



Biológia Szekció

37. OTDK Biológia Szekció

Antiparazita pentamidin analógok transzporter kölsönhatásainak jellemzése

Készítette:

Fülöp Sára, Biotechnológia MSc, II. évf. (2023)

Küldő intézmény:

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar

Kutatómunka elvégzésének helye:

HUN-REN, Természettudományi Kutatóközpont, Molekuláris Élettudományi Intézet

Témavezető:

Dr. Laczka Csilla, PhD, DSc, tudományos tanácsadó

HUN-REN, Természettudományi Kutatóközpont, Molekuláris Élettudományi Intézet

Konzulens:

Dr. Bakos Éva, PhD, tudományos főmunkatárs

HUN-REN, Természettudományi Kutatóközpont, Molekuláris Élettudományi Intézet

Tartalomjegyzék

1.	Irodalmi bevezető	5
1.1.	A pentamidin, mint antiparazita gyógyszer	5
1.1.1.	Alkalmazási területek, limitációk	5
1.1.2.	Farmakokinetika	6
1.1.3.	Hatásmechanizmus	6
1.2.	Az OATP fehérjecsald	8
1.2.1.	Az OATP fehérjecsald általános jellemzői	8
1.2.2.	Humán OATP-k jelentősége	8
1.2.3.	Az OATP1A2 és OATP2B1 fehérjék	9
1.3.	A pentamidin transzportja a vér-agy gát sejtjeibe	11
1.4.	Pentamidin analógok	11
1.4.1.	Toxicitás	13
1.4.2.	Anti- <i>Pneumocystis</i> hatás	13
1.4.3.	Más gombák és baktériumok elleni hatékonyság	14
1.4.4.	Egyéb vizsgált hatások	14
2.	Célkitűzés	15
3.	Anyagok és módszerek	16
3.1.	Munkám során használt vegyületek	16
3.2.	Munkám során használt sejtvonalak	16
3.3.	Transzport gátlás vizsgálatok fluoreszcens módszerrel	16
3.4.	Citotoxicitás vizsgálatok fluoreszcens módszerrel	18
3.5.	Sejthalál mechanizmus vizsgálata áramlási citometriával	19
4.	Eredmények és értékelésük	20
4.1.	Transzport gátlás vizsgálatok fluoreszcens módszerrel	20
4.1.1.	Pentamidin analógok hatása az OATP2B1 transzport aktivitására	20
4.1.2.	Pentamidin analógok hatása az OATP1A2 transzport aktivitására	22
4.2.	Citotoxicitás vizsgálatok OATP fehérjéket termelő sejteken	23
4.2.1.	Pentamidin analógok citotoxicitásának vizsgálata A431-OATP2B1 és A431-kontroll sejteken	24

4.2.2.	Pentamidin analógok citotoxicitásának vizsgálata A431-OATP1A2 és A431-kontroll sejteken	25
4.2.3.	Pentamidin analógok citotoxicitásának vizsgálata HEK-293-OATP1A2 és HEK-293-kontroll sejteken	27
4.3.	Sejthalál mechanizmus vizsgálata áramlási citometriával	28
4.4.	Eredmények összegzése, következtetések	30
5.	Összefoglalás	33
6.	Köszönetnyilvánítás	34
7.	Irodalomjegyzék	35

Rövidítésjegyzék

ABC: ATP Binding Cassette, jellegzetes ATP-kötő kazettát tartalmazó fehérjecsalád neve

BBB: blood-brain barrier, vér-agy gát

BSP: bromoszulfoftalein

CYP: citokróm P450

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium, sejttenyésztő médium

EMA: European Medicines Agency, Európai Gyógyszerügynökség

FBS: fetal bovine serum, magzati marha szérum

FDA: US Food and Drug Administration, USA Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala

FITC: fluoreszcein-izotiocianát

HAPT1: nagy affinitású pentamidin transzporter 1

HAT: humán afrikai trypanosomiasis (afrikai álomkór)

IC₅₀: half-maximal inhibitory concentration, félmaximális gátlási koncentráció

ITC: International Transporter Consortium, Nemzetközi Transzporter Konzorcium

LAPT: kis affinitású pentamidin transzporter 1

MRP: multidrog rezisztencia asszociált protein

MRSA: meticillin rezisztens *Staphylococcus aureus*

NPP: new permeability pathway, új permeabilitási útvonal

OATP: organikus anion transzporter polipeptid

OCT1: organikus kation transzporter 1

PBS: phosphate buffered saline, foszfát puffer

P-gp: P-glikoprotein

PI: propídium-jodid

SLCO: solute carrier for OATPs, OATP-ket kódoló gén neve

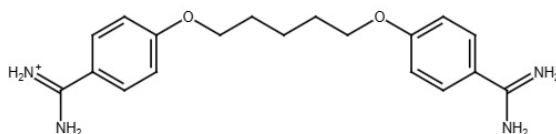
SR101: szulforodamin 101

1. Irodalmi bevezető

1.1. A pentamidin, mint antiparazita gyógyszer

1.1.1. Alkalmazási területek, limitációk

A pentamidin (1. ábra) egy szintetikus aromás diamidin, melynek antiparazita hatása több, mint 80 éve ismert (Yorke, 1940). Szerepel a WHO alapvető gyógyszerek listáján első fázisú *Trypanosoma brucei gambiense* okozta álmokor (humán afrikai trypanosomiasis, HAT), valamint kiegészítő terápiaként az immunhiányos személyeknél súlyos tüneteket okozó *Pneumocystis jirovecii* (korábban *Pneumocystis carinii*) és *Toxoplasma gondii* fertőzések kezelésére (WHO Expert Committee, 2023). Emellett a pentamidint alkalmazzák leishmaniasis másodvonalbeli kezelésére (Kip et al., 2018), hatékony *Plasmodium falciparum*, a malária kórokozója ellen is (Bell et al., 1990; Stead et al., 2001), továbbá antibakteriális és antineoplasztikus hatása is régóta ismert (Schoenbach & Greenspan, 1948). Korábban pentamidin-dimezilát és -izetionát, ma már csak -izetionát vízben oldódó bázikus só formájában forgalmazzák. Az FDA (US Food and Drug Administration) 1984-ben hagyta jóvá a pentamidint a HAT kezelésére.



1. ábra: A pentamidin szerkezete

A pentamidin felhasználhatóságát számos tényező limitálja. Egyik ilyen ok, hogy nem képes átjutni a vér-agy gáton (blood-brain barrier, BBB), így az álmokor kezelésére csak a betegség korai fázisában alkalmas, amikor a kórokozó még nem jutott be a központi idegrendszerbe. A másik tényező, ami korlátozza alkalmazását, hogy két, erősen bázikus amidin csoportja következtében szájon át alkalmazva nem szívódik fel megfelelő mértékben, ezért intramuszkuláris és intravénás úton adják a betegeknek, mely a pentamidinnel kezelt betegségekben leginkább érintett, fejletlen egészségügyi rendszerrel rendelkező országokban szintén nehézséget okoz (Kotthaus et al., 2011). Végezetül, a pentamidinnek számos súlyos mellékhatása ismert, mint a diabetes mellitus, súlyos hipoglikémia, sokk, szívizomgyulladás és vesekárosodás (WHO Expert Committee, 2010).

1.1.2. Farmakokinetika

A rendelkezésre álló adatok alapján a pentamidinnel kezelt betegek vérplazmájában a pentamidin maximális koncentrációja 209-825 ng/ml (0,6-2,4 μ M) közötti érték (Kip et al., 2018). A plazmakoncentráció a vizsgált esetek többségében a beadástól számított 1 órán belül eléri maximális értékét (Conte et al., 1986; Bronner et al., 1991), ezután néhány perc alatt jelentősen csökken a szövetekbe történő felvételnek köszönhetően, majd lassabban, 11-12 napos felezési idővel csökken tovább (Conte, 1991; Bronner et al., 1995).

A pentamidin legnagyobb mértékben a vesében, májban, lépben és a mellékvesékben, kisebb mértékben a tüdőben halmozódik fel, és bizonyos szövetekben hónapokkal az adagolás után is kimutatható (Donnelly et al., 1988). Kis részben vizelettel távozik, nagyobb részben metabolizálódik (Conte et al., 1986; Conte, 1991; Bronner et al., 1995). A CYP (citokróm P450) enzimek, elsősorban a CYP1A1, kisebb mértékben a CYP3A5 és a CYP4A11 enzimek metabolizálják (X. Q. Li et al., 2003).

1.1.3. Hatásmechanizmus

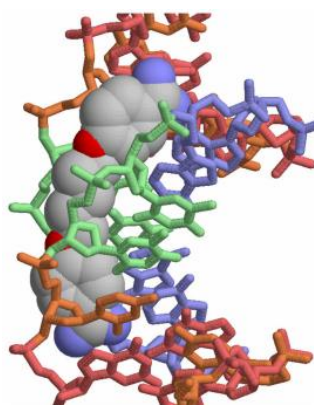
A pentamidin parazitasejtekbe való felvételét az adott kórokozóra specifikus mechanizmusok irányítják, melyekről egyes kórokozó nemzetségek esetén több, más nemzetségek esetén kevesebb irodalmi adat áll rendelkezésre.

Trypanosoma brucei brucei (állatokat fertőző *T. brucei* alfaj) esetén három transzportert azonosítottak, melyek részt vesznek a pentamidin parazita sejtekbe való felvételében. A P2 nukleozid transzporter (Carter et al., 1995; De Koning & Jarvis, 1999) 50-70 %-ban felelős a pentamidin felvételéért. Ezen kívül a LAPT1 (kis affinitású (nagy kapacitású) pentamidin transzporter 1) (De Koning & Jarvis, 2001) és a HAPT1 (nagy affinitású (kis kapacitású) pentamidin transzporter 1) (De Koning, 2001) segíti a pentamidin felvételét a *T. brucei* sejtekbe.

A *Leishmania* nemzetség több tagjában, például *L. donovani*, *L. amazonensis* (Basselin et al., 1996) és *L. mexicana* (Basselin et al., 2002), szintén bizonyították, hogy a pentamidin felvétele nagy affinitású, telíthető transzporter közvetítésével történik. *L. donovani*-ban azt is megállapították, hogy feltehetően létezik egy másodlagos, kis affinitású, nem telíthető felvételi mechanizmus is (Mukherjee et al., 2006).

Plasmodium falciparum fertőzött vörösvérsejtekbe a pentamidin a kórokozó által a gazdasejt felszínén aktivált NPP (új permeabilitási útvonal) (Ginsburg et al., 1983) pórusain keresztül jut be (Stead et al., 2001).

A pentamidin hatásmechanizmusa nem teljesen tisztázott, és különböző parazitákban eltérő lehet. Egyik igazolt mechanizmus, hogy a pentamidin képes a DNS tartalmú organellekbe (sejtmag, kinetoplaszt) bejutni és ott a célsejt DNS-ének kis árkába kötődni, így hátráltatva a parazita transzkripcióját és replikációját. A molekula hajlott, viszonylag flexibilis alakjának köszönhetően illeszkedik a kis-árokba (Wilson et al., 2008), ahol preferáltan AT-gazdag régiókhoz, legalább 4 egymást követő AT bázispárhoz kötődik. A kölcsönhatás két hidrogénhíddal valósul meg, melyekben a pentamidin -NH csoportjai donorként, a kis árok belső részén található adenin N3 atomja és timin O2 atomja pedig akzeptorként vesznek részt (Fox et al., 1990). A kölcsönhatást erősíti az aromás gyűrűk π - π kölcsönhatása a kis árok falával, és a molekula pozitív töltése, mely ellensúlyozza a DNS foszfát-csoportjainak negatív töltését. GC bázispárok esetén hasonlóan erős kölcsönhatás nem tud megvalósulni a harmadik, szterikusan kedvezőtlen hidrogénkötés és a kis-árok nagyobb szélessége miatt (Wilson et al., 2008). A 2. ábrán látható a DNS kis árkába kötődő pentamidin kristályszerkezete.



2. ábra: A DNS kis árkának AATT szekvenciájához kötődő pentamidin kristályszerkezete (Wilson et al., 2008)

A pentamidinnel történő kezelés két fontos célpontja, a *Trypanosoma* és *Leishmania* nemzetségek a Kinetoplastida osztályba tartoznak, melynek tagjai mitokondriális DNS-üket a kinetoplaszt nevű organellem tartalmazzák. A kinetoplaszt a Kinetoplastida osztályra jellemző, a mitokondriumon belül található, több ezer kópiát tartalmazó cirkuláris DNS hálózat (Cavalcanti & De Souza, 2018), mely a pentamidin és rokon vegyületeinek kiemelt támadáspontja ezen parazitákban (Wilson et al., 2008). Ez biztosítja a pentamidin (részleges) szelektivitását.

1.2. Az OATP fehérjecsalád

1.2.1. Az OATP fehérjecsalád általános jellemzői

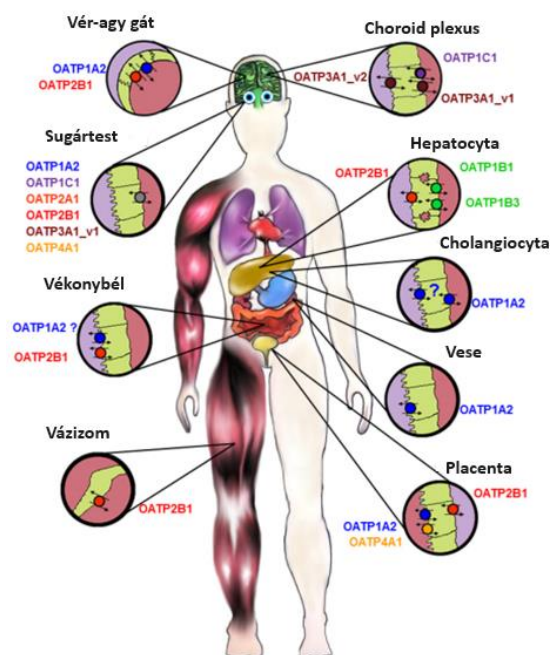
Az OATP (organikus anion transzporter polipeptid) család tagjai az SLCO (solute carrier, korábban SLC21) szupercsaládba tartozó (Hagenbuch & Meier, 2004), 12 transzmembrán doménnal és intracelluláris C- és N-terminálissal rendelkező membrántranszporter molekulák (Wang et al., 2008; Obaidat et al., 2012). Szubsztrátjaik közé tartozik számos endogén anyag (pl. bilirubin, epesavak, eikozanoidok, prosztaglandinok, hormonok, valamint szulfát- és glukuronid konjugátumaik) és xenobiotikum (pl. sztatinok, antibiotikumok, antivirális szerek, szívglikozidok, immunszuppresszánsok, antidiabetikumok, rákellenes gyógyszerek), melyek főként 300 Da-nál nagyobb molekulatömegű szerves anionok, de semleges és pozitív töltésű molekula is megtalálható köztük (Kovacsics et al., 2016) .

Különböző fajok genomjának szekvenálása alapján eddig több, mint 300 OATP-t azonosítottak (Hagenbuch & Stieger, 2013). A legalább 40 %-ban azonos szekvenciával rendelkező OATP-ket egy családba, a legalább 60 %-ban azonos szekvenciával rendelkező OATP-ket egy alcsaládba soroljuk. Az ismert OATP-k 6 családot (OATP1-OATP6) és 13 alcsaládot (pl. OATP2A) alkotnak. Az alcsaládokon belül az OATP-k számozása (pl. OATP2A1) felfedezésük sorrendjében történt (Hagenbuch & Meier, 2004).

Az OATP-k nátrium- és ATP-független módon működő transzporterek (Kovacsics et al., 2016). Transzport mechanizmusuk nem teljesen tisztázott, de általánosan elfogadott, hogy szerves ioncserélőként (exchanger) működnek, vagyis valamilyen elleniont, pl. bikarbonátot (Satlin et al., 1997; Leuthold et al., 2009) vagy redukált glutationt (L. Li et al., 1998, 2000) juttatnak ki a sejtől szubsztrátjuk beáramlásával egyidőben. Az OATP-mediált transzportot számos tényező befolyásolhatja, mint pl. az extracelluláris pH (Kobayashi et al., 2003; Leuthold et al., 2009), más szubsztrát vagy inhibitor jelenléte, valamint az OATP expresszió szabályozása transzkripció vagy poszt-transzlációs szinten (Hagenbuch & Stieger, 2013).

1.2.2. Humán OATP-k jelentősége

11 humán OATP-t ismerünk (OATP1A2, 1B1, 1B3, 1C1, 2A1, 2B1, 3A1, 4A1, 4C1, 5A1, 6A1), melyek epithel és endothel sejtek sejtmembránjaiban expresszálódnak. Néhány OATP szervspecifikus (pl. OATP1B1 és OATP1B3 a májra jellemző), míg mások többféle szövetben is expresszálódnak (pl. OATP2A1, OATP3A1 és OATP4A1) (Obaidat et al., 2012). A 3. ábra a humán OATP-k legfontosabb előfordulási helyeit szemlélteti.



3. ábra: Humán OATP-k előfordulása a szervezetben, az azonos alcsaládba tartozó OATP-eket azonos szín jelöli (Hagenbuch & Stieger, 2013)

A 11 humán OATP közül az OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 és OATP2B1 igazoltan szerepet játszik a gyógyszerek *in vivo* sorsának alakulásában. A májban expresszálandó OATP1B1 és OATP1B3 (Obaidat et al., 2012) működése kulcsfontosságú több gyógyszer, pl. sztatinek eliminációjában. Gyógyszerszubsztrátjaik egyidejű alkalmazása megváltozott farmakokinetikát és akár nem várt toxicitást eredményezhet (Kovacsics et al., 2016). Ezért az ITC (International Transporter Consortium), az FDA és az EMA (European Medicines Agency) egyaránt javasolják a gyógyszerfejlesztés során az új gyógyszer-jelölt molekulák OATP1B1 és OATP1B3 transzporterekkel való kölcsönhatásainak vizsgálatát (Zamek-Gliszczyński et al., 2018; FDA CDER, 2020; ICH Committee, 2022). Emellett az ITC az elsősorban a vékonybélben fontos OATP2B1 kölcsönhatásainak vizsgálatát is javasolja (Zamek-Gliszczyński et al., 2018, 2022). Az OATP1A2 szerepe elsősorban a vér-agy-gáton történő átjutásban lehet fontos, erre azonban nincs egyértelmű klinikai bizonyíték, ezért az ITC és az egyéb szabályozó hatóságok nem fogalmaznak meg javaslatot az OATP1A2 vizsgálatára gyógyszerfejlesztés során (Zamek-Gliszczyński et al., 2018).

1.2.3. Az OATP1A2 és OATP2B1 fehérjék

Kutatómunkám során az OATP1A2 és OATP2B1 transzporterekkel foglalkoztam, melyek fő előfordulási helyeit az emberi szervezetben és endogén szubsztrátjaikat az 1. táblázatban foglaltam össze.

	Expresszió helye a humán szervezetben	Endogén szubsztrátok
OATP1A2	• BBB • szem (retina) • bél • vese (disztális tubulus) • máj (cholangiocyták) • neuronok • vér-here gát • placenta	• epesók (taurokolát, kolát, urzodezoxikolát) • hormonok (tiroxin, dehidroepiandroszteron-szulfát, öszttron-3-szulfát) • neuropeptidek (substance P, vazoaktív intesztinális peptid) • proszttaglandin E2 • bilirubin • all transz-retinol
OATP2B1	• BBB • szem (retina) • bél • máj (hepatocyták) • vázizom • placenta	• taurokolát • hormonok (dehidroepiandroszteron-szulfát, öszttron-3-szulfát) • neuropeptidek (substance P, vazoaktív intesztinális peptid) • proszttaglandin E2 • leukotrién C4 • tromboxán B2

1. táblázat: A kutatómunkám során vizsgált OATP1A2 és OATP2B1 fehérjék expressziója az emberi szervezetben (mRNS és/vagy fehérje adatok alapján) és endogén szubsztrátjaik (Kovacsics et al., 2016)

- Máj

Az OATP1A2 megtalálható az epevezeték epithel sejtjeiben, a cholangiocytákban, így szerepet játszik az epesavak, a konjugátatlan bilirubin és a gyógyszerek reabszorpciójában. Az OATP2B1 expresszálódik a hepatocytákban, így szintén szerepe lehet a máj által történő méregtelenítésben, de hatását nehéz elkülöníteni a májsejtekre specifikus OATP1B1 és OATP1B3 hatásától átfedő szubsztrátspecifitásuk miatt (Hagenbuch & Stieger, 2013). Ráadásul, a májban az OATP2B1 és OATP1B3 expressziója töredéke az OATP1B1 fehérje expressziójának (Özvegy-Laczka et al., 2023).

- Vese

Az OATP1A2 megtalálható a nefronok disztális tubulusában, így szerepe lehet a gyógyszerek vesében történő reabszorpciójában is (Badagnani et al., 2006).

- Vékonybél

A vékonybélben számos OATP megtalálható, többek között az OATP1A2 is (Kovacsics et al., 2016). Azonban az enterocytákban az OATP2B1 mRNS-e mutatható ki legnagyobb mennyiségben (Meier et al., 2007), így feltételezhetően a gyógyszerek felszívódására és orális elérhetőségére az OATP2B1-nek van a legnagyobb befolyása (Kovacsics et al., 2016).

- Vér-agy gát és egyéb vér-szövet gátak

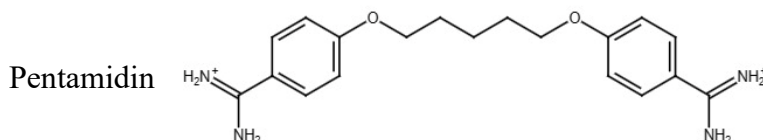
Az OATP1A2 és OATP2B1 megtalálható az agyi kapilláris endothel sejtek apikális oldalán, így befolyásuk lehet arra, hogy mely gyógyszerek juthatnak be a központi idegrendszerbe. E két transzporter szintén jelen van a retinában, és közreműködnek a retinába történő neurotranszmitter és neuroszteroid felvételben (Gao et al., 2015). Az OATP1A2 befolyásolja a gyógyszerek átjutását a vér-here, a vér-szem és a placentális gáton, míg az OATP2B1 a vér-szem és a placentális gáton való átjutásban szerepelhet (Kovacsics et al., 2016).

1.3. A pentamidin transzportja a vér-agy gát sejtjeibe

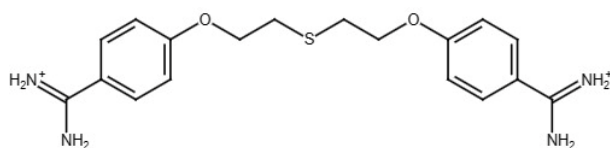
Eddig két olyan transzportert azonosítottak, amelyek a pentamidin humán sejtekbe történő felvételét segítik elő. A pentamidin szubsztrátja a humán OCT1 (organikus kation transzporter 1, gén név: SLC22A1) fehérjének (Ming et al., 2009), mely elsősorban a májban expresszálódik (Gorboulev et al., 1997), de megtalálható a BBB endothel sejtjeiben is és képes a pentamidint azokba bejuttatni (Sekhar et al., 2017). Kutatócsoportunk korábban felfedezte, hogy a BBB endothel sejtjeiben expresszálódó OATP1A2 is elősegíti a pentamidin felvételét (Ungvári et al., 2023). Bár a pentamidin felhalmozódik a vér-agy gát endothel sejtjeiben, az agyba nem jut be elegendően nagy mennyiségben, mert a P-gp (P-glikoprotein) és az MRP (multidrog rezisztencia asszociált protein) ABC (ATP-kötő kazetta) típusú efflux transzporterek visszajuttatják a vérbe (Sanderson et al., 2009).

1.4. Pentamidin analógok

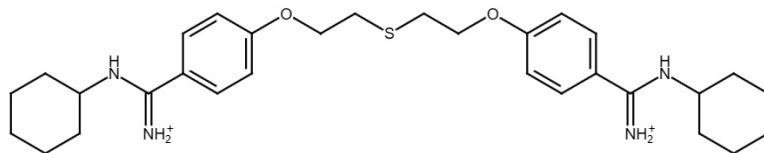
A munkám során hat pentamidin analógot (PK-168, PK-171, PK-174, PK-175, PK-176, PK-177) vizsgáltam (4. ábra), amelyek a linker régióban található O és S heteroatomok helyzetében és/vagy az NH⁺- csoportokon található szubsztituensekben térnek el egymástól és a pentamidintól.



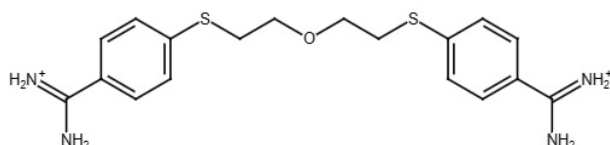
PK-168



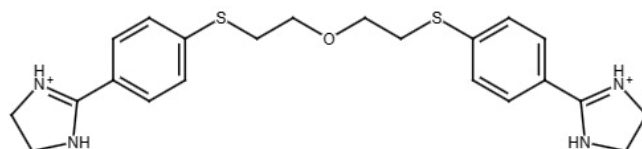
PK-171



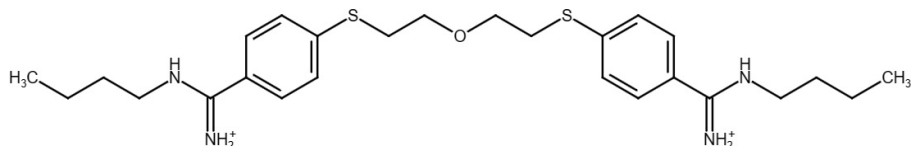
PK-174



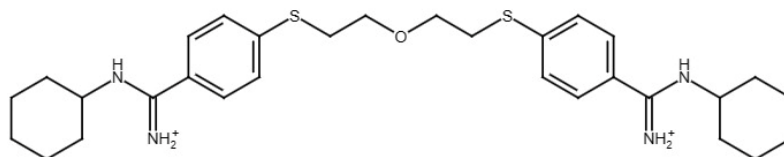
PK-175



PK-176



PK-177



4. ábra: Kutatómunkám során vizsgált pentamidin analógok szerkezeti képlete

A hat vegyületet nemzetközi kollaboráció keretében kaptuk. A kollaborációs partner ezek közül négy vegyület biológiai aktivitását jellemezte. Vizsgálták toxicitásukat humán és emlős sejtekben, anti-*Pneumocystis* hatásukat és más gombák és baktériumok elleni hatékonyságukat (Maciejewska et al., 2012, 2014, 2017; Żolek et al., 2019). Ezeket az eredményeket az 1.4.1-4. fejezetekben mutatom be.

1.4.1. Toxicitás

A vegyületek toxicitását A549 és HeLa humán sejtvonalakon és az L2 patkány sejtvonalon vizsgálták. A PK-168 az A549 és L2 sejtvonalakra a vizsgált koncentrációtartományban nem volt toxikus (Maciejewska et al., 2012). A PK-171 vegyületnek az A549 sejtvonalra enyhén toxikus hatása volt, míg a HeLa sejtvonalon nem tapasztaltak toxicitást a vizsgált koncentrációtartományban (Maciejewska et al., 2014). A PK-174 az A549, HeLa és L2 sejtvonalra is enyhén toxikus volt (Maciejewska et al., 2014, 2017). A PK-175 enyhén toxikus volt az A549 sejtvonalra, de a vizsgált koncentrációtartományban nem volt toxikus L2 sejtekre (Maciejewska et al., 2017). A rendelkezésre álló IC_{50} (félmaximális gátlási koncentráció) értékeket a 2. táblázatban foglaltam össze.

1.4.2. Anti-*Pneumocystis* hatás

Pneumocystis carinii (patkányokat fertőző *Pneumocystis* faj) elleni hatékonyság szempontjából három vegyületet teszteltek. A PK-168 esetén a pentamidinhez képest gyengébb (Maciejewska et al., 2012), a PK-174 esetén a pentamidinhez képest 2-szer erősebb, míg a PK-175 esetén a pentamidinhez képest mintegy 50-szer erősebb (Maciejewska et al., 2017) hatást tapasztaltak. A rendelkezésre álló IC_{50} értékeket a 2. táblázatban foglaltam össze.

Vegyület	Toxicitás humán és emlős sejtekre IC_{50} (μ M)	Anti- <i>Pneumocystis</i> hatás IC_{50} (μ M)
Pentamidin	A549: $23,5 \pm 4,3$ L2: $33,8 \pm 13,3$ (Maciejewska et al., 2017)	0,50 (Maciejewska et al., 2012)
PK-168	A549: > 232 L2: > 232 (Maciejewska et al., 2012)	1,18 (Maciejewska et al., 2012)
PK-171	A549: ≥ 84 HeLa: > 168 (Maciejewska et al., 2014)	Nem áll rendelkezésre irodalmi adat.
PK-174	A549: 22 HeLa: < 112 (Maciejewska et al., 2014) A549: $50,9 \pm 10,3$ L2: $26,4 \pm 7,4$ (Maciejewska et al., 2017)	$< 0,223$ (Maciejewska et al., 2017)
PK-175	A549: $30,6 \pm 10,2$ L2: > 200 (Maciejewska et al., 2017)	0,010 (Maciejewska et al., 2017)

2. táblázat: A munkám során vizsgált pentamidin analógokról az irodalomban megtalálható, toxicitásra és anti-*Pneumocystis* hatásra vonatkozó IC_{50} értékek, a szórás feltüntetésével, amennyiben rendelkezésre állt

1.4.3. Más gombák és baktériumok elleni hatékonyság

Micrococcus luteus, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus brasiliensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, és *Zygosaccharomyces rouxi* (utóbbi csak PK-168 esetén) ellen hatékonynak találták a PK-168, PK-171 és PK-174 vegyületeket. A PK-171 és PK-174 a vizsgált Gram-pozitív baktériumok növekedését erősebben gátolta, mint a Gram-negatív törzsekét. A PK-171 különösen hatékonynak bizonyult élesztők ellen. Öt vizsgált MRSA (meticillin rezisztens *Staphylococcus aureus*) törzs ellen a PK-168 és PK-174 a pentamidinhez hasonló, a PK-171 viszont 10-szer erősebb hatékonyságot mutatott (Maciejewska et al., 2014).

1.4.4. Egyéb vizsgált hatások

A PK-168, PK-171, PK-174 és PK-175 vegyületek matematikai modell alapján végzett predikció szerint kedvező „drug-likeness” paraméterekkel rendelkeznek orális gyógyszerek létrehozásához. A PK-171 és PK-175 vegyületek a becslések alapján feltételezhetően képesek átlépni a vér-agy gáton, míg a PK-168 és PK-174 vegyületekről ez kevésbé valószínű. Kísérletes és számítási módszerek kombinációjával nyert adatok szerint a négy vegyület nem kardiotoxikus (Żołek et al., 2019).

2. Célkitűzés

Munkám célja hat pentamidin analóg kölcsönhatásainak jellemzése volt a vér-agy gát endothel sejtjeiben megtalálható OATP1A2 és OATP2B1 fehérjékkel. Ennek során vizsgáltam a pentamidin analógok transzporter gátló hatását és OATP1A2 vagy OATP2B1 fehérjéket termelő sejtvonalakra kifejtett *in vitro* toxicitását. Arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a kutatócsoportunkban korábban vizsgált pentamidinhez képest mennyiben tér el az új vegyületek viselkedése, pl. a központi idegrendszerbe való bejutás és toxicitás tekintetében. Célom volt továbbá a pentamidin és analógjai által előidézett sejthalál mechanizmus megértése.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Munkám során használt vegyületek

A kísérleteimhez használt pentamidin analógokat Teresa Żolek kutatócsoportja szintetizálta a Varsói Orvostudományi Egyetemen diklorid sók formájában. A PK-168 (Maciejewska et al., 2012), PK-171, PK-174 (Maciejewska et al., 2014) és PK-175 (Maciejewska et al., 2017) szintézisének lépéseit már publikálták, a PK-176 és PK-177 újonnan előállított vegyületek.

Azon felhasznált anyagokat, amelyeknél nem jelzem külön a gyártót, a Sigma-Aldrich Kft.-től szereztük be.

3.2. Munkám során használt sejtvonalak

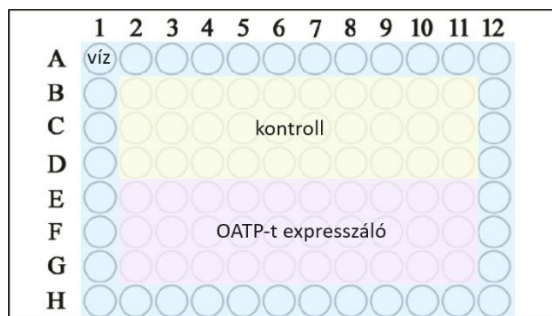
Kísérleteimet A431 (humán epidermoid karcinóma) és HEK-293 (humán embrionális vese) sejtvonalakon végeztem. Az OATP1A2 (A431-OATP1A2, HEK-293-OATP1A2) vagy OATP2B1 (A431-OATP2B1) fehérjét túlexpresszázó és kontroll sejtvonalakat kutatócsoportunkban állították elő korábban. Az OATP1A2 cDNS-ének bevitele az A431 és HEK-293 sejtvonalba rekombináns lentivírustal történt (Patik et al., 2018; Bakos et al., 2020), míg az OATP2B1 A431 sejtvonalban történő expressziójához transzpozon alapú génbevittet alkalmaztak (Patik et al., 2018). A kontroll sejtvonalakat OATP cDNS-t nem tartalmazó vektorral transzfektálták. Az OATP1A2 és OATP2B1 fehérjéket expresszázó sejtvonalakban az OATP-k jelenlétét Western blot-tal igazolták.

A sejtvonalak fenntartása 37 °C hőmérsékleten, 5 % szén-dioxid koncentráció mellett történt DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Fisher Scientific) sejtenyészítő médiumban, melyet 2 mM L-glutaminnal, 10 % FBS-sel (magzati marha szérum), 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomocinnal komplettáltam. A sejteket 2-4 naponta passzáltam és kb. 20 passzálasig használtam.

3.3. Transzport gátlás vizsgálatok fluoreszcens módszerrel

A transzport gátlás és citotoxicitás kísérletekhez sejtenyészítésre alkalmas 96 lyukú lemezeket használtam. Transzport gátlás kísérletekhez lyukanként 80000 sejtet 200 µl térfogatban, citotoxicitás kísérletekhez pedig lyukanként 5000 sejtet osztottam ki 100 µl térfogatban. Minden lemez esetén 3 sorba OATP-t expresszázó, 3 sorba kontroll sejteket

osztottam, a szélső lyukakba pedig 200 µl steril víz került. Egy lemez elrendezése az 5. ábrán látható.



5. ábra: A 96 lyukú lemez elrendezése transzport gátlás és citotoxicitás kísérletekhez történő sejtkirakásnál

A sejtek a méréseket megelőzően 24 órán át 37 °C hőmérsékleten, 5 % CO₂ koncentráció mellett inkubálódtak. Másnap a sejtekről eltávolítottam a médiumot, és 3-szor mostam őket lyukanként 200 µl szobahőmérsékletű 1xPBS-sel (foszfát puffer: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4). A vizsgált pentamidin analógokat, a kontroll inhibitoroként használt bromoszulfoftaleint (BSP) és a fluoreszcens szubsztrátot transzport pufferben (125 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 12 mM MgSO₄, 25 mM MES, 5,6 mM glükóz, OATP1A2 esetén 10 N NaOH hozzáadásával pH 7,4 értékre, OATP2B1 esetén 1 M HEPES hozzáadásával pH 5,5 értékre állítva) a kívánt végkoncentráció kétszeresére hígítottam. 50 µl transzport pufferben oldott vizsgált vegyülettel, BSP-vel vagy csak 50 µl transzport pufferrel (kezeletlen kontroll) 5 percig 37 °C-on előinkubáltam a sejteket. Ezután 50 µl transzport pufferben oldott fluoreszcens szubsztrátot (OATP1A2 esetén 0,5 µM szulforodamin 101 (SR101), OATP2B1 esetén 20 µM piranin) is adtam a sejtekhez, majd OATP1A2 esetén 10 percig, OATP2B1 esetén 15 percig inkubáltam a lemezt 37 °C-on. Az inkubációs idő letelte után eltávolítottam a reakcióelegyet a sejtekről, majd 3-szor mostam 200 µl jéghideg 1xPBS-sel, ezzel leállítottam a reakciót. Végül 200 µl jéghideg 1xPBS-ben olvastam le a sejtek fluoreszcenciáját 586/605 nm (SR101) és 460/510 nm (piranin) gerjesztési/kibocsátási hullámhosszokon Perkin Elmer EnSpire Plate Reader fluoreszcens lemezolvasó készülék használatával. Az egyes oszlopokba azonos anyag azonos koncentrációja került, így 3-3 technikai párhuzamos mérést végeztem.

A pentamidin analógok különböző koncentrációja esetén jellemző transzport aktivitást a következő képlettel számítottam ki a mért fluoreszcencia értékekből:

$$\text{transzport (\%)} = \frac{\text{átlag (OATP, kezelt)} - \text{átlag (kontroll sejtek, kezelt)}}{\text{átlag (OATP, kezeletlen)} - \text{átlag (kontroll sejtek, kezeletlen)}} \cdot 100\%$$

ahol átlag (OATP, kezelt) és átlag (kontroll sejtek, kezelt) a pentamidin analóggal azonos koncentrációban kezelt OATP-t expresszálo és kontroll sejtek esetén 3 párhuzamos lyukban mért fluoreszcencia átlaga, átlag (OATP, kezeletlen) és átlag (kontroll sejtek, kezeletlen) a kezeletlen OATP-t expresszálo és kontroll sejtek esetén a 3 párhuzamos lyukban mért fluoreszcencia átlaga.

Az IC₅₀ értékek meghatározására az Origin szoftvert (verzió: 2023, OriginLab Corporation) használtam. A pentamidin analógok koncentrációjának függvényében ábrázoltam a transzport aktivitás értékeket és a pontokra a program Hill1 függvényét illesztettem. Minden körülmény esetén minimum 3 biológiai párhuzamos mérést végeztem, különböző passzálásokból származó sejtekkel, majd kiszámítottam a IC₅₀ értékek átlagát és szórását.

3.4. Citotoxicitás vizsgálatok fluoreszcens módszerrel

A 3.3. fejezetben már ismertetett módon 96 lyukú lemezekre lyukanként 5000 sejtet osztottam ki 100 µl térfogatban. A lemezeket 24 órán át inkubáltam 37 °C és 5 % CO₂ koncentráció mellett. Ezután a vizsgált pentamidin analógokat médiummal különböző koncentrációkban hígítottam, és az oldatok 100 µl térfogatával kezeltem a sejteket. Negatív kontrollként 100 µl médiumot alkalmaztam (kezeletlen sejtek). A kezelést úgy végeztem, hogy egy vegyület egy koncentrációja a lemez egy oszlopába kerüljön, így 3-3 párhuzamos lyuk legyen minden esetben. További 4 napot inkubáltam a sejteket 37 °C-on, 5 % CO₂ koncentráció mellett. A kezelés leállításához A431 sejtek esetén eltávolítottam a vegyületeket tartalmazó médiumot a sejtekről, majd a sejtek életképességének vizsgálatához 100 µl 5 %-os Presto Blue reagenst adtam a sejtekhez. HEK-293 sejtek esetén a felülúszó eltávolítása nélkül 50 µl 25 %-os Presto Blue reagenst adtam a sejtekhez (így a végkoncentráció szintén 5 % lett). A Presto Blue reagenssel 1 órán keresztül inkubáltam a sejteket 37 °C-on, 5 % CO₂ koncentráció mellett, majd Perkin Elmer EnSpire Plate Reader lemezolvasó készülék használatával leolvastam a fluoreszcenciát 555/585 nm gerjesztési/kibocsátási hullámhosszon. Háttérként (blank) az A431 sejtek esetében sejteket nem tartalmazó 100 µl 5 %-os Presto Blue reagenst, HEK-293 sejtek esetén 200 µl médiumot és 50 µl 25 %-os Presto Blue reagenst tartalmazó lyukak fluoreszcencia értékeit használtam.

A pentamidin analógok különböző koncentrációja mellett jellemző életképességet a következő képlettel számítottam ki a mért fluoreszcencia értékekből:

$$\text{életképesség (\%)} = \frac{\text{átlag (kezelt)} - \text{átlag (blank)}}{\text{átlag (kezeletlen)} - \text{átlag (blank)}} \cdot 100\%$$

ahol átlag (kezelt) a pentamidin analóggal kezelt sejtek és átlag (kezeletlen) a kezeletlen sejtek esetén a 3 párhuzamos lyuk fluoreszcenciájának átlaga, átlag (blank) a háttér lyukakban mért fluoreszcencia átlaga.

Az IC₅₀ értékek meghatározására az Origin szoftvert (verzió: 2023, OriginLab Corporation) használtam. A pentamidin analógok koncentrációjának függvényében ábrázoltam az életképesség értékeket és a pontokra a program Hill1 függvényét illesztettem. Minden körülmény esetén minimum 3 biológiai párhuzamos mérést végeztem, különböző passzálásokból származó sejtekkel, majd kiszámítottam a IC₅₀ értékek átlagát és szórását, külön az OATP-t expresszálo és a kontroll sejtekre.

3.5. Sejthalál mechanizmus vizsgálata áramlási citometriával

Az apoptózis korai szakaszának és késői fázisának/nekrózisnak detektálása fluoreszcensen jelölt annexin V (annexin V – FITC, FITC: fluoreszcein-izotiocianát) és a nukleinsav festék propídium-jodid segítségével történt. A kísérlethez 6 lyukú lemezekre lyukanként 120000 sejtet osztottam 2 ml térfogatban, majd 24 órán át inkubáltam a sejteket 37 °C és 5 % CO₂ koncentráció mellett.

Másnap a sejtekről leszívtam a médiumot és lyukanként 2 ml megfelelő koncentrációjú vegyülettel kezeltem őket. A pentamidint és a PK-168 analógot az A431 sejteken végzett citotoxicitás kísérletek során meghatározott IC₅₀ értékük (pentamidin: 0,4 µM (Ungvári et al., 2023), PK-168: 0,18 µM) 2-szeresének megfelelő koncentrációnál alkalmaztam médiumban hígítva. Negatív kontrollként 2 ml médiumot használtam (kezeletlen sejtek). Ezután másnapig inkubáltam a sejteket 37 °C és 5 % CO₂ koncentráció mellett.

A sejteket tripszines kezeléssel választottam el a lemeztől, majd médiummal gyűjtöttem össze. A sejteket megmostam 1 ml PBS-sel, majd 100 µl annexin kötő pufferben hígítva 4 µl annexin V – FITC konjugátumot és 5 µl 0,1 mg/ml propídium-jodidot adtam a sejtekhez és 15 percig inkubáltam őket szobahőmérsékleten, fénytől védve. A inkubációs idő letelte után 400 µl annexin kötő puffert adtam a mintákhoz, és Attune NxT Flow Cytometer áramlási citométerrel mértem az annexin V – FITC és a propídium-jodid által festett sejtek arányát. A pentamidin és a PK-168 esetén is 3-3 biológiai párhuzamos mérést végeztem, különböző passzálásokból származó sejtekkel.

4. Eredmények és értékelésük

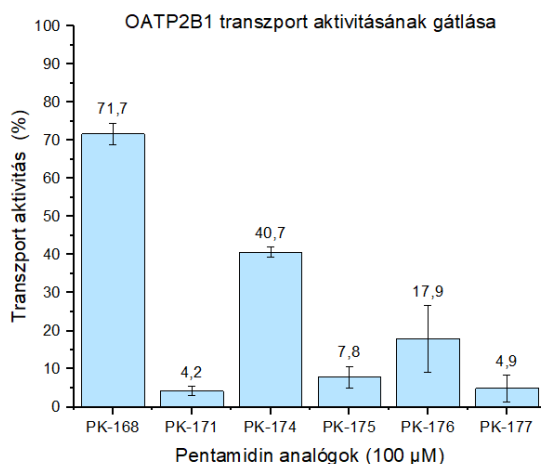
4.1. Transzport gátlás vizsgálatok fluoreszcens módszerrel

A pentamidin analógok OATP1A2 és OATP2B1 transzporterekkel való interakcióját a kutatócsoportunk által kifejlesztett fluoreszcens indirekt transzport módszerekkel vizsgáltam (Bakos et al., 2020; Székely et al., 2020). Azt mértem, hogy a pentamidin analógok jelenléte milyen mértékben gátolja az OATP1A2 vagy OATP2B1 egy ismert fluoreszcens szubsztrátjának transzportját az OATP-t expresszáló sejtekbe. Amennyiben valamely vegyület jelenléte csökkenti az ismert szubsztrát sejtekbe történő bejutását, akkor az adott vegyület az OATP szubsztrátja vagy inhibitora. Az ismert szubsztrát az OATP1A2 esetén az SR101 (Bakos et al., 2020), az OATP2B1 esetén a piranin (Székely et al., 2020) volt. Ezen kísérleteket csak A431 sejtekkel végeztem el, mivel csoportunk korábban megállapította, hogy a transzport gátlás eredménye nem függ a vizsgált sejtvonaltól, amennyiben a sejtekben megfelelő mértékben expresszálódik a vizsgált OATP (Patik et al., 2018; Bakos et al., 2020).

Csoportunkban korábban vizsgálták a pentamidin OATP1A2 és OATP2B1 transzporterekkel való kölcsönhatását (Ungvári et al., 2023), ezért az analógokra kapott eredményeket ezekkel az adatokkal hasonlítom össze. Az ismertetett eredmények minimum 3 biológiai párhuzamos mérés átlagát és szórását (SD) mutatják.

4.1.1. Pentamidin analógok hatása az OATP2B1 transzport aktivitására

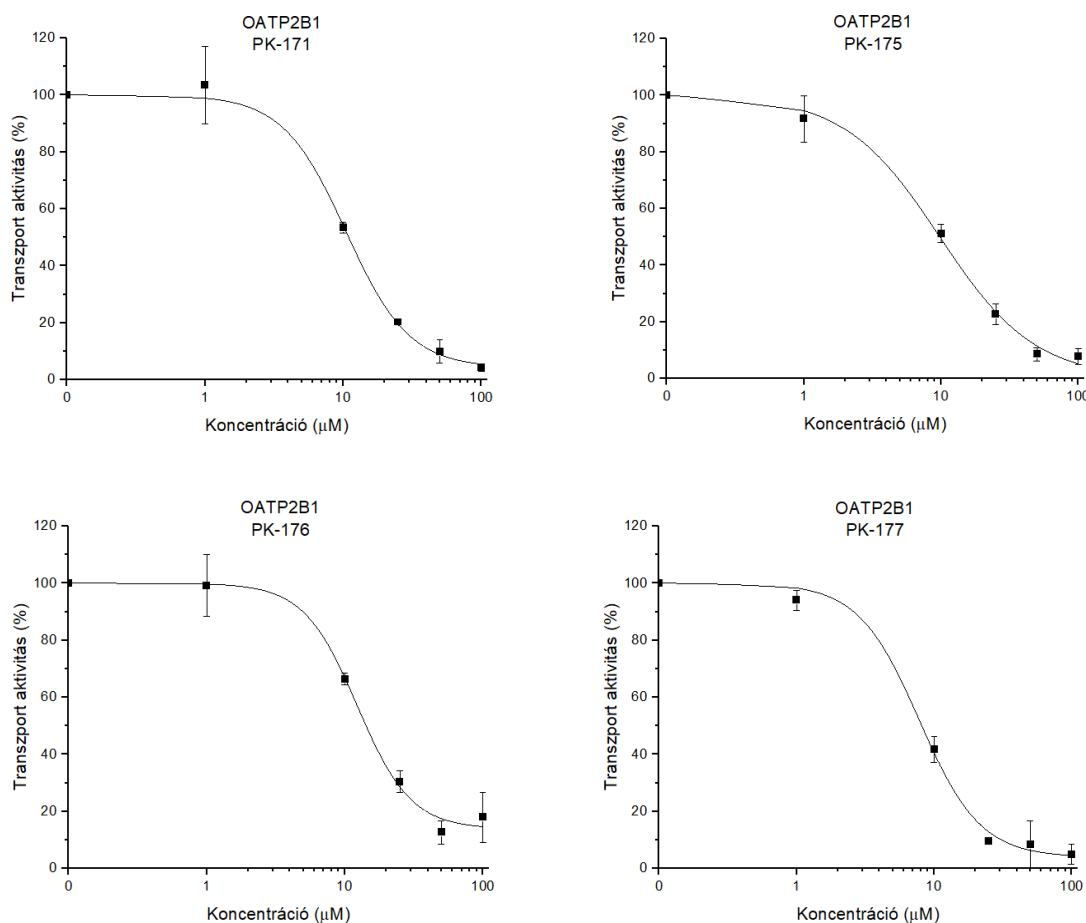
Mivel a csoportunkban korábban elvégzett kísérletek során 100 μM koncentrációig nem tapasztaltak interakciót a pentamidin és az OATP2B1 transzporter között, ezért a kísérleteket először csak 100 μM koncentrációnál végeztem el (6. ábra).



6. ábra: Transzport gátlás A431-OATP2B1 sejtekben. 96 lyukú lemezre előző nap kiosztott sejteket (80000/lyuk) 100 μM pentamidin analóggal és 20 μM piraninnal 15 percig, 37 °C-on inkubáltam. A sejtekben lévő piranin fluoreszcenciáját fluoreszcens lemezolvasóval

detektáltam, és a transzport aktivitást a kontroll, csak festékekkel kezelt sejtekben mért fluoreszcencia alapján határoztam meg. Az ábrán 3 független mérés átlaga $\pm$ SD értékek láthatók.

A 6. ábrán bemutatott eredmények alapján a PK-171, PK-175, PK-176 és PK-177 vegyületeket 100 μ M koncentrációban alkalmazva jelentősen ($> 60\%$) gátolták a piranin OATP2B1 mediálta felvételét, ezért ezeket a vegyületeket szélesebb koncentráció tartományban is teszteltem az IC₅₀ értékek meghatározása érdekében (7. ábra és 3. táblázat).



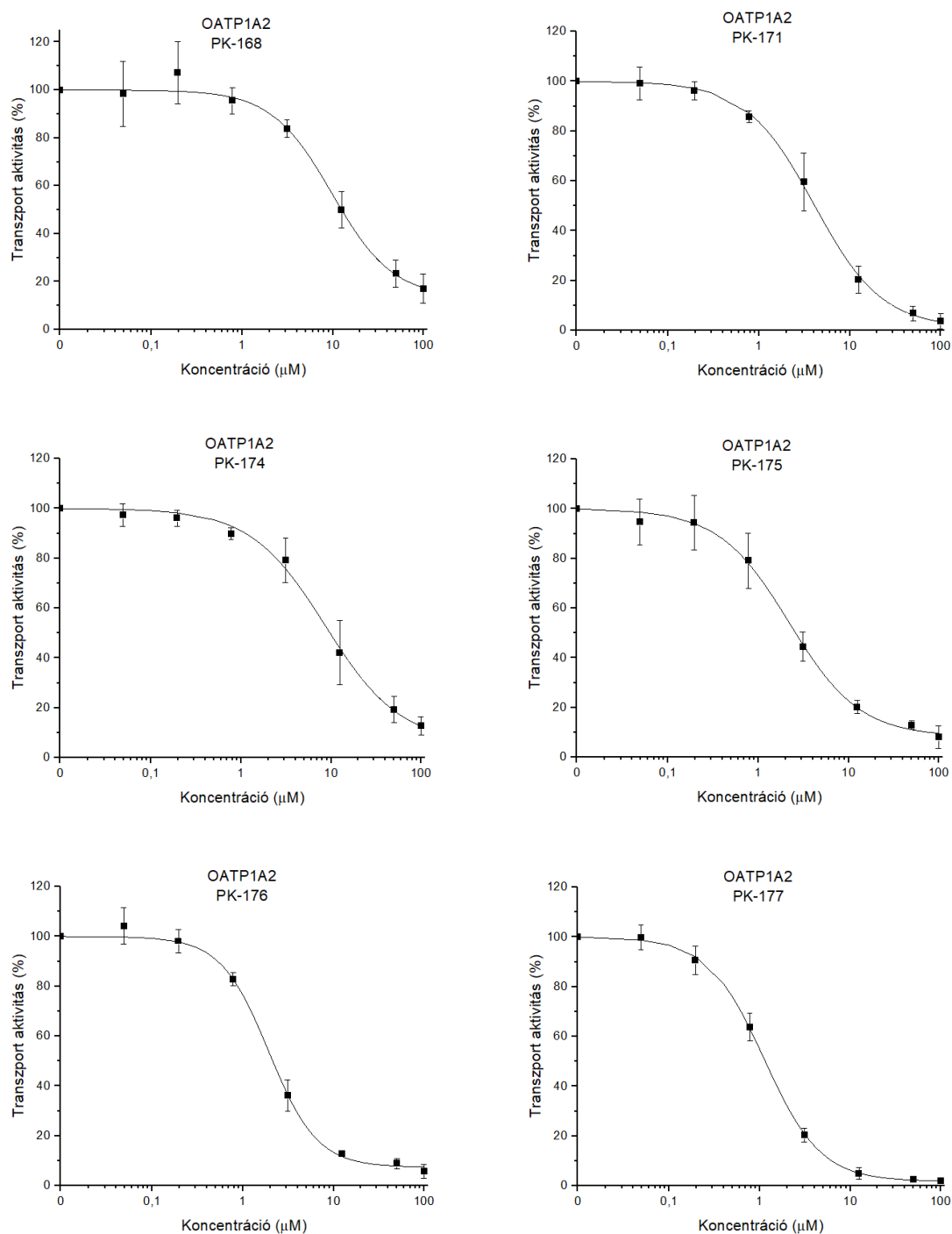
7. ábra: Pentamidin analógok koncentrációfüggő transzport gátló hatása A431-OATP2B1 sejtekben. 96 lyukú lemezre előző nap kiosztott sejteket (80000/lyuk) a pentamidin analógok különböző koncentrációival és 20 μ M piraninnal inkubáltam 15 percig, 37 °C-on. A sejtekben lévő piranin fluoreszcenciáját fluoreszcens lemezolvasóval detektáltam, és a transzport aktivitást a kontroll, csak festékekkel kezelt sejtekben mért fluoreszcencia alapján határoztam meg. Az ábrán 3 független mérés átlaga $\pm$ SD értékek láthatók.

Pentamidin analóg	Pentamidin	PK-168	PK-171	PK-174	PK-175	PK-176	PK-177
IC ₅₀ (μM)	>100*	>100	10,52 $\pm$ 1,11	>50	9,72 $\pm$ 1,76	14,22 $\pm$ 0,05	7,97 $\pm$ 0,42

3. táblázat: Pentamidin analógok IC₅₀ értékei A431-OATP2B1 sejteken végzett transzport gátlás kísérletekben (7. ábra), *Ungvári et al., 2023

4.1.2. Pentamidin analógok hatása az OATP1A2 transzport aktivitására

Előzetes kísérletek során a pentamidin analógok 100 μM koncentrációban nagymértékben (közel 100 %) gátolták az OATP1A2 transzport aktivitását, ezért mind a hat vegyületet széles koncentrációtartományban teszteltem (8. ábra és 4. táblázat).



8. ábra: Pentamidin analógok koncentrációfüggő transzport gátló hatása A431-OATP1A2 sejtekben. 96 lyukú lemezre előző nap kiosztott sejteket (80000/lyuk) a pentamidin analógok

különböző koncentrációival és 0,5 μM SR101 festékkel inkubáltam 10 percig, 37 °C-on. A sejtekben lévő SR101 fluoreszcenciáját fluoreszcens lemezolvasóval detektáltam, és a transzport aktivitást a kontroll, csak festékkel kezelt sejtekben mért fluoreszcencia alapján határoztam meg. Az ábrán 3 független mérés átlaga $\pm$ SD értékek láthatók.

Pentamidin analóg	Pentamidin	PK-168	PK-171	PK-174	PK-175	PK-176	PK-177
IC ₅₀ (μM)	5,5*	13,24 $\pm$ 3,78	4,29 $\pm$ 1,36	10,45 $\pm$ 4,17	2,55 $\pm$ 0,56	2,15 $\pm$ 0,23	1,15 $\pm$ 0,14

4. táblázat: Pentamidin analógok IC₅₀ értékei A431-OATP1A2 sejteken végzett transzport gátlás kísérletekben (8. ábra), *Ungvári et al., 2023

A vizsgált 6 vegyület mindegyike gátolta az SR101 OATP1A2 mediálta transzportját, tehát kölcsönhatnak a transzporterrel. A PK-171 vegyülettel a pentamidinhez hasonló, míg a PK-175, PK-176 és PK-177 vegyületekkel a pentamidinnél alacsonyabb IC₅₀ értékeket kaptam, ami arra utal, hogy ezek a vegyületek a pentamidinhez hasonló, vagy akár nagyobb hatékonysággal lépnek interakcióba az OATP1A2 fehérjével.

Azonban a transzport gátlás kísérletek alapján nem dönthető el, hogy a vegyületek az OATP1A2 és OATP2B1 szubsztrátjai vagy inhibitorai. Ennek vizsgálata érdekében a továbbiakban citotoxicitási tesztekot végeztem.

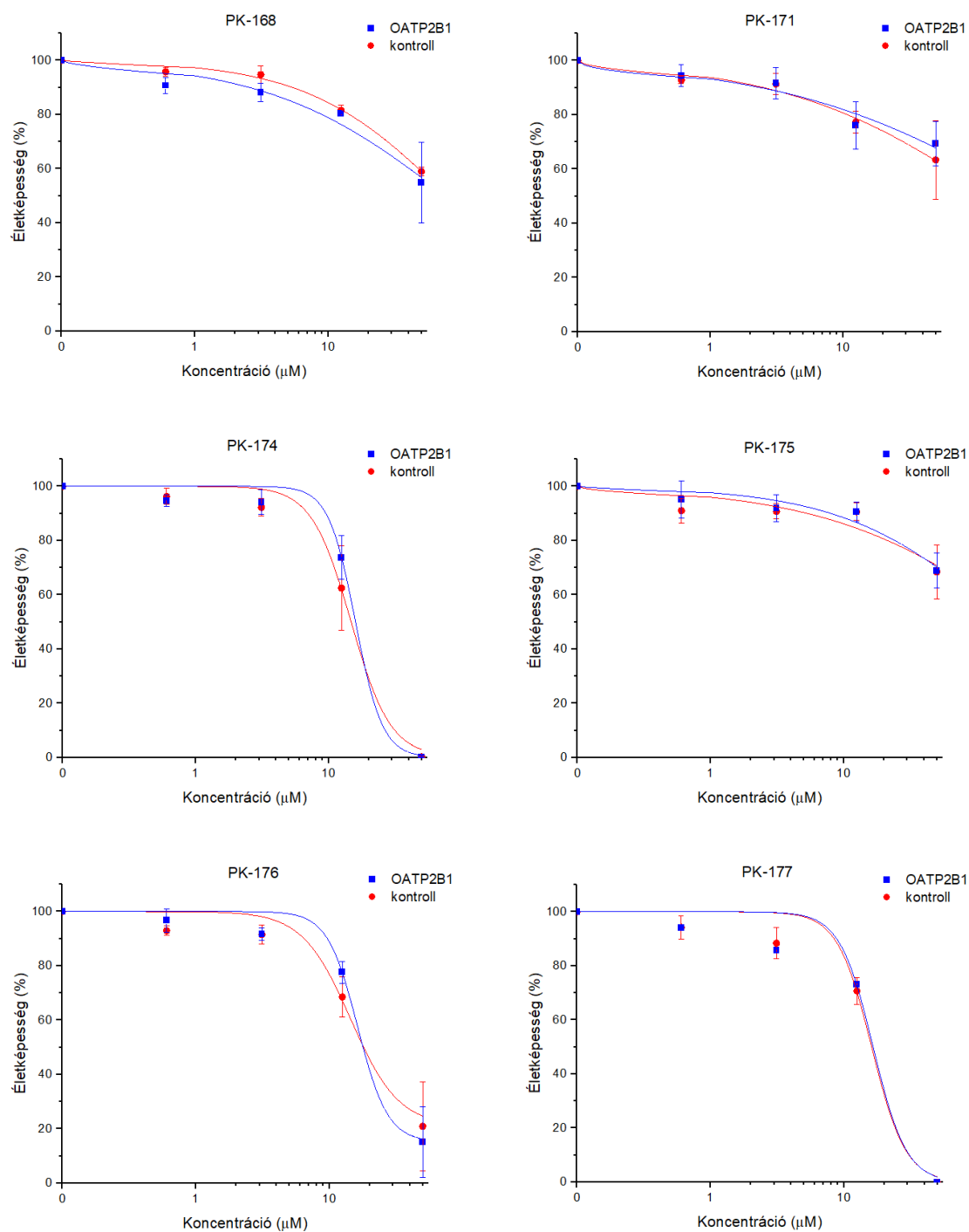
4.2. Citotoxicitás vizsgálatok OATP fehérjéket termelő sejteken

A citotoxicitás tesztek során azt vizsgáltam, hogy a pentamidin analógok toxikusak-e az A431 és HEK-293 humán sejtekre, és az OATP1A2 vagy OATP2B1 transzporterek overexpressziója befolyásolja-e a toxicitásukat. A toxikus OATP szubsztrátok hatékonyabb felvétele a szubsztrátok fokozott toxicitását eredményezi az adott OATP-t expresszáló sejtekben az OATP-t nem expresszáló sejtekhez képest (Windt et al., 2019; Bakos et al., 2020). Amennyiben a transzportert expresszáló sejtek életképessége jelentősen hatékonyabban csökken egy vegyület hatására, mint a kontroll sejtek életképessége, a jelenség egy lehetséges magyarázata, hogy az adott vegyület szubsztrátja a transzporternek. A transzport gátlás vizsgálat alapján nem dönthető el, hogy egy adott vegyület szubsztrátja vagy inhibitora a vizsgált OATP-nek, de amennyiben a transzport gátlás vizsgálat interakciót mutat, és a citotoxicitás vizsgálat alapján az OATP jelenléte érzékenyebbé teszi a sejteket a vegyületre, akkor arra következtethetünk, hogy a vegyület nagy valószínűséggel szubsztrát.

A sejtek életképességének mérésére Presto Blue (Thermo Fisher Scientific) reagenst használtam, melynek fluoreszcenciája a sejtekkel történő megfelelő inkubációs időt követően az élő sejtek számával arányos. Az ismertetett eredmények minimum 3 biológiai párhuzamos mérés átlagát és szórását (SD érték) mutatják.

4.2.1. Pentamidin analógok citotoxicitásának vizsgálata A431-OATP2B1 és A431-kontroll sejteken

A pentamidin analógok citotoxikus hatását 50 μM koncentrációig vizsgáltam az A431-OATP2B1 és kontroll sejteken (9. ábra és 5. táblázat).



9. ábra: Pentamidin analógok citotoxicitása A431-OATP2B1 és -kontroll sejtekben. 96 lyukú lemezre előző nap kiosztott sejteket (5000/lyuk) a pentamidin analógok növekvő

koncentrációival kezeltem, majd 4 nap után a sejtek életképességét Presto Blue reagenssel határoztam meg. Az ábrán 3 független mérés átlaga $\pm$ SD értékek láthatók.

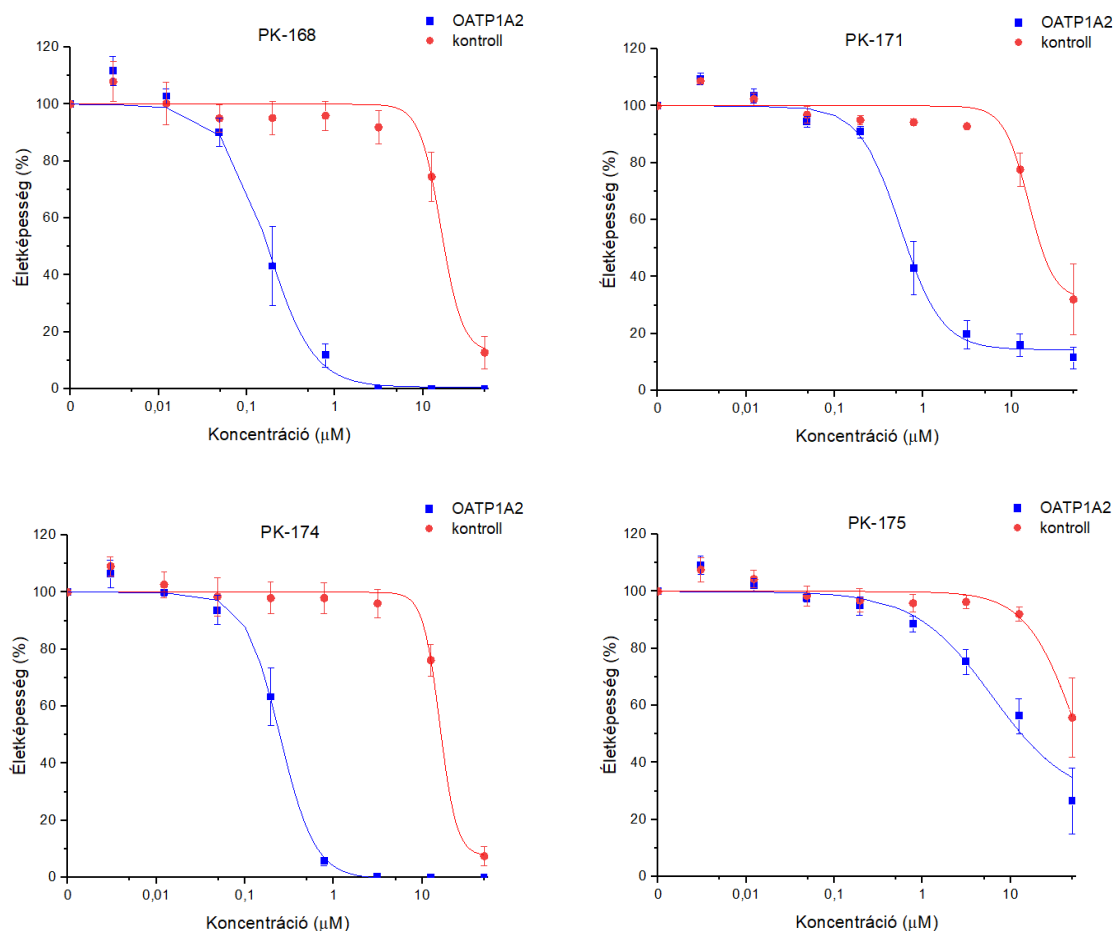
Pentamidin analóg		Penta- midin	PK-168	PK-171	PK-174	PK-175	PK-176	PK-177
IC ₅₀ (μ M)	A431-OATP2B1	21,2*	>50	>50	15,80 $\pm$ 1,21	>50	18,25 $\pm$ 1,61	16,53 $\pm$ 0,10
	A431-kontroll	26,2*	>50	>50	14,48 $\pm$ 2,45	>50	22,02 $\pm$ 10,70	15,87 $\pm$ 0,46

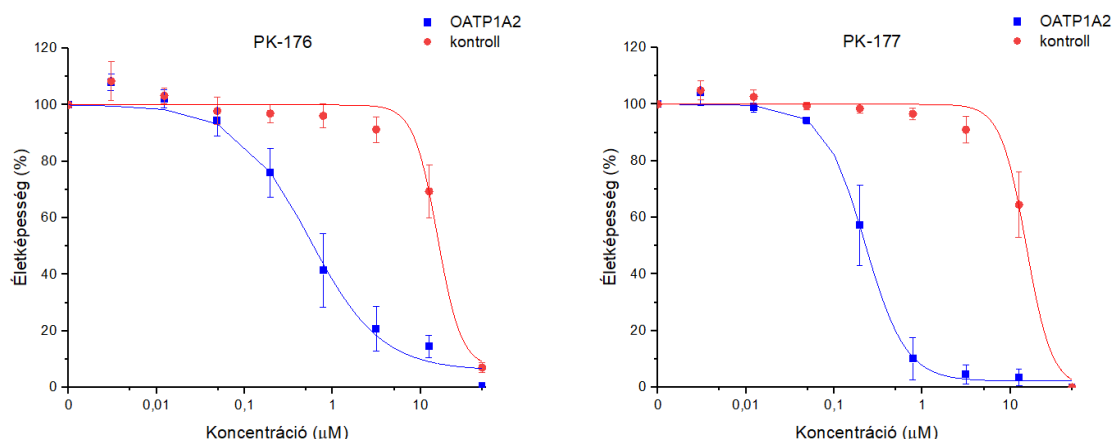
5. táblázat: Pentamidin analógok IC₅₀ értékei A431-OATP2B1 és -kontroll sejteken végzett citotoxicitás kísérletekben, *Ungvári et al., 2023

A méréseim (9. ábra és 5. táblázat) alapján, egyik vegyület hatása sem különbözik jelentős mértékben az A431-OATP2B1 és A431-kontroll sejteken, vagyis az OATP2B1 expressziója a pentamidinhez hasonlóan egyik pentamidin analógra sem tette érzékenyebbé az A431 sejteket.

4.2.2. Pentamidin analógok citotoxicitásának vizsgálata A431-OATP1A2 és A431-kontroll sejteken

A pentamidin analógok citotoxikus hatását 50 μ M koncentrációig vizsgáltam az A431-OATP1A2 és kontroll sejteken (10. ábra és 6. táblázat).





10. ábra: Pentamidin analógok citotoxicitása A431-OATP1A2 és -kontroll sejtekben. 96 lyukú lemezre előző nap kiosztott sejtek (5000/lyuk) a pentamidin analógok növekvő koncentrációival kezeltem, majd 4 nap után a sejtek életképességét Presto Blue reagenssel határoztam meg. Az ábrán 3 független mérés átlaga $\pm$ SD értékek láthatók.

Pentamidin analóg		Pentamidin	PK-168	PK-171	PK-174	PK-175	PK-176	PK-177
IC ₅₀ (μM)	A431-OATP1A2	0,4*	0,18 $\pm$ 0,06	0,69 $\pm$ 0,17	0,25 $\pm$ 0,04	15,73 $\pm$ 9,16	0,70 $\pm$ 0,38	0,24 $\pm$ 0,08
	A431-kontroll	26,2*	16,95 $\pm$ 0,33	24,59 $\pm$ 9,12	15,76 $\pm$ 1,79	>50	15,88 $\pm$ 1,05	14,54 $\pm$ 1,50

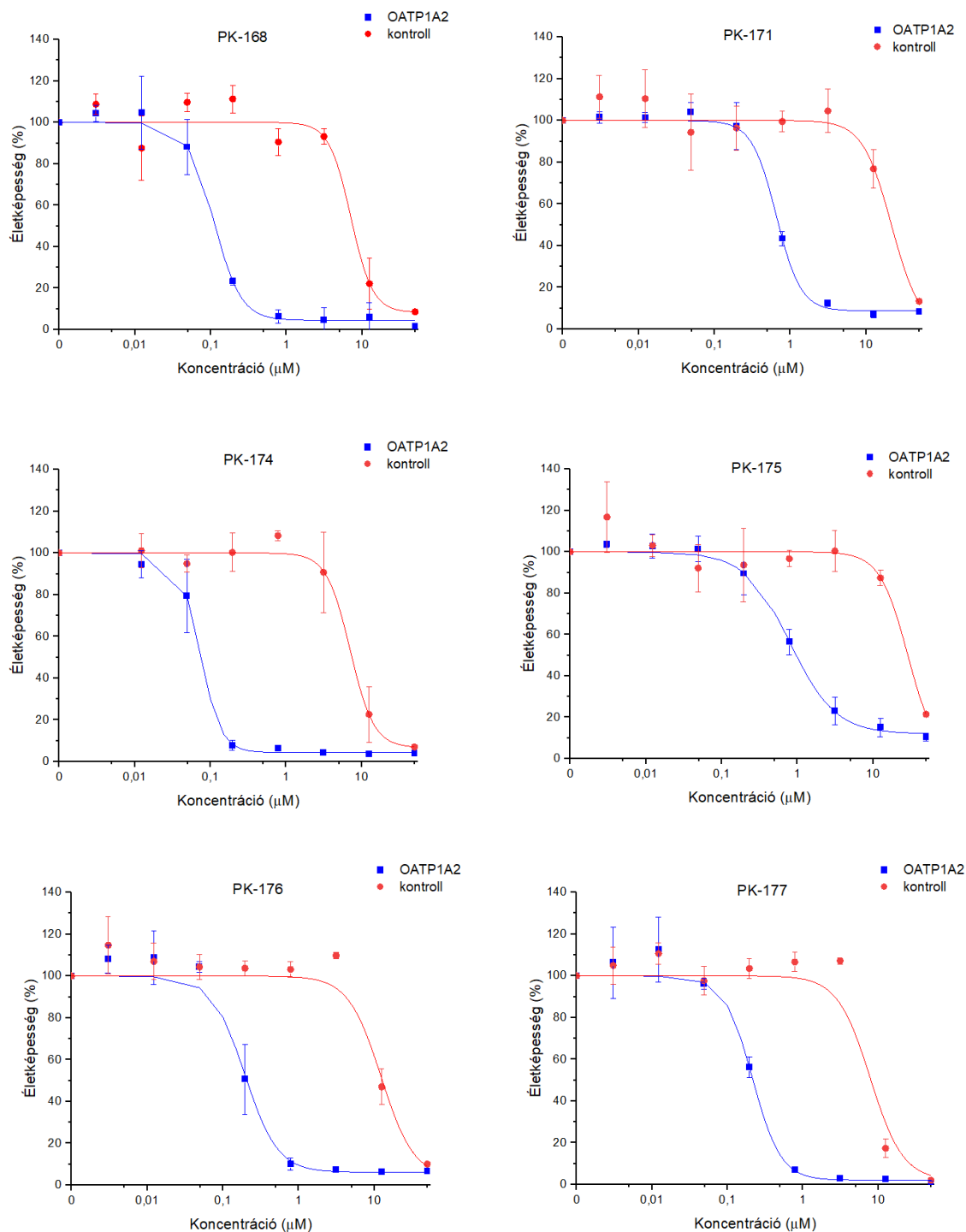
6. táblázat: Pentamidin analógok IC₅₀ értékei A431-OATP1A2 és -kontroll sejteken végzett citotoxicitás kísérletekben (10. ábra), *Ungvári et al., 2023

Mindegyik vizsgált vegyület esetén jelentősen alacsonyabb IC₅₀ értéket kaptam az OATP1A2 transzportert expresszáló sejteken a kontroll sejteken mértékhez képest, vagyis az OATP1A2 expressziója érzékenyebbé tette a sejteket a pentamidin analógokkal szemben. A PK-175 kivételével minden vegyület esetén a pentamidinnel összevethető IC₅₀ értéket kaptam az A431-OATP1A2 sejteken. Annak ellenére, hogy a PK-175 kevésbé volt toxikus a pentamidinhez képest, az OATP1A2-t expresszáló sejtek ezzel a vegyülettel szemben is jelentősen érzékenyebbnak mutatkoztak a kontroll sejtekhez képest.

Az A431 sejteken végzett citotoxicitás kísérletek azt is mutatják, hogy a hat vegyület nagy koncentrációk esetén az A431-kontroll sejtekre is toxikus. A vegyületek a pentamidinhez hasonló, vagy valamivel erősebb toxicitást mutatnak, a PK-175 toxicitása a legkisebb, az életképesség csökkenése azonban esetében is látható (9. és 10. ábra).

4.2.3. Pentamidin analógok citotoxicitásának vizsgálata HEK-293-OATP1A2 és HEK-293-kontroll sejteken

Annak érdekében, hogy igazoljuk, az OATP1A2-szelektív toxicitás nem sejt-specifikus, a vegyületek toxicitását OATP1A2-t termelő HEK-293 és kontroll HEK-293 sejteken is teszteltem (11. ábra és 7. táblázat).



11. ábra: Pentamidin analógok citotoxicitása HEK-293-OATP1A2 és -kontroll sejtekben. 96 lyukú lemezre előző nap kiosztott sejteket (5000/lyuk) a pentamidin analógok növekvő koncentrációival kezelttem, majd 4 nap után a sejtek életképességét Presto Blue reagenssel határoztam meg. Az ábrán 3 független mérés átlaga $\pm$ SD értékek láthatók.

Pentamidin analóg		Penta- midin	PK-168	PK-171	PK-174	PK-175	PK-176	PK-177
IC ₅₀ (μ M)	HEK- OATP1A2	0,09*	0,13 $\pm$ 0,04	0,71 $\pm$ 0,06	0,08 $\pm$ 0,02	0,96 $\pm$ 0,23	0,21 $\pm$ 0,06	0,22 $\pm$ 0,02
	HEK- kontroll	6,9*	7,64 $\pm$ 1,61	15,10 $\pm$ 1,29	7,13 $\pm$ 3,46	16,53 $\pm$ 2,72	12,86 $\pm$ 1,74	8,00 $\pm$ 0,46

7. táblázat: Pentamidin analógok IC₅₀ értékei HEK-293-OATP1A2 és -kontroll sejteken végzett citotoxicitás kísérletekben, *Ungvári et al., 2023

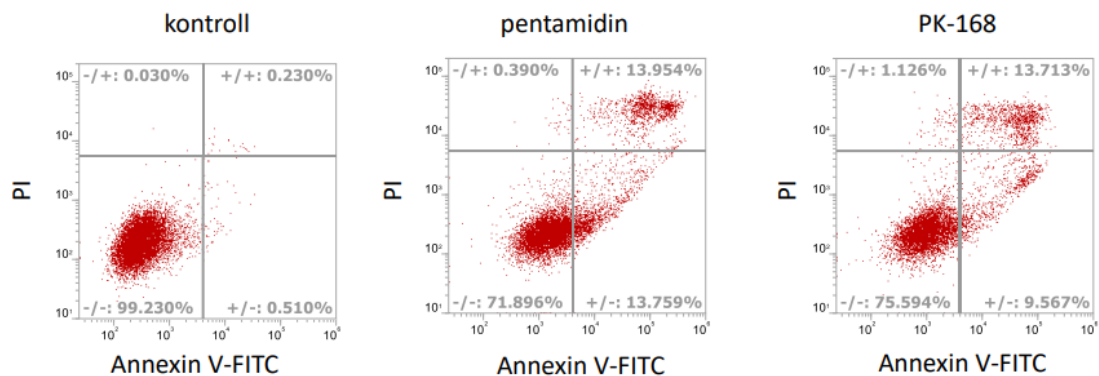
A vegyületek jelentősen toxikusabbnak bizonyultak a HEK-293-OATP1A2 sejtekre, mint a HEK-293-kontroll sejtekre, tehát ezen sejtvonal esetén is tapasztalható az OATP1A2 expresszió okozta érzékenyítés. A PK-168, PK-174, PK-176 és PK-177 vegyületek esetén a pentamidinnel közel azonos, míg a PK-171 és PK-175 vegyületek esetén valamivel magasabb IC₅₀ értéket kaptam a HEK-293-OATP1A2 sejtekre. A hat vegyület nagyobb koncentrációk esetén a HEK-293-kontroll sejtekre is toxikus, a pentamidinhez hasonló, vagy akár kisebb mértékben.

4.3. Sejthalál mechanizmus vizsgálata áramlási citometriával

A sejthalál mechanizmus vizsgálatok célja a pentamidin és analógjai által a rájuk érzékeny sejtekben előidézett sejthalál mechanizmus megértése volt. Kísérleteimhez az A431-OATP1A2 sejtvonalat használtam, és a pentamidint, valamint a méréseim alapján erre a sejtvonalra legtoxikusabb analógot, a PK-168-at vizsgáltam.

Az apoptózis korai és késői fázisának/nekrózisnak a detektálása fluoreszcensen jelölt annexin V (annexin V – FITC) és a nukleinsav festék propídium-jodid használatával történt. Az apoptózis korai fázisában a sejtek membránja még nem átjárható a propídium-jodid számára, azonban a membránjukban található foszfatidil-szerin molekulák kifordulnak, amelyekhez az annexin V így kötődni képes. Az apoptózis késői fázisában, valamint nekrosis folyamán a plazmamembrán integritása megszűnik, így a propídium-jodid megfesti a sejteket, valamint az annexin V is kötődik a sejtek foszfatidil-szerin molekuláihoz. Az annexin V – FITC és a propídium-jodid fluoreszcenciájának mérésével így elkülöníthetők az élő, az apoptózis korai fázisában és az apoptózis késői fázisában / nekrotikus állapotban lévő sejtpopulációk.

A pentamidinnel és a PK-168 analóggal is 3 biológiai párhuzamos mérést végeztem. A 12. ábrán egy reprezentatív mérés eredménye látható.



12. ábra: Áramlási citometriás annexin V kötődés vizsgálat eredménye, PI: propídium-jodid

A kontroll, pentamidinnel vagy PK-168-val nem kezelt sejtekben az élő sejtek (annexin V negatív, propídium-jodid negatív) 99 %-os többségben vannak. A pentamidin esetén az apoptózis korai fázisában (annexin V pozitív, propídium-jodid negatív) és az apoptózis késői fázisában vagy nekrozisban (annexin V pozitív, propídium-jodid pozitív) lévő sejtek aránya is kb. 14 %, míg a PK-168 kezelés hatására az apoptózis korai fázisában kb. a sejtek 10 %-át, az apoptózis késői fázisában vagy nekrozisban kb. a sejtek 14 %-át detektáltuk.

4.4. Eredmények összegzése, következtetések

A pentamidin évtizedek óta alkalmazott antiparazita gyógyszer. Számos hátrányos tulajdonsága (vér-agy gáton való limitált átjutás, súlyos mellékhatások, alacsony biohasznosulás szájon át történő adagolás esetén) indokolja a nála hatékonyabb és/vagy kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkező új vegyületek kifejlesztését. Az OATP1A2 és OATP2B1 a vér-agy gátban és más szövetekben expresszálandó transzporterek, melyek befolyásolják a gyógyszerek *in vivo* sorsának alakulását (Kovacsics et al., 2016). Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a pentamidin az OATP1A2 szelektív szubsztrátja, az OATP2B1 fehérjével pedig nem lép kölcsönhatásba, vagyis az OATP1A2 fontos szerepet tölthet be a pentamidin vér-agy gát endothel sejtjeibe történő felvételében (Ungvári et al., 2023). Munkám során nemzetközi együttműködés keretében, hat pentamidin analógot vizsgáltam az OATP1A2 és OATP2B1 fehérjékkel való kölcsönhatásuk, OATP1A2 vagy OATP2B1 transzportert expresszálo és kontroll humán sejtekre kifejtett toxicitásuk és a rájuk érzékeny sejtekben kiváltott sejthalál mechanizmus tekintetében.

A transzport gátlás kísérletek során a pentamidinnel ellentétben a PK-171, PK-175, PK-176 és PK-177 vegyületek gátolták az OATP2B1 transzport aktivitását (7. ábra és 3. táblázat), vagyis kölcsönhatásba lépnek ezzel a fehérjével, azonban ez csak viszonylag nagy koncentrációk esetén számottevő mértékű ($IC_{50} = 7,97-14,22 \mu M$). Mind a hat vegyület gátolta az OATP1A2 transzport aktivitását (8. ábra és 4. táblázat), vagyis az OATP1A2 fehérjével mind a hat vegyület kölcsönhatásba lép. A PK-168 és PK-174 a pentamidinhez ($IC_{50} = 5,5 \mu M$) képest gyengébb ($IC_{50} = 13,24$ és $10,45 \mu M$), a PK-171 a pentamidinhez hasonló erősségű ($IC_{50} = 4,29 \mu M$), a PK-175, PK-176 és PK-177 pedig a pentamidinhez képest erősebb ($IC_{50} = 1,15-2,55 \mu M$) interakciót mutatott.

A citotoxicitás kísérletek során a pentamidinhez hasonlóan egyik vegyület hatása sem különbözött jelentős mértékben az A431-OATP2B1 és A431-kontroll sejteken (9. ábra és 5. táblázat), vagyis az OATP2B1 expressziója egyik pentamidin analógra sem tette érzékenyebbé az A431 sejteket, ami arra enged következtetni, hogy a vegyületek nem szubsztrátjai az OATP2B1-nek. Azonban a transzport gátlás kísérletek a PK-171, PK-175, PK-176 és PK-177 esetén interakciót mutattak. A transzport gátlás és citotoxicitás mérések együttes eredménye alapján tehát a felsorolt 4 vegyület nagyobb koncentrációk esetén ($IC_{50} = 7,97-14,22 \mu M$) az OATP2B1 inhibitora. Emiatt számolni kell azzal, hogy ezen vegyületek kisebb mértékben

gátolhatják az OATP2B1 endogén szubsztrátjainak (pl. hormonok, neuropeptidek) transzportját, befolyásolhatják a máj méregtelenítő funkcióját, a gyógyszerek bélből történő felszívódását, neurotranszmitterek és neuroszteroidok retinába történő felvételét, továbbá gyógyszerek átjutását a vér-agy, vér-szem és placentális gáton.

A pentamidinhez hasonlóan mindegyik vizsgált vegyülettel jelentősen alacsonyabb IC_{50} értéket kaptam az A431-OATP1A2 sejteken, mint a kontroll sejteken (10. ábra és 6. táblázat). Ennek a jelenségnek egy lehetséges magyarázata, hogy az OATP1A2 elősegíti a vegyületek sejtekbe történő felvételét. Annak érdekében, hogy az OATP1A2-szelektív toxicitás sejt-specifikusságát (A431) kizárjam, a citotoxicitás vizsgálatot OATP1A2-t expresszáló és kontroll HEK-293 sejtvonalon is elvégeztem, melynek eredménye szintén azt mutatta, hogy az OATP1A2 jelenléte érzékenyebbé teszi a sejteket a toxikus vegyületekkel szemben (11. ábra és 7. táblázat). Mivel az A431-OATP1A2 sejteken végzett transzport gátlás mérések is interakciót mutattak, a transzport gátlás és citotoxicitás kísérletek együttes eredménye alapján nagy valószínűséggel állítható, hogy a hat vizsgált vegyület a pentamidinhez hasonlóan az OATP1A2 szelektív szubsztrátja.

A citotoxicitás kísérletben kapott IC_{50} értékek alapján azonban nem dönthető el, hogy melyik vegyület a nagyobb affinitású OATP1A2 szubsztrát, mivel a toxikusságban több tényező is szerepet játszhat. A transzport gátlás kísérletekben mért IC_{50} értékek (4. táblázat) viszont a vegyületek és az OATP1A2 interakciójának erősségéről szolgáltatnak információt. Ez alapján feltételezhető, hogy a PK-168 és PK-174 a pentamidinhez képest kisebb affinitású, a PK-171 a pentamidinhez hasonló, a PK-175, PK-176 és PK-177 pedig a pentamidinnél nagyobb affinitású OATP1A2 szubsztrátok. Ez alapján az utóbbi három vegyületről feltételezhetjük, hogy a pentamidinnél nagyobb mértékben juthatnak be a vér-agy gát endothel sejtjeibe az OATP1A2 működése segítségével. Ez összhangban áll Żolek et al. becsléseivel, melyek szerint a PK-171 és PK-175 vegyületek feltételezhetően képesek átlépni a vér-agy gáton, a PK-168 és PK-174 vegyületekről viszont ez kevésbé valószínű (Żolek et al., 2019).

Kísérleteim alapján a hat pentamidin analóg erősen toxikus az OATP1A2-t expresszáló sejtekre. Bár a kísérleteim során az OATP1A2-t túlexpresszáló sejtekkel dolgoztam, vagyis *in vivo* körülmények között ilyen erős toxikus hatás feltételezhetően nem fordulna elő, fontos megállapítanunk, hogy a hatékonyabb OATP1A2 mediálta transzport fokozottabb toxicitással is járhat az OATP1A2 fehérjét expresszáló szövetekben, mint az agy, szem, bél, vese, máj, neuronok, vér-here gát és a placenta. Továbbá a vizsgált vegyületek az OATP-t nem expresszáló sejtekre is enyhe toxikus hatást mutattak. Ez összhangban áll a PK-171, PK-174 és K-175

vegyületekről rendelkezésre álló irodalmi adatokkal, melyek szerint az említett három vegyület enyhén toxikusnak mutatkozott egy vagy több emlős/humán sejtvonalra (Maciejewska et al., 2014, 2017). A PK-168 esetén viszont nem detektáltak toxikus hatást a vizsgált sejtvonalakon (Maciejewska et al., 2012).

A méréseim alapján az -NH csoportokon található szubsztituensek fokozzák az OATP2B1 inhibíció és az OATP1A2 mediálta transzport hatékonyságát, valamint a PK-175 szerkezetében az amidin csoportok imidazolin gyűrűvé zárása csökkenti a molekula toxicitását. A PK-171 és PK-177 csak a linker régióban található O és S heteroatomok fordított elrendezésében térnek el, ezért arra is következtethetünk, hogy a PK-177 linker régiójában található S-O-S elrendezés kedvező a vér-agy gáton való átjutás, viszont kedvezőtlen a vegyület toxicitása szempontjából a PK-171 linker régiójában található O-S-O elrendezéshez képest.

Összegezve a PK-175, PK-176 és PK-177 vegyületekről feltételezhető, hogy a vér-agy gáton a pentamidinnél könnyebben jutnak át. Ezen három vegyület közül a PK-175 mutatkozott a legkevésbé toxikusnak A431 és HEK-293 sejtekre, valamint Żołek et al. predikciója szerint kedvező „drug-likeness” paraméterekkel rendelkezik és feltételezhetően nem kardiotoxikus (Żołek et al., 2019). Utóbbi adatok nem állnak rendelkezésre a PK-176 és PK-177 vegyületekről, így nem tudunk összehasonlítást végezni, de az ismert adatok alapján az általam vizsgált hat vegyület közül a PK-175 szerkezete tűnik a legkedvezőbbnek a vér-agy gáton átjutó, alacsony toxicitással rendelkező szer fejlesztésére. Itt azonban fontos lenne vizsgálni, hogy a vér-agy-gát ABC efflux transzporterei, az ABCB1 (P-glikoprotein) és az ABCG2 fehérjék kipumpálják-e ezeket a vegyületeket a sejtekből, és így „semlegesítik”-e az OATP1A2 által történő fokozott felvételt. Ennek tisztázása további kísérleteket igényel.

A transzport gátlás és citotoxicitás kísérleteken kívül sikeresen kimutattam, hogy a pentamidin és analógjai feltehetően apoptózis kiváltásával pusztítják el a rájuk érzékeny sejteket, mely információ hasznos lehet a vegyületek hatásmechanizmusának megértése szempontjából.

5. Összefoglalás

A pentamidin az FDA (US Food and Drug Administration) által jóváhagyott parazita-ellenes szer. Elsősorban a *Trypanosoma brucei* okozta álmokor kezelésére használják, de alkalmazzák *Pneumocystis*, *Toxoplasma* és *Leishmania* fertőzések esetén is. A pentamidin hatékonyságát azonban limitálja, hogy nem jut át a vér-agy gáton, ezért az álmokor kezelésére csak a betegség korai fázisában alkalmas, amikor a kórokozó még nincs jelen a központi idegrendszerben. Emellett számos mellékhatása lehet, mint diabetes mellitus, súlyos hipoglikémia, sokk, szívizomgyulladás, vesekárosodás. További hátránya, hogy szájon át nem alkalmazható.

Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a pentamidin humán sejtekbe történő felvételét az Organikus anion transzporter polipeptid 1A2, OATP1A2 (gén név: SLCO1A2) képes elősegíteni. Az OATP1A2 egy solute carrier-típusú membránfehérje, amely szerves molekulák, többek között számos gyógyszer sejtbeli felvételét facilitálja. Munkám során a pentamidin hat analógjának kölcsönhatását teszteltem az OATP fehérjecsalád két tagjával, az OATP1A2 és OATP2B1 fehérjékkel, melyek többek között a vér-agy gát endothel sejtjeiben expresszálódnak, és a farmakokinetika fontos meghatározói.

Kísérleteim során a vegyületek transzporterekkel való kölcsönhatását a kutatócsoportunk által kifejlesztett fluoreszcens módszerekkel jellemeztem. Szintén vizsgáltam, hogy a vegyületek toxikusak-e a humán modell sejtekre és azt befolyásolja-e az OATP1A2 és OATP2B1 fehérjék jelenléte. Áramlási citometriával annexin V kötődés teszteket végeztem a toxikus vegyületek hatásmechanizmusának megértése érdekében.

Kísérleteim alapján a tesztelt vegyületek, a pentamidinhez hasonlóan, az OATP1A2 transzporter szelektív szubsztrátjai, amelyeket az OATP2B1 nem szállít. Eredményeim elősegítik az új antiparazita vegyületek *in vivo* sorsának előrejelzését, mint toxicitás, felszívódás és eloszlás, ezzel előmozdíthatják hatékonyabb gyógyszerek fejlesztését. A tesztelt vegyületek és az OATP1A2 közötti kölcsönhatásból pedig szerkezet-aktivitás összefüggéseket vonhatunk le, amelyek célzott OATP1A2 szubsztrátok vagy inhibitorok tervezését segítik elő.

6. Köszönetnyilvánítás

Nagyon szépen köszönöm témavezetőmnek, Dr. Laczka Csillának, hogy lehetőséget biztosított kutatómunkám elvégzésére, és munkámat szakértelmével, türelmével, segítőkész hozzáállásával támogatta.

Szintén nagy köszönettel tartozom konzulensemnek, Dr. Bakos Évának, akitől rengeteg segítséget kaptam a kísérletek elvégzése és a dolgozat megírása során, és mindig számíthattam rá.

A munkám során vizsgált vegyületeket Dr. Teresa Żołek (Varsói Orvostudományi Egyetem) bocsátotta rendelkezésünkre, amiért neki és csoportjának is köszönettel tartozom.

Továbbá szeretném megköszönni a Gyógyszerrezisztencia Kutatócsoport többi tagjának, hogy szükség esetén tanácsokkal láttak el munkám során.

7. Irodalomjegyzék

- Badagnani, I., Castro, R. A., Taylor, T. R., Brett, C. M., Huang, C. C., Stryke, D., Kawamoto, M., Johns, S. J., Ferrin, T. E., Carlson, E. J., Burchard, E. G., & Giacomini, K. M. (2006). Interaction of methotrexate with organic-anion transporting polypeptide 1A2 and its genetic variants. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(2), 521–529. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.104364>
- Bakos, É., Németh, O., Patik, I., Kucsma, N., Várady, G., Szakács, G., & Özvegy-Laczka, C. (2020). A novel fluorescence-based functional assay for human OATP1A2 and OATP1C1 identifies interaction between third-generation P-gp inhibitors and OATP1A2. *FEBS Journal*, 287(12), 2468–2485. <https://doi.org/10.1111/febs.15156>
- Basselin, M., Denise, H., Coombs, G. H., & Barrett, M. P. (2002). Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(12), 3731–3738. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.3731-3738.2002>
- Basselin, M., Lawrence, F., & Robert-Gero, M. (1996). Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. In *Biochem. J* (Vol. 315).
- Bell, C. A., Hall, J. E., Kyle, D. E., Grogl, M., Ohemeng, K. A., Allen, M. A., & Tidwell, R. R. (1990). Structure-Activity Relationships of Analogs of Pentamidine against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania mexicana amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(7), 1381–1386. [https://doi.org/https://doi.org/10.1128/aac.34.7.1381](https://doi.org/10.1128/aac.34.7.1381)
- Berger, M. L., Maciejewska, D., Vanden Eynde, J. J., Mottamal, M., Zabiński, J., Kaźmierczak, P., Rezler, M., Jarak, I., Piantanida, I., Karminski-Zamola, G., Mayence, A., Rebernik, P., Kumar, A., Ismail, M. A., Boykin, D. W., & Huang, T. L. (2015). Pentamidine analogs as inhibitors of [3H]MK-801 and [3H]ifenprodil binding to rat brain NMDA receptors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(15), 4489–4500. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.06.012>
- Bray, P. G., Barrett, M. P., Ward, S. A., & De Koning, H. P. (2003). Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: Past, present and future. In *Trends in Parasitology* (Vol. 19, Issue 5, pp. 232–239). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(03\)00069-2](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00069-2)
- Bronger, H., König, J., Kopplow, K., Steiner, H. H., Ahmadi, R., Herold-Mende, C., Keppler, D., & Nies, A. T. (2005). ABCC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. *Cancer Research*, 65(24), 11419–11428. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1271>
- Bronner, U., Douna, F., Ericsson, Ö., Gustafsson, L. L., Miézan, T. W., Rais, M., & Rombo, L. (1991). Pentamidine concentrations in plasma, whole blood and cerebrospinal fluid during treatment of *Trypanosoma gambiense* infection in Côte-d'Ivoire. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(5), 608–611. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0035-9203\(91\)90364-5](https://doi.org/10.1016/0035-9203(91)90364-5)
- Bronner, U., Gustafsson, L., Doua, F., Ericsson, O., Miezan, T., Rais, M., & Rombo, L. (1995). Pharmacokinetics and adverse reactions after a single dose of pentamidine in patients with *Trypanosoma gambiense* sleeping sickness. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 39(3), 289–295. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1995.tb04451.x>

- Carter, N. S., Berger, B. J., & Fairlamb, A. H. (1995). Uptake of diamidine drugs by the P2 nucleoside transporter in melarsen- sensitive and -resistant *Trypanosoma brucei brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(47), 28153–28157. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.47.28153>
- Cavalcanti, D. P., & De Souza, W. (2018). The kinetoplast of trypanosomatids: From early studies of electron microscopy to recent advances in atomic force microscopy. *Scanning*. <https://doi.org/10.1155/2018/9603051>
- Conte, J. E. (1991). Pharmacokinetics of Intravenous Pentamidine in Patients with Normal Renal Function or Receiving Hemodialysis. *The Journal of Infectious Diseases*, 163(1), 169–175. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/infdis/163.1.169>
- Conte, J. E., Upton, R. A., Phelps, R. T., Wofsy, C. B., Zurlinden, E., & Lin, E. T. (1986). Use of a Specific and Sensitive Assay to Determine Pentamidine Pharmacokinetics in Patients with AIDS. *The Journal of Infectious Diseases*, 154(6), 923–929. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/infdis/154.6.923>
- De Koning, H. P. (2001). *Uptake of Pentamidine in Trypanosoma brucei brucei is Mediated by Three Distinct Transporters: Implications for Cross-Resistance with Arsenicals*. 59(3), 586–592. <https://doi.org/https://doi.org/10.1124/mol.59.3.586>
- De Koning, H. P., & Jarvis, S. M. (1999). Adenosine transporters in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*: Substrate recognition motifs and affinity for trypanocidal drugs. *Molecular Pharmacology*, 56(6), 1162–1170. <https://doi.org/10.1124/mol.56.6.1162>
- De Koning, H. P., & Jarvis, S. M. (2001). Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by the P2 adenosine transporter and at least one novel, unrelated transporter. *Acta Tropica*, 80(3), 245–250. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(01\)00177-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0001-706x(01)00177-2)
- Donnelly, H., Bernard, E. M., Rothkotter, H., Gold, J. W. M., & Armstrong, D. (1988). Distribution of Pentamidine in Patients with AIDS. *The Journal of Infectious Diseases*, 157(5), 985–989. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/infdis/157.5.985>
- FDA CDER. (2020). *In Vitro Drug Interaction Studies-Cytochrome P450 Enzyme-and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry*. <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>
- Fox, K. R., Sansom, C. E., & Stevens, M. F. G. (1990). Footprinting studies on the sequence-selective binding of pentamidine to DNA. *FEBS*, 266(1), 150–154. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81527-U](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81527-U)
- Gao, B., Vavricka, S. R., Meier, P. J., & Stieger, B. (2015). Differential cellular expression of organic anion transporting peptides OATP1A2 and OATP2B1 in the human retina and brain: implications for carrier-mediated transport of neuropeptides and neurosteroids in the CNS. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 467(7), 1481–1493. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1596-x>
- Ginsburg, H., Krugliak, M., Eidelman, O., & Ioav Cabantchik, Z. (1983). New permeability pathways induced in membranes of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes.

- Molecular and Biochemical Parasitology*, 8, 177–190.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-6851\(83\)90008-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-6851(83)90008-7)
- Gorboulev, V., Ulzheimer, J. C., Akhoundova, A., Ulzheimer-Teuber, I., Karbach, U., Quester, S., Baumann, C., Lang, F., Busch, A. E., & Koepsell, H. (1997). Cloning and Characterization of Two Human Polyspecific Organic Cation Transporters. *DNA AND CELL BIOLOGY*, 16(7), 871–881.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1089/dna.1997.16.871>
- Hagenbuch, B., & Meier, P. J. (2004). Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: Phylogenetic classification as OATP/SLCO super-family, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 447(5), 653–665. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1168-y>
- Hagenbuch, B., & Stieger, B. (2013). The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), 396–412.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.009>
- ICH Committee for Medicinal Products for Human Use. (2022). *ICH Guideline M12 on drug interaction studies* EMA/CHMP/ICH/652460/2022.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m12-drug-interaction-studies-step-2b_en.pdf
- Kip, A. E., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H., & Dorlo, T. P. C. (2018). Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. In *Clinical Pharmacokinetics* (Vol. 57, Issue 2, pp. 151–176). Springer International Publishing.
<https://doi.org/10.1007/s40262-017-0570-0>
- Kobayashi, D., Nozawa, T., Imai, K., Nezu, J. I., Tsuji, A., & Tamai, I. (2003). Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(2), 703–708. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.051300>
- Kotthaus, J., Kotthaus, J., Schade, D., Schwering, U., Hungeling, H., Müller-Fielitz, H., Raasch, W., & Clement, B. (2011). New Prodrugs of the Antiprotozoal Drug Pentamidine. *ChemMedChem*, 6(12), 2233–2242. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201100422>
- Kovaacsics, D., Patik, I., & Özvegy-Laczka, C. (2016). The role of organic anion transporting polypeptides in drug absorption, distribution, excretion and drug-drug interactions. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 13(4), 409–424.
<https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1253679>
- Lee, W., Glaeser, H., Smith, L. H., Roberts, R. L., Moeckel, G. W., Gervasini, G., Leake, B. F., & Kim, R. B. (2005). Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): Implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9610–9617.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M411092200>
- Leuthold, S., Hagenbuch, B., Mohebbi, N., Wagner, C. A., Meier, P. J., & Stieger, B. (2009). Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296(3), 570–582.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00436.2008.-Organic>

- Li, L., Lee, T. K., Meier, P. J., & Ballatori, N. (1998). Identification of Glutathione as a Driving Force and Leukotriene C4 as a Substrate for oatp1, the Hepatic Sinusoidal Organic Solute Transporter*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(26), 16184–16191. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.16184>
- Li, L., Meier, P. J., & Ballatori, N. (2000). Oatp2 Mediates Bidirectional Organic Solute Transport: A Role for Intracellular Glutathione. *Molecular Pharmacology*, 58(2), 335–340. <https://doi.org/https://doi.org/10.1124/mol.58.2.335>
- Li, X. Q., Björkman, A., Andersson, T. B., Gustafsson, L. L., & Masimirembwa, C. M. (2003). Identification of human cytochrome P450s that metabolise anti-parasitic drugs and predictions of in vivo drug hepatic clearance from in vitro data. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 59(5–6), 429–442. <https://doi.org/10.1007/s00228-003-0636-9>
- Maciejewska, D., Zabinski, J., Kaźmierczak, P., Rezler, M., Krassowska-Świebocka, B., Collins, M. S., & Cushion, M. T. (2012). Analogs of pentamidine as potential anti-Pneumocystis chemotherapeutics. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.12.010>
- Maciejewska, D., Zabiński, J., Kaźmierczak, P., Wójciuk, K., Kruszewski, M., & Kruszewska, H. (2014). In vitro screening of pentamidine analogs against bacterial and fungal strains. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 24(13), 2918–2923. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.04.075>
- Maciejewska, D., Zabiński, J., Rezler, M., Kaźmierczak, P., Collins, M. S., Ficker, L., & Cushion, M. T. (2017). Development of highly active anti-Pneumocystis bisbenzamidines: Insight into the influence of selected substituents on the in vitro activity. *MedChemComm*, 8(10), 2003–2011. <https://doi.org/10.1039/c7md00445a>
- Meier, Y., Eloranta, J. J., Darimont, J., Ismail, M. G., Hiller, C., Fried, M., Kullak-Ublick, G. A., & Vavricka, S. R. (2007). Regional distribution of solute carrier mRNA expression along the human intestinal tract. *Drug Metabolism and Disposition*, 35(4), 590–594. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.013342>
- Ming, X., Ju, W., Wu, H., Tidwell, R. R., Hall, J. E., & Thakker, D. R. (2009). Transport of dicationic drugs pentamidine and furamidine by human organic cation transporters. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(2), 424–430. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.024083>
- Mukherjee, A., Padmanabhan, P. K., Sahani, M. H., Barrett, M. P., & Madhubala, R. (2006). Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in Leishmania donovani. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 145(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.08.016>
- Obaidat, A., Roth, M., & Hagenbuch, B. (2012). The Expression and Function of Organic Anion Transporting Polypeptides in Normal Tissues and in Cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 52, 135–151. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010510-100556>
- Özvegy-Laczka, C., Ungvári, O., & Bakos, É. (2023). Fluorescence-based methods for studying activity and drug-drug interactions of hepatic solute carrier and ATP binding cassette proteins involved in ADME-Tox. *Biochemical Pharmacology*, 209(115448). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115448>
- Patik, I., Székely, V., Német, O., Szepesi, Á., Kucsma, N., Várady, G., Szakács, G., Bakos, É., & Özvegy-Laczka, C. (2018). Identification of novel cell-impermeant fluorescent

- substrates for testing the function and drug interaction of Organic Anion-Transporting Polypeptides, OATP1B1/1B3 and 2B1. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20815-1>
- Sanderson, L., Dogruel, M., Rodgers, J., De Koning, H. P., & Thomas, S. A. (2009). Pentamidine movement across the murine blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers: Effect of trypanosome infection, combination therapy, P-glycoprotein, and multidrug resistance-associated protein. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 329(3), 967–971. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.149872>
- Satlin, L. M., Amin, V., & Wolkoff, A. W. (1997). Organic anion transporting polypeptide mediates organic anion/HCO₃⁻ exchange. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42), 26340–26345. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.42.26340>
- Schoenbach, E. B., & Greenspan, E. M. (1948). The Pharmacology, Mode of Action and Therapeutic Potentialities of Stilbamidine, Pentamidine, Propamidine and other Aromatic Diamidines - A Review. *Medicine (Baltimore)*, 27(3), 327–377. <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/00005792-194809000-00003>
- Sekhar, G. N., Georgian, A. R., Sanderson, L., Vizcay-Barrena, G., Brown, R. C., Muresan, P., Fleck, R. A., & Thomas, S. A. (2017). Organic cation transporter 1 (OCT1) is involved in pentamidine transport at the human and mouse blood-brain barrier (BBB). *PLOS ONE*, 12(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173474>
- Stead, A. M. W., Bray, P. G., Edwards, I. G., Dekoning, H. P., Elford, B. C., Stocks, P. A., & Ward, S. A. (2001). Diamidine Compounds: Selective Uptake and Targeting in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Pharmacology*, 59(5), 1298–1306. <https://doi.org/https://doi.org/10.1124/mol.59.5.1298>
- Székely, V., Patik, I., Ungvári, O., Telbisz, Á., Szakács, G., Bakos, É., & Özvegy-Laczka, C. (2020). Fluorescent probes for the dual investigation of MRP2 and OATP1B1 function and drug interactions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 151. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105395>
- Ungvári, O., Bakos, É., Kovacsics, D., & Özvegy-Laczka, C. (2023). The fluorescence-based competitive counterflow assay developed for organic anion transporting polypeptides 1A2, 1B1, 1B3 and 2B1 identifies pentamidine as a selective OATP1A2 substrate. *The FASEB Journal*, 37(11). <https://doi.org/10.1096/fj.202300530RR>
- Wang, P., Hata, S., Xiao, Y., Murray, J. W., & Wolkoff, A. W. (2008). Topological assessment of oatp1a1: a 12-transmembrane domain integral membrane protein with three N-linked carbohydrate chains. *Am J Physiol Gastro-Intest Liver Physiol*, 294, 1052–1059. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00584.2007.-Organic>
- WHO Expert Committee. (2010). *Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010, WHO Technical Report Series 949*. World Health Organization. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf;jsessionid=33D3D8B500CCA5ADBAE60D7F3AEECAD9?sequence=1
- WHO Expert Committee. (2023). *Web Annex A. World Health Organization Model List of Essential Medicines – 23rd List, 2023*. In: *The selection and use of essential medicines 2023: Executive summary of the report of the 24th WHO Expert Committee on the*

Selection and Use of Essential Medicines, 24 – 28 April 2023. Geneva: World Health Organization; 2023 (WHO/MHP/HPS/EML/2023.02). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
<http://apps.who.int/bookorders>.

- Wilson, W. D., Tanious, F. A., Mathis, A., Tevis, D., Hall, J. E., & Boykin, D. W. (2008). Antiparasitic Compounds That Target DNA. *Biochimie*, 90(7), 999–1014. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016%2Fj.biochi.2008.02.017>
- Windt, T., Tóth, S., Patik, I., Sessler, J., Kucsma, N., Szepesi, Á., Zdrazil, B., Özvegy-Laczka, C., & Szakács, G. (2019). Identification of anticancer OATP2B1 substrates by an in vitro triple-fluorescence-based cytotoxicity screen. *Archives of Toxicology*, 93(4), 953–964. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02417-6>
- Yorke, W. (1940). Recent Work on the Chemotherapy of Protozoal Infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 33(5), 463–476. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(40\)90029-3](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(40)90029-3)
- Zamek-Gliszczyński, M. J., Sangha, V., Shen, H., Feng, B., Wittwer, M. B., Varma, M. V. S., Liang, X., Sugiyama, Y., Zhang, L., & Bendayan, R. (2022). Transporters in Drug Development: International Transporter Consortium Update on Emerging Transporters of Clinical Importance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 112(3), 485–500. <https://doi.org/10.1002/cpt.2644>
- Zamek-Gliszczyński, M. J., Taub, M. E., Chothe, P. P., Chu, X., Giacomini, K. M., Kim, R. B., Ray, A. S., Stocker, S. L., Unadkat, J. D., Wittwer, M. B., Xia, C., Yee, S. W., Zhang, L., & Zhang, Y. (2018a). Transporters in Drug Development: 2018 ITC Recommendations for Transporters of Emerging Clinical Importance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 104(5), 890–899. <https://doi.org/10.1002/cpt.1112>
- Zamek-Gliszczyński, M. J., Taub, M. E., Chothe, P. P., Chu, X., Giacomini, K. M., Kim, R. B., Ray, A. S., Stocker, S. L., Unadkat, J. D., Wittwer, M. B., Xia, C., Yee, S. W., Zhang, L., & Zhang, Y. (2018b). Transporters in Drug Development: 2018 ITC Recommendations for Transporters of Emerging Clinical Importance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 104(5), 890–899. <https://doi.org/10.1002/cpt.1112>
- Żółek, T., Qile, M., Kaźmierczak, P., Bloothoof, M., Van Der Heyden, M. A. G., & Maciejewska, D. (2019). Drug-likeness of linear pentamidine analogues and their impact on the hERG K⁺ channel-correlation with structural features. *RSC Advances*, 9(66), 38355–38371. <https://doi.org/10.1039/c9ra08404e>