

# Drug Induced Phospholipidosis and Cationic Amphiphilic Drugs

## İlaçlar İle İndüklenen Fosfolipidozis ve Katyonik Amfifilik İlaçlar

Tuğçe BORAN<sup>1</sup>  
Ayşe Tarbin JANNUZZI<sup>1</sup>  
Buket ALPERTUNGA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,  
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı,  
Beyazıt 34116, İstanbul, Türkiye

**\*Corresponding Author:**  
Buket ALPERTUNGA  
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,  
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, 34116,  
Beyazıt, İstanbul, Türkiye.  
Phone: +90 212 440 02 70,  
E-mail: tunga@istanbul.edu.tr

Received date: 29.06.2017  
Accepted date: 20.10.2017

### ABSTRACT

Phospholipidosis is a lipid storage disorder and it is characterized by excessive accumulation of phospholipids in tissues such as liver, kidney, brain and lung. Accumulation of phospholipid in the cells leads to foamy cytoplasm, cytoplasmic vacuoles and lamellar bodies which are also used as important histopathological biomarkers of phospholipidosis. Cationic amphiphilic drugs (CADs) are known to have a potential for development of phospholipidosis. CADs have a hydrophobic ring structure and hydrophilic side chain which contains an amine group. Because of their hydrophobic structure, CADs can pass through the membranes easily and get trapped in the lysosomes thereby become cationic in the acidic environment of lysosomes. The mechanism and the functional effects of drug induced phospholipidosis are not fully understood. However, phospholipidosis is thought to be a toxic response due to a probable relationship between cell death and altered cell functions, and the development of phospholipidosis is considered as an adverse reaction.

**Key words:** Drug induced phospholipidosis, cationic amphiphilic drugs, drug adverse effects

### ÖZET

Fosfolipidozis bir lipid depo bozukluğudur ve karaciğer, böbrek, beyin ve akciğer gibi dokularda fosfolipidlerin aşırı birikimi ile karakterizedir. Hücrelerde fosfolipid birikimi fosfolipidozisin önemli histopatolojik biyobelirteçleri olarak da kullanılan köpüklü sitoplazmaya, sitoplazmik vakuollere ve lamellar cisimciklerin oluşmasına neden olur. Katyonik amfifilik ilaçlar (KAİ'lar)'ın fosfolipidozis geliştirme potansiyellerinin olduğu bilinmektedir. KAİ'lar hidrofobik bir halka yapısı ile amin grubu içeren hidrofilik bir yan zincire sahiptirler. Sahip oldukları hidrofobik yapı sayesinde membranları kolaylıkla geçerler ve lizozomların asit ortamında katyonik hale geçip lizozomlarda tutulurlar. İlaçlar ile indüklenen fosfolipidozisin fonksiyonel olarak nasıl bir etkiye neden olduğu ve mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak, fosfolipidozis ile değişmiş hücre fonksiyonları ve hücre ölümü arasında olası bir ilişki bulunması nedeniyle toksik bir yanıt oluşturduğu düşünülmekte ve fosfolipidozis gelişimi advers etki olarak kabul edilmektedir.

**Anahtar kelimeler:** İlaçlar ile indüklenen fosfolipidozis, katyonik amfifilik ilaçlar, ilaç advers etkileri

### 1. Giriş

Lizozomlar hücre sel subsellüler organeller olup, endozomal lizozomal sistemin bir parçasıdır. Sahip olduğu asidik pH ve bu pH'da aktivite gösteren enzimleri sayesinde hücre sel geri

dönüşüm merkezleri olarak görev alırlar [1]. 50'den fazla lizozomal enzim lipidlerin, fosfolipidlerin, glikolipidlerin, nükleik asit ve şekerlerin hücre içi yıkımından sorumludur [2]. Lizozomlarda membran geçirgenliğinin artması sonucunda lizozomal

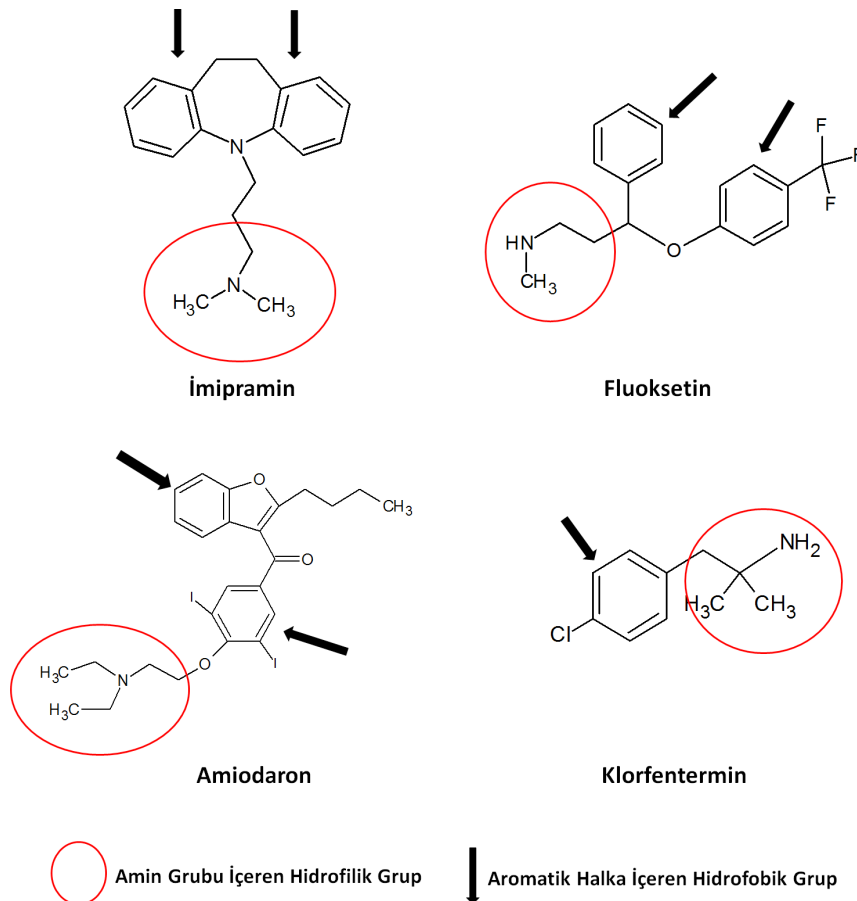
içeriğın özellikle katepsin proteazların sitozole salınması mitokondriyal apoptotik kaskadın yukarı yönde regülasyonuna ve nekroz gelişimine katkıda bulunur [3]. Ayrıca, lizozomlar birçok hastalık süreci, hücre ölümü, adaptif yanıt ile ilişkili olan otofaji yolağında otogazomlar ile birleşerek hücre içi makromoleküllerin ve organellerin degradasyonunda rol alırlar [4,5].

Fosfolipidozis, hücre lizozomlarında fosfolipidlerin aşırı birikmesi olarak tarif edilen bir lipid depo bozukluğudur. Nadir görülen lizozomal lipid depo bozuklukları olan Niemann Pick ve Tay-Sachs Hastalıkları'nda olduğu gibi fosfolipidozis genetik kökenli olabilir. Ayrıca çeşitli ilaçlar ve kimyasallar hücrel metabolizmayı bozarak fosfolipidozis gelişimine neden olabilirler [6,7]. 50'den fazla ilacın fosfolipidozise neden olduğu belirlenmiştir ve bu ilaçların çok büyük bir kısmı katyonik amfifilik ilaçlar (KAİ'lar) dır. Ancak, ilaçlarla indüklenen fosfolipidozis ve advers ilaç etkileri arasındaki ilişki tam olarak açıklanamamıştır [8].

## 2. Katyonik Amfifilik İlaçlar

Katyonik amfifilik yapıya sahip birçok ilaç hücrelerde fosfolipidozis oluşumunu indüklemektedir. KAİ'ların fi-

zikokimyasal özellikleri benzer olmakla beraber terapötik hedefleri farklılık göstermektedir. Yapılarında hidrofobik özellikte aromatik veya alifatik halka ve hidrofilik (amin) bir yan zincir bulunmaktadır [9]. Hidrofobik yapısı sayesinde membranlardan kolaylıkla geçerler ve ilaçların zayıf bazik yapıları lizozomlardaki asidik ortam sebebiyle protonize olur. Katyonik hale geçen ilaçlar lizozomlarda tutulurlar ve fosfolipaz aktivitesini inhibe ederek fosfolipid degradasyonunu azaltabilirler. KAİ'ler ile fosfolipidlerin bu şekildeki etkileşimi sonucu oluşan sindirilemeyen kompleksler fosfolipid yıkımının azalmasına neden olabilir. Teorik olarak, KAİ'ler lizozomlara endositoz, otofaji veya bir ilaç spesifik taşıyıcı aracılığı ile alınabilir, ancak pasif difüzyon KAİ'lerin lizozomlarda birikmesi için ana mekanizmadır. Ayrıca KAİ'lerin, fosfolipid ve kolesterol biosentezini artırdığını, lizozomal enzim transportunu bozduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [6,10-12]. Bu etkilere bağlı olarak, hücre siklusunda ve intraselüler transportta bozulmalar görülmektedir [11]. KAİ'lerin fosfolipidozisi indükleme süresi ilacın hedef dokuya afinitesine bağlı olarak birkaç günden birkaç aya kadar değişiklik gösterebilir [7]. Hücre kültürü modelleriyle yapılan çalışmalarda sadece saatler içinde fosfolipidozisin karakteristik özellikleri gösterilebilmiştir [9,13], (Şekil 1).



Şekil 1. Çeşitli katyonik amfifilik ilaçların yapısal formülleri

### 3. KAİ'ler Tarafından İndüklenen Fosfolipidozis-in Histopatolojik Özellikleri

KAİ'ler tarafından indüklenen fosfolipidozisin bazı temel özellikleri bulunmaktadır. Bunlardan ilki hücrelerde aşırı fosfolipid birikmesidir. Bunun sonucu olarak birçok hücre tipinde mikroskop altında köpüklü makrofajlar ve sitoplazmik vakuoller görülmektedir [6]. İkinci ve en önemli temel özelliği lamellar cisimciklerin oluşmasıdır. Ayrıca oluşan bu lamellar cisimciklerin elektron mikroskobu görüntüleri fosfolipidozisin patolojik ve morfolojik belirteci olarak kullanılmaktadır. Üçüncü olarak; fosfolipidozise neden olan ilacın veya metabolitin lizozomlarda birikmesi ve gelişen fosfolipidozisin ilaç kullanımı bırakıldığında geri dönüşümlü olmasıdır [14].

#### 3.1. Lamellar Cisimcikler

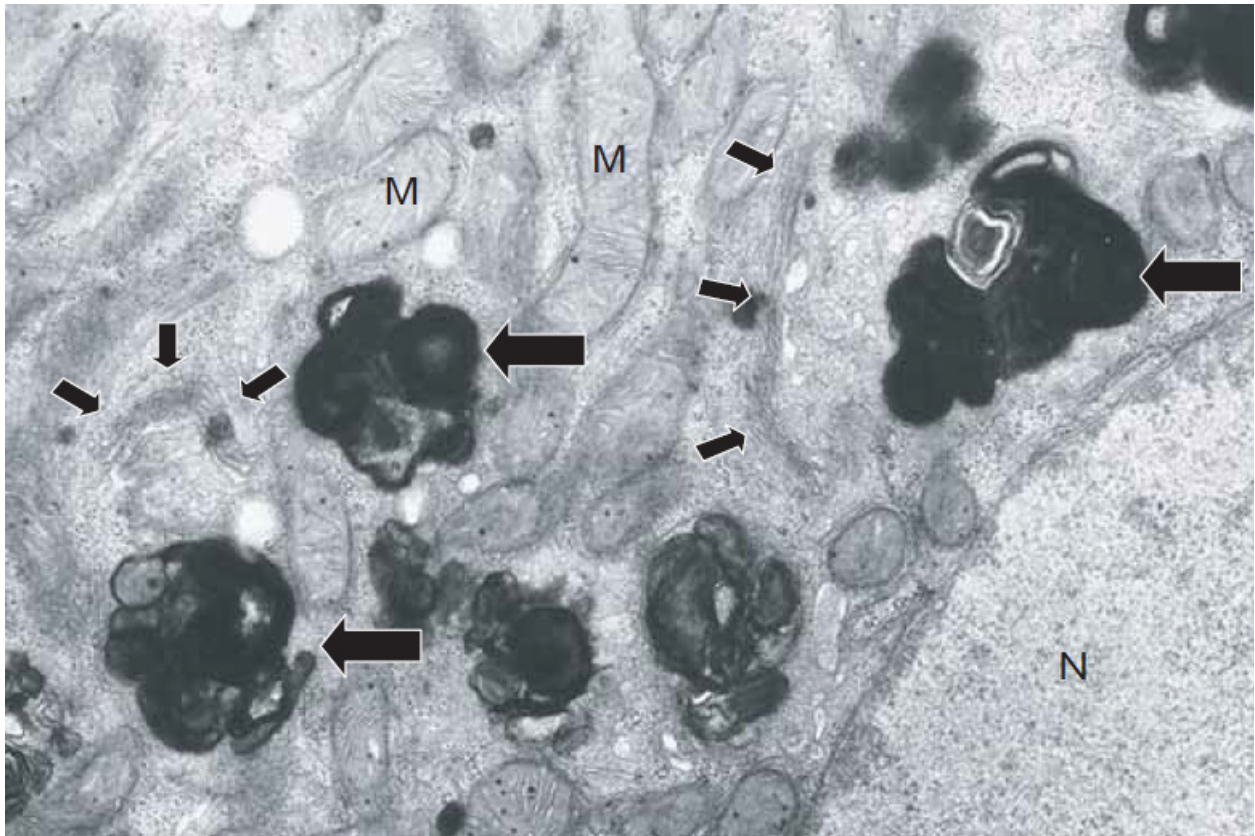
İlaç-fosfolipid komplekslerinin hücrelerde birikmesi sonucu lizozomal lamellar inklüzyon cisimcikleri, myeloid cisimcikler, multi-lamellenmiş cisimcikler, konsantr

olmuş cisimcikler, kıvrımlı ve membranöz sitoplazmik cisimcikler olarak da adlandırılan ultrastrüktürel lamellar cisimcikler oluşur. Fosfolipidozisin karakteristik özelliği olan bu cisimcikler oluştuğu dokularda transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) aracılığı ile görüntülenebilirler [14], (Şekil 2).

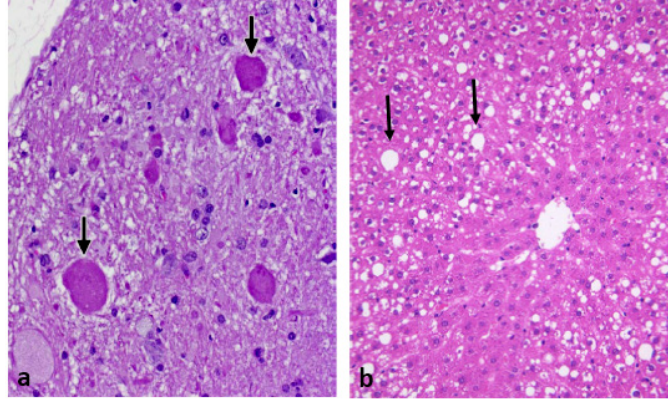
Lamellar cisimciklerin nasıl oluştuğu tam olarak bilinmemekle birlikte membran fizyonu veya trans-Golgi ağından tomurcuklanma ile çok tabakalı unilamellar vezikül yığınlarından köken aldığı öne sürülmüştür [8].

#### 3.2. Köpüklü Sitoplazma ve Sitoplazmik Vakuoller

İlk olarak 1948 yılında Nelson ve Fitzhugh tarafından klorokine maruz bırakılan sıçanların makrofajlarında soluk köpüklü hücreler saptanmıştır. Daha sonra bu durumun KAİ'lere maruziyet sonucu oluşan fosfolipidoziste genel yanıt olarak oluştuğu bildirilmiştir [15]. Ayrıca hücre sitoplazmalarında büyüklü küçük vakuol oluşumu ve bu vakuoller içeren hücre sayısında artış ile karakterizedir [6], (Şekil 3).



**Şekil 2.** Trospektomisin uygulanan sıçanlarda karaciğer TEM görüntüsü. Lamellar cisimcikler geniş oklarla, golgi aygıtları ince oklarla, mitokondri M, nukleus N ile gösterilmiştir [14].



**Şekil 3.** Köpüklü sitoplazma ve sitoplazmik vakuollerin hematoksilin/eozin ile boyanmış görüntüleri Şekil 3a. 12 ay süreyle 30 mg/kg Posakonazol'e maruz bırakılmış köpek medullası: Kesitte köpüklü ve yoğun eozonofilik materyal içeren genişlemiş aksonlar ok ile gösterilmiştir [16]. Şekil 3b. 29 gün süreyle 100 mg/kg Klomipramin'e maruz bırakılmış şıçan hepatositleri: Sitoplazmik vakuoller okla gösterilmiştir [17].

#### 4. Fosfolipidozisin Toksikolojik Açıdan Önemi

KAİ'lerin indüklediği fosfolipid birikimi sıklıkla akciğer, karaciğer, beyin, oküler dokular, kalp, adrenal bezler, hematopoitik doku ve dolaşımdaki lenfositlerde görülmektedir [7]. İlacın birikme bölgesi türe, dokulara veya hücrelere bağlı olarak değişiklik gösterebilir [18]. Fosfolipidozisin fonksiyonel olarak nasıl bir etkiye neden olduğu ve toksikolojik açıdan önemi tartışmalıdır. KAİ'ler ile indüklenen fosfolipidozisi organizmadaki bozulmuş hücresel veya dokusal işlev ile direkt olarak ilişkilendiren kesin kanıt bulunmamaktadır. Ancak, genel görüş ilaç aracılı fosfolipidozisin toksisiteye neden olduğu yönündedir. *In vitro* çalışmalar fosfolipidozisin lizozomal protein degradasyonunun bozulması, pinositoz ve endositozun azalması, serbest radikal oluşumunun artması, immün cevabın baskılanması gibi önemli hücresel disfonksiyonlara neden olduğunu göstermiştir [10,15]. Ayrıca KAİ'ler hücre membranlarını etkilemektedir ve bu özelliği fosforilasyon yolları, iyon transportu, diğer metabolik yollar gibi hücre fonksiyonu için önemli olan mekanizmalar ile ilişkilidir [7].

Lizozomda metabolize edilmemiş KAİ substratların birikimi hücrelerde lizozomal membran geçirgenliğini ve hücre içi trafikte kusurların yanı sıra hücre içi sinyalizasyonunda ve gen ekspresyonunda değişiklikler de dahil olmak üzere çeşitli olası zararlı sonuçlar doğurabilir. Ayrıca, hücresel homeostazın sağlanmasında lizozomal degradasyon yollarının çok önemli rolü vardır. Bu nedenle lizozomlarda fosfolipidozisin sonucu ortaya çıkan disfonksiyon birçok hastalık gelişimi ile ilişkili olabilir. Lizozomal disfonksiyon sonucunda otofagozomların ve otofaji substratlarının lizozomlar ile füzyonunun bloke olmasının otofajik yoldaki işlev bozuklarının nedeni olduğu düşünülmektedir [19].

Diğer bir görüş, fosfolipidozisin bir hücresel savunma

mekanizması olduğu yönündedir. Bu görüşe göre; hücreler ilacı lizozomal kompartmanlarda lameller fosfolipid cisimcikleri olarak biriktirir. Daha sonra bu lameller cisimcikler ekzositozla atılır ve makrofajlar tarafından temizlenir. Bu durum ilacın hücrede yaratabileceği aşırı oksidasyon, detoksifikasyon ve reaktif oksijen türleri oluşumunu önleyerek hücreleri stresten koruyan ve olası toksik etkilere engel olan adaptif bir yanıtır. Ancak bu birikimin lizozomlarda enzim aktivitesi inhibisyonu gibi sekonder etkilere neden olduğu ileri sürülmektedir [14].

#### 5. Fosfolipidozisin Oluşumunu İndükleyen Katyonik Amfilik İlaçlar

Piyasada bulunan KAİ'lerden 50'den fazlasının, vücutta bir veya birden fazla dokuda fosfolipidozisin gelişimine neden olduğu bilinmektedir. Bu KAİ'ler antidepressanlar, antibiyotikler, antimalaryaller, antiaritmikler, antihiperlipidemikler gibi pek çok farklı terapötik gruba aittirler. Fosfolipidozisin vücutta birçok dokuda gelişebilir, ancak geliştiği doku türden türe, ilacın fosfolipidlere olan afinitesine, biyokimyasal ve yapısal farklılıklarına göre değişiklik gösterir [7,18]. KAİ'lerden klinik olarak kullanımı bulunan, *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların sonucunda hücrelerde fosfolipidozisi indüklediği bildirilen ilaçlar, gruplarına göre Tablo 1'de ayrıntılı şekilde gösterilmiştir. Örneğin; SSRI grubuna ait Sitalopram *in vitro* ortamda [19] ve hayvanların böbrek ve akciğerlerinde [20] fosfolipidozise neden olurken, insanlarda böyle bir etki göstermez, ancak aynı gruptan Fluoksetin'in *in vitro* ortamda [11], hayvanlarda [21] ve insanlarda [22] fosfolipidozise neden olduğu raporlanmıştır. Gonzalez-Rothi ve ark. (1995) tarafından yayımlanan olgu raporunda Fluoksetin'den dolayı oluşan fosfolipidozisin ile beraber pulmoner alveolit bildirilmiş ve pulmoner alveolit ve fosfolipidozisin arasında nedensel bir ilişki olabileceğine dikkat çekilmiştir [22].



**Tablo 1.** İlaç ile indüklenen fosfolipidozise neden olduğu bildirilen ilaç grupları ve ilaçlar

<b>Fosfolipidozise Neden Olan İlaçlar</b>	<i>İn Vitro</i>	<b>Hayvan</b>	<b>İnsan</b>
<b>Anorektik</b>			
Klorfentermin		✓ (23-34)	
Fenfluramin		✓ (35)	
Kloforeks		✓ (36)	
<b>Antiaritmik</b>			
Amiodaron	✓ (11, 37)	✓ (38-44)	✓ (42, 45-51)
<b>Antianjinal</b>			
Perheksilin	✓ (11, 52)	✓ (53)	✓ (54)
4,4'-Dietilaminoetoksiheksazol		✓ (34, 55, 56)	✓ (57)
<b>Antibiyotik</b>			
Gentamisin	✓ (58)	✓ (28, 58-62,69)	✓ (63)
Azitromisin	✓ (64-66)		✓ (67)
Eritromisin		✓ (68, 69)	
Trimetoprim-Sulfametoksazol			✓ (70)
Amikasin	✓ (58)	✓ (58, 71)	✓ (63)
Netilmisin		✓ (59, 62)	
Neomisin		✓ (59)	
Tobramisin		✓ (59)	✓ (63)
Klindamisin		✓ (68)	
Trospektomisin		✓ (69, 72, 73)	
<b>Trisiklik Antidepresan</b>			
Klomipramin	✓ (11, 74)	✓ (25, 26, 34, 75-77)	
İmipramin	✓ (11, 74, 78)	✓ (25, 26, 53, 75, 77, 79-81)	
1-Kloro-Amitriptilin		✓ (33, 34, 53, 76)	
İprindol		✓ (26, 33, 34, 75-77)	
<b>Selektif Serotonin Geri Alım İnhibitörü (SSRI)</b>			
Fluoksetin	✓ (11)	✓ (21)	✓ (22)
Sitalopram	✓ (19, 74)	✓ (20)	
Sertralin	✓ (11)		
Zimelidin	✓ (11)	✓ (82)	
<b>Antipsikotik</b>			
Tiyoridazin	✓ (11)	✓ (75)	
Klorpromazin	✓ (11)	✓ (75, 83)	
Klozapin	✓ (11)		
<b>Antimikrobiyal</b>			
Pentamidin		✓ (84)	✓ (85)
<b>Antifungal</b>			
Posakonazol		✓ (16)	
Ketokonazol	✓ (11)	✓ (86, 87)	
<b>Antiestrojen</b>			
Tamoksifen	✓ (11)	✓ (88)	
<b>Statin</b>			
Atorvastatin			✓ (89)
Simvastatin			✓ (89, 90)
Rosuvastatin			✓ (89)
<b>Antimalaryal</b>			
Klorokin		✓ (34, 91-94)	✓ (95-98)
Hidroksiklorokin			✓ (99-101)
<b>Sekretolitik</b>			
Ambroksol		✓ (102, 103)	
Bromheksin		✓ (103, 104)	
<b>Antihistaminik</b>			
Klorsiklizin	✓ (11)	✓ (27, 105)	

Klorfentermin anorektik bir ilaçtır. Lüllmann-Rauch ve Reil. (1974) tarafından kobay, fare ve tavşanlar ile yapılan uzun süreli maruziyet çalışmalarında hayvanlarda köpüklü makrofajların görüldüğü, makrofajlarda ve diğer pulmoner hücrelerde, adrenal korteks hücrelerinde lamellar cisimlerin bulunduğu saptanmıştır [23]. Ayrıca sıçanlar ile yaptığı diğer iki çalışmada Klorfentermin'in nefronlarda ve böbrek toplayıcı sistemlerinde, göz pigment epitel hücrelerinde multilamellar sitoplazmik inklüzyonlara neden olduğunu bildirmişlerdir [25,26]. Gloster ve ark. (1976) Klorfentermin' in sıçanların akciğer ağırlıklarını arttırdığını ve bu ağırlık artışının akciğerlerde fosfolipid birikiminden kaynaklandığını raporlamışlardır [24].

Antiaritmik ilaç Amiodaron'un fosfolipidozis gelişimine neden olduğu *in vitro*, hayvan ve insan çalışmalarında bildirilmiştir. Fosfolipidozis oluşumu ile birlikte insanlarda keratopati, nefrotoksisite, nöropati ve hepatotoksisite, köpüklü makrofajların gözlendiği pulmoner toksisite, gelişimi raporlanmıştır [45-48]. Ayrıca insan hepatositlerinde fosfolipidozis [49,50], insan gözünde korneal, konjunktival ve lens epiteli, konjunktival fibrositler, konjunktival vasküler endotelde lizozom benzeri intra sitoplazmik inklüzyonlar içinde lipid birikimi [45] bildirilmiştir. Riva ve ark. (1987) sıçanlarda kan ve akciğerlerdeki Amiodaron konsantrasyonu arttıkça, akciğer hücrelerinde fosfolipid içeriğinin arttığını [39], Reasor ve ark. (1988) akciğer hücrelerinin lamellar cisimciklerle ve amorf, granüler, membranöz metaryallerle dolduğunu gözlemlemişlerdir [38].

Antimalaryal bir ilaç olan Klorokin'in insanlarda fosfolipidozis oluşumuna neden olduğu çok uzun zamandır bilinmektedir. Klorokin insanlarda kardiyotoksik, nefrotoksik etkiye sahiptir, bunun dışında retinopati ve myopatiye neden olduğu, bu toksik etkilerin fosfolipidozisle eş zamanlı görüldüğü raporlanmıştır. Klorokin'in insanlarda neden olduğu iskelet kası, kalp kası, böbrek hasarında ilacın bırakılmasından sonra düzelleme görülebildiği ve bu düzelmelerin myeloid cisimciklerin yok olması ile uyumlu olduğu söylenmektedir. İnsan ve hayvanlarda yapılan çalışmalar Klorokin' in retinada lamellar yapılara neden olduğunu göstermiştir, bu yapıların oluşmasını ganglion hücrelerinin ve fotoreseptörlerin kaybı izlemiştir. Klorokin'in neden olduğu oküler toksisitenin ilacın bırakılmasından sonra da devam ettiği kaydedilmiştir [95-98]. Başka bir çalışmada Klorokin verilen sıçanların akciğerlerinde ve en fazla alveolar makrofajlarda fosfolipid birikimi olduğu belirtilmiştir [93]. Hallberg ve ark. (1990) tarafından Klorokin'e maruz bırakılan farelerde nöroretina ve retinal pigment epitelyumu morfolojik ve biyokimyasal olarak incelenmiş, lizofosfatidilkolin hariçindeki fosfolipidlerde artış saptanmış, fosfolipidozisin morfolojik belirteçleri yalnızca nöroretinanın ganglion hücrelerinde gözlemlenmiştir [92]. Aynı gruba ait diğer bir ilaç olan Hidroksiklorokin'e maruz kalan insanlarda renal fosfolipidozis gelişimi bildirilmiştir [99-101].

Trisiklik antidepresanlardan İmipramin, Klomipramin ve İprindol'un fosfolipidozis gelişimine neden olduğunu bildiren çalışmalar literatürde mevcuttur. İmipramin ve Klomipramin'in *in vitro* ortamda [11,74,78], İmipramin, Klomipramin ve İprindol'un sıçan modeli ile yapılan çalışmalarda [26,75,77] fosfolipidozise neden olduğu gösterilmiştir. Sıçanların İmipramin'e maruziyeti sonucunda ilacın esas olarak pulmoner dokularda biraz da karaciğerde biriktiği, bu bölgelerde fosfolipidozise neden olduğu belirtilmiştir [79,80]. Geist ve Lüllmann-Rauch (1994) tarafından yapılan başka bir çalışmada İmipramin'in sıçan vajina ve uterus epitelinde lipidosise neden olduğu belirlenmiştir [81]. Sıçanlarla Klomipramin ve İmipramin'in gözün pigment epitelinde [25], İmipramin, klomipramin ve İprindol'un sıçanların pulmoner hücrelerinde, nefronlarında, böbrek toplayıcı kanallarında, hepatic hücrelerinde, lenfositlerle lameller sitoplazmik inklüzyon cisimcikleri oluşumuna neden olduğu, pulmoner hücrelerde ve karaciğer hücrelerinde köpüklü yapıların görüldüğü raporlanmıştır [26,75,77].

Aminoglikozid grubu antibiyotiklerin fosfolipidozis oluşturduğuna dair veriler literatürde mevcuttur. Dört gün süreyle Amikasin, Tobramisin veya Gentamisin kullanan hastaların böbrek dokularında erken lizozomal fosfolipidozis saptandığı raporlanmıştır [63]. Ayrıca, yapılan diğer çalışmalar Gentamisin'in sıçanların renal korteksinde fosfolipid miktarını artırdığı, alkalen fosfataz ve Na-K ATPaz enzim aktivitelerinde önemli derecede azalmaya neden olduğunu ortaya çıkarmıştır. Böbrek homojenatları ve lizozomal fraksiyonlar incelendiğinde total renal fosfolipid konsantrasyon artışı ve fosfolipaz C enzim inhibisyonu saptanmıştır [58-60]. Aynı ilaç grubundan Azitromisin kullanan 3995 insanda yapılan çalışmada, ilaç kullanımı ile fosfolipidozis gelişimi arasında bir ilişki olmadığı bildirilmiştir [67]. Ancak sıçan embriyo fibroblastları ile yapılan diğer bir çalışmada Azitromisinin ve Eritromisin'in fosfolipidozise neden olduğu raporlanmıştır [64]. Trimetoprim-sulfametoksazol kullanan bir hastada uzamış, ciddi kolestatik reaksiyon gelişmiş ve yapılan karaciğer biyopsisi sonucunda fosfolipidozisin karakteristik özelliği olan lizozomal inklüzyon cisimciklerinin görüldüğü raporlanmıştır [70].

Antimikrobiyal ajanlardan Pentamidin sıçanların hepatositlerinde lizozomal lamellar cisimciklerin oluşmasına ve fosfolipid içeriğinin artmasına neden olmuştur [84]. İmmunosupresif bir ilaç olan Sirolimus ile birlikte Pentamidin kullanan bir hastada Pentamidin'in Sirolimus'un neden olduğu akciğer toksisitesini artırdığı öne sürülmüştür [85].

Klinikte oldukça yaygın kullanımını olan statin grubu ilaçlardan Rosuvastatin, Simvastatin ve Atorvastatin'in insanlarda neden olduğu pulmoner toksisitenin fosfolipidozis ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir [89,90].

## 6. İlaç Geliştirme Aşamalarında Fosfolipidozis

Yeni ilaçların geliştirilmesinde molekülün potansiyel toksikolojik değerlendirilmesinin yapılması oldukça önemlidir. İlk aşamada yapı aktivite analizi ve biyoinformatik metodlar gibi in silico yöntemlerden yararlanılır.

Katyonik amfifilik ilaçlar, sahip oldukları amfifilik karakterleri sayesinde özellikle kan-beyin bariyeri olmak üzere biyolojik membranlardan kolaylıkla geçerler. KAI'lerin hidrofobik yapıları non iyonize halde plazma membranlarından geçişini veya plazma membranlarından penetre olmasını artırır, ayrıca membran reseptörleri ile etkileşimi kolaylaştırır. İyonize moleküller membranlar arasında kalmaya meyillidirler ve membranöz değişikliklere katkıda bulunurlar. KAI'lerin katyonik yapısı hücre membranı boyunca sodyum ve kalsiyum iyonlarının hareketini ve bu şekilde reseptör aracılı reaksiyonları etkileyebilir. Tüm bu özellikleri KAI'lerin güçlü farmakolojik aktivitede olmalarına katkı sağlarken fosfolipidozis geliştirme potansiyellerini de artırır. Bu nedenle ilaç geliştirilmesi esnasında ilaçların fosfolipidozis oluşturma potansiyelini belirlemede dikkat edilecek en önemli özellik kimyasal yapılarıdır [6].

Fosfolipidozisin ilaçların advers etkileri ile ilişkisi tam olarak açıklanmamış olsa da ilaç firmaları ilaç adaylarını modifiye ederek fosfolipidozis oluşturma potansiyellerinin önüne geçmeye çalışmaktadırlar [10,107]. Bu nedenle başarılı bir ilaç geliştirme süreci için ilaç geliştirilmenin erken aşamalarında fosfolipidozise neden olan ilaçların belirlenmesine olanak sağlayan metodların geliştirilmesi oldukça önemlidir.

İlaç ile indüklenen fosfolipidozisi öngörebilmek için geliştirilmiş Ploemen modeli [106], Tomizawa modeli [106], Pelletier modeli [107] ve Hanumegowda modeli [108] gibi bazı in silico modeller mevcuttur. Bu modeller ilaçların lipofilitesi (log P) veya iyonizasyon durumu (pKa) gibi fizikokimyasal özelliklerine dayanarak değerlendirme yapmaktadır [109]. Son yıllarda FDA, ilaçlarla indüklenen fosfolipidozise neden olan ve olmayan 700'den fazla ilacın yer aldığı bir veri tabanı oluşturmuştur. Bu veri tabanı ilaçların yapısal benzerlikleri ile fosfolipidozis oluşturma özellikleri arasındaki ilişkiyi araştırmak, katyonik amfifilik yapıda olmasından bağımsız bir şekilde fosfolipidozisi indükleyebilecek bileşiklerin belirlenmesine yardımcı olmak için hazırlanmıştır. 2008 yılında FDA bu veri tabanını kullanarak ilaçlarla indüklenen fosfolipidozi öngörebilmek için kantitatif yapı aktivite ilişkisi (QSAR) modellerini geliştirmiş ve 2012 yılında veri tabanındaki 743 bileşiği kullanarak QSAR modellerini güncelleştirilmiştir [110,111]. Bu modellerin geliştirilmesindeki amaç ilaç ile indüklenen fosfolipidozise neden olabilecek yeni ilaçların belirlenmesinde düzenleyici toksikoloji biliminin ihtiyaçlarını karşılamaktır [109].

## 7. Fosfolipidozisin Belirlenmesinde Kullanılabilir Biyobelirteçler

### 7.1. Işık ve Transmisyon Elektron Mikroskopisi (TEM)

Işık mikroskobu altında dokularda ve hücrelerde lipid birikimleri belirlenebilmektedir. Ancak lamellar cisimciklerin, köpüklü sitoplazma ve sitoplazmik vakuollerin görüntülenmesinde yeterli duyarlılığa sahip değildir. Bu nedenle TEM'in, fosfolipidozisin belirlenmesinde kullanılan en güvenilir ve hassas yöntem olduğu düşünülmektedir. Hücrelerde fosfolipid birikiminden dolayı oluşan myeloid cisimcikler, doku kesitlerinde, periferik kan hücrelerinde, idrar sedimentlerinde TEM kullanılarak görüntülenebilmektedir. Bu myeloid cisimcikler elektron mikroskopunda tek bir sınırlayıcı zar tarafından çevrelenmiş, elektron yoğunluğu yüksek, membranöz konsantrik tabakalar ile karakterizedir. Elektron mikroskobu, fosfolipidozisin saptanmasında önemli bir yöntem olmasına rağmen pahalı olması ve tekniğin yüksek verimli taramalara uygun olması gibi dezavantajları vardır [11,112,113].

### 7.2. Floresan Problar ve Lizozotropik Bileşikler

Nil kırmızısı (Nile Red), NBD-PE, LipidTOX gibi floresan boyalar fosfolipidozis belirlenmesinde kullanılabilir. Floresan işaretli fosfolipidler hücrelere ve lizozomlara pasif olarak alınır. Floresan boyaların hücrelerdeki kümülasyonu ile lamellar cisimciklerin miktarı korelasyon gösterir. Fosfolipidozis saptanmasında floresan boyaların yoğunluğu direkt olarak ölçülebileceği gibi akış sitometri yönteminde de yararlanılabilir. Ancak, bu yöntemlerin spesifikliği ve duyarlılığı tartışmalıdır [114].

LysoTracker Red, zayıf baza bağlı bir florofordur bu nedenle lizozom gibi asidik ortamlara kolayca girebilir. Ortamda diğer lipofilik bazik bileşiklerin ve katyonik amfifilik maddelerin bulunması durumunda LysoTracker Red, bu bileşiklerle yarışa girer sonuçta pH'tan bağımsız olarak boyanın floresan sinyalinde azalmaya neden olur. Floresan sinyalde azalmanın ölçülmesiyle fosfolipidozis saptanmaktadır. Ancak floresan boyadaki azalmanın tamamen lizozomlarda biriken bileşiklerle alakalı olmaması bu yöntemdeki en önemli dezavantajdır [13].

Ayrıca, floresan problar ve lizozotropik bileşiklerden, yüksek içerikli tarama yöntemi ile fosfolipidozisin belirlenmesinde yararlanılabilir [9,13,115].

### 7.3. Bismonoasilgiserolfosfat (BMP)

Lizobisfosfatidik asit (LBPA) olarak da bilinen bis (monogliserol) fosfat (BMP) lizozom membranının iç tarafında bulunan, lizozomal pH'ta eksi yüklü, lizozoma özgü bir fosfolipiddir. BMP'nin fosfolipidler arasında lizozomlarda sentezlenen tek fosfolipid olduğu düşünülmektedir. Ayrıca BMP'nin lizozomal membran dinamiğinin düzenlenmesinde ve lipid katabolizmasının gerçekleşmesinde önemli

fonksiyonları vardır [15,116]. Hücrenin lizozoma ihtiyacının arttığı durumlarda BMP miktarında artış görülmektedir. Ayrıca BMP'nin ilaç ile indüklenen fosfolipidoziste insan ve hayvan dokularında arttığı gösterilmiştir [57,117]. BMP, myeloid cisimciklerin ekzositozu ile dolaşıma salınması, kolesterol alımı süresince lipoproteinlerle birlikte taşınması nedeniyle fosfolipidoziste biyobelirteç olarak kullanılabilir. Plazma/serum ve idrarda monitöre edilebilebilen di-docosahexaenoyl (22:6) BMP (di-22:6-BMP)'nin non-klinik çalışmalarda fosfolipidozis oluşan insan ve hayvan dokularında güvenilir bir biyomarker olduğu ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır [112,117-119]. Ancak, fosfolipidozisin belirlenmesinde idrarda ölçülen di-22:6 BMP'nin serumdaki di-22:6 BMP'den daha doğru sonuç verdiği gösterilmiştir [119]. LC-MS analizi ile idrar (BMP) düzeyinin ölçülmesinin klinikte fosfolipidozisin belirlenmesinde kullanılabilir non-invazif bir biyomarker olduğu düşünülmektedir [120].

#### 7.4. Diğer yöntemler

Yeni yaklaşımlara göre, hücrelerde gen ekspresyonu seviyelerinde ve fosfolipaz enzim düzeylerinde meydana gelen değişikliklerden fosfolipidozisin saptanmasının mümkün olabileceği düşünülmektedir.

Abe ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada MDCK hücrelerinin Amiodaron'a maruziyeti sonucunda lizozomal fosfolipaz A2 (LPA2) enziminin substratlarında artış saptanmış ve fosfolipidozisin saptanmasında, fosfolipaz enzimlerinin inhibisyonun ölçülmesinin kullanılabilirliği düşünülmüştür [121]. Katyonik amfifilik yapıya sahip 33 kimyasalla yapılan başka bir çalışmada fosfolipidozis ile lizozomal fosfolipaz A1 (LPA1) inhibisyonu arasında korelasyon gösterilmiştir. Ancak analiz esnasında kullanılması gereken kimyasal madde miktarının çokluğu nedeniyle analiz maliyetinin yüksek olması bu yöntemin dezavantajıdır [6].

İlaçların gerek geliştirilme aşamasında gerekse klinikte kullanımı esnasında fosfolipidozise neden olup olmadığının saptanabilmesi için bazı toksikogenomik çalışmalar yapılmaktadır [17,122,123]. 2005 yılında Sawada ve ark. (2005) tarafından fosfolipidozis oluşturduğu bilinen 12 ilacın HepG2 hücrelerinde fosfolipidozis oluşturması TEM'de görüntülenerek skorlama yapılmış, daha sonra gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) ve DNA mikroarray analizi yapılmıştır. Sonuçta fosfolipidozis oluşturduğu bilinen 12 ilacın HepG2 hücrelerine maruziyeti sonucunda gen ekspresyon profilinin belirlenmesi ile fosfolipidozisin mekanizması ile ilgili daha fazla bilgi edinilmiş ayrıca fosfolipidozisin belirlenmesinde kullanılabilir 17 gen saptanmıştır [11]. Sawada ve ark. (2006) çalışmalarını geliştirmişler ve *in vitro* fosfolipidozisin belirlenmesinde HepG2 hücrelerinde daha yüksek verimli (higher-throughput) Array Plate bazlı metodunun qRT-PZR yerine kullanılabilirliği göstermişlerdir [124].

## 8. Sonuç

İlaçlar ile indüklenen fosfolipidozis hücrelerde ilaç ve fosfolipid birikimi ile karakterize bir durumdur. KAI'lerin fosfolipidozis oluşumuna neden olduğunu bildiren çalışmalar uzun yıllardır literatürde yer almaktadır. Ancak, ilaç aracılı toksik etki olduğu düşünülen fosfolipidozisin mekanizmasının, fonksiyonel ve toksik etkilerinin tam olarak bilinmemesi ilaç endüstrisinde ve klinikte önemli bir sorundur. İlaç endüstrisinde ilaç geliştirilen erken aşamalarında aday ilacın fosfolipidozise neden olup olmadığını saptamak için yüksek verimli çeşitli metodlar geliştirilmesine dair çalışmalar devam etmektedir. Ayrıca fosfolipidozisin klinikte hangi etkilere neden olduğu veya ilaçlara bağlı olarak oluşan toksik etkiler ile ilişkisinin bulunup bulunmadığının belirlenmesi için klinikte kullanılabilir biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

## Kaynaklar

1. Bagshaw RD, Mahuran DJ, Callahan JW: A proteomic analysis of lysosomal integral membrane proteins reveals the diverse composition of the organelle. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2005, 4(2):133-143.
2. Walkley SU: Pathogenic cascades in lysosomal disease-why so complex? *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2009, 32(2):181-189.
3. Aits S, Jäättelä M: Lysosomal cell death at a glance. *Journal of Cell Science* 2013, 126:1905-1912..
4. Ohsumi Y: Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001, 2(3):211-216.
5. Levine B: Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 2005, 120(2):159-162.
6. Nonoyama T, Fukuda R: Drug-induced phospholipidosis-pathological aspects and its prediction. *Journal of Toxicologic Pathology* 21(1):9-24.
7. Halliwell WH: Cationic amphiphilic drug-induced phospholipidosis. *Toxicologic Pathology* 1997, 25(1):53-60.
8. Anderson N, Borlak J: Drug-induced phospholipidosis. *FEBS Letters* 2006, 580(23):5533-5540.
9. van de Water F, Havinga J, Ravestloot W, Horbach G, Schoonen W: High content screening analysis of phospholipidosis: validation of a 96-well assay with CHO-K1 and HepG2 cells for the prediction of *in vivo* based phospholipidosis. *Toxicology In Vitro* 2011, 25(8):1870-1882.
10. Reasor MJ, Kacew S: Drug-induced phospholipidosis: are there functional consequences? *Experimental Biology and Medicine* 2001, 226(9):825-830.
11. Sawada H, Takami K, Asahi S: A toxicogenomic approach to drug-induced phospholipidosis: analysis of its induction mechanism and establishment of a novel *in vitro* screening system. *Toxicological Sciences* 2005, 83(2):282-292.
12. Ikeda K, Hirayama M, Hirota Y, Asa E, Seki J, Tanaka Y: Drug-induced phospholipidosis is caused by blockade of mannose 6-phosphate receptor-mediated targeting of lysosomal enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008, 377(1):268-274.
13. Nadanaciva S, Lu S, Gebhard DF, Jessen BA, Pennie WD, Will Y: A high content screening assay for identifying lysosomotropic compounds. *Toxicology In Vitro* 2011, 25(3):715-723.
14. Reasor MJ, Hastings KL, Ulrich RG: Drug-induced phospholipidosis: issues and future directions. *Expert Opinion on Drug Safety* 2006, 5(4):567-583.



15. Shayman JA, Abe A: Drug induced phospholipidosis: an acquired lysosomal storage disorder. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2013, 1831(3):602-611.
16. Cartwright ME, Petruska J, Arezzo J, Frank D, Litwak M, Morrissey RE, et al.: Phospholipidosis in neurons caused by posaconazole, without evidence for functional neurologic effects. *Toxicologic Pathology* 2009, 37(7):902-910.
17. Hirode M, Ono A, Miyagishima T, Nagao T, Ohno Y, Urushidani T: Gene expression profiling in rat liver treated with compounds inducing phospholipidosis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2008, 229(3):290-299.
18. Sadrich N, The regulatory challenge of drug-induced phospholipidosis. FDA Pharmaceutical Science and Clinical Pharmacology Advisory Committee meeting; Apr 14, 2010.
19. Hutchinson TH, Mahshid Y, Jönsson R, Björklund C, Kenne K: Proteomic analysis of phospholipidosis in citalopram treated U937 cells—support for the cholesterol biosynthesis hypothesis. *Toxicology In Vitro* 2008, 22(5):1198-1204.
20. Lüllmann-Rauch R, Nässberger L: Citalopram-induced generalized lipidosis in rats. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 1983, 52(3):161-167.
21. Wold JS, Joost RR, Griffing WJ, Marroquin F, Harris P: Phospholipid accumulation in rats produced by fluoxetine and chlorphentermine. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1976, 37:118-119.
22. Gonzalez-Rothi RJ, Zander DS, Ros PR: Fluoxetine hydrochloride (Prozac)-induced pulmonary disease. *CHEST Journal*. 1995, 107(6):1763-1765.
23. Lüllmann-Rauch R, Reil G-H: Chlorphentermine-induced lipidosislike ultrastructural alterations in lungs and adrenal glands of several species. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1974, 30(3):408-421.
24. Gloster J, Heath D, Hasleton P, Harris P: Effect of chlorphentermine on the lipids of rat lungs. *Thorax* 1976, 31(5):558-564.
25. Lüllmann-Rauch R: Retinal lipidosis in albino rats treated with chlorphentermine and with tricyclic antidepressants. *Acta Neuropathologica* 1976, 35(1):55-67.
26. Lüllmann-Rauch R: Lipidosislike renal changes in rats treated with chlorphentermine or with tricyclic antidepressants. *Virchows Arch B Cell Pathology* 1975, 18(1):51-60.
27. Kacew S: Alterations in newborn and adult rat lung morphology and phospholipid levels after chlorcyclizine or chlorphentermine treatment. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1982, 65(1):100-108.
28. Kacew S: Gentamicin or chlorphentermine induction of phospholipidosis in the developing organism: role of tissue and species in manifestation of toxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1985, 232(1):239-243.
29. Reasor MJ, Koshut RA: Augmentation in antioxidant defense mechanisms in rat alveolar macrophages following induction of phospholipidosis with chlorphentermine. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1980, 55(2): 334-341.
30. Reasor MJ, Walker ER: Recovery from chlorphentermine-induced phospholipidosis in rat alveolar macrophages: Morphological features. *Experimental and Molecular Pathology* 1981, 35(3):370-379.
31. Reasor MJ, Castranova V: Recovery from chlorphentermine-induced phospholipidosis in rat alveolar macrophages: Biochemical and cellular features. *Experimental and Molecular Pathology* 1981, 35(3):359-369.
32. Reasor MJ, Koshut RA, Castranova V: Biochemical characteristics of rat alveolar macrophages with chlorphentermine-induced phospholipidosis: Variations with increasing cell size. *Experimental and Molecular Pathology* 1979, 31(2):297-307.
33. Lüllmann-Rauch R: Lipidosis-like alterations in spinal cord and cerebellar cortex of rats treated with chlorphentermine or tricyclic antidepressants. *Acta Neuropathologica* 1974, 29(3):237-249.
34. Frisch W, Lüllmann-Rauch R: Differential effects of chloroquine and of several other amphiphilic cationic drugs upon rat choroid plexus. *Acta Neuropathologica* 1979, 46(3):203-208.
35. Lüllmann-Rauch R, Reil G-H: Fenfluramine-induced ultrastructural alterations in tissues of rats and guinea pigs. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1974, 285(2):175-184.
36. Ryrfeldt Å: Drug-induced inflammatory responses to the lung. *Toxicology Letters* 2000, 112-113:171-176.
37. Martin W, Kachel D, Vilen T, Natarajan V: Mechanism of phospholipidosis in amiodarone pulmonary toxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1989, 251(1): 272-278.
38. Reasor MJ, Ogle CL, Walker ER, Kacew S: Amiodarone-induced Phospholipidosis in Rat Alveolar Macrophages 1-3. *American Review of Respiratory Disease* 1988, 137:510-518.
39. Riva E, Marchi S, Pesenti A, Bizzi A, Cini M, Veneroni E, et al.: Amiodarone induced phospholipidosis biochemical, morphological and functional changes in the lungs of rats chronically treated with amiodarone. *Biochemical Pharmacology* 1987, 36(19):3209-3214.
40. Heath M, Costa-Jussa F, Jacobs J, Jacobson W: The induction of pulmonary phospholipidosis and the inhibition of lysosomal phospholipases by amiodarone. *British Journal of Experimental Pathology* 1985, 66(4):391-397.
41. Mortuza GB, Neville WA, Delaney J, Waterfield CJ, Camilleri P: Characterisation of a potential biomarker of phospholipidosis from amiodarone-treated rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2003, 1631(2):136-146.
42. Goldman I, Winkler M, Raper S, Barker M, Keung E, Goldberg H, et al.: Increased hepatic density and phospholipidosis due to amiodarone. *American Journal of Roentgenology* 1985, 144(3):541-546.
43. Delaney J, Neville WA, Swain A, Miles A, Leonard MS, Waterfield CJ: Phenylacetyl glycine, a putative biomarker of phospholipidosis: its origins and relevance to phospholipid accumulation using amiodarone treated rats as a model. *Biomarkers*. 2004, 9(3):271-290.
44. Ágoston M, Örsi F, Fehér E, Hagymási K, Orosz Z, Blázovics A, et al.: Silymarin and vitamin E reduce amiodarone-induced lysosomal phospholipidosis in rats. *Toxicology*. 2003, 190(3):231-241..
45. D'Amico DJ, Kenyon KR, Ruskin JN: Amiodarone keratopathy: drug-induced lipid storage disease. *Archives of Ophthalmology* 1981, 99(2):257-261.
46. Adams P, Holt D, Storey G, Morley A, Callaghan J, Campbell R: Amiodarone and its desethyl metabolite: tissue distribution and morphological changes during long-term therapy. *Circulation* 1985, 72(5):1064-1075.
47. Reasor MJ, McCloud CM, Beard TL, Ebert DC, Kacew S, Gardner MF, et al.: Comparative evaluation of amiodarone-induced phospholipidosis and drug accumulation in Fischer-344 and Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 1996, 106(1-3):139-147.
48. Marchlinski FE, Gansler TS, Waxman HL, Josephson ME: Amiodarone pulmonary toxicity. *Annals of Internal Medicine* 1982; 97(5):839-845.
49. Kleiner DE. Amiodarone-Induced Phospholipidosis. In: Ferrell LD, Kakar S (eds) *Liver pathology*. Demos Medical Publishing; New York, USA. 2011: pp 237-239.
50. Guigui B, Perrot S, Berry JP, Fleury-Feith J, Martin N, Métreau JM, et al.: Amiodarone-induced hepatic phospholipidosis: A morphological alteration independent of pseudoalcoholic liver disease. *Hepatology* 1988, 8(5):1063-1068.
51. Martin W, Standing J: Amiodarone pulmonary toxicity: biochemical evidence for a cellular phospholipidosis in the bronchoalveolar lavage of human subjects. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1988, 244(2):774-779.
52. Hauw J-J, Boutry J-M, Albouze S, Harpin M, Baudrimont M, Escourroule R, et al: Perhexiline maleate-induced lipidosis in cultured human fibroblasts: cell kinetics, ultrastructural and biochemical studies. *Virchows Arch B Cell Pathology* 1980, 34(1):239-249.

53. Yoshimura S, Hayashi Y: Ultrastructural alterations of peripheral ganglia in rats by phospholipidosis-inducing drugs (The 5th Meeting for the Study of Toxic Effect). *Journal of Toxicological Sciences* 1978, 3(3):249-250.
54. Pessayre D, Bichara M, Feldmann M, Degott C, Potet F, Benhamou JP: Perhexiline maleate-induced cirrhosis. *Gastroenterology* 1979, 76(1):170-177.
55. Felix A, Feuer G, McGuire EJ, Takada A: Morphological and biochemical changes in the liver of various species in experimental phospholipidosis after diethylaminoethoxyhexestrol treatment. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1975, 34(1):28-44.
56. Tashiro Y, Watanabe Y, Enomoto Y: Experimental phospholipidosis induced by 4, 4'-diethyl-aminoethoxyhexestrol. *Pathology International* 1983, 33(5): 929-942.
57. Yamamoto A, Adachi S, Ishikawa K, Yokomura T, Kitani T, Terushi N, et al.: Studies on drug-induced lipidoses. *The Journal of Biochemistry* 1971, 70(5):775-784.
58. Carlier M-B, Rollman B, Van Hoof F, Tulkens P: Mechanism of aminoglycoside-induced lysosomal phospholipidosis: in vitro and in vivo studies with gentamicin and amikacin. *Biochemical Pharmacology* 1982, 31(23):3861-3870.
59. Josepovitz C, Levine R, Farruggella T, Kaloyanides GJ: Comparative effects of aminoglycosides on renal cortical and urinary phospholipids in the rat. *Experimental Biology and Medicine* 1986, 182(1):1-5.
60. Kacew S: Cationic amphiphilic drug-induced renal cortical lysosomal phospholipidosis: an in vivo comparative study with gentamicin and chlorpheniramine. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1987, 91(3):469-476.
61. Giuliano RA, Paulus GJ, Verpooten GA, Pattyn VM, Pollet DE, Nouwen EJ, et al.: Recovery of cortical phospholipidosis and necrosis after acute gentamicin loading in rats. *Kidney International* 1984, 26(6):838-847.
62. Feldman S, Wang M, Kaloyanides G: Aminoglycosides induce a phospholipidosis in the renal cortex of the rat: an early manifestation of nephrotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1982, 220(3):514-520.
63. De Broe ME, Paulus GJ, Verpooten GA, Roels F, Buysens N, Wedden R, et al.: Early effects of gentamicin, tobramycin, and amikacin on the human kidney. *Kidney International* 1984, 25(4):643-652.
64. Van Bambeke F, Gerbaux C, Michot J-M, d'Yvoire MB, Montenez J-P, Tulkens PM: Lysosomal alterations induced in cultured rat fibroblasts by long-term exposure to low concentrations of azithromycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998, 42(6):761-767.
65. Liu Y, Kam WR, Ding J, Sullivan DA: One man's poison is another man's meat: using azithromycin-induced phospholipidosis to promote ocular surface health. *Toxicology* 2014, 320:1-5.
66. Van Bambeke F, Montenez J-P, Piret J, Tulkens PM, Courtoy PJ, Mingeot-Leclercq M-P: Interaction of the macrolide azithromycin with phospholipids. I. Inhibition of lysosomal phospholipase A1 activity. *European Journal of Pharmacology* 1996, 314(1-2):203-214.
67. Hopkins S: Clinical toleration and safety of azithromycin. *The American Journal of Medicine* 1991, 91(3):40-45.
68. Gray J, Purmalis A, Purmalis B, Mathews J: Ultrastructural studies of the hepatic changes brought about by clindamycin and erythromycin in animals. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1971, 19(2):217-233.
69. Cox JW, Ulrich RG, Larson PG, Cramer CT: Acute hepatocellular effects of erythromycin, gentamicin, and trospectomycin in the perfused rat liver: lack of correlation between lamellar body induction potency and cytotoxicity. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 1988, 62(5):337-343.
70. Muñoz SJ, Martínez-Hernández A, Maddrey WC: Intrahepatic cholestasis and phospholipidosis associated with the use of trimethoprim-sulfamethoxazole. *Hepatology* 1990, 12(2):342-347.
71. Toubeau G, Nonclercq D, Zanen J, Lambrecht P, Tulkens PM, Heuson-Stiennon J-A, et al.: Distribution of epidermal growth factor in the kidneys of rats exposed to amikacin. *Kidney International* 1991, 40(4):691-699.
72. Cox JW, Ulrich RG, Wynalda MA, McKenna R, Larsen ER, Ginsberg LC, et al.: Reversible, hepatic, lysosomal phospholipidosis in rat induced by subchronic daily administration of trospectomycin sulfate. *Biochemical Pharmacology* 1989, 38(20):3535-3541.
73. Ulrich RG, Petrella DK, Larsen ER, Cox JW, Cramer CT, Piper RC, et al.: Hepatic changes produced by 30-day administration of a novel aminocyclitol antibiotic, trospectomycin sulfate, to laboratory animals. *Fundamental and Applied Toxicology* 1990, 14(1):60-70.
74. Hansson AL, Xia Z, Berglund MC, Bergstrand A, Depierre JW, Nässberger L: Reduced cell survival and morphological alterations induced by three tricyclic antidepressants in human peripheral monocytes and lymphocytes and in cell lines derived from these cell types. *Toxicology In Vitro* 1997, 11(1-2):21-31.
75. Lüllmann-Rauch R: Lipidosis-like ultrastructural alterations in rat lymph nodes after treatment with tricyclic antidepressants or neuroleptics. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1974, 286(2):165-179.
76. Lüllmann-Rauch R: Lipidosis-like alterations in dorsal root ganglion cells of rats treated with tricyclic antidepressants. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1974, 283(2):219-222.
77. Lüllmann-Rauch R, Scheid D: Intraalveolar foam cells associated with lipidosis-like alterations in lung and liver of rats treated with tricyclic psychotropic drugs. *Virchows Arch B Cell Pathology* 1975, 19:255-268.
78. Palmeri S, Mangano L, Battisti C, Malandrini A, Federico A: Imipramine induced lipidosis and dexamethasone effect: morphological and biochemical study in normal and chronic GM2 gangliosidosis fibroblasts. *Journal of The Neurological Sciences*. 1992, 110(1-2):215-221.
79. Xia Z, Ying G, Hansson AL, Karlsson H, Xie Y, Bergstrand A, et al.: Antidepressant-induced lipidosis with special reference to tricyclic compounds. *Progress in Neurobiology*. 2000, 60(6):501-512.
80. Drew R, Siddik Z, Mimnaugh E, Gram T: Species and dose differences in the accumulation of imipramine by mammalian lungs. *Drug Metabolism and Disposition* 1981, 9(4):322-326.
81. Geist SH, Lüllmann-Rauch R: Experimentally induced lipidosis in uterine and vaginal epithelium of rats. *Annals of Anatomy* 1994, 176(1):3-9.
82. Bockhardt H, Lüllmann-Rauch R: Zimelidine-Induced Lipidosis in Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 1980, 47(1):45-48.
83. Kodavanti UP, Lockard VG, Mehendale HM: In vivo toxicity and pulmonary effects of promazine and chlorpromazine in rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 1990, 5(4):245-251.
84. Glaumann H, Bronner U, Ericsson Ö, Gustafsson L, Rombo L: Pentamidine accumulates in rat liver lysosomes and inhibits phospholipid degradation. *Pharmacology & Toxicology*. 1994, 74(1):17-22.
85. Filippone E, Carson J, Beckford R, Jaffe B, Newman E, Awsare B, et al.: Sirolimus-induced pneumonitis complicated by pentamidine-induced phospholipidosis in a renal transplant recipient: a case report. *Transplantation Proceedings* 2011; 43(7):2792-2797.
86. Whitehouse L, Menzies A, Mueller R, Pontefract R: Ketoconazole-induced hepatic phospholipidosis in the mouse and its association with de-N-acetyl ketoconazole. *Toxicology*. 1994, 94(1-3):81-95.
87. Pakuts A, Parks R, Paul C, Bujaki S, Mueller R: Ketoconazole-induced hepatic lysosomal phospholipidosis: the effect of concurrent barbiturate treatment. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 1990, 67(1):55-62.
88. Lüllmann H, Lüllmann-Rauch R: Tamoxifen-induced generalized lipidosis in rats subchronically treated with high doses. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1981, 61(1):138-146.
89. Huang L-K, Tsai M-J, Tsai H-C, Chao H-S, Lin F-C, Chang S-C: Statin-induced lung injury: diagnostic clue and outcome. *Postgraduate Medical Journal* 2013, 89:14-19.
90. Lantuejoul S, Brambilla E, Brambilla C, Devouassoux G: Statin-induced fibrotic non-specific interstitial pneumonia. *European Respiratory Journal* 2002, 19(3):577-580.

91. Matsuzawa Y, Hostetler KY: Inhibition of lysosomal phospholipase A and phospholipase C by chloroquine and 4,4-bis(diethylaminoethoxy)  $\alpha,\beta$ -diethyldiphenylethane. *The Journal of Biological Chemistry* 1980, 255:5190-5194.
92. Hallberg A, Naeser P, Andersson A: Effects of long-term chloroquine exposure on the phospholipid metabolism in retina and pigment epithelium of the mouse. *Acta Ophthalmologica*. 1990, 68(2):125-130.
93. Gräbner R, Meerbach W: Imipramine and chloroquine induced alterations in phospholipid content of rat lung. *Experimental Pathology* 1983, 24(4):253-259.
94. Matsuzawa Y, Hostetler KY: Studies on drug-induced lipodosis: subcellular localization of phospholipid and cholesterol in the liver of rats treated with chloroquine or 4, 4'-bis (diethylaminoethoxy) alpha, beta-diethyldiphenylethane. *Journal of Lipid Research* 1980, 21(2):202-214.
95. Jones C, Salisbury RS, Jayson M: The presence of abnormal lysosomes in lymphocytes and neutrophils during chloroquine therapy: a quantitative ultrastructural study. *Annals of The Rheumatic Diseases* 1984, 43:710-715.
96. Müller-Höcker J, Schmid H, Weiss M, Dendorfer U, Braun G: Chloroquine-induced phospholipidosis of the kidney mimicking Fabry's disease: case report and review of the literature. *Human Pathology* 2003, 34(3):285-289.
97. Bonanomi MT, Dantas NC, Medeiros FA: Retinal nerve fibre layer thickness measurements in patients using chloroquine. *Clinical & Experimental Ophthalmology* 2006, 34(2):130-136.
98. Roos JM, Aubry M-C, Edwards WD: Chloroquine cardiotoxicity: clinicopathologic features in three patients and comparison with three patients with Fabry disease. *Cardiovascular Pathology* 2002, 11(5):277-283.
99. Brealey J, Carroll R: Hydroxychloroquine-induced phospholipidosis in a renal transplant patient. *Ultrastructural Pathology* 2017, 41(1):124-125.
100. Costa R: Hydroxychloroquine, Renal phospholipidosis: case report. *Reactions* 2013, 1470(1):24.
101. Khubchandani SR, Bichle LS: Hydroxychloroquine-induced Phospholipidosis in a Case of SLE: The Wolf in Zebra Clothing. *Ultrastructural Pathology* 2013, 37(2):146-150.
102. Heath M, Jacobson W: The inhibition of lysosomal phospholipase A from rabbit lung by ambroxol and its consequences for pulmonary surfactant. *Lung* 1985, 163(1):337-344.
103. Von Wichert P, Bavendamm U, Von Teichmann M, Müller G, Thalheim E, Wilke A, et al.: Increased incorporation of fatty acids into phospholipids of lungs and livers of rabbits under the influence of bromhexine and ambroxol. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1977, 297(3):269-273.
104. Gil J, Thurnheer U: Morphometric evaluation of ultrastructural changes in type II alveolar cells of rat lung produced by bromhexine. *Respiration* 1971, 28(5):438-456.
105. Reasor M, Heyneman C, Walker E: Chlorcyclizine--induced pulmonary phospholipidosis in rats. *Research Communications In Chemical Pathology and Pharmacology* 1982; 38(2):235-246.
106. Ploemen J-PH, Kelder J, Hafmans T, van de Sandt H, van Burgsteden JA, Salemink PJ, et al.: Use of physicochemical calculation of pKa and CLogP to predict phospholipidosis-inducing potential: a case study with structurally related piperazines. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2004, 55(5):347-355.
107. Pelletier DJ, Gehlhaar D, Tilloy-Ellul A, Johnson TO, Greene N: Evaluation of a published in silico model and construction of a novel Bayesian model for predicting phospholipidosis inducing potential. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2007, 47(3):1196-1205.
108. Hanumegowda UM, Wenke G, Regueiro-Ren A, Yordanova R, Corradi JP, Adams SP: Phospholipidosis as a function of basicity, lipophilicity, and volume of distribution of compounds. *Chemical Research In Toxicology* 2010, 23(4):749-755.
109. Choi SS, Kim JS, Valerio LG, Sadrieh N: In silico modeling to predict drug-induced phospholipidosis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2013, 269(2):195-204.
110. Kruhlak NL, Choi SS, Contrera JF, Weaver JL, Willard JM, Hastings KL, et al.: Development of a phospholipidosis database and predictive quantitative structure-activity relationship (QSAR) models. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2008, 18(2-3):217-227.
111. Orogo AM, Choi SS, Minnier BL, Kruhlak NL: Construction and consensus performance of (q)sar models for predicting phospholipidosis using a dataset of 743 compounds. *Molecular Informatics* 2012, 31(10):725-739.
112. Liu N, Tengstrand EA, Chourb L, Hsieh FY: Di-22: 6-bis (monoacylglycerol) phosphate: a clinical biomarker of drug-induced phospholipidosis for drug development and safety assessment. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2014, 279(3):467-476.
113. Chatman LA, Morton D, Johnson TO, Anway SD: A strategy for risk management of drug-induced phospholipidosis. *Toxicologic Pathology* 2009, 37(7):997-1005.
114. Park S, Choi YJ, Lee BH: In vitro validation of drug-induced phospholipidosis. *The Journal of Toxicological Sciences* 2012, 37(2):261-267.
115. Bauch C, Bevan S, Woodhouse H, Dilworth C, Walker P: Predicting in vivo phospholipidosis-inducing potential of drugs by a combined high content screening and in silico modelling approach. *Toxicology In Vitro* 2015, 29(3):621-630.
116. Frederick TE, Chebukati JN, Mair CE, Goff PC, Fanucci GE: Bis (monoacylglycerol) phosphate forms stable small lamellar vesicle structures: insights into vesicular body formation in endosomes. *Biophysical Journal* 2009, 96(5):1847-1855.
117. Tengstrand EA, Miwa GT, Hsieh FY: Bis (monoacylglycerol) phosphate as a non-invasive biomarker to monitor the onset and time-course of phospholipidosis with drug-induced toxicities. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2010, 6(5):555-570.
118. Thompson KL, Haskins K, Rosenzweig BA, Stewart S, Zhang J, Peters D, et al.: Comparison of the diagnostic accuracy of di-22: 6-bis (monoacylglycerol) phosphate and other urinary phospholipids for drug-induced phospholipidosis or tissue injury in the rat. *International Journal of Toxicology* 2012, 31(1):14-24.
119. Thompson KL, Zhang J, Stewart S, Rosenzweig BA, Shea K, Mans D, et al.: Comparison of urinary and serum levels of di-22: 6-bis (monoacylglycerol) phosphate as noninvasive biomarkers of phospholipidosis in rats. *Toxicology Letters* 2012, 213(2):285-291.
120. Baronas ET, Lee J-W, Alden C, Hsieh FY: Biomarkers to monitor drug-induced phospholipidosis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007, 218(1):72-78.
121. Abe A, Hiraoka M, Shayman JA: A role for lysosomal phospholipase A2 in drug induced phospholipidosis. *Drug Metabolism Letters* 2007, 1(1):49-53.
122. Ceccarelli M, Germani R, Massari S, Petit C, Nurisso A, Wolfender J-L, et al.: Phospholipidosis effect of drugs by adsorption into lipid monolayers. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 2015, 136:175-184.
123. Yudate HT, Kai T, Aoki M, Minowa Y, Yamada T, Kimura T, et al.: Identification of a novel set of biomarkers for evaluating phospholipidosis-inducing potential of compounds using rat liver microarray data measured 24-h after single dose administration. *Toxicology* 2012, 295(1-3):1-7.
124. Sawada H, Taniguchi K, Takami K: Improved toxicogenomic screening for drug-induced phospholipidosis using a multiplexed quantitative gene expression ArrayPlate assay. *Toxicology In Vitro* 2006, 20(8): 1506-1513.