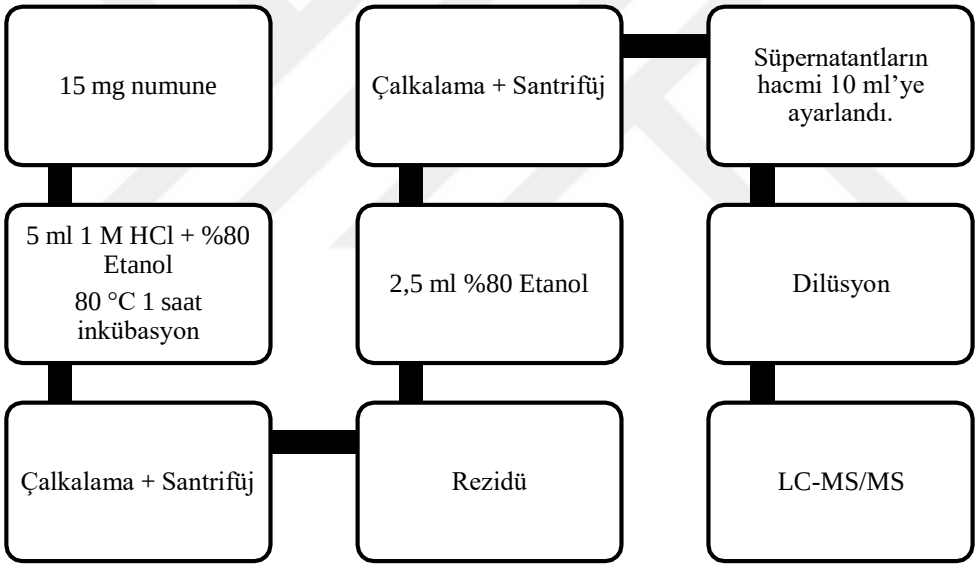
MNP'nin 0-840. saat için tüm plazma ve süte ait konsantrasyonu-zaman eğrisi, Microsoft Excel ve Graphpad Prism versiyon 9.1.2 (ABD) programları kullanılarak elde edildi. 0-840. saat arasında her zaman noktasındaki ortalama konsantrasyonlardan elde edilen plazma ve süt konsantrasyonu-zaman eğrisi kullanılarak, AUC $0\text{-}840_{sa}$ lineer trapezoidal yöntemine (yamuklar yöntemi) göre hesaplandı. c_{maks} ve t_{maks} parametreleri plazma ve süt konsantrasyonu-zaman eğrisine bakılarak saptandı.

Gruplar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığı Graphpad Prism versiyon 9.1.2 (ABD) programı ile tek yönlü varyans analizlerini (ANOVA, Analysis of Variance) takiben Tukey veya Sidak post-hoc testler ile değerlendirildi ve $p<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.4. Hayvanlara Verilen Yem Maddelerindeki Genistein ve Daidzein İdentifikasyonu

Kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirmek amacıyla Penalvo ve ark. (2004) tarafından bildirilen yönteme göre soya yemi, yonca, buğday samanı ve standart yemden genistein ve daidzein LC-MS/MS analizleri gerçekleştirildi.

15 mg yem numuneleri ulltra hassas terazide tartıldı ve internal standart olarak her bir numuneye 1 ppm atropine-d3'ten 50 µl eklendi. 1 M HCl %80'lik etanol (LC-MS grade) içinde hazırlanarak numunelere 5 ml eklendi ve 80°C'de 1 saat hidrolize edildi. İnkübasyon sonrası numuneler soğutuldu. 4400 rpm'de 30 dakika santrifüj sonrası 2,5 ml etanol eklendi. Numuneler tekrar santrifüj edilerek 0,2 µm filtrelerden geçirildi ve LC-MS/MS'e enjeksiyon yapıldı (Penalvo ve ark. 2004) (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: Soyadaki izoflavonların ekstraksiyon metodu akış şeması -Penalvo ve ark. (2004)'ten değiştirilerek

2 mg daidzein ve genistein ayrı ayrı 20 ml DMSO ile çözülerek 100 ppm konsantrasyonunda stok daidzein ve genistein çözeltileri hazırlandı. Boş matriks olarak izoflavon bulunmayan buğday ununa (15 mg) 1 ppm daidzein ve 1 ppm genistein'den 150 – 300 - 600 µl spike yapıldı ve bunun sonucunda 10 – 20 - 40 ppb olmak üzere üç farklı konsantrasyonda çözelti elde edildi.

Kör olarak kullanılan buğday ununa ilave edilen daidzein ve genistein kromatogramlarından elde edilen pik alanları kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisinden y=ax+b denklemleri elde edildi. Elde edilen kromatogramlardan integre edilen pik alanları, buğday unu y=ax+b denklemine yerleştirilerek konsantrasyonları hesaplandı.

Mobil faz (A) % 0,1 formik asit içeren MS grade su; mobil faz (B) MS grade metanol kullanıldı.

LC-MS/MS şartları

Cihaz: Thermo Q Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spektrometre

Enjeksiyon hacmi: 5 µL

Kolon: Waters Xbridge C18 3,5 µm 2,1 x 150 mm

Kolon akışı: 0,3 mL/dk

Kolon fırını sıcaklığı: 40°C

Analiz süresi: 11 dk

Akış gradiyenti:

	Mobil faz A %	Mobil faz B %
0. dakika	98	2
3. dakika	98	2
6. dakika	5	95
8. dakika	5	95
8,01. dakika	98	2
11. dakika	98	2

3.5. Monepantel ve Monepantel Sülfonun BCRP Membran Bazlı Deney Sisteminde Analizi

3.5.1. ATPaz Aktivite Deneyleri

ATPaz aktivite deneyleri SB-BCRP-M PREDEASY^{TM} ATPase Kit protokolüne göre gerçekleştirildi (Sarkadi ve ark. 1992).

ABC taşıyıcıları ATP hidrolizi sonucu açığa çıkan enerjiyi kullanarak substratları hücrelerden dışarı pompalamaktadır. Deney prensibi ATP hidrolizi sonucu açığa çıkan inorganik fosfatın (P_i) basit bir kolorimetrik reaksiyonla tespit edilmesine dayanmaktadır. Taşıyıcı tarafından libere olan Pi miktarı taşıyıcının aktivitesi ile orantılıdır. Membran preparatları farklı ATPaz enzimlerini de içermesi nedeniyle, ABC taşıyıcısı ile ilgili spesifik ATPaz aktivitesi ve toplam ATPaz aktivitesi ayırt edilmelidir. ABC taşıyıcıları, Na_3VO_4 (sodyum ortovanadat) tarafından etkin bir şekilde inhibe edilmesi nedeniyle taşıyıcıların aktivitesi, toplam ATPaz aktivitesinin vanadata duyarlı kısmı baz alınarak belirlenmektedir.

Deney, aynı plaka üzerinde gerçekleştirilen aktivasyon ve inhibisyon çalışmasından oluşmaktadır. Aktivasyon deneyinde taşınan substratlar, temel (baseline) vanadata duyarlı ATPaz aktivitesini stimüle edebilmektedir. Taşıyıcıyının, iyi bilinen bir aktivatörünün varlığında gerçekleştirilen inhibisyon deneyinde ise, inhibitörler veya yavaş taşınan bileşikler maksimum vanadata duyarlı ATPaz aktivitesini inhibe edebilmektedir. Bazı durumlarda, inhibitörler veya yavaş taşınan bileşikler temel taşıyıcı ATPaz aktivitesini de inhibe edebilmektedir. Aktivasyon ve inhibisyon deneyleri birbirini tamamlayıcı deneylerdir. Aktivasyon deneyinde belirlenen stimülasyon, bileşiğin taşıyıcının bir substratı olduğunu gösterirken; inhibisyon testinde belirlenen etkileşimler, yalnızca test edilen bileşiklerin taşıyıcı ile etkileşimini göstermektedir. İnhibisyon deneyi bileşiğin substrat veya inhibitör olduğuna dair ilişkin bilgi vermemektedir (Sarkadi ve ark. 1992).

Gerçekleştirilen SB-BCRP-M ATPaz aktivite deneylerinde beş kontrol grubu oluşturuldu.

Kontrol 1: Temel ATPaz aktivitesi

Kontrol 2: Na_3VO_4'a duyarlı olmayan ATPaz aktivitesi

Kontrol 3: Tam aktive olmuş membranların ATPaz aktivitesi (Aktivasyon çalışmalarında pozitif kontrol)

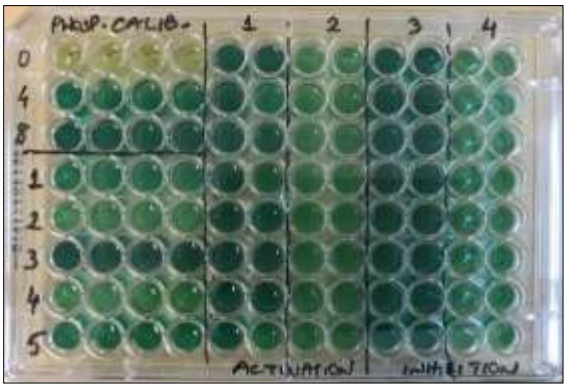
Kontrol 4: Tam aktive olmuş membranların Na_3VO_4'a duyarlı olmayan ATPaz aktivitesi

Kontrol 5: Tam aktive olmuş membranların inhibe ATPaz aktivitesi (İnhibisyon çalışmalarında pozitif kontrol)

SB-BCRP-M ATPaz aktivite deneylerinde aktivasyon ve inhibisyon testi için oluşturulan mikroplaka dizaynı Şekil 3-2'de sunulmuştur:

Plaka	Kontroller				Test ilacı (µM)		Test ilacı (µM) + vanadat		Test ilacı (µM) + aktivatör		Test ilacı (µM) +aktivatör+vanadat	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 nmol Pi				300,00	300,00	300,00	300,00	300,00	300,00	300,00	300,00
B	4 nmol Pi				100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
C	8 nmol Pi				33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33
D	Kontrol 1				11,11	11,11	11,11	11,11	11,11	11,11	11,11	11,11
E	Kontrol 2				3,70	3,70	3,70	3,70	3,70	3,70	3,70	3,70
F	Kontrol 3				1,23	1,23	1,23	1,23	1,23	1,23	1,23	1,23
G	Kontrol 4				0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41
H	Kontrol 5				0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14

0 nmol Pi	Analiz karışımı + 10 µl distile su
4 nmol Pi	Analiz karışımı + 10 µl 0,4 mM Pi
8 nmol Pi	Analiz karışımı + 10 µl 0,8 mM Pi
Kontrol 1	Membran süspansiyonu + 1 µl çözücü
Kontrol 2	Membran süspansiyonu + vanadat (1,2 mM) + 1 µl çözücü
Kontrol 3	Membran süspansiyonu + aktivatör + 1 µl çözücü
Kontrol 4	Aktive membran süspansiyonu + vanadat (1,2 mM) + 1 µl çözücü
Kontrol 5	Aktive membran süspansiyonu + 1 µl inhibitör
	Membran süspansiyonu + 1 µl test ilacı
	Membran süspansiyonu + vanadat + 1 µl test ilacı
	Aktive membran süspansiyonu + 1 µl test ilacı
	Aktive membran süspansiyonu + vanadat + 1 µl test ilacı



Şekil 3-2: Aktivasyon ve inhibisyon çalışması için düzenlenen mikroplakanın tasarımı ve SB-BCRP-M ATPaz aktivite deneyi sonrası mikroplakanın görünümü

3.5.1.1. ATPaz Deney Yöntemi

Tüm solüsyonlar kullanılmadan önce taze şekilde hazırlandı. Solüsyonları hazırlamak için distile su (Milli-Q su) kullanıldı.

1. 9,54 mg MNP hassas terazide tartıldıktan sonra 0,403 ml DMSO'da çözdürüldü ve 50 mM MNP stok solüsyonu elde edildi. 2,16 mg $MNPSO_2$ hassas terazide tartıldıktan sonra 0,0854 ml DMSO'da çözdürüldü ve 50 mM $MNPSO_2$ stok solüsyonu elde edildi. MNP ve $MNPSO_2$ stok solüsyonları 50 kat sulandırıldı.
2. 1,2 ml 10xBlokör solüsyonuna 10,8 ml ultra saf su eklenerek 12 ml 1xBlokör solüsyon elde edildi. 4 ml 3xDevelopman solüsyonuna 8 ml distile su eklenerek 12 ml 1xDevelopman solüsyon elde edildi. Kullanılmadan önce 3 kere vortekslendi. Bu solüsyonlar analiz süresince oda sıcaklığında tutuldu.
3. 870 µl 10xMedyum solüsyonuna 7830 µl distile su eklenerek 8700 µl analiz karışımı elde edildi. Analiz süresince buz üzerinde tutuldu.
4. 2 ml'lik ependorf tüpünde 50 µl 0,2 M MgATP solüsyonuna 950 µl analiz karışımı eklenerek 1000 µl MgATP solüsyonu elde edildi. Analiz süresince buz üzerinde tutuldu.
5. Analiz karışımı içindeki membran süspansiyonu hazırlandı (Şekil 3-3'de yer alan akış şemasında şematize edilmiştir).

   Membran stok solüsyonu 25°C su banyosunda eritildi ve 2-3 kere pipetasyon işlemi uygulanarak homojenize edildi. 120 µl membran stok solüsyonu 5880 µl analiz karışımı eklenerek 6000 µl'ye dilüe edildi (Elde edilen solüsyon 1-2 saniye vortekslenerek iyice karıştırıldı).

   İnhibisyon çalışması için orijinal membran süspansiyonundan 3000 µl alındı ve 5 mM Sülfosalazin'den 7,5 µl eklenerek bir cam tüpe aktarıldı. Bu solüsyon, **"Aktive"** membran süspansiyonu diye adlandırıldı.

   Aktivasyon çalışması için orijinal membran solüsyonundan 2600 µl pipetasyon işlemi uygulanarak bir cam tüpe aktarıldı ve 6,5 µl DMSO eklendi. Bu solüsyon, **"Temel"** membran süspansiyonu olarak adlandırıldı.

   Dört adet 5 ml'lik cam tüp **Kontrol 1**, **Kontrol 2**, **Kontrol 3**, **Kontrol 4** olarak adlandırıldı.

"Temel" membran süspansiyonundan 1200 µl alınarak **Kontrol 1** tüpüne aktarıldı. 3 µl distile su eklendi.

"Temel" membran süspansiyonundan geriye kalan 1200 µl alınarak **Kontrol 2** tüpüne aktarıldı. 600 mM Na-ortovanadat solüsyonundan 3 µl eklendi.

"Aktive" membran süspansiyonundan 1600 µl alınarak **Kontrol 3** tüpüne aktarıldı. 4 µl distile su eklendi.

"Aktive" membran süspansiyonundan 1200 µl alınarak Kontrol 4 tüpüne aktarıldı. 600 mM Na-ortovanadat solüsyonundan 3 µl eklendi.

Hazırlanan süspansiyonların tamamı buz üzerinde tutuldu.

6. 96 kuyucuklu plaka buz üzerine yerleştirildi.

7. Fosfat kalibrasyonu olan kuyucuklara 40 µl analiz karışımı eklendi.

8. Hazırlanan kontrol solüsyonları, Şekil 3-2'de gösterilen plaka düzeneğine göre her bir kuyucuğa 40 µl membran (toplam) süspansiyonu olacak şekilde dağıtıldı.

9. Fosfat kalibrasyonu yapılan kuyucuklara 10 µl distile su eklendi. 10 µl 0,4 mM ve 10 µl 0,8 mM KH_2PO_4 solüsyonları fosfat kalibrasyonu yapılan kuyucuklara eklendi.

10. Kontrol kuyucuklarına 1 µl DMSO eklendi (Kontrol 1, Kontrol 2, Kontrol 3, Kontrol 4).

11. Kontrol 5 kuyucuklarına 1 µl inhibitör (Ko143) eklendi.

12. DMSO içinde seri dilüsyonu yapılmış test ilacından (MNP ve $MNPSO_2$) 1 µl uygun kuyucuklara eklendi (Pipetleme süresini kısaltmak için 8 kanallı pipet kullanıldı).

13. 96 kuyucuklu plaka ve MgATP solüsyonu çalkalamalı ısıtıcıda 37°C'de 10 dakika preinkübasyona bırakıldı.

14. Fosfat kalibrasyonu kuyucukları dışındaki her kuyucuğa 10 µl MgATP eklenerek reaksiyon başlatıldı.

15. 96 kuyucuklu plaka çalkalamalı ısıtıcıda 37°C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

16. Oda ısısında bulunan 1xDevelopman solüsyondan tüm kuyucuklara 100 µl eklenerek ATPaz reaksiyonu durduruldu.

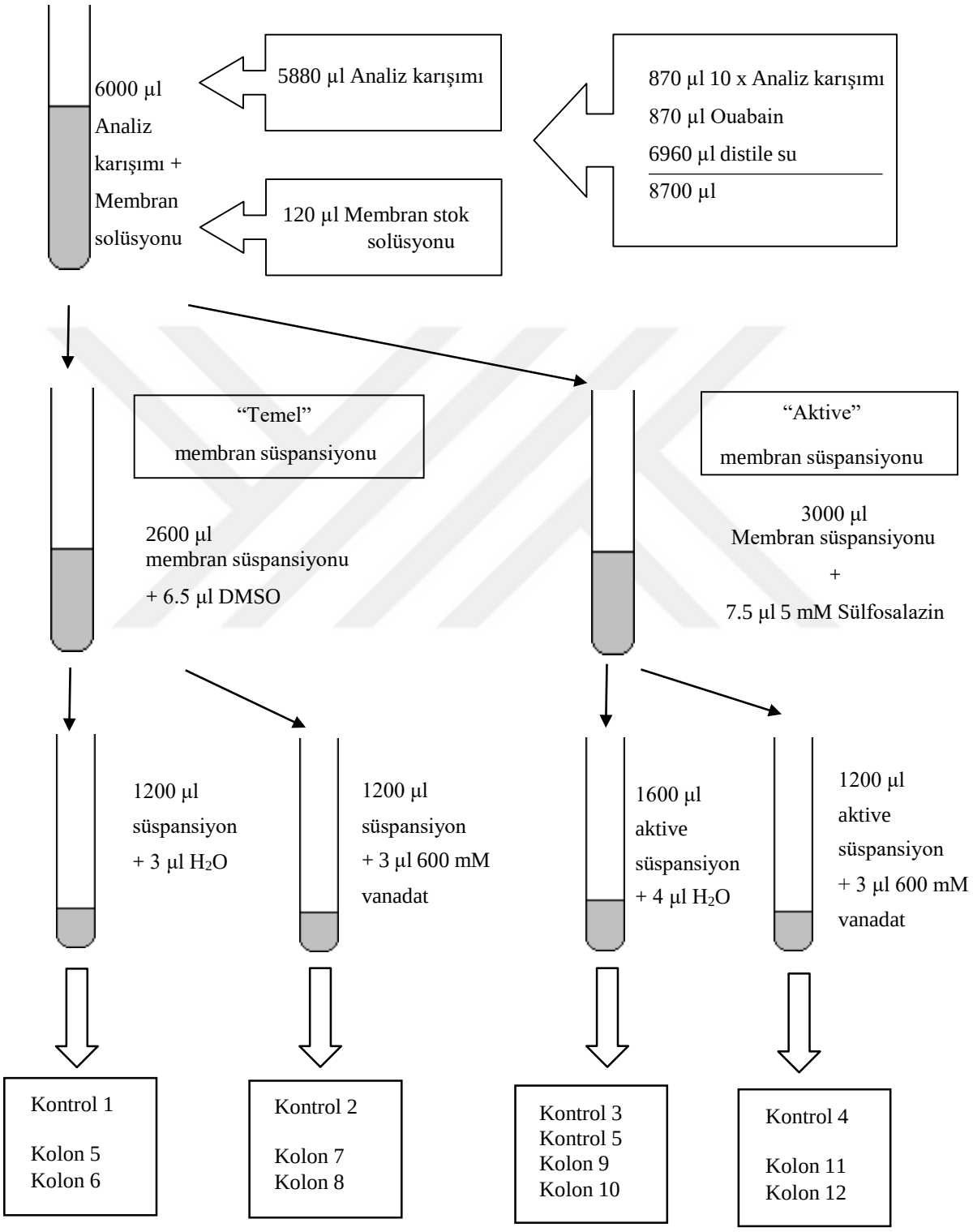
17. İki dakika sonra oda ısısında bulunan 1xBlokör solüsyondan tüm kuyucuklara 100 µl eklendi.

18. 96 kuyucuklu plaka çalkalamalı ısıtıcıda 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

19. OD (Optik Dansite) değerleri 590 ve 630 nm arasında mikroplaka okuyucuda okundu.

20. Sonuçlar analiz edildi.

SB-BCRP-M ATPaz aktivite deneylerinde membran solüsyonlarının hazırlanması Şekil 3-3'te akış şeması şeklinde gösterilmiştir:



Şekil 3-3: SB-BCRP-M ATPaz deneylerinde membran solüsyonlarının hazırlanması akış şeması

3.5.1.2. Hesaplamalar

Hesaplamalar aşağıdaki formülleri esas alan yönteme göre gerçekleştirildi.

Temel vanadata duyarlı ATPaz aktivite için OD değeri (OD_{temel}) = Kontrol 1 - Kontrol 2

Maksimum vanadata duyarlı ilaç tarafından stimüle edilmiş ATPaz aktivitesi (OD_{maks}) = (Kontrol 3 - Kontrol 4) – (Kontrol 1 – Kontrol 2)

Bağıl ATPaz aktivitesi

Aktivasyon çalışması: $\frac{((\text{Test ilacı}) - (\text{Test ilacı} + \text{Vanadat}) - OD_{temel}) \times 100}{OD_{maks}}$

İnhibisyon çalışması: $\frac{((\text{Test ilacı} + \text{Aktivatör}) - (\text{Test ilacı} + \text{Aktivatör} + \text{Vanadat}) - OD_{temel}) \times 100}{OD_{maks}}$

EC50 değerleri, aşağıdaki denklem kullanılarak non-linear regresyon ile konsantrasyon grafiğine karşı vanadata duyarlı ATPaz aktivitesine denk gelen sigmoidal doz-yanıt eğrisinden belirlendi:

$$Y = V_{min} + \frac{(V_{maks} - V_{min})}{1 + 10^{(\log EC50 - \log[A])\ x\ nH}}$$

Y vanadata duyarlı ATPaz aktivitesini, V_{min} gözlenen minimum aktivasyonu, V_{maks} gözlenen maksimum aktivasyonu, [A] test ilacının konsantrasyonunu, EC50 V_{min} ve V_{maks} arasında yarısına karşılık gelen konsantrasyonu ve nH tepe eğimini ifade etmektedir. IC50 değerleri, aynı denklem kullanılarak sigmoidal doz yanıt eğrisinden belirlendi ve IC50, denklemde EC50'ye karşılık gelmektedir.

IC50 ve EC50 değerleri, farklı modülatörlerin bağlanma affinitesinin sıralanması ve karşılaştırılması amacıyla test edilen bileşiğin ABC taşıyıcılarına bağlanma affinitesini tahmin etmede kullanılmaktadır.

3.5.2. Veziküler Taşınma İnhibisyon Deneyleri

BCRP-HEK293 veziküler taşınma inhibisyon deneyleri genel protokolüne (Solvo Biotechnology) göre gerçekleştirildi.

ABC taşıyıcılarının çoğu enerji kaynağı olarak ATP kullanarak substratları hücre membranlarından taşımaktadır. Bu taşınmayı ölçmek için kullanılan metotlardan biri de veziküler taşınma deneyidir. Veziküler taşınma deneyinde, test edilen ilaçlar ile efluks taşıyıcısı arasındaki etkileşimin belirlenmesi hedeflenmektedir. Deney prensibi olası etkileşimin, prob substrat taşınma hızının taşıyıcı-eksprese eden hücrelerden pürifiye edilmiş içten dışa membran veziküllere modülasyonuna dayanmaktadır (Glavinas ve ark. 2008).

BCRP-HEK293 veziküler taşınma inhibisyon deneylerinde kullanılan stok solüsyonların içerik, miktar ve hazırlanışları Tablo 3-4'te verilmiştir.

Tablo 3-4: VT inhibisyon analizlerinde kullanılan stok solüsyonların içerik ve miktarları

Stok Solüsyonlar
1,7 M Tris: 20,587 g Trizma base 100 ml distile suda çözdürüldü ve 1,7 M Tris elde edildi.
0,1 M Tris HCl: 1,21 g Trizma base 90 ml distile suda çözdürüldü ve 1 M HCl ile pH 7,4'ye ayarlandı. Solüsyon 100 ml distile suya tamamlandı ve 0,1 M Tris HCl elde edildi.
1 M Sükroz, **1 M NaCl** ve **0,1 M $MgCl_2$** distile suda hazırlandı.
0,2 M Mg-ATP: 2,2 g ATP ve 0,813 g $MgCl_2$ 10 ml distile suda çözdürüldü ve 1,7 M Tris ile ph 7,4'ye ayarlandı. Solüsyon 20 ml distile suya tamamlandı.
0,2 M AMP: 1,39 g AMP 10 ml distile suda çözdürüldü ve NaOH ile pH 7,4'ye ayarlandı. Solüsyon 20 ml distile suya tamamlandı.
Referans inhibitörler
0,1 mM Ko143 (DMSO'da) BCRP-HEK293 VT inhibisyon deneyinde kullanıldı.
İşaretlenmemiş substratlar
750 µM Östron 3-sülfat sodyum tuzu (DMSO'da) BCRP HEK293 VT inhibisyon deneyinde kullanıldı.
Radyoaktif işaretli substratlar
^{3}H-E3S: Östron sülfat, amonyum tuzu, [6,7-^{3}H(N)]-, 1 mCi/ml (etanol:su 1:1) (Perkin Elmer) BCRP HEK293 VT inhibisyon deneyinde kullanıldı.

BCRP-HEK293 veziküler taşınma inhibisyon deneylerinde hazırlanan tampon çözeltiler Tablo 3-5'te belirtilmiştir.

Tablo 3-5: VT inhibisyon analizlerinde kullanılan tamponların içerik ve miktarları

Transfer Tamponu	**Eklenen Miktar**	**Final konsantrasyon**
0,1 M Tris-HCl	1 ml	10 mM
1 M Sükroz	2,5 ml	250 mM
0,1 M $MgCl_2$	1 ml	10 mM
Distile su	5,5 ml	
Toplam hacim	10 ml	
Yıkama Tamponu	**Eklenen Miktar**	**Final konsantrasyon**
0,1 M Tris-HCl	50 ml	10 mM
1 M Sükroz	125 ml	250 mM
1 M NaCl	50 ml	100 mM
Distile su	275 ml	
Toplam hacim	500 ml	

BCRP-HEK293 veziküler taşınma inhibisyon deney koşulları Tablo 3-6'da verilmiştir.

Tablo 3-6: VT inhibisyon analizleri için deney koşulları

75 µl reaksiyon hacminde total E3S konsantrasyonu	1 µM
Kuyucuk başına spesifik aktivite	0,2 µCi
Kuyucuk başına düşen membran süspansiyonundaki protein miktarı	12,5 µg
Ko143 ve Valspodar final konsantrasyonu	1 µM
İnkübasyon süresi	1 dakika
İnkübasyon sıcaklığı	32 °C
Reaksiyon karışımı	
^{3}H-E3S, 1 mCi/ml, 51300 mCi/mmol, 19,5 µM chem.cc.	20,4 µl
750 µM Östron 3-sülfat sodyum tuzu	9,7 µl
Membran süspansiyonu	255 µl
Transfer tamponu	4814,9 µl
Toplam hacim	5100 µl

3.5.2.1. VT İnhibisyon Deney Yöntemi

Solüsyonlar kullanılmadan önce taze şekilde hazırlandı. Solüsyonları hazırlamak için distile su (Milli-Q su) kullanıldı. ATPaz deneyleri için hazırlanan 50 mM stok MNP ve $MNPSO_2$ solüsyonları bu deneyde de kullanıldı.

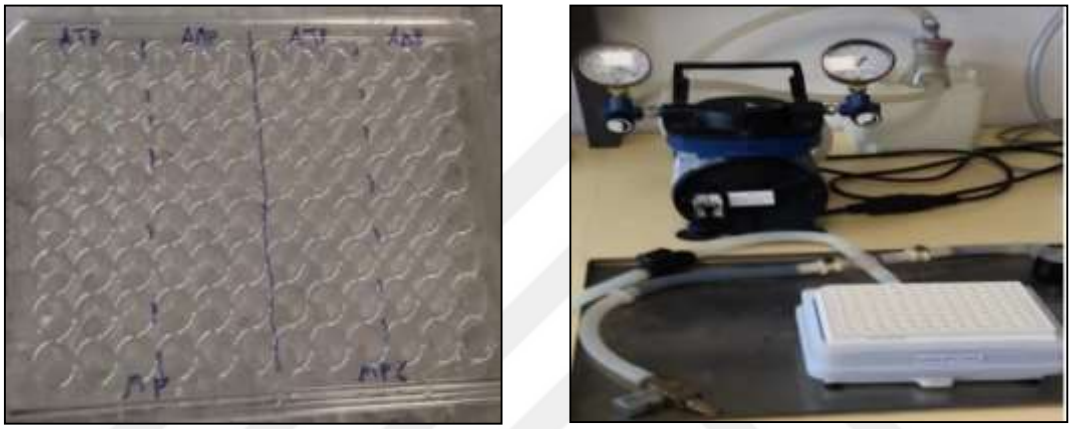
1. Hazırlanan tüm reaktifler buz üzerine konuldu.
2. Buz üzerine konulan membran süspansiyonu ile soğuk taşınma tamponu karıştırıldı ve sonra prob substrat solüsyonları eklendi. Buza yerleştirilmiş filtre mikroplakası olmayan standart 96-kuyucuklu mikroplakanın tüm kuyucuklarına bu süspansiyondan 50 µl eklendi.
3. İkinci bir yardımcı plaka üzerinde kuyucuk başına 20 µl final hacimde DMSO içinde test ilacının (MNP ve $MNPSO_2$) seri dilüsyonu hazırlandı.
4. Test ilaçları (MNP ve $MNPSO_2$) (0,75 µl) ve çözücüsü; referans inhibitörler ve bunun çözücüsü (0,75 µl) eklendi.
5. Buz üzerinde 1410 µl taşınma tamponu ile 90 µl Mg-ATP karıştırıldı. Kullanmadan önce ATP stok solüsyonunun tamamen karıştığı kontrol edildi.
6. Buz üzerinde 1410 µl taşınma tamponu ile 90 µl AMP karıştırıldı.
7. Mikroplakadaki ATP ve AMP 32 °C sıcaklıkta çalkalamalı ısıtıcıda 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
8. Filtre plakası ıslatıldı ve filtrasyon sistemi kuruldu. BCRP-HEK293 VT inhibisyon deneylerinde filtre plakasının her kuyucuğu 100 µl 100 µM E3S ile yıkandı. 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Vakum ile sıvı kuyucuklardan alındı.
9. Belirlenen kuyucuklara 25 µl ATP ve AMP eklendi. Plaka çalkalamalı ısıtıcıda çalkalandı. 32 °C 1 dakika inkübe edildi. Filtrasyon, deney soğuk yıkama tamponu ile durdurulduktan sonra 2 dakika içinde yapıldı.
10. 200 µl soğuk yıkama tamponu eklenerek reaksiyon durduruldu. Numuneler filtre plakasına ve filtreye transfer edildi (Şekil 3-4).
11. Kuyucuklar 5 × 200 µl soğuk yıkama tamponu ile yıkandı.
12. Filtre plakasının üç boş kuyucuğuna ilk adımda hazırlanan 10 µl'lik membran süspansiyonu eklendi. Bu filtreler üzerinde ölçülen radyoaktivite (cpm) bir kuyucuktaki toplam aktiviteyi hesaplamada kullanıldı.

13. Filtre plakası kurulandı (işlemi hızlandırmak için saç kurutma makinesi kullanıldı).

14. Her kuyucuğa 100 µl sintilasyon kokteyli eklendi.

15. Sintilasyon plaka folyosu ile kapatıldı ve numunelerin kokteylle karışması için 60 dakika karanlıkta bekletildi.

16. Sintilasyon sayım cihazında analiz yapıldı.



Şekil 3-4: VT inhibisyon analizinde mikroplakada ATP - AMP eklenen kolonların gösterimi (solda) ve vakum pompa sistemi ile filtre plakasının gösterimi (sağda)

3.5.2.2. Hesaplamalar

Hesaplamalar aşağıdaki formülleri esas alan yönteme göre gerçekleştirildi.

ATP bağımlı taşınma (cpm): Kontrol ve numuneler için ATP varlığında ölçülen ortalama cpm değerlerinden ATP yokluğunda ölçülen ortalama cpm değerleri çıkarılarak elde edildi.

ATP bağımlı taşınma (pmol/mg/dk): Adım 11'de hazırlanan belirlenmiş kuyucuklarda ölçülen cpm'lerin ortalaması 5 ile çarpılarak toplam aktivite (cpm) hesaplandı. Aşağıdaki formül kullanılarak pmol/mg membran protein/dakika cinsinden taşınma hızı hesaplandı.

$$\frac{ATP\ bağımlı\ taşınma\ (cpm)}{Toplam\ aktivite} \times \frac{Substrat\ konsantrasyonu\ (nM) \times Hacim\ (ml)}{Membran\ protein\ (mg) \times Zaman\ (\text{dk})}$$

ATP bağımlı taşınma (%): Test edilen ilacın aktivasyon veya inhibisyon yüzdesi hesaplandı. Bu hesaplamada, ilaç bulunmayan kontrolde belirlenen ATP bağımlı taşınma % 100 olarak alındı ve diğer tüm değerler bu bağıl skalada gösterildi. Aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\frac{Test\ ilacı\ varlığında\ ATP\ bağımlı\ taşınma\ (cpm)}{\text{İ}laçsız\ kontrolde\ ATP\ bağımlı\ taşınma\ (cpm)} \times 100$$

% Aktivite değerlerinin standart sapması aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$SS_{Aktivite\,\%_i} = 100 \times \sqrt{(\frac{VarB^{\,2}}{A}) + \frac{VarA \times B^2}{A^4}}$$

A ilaç bulunmayan kontrolde ATP bağımlı taşınma olduğunda, B ise ilaç varlığında ATP bağımlı taşınma olduğu durumlarda geçerlidir.

VT inhibisyon deneylerinin sonuçları, ATPaz aktivitesi için kullanılan aynı doz yanıtına karşı inhibisyon denklemi (değişken eğimli sigmoid denklemi) kullanılarak değerlendirildi.

$$Y = V_{min} + \frac{(V_{maks} - V_{min})}{1 + 10^{(\log EC50 - \log[A])\ x\ nH}}$$

Y hıza (dakikada miligram protein başına substrat pikomol), V_{min} minimum hıza (tamamen inhibe edilmiş taşınma), V_{maks} maksimum hıza (inhibitör yokluğunda), IC50 V_{min} ve V_{maks} arasında yarısına karşılık gelen ligant konsantrasyonuna, A gerçek test ilaç konsantrasyonuna ve nH tepe eğimine karşılık gelmektedir.

3.6. BCRP'nin Meme Bezindeki Ekspresyonlarının Western Blot ile Değerlendirilmesi

BCRP substratı olan MNP'nin sütle eliminasyonundaki rolünü gösterebilmek için BCRP'nin laktasyonda ve laktasyonda olmayan Kıvırcık ırkı dişi koyunların meme bezindeki düzeyleri MNP uygulaması olmadan Western blot yöntemi ile belirlendi.

3.6.1. Koyunların Meme Dokusundan Biyopsi Örneği Alınması

Numuneler, koyunların meme bezi parenşim dokusundan aseptik koşullarda tek kullanımlık steril punch biyopsi aleti (Kai, Japonya) ile alındı. Yapılan tüm işlemler anestezi altında gerçekleştirildi. Numuneler laboratuvara taşınmadan önce sıvı azot içinde donduruldu ve analize kadar -80 °C'de saklandı.

3.6.2. Meme Bezi Dokusundan Protein İzolasyonu

-80 °C'de saklanan meme dokuları %2'lik SDS ve seramik boncuklar eklenerek MagNA Lyser Green Beads tüplerine alındı. MagNA Lyser (Roche, İsviçre) cihazında 6500 rpm'de 60 saniye süre ile örnekler homojenize edildi. Bu işlem iki kez tekrar edildi. 70 °C 10 dk 1400 rpm'de inkübe edildi. 10000 g'de 5 dk ultrasantrifüj edildi. Protein konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla Bikinkoninik asit (BCA) metodu kullanıldı. Süpernatant alınarak SMART^{TM} BCA Protein Test Kiti (Intron Biotechnology, Güney Kore) ile total protein konsantrasyonu ölçüldü. Tüm adımlar üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Protein konsantrasyon tayini mikroplaka protokolüne göre yapıldı ve absorbans değerleri 562 nm'de ölçüldü. Standart olarak kitte yer alan 2 mg/ml konsantrasyondaki BSA kullanıldı. Absorbans ölçümünü takiben Excel'de standart eğrisi çizilerek konsantrasyonlar hesaplandı.

3.6.3. Western Blotlama

Western Blot metodu elektroforez ile ayrılmış proteinlerin belirlenmesinde kullanılan immünolojik bir yöntemdir. Kompleks karışım içinden hedef proteinler hakkında kalitatif ve semikantitafif sonuç elde edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Konsantrasyonları belirlenen protein örnekleri 5 dakika boyunca 95 °C'de inkübe edildi ve ardından buza alındı. İlk kuyucuğa boyalı marker yüklendi ve devamında diğer kuyucuklara protein örnekleri yüklenerek 80 V'ta 20 dakika süreyle, daha sonra 110 V'ta 1,5 saat yürütüldü. Proteinler ayrıştıktan sonra transfer basamağına geçildi. Jelin

büyüklüğüne göre kesilmiş 0,45 µm gözenek büyüklüğü olan PVDF membran (Roche) 2 dk arayla metanol içinde ve transfer tamponunda bekletilerek aktive edildi. Elektroforez işlemi sonrası membran, jel ve filtre kağıdı sandviç yöntemiyle hazırlandı ve Biorad transfer aparatı ile 100 V'ta proteinler jelden membrana transfer edildi. Transfer sonrası nonspesifik bölgelerin bloke edilmesi amacıyla membran bloklama çözeltisi (1 x TBST ve % 5 yağsız süt tozu) ile 1 saat bekletildi. Primer ve sekonder antikorlar 1 x TBST ile hazırlanmış % 5 yağsız süt tozu solüsyonu içinde ABCG2 1:500, Beta Aktin 1:5000, Anti-rat Ig G 1:5000 olacak şekilde hazırlandı. Primer antikor ile +4 °C'de bir gece inkübasyon yapıldı ve ardından membran 1 x TBST ile 3 defa 5 dakika yıkandı. Ardından sekonder antikor ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi ve membran 1 x TBST ile 3 defa 5 dakika yıkandı. Son yıkama esnasında luminol çalışma solüsyonu hazırlandı. Kemilüminesans görüntüleme için SuperSignal™ West Pico Plus ECL kiti içerisindeki reaktifler 1:1 oranında karıştırılarak çalışma çözeltisi elde edildi ve membrana eklendi. 1 dakika inkübe edildikten sonra membran hava kalmayacak şekilde kapatılarak Syngene ECL ile karanlık ortamda görüntüleme sağlandı. Western blot sonucunda elde edilen protein bant profilleri Image J programı ile analiz edildi.

Jel elektroforez ve transfer aşamasında kullanılan solüsyonların içerikleri, miktarları ve hazırlanış şekilleri Tablo 3-7'de verilmiştir.

Tablo 3-7: Jel elektroforez ve transfer aşamasında kullanılan solüsyonların içerikleri ve miktarları

Solüsyon	**Hazırlanışı**
%10 Ayırıcı jel (running gel)	2,334 ml %30 Akrilamid : bisakrilamid (37,5 : 1) + 2,625 ml 1 M Tris-Cl pH 8,8 + 0,07 ml %10 SDS + 1,894 µl dH_2O + 0,07 ml %10 APS (Amonyum persülfat) + 0,007 ml TEMED (Tetrametiletilendiamin)
% 5 Toplayıcı Jel (stacking gel)	0,5 ml %30 Akrilamid : bisakrilamid (37,5 : 1) + 0,38 ml 1 M Tris-Cl pH 6,8 + 0,03 ml %10 SDS + 2,058 ml dH_2O + 0,03 ml %10 APS (Amonyum persülfat) + 0,003 ml TEMED (Tetrametiletilendiamin)

5xYürütme Tamponu (running buffer)	7,55 g Tris-baz + 47 g Glisin + 300 ml dH_2O + 50 ml % 10 SDS dH_2O ile 500 ml'ye tamamlandı.
10xTransfer tamponu	72 g Glisin + 15,15 g Tris baz + dH2O ile 500 ml'ye tamamlandı.
1 x Transfer tamponu	70 ml 10 x Transfer Tamponu + 105 ml Metanol + dH_2O ile 700 ml'ye tamamlandı.
10xTBS	24,2 g Tris Baz + 87,66 g NaCl + pH 8'e sabitlendikten sonra dH_2O ile 1000 ml'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.
1xTBST	100 ml 10 x TBS + 900 ml dH_2O + 1 ml % 0,1 Tween-20
% 5 Yağsız süt tozu	5 g Yağsız süt tozu + 100 ml TBS-T
% 10 SDS	100 g SDS + Damla damla HCl (toplamda 35 µl kadar) ile pH 7,2'ye getirildikten sonra dH_2O ile 1000 ml'ye tamamlandı.

4. BULGULAR

4.1. Plazma ve Süt HPLC Metodu Validasyon Sonuçları

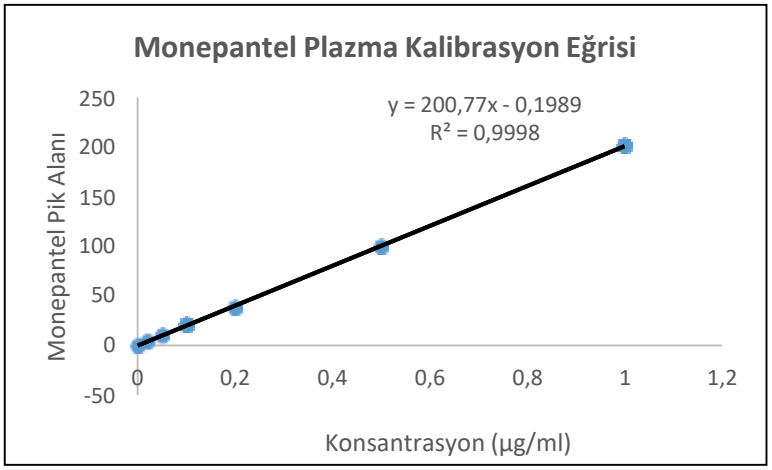
4.1.1. Plazma HPLC Metodu Validasyon Sonuçları

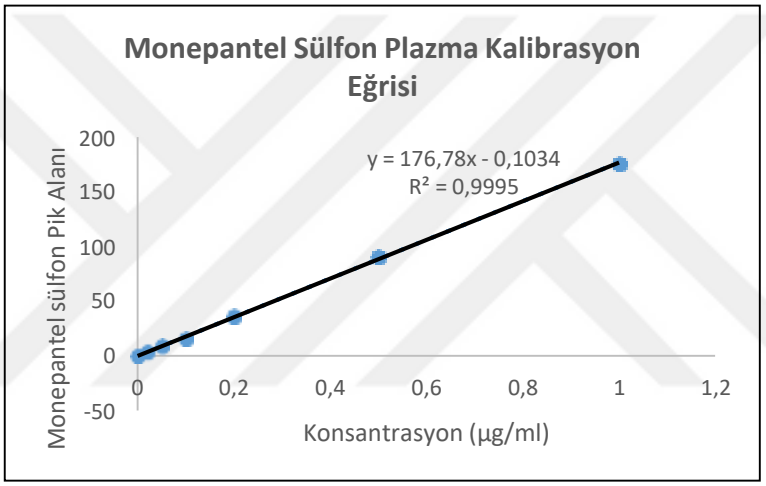
MNP ve $MNPSO_2$'nin plazmadan tayini için kullanılan metodun validasyon sonuçları Tablo 4-1'de sunulmuştur. MNP ve $MNPSO_2$ plazmada 1 – 0,02 µg/ml konsantrasyon aralığında doğrusal bulunmuştur. Plazma MNP ve $MNPSO_2$ kalibrasyon eğrileri Şekil 4-1'de sunulmuştur. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerlerinin % varyasyon katsayısı (% CV) değerleri % 10'dan düşük bulunmuştur. Elde edilen geri kazanım değerleri % 100'e yakındır.

Tablo 4-1: Plazma monepantel ve monepantel sülfon tayininde kullanılan HPLC metodunun validasyon verileri

Parametreler	**MNP Kromatografik Koşullar**	**$MNPSO_2$ Kromatografik Koşullar**
Doğrusallık aralığı (µg/ml)	1-0,02	1-0,02
R^2 değeri	0,9998	0,9995
Regresyon denklemi	y = 200,77x - 0,1989	y = 176,78x - 0,1034
LOD (µg/ml)	0,003	0,004
LOQ (µg ml)	0,01	0,014
Gün içi tekrarlanabilirlik (%CV) n=6	3,29	1,03
Günler arası tekrarlanabilirlik (%CV) n=6	4,93	6,21
Geri kazanım (1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,1 µg/ml)	%98,6, %98,1, %97	%98,6, %98,1, %97
Alıkonma zamanı (retention time)	14,52	13,96

LOD: dedeksiyon limiti (limit of dedection); LOQ: kantifikasyon limiti (limit of quantification); %CV: varyasyon katsayısı (coefficient of variation)

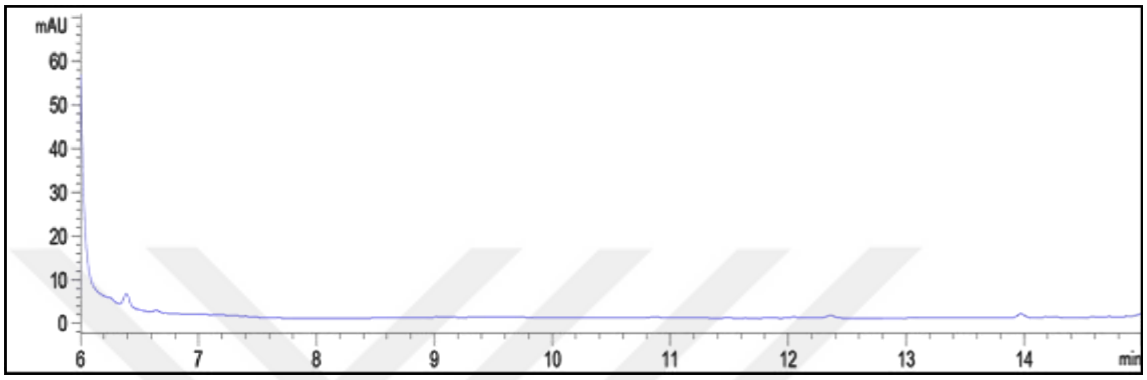




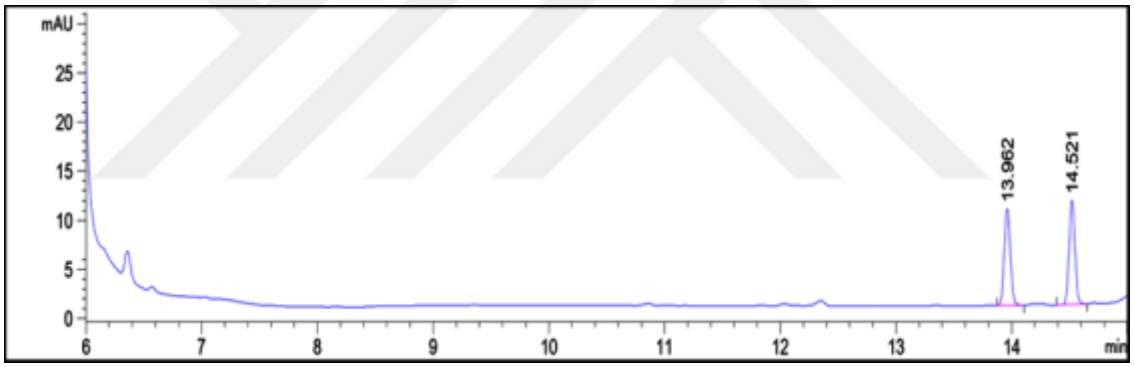
Şekil 4-1: Monepantel ve monepantel sülfon plazma standartlarının pik alanı-konsantrasyon kalibrasyon eğrileri.

Plazma validasyon verilerine göre, MNP ve $MNPSO_2$'nin plazmadan tayin metodunun tekrarlanabilir olduğu valide edilmiştir. Validasyon çalışmalarında kullanılan boş plazma, MNP ve $MNPSO_2$ eklenmiş plazma standartlarına ait kromatogramlar Şekil 4-2'de sunulmuştur.

A



B



Şekil 4-2: (A) Koyun boş plazma örneklerinin ekstraksiyonu ve HPLC sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram. MNP ve $MNPSO_2$'ye ait pik gözlenmemiştir. (B) Koyun plazmasına spike edilen MNP ve $MNPSO_2$ standardına ait kromatogram. Alıkonma zamanı MNPSO2 için 13,96 dakika ve MNP için 14,52 dakika olarak saptanmıştır.

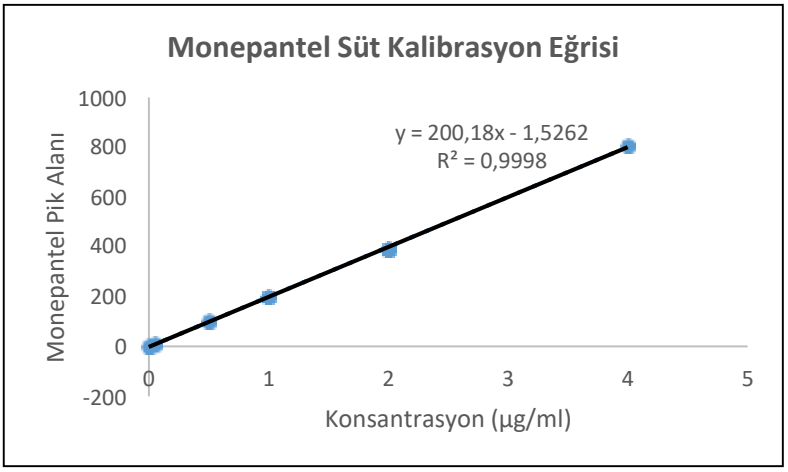
4.1.2. Süt HPLC Metodu Validasyon Sonuçları

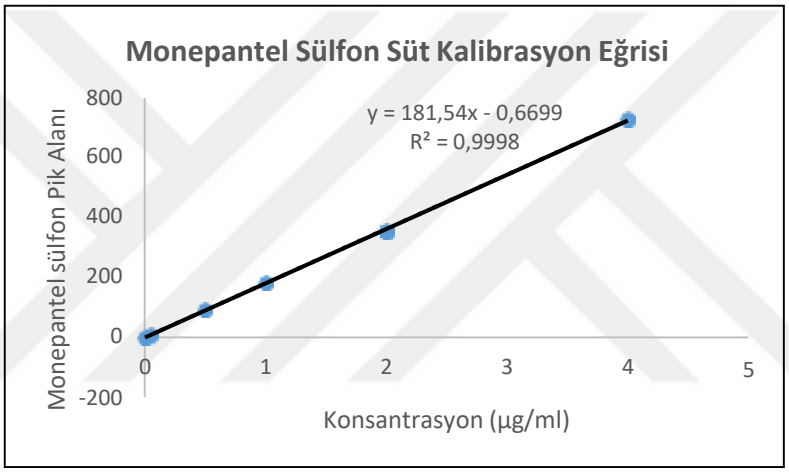
MNP ve $MNPSO_2$'nin sütten tayini için kullanılan metodun validasyon sonuçları Tablo 4-2'de sunulmuştur. MNP ve $MNPSO_2$ sütte 4 – 0,02 µg/ml konsantrasyon aralığında doğrusal bulunmuştur. Süt MNP ve $MNPSO_2$ kalibrasyon eğrileri Şekil 4-3'te sunulmuştur. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerlerinin % varyasyon katsayısı (% CV) değerleri % 10'dan düşük bulunmuştur. Elde edilen geri kazanım değerleri Tablo 4-2'de verilmiştir.

Tablo 4-2: Süt monepantel ve monepantel sülfon tayininde kullanılan HPLC metodunun validasyon verileri

Parametreler	**MNP Kromatografik Koşullar**	**$MNPSO_2$ Kromatografik Koşullar**
Doğrusallık aralığı (µg /ml)	4-0,02	4-0,02
R^2 değeri	0,9998	0,9998
Regresyon denklemi	y = 200,18x - 1,5262	y = 181,54x - 0,6699
LOD (µg /ml)	0,002	0,004
LOQ (µg /ml)	0,009	0,013
Gün içi tekrarlanabilirlik (%CV) n=6	1,35	1,65
Günler arası tekrarlanabilirlik (%CV) n=6	4,95	4,81
Geri kazanım (4 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml)	%78,5, %78, %76	%78,5, %78, %76
Alıkonma zamanı (dk/retention time)	14,51	13,95

LOD: dedeksiyon limiti (limit of dedection); LOQ: kantifikasyon limiti (limit of quanrification); %CV: varyasyon katsayısı (coefficient of variation)

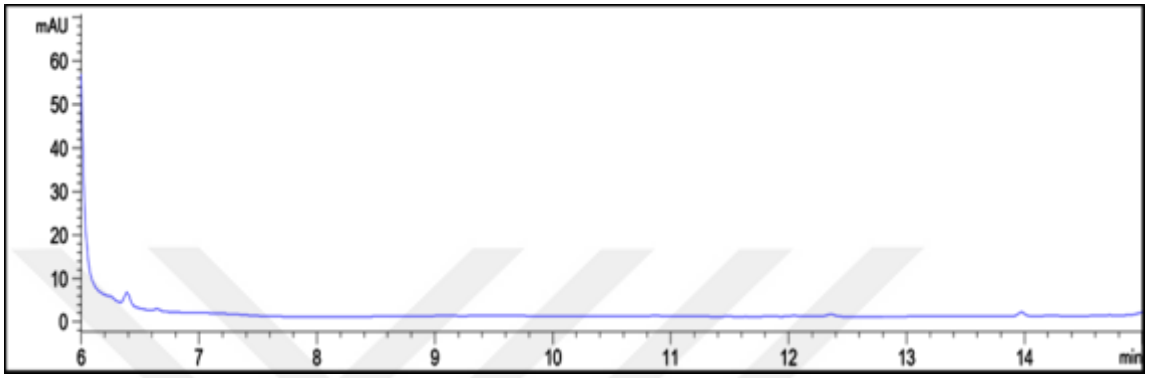




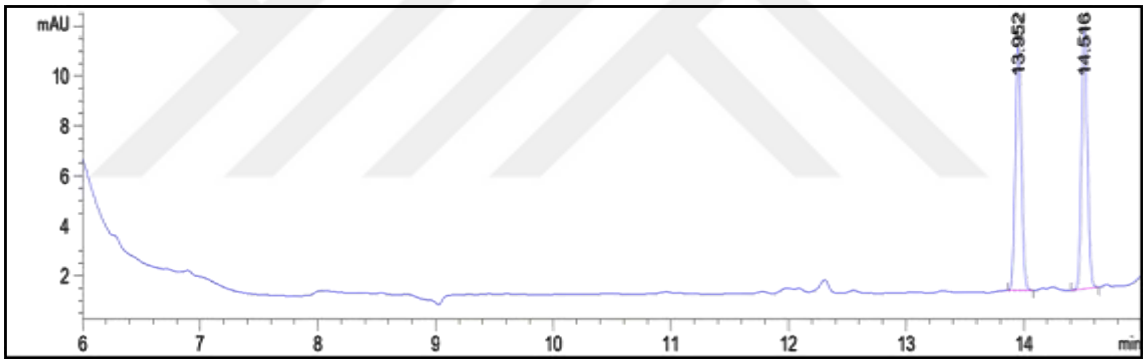
Şekil 4-3: Monepantel ve monepantel sülfon süt standartlarının pik alanı-konsantrasyon kalibrasyon eğrileri

Süt validasyon verilerine göre, MNP ve MNPSO2'nin sütten tayin metodunun tekrarlanabilir olduğu valide edilmiştir. Validasyon çalışmalarında kullanılan boş süt, MNP ve $MNPSO_2$ eklenmiş süt standartlarına ait kromatogramlar Şekil 4-4'te sunulmuştur.

A



B



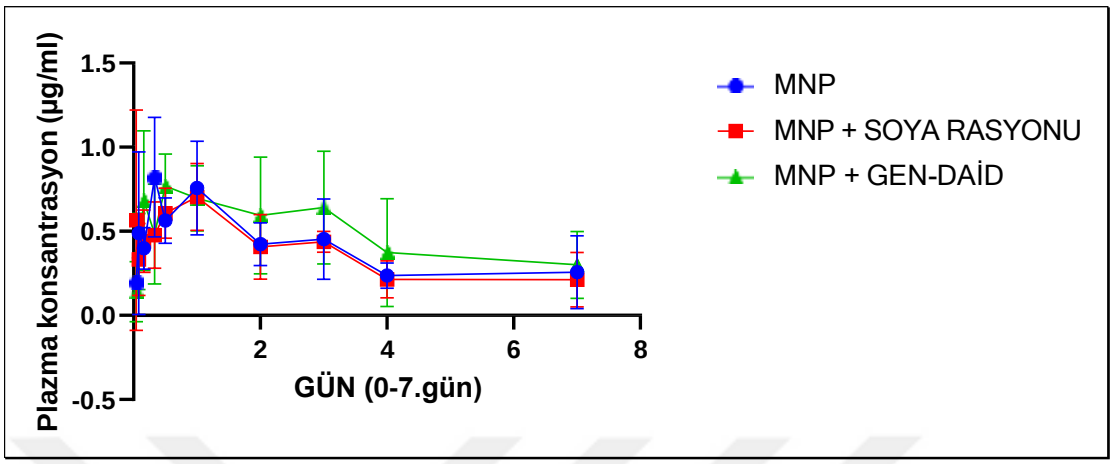
Şekil 4-4: (A) Koyun boş süt örneklerinin ekstraksiyonu ve HPLC sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram. MNP ve $MNPSO_2$'ye ait pik gözlenmemiştir. (B) Koyun sütüne spike edilen MNP ve $MNPSO_2$ standardına ait kromatogram. Alıkonma zamanı $MNPSO_2$ için 13,95 dakika ve MNP için 14,51 dakika olarak saptanmıştır.

4.2. Plazma ve Süt Monepantel Farmakokinetiği

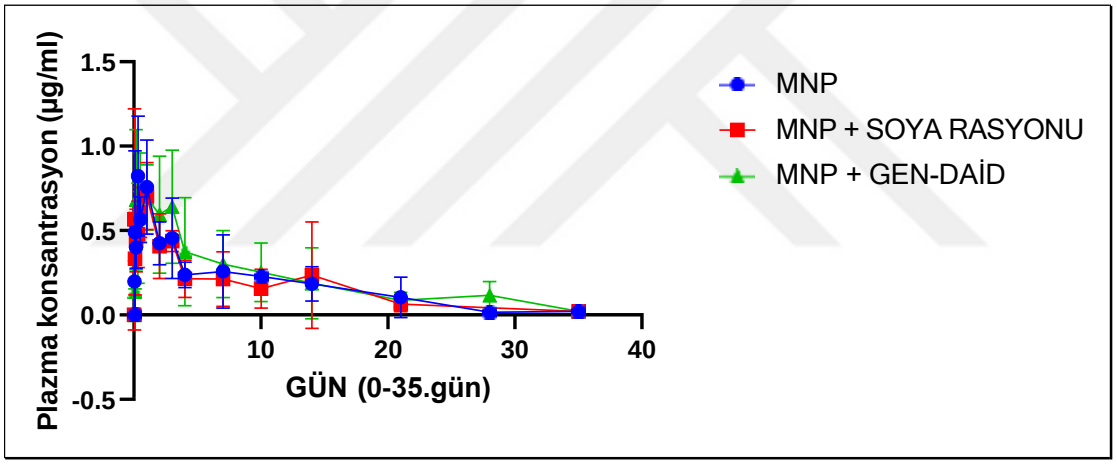
MNP'nin plazma ve süt konsantrasyonları, deney grupları olarak tanımlanan standart rasyonla beslenen koyunlar (MNP), soya ile zenginleştirilmiş rasyonla beslenen koyunlar (MNP + soya rasyonu) ve standart rasyonun yanı sıra ekzojen genistein ve daidzein verilen koyunlarda (MNP + Gen-Daid) ölçülmüştür. Koyunlarda MNP oral uygulamayı (2,5 mg/kg) takiben elde edilen $MNPSO_2$ plazma konsantrasyonları Şekil 4-5'te sunulmuştur. Plazma ve sütte belirlenen MNP ve $MNPSO_2$ farmakokinetik parametreleri Tablo 4-3'te sunulmuştur.

Genistein ve daidzein ile etkileşimi değerlendirmek amacıyla yapılan hesaplamalarda, soya ile zenginleştirilmiş rasyon ve ekzojen izoflavon alan hayvanlar arasında $MNPSO_2$ plazma konsantrasyonunda önemli bir fark kaydedilmemiştir; ancak $MNPSO_2$ süt AUC (0-840 sa) µg sa/ml değerleri soya ile zenginleştirilmiş rasyonla beslenen grupta (MNP + soya rasyonu) ve izoflavonoidlerle beslenen grupta önemli oranda azalma göstermiştir (Tablo 4-3). Ek olarak, soya rasyonu grubunda AUC (0-840 sa) süt/plazma oranı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmıştır (% 40,11) ($p < 0,05$). Bu grupta sütle atılan MNP dozunun yüzdesi, farmakokinetik sonuçları doğrulayarak önemli ölçüde azalmıştır.

A.

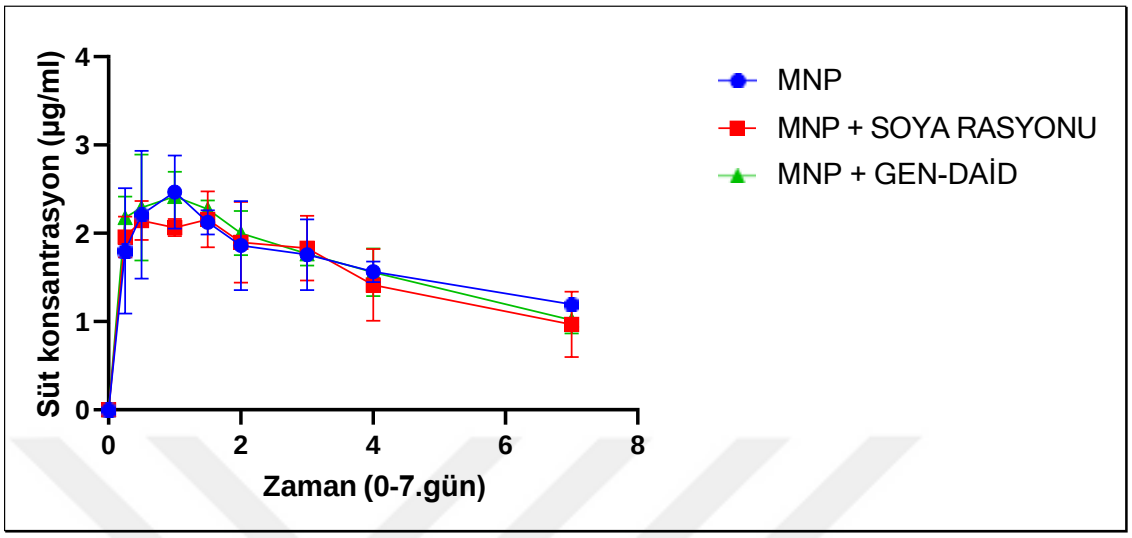


B.

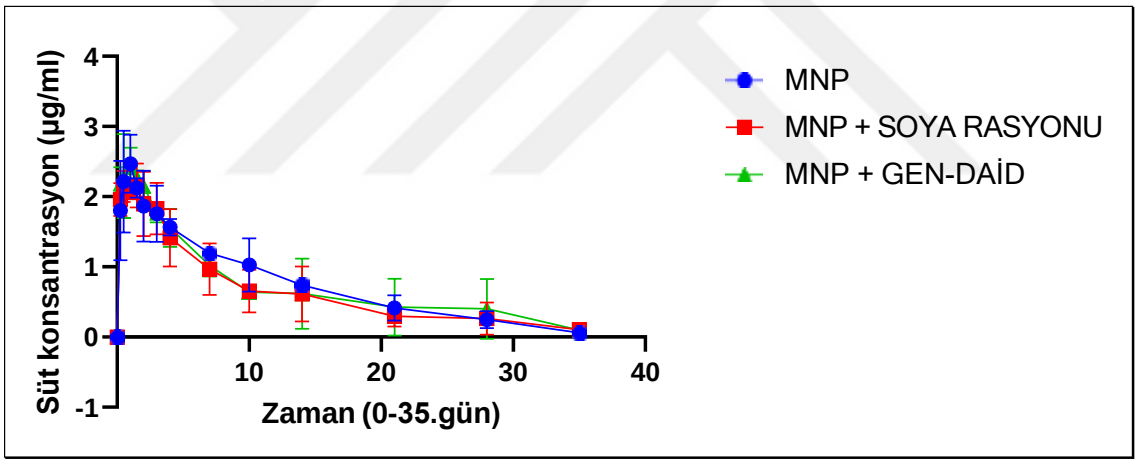


Şekil 4-5: Üç deney grubunda koyunlarda monepantel oral uygulamayı (2,5 mg / kg) takiben elde edilen monepantel sülfon plazma konsantrasyonları (µg /mL) ve zaman (gün) eğrileri. A: 0-7.gün B: 0-35.gün. Her nokta ortalama ± SD'yi (n = 16) temsil etmektedir.

A.



B.



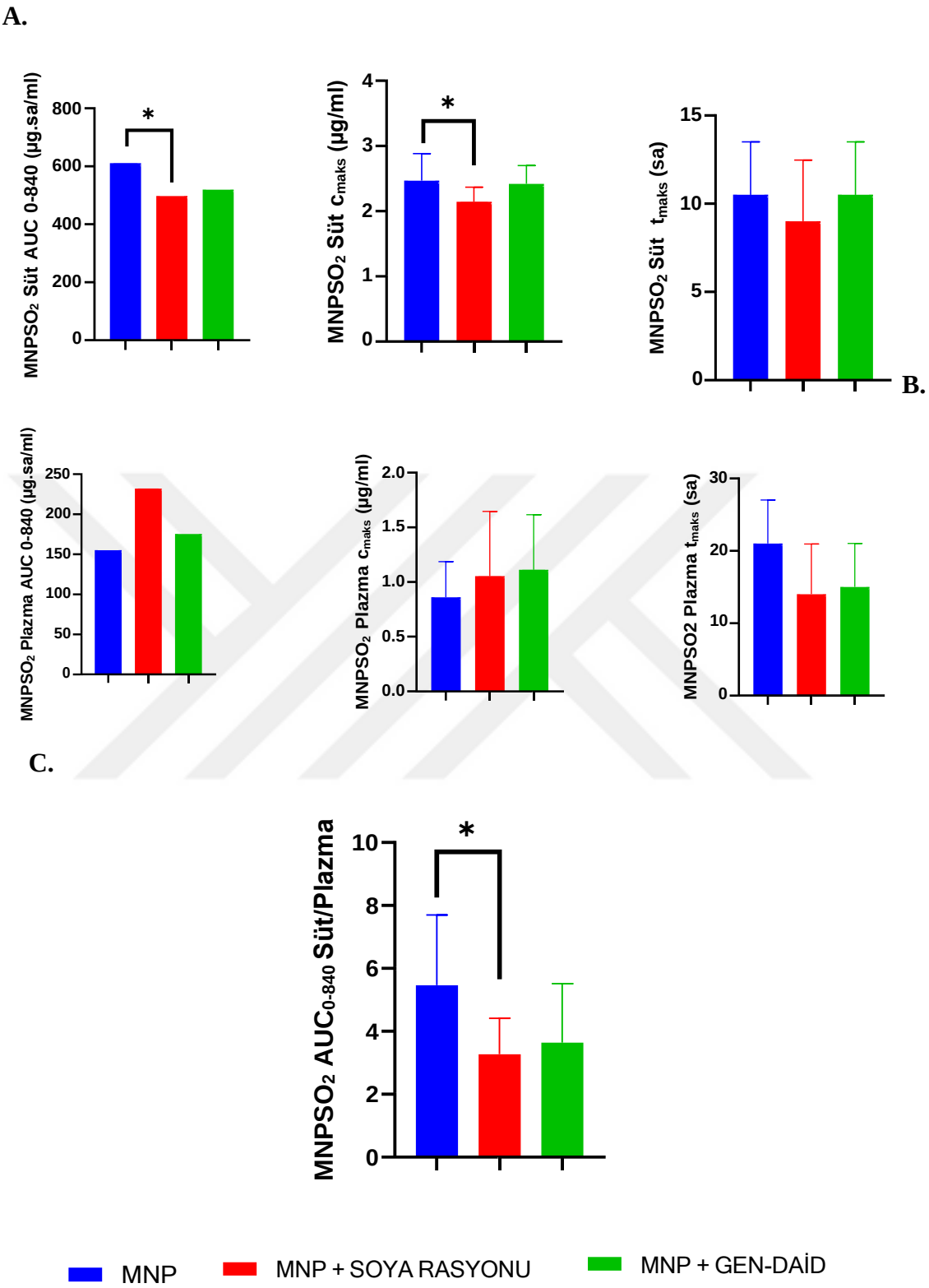
Şekil 4-6: Üç deney grubunda koyunlarda monepantel oral uygulamayı (2,5 mg / kg) takiben elde edilen monepantel sülfon süt konsantrasyonları (µg / mL) ve zaman (gün) eğrileri. A: 0-7.gün B: 0-35.gün. Her nokta ortalama ± SD'yi (n = 16) temsil etmektedir.

Tablo 4-3: Üç deney grubunda monepantelin (2,5 mg/kg) oral uygulamasından sonra elde edilen monepantel ve monepantel sülfon plazma ve süt farmakokinetik parametreleri

	MNP	**MNP + Soya rasyonu**	**MNP + Gen-Daid**	**MNP**	**MNP + Soya rasyonu**	**MNP + Gen-Daid**
Plazma	**(MNP)**			**($MNPSO_2$)**		
AUC (0-840 sa) µg.sa/ mL	5,53 ± 0,56	10,56 ± 3,85	8,05 ± 2,46	155 ± 25,73	232,1 ± 35,66	175,3 ± 31,37
c_{maks} (µg/ mL)	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,03	0,07 ± 0,04	0,64 ± 0,17	0,7 ± 0,19	0,69 ± 0,19
t_{maks} (sa)	6 ± 2,3	3,5 ± 1	4 ± 2,82	21 ± 6	14 ± 6,92	15 ± 6
Süt	**(MNP)**			**($MNPSO_2$)**		
AUC (0-840 sa) µg.sa/ mL	-	-	-	611,6 ± 31,91	497,6 ± 53,48*	519,9 ± 51,04
c_{maks} (µg/mL)	-	-	-	2,46 ± 0,41	2,14 ± 0,22*	2,41 ± 0,28
t_{maks} (sa)	-	-	-	10,5 ± 3	9 ± 3,46	10,5 ± 3
AUC (0-840 sa) (Süt/Plazma)	-	-	-	5,46 ± 2,23	3,27 ± 1,13*	3,63 ± 1,87

Sonuçlar, ortalama ± SD (n = 16) olarak gösterilmiştir.

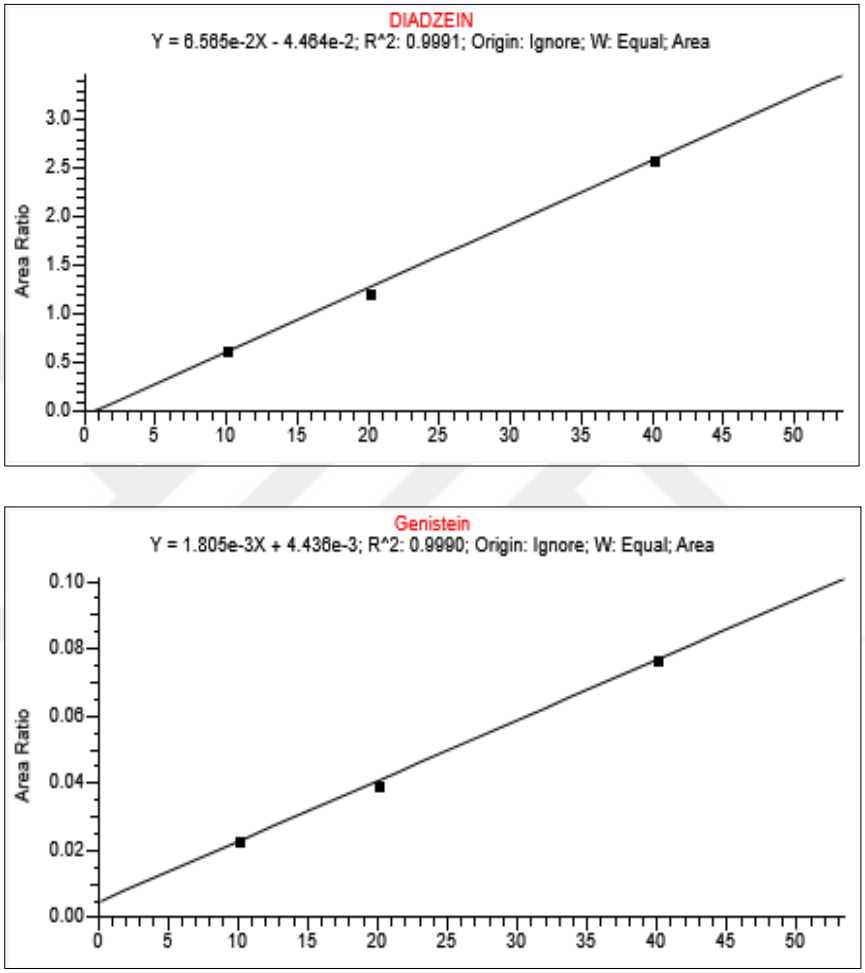
* MNP grubunun MNP + Soya rasyonu grubundan fark, *p <0,05.



Şekil 4-7: (A) Üç gruba oral yoldan 2,5 mg/kg MNP uygulanmasını takiben elde edilen süt $MNPSO_2$ $AUC_{0\text{-}840}$ c_{maks} t_{maks} verileri. (B) Üç gruba oral yoldan 2,5 mg/kg MNP uygulanmasını takiben elde edilen plazma $MNPSO_2$ $AUC_{0\text{-}840}$ c_{maks} t_{maks} verileri. (C) Üç gruba oral yoldan 2,5 mg/kg MNP uygulanmasını takiben elde edilen süt $MNPSO_2$ $AUC_{0\text{-}840}$ süt/plazma oranı verileri. Tek-yönlü ANOVA, * p<0,05; Ort ± SD.

4.3. Yem Genistein ve Daidzein Düzeylerinin LC-MS/MS İle Belirlenmesi

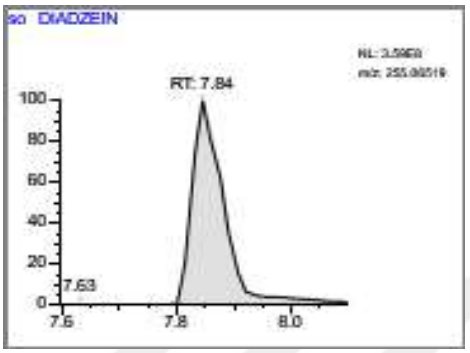
Daidzein ve genisteinin analitik incelenmesinde, öncelikle kör olarak kullanılan buğday unu üzerine genistein ve daidzein standartları eklenmiş ve elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 4-8'de verilmiştir.



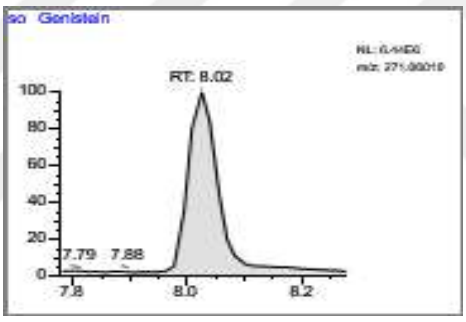
Şekil 4-8: Daidzein ve genistein kalibrasyon eğrileri

Soya yeminde yapılan LC-MS/MS ölçümü sonucu, daidzein alıkonma zamanı (retention time: RT) 7,84 dakika genistein alıkonma zamanı (RT) 8,02 dakika ve internal standart (IS) olarak kullanılan atropine-d3 alıkonma zamanının (RT) 8,48 dakika olduğu tespit edildi (Şekil 4-9).

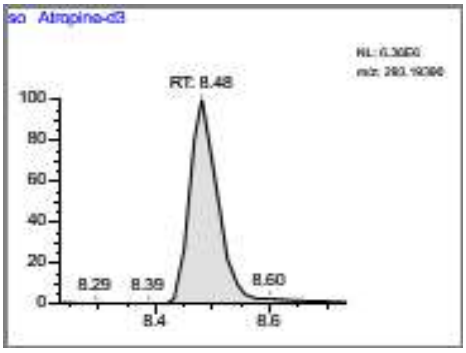
A.



B.



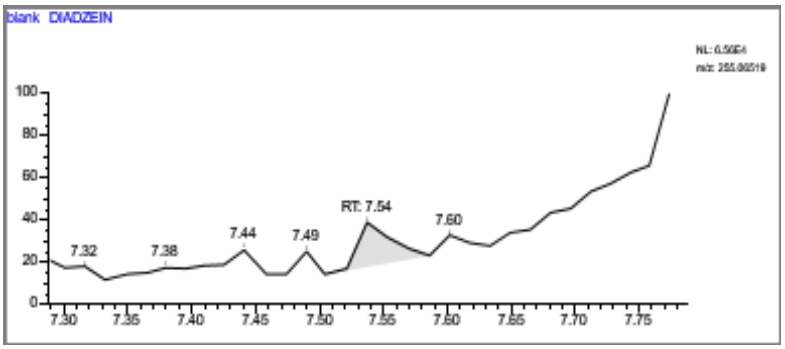
C.



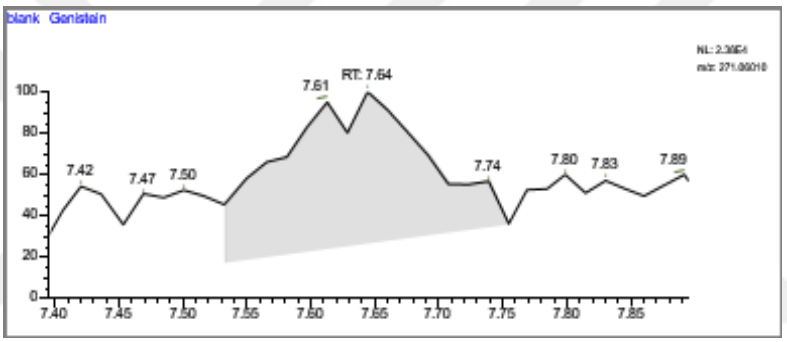
Şekil 4-9: (A) Daidzein (RT:7,84) (B) Genistein (RT:8,02) ve (C) Atropine-d3'e (IS) (RT:8,48) ait kromatogramlar

Kör (blank) matriks olarak kullanılan buğday ununda daidzein, genistein ve IS atropin-d3 kromatogramları Şekil 4-10'da verilmiştir.

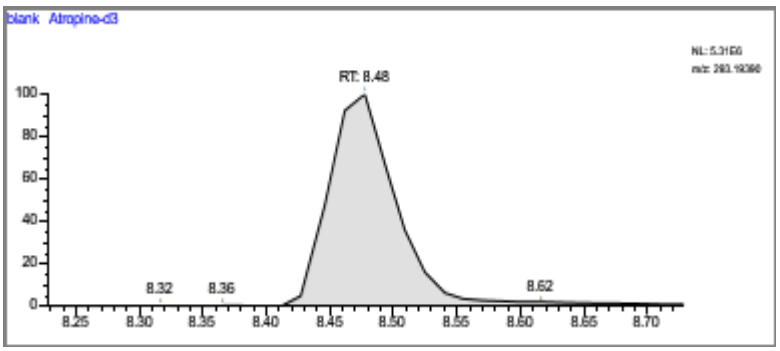
A.



B.



C.



Şekil 4-10: Buğday unu (kör matrikste) ekstraksiyonu sonucu elde edilen kromatogramlar. Daidzein (A) ve genistein'e (B) ait pik gözlenmezken, atropin-d3'e (C) ait pik gözlenmiştir.

Soya yemindeki daidzein miktarı 945 ppm (94,5 mg/100 g), genistein miktarı 615 ppm (61,5 mg/100 g) olarak saptandı. Standart yem, yonca ve buğday samanından yapılan ekstraksiyonlar sonucu genistein ve daidzein miktarlarının tespit limitinin altında kaldığı gözlendi.

4.4. BCRP ATPaz Aktivite ve Veziküler Taşınma İnhibisyon Deneyleri Sonuçları

i. ATPaz Aktivite Ölçümü

ATP hidrolizi SB-BCRP-M PREDEASY™ ATPaz Kiti (Solvo Biotechnology, Macaristan) üreticinin talimatları doğrultusunda inorganik fosfatın liberasyonu ölçülerek belirlenmiştir. Membran vezikülleri 1,2 mM sodyum ortovanadat içeren ve içermeyen çeşitli MNP ve $MNPSO_2$ konsantrasyonları ile inkübe edilmiştir. ATPaz aktiviteleri, ABC efluks pompası inhibitörü olan 1,2 mM sodyum ortovanadatın varlığında ve yokluğunda ölçülen inorganik fosfat liberasyon farkı ile belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar vanadata duyarlı ATPaz aktiviteleri olarak sunulmuştur.

Deneylerden elde edilen sonuçlar Graphpad Prism versiyon 9.1.2 (ABD) programı kullanılarak analiz edilmiştir. MNP ve $MNPSO_2$ ATPaz deneylerine dayalı olarak hesaplanan EC50 ve IC50 değerleri Tablo 4-4'te verilmiştir.

ii. Veziküler Taşınma İnhibisyon Ölçümü

MNP ve $MNPSO_2$'nin taşıyıcılar ile etkileşimi E3S taşınmasının başlangıç hızının membran vezikküllerine modülasyonu ile tespit edilmiştir. Veziküler taşınma inhibisyon deneyleri, üreticinin talimatları doğrultusunda (Solvo Biotechnology veziküler taşınma inhibisyon deneyleri genel protokolü, Macaristan) gerçekleştirilmiştir. İçten dışa membran vezikküllerini içeren membran fraksiyonları, prob substratı olarak [^{3}H]E3S kullanılarak ATP varlığı veya yokluğunda 96 kuyucuklu plakada inkübe edilmiştir. Taşınma, soğuk yıkama tamponunun eklenmesiyle ve 96 kuyucuklu filtre plakasının (Millipore) cam fiber filtrelerinden hızlı filtrasyonla durdurulmuştur. Filtreler beş kez 200 µl soğuk yıkama tamponu ile yıkanıp kurutulduktan sonra tutulan radyoaktivite, sıvı sintilasyon sayacı (Perkin Elmer Mikrobeta 2, ABD) kullanılarak sintilasyon kokteylinde (Ultima Gold™ XR, Perkin Elmer, ABD) ölçülmüştür.

MNP ve $MNPSO_2$ veziküler taşınma inhibisyon deneylerine dayalı olarak hesaplanan IC50 değerleri Tablo 4-4'te verilmiştir.

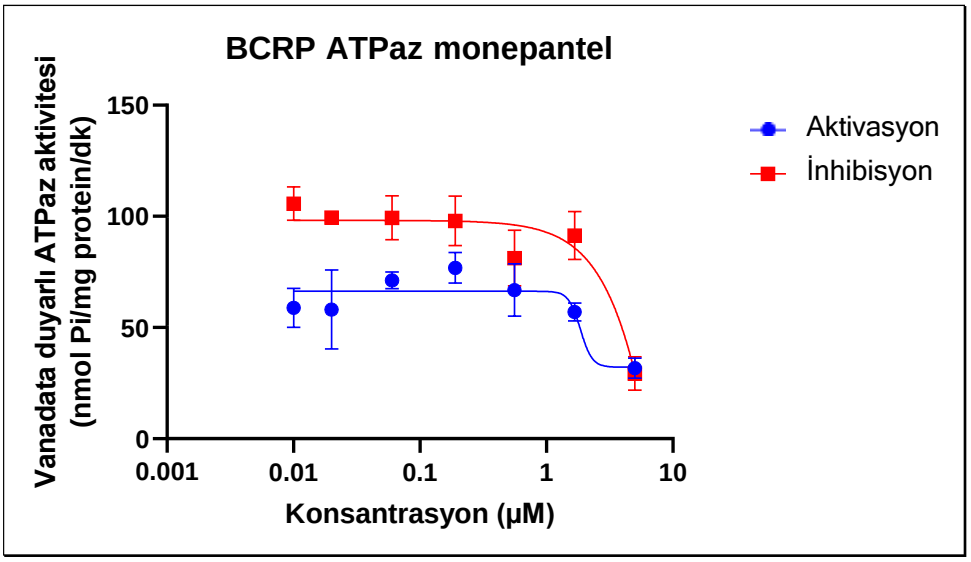
Tablo 4-4: MNP ve $MNPSO_2$ ATPaz ve VT inhibisyon deneylerinde elde edilen EC50 ve IC50 değerleri

ABC taşıyıcı		Deneyler	EC50 (µM)	IC50 (µM)
BCRP	MNP	ATPaz	2,03	919,7
		VT inhibisyon	-	0,27
	$MNPSO_2$	ATPaz	3,33	78,42
		VT inhibisyon	-	0,14

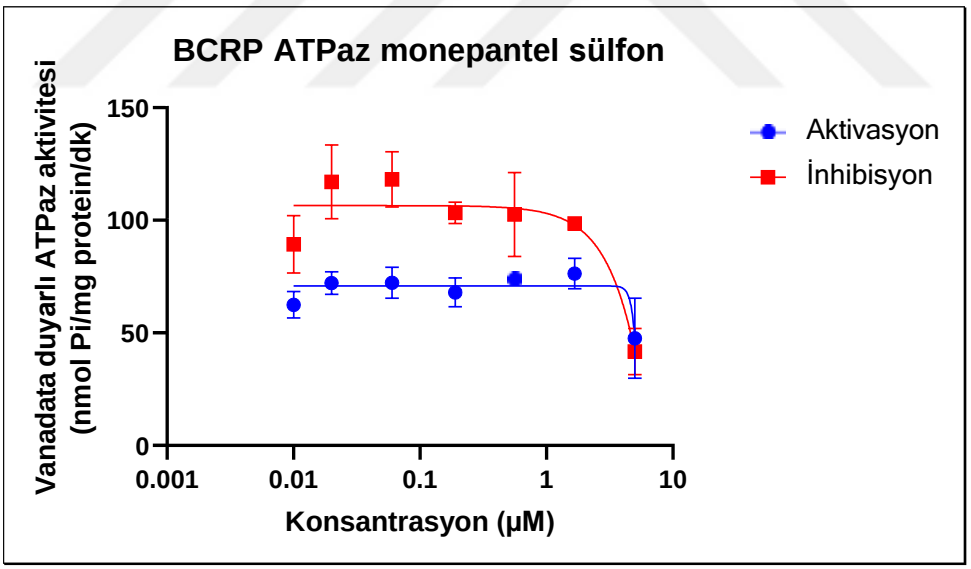
MNP ve $MNPSO_2$'nin efluks taşıyıcıları ile etkileşimlerini test etmek için BCRP'yi aşırı eksprese eden SB-BCRP-M membranları kullanılarak ATPaz deneyleri gerçekleştirilmiştir.

MNP ve $MNPSO_2$'nin BCRP'nin vanadata duyarlı ATPaz aktivitesini aktive etmediği; ancak özellikle $MNPSO_2$ için BCRP vanadata duyarlı ATPaz aktivitesini inhibe ettiği görülmüştür (Şekil 4-11 ve 4-12).

BCRP ile MNP ve $MNPSO_2$ etkileşimlerini doğrulamak için prob substrat olarak [^{3}H]E3S kullanılarak veziküler taşınma inhibisyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Her iki deney sonucunda etkileşimi doğrulayan sonuçlar olduğu görülmüştür. SB-BCRP-HEK293 deneylerinde MNP için IC50 değerleri 0,27 µM, $MNPSO_2$ için 0,14 µM bulunmuştur (Şekil 4-13) (Tablo 4-4).



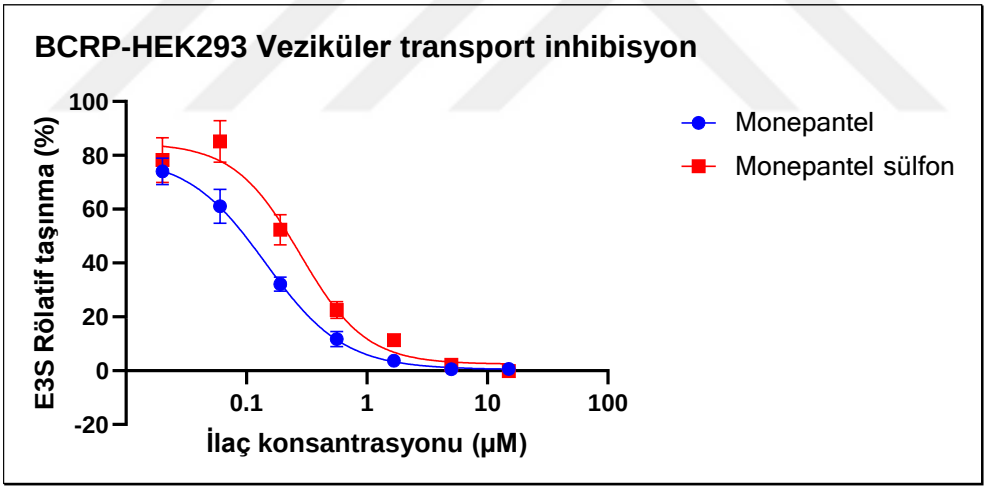
Şekil 4-11: Monepantel için SB-BCRP-M membranında yapılan vanadata duyarlı ATPaz aktivitesi deneyinde aktivasyon (mavi daireler) ve inhibisyon (kırmızı kareler) koşulları.



Şekil 4-12: Monepantel sülfon için SB-BCRP-M membranında yapılan vanadata duyarlı ATPaz aktivitesi deneyinde aktivasyon (mavi daireler) ve inhibisyon (kırmızı kareler) koşuları.

VT inhibisyon deneylerinde MNP ve $MNPSO_2$ için kullanılan izotop ve substrat sonuçları şu şekildedir:

Spesifik aktivite (mCi/ mmol)	51300
İzotop konsan. (mCi/ml)	1
# kuyucuk	102
Miks/kuyucuk (ml)	50
Miks toplam hacim (ml)	5100
İzotop /kuyucuk (µl)	0,2
Toplam izotop (ml)	20,4
İzotop final konsant(mM)	0,05
Soğuk subs. Stok kons. (µM)	750
Soğuk subs. final kons. (µM)	0,95
Soğuk substrat toplam (µl)	9,6697856

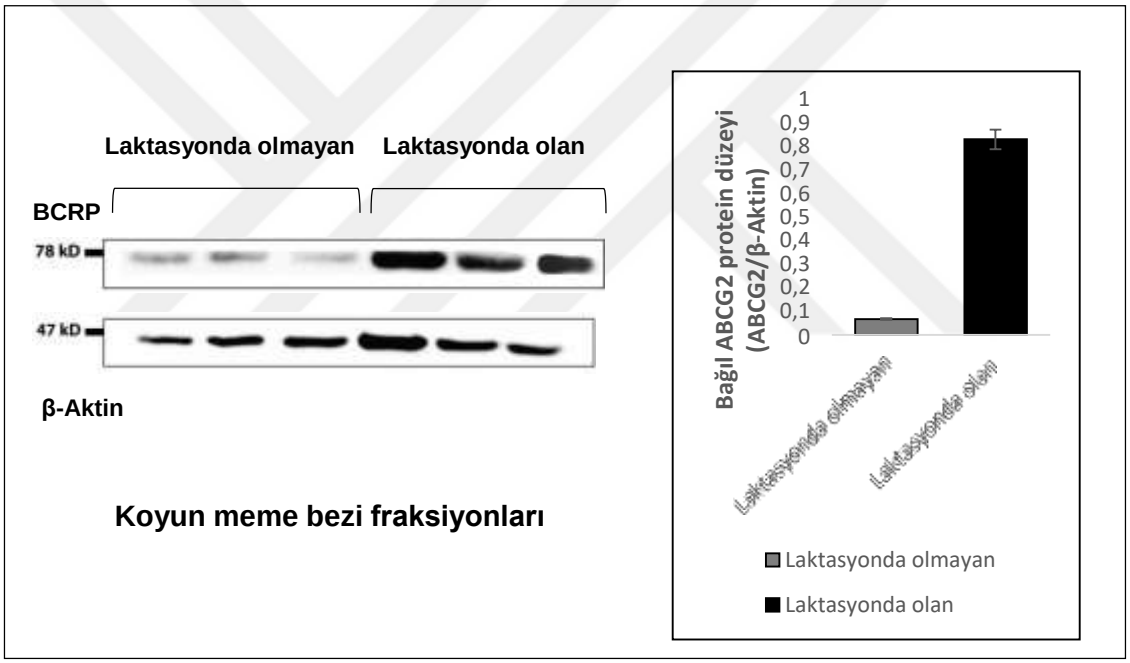


Şekil 4-13: BCRP-HEK293 içten dışa veziküllere ATP bağımlı E3S taşınması

4.5. BCRP'nin Meme Bezinde Ekspresyonlarının Western Blot Deney Sonuçları

BCRP'nin laktasyonda ve laktasyonda olmayan dişi koyunların meme bezindeki düzeyleri MNP uygulaması olmadan Western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu taşıyıcı proteinin laktasyonda olan dişi koyunlarda kuru dönemdeki dişi koyunlara göre ($p<0,001$) 12,23 kat daha fazla eksprese olduğu gösterilmiştir (Şekil 4-14). Laktasyonda ve laktasyonda olmayan dişi koyunlardaki BCRP düzeyi karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) bulunmuştur.

Laktasyondaki (n=3) üç dişi koyunun meme bezinde sırasıyla 71 µg, 62 µg, 60 µg; laktasyonda olmayan (n=3) üç dişi koyunun meme bezinde sırasıyla 52 µg, 52 µg, 50 µg membran proteini bulunmaktadır. Kontrol olarak Beta aktin kullanılmıştır.



Şekil 4-14: Koyun meme bezi membran fraksiyonlarında BCRP'nin (BXP-53) ekspresyonu ve kantifikasyonu için yapılan Western blot deneyleri. Student's t test: $p<0,001$

5. TARTIŞMA

Helmintlere karşı verilen mücadelede genel olarak benzimidazoller (flubendazol, albendazol ve fenbendazol), imidatiyazoller (levamizol) ve makrosiklik laktonlar (ivermektin) gibi antelmentik ilaçlar kullanılmaktadır. Benzer yapıdaki bu antelmentiklerin uzun yıllar boyunca sık kullanımı sonucunda bazı helmintlerde ilaç direnci açığa çıkmıştır (Gobert ve Jones 2008; Papadopoulos 2008; Leathwick 2012). Direnç oluşumunun dünya çapında ciddi bir sorun olması ve büyük ekonomik kayıplara yol açmasının sonucu olarak yeni bileşik sentezi çalışmaları yapılmış ve 2009 yılında MNP (AAT 1566) keşfedilmiştir (Kaplan 2004; Kaminsky ve ark. 2008a; Papadopoulos 2008). MNP günümüzde veteriner alanda ruminantlarda kullanım için onaylı bir bileşiktir (Kaminsky ve ark. 2008b). Buna ek olarak düşük toksisite, uygun farmakokinetik özellikler, koyun ve inek nematodlarına karşı geniş spektrumlu etkinlik gibi özelliklere sahip olması nedeniyle ruminantlarda helmintozis tedavisinde seçkinleşen bir bileşiktir.

Çalışmamızda, BCRP inhibisyonuna yol açtığı *in vivo* ve *in vitro* şartlarda kanıtlanmış olan soya izoflavonları genistein ve daidzeinin, bir BCRP substratı olan MNP'nin koyun plazma ve süt farmakokinetiğine etkisi incelenmiştir. Plazma ve sütteki MNP ve $MNPSO_2$ düzeyleri valide edilmiş HPLC yöntemi ile tayin edilmiştir. Ek olarak membran deneylerinde MNP/$MNPSO_2$ ile BCRP etkileşimi incelenmiş; western blot deneyleri ile MNP uygulanmamış laktasyondaki ve kuru dönemdeki koyunlardan alınan meme dokularındaki BCRP ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. Koyunlarda MNP farmakokinetiği ile ilgili çalışmaların varlığına karşın bu bileşiğin izoflavonlar ile etkileşiminin moleküler düzeyde incelendiği bir araştırmanın bulunmaması nedeniyle çalışmamız özgünlük arz etmektedir. Farmakokinetik parametrelerin yanı sıra BCRP etkileşim deneyleri ile incelenen bu model çalışmada koyunlara MNP'nin tedavi dozu 2,5 mg/kg oral yolla uygulanmıştır (Karadzovska ve ark. 2009). BCRP'ye bağımlı ilaç etkileşim çalışmalarında bildirilen sonuçlara dayanarak, bir gruba BCRP inhibitörü olarak genistein ve daidzein 10 mg/kg dozda oral yolla uygulanmış, diğer gruptaki hayvanlar ise soya yönünden zengin rasyonla beslenmiştir (Perez ve ark. 2013).

Çalışmamızda kontrol grubunun süt ve plazma konsantrasyon-zaman eğrileri incelendiğinde, MNP'nin daha önce yapılan çalışmalarla (Karadzovska ve ark. 2009; Hosking ve ark. 2010a; Lifschitz ve ark. 2014; Mahnke ve ark. 2016) oldukça benzer bir farmakokinetik profil sergilediği görülürken; soya yönünden zengin rasyonla beslemenin

ve izoflavonların ekzojen olarak verilmesinin, MNP'nin farmakokinetik profilini değiştirebileceği tespit edilmiştir. MNP ana metaboliti $MNPSO_2$'nin ruminant sütlerinde ilaç dağılımı ve rezidü çalışmalarında belirteç rezidü olduğu ve ayrıca $MNPSO_2$ ile ana ilaç MNP karşılaştırıldığında benzer *in vitro* antelmentik etkinliğe sahip oldukları bildirilmiştir (Karadzovska ve ark. 2009; EMA 2013). Koyunlarda yapılan farmakokinetik çalışmalarda plazma ve sütte saptanabilen tek metabolitin $MNPSO_2$ olması nedeniyle çalışmamızda MNP farmakokinetiğine ek olarak $MNPSO_2$ farmakokinetiği de incelenmiştir. Çalışmamızda MNP oral yolla alındıktan sonra hızlı bir şekilde metabolize olmuş, plazmada 24. saate, sütte ise 36. saate kadar belirlenebilmiştir. Buna karşın $MNPSO_2$ hem sütte hem de plazmada 840. saate kadar saptanmıştır. Kan ve sütte saptadığımız konsantrasyonlar MNP'nin hızlı bir şekilde metabolize olarak $MNPSO_2$'ye dönüştüğünü göstermektedir. Çalışmamızda $MNPSO_2$ koyunların plazma ve sütünde ana metabolit olarak saptanmıştır ve önceki farmakokinetik çalışmalara benzer şekilde MNP'ye kıyasla önemli ölçüde uzun bir kalıcılık sergilemiştir (Lifschitz ve ark. 2014; Mahnke ve ark. 2016). Laktasyondaki Merinos ırkı koyunlarda da benzer olarak $MNPSO_2$ ve MNP'nin sütteki ortalama kalıntılarının 12., 24., 48. saat ve 7. günde 5790/1145, 4417/485, 2467/153'ten 511/11 µg/l'ye düştüğü bildirilmiştir. Bu çalışmadan da MNP'nin *in vivo* koşullarda hızlı bir şekilde sülfon metabolitine dönüştüğü anlaşılmaktadır. Yağsız süt fraksiyonunda oldukça düşük rezidü görülmesi nedeniyle de ana ilaç ve metabolitinin lipofilik olduğu bildirilmiştir (EMA 2013). MNP + soya grubunda yer alan hayvanların plazma $MNPSO_2$ konsantrasyonları 24. saatten itibaren MNP + Gen-Daid grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Bu durum soya ile beslenen grubun akut izoflavon verilen gruba kıyasla BCRP inhibisyonunun daha yüksek oranda gerçekleştiğini ve bunun sonucunda elde edilen plazma ilaç konsantrasyonlarının daha yüksek olduğunu gösteren bir bulgudur. MNP + soya grubunda yer alan hayvanların süt $MNPSO_2$ konsantrasyonları ise 12. saatten itibaren MNP ve MNP + Gen-Daid grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Bu elde edilen bulgu, 12. saatten sonra ana ilaç MNP'nin hızlı bir şekilde metabolize olarak $MNPSO_2$'ye dönüşmesi sonucunda ve soyadaki izoflavonoidler aracılığıyla BCRP'nin inhibisyonu sonucunda sütteki ilaç miktarının etkin biçimde azaldığını göstermektedir. Çalışmamız sonucunda sütte saptadığımız $MNPSO_2$ c_{maks} değerleri (MNP, MNP + soya rasyonu, MNP + Gen-Daid gruplarında sırasıyla) (2,46 ± 0,41; 2,14 ± 0,22*; 2,41 ± 0,28 µg/ml) ($p<0,05$) MNP'nin koyun sütüne yüksek düzeyde geçtiğini göstermektedir. MNP

+ soya rasyonu grubunda sütte saptanan c_{maks} değerinin MNP grubuna kıyasla daha düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). İzoflavonların birlikte uygulanmasını takiben MNP'nin süte geçişinin azaldığı saptanmıştır. MNP + Gen-Daid grubunda $MNPSO_2$ seviyeleri düşmüştür; ancak sadece MNP + soya grubunda istatistiki olarak anlamlılık görülmüştür ($p<0,05$). Trapezoidal yönteme (yamuklar yöntemi) göre belirlenen $MNPSO_2$ süt AUC_{0-840} değerleri, MNP grubuna kıyasla tüm deney gruplarında azalma göstermiştir (MNP, MNP + soya rasyonu, MNP + Gen-Daid gruplarında sırasıyla $611,6 \pm 31,91$ $497,6 \pm 53,48$* ve $519,9 \pm 51,04$, $p<0,05$). Sonuç olarak hem MNP + soya grubu hem de MNP + Gen-Daid grubu ile MNP grubu karşılaştırıldığında, 0-840 saat için hesaplanan süt AUC değerlerinde (AUC_{0-840}) sırasıyla % 18,7 ve % 15 düşüş görülmüştür. Bu sonuçlar ışığında, ekzojen olarak genistein ve daidzein verilen gruba oranla soya yemi verilen hayvanlarda $MNPSO_2$ süt AUC_{0-840} değerlerinde anlamlı bir düşüş görülmesi, soyada genistein ve daidzeine ek olarak bulunan apigenin, luteolin ve glisitin gibi diğer flavonoidlerden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Flavonoidler ile BCRP substratı ilaçlar arasındaki *in vivo* etkileşim oldukça karmaşıktır; çünkü izoflavon içermeyen modifiye bir rasyonda bulunan konjuge metabolitlerin ve diğer bileşenlerin varlığı ile de ilaç emilimi ve eliminasyonunun etkilenebileceği düşünülmektedir. Bu nedenle flavonoidlerin süte geçişindeki rolünü açıklığa kavuşturmak için daha fazla araştırma yapılması gerektiği bildirilmektedir (Perez ve ark. 2013).

MNP'nin üç farklı dozda (1 – 3 – 10 mg/kg) koyunlarda farmakokinetiğinin incelendiği bir çalışmada, uygulamadan 1 ve 4 saat sonra elde edilen $MNPSO_2$ konsantrasyonlarının MNP'ye oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Karadzovska ve ark. 2009). MNP'nin farmakokinetiği üzerine koyun ırkı ve cinsiyetinin etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise iki ayrı çalışmadan elde edilen farmakokinetik profillerin karşılaştırılmasında Merinos ırkı koyunların Dorset melezi koyunlara oranla plazmada daha yüksek MNP ve $MNPSO_2$ konsantrasyonlara ulaştığı ve konsantrasyonlara ulaştıkları sürenin daha hızlı olduğu saptanmıştır. MNP 2,5 mg/kg oral yolla uygulandıktan sonra $MNPSO_2$ için elde edilen t_{maks} değerleri Merinos ırkı dişi koyunlarda erkek koyunlara oranla daha düşük, Dorset melezi dişi ve erkek koyunlarda ise aynı saptanmıştır. $MNPSO_2$ için elde edilen c_{maks} değerleri ise Merinos ırkı dişi koyunlarda erkek koyunlara oranla daha yüksek, Dorset melezi dişi ve erkek koyunlarda aynı saptanmıştır (Hosking ve ark. 2010a). Romney ırkı koyunlarda yapılan bir diğer MNP farmakokinetik çalışmasında ise 2,5 mg/kg dozda MNP oral yoldan uygulandıktan

sonra ilaç/metabolit plazma dağılım kinetiği 14 gün boyunca incelenmiştir. MNP ve $MNPSO_2$ konsantrasyonlarının HPLC yöntemi ile belirlenmesi sonucu ana bileşik MNP'nin hızla $MNPSO_2$'ye dönüştüğü belirlenmiştir. MNP sistemik biyoyararlanımı $MNPSO_2$ için gözlenenden çok daha düşük bulunmuştur. Elde ettikleri yüksek AUC $MNPSO_2$/MNP oranı ile de $MNPSO_2$'nin plazmada daha uzun kalıcılık sergilediğini öne sürmüşlerdir. Çalışmamızda kullanılan doz, uygulama yolu ve metodoloji Karadzovska ve ark. (2009), Hosking ve ark. (2010a) ve Lifschitz ve ark. (2014) ile aynı olup sadece kullanılan koyun ırkı ve cinsiyeti farklılık göstermektedir. Bu çalışma bulguları ile bizim çalışma bulgularımız arasında gözlenen farmakokinetik farklılıkların koyun ırk ve cinsiyetinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çalışmamızda ilaç uygulaması sonrası koyun plazmalarındaki $MNPSO_2$ düzeyleri Karadzovska ve ark. (2009) ve Lifschitz ve ark. (2014) tarafından bildirilen yöntemlerin modifikasyonları ile saptanmıştır. Yöntem ile elde edilen geri kazanımın yüksek (ort. % 97,9), R^2 değerinin 1'e yakın (R^2 = 0,9995), tespit ve tayin limitinin düşük (LOD değeri 0,004 μg/ml ve LOQ değeri 0,014 μg/ml) ve gün içi ile günler arası tekrarlanabilirliğin (% CV (varyasyon katsayısı) < % 10) olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçların FDA ve EMA Biyoanalitik Yöntem Validasyon Kılavuzuna (FDA 2001; EMA 2011) uygunluk gösterdiği görülmektedir. Nonkompartmental analizlerde elde ettiğimiz plazma $MNPSO_2$ $AUC_{0\text{-}840}$ seviyeleri MNP grubuna kıyasla MNP + Gen-Daid ve MNP + soya rasyonu grubunda daha yüksek olma eğilimi göstermiştir. MNP + soya grubu ve MNP + Gen-Daid grubu ile MNP grubu karşılaştırıldığında, 0-840 saat için hesaplanan plazma AUC değerlerinde ($AUC_{0\text{-}840}$) sırasıyla % 33,22 ve % 11,59 artış görülmüştür. MNP grubuna göre hem c_{maks} hem de plazma $MNPSO_2$ $AUC_{0\text{-}840}$ değerlerinde görülen bu artışlar istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. Plazma AUC, t_{maks} ve c_{maks} gibi elde ettiğimiz farmakokinetik verilerden yola çıkılarak MNP + soya grubu ve MNP + Gen-Daid grubunda kanda $MNPSO_2$'nin uzun süreli ve yüksek konsantrasyonlardaki varlığının, daha etkin bir tedavi sağlayabileceği yönünde önemli bulgular olduğu görüşündeyiz.

BCRP/ABCG2'nin, ilaçların vücuttaki dağılımını klinik açıdan önemli oranda etkileyebilmesi, farmakoterapi alanında yapılan araştırmalarda ABC taşıyıcı proteinlerine olan ilgiyi giderek arttırmaktadır (Schrinkx ve Fink-Gremmels 2008; Mealey 2012). BCRP, çoğu hücre tipinde antibakteriyellerin ve antiparaziterlerin akümülasyonu ve efluksununun modülasyonunda belirleyici bir role sahiptir. ABC taşıyıcı proteinlerinin veteriner alandaki rolünün değerlendirilmesine yönelik çalışmalar henüz başlangıç

aşamasında olmasına karşın bu proteinlerin benzimidazol antelmentikler, tirozin kinaz inhibitörleri, florokinolon antibiyotikler gibi veteriner alanda yaygın olarak kullanılan birçok ilacın farmakokinetiğinde değişikliğe neden olduğu bildirilmiştir (Laffont ve ark. 2002; Mealey 2012). ABC taşıyıcı proteinlerinin benzimidazol türevi bazı antelmentiklerin (albendazol ve fenbendazolün sırasıyla albendazol sülfoksit ve oksfendazol sülfoksit türevleri) taşınması üzerine olan etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, söz konusu ilaçların P-gp ve MRP2 proteini tarafından taşınmadığı, insan BCRP proteini tarafından orta düzeyde taşındığı; fare Bcrp1 proteini tarafından ise yüksek düzeyde taşındığı ortaya konmuştur (Merino ve ark. 2005a). Polarize MDCKII-bABCG2 hücre serileriyle yapılan transsellüler taşınma çalışmalarında MNP ve $MNPSO_2$'nin BCRP proteini aracılı taşındığı *in vitro* koşullarda gösterilmiştir (Mahnke ve ark. 2016). BCRP proteini tarafından taşınmanın bileşik ve hayvan türüne göre değiştiği dikkate alınarak çalışmamızda *in vivo* koşullarda MNP'nin koyunlardaki farmakokinetiğine izoflavonların etkisi incelenmiştir.

BCRP, ksenotoksinlerin ve bazı ilaçların süte geçişinde önemli rol oynamaktadır (Jonker ve ark. 2005; Merino ve ark. 2005b). Süte aktif olarak taşınan ilaçların difüzyon modeliyle tahmin edilenden daha yüksek süt/plazma (S/P) oranları gösterdiği belirtilmiştir (Gerk ve ark. 2001). BCRP'nin ekspresyonunu ve fonksiyonunu birlikte uygulanan ilaçlar veya izoflavonoidler gibi doğal ürünler (Zhang ve Morris 2003; Cooray ve ark. 2004) cinsiyet (Merino ve ark. 2005b) veya genetik polimorfizmler gibi faktörlerin etkisi ile değiştirebildiği gösterilmiştir. Süte ilaç geçişi ayrıca iyonizasyon, lipofilite veya plazma proteinlerine bağlanma gibi fizikokimyasal ilaç özellikleri ile ilişkili olabilmektedir (Ito ve Lee 2003). Bununla birlikte, *abcg2*$^{-/-}$ knockout fareler ile yapılan bir çalışmada, kemoterapötik ilaç olan topotekan ve anti ülseratif ilaç olan simetidin gibi ilaçların yüksek S/P oranlarına sahip oluşu ile aktif BCRP aracılı ilaç taşınması arasında güçlü bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (Jonker ve ark. 2005). Çalışmamızda aldığımız *in vivo* sonuçlarda $MNPSO_2$ $AUC_{0\text{-}840}$ S/P oranının (0-840 saat) MNP grubuna oranla (5,46 ± 2,23), MNP + soya rasyonu grubu (3,27± 1,13*) ve MNP + Gen-Daid grubunda (3,63 ± 1,87) ciddi oranda düştüğü ve süte $MNPSO_2$ atılımının önemli miktarda azaldığı saptanmıştır. MNP + soya grubu ve MNP + Gen-Daid grubu ile MNP grubu karşılaştırıldığında, $MNPSO_2$ $AUC_{0\text{-}840}$ S/P oranları değerlerinde sırasıyla % 40,11 ve % 33,52 düşüş görülmüştür; ancak bu düşüş yalnızca MNP + soya grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu bulgulardan yola çıkılarak yalnızca MNP + soya

grubunda anlamlı düşüş olması genistein ve daidzeine ek olarak soyada bulunan diğer flavonoidlerden kaynaklandığını veya flavonoidlerin uygulandıkları formun önemli olabileceğini düşündürmektedir. Laktasyon periyodunun 3-4. aylarındaki koyunlarda elde ettiğimiz yüksek $MNPSO_2$ AUC S/P oranı, MNP'nin oABCG2 (ovine ABCG2) efluks taşıyıcısı tarafından süte taşınma ihtimalinin yüksek olduğunu göstermektedir. Elde ettiğimiz bu bulgular, izoflavonoidlerin varlığında MNP'nin sütle atılım sürecine olan etkisini ve buna ek olarak taşıyıcı proteinler üzerinden, MNP farmakokinetiğinin, izoflavonoidler tarafından değiştirilebileceğini akla getirmektedir.

MNP'nin Jersey ırkı süt ineklerinde *in vivo* farmakokinetik ve *in vitro* efluksunun araştırıldığı bir çalışmada ana metabolit $MNPSO_2$'nin, bABCG2 (inek ABCG2) model substratı olduğu saptanmıştır (Mahnke ve ark. 2016). Araştırmacıların ineklerde ilk olarak MNP'nin farmakokinetiği ile ilişkili bu çalışmada, koyunlarda elde edilen bulgulara benzer şekilde MNP'nin oral yolla uygulama sonrası *in vivo* metabolizmasının çok hızlı olduğu gözlenmiştir (Karadzovska ve ark. 2009; Lifschitz ve ark. 2014). Ayrıca $MNPSO_2$'nin plazma örneklerindeki ana metabolit olduğu ve inek kan dolaşımında ana ilacınkinden daha uzun süre kalıcı olduğu bildirilmiştir. $MNPSO_2$ AUC S/P oranının 6,75 ± 3,54 olarak gösterilmesi süte MNP'in yüksek oranda taşındığını gösteren bir sonuçtur (Mahnke ve ark. 2016). Çalışmamızda izoflavonoid verilmeyen yalnızca 2,5 mg/kg dozda oral yolla MNP uygulanan kontrol grubunda AUC S/P oranı 5,46 ± 2,23 bulunmuştur. Bu çalışma bulguları ile çalışmamızdaki AUC S/P oranı farklılığının hayvan türüne bağlı metabolizma farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

BCRP inhibitörleri BCRP substratı olan ilaçlarla birlikte uygulandığında ilaçların *in vivo* dispozisyonunda (emilim, dağılım, atılım, süte geçiş) değişiklik meydana gelmektedir (Ballent ve ark. 2012; Mealey 2012). ABC taşıyıcı proteinlerinin inhibisyonu ile birlikte koyunlarda kullanılan ilaçların biyoyararlanımının arttığı saptanmıştır (Dupuy ve ark. 2003; Merino ve ark. 2003). Son yıllarda BCRP inhibitörü olarak sürekli gelişen bir sınıf olarak görülen polifenoller (tanenler, gossipol, fagopirin ve izoflavonlar) ruminant yemlerinde orta düzeyde bulunmaktadır. Ruminant yemlerinde bulunan soyadaki ana izoflavonlar genistein ve daidzeinin hem *in vitro* hem *in vivo* koşullarda BCRP inhibitörü olarak davrandığı gösterilmiştir (Imai ve ark. 2004; Merino ve ark. 2010; Zhang ve ark. 2004b). Genistein ve daidzein *in vivo* koşullarda büyük oranda glukuronid ve sülfat formlarına metabolize olsalar da BCRP ile etkileşime girerek inhibe

ettikleri bildirilmiştir (Alvarez ve ark. 2011). Koyunlarda yapılan çalışmalar, BCRP substratı olan enrofloksasin, danofloksasin ve nitrofurantoin gibi ilaçların genistein ve daidzein gibi BCRP inhibitörleriyle birlikte kullanımı sonucunda süte ilaç geçişinin azaldığını ortaya koymuştur (Pulido ve ark. 2006; Perez ve ark. 2009b; 2013). Genisteinin enrofloksasinin sütteki konsantrasyonları üzerindeki etkisini anlamak için yapılan bir çalışmada, laktasyondaki koyunlara genistein ile birlikte ve genistein olmadan enrofloksasin uygulanmıştır (Pulido ve ark. 2006). Genistein uygulanan koyunlar ile uygulanmayan koyunlar (kontrol grubu) arasında enrofloksasin c_{maks} değerinde herhangi bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir. Buna karşın genistein uygulanan koyunların sütündeki enrofloksasin AUC değerinde 1,5 kat azalma saptanmış ve genisteinin enrofloksasinin sütteki konsantrasyonlarını azalttığı bildirilmiştir. Araştırmacılar genisteinin sütteki enrofloksasin konsantrasyonlarını azaltması ile ilişkili olarak sütteki ilaç arınma süresinin kısaltılabileceğini öne sürmüşlerdir. Çalışmamızda MNP + Gen-Daid grubundaki hayvanların sütündeki $MNPSO_2$ AUC değerinde 1,17 kat, MNP + soya grubunda ise 1,22 kat azalma saptanmıştır. Elde ettiğimiz c_{maks} değerlerinde ise MNP + Gen-Daid grubunda 1,02 kat, MNP + soya grubunda 1,14 kat azalma saptanmıştır. Bu veriler ışığında daidzein ve genistein gibi izoflavonoidlerin BCRP inhibitörü özelliği göstererek MNP'nin süte geçişini azalttığını düşünmekteyiz. Çalışmamızda MNP grubunda süt $MNPSO_2$ t_{maks} değeri 10,5 ± 3 saat olarak tespit edilmiştir ve bu bulgu bundan önce yapılan çalışmalarla (Mahnke ve ark. 2016) uyum göstermektedir. MNP + soya grubunda ise süt $MNPSO_2$ t_{maks} değeri 9 ± 3,46 saate düşmüş; ancak MNP + Gen-Daid grubunda süt $MNPSO_2$ t_{maks} değeri MNP grubunda olduğu gibi 10,5 ± 3 saat olarak saptanmıştır. Elde edilen t_{maks} değerleri arasında istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır. Benzer nitelikteki bir başka çalışmada ise laktasyondaki koyunlarda BCRP substratları olan danofloksasin ve nitrofurantoinin sütteki dağılımı üzerine izoflavon kombinasyonlarının (genistein + daidzein) etkisi incelenmiştir (Perez ve ark. 2009b; 2013). Danofloksasin ve nitrofurantoinin tedavi amaçlı uygulamalarda laktasyondaki hayvanların sütüne geçtiği bilinmektedir (Merino ve ark. 2005b; Escudero ve ark. 2007). Nitrofurantoin deneyinde, standart rasyona ek olarak oral gavajla ekzojen izoflavonlar (10 mg/kg genistein + 10 mg/kg daidzein) verilen koyunlarda nitrofurantoinin süt AUC'sinde önemli bir düşüş saptandığı bildirilmiştir (Perez ve ark. 2009b). Bunun yanında yalnızca nitrofurantoin verilen kontrol grubundaki hayvanlarda, izoflavonlara maruz kalan koyunlara kıyasla daha yüksek plazma nitrofurantoin AUC ve c_{maks} değeri

saptanmıştır (Perez ve ark. 2009b). Bu durum, BCRP inhibisyon mekanizması ile uyumlu olmadığından araştırmacılar izoflavon verilen koyunlarda, emilimin azalması veya nitrofurantoinin atılımının artması nedeniyle plazma nitrofurantoin konsantrasyonunun azalmış olabileceğini önermişlerdir. Danofloksasin deneyinde, 15 gün boyunca soya yönünden zengin rasyonla beslenen grupta, izoflavon içermeyen yemlerle beslenen laktasyondaki koyunlara oranla sütteki danofloksasin'in AUC ve c_{maks}'ı önemli ölçüde azaldığı ortaya konmuştur (Perez ve ark. 2013). Oral yolla 10 mg/kg genistein ve 10 mg/kg daidzein verilen koyunlarda, danofloksasinin süt konsantrasyonlarında benzer bir azalma görülmemiştir. Araştırmacılar bu durumu bileşiklerin uygulandığı formun (katı ve sıvı, aglikon ve glikon) veya rasyondaki bileşiklerin diğer kimyasalların farmakokinetiği üzerindeki etkisini değiştirebilmesi nedeniyle olduğunu açıklamışlardır. Ayrıca bu araştırmalarda rasyonlarda bulunan genistein ve daidzein miktarları bildirilmemesine karşın çalışmamızda hayvanlara verilen rasyonlardaki genistein ve daidzeinin kantitatif ölçümleri yapılmıştır.

Ruminant yemlerinde yaygın protein kaynağı olarak kullanılan soya, bir fitoöstrojen grubu olan izoflavonların ana kaynağı olduğundan içerdiği genistein ve daidzein konsantrasyonları LC-MS/MS analizleri ile saptanmıştır. Analizlerde elde edilen sonuçların daha güvenilir olarak ortaya konulabilmesi ve doğrulama yapılabilmesi amacıyla kör olarak izoflavonoid bulunmayan buğday unu kullanılmıştır. Yem analizlerinde toplam genistein ve daidzein miktarının belirlenmesi için Penalvo ve ark. (2004) tarafından geliştirilen ve valide edilen yeni bir ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, yem numunelerinin 1 M HCl % 80 etanol içinde 80°C'de 1 saat inkübasyonunun izoflavonların ekstraksiyonu ve hidrolize edilmesinde en iyi yöntem olduğu gösterilmiştir. Bu koşullarda hidrolize edilmemiş formların miktarının oldukça düşük olduğu, aglikonlara tam hidroliz sağlandığı ve hidrolize olmayan formların % 0,3'ten az olduğu saptanmıştır. Soya yemindeki daidzein miktarı 94,5 mg/100 g olarak bulunurken, genistein miktarı 61,5 mg/100 g olarak saptanmıştır. Çalışmamızın bu aşamasında elde edilen sonuçlar, literatürlerde bildirilen izoflavonoid değerleri ile (100 g soyada 100-200 mg izoflavonoid) paralel niteliktedir (Broderick 1995, 2003). Çalışmamızda MNP + Gen-Daid grubunda yer alan her hayvanın kg canlı ağırlığı dikkate alındığında hayvan başına toplamda 913 mg genistein ve daidzein aldığı, MNP + soya grubunda ise bir hayvanın günde ortalama 2 kg yem yediği ve rasyondaki soya oranı dikkate alınarak toplamda 390 mg genistein ve daidzein almış olduğu saptanmıştır. MNP

+ Gen-Daid grubunda yer alan hayvanların plazma $MNPSO_2$ konsantrasyonlarının 24. saate kadar MNP + soya grubuna kıyasla daha yüksek bulunması daha yüksek izoflavonoid alımı sonucu BCRP'nin inhibe olduğu ve plazma $MNPSO_2$ konsantrasyonunu arttırdığını düşündürmektedir ($p<0,05$).

Çalışmamızda genistein ve daidzeinin ekzojen uygulanması sonucu MNP'nin süte atılımının değişmediği; uzun süreli soya alımının akut izoflavon uygulamasına oranla daha iyi sonuçlar verdiği ortaya konmuştur. Bu bağlamda farelerde yapılan bir çalışmada plazmadaki 1,5 nM konsantrasyonda genistein ve daidzeinin beyin, testis, epididimis ve fötüste Bcrp1 ile *in vivo* etkileşime girdiği gösterilmiştir (Enokizono ve ark. 2007). Benzer yönde yapılan diğer çalışmalarda, BCRP'nin her iki izoflavonun plazmadaki ana metabolitleri olan glukuronid ve sülfat formlarının apikal efluksundan sorumlu olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark. 2008; Alvarez ve ark. 2011). Kadınlarda yapılan bir çalışmada 5 gün izoflavon takviyesinden sonra meme dokusunda konjuge metabolitlerin (glukuronidler) saptandığı, meme bezi epitel hücrelerinde 20-25 pmol/g izoflavon aglikon ve 900-1150 pmol/g izoflavon glukuronid düzeylerine ulaştığı saptanmıştır (Bolca ve ark. 2010). Bu amaç doğrultusunda gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise koyunların meme bezlerinde toplam 10 nmol/g izoflavon saptandığı bildirilmiştir (Urpi-Sarda ve ark. 2008). Yapılan bu çalışmalara dayanarak, uzun süreli izoflavon alımı sonrası bu bileşiklerin daha yüksek seviyelerde meme bezinde akümüle olabileceği ve bunun sonucunda da meme alveolar hücrelerin apikal membranında bulunan BCRP ile etkileşime girebileceği öngörülmüştür (Perez ve ark. 2013). Çalışmamızda ise tek doz genistein ve daidzein uygulanan koyunların sütündeki ilaç miktarının, soya verilen gruptaki koyunların sütündeki ilaç miktarına göre daha yüksek bulunmasının BCRP inhibisyonu için yeterli ve sürekli konsantrasyonların sağlanamadığı anlamına gelmektedir. MNP + soya grubundaki hayvanların deneyden önceki 15 gün boyunca ve deney süresince soya yönünden zengin rasyonla beslenmesi akut izoflavon uygulanmasına oranla elde edilen bulguları doğrular niteliktedir.

Çalışmamızda laktasyonda ve kuru dönemde olan üçer dişi koyun meme bezindeki BCRP ekspresyon düzeyleri MNP uygulaması olmadan western blot ile değerlendirilmiştir. Laktasyon dönemindeki Kıvırcık ırkı dişi koyunların meme bezi parenşim dokusundaki BCRP ekspresyon düzeylerinin kuru dönemdekilere oranla 12,23 kat ($p<0,001$) daha fazla olduğu saptanmıştır. ABCG2, monoklonal antikor BXP-53

kullanılarak belirlenmiş olup yaklaşık 72-80 kDa'da belirgin olarak saptanmıştır. Beta aktin ise kontrol olarak kullanılmıştır ve yaklaşık 42 kDa'da belirgin olarak saptanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda laktasyon döneminin 3-4. ayında olan Kıvırcık ırkı dişi koyun meme bezlerinde daha yüksek BCRP ekspresyonu olduğu net bir şekilde görülmektedir (Şekil 4-14). BCRP'nin biyolojik fonksiyonlarının immünohistokimya ve western blot deneyleri ile araştırıldığı bir çalışmada, ABCG2'nin 8 ve 14 haftalık çiftleşmemiş farelerde eksprese edilmediği, gebeliğin sonlarında ve özellikle laktasyon sırasında yüksek oranda indüklendiği ortaya konmuştur (Jonker ve ark. 2005). ABCG2'nin başlıca alveolar epitel hücrelerin apikal membranında tespit edilmesine karşın; meme duktuslarında tespit edilemediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada ekspresyonun laktasyonun bitmesini takiben hızlı şekilde azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca çiftleşmemiş veya laktasyonda olmayan inekler ve insanlara oranla laktasyon dönemindeki meme bezinde bulunan ABCG2'nin daha yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir. Laktasyonda ve kuru dönemde olan Assaf ırkı koyunların meme bezindeki BCRP ekspresyon düzeyinin karşılaştırıldığı benzer nitelikteki bir çalışmada Jonker ve ark. (2005) tarafından ineklerde bildirilen sonuçlarla benzer bulgular elde edilmiştir (Pulido ve ark. 2006). Laktasyondaki ineklerin meme bezinde sırasıyla 1, 5 ve 10 µg düzeyde proteini kıyaslamaları sonucunda BCRP ekspresyonlarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Koyun BCRP 72-80 kDa aralığında görülürken; inek BCRP mevcut membran proteinlerinin glikozilasyon derecesine bağlı olarak daha düşük bir moleküler kütlede (yaklaşık 60 kDa) saptanmıştır. BCRP ekspresyon düzeyinin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada laktasyonda ve kuru dönemde olan süt inekleri, koyun ve keçilerde BCRP/ABCG2'nin meme bezindeki ekspresyonu sistematik olarak karşılaştırılmıştır (Lindner ve ark. 2013). BCRP'nin meme bezinde alveolar epitel hücrelerinde ve tüm süt ineklerinin meme duktuslarının apikalinde bulunduğu saptanmıştır. BCRP ekspresyonları, laktasyonda olmayan hayvanlara kıyasla laktasyondaki ineklerde 9,69 kat ($p<0,001$) ve koyunlarda 12,32 kat ($p<0,01$) artış göstermiştir. Keçilerin laktasyondaki meme dokusu laktasyonda olmayan meme dokusuna oranla en yüksek BCRP ekspresyonunu 21,44 kat ($p<0,001$) göstermiştir. Araştırmacılar tarafından alınan bu sonuçlarla BCRP'nin sitoprotektif rolü olduğu ve önemli doku bariyerlerinde atılıma katkıda bulunduğu önerilmiştir. Ayrıca BCRP substratı olan ilaçların kullanıldığı süt hayvanlarında veteriner farmakoterapi açısından önemli etkilere sahip olabileceği bildirilmiştir (Lindner ve ark. 2013).

Çalışmamızda BCRP ile MNP/$MNPSO_2$ etkileşiminin farmakolojik özelliğini belirlemek amacıyla vanadata duyarlı ATPaz aktivitesi ve veziküler taşınma inhibisyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Membran bazlı deneylerin, ilaç-taşıyıcı etkileşimlerini ölçme ve bu etkileşimlerin niteliğinin anlaşılmasında yüksek veimli araçlar olduğu bildirilmektedir (Fekete ve ark. 2015). Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz ATPaz ve VT inhibisyon deneyleri sonucunda MNP ve $MNPSO_2$ ile BCRP'nin etkileşim içinde olduğu gösterilmiştir. ATPaz deneyleri sonucunda MNP için IC50 değeri 919,7 µM, $MNPSO_2$ için IC50 değeri 78,42 µM olarak saptanmıştır. Bu alınan sonuçlar, MNP ve $MNPSO_2$'nin yavaş taşınan BCRP substratı olabileceğini, buna ek olarak $MNPSO_2$'nin MNP'ye oranla daha güçlü bir inhibitör olabileceğini düşündürmektedir. VT inhibisyon deneylerinde alınan sonuçların ATPaz aktivite deneylerini doğrular nitelikte olduğu ve MNP ile $MNPSO_2$'nin BCRP membranlarında etkileşime girdiği saptanmıştır. VT inhibisyon deneylerinde MNP için IC50 değeri 0,27 µM, $MNPSO_2$ için IC50 değeri 0,14 µM olarak saptanmıştır. Bu değerler $MNPSO_2$'nin BCRP'nin model substratı olma özelliğini doğrulamaktadır.

BCRP ATPaz deneylerinde hem MNP hem de $MNPSO_2$ için inhibisyon görülmüştür; ancak aktivasyon görülmemiştir (Şekil 4-11, 4-12). Bu bulgular ile $MNPSO_2$'nin yavaş taşınan bir BCRP substratı olduğu kesin olarak söylenememekle birlikte; BCRP ile etkileşime girme olasılığının yüksek olduğu düşünülmektedir. VT inhibisyon deneylerinde de hem MNP hem de $MNPSO_2$ için BCRP ile etkileşimin olduğunu doğrulayan sonuçlar alınmıştır (Şekil 4-13). İneklerde yapılan *in vitro* transsellüler taşınma çalışmasında $MNPSO_2$'nin BCRP substratı olduğuna dair bulgular bulunmaktadır (Mahnke ve ark. 2016). Aldığımız $MNPSO_2$ ATPaz bulguları ile Mahnke ve ark. (2016) tarafından MDCKII/MDCKII-BCRP monolayer deneylerinde yapılan çalışma arasında ilişki kurulabilir; çünkü BCRP'nin MDCKII kontrol/mock hücrelerinde vektörel taşındığı ve BCRP inhibitörü FTC'nin efluks oranını 3-4'e düşürdüğü gösterilmiştir. Bu sonuçların her ikisi de, $MNPSO_2$'nin MDCKII hücrelerinde önemli oranda eksprese edilen BCRP tarafından taşındığını göstermektedir. MNP ile şu ana kadar yayınlanan herhangi bir MDCKII verisi bulunmaması nedeniyle yaptığımız ATPaz deney sonuçlarına dayanarak benzer olabileceğini düşünmekteyiz.

5.1. Sonuç ve Çıkarımlar

Süt, tüm memelilerde besin maddesi ve biyoaktif bileşenlerin ana kaynaklarından biridir ve yenidoğan gelişiminin erken aşamalarında oldukça önemlidir. Süt üretimi, taşıma mekanizmalarına bağlı olarak gelişen oldukça karmaşık bir süreçtir. Son yıllarda yapılan birçok çalışmada bu mekanizmanın açığa çıkarılması için meme bezinde bulunan taşıyıcılar üzerine odaklanılmıştır.

Bileşiklerin süte geçişini sağlayan en önemli taşıyıcı süper ailelerinden biri ABC taşıyıcı proteinleri ailesidir. Bu taşıyıcı proteinlerin ekspresyonları meme bezinin laktasyon periyotlarına göre değişiklik göstermektedir. Ruminantların meme bezinde bulunan ABC taşıyıcı proteinlerinden BCRP ile sütteki ksenobiyotik rezidüleri arasında ilişki bulunmaktadır ve bu durum ABC taşıyıcı proteinleri ile etkileşimin bir sonucu olarak ilaç arınma süresinin kısaltılmasında önem taşımaktadır.

Çalışmamızda, BCRP substratı MNP'nin sütle atılımı soya ile zenginleştirilmiş rasyon ile değiştirilmiş ve bunun sonucunda koyun sütündeki ilaç konsantrasyonunun azaldığı saptanmıştır. Yemdeki izoflavonoidlerle efluks taşıyıcıları arasındaki etkileşimiyle gelişen bu durum sonucunda ilaç arınma süresi kısalmaktadır. Araştırmamız, koyunlarda MNP'nin izoflavonoidlerle birlikte uygulanması ile süte atılımı değiştirmesi ve membran deneyleri ile etkileşimin gösterilmesi açısından ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Gerçekleştirdiğimiz ATPaz ve VT inhibisyon deneylerinde MNP/MNPSO_2 ile BCRP etkileşimlerinin olması, western blot deneylerinde laktasyondaki dişi koyunlarda BCRP ekspresyon düzeyinin daha yüksek olması ve *in vivo* deneylerde MNP'nin süte geçişinin izoflavonoidler tarafından önemli ölçüde inhibe edilmesi, MNP'nin koyun BCRP aracılı efluksu olduğu görüşünü desteklemektedir.

BCRP ilaç substrat ve inhibitörleri arasında açığa çıkan etkileşimler sonucu süt hayvanlarının farmakoterapisi açısından birçok çıkarım yapılabilmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar ışığında ilaç rezidülerinin süte geçişinde BCRP inhibitörlerinin potansiyel rolünün daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunulmasını, böylelikle süt ürünleri tüketicilerinin olası ilaç rezidülerine ve diğer ksenobiyotiklere karşı korunmasını hedeflemekteyiz.

Ruminantlarda diğer antelmentik sınıflarına karşı direnç artması sonucu geliştirilen ve özgün bir antelmentik etki mekanizmasına sahip olan MNP'nin

farmakokinetik davranışı ile ilgili elde ettiğimiz verilerin, gelecekte yapılacak MNP etkinlik ve kalıntı çalışmalarının yorumlanmasına katkı sağlaması hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

Adachi, Y., Suzuki, H. ve Sugiyama, Y. (2001). Comparative studies on in vitro methods for evaluating in vivo function of MDR1 P-glycoprotein. *Pharmaceutical Research*, **18**(12), 1660-1668.

Agarwal, S. ve Elmquist, W.F. (2012). Insight into the cooperation of P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) at the blood–brain barrier: a case study examining sorafenib efflux clearance. *Molecular Pharmaceutics*, **9**(3), 678-684.

Agatonovic-Kustrin, S., Ling, L.H., Tham, S.Y., ve Alany, R.G. (2002). Molecular descriptors that influence the amount of drugs transfer into human breast milk. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **29**(1-2), 103-119.

Ahmed-Belkacem, A., Pozza, A., Muñoz-Martínez, F., Bates, S.E., Castanys, S., Gamarro, F. ve ark. (2005). Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2. *Cancer Research*, **65**(11), 4852-4860.

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S.I., Itoh, N. ve ark. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, **262**(12), 5592-5595.

Alcorn, J., Lu, X., Moscow, J.A. ve McNamara, P.J. (2002). Transporter gene expression in lactating and nonlactating human mammary epithelial cells using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **303**(2), 487-496.

Allen, J.D., Van Loevezijn, A., Lakhai, J.M., Van Der Valk, M., Van Tellingen, O., Reid, G. ve ark. (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. *Molecular Cancer Therapeutics*, **1**(6), 417-425.

Allikmets, R., Schriml, L.M., Hutchinson, A., Romano-Spica, V. ve Dean, M. (1998). A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Research*, **58**(23), 5337-5339.

Allred, C.D., Ju, Y.H., Allred, K.F., Chang, J. ve Helferich, W.G. (2001). Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. *Carcinogenesis*, **22**(10), 1667-1673.

Al-Shawi, M.K., Polar, M.K., Omote, H. ve Figler, R.A. (2003). Transition state analysis of the coupling of drug transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(52), 52629-52640.

Alvarez, A.I., Merino, G., Molina, A.J., Pulido, M.M., McKellar, Q.A. ve Prieto, J.G. (2006). Role of ABC transporters in veterinary drug research and parasite resistance. *Current Drug Delivery*, **3**(2), 199-206.

Alvarez, A.I., Pérez, M., Prieto, J.G., Molina, A.J., Real, R. ve Merino, G. (2008a). Fluoroquinolone efflux mediated by ABC transporters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**(9), 3483-3493.

Alvarez, L., Lifschitz, A., Entrocasso, C., Manazza, J., Mottier, L., Borda, B. ve ark. (2008b). Evaluation of the interaction between ivermectin and albendazole following their combined use in lambs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **31**(3), 230-239.

Alvarez, A.I., Real, R., Pérez, M., Mendoza, G., Prieto, J.G., ve Merino, G. (2010). Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **99**(2), 598-617.

Alvarez, A.I., Vallejo, F., Barrera, B., Merino, G., Prieto, J.G., Tomas-Barberan, F. ve ark. (2011). Bioavailability of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in breast cancer resistance protein 1 knockout mice. *Drug Metabolism and Disposition*, **39**, 2008–2012.

Alvinerie, M., Escudero, E., Sutra, J.F., Eeckhoutte, C. ve Galtier, P. (1998). The pharmacokinetics of moxidectin after oral and subcutaneous administration to sheep. *Veterinary Research*, **29**, 113-118.

An, G. ve Morris, M.E. (2010). Effects of the isoflavonoid biochanin A on the transport of mitoxantrone in vitro and in vivo. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, **31**(5-6), 340-350.

Antignac, J.P., Cariou, R., Le Bizec, B., Cravedi, J.P. ve Andre, F. (2003) Identification of phytoestrogens in bovine milk using liquid chromatography/

electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, **17**, 1256–1264.

Aptel, H.B., Burnay, M.M., Rossier, M.F. ve Capponi, A.M. (1999). The role of tyrosine kinases in capacitative calcium influx-mediated aldosterone production in bovine adrenal zona glomerulosa cells. *Journal of Endocrinology*, **163**(1), 131-138.

Arts, I.C. ve Hollman, P.C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81**(1), 317S-325S.

Asashima, T., Hori, S., Ohtsuki, S., Tachikawa, M., Watanabe, M., Mukai, C., ve ark. (2006). ATP-binding cassette transporter G2 mediates the efflux of phototoxins on the luminal membrane of retinal capillary endothelial cells. *Pharmaceutical Research*, **23**(6), 1235-1242.

Aszalos, A. (2007). Drug–drug interactions affected by the transporter protein, P-glycoprotein (ABCB1, MDR1): II. Clinical aspects. *Drug Discovery Today*, **12**(19-20), 838-843.

Aszalos, A. (2008). Role of ATP-binding cassette (ABC) transporters in interactions between natural products and drugs. *Current Drug Metabolism*, **9**(10), 1010-1018.

APVMA (2010). Public Release Summary on the Evaluation of the New Active Monepantel in the Product Zolvix Monepantel Broad Spectrum Oral Anthelmintic for Sheep. APVMA product number 62752, 1–79. ISSN: 1443–1335. https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/14141-prs-monepantel.pdf

Bakos, É., Evers, R., Szakács, G., Tusnády, G.E., Welker, E., Szabó, K. ve ark. (1998). Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(48), 32167-32175.

Bakos, É., Evers, R., Sinkó, E., Váradi, A., Borst, P. ve Sarkadi, B. (2000). Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. *Molecular Pharmacology*, **57**(4), 760-768.

Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J. ve Lanusse, C. (2006). Modulation of the P-glycoprotein-mediated intestinal secretion of ivermectin: in vitro and in vivo assessments. *Drug Metabolism and Disposition*, **34**(3), 457-463.

Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J. ve Lanusse, C. (2007). Involvement of P-glycoprotein on ivermectin kinetic behaviour in sheep:

itraconazole-mediated changes on gastrointestinal disposition. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics,* **30**(3), 242-248.

Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Maté, L., Sallovitz, J. ve Lanusse, C. (2009). Application of the Ussing chamber technique to assess P-glycoprotein-mediated intestinal drug transport. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **32**, 245-246.

Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Maté, L. ve Lanusse, C. (2012). In vivo and ex vivo assessment of the interaction between ivermectin and danofloxacin in sheep. *The Veterinary Journal*, **192**(3), 422-427.

Ballent, M., Maté, L., Virkel, G., Sallovitz, J., Viviani, P., Lanusse, C. ve ark. (2014). Intestinal drug transport: ex vivo evaluation of the interactions between ABC transporters and anthelmintic molecules. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **37**(4), 332-337.

Banerjee, S., Li, Y., Wang, Z. ve Sarkar, F. H. (2008). Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Letters*, **269**(2), 226-242.

Barker, S.A. ve Kappel, L.C. (1997). Drug residues in milk from cows administered fenbendazole as a paste, drench, or feed top-dressing. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20**(2), 160-162.

Barnes, E.H., Dobson, R.J. ve Barger, I.A. (1995). Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. *Parasitology Today*, **11**(2), 56-63.

Barnes, S. (2010). The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. *Lymphatic Research and Biology*, **8**(1), 89-98.

Barrera, B., González-Lobato, L., Otero, J.A., Real, R., Prieto, J.G., Álvarez, A.I. ve ark. (2013). Effects of triclabendazole on secretion of danofloxacin and moxidectin into the milk of sheep: role of triclabendazole metabolites as inhibitors of the ruminant ABCG2 transporter. *The Veterinary Journal*, **198**(2), 429-436.

Barrett, J.F., George, J.M. ve Lamond, D.R. (1965). Reproductive performance of Merino ewes grazing red clover (Trifolium pratense L.), improved pasture, or native pasture. *Australian Journal of Agricultural Research*, **16**(2), 189-200.

Beery, E., Rajnai, Z., Abonyi, T., Makai, I., Bánsághi, S., Erdő, F. ve ark. (2012). ABCG2 modulates chlorothiazide permeability in vitro–characterization of its interactions. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **27**(3), 349-353.

Behnke, J.M., Buttle, D.J., Stepek, G., Lowe, A. ve Duce, I.R. (2008). Developing novel anthelmintics from plant cysteine proteinases. *Parasites & Vectors*, **1**(1), 29.

Berggren, S., Gall, C., Wollnitz, N., Ekelund, M., Karlbom, U., Hoogstraate, J. ve ark. (2007). Gene and protein expression of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and CYP3A4 in the small and large human intestine. *Molecular Pharmaceutics*, **4**(2), 252-257.

Bircsak, K. ve Aleksunes, L. (2015). Interaction of isoflavones with the bcrp/abcg2 drug transporter. *Current Drug Metabolism*, **16**(2), 124-140.

Bitto, A., Burnett, B.P., Polito, F., Marini, H., Levy, R.M., Armbruster, M.A. ve ark. (2008). Effects of genistein aglycone in osteoporotic, ovariectomized rats: a comparison with alendronate, raloxifene and oestradiol. *British Journal of Pharmacology*, **155**(6), 896-905.

Boersma, M.G., Van der Woude, H., Bogaards, J., Boeren, S., Vervoort, J., Cnubben, N.H. ve ark. (2002). Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. *Chemical Research in Toxicology*, **15**(5), 662-670.

Bolca, S., Urpi-Sarda, M., Blondeel, P., Roche, N., Vanhaecke, L., Possemiers, S. ve ark. (2010). Disposition of soy isoflavones in normal human breast tissue. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **91**, 976–984.

Breedveld, P., Zelcer, N., Pluim, D., Sönmezer, Ö., Tibben, M.M., Beijnen, J. H. ve ark. (2004). Mechanism of the pharmacokinetic interaction between methotrexate and benzimidazoles: potential role for breast cancer resistance protein in clinical drug-drug interactions. *Cancer Research*, **64**(16), 5804-5811.

Broderick, G.A. (1995). Desirable characteristics of forage legumes for improving protein utilization in ruminants. *Journal of Animal Science*, **73**(9), 2760-2773.

Broderick, G.A. (2003). Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **86**(4), 1370-1381.

Bronger, H., König, J., Kopplow, K., Steiner, H.H., Ahmadi, R., Herold-Mende, C. ve ark. (2005). ABCC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. *Cancer Research,* **65**(24), 11419-11428.

Brown, C.D., Sayer, R., Windass, A.S., Haslam, I.S., De Broe, M.E., D'Haese, P.C., ve ark. (2008). Characterisation of human tubular cell monolayers as a model of proximal tubular xenobiotic handling. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **233**(3), 428-438.

Burdette, C.Q. ve Marcus, R.K. (2013). Determination of isoflavone content in soy, red clover, and kudzu dietary supplement materials by liquid chromatography-particle beam/electron ionization mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, **96**(5), 925-932.

Buxbaum, E. (1999). Co-operative binding sites for transported substrates in the multiple drug resistance transporter Mdr1. *European Journal of Biochemistry,* **265**(1), 64-70.

Cai, J. ve Gros, P. (2003). Overexpression, purification, and functional characterization of ATP-binding cassette transporters in the yeast, Pichia pastoris. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1610**(1), 63-76.

Cermak, R. (2008). Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology,* **4**(1), 17-35.

Cha, P.C., Mushiroda, T., Zembutsu, H., Harada, H., Shinoda, N., Kawamoto, S. ve ark. (2009). Single nucleotide polymorphism in ABCG2 is associated with irinotecan-induced severe myelosuppression. *Journal of Human Genetics*, **54**(10), 572-580.

Chan, L.M., Lowes, S. ve Hirst, B.H. (2004). The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **21**(1), 25-51.

Chen, Y.M., Ho, S.C., Lam, S.S., Ho, S.S. ve Woo, J.L. (2003). Soy isoflavones have a favorable effect on bone loss in Chinese postmenopausal women with lower bone mass: a double-blind, randomized, controlled trial. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **88**(10), 4740-4747.

Choo, E.F., Leake, B., Wandel, C., Imamura, H., Wood, A.J., Wilkinson, G.R., ve ark. (2000). Pharmacological inhibition of P-glycoprotein transport enhances

the distribution of HIV-1 protease inhibitors into brain and testes. *Drug Metabolism and Disposition*, **28**(6), 655-660.

Cisternino, S., Mercier, C., Bourasset, F., Roux, F. ve Scherrmann, J.M. (2004). Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer research*, **64**(9), 3296-3301.

Clark, R., Kerr, I.D. ve Callaghan, R. (2006). Multiple drug binding sites on the R482G isoform of the ABCG2 transporter. *British Journal of Pharmacology*, **149**(5), 506-515.

Clarkson, T.B., Utian, W.H., Barnes, S., Gold, E.B., Basaria, S.S., Aso, T., ve ark. (2011). The role of soy isoflavones in menopausal health: report of The North American Menopause Society/Wulf H. Utian Translational Science Symposium in Chicago, IL (2010). *Menopause*, **18**(7), 732-753.

Cohen-Zinder, M., Seroussi, E., Larkin, D.M., Loor, J.J., Everts-Van Der Wind, A., Lee, J.H. ve ark. (2005). Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. *Genome Research*, **15**(7), 936-944.

Coles, G.C. (1999). Anthelmintic resistance and the control of worms. *Journal of Medical Microbiology*, **48**(4), 323-325.

Conseil, G., Decottignies, A., Jault, J.M., Comte, G., Barron, D., Goffeau, A. ve ark. (2000). Prenyl-flavonoids as potent inhibitors of the Pdr5p multidrug ABC transporter from Saccharomyces cerevisiae. *Biochemistry*, **39**(23), 6910-6917.

Constantinou, A.I., White, B.E., Tonetti, D., Yang, Y., Liang, W., Li, W. ve ark. (2005). The soy isoflavone daidzein improves the capacity of tamoxifen to prevent mammary tumours. *European Journal of Cancer*, **41**(4), 647-654.

Cooray, H.C., Janvilisri, T., van Veen, H.W., Hladky, S.B. ve Barrand, M.A. (2004). Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **317**(1), 269-275.

Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R. ve ark. (1989). Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86**(2), 695-698.

Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigne, C. ve Remesy, C. (2001). Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. *The Journal of Nutrition*, **131**(8), 2109-2114.

Cromie, L., Ferry, M., Couper, A., Fields, C. ve Taylor, S.M. (2006). Pharmacokinetics of a novel closantel/ivermectin injection in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **29**(3), 205-211.

Cusatis, G., Gregorc, V., Li, J., Spreafico, A., Ingersoll, R.G., Verweij, J., ve ark. (2006) Pharmacogenetics of ABCG2 and adverse reactions to gefitinib. *Journal of the National Cancer Institute*, **98**, 1739–1742.

Cusatis, G. ve Sparreboom, A. (2008) Pharmacogenomic importance of ABCG2. *Pharmacogenomics*, **9**(8),1005–1009.

Dahan, A., Lennernäs, H. ve Amidon, G.L. (2012). The fraction dose absorbed, in humans, and high jejunal human permeability relationship. *Molecular Pharmaceutics*, **9**(6), 1847-1851.

Davis, J.L., Little, D., Blikslager, A.T. ve Papich, M.G. (2006). Mucosal permeability of water-soluble drugs in the equine jejunum: a preliminary investigation. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **29**(5), 379-385.

Day, A.J., DuPont, M.S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M.J., Morgan, M.R. ve ark. (1998). Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β-glucosidase activity. *FEBS Letters*, **436**(1), 71-75.

De Frutos, E.E. (2014). Understanding the function of the membrane transporter ABCG2 by comparison with-P glycoprotein: Interaction with antitumorals, antibiotics, hormones and other compounds. Leon Üniversitesi, Doktora tezi.

De Liguoro, M., Longo, F., Brambilla, G., Cinquina, A., Bocca, A. ve Lucisano, A. (1996). Distribution of the anthelmintic drug albendazole and its major metabolites in ovine milk and milk products after a single oral dose. *Journal of Dairy Research*, **63**(4), 533-542.

Dean, M., Hamon, Y. ve Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*, **42**(7), 1007-1017.

Dean, M. ve Annilo, T. (2005). Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **6**, 123-142.

DeGorter, M.K., Xia, C.Q., Yang, J.J. ve Kim, R.B. (2012). Drug transporters in drug efficacy and toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **52**, 249-273.

Dobson, R.J., Hosking, B.C., Besier, R.B., Love, S., Larsen, J.W.A., Rolfe, P.F. ve ark. (2011). Minimising the development of anthelmintic resistance, and optimising the use of the novel anthelmintic monepantel, for the sustainable control of nematode parasites in Australian sheep grazing systems. *Australian Veterinary Journal*, **89**(5), 160-166.

Doerge, D.R., Chang, H.C., Churchwell, MI. ve Holder, C.L. (2000). Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition*, **28**(3), 298-307.

Donnini, S., Finetti, F., Lusini, L., Morbidelli, L., Cheynier, V., Barron, D., ve ark. (2006). Divergent effects of quercetin conjugates on angiogenesis. *British Journal of Nutrition*, **95**(5), 1016-1023.

Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K. ve ark. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**(26), 15665-15670.

Ducray, P., Gauvry, N., Pautrat, F., Goebel, T., Fruechtel, J., Desaules, Y., ve ark. (2008). Discovery of amino-acetonitrile derivatives, a new class of synthetic anthelmintic compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **18**(9), 2935-2938.

Dupuy, J., Larrieu, G., Sutra, J.F., Lespine, A. ve Alvinerie, M. (2003). Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by a natural flavonoid: quercetin. *Veterinary Parasitology*, **112**(4), 337-347.

Dupuy, J., Alvinerie, M., Ménez, C. ve Lespine, A. (2010). Interaction of anthelmintic drugs with P-glycoprotein in recombinant LLC-PK1-mdr1a cells. *Chemico-biological Interactions*, **186**(3), 280-286.

El-Sheikh, A.A., Van Den Heuvel, J.J., Koenderink, J.B. ve Russel, F.G. (2008). Effect of hypouricaemic and hyperuricaemic drugs on the renal urate efflux

transporter, multidrug resistance protein 4. *British Journal of Pharmacology*, **155**(7), 1066-1075.

EMA (1999). Council Regulation of the European Union No. 2377/90 and Commission Regulation Nos. 508/1999, 2385/1999, 2393/1999 and 807/2001. https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/files/eudralex/vol-5/reg_1990_2377_cons_2008/reg_1990_2377_consol_en.pdf

EMA (2010). Guideline on the Investigation of Drug Interactions. 22 April 2010. CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 – Corr.* Committee for Human Medicinal Products (CHMP). http://www.ema.europa.eu/docs/en_gb/document_library/scientific_guideline/210/05/wc500090112.pdf.2010

EMA (2011). Guideline on Bioanalytical Method Validation. European Medicines Agency Science Medicines Health. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf

EMA (2013). European public MRL assessment report (EPMAR). 24 May 2013. EMA/CVMP/741250/2011. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use. https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/monepantel-caprine-ovine-milk-european-public-maximum-residue-limit-assessment-report-4-epmar-cvmp_en.pdf

Eneroth, A., Åström, E., Hoogstraate, J., Schrenk, D., Conrad, S., Kauffmann, H.M. ve ark. (2001). Evaluation of a vincristine resistant Caco-2 cell line for use in a calcein AM extrusion screening assay for P-glycoprotein interaction. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **12**(3), 205-214.

Enokizono, J., Kusuhara, H. ve Sugiyama, Y. (2007) Effect of breast cancer resistance protein (Bcrp / Abcg2) on the disposition of phytoestrogens. *Molecular Pharmacology*, **72**(4), 967–975.

Enokizono, J., Kusuhara, H., Ose, A., Schinkel, A.H. ve Sugiyama, Y. (2008). Quantitative investigation of the role of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting brain and testis penetration of xenobiotic compounds. *Drug Metabolism and Disposition*, **36**(6), 995-1002.

Escudero, E., Cárceles, C.M., Fernandez-Varon, E., Marin, P. ve Benchaoui, H. (2007). Pharmacokinetics of danofloxacin 18% in lactating sheep and goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **30**(6), 572-577.

Evans, G.L., Ni, B., Hrycyna, C.A., Chen, D., Ambudkar, S.V., Pastan, I. ve ark. (1995). Heterologous expression systems for P-glycoprotein: E. coli, yeast, and baculovirus. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **27**(1), 43-52.

Evers, R., Zaman, G. J., van Deemter, L., Jansen, H., Calafat, J., Oomen, L.C. ve ark. (1996). Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. *The Journal of Clinical Investigation*, **97**(5), 1211-1218.

FDA (2001). Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf

FDA (2012). Guidance compliance regulatory information. The United States Food and Drug Administration. http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm292362.pdf.2012

Fekete, Z., Rajnai, Z., Nagy, T., Jakab, K.T., Kurunczi, A., Gémes, K. ve ark. (2015). Membrane assays to characterize interaction of drugs with ABCB1. *The Journal of Membrane Biology*, **248**(6), 967-977.

Garcia-Lino, A.M., Alvarez-Fernandez, I., Blanco-Paniagua, E., Merino, G., ve Alvarez, A.I. (2019). Transporters in the Mammary gland-Contribution to presence of nutrients and drugs into milk. *Nutrients*, **11**(10), 2372.

Gardner, C.D., Chatterjee, L.M. ve Franke, A.A. (2009). Effects of isoflavone supplements vs. soy foods on blood concentrations of genistein and daidzein in adults. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **20**(3), 227-234.

Gerk, P.M., Oo, C.Y., Paxton, E.W., Moscow, J.A., ve McNamara, P.J. (2001). Interactions between cimetidine, nitrofurantoin, and probenecid active transport into rat milk. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **296**(1), 175-180.

Giacomini, K.M., Huang, S.M., Tweedie, D.J., Benet, L.Z., Brouwer, K.L., Chu, X. ve ark. (2010). Membrane transporters in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, **9**(3), 215.

Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J. ve Sarkadi, B. (2004). The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Current Drug Delivery*, **1**(1), 27-42.

Glavinas, H., Kis, E., Pal, A., Kovacs, R., Jani, M., Vagi, E. ve ark. (2007). ABCG2 (breast cancer resistance protein/mitoxantrone resistance-associated protein) ATPase assay: a useful tool to detect drug-transporter interactions. *Drug Metabolism and Disposition*, **35**(9), 1533-1542.

Glavinas, H., Méhn, D., Jani, M., Oosterhuis, B., Herédi-Szabó, K. ve Krajcsi, P. (2008). Utilization of membrane vesicle preparations to study drug–ABC transporter interactions. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **4**(6), 721-732.

Gobert, G.N. ve Jones, M.K. (2008). Discovering new schistosome drug targets: the role of transcriptomics. *Current Drug Targets*, **9**(11), 922-930.

Goldberg, H., Ling, V., Wong, P.Y. ve Skorecki, K. (1988). Reduced cyclosporin accumulation in multidrug-resistant cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **152**(2), 552-558.

Good, B. (2012). Anthelmintic resistance – a potential challenge for sheep procedures? İçinde Diskin, M.G. ve McHugh, M.P. (Ed.) *Technical Updates on Sheep Production*. Teagasc - Agriculture and Food Development Authority, Carlow, Ireland; 72-75.

Harada, M., Kan, Y., Naoki, H., Fukui, Y., Kageyama, N., Nakai, M. ve ark. (1999). Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with ingested (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **63**(6), 973-977.

Haslam, I.S., Wright, J.A., O'Reilly, D.A., Sherlock, D.J., Coleman, T. ve Simmons, N.L. (2011). Intestinal ciprofloxacin efflux: the role of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Drug Metabolism and Disposition*, **39**(12), 2321-2328.

Haslam, I.S. ve Simmons, N.L. (2014). Expression of the ABC transport proteins MDR1 (ABCB1) and BCRP (ABCG2) in bovine rumen. *Journal of Comparative Physiology B*, **184**(5), 673-681.

Hedlund, T.E., Johannes, W.U. ve Miller, G.J. (2003). Soy isoflavonoid equol modulates the growth of benign and malignant prostatic epithelial cells in vitro. *The Prostate*, **54**(1), 68-78.

Henrich, C.J., Robey, R.W., Bokesch, H.R., Bates, S.E., Shukla, S., Ambudkar, S.V. ve ark. (2007) New inhibitors of ABCG2 identified by high-throughput screening. Molecular Cancer Therapeutics, **6**, 3271–3278.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. ve Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**(10), 572-584.

Herwaarden, A.E.V., Wagenaar, E., Karnekamp, B., Merino, G., Jonker, J.W. ve Schinkel, A.H. (2006). Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) reduces systemic exposure of the dietary carcinogens aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but also mediates their secretion into breast milk. *Carcinogenesis*, **27**(1), 123-130

Higgins, C.F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology*, **8**(1), 67-113.

Hillgren, K.M., Keppler, D., Zur, A.A., Giacomini, K.M., Stieger, B., Cass, C.E. ve ark. (2013). Emerging transporters of clinical importance: an update from the International Transporter Consortium. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **94**(1), 52-63.

Holcapek, M., Kolarova, L. ve Nobilis, M. (2008). High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **391**(1), 59-78.

Holcapek, M., Jirasko, R. ve Lisa, M. (2012). Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A*, **1259**, 3-15.

Hosking, B.C., Kaminsky, R., Sager, H., Karadzovska, D., Seewald, W., Giraudel, J.M. ve ark. (2010a). The effect of sheep breed, age, and gender on the pharmacokinetics and efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile derivative. *Parasitology Research*, **106**(2), 367.

Hosking, B.C., Stein, P.A., Karadzovska, D., House, J.K., Seewald, W. ve Giraudel, J.M. (2010b). Effect of route of administration on the efficacy and pharmacokinetics of an experimental formulation of the amino-acetonitrile derivative monepantel in sheep. *Veterinary Record*, **166**(16), 490-494.

Hu, M., To, K.K., Mak, V.W. ve Tomlinson, B. (2006) The ABCG2 transporter and its relations with the pharmacokinetics, drug interaction and lipid-

lowering effects of statins. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, **7**, 49–62.

Huisman, M.T., Smit, J.W., Wiltshire, H.R., Hoetelmans, R.M., Beijnen, J.H. ve Schinkel, A.H. (2001). P-glycoprotein limits oral availability, brain, and fetal penetration of saquinavir even with high doses of ritonavir. *Molecular Pharmacology*, **59**(4), 806-813.

Hussain, M., Banerjee, M., Sarkar, F.H., Djuric, Z., Pollak, M.N., Doerge, D. ve ark. (2003). Soy isoflavones in the treatment of prostate cancer. *Nutrition and Cancer*, **47**(2), 111-117.

Ieiri, I., Higuchi, S. ve Sugiyama, Y. (2009). Genetic polymorphisms of uptake (OATP1B1, 1B3) and efflux (MRP2, BCRP) transporters: implications for inter-individual differences in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of statins and other clinically relevant drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **5**(7), 703-729.

Imai, Y., Asada, S., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T. ve ark. (2003). Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Molecular Pharmacology*, **64**(3), 610-618.

Imai, Y., Tsukahara, S., Asada, S. ve Sugimoto, Y. (2004). Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance. *Cancer Research*, **64**(12), 4346-4352.

Imperiale, F., Lifschitz, A., Sallovitz, J., Virkel, G. ve Lanusse, C. (2004). Comparative depletion of ivermectin and moxidectin milk residues in dairy sheep after oral and subcutaneous administration. *Journal of Dairy Research*, **71**(4), 427-433.

Ingram, D., Sanders, K., Kolybaba, M. ve Lopez, D. (1997). Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer. *The Lancet*, **350**(9083), 990-994.

Ito, S. ve Alcorn, J. (2003). Xenobiotic transporter expression and function in the human mammary gland. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **55**(5), 653-665.

Ito, S. ve Lee, A. (2003). Drug excretion into breast milk—overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **55**(5), 617-627.

Janvilisri, T., Venter, H., Shahi, S., Reuter, G., Balakrishnan, L. ve ark. (2003). Sterol transport by the human breast cancer resistance protein (ABCG2)

expressed in Lactococcus lactis. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(23), 20645-20651.

Jefferson, W.N., Couse, J.F., Padilla-Banks, E., Korach, K.S. ve Newbold, R.R. (2002). Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER) α expression and multioocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ERβ-mediated and nonestrogenic actions. *Biology of Reproduction*, **67**(4), 1285-1296.

Jin, Q.R., Shim, W.S., Choi, M.K., Tian, G.Y., Song, I.S., Yang, S.G. ve ark. (2009). Decreased urinary secretion of belotecan in folic acid-induced acute renal failure rats due to down-regulation of Oat1 and Bcrp. *Xenobiotica*, **39**(10), 711-721.

Jonker, J.W., Smit, J.W., Brinkhuis, R.F., Maliepaard, M., Beijnen, J.H., Schellens, J.H. ve ark. (2000). Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *Journal of the National Cancer Institute*, **92**(20), 1651-1656.

Jonker, J.W., Buitelaar, M., Wagenaar, E., Van Der Valk, M.A., Scheffer, G.L., Scheper, R.J. ve ark. (2002). The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(24), 15649-15654.

Jonker, J.W., Merino, G., Musters, S., van Herwaarden, A.E., Bolscher, E., Wagenaar, E. ve ark. (2005). The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nature Medicine*, **11**(2), 127-129.

Jovanovich, S.V., Steenken, S., Simic, M.G. ve Hara, Y. (1998) Antioxidant properties of flavonoids: Reduction potentials and electron transfer reactions of Flavonoids radicals. İçinde RiceEvans, C.A ve Packer, L. (Ed.), *Flavonoids in Health and Disease*. New York: Marcel Dekker; 137–161.

Ju, Y.H., Allred, C.D., Allred, K.F., Karko, K.L., Doerge, D.R. ve Helferich, W.G. (2001). Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice. *The Journal of Nutrition*, **131**(11), 2957-2962.

Juliano, R.L. ve Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **455**(1), 152-162.

Kaminsky, R., Ducray, P., Jung, M., Clover, R., Rufener, L., Bouvier, J., ve ark. (2008a). A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*, **452**(7184), 176-180.

Kaminsky, R., Gauvry, N., Weber, S.S., Skripsky, T., Bouvier, J., Wenger, A. ve ark. (2008b). Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitology Research*, **103**(4), 931-939.

Kaminsky, R., Bapst, B., Stein, P.A., Strehlau, G.A., Allan, B.A., Hosking, B.C. ve ark. (2011). Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multi-resistant nematodes of sheep. *Parasitology Research*, **109**(1), 19-23.

Kaminsky, R. ve Rufener, L. (2012). Monepantel: from discovery to mode of action. İçinde Caffrey, C.R. (Ed.), *Parasitic Helminths – Targets, Screens, Drugs and Vaccines*, Weinheim, Germany: Wiley-Blackwell; 233–249

Kaminsky, R., Rufener, L., Bouvier, J., Lizundia, R., Weber, S.S. ve Sager, H. (2013). Worms—A "license to kill". *Veterinary Parasitology*, **195**(3-4), 286-291.

Kaplan, R.M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*, **20**(10), 477-481.

Karadzovska, D., Seewald, W., Browning, A., Smal, M., Bouvier, J. ve Giraudel, J.M. (2009). Pharmacokinetics of monepantel and its sulfone metabolite, monepantel sulfone, after intravenous and oral administration in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **32**(4), 359-367.

Katayama, K., Masuyama, K., Yoshioka, S., Hasegawa, H., Mitsuhashi, J. ve Sugimoto, Y. (2007). Flavonoids inhibit breast cancer resistance protein-mediated drug resistance: transporter specificity and structure–activity relationship. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **60**(6), 789-797.

Keep, R.F. ve Jones, H.C. (1990). A morphometric study on the development of the lateral ventricle choroid plexus, choroid plexus capillaries and ventricular ependyma in the rat. *Developmental Brain Research*, **56**(1), 47-53.

Kelly, G.E., Joannou, G.E., Reeder, A.Y., Nelson, C. ve Waring, M.A. (1995). The variable metabolic response to dietary isoflavones in humans. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **208**(1), 40-43.

Kiki-Mvouaka, S., Menez, C., Borin, C., Lyazrhi, F., Foucaud-Vignault, M., Dupuy, J. ve ark. (2010). Role of P-glycoprotein in the disposition of macrocyclic

lactones: a comparison between ivermectin, eprinomectin, and moxidectin in mice. *Drug Metabolism and Disposition*, **38**(4), 573-580.

Kinsella, B., Byrne, P., Cantwell, H., McCormack, M., Furey, A. ve Danaher, M. (2011). Determination of the new anthelmintic monepantel and its sulfone metabolite in milk and muscle using a UHPLC–MS/MS and QuEChERS method. *Journal of Chromatography B*, **879**(31), 3707-3713.

Kitamura, S., Maeda, K., Wang, Y. ve Sugiyama, Y. (2008). Involvement of multiple transporters in the hepatobiliary transport of rosuvastatin. *Drug Metabolism and Disposition*, **36**(10), 2014-2023.

Kitamura, Y., Kusuhara, H. ve Sugiyama, Y. (2010). Functional characterization of multidrug resistance-associated protein 3 (mrp3/abcc3) in the basolateral efflux of glucuronide conjugates in the mouse small intestine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **332**(2), 659-666.

Klaassen, C.D. ve Aleksunes, L.M. (2010). Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacological Reviews*, **62**(1), 1-96.

Köhler, P. (2001). The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*, **31**(4), 336-345.

Koritz, G.D. (1983). Influence of ruminant gastrointestinal physiology on the pharmacokinetics of drugs in dosage forms administered orally. İçinde *Veterinary Pharmacology and Toxicology*. Dordrecht: Springer; 151-163.

Krishnamurthy, P. ve Schuetz, J. D. (2006). Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **46**, 381-410.

Kruijtzer, C.M.F., Beijnen, J.H., Rosing, H., ten Bokkel Huinink, W.W., Schot, M., Jewell, RC. ve Schellens, J.H.M. (2002). Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918. *Journal of Clinical Oncology*, **20**(13), 2943-2950.

Kuiper, GG., Lemmen, JG., Carlsson, B.O., Corton, J.C., Safe, S.H., Van Der Saag, P.T. ve Gustafsson, J.A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β. *Endocrinology*, **139**(10), 4252-4263.

Kulling, S.E., Honig, D.M. ve Metzler, M. (2001). Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in vitro and in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**(6), 3024-3033.

Kunta, J.R. ve Sinko, P.J. (2004). Intestinal drug transporters: in vivo function and clinical importance. *Current Drug Metabolism*, **5**(1), 109-124.

Kuppens, I.E., Witteveen, E.O., Jewell, R.C., Radema, S.A., Paul, E.M., Mangum, S.G., ve ark. (2007) A phase I, randomized, open-label, parallel-cohort, dose-finding study of elacridar (GF120918) and oral topotecan in cancer patients. *Clinical Cancer Research*, **13**, 3276–3285.

Laffont, C.M., Toutain, P.L., Alvinerie, M. ve Bousquet-Mélou, A. (2002). Intestinal secretion is a major route for parent ivermectin elimination in the rat. *Drug Metabolism and Disposition*, **30**(6), 626-630.

Lankas, G.R., Wise, L.D., Cartwright, M.E., Pippert, T. ve Umbenhauer, D. R. (1998). Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reproductive Toxicology*, **12**(4), 457-463.

Lanusse, C., Lifschitz, A., Virkel, G., Alvarez, L., Sanchez, S., Sutra, J. F. ve ark. (1997). Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20**(2), 91-99.

Leathwick, D.M. (2012). Modelling the benefits of a new class of anthelmintic in combination. *Veterinary Parasitology*, **186**(1-2), 93-100.

Leathwick, D.M. (2013). Managing anthelmintic resistance–parasite fitness, drug use strategy and the potential for reversion towards susceptibility. *Veterinary Parasitology*, **198**(1-2), 145-153.

Leathwick, D.M. ve Besier, R.B. (2014). The management of anthelmintic resistance in grazing ruminants in Australasia—strategies and experiences. *Veterinary Parasitology*, **204**(1-2), 44-54.

Lecova, L., Stuchlikova, L., Prchal, L. ve Skalova, L. (2014). Monepantel: the most studied new anthelmintic drug of recent years. *Parasitology*, **141**(13), 1686.

Lee, S.H. ve Altenberg, G.A. (2003). Expression of functional multidrug-resistance protein 1 in Saccharomyces cerevisiae: effects of N-and C-terminal affinity tags. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **306**(3), 644-649.

Lee, Y.J., Kusuhara, H., Jonker, J.W., Schinkel, A.H. ve 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. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **312**(1), 44-52.

Leimanis, M.L. ve Georges, E. (2007). ABCG2 membrane transporter in mature human erythrocytes is exclusively homodimer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **354**(2), 345-350.

Lennernäs, H. (1997). Human jejunal effective permeability and its correlation with preclinical drug absorption models. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **49**(7), 627-638.

Leslie, E.M., Deeley, R.G. ve Cole, S.P. (2003). Bioflavonoid stimulation of glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). *Drug Metabolism and Disposition*, **31**(1), 11-15.

Leslie, E.M., Deeley, R.G. ve Cole, S.P. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **204**(3), 216-237.

Lespine, A., Martin, S., Dupuy, J., Roulet, A., Pineau, T., Orlowski, S. ve Alvinerie, M. (2007). Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: structure–affinity relationship. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **30**(1), 84-94.

Li, Y. ve Paxton, J.W. (2013). The effects of flavonoids on the ABC transporters: consequences for the pharmacokinetics of substrate drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **9**(3), 267-285.

Liang, X.J. ve Aszalos, A. (2006). Multidrug transporters as drug targets. *Current Drug Targets*, **7**(8), 911-921.

Licht, A. ve Schneider, E. (2011). ATP binding cassette systems: structures, mechanisms, and functions. *Central European Journal of Biology*, **6**(5), 785-801.

Lifschitz, A.L., Virkel, G.L., Sallovitz, J.M., Pis, A., Imperiale, F.A. ve Lanusse, C.E. (2004). Loperamide modifies the tissue disposition kinetics of ivermectin in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **56**(1), 61-67.

Lifschitz, A., Virkel, G., Ballent, M., Sallovitz, J. ve Lanusse, C. (2009). Combined use of ivermectin and triclabendazole in sheep: in vitro and in vivo characterisation of their pharmacological interaction. *The Veterinary Journal*, **182**(2), 261-268.

Lifschitz, A., Ballent, M., Virkel, G., Sallovitz, J., Viviani, P. ve Lanusse, C. (2014). Accumulation of monepantel and its sulphone derivative in tissues of

nematode location in sheep: pharmacokinetic support to its excellent nematodicidal activity. *Veterinary Parasitology*, **203**(1-2), 120-126.

Lin, J.H., Chiba, M. ve Baillie, T.A. (1999). Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized? *Pharmacological Reviews*, **51**(2), 135-158.

Lindner, S., Halwachs, S., Wassermann, L. ve Honscha, W. (2013). Expression and subcellular localization of efflux transporter ABCG 2/BCRP in important tissue barriers of lactating dairy cows, sheep and goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **36**(6), 562-570.

Litman, T., Nielsen, D., Skovsgaard, T., Zeuthen, T. ve Stein, W.D. (1997). ATPase activity of P-glycoprotein related to emergence of drug resistance in Ehrlich ascites tumor cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, **1361**(2), 147-158.

Litman, T., Druley, T.E., Stein, W.D. ve Bates, S.E. (2001). From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, **58**(7), 931-959.

Love, S. (2014). First confirmed case of resistance to new drench in Australia—what does it mean? WormBoss: http://www.wormboss.com.au/news/articles/drenchresistance/firstconfirmed-case-of-resistance-to-new-drench-in-australiawhat-does-itmean.php

Lund, T.D., Munson, D.J., Haldy, M.E., Setchell, K.D., Lephart, E.D., ve Handa, R.J. (2004). Equol is a novel anti-androgen that inhibits prostate growth and hormone feedback. *Biology of Reproduction*, **70**(4), 1188-1195.

Madejczyk, M.S., Aremu, D.A., Simmons-Willis, T.A., Clarkson, T.W. ve Ballatori, N. (2007). Accelerated urinary excretion of methylmercury following administration of its antidote N-acetylcysteine requires Mrp2/Abcc2, the apical multidrug resistance-associated protein. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **322**(1), 378-384.

Mahnke, H., Ballent, M., Baumann, S., Imperiale, F., Von Bergen, M., Lanusse, C. ve ark. (2016). The ABCG2 efflux transporter in the mammary gland mediates veterinary drug secretion across the blood-milk barrier into milk of dairy cows. *Drug Metabolism and Disposition*, **44**(5), 700-708.

Maliepaard, M., Scheffer, G.L., Faneyte, I.F., van Gastelen, M.A., Pijnenborg, A.C., Schinkel, A.H. ve ark. (2001). Subcellular localization and distribution of the

breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Research*, **61**(8), 3458-3464.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. ve Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **79**(5), 727-747.

Marchetti, S., de Vries, N.A., Buckle, T., Bolijn, M.J., van Eijndhoven, M.A., Beijnen, J.H. ve ark. (2008). Effect of the ATP-binding cassette drug transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2 on erlotinib hydrochloride (Tarceva) disposition in in vitro and in vivo pharmacokinetic studies employing Bcrp1$^{-/-/}$Mdr1a/1b$^{-/-}$ (triple-knockout) and wild-type mice. *Molecular Cancer Therapeutics*, **7**(8), 2280-2287.

Martin, P.M., Horwitz, K.B., Ryan, D.S. ve Mcguire, W.L. (1978). Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology*, **103**(5), 1860-1867.

Mayer, U., Wagenaar, E., Beijnen, J.H., Smit, J.W., Meijer, D.K., van Asperen, J. ve ark. (1996). Substantial excretion of digoxin via the intestinal mucosa and prevention of long-term digoxin accumulation in the brain by the mdrla P-glycoprotein. *British Journal of Pharmacology*, **119**(5), 1038-1044.

Mealey, K.L. (2012). ABCG2 transporter: therapeutic and physiologic implications in veterinary species. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **35**(2), 105-112.

Merino, G., Molina, A.J., García, J.L., Pulido, M.M., Prieto, J.G. ve Álvarez, A.I. (2003). Intestinal elimination of albendazole sulfoxide: pharmacokinetic effects of inhibitors. *International Journal of Pharmaceutics*, **263**(1-2), 123-132.

Merino, G., Jonker, J.W., Wagenaar, E., Pulido, M.M., Molina, A.J., Alvarez, A.I. ve ark. (2005a). Transport of anthelmintic benzimidazole drugs by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Drug Metabolism and Disposition*, **33**(5), 614-618.

Merino, G., Jonker, J.W., Wagenaar, E., van Herwaarden, A.E. ve Schinkel, A.H. (2005b). The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Molecular Pharmacology*, **67**(5), 1758-1764.

Merino, G., Alvarez, A.I., Pulido, M.M., Molina, A.J., Schinkel, A.H. ve Prieto, J.G. (2006). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports

fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug Metabolism and Disposition*, **34**(4), 690-695.

Merino, G., Perez, M., Real, R., Egido, E., Prieto, J.G. ve Alvarez, A.I. (2010). In vivo inhibition of BCRP/ABCG2 mediated transport of nitrofurantoin by the isoflavones genistein and daidzein: A comparative study in Bcrp1$^{-/-}$ Mice. *Pharmaceutical Research*, **27**(10), 2098-2105.

Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B. ve ark. (1999). Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Research*, **59**(1), 8-13.

Mizuno, N., Niwa, T., Yotsumoto, Y. ve Sugiyama, Y. (2003). Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacological Reviews*, **55**(3), 425-461.

Molday, R.S. (2015). Insights into the molecular properties of ABCA4 and its role in the visual cycle and Stargardt disease. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, **134**, 415-431.

Molento, M.B., Lifschitz, A., Sallovitz, J., Lanusse, C. ve Prichard, R. (2004). Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep. *Parasitology Research*, **92**(2), 121-127.

Moreno, L., Imperiale, F., Mottier, L., Alvarez, L. ve Lanusse, C. (2005). Comparison of milk residue profiles after oral and subcutaneous administration of benzimidazole anthelmintics to dairy cows. *Analytica Chimica Acta*, **536**(1-2), 91-99.

Morisaki, K., Robey, R.W., Ozvegy-Laczka, C., Honjo, Y., Polgar, O., Steadman, K. ve ark. (2005) Single nucleotide polymorphisms modify the transporter activity of ABCG2. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **56**, 161–172.

Morito, K., Hirose, T., Kinjo, J., Hirakawa, T., Okawa, M., Nohara, T. ve ark. (2001). Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors α and β. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **24**(4), 351-356.

Morris, M.E. ve Zhang, S. (2006). Flavonoid–drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sciences*, **78**(18), 2116-2130.

Neuhouser, M.L. (2004). Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer*, **50**(1), 1-7.

Newbold, R.R., Banks, E.P., Bullock, B. ve Jefferson, W.N. (2001). Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer Research*, **61**(11), 4325-4328.

Nies, A.T., Jedlitschky, G., König, J., Herold-Mende, C., Steiner, H.H., Schmitt, H.P. ve ark. (2004). Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1–MRP6 (ABCC1–ABCC6), in human brain. *Neuroscience*, 129(2), 349-360.

Nies, A.T., Herrmann, E., Brom, M. ve Keppler, D. (2008). Vectorial transport of the plant alkaloid berberine by double-transfected cells expressing the human organic cation transporter 1 (OCT1, SLC22A1) and the efflux pump MDR1 P-glycoprotein (ABCB1). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **376**(6), 449-461.

Otero, J.A., Real, R., de la Fuente, Á., Prieto, J.G., Marqués, M., Álvarez, A.I. ve ark. (2013). The bovine ATP-binding cassette transporter ABCG2 Y581S single nucleotide polymorphism increases milk secretion of the fluoroquinolone danofloxacin. *Drug Metabolism and Disposition*, **41**(3), 546-549.

Otero, J.A., Barrera, B., de la Fuente, A., Prieto, J.G., Marqués, M., Álvarez, A.I. ve ark. (2015). The gain-of-function Y581S polymorphism of the ABCG2 transporter increases secretion into milk of danofloxacin at the therapeutic dose for mastitis treatment. *Journal of Dairy Science*, **98**(1), 312-317.

Otero, J.A., Miguel, V., González-Lobato, L., García-Villalba, R., Espín, J. C., Prieto, J. G. ve ark. (2016). Effect of bovine ABCG2 polymorphism Y581S SNP on secretion into milk of enterolactone, riboflavin and uric acid. *Animal*, **10**(2), 238-247.

Ozvegy, C., Litman, T., Szakács, G., Nagy, Z., Bates, S., Váradi, A. ve ark. (2001). Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **285**(1), 111-117.

Ozvegy-Laczka, C., Cserepes, J., Elkind, N.B. ve Sarkadi, B. (2005). Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. *Drug Resistance Updates*, **8**(1-2), 15-26.

Papadopoulos, E. (2008). Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Ruminant Research*, **76**(1-2), 99-103.

Pardridge, W.M. (2002). Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nature Reviews Drug Discovery*, **1**(2), 131-139.

Penalvo, J.L., Nurmi, T. ve Adlercreutz, H. (2004). A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. *Food Chemistry*, **87**(2), 297-305.

Perez, M., Blazquez, A.G., Real, R., Mendoza, G., Prieto, J.G., Merino, G. ve ark. (2009a). In vitro and in vivo interaction of moxidectin with BCRP/ABCG2. *Chemico-Biological Interactions*, **180**(1), 106-112.

Perez, M., Real, R., Mendoza, G., Merino, G., Prieto, J.G. ve Alvarez, A.I. (2009b). Milk secretion of nitrofurantoin, as a specific BCRP/ABCG2 substrate, in assaf sheep: modulation by isoflavones. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **32**(5), 498-502.

Perez, M., Otero, J.A., Barrera, B., Prieto, J.G., Merino, G. ve ark. (2013). Inhibition of ABCG2/BCRP transporter by soy isoflavones genistein and daidzein: effect on plasma and milk levels of danofloxacin in sheep. *The Veterinary Journal*, **196**(2), 203-208.

Perez-Victoria, J.M., Chiquero, M.J., Conseil, G., Dayan, G., Di Pietro, A., Barron, D. ve ark.(1999). Correlation between the affinity of flavonoids binding to the cytosolic site of Leishmania tropica multidrug transporter and their efficiency to revert parasite resistance to daunomycin. *Biochemistry*, 38(6), 1736-1743.

Perez-Victoria, J.M., Pietro, A., Barron, D., Ravelo, A.G., Castanys, S. ve Gamarro, F. (2002). Multidrug resistance phenotype mediated by the P-glycoprotein-like transporter in Leishmania: a search for reversal agents. *Current Drug Targets*, **3**(4), 311-333.

Piskula, M.K. ve Terao, J. (1998). Accumulation of (−)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *The Journal of Nutrition*, **128**(7), 1172-1178.

Polli, J.W., Olson, K.L., Chism, J.P., John-Williams, L.S., Yeager, R.L., Woodard, S.M. ve ark. (2009). An unexpected synergist role of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the central nervous system penetration of the tyrosine kinase inhibitor lapatinib (N-{3-chloro-4-[(3-fluorobenzyl) oxy] phenyl}-6-[5-({[2-(methylsulfonyl) ethyl] amino} methyl)-2-furyl]-4-quinazolinamine; GW572016). *Drug Metabolism and Disposition*, **37**(2), 439-442.

Prichard, R. (1994). Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, **54**(1-3), 259-268.

Prichard, R., Ménez, C. ve Lespine, A. (2012). Moxidectin and the avermectins: consanguinity but not identity. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, **2**, 134-153.

Pritchett, L.E., Atherton, K.M., Mutch, E. ve Ford, D. (2008). Glucuronidation of the soyabean isoflavones genistein and daidzein by human liver is related to levels of UGT1A1 and UGT1A9 activity and alters isoflavone response in the MCF-7 human breast cancer cell line. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **19**(11), 739-745.

Pulido, M.M., Molina, A.J., Merino, G., Mendoza, G., Prieto, J.G. ve Alvarez, A.I. (2006). Interaction of enrofloxacin with breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): influence of flavonoids and role in milk secretion in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **29**(4), 279-287.

Ramirez, C.J., Minch, J.D., Gay, J.M., Lahmers, S.M., Guerra, D.J., Haldorson, G.J. ve ark. (2011) Molecular genetic basis for fluoroquinolone-induced retinal degeneration in cats. *Pharmacogenetics Genomics*, **21**, 66–75.

Real, R., Egido, E., Pérez, M., Gonzalez-Lobato, L., Barrera, B., Prieto, J.G. ve ark. (2011a). Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the secretion of danofloxacin into milk: interaction with ivermectin. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **34**(4), 313-321.

Real, R., González-Lobato, L., Baro, M.F., Valbuena, S., de la Fuente, A., Prieto, J.G. ve ark. (2011b). Analysis of the effect of the bovine adenosine triphosphate-binding cassette transporter G2 single nucleotide polymorphism Y581S on transcellular transport of veterinary drugs using new cell culture models. *Journal of Animal Science*, **89**(12), 4325-4338.

Rimbach, G., Weinberg, P.D., de Pascual-Teresa, S., Alonso, M.G., Ewins, B.A., Turner, R. ve ark. (2004). Sulfation of genistein alters its antioxidant properties and its effect on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1670**(3), 229-237.

Roberts, L.M., Black, D.S., Raman, C., Woodford, K., Zhou, M., Haggerty, J.E. ve ark. (2008). Subcellular localization of transporters along the rat blood–brain

barrier and blood–cerebral-spinal fluid barrier by in vivo biotinylation. *Neuroscience*, **155**(2), 423-438.

Robertson, E.E. ve Rankin, G.O. (2006). Human renal organic anion transporters: characteristics and contributions to drug and drug metabolite excretion. *Pharmacology & Therapeutics*, **109**(3), 399-412.

Robey, R.W., Honjo, Y., van de Laar, A., Miyake, K., Regis, J.T., Litman, T. ve ark. (2001). A functional assay for detection of the mitoxantrone resistance protein, MXR (ABCG2). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1512**(2), 171-182.

Robey, R.W., To, K.K., Polgar, O., Dohse, M., Fetsch, P., Dean, M. ve ark. (2009). ABCG2: a perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **61**(1), 3-13.

Rolfe, B.G. (1988). Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation. *BioFactors (Oxford, England)*, **1**(1), 3-10.

Rowland, I.R., Wiseman, H., Sanders, T.A., Adlercreutz, H. ve Bowey, E.A. (2000). Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutrition and Cancer*, **36**(1), 27-32.

Rufener, L., Mäser, P., Roditi, I. ve Kaminsky, R. (2009). Haemonchus contortus acetylcholine receptors of the DEG-3 subfamily and their role in sensitivity to monepantel. *Plos Pathogens*, **5**(4), e1000380.

Rufener, L., Keiser, J., Kaminsky, R., Mäser, P. ve Nilsson, D. (2010a). Phylogenomics of ligand-gated ion channels predicts monepantel effect. *PloS Pathogens*, **6**(9), e1001091.

Rufener, L., Baur, R., Kaminsky, R., Mäser, P. ve Sigel, E. (2010b). Monepantel allosterically activates DEG-3/DES-2 channels of the gastrointestinal nematode Haemonchus contortus. *Molecular Pharmacology*, **78**(5), 895-902.

Saito T., Zhang Z.J., Ohtsubo T., Noda I., Shibamori Y., Yamamoto T. ve ark. (2001). Homozygous disruption of the mdr1a P-glycoprotein gene affects blood-nerve barrier function in mice administered with neurotoxic drugs. Acta oto-laryngologica, **121**(6), 735-742.

Sakla, M.S., Shenouda, N.S., Ansell, P.J., MacDonald, R.S. ve Lubahn, D.B. (2007). Genistein affects HER2 protein concentration, activation, and promoter regulation in BT-474 human breast cancer cells. *Endocrine*, **32**(1), 69-78.

Sangster, N.C. ve Gill, J. (1999). Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitology Today*, **15**(4), 141-146.

Sarkadi, B., Price, E.M., Boucher, R.C., Germann, U.A. ve Scarborough, G.A. (1992). Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, **267**(7), 4854-4858.

Sato, M., Iwanaga, T., Mamada, H., Ogihara, T., Yabuuchi, H., Maeda, T. ve ark. (2008). Involvement of uric acid transporters in alteration of serum uric acid level by angiotensin II receptor blockers. *Pharmaceutical Research*, **25**(3), 639-646.

Schadewinkel-Scherkl, A.M., Rasmussen, F., Merck, C.C., Nielsen, P. ve Frey, H.H. (1993). Active transport of benzylpenicillin across the blood-milk barrier. *Pharmacology & Toxicology*, **73**(1), 14-19.

Schinkel, A.H., Smit, J.J.M., van Tellingen, M., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., Van Deemter, L. ve ark. (1994). Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, **77**(4), 491-502.

Schinkel, A.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A. ve Borst, P. (1995). Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *The Journal of Clinical Investigation*, **96**(4), 1698-1705.

Schinkel, A.H., Wagenaar, E., Mol, C.A. ve van Deemter, L. (1996). P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *The Journal of Clinical Investigation*, **97**(11), 2517-2524.

Schinkel, A.H. ve Jonker, J.W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64**, 138-153.

Schrickx, J.A. ve Fink-Gremmels, J. (2008). Implications of ABC transporters on the disposition of typical veterinary medicinal products. *European Journal of Pharmacology*, **585**(2-3), 510-519.

Schröder, C., Matthies, A., Engst, W., Blaut, M. ve Braune, A. (2013). Identification and expression of genes involved in the conversion of daidzein and

genistein by the equol-forming bacterium Slackia isoflavoniconvertens. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**(11), 3494-3502.

Schuetz, E.G., Umbenhauer, D.R., Yasuda K., Brimer C., Nguyen, L., Relling M.V. ve ark. (2000). Altered expression of hepatic cytochromes P450 in mice deficient in one or more mdr1 genes, *Molecular Pharmacology*, **57**, 188–197.

Scott, I., Pomroy, W.E., Kenyon, P.R., Smith, G., Adlington, B. ve Moss, A. (2013). Lack of efficacy of monepantel against Teladorsagia circumcincta and Trichostrongylus colubriformis. *Veterinary Parasitology*, **198**(1-2), 166-171.

Setchell, K.D., Brown, N.M., Desai, P., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B.E., Brashear, W. T. ve ark. (2001). Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *The Journal of Nutrition*, **131**(4), 1362S-1375S.

Setchell, K.D., Brown, N.M. ve Lydeking-Olsen, E. (2002). The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *The Journal of Nutrition*, **132**(12), 3577-3584.

Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M. ve Barnes, S. (1997). Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *The Journal of Nutrition*, **127**(7), 1260-1268.

Sharom, F.J., Yu, X., Lu, P., Liu, R., Chu, J. W., Szabó, K. ve ark. (1999). Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter (MDR1) with high affinity peptide chemosensitizers in isolated membranes, reconstituted systems, and intact cells. *Biochemical Pharmacology*, **58**(4), 571-586.

Shirasaka, Y., Onishi, Y., Sakurai, A., Nakagawa, H., Ishikawa, T. ve Yamashita, S. (2006). Evaluation of human P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) ATPase activity assay method by comparing with in vitro transport measurements: Michaelis–Menten kinetic analysis to estimate the affinity of P-glycoprotein to drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **29**(12), 2465-2471.

Short, C.R., Flory, W., Hsieh, L.C. ve Barker, S.A. (1988). The oxidative metabolism of fenbendazole: a comparative study. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **11**(1), 50-55.

Shukla, S., Ohnuma, S. ve Ambudkar, S. (2011). Improving cancer chemotherapy with modulators of ABC drug transporters. *Current Drug Targets*, **12**(5), 621-630.

Smit, J.W., Schinkel, A.H., Weert, B. ve Meijer, D.K. (1998). Hepatobiliary and intestinal clearance of amphiphilic cationic drugs in mice in which both mdr1a and mdr1b genes have been disrupted. *British Journal of Pharmacology*, **124**(2), 416-424.

Song, T., Barua, K., Buseman, G. ve Murphy, P.A. (1998). Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **68**(6), 1474S-1479S.

Souhaili-El Amri, H., Mothe, O., Totis, M., Masson, C., Batt, A., Delatour, P. ve ark. (1988). Albendazole sulfonation by rat liver cytochrome P-450c. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **246**(2), 758-764.

Sparreboom, A., Van Asperen, J., Mayer, U., Schinkel, A.H., Smit, J.W., Meijer, D.K. ve ark. (1997). Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**(5), 2031-2035.

Spencer, J. P., Chowrimootoo, G., Choudhury, R., Debnam, E.S., Srai, S.K. ve Rice-Evans, C. (1999). The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Letters*, **458**(2), 224-230.

Spencer, J.P., Abd El Mohsen, M.M. ve Rice-Evans, C. (2004). Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **423**(1), 148-161.

Squadrito, F., Marini, H., Bitto, A., Altavilla, D., Polito, F., Adamo, E.B. ve ark. (2013). Genistein in the metabolic syndrome: results of a randomized clinical trial. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **98**(8), 3366-3374.

Stavrovskaya, A.A. ve Stromskaya, T.P. (2008). Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Moscow)*, **73**(5), 592-604.

Stieger, B., O'Neill, B. ve Meier, P. J. (1992). ATP-dependent bile-salt transport in canalicular rat liver plasma-membrane vesicles. *Biochemical Journal*, **284**(1), 67-74.

Stieger, B., Fattinger, K., Madon, J., Kullak-Ublick, G.A. ve Meier, P.J. (2000). Drug-and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology*, **118**(2), 422-430.

Strom, S.S., Yamamura, Y., Duphorne, C.M., Spitz, M.R., Babaian, R.J., Pillow, P.C. ve ark. (1999). Phytoestrogen intake and prostate cancer: A case-control study using a new database. *Nutrition and Cancer*, **33**(1), 20-25.

Stuchlikova, L., Jirasko, R., Vokral, I., Lamka, J., Spulak, M., Holcapek, M. ve ark. (2013). Investigation of the metabolism of monepantel in ovine hepatocytes by UHPLC/MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **405**(5), 1705-1712.

Stuchlikova, L., Jirasko, R., Vokral, I., Valat, M., Lamka, J., Szotakova, B. ve ark. (2014). Metabolic pathways of anthelmintic drug monepantel in sheep and in its parasite (Haemonchus contortus). *Drug Testing and Analysis*, **6**(10), 1055-1062.

Sugawara, I., Kataoka, I., Morishita, Y., Hamada, H., Tsuruo, T., Itoyama, S. ve ark. (1988). Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16. *Cancer Research*, **48**(7), 1926-1929.

Sugiyama, Y., Kusuhara, H. ve Suzuki, H. (1999). Kinetic and biochemical analysis of carrier-mediated efflux of drugs through the blood–brain and blood–cerebrospinal fluid barriers: importance in the drug delivery to the brain. *Journal of Controlled Release*, **62**(1-2), 179-186.

Szakacs, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C. ve Gottesman, M.M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, **5**(3), 219-234.

Szakacs, G., Váradi, A., Özvegy-Laczka, C. ve Sarkadi, B. (2008). The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME–Tox). Drug Discovery Today, **13**(9-10), 379-393.

Takahata, T., Ookawa, K., Suto, K., Tanaka, M., Yano, H., Nakashima, O. ve ark. (2008). Chemosensitivity determinants of irinotecan hydrochloride in hepatocellular carcinoma cell lines. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **102**(4), 399-407.

Tamaki, H., Satoh, H., Hori, S., Ohtani, H. ve Sawada, Y. (2010). Inhibitory effects of herbal extracts on breast cancer resistance protein (BCRP) and structure-inhibitory potency relationship of isoflavonoids. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **25**(2), 170-179.

Tang, S.C, Lagas, J.S., Lankheet, N.A., Poller, B., Hillebrand, M.J., Rosing, H., ve ark. (2012). Brain accumulation of sunitinib is restricted by P-glycoprotein

(ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) and can be enhanced by oral elacridar and sunitinib coadministration. *International Journal of Cancer*, **130**(1), 223-33.

Tang, S.C., de Vries, N., Sparidans, R.W., Wagenaar, E., Beijnen, J.H. ve Schinkel, A.H. (2013). Impact of P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) gene dosage on plasma pharmacokinetics and brain accumulation of dasatinib, sorafenib, and sunitinib. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **346**(3), 486-494.

Terao, J., Yamaguchi, S., Shirai, M., Miyoshi, M., Moon, J.H., Oshima, S. ve ark. (2001). Protection by quercetin and quercetin 3-O-β-D-glucuronide of peroxynitrite-induced antioxidant consumption in human plasma low-density lipoprotein. *Free Radical Research*, **35**(6), 925-931.

Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I. ve ark. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **84**(21), 7735-7738.

Tolleson, W.H., Doerge, D.R., Churchwell, M.I., Marques, M.M. ve Roberts, D.W. (2002). Metabolism of biochanin A and formononetin by human liver microsomes in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**(17), 4783-4790.

Tribolo, S., Lodi, F., Connor, C., Suri, S., Wilson, V.G., Taylor, M.A. ve ark. (2008). Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*, **197**(1), 50-56.

Tukey, R.H. ve Strassburg, C.P. (2000). Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **40**(1), 581-616.

USDA (2008). U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. *USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods*. Release 2.0. Nutrient Data Laboratory; https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/80400525/Data/isoflav/Isoflav_R2.pdf

Uchida, Y., Ohtsuki, S., Katsukura, Y., Ikeda, C., Suzuki, T., Kamiie, J. ve ark. (2011). Quantitative targeted absolute proteomics of human blood–brain barrier transporters and receptors. *Journal of Neurochemistry*, **117**(2), 333-345.

Urpi-Sarda, M., Morand, C., Besson, C., Kraft, G., Viala, D., Scalbert, A. ve ark. 2008. Tissue distribution of isoflavones in ewes after consumption of red clover silage. *Archives of Biochemistry and Biophysics,* **476**, 205–210.

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 in Pharmacological Sciences*, **27**(1), 10-16.

van Zanden, J.J., Wortelboer, H.M., Bijlsma, S., Punt, A., Usta, M., van Bladeren, P.J. ve ark. (2005). Quantitative structure activity relationship studies on the flavonoid mediated inhibition of multidrug resistance proteins 1 and 2. *Biochemical Pharmacology*, **69**(4), 699-708.

Virkel, G., Lifschitz, A., Sallovitz, J., Pis, A. ve Lanusse, C. (2004). Comparative hepatic and extrahepatic enantioselective sulfoxidation of albendazole and fenbendazole in sheep and cattle. *Drug Metabolism and Disposition*, **32**(5), 536-544.

Virkel, G., Lifschitz, A., Sallovitz, J., Pis, A. ve Lanusse, C. (2006). Assessment of the main metabolism pathways for the flukicidal compound triclabendazole in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **29**(3), 213-223.

Virkel, G., Ballent, M., Lanusse, C. ve Lifschitz, A. (2018). Role of ABC transporters in veterinary medicine: Pharmaco-toxicological implications. *Current Medicinal Chemistry*, **26**(7), 1251-1269.

Vlaming, M.L., Lagas, J.S. ve Schinkel, A.H. (2009a). Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **61**(1), 14-25.

Vlaming, M.L., Pala, Z., van Esch, A., Wagenaar, E., de Waart, D.R., van de Wetering, K. ve ark. (2009b). Functionally overlapping roles of Abcg2 (Bcrp1) and Abcc2 (Mrp2) in the elimination of methotrexate and its main toxic metabolite 7-hydroxymethotrexate in vivo. *Clinical Cancer Research*, **15**(9), 3084-3093.

Vokral, I., Jirasko, R., Jedlickova, V., Bartikova, H., Skalova, L., Lamka, J. ve Szotakova, B. (2012). The inability of tapeworm Hymenolepis diminuta and fluke Dicrocoelium dendriticum to metabolize praziquantel. *Veterinary Parasitology*, **185**(2-4), 168-174.

Vokral, I., Jedlickova, V., Jirasko, R., Stuchlikova, L., Bartikova, H., Skalova, L. ve ark. (2013). The metabolic fate of ivermectin in host (Ovis aries) and parasite (Haemonchus contortus). *Parasitology*, **140**(3), 361.

Walle, T., Otake, Y., Brubaker, J.A., Walle, U.K. ve Halushka, P.V. (2001). Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **51**(2), 143-146.

Walle, T., Browning, A.M., Steed, L.L., Reed, S.G. ve Walle, U.K. (2005). Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *The Journal of Nutrition*, **135**(1), 48-52.

Wang, J., Eltoum, I.E. ve Lamartiniere, C.A. (2004). Genistein alters growth factor signaling in transgenic prostate model (TRAMP). *Molecular and Cellular Endocrinology*, **219**(1-2), 171-180.

Wang, X. ve Morris, M.E. (2007). Effects of the flavonoid chrysin on nitrofurantoin pharmacokinetics in rats: potential involvement of ABCG2. *Drug Metabolism and Disposition*, **35**(2), 268-274.

Wang, X. ve Morris, M.E. (2008). Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonoid 7, 8-benzoflavone in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**(10), 4546-4556.

Wang, S.W., Chen, Y., Joseph, T. ve Hu, M. (2008). Variable isoflavone content of red clover products affects intestinal disposition of biochanin A, formononetin, genistein, and daidzein. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **14**, 287–297.

Wassermann, L., Halwachs, S., Baumann, D., Schaefer, I., Seibel, P. ve Honscha, W. (2013a). Assessment of ABCG2-mediated transport of xenobiotics across the blood–milk barrier of dairy animals using a new MDCKII in vitro model. *Archives of Toxicology*, **87**(9), 1671-1682.

Wassermann, L., Halwachs, S., Lindner, S., Honscha, K.U. ve Honscha, W. (2013b). Determination of functional ABCG2 activity and assessment of drug–ABCG2 interactions in dairy animals using a novel MDCKII in vitro model. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **102**(2), 772-784.

Watanabe, S., Uesugi, S. ve Kikuchi, Y. (2002). Isoflavones for prevention of cancer, cardiovascular diseases, gynecological problems and possible immune potentiation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **56**(6), 302-312.

Wegner, C.C., Zhou, X., Ding, Z.M., Kuo, M.T. ve Carson, D.D. (1997). Tyrosine kinase inhibition decreases Muc-1 expression in mouse epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, **170**(2), 200-208.

Woodward, O.M., Köttgen, A., Coresh, J., Boerwinkle, E., Guggino, W.B. ve Köttgen, M. (2009). Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(25), 10338-10342.

Wu, A.H., Yu, M.C., Tseng, C.C. ve Pike, M.C. (2008a). Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk. *British Journal of Cancer*, **98**(1), 9-14.

Wu, H.J., Luo, J., Wu, N., Matand, K., Zhang, L.J., Han, X.F. ve ark. (2008b). Cloning, sequence and functional analysis of goat ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2). *Molecular Biotechnology*, 39(1), 21-27.

Xia, C.Q., Yang, J.J. ve Gan, L.S. (2005). Breast cancer resistance protein in pharmacokinetics and drug–drug interactions. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **1**(4), 595-611.

Xia, C.Q., Milton, M.N. ve Gan, L.S. (2007). Evaluation of drug-transporter interactions using in vitro and in vivo models. *Current Drug Metabolism*, **8**(4), 341-363.

Yan, L. ve Spitznagel, E. L. (2009). Soy consumption and prostate cancer risk in men: a revisit of a meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(4), 1155-1163

Yan, G.R., Xiao, C.L., He, G.W., Yin, X.F., Chen, N.P., Cao, Y. ve ark. (2010). Global phosphoproteomic effects of natural tyrosine kinase inhibitor, genistein, on signaling pathways. *Proteomics*, **10**(5), 976-986.

Yang, J.H., Hsia, T.C., Kuo, H.M., Chao, P.D.L., Chou, C.C., Wei, Y.H. ve ark. (2006). Inhibition of lung cancer cell growth by quercetin glucuronides via G2/M arrest and induction of apoptosis. *Drug Metabolism and Disposition*, **34**(2), 296-304.

Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R. ve ark. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, **59**(3), 113-122.

Zaher, H., Khan, A.A., Palandra, J., Brayman, T.G., Yu, L. ve Ware, J.A. (2006). Breast cancer resistance protein (Bcrp/abcg2) is a major determinant of

sulfasalazine absorption and elimination in the mouse. *Molecular Pharmaceutics*, **3**(1), 55-61.

Zeng, H., Liu, G., Rea, P.A. ve Kruh, G.D. (2000). Transport of amphipathic anions by human multidrug resistance protein 3. *Cancer Research*, **60**(17), 4779-4784.

Zhang, S. ve Morris, M. E. (2003). Effects of the flavonoids biochanin A, morin, phloretin, and silymarin on P-glycoprotein-mediated transport. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **304**(3), 1258-1267.

Zhang, S., Yang, X. ve Morris, M. E. (2004a). Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Molecular Pharmacology*, **65**(5), 1208-1216.

Zhang, S., Yang, X. ve Morris, M. E. (2004b). Combined effects of multiple flavonoids on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Pharmaceutical Research*, **21**(7), 1263-1273.

Zhang, S., Wang, X., Sagawa, K. ve Morris, M. E. (2005). Flavonoids chrysin and benzoflavone, potent breast cancer resistance protein inhibitors, have no significant effect on topotecan pharmacokinetics in rats or mdr1a/1b $^{(-/-)}$ mice. *Drug Metabolism and Disposition*, **33**(3), 341-348.

Zhang, L., Lin, G., Kovács, B., Jani, M., Krajcsi, P. ve Zuo, Z. (2007a). Mechanistic study on the intestinal absorption and disposition of baicalein. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **31**(3-4), 221-231.

Zhang, L., Zuo, Z. ve Lin, G. (2007b). Intestinal and hepatic glucuronidation of flavonoids. *Molecular Pharmaceutics*, **4**(6), 833-845.

Zhao, X. ve Lacasse, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *Journal of Animal Science*, **86**, 57-65.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI


KOYUNLARDA MONEPANTELİN SÜTLE ATILIMINDA BCRP (ABCG2)'NİN ROLÜ VE BAZI İZOFLAVONOİD BİLEŞİKLERİYLE OLASI ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%5	%4	%1	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

1- Güneş Y., Bakırel T., Üstüner Aydal O. "Adverse Effects of Conventional Drug-Medicinal Plant Interactions in Veterinary Medicine". The Fifth International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, Nevşehir, Türkiye, 24 - 26 April 2019, ss.105.

2- Güneş Y., Sarı A. B. "A New Class of Anthelmintic Drugs in Farm Animals: Aminoacetonitrile Derivatives". 5th International Vet-Istanbul Group Congress & 8th International Scientific Meeting Days of Veterinary Medicine - 2018, Ohrid, Makedonya, 23 - 27 September 2018, ss.168.

3- Güzelaydın K., Güneş Y. . "Drug Usage in Freshwater Aquarium Fish". 20. Uluslararası Veteriner Hekimliği Öğrencileri Bilimsel Araştırma Kongresi, İSTANBUL, TÜRKİYE, İstanbul, Türkiye, 3 - 05 Mayıs 2018, ss.288-289.

4- Güneş Y. , Üstüner Aydal O. , Bakırel T. , Üstün Alkan F. , Anlaş F. C. , Yalçın E. "P-glycoprotein and its role in herb-drug interactions". 19. Uluslarası Veteriner Hekimliği Öğrencileri Bilimsel Araştırma Kongresi, İSTANBUL, TÜRKİYE, İstanbul, Türkiye, 2 - 04 Mayıs 2017, ss.53-54.

5- Theoretical Background and Experimental Process Training about ABC Transporters, Transepithelial Transport Assays, Basic Cell Culture Training and Use of HPLC Systems, Deparment of Biomedical Sciences and Institute of Animal Health (INDEGSAL), University of Leon, Spain, 03.09. – 02.01.2019.

6- The Training Included the Theoretical Background and Experimental Process of the ATPase and Vesicular Transport Assays, Solvo Biotechnology Laboratory-Szeged, Hungary, 14 – 25.01.2019.

7- Agilent 1260 Infinity LC Hardware ve Chemstation Software, Sem Laboratuvar Cihazları, 21.05.2018.

8- Basic Sciences, Animal Production and Animal Welfare, Animal Health and Internal Medicine, Clinical Sciences, Food Safety and Veterinary Public Health, 5th International Vet - Istanbul Group Congress & 8th International Scientific Meeting Days of Veterinary Medicine, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, 23 – 27.01.2018.

9- Basic Course of Dentistry - Periodontal Disease and Dental Prophylaxis, Neurologic Examination- Lets Localise the Problem, 5th International Vet - Istanbul Group Congress & 8th International Scientific Meeting Days of Veterinary Medicine, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, 23– 27.01.2018.

10- VI. Moleküler Tıpta Kullanılan Teknikler Kursu Modül 4 Eğitimi (Teorik: Western Blot Teknikleri ve Kullanım Alanları, Pratik: Western Blot Analizi) İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, 05 – 06.04.2018.

11- Klinik Araştırmalar Etik Kurulları ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulları Çalıştayı Katılım Belgesi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 11.12.2017.

12- Bilimsel Proje Hazırlama Çalıştayı Katılım Belgesi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 30.11.2017.

13- Tinçel Kültür Vakfı Yurtdışı Araştırma Bursu (3 ay süreli), 2019